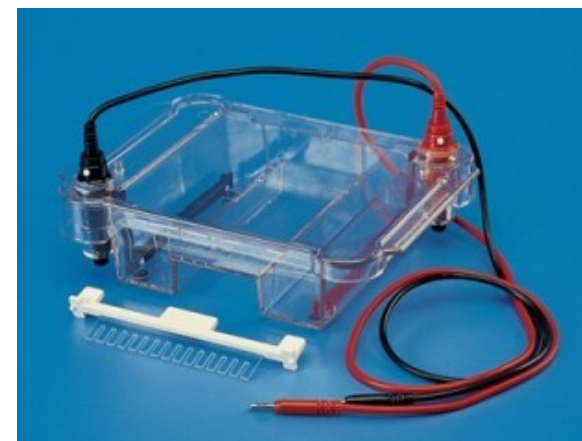
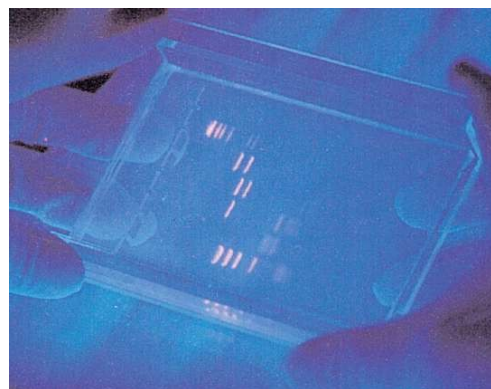
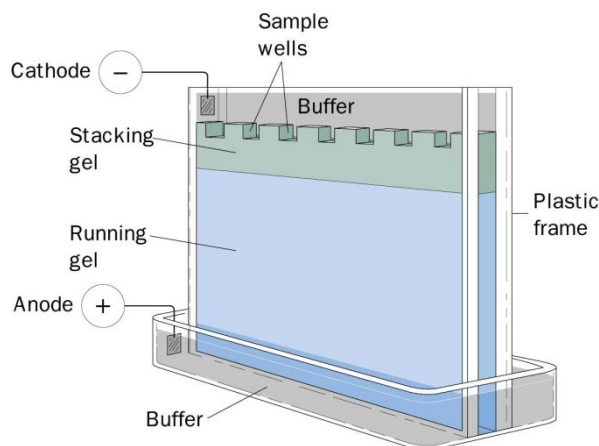


# ELEKTROFORÉZA

## enzymů a neenzymatických bílkovin



**elektroforéza:** z řečtiny = transport pomocí elektřiny  
obecně = pohyb nabitých částic v médiu vlivem el. pole

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 můžeme zjistit sekvenováním –  
pokud to není možné, lze nahradit elektroforézou proteinů

z 20 AA 3 nesou kladný náboj (Arg, Lys, His), 2 záporný náboj (Asp, Glu)

kromě náboje i velikost a konformace makromolekuly (-S-S-  
můstky, van der Waalsovy 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

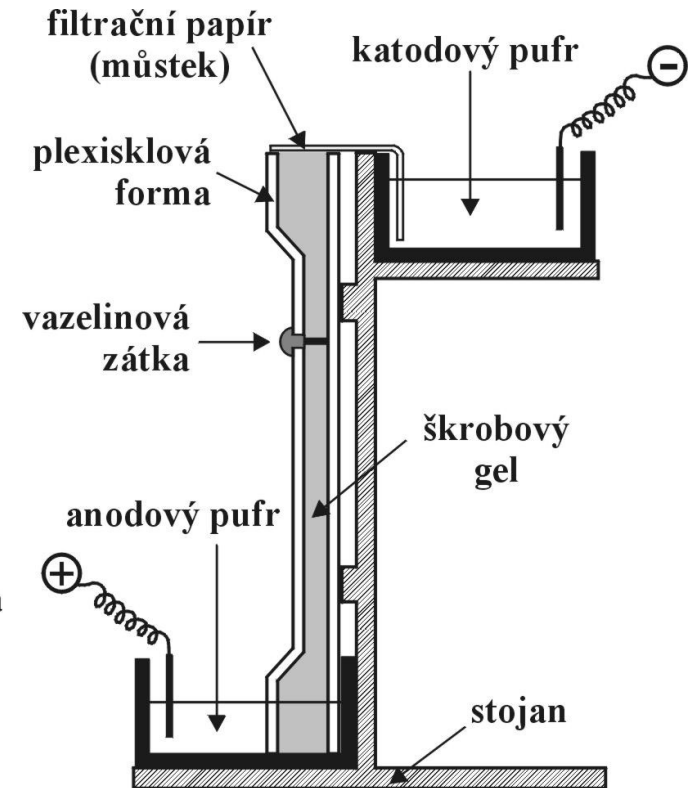
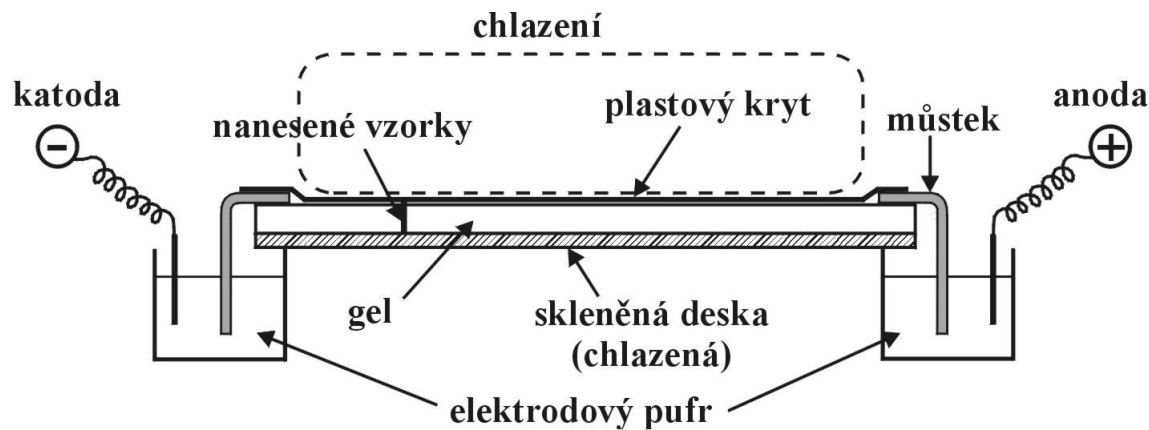
celulózoacetát (CAGE): náboj

agar, agaróza (AGE): náboj

polyakrylamid (PAGE): velikost molekuly + náboj

# Metody elektroforézy

- horizontální
- vertikální
- kapilárová

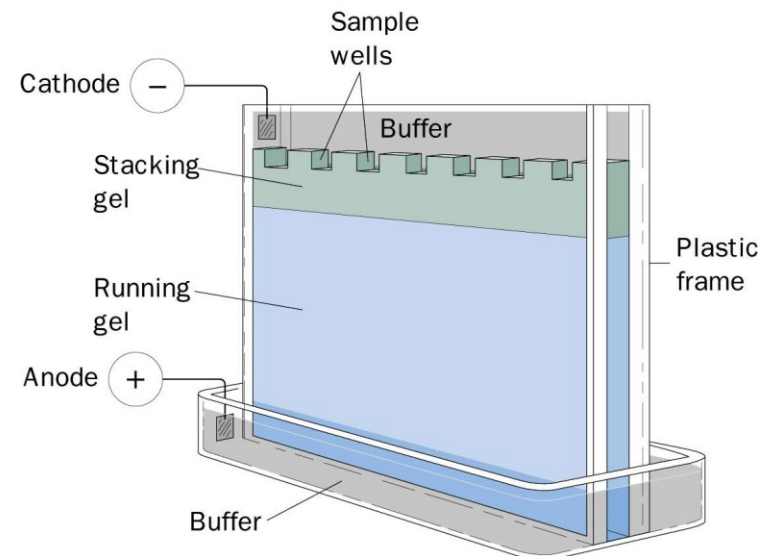


# Metody elektroforézy

## 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 = **izotachofórzeza**



# Metody elektroforézy

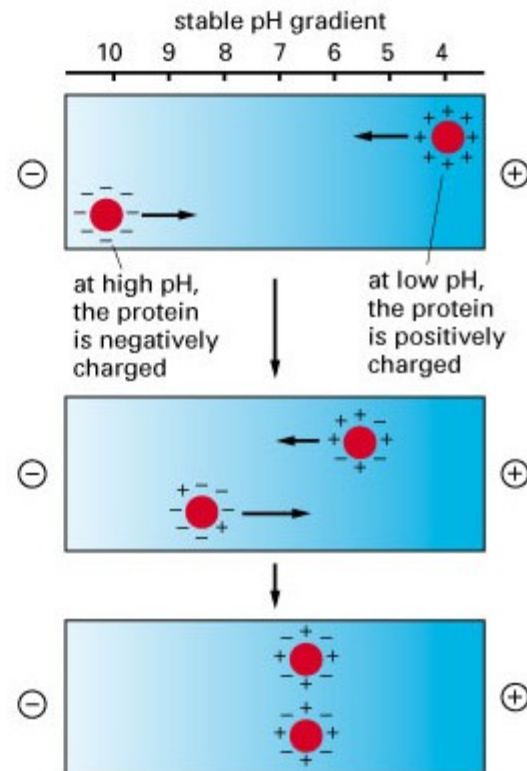
## 3. Izoelektrická fokusace (isoelectric focusing, IEF):

v gelu syntetické polyamino polykarbonátové skupiny = nosné amfolyty s rozsahem pI

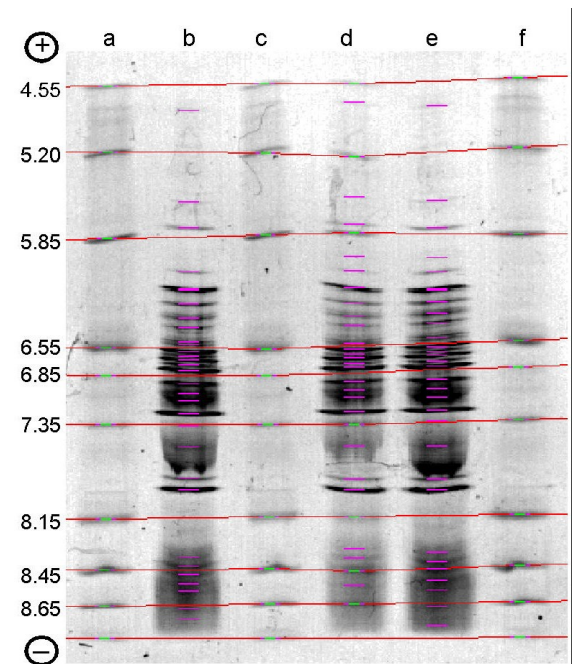
připojením el. pole → stabilní gradient pH; amfolyty drženy v gelu silnou kyselinou při anodě a silnou zásadou při katodě

### ISOELECTRIC FOCUSING

For any protein there is a characteristic pH, called the **isoelectric point**, at which the protein has no net charge and therefore will not move in an electric field. In **isoelectric focusing**, proteins are electrophoresed in a narrow tube of polyacrylamide gel in which a pH gradient is established by a mixture of special buffers. Each protein moves to a point in the gradient that corresponds to its isoelectric point and stays there.



The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.





# Metody elektroforézy

## 4. ELFO v močovině 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)

## 5. 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

# Metody elektroforézy

Schopnost separace proteinů krevní plazmy:

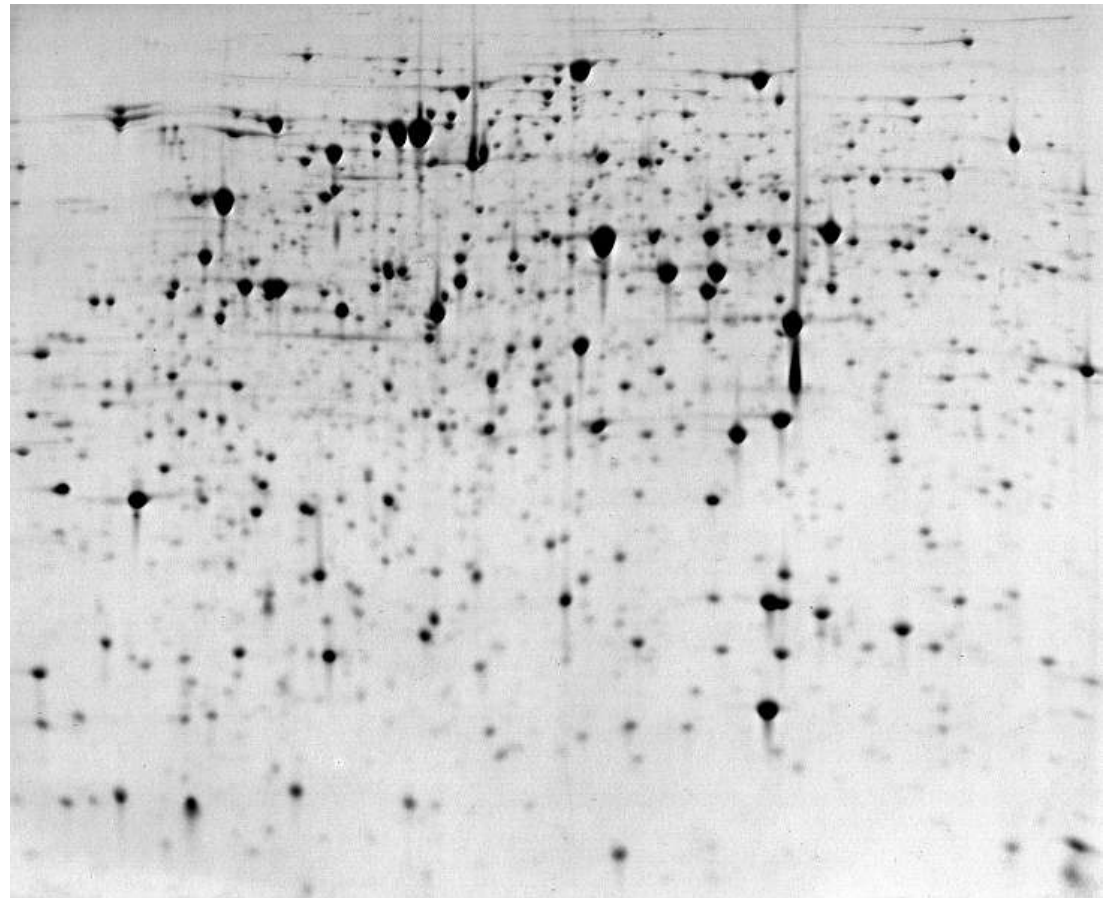
CAGE: 5 pruhů

SGE: 15

PAGE: 19

IEF > 30

2-D ELFO ca. 300 skvrn  
~ 75-100 polypeptidů

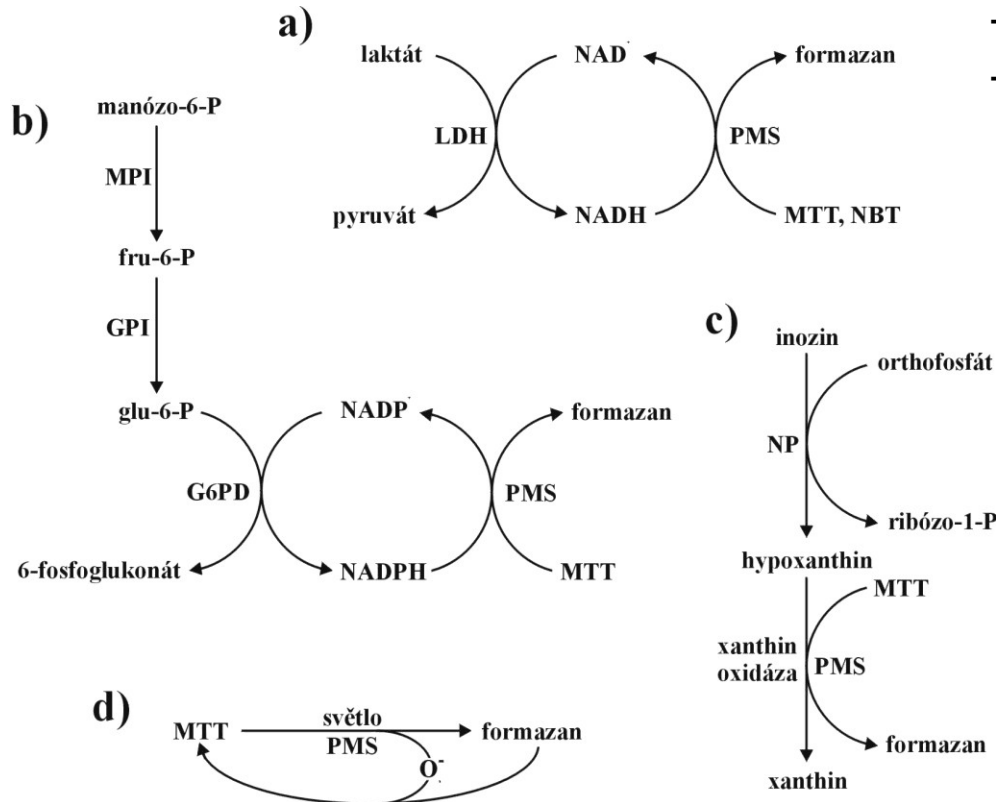


# Detekce proteinů

**nespecifická:** amidočern, 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  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$
- někdy nutno dodat další enzymy



obarvený gel = obecně **elektroforetogram**,  
jestliže obarveny enzymy = **zymogram** (enzymogram)

proužky = „elektromorfy“, „alely“, „alelomorfy“

**izozymy, alozymy**

