

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261027

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 13 06 86
(21) PV 4391-86.L

(51) Int. Cl.⁴

C 08 F 20/60//
G 01 N 27/26

(40) Zveřejněno 15 06 88

(45) Vydáno 14 04 89

(75)

Autor vynálezu

WIESNER IVO ing., Ústí nad Labem

(54) Způsob přípravy polyakrylamidového gelu zejména pro elektroforezu

Řešení se týká oboru polymerů a analytické chemie. Je řešen technický problém přípravy polyakrylamidových gelů pro elektroforezu. Podstatou řešení je provedení polymerace 3,5 až 28% roztoku akrylamidu a N,N'-bis-methylenakrylamidu v molárním poměru 1 ku 0,01 až 0,05 v přítomnosti dihydrátu hydrosiřičitanu sodného a methylenové modři působením persíranu draselného nebo amonného. Řešení může být využito při přípravě gelů pro elektroforetická dělení polypeptidů, proteinů a jiných nabitých částic obecně.

Vynález se týká způsobu přípravy polyakrylamidového gelu zejména pro elektroforetické dělení.

V rámci základního i aplikovaného výzkumu biologických systémů nalézá široké použití elektroforetické dělení polypeptidů, bílkovin, enzymů a jiných elektricky nabitých částic. Dělení se provádí obvykle ve vrstvě vodného gelu na bázi agaru, agaroz, škrobů, modifikované celulózy nebo polymerního akrylamidu. Relativně nejlepší výsledky dělení se dosahují zejména na polyakrylamidových gelech sítěných např. N,N'-bis-methylenakrylamidem. Tento gel se připraví bez větších nesnází i v laboratorních podmínkách, je dostatečně mechanicky pevný a lze na něm dosáhnout vyhovujícího dělicího efektu. Závažným nedostatkem je však kolísavá kvalita gelu připravovaného podle stávajícího stavu metodiky radikálovou polymerací nejčastěji působením persíranu a sloučenin obsahujících terciární dusík. Částečně lze uvedené potíže snížit užíváním vysoce čistých složek polymeračního systému, ale hlavní příčina nedostatečné reprodukovatelnosti - inhibice polymerace vzdušným kyslíkem - zůstává.

Současný stav techniky nezná způsob dosažení takové reprodukovatelnosti kvality gelu, která je pro elektroforetické dělení nezbytná (vyjma polymerace v inertním prostředí, která je však technicky velmi náročná).

Na základě experimentálních prací jsme našli nový způsob přípravy polyakrylamidového gelu, který výše uvedené nedostatky způsobené difuzí vzdušného kyslíku vylučuje a dovoluje připravovat gely pro elektroforetické dělení s velmi dobrou reprodukovatelností. Způsob přípravy polyakrylamidového gelu podle vynálezu spočívá v tom, že 3,5 až 28% vodný roztok směsi 100 hmotnostních dílů akrylamidu a N,N'-methylen-bis-akrylamidu v molárním poměru 1 ku 0,01 až 0,05 se mísí s 1,0 až 10,5 hmotnostními díly 0,5% roztoku methylenové modři a přidávkem pufru obsahujícího 0,1 až 0,4% N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu se pH roztoku upraví na 8 až 9, načež se na roztok působí 0,4 až 1,0% roztokem hydrosiřičitanu sodného do odbarvení. K bezbarvému roztoku se přidá 0,2 až 0,6 hmotnostních dílů práškového dihydrátu hydrosiřičitanu sodného, načež se na homogenní roztok působí 500 hmotnostními díly persíranu draselného nebo amonného o koncentraci 0,1 až 0,5%.

Při pokojové teplotě proběhne polymerace do stadia gelu nejdéle do pěti minut a plné hustoty polymerní sítě dosáhne po 2 až 12 hodinách, závisle na teplotě.

Způsob podle vynálezu poskytuje velmi dobře reprodukovatelnou kvalitu gelů, což lze nejlépe dokázat vlastním elektroforetickým dělením. Aplikace jiných redox systémů polymerace akrylamidu, jako na příklad persíran-siřičitan, persíran-sirnatán atd. se způsobu polymerace podle vynálezu dosaženým technickým účinkem nevyrovnají. Redox systém podle vynálezu je při přípravě vodných gelů vysoce reaktivní a souběžně vylučuje nežádoucí efekt kyslíkové inhibice polymerace, který se v případě ostatních iniciačních systémů nekontrolovaně a nereprodukovatelně uplatňuje se známými důsledky. Použitý barevný indikátor dovoluje precizní kontrolu redox potenciálu polymeračního prostředí, jehož porušení se okamžitě projeví zmodráním. Význačnou výhodou způsobu podle vynálezu je skutečnost, že po skončení polymerace je v gelu dosažena opět více méně fyziologická hodnota redox potenciálu prostředí vlivem nestability hydrosiřičitanu. Nežádoucí látky (elektricky nabitě) se snadno odstraní elektroforezou bez vzorku, tzv. "pre-run".

Mezi neméně významné výhody uváděného způsobu patří i dosahované ostřejší dělení látek s velmi dobrou reprodukovatelností.

P ř í k l a d

Předem se připraví tyto čisté roztoky:

roztok A:

28,0 g akrylamidu a 0,735 g N,N'-metylen-bis-akrylamidu ve 100 ml deionisované vody, udržuje se při teplotě 0 až 4 °C.

roztok B:

36,6 g tris-(hydroxymethyl)aminomethan a 200 µl N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu se rozpustí v 40 ml deionisované vody, 1N HCl se pH roztoku upraví na 8,9 a deionisovanou vodou roztok doplní do celkového objemu 100 ml.

roztok C:

200 mg dihydrátu hydrosiřičitanu sodného ve 25 ml deionisované vody.

roztok D:

100 mg persíranu draselného v 50 ml deionisované vody.

Postup:

Smíchá se 6 ml roztoku A se 3 ml roztoku B a ředí se 10 ml deionisované vody. Roztok se obarví 1 kapkou 0,5% roztoku methylenové modři a za míchání se přikapává roztok C do odbarvení, načež se k bezbarvému roztoku přidá 7 mg práškového dihydrátu hydrosiřičitanu sodného a po rozpuštění 5 ml roztoku D. Krátce se míchá a reakční směs se nalévá do prostoru elektroforetické desky či trubičky. Po 2 až 5 minutách roztok přechází do gelu, načež se nechá při 25 °C 12 hodin dozrát.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy polyakrylamidového gelu, zejména pro elektroforezu, redoxní polymerací akrylamidu a N,N'-bis-methylenakrylamidu ve vodném prostředí v přítomnosti pufru vyznačený tím, že 3,5 až 28% vodný roztok směsi 100 hmotnostních dílů akrylamidu a N,N'-bis-methylenakrylamidu v molárním poměru 1 ku 0,01 až 0,05 se mísí s 1,0 až 10,5 hmotnostními díly 0,5% roztoku methylenové modři a přidavkem pufru obsahujícího 0,1 až 0,4% N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu se pH roztoku upraví na 8 až 9, načež se na roztok působí 0,4 až 1,0% roztokem hydrosiřičitanu sodného do odbarvení, k bezbarvému roztoku se přidá 0,2 až 0,6 hmotnostních dílů práškového dihydrátu hydrosiřičitanu sodného, načež se na homogenní roztok působí 500 hmotnostními díly persíranu draselného nebo amonného o koncentraci 0,1 až 0,5% do ukončení polymerace.