

ELEKTROFORÉZA

enzymů a neenzymatických bílkovin

- Do konce 50. let genetická proměnlivost v populacích studována pouze na základě mendelovských morfologických znaků nebo polytenních chromozomů → otázka, do jaké míry tyto jevy reprezentují skutečnou míru genetické proměnlivosti v přírodě
- substituce aminokyselin (možno zjistit sekvencováním proteinů - to ale problematické):
z 20 AA 3 nesou kladný náboj (Arg, Lys, His), 2 záporný náboj (Asp, Glu)
- elektroforéza: z řečtiny = transport pomocí elektřiny
obecně = pohyb nabitých částic v médiu vlivem elektrického pole
- kromě náboje i velikost a konformace makromolekuly (-S-S- můstky, van der Waalovy síly, vodíkové vazby, elektrostatické síly); pH pufru
- stabilizace el. náboje - specifický pufr s vysokou iontovou silou a pH co nerozdílnější od pI daného proteinu: pH 3-10, nejčastěji 6,5-9,5
- náboj většiny proteinů při pH 8-9 záporný → migrace k anodě

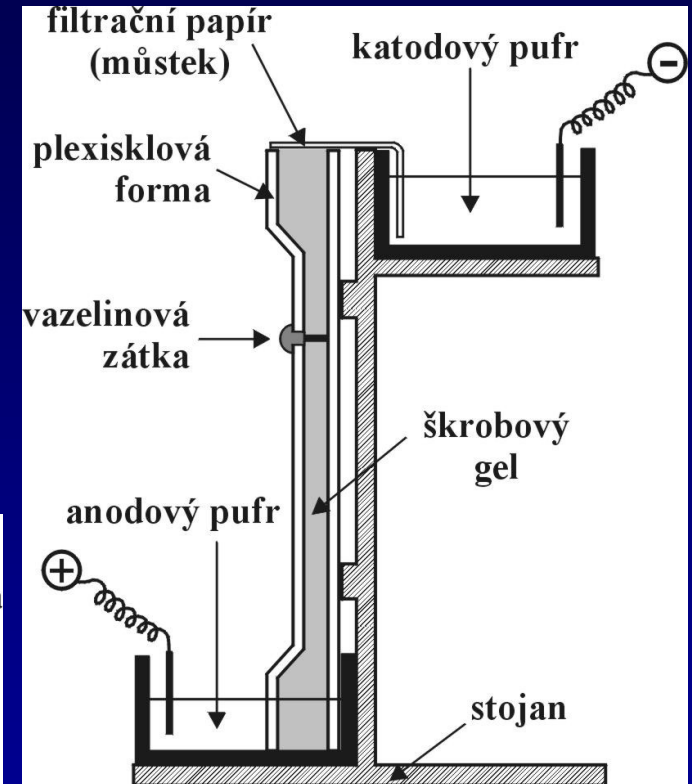
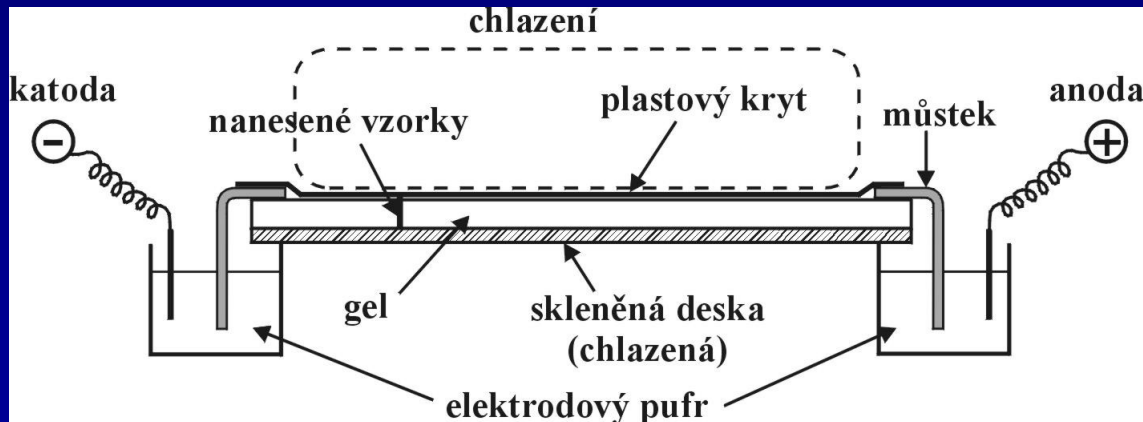
- **Princip ELFO znám již od konce 19. stol.**
- **1937 - Thisselius: metoda „pohyblivého rozhraní“**
- **1949 - Linus Pauling: papírový nosič - abnormální Hb srpkovité anémie**
- **1955 - O. Smithies: škrob**
- **1957 - Hunter a Moeller: užití katalytických schopností enzymů (histochemické barvení)**
- **1966 - aplikace ELFO na přírodní populace: Harry Harris (člověk), Richard Lewontin a John Hubby (octomilka)**

- **Úroveň genetické proměnlivosti v přírodních populacích:**
 - **20-50% lokusů polymorfních**
 - **průměrná heterozygotnost: savci - ca. 5%, bezobratlí a rostliny - 15-20%**

- **Nosiče (média):**
- **škrob (starch gel el., SGE): velikost molekuly + velikost náboje**
- **celulózoacetát (CAGE): náboj**
- **agar, agaróza (AGE): náboj**
- **polyakrylamid (PAGE): velikost molekuly + náboj**

Metody elektroforézy

- **horizontální**
- **vertikální**
- **kapilárová**



Metody elektroforézy

1 ELFO v kontinuálním pufru

2 ELFO v diskontinuálním pufru (multifázická ELFO):

- 2 gely o různých koncentracích - koncentrující a separující
- na rozhraní „sendvičování“ proteinů mezi „vedoucím“ a „taženým“ iontem; pokud jen tento krok = **izotachoforéza**

3 Izoelektrická fokusace (isoelectric focusing, IEF):

- v gelu syntetické polyamino polykarbonátové skupiny = **nosné amfolyty** s rozsahem pI
- připojením el. pole → stabilní gradient pH; amfolyty drženy v gelu silnou kyselinou při anodě a silnou zásadou při katodě

4 ELFO v močovíně a SDS:

- **SDS = sodium dodecyl sulphate (= aniontový detergent):**
schopnost rozpouštět některé proteiny a štěpit některé polymery
SDS způsobuje silný záporný náboj proteinů migrace jen podle
hmotnosti molekuly
- **močovina: podobně jako SDS, ale náboj proteinů normální - migrace
podle celkového náboje**
- **(podobně možnost tepelné denaturace proteinů a následná ELFO)**
- **Dvousměrná (2-D) ELFO:**
- **připojení el. pole postupně ve dvou na sebe kolmých směrech
např.: 1. fáze = IEF, 2. fáze = SDS ELFO - kombinace pI a molekulové
hmotnosti**

Schopnost separace proteinů krevní plazmy:

- **CAGE: 5 pruhů; SGE: 15; PAGE: 19; IEF > 30;**
2-D ELFO: ca. 300 skvrn ~ 75-100 polypeptidů

Detekce proteinů

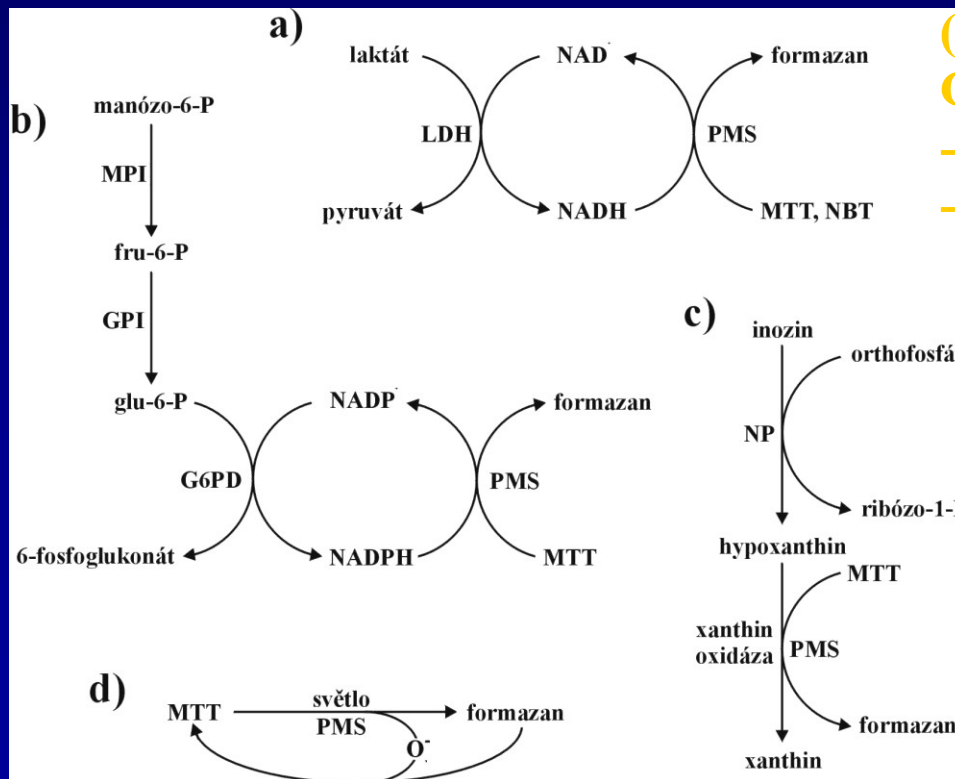
- **nespecifická:** amidočerň, Coomassie Brilliant Blue R

- **specifická:**

barviva pro glykoproteiny, lipoproteiny

histochemické barvení enzymů: spřažení katalýzy přeměny specifického substrátu s barvicí reakcí

- nitrotetrazoliové soli (MTT, NBT) + PMS (phenazin methosulfát); Fast Blue RR; Fast Garnett GBC, Fast Black K
- redukce NAD^+ , NADP^+
- někdy nutno dodat další enzymy



- **obarvený gel = obecně elektroforetogram,**
jestliže obarveny enzymy = zymogram (enzymogram)
proužky = „elektromorfy“, „alely“, „alelomorfy“
izozymy, alozymy

