

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Άννα-Μαρία Ψαρρά
ΤΒΒ, Παν/μιο Θεσσαλίας
Λάρισα 2015

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Αναλυτικός τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων όπως πρωτεϊνών DNA, RNA

Αρχή της μεθόδου

Μόρια που φέρουν καθαρό φορτίο δύναται να μετακινηθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο

ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ DNA ΚΑΙ RNA ΜΕΣΑ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ

$$U = E \cdot z / f$$

E = Ένταση ηλεκτρικού πεδίου ($E = F/z$)

Z = καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης

$E \cdot z$ = Ηλεκτροστατική δύναμη

f = Δύναμη τριβής

Ο **συντελεστής τριβής** εξαρτάται από τη **μάζα** και το **σχήμα** του μορίου που μετακινείται και από το **ιξώδες του μέσου**

Για σφαίρα

$$f = 6\pi\eta r$$

η = Ιξώδες του μέσου

r = ακτίνα

ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών γίνεται μέσω μίας πηκτής πολυακρυλαμιδίου

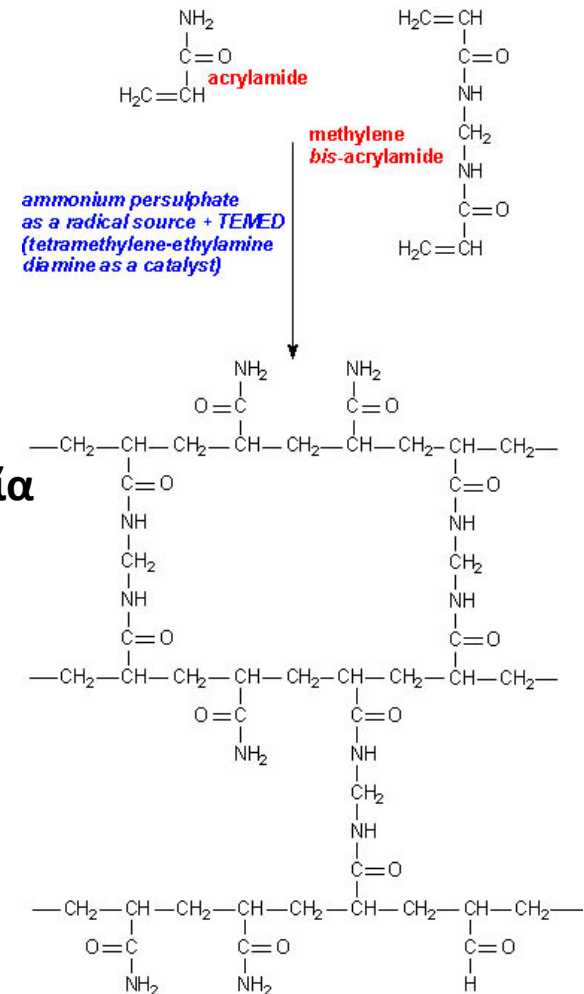
Πολυμερισμός **ακρυλαμιδίου**

Διασύνδεση πολυμερών ακρυλαμιδίου με **μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου**

Υπερθεικό αμμώνιο: Εκκινητής πολυμερισμού, δημιουργία ελεύθερων ριζών

TEMED : τετραμεθυλεν αιθυλαμιν διαμίνη, επιταχυντής πολυμερισμού, καταλύτης

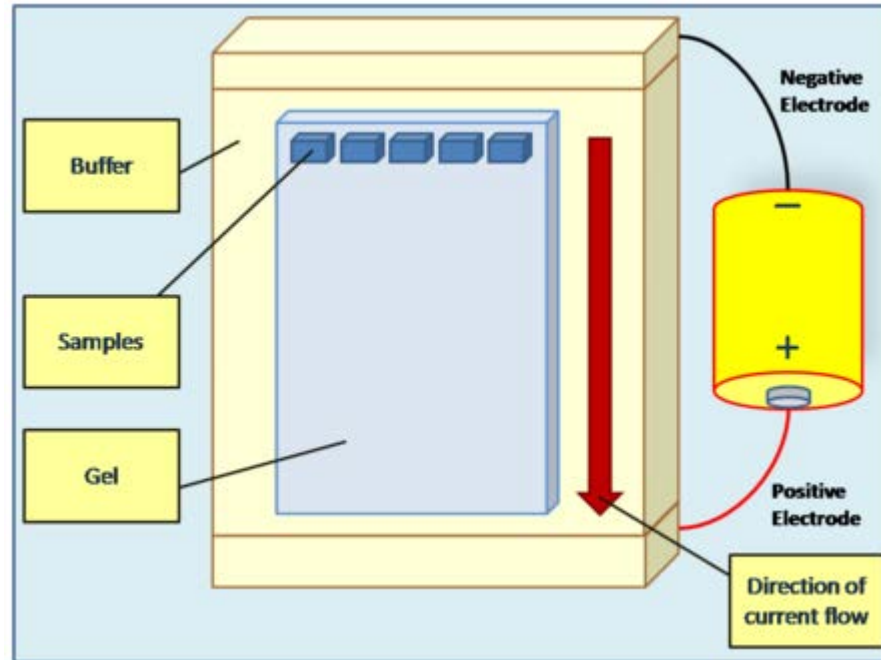
Η πηκτική λειτουργεί ως μοριακός ηθμός



ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν μικρή κινητικότητα
Μόρια με μικρό μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα

ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ




http://creationwiki.org/pool/images/thumb/7/71/Gel_electrophoresis1.png/450px-Gel_electrophoresis1.png

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Διάλυμα διαλυτοποίησης πρωτεϊνών

SDS : δωδεκακυλο-θειικό νάτριο

-  Ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τη μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις
- 1 μόριο SDS / 2 αμινοξέα
- Προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται
- Το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο μετά τη σύνδεση με το SDS
- Το αρνητικό φορτίο που αποκτούν οι πρωτεΐνες είναι περίπου ανάλογο με τη μάζα τους
- Ο λόγος φορτίο/μάζα είναι ίδιος για όλες τις πρωτεΐνες

Μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη

Αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών

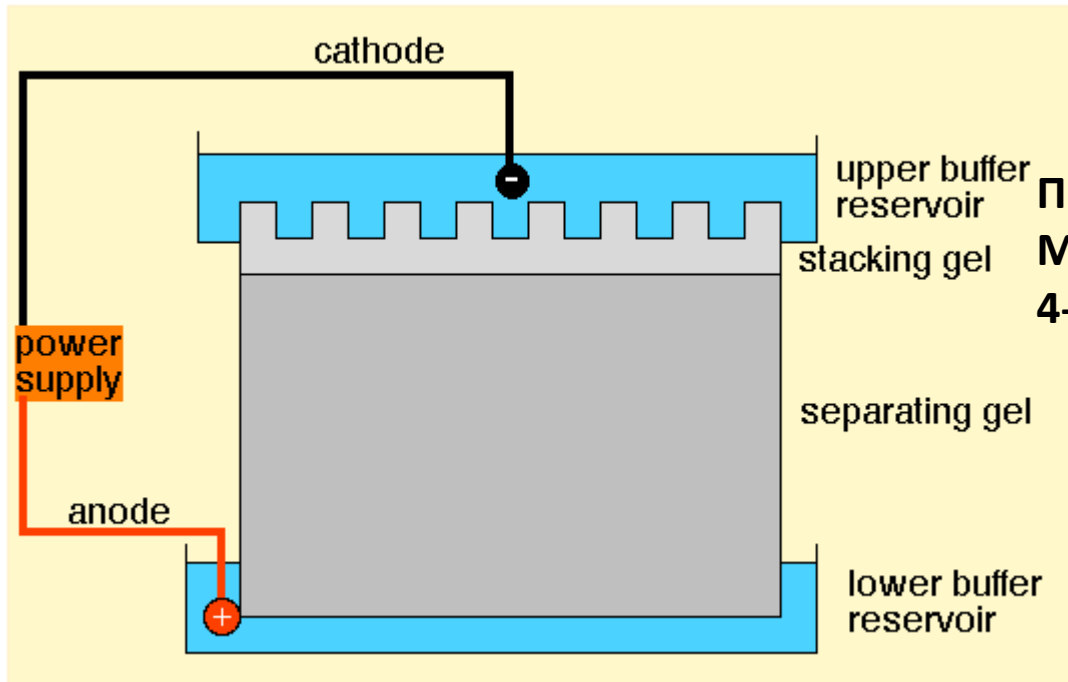
Γλυκερόλη

Αποτρέπει τη διάχυση των πρωτεϊνών στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης διατηρώντας της διαλυμένες σε ένα πυκνότερο διάλυμα

Ρυθμιστικό διάλυμα : Διατήρηση επιθυμητού pH

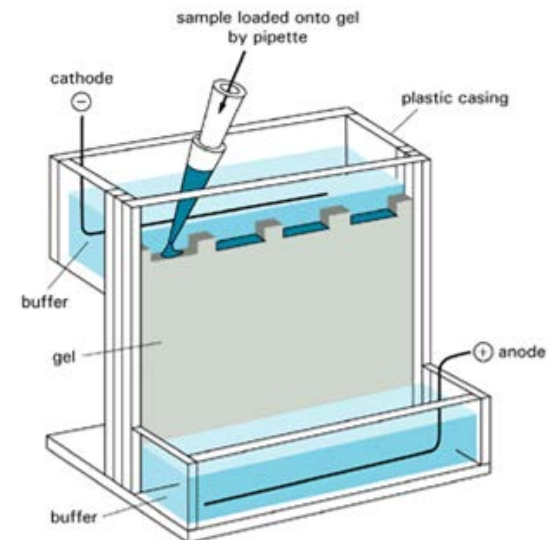
Χρωστική κυανού του Coomassie: Παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης

ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ



Πηκτή επιστοιβάξης, pH:6.8
Μικρή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου
4-6 %

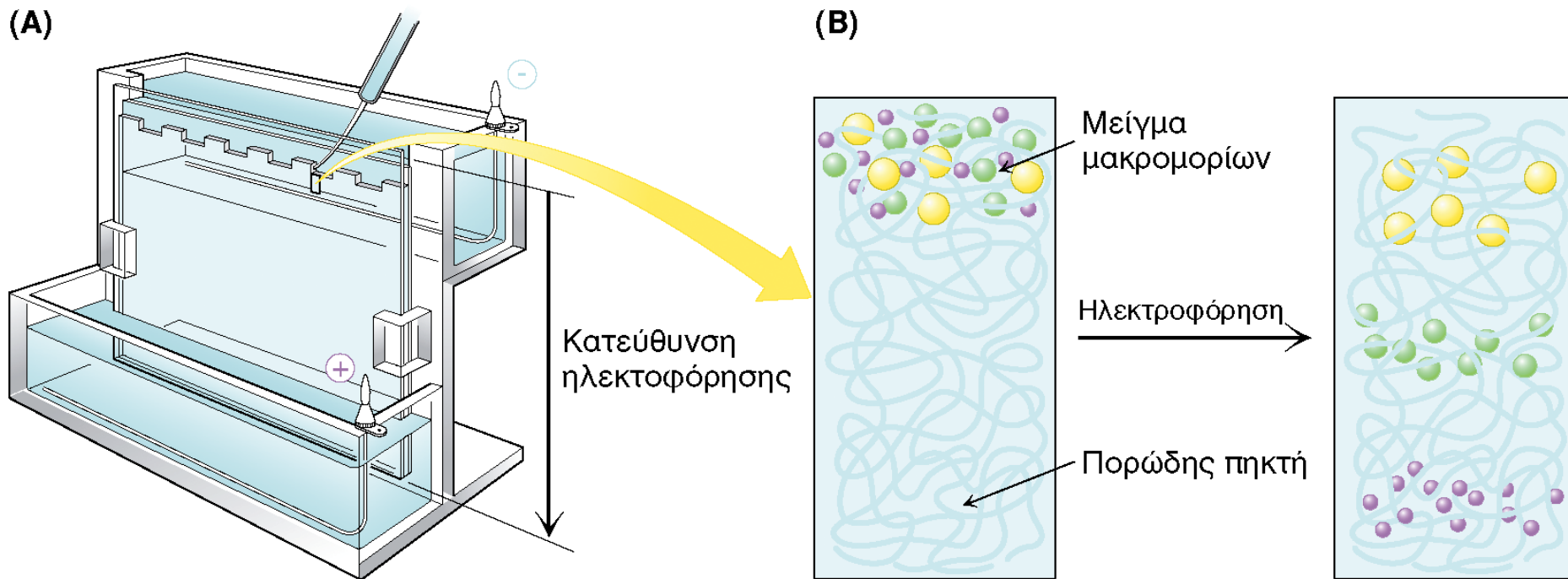
Πηκτή διαχωρισμού, pH:8.8



<http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/eph.gif>

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται κυρίως βάσει της μάζας τους
ΟΛΕΣ ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΕΙΝΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΟΡΤΙΣΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΟΥΝΤΑΙ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΠΟΛΟ



ΕΙΚΟΝΑ 4.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. (A) Μια συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πη-

Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα και γρήγορα δια μέσου της πηκτής

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μέθοδος:

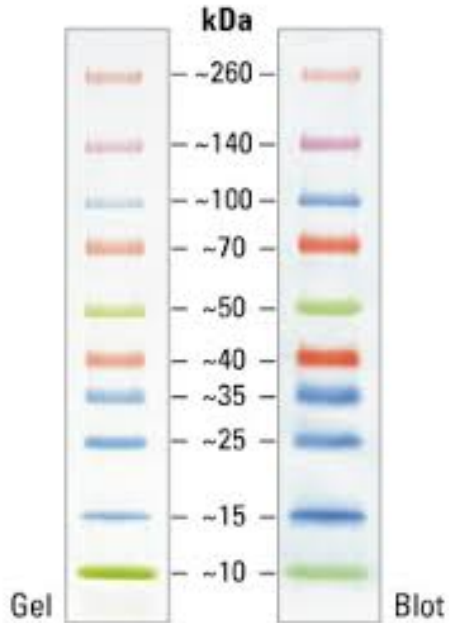
Γρήγορη

Ευαίσθητη

Μεγάλη διαχωριστική ικανότητα

ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

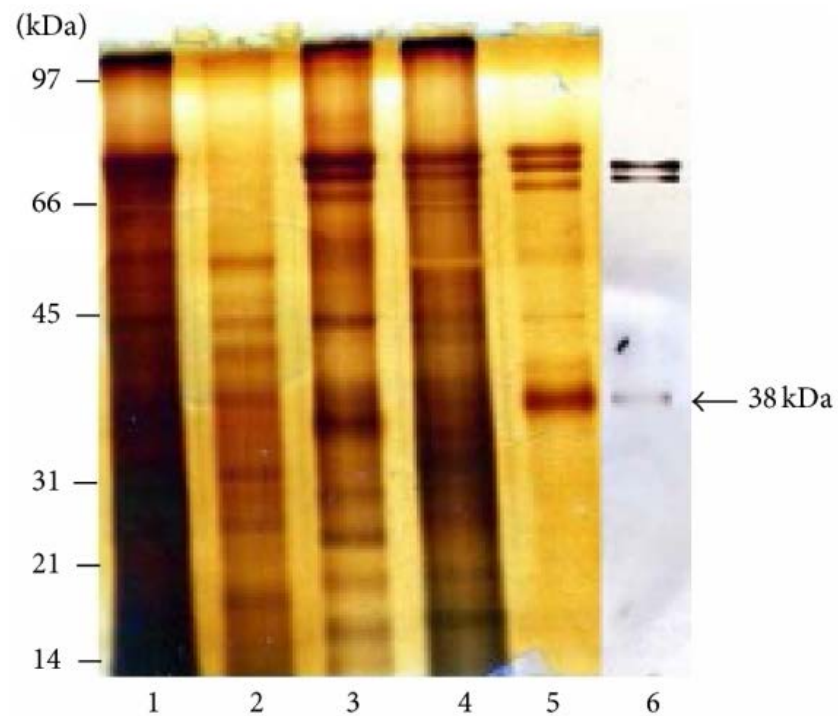
Χρώση με κυανό του Coomassie



ΕΙΚΟΝΑ 4.9 Χρώση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυ-

ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Χρώση με νιτρικό άργυρο



Nagdas et al Biochemistry Research International Volume 2014, Article ID 573293

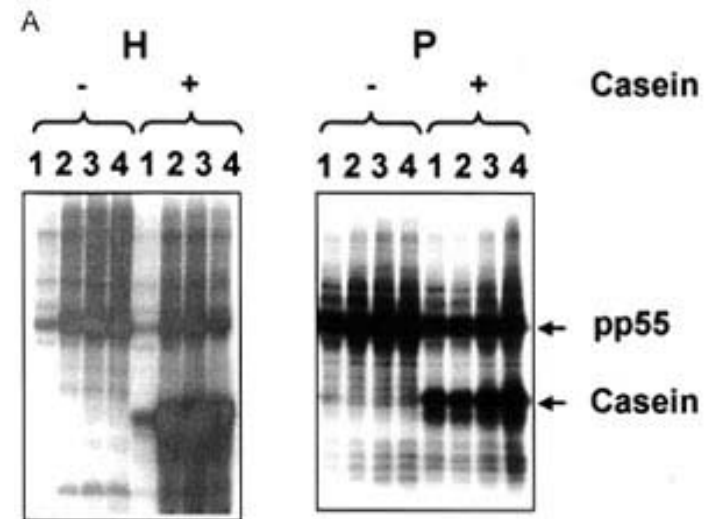
Ραδιενεργή σήμανση πρωτεϊνών

Ραδιενεργά σημασμένες πρωτεΐνες (άμεσα ή έμμεσα)

π.χ σύνθεση σε περιβάλλον όπου υπάρχει διαθεσιμότητα
ραδιενεργά σημασμένων αμινοξέων

Ανίχνευση με τη δοκιμασία της αυτοραδιογραφίας

Ανίχνευση σε φίλμ ακτινογραφίας



<http://www.scielo.br/img/revistas/mioc/v99n8/a11f04a.jpg>

Ευαισθησία χρώσεων πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Κυανό του Coomassie: ($\geq 0.1 \mu\text{g}$, $\sim 2\text{pmol}$)

Άργυρος : ($\geq 0.02 \mu\text{g}$)

Αυτοραδιογραφία : $\leq 0.02 \mu\text{g}$

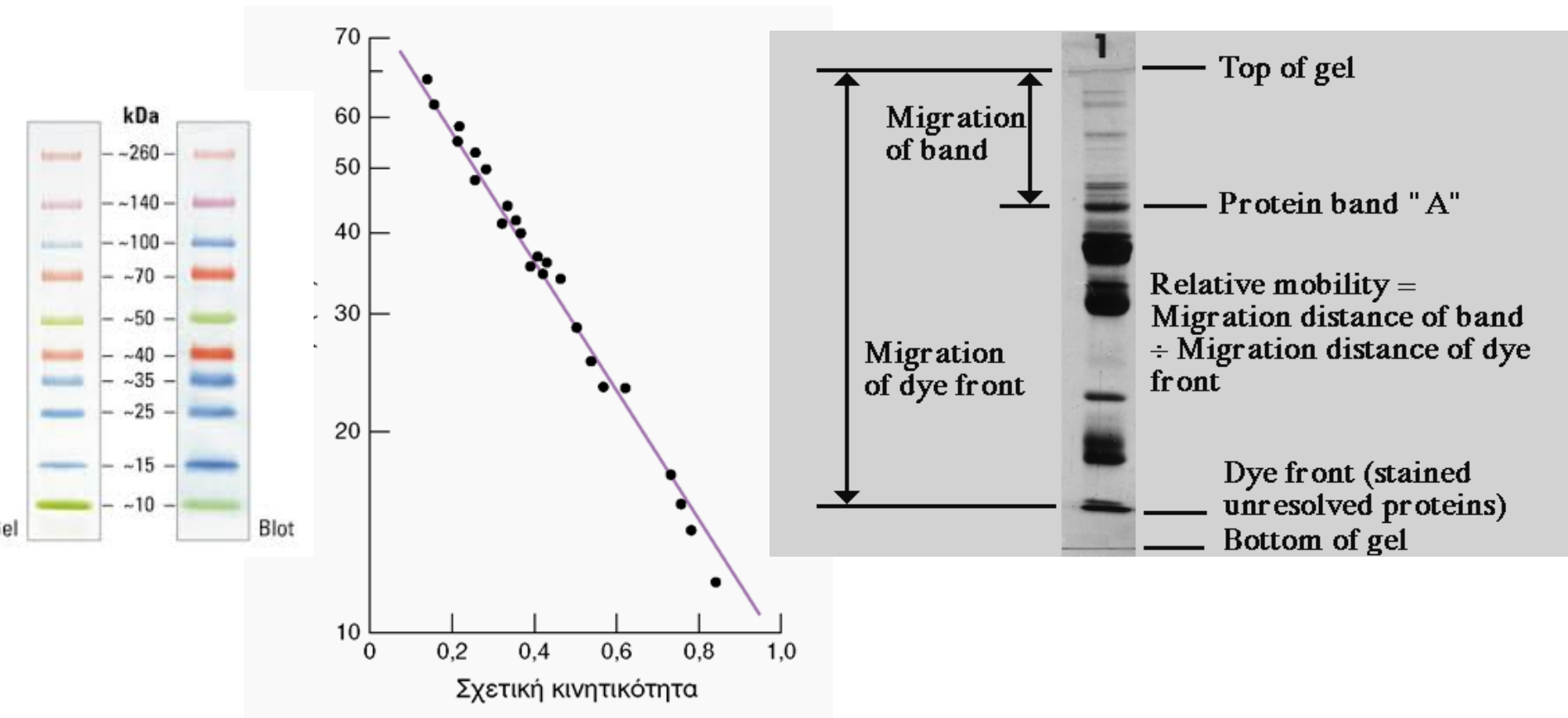
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Έλεγχος αποτελεσματικότητας καθαρισμού της πρωτεΐνης



ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Προσδιορισμός μοριακού βάρους πρωτεΐνης



http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gelpics/sds_images/relnob.gif

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΕΙ ΤΟ ΦΟΡΤΙΟ ΤΟΥΣ
ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΧΕΤΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥΣ ΣΕ ΟΞΙΝΑ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
σε πηκτή απουσία SDS με βαθμίδωση pH

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ (pI)

pH όπου το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν

Z=0

$$U = E \cdot z / f$$

U=0

Η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να συναντήσει pH ίσο με το pI

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ

Η βαθμίδωση pH σχηματίζεται με ηλεκτροφόρηση πρώτα πολυαμφολυτών (φορτισμένων πολυμερών) που έχουν πολλές τιμές pI, που διαφέρουν ακόμα και κατά 0,01).

Διαχωρισμός πρωτεϊνών που διαφέρουν στο pI τους ακόμα και κατά 0,01, δηλαδή κατά ένα μόνο αρνητικό φορτίο

Αμφολύτες.

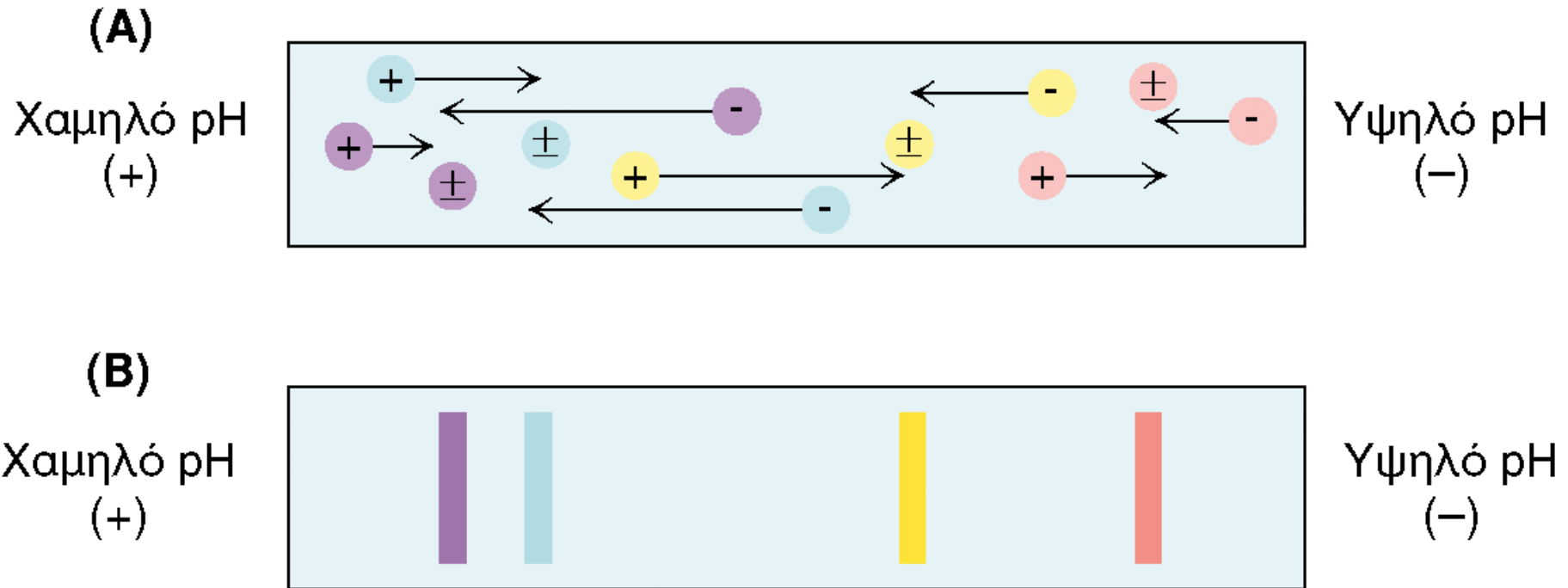
Χημικές ενώσεις, οι οποίες συμπεριφέρονται άλλοτε ως βάσεις και άλλοτε ως οξέα ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται

Για κάθε αμφολύτη υπάρχει μια συγκεκριμένη τιμή pH, για την οποία το συνολικό μόριο είναι ουδέτερο – αν και μπορεί να υπάρχουν επιμέρους φορτισμένες ομάδες, οι οποίες ωστόσο ως σύνολο εξουδετερώνονται - η τιμή αυτή αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI).

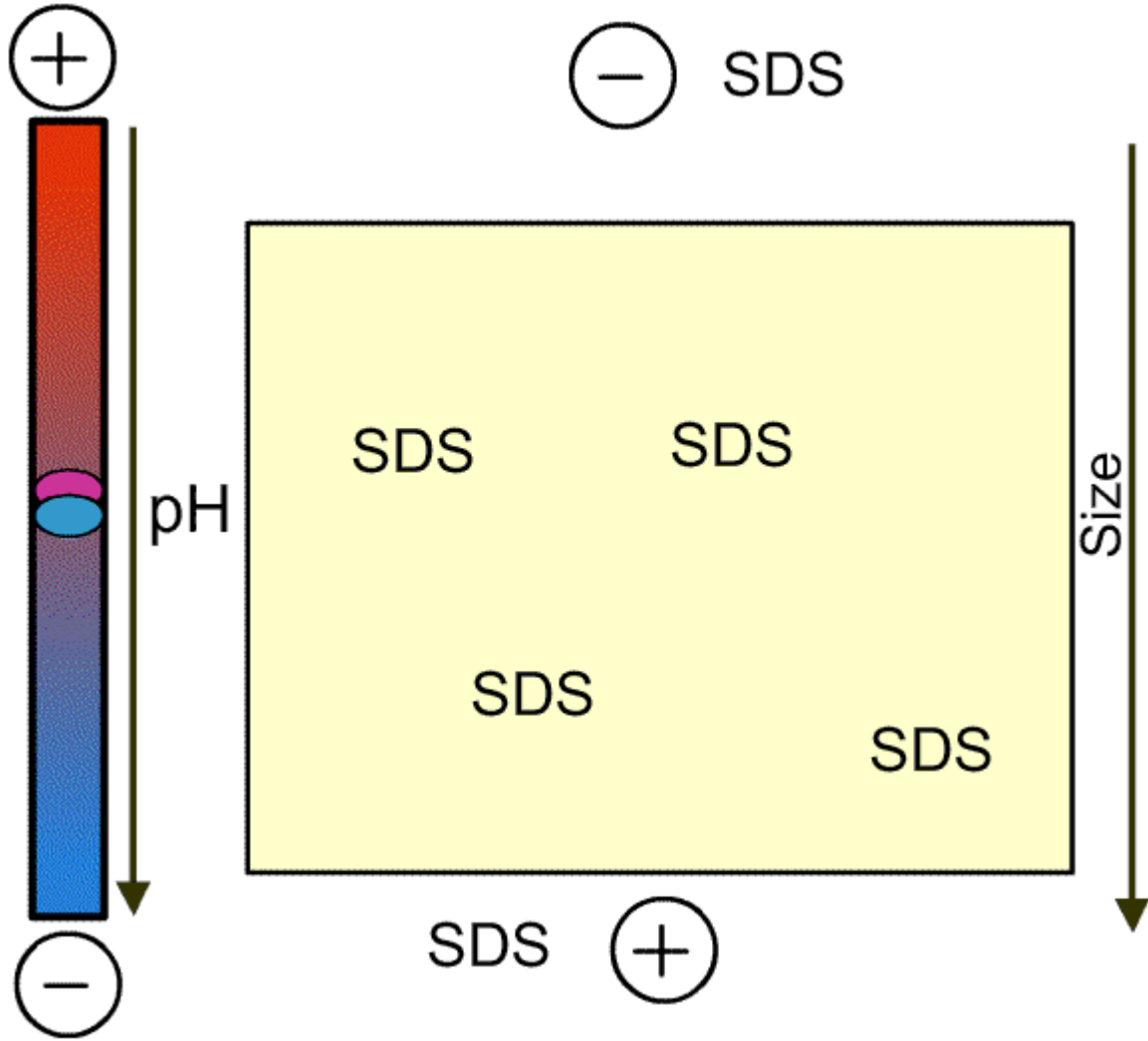
Οι πρωτεΐνες είναι αμφολύτες

Για τιμές pH κάτω του pI τους οι πρωτεΐνες φέρουν καθαρό θετικό φορτίο ενώ για τιμές pH άνω του pI τους, οι πρωτεΐνες φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο.

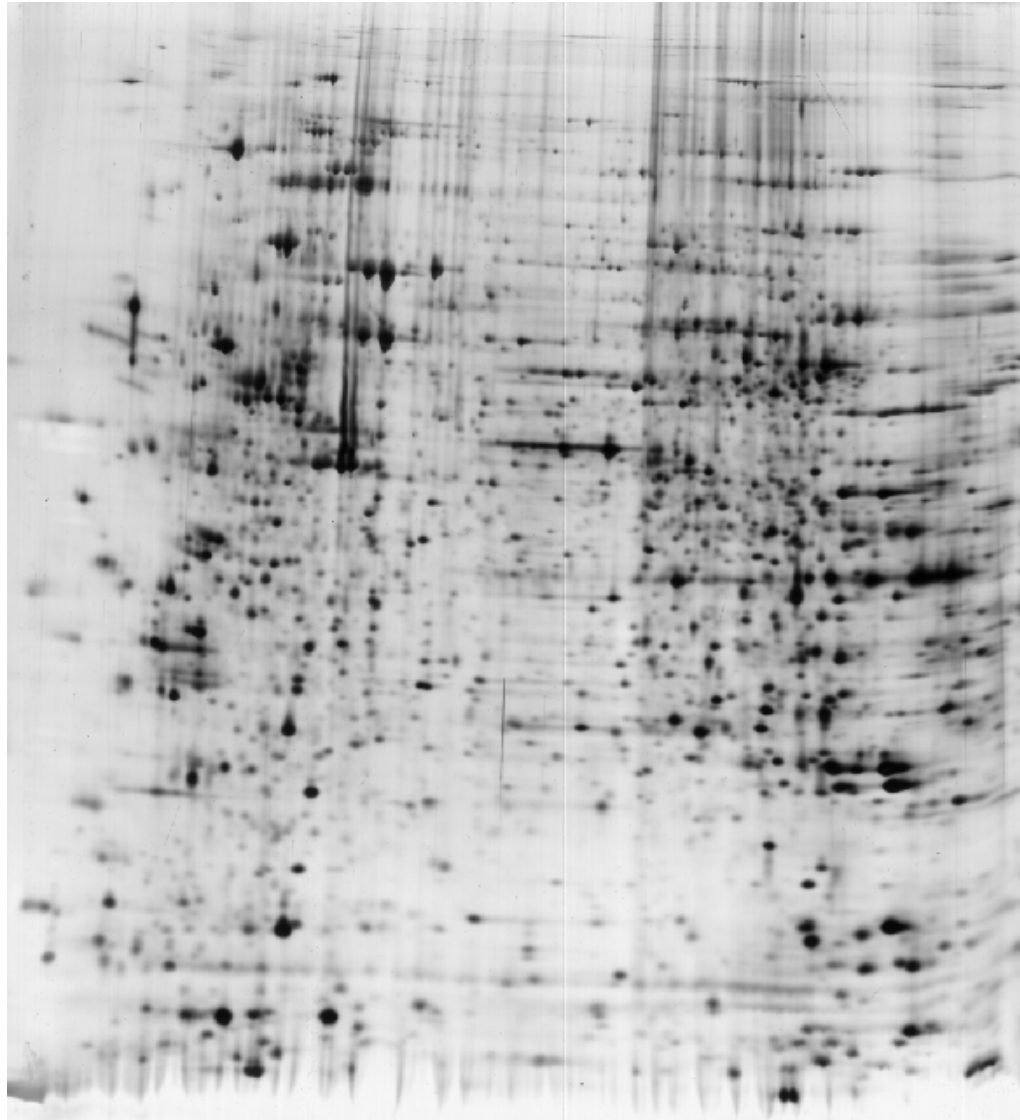
ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ



ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ (2D PAGE)

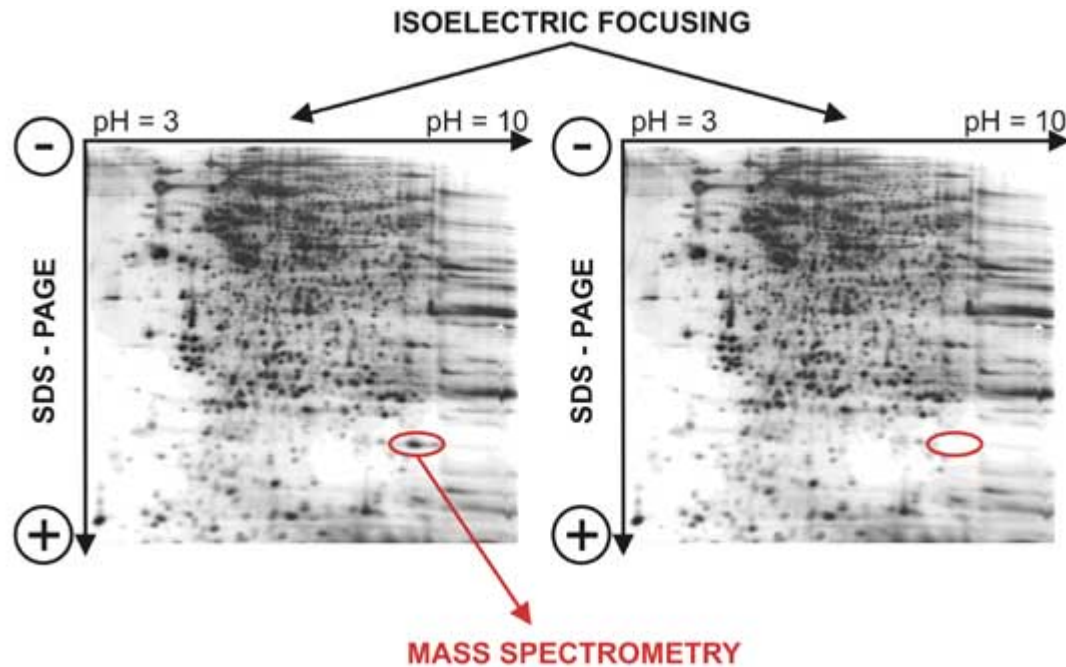


Παράδειγμα 2D PAGE ηλεκτροφόρησης



ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

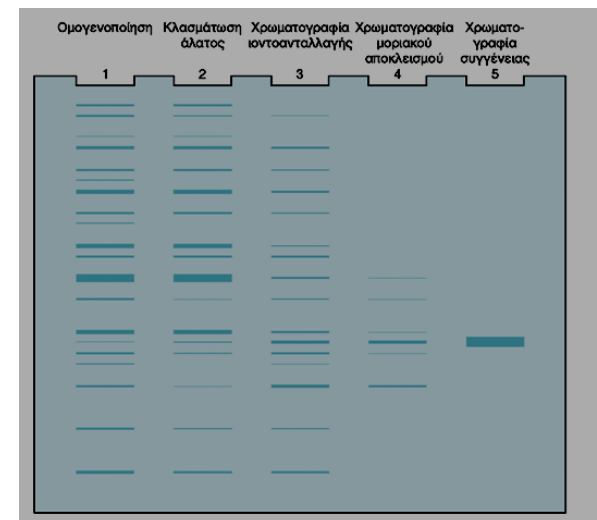


ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΟΕΚΦΡΑΣΗΣ Η ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΕΝΟΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ -ΕΝΖΥΜΟΥ

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1 Ποσοτικοποίηση του πρωτοκόλλου καθαρισμού μιας υποθετικής πρωτεΐνης.

Στάδιο	Ολική πρωτεΐνη (mg)	Ολική δραστηριότητα (μονάδες)	Ειδική δραστηριότητα (μονάδες mg ⁻¹)	Απόδοση (%)	Επίπεδο καθαρότητας
Ομογενοποίηση	15.000	150.000	10	100	1
Κλασμάτωση άλατος	4.600	138.000	30	92	3
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	1.278	115.500	90	77	9
Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	68,8	75.000	1.100	50	110
Χρωματογραφία συγγένειας	1,75	52.500	30.000	35	3.000



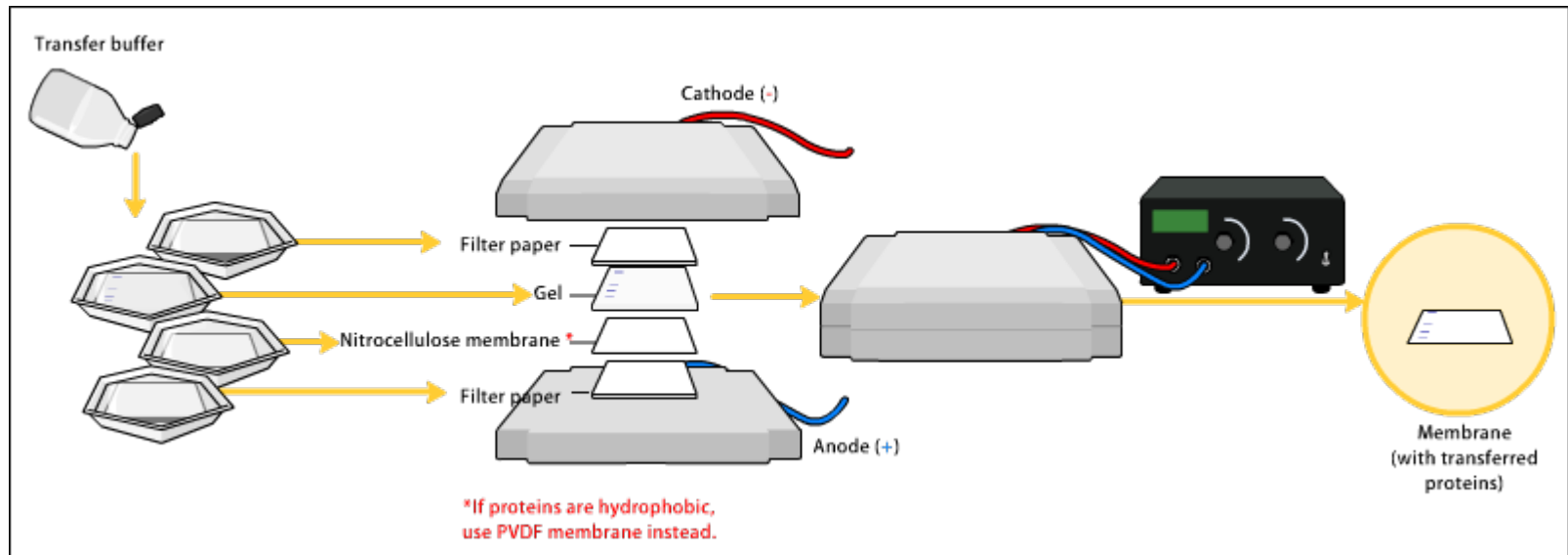
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΕΝΟΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ -ΕΝΖΥΜΟΥ

ΑΠΟΔΟΣΗ= (ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΤΑΔΙΟΥ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ / ΑΡΧΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ)*100

ΕΠΙΠΕΔΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ = ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΤΑΔΙΟΥ / ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΡΧΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

Επιτυχημένο πρωτόκολλο απομόνωσης υψηλή καθαρότητα και όσο το δυνατόν υψηλή απόδοση

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ - WESTERN BLOT



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer.png

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ - WESTERN BLOT

Detection in Western Blots

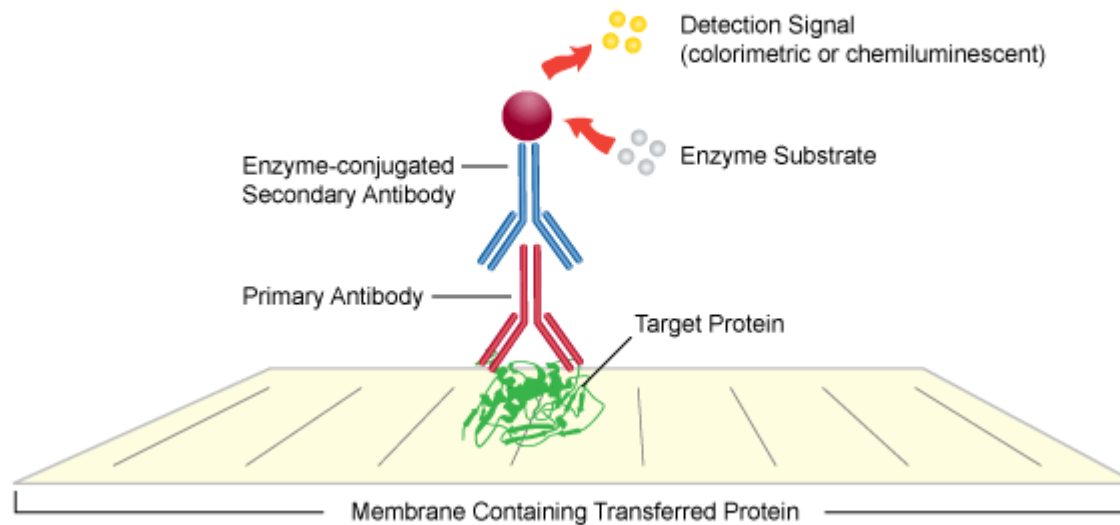


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

http://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.leinco.com%2Fgeneral_wb&ei=fXpcVJXNN4z2PNSrgRg&bvm=bv.79184187,d.d2s&psig=AFQjCNGcsD-TGsp6R-WhzBr1ElzKL0b9lw&ust=1415433210703287