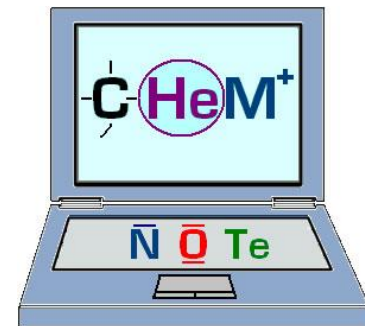




Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

ELEKTROFORÉZA

- ***K čemu to je?***
 - kritérium čistoty preparátu
 - stanovení molekulové hmotnosti makromolekul
 - stanovení izoelektrického bodu
- většinou analytická metoda, čili ne pro separaci čistých proteinů naveliko (ale existuje i preparativní elektroforéza)

ELEKTROFORÉZA

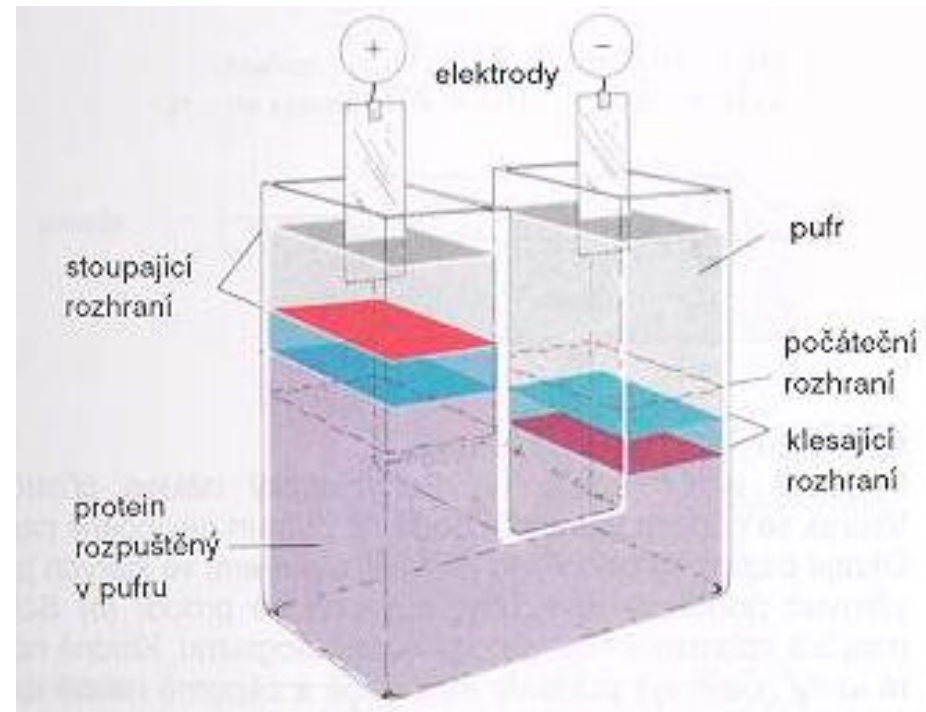
- techniky využívající pohyb ionizovaných částic v elektrickém poli
- rychlost pohybu iontu v elektrickém poli závisí na
 - intenzitě elektrického pole
 - poměru náboje iontu k jeho velikosti
 - odporu prostředí
- 3 základní techniky provedení (s řadou dalších modifikací)
 - volná elektroforéza (s pohyblivým rozhraním)
 - zonová elektroforéza (na nosičích)
 - izoelektrická fokusace a izotachoforéza (rovnovážná elektroforéza)

EFEKTIVNÍ MOBILITA

- tzv. **efektivní mobilita** (skutečná při reálném experimentu) je obvykle nižší než teoretická a závisí na řadě dalších faktorů
 - teplota (resp. viskozita prostředí, ve kterém elektroforéza probíhá)
 - pH roztoku (většina separovaných molekul jsou slabé kyseliny nebo zásady - s pH se mění jejich náboj a tím i mobilita)
 - koncentrace použitého pufru (iontová síla roztoku ovlivňuje pohyblivost iontů)
 - „poloměr iontu“ – u většiny biopolymerů těžko zjistitelný faktor, nicméně je jasné, že čím větší molekula, tím nižší pohyblivost)
 - u elektroforéz na nosiči řada dalších faktorů (porozita nosiče, interakce iontů s nosičem a další)
- **k rozdělení látek při elektroforéze dojde jen tehdy, mají-li dostatečně odlišnou efektivní elektroforetickou pohyblivost**

VOLNÁ ELEKTROFORÉZA

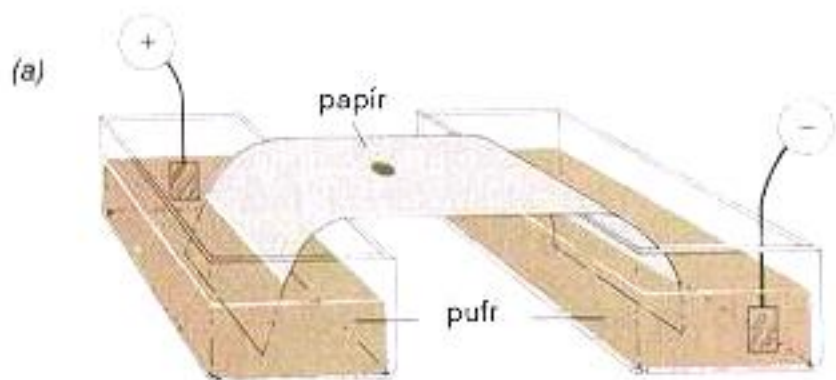
- roztok proteinů v trubici tvaru U, na obou koncích převrstvený pufr bez proteinů, vložením elektrod do pufru se molekuly proteinů začnou pohybovat k elektrodám s opačnou polaritou a rozdělí se na základě rozdílných nábojů a koeficientů tření – vzniknou pohyblivá rozhraní mezi jednotlivými druhy proteinů
- historicky první metoda, řada nevýhod (konvekční míchání zón, mnoho vzorku)



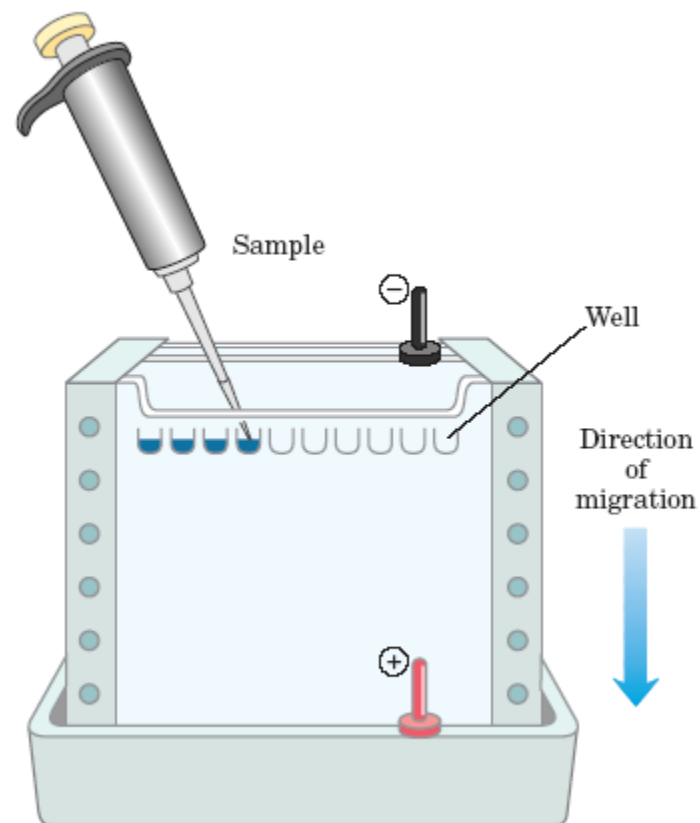
ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

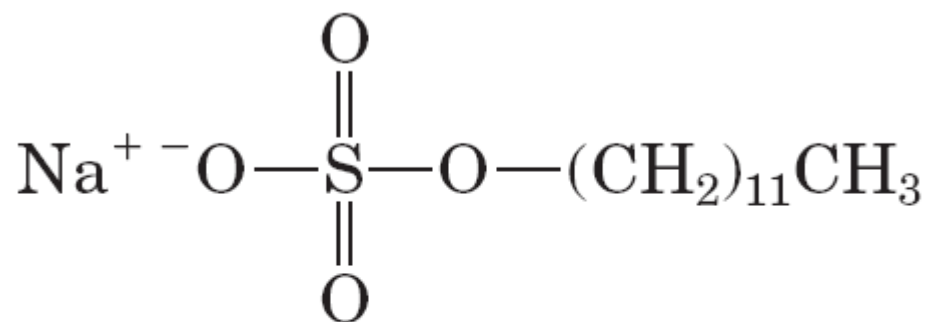
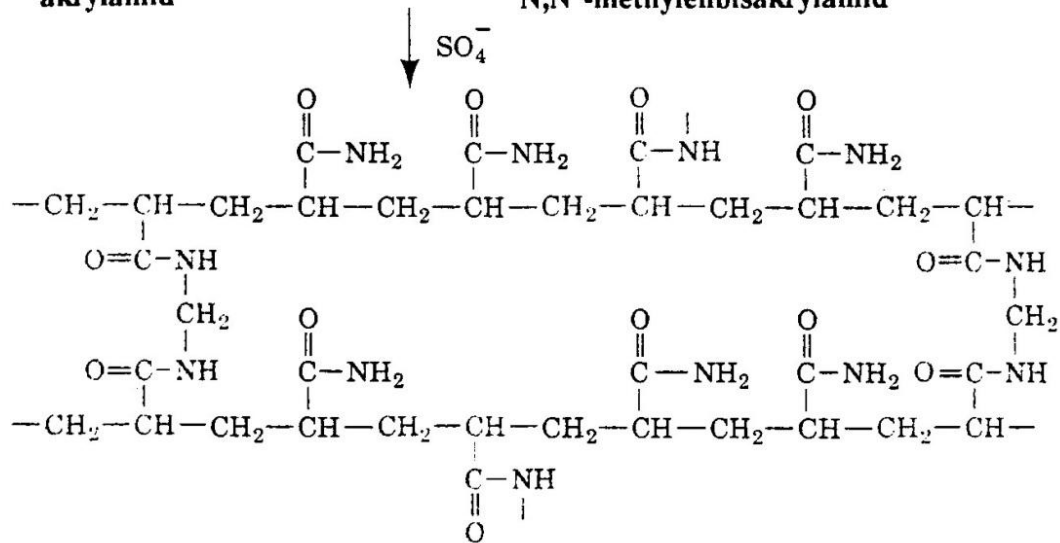
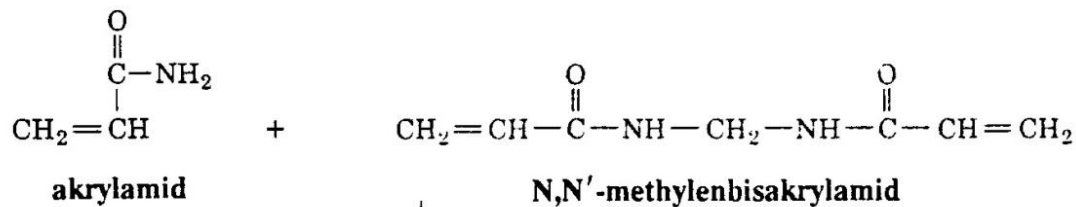
- elektroforéza na nosiči, jako je filtrační papír, celulóza, různé typy gelů (agarosa, polyakrylamid)
- výrazné omezení konvekčního míchání, lepší rozdělení, méně vzorku
- *elektroforéza na celulóze*
 - vzorek ve formě kapky se nanáší na pruh filtračního papíru navlhčeného roztokem pufru, konce se ponoří do oddělených elektrodových prostorů
 - pohyb iontu je v rozhodující míře závislý na poměru náboje k velikosti částice
 - zdánlivá podobnost s papírovou chromatografií, ale tam je dělení dáno polaritou molekul
- *elektroforéza v gelu*
 - porózní gely umožňují separaci na principu molekulového síta a zároveň elektroforetická pohyblivost
 - na rozdíl od gelové filtrace se velké molekuly zpožďují za malými

papírová elektroforéza



gelová elektroforéza



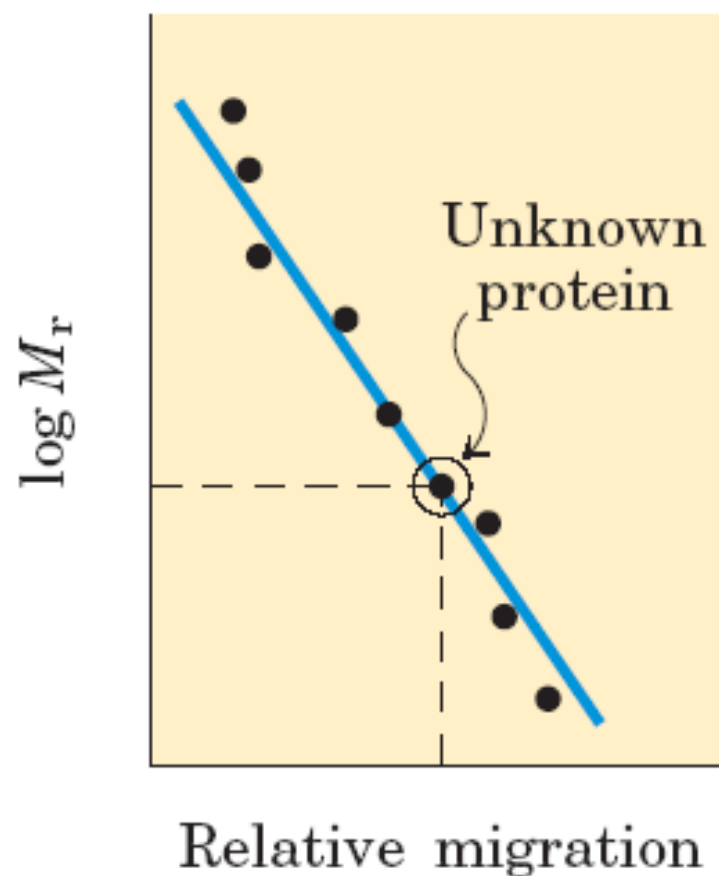
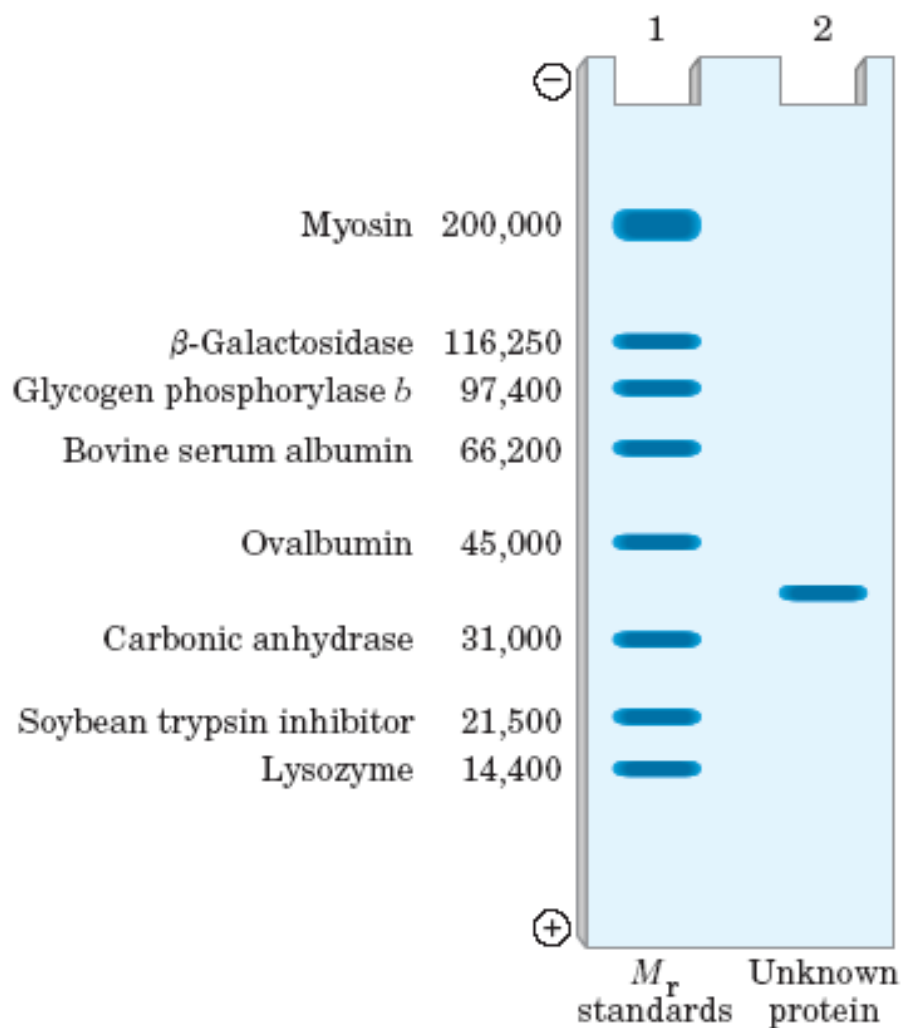


Sodium dodecyl sulfate
(SDS)

ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

- PAGE – kontinuální či diskontinuální uspořádání (koncentrace gelu, pH, iontová síla)
 - zaostřovací gel : nepohyblivějším aniontem je chloridový, následují zóny bílkovin a poslední je glycin, při konstantní hodnotě intenzity proudu se seřazené zóny pohybují stejnou rychlostí, dochází ke vzniku ostře ohraničených za sebou těsně následujících zón iontů, protože rychlost pohybujících se zón je konstantní, vytváří se stupňovitý gradient potenciálu – vzniká samozaostřující efekt. Zpozdí-li se některý ion za „svou“ zónou, ocitne se v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho okamžitě urychlí tak, aby dohnal svou zónu (a naopak)
 - dělicí gel : má vyšší hodnotu pH než rozdělovací, glycin se stává druhým nepohyblivějším iontem + různá pohyblivost v gelové matici – dochází k dělení
- SDS PAGE
- pulsní gelová elektroforéza DNA
 - 0,1% agarosa nejkřehčí použitelná, rozdělení jen do 100 kbp

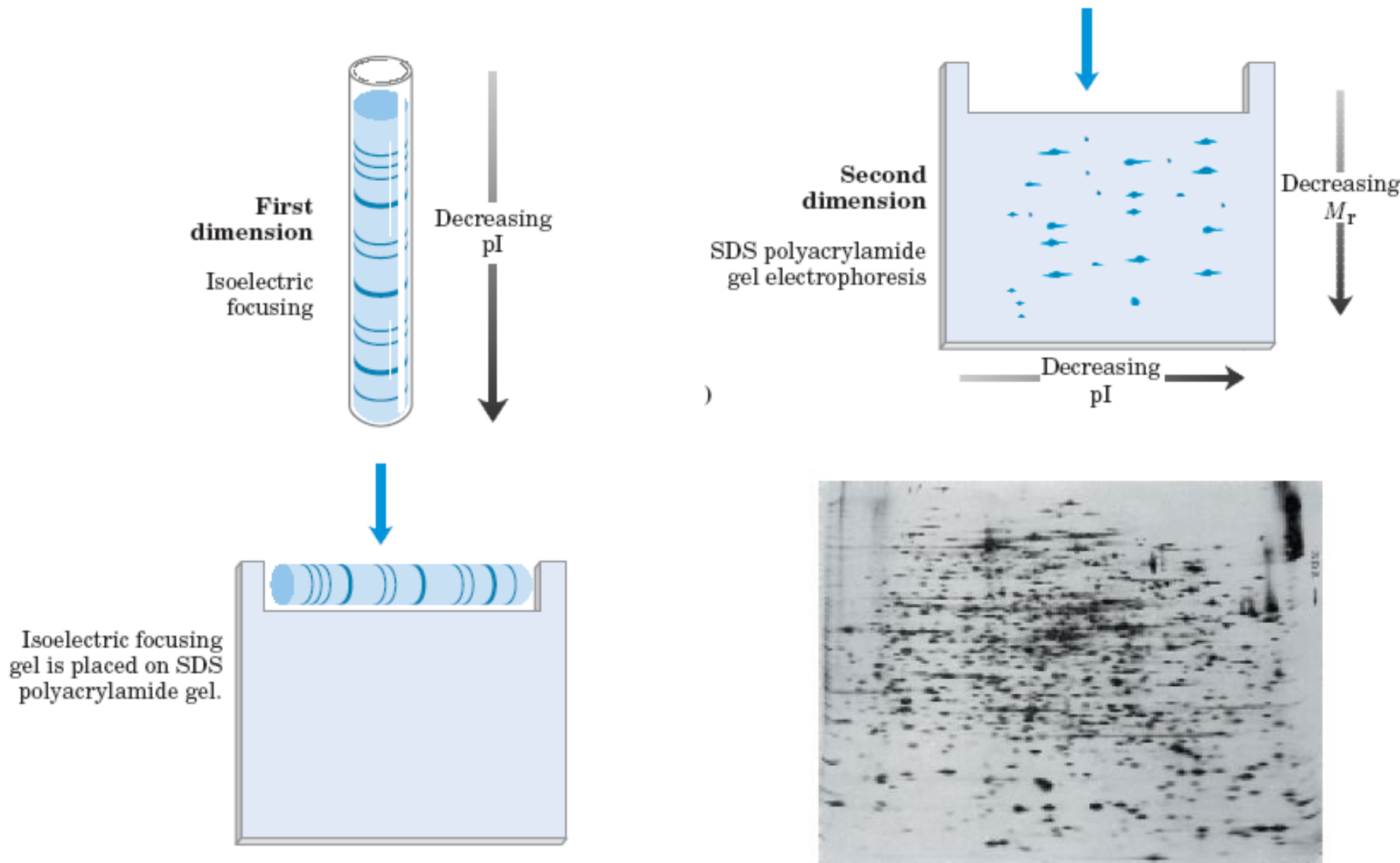
Odhad molekulové hmotnosti proteinu pomocí SDS PAGE



ROVNOVÁŽNÁ ELEKTROFORÉZA

- IEF – izoelektrická fokusace je diskontinuální elektroforéza v prostředí gradientu pH
 - gradient se vytváří sám (amfolyt – směs peptidů o různém pI), pH se snižuje od katody k anodě
 - proteiny putují do místa odpovídající jejich pI s přesností 0,001 jednotky pH
- dvourozměrná elektroforéza, afinitní elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza



DETEKCE PO ELEKTROFORÉZE

- proteiny
 - Coomassie modř (R-250, G-250) v roztoku methanolu a kyseliny octové (fixace, komplex barvivo-protein)
 - barvení stříbrem – vyšší citlivost (0,1 ng) – redukce stříbrného iontu na kovové stříbro formaldehydem v alkalickém prostředí
 - stanovení aktivity (enzymy)
 - Western blot – přenesení proteinů na nitrocelulosovou nebo polyvinylidenfluoridovou membránu a následná vizualizace (Ponceau S, amidočerň, **imunodetekce**)
- DNA
 - ethidium bromid či jiná fluorescenční barviva
 - barvení stříbrem
 - Southern blot

Southern blot s radiodetekcí

