

# Elektroforéza a Western blot

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratory of interaction and function of essential Biomolecules

NCBR - National Centre for Biomolecular Research

[labLifeB.org](http://labLifeB.org)

# Přehled

- 1. Princip elektroforézy** – vznik molekulového síta
- 2. Materiál a instrumentace** – chemikálie, zdroje a vany
- 3. Elektroforéza DNA** – nativní a UREA denaturační
- 4. Elektroforéza proteinů** – SDS denaturační a nativní

# 1. Princip elektroforézy

Gelová elektroforéza je technika používaná k oddělení fragmentů DNA podle jejich velikosti. Vzorke DNA se vloží do jamek (prohlubní) na jednom konci gelu a k jejich protažení gelem se aplikuje elektrický proud. Fragmenty DNA jsou negativně nabitě, takže se pohybují směrem ke kladné elektrodě.

Protože všechny fragmenty DNA mají stejné množství náboje na hmotnost, malé fragmenty se pohybují gelem rychleji než velké fragmenty. Když je gel obarven barvivem vázajícím DNA, lze fragmenty DNA považovat za pásy, z nichž každý představuje skupinu fragmentů DNA stejné velikosti.

## 2. Chemikálie

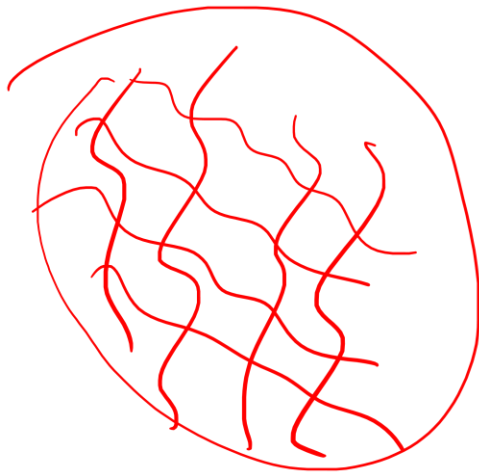
**Molekulové síto** v gelu vzniká díky polyakrylamidu a agaróze.

**Rozlišení** gelu udává velikost pórů síta je dáno koncentrací PA a poměru AA:BisAA u Agarů také koncentrací a kvalitou agarů – čím kvalitnější, tím menší molekuly rozdělí.

PAGE – polyakrylamidová elektroforéza se používá na separaci proteinů a fragmentů DNA menších než 100 bazí.

Agaróza se používá na separaci fragmentů DNA delších než 100 bazí.

# Agaróza



DNA > 100 bází

# PAGE



Proteiny a peptidy  
DNA < 100 bází

## 2. Instrumentace

**Zdroj elektrického napětí** – rozsah napětí 300 V až 3000V podle způsobu použití.

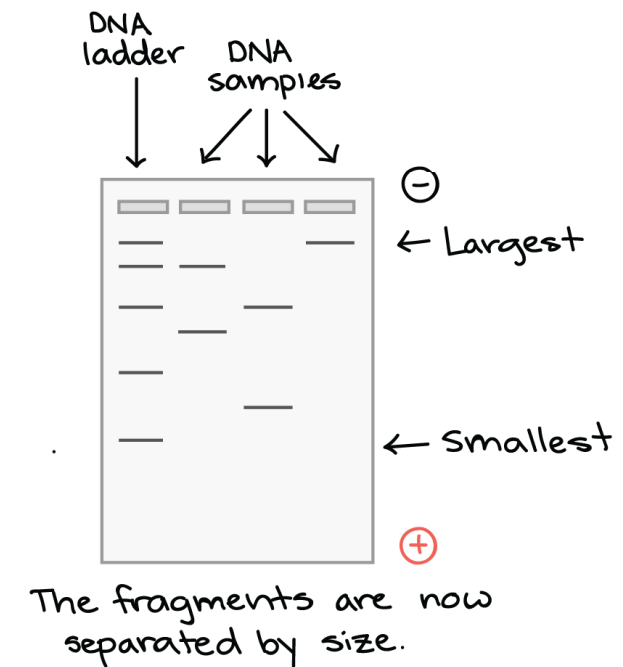
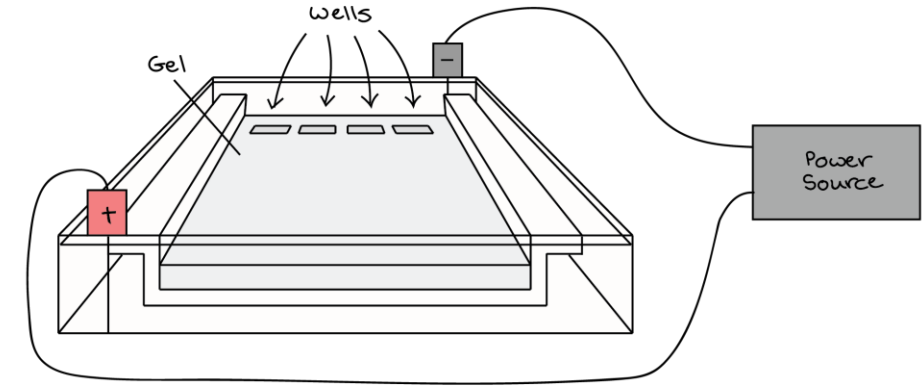
Stejnoseměrné napětí pro malé a střední molekuly.

Pulzní elektroforéza s proměnlivým směrem proudu pro velké molekuly.

**Vany** – obsahují opačně nabitě elektrody. Proud prochází skrz gel, který je ponořen ve stejném pufru, jako je pufr uvnitř gelu.

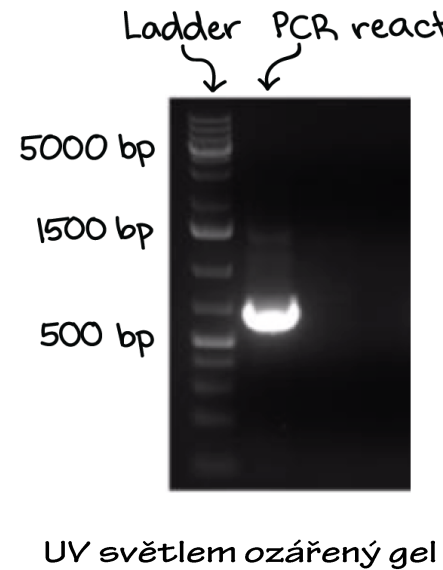
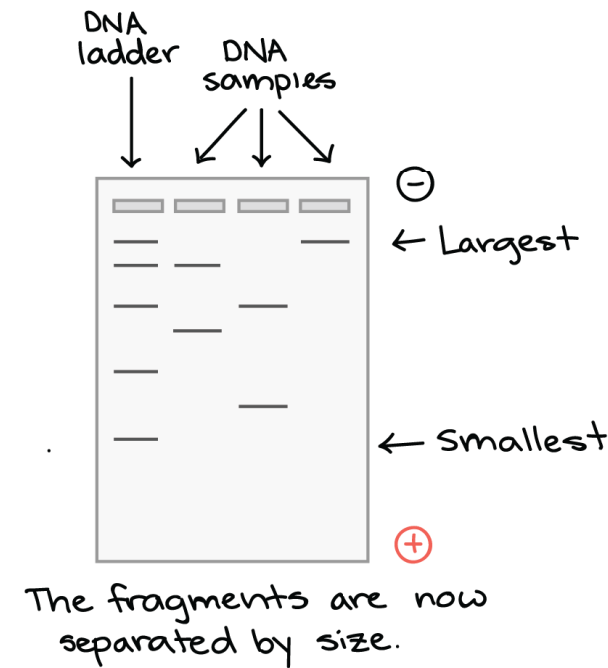
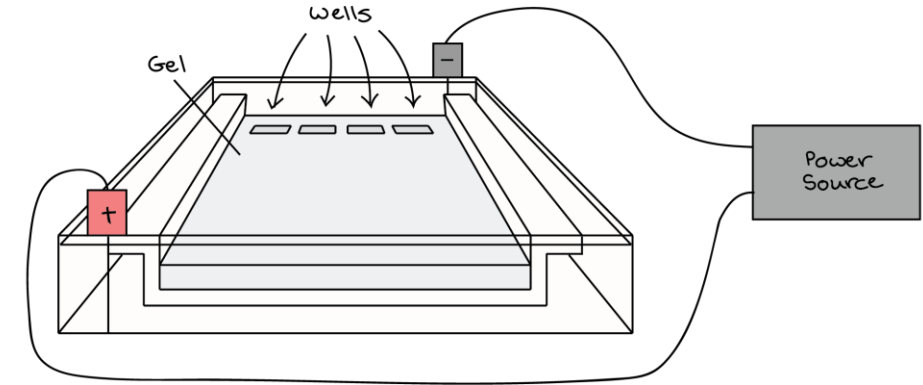
# 3. Elektroforéza DNA

1. Gelová elektroforéza rozděljuje fragmenty DNA podle velikosti.
2. Vzorky DNA se vloží do jamek na jednom konci gelu.
3. Fragmenty DNA jsou negativně nabitě, takže se pohybují směrem ke kladné elektrodě. Protože všechny fragmenty DNA mají stejný poměrný náboj vztažený na délku, malé fragmenty se pohybují gelem rychleji než velké fragmenty.
4. Když je gel obarven barvivem vázajícím DNA, lze fragmenty DNA považovat za pásy, z nichž každý představuje skupinu fragmentů DNA stejné velikosti.



# 3. Elektroforéza DNA

1. Gelová elektroforéza rozděljuje fragmenty DNA podle velikosti. Používá se **agarový horizontální gel**.
2. Vzorke DNA se vloží do jamek na jednom konci gelu.
3. Fragmenty DNA jsou negativně nabitě, takže se pohybují směrem ke kladné elektrodě.
4. Protože všechny fragmenty DNA mají stejný poměrný náboj vztažený na délku, malé fragmenty se pohybují gelem rychleji než velké fragmenty.
5. Když je gel obarven barvivem vázajícím DNA, lze fragmenty DNA považovat za pásy, z nichž každý představuje skupinu fragmentů DNA stejné velikosti.

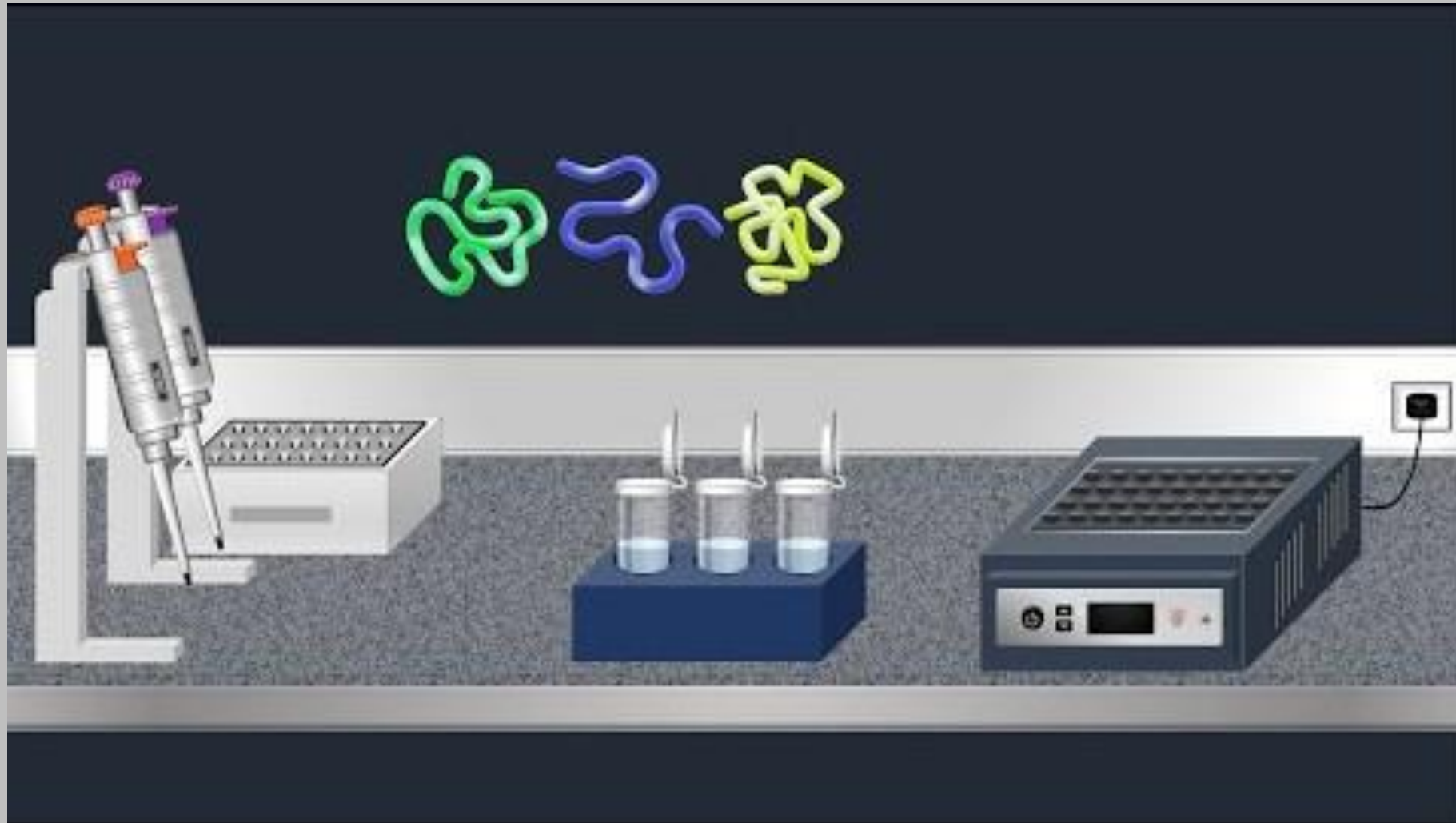




# 4. Elektroforéza proteinů

1. Gelová elektroforéza rozděluje proteiny podle velikosti. Používá se **polyakrylamidový vertikální gel**.
2. Aby mohlo dojít k separaci pouze na základě velikosti, vzorky proteinů, s přidaným SDS sodium dodecyl síranem se denaturují zahřátím a vloží do jamek na horní částí gelu.
3. Fragmenty proteinů se díky SDS stávají negativně nabitě, takže se pohybují směrem ke kladné elektrodě.
4. Protože všechny fragmenty proteinů mají díky SDS podobný poměrný náboj, proteiny o malé hmotnosti = kratší délce se pohybují gelem rychleji než velké proteiny.
5. Gel je následně obarven barvivem vázajícím se na aminokyseliny např. Coomasie blue.

# 5. Animovaný princip SDS PAGE



# 6. Animovaný princip Western blot



# Vložit nový snímek o Wester blot

- Dobrý den,
- 
- v návaznosti na dnešní přednášku o ELFU posílám jen pár drobností co mě zpětně napadly jako zajímavé k zařazení v budoucnosti.
- 
- Přišlo by mi pěkné zmínit ve zkratce k možnostem barvení jejich detekční limit a využití - např. právě western blot, nebo silver staining, který by měl být v teorii značně citlivější než Coomassie. V praxi se nám totiž stalo, že jsme hledali možnost jak zviditelnit velmi malou koncentraci proteinu, se kterou mělo Coomassie už problém.
- 
- Možná zmínit i některé širší uplatnění gelů než jen ověření identity a kvality vzorku - hrubý odhad oligomerního stavu (nativem; nebo ve spojení s crosslinkingem pomocí SDS PAGE); nebo spojení s denzitometrií, které se při elektroforéze hned nevybaví, ale přijde mi hezké jak široké může mít tak zdánlivě jednoduchá metoda využití.
- 
- Jinak si myslím, že přednáška byla super a i po desítkách seběhnutých gelů jsem se pořád něco nového dozvěděla.
- 
- Krásný zbytek dne.
- 
- S pozdravem,
- 
- Alexandra Náplavová