

Charakterystyka białek surowicy krwi rozdzielonych elektroforetycznie gęsi kubańskiej

SPIS TREŚCI

1. Wstęp i przegląd piśmiennictwa.....	4
1.1. Zastosowanie metod elektroforetycznych...	4
1.2. Polimorfizm DNA.....	9
2. Materiały i metody.....	14
2.1. Wykonanie roztworu żelu.....	15
2.2. Formowanie żelu.....	15
2.3. Dozowanie próbek.....	15
2.4. Elektroforeza.....	15
2.5. Przygotowanie roztworów buforowych.....	15
2.6. Utrwalanie.....	16
2.7. Suszenie.....	16
3. Wyniki i omówienie (opis frakcji).....	18
4. Dyskusja.....	36
5. Wnioski.....	38
Piśmiennictwo.....	39

1. WSTĘP I PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1.1 Zastosowanie metod elektroforetycznych.

Przeprowadzenie elektroforezy (np. surowicy krwi) pozwala określić liczbę występujących frakcji białkowych oraz prześledzić ich drogę wędrówki w nośniku. Proces rozdziału białek na poszczególne frakcje przeprowadza się między innymi na żelu poliakrylamidowym umieszczonym w polu elektrycznym.

Zjawisko elektroforezy, czyli ruchu naładowanych cząsteczek lub ich kompleksów względem nieruchomej cieczy pod wpływem przyłożonego napięcia wykorzystuje się od kilkudziesięciu lat zarówno w procesie izolowania jak i oczyszczania białek,

a także do ich identyfikacji, kontroli czystości, ilościowego oznaczenia, pomiaru ruchliwości i punktów izoelektrycznych (Rzeszotarska i Nowak, 1983).

Techniki elektroforetyczne znalazły szerokie zastosowanie w medycynie i farmacji. Obraz białek uzyskanych w wyniku rozdziału elektroforetycznego, przeprowadzonego na odpowiednim nośniku, pozwala stwierdzić obecność poszczególnych form białka u osobnika, a następnie określić częstość występowania tych form w populacji. Określenie modelu dziedziczenia frakcji pozwala przypisać im oznaczenie genetyczne. Klasyfikacja frakcji białek przyjmowana jest przez analogie z innymi gatunkami zwierząt (Smalec i in., 2000).

Metody elektroforezy zyskują na znaczeniu. Elektroforeza bibułowa mimo swych licznych wad jest w wielu przypadkach metodą niezastąpioną, szczególnie cenną w przeprowadzaniu identyfikacji produktów, rozkładu niektórych środków leczniczych, jak również rozdziału białek (Opieński-Blaauth, 1967).

Szerokie badanie elektroforetyczne w zakresie alkaloidów przeprowadzone w farmacji gdzie opracowano metody elektroforetycznego rozdziału alkaloidów pochodnych tropiny, alkaloidów opium, alkaloidów chinolinowych, Wiele uwag poświęcono również mieszaninom wieloskładnikowym. Elektroforetycznie rozdzielono atropinę od kodeiny i papaweryny; atropinę i kodeinę od bucyny; kodeinę, strychninę od piramidonu (Kretowicz, 1971).

Szerokie zastosowanie znalazła elektroforeza w badaniach antybiotyków, które pod względem elektroforetycznym zachowują się różnie. Jedne z antybiotyków reagują jak kationy inne jak aniony. Stwierdzono np. że penicylina G i erytromycyna przesuwają się do anody, podobnie zachowuje się sól potasowa penicyliny. Badano również elektroforetycznie chlorotetracyklinę, bacytracynę, cykloserynę, oleandomycynę i streptomycynę (Waksmudzki A, 1954).

Opracowano metodę elektroforetycznego wykrywania zanieczyszczeń ołowiem, cynkiem, miedzią i żelazem w preparatach farmaceutycznych (Kowalczyk K, 1958).

Wielkie praktyczne znaczenie uzyskała elektroforeza bibułowa w chemii klinicznej w zakresie diagnostyki leczenia chorych na gruźlicę, reumatyzm, przy zatruciu grzybami itd (Filipowicz, 1981). Wiele prac poświęcono zmianom frakcji białkowych w surowicy krwi kobiet z objawami rzucawki porodowej. Stwierdzono

również, że zakłócenie gospodarki hormonalnej w okresie ciąży i porodu wpływa na wyraźne zmiany we frakcjach białkowych surowicy krwi kobiet (Ostrowski, 1970).

Ze zjawiskami elektroforezy związane są takie pojęcia jak polimorfizm, białko surowicy krwi itp. Poniżej zamieszczono krótką charakterystykę poszczególnych terminów.

Polimorfizm - (wielopostaciowość) -zjawisko występowania więcej niż dwóch cech uwarunkowanych genetycznie - fenotypów w obrębie tej samej cechy (Leksykon tematów z zakresu genetyki i hodowli zwierząt, 1994). Słowo to składa się z dwóch członów i końcówki „poli” (z gr polys) znaczy wiele - rozmaite, dużo. Drugi z nich „morf” oznacza formę, kształt, budowę. Końcówka -izm sugeruje teorię systemu.

Elektroforeza - oznacza ruch cząsteczek fazy rozproszonej posiadających ładunek elektryczny względem fazy rozpraszającej pod wpływem przyłożonej różnicy potencjałów. Początkowo pod tą nazwą określano wędrówkę cząsteczek koloidalnych. Obecnie ta nazwa odnosi się również do wędrówki niektórych jonów w ośrodku rozpraszającym - jonoforeza (Szyszko, 1975).

Elektroforeza umożliwia określenie jedynie wielkości ładunku elektrycznego nie pozwala jednak oznaczyć liczby ładunków dodatnich lub ujemnych, którą określa się metodą elektromiareczkowania (Karpiak, 1975).

Elektroforeza jest techniką stosowaną przy rozdziale, analizie i oczyszczaniu kwasów nukleinowych i białek. DNA i RNA mają ładunek ujemny i zgodnie z tym ładunkiem, nadawanym przez grupy fosforanowe, migrują w polu elektrycznym w kierunku anody. Szybkość migracji zależy od wielkości i kształtu cząsteczki.

Schemat postępowania jest następujący: żel ulega zestaleniu w formie cienkiej płytki. W zastygłym żelu znajduje się szereg dołków, do których wprowadzane są próbki DNA oraz z reguły tzw. standard, czyli mieszaninę cząsteczek o znanych masach, dzięki czemu możliwa będzie później kalibracja żelu. Przed naniesieniem na żel do próbki dodano barwnik, który informuje nas o tym jak daleko zaszły najszybsze cząsteczki (co jest niezbędne, ponieważ DNA w żelu nie widać) oraz związek interkalujący - bromek etydydny, który fluoryzuje w świetle UV co pozwalający na zlokalizowanie prążków (Sixma i Wynberg, 1968). Minimalna ilość DNA, którą widać na żelu w postaci prążka to 20ng. a maksymalna 200ng. Żel

umieszczony zostaje w specjalnym aparacie do elektroforezy i zalewany buforem przewodzącym prąd.

Podłączony zostaje zasilacz generujący prąd o stałym i określonym napięciu i natężeniu. Jakość rozdziału fragmentów DNA zmniejsza się w miarę zwiększania napięcia w czasie elektroforezy. Do otrzymania optymalnej jakości stosuje się napięcie nie większe niż 5V na 1cm żelu. Kalibracja wielkości fragmentów cząsteczek w żelu wykorzystuje zasadę, że liniowe cząsteczki DNA migrują w żelu agarozowym z prędkością odwrotnie proporcjonalną logarytmu dziesiętnego ich masy cząsteczkowej wyrażonej w Daltonach lub w tysiącach par zasad, czyli kb. Kalibracja żelu polega na wykreśleniu krzywej zależności odległości przebytej w czasie elektroforezy przez poszczególne fragmenty od logarytmu masy cząsteczkowej (Berthilliera A, 1975).

Elektroforezę można przeprowadzać w żelach sztywnych lub denaturujących. Współcześnie stosowane nośniki obejmują agarozę lub poliakrylamid.

1. Żele agarozowe.

Metoda szybka, prosta, powszechnie stosowana. Zdolność rozdzielcza zależy od wielkości porów w żelu, których rozmiary są zdeteminowane przez stężenie agarozy. Żeli bardziej stężonych tj. 1,4% - 2,0% używa się do rozdziału cząsteczek mniejszych (0,5kb - 2,0kb). Żele mniej stężone 0,5% - 0,7% stosuje się do rozdziału cząsteczek większych (10kb - 20kb i więcej.). Zaletą może być niekiedy fakt, że podczas elektroforezy możliwe jest rozdzielenie cząsteczek o tej samej wielkości, ale zróżnicowanych pod względem kształtu. Doskonałym przykładem jest rozdział trzech różnych form plazmidu: CCC, liniowej i OC. Pierwsza najszybciej wędruje w żelu, druga wolniej, trzecia najwolniej.

2. Żele akrylamidowe.

Powstają przez polimeryzacje monomerów akrylamidu w długie łańcuchy z wytworzeniem wiązań poprzecznych przez bisakrylamid. Można regulować sieciowanie poprzez manipulację porcjami stężeń akrylamidu od bisakrylamidu. Do zajścia reakcji niezbędna jest obecność katalizatora (PERS- nadsiarczan potasowy) i związku inicjującego reakcję (TEMED). Żele te stosuje się przy rozdziale fragmentów o wielkości kilku par zasad (205 poliakrylamid) do tysiąca par zasad (3% poliakrylamid) a także przy rozdziale jednoniciowych cząsteczek DNA, np. do sekwencjonowania.

3. Żele denaturujące.

Ponieważ szybkość migracji w żelu jednoniciowym cząsteczek, zależy nie tylko od wielkości i ładunku, ale także w dużym stopniu od ich struktury przestrzennej (w przypadku dwuniciowych cząsteczek DNA nie ma to większego znaczenia), aby dokładnie określić ich wielkość należy wyeliminować różnice w szybkości migracji wywołane różną konformacją cząsteczki. Jest to szczególnie ważne w przypadku jednoniciowego RNA, które tworzy miejscowe struktury dwuniciowe. W tym właśnie celu stosuje się żele denaturujące, agarozowe lub poliakrylamidowe.

Najczęściej używanymi czynnikami denaturującymi są; formaldehyd i glikosol w żelach agarozowych (przy analizie preparatów RNA) lub w żelach poliakrylamidowych (przy analizie jednoniciowych fragmentów DNA).

Elektroforeza w polu pulsacyjnym jest stosowana do rozdzielania dużych cząsteczek DNA – od 2.104bp do 107bp czyli od 20kb do 10Mb. Można w ten sposób rozdzielić całe chromosomy np. drożdżowe. Pole elektryczne jest wyłączone w krótkich odstępach czasu. Kiedy pole elektryczne jest włączone cząsteczki migrują zgodnie ze swoją wielkością, a gdy zostanie wyłączone mają tendencję do relaksacji i zwijania. Następnie kierunek pola elektrycznego jest zmieniany od 90 lub 180 stopni w stosunku do poprzedniego. Dłuższe cząsteczki zaczynają się poruszać wolniej niż krótsze. Powtarzające się zmiany kierunku pola stopniowo powodują rozdzielenie (Ostrowski W. 1970).

- W zależności od kierunku poruszania się cząsteczek obdarzonych ładunkiem pod wpływem pola elektrycznego mamy do czynienia z tak zwaną:
- anaforezą – jeśli cząsteczki posuwają się w kierunku anody,
- kataforezą – jeśli poruszają się w stronę katody (Szyszko 1975).

W zależności od rodzaju roztworu elektroforezę dzielimy na:

- elektroforeza ruchomej granicy (elektroforeza czołowa),
- elektrodekontakcja (elektroforeza konwekcyjna),
- elektroforeza z wymuszonym przepływem,
- elektroforeza kurtynowa (odchyleniowa).

W zależności od rodzaju nośnika gdzie przebiega elektroforeza dzielimy ją :

- elektroforeza w nośnikach kapilarnych i porowatych (np. elektroforeza na

- bibule, elektroforeza na folii acetylocelulozowej),
- elektroforeza żelowa (np. na żelu skrobiowym, poliakrymidowym).

W zależności od buforu wykorzystywanego przy elektroforezie dzielimy ją na:

- izotachoforezę,
- immunoelektroforezę (Rzeszutarska i Nowak 1983).

Wśród stosowanych systemów analizy DNA wyróżnia się metodę fingerprinting. Genomowy DNA wyizolowany z jąder komórkowych różnych tkanek podawany jest trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Fragmenty tak „pociętego” DNA podaje się elektroforezie w żelu agarowym. Rozdzielone fragmenty przenoszone są na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy, wg metody Southerna i hybrydyzowane. W wyniku hybrydyzacji otrzymuje się od osobnika wiele prążków, będących fizyczną reprezentacją sygnału od odpowiednio oznakowanej sondy, co jest związane z allelami loci na wszystkich chromosomach. Liczba i położenie prążków są charakterystyczne dla każdego osobnika (Zawadzka i Jaszcak Przegląd hodowlany 8/200).

Liczba stron	38
Nazwa Szkoły Wyższej	Akademia Podlaska w Siedlcach
Rodzaj pracy	magisterska
Rok oddania	2001

To jest gotowa, obroniona praca. Gdyby chcieli Państwo zlecić napisanie zupełnie nowej pracy, to zapraszamy na stronę [pisanie prac](#) - sprawdzony serwis!