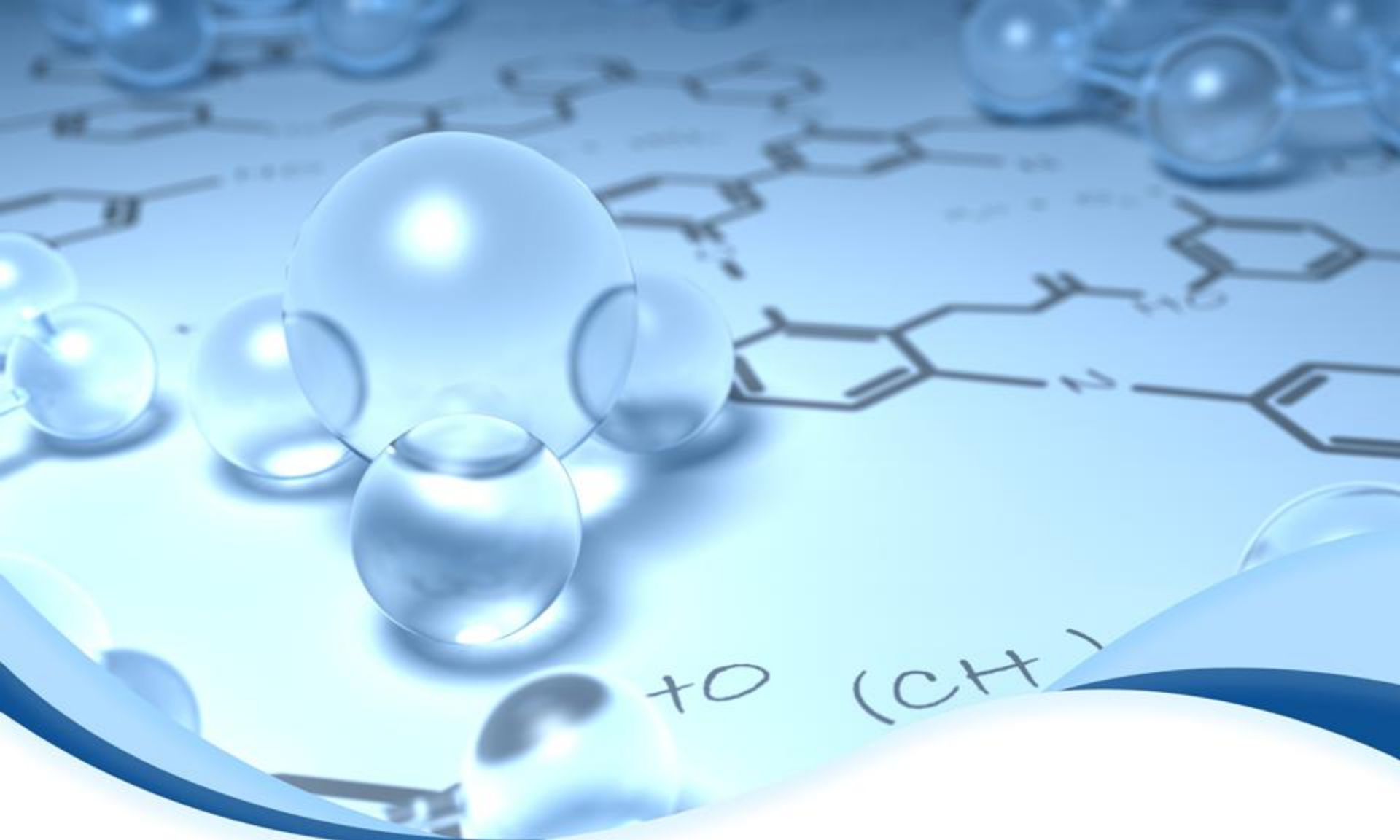




ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

м-р Пеце Шеровски

Основен принцип

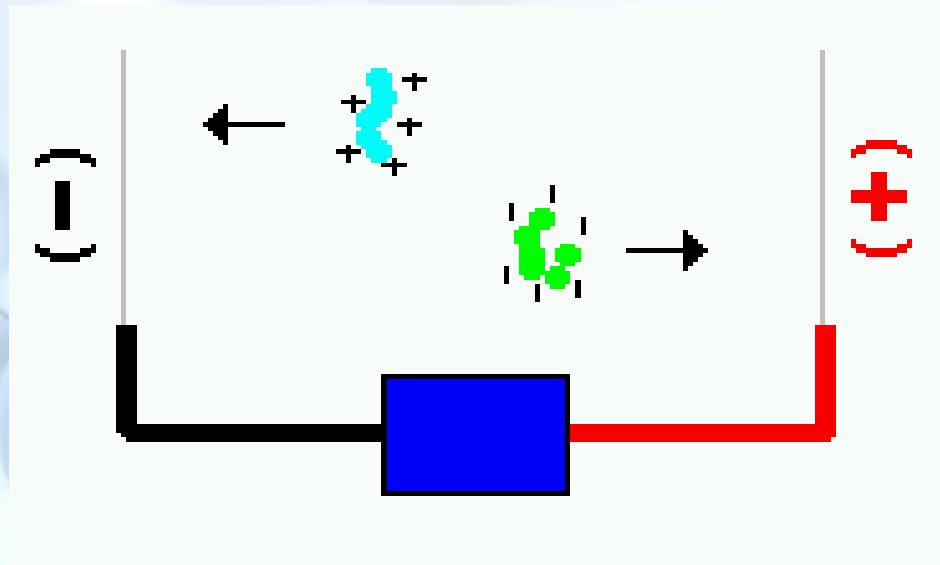
➤ Разделување на наелектризирани биомолекули под дејство на електрично поле.

Кои биомолекули?

- аминокиселини
- пептиди
- протеини
- нуклеински киселини

Основен принцип

- Разделување на наелектризирани биомолекули под дејство на електрично поле.
- Јонизабилните групи од овие молекули, при дадено рН, постојат како наелектризирани честички и тоа како анјони (со негативен полнеж) и како катјони (со позитивен полнеж)



Основен принцип

➤ Математички релации

- Силата којашто ги придвижува макромолекулите е електричниот потенцијал E
- Меѓутоа, постои и сила на триење f , која што предизвикува забавување на честичките
- Оваа сила зависи од: големината на честичките, нивната форма, порозноста и вискозноста на медиумот

The diagram illustrates the relationship between three variables in a mathematical equation. On the left, a box labeled "Брзина на движење на честичката" (Velocity of the particle) has an arrow pointing to the variable V in the equation $V = \frac{E}{f}$. On the right, two boxes are stacked vertically: "Електричен потенцијал" (Electric potential) and "Сила на триење" (Friction force). Arrows point from each of these boxes to the variables E and f in the equation, respectively.

$$V = \frac{E}{f}$$

Основен принцип

- Математички релации
- електрофоретска подвижност на молекулата (μ)

The diagram illustrates the mathematical relationship for electrophoretic mobility (μ). The central equation is
$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$
 Four labels in boxes are connected to the equation by arrows: 1. "Брзина на движење на честичката" (Velocity of the particle) points to V . 2. "Електричен потенцијал" (Electric potential) points to E . 3. "Полнеж на честичката" (Charge of the particle) points to Z . 4. "Сила на триење" (Frictional force) points to f .

Брзина на движење на честичката

Електричен потенцијал

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

Полнеж на честичката

Сила на триење

- честички кои имаат сличен полнеж може да имаат различна μ

Поделба на електрофорезата

- Електрофореза на хартија
- Електрофореза на целулоза ацетат (CAGE)
- Електрофореза на скробен гел
- Електрофореза на агар гел (AGE)
- Електрофореза на полиакриламиден гел (PAGE)
- Електрофореза со денатурирачки средства (SDS - PAGE)
- Изоелектрично фокусирање на полиакриламиден гел (PAGE IF)
- Диск електрофореза
- Капиларна електрофореза
- Дво-димензионална електрофореза (2DE)
- Чип електрофореза

Поделба на електрофорезата

Поделба според принципот на разделување

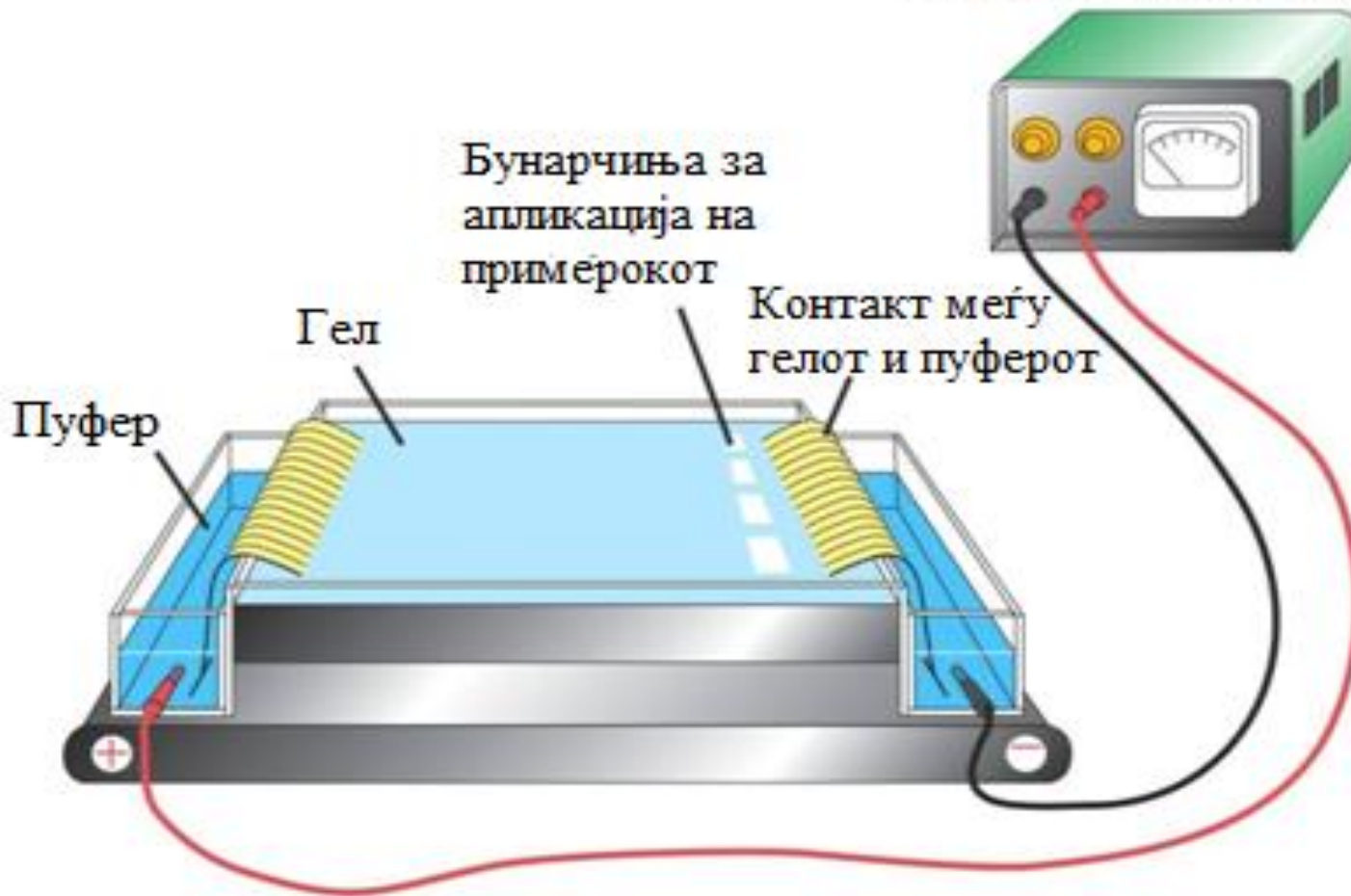
- **Изоелектрично фокусирање**
- **Денатурирачка електрофореза**
- **Неденатуриралча електрофореза**
- **Капиларна електрофореза**
- **Дво димензионална електрофореза**

Поделба според носачот

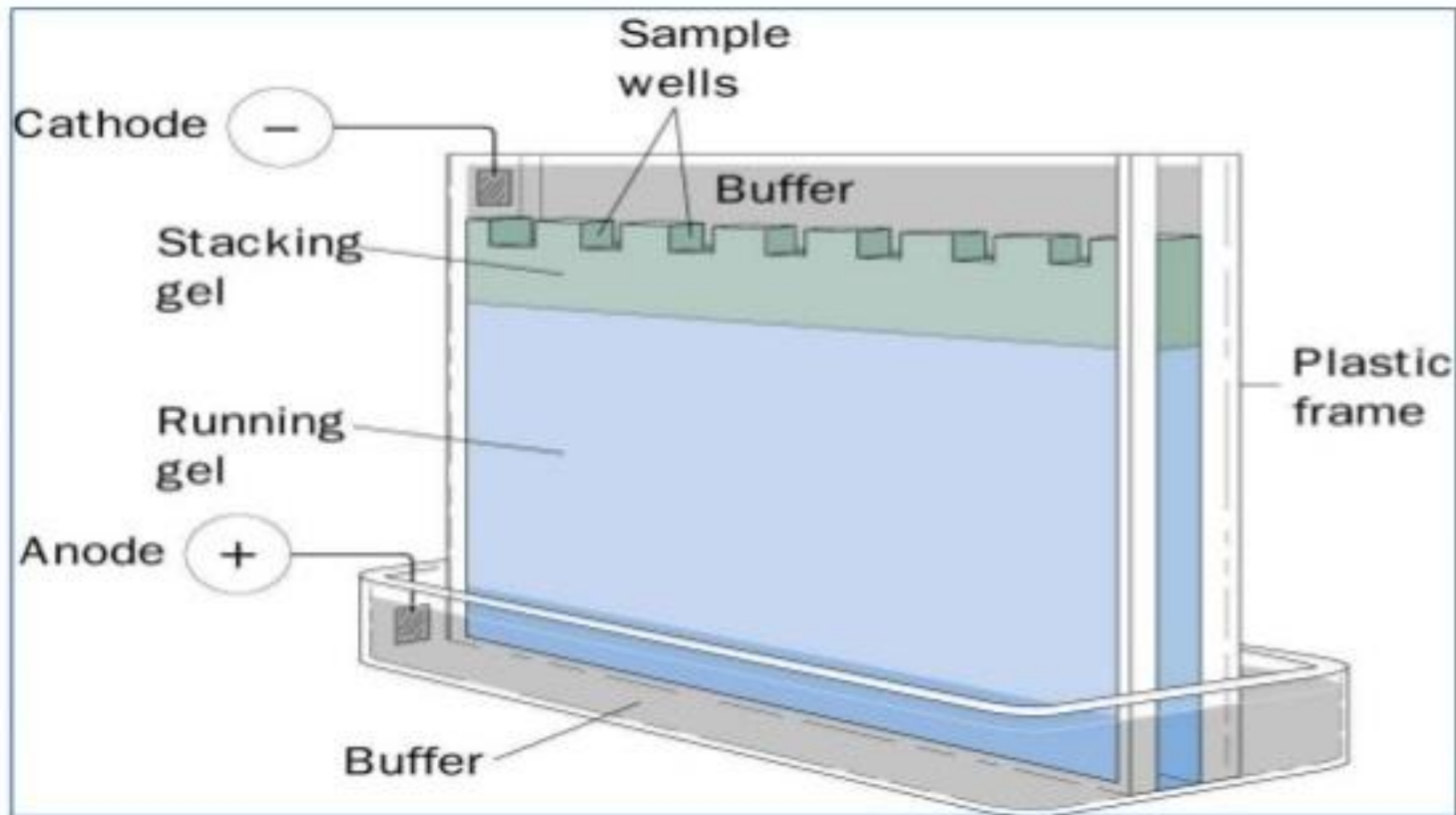
- **Електрофореза на хартија**
- **Електрофореза на целулоза ацетат**
- **Електрофореза на агарозен гел**
- **Електрофореза на полиакриламиден гел**

Инструментација

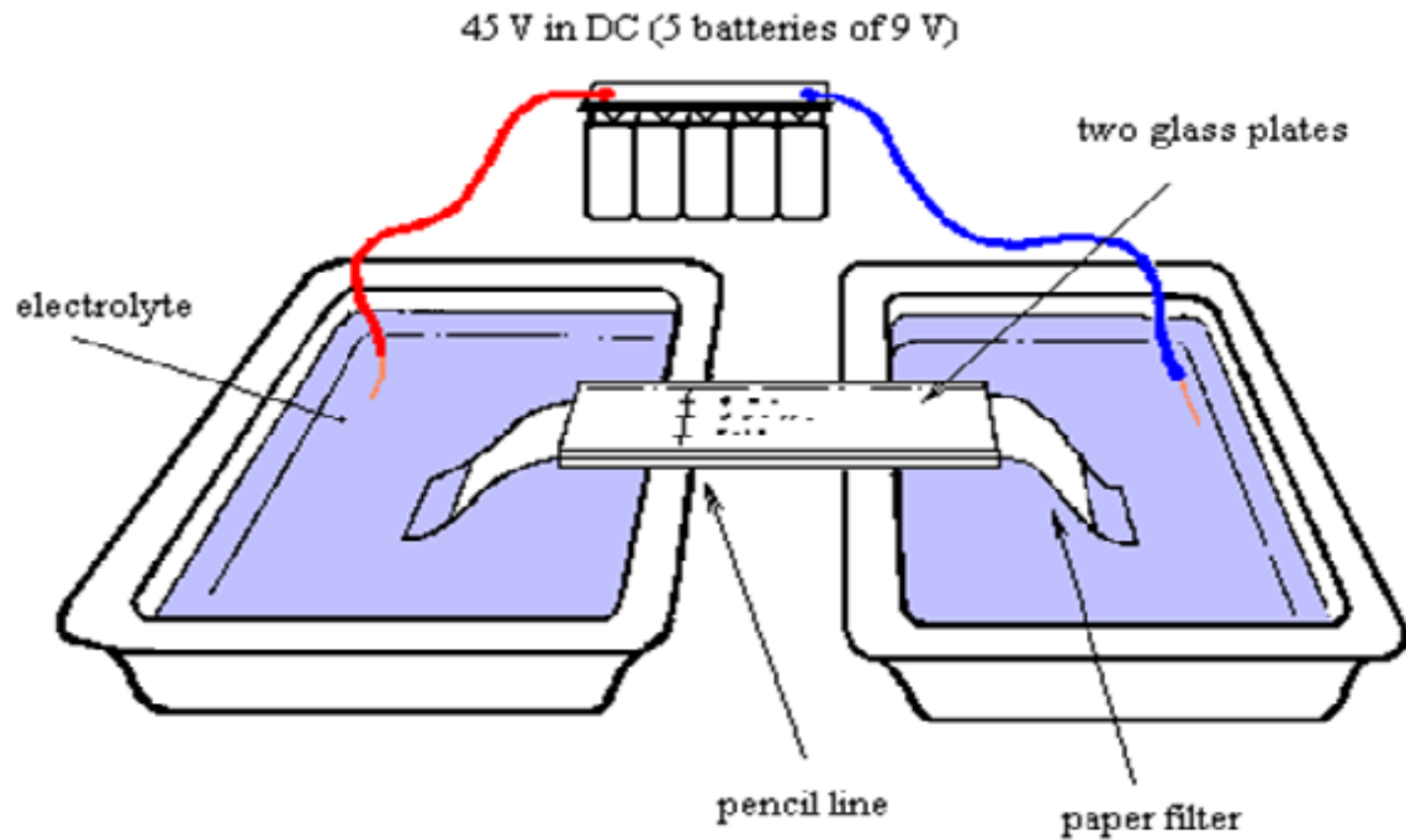
Извор на електрична струја



Инструментација

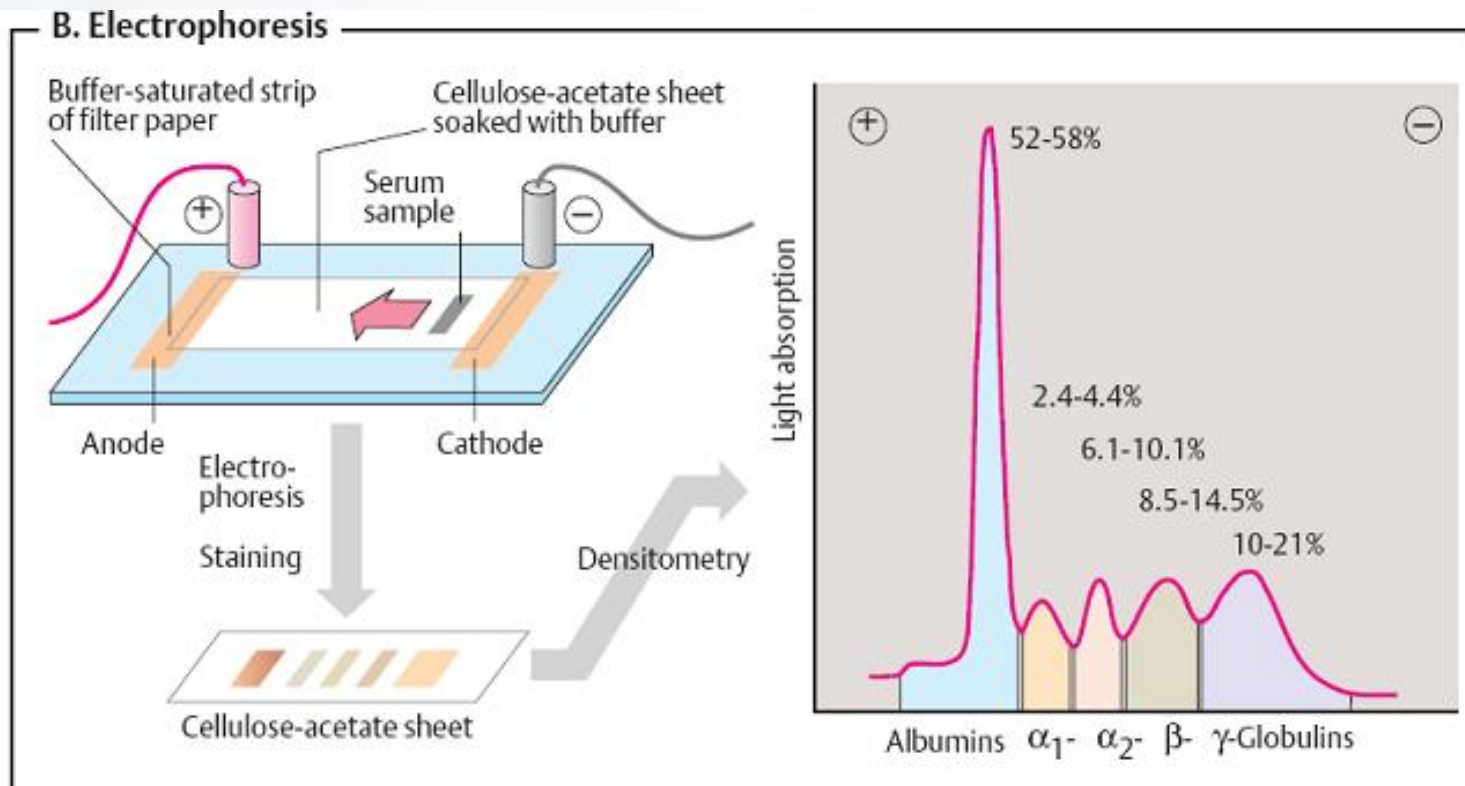


Електрофореза на хартија



Електрофореза на целулоза ацетат

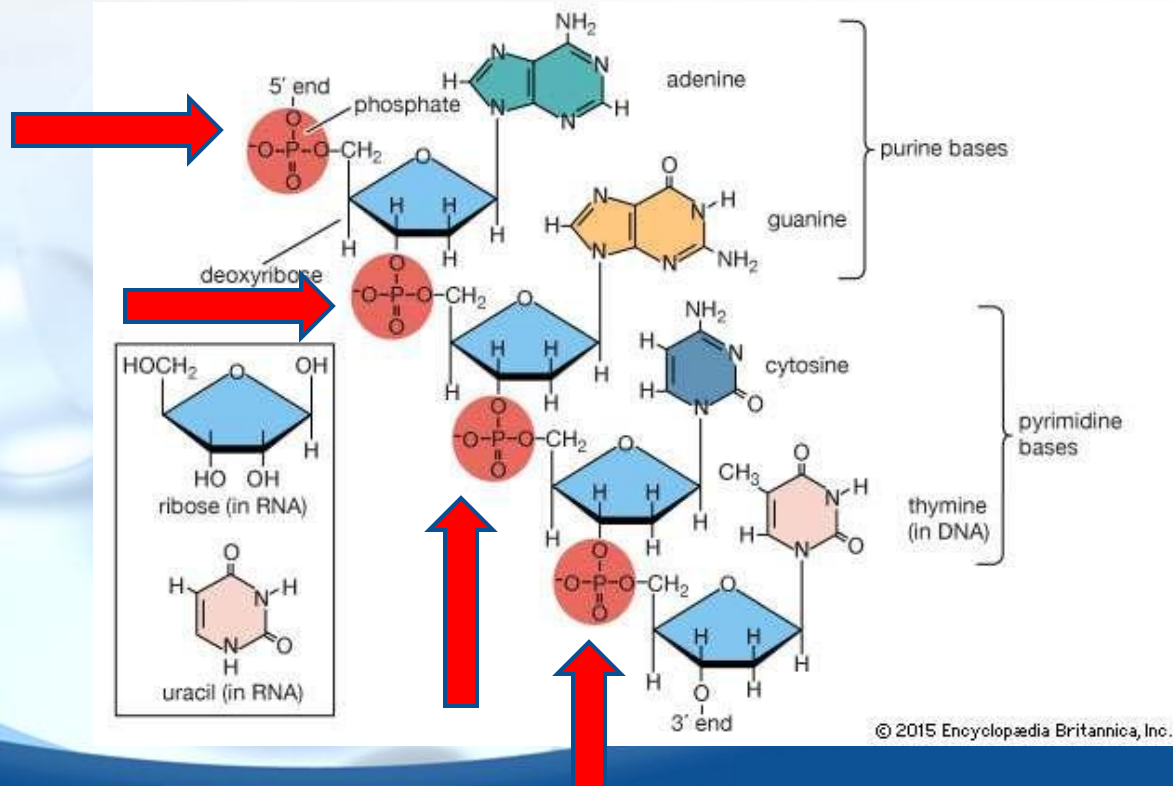
- Замена за електрофорезата на хатрија
- Анализа на протеини во серум



Електрофореза на агарозен гел

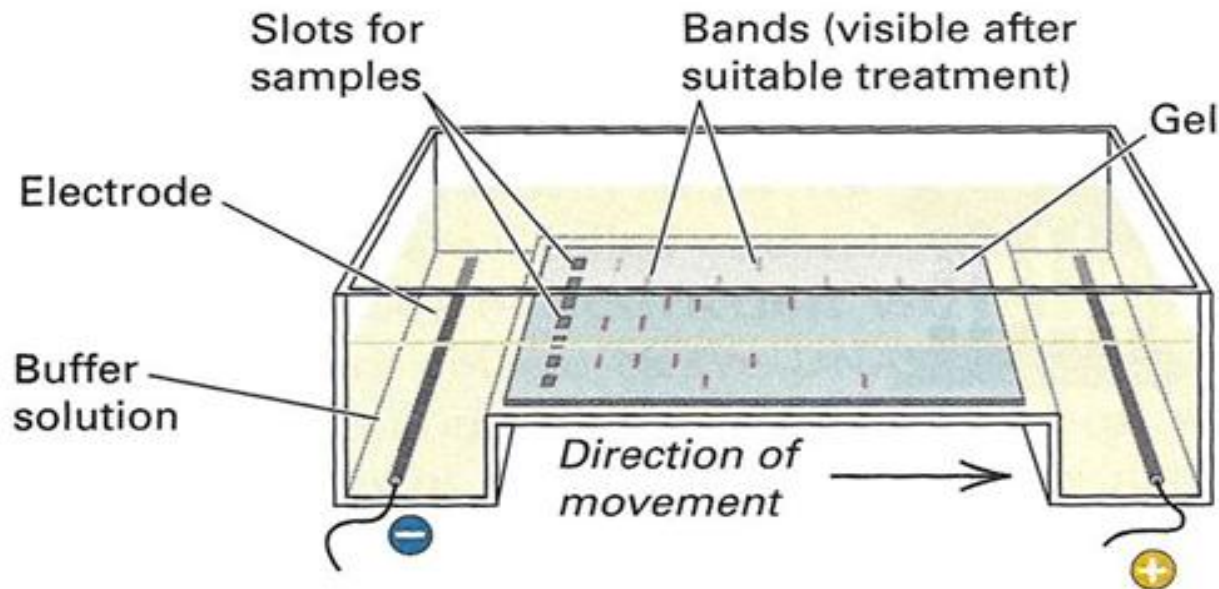
- Анализа на поголеми молекули како DNA и RNA
- Се разделуваат според природниот полнеж (неденатуирачка)

Од каде потекнува полнежот на DNA?



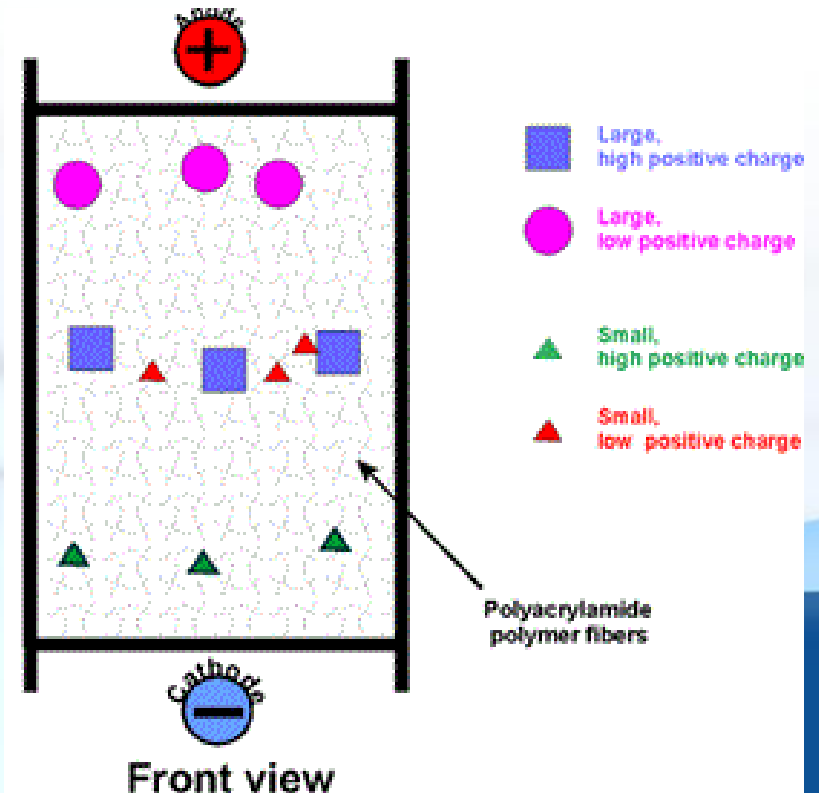
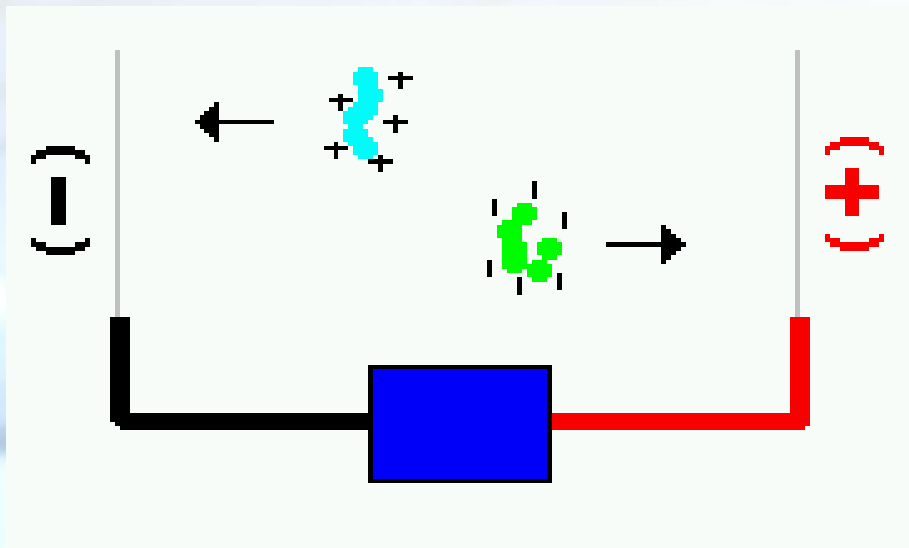
Електрофореза на агарозен гел

- Анализа на поголеми молекули како DNA и RNA
- Се разделуваат според природниот полнеж (неденатуирачка)
- Големината на порите зависи од концентрацијата
- Ниска точка на топење



Неденатуриращка електрофореза

Протеините се разделяват врз основа на полнежот, големината и формата



SDS-PAGE електрофореза

- **Основен принцип:**

Разделување на наелектризирани биомолекули под дејство на електрично поле врз основа на нивната молекулска маса

- **Денатурирачка електрофореза**

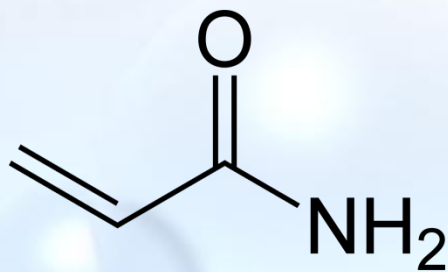
- **Носач: полиакриламиден гел**

Чекори при изведување на SDS-PAGE

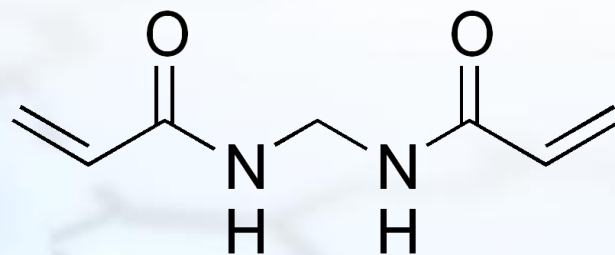
- 1. Подготовка на гелот**
- 2. Обработка на примерокот**
- 3. Апликација на примерокот**
- 4. Тек на електрофорезата**
- 5. Фиксирање на гелот**
- 6. Боење на гелот**
- 7. Обезбојувањ на делот**
- 8. Обработка на податоците**

1. Подготовка на гелот

➤ Полимер составен од акриламид и бис акриламид (N,N' - метилен бисакриламид)



Акриламид



N,N' - метилен бисакриламид

1. Подготовка на гелот

Супстанции:

Акриламид

N,N' - метилен бисакриламид

Амониум персулфат $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$

N,N,N',N' -тетраметилендиамин (TEMED)

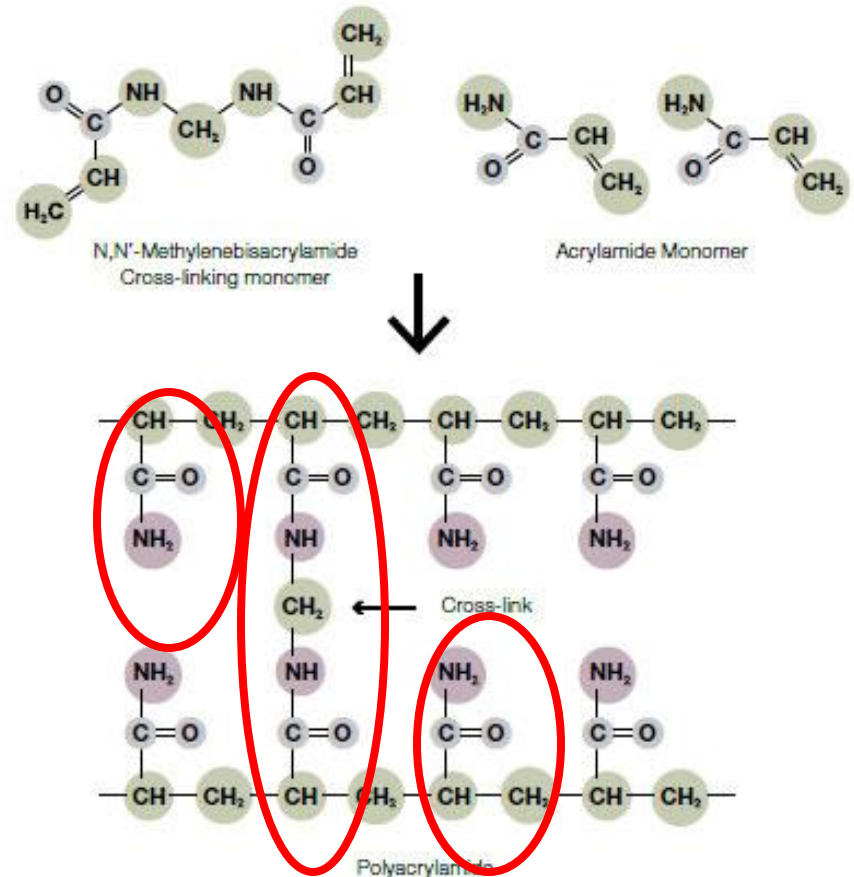
Пуфер

Која е улогата на секоја од нив?

1. Подготовка на гелот

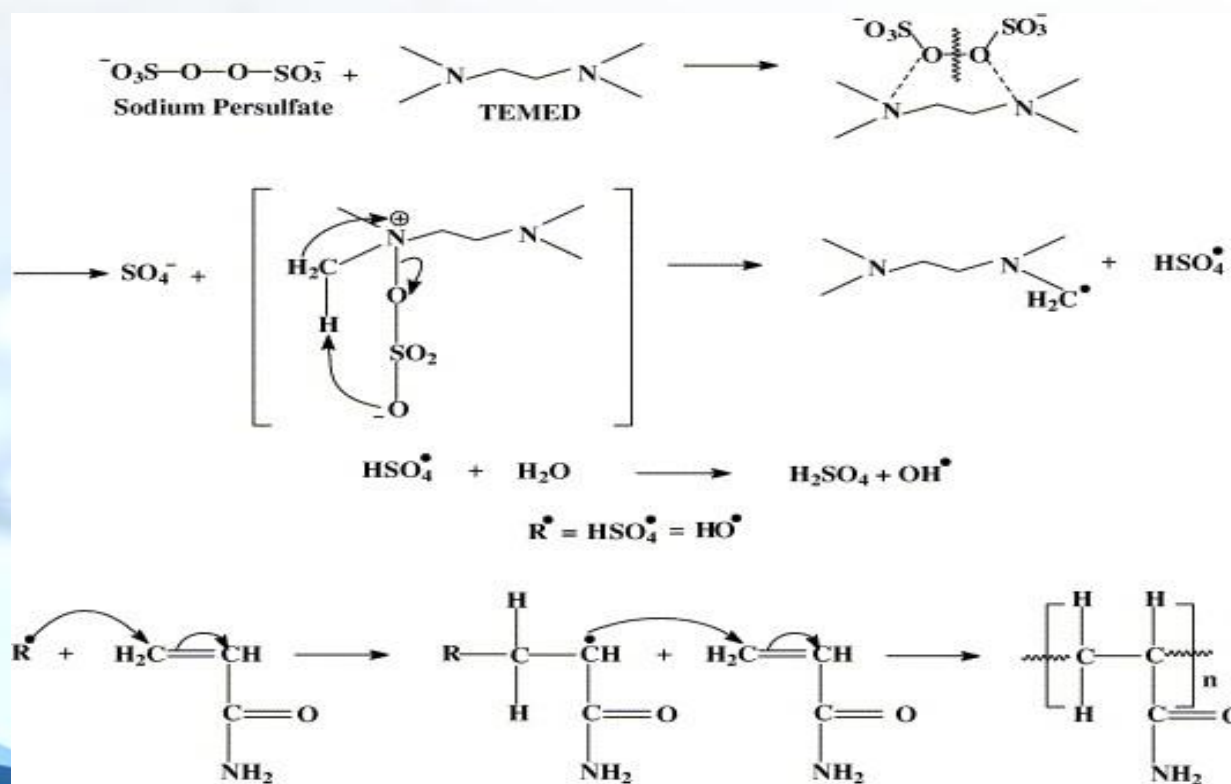
- Акриламид – формира долги низи
- *N,N'* - метилен бисакриламид – поврзување на полимерните низи и формирање на пори
- Амониум персулфат и TEMED

формирање на слободни радикали за отпочнување на процесот на полиемеризација

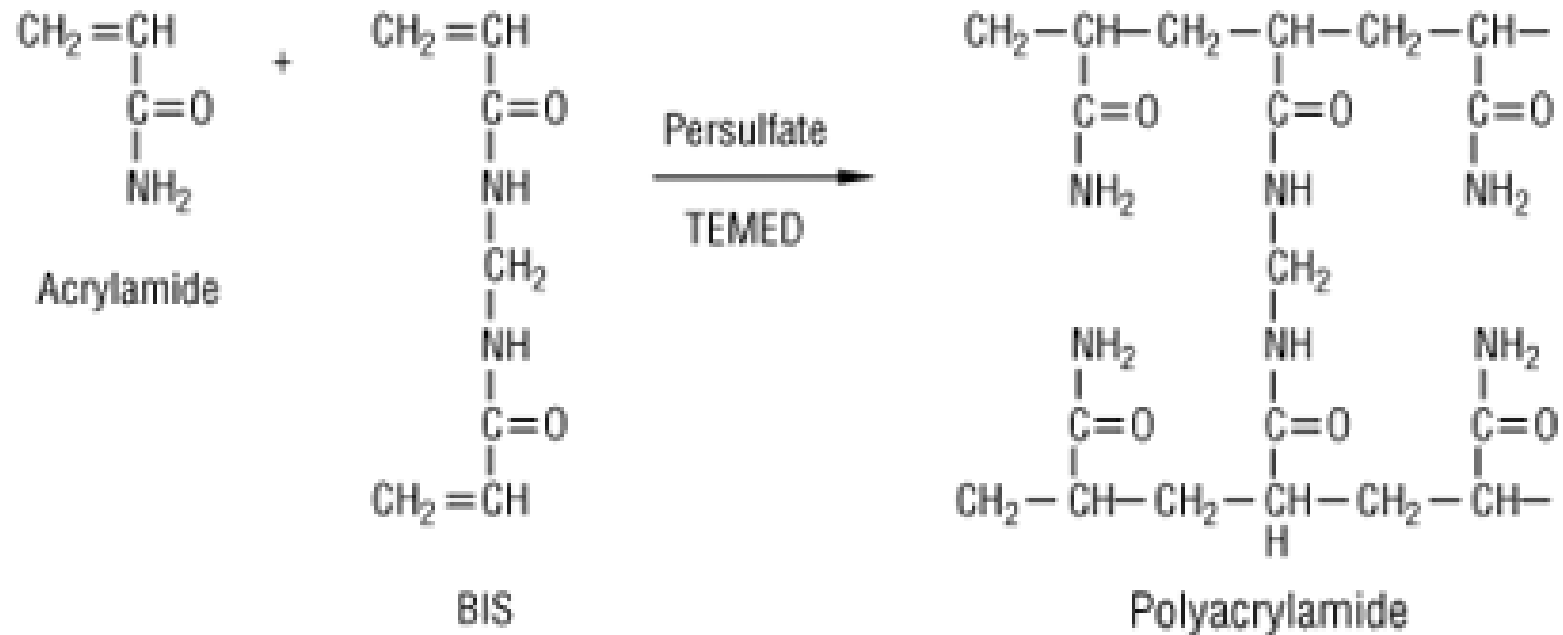


1. Подготовка на гелот

- TEMED поттикнува добивање на слободен радикал од персулфатниот јон
- Добиениот слободен радикал веднаш реагира со молекула на акриламид
- Верижна реакција

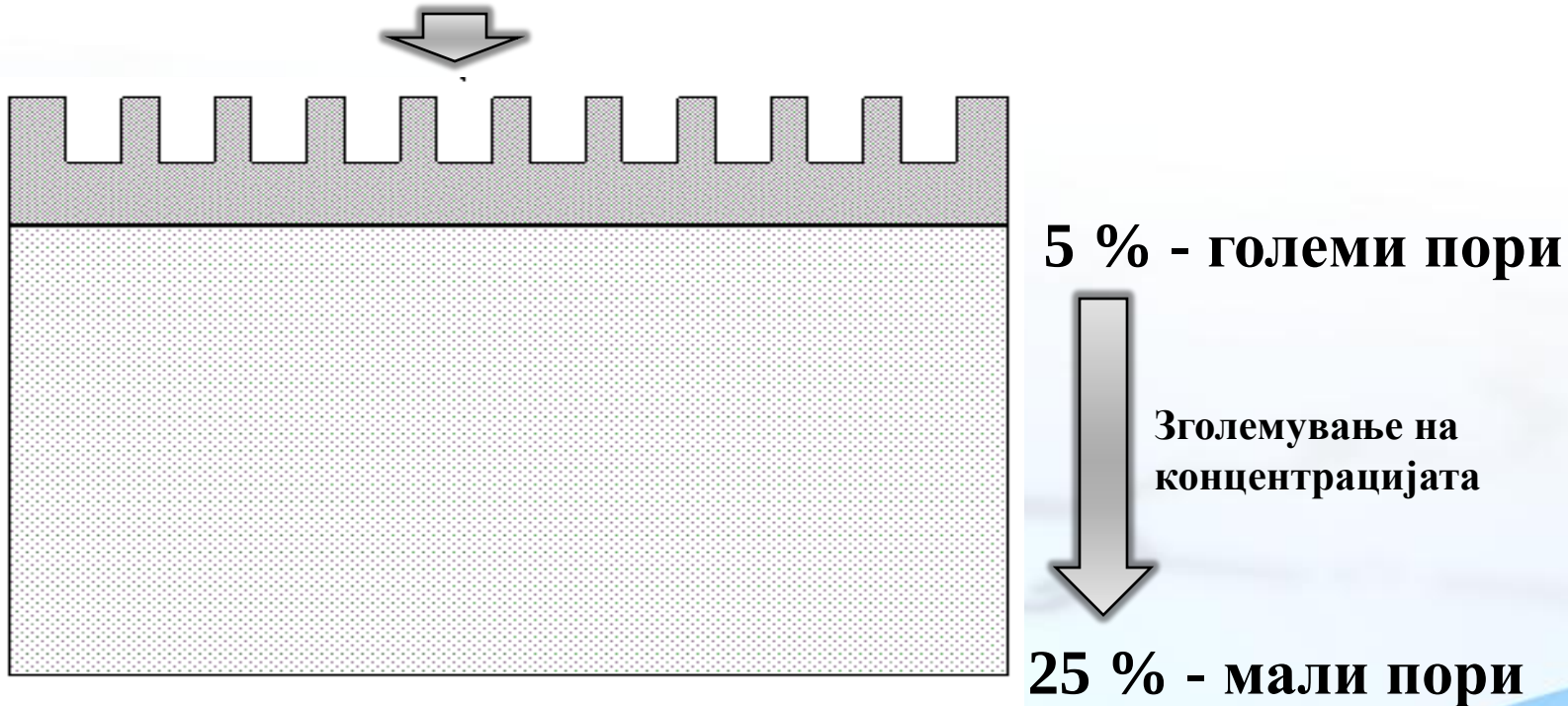


1. Подготовка на гелот



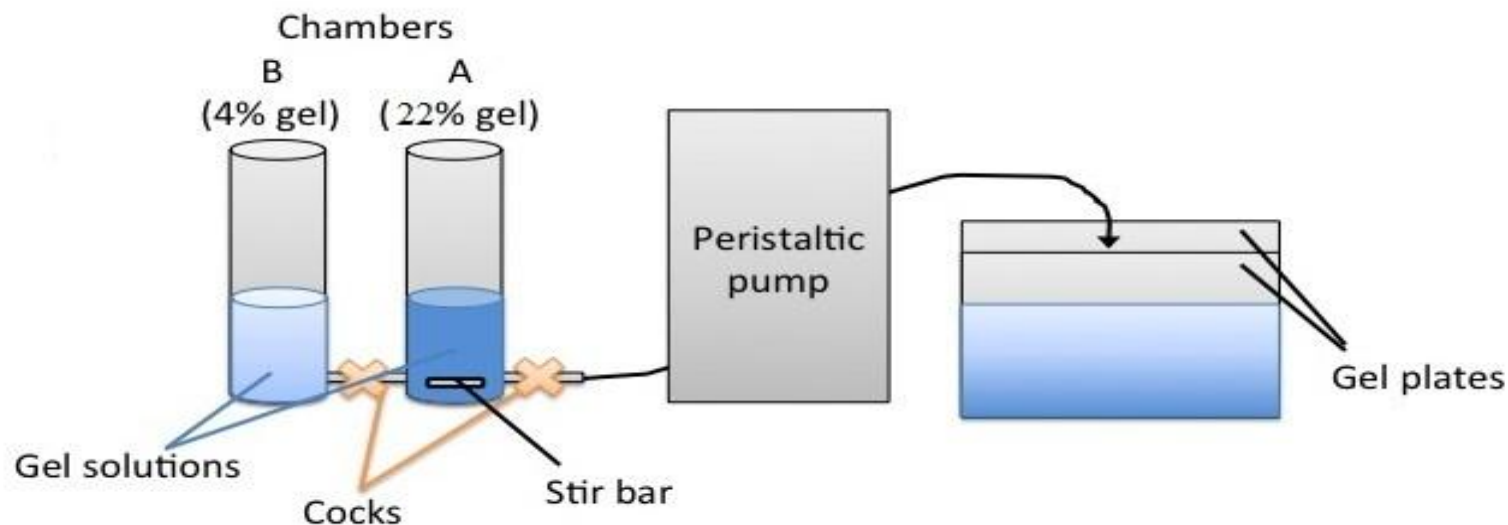
Градиентни гелови

Бунарчиња за апликација на примерок



- Висока резолуција
- Молекулите се разделуваат како низ сито
- Градиентот може да се менува

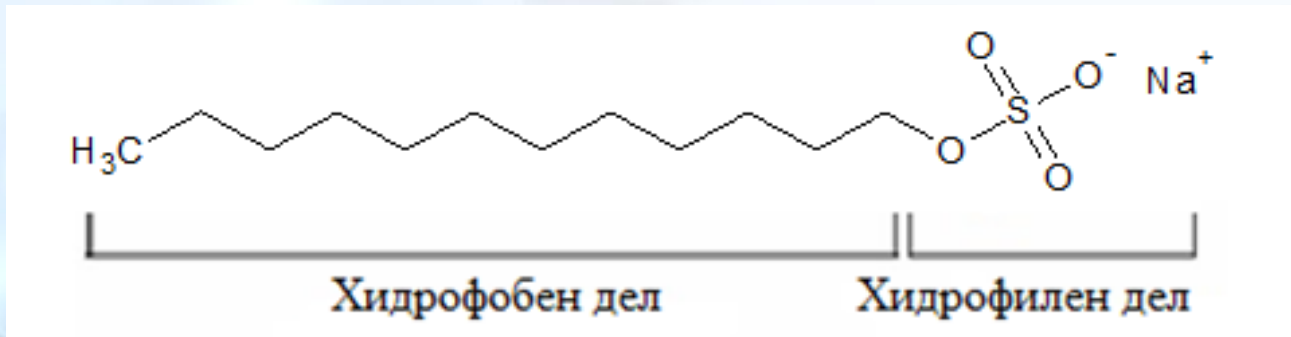
Градиентни гелови



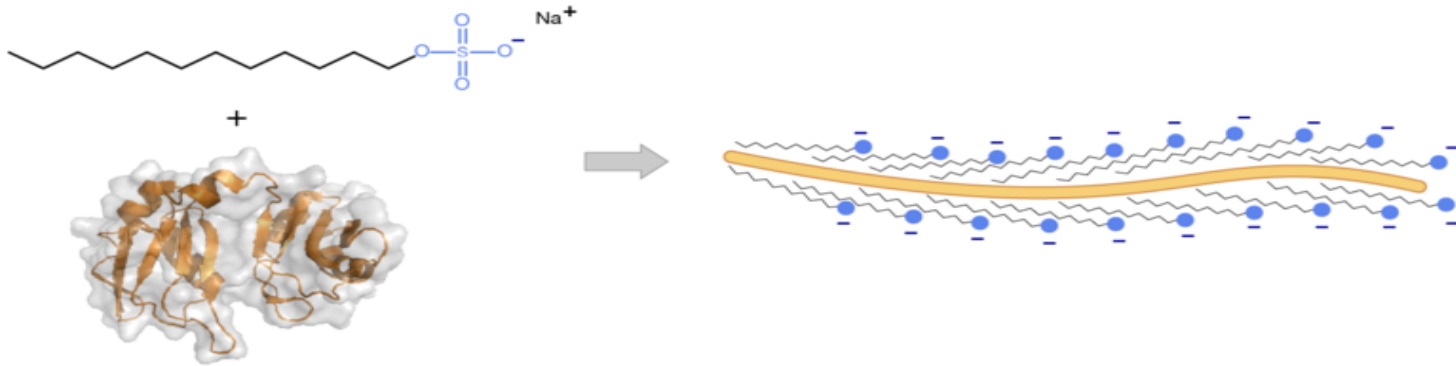
Супстанции	4 %	22 %
Акриламид 30 %	3 mL	7 mL
Вода	13 mL	0 mL
Гел пуфер (1,5 M Tris, 0,01 M SDS, 0,001 M NaN ₃)	5,2 mL	2,5 mL
TEMED	8 µL	8 µL
0,35 M Амониум персулфат	20 µL	20 µL
Вкупен волумен	21 mL	9,5 mL

2. Обработка на примерокот

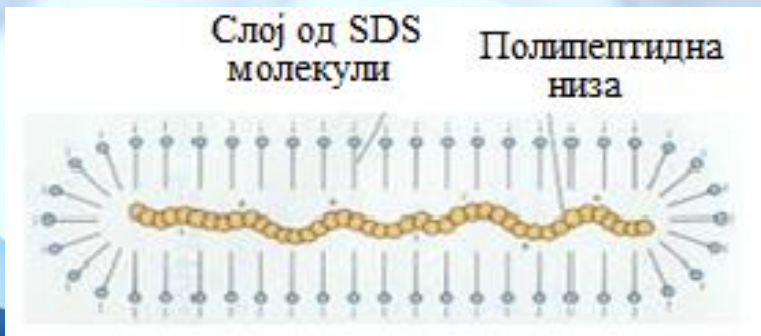
1. Денатурација на протеините со уреа (нарушување на секундарната и терцијарната структура)
2. Додавање на SDS – натриум додецил сулфат



2. Обработка на примерокот

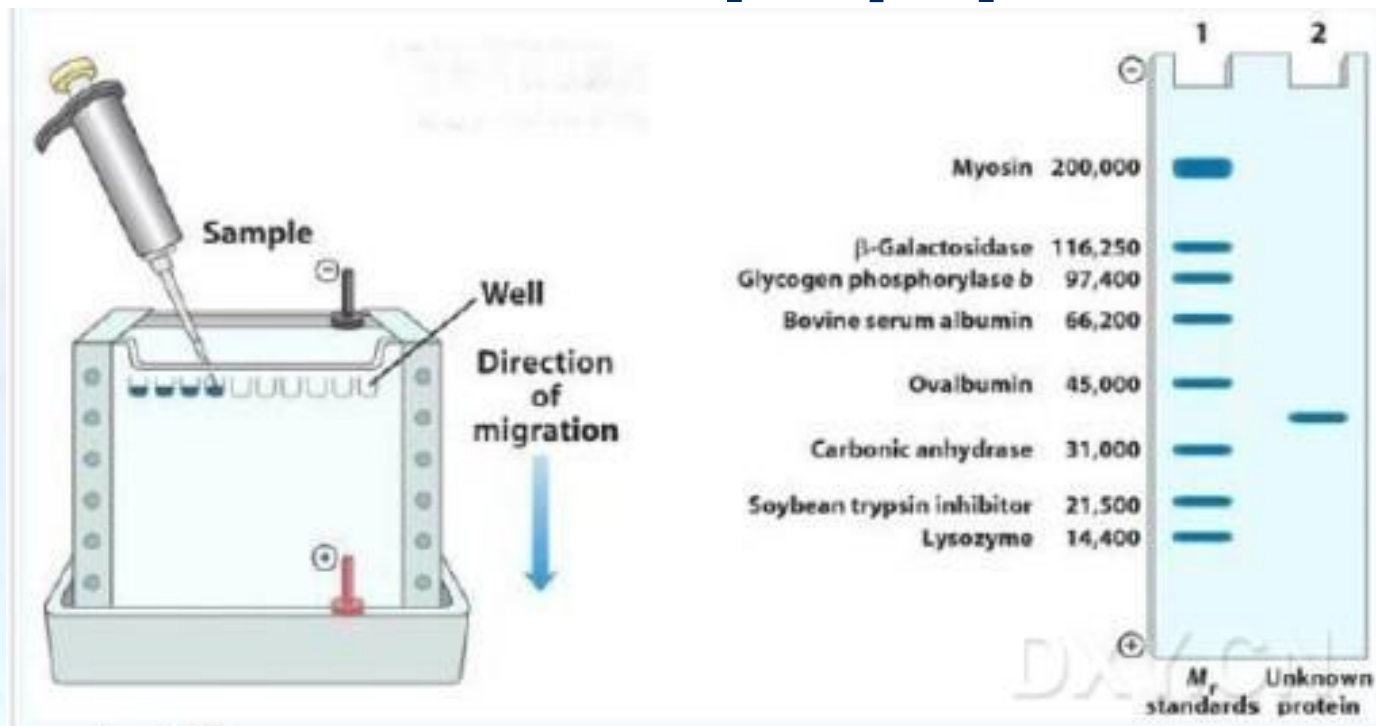


1. Протеините формираат низи
2. Имаат негативен полнеж по целата должина
3. Формираат еден вид на мицела



4. Апликација на примерокот

5. Тек на електрофорезата



- Протеините се движат кон анодата (400-600 V)
- Се разделуваат според молекулската маса
- За определување на нивната молекулска маса потребно е споредување со стандард

5. Фиксирање на гелот

Гелот се потопува во раствор составен од:

вода

формалдехид,

изопропанол

оцетна киселина

во текот на 20 min

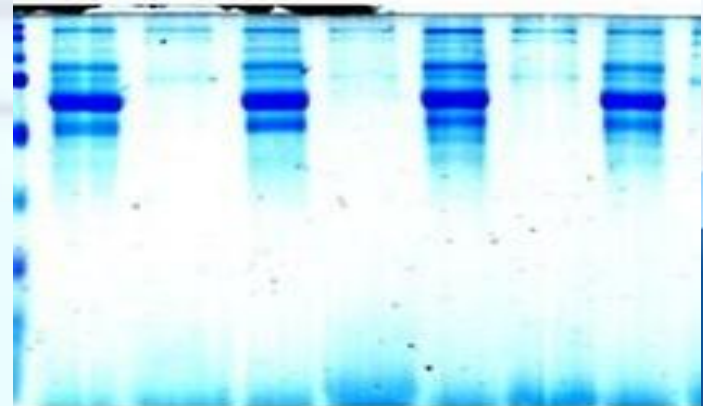
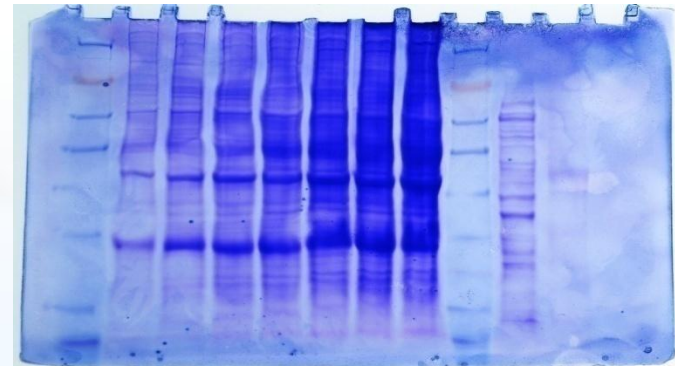
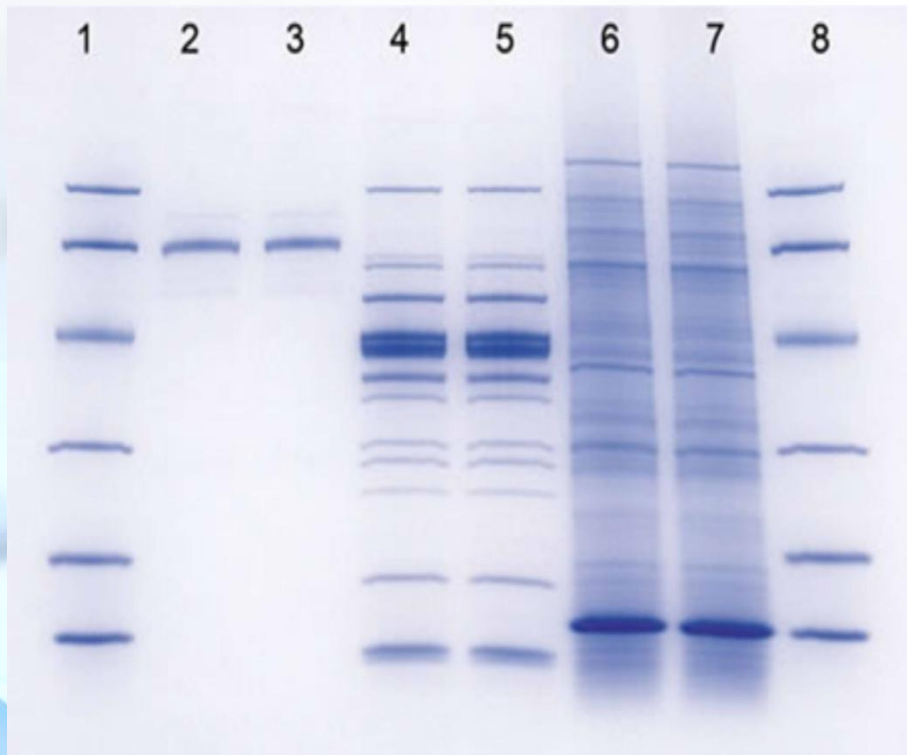
6. Боење на гелот

Потопување на гелот во алкохолен раствор на бојата Commassie brilijant blue R-250 во текот на 20 min



7. Обезбојување на гелот

Потопување во раствор составен од оцетна киселина и етанол



8. Сушење или скенирање

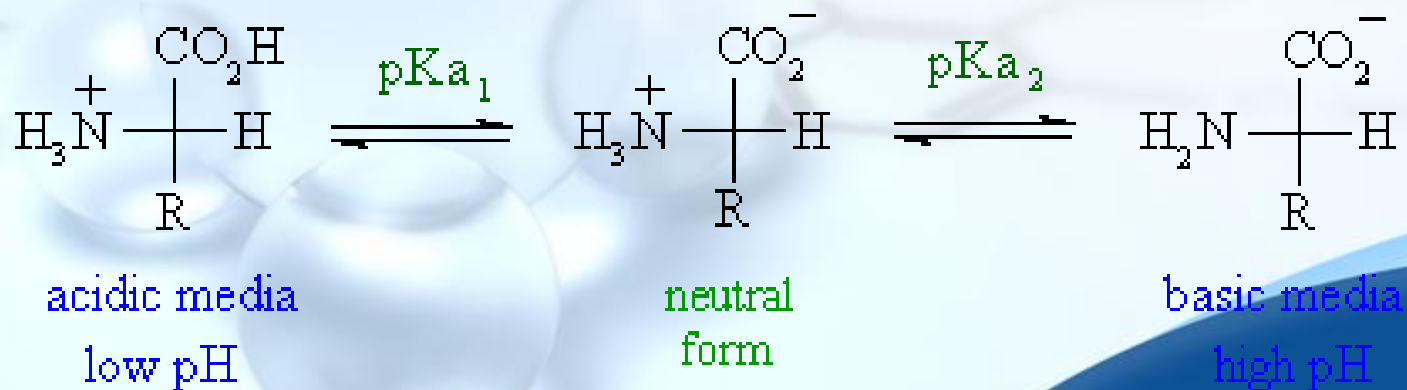
- **Сушење на гелот**
 - Гелот се става помеѓу две хидрофилни фолии
 - Се суши во gel dryer



- **Алтернативно – скенирање на гелот**

Изоелектрично фокусирање

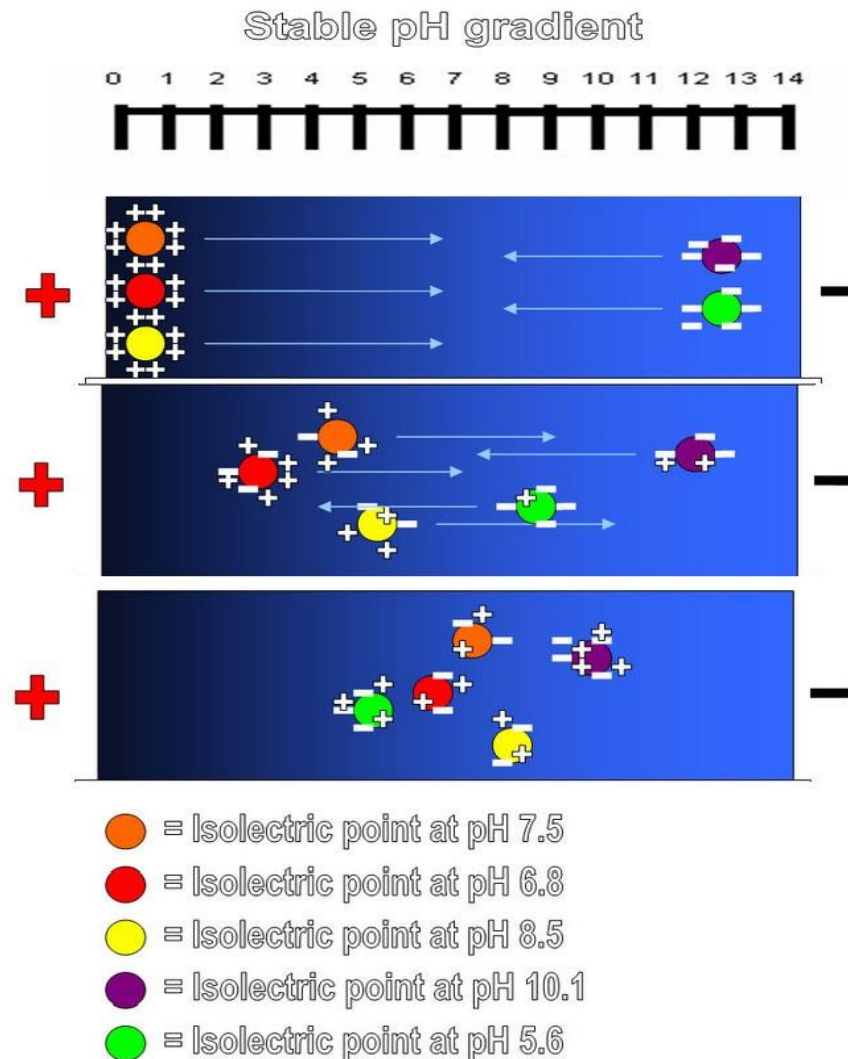
- Разделување на биомолекулите врз основа на нивната изоелектрична точка (pI)
- Што претставува pI?
 - pH при која протеинот се наоѓа во форма на цвитер јон (вкупниот полнеж е нула)



Изоелектрично фокусирање

- Носач: полиакриламиден гел во кој има додадени амфолити (полиамино поли карбоксилни соединенија)
- Протеините се разделуваат според изоелектричната точка
- При pH помала од pI протеините имаат позитивен полнеж и се движат кон катодата
- При pH поголена од pI протеините имаат негативен полнеж и се движат кон анодата

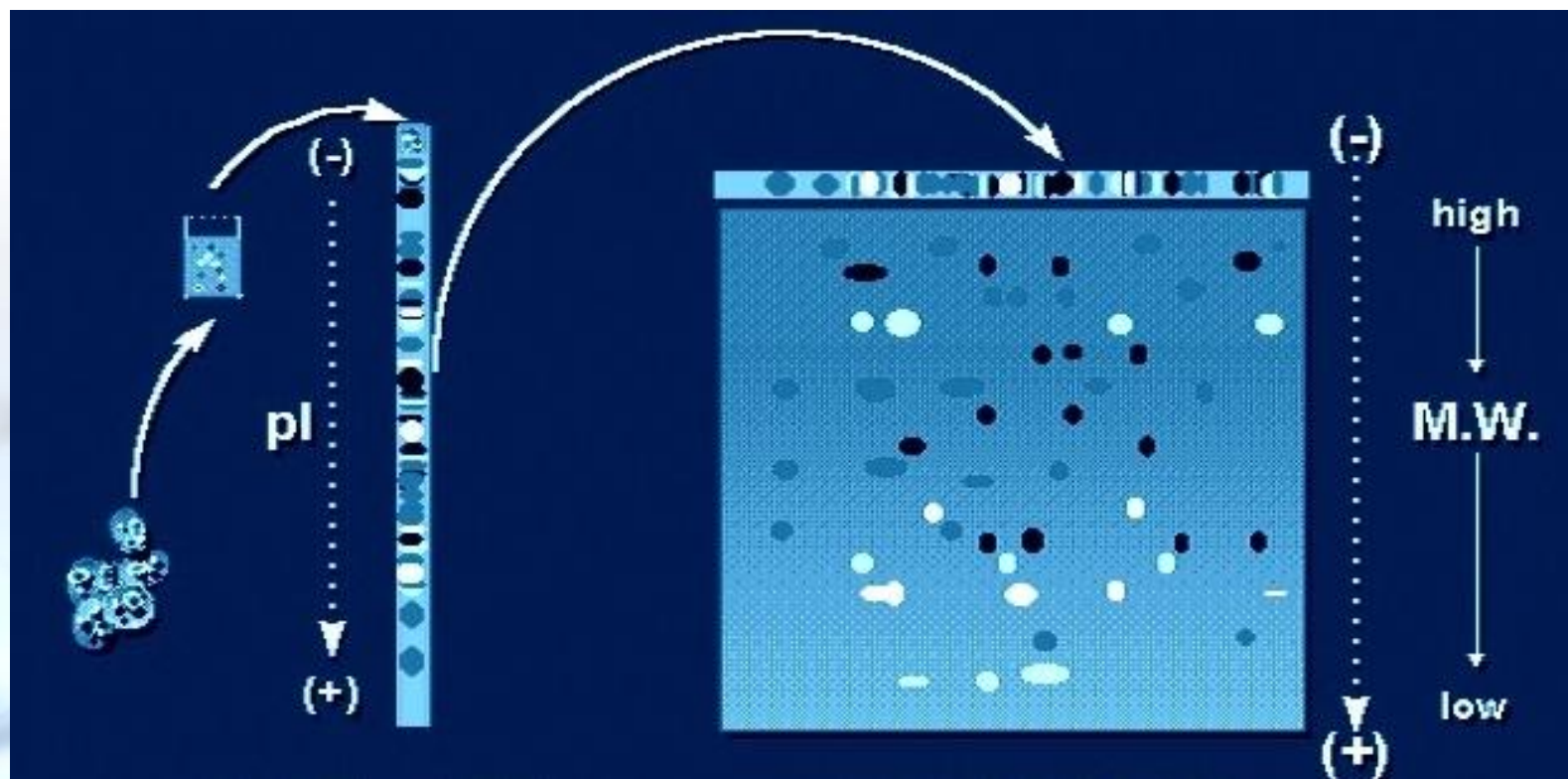
Изоелектрично фокусирање



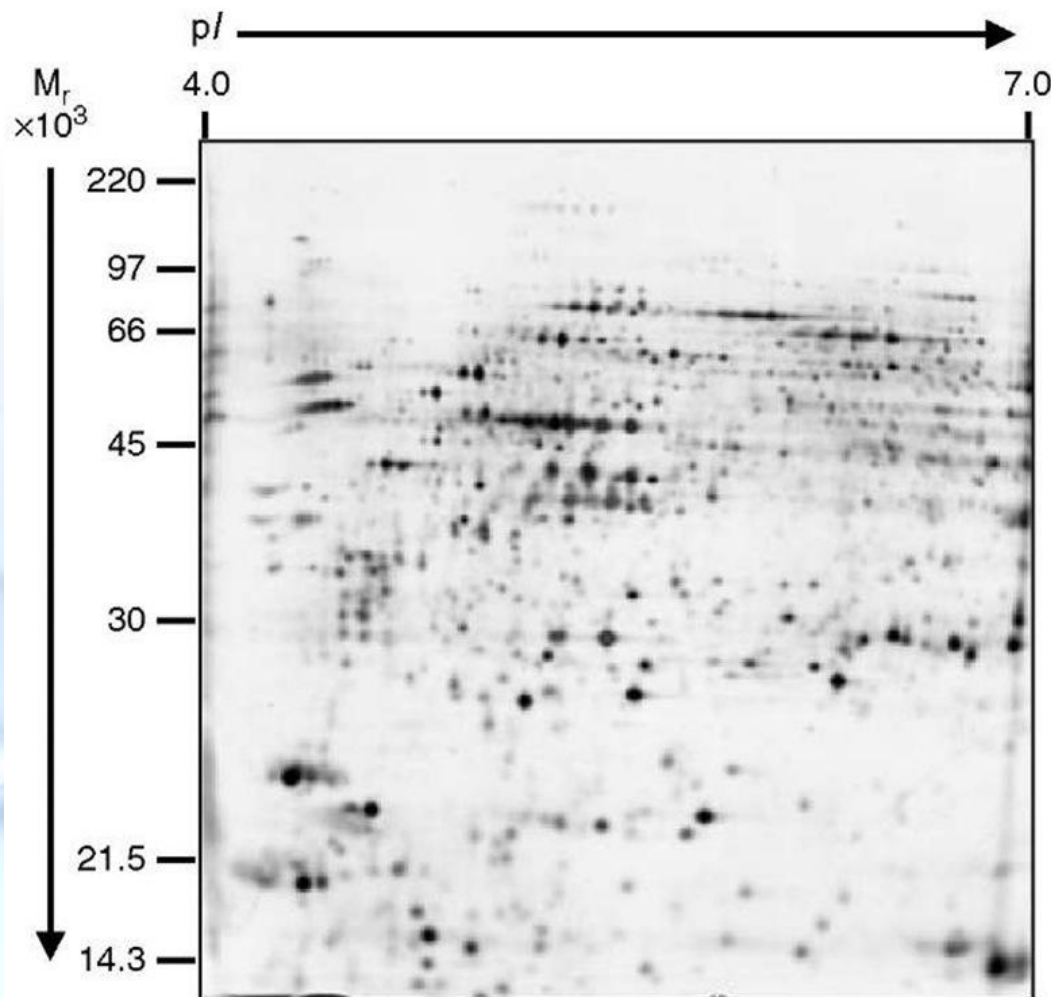
Дво димензионална електрофореза

- **Прва димензија: изоелектрично фокусирање**
- **Втора димензија: SDS-PAGE**
- **Многу висока резолуција**
- **Можност за разделување на илјадници протеини одеднаш**
- **Можност за трета димензија (спрегање со масена спектрометрија)**

Дво димензионална електрофореза



Дво димензионална електрофореза





Ви благодарам на вниманието !