

# *ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ*

Γεώργιος Τσιώτης  
Τμήμα Χημείας  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

# ΟΡΙΣΜΟΣ

- Ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση των σωματιδίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο.
- Ιδιότητες των σωματιδίων (φορτίο, μέγεθος) προκαλούν μια διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα.
- Τα διαφορετικά σωματίδια διαχωρίζονται και συσσωρεύονται, σε ζώνη.
- Οι χημικές ενώσεις που φέρουν φορτίο λόγω ιοντισμού μετακινούνται, ανάλογα με το είδος του φορτίου, προς την άνοδο (θετικό πόλο) ή προς την κάθοδο (αρνητικό πόλο).
- Εφαρμογές
  - στο διαχωρισμό μακρομορίων, π.χ. πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, DNA και RNA, και οργανικών ουσιών
  - στον έλεγχο της καθαρότητας δείγματος
  - ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο
  - προσδιορισμό MB

# ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1937: Arne Tiselius apparatus  
(υγρό μέσο)

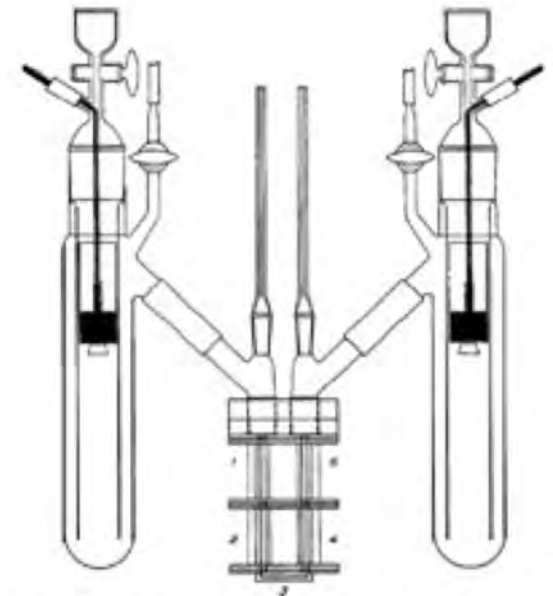
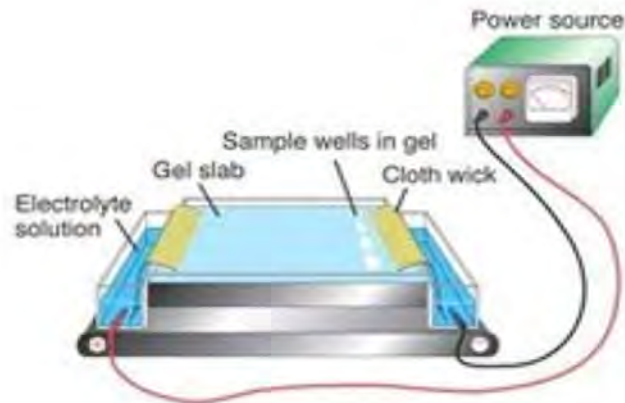


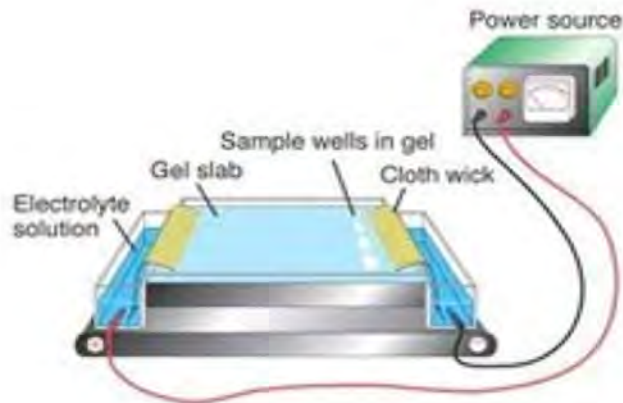
Fig. 3. Electrophoresis U-tube assembled with electrode containers for reversible electrodes.

1950: Ηλεκτροφόρηση ζώνης  
(στερεό ή gel)



# ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1937: Arne Tiselius apparatus  
(υγρό μέσο)



1950: Ηλεκτροφόρηση ζώνης  
(στερεό ή gel)

# ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Σ' ένα ηλεκτρικό πεδίο ασκούνται διαφορετικές δυνάμεις σε ένα φορτισμένο σωματίδιο

- Δύναμη επιτάχυνσης  $F_e = q \cdot E$       $q = z \cdot e$
- Δύναμη τριβής:  $F_{tr} = f_c \cdot u$
- $E$  = ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- $z$  = καθαρό φορτίο του μορίου
- $f_c$ : συντελεστή τριβής
- $u$  ταχύτητα μετανάστευσης

είναι οι δυνάμεις σε ισορροπία, το σωματίδιο κινηται με μια σταθερή ταχύτητα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο.

# ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

$$F_e = F_f \rightarrow q \cdot E = f_c \cdot v$$

$$v = \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E$$

- **v** = ταχύτητα μετακίνησης μορίου σε ηλεκτρικό πεδίο
- **E** = ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- **z** = καθαρό φορτίο του μορίου
- **f** = συντελεστή τριβής (εξαρτάται από μάζα και σχήμα μορίου και από πυκνότητα του μέσου)
- Ο συντελεστής **u** (**κινητικότητα**) είναι μια αναλογικότητα μεταξύ του ρυθμού μετανάστευσης και ένταση του πεδίου
- ειδική για κάθε ουσία



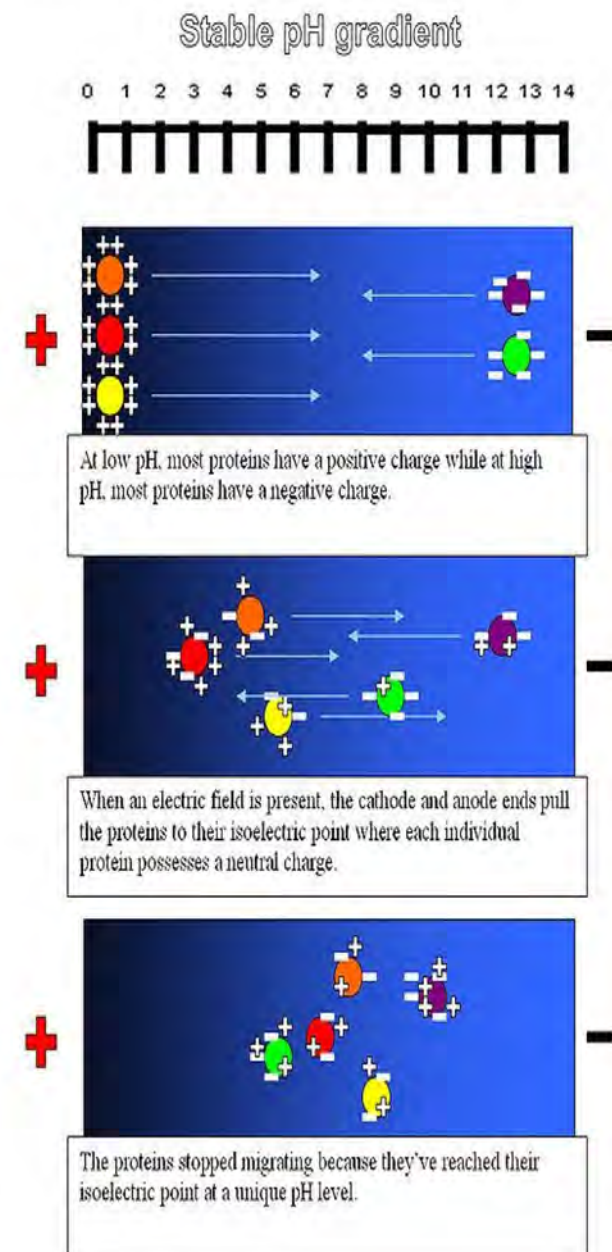
# ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

$$\mu = Q / k \cdot r \cdot n$$

- **Ηλεκτροφορητική κινητικότητα ( $\mu$ )**
  - Ανάλογη με το φορτίο του μορίου ( $Q$ )
  - Αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθός του ( $r$ ) και τη γλοιότητα του διαλύματος ( $n$ )

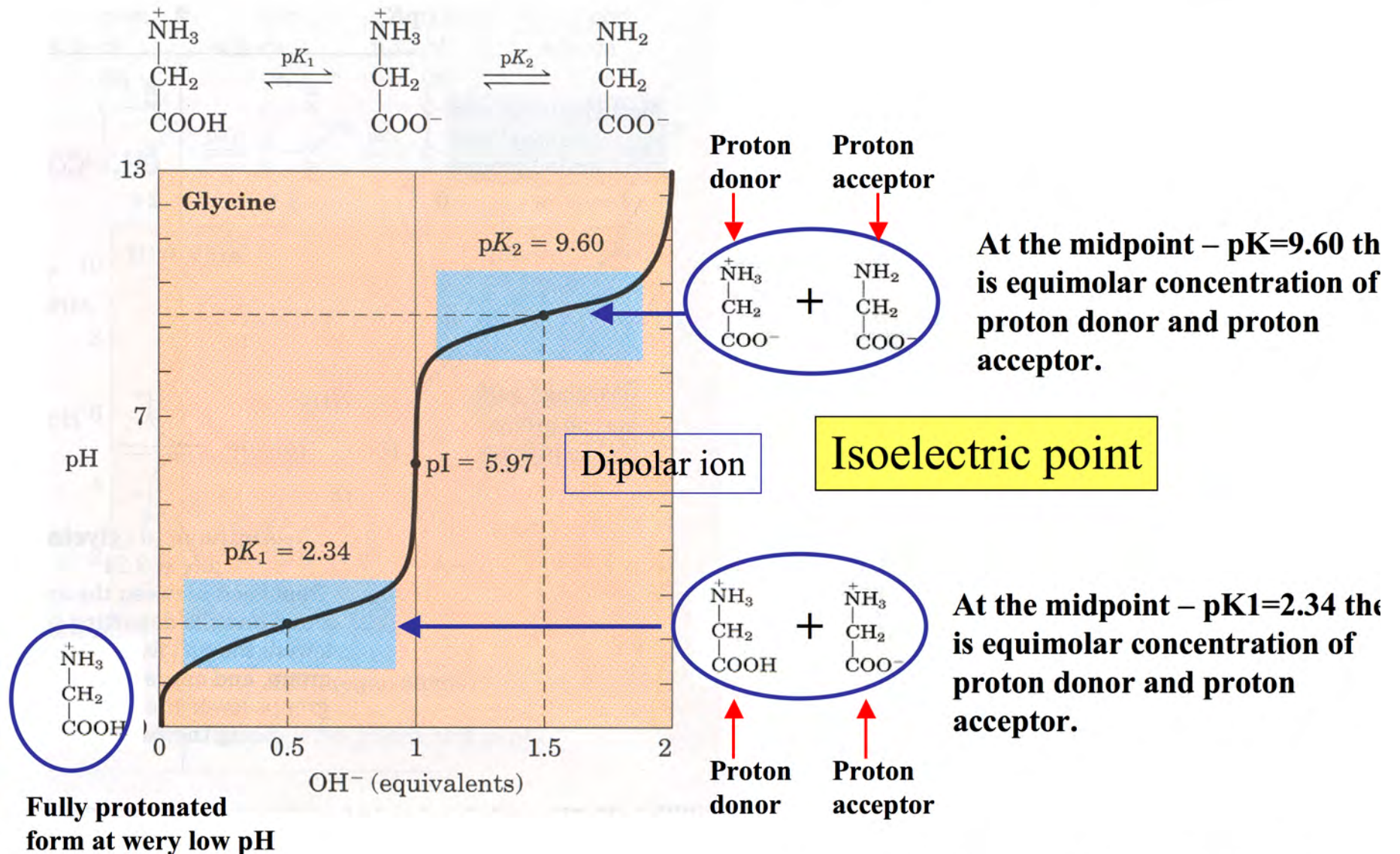
# ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

- Οι πρωτεΐνες έχουν αρνητικό ή θετικό ολικό φορτίο ανάλογα με το pH (αμφολυτικές ιδιότητες).
- ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ:
- pH στο οποίο το ολικό φορτίο είναι ουδέτερο.
- Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών γίνεται με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα.





# ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ



# ΚΥΡΙΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

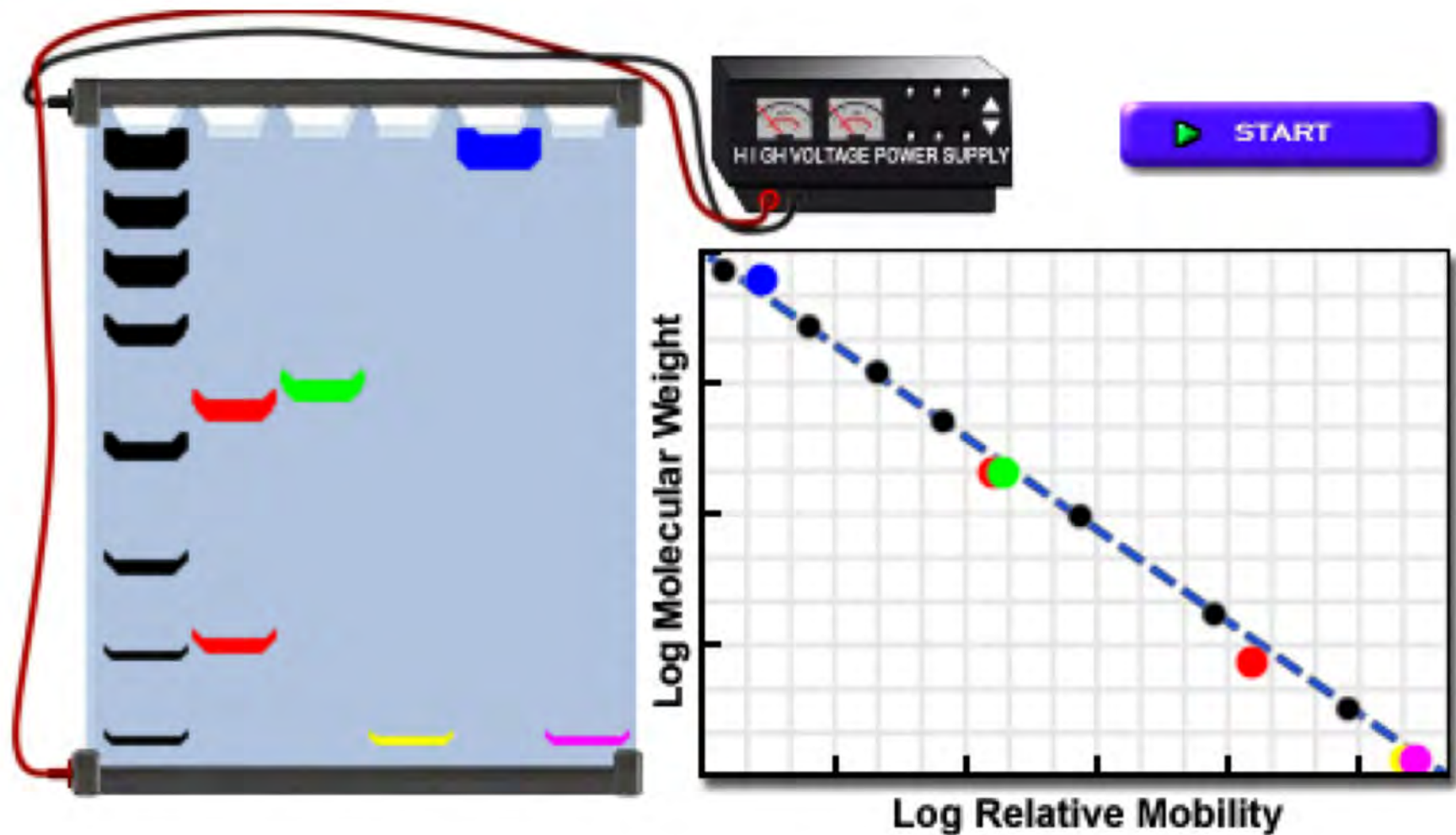
- Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (zone electrophoresis, ZE)
- Ισοταχής ηλεκτροφόρηση (Isotachopheresis, ITP)
- Ισοηλεκτρικός εστιασμός (Isoelectric focusing)

# ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **Ρόλος:**
  - Μεταφορά ρεύματος
  - Διατήρηση του pH σταθερού
  - καθορίζει το ηλεκτρικό φορτίο της διαλυμένης ουσίας
  - Υψηλή ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος παράγουν ευκρινείς ζώνες παράγουν περισσότερη θερμότητα
- **Είδη:**
  - Βαρβιτουρικά
  - Tris (τρις υδροξυλαμινομεθάνιο)
    - Tris/Acetate/EDTA
    - Tris/Borate/EDTA
- **pH = 8,8**



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΖΩΝΗΣ





# ΜΕΣΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

- **Χαρτί** (Paper electrophoresis)
- **Οξική κυτταρίνη** (Cellulose acetate electrophoresis)
- **Τριχοειδής σωλήνας** (Capillary electrophoresis)
- **Πηκτές (gels)** – πορώδη υλικά
  - Αγαρόζης (Agarose electrophoresis)
  - Πολυακρυλαμίδης (PAGE)
    - Με αποδιάταξη –απώλεια τεταρτοταγούς δομής (SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate)
    - Χωρίς αποδιάταξη (native PAGE)
    - Δύο διαστάσεων (2D-electrophoresis)

# ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

- Εύκολος χειρισμός
- Φυσικό και όχι χημικό περιβάλλον για το δείγμα
- Εύκολος χειρισμός του δείγματος
- Μπορεί να αποθηκευτεί το gel (4° C)
- Όσο μεγαλύτερη η πυκνότητα τόσο μικρότερα μακρομόρια διαχωρίζονται (0,6 – 3%)
- Συνήθως χρησιμοποιείται 1%

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- **Ηλεκτροφόρηση μεγάλων μορίων DNA**
- Ηλεκτροφόρηση **πρωτεϊνών MB>200kDa**, λόγω μη ομοιογενών πόρων

# ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

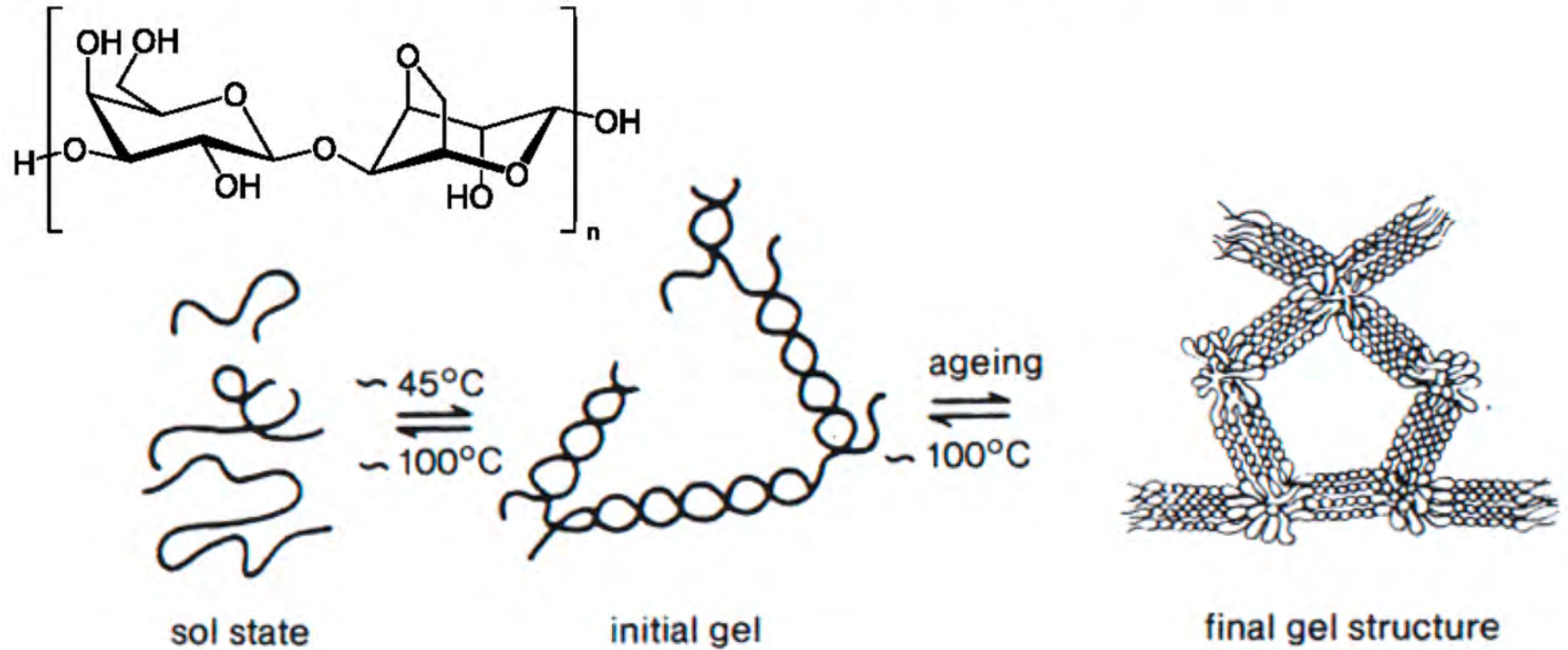


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)



# ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
<b>0.5%</b>	<b>1 kb to 30 kb</b>
<b>0.7%</b>	<b>800 bp to 12 kb</b>
<b>1.0%</b>	<b>500 bp to 10 kb</b>
<b>1.2%</b>	<b>400 bp to 7 kb</b>
<b>1.5%</b>	<b>200 bp to 3 kb</b>
<b>2.0%</b>	<b>50 bp to 2 kb</b>

**Table 1: Correct Agarose Gel Concentration for Resolving DNA Fragments**



# ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

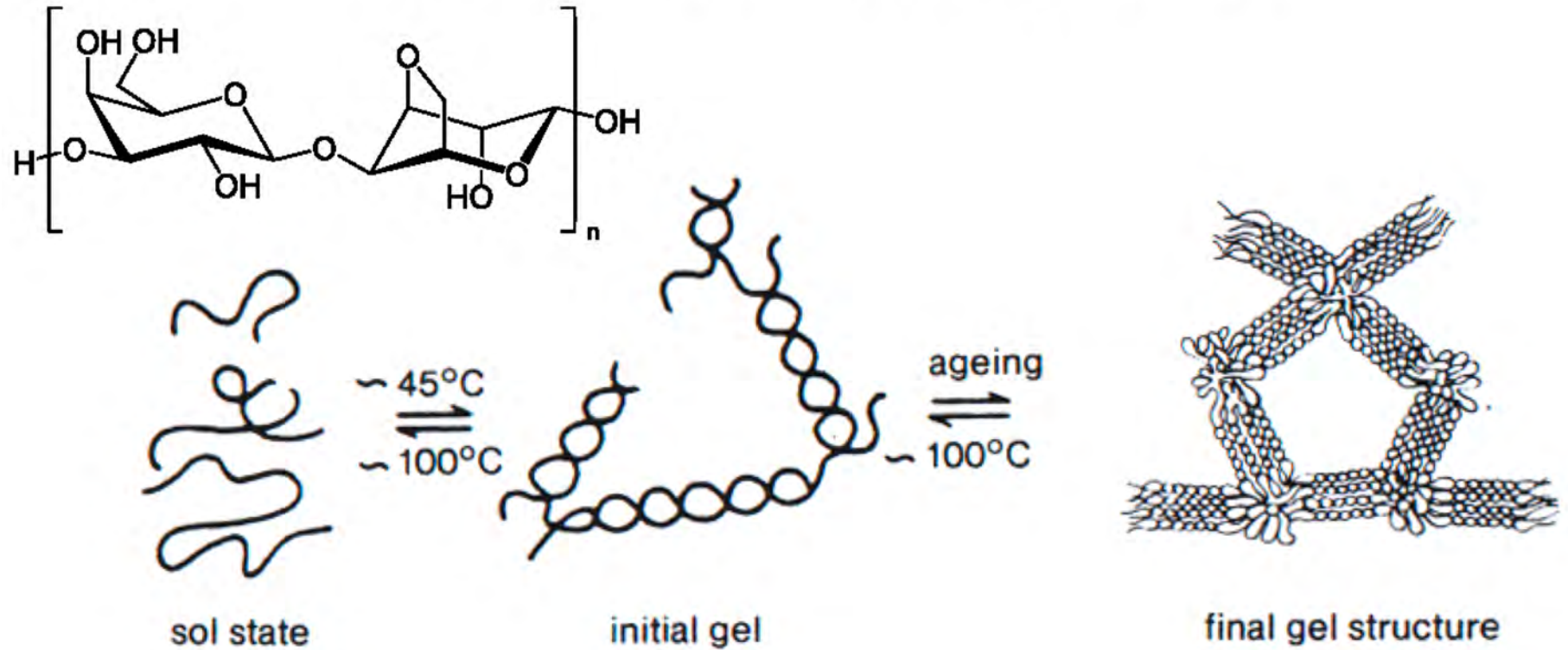
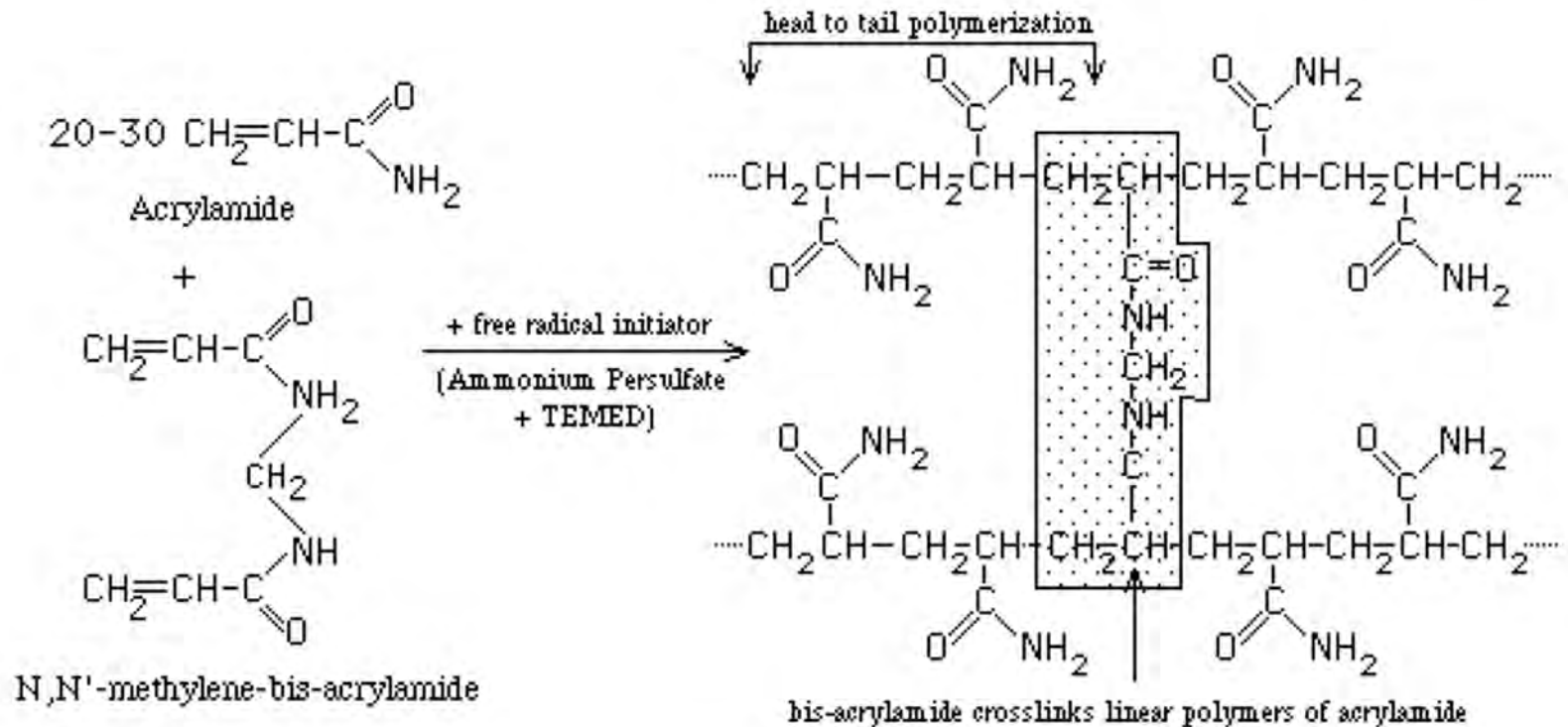


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

# ΠΗΚΤΕΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (PAGE)

- Ομοιόμορφοι πόροι
  - **ΠΡΟΣΟΧΗ** Η ακρυλαμίδα είναι νευροτοξίνη
- ## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
- Ηλεκτροφόρηση **πρωτεϊνών** MB 5-2000kDa για
    - Διαχωρισμό πρωτεϊνών
    - Διαχωρισμό ισομορφών πρωτεϊνών
  - Ηλεκτροφόρηση **μικρών μορίων DNA ή RNA και ολιγονουκλεοτιδίων**
  - **Πυκνότητες** 6%, 8%, 10%, 12%, 15%

# ΠΗΚΤΕΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ



The gel pores size is determined by two parameters:

Total monomer concentration (%T)

$$\%T = \frac{\text{gr (acrylamide + bisacrylamide)}}{\text{total volume(ml)}} \times 100$$

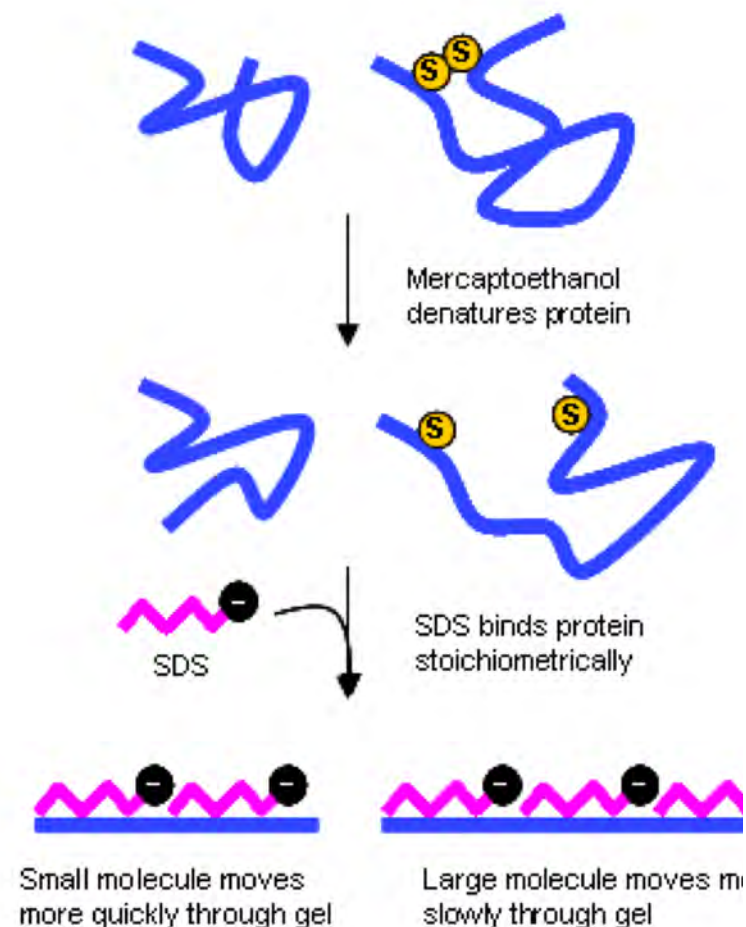
The weight percentage of crosslinker (%C)

$$\%C = \frac{\text{gr (bisacrylamide)}}{\text{gr (acrylamide + bisacrylamide)}} \times 100$$



# ΠΗΚΤΕΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

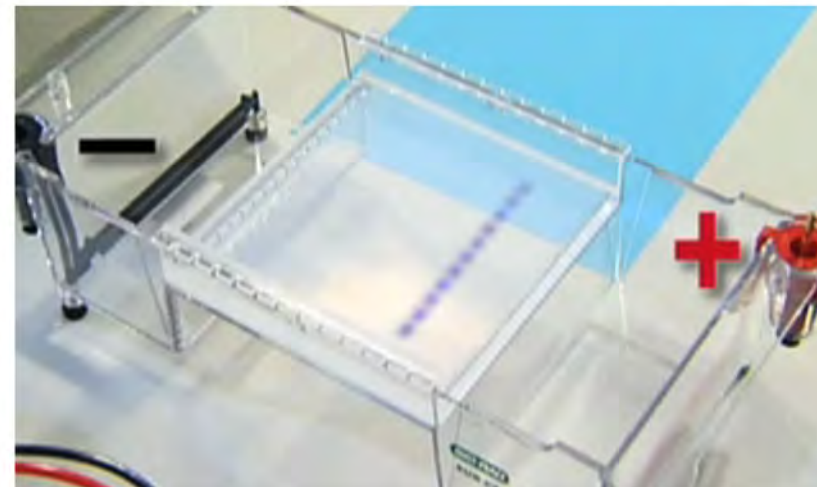
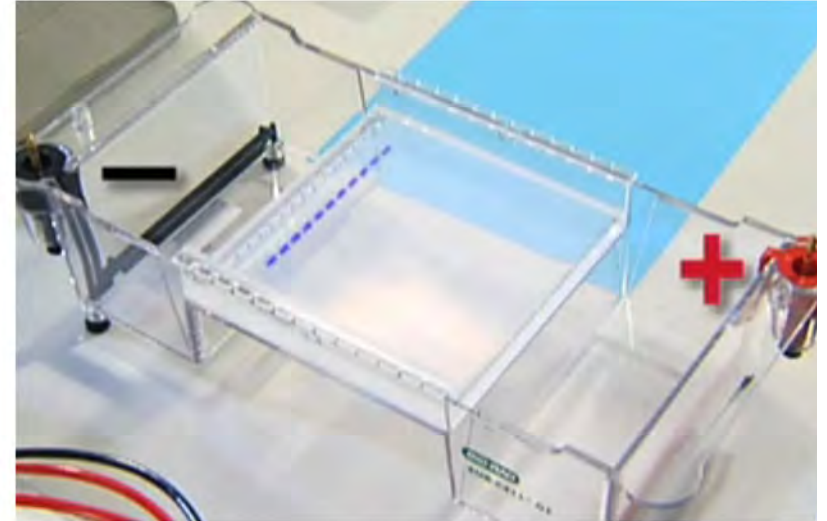
- **Αποδιάταξης (denaturing)**
  - SDS (Sodium dodecyl sulfate):  
Αποδιατάσσει την πρωτεΐνη
- SDS, 2-μερκαπτο-αιθανόλη / DTT σπάει δισουλφιδικούς δεσμούς.
- γλυκερόλη κάνει το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος πιο πυκνό από το περιβάλλον ρυθμιστικό διεξαγωγής της γέλης πρωτεΐνης, επιτρέποντας την εύκολη φόρτωση μέσα στους θύλακες της πηκτής.
- **Χωρίς αποδιάταξη (native)**
  - Χρήση στην πρωτεωμική
  - Μελέτη τεταρτοταγούς δομής πρωτεΐνης
  - Οπτικοποίηση όχι μόνο με χρώσεις αλλά και με μεθόδους ανοσολογικές



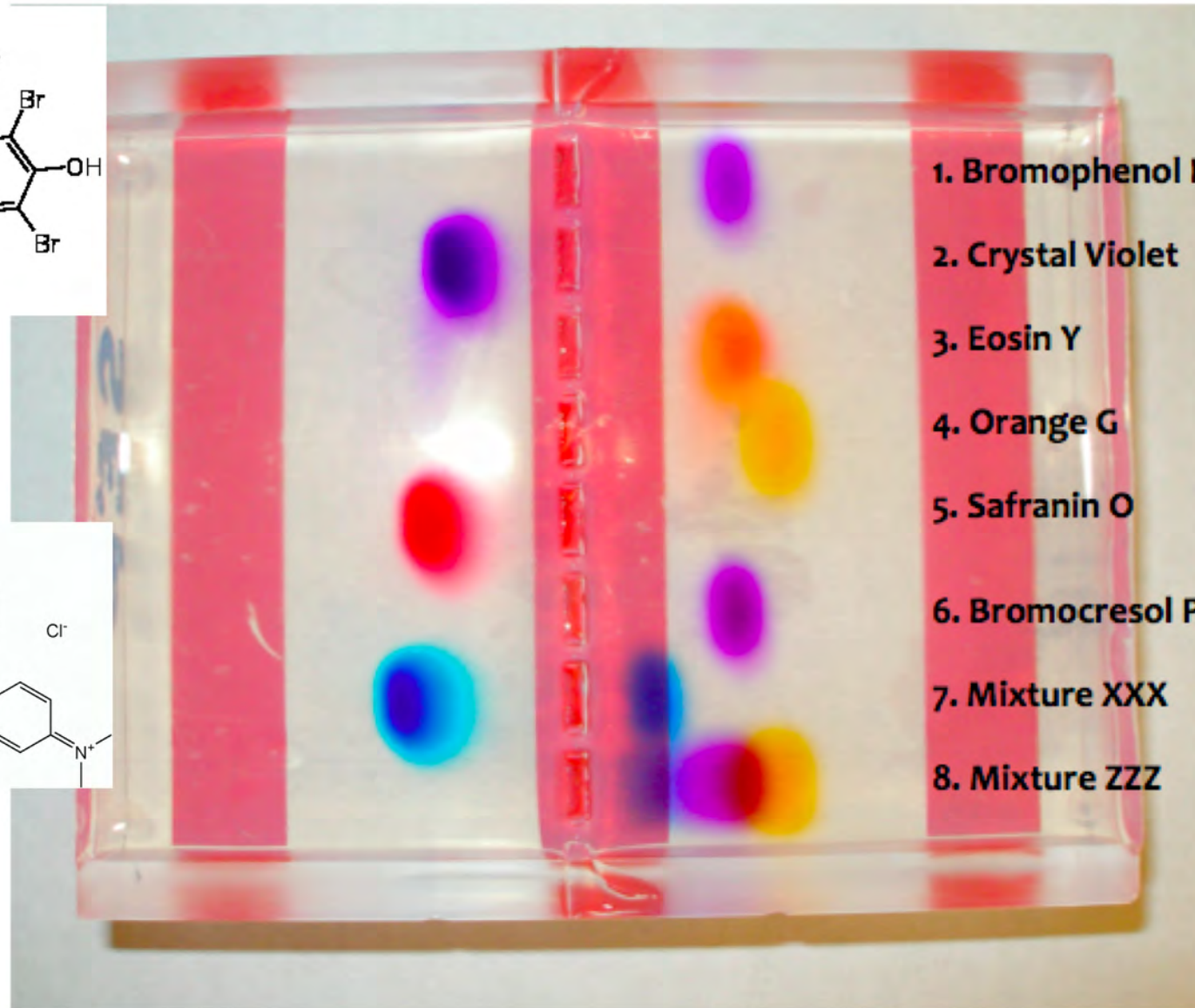
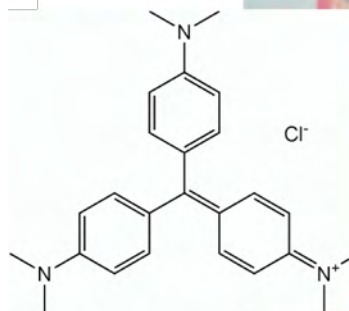
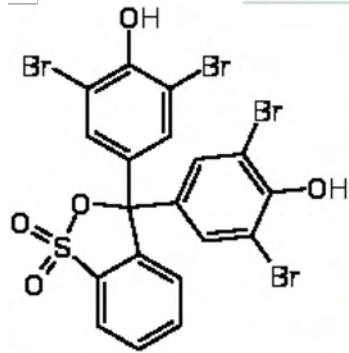


# ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΦΟΡΤΙΣΗΣ (Loading buffers)

- Bromophenol blue
- Cresol Red
- Orange G



# ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΦΟΡΤΙΣΗΣ



1. Bromophenol Blue

2. Crystal Violet

3. Eosin Y

4. Orange G

5. Safranin O

6. Bromocresol Purple

7. Mixture XXX

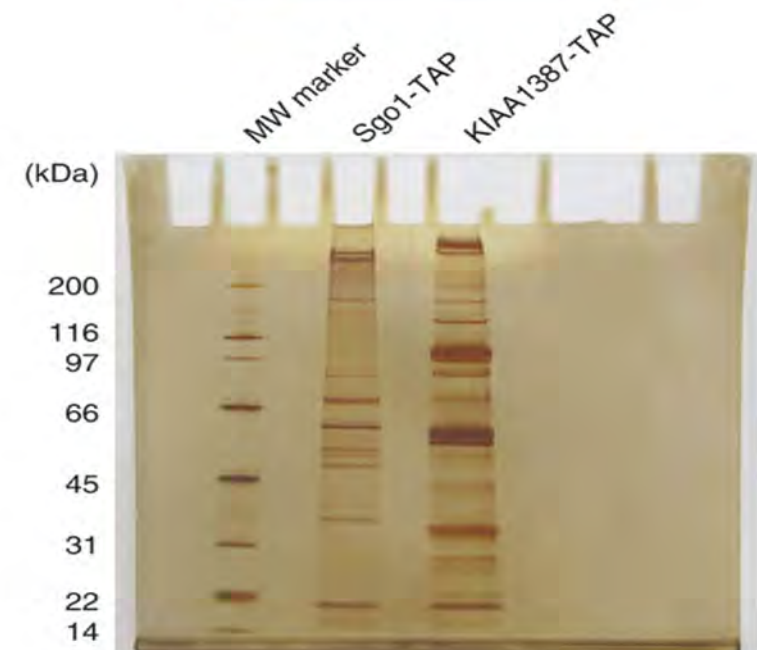
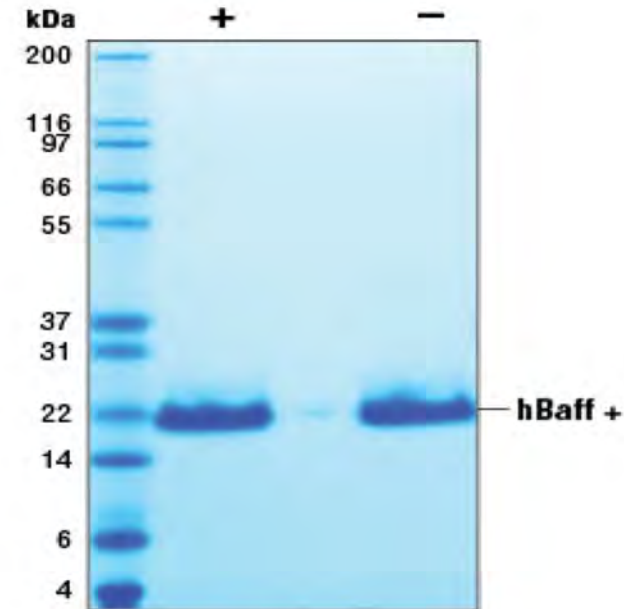
8. Mixture ZZZ

+

# ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

- **Χρώσεις**

- **Coomassie Brilliant Blue** (έως 30 ng)
- **Colloidal Coomassie Blue** (έως 10 ng)
- **Zinc-imidazole** (έως 2 ng)
- **Silver stain** (έως 2 ng)
- **SYPRO Ruby** (έως 1 ng)
- **Oil Red O**
- **Sudan Black B**

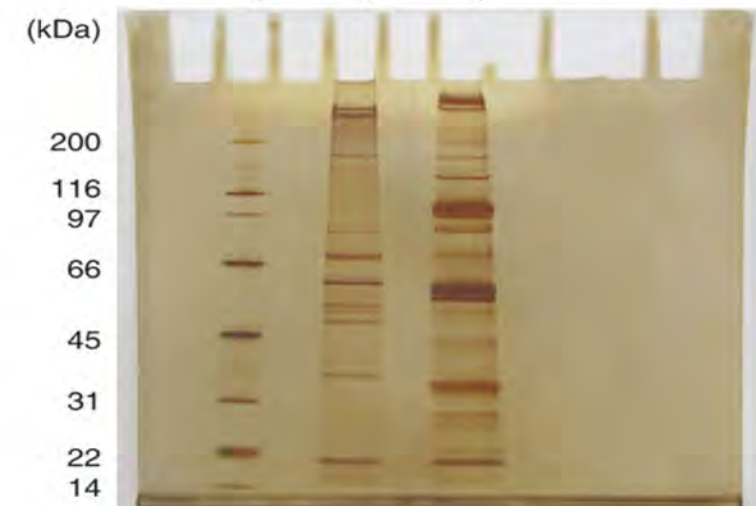
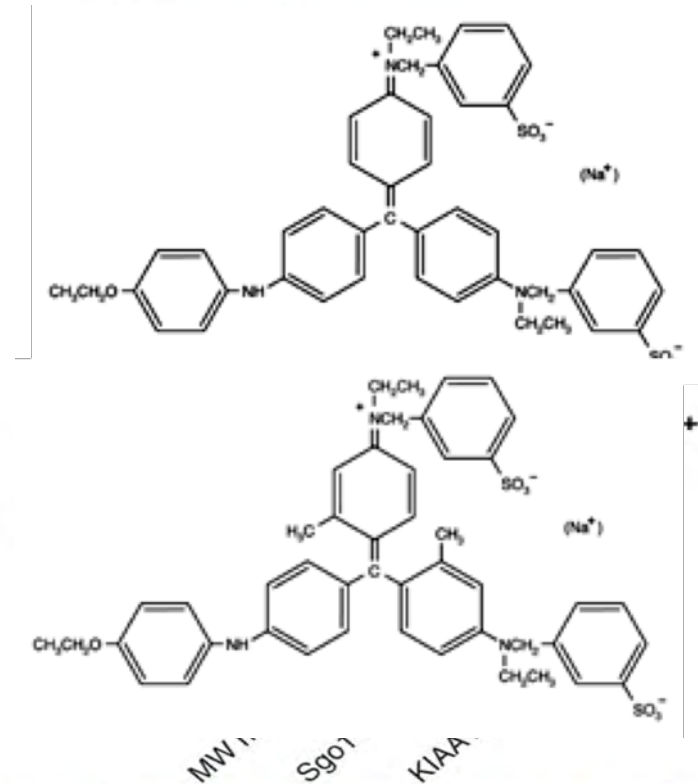




# ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

- **Χρώσεις**

- **Coomassie Brilliant Blue** (έως 30 ng)
- **Colloidal Coomassie Blue** (έως 10 ng)
- **Zinc-imidazole** (έως 2 ng)
- **Silver stain** (έως 2 ng)
- **SYPRO Ruby** (έως 1 ng)
- **Oil Red O**
- **Sudan Black B**

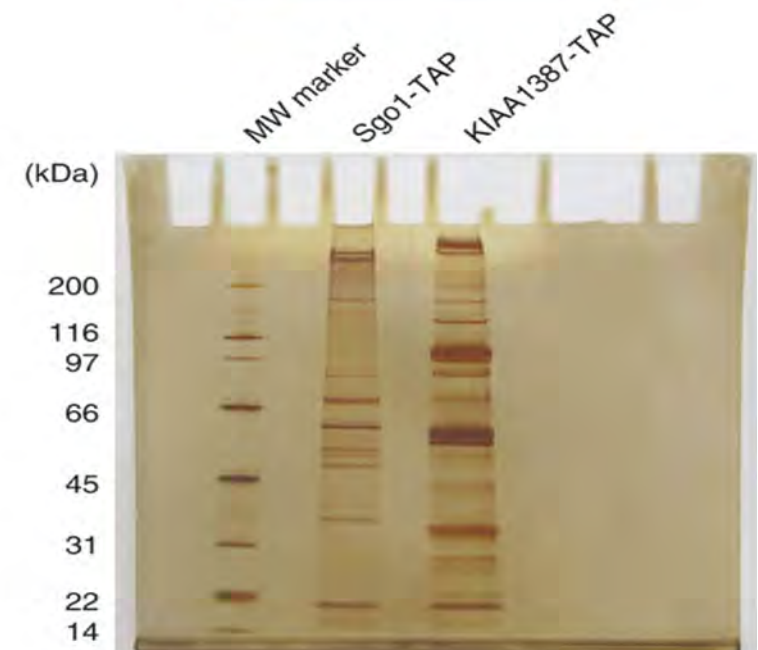
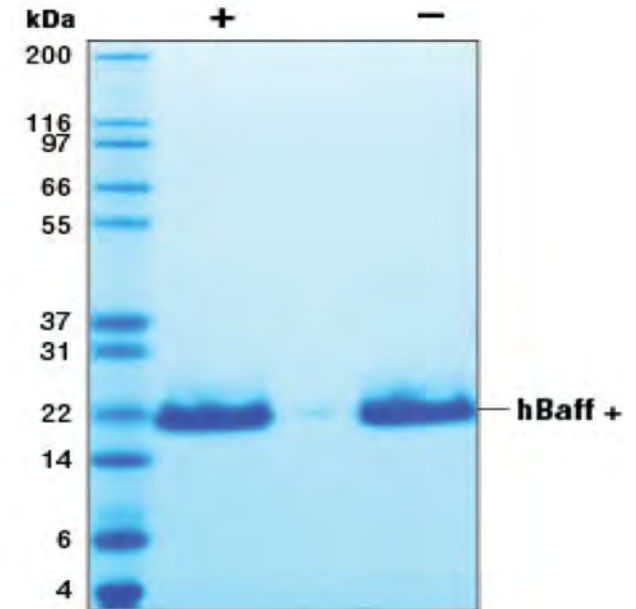




# ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

- **Χρώσεις**

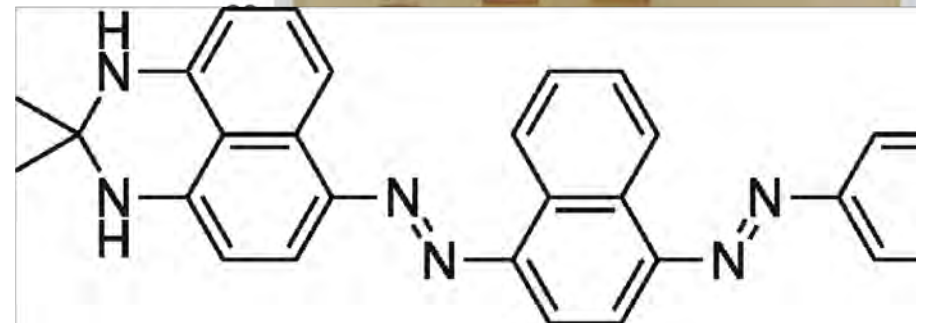
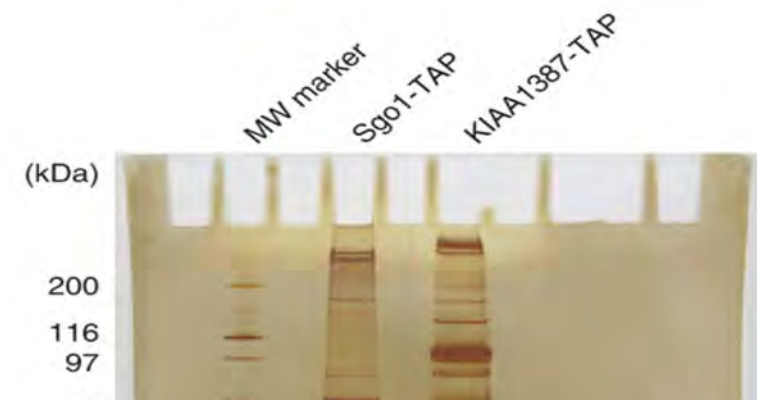
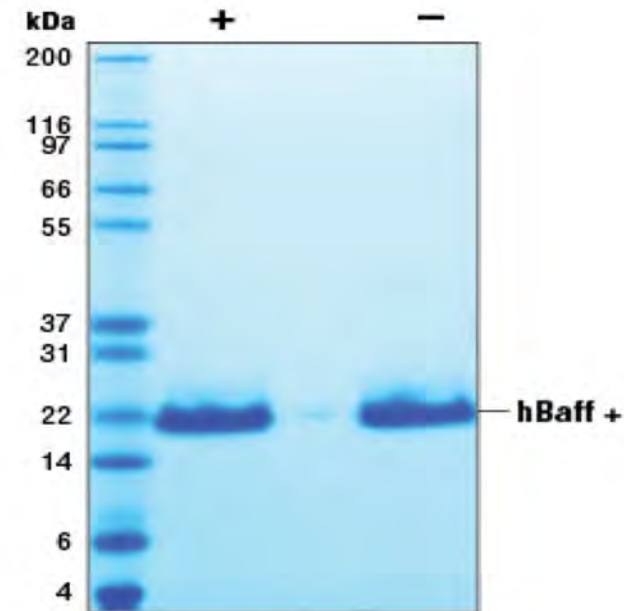
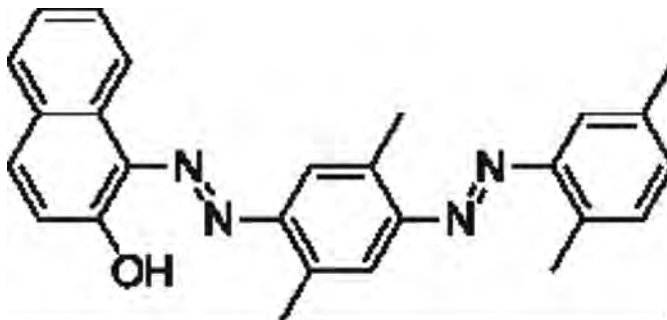
- **Coomassie Brilliant Blue** (έως 30 ng)
- **Colloidal Coomassie Blue** (έως 10 ng)
- **Zinc-imidazole** (έως 2 ng)
- **Silver stain** (έως 2 ng)
- **SYPRO Ruby** (έως 1 ng)
- **Oil Red O**
- **Sudan Black B**



# ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

- **Χρώσεις**

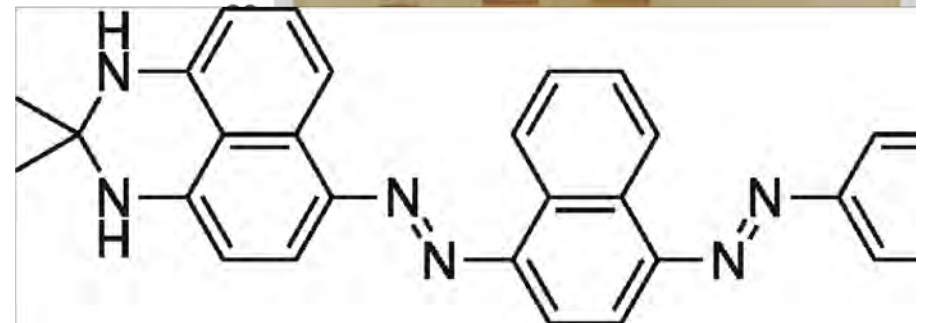
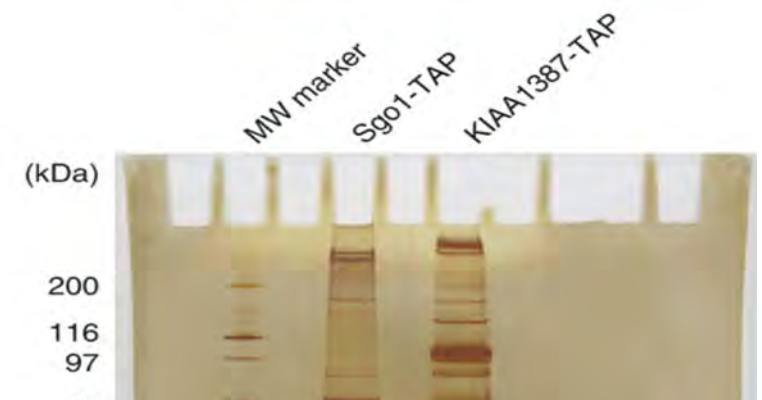
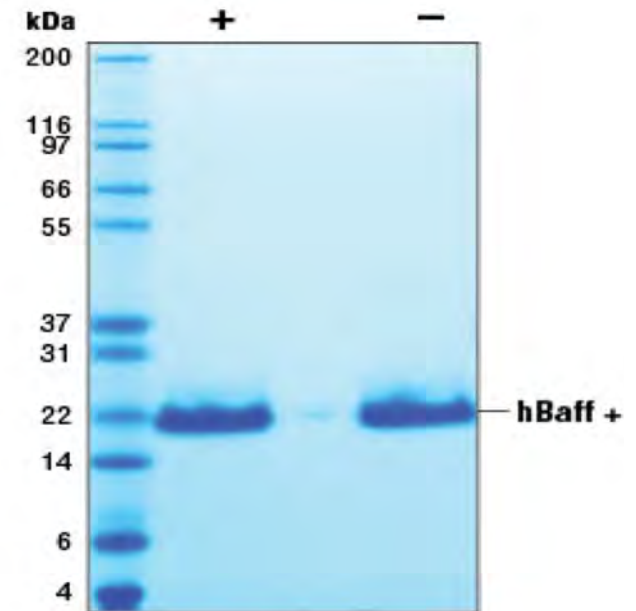
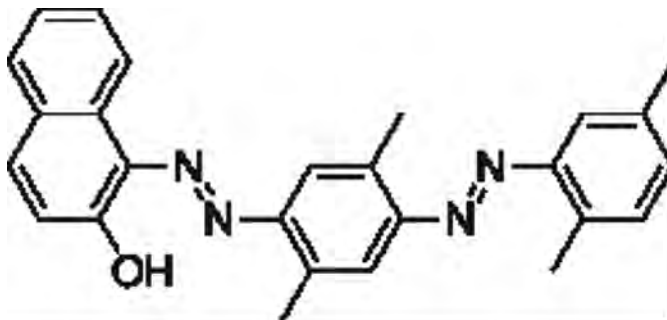
- **Coomassie Brilliant Blue** (έως 30 ng)
- **Colloidal Coomassie Blue** (έως 10 ng)
- **Zinc-imidazole** (έως 2 ng)
- **Silver stain** (έως 2 ng)
- **SYPRO Ruby** (έως 1 ng)
- **Oil Red O**
- **Sudan Black B**



# ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

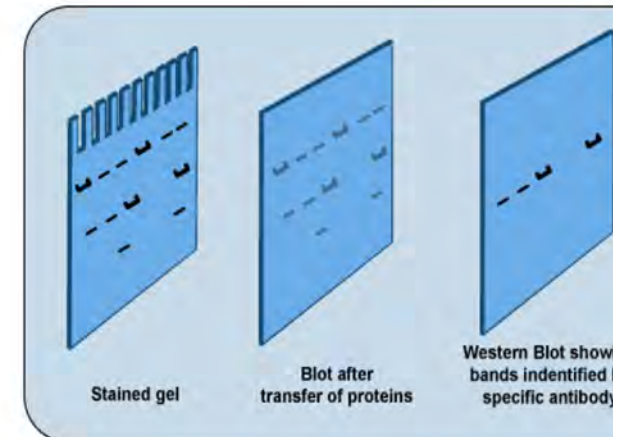
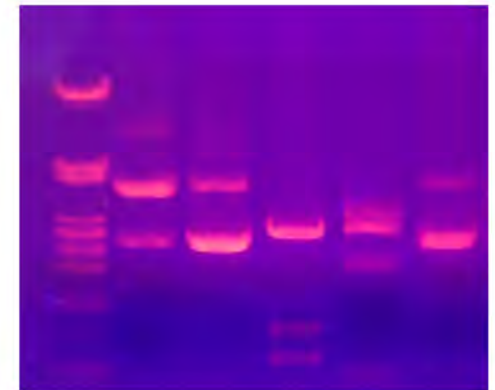
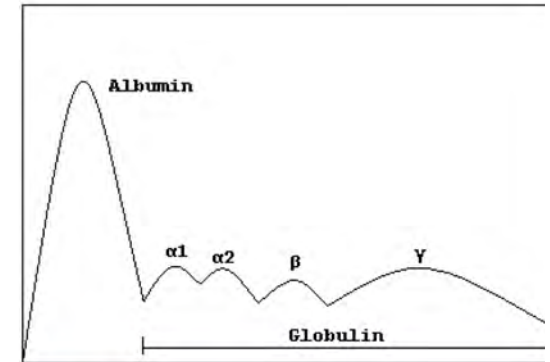
- **Χρώσεις**

- **Coomassie Brilliant Blue** (έως 30 ng)
- **Colloidal Coomassie Blue** (έως 10 ng)
- **Zinc-imidazole** (έως 2 ng)
- **Silver stain** (έως 2 ng)
- **SYPRO Ruby** (έως 1 ng)
- **Oil Red O**
- **Sudan Black B**



# ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

- **Πυκνόμετρο σάρωσης** (scanning densitometer) – για ποσοστιαία αναλογία κλασμάτων
- **Ανάγνωση σε UV**
- **Blotting** (π.χ. Western)
- **Ανάλυση με φασματογράφο μάζας**

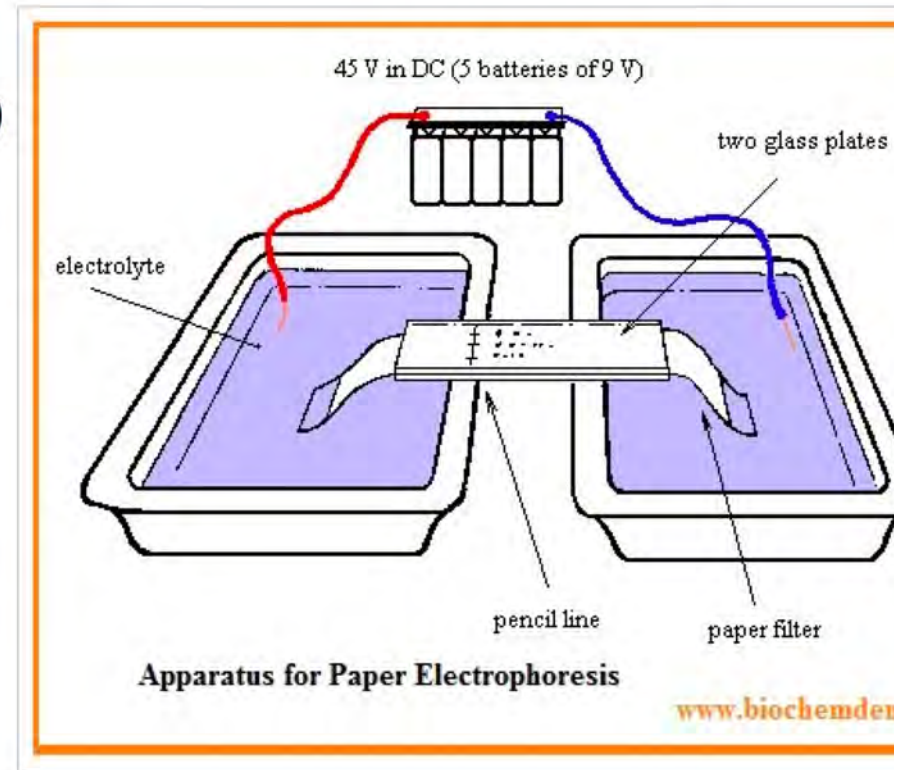




# ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

## 1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΕΣΗ ΣΤΟ ΧΑΡΤΙ

- Στο παρελθόν χρήση για λευκώματα ορού
- **Πλεονεκτήματα:**
  - Υψηλή αντοχή υλικού
  - Χαμηλό κόστος
  - Ευκολία χρήσης
- **Μειονεκτήματα:**
  - Διάρκεια 14 – 16 ώρες
  - Χαμηλή διακριτική ικανότητα



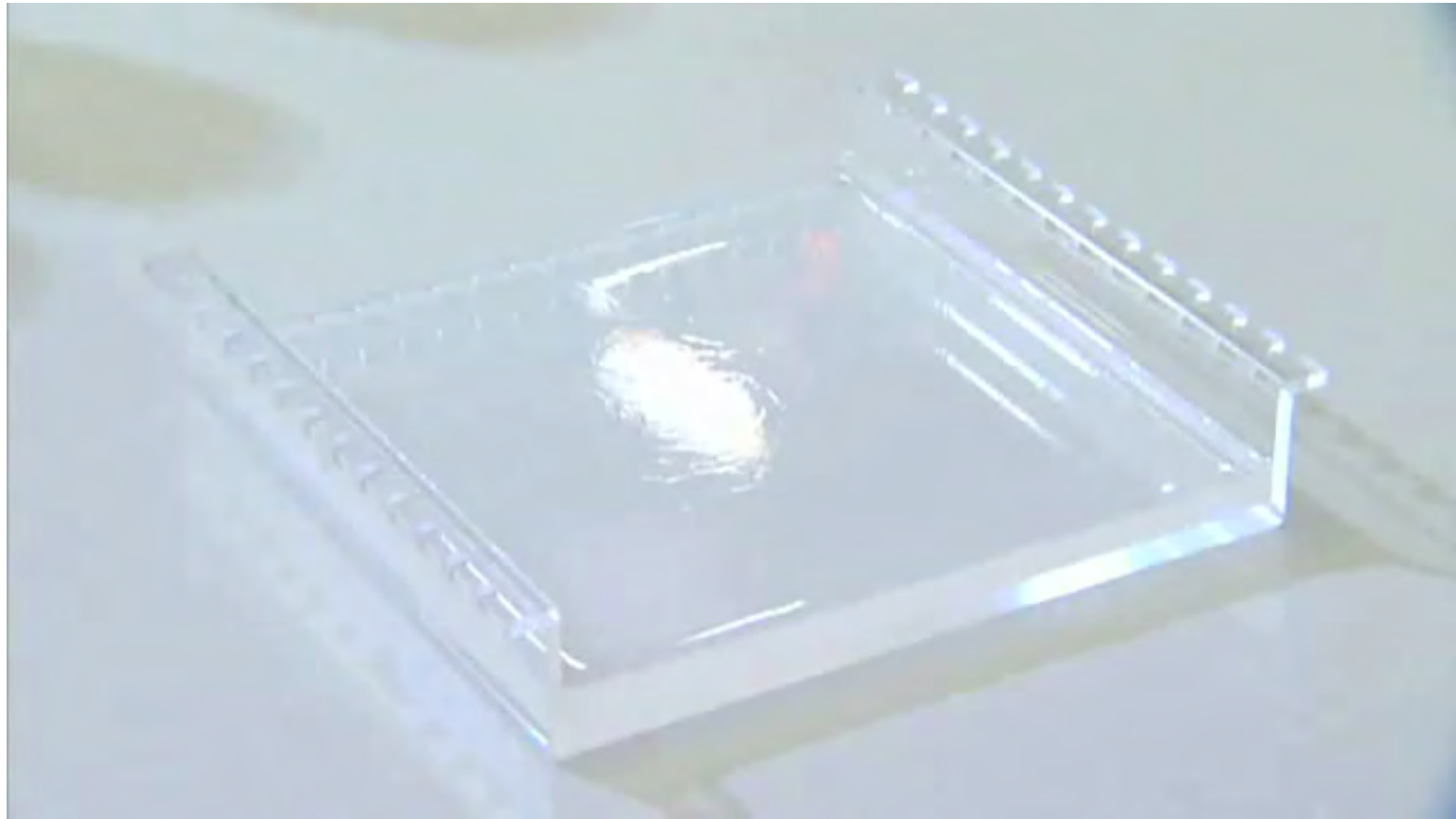
# ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ

### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

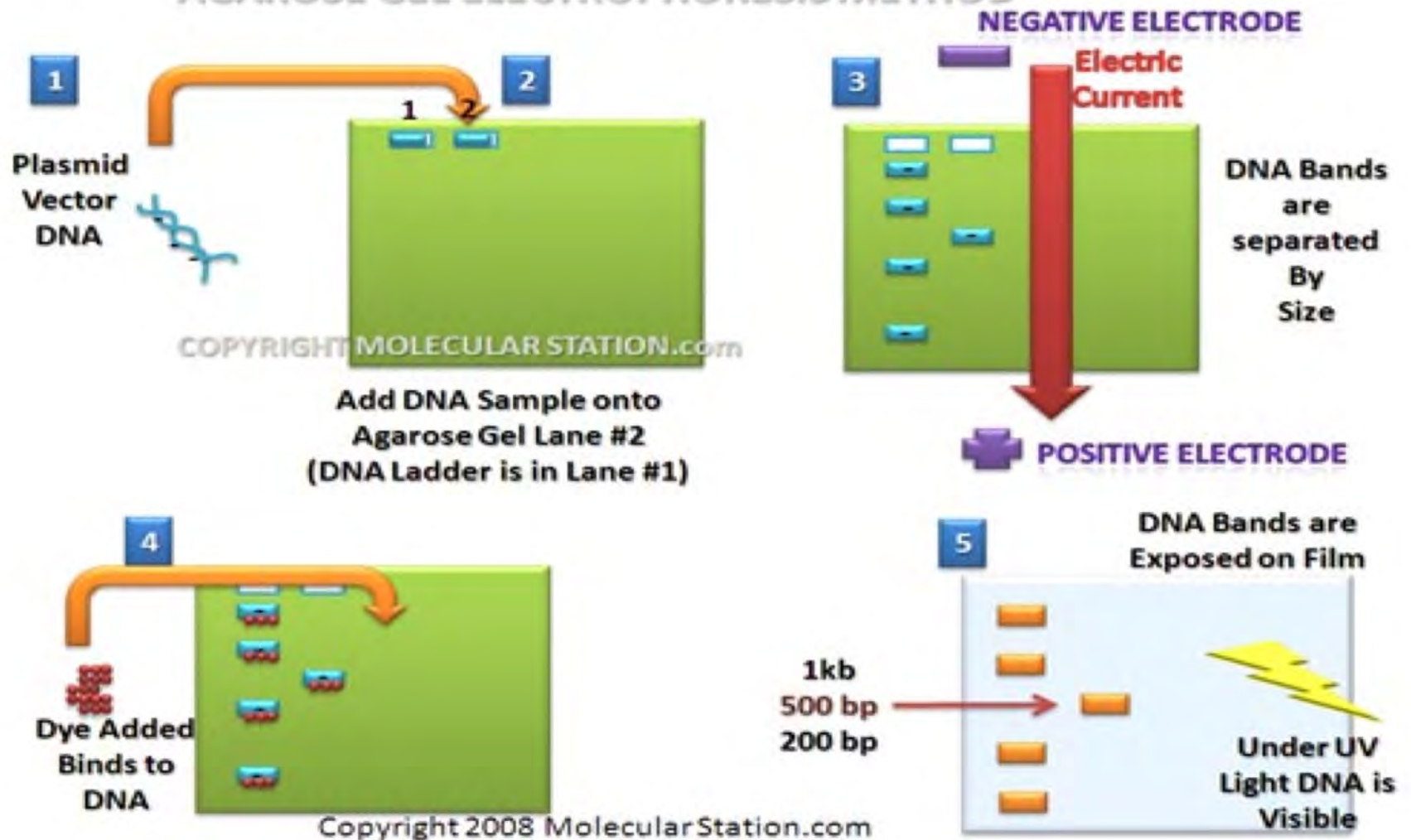
- **ΚΥΡΙΩΣ** για το διαχωρισμό **DNA** και **RNA**
- Καθαρισμό / απομόνωση τμημάτων DNA μετά την επίδραση περιοριστικών ενζύμων
- Ανάλυση προϊόντων PCR
- Ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό DNA

# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ

## AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS METHOD



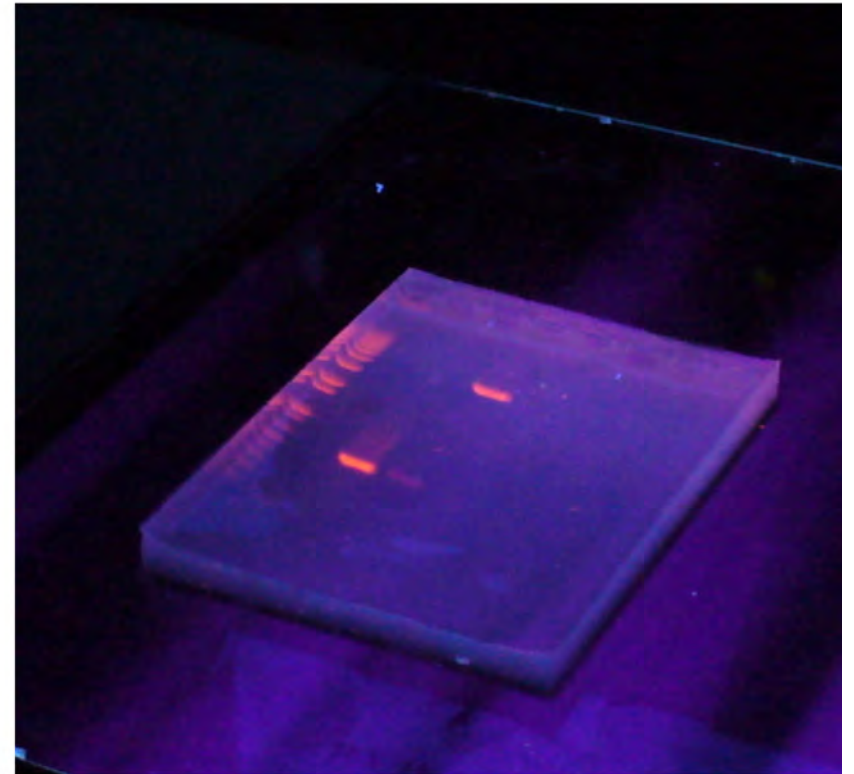


# ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

**Χωρίς UV**



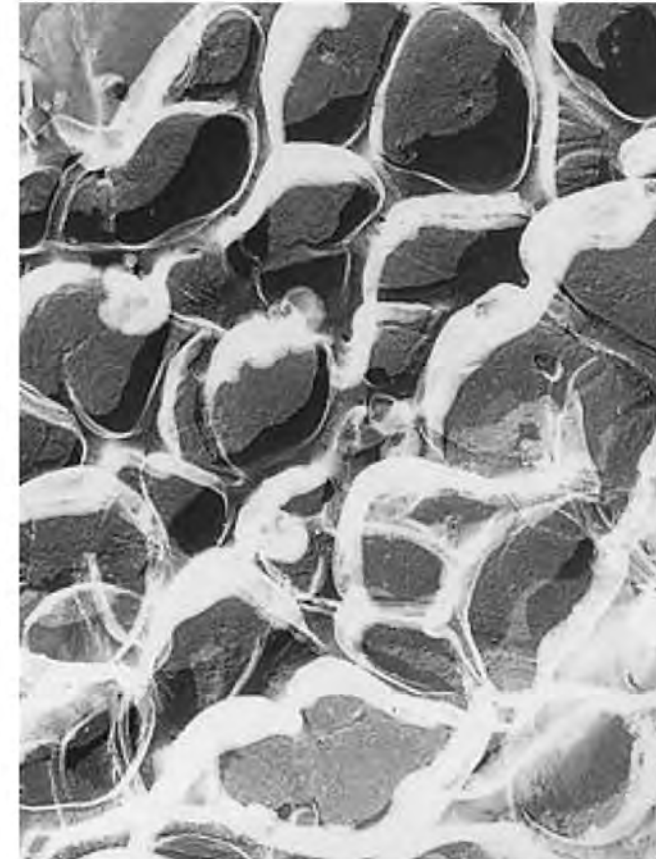
**Με UV**



# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- ΚΥΡΙΩΣ ηλεκτροφόρηση μικρών πρωτεϊνών, χωρίς να μπορεί να μελετηθεί η τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών
- Ηλεκτροφόρηση μικρών μορίων DNA ή RNA και ολιγονουκλεοτιδίων



# SDS-PAGE Η/

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

•ΚΥΡΙΩΣ ηλεκτροφόρηση μι  
πρωτεϊνών, χωρίς να μπορε  
μελετηθεί η τεταρτοταγής δομ  
πρωτεϊνών

•Ηλεκτροφόρηση μικρών μορ  
DNA ή RNA και ολιγονουκλ

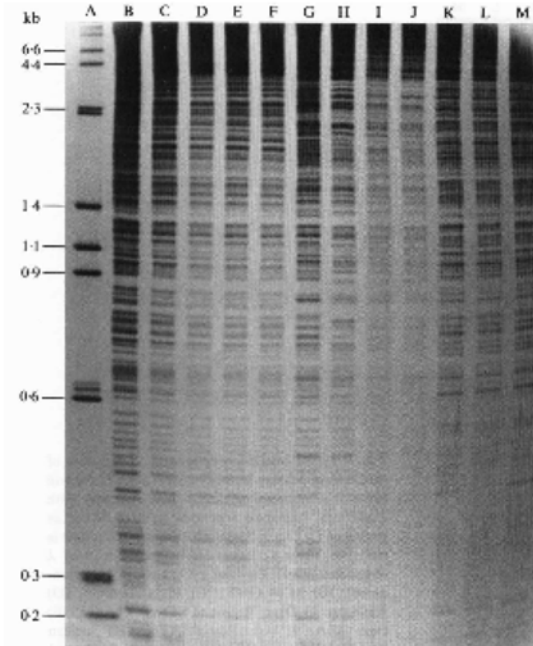


Fig. 1. *EcoRI* restriction endonuclease digestion the DNA of twelve *C. burnetii* isolates. Chromosom DNA was digested with *EcoRI* and frange separated by SDS-PAGE on a 7.5% gel us Laemmli buffers. DNA bands were visualized silver staining. Lanes: (A) *HindIII*-digested  $\lambda$  ph and *HaeIII*-digested  $\phi$ X174 phage (size standart) (B) MSU Goat Q177; (C) K Q154; (D) F Q228; P Q173; (F) Canada Goat Q218; (G) Nine M RSA493 phase I; (H) Goat Q195; (I) M-44 RSA4 (J) Henzerling RSA331; (K) L Q216; (L) G Q2 (M) S Q217.

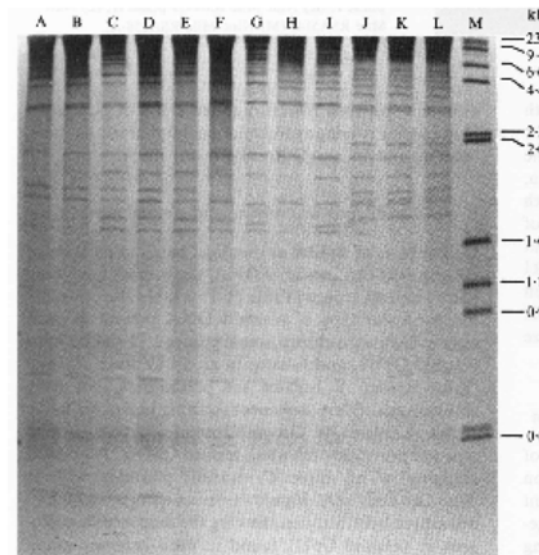


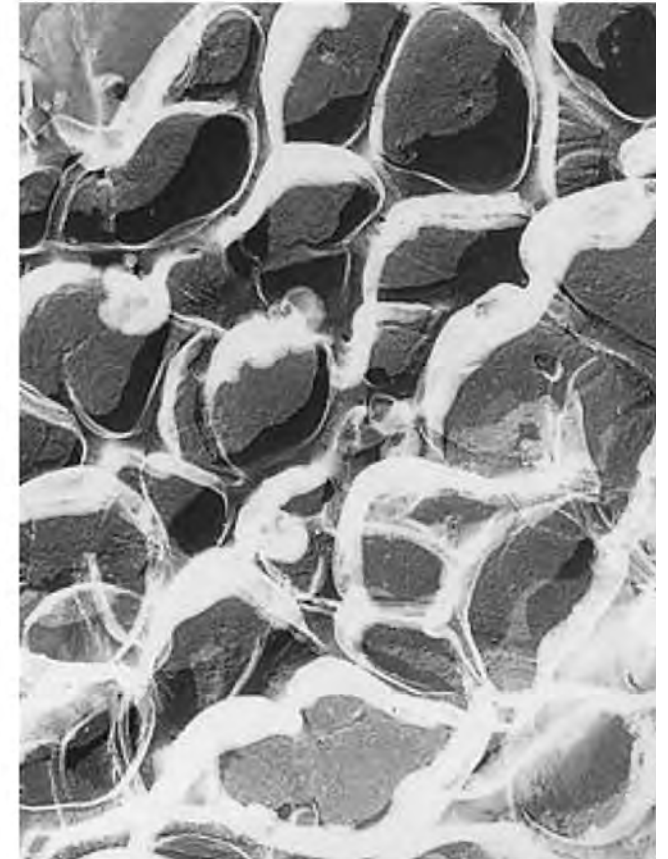
Fig. 2. *BamHI* restriction endonuclease digestion the DNA of twelve *C. burnetii* isolates. Chromosom DNA was digested with *BamHI* and frange separated by SDS-PAGE as described for Fig. Lanes: (A) MSU Goat Q177; (B) K Q154; F Q228; (D) P Q173; (E) Canada Goat Q218; Nine Mile RSA493 phase I; (G) Goat Q195; (H) 44 RSA459; (I) Henzerling RSA331; (J) L Q216; G Q212; (L) S Q217; (M) *HindIII*-digested  $\lambda$  ph and *HaeIII*-digested  $\phi$ X174 phage (size standart)



# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

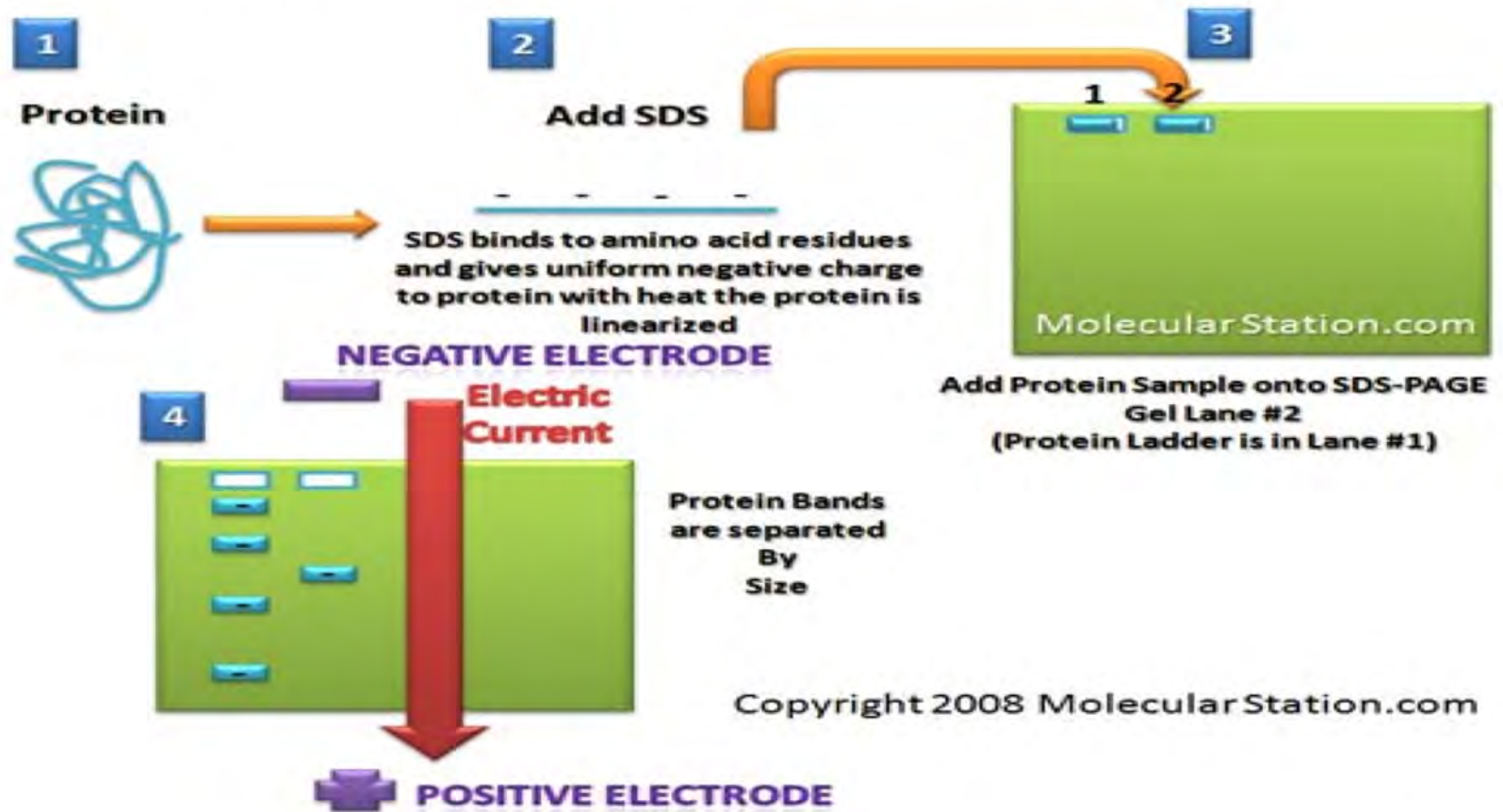
- ΚΥΡΙΩΣ ηλεκτροφόρηση μικρών πρωτεϊνών, χωρίς να μπορεί να μελετηθεί η τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών
- Ηλεκτροφόρηση μικρών μορίων DNA ή RNA και ολιγονουκλεοτιδίων



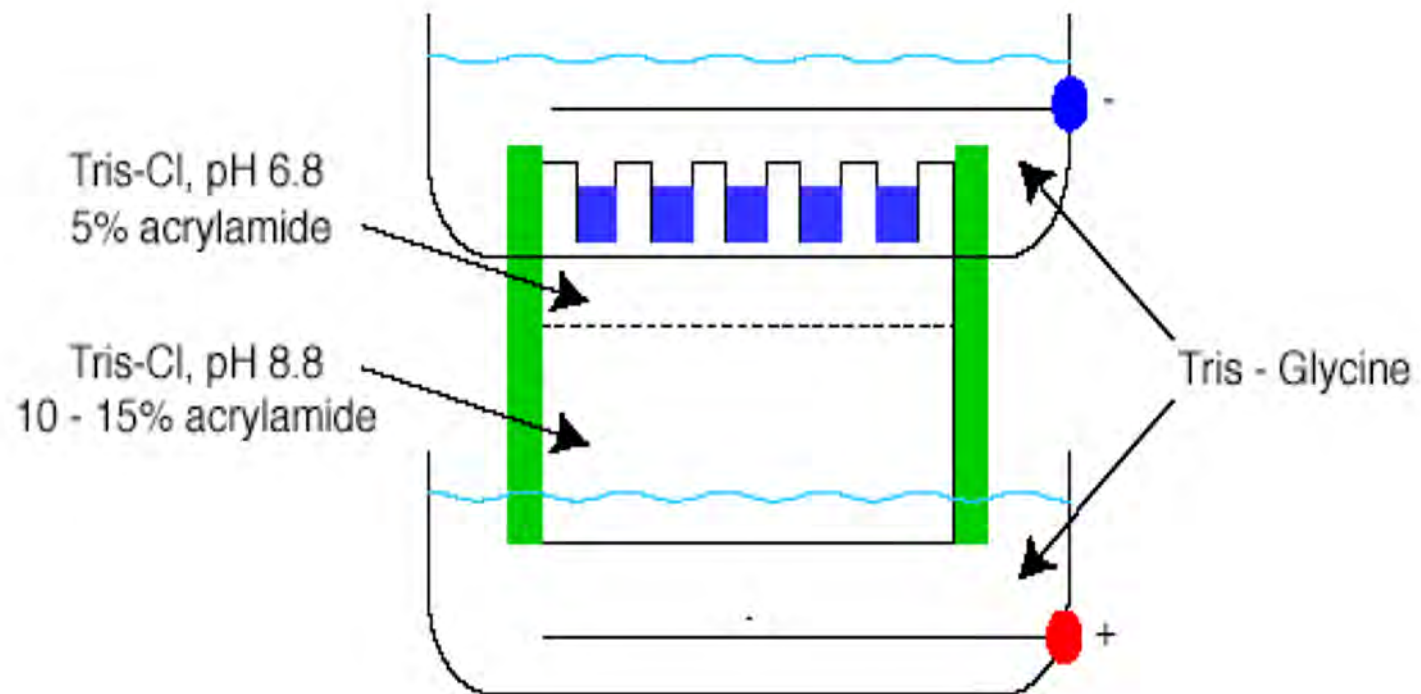


# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

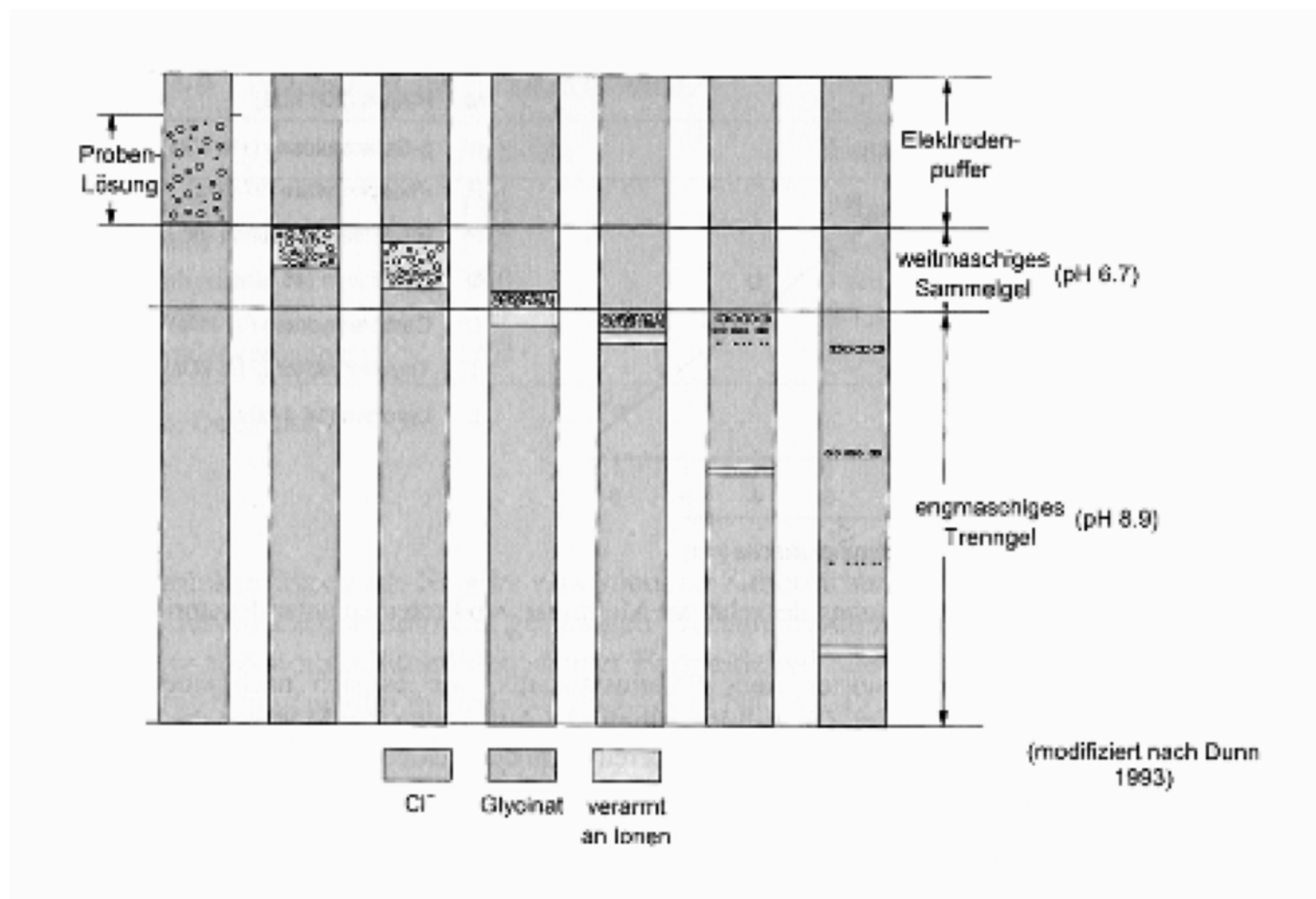
## PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD



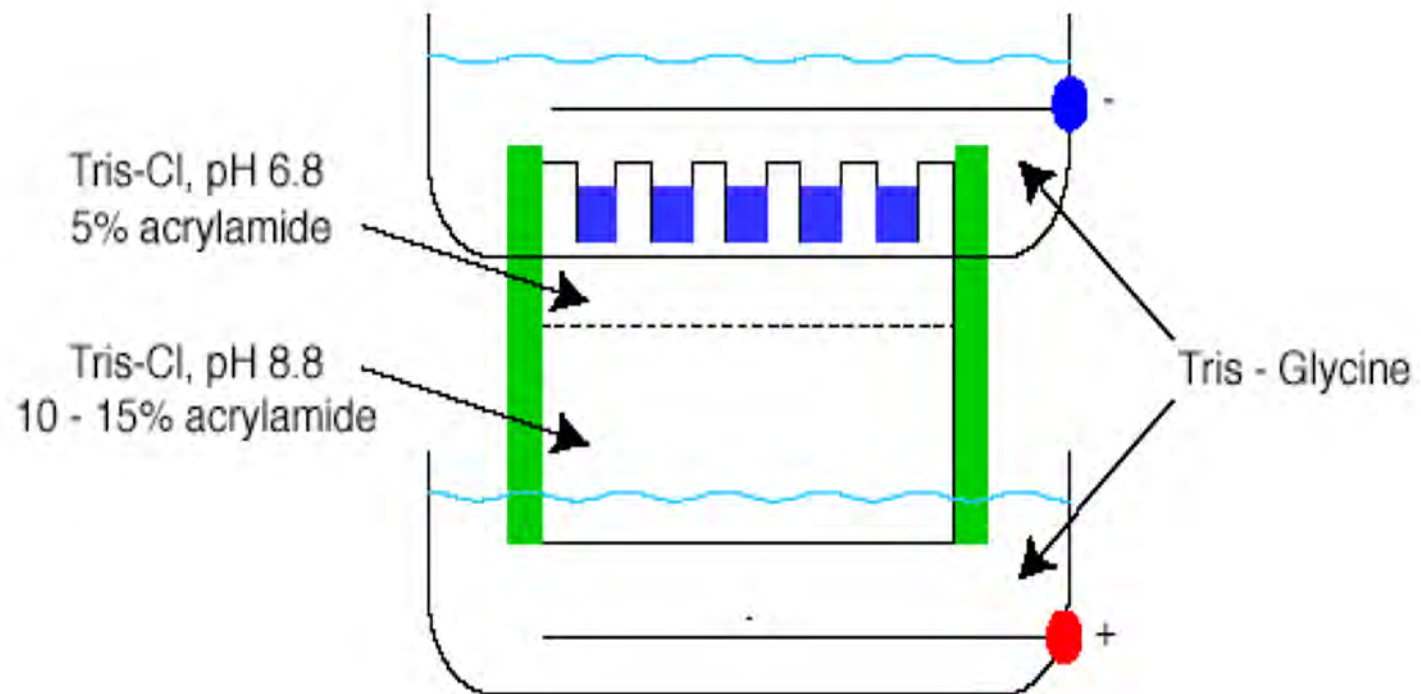
# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

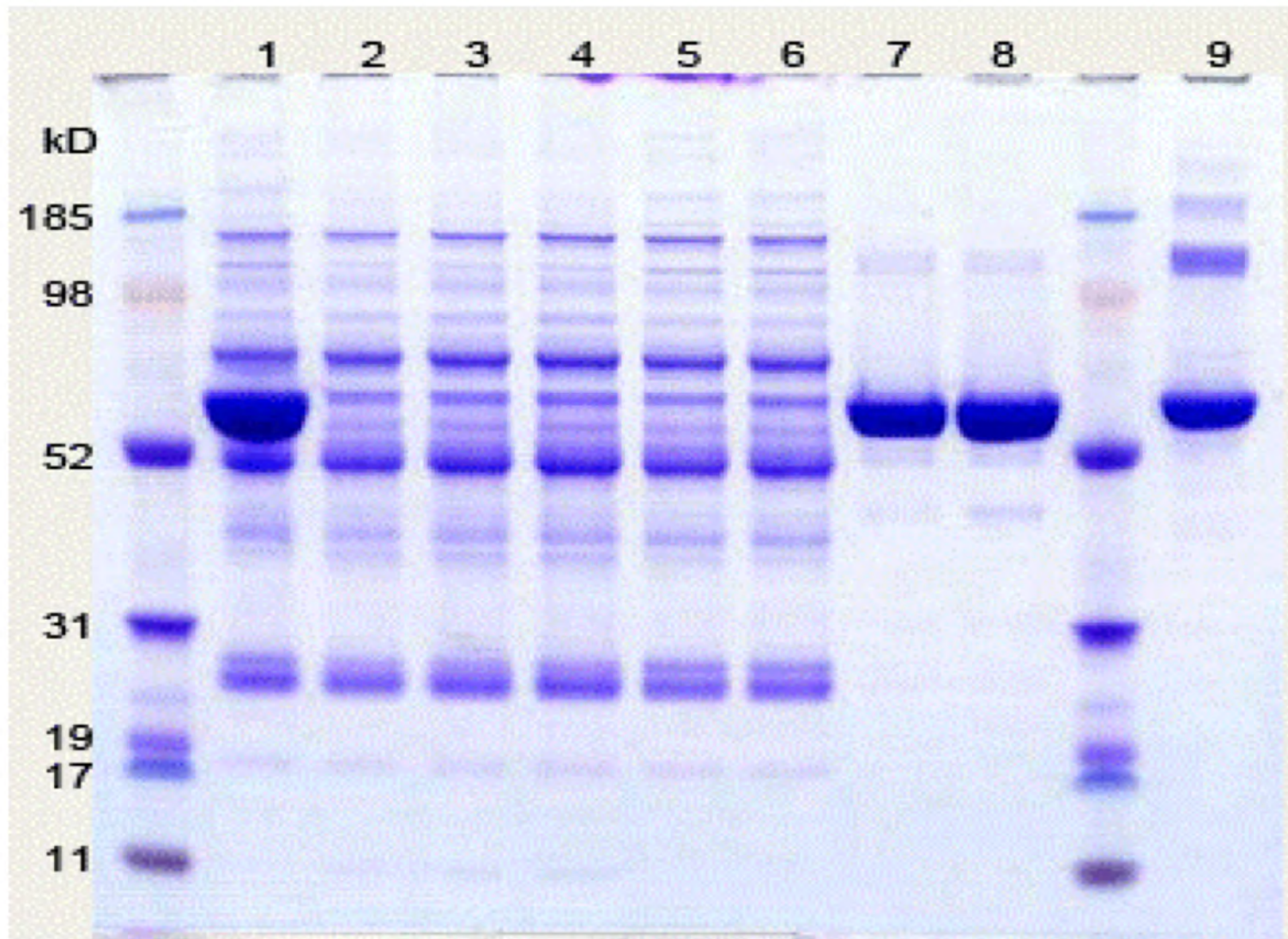


# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

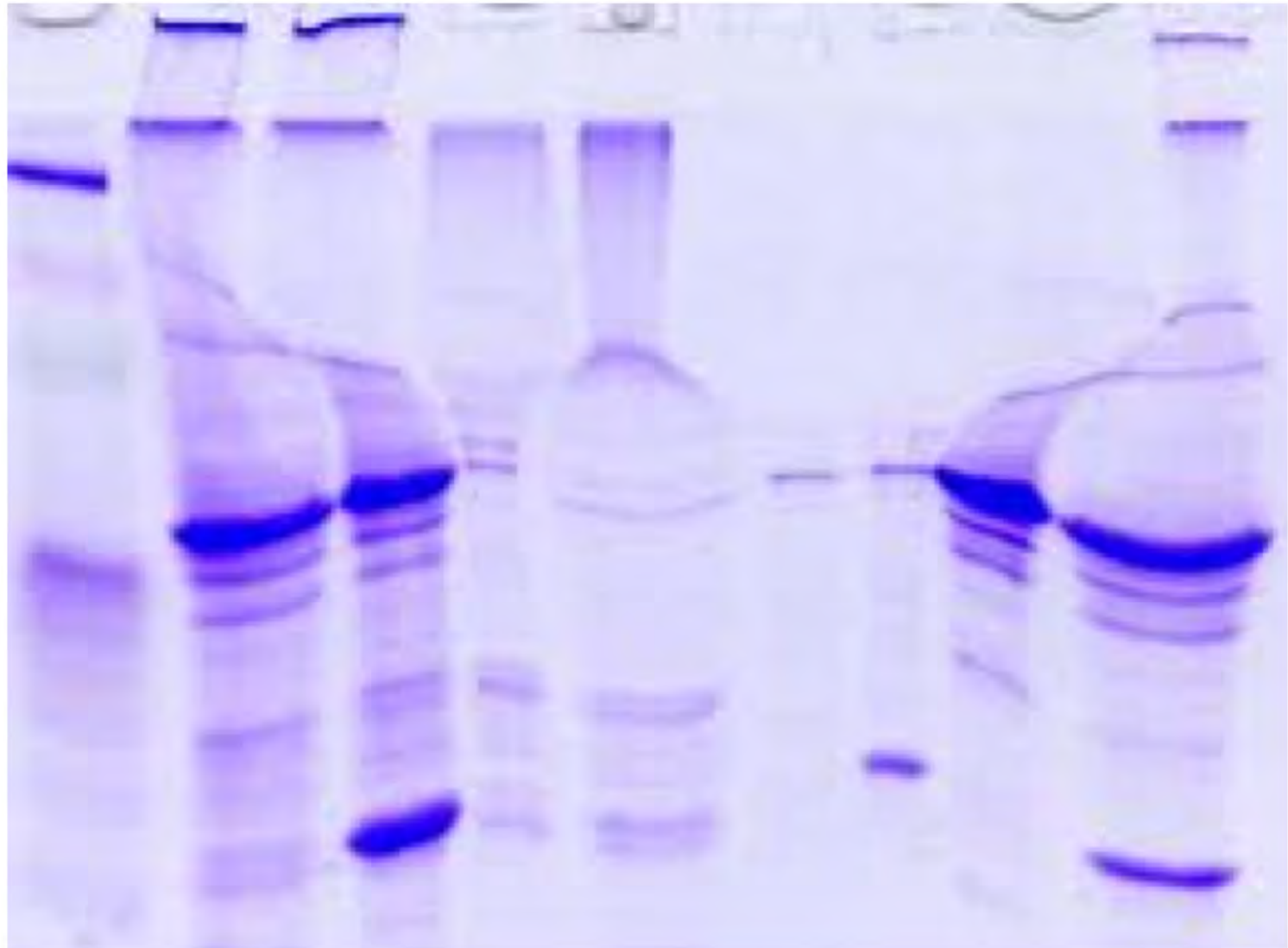




# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



# SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



# NATIVE PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα δεν εξαρτάται μόνο από το **φορτίο** και τη **μάζα**, αλλά και από το **φυσικό σχήμα** και **μέγεθος** της πρωτεΐνης

- **Blue native (BN)**
- **Clear native (CN)**
- Quantitative Preparative Native Continuous PAGE (**QPNC-PAGE**)



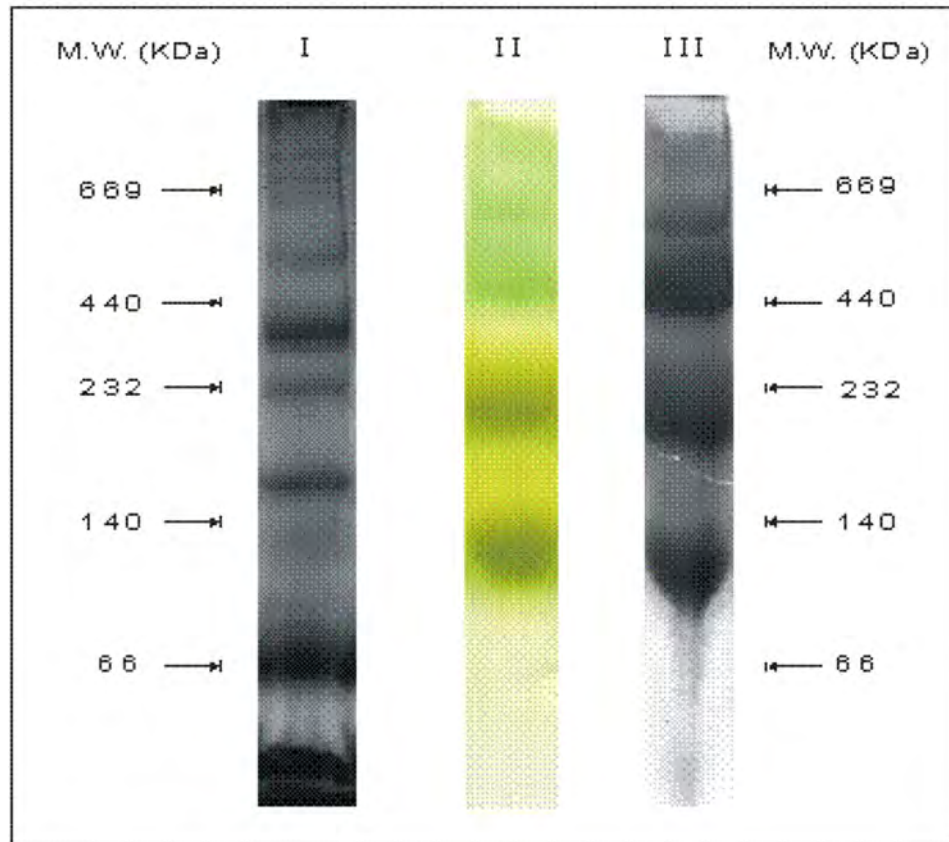
# BLUE NATIVE PAGE (BN)

- Η Coomassie Brilliant Blue φορτίζει τις πρωτεΐνες.
- Λειτουργεί σαν αποδιατακτικό μέσο

## **CLEAR NATIVE PAGE (CN)**

- Δεν υπάρχει χρωστική να φορτίσει τις πρωτεΐνες,
- Κινούνται μόνο βάσει του φορτίου που αποκτούν μέσα στο buffer

# NATIVE PAGE (BN)



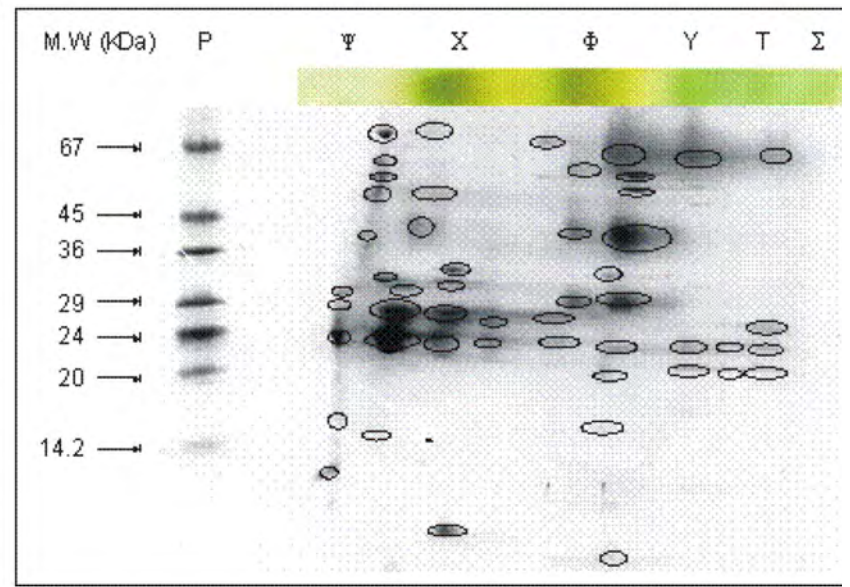
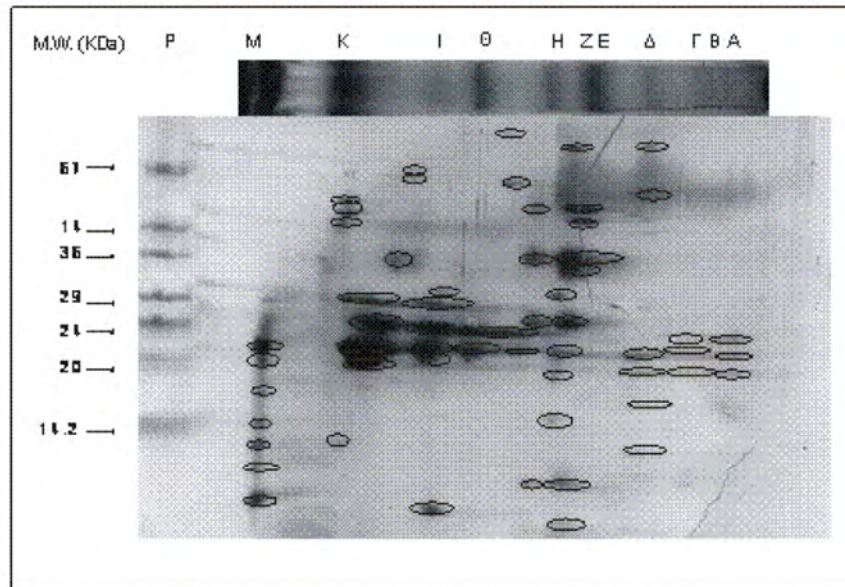
I: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση διαλυτοποιημένων θυλακοειδών μετά από χρώση με τη μπλε χρωστική Coomassie.

II: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (Green-native PAGE/πρώτη διάσταση) διαλυτοποιημένων θυλακοειδών.

III: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (Green-native PAGE/πρώτη διάσταση) διαλυτοποιημένων θυλακοειδών, μετά από χρώση με τη μπλε χρωστική Coomassie.

Η διαβάθμιση των συγκεκριμένων πηκτών σε πολυακρυλαμίδιο είναι 4<sup>ο</sup> 13%.

# SDS-Tricine PAGE/δεύτερη διάσταση



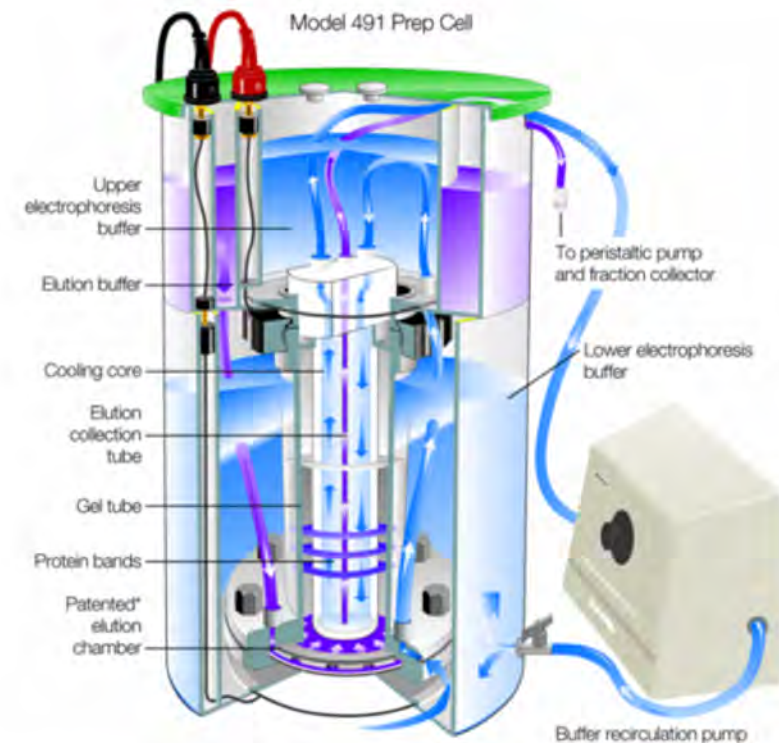


# QUANTITATIVE PREPARATIVE NATIVE PAGE (QPNC-PAGE)

- Το buffer με pH 10,0 κινεί τις πρωτεΐνες.
- Τα κλάσματα εκκλύονται σε pH 8,0

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Προσδιορισμός συμπαραγόντων, π.χ. Fe, Cu, Zn, κλπ
- Ποσοτικός Προσδιορισμός μεταλλοπρωτεϊνών



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

## ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ

### •ΧΡΩΣΗ με

- Coomassie Brilliant Blue ή
- Silver

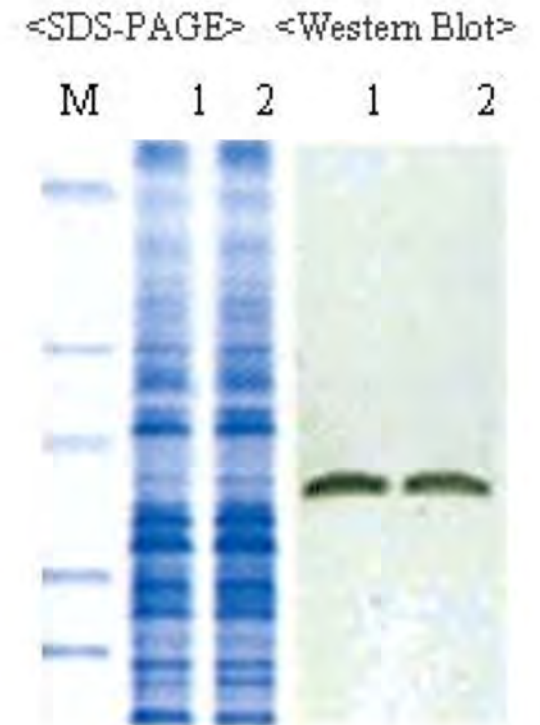
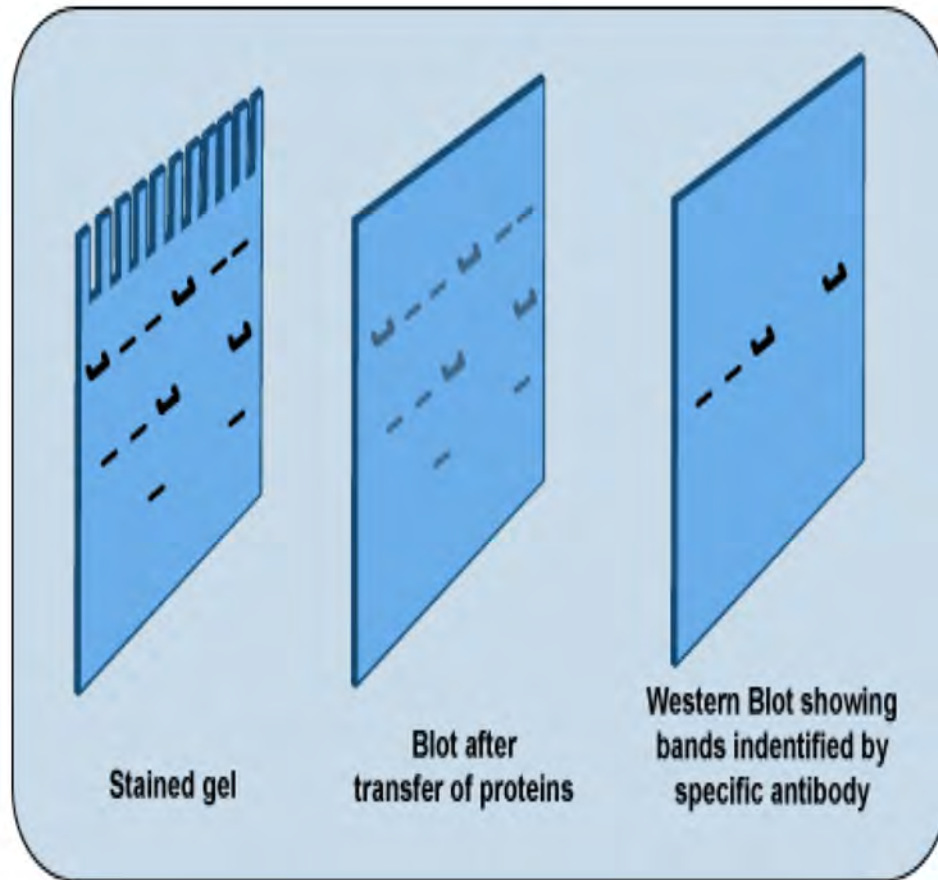
### Ανίχνευση

- ενζυμοανοσολογικά (Immunoblotting)
- ραδιονοσολογικά
- με χημειοφωταύγεια

### •ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN) γιατί

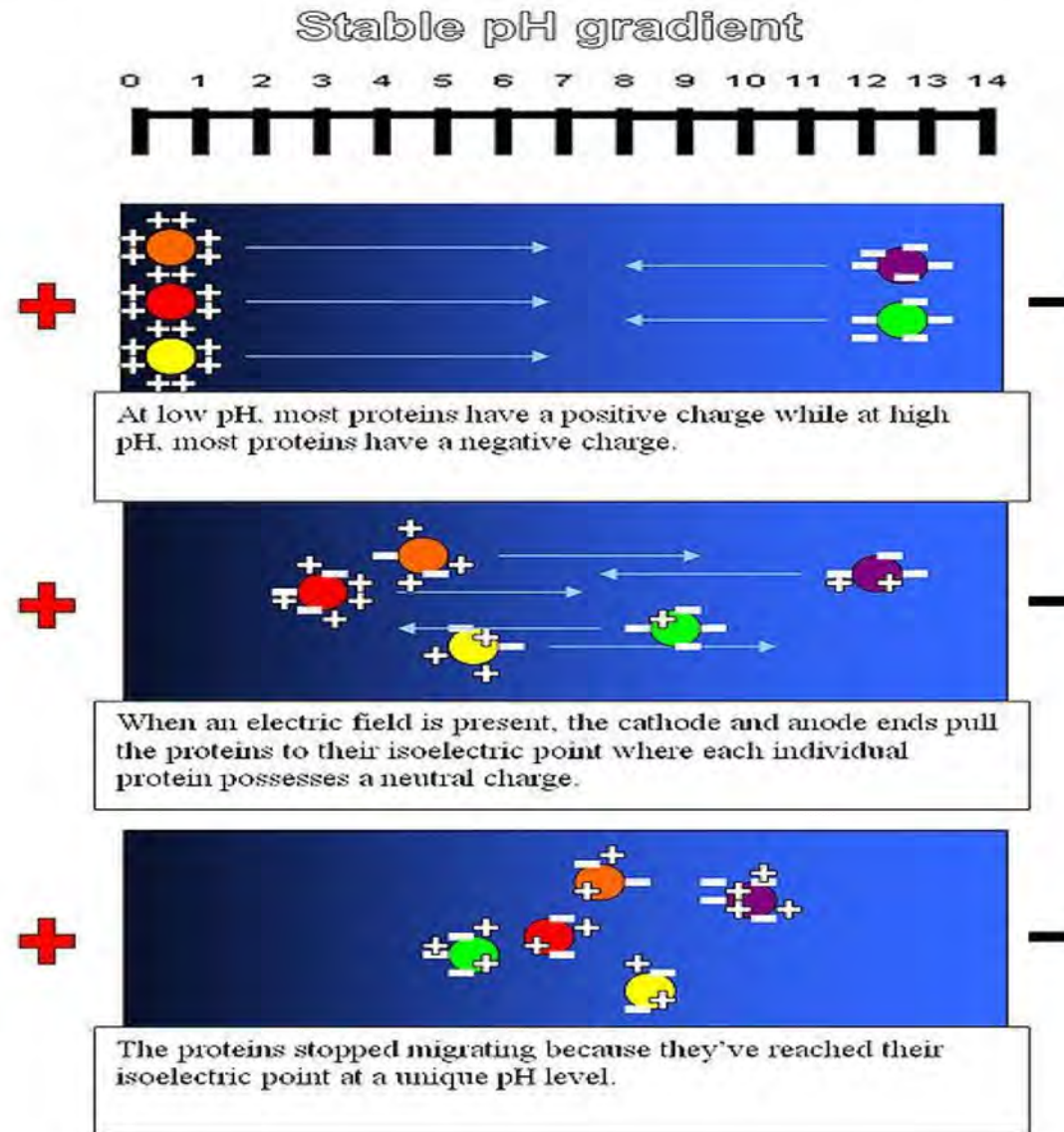
- Δεν μπορεί να αποθηκευτεί η πηκτή
- Πρέπει να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες

# WESTERN BLOTTING





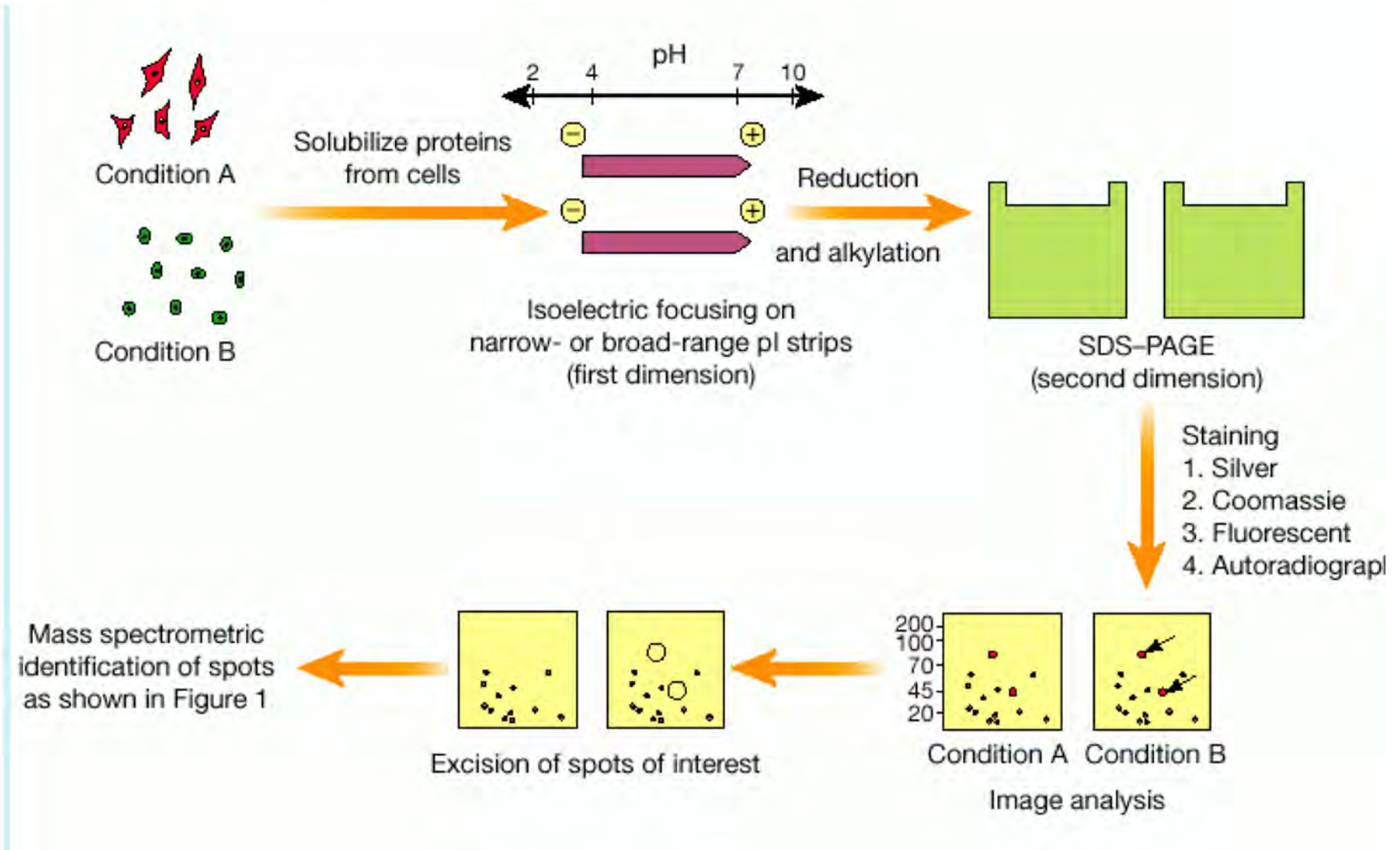
# ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ



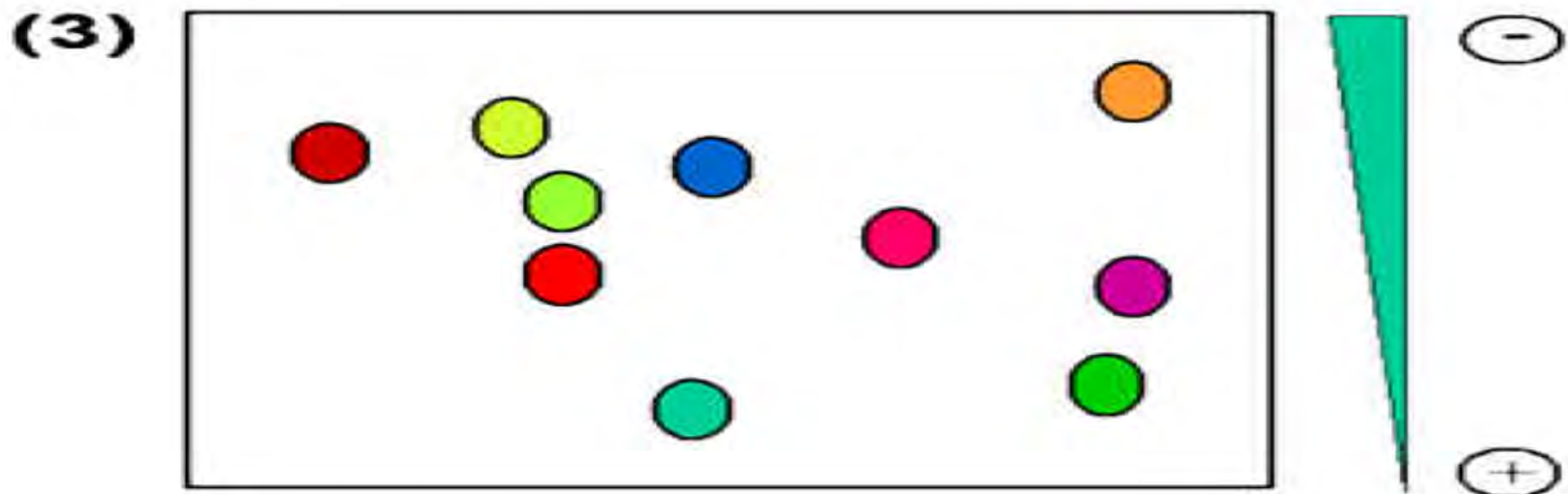
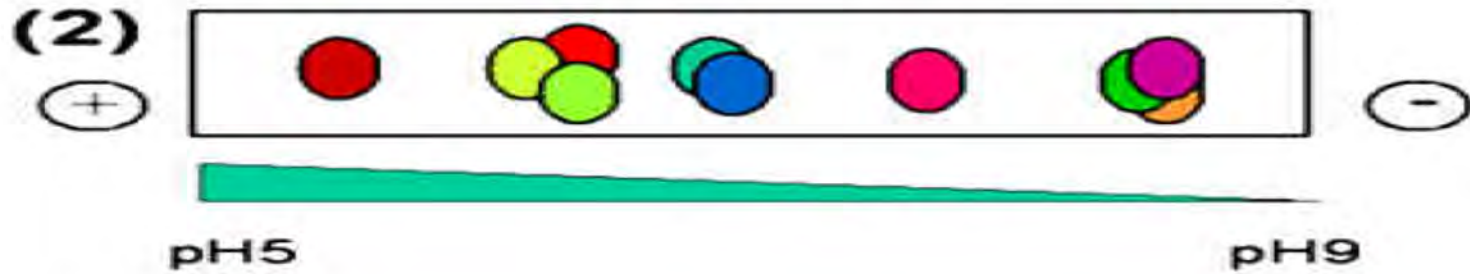
# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ (2D) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- **1<sup>η</sup> Διάσταση: Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ισοηλεκτρικό εστιασμό**
  - Βαθμίδωση pH στο gel
  - Οι πρωτεΐνες καθιλώνονται στο ισοηλεκτρικό τους σημείο
- **2<sup>η</sup> Διάσταση: Σε 90° SDS-PAGE**

# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

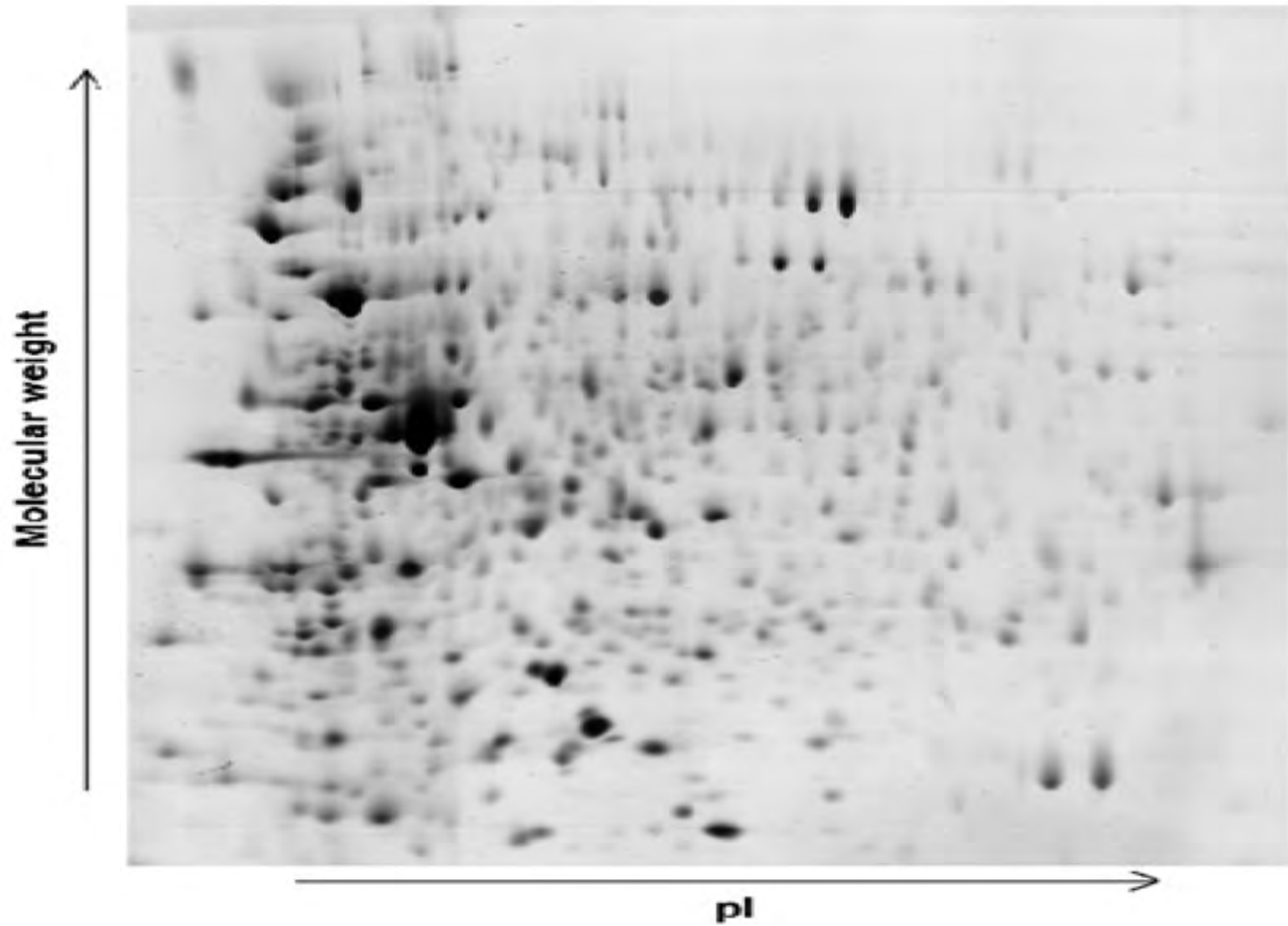


# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ (2D) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



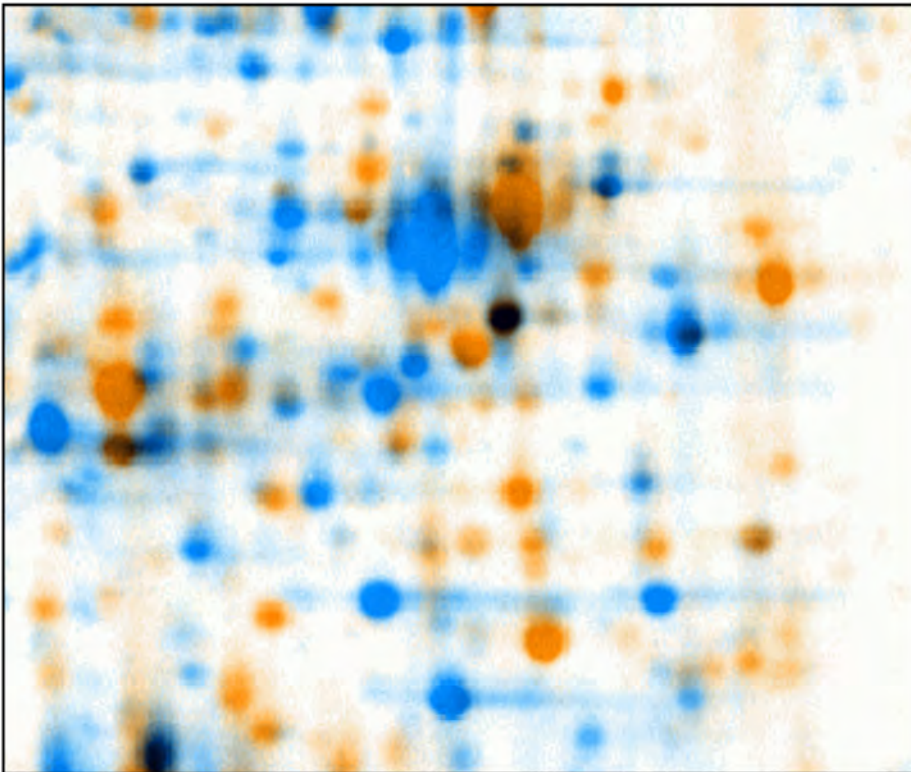


# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

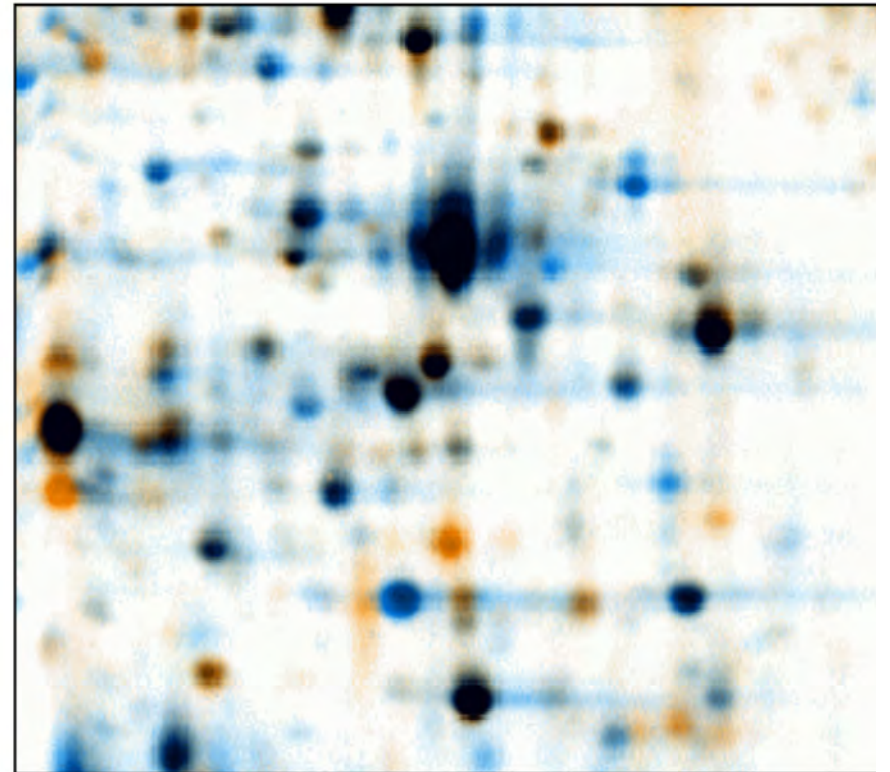


# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

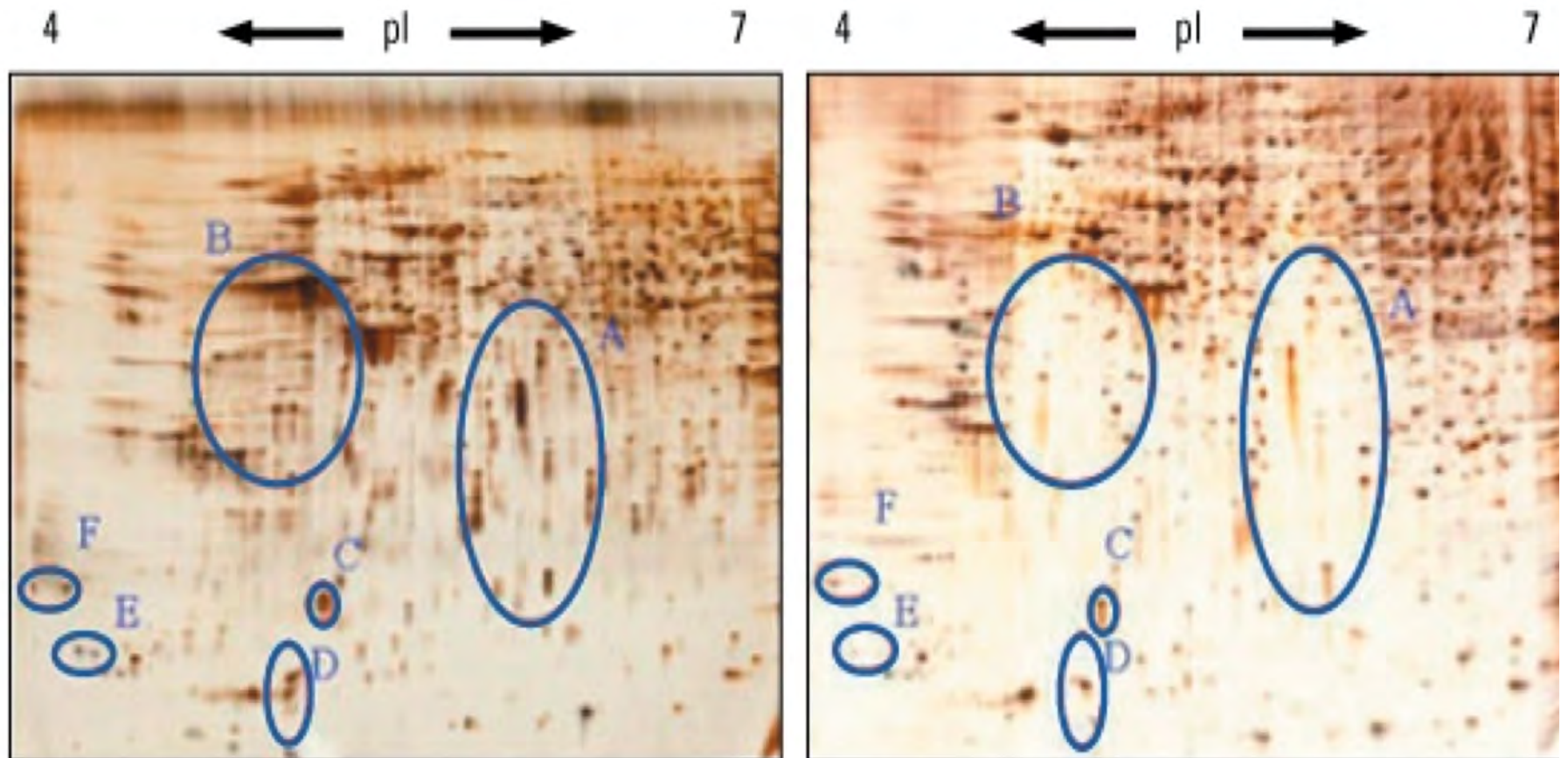
**ΧΩΡΙΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ**



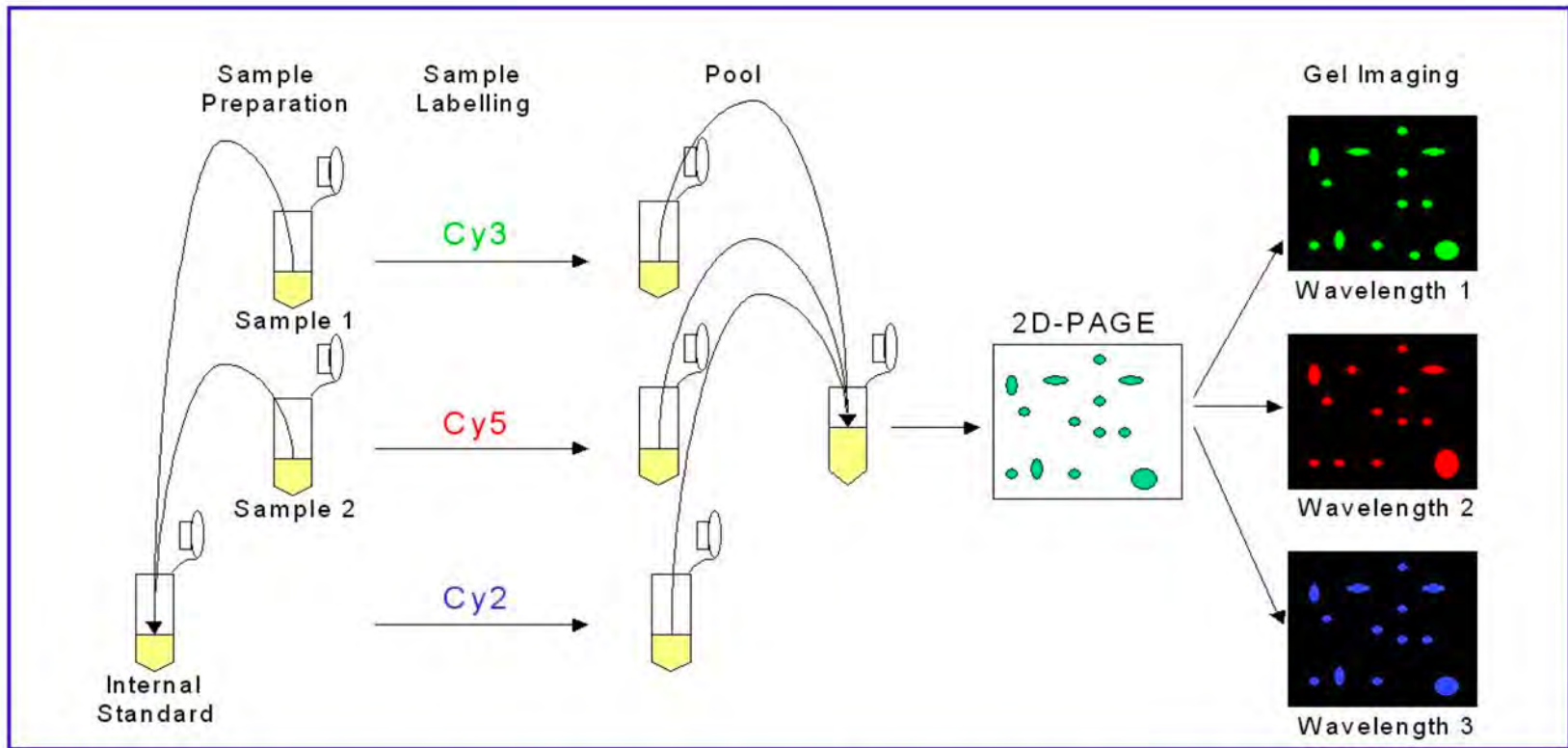
**ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ**



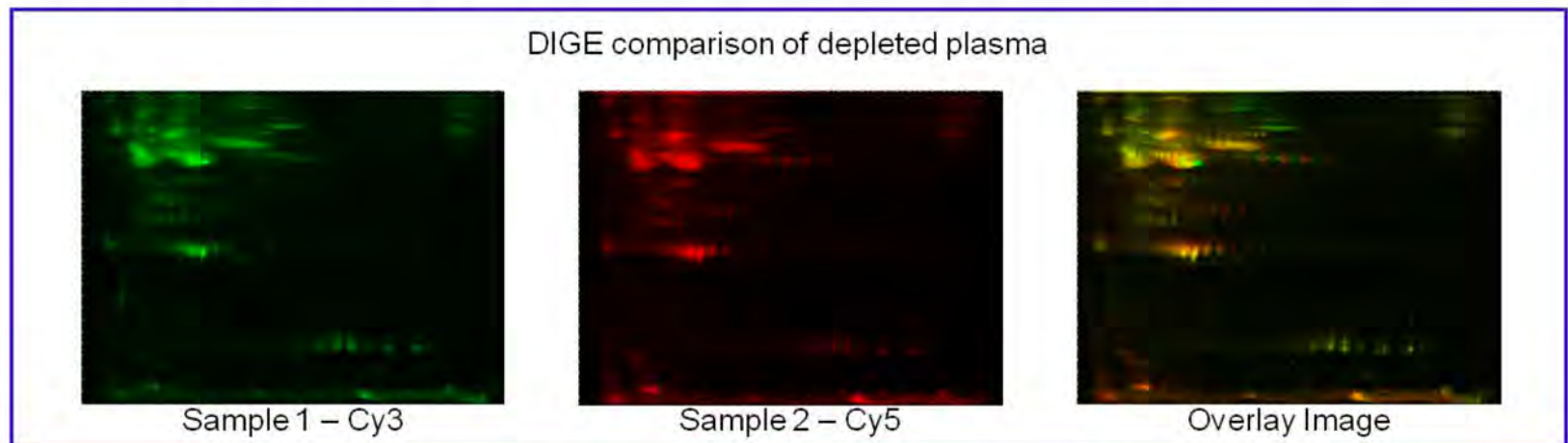
# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ







Samples are labelled with different fluorescent tags, allowing 2 samples to be separated on a single gel, removing gel-to-gel variation. An internal standard, composed of all samples in the experiment, is run on each gel, allowing comparison of samples on different gels.



# ΔΥΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Μελέτη λειτουργικών πρωτεϊνών κυττάρων (**ποιοτική πρωτεωμική**) – Μελέτη **μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων** πρωτεϊνών
- Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – ως δείκτες (**ποσοτική πρωτεωμική**)

# ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Ηλεκτροφόρηση με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται
- Αγαρόζη 1%
  - Διευκολύνει την κίνηση των πρωτεϊνών (μη αποδιαταγμένες)
  - Καθηλώνει τα ανοσοσυμπλέγματα
- Υψηλό pH (8,6)
- Οριζόντια
- Χρώση με Coomassie Brilliant Blue



# ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

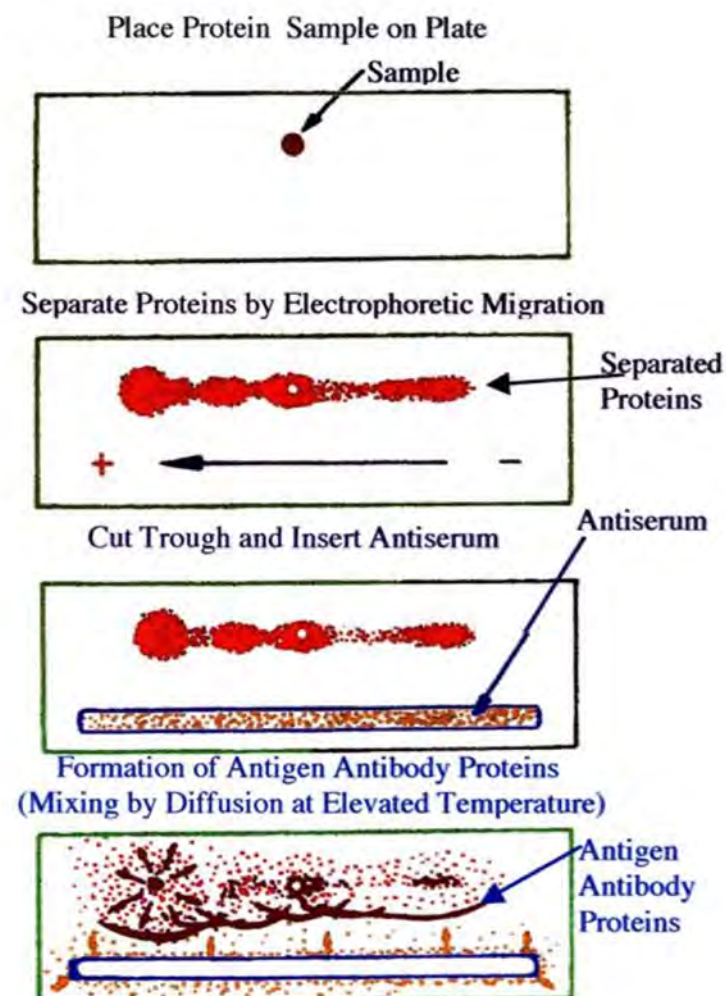
- **ΕΙΔΗ**
- **Ανοσοηλεκτροφορητική ανάλυση (1D)**
- **Crossed (2D ποσοτική)**
- **Rocket (1D ποσοτική)**
- **Fused rocket**
- **Affinity**

# ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

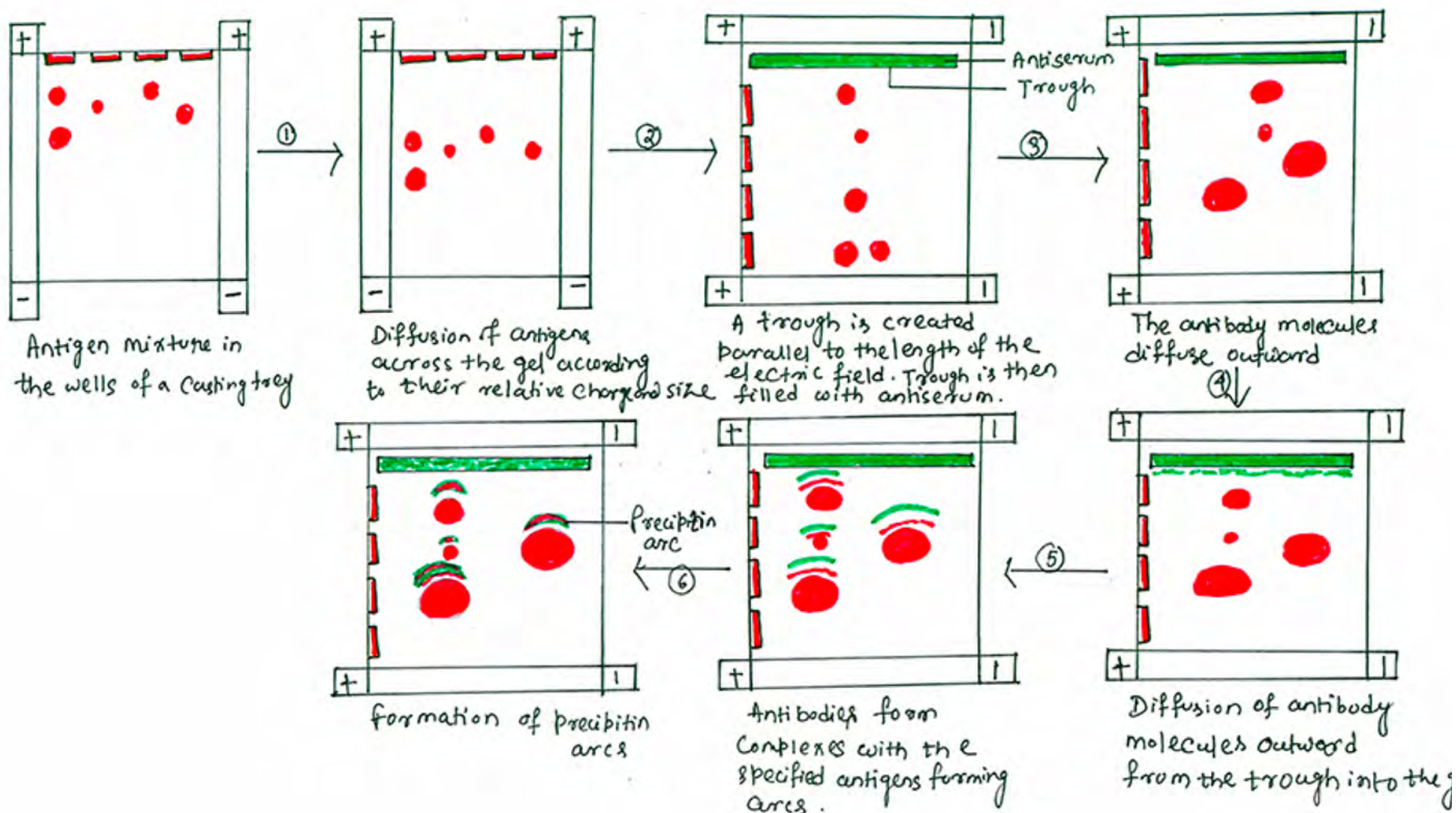
## Ανοσοηλεκτροφορητική ανάλυση (1D)

Τεχνική που συνδυάζει αρχικά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών και κατόπιν την ανοσοδιάχυση με αποτέλεσμα την καθίζηση τόξων συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος. Συνήθως χρησιμοποιείται για τον ποσοστικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών,

- Γίνεται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
- Προστίθενται αντισώματα
- Δημιουργούνται ανοσοσυμπλέγματα με τις πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν



# ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



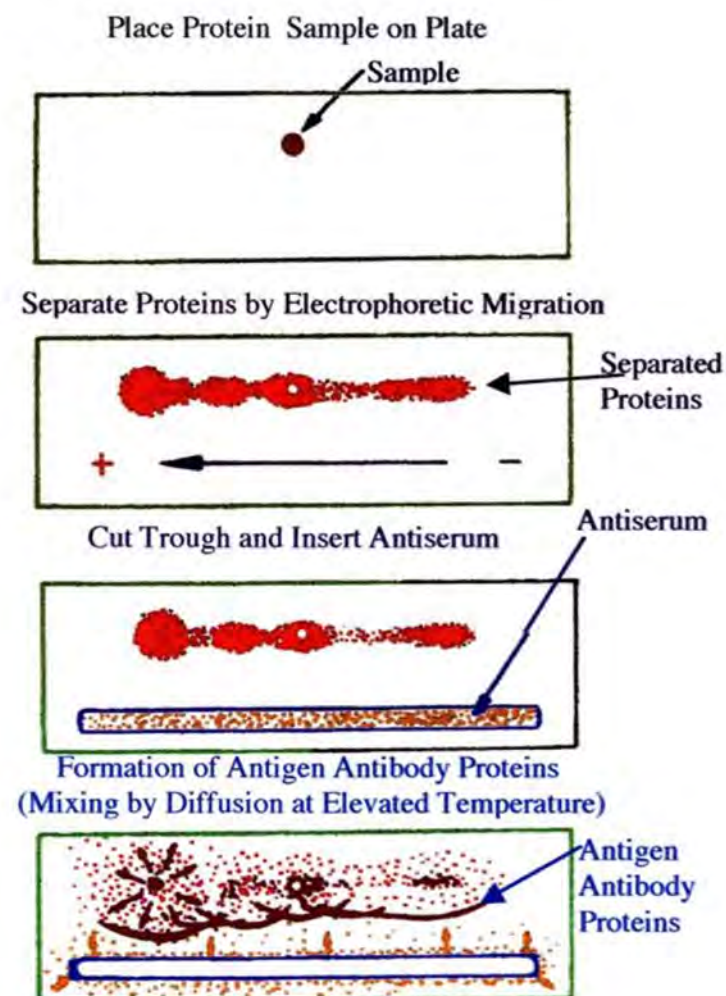


# ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

## Ανοσοηλεκτροφορητική ανάλυση (1D)

Τεχνική που συνδυάζει αρχικά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών και κατόπιν την ανοσοδιάχυση με αποτέλεσμα την καθίζηση τόξων συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος. Συνήθως χρησιμοποιείται για τον ποσοστικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών,

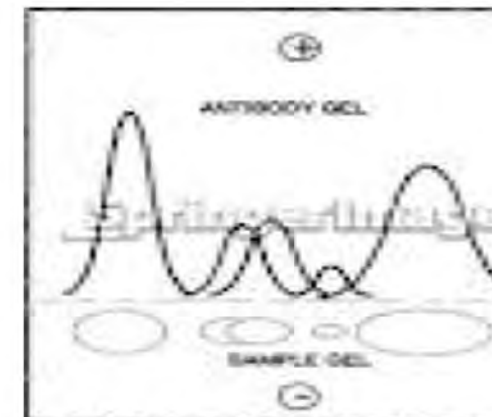
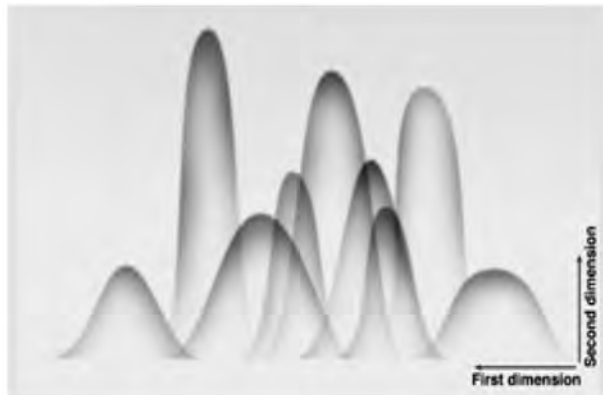
- Γίνεται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
- Προστίθενται αντισώματα
- Δημιουργούνται ανοσοσυμπλέγματα με τις πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν



# ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

## Crossed (2D)

- Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στην 1<sup>η</sup> διάσταση
- 2<sup>η</sup> διάσταση σε gel που περιέχει αντισώματα
- Το ανοσοσύμπλεγμα έχει σχήμα κωδωνοειδές

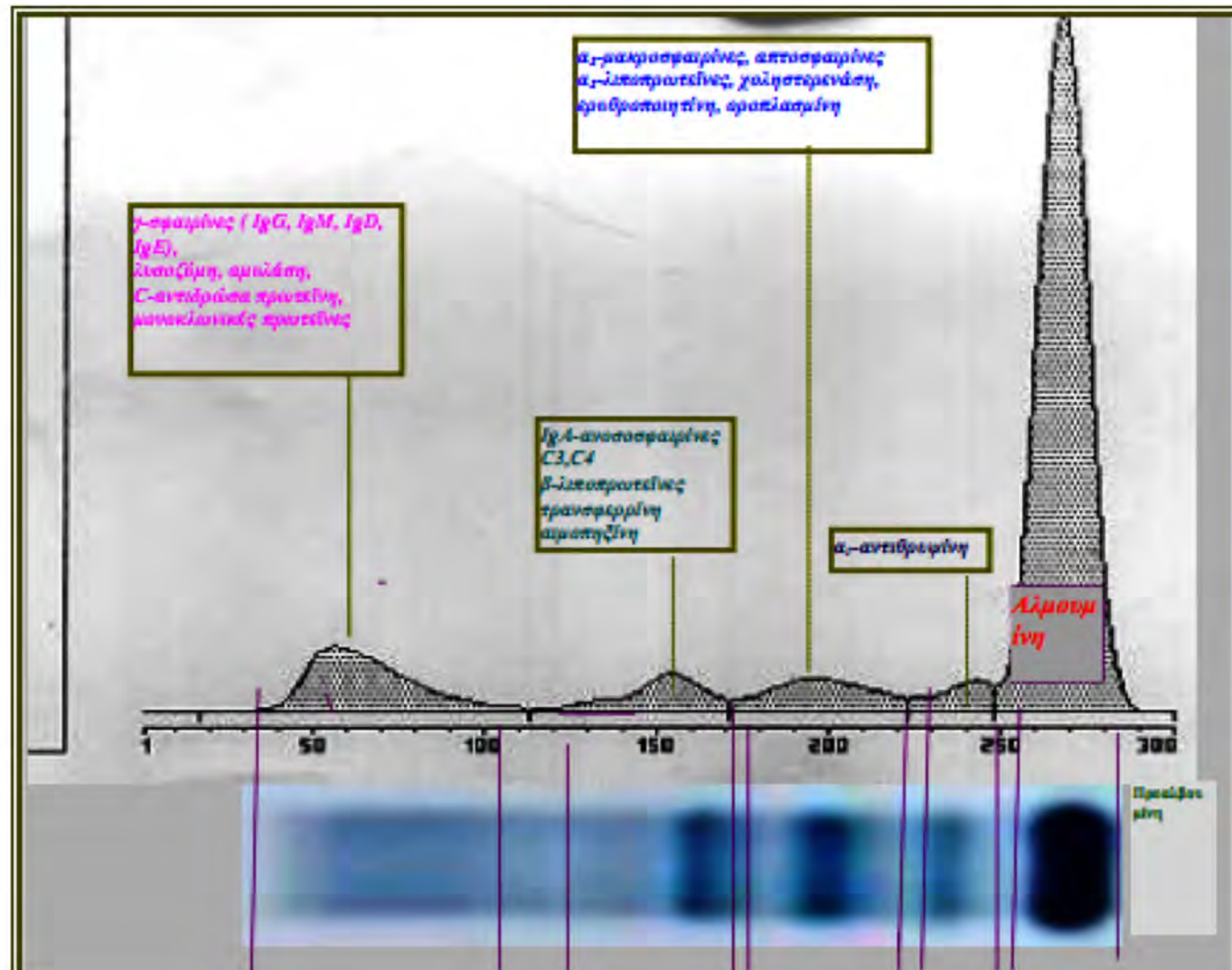


# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

- **ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA**
- **ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**
- **ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ**
- **ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

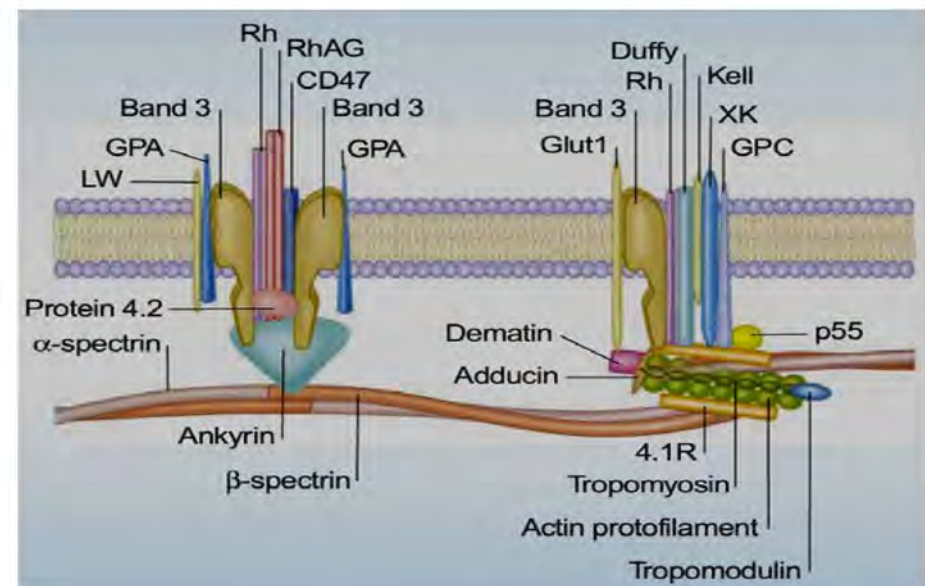
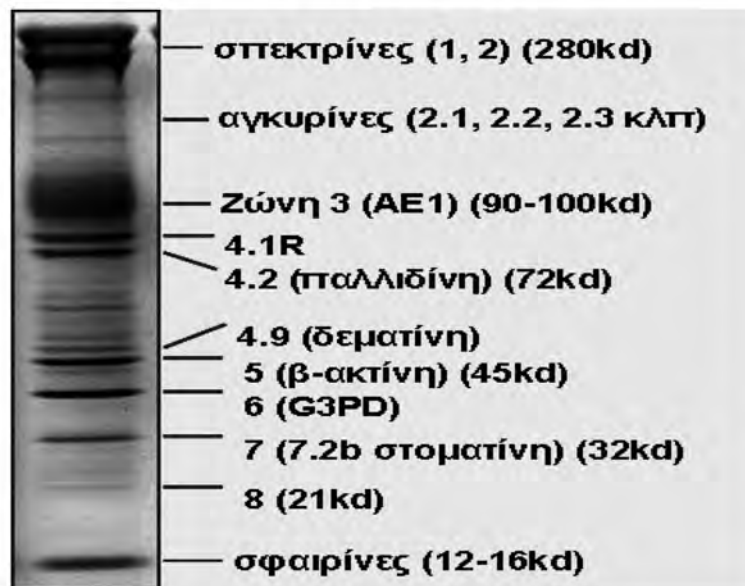


# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ



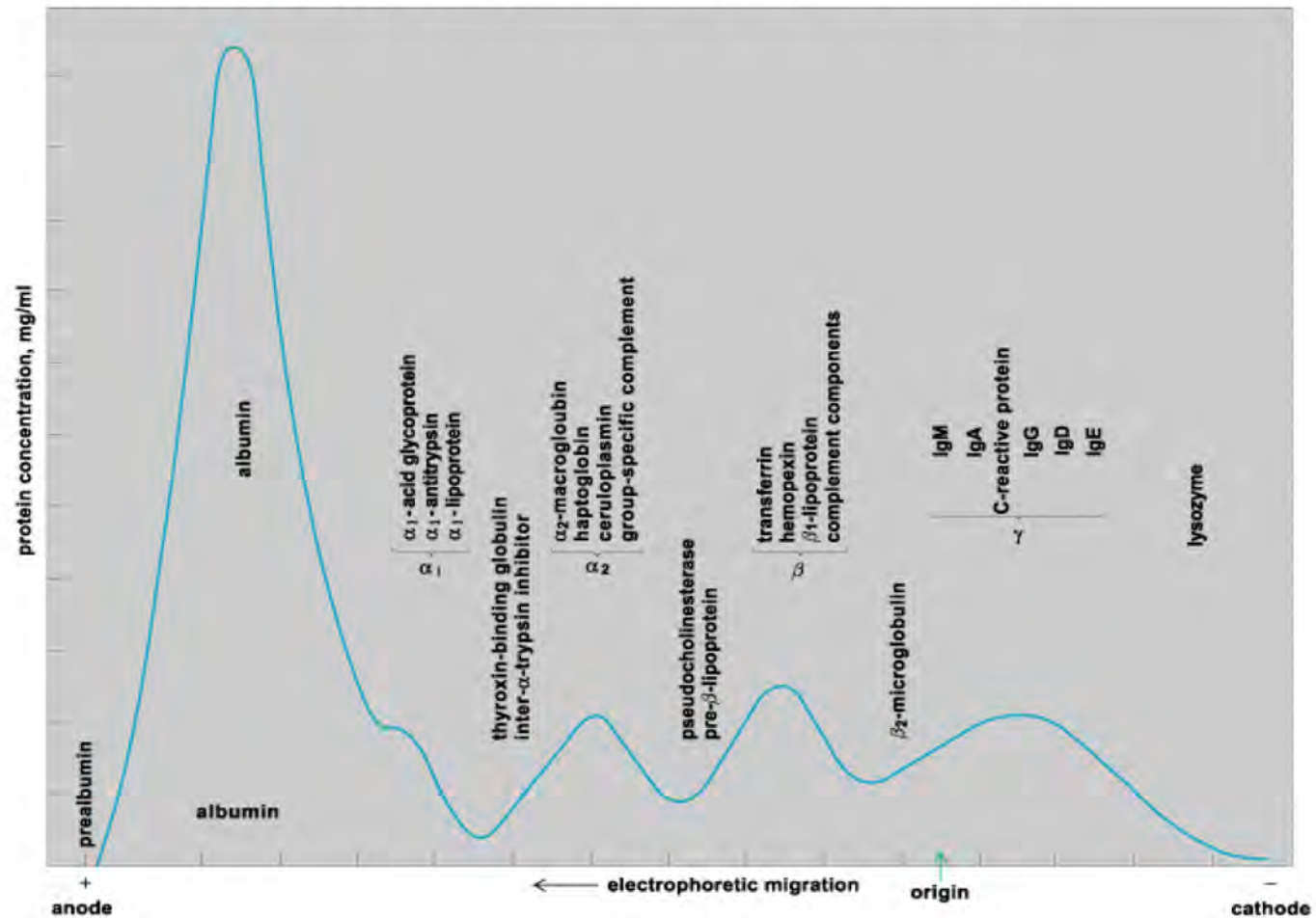
# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Χαρακτηρισμός άγνωστων πρωτεϊνικών μορίων (υποδοχείς, λειτουργικές και δομικές μονάδες κυττάρου)
- Διαγνωστική



# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

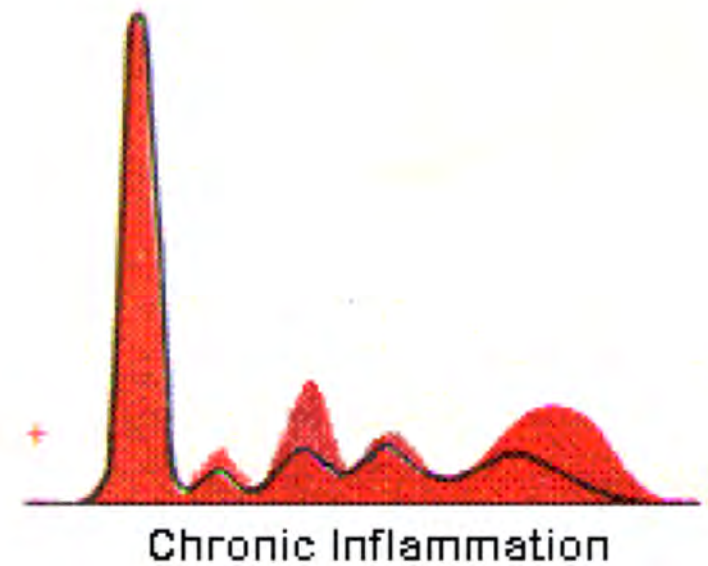
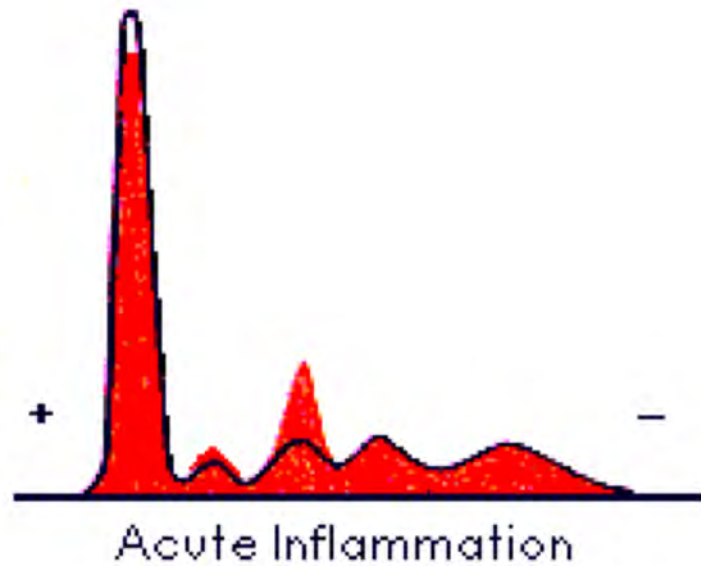
- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ





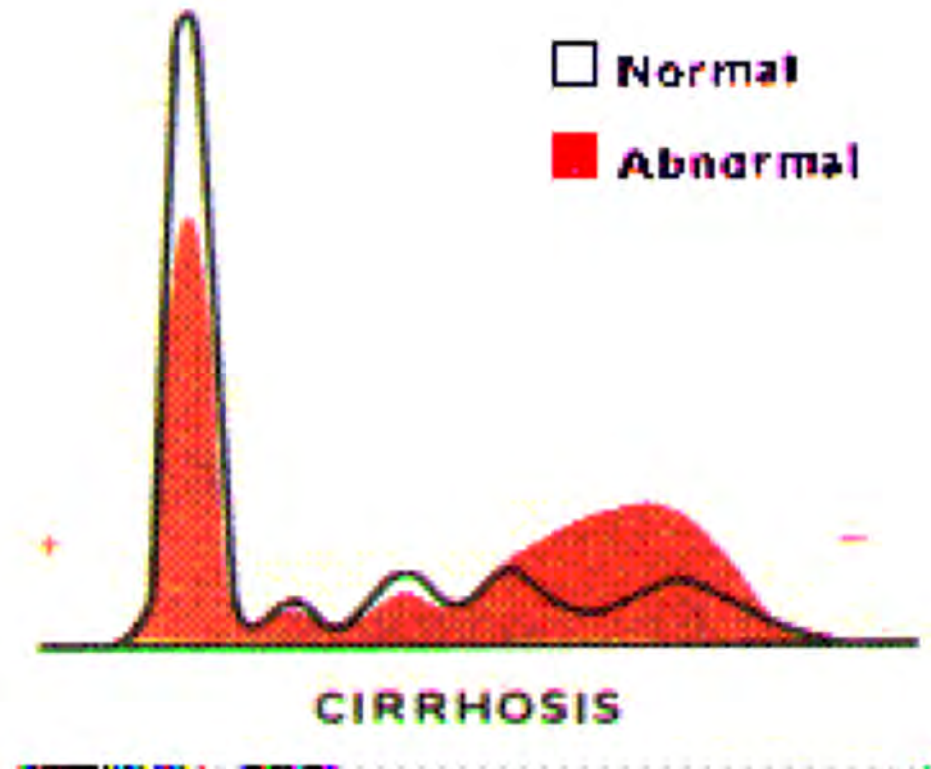
# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

## ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ



# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

## ΗΠΑΤΟΠΑΘΕΙΑ - ΚΙΡΡΩΣΗ



# **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

**ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ ΓΑΜΜΑΠΑΘΕΙΑ**

**ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗ – ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΗ  
ΓΑΜΜΑΠΑΘΕΙΑ**

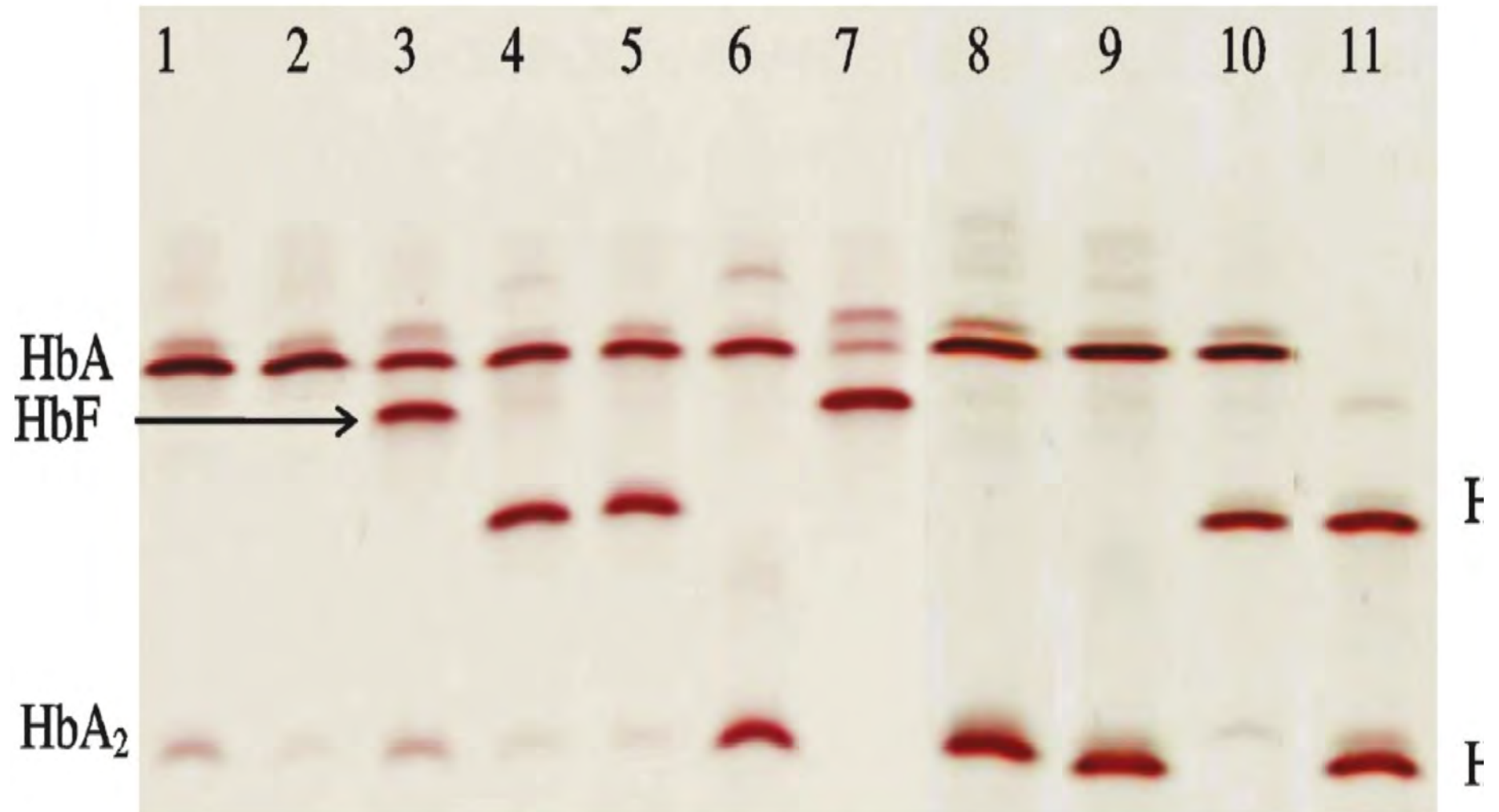
**ΥΠΟΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ**

**ΝΕΦΡΩΣΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ**

**ΕΛΛΕΙΨΗ Α1-ΑΝΤΙΘΡΥΨΙΝΗΣ**

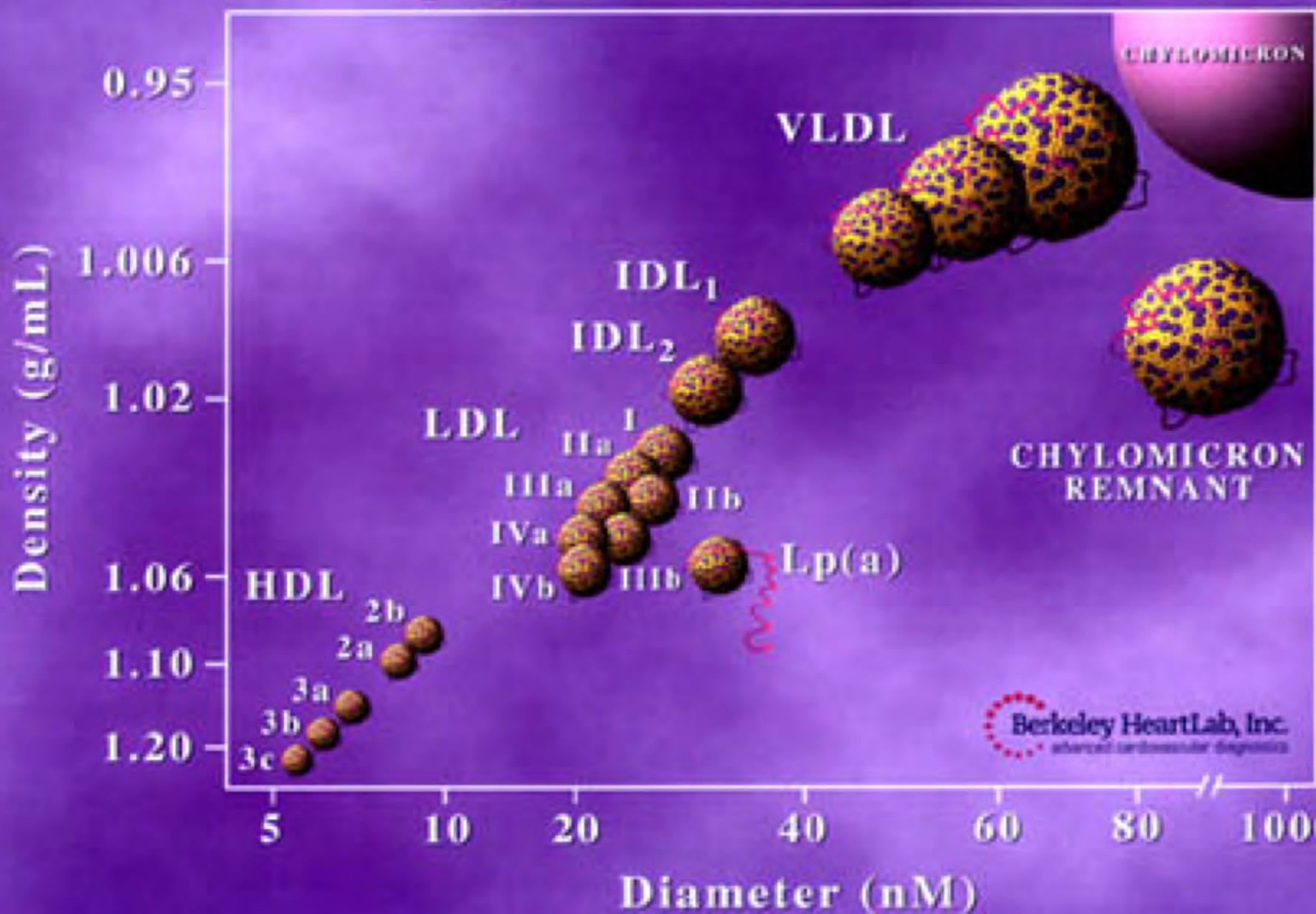


# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ



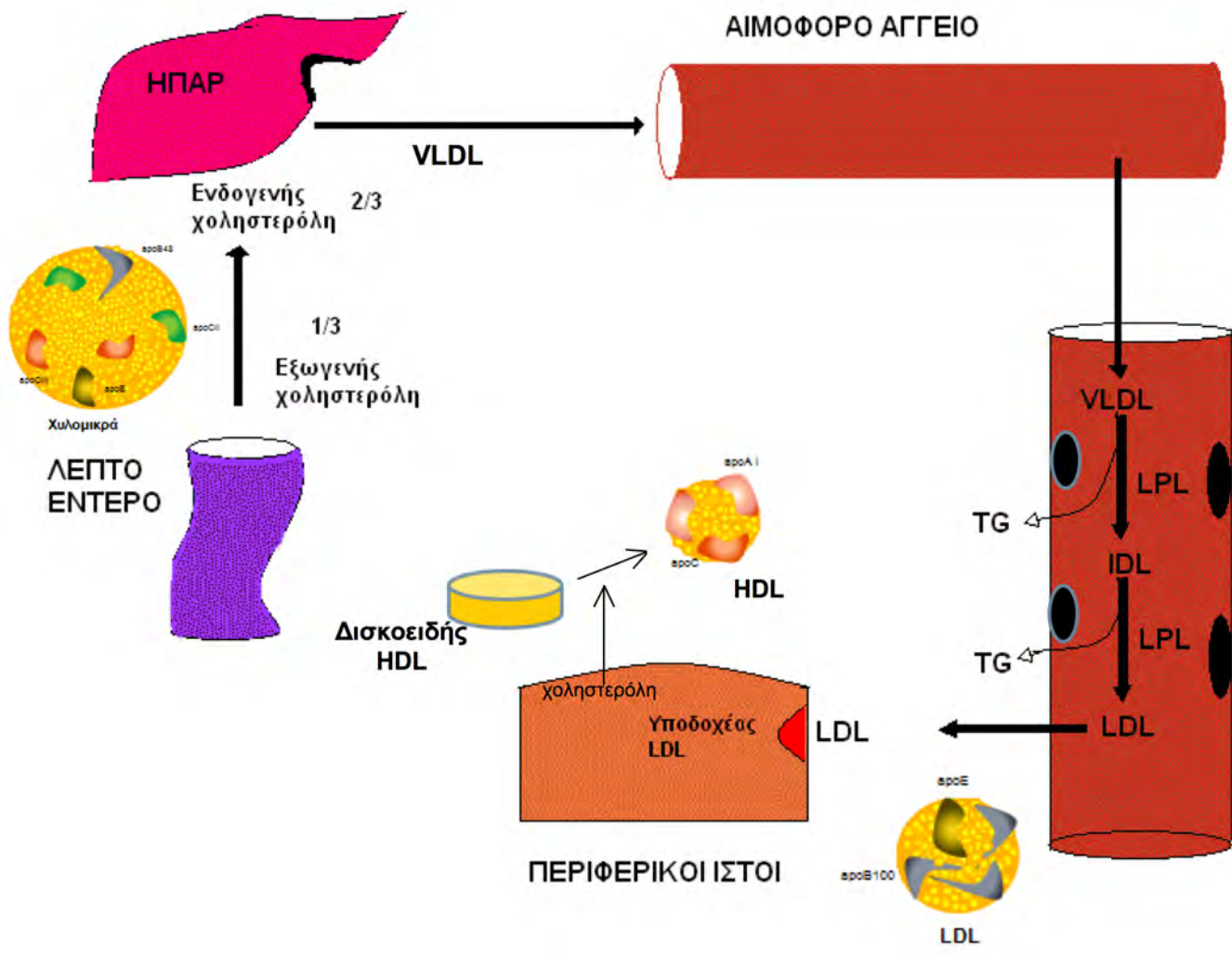
# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

# Lipoprotein Subclasses



Berkeley HeartLab, Inc.  
advanced cardiovascular diagnostics

# ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

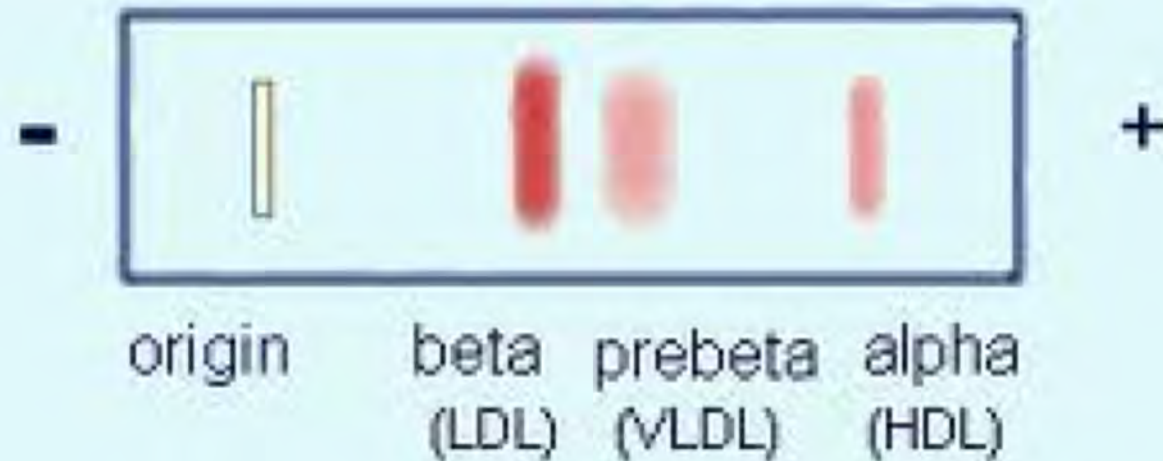




# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

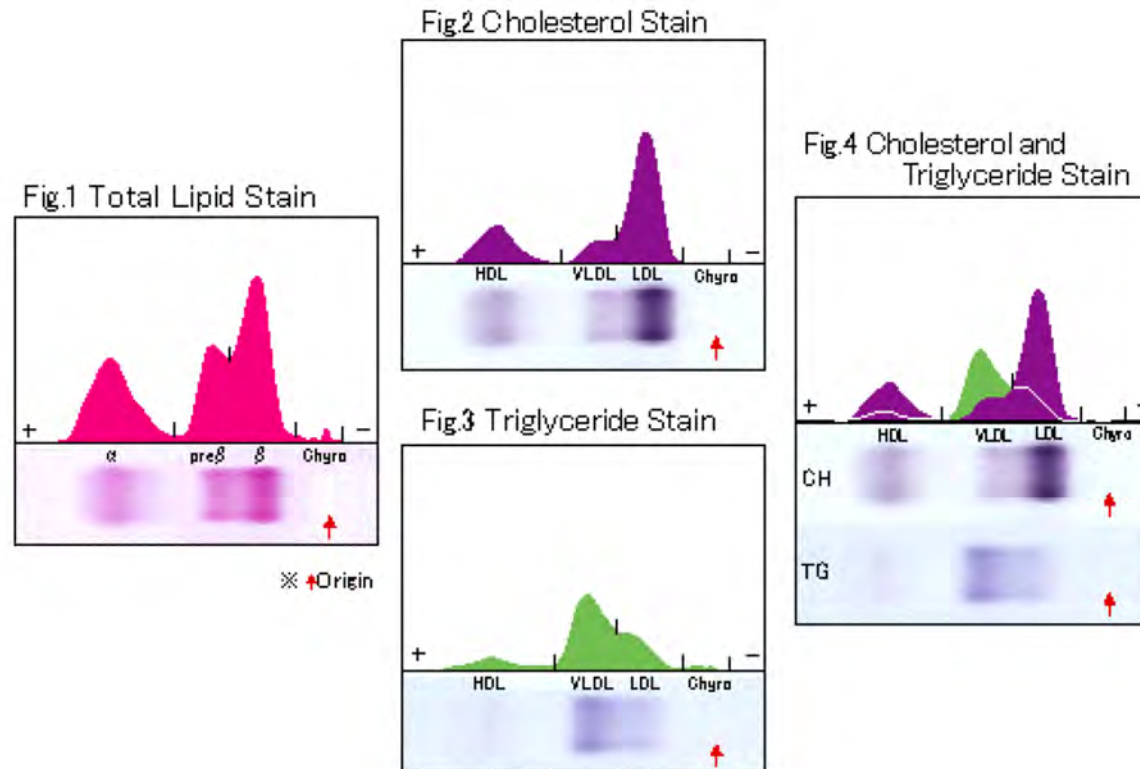
- Σε gel αγαρόζης – Οριζόντια συσκευή
- Χρώσεις Sudan Red, Oil Red O, Sudan Black

## Electrophoretic Pattern of Serum Lipoproteins



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΟΤΕΪΝΩΝ

Lipid Electrophoresis Pattern



Courtesy of Helena Laboratories, Urawa, Japan

# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Διάγνωση δυσλιπιδιμιών

## LIPOPROTEIN ELECTROPHORESIS

