

ELEKTROFORÉZA

enzymů a neenzymatických bílkovin

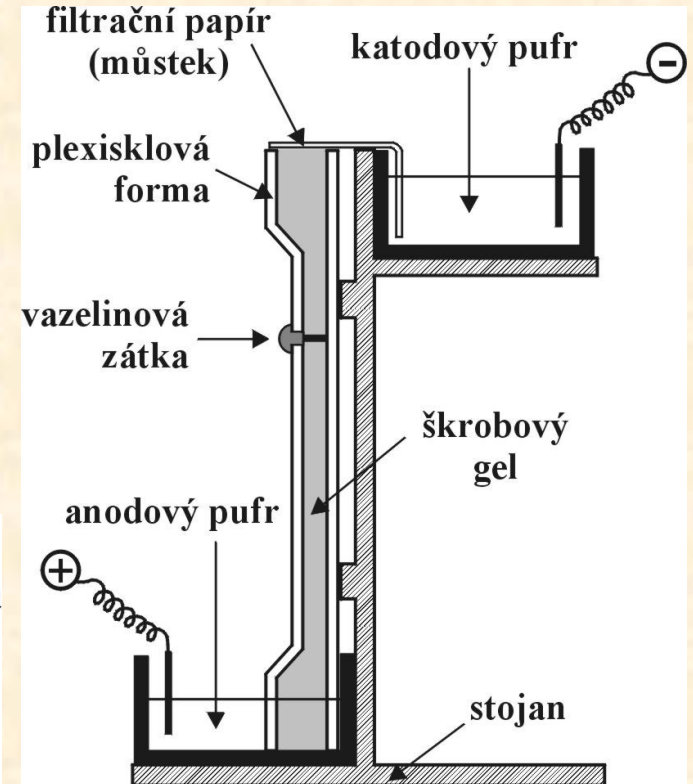
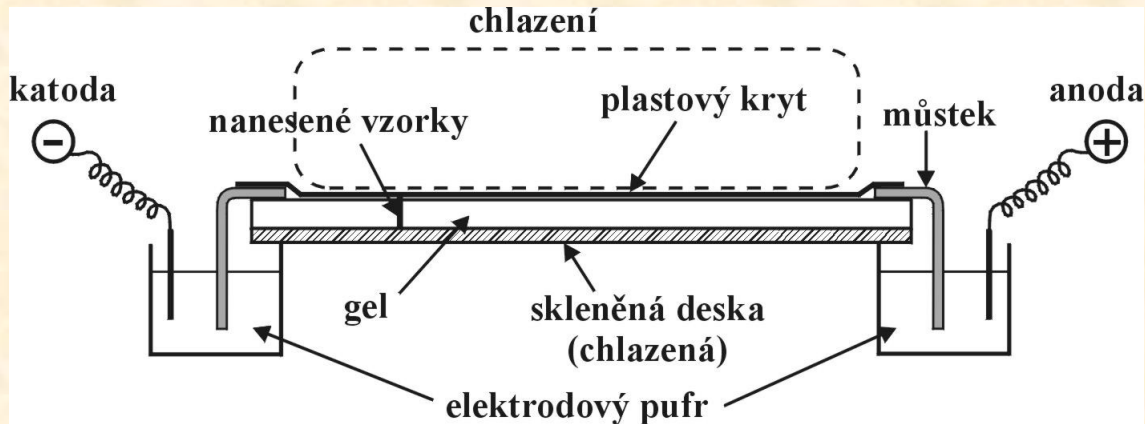
- Do konce 50. let genetická proměnlivost v populacích studována pouze na základě mendelovských morfologických znaků nebo polytenních chromozomů → **otázka, do jaké míry tyto jevy reprezentují skutečnou míru genetické proměnlivosti v přírodě**
- substituce aminokyselin (možno zjistit sekvencováním proteinů - 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 Waalsovy síly, vodíkové vazby, elektrostatické síly); pH pufru
- stabilizace el. náboje - specifický pufr s vysokou iontovou silou a pH co nerozdílnější od pl daného proteinu: pH 3-10, nejčastěji 6,5-



- 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 pufu

2 ELFO v diskontinuálním pufu (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 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)**
- **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:**

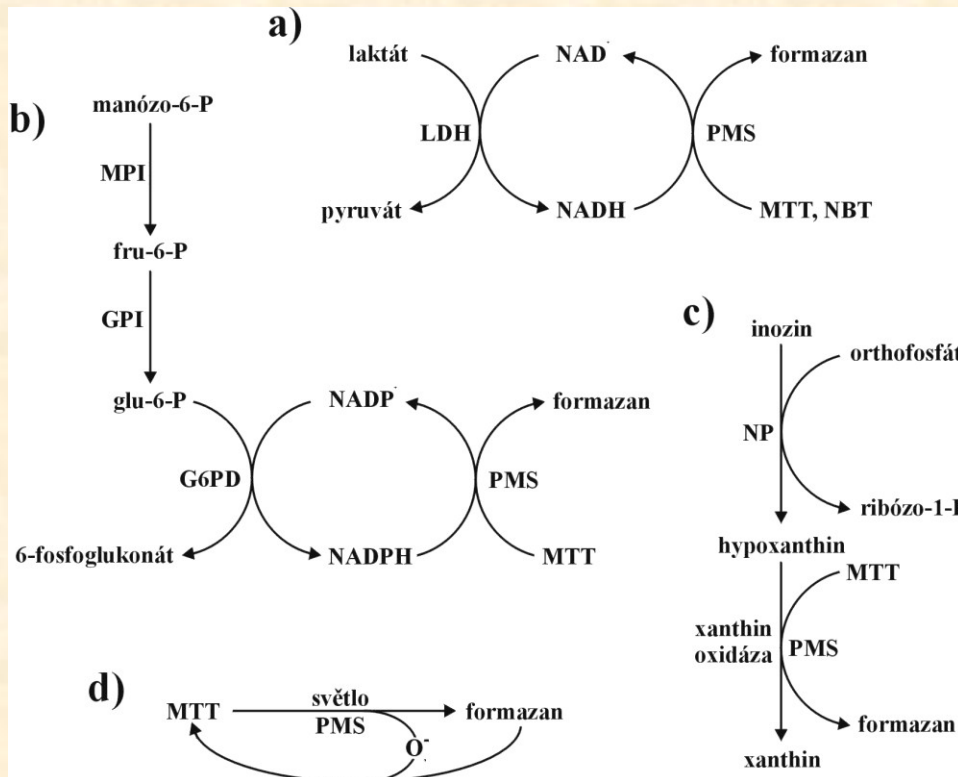
barviva pro glykoproteiny, lipoproteiny

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

