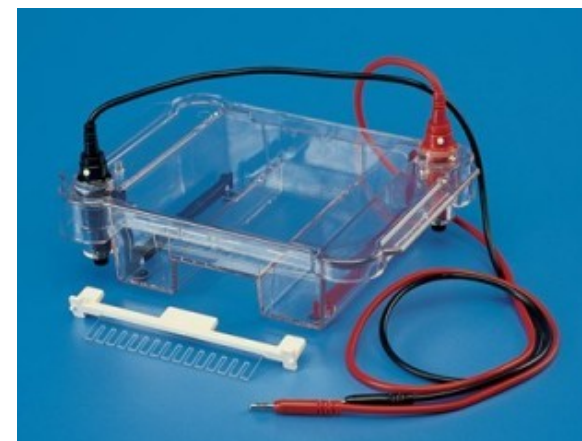
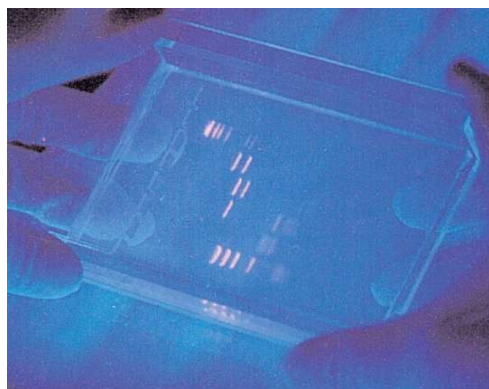
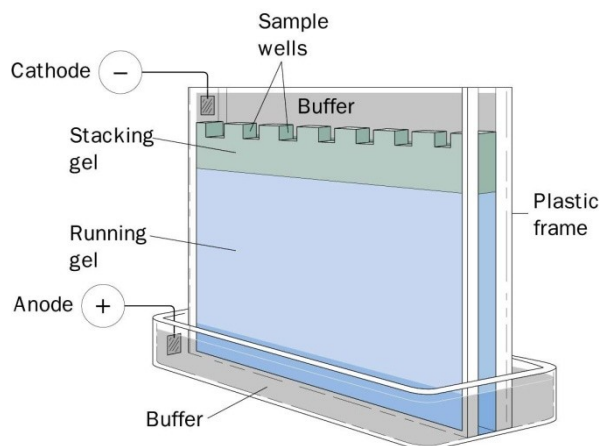


ELEKTROFORÉZA

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

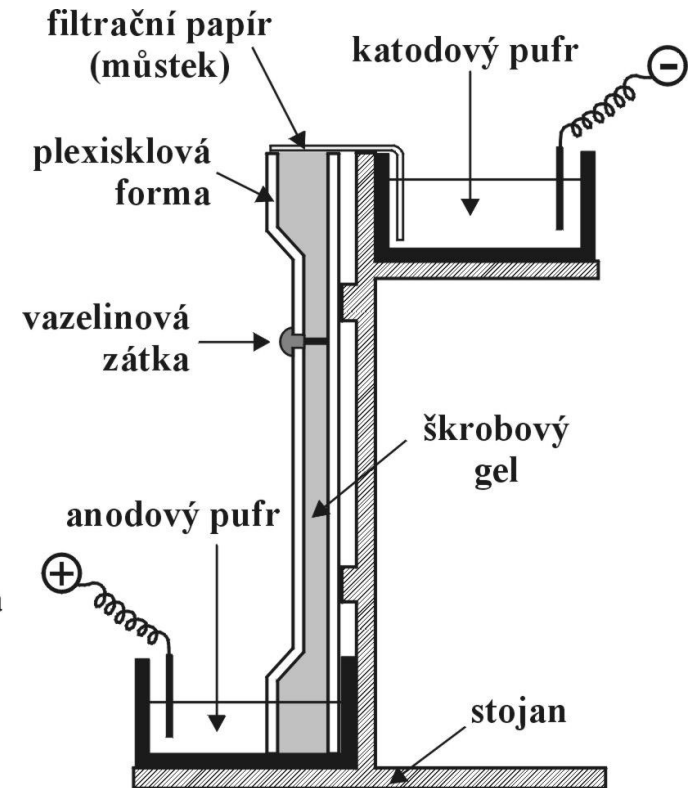
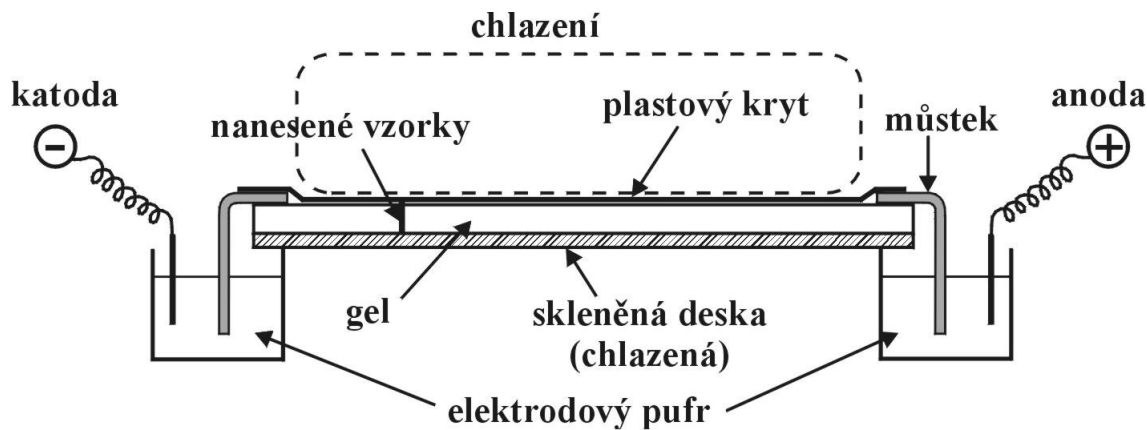
celulózoacetát (CAGE): náboj

agar, agaróza (AGE): náboj

polyakrylamid (PAGE): velikost molekuly + náboj

Metody elektroforézy

- horizontální
- vertikální
- kapilárová

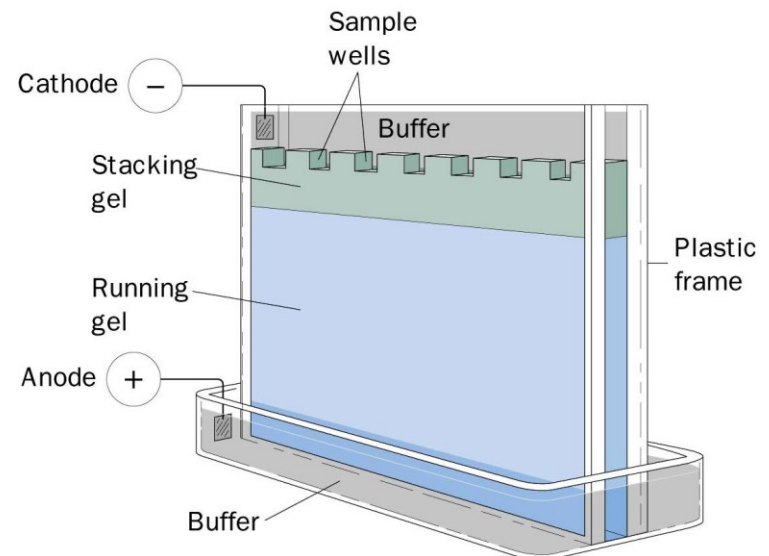


Metody elektroforézy

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 = **izotachoforéza**



Metody elektroforézy

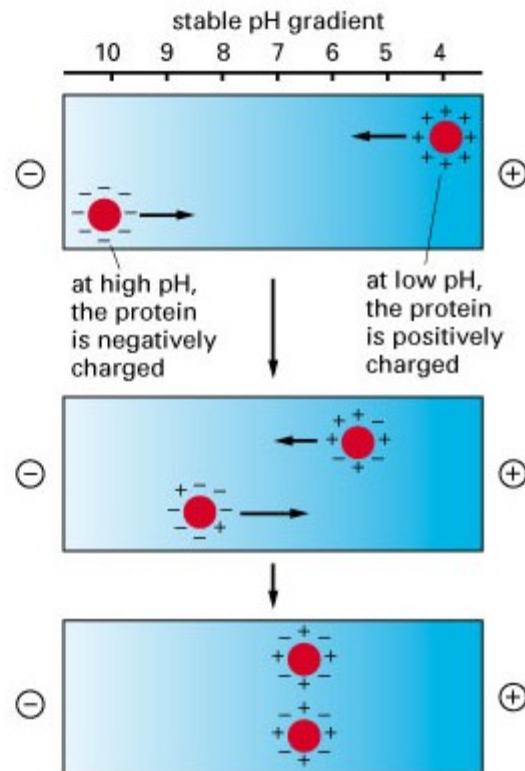
3. Izoelektrická fokusace (isoelectric focusing, IEF):

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

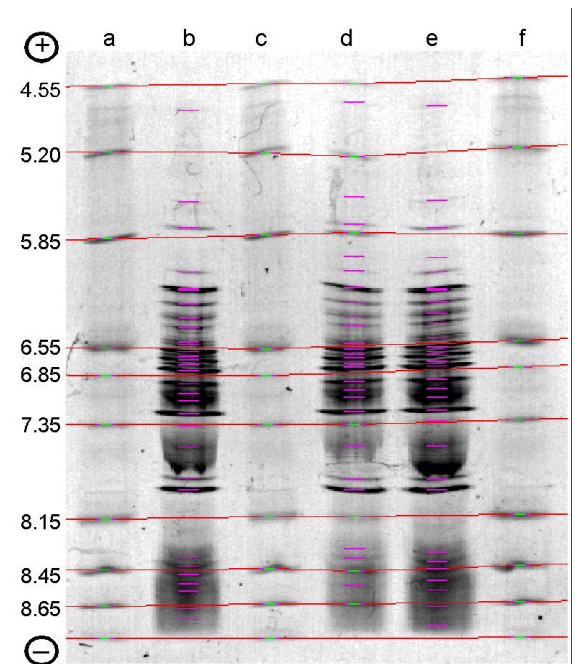
připojením el. pole → stabilní gradient pH; amfolyty drženy v gelu silnou kyselinou při anodě a silnou zásadou při katodě

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:

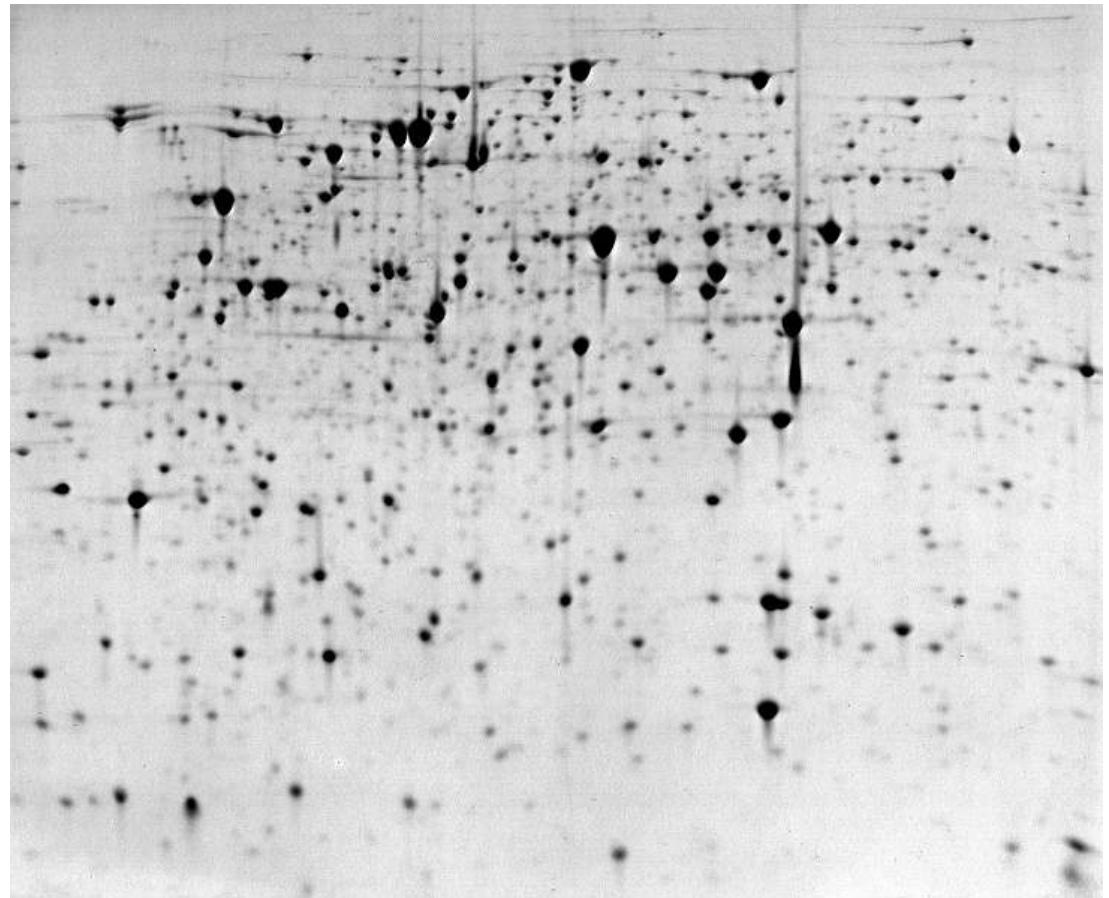
CAGE: 5 pruhů

SGE: 15

PAGE: 19

IEF > 30

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

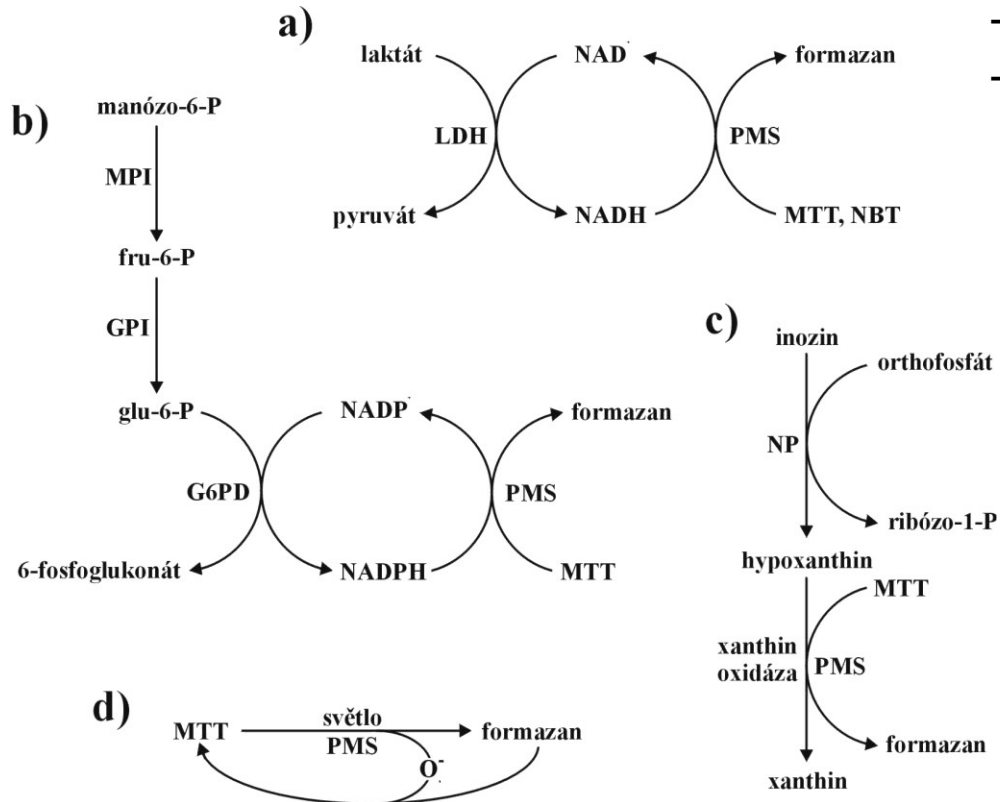


Detekce proteinů

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 NAD^+ , NADP^+
- někdy nutno dodat další enzymy



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

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

izozymy, alozymy

