

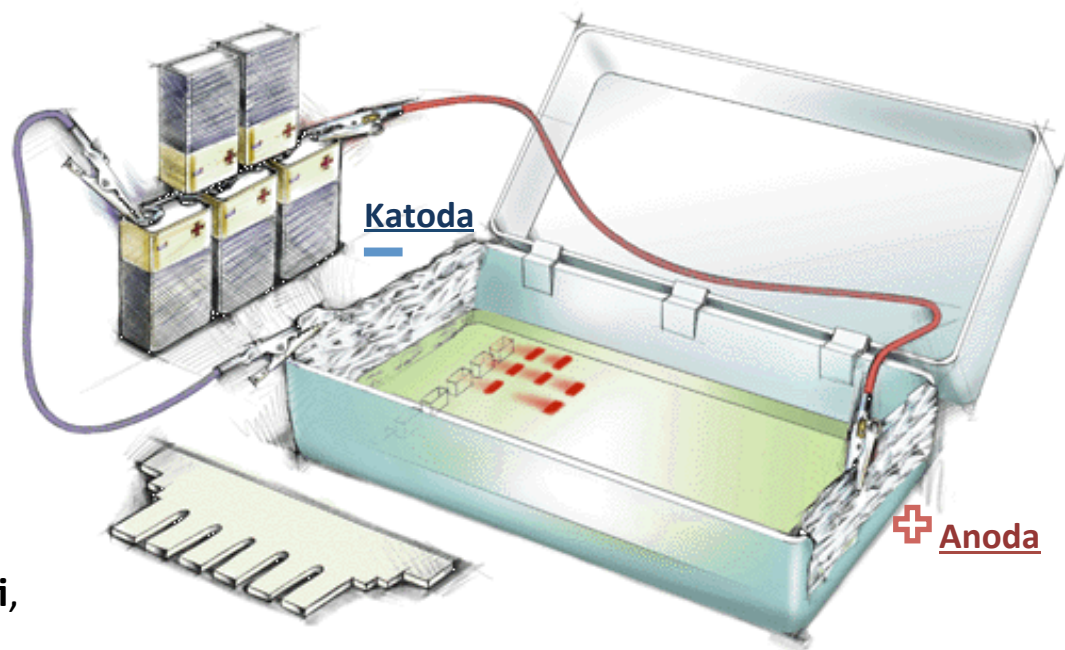
# **ELEKTROFOREZE**

## **in BARVANJE**

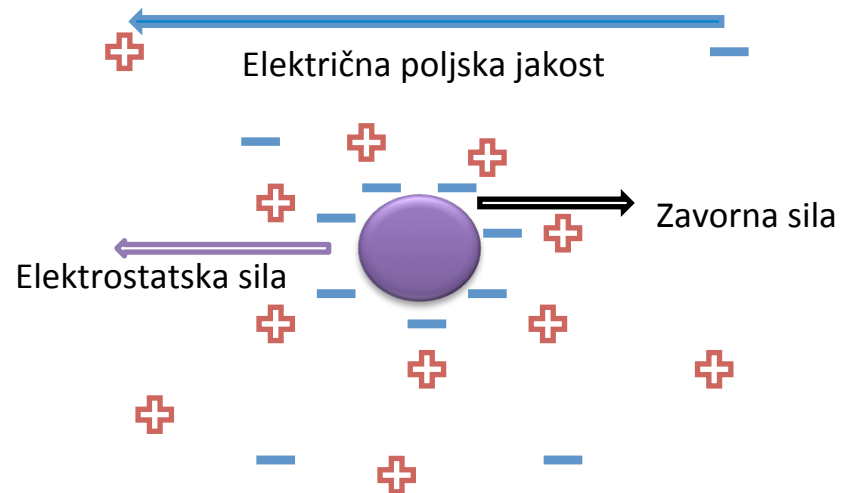
**7. vaja – Poliakriamidna elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE) in Western prenos**

# Elektroforeza

- Separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju.
- Hitrost potovanja odvisna od celokupnega **naboja**, oblike, **velikosti**, ipd., kar vodi do ločitve.
- Celo enako nabite molekule se bodo pri potovanju skozi el. polje ločile, če se le razlikujejo v velikosti in/ali obliki, ker nanje deluje različna zavorna sila.

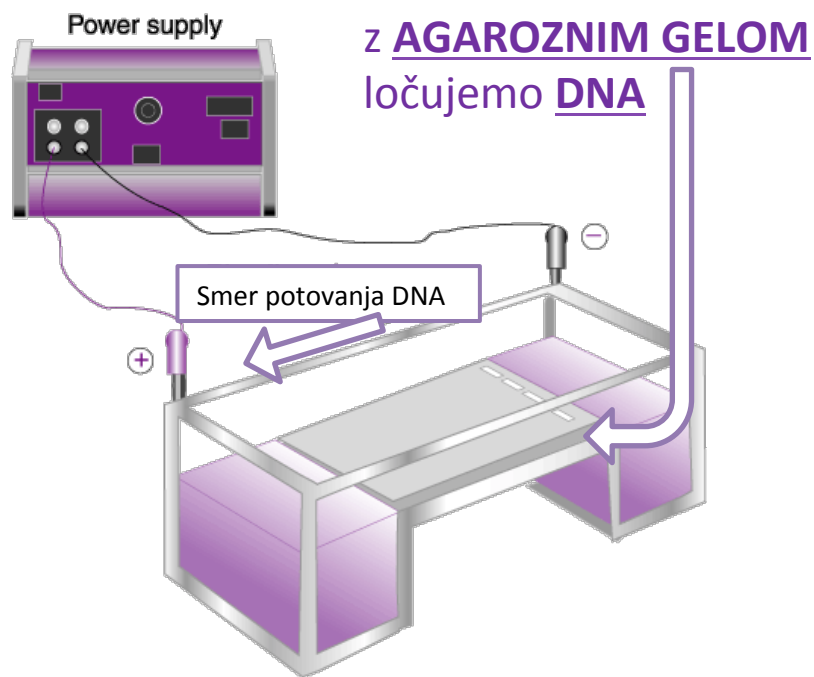


<http://edu.glogster.com/media/5/18/3/24/183/2460.gif>



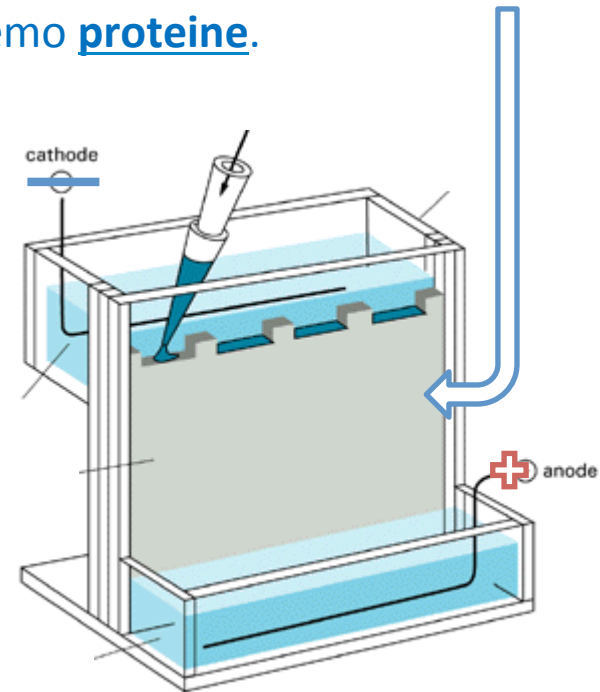
# Gelske elektroforeze

- Biološke molekule se med sabo razlikujejo v obliki, polarnosti, naboju in velikosti.
- Poznamo agarozne in poliakrilamidne gele, ki jih uporabljamo za ločevanje makromolekul.



<http://www.biochem.arizona.edu/Lecture2.html>

s POLIAKRILAMODNIM GELOM ločujemo proteine.

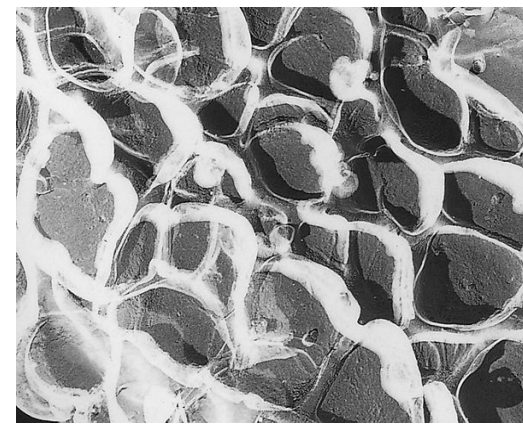


[http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html)

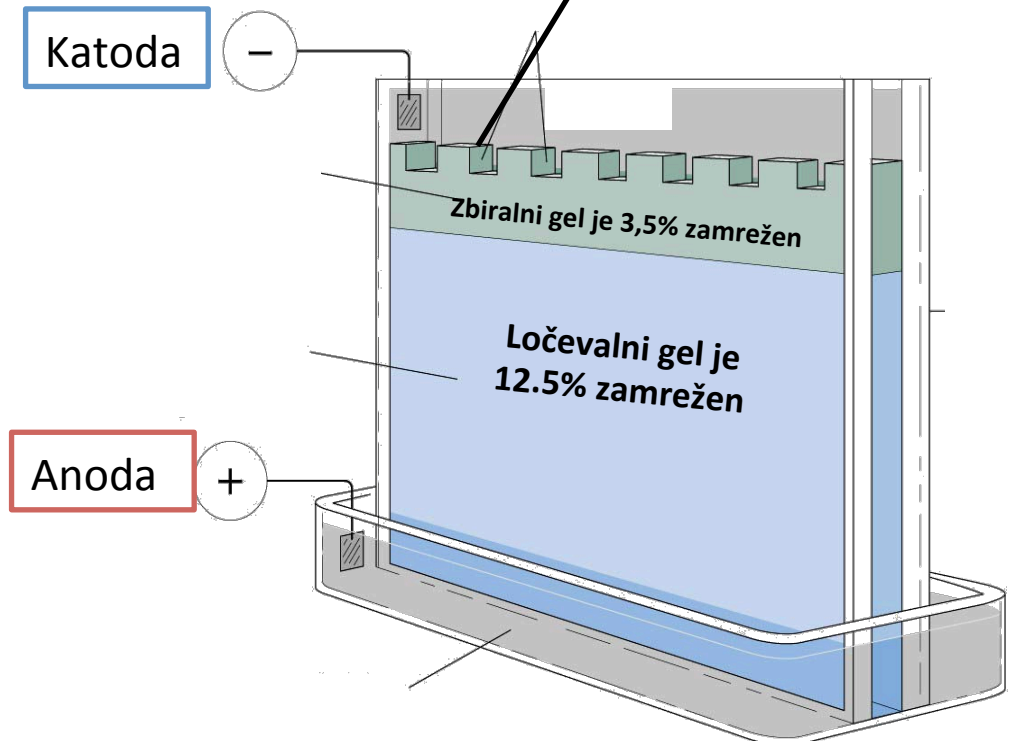
# Priprava poliakrilamidnega gela

- Molekule v vzorcu, ki ga naneseemo nimajo enakega začetnega položaja.
- Z uporabo dveh gelov z različno stopnjo zamreženosti se izognemo razširjenim pasovom in slabši resoluciji pri ločevanju proteinov.
- Molekule se na poti skozi manj zamrežen zbiralni gel skoncentrirajo v ozek pas in ko dosežejo bolj zamrežen ločevalni gel, se začno ločevati na osnovi naboja in velikosti.

Vzorci naneseemo v žepke skupaj z barvilom bromofenolmodro (nam kaže fronto) in saharozo oz. glicerolom, da se vzorec posede v žepke



Zamrežen poliakrilamidni gel pod el. mikroskopom



# Poliakrilamidna elektroforeza

V biokemiji uporabljamo:

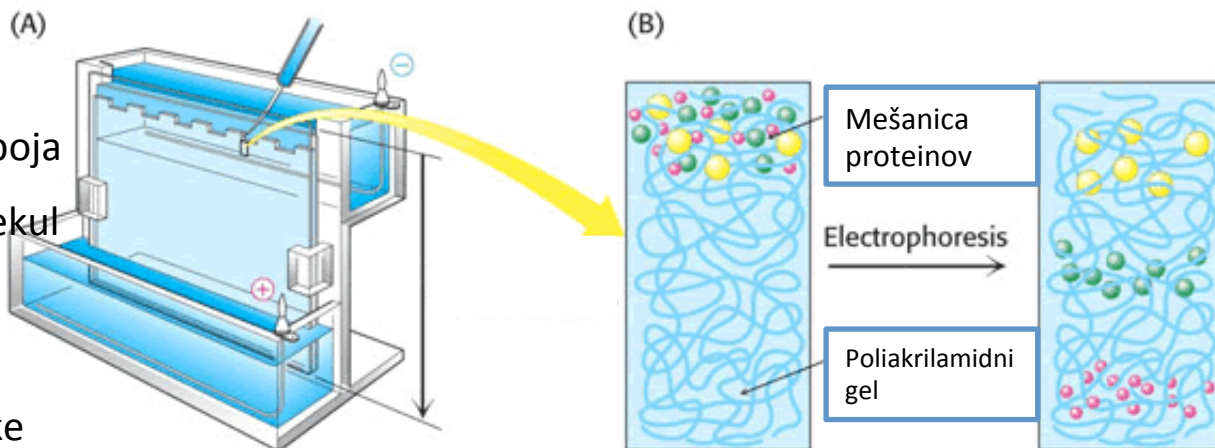
- Nativno poliakrilamidno gelsko elektroforezo (**nativna PAGE**).
- Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS) (**NaDS PAGE**).

# Nativna PAGE

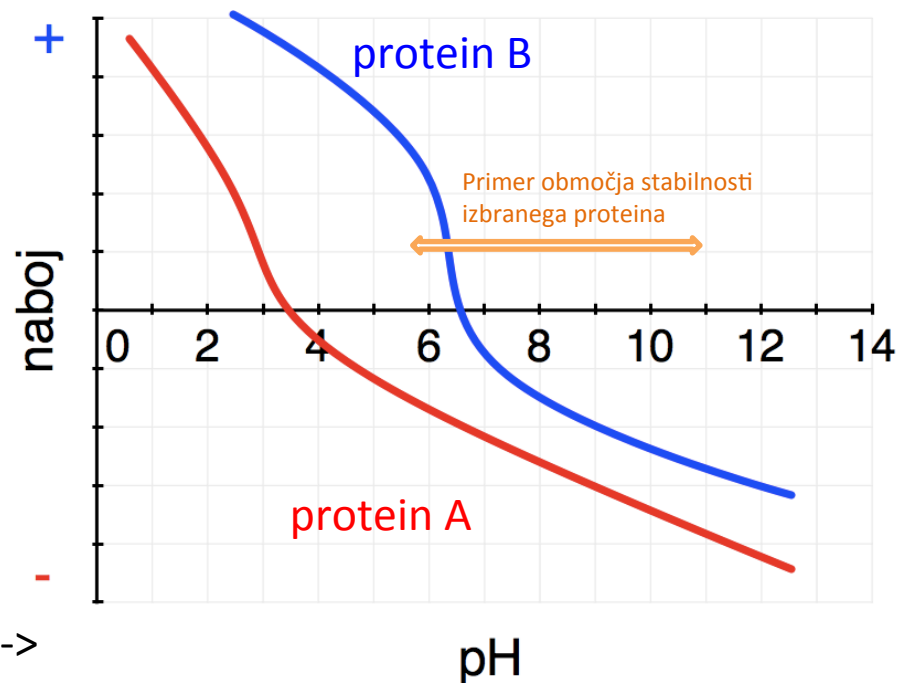
- Proteini se ločujejo na osnovi naboja in velikosti. Nativna struktura molekul se ohrani.

- Proteini ne izgubijo svoje biološke funkcije. Vsi nivoji strukture ostanejo nespremenjeni.

- Protein, ki ga ločujemo imamo v pufri in gelu s takšnim pH, da bo stabilen, negativno nabit in bo zato potoval proti pozitivni elektrodi anodi.



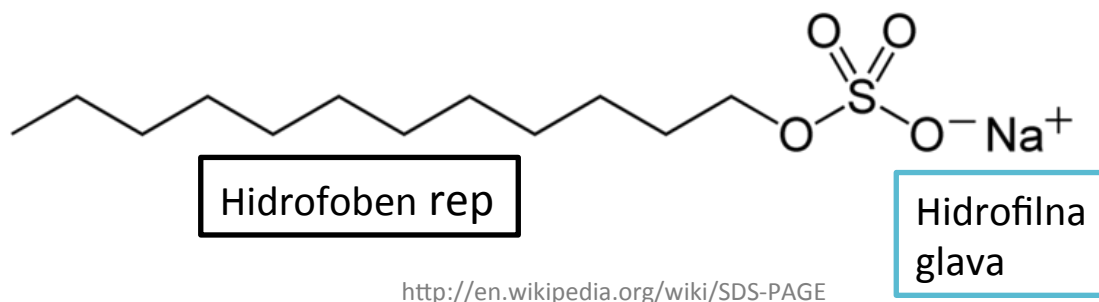
[http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html)



# NaDS PAGE

- Elektroforeza je primerna za določevanje relativne molekulske mase ( $M_r$ ).

- Elektroforezo izvedemo tako kot pri nativni PAGE, le da je v vseh pufrih in gelu prisoten NaDS.



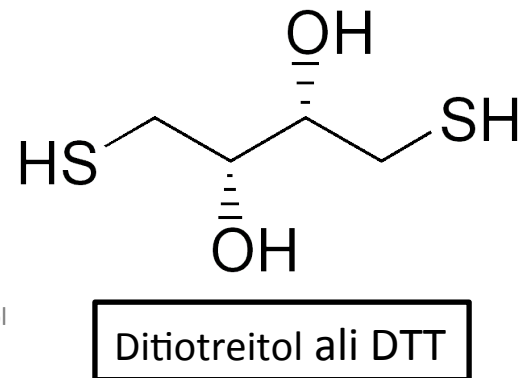
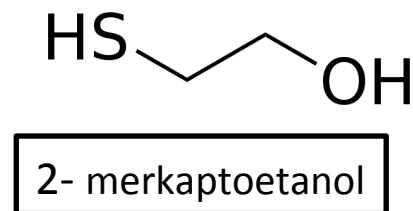
- Natrijev dodecilsulfat (NaDS) je amfipatična molekula, ki deluje

kot detergent in se nespecifično veže na protein in ga denaturira in negativno nabije.

- Disulfidne vezi v proteinu

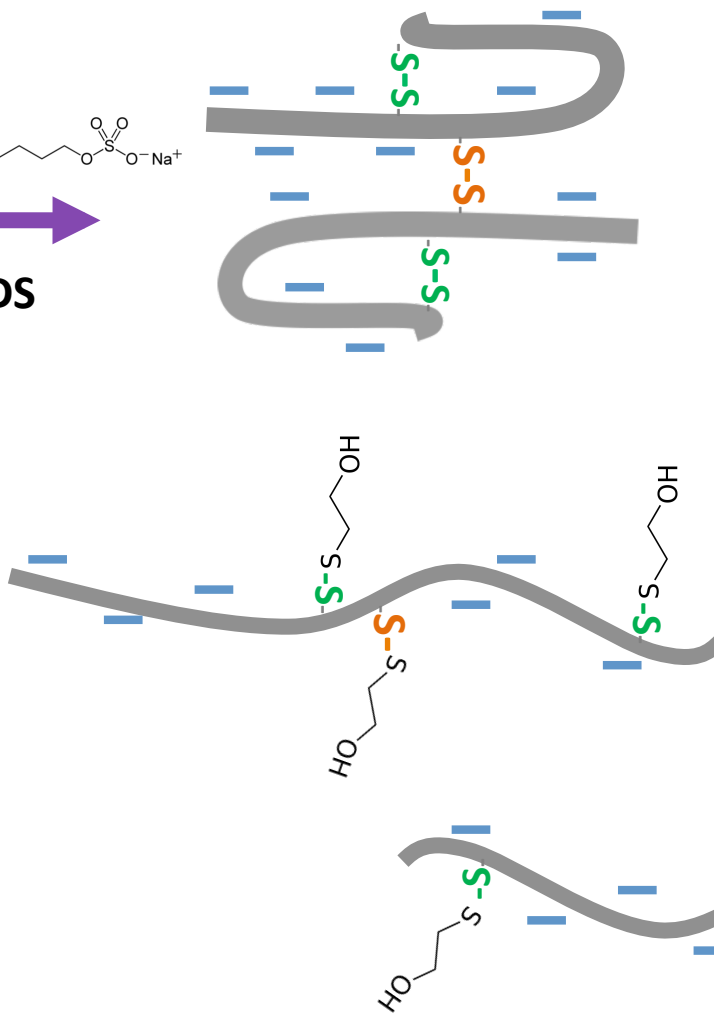
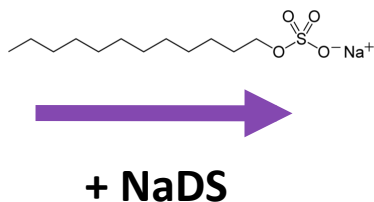
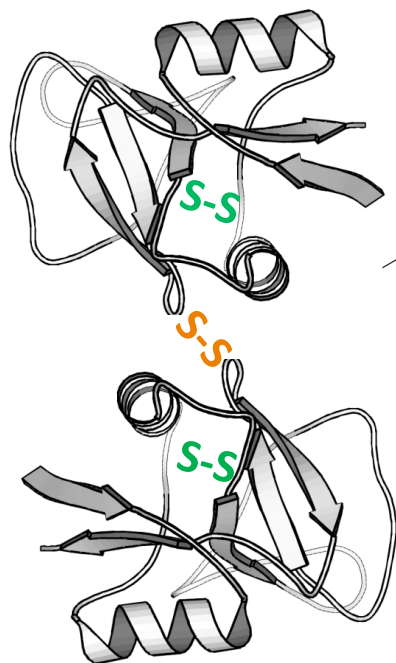
prekinemo z dodatkom reducenta

(2-merkaptanoetanol ali DTT (ditiotreitol)).

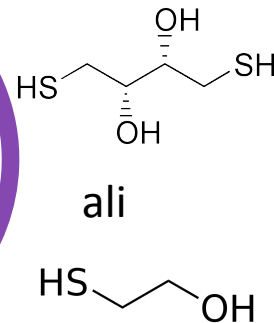


# NaDS PAGE

Vpliv detergenta in reducenta



+DTT ali  
2- merkaptoetanol



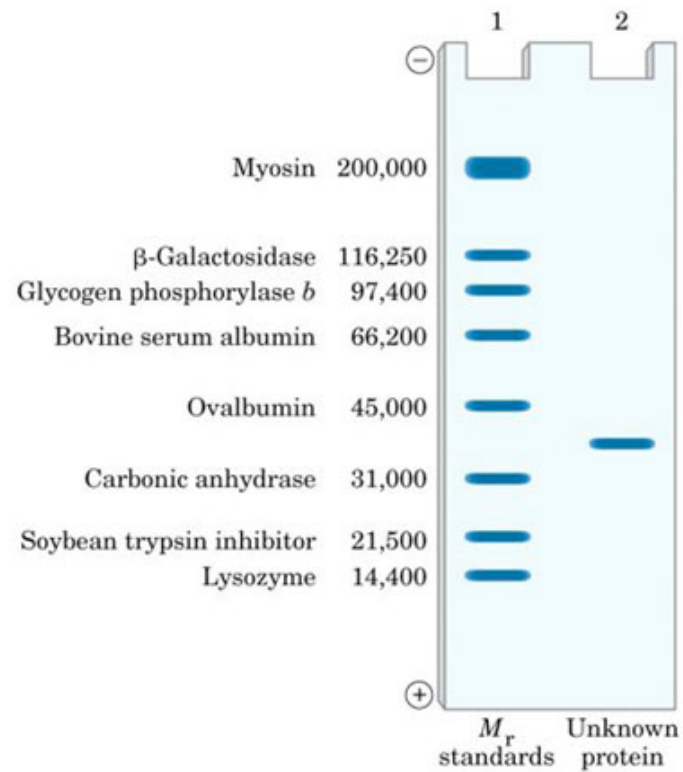
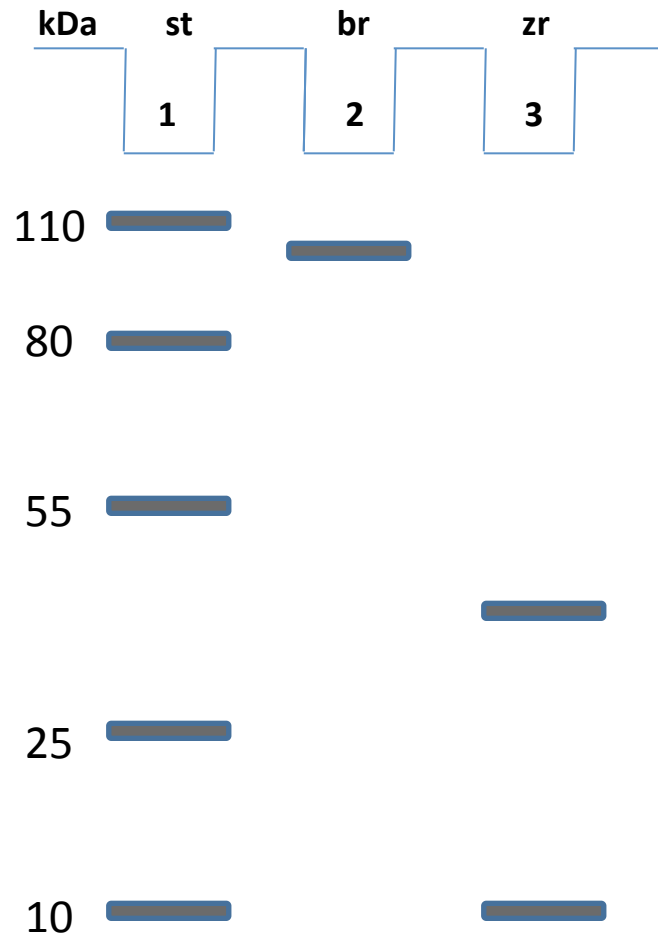
Primer homodimernega  
proteina velikega ~ 30kDa

— Negativni naboj, kot posledica  
vezave NaDS na protein



# NaDS PAGE

Vpliv detergenta in reducenta



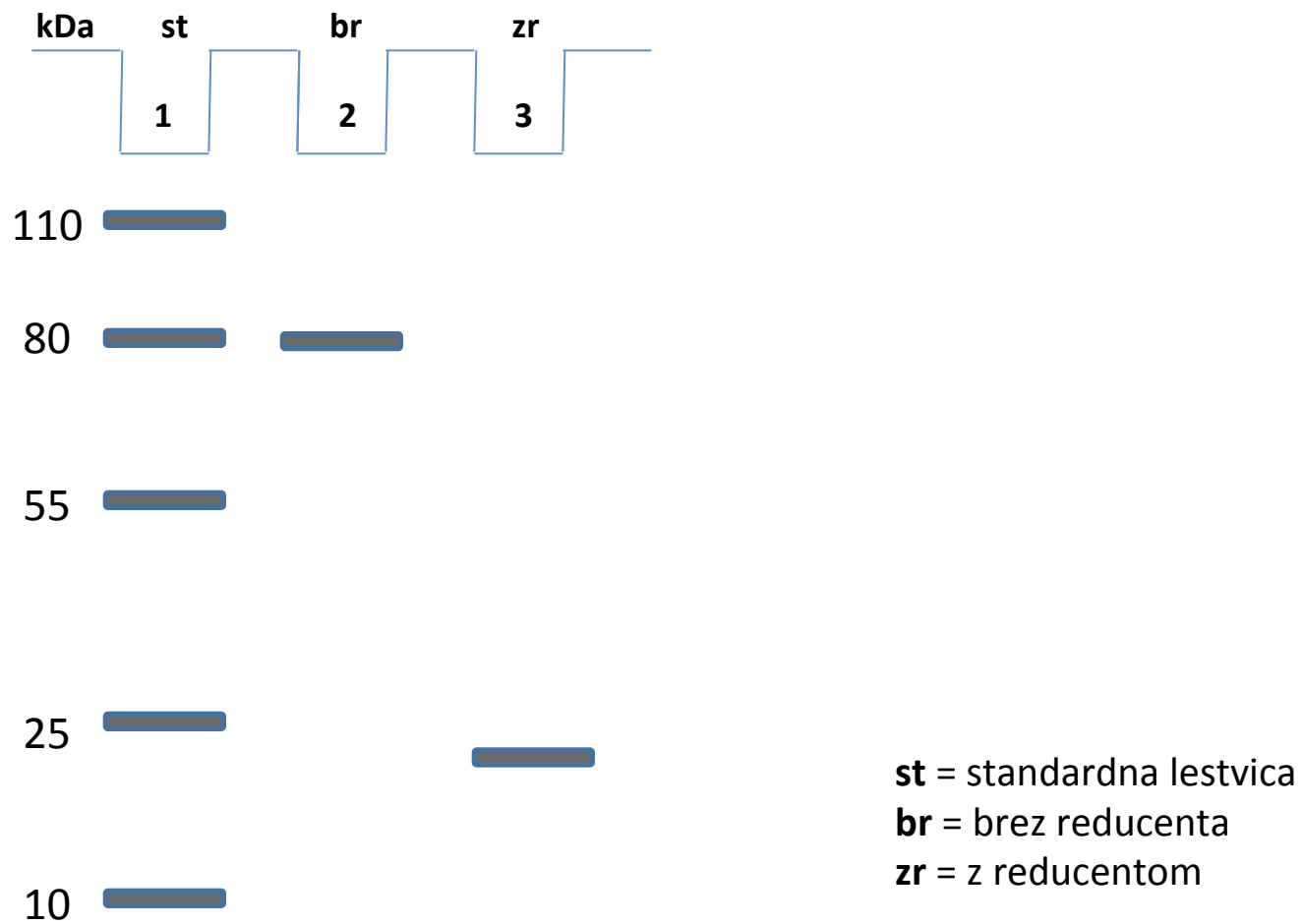
<http://teamwork.jacobs-university.de:8080/confluence/display/~nivanovski/BCCB+Final+Exam+Answers>

Primer standardne proteinske lestvice

**st** = standardna lestvica  
**br** = brez reducenta  
**zr** = z reducentom

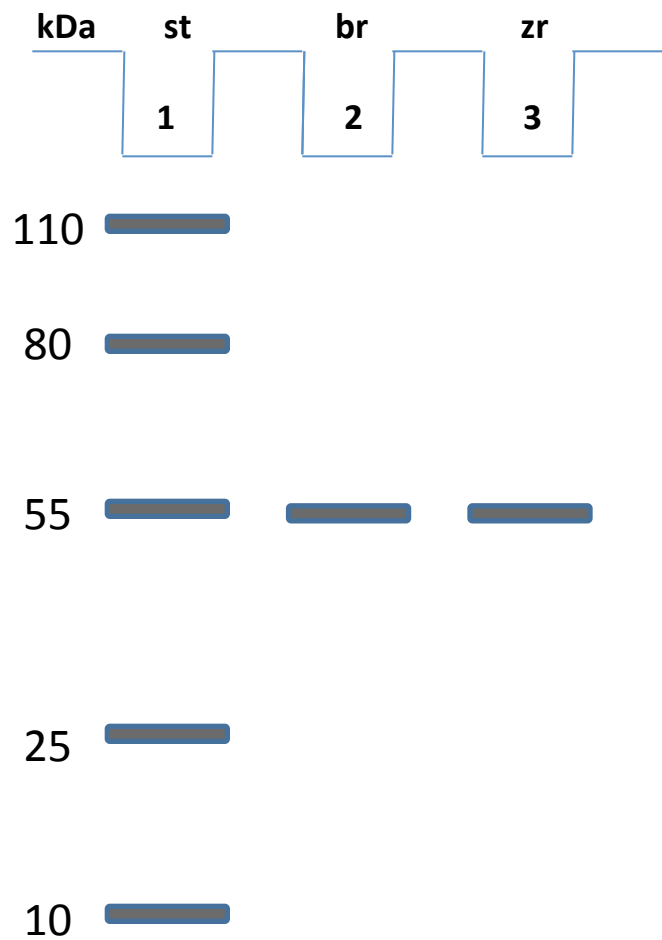
# NaDS PAGE

Vpliv detergenta in reducenta



# NaDS PAGE

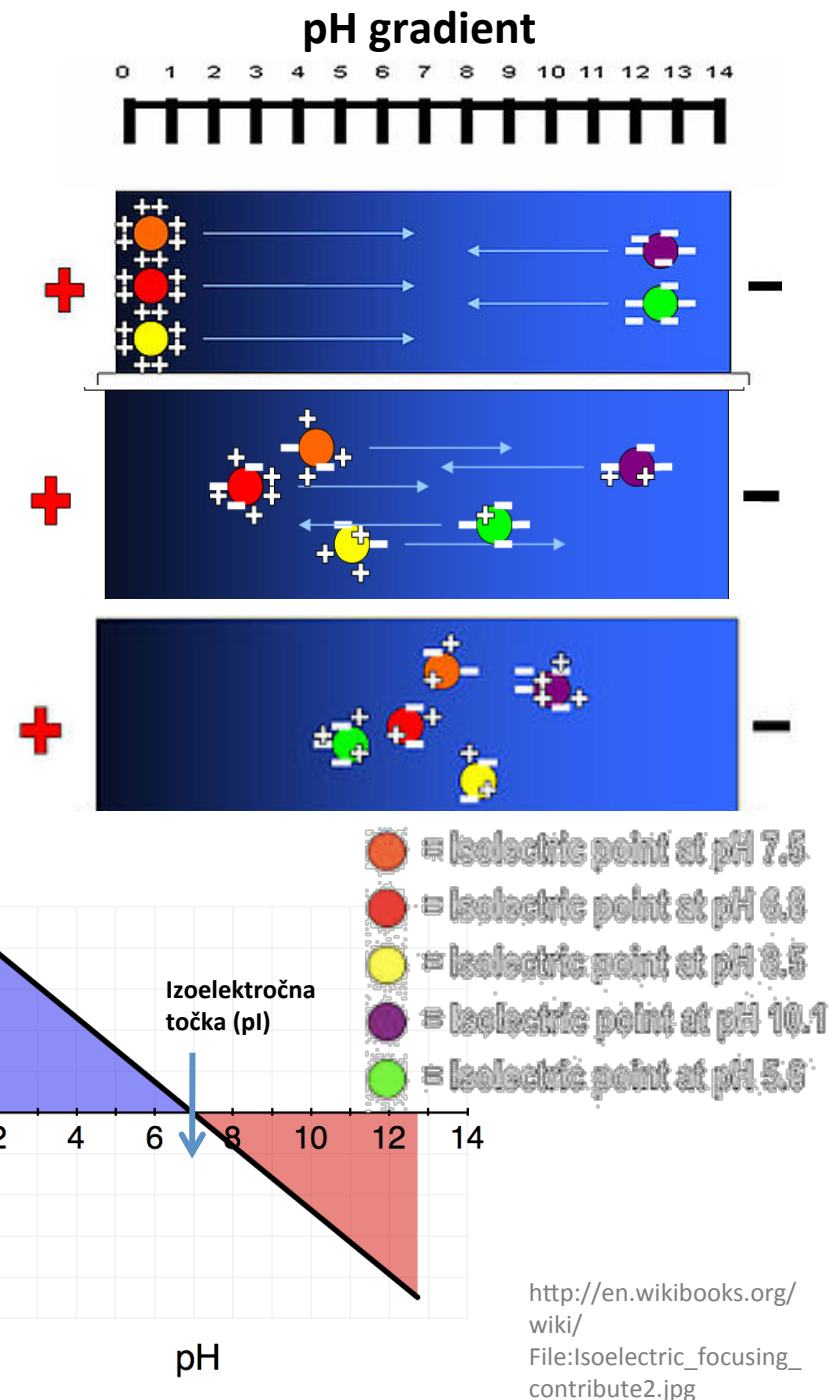
Vpliv detergenta in reducenta



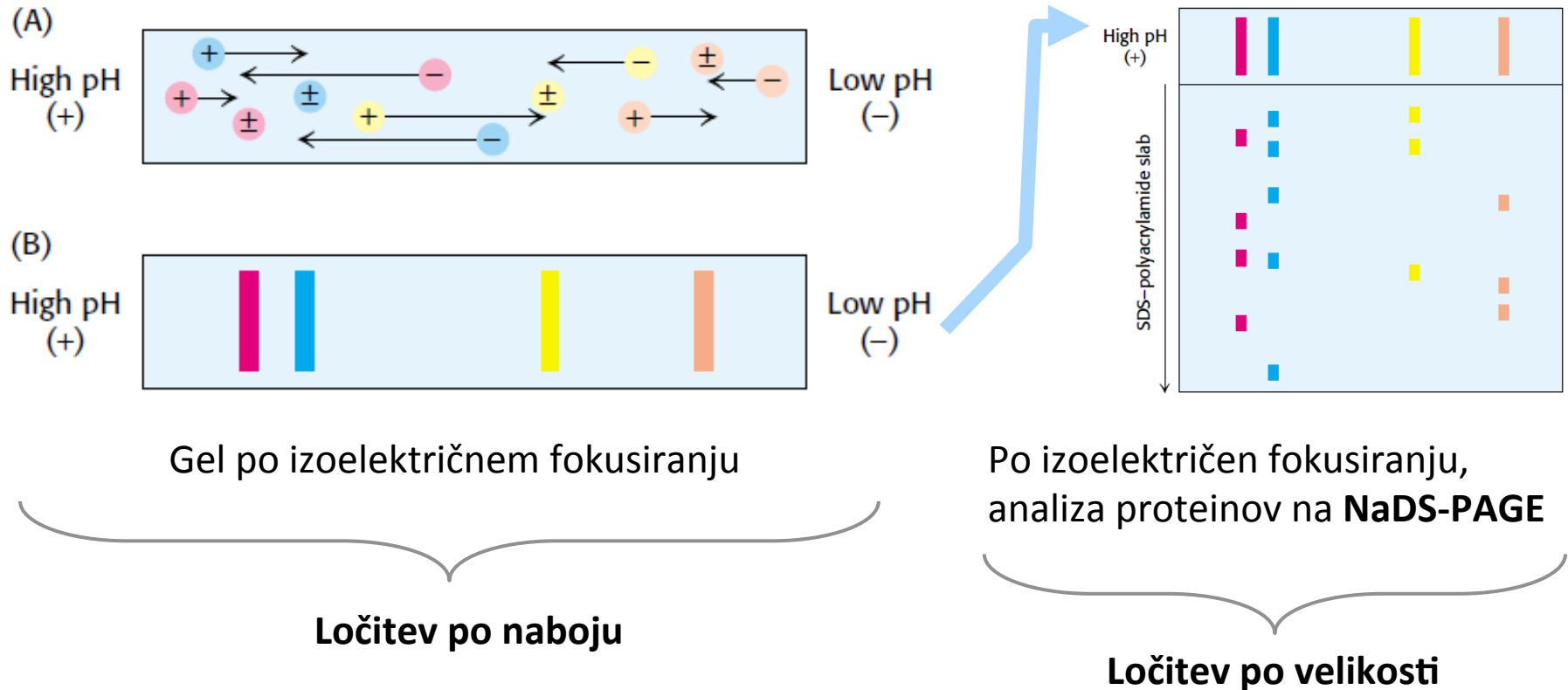
**st** = standardna lestvica  
**br** = brez reducenta  
**zr** = z reducentom

# Izoelektrično fokusiranje

- Spremljamo razlike v celokupnem naboju proteina.
- Ohrani se nativna konformacija proteina (vsi nivoji strukture).
- V stopnji **predfokusiranja** gelu dodamo amfolite, ki nam v električnem polju ustvarijo pH gradient.
- Po dodatku vzorca bodo proteini v el. polju glede na svoj celokupen naboj potovali proti katodi ali anodi. Ustavijo se na mestu pri pH, je enak njihovi pI.



# Izoelektrično fokusiranje



- Če ima protein eno samo liso na NaDS-PAGE in eno liso pri izoelektričnem fokusiranju, velja za čistega. Če je lis več in se malo razlikujejo, gre za izoobliko istega proteina, ki se med seboj malo razlikujejo. ????????????

# **Prenos western** (angl. Western blotting)

Prenos proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno / najlonsko membrano.

## **Prenos Northern**

Prenos RNA molekul iz gela na membrano

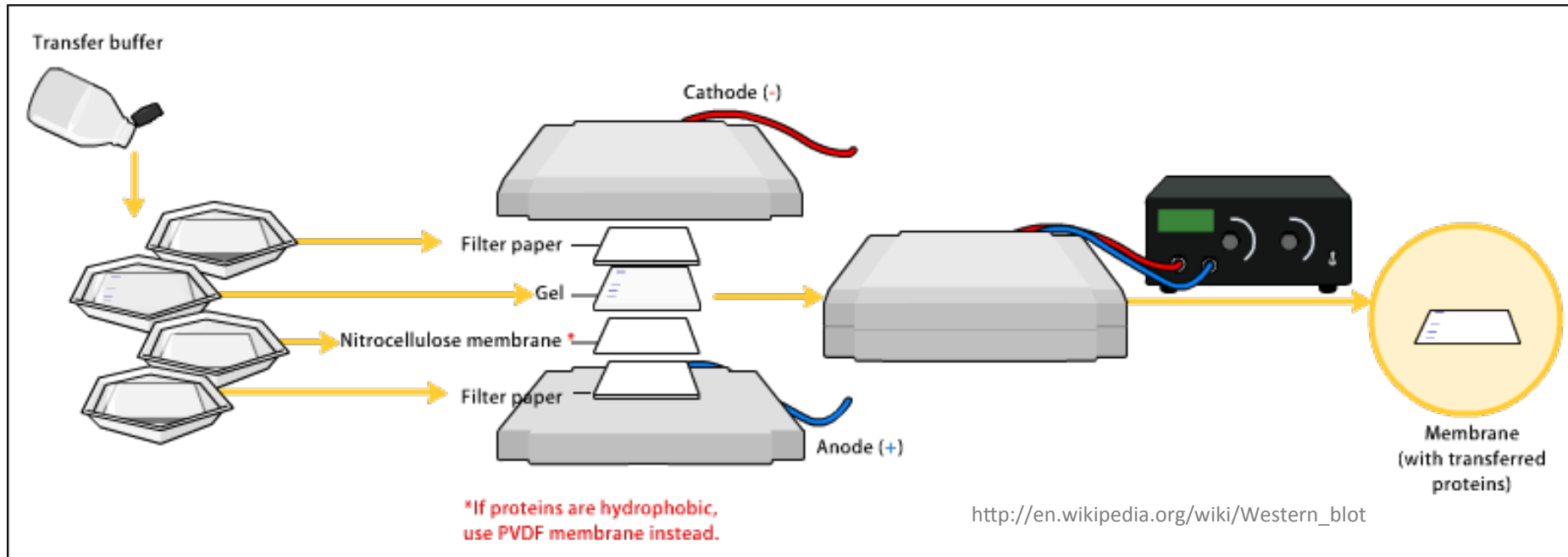
## **Prenos Eastern**

Kot western prenos, le da gre kasneje za detekcijo specifičnih postranslacijskih modifikacij na proteinih (lipidi, fosforilacija, glikozilacija)

## **Prenos Southern**

Prenos DNA molekul iz gela na membrano

# Western prenos (angl. Western blotting)

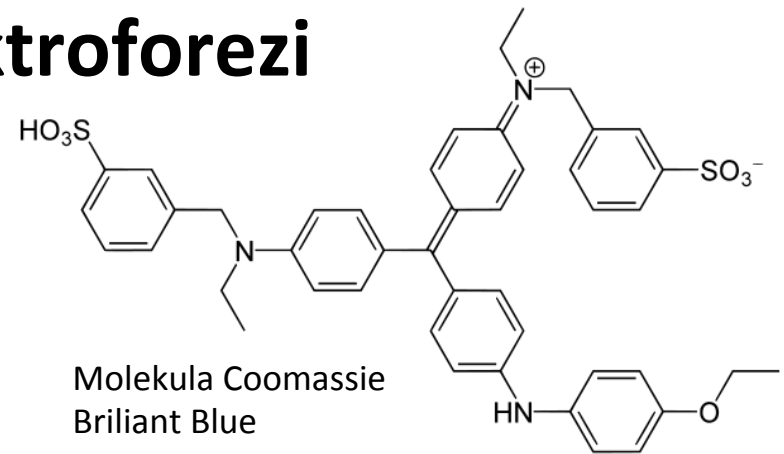


- Po elektroforski ločbi vzorca na poliakrilamidnem gelu proteine **s pomočjo električnega toka prenesemo na membrano** (nitrocelulozno (NC) ali polivinil difluoridno (PVDF)).
- Negativno nabiti proteini bodo potovali **proti pozitivni anodi**.
- Primerno za prenos proteinov na membrano po nativni ali NaDS – PAGE.
- Proteini vezani na membrano so primerni za nadaljnje analize (npr. detekcija s protitelesi).

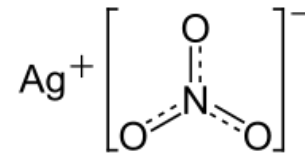
# Detekcija proteinov po elektroforezi

Proteine nespecifično barvamo z barvili kot so:

- **Coomassie Brilliant Blue** (običajno se bolj veže na nabite skupine lizina, arginina ali histidina).
  - detekcija (1 ug)
- Barvanje z **AgNO<sub>3</sub>**
  - Ag<sup>+</sup> se po vezavi na protein reducira do elementarnega srebra
  - detekcija 100-krat manjše količine proteinov kot s CBB (1 ng)
- Radioaktivno označene proteine detektiramo z **avtoradiografijo**.



[http://en.wikipedia.org/wiki/Coomassie\\_Brilliant\\_Blue](http://en.wikipedia.org/wiki/Coomassie_Brilliant_Blue)



---

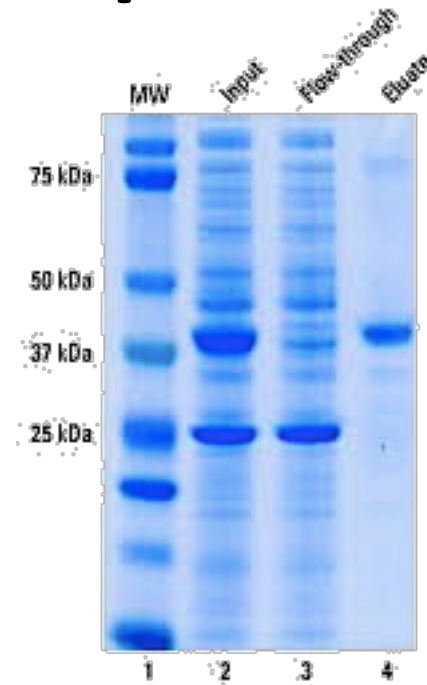
## Specifična detekcija proteinov :

- S substratom v gelu nativne PAGE. Dobljena slika se imenuje cimogram.
- S protitelesi



# Detekcija proteinov po elektroforezi

- Barvanje NaDS -  
poliakrilamidneg gela s  
**Coomassie Brilliant Blue**



- Barvanje z  $\text{AgNO}_3$

