WARNING

Materiały publikowane w formie „jest jak jest", mogą wymagać rozszerzenia lub komentarzy.

Elektroforeza

Grzyb Aleksandra, Kamińska Karolina

Cel prezentacji :

- Pojęcie elektroforezy
- Mechanizm elektroforezy
- Rodzaje elektroforezy
- Znaczenie praktyczne i diagnostyczne

Termin elektroforeza

- Ruch cząsteczek obdarzonych ładunkiem i jonów w polu elektrycznym
- Stosowana do rozdziału makrocząsteczek różniących się ładunkiem, rozmiarem, kształtem i zdolnością do tworzenia kompleksów np. DNA i białek

Rodzaje elektroforezy

- Elektroforeza strefowa

Najpowszechniejsza, przy stałej wartości pH elektrolitu, wykorzystuje ruchliwości elektroforetyczną jonów na nośniku w polu elektrycznym.

❖Izotachoforeza

Nieciągła wartość pH w nośniku, jony migrują pomiędzy dwoma systemami elektrolitów o różnej wartości pH (elektrolit wiodący, elektrolit zamykający).

W obszarze pomiędzy tymi dwoma elektrolitami znajdują się separowane makrojony.

❖Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)

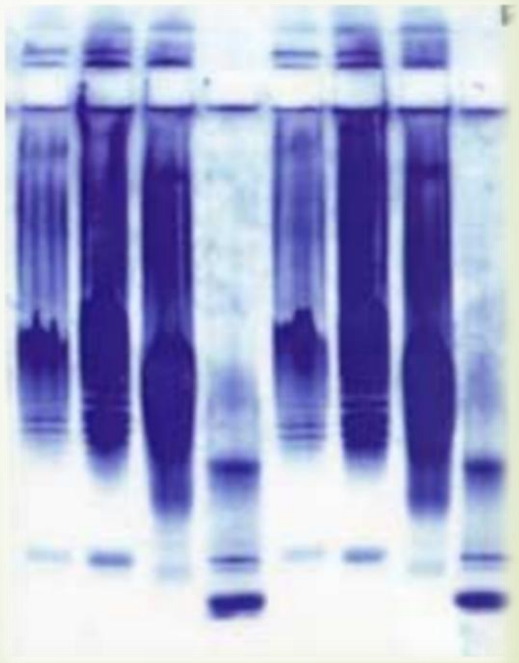
Wartość pH buforu zmienia się w sposób ciągły od wartości najwyższej przy katodzie do najniższej przy anodzie.

Białka i peptydy migrują w polu elektrycznym w kierunku elektrod o znaku przeciwnym ich ładunkowi.

Zmieniające się wartości pH elektrolitu zatrzymują je w miejscu, w którym pH=pI.

❖Elektroforeza natywna

Prowadzona zwykle w poliakrylamidzie w warunkach, w których makrocząsteczki pozostają niezdenaturowane.



Przykład elektroforezy białek w warunkach natywnych.

❖Elektroforeza w obecności SDS (siarczan dodecylu sodu)

Najczęściej stosowany dla separacji makromolekuł białkowych.

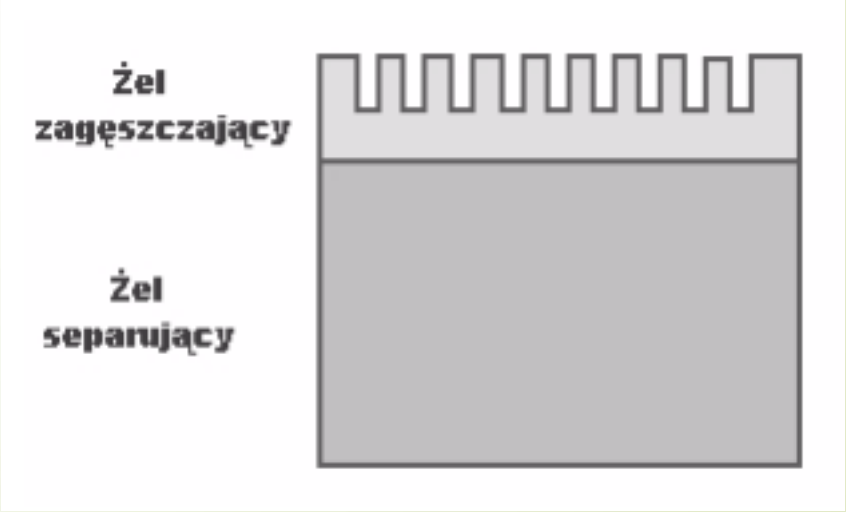
Substancja powierzchniowo czynna przyczynia się do znacznego poprawienia rozdzielczości techniki elektroforetycznej.

Barwienia kompleksów białko-SDS jest znacznie wydajniejsze niż samego białka, jego obecność eliminuje enzymatyczną degradację białek w trakcie separacji.

❖Elektroforeza nieciągła

Połączenie izotachoforezy z elektroforezą strefową, bardziej wydajna

W żelu zagęszczającym następuje izotachofereza, a separującym elektroforeza strefowa.

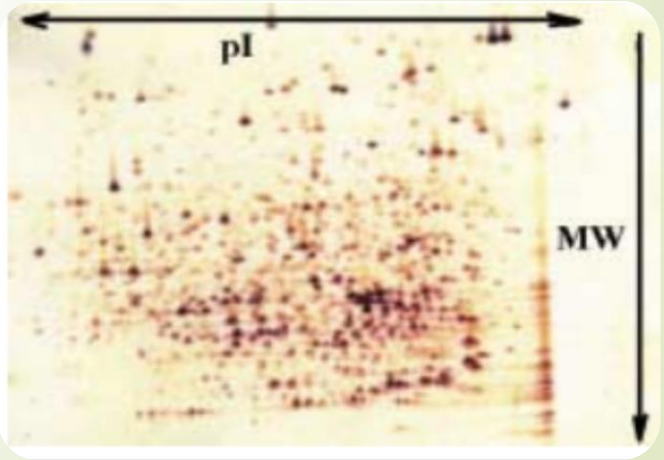


Schemat żelu do elektroforezy nieciągłej. Skład elektrolitów i wartość pH obu żeli oraz ich porowatości różnią się.

❖Elektroforeza dwukierunkowa

Złożona z trzech podstawowych rodzajów elektroforezy

- ✓ separacji białek techniką ogniskowania izoelektrycznego
- ✓ elektroforezę płytową w celu wykonania separacji według mas cząsteczkowych
- ✓ po zakończeniu procedur i wybarwieniu żelu uzyskuje się dwuwymiarową mapę rozkładu białek



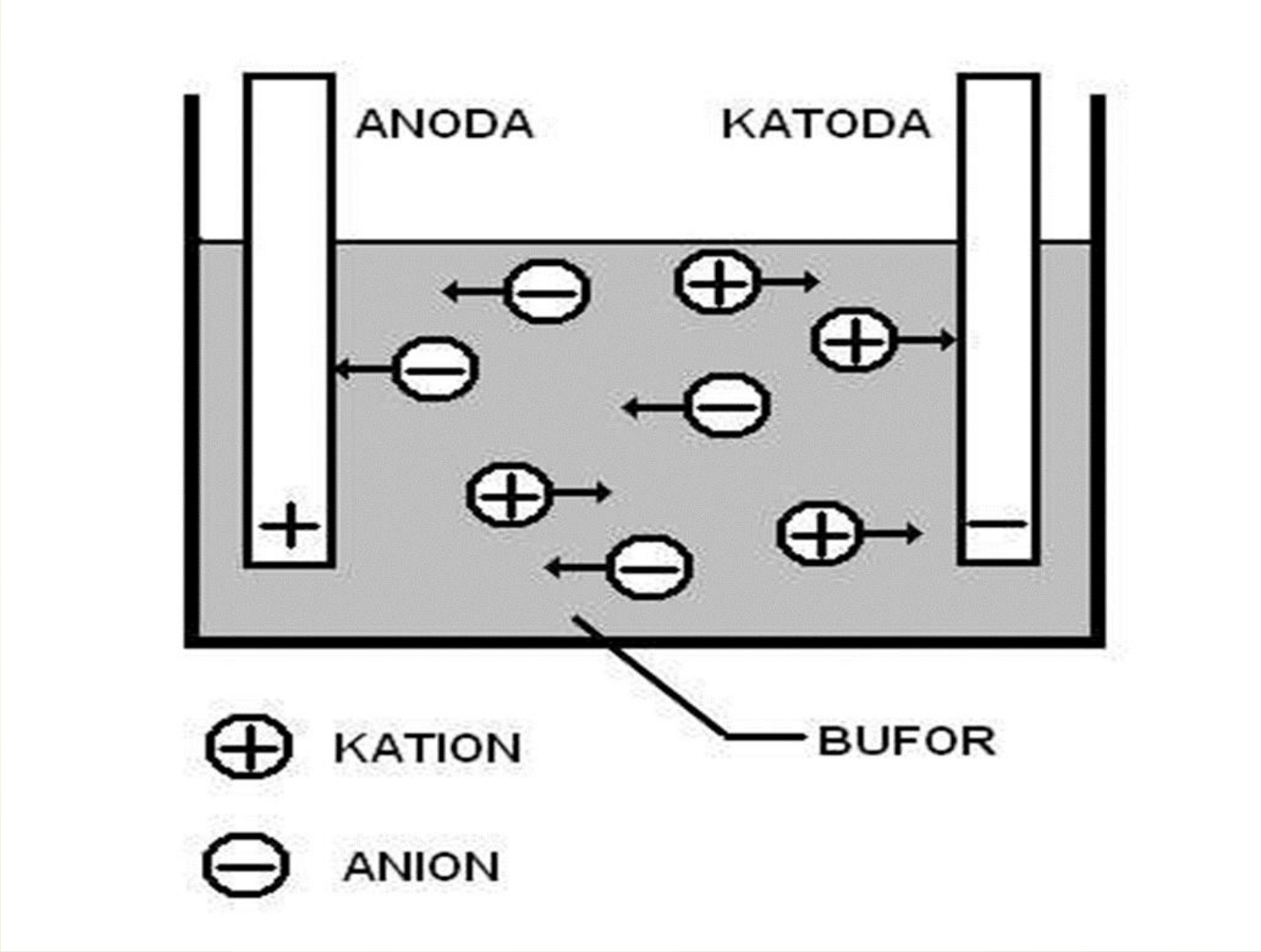
❖Immunoelektroforeza

Metoda rozdziału i identyfikacji rozpuszczalnych antygenów (białek) w żelu

Po elektroforezie białek podaje się do żelu przeciwciała, które dyfundują bocznie w kierunku antygenu (białka)

W miejscu połączenia białka ze swoistym dla niego przeciwciałem następuje wytrącenie kompleksu antygen–przeciwciało

Zasada działania elektroforezy



Elektroforeza kwasów nukleinowych odbywa się na żelach

- ✓ Cząsteczki kwasów nukleinowych, w buforach o pH zbliżonym do neutralnego, posiadają ładunek ujemny i migrują w kierunku anody (elektrody (+))

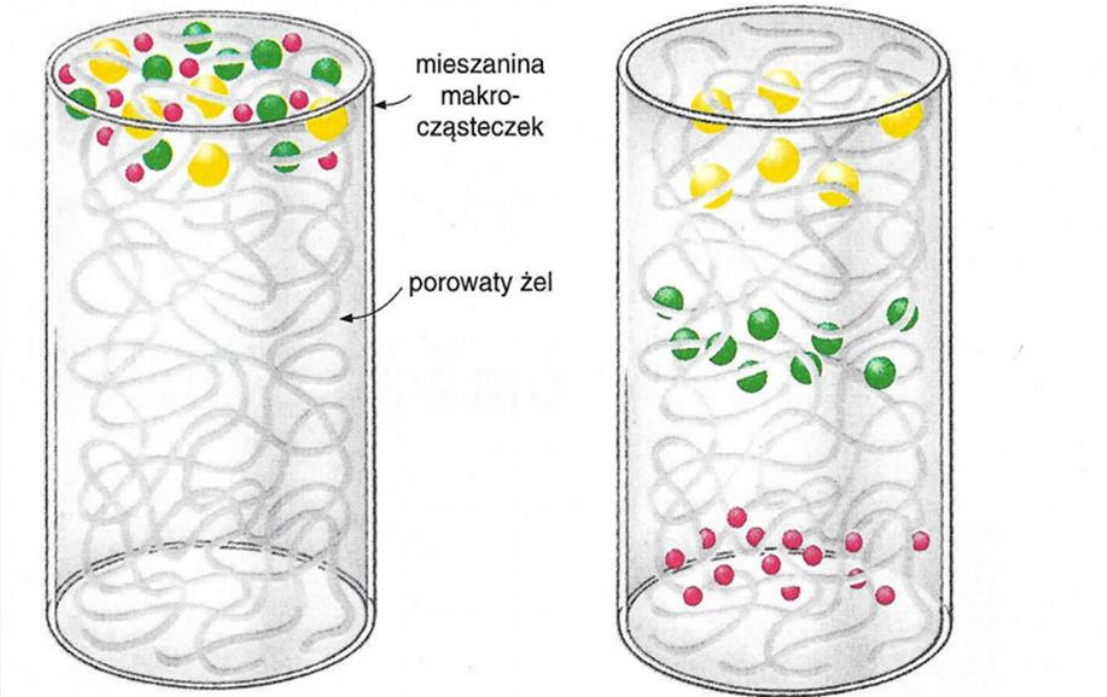
- ✓ Uzyskanie poprawnego rozdziału elektroforetycznego wymaga zastosowania odpowiednich warunków prądowych aby nie spowodować podniesienia temperatury żelu i denaturacja DNA.

Zastosowanie elektroforezy DNA:

- ✓ Ustalenie wielkości fragmentów DNA na podstawie porównania tempa migracji prążków w stosunku do wzorca mas cząsteczkowych.
- ✓ Ustalenie ilość preparatu na podstawie porównania intensywność fluorescencji.
- ✓ Identyfikację ewentualnej degradacji preparatu, która jest widoczna na żelu w postaci smugi.
- ✓ Identyfikację zanieczyszczeń obecnych w preparacie.

Żele do elektroforezy:

- ✓ Agarozowy- agaroza z odpowiednim buforem, po schłodzeniu tworzy pory stabilizowane wiązaniami wodorowymi, wielkość porów zależy od jej stężenie, wykorzystywana do rozdziału dużych cząstek np. DNA(oznaczenie sekwencji nukleotydów), lipoproteiny, immunoglobuliny.



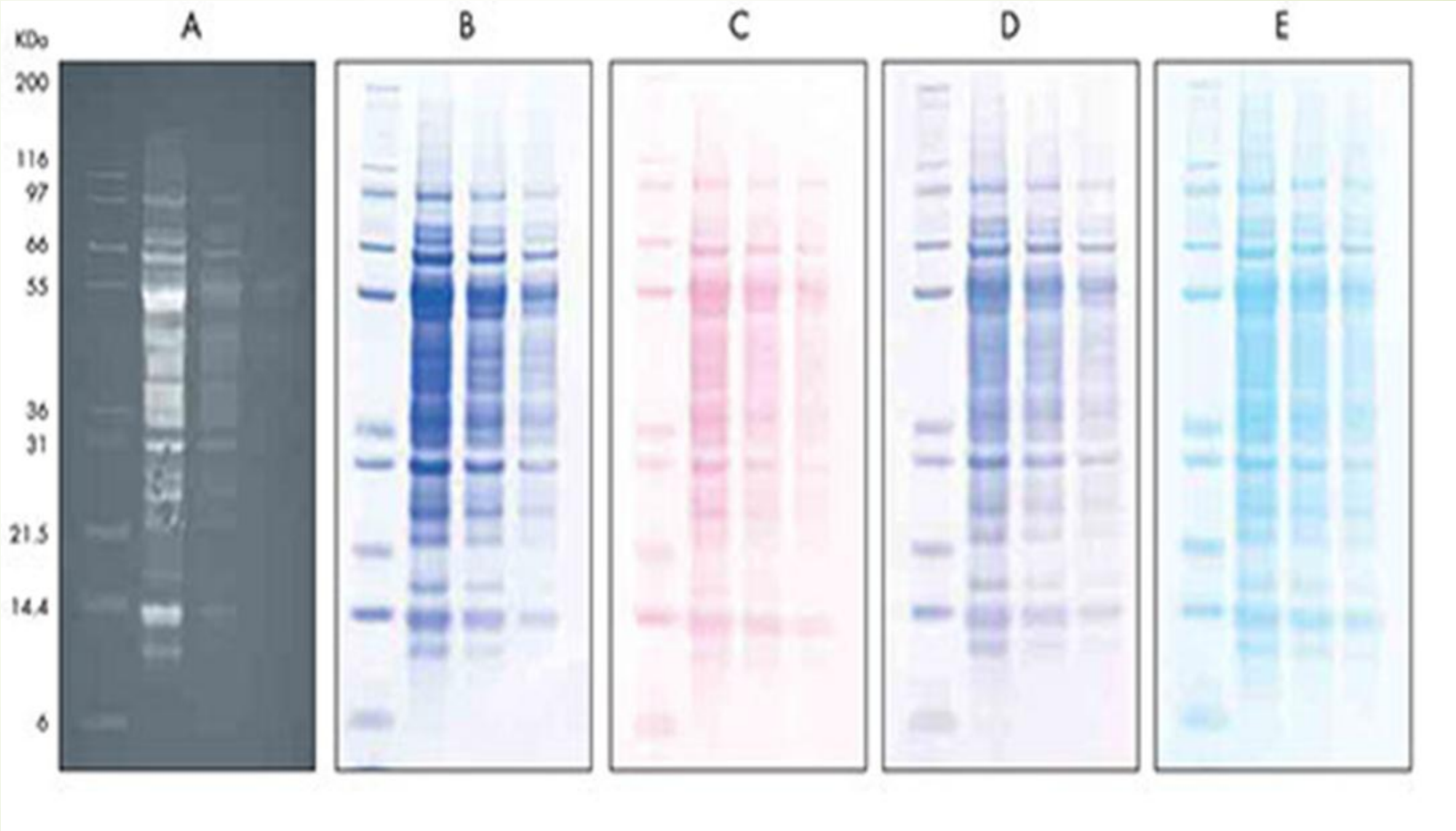
- poliakrylamidowy- uzyskany z monomerów akryloamidu i substancji sieciującej. Stosuje się do rozdziałów mniejszych fragmentów DNA. Elektroforeza przeprowadzona we właściwych warunkach umożliwia rozdział DNA z dokładnością do jednego nukleotydu.

Elektroforeza białek

- Elektroforeza kwasów nukleinowych i białek ma wiele cech wspólnym w sensie nośników i aparatów a nawet sposobu barwienia.

- Główna różnicą to sumaryczny ładunek cząsteczek, który w przypadku kwasów nukleinowych zawsze przyjmuje wartość ujemną, natomiast cząsteczki białka cechują się zróżnicowanym ładunkiem.

Barwienie żeli



Zastosowanie i praktyczne wykorzystanie:

- ✓ Metoda elektroforezy znalazła szerokie zastosowanie w farmacji i biomedycynie jako narzędzie do rozdzielania, izolowania i analizy ilościowej oraz jakościowej składników próbek szczególnie leków i pochodzenia biologicznego.

- ✓ Analizie podlega materiał biologiczny (surowica, mocz, różne tkanki, a nawet pojedyncze komórki) pod względem poznania profilu frakcji białkowych czy DNA i RNA.

- ✓ Wyniki takiej analizy pomagają przy ustaleniu rodzaju schorzenia i postępów leczenia, cech genetycznych.

- Elektroforeza żelowa jest też wykorzystywana do analizy rozładu chemicznego leków jako pojedynczych substancji chemicznych, złożonych mieszanek oraz ich zanieczyszczeń.

- Coraz częściej wykorzystuje się tę metodę do kontroli procesu technologicznego oraz do identyfikacji wielu związków znajdujących się w produktach żywnościowych.

Bibliografia

- „Wprowadzenie do analityki biochemicznej” Bogumił Leszczyński, Siedlce 2004
- „Przykłady analiz DNA” Ryszard Słomski, Poznań 2004
- „Analiza DNA” Ryszard Słomski, Poznań 2011
- Internet („Elektroforeza przykłady zastosowań” opracowanie zbiorowe pod redakcją Bogdana Walkowiaka i Violetty Kochmańskiej)