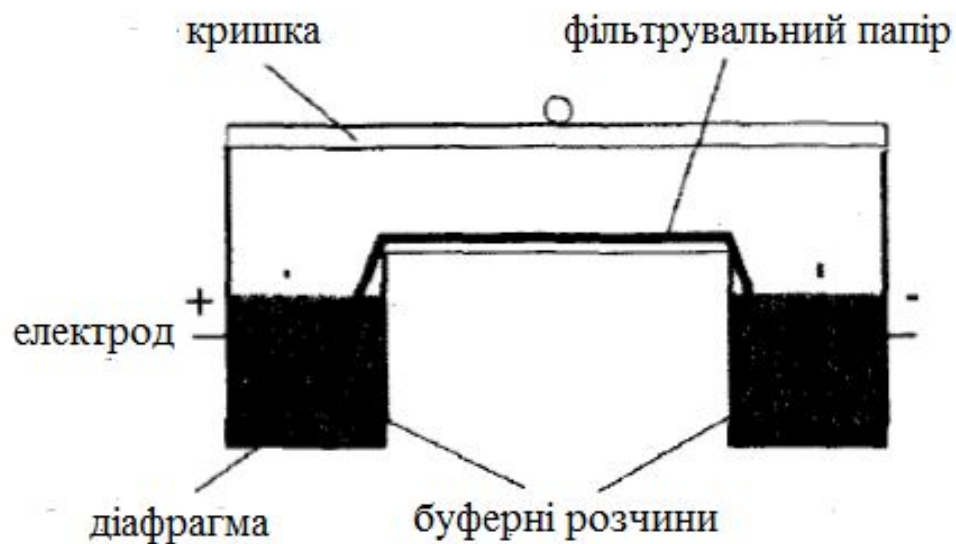
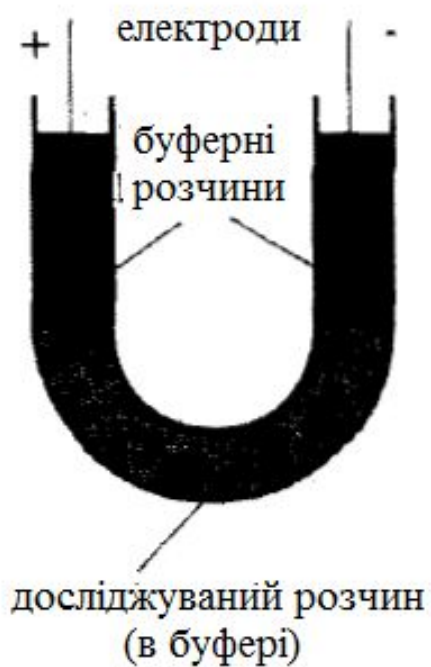


Електрофорез

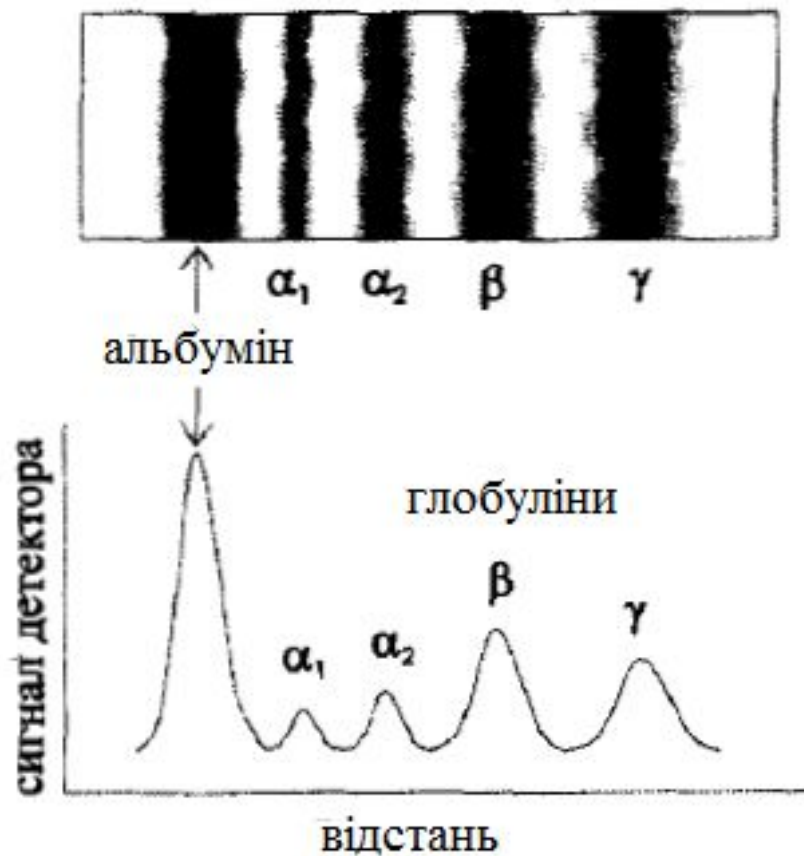
Зміст:

1. Класичний електрофорез.
2. Капілярний електрофорез.

Класичний електрофорез



Електрофореграма



Терміни:

Електрофорез – це рух заряджених частинок у розчині під дією електричного поля.

Електрофореграма – зображення, яке отримується після розділення складної суміші за допомогою електрофорезу і специфічного проявлення.

Електрофоретичний метод – спосіб просторового розділення молекул, які мають різний заряд і розміри, шляхом їх переміщення в електричному полі.

Електрофоретична рухливість молекули – швидкість руху зарядженої молекули (см/год) в електричному полі напруженістю 1 В/см.

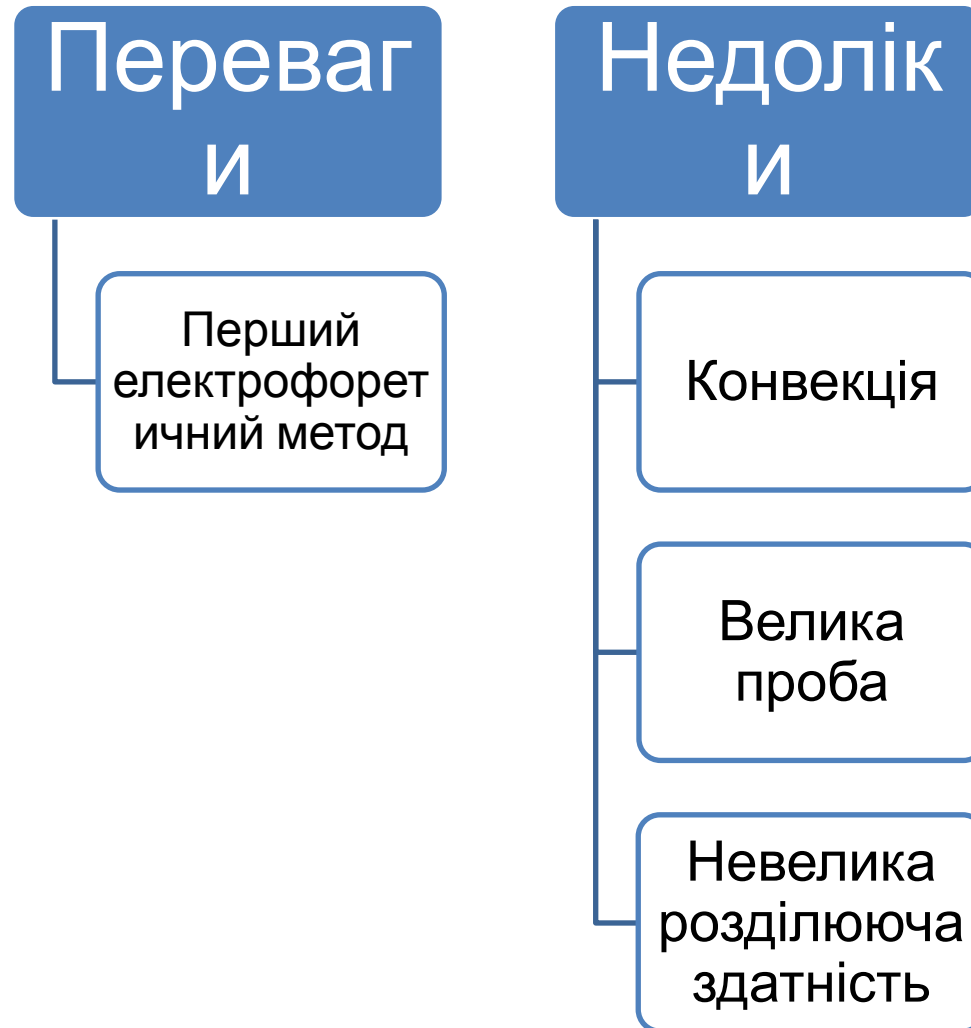
Зональний електрофорез – електрофорез, який проводиться при постійному значенні рН буферного розчину, який заповнює носій (папір, гель).

Гель-електрофорез

Гель-електрофорез – це метод, у якому заряджені молекули розділяються за рахунок фізичних властивостей, таких як заряд або маса, при продавлюванні через гелеву матрицю за допомогою електричного струму.

Ізоелектрична точка – значення рН середовища, при якому позитивні і негативні заряди іонізованих груп скомпенсовані, тому заряд молекули дорівнює 0.

Електрофорез з рухомою межею



Електрофорез на папері



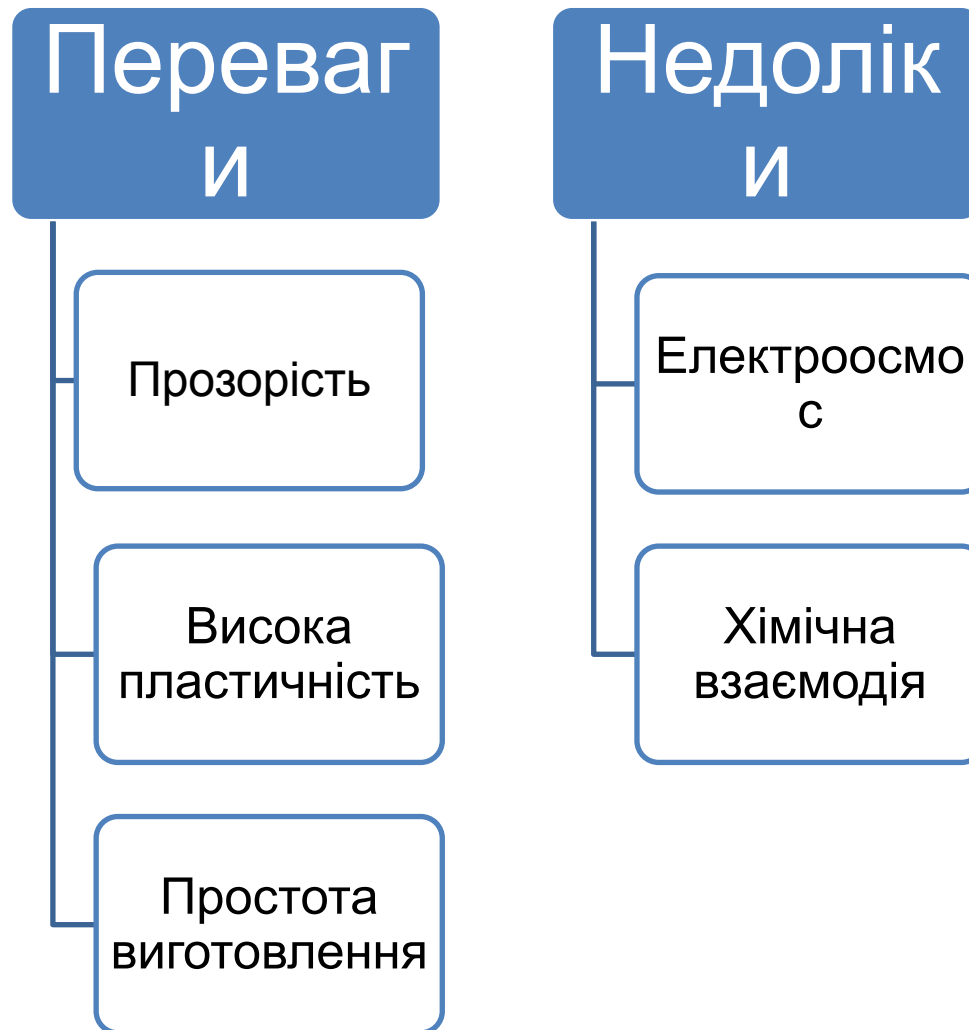
Електрофорез на ацетаті целюлози



Електрофорез у крохмальному гелі



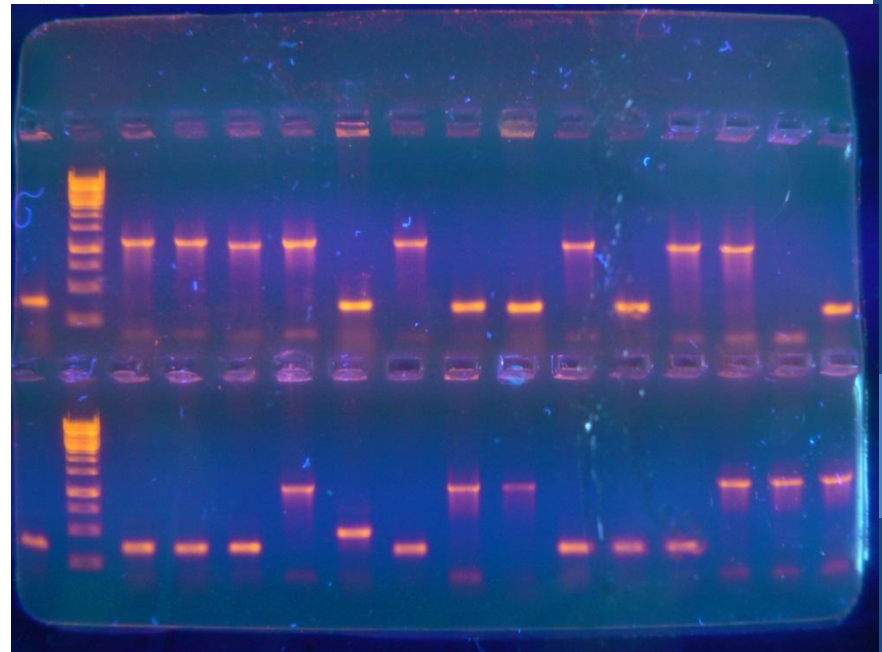
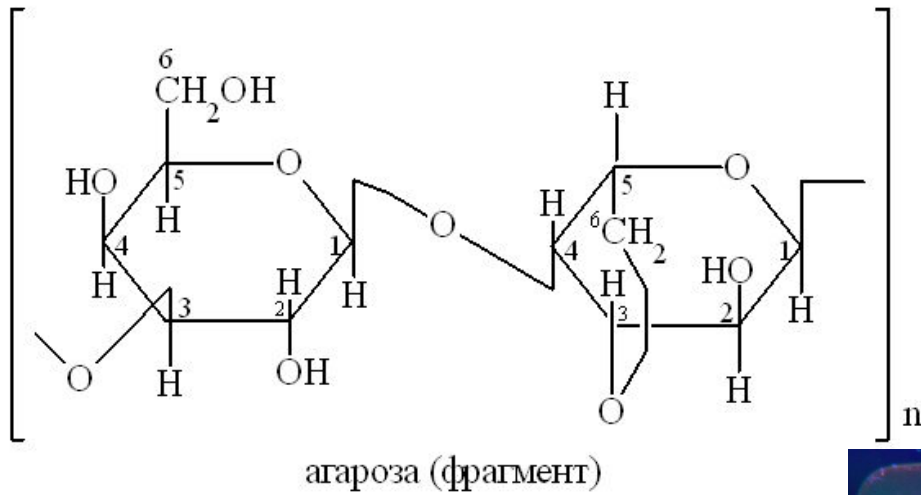
Електрофорез в агаровому і агарозному гелі



Електрофорез у поліакриламідному гелі



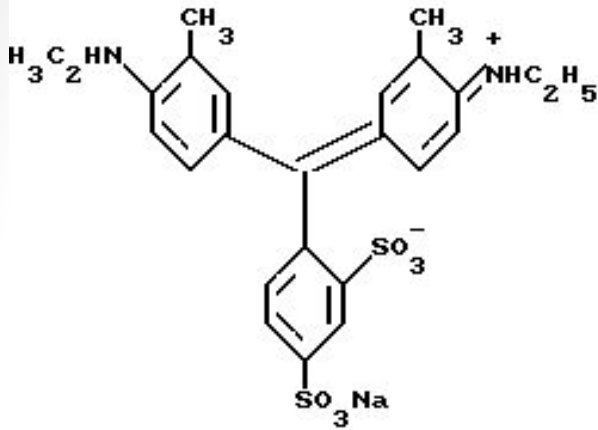
Електрофорез в агарозному гелі



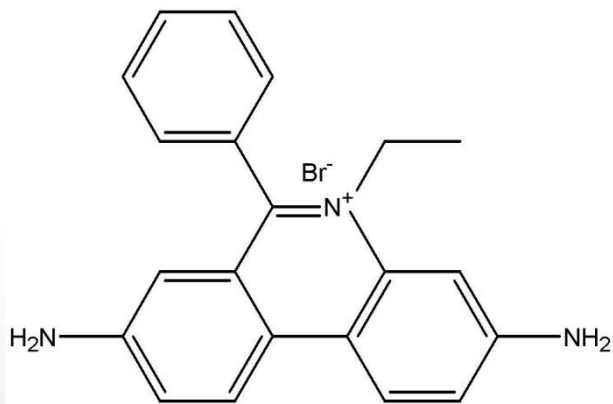
Вплив концентрації гелю на розділення

Концентрація агарози, %	Діапазон розмірів ДНК, н. п.
0,75	10000-15000
1,00	500-10000
1,25	300-5000
1,50	200-4000
2,00	100-2500
2,50	50-1000

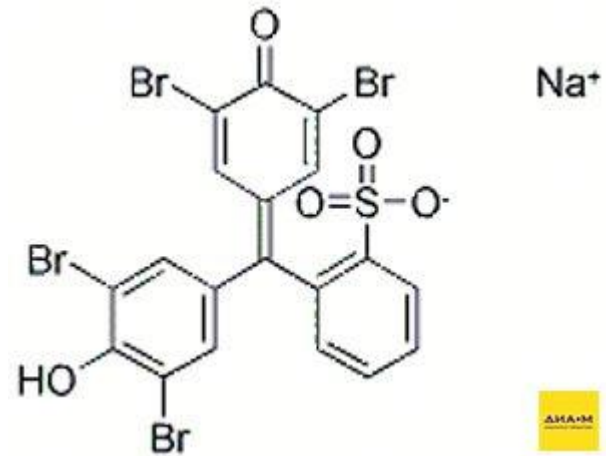
Барвники



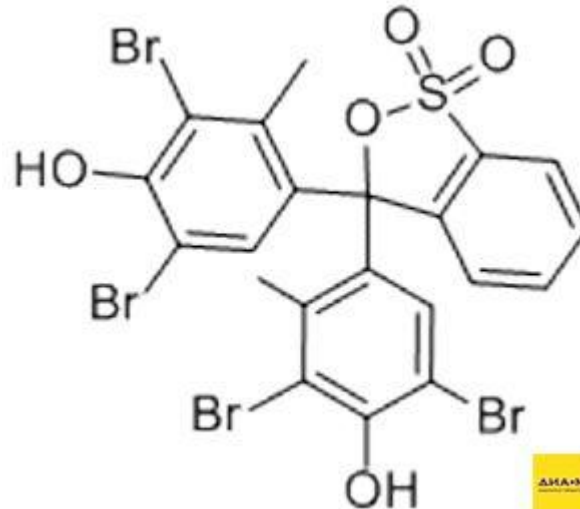
ксиленціано
л



бромуватий
еритій

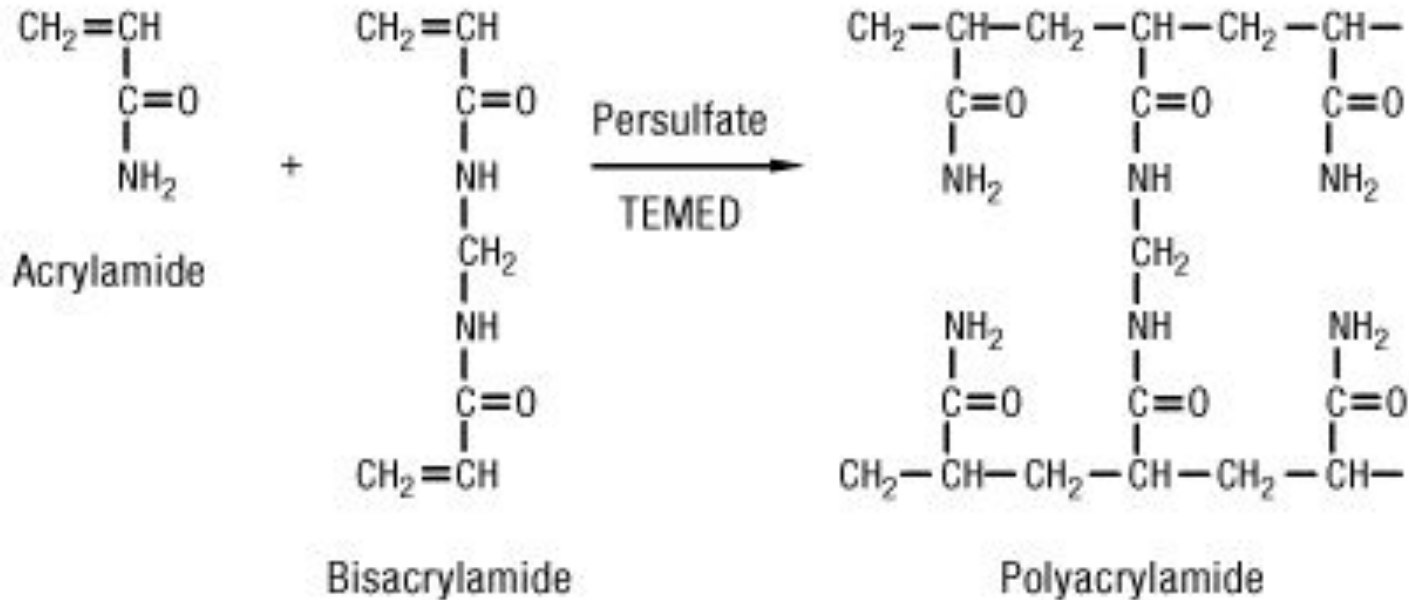


бромфеноловий
синій



бромкрезоловий
зелений

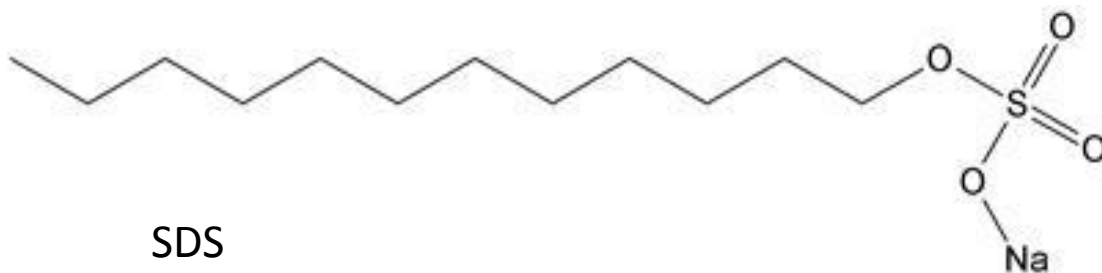
Електрофорез у поліакриламідному гелі



Вплив концентрації гелю на розділення

Концентрація агарози, %	Розмір білка, кДа
5,0	36-205
7,5	24-205
10,0	14-205
12,5	14-66
15,0	10-45

Денатурующий электрофорез



Sigma

- Міозин з м'язів свинні – 200000
- Бета-галактоїдаза з E.Coli – 116000
- Фосфорилаза В з м'язів кролика – 97400
- Альбумін бичачий – 66000
- Альбумін з курячого яєчного білка – 45000
- Карбоангідраза з бичачих еритроцитів - 29000

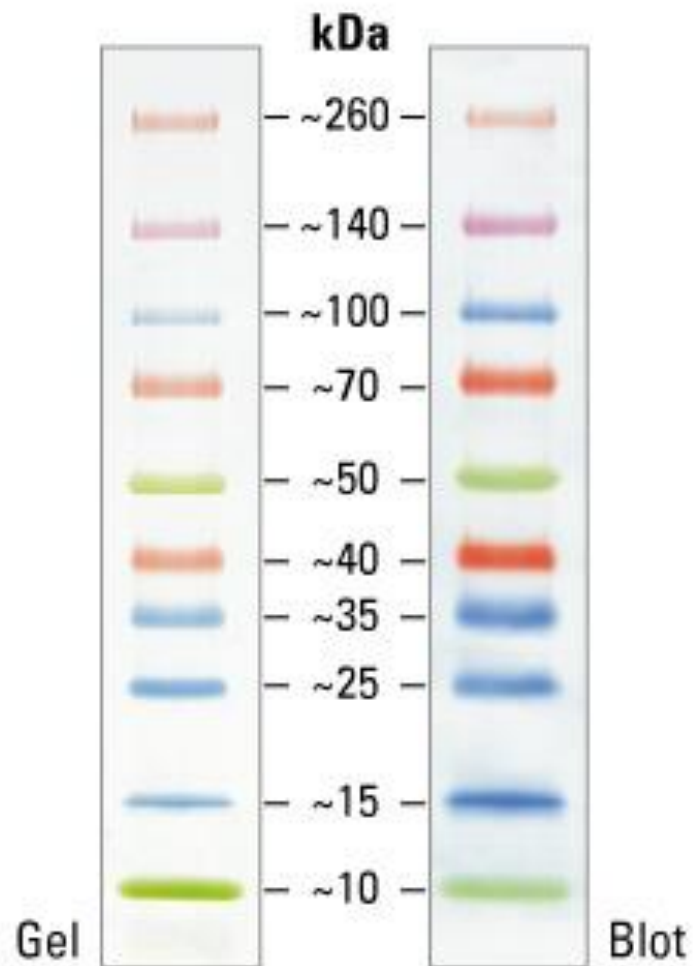
Sigma Dalton Mark VII-L

- Альбумін бичачий – 66000
- Альбумін з курячого яєчного білка – 45000
- Гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа з м'язів кролика – 36000
- Карбоангідраза з бичачих еритроцитів – 29000
- Трипсиноген з підшлункової залози бика – 24000
- Інгібітор трипсину сої – 20100
- Альфа-лактальбумін з коров'ячого молока – 14200.

Проявлення білків

- Фарбування барвниками;
- Проявлення сріблом;
- Фарбування цинком;
- Флуоресцентне проявлення;
- Специфічні проявники функціональних груп

Вестерн-блотінг



Прямі методи

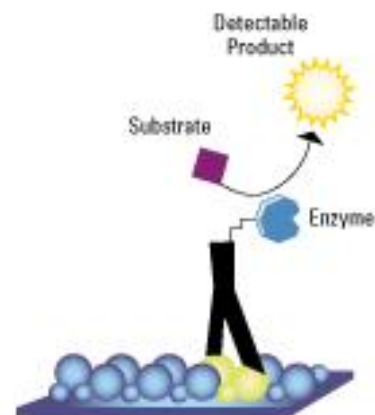
Переваги:

- Швидші;
- Немає перехресної взаємодії;
- Можливості використання подвійних міток на антитілах

Недоліки:

- Зниження імунної реакційної здатності при маркуванні первинних антитіл;
- Вартість первинних антитіл;
- Невеликий вибір антитіл;
- Слабке посилення сигналу.

Direct



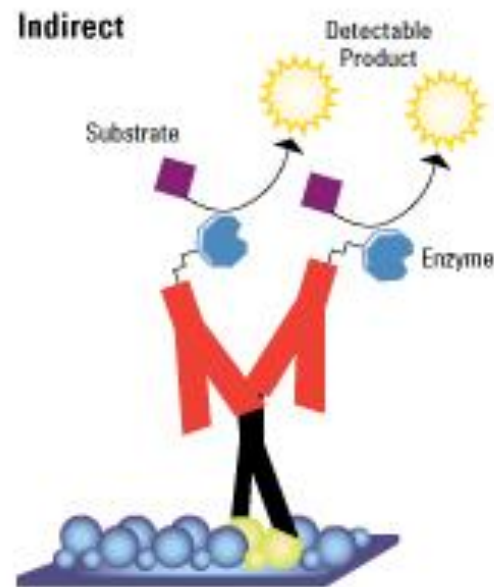
Непрямі методи

Переваги:

- Посилення сигналу;
- Велика кількість мічених вторинних антитіл;
- Перехресна взаємодія;
- Маркування не впливає на первинне антитіло;
- Зміна методу детектування.

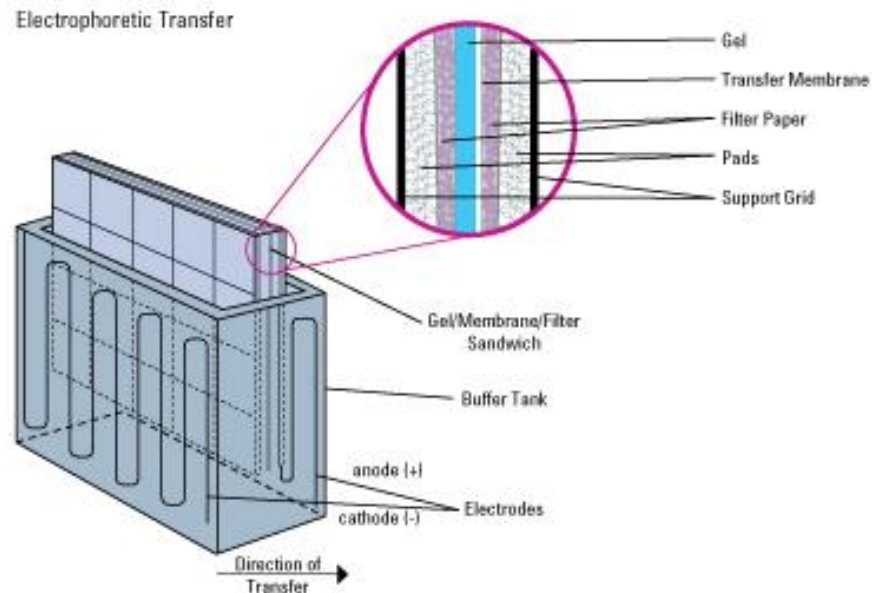
Недоліки:

- Неспецифічні взаємодії;
- Додаткові етапи процесу.



Методи перенесення:

- Дифузійне;
- Капілярне;
- Термічно-прискорене конвективне;
- Вакуумне;
- Електроелювання.



Ефективність перенесення:

- Склад гелю;
- Повний контакт гелю з мембраною;
- Положення електродів;
- Час перенесення;
- Розмір і склад білків;
- Напруженість поля;
- Наявність ПАР і спиртів у буфері.

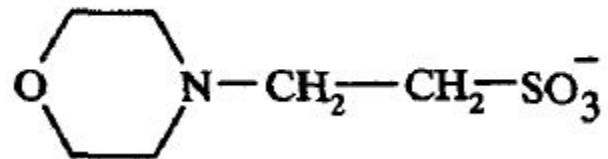
Рух частинок

$$v_i = E u_i$$

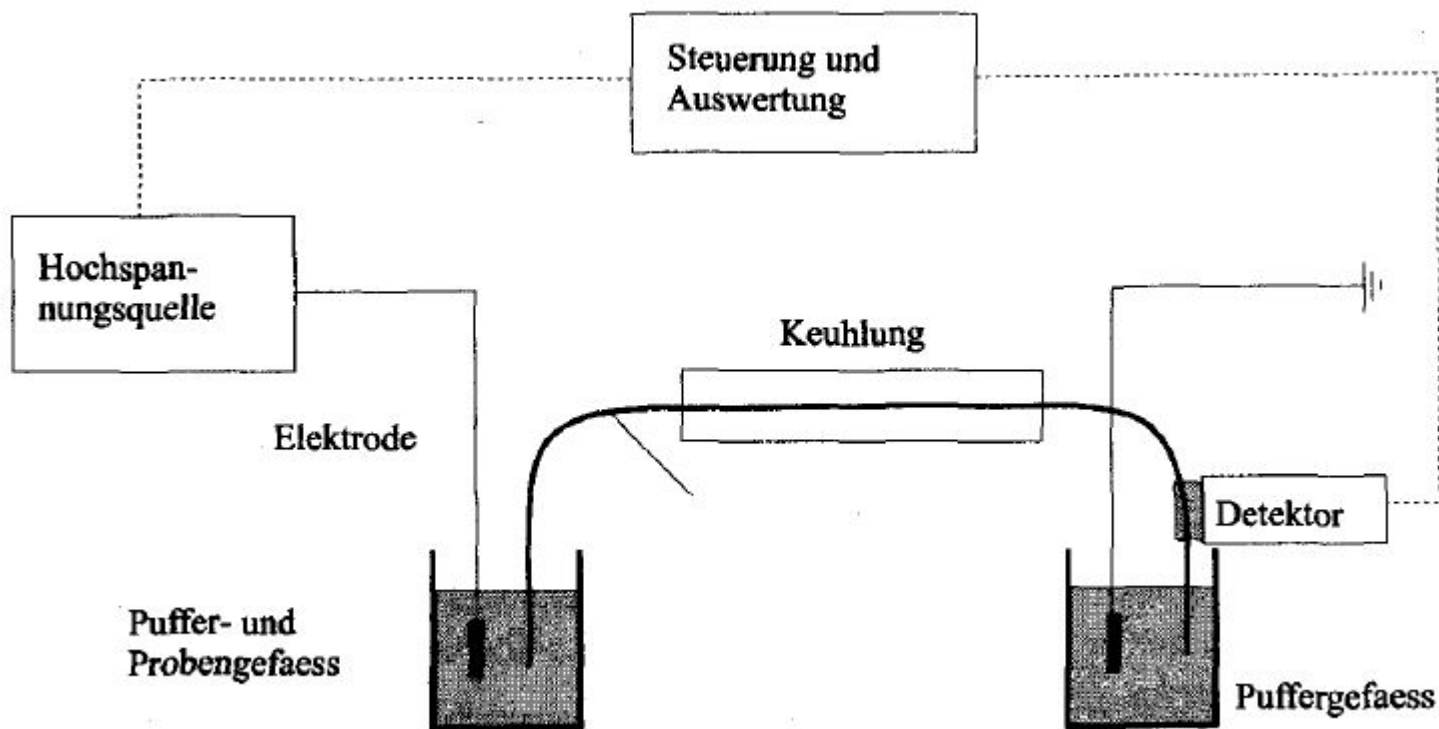
$$v = E_1 u_1 = E_2 u_2 = \dots = E_n u_n$$

$$u_1 > u_2 > \dots > u_n,$$

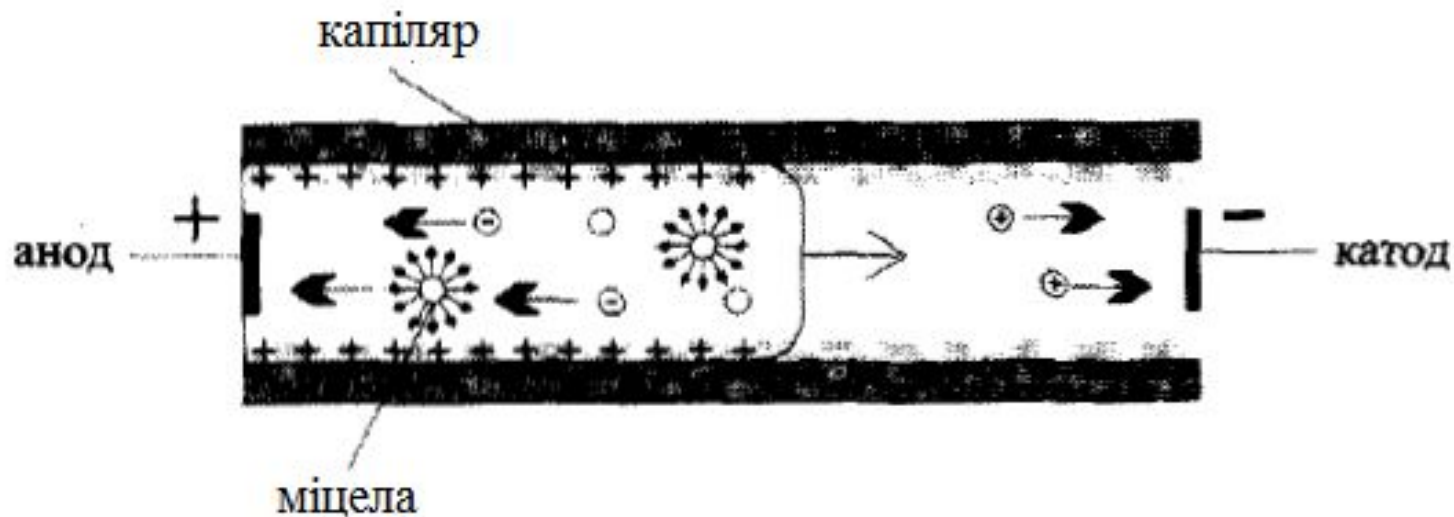
$$E_1 < E_2 < \dots < E_n.$$



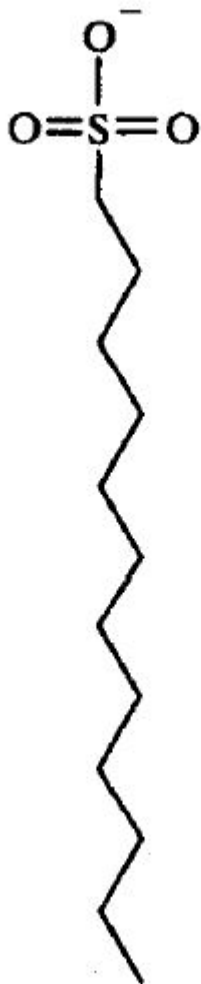
Капілярний електрофорез



Електроосмотичний потік



Міцелярна електрокінетична хроматографія



додecilсульфат

