

Электрофоретические и хроматографические методы

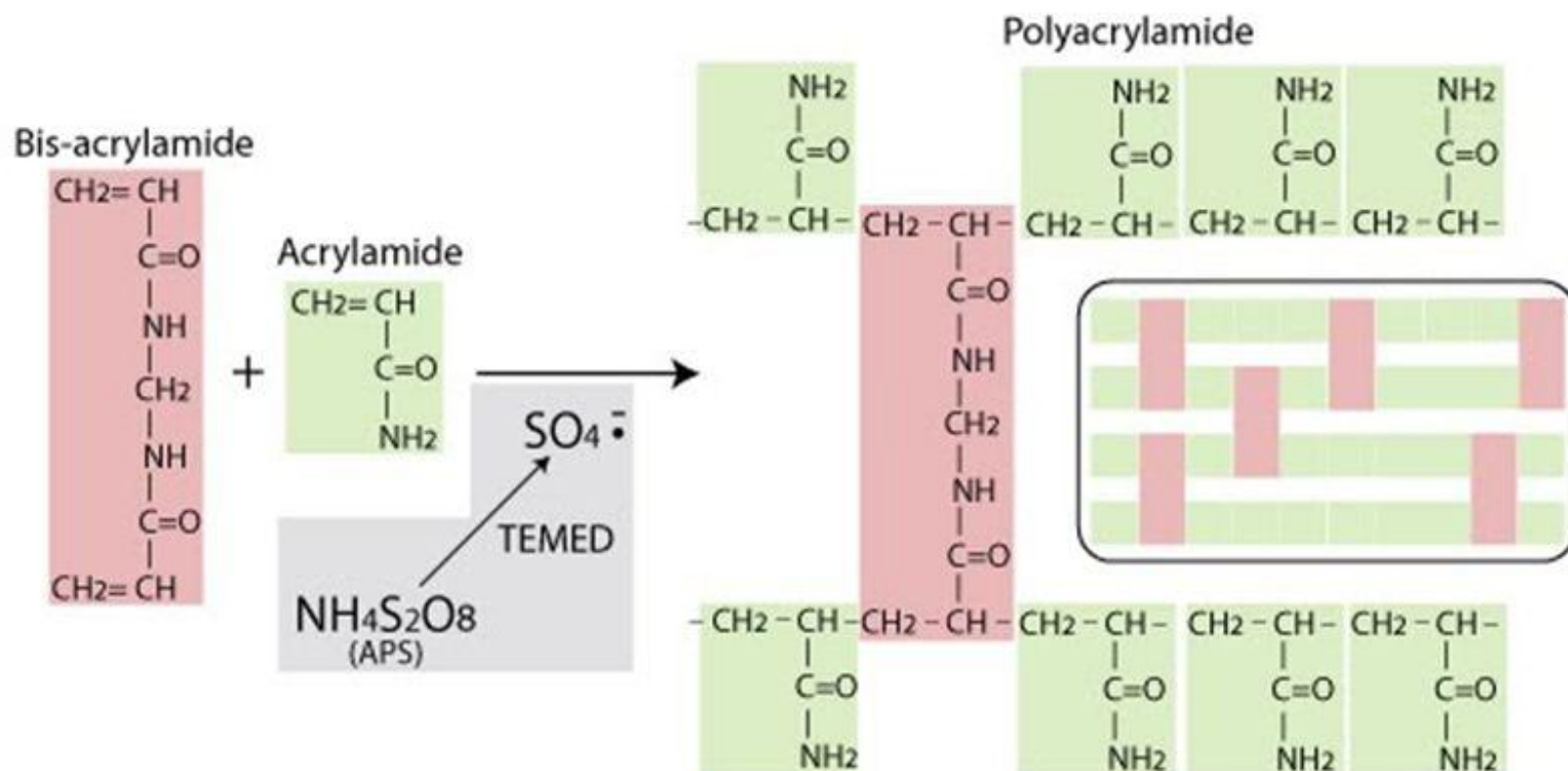
Дидио Анна

Каф.биохимии

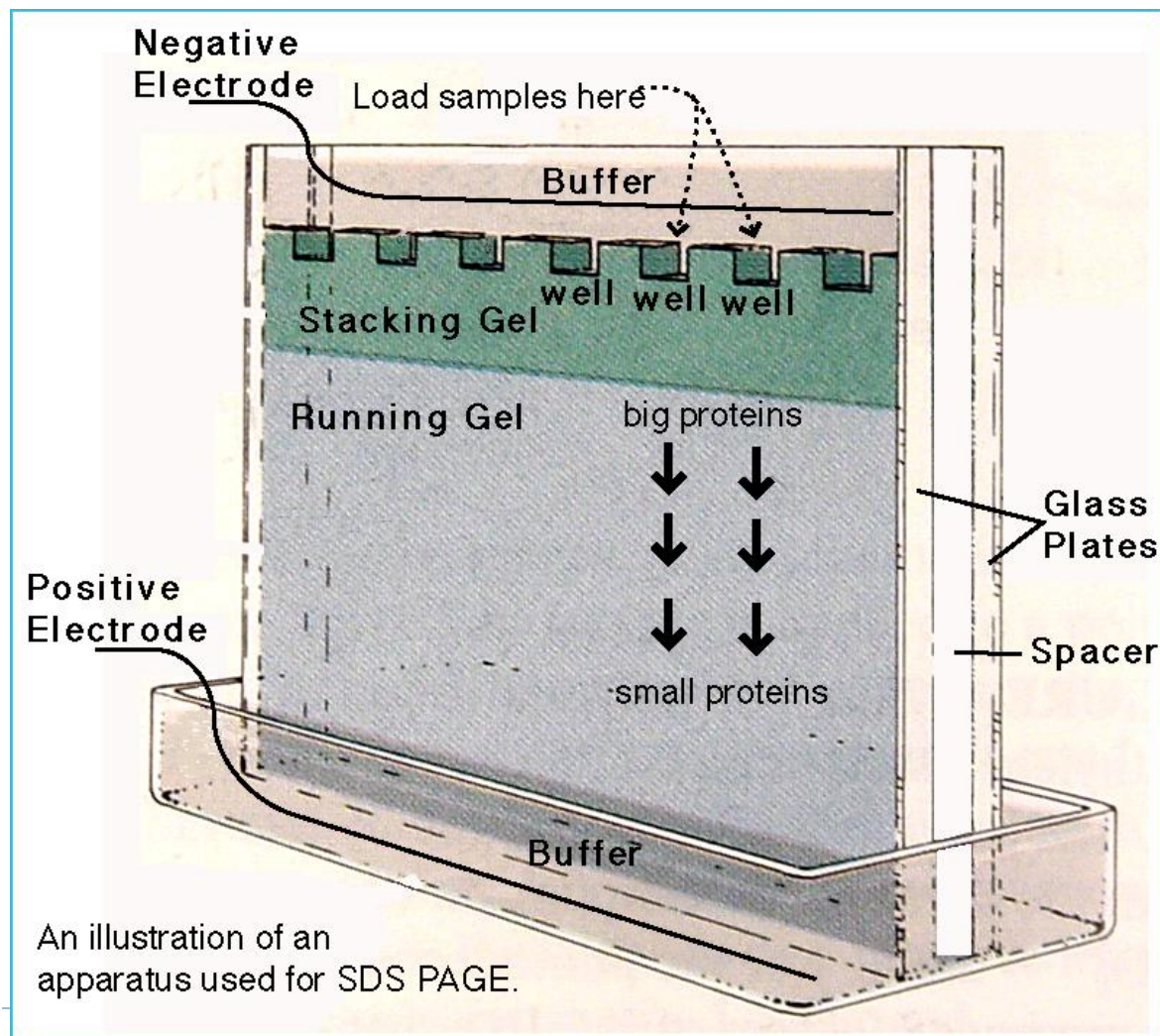
2016

Общие принципы электрофореза

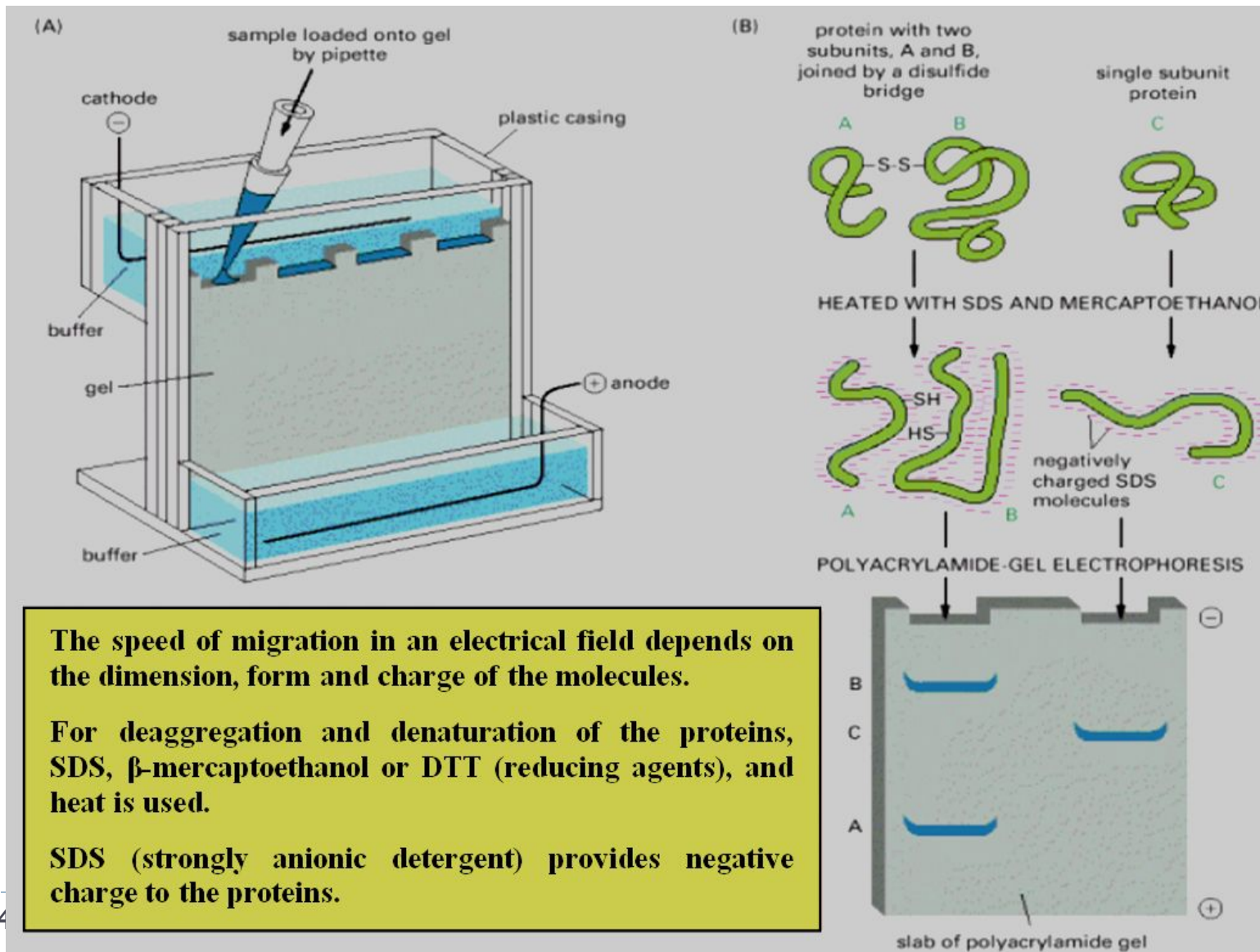
Полимеризация геля



Общие принципы электрофореза



Диск-электрофорез ПААГ в присутствии с ДДС-На.



The speed of migration in an electrical field depends on the dimension, form and charge of the molecules.

For deaggregation and denaturation of the proteins, SDS, β -mercaptoethanol or DTT (reducing agents), and heat is used.

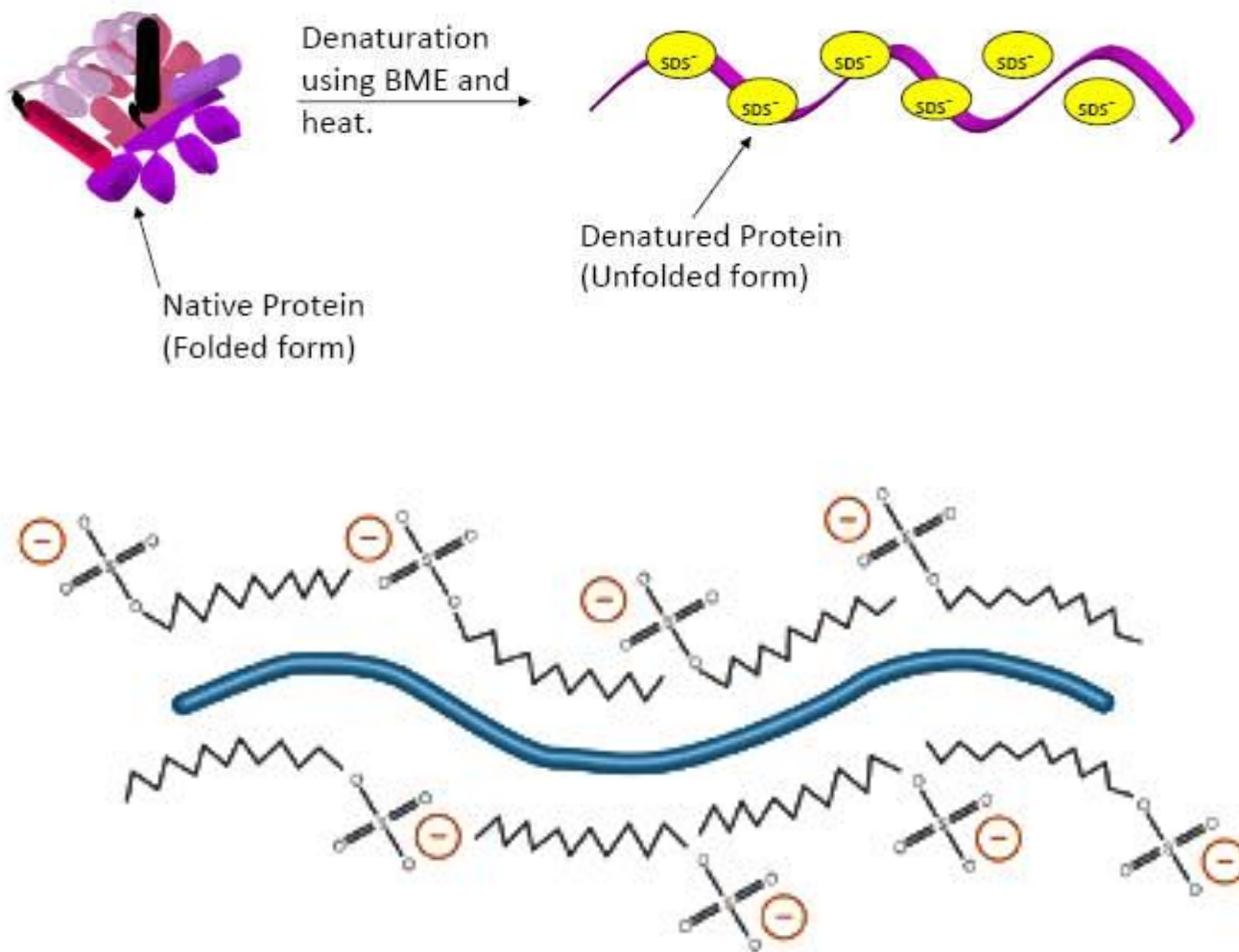
SDS (strongly anionic detergent) provides negative charge to the proteins.

Диск-электрофорез ПААГ в присутствии с ДДС-На.

□ Электрофоретический модуль Biorad

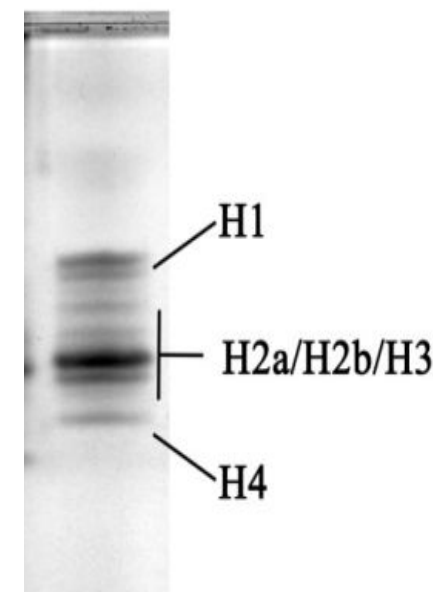
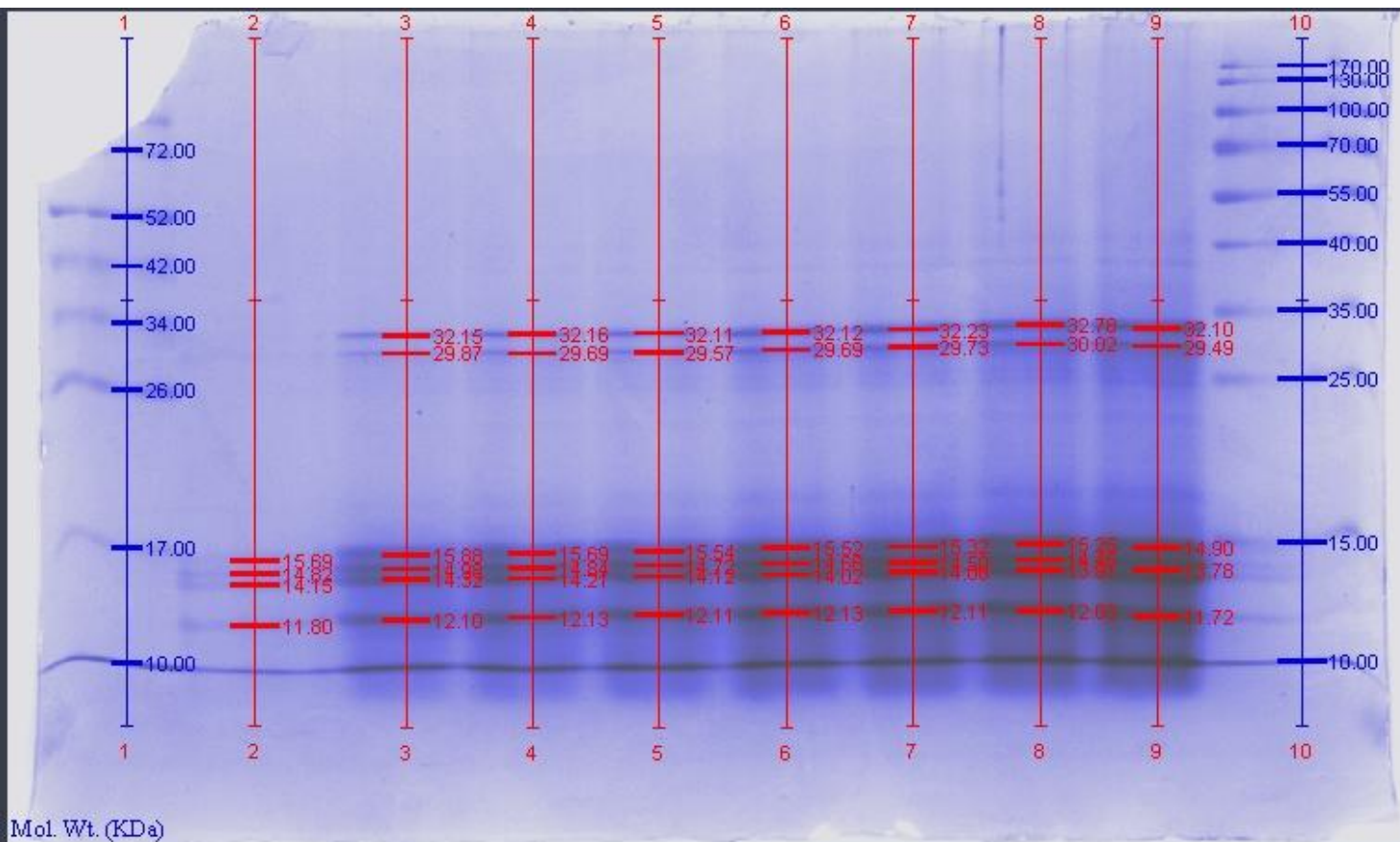


Диск-электрофорез ПААГ в присутствии с ДДС-Na.

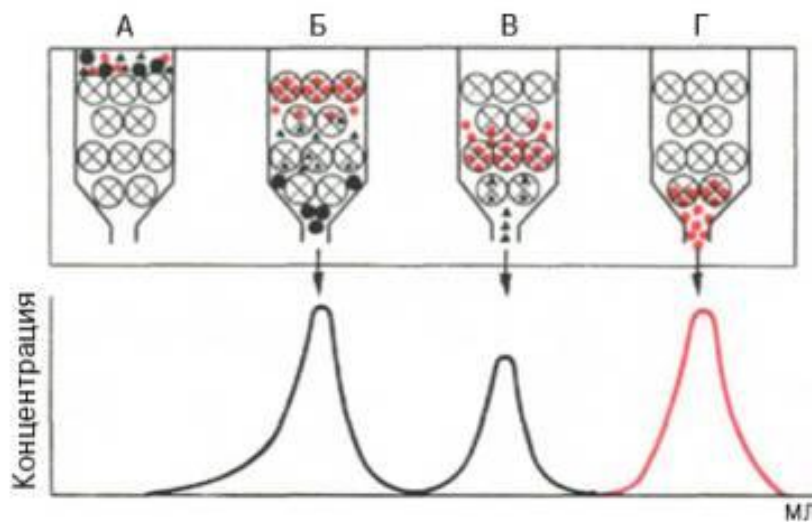
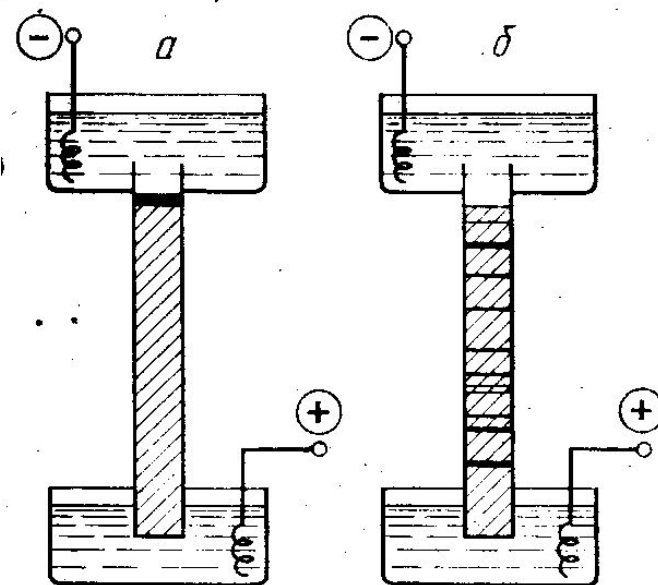


Кислый электрофорез

□ Электрофореграмма препарата гистонов



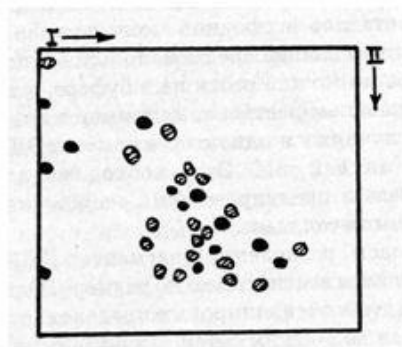
Капиллярный электрофорез



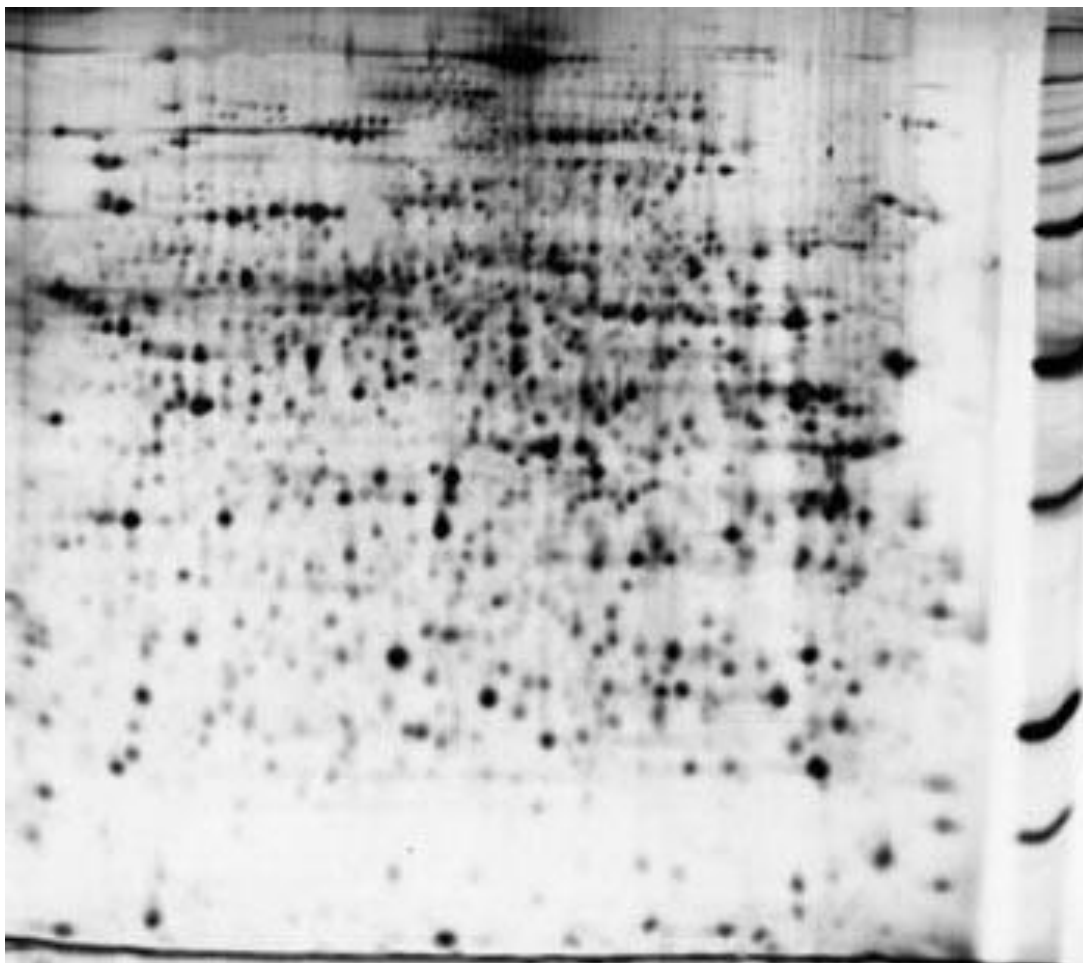
Двумерный ЭФ

1й этап – разделение по размеру в одних условиях.

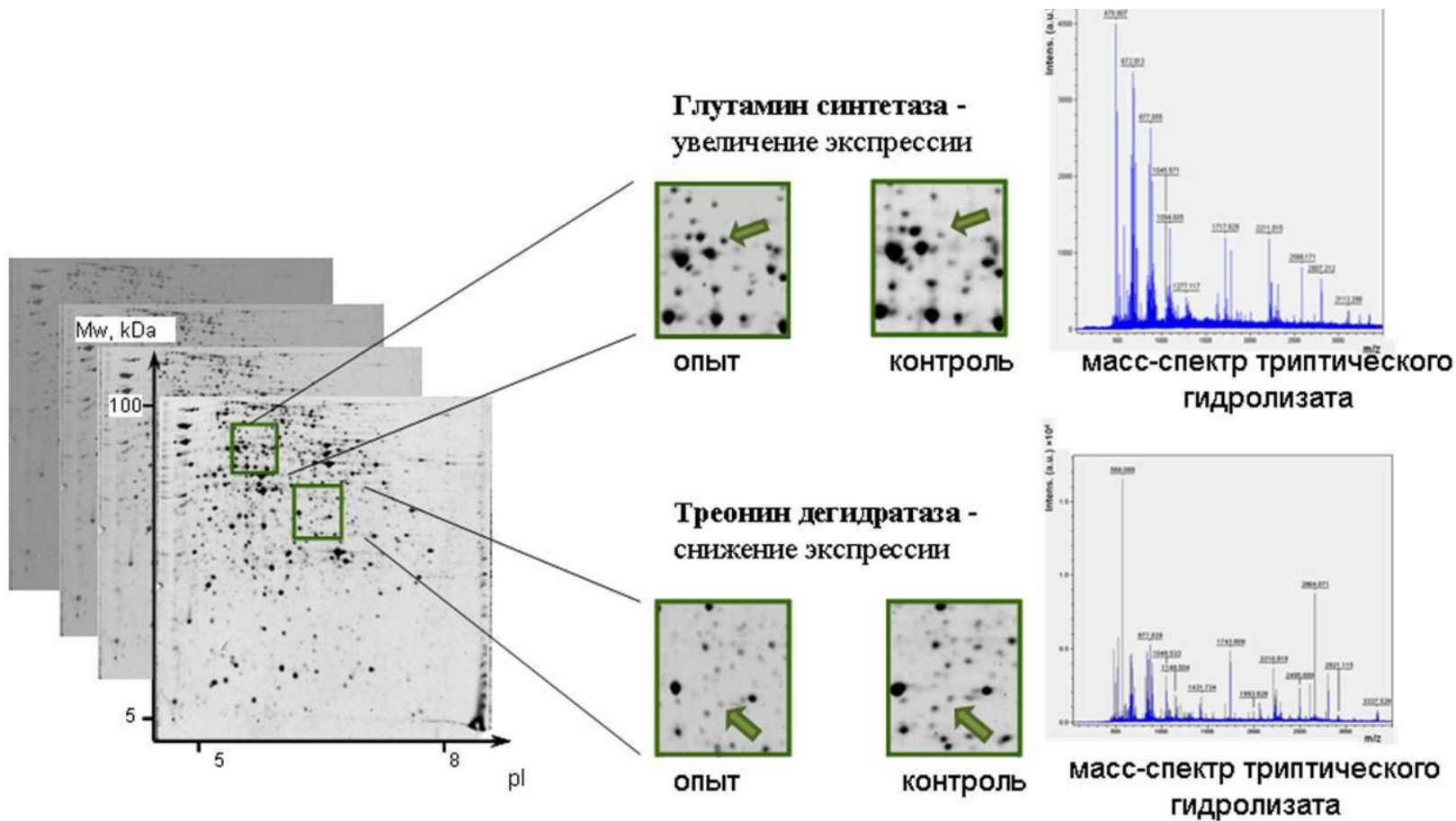
Поворот геля на 90 градусов и проведение ЭФ в других условиях (например в градиенте рН или в буфере с другим рН)



Двумерный электрофорез



Двумерный электрофорез




Изоэлектрическая точка

Величина изоэлектрической точки амфотерной молекулы определяется величинами констант диссоциации кислотной и основной фракций:

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Изоэлектрическое фокусирование — технология разделения молекул по разнице в их изоэлектрических точках. Это разновидность зонального электрофореза, которую обычно проводят в геле.

Метод применяют для изучения белков, которые отличаются значениями изоэлектрической точки, то есть соотношением остатков кислых и основных аминокислот.



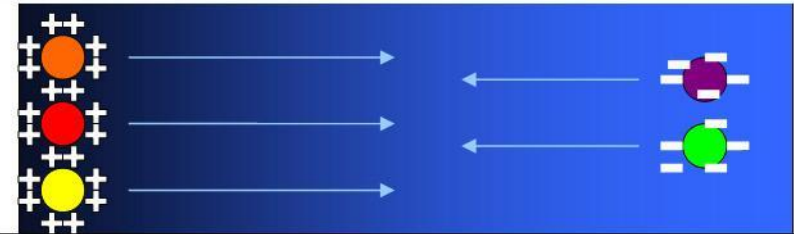
Stable pH gradient



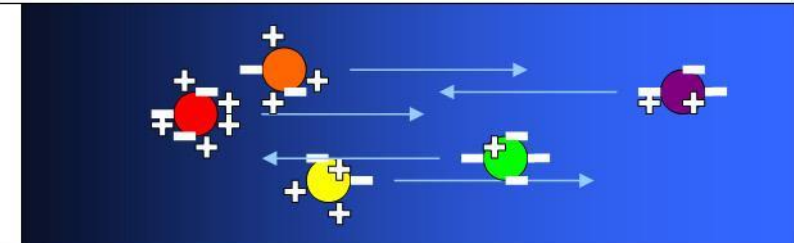
Изоэлектрофокусировани

e

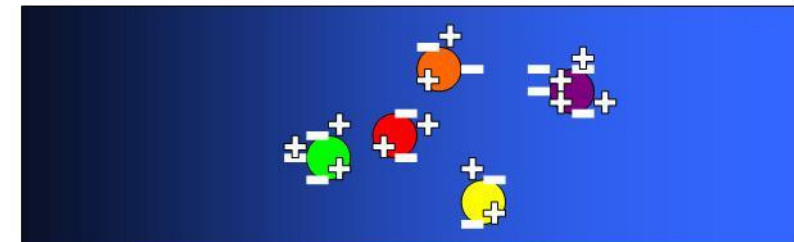
- = Isoelectric point at pH 7.5
- = Isoelectric point at pH 6.8
- = Isoelectric point at pH 8.5
- = Isoelectric point at pH 10.1
- = Isoelectric point at pH 5.6



At low pH, most proteins have a positive charge while at high pH, most proteins have a negative charge.



When an electric field is present, the cathode and anode ends pull the proteins to their isoelectric point where each individual protein possesses a neutral charge.

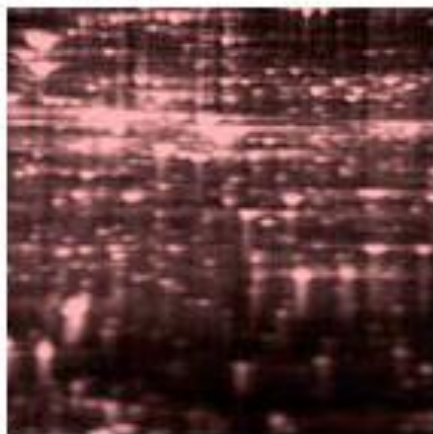


The proteins stopped migrating because they've reached their isoelectric point at a unique pH level.

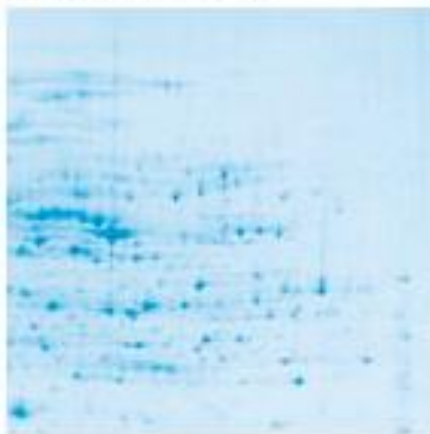


Детекция результатов электрофореза

Flamingo



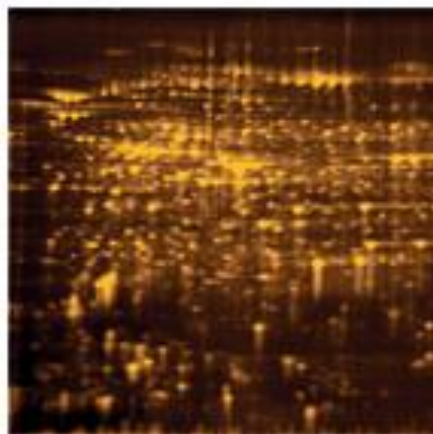
Coomassie Blue



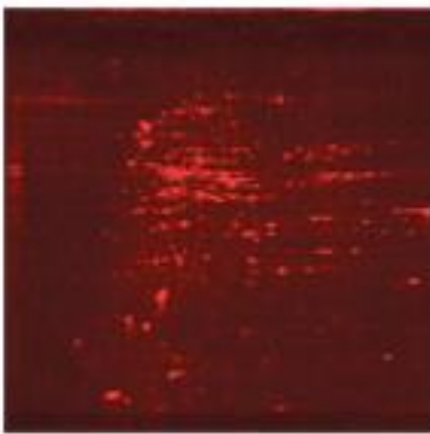
Silver



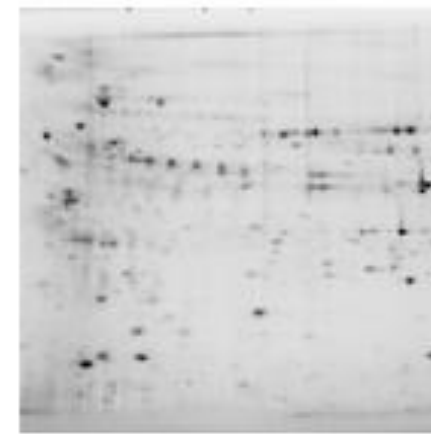
Oriole



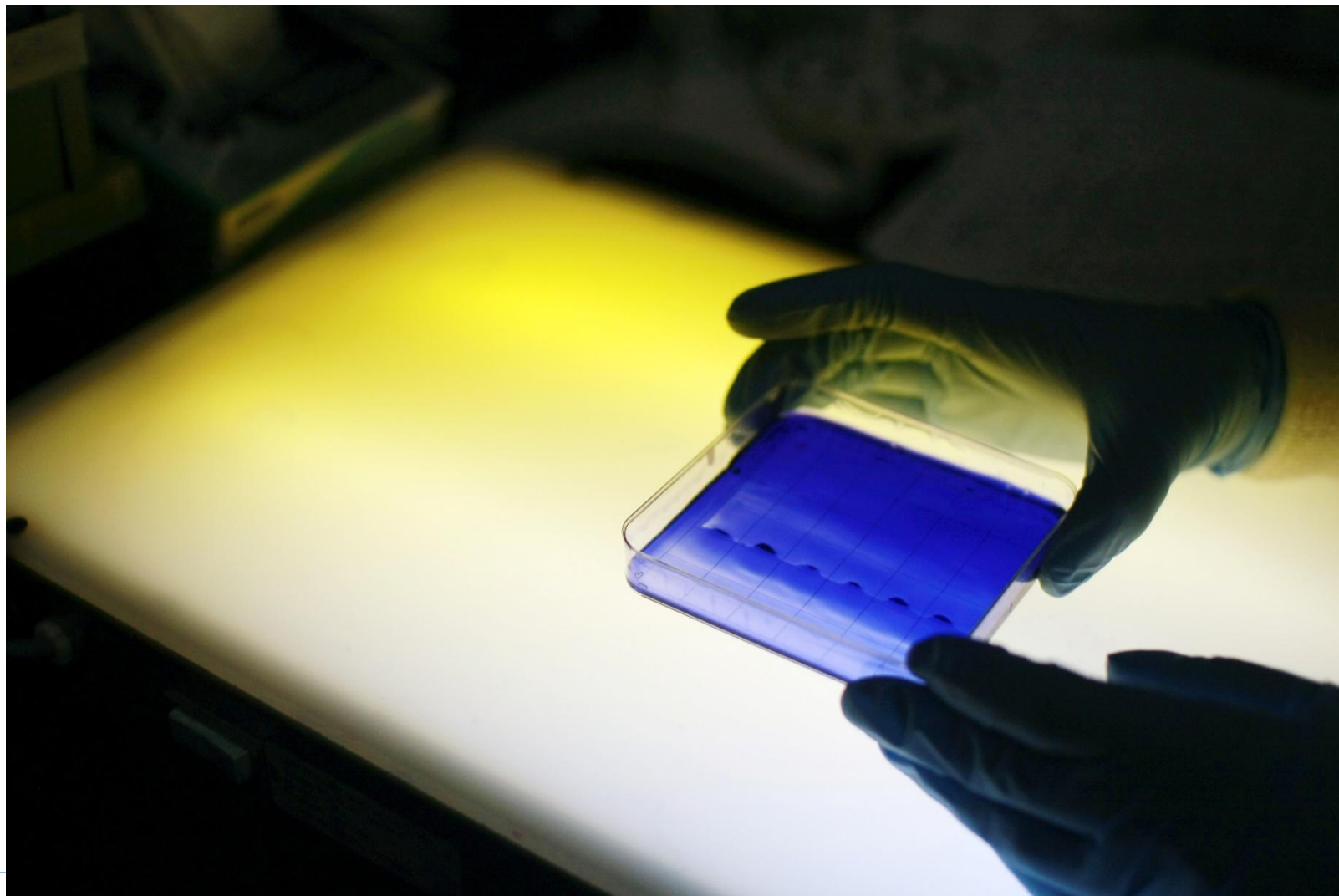
SYPRO Ruby



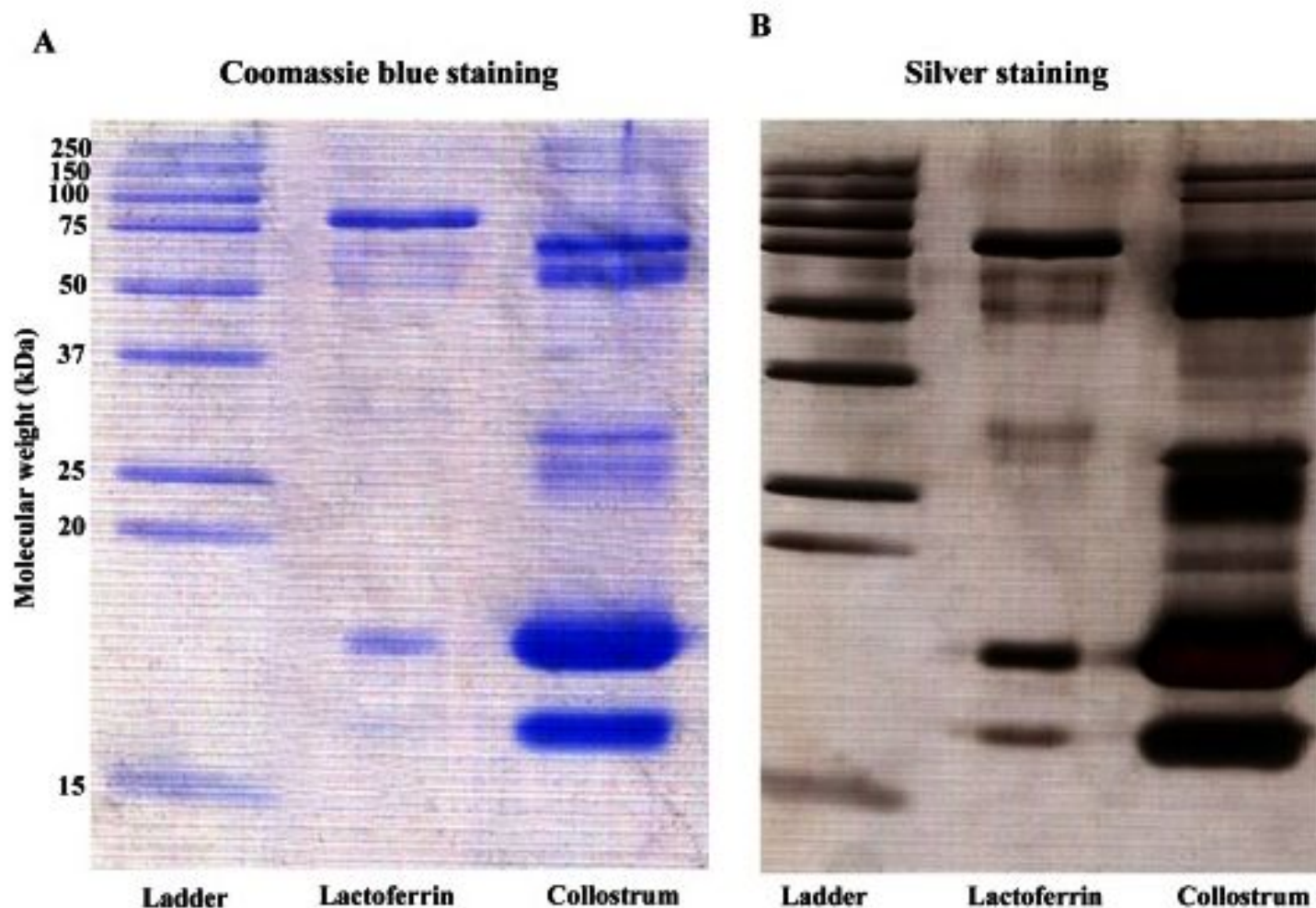
Stain-free



Детекция результатов электрофореза



Детекция результатов электрофореза

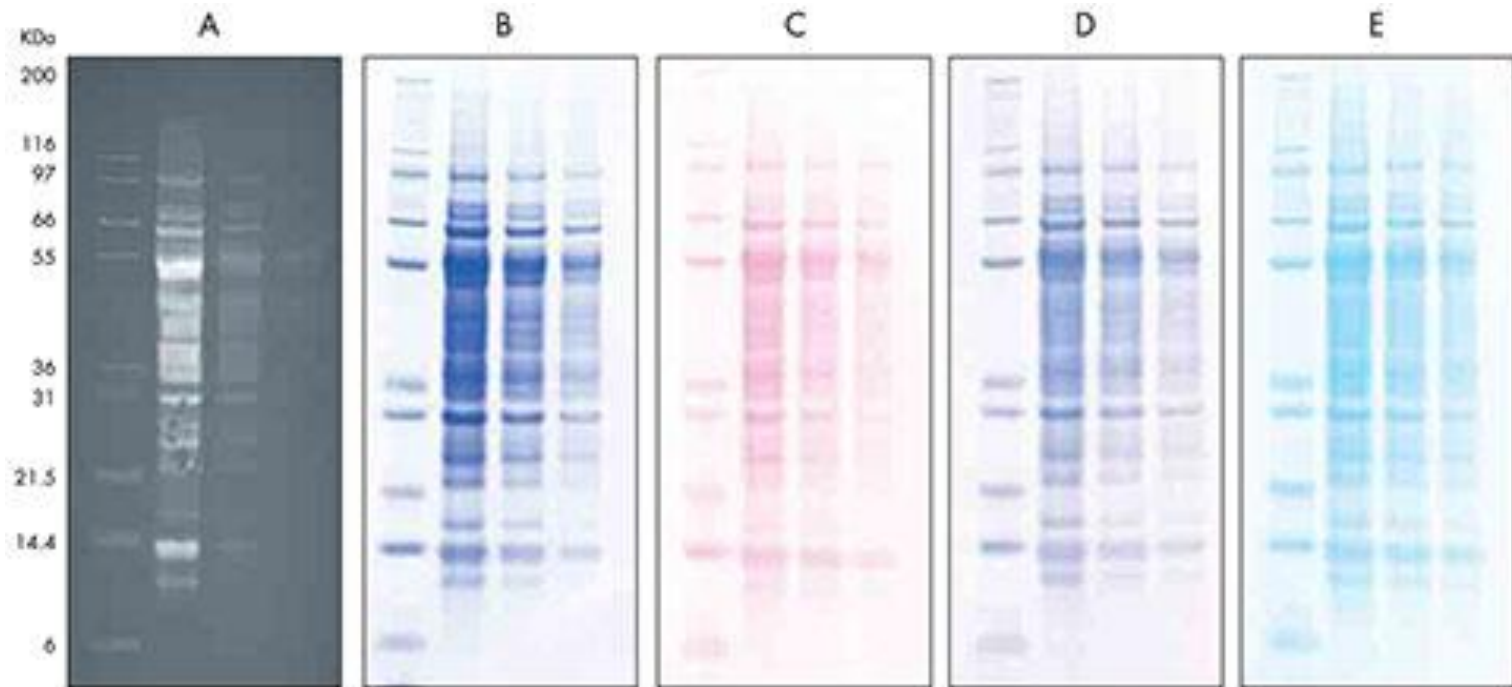


Электроперенос

- Камеры для электропереноса Biorad



Детекция результатов электропереноса



(A) Трансиллюминация

(B) Кумасси бриллиантовый синий

(C) Понсо красный

(D) Амидочерный

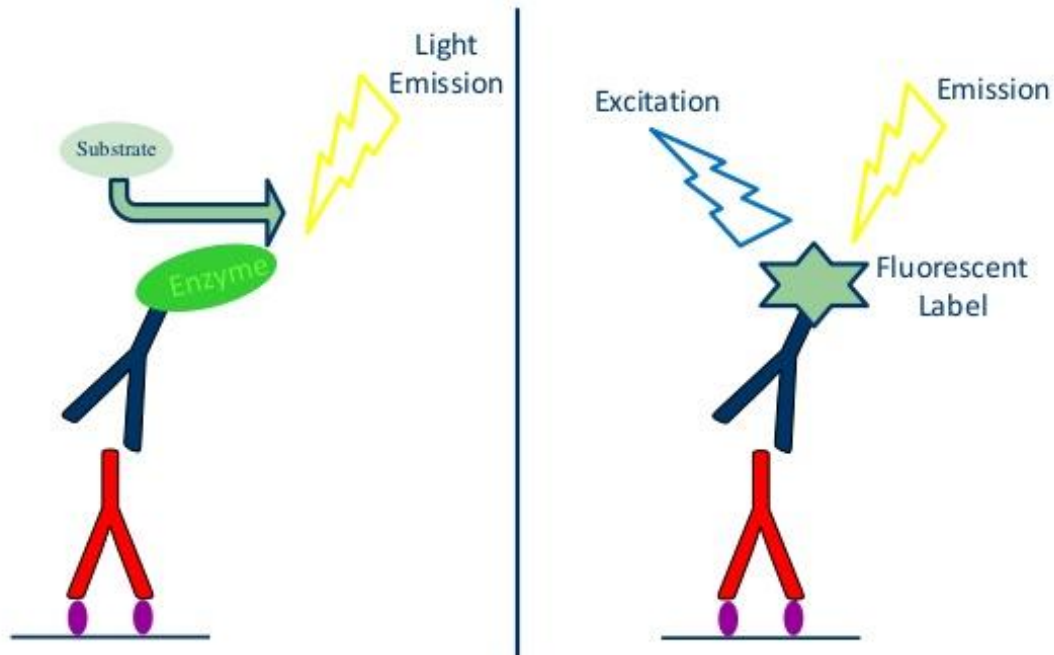
(E) Окрашивание двухвалентными металлами.

Детекция результатов электрофореза и электропереноса



Детекция результатов электропереноса

Chemical vs. Immunofluorescence



ИФА (иммуноферментный анализ)



Визуализация радиоактивной метки

- Мембрана контактирует с рентгеновской пленкой
- Авторадиограмма на соответствует положению радиоактивного зонда на мембране



unbound probe is washed off
and layed onto X-ray film



Определение концентрации белка с применением флуоресцентных зондов

□ Qubit 2.0

