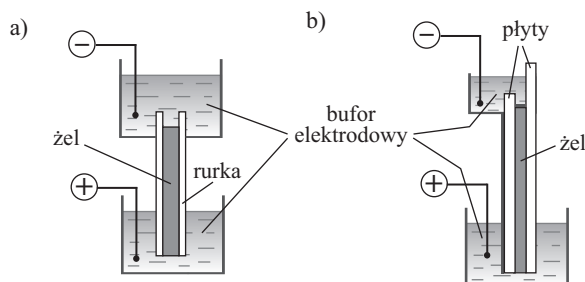


### 3.3. Elektroforeza żelowa

**Elektroforezę żelową** (*gel electrophoresis*) (*polyacrylamide gel electrophoresis* – *Clear Native PAGE*), można prowadzić w pozycji **ustawienia pionowego** (*vertical system*), dwiema metodami [3.3–3.8]:

1. za pomocą szklanych rurek (elektroforeza rurowa) (*tube electrophoresis*) (rys. 3.3a);
2. pomiędzy dwiema szklanymi płytami rozdzielonymi przekładkami dystansowymi (*spacers*) (elektroforeza płytowa) (*slab electrophoresis*) (rys. 3.3b), do których wprowadza się nośnik. Górna część nośnika musi być przykryta warstwą buforu elektrodowego (elektrolitu). Brak kontaktu elektrolitu z żelem powoduje przerwanie obwodu elektrycznego i zatrzymanie elektrolizy. Ciepło jest łatwiej odprowadzać przez ściankę kontaktującą się z jedną z płyt.

W metodzie 1 występują trudności z odprowadzeniem ciepła generowanego przez przepływający prąd. Dodatkową trudnością w obu metodach jest wyciekanie elektrolitu z górnej części do dolnej, co wymaga stałego uzupełniania.

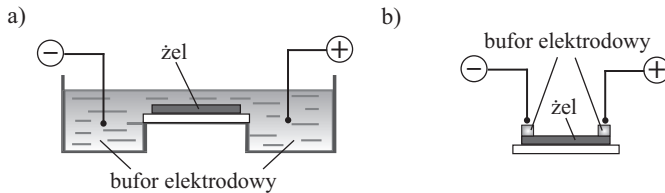


**Rys. 3.3.** Schematyczne przedstawienie rodzajów elektroforezy pionowej: a) elektroforeza rurowa, b) elektroforeza płytowa

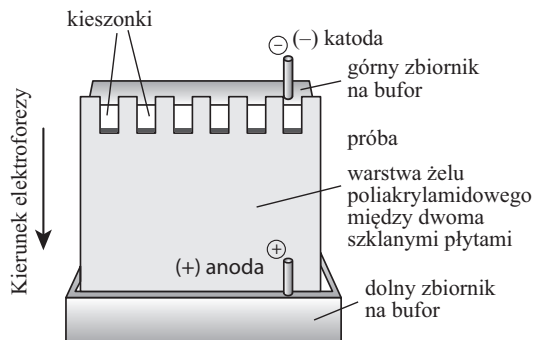
Elektroforezę w pozycji **ustawienia poziomego** (*horizontal system*), prowadzi się szklanej kuwecie z nośnikiem umieszczonym poziomo (rys. 3.4). Bufory elektrodowe zamknięte są w zestalonej agarozie lub warstwach bibuły filtracyjnej. Zaletą tej metody jest łatwe odprowadzenie ciepła oraz brak wycieku elektrolitu.

- Badane białko wprowadza się do rurki (8–10 cm długości i średnicy 1 cm) lub między płytki (10 cm × 20 cm) wypełnionej nośnikiem (żelem) od góry (rys. 3.5):
- używając buforów o identycznym pH do sporządzania nośnika, przygotowania próbki i przeprowadzania elektroforezy (ponieważ białka z próbki nie ulegają zagęszczeniu na linii startu, konieczne jest nanoszenie ich na nośnik o niewielkiej objętości i obecności środka zagęszczającego gliceryny);
  - stosując dwa rodzaje żelu o różnej porowatości i o różnym rozkładzie pH (**metoda Laemmliego**):

- w miejscu startu rozdziału pH wynosi 6,8, aby zwiększyć koncentrację białka przed startem i zapewnić równoczesny start do rozdziału (białka ulegają ściśnięciu do bardzo wąskiego paska, ok. 0,1 mm, dzięki czemu wnikają w żel rozdzielający w tym samym czasie, co pozwala na uzyskanie ostrych i wyraźnych prążków);
- żel drugi rozdzielający białka ma pH 8,8, następuje tu rozdzielanie według masy cząsteczkowej.



Rys. 3.4. Schematyczne przedstawienie rodzajów elektroforezy poziomej: a) zanurzeniowa, b) półsucha



Rys. 3.5. Schemat budowy zestawu do rozdzielania elektroforetycznego

Obecnie prowadzi się elektroforezę jednowymiarową w komercyjnych zestawach pokazanych na rys. 3.5 i fot. 3.1 [3.7].

Elektroforezę prowadzi się przy stałych wartościach jednego z trzech parametrów: natężenia, napięcia lub mocy.

1. Przy **stałym natężeniu** ilość wydzielanego ciepła zwiększa się z czasem, co może prowadzić do przegrzania żelu i zaburzeń przy rozdzielaniu białek, a także ich termicznej denaturacji. Wymaga to specjalnego chłodzenia. Elektroforezę prowadzi się przy natężeniu 12–30 mA na każdy żel o grubości 1 mm i szerokości 10 cm. Z uwagi na krótki czas trwania, jest to najczęściej stosowana metoda rozdzielania.
2. Przy **stałym napięciu** szybkość przemieszczania się białek maleje z czasem, zmniejsza się też ilość wydzielanego ciepła.
3. Przy **stałej mocy** szybkość przemieszczania się białek maleje z czasem, a ilość wydzielanego ciepła jest stała i nie prowadzi do przegrzania próbki.