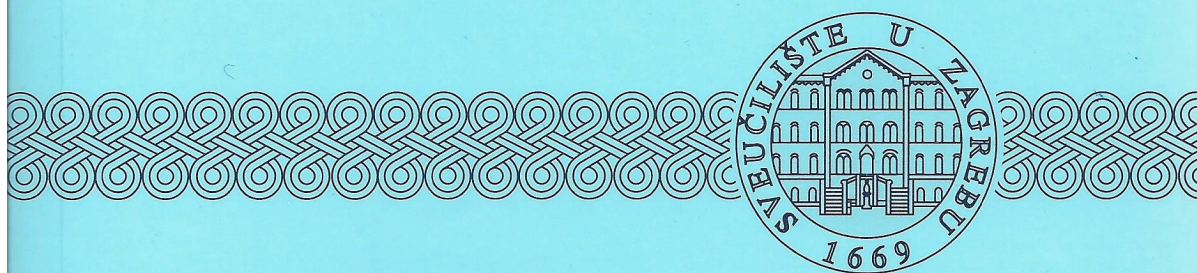


IVAN PILJAC

ELEKTROFOREZA



UDŽBENICI SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
MANUALIA UNIVERSITATIS ZAGRABIENSIS



U troškovima izdavanja ove knjige sudjelovalo je sredstvima za novčano podupiranje visokoškolskog udžbenika i znanstvene knjige u 2006. godini

**MINISTARSTVO ZNANOSTI, OBRAZOVANJA I ŠPORTA
REPUBLIKE HRVATSKE**

ELEKTROFOREZA

Napisao

IVAN PILJAC

umirovljeni redoviti profesor Prehrambeno-biotehnološkog
fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Media Print
TISKARA HRASTIĆ
Zagreb, 2006.

Nakladnik
MEDIA PRINT TISKARA HRASTIĆ d.o.o.
ZAGREB, Murati 16,
Za nakladnika
DARKO HRASTIĆ, graf. ing.

Uredio
IVAN PILJAC

Recenzirali
prof. dr. sc. BOŽIDAR GRABARIĆ
prof. dr. sc. NJEGOMIR RADIĆ
prof. dr. sc. ZORAN ZGAGA

Lektorirao
IVAN MARTINČIĆ, prof.

Odobrio Senat Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstava za
znanstveno-nastavnu literaturu Sveučilišta u Zagrebu, rješenjem
broj 02-1535/4-2005 od 13. prosinca 2005.

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Nacionalna i sveučilišna knjižnica – Zagreb

UDK 543 . 545 . 2(075 . 8)

PILJAC, Ivan
Elektroforeza / napisao Ivan Piljac.-
Zagreb : Media Print, 2006. - (Udžbenici
Sveučilišta u Zagrebu = Manualia
Universitatis studiorum Zagrabienensis)

ISBN 953-95404-0-2

I. Elektroforeza -- Udžbenik

460418040

ISBN 953-95404-0-2

REPRINT

Vlastita naklada autora

Digitalizirano izdanje izvornika objavljenog 2006. god.

URL: http://www.fer.unizg.hr/_download/repository/Ivan_Piljac_-_Elektroforeza.pdf

Zagreb, 2015.

ISBN 978-953-58487-1-4

Predgovor

Početa mi je namjera bila da metode elektroforeze opišem u jednom od poglavlja novog izdanja mojeg sveučilišnog udžbenika *Elektroanalitičke metode, teorijske osnove, mjerne naprave i primjena*. Naime, udžbenik sadrži teorijska objašnjenja mnogih fizikalno-kemijskih veličina i teorijskih modela na kojima se temelje metode elektroforeze. Međutim, toliko je metoda elektroforetske separacije, da sam se odlučio izdati samostojnu knjigu.

Naime, razvojem metoda elektroforetske separacije dramatično raste njihov broj: od pionirskog rada Tiseliusa, koji čini separaciju proteina u slobodnoj otopini, preko separacija na čvrstim nosačima elektrolita: papiru, membrani celuloznog acetata i dr., do separacija na gelovima: škrobu, agaru, agarazi i poliakrilamidnom gelu, u kojima se primjenjuju različiti mehanizmi razdvajanja molekulskih iona temeljem njihova nativnog efektivnog električnog naboja, s primjesama izmijenjenog električnog naboja, temeljem veličine molekulskih iona, učinka molekularnog sita nosača elektrolitne otopine i drugih specifičnih svojstava.

Široku primjenu nalaze suvremene metode diskontinuirane elektroforeze, SDS-elektroforeze, imunoelektroforeze, dvodimenzijske elektroforeze visoke rezolucije i brojne metode elektroforeze u kapilari.

Osim uporabe u kemijskoj analizi, metode elektroforeze na gelovima jedinstvene su tehnike koje omogućuju utvrđivanje sekvencija DNA, put su za izolaciju molekulskih vrsta od proteina do gena, a sekvenciranjem aminokiselina put su prema kloniranju gena i sintezi proteina.

Spektar mogućnosti primjene brojem i raznolikošću problem je za početnike, studente različitih fakulteta, ali i za iskusne analitičare.

Ova knjiga pokušaj je sistematskog pristupa metodama elektroforeze.

Teorijske fizikalno-kemijske osnove elektroforetske separacije, poboljšanja rezolucije razdvajanja, identifikacije i detekcije makromolekulskih iona, dane su u opsegu koji omogućava razumijevanje fizikalno-kemijskih mehanizama dionih procesa u različitim metodama elektroforeze.

Budući da, na hrvatskom jeziku, ne postoji knjiga o metodama elektroforeze pa ni ustaljeno nazivlje, pokušao sam uvesti hrvatsku nomenklaturu za ovo područje.

Za uloženi trud zahvaljujem se: prof. dr. sc. Njegomiru Radiću, prof. dr. sc. Božidaru Grabariću i prof. dr. sc. Zoranu Zgagi, recenzentima rukopisa, prof. dr. sc. Stanku Tonkoviću i prof. dr. sc. Mariju Cifreku na korisnim savjetima u vezi s poglavljem o električnim izvorima za elektroforezu, te prof. dr. sc. Pavlu Mildneru, koji je pročitao uređeni tekst knjige i akribijom dugogodišnjeg glavnog urednika znanstvenog časopisa uočio i najmanje nedostatke.

Nadam se da će knjiga biti korisna studentima i diplomiranim inženjerima različitih struka.

Ivan Piljac

Sadržaj

1. TEORIJSKE OSNOVE	1
2. ELEKTROFOREZA U SLOBODNOJ OTOPINI.....	9
2.1. Elektroforeza pomičnih granica	9
2.2. Elektroforeza u protočnoj otopini	11
3. ELEKTROFOREZA U OTOPINI NA NOSAČU	13
3.1. Elektroforeza na čvrstom nosaču	13
3.2. Elektroforeza u gelu	14
3.2.1. Škrobni gel	16
3.2.2. Agarozni gel	16
3.2.3. Poliakrilamidni gel	17
4. ELEKTROFOREZA U HOMOGENOM POLIAKRILAMIDNOM GELU UZ HOMOGENI PUFER	21
4.1. Električni naboj elektroforetskih jedinki	21
4.2. Kontrola električnog naboja elektroforetskih jedinki.....	22
4.3. Učinak veličine pora	24
4.4. Naprave za elektroforezu	25
4.5. Priprava gela	27
4.6. Detekcija i kvantifikacija razdvojenih molekulskih vrsta	31
4.6.1. Bojenje makromolekula	31
4.6.2. Kvantifikacija denzitometrijom.....	35
4.6.3. Kvantifikacija videokamerom i digitalnim preslikačem	39
4.6.4. Detekcija i kvantifikacija radiometrijom.....	39
4.7. Prijenos makromolekula iz gela na površinu membrane	41
4.7.1. Prijenos difuzijom	41
4.7.2. Prijenos ispiranjem kapilarnim protokom otopine pufera	42
4.7.3. Prijenos tlačenjem	43
4.7.4. Prijenos elektroforezom	43

VIII

4.8. Detekcija i kvantifikacija makromolekula na membrani	44
4.9. Primjene elektroforeze na homogenom poliakrilamidnom gelu uz homogeni pufer	46
5. ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNOM GELU UZ DISKONTINUIRANE UVJETE.....	47
5.1. Načelo nagomilavanja.....	47
5.2. Višefazni pufer.....	51
5.3. Postupak i naprava	52
5.4. Priprava otopine analita	54
5.5. Selektivno nagomilavanje.....	55
5.6. Električni uvjeti elektroforeze.....	55
5.7. Primjena.....	56
6. ODREĐIVANJE RELATIVNE MOLEKULSKE MASE ELEKTROFOREZOM NA POLIAKRILAMIDNOM GELU	57
6.1. Fergusonov prikaz.....	58
6.2. Gel s gradijentom poroznosti	61
6.3. Priprava gela s gradijentom poroznosti.....	62
7. ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNOM GELU U PRISUTNOSTI ADITIVA	67
7.1. SDS-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu.....	68
8. ELEKTROFOREZA NA GELU OD AGAROZE	79
8.1. Metode imunoelektroforeze	80
8.1.1. Metoda prema Grabaru i Williamsu.....	82
8.1.2. Metoda prema Laurellu	83
8.1.3. Unakrsna imunoelektroforeza	85
8.1.4. Dvojna unakrsna imunoelektroforeza	86
8.1.5. Linijska imunoelektroforeza	87
8.1.6. Metoda polaganja	89
8.1.7. Metode intermedijarnoga gela.....	89
8.1.8. Protusmjerna imunoelektroforeza	90
8.1.9. Detekcija imunoprecipitata	91
8.2. Elektroforeza proteina	93
8.3. Elektroforeza nukleinskih kiselina.....	93

8.3.1. Separacija ribonukleinskih kiselina (RNA).....	97	
8.3.2. Sekvencija DNA molekula.....	97	
9. IZOELEKTRIČNO SABIRANJE (FOKUSIRANJE).....	103	
9.1. Načelo metode	103	
9.2. Oblikovanje gradijenta pH.....	105	
9.3. Nanošenje otopine analita.....	108	
9.4. Izoelektrično sabiranje u poliakrilamidnom gelu.....	108	
9.5. Poliakrilamidni gel s nepomičnim gradijentom pH	110	
9.6. Izoelektrično sabiranje u gelu od agaroze	111	
9.7. Detekcija proteina	112	
9.8. Izoelektrično sabiranje za preparativne svrhe	113	
9.9. Izoelektrične membrane.....	114	
9.10. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti proteina o pH	115	
10. IZOTAHOFOREZA	119	
10.1. Načelo metode	119	
10.2. Načini izvođenja izotahoforeze.....	124	
10.3. Detekcija sastojaka analita.....	125	
11. DVODIMENZIJSKA (2D) ELEKTROFOREZA VELIKE REZOLUCIJE ...	129	
11.1. Način izvođenja metode.....	129	
11.2. Razdvajanje analita u prvom stupnju u gelu s nepomičnim	gradijentom pH	131
11.3. Razdvajanje u drugom stupnju.....	134	
11.4. Identifikacija i kvantifikacija	136	
12. ELEKTROFOREZA U KAPILARI	139	
12.1. Načelo metode i obilježja (separacijske) kapilare.....	140	
12.2. Unošenje otopine analita u kapilaru.....	143	
12.3. Razdvajanje sastojaka analita u kapilari	145	
12.4. Elektroforeza u kapilari ispunjenoj otopinom pufera.....	146	
12.5. Elektroforeza u kapilari ispunjenoj molekularnim sitom.....	148	

12.6. Elektroforeza u kapilari s izoelektričnim sabiranjem.....	149
12.7. Elektroforeza u kapilari s elektrolitom i micelama	152
12.8. Detekcija i kvantifikacija	153
12.9. Primjena.....	157
13. VISOKONAPONSKI IZVORI ZA ELEKTROFOREZU.....	160
VAŽNIJE KNJIGE S PODRUČJA ELEKTROFOREZE.....	166
Popis simbola.....	169
Predmetno kazalo	169

1. TEORIJSKE OSNOVE

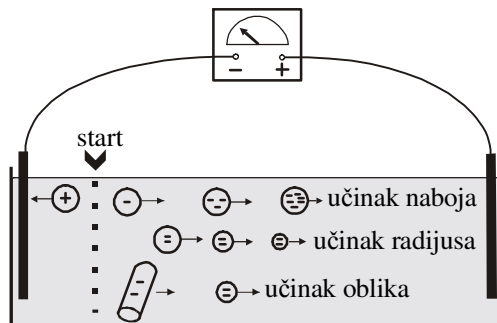
Elektroforezom nazivamo migraciju (putovanje) električki nabijenih čestica kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja. Za razliku od drugih elektroanalitičkih metoda s pomoću kojih analitički podatak dobivamo temeljem elektrokemijskog procesa koji se odvija na radnoj ili indikatorskoj elektrodi, u elektroforezi analitički ili drugi podatak utvrđujemo na temelju *razdiobe* analiziranih električki nabijenih čestica što se događa u mediju između elektroda. Elektrode služe isključivo za uspostavljanje električnog polja kroz otopinu odnosno medij u kojem se nalaze električki nabijene čestice. Premda se na elektrodama, zbog razlike električnog potencijala između površine kovinskih elektroda i otopine odvijaju procesi oksidacije i redukcije, tj. elektroliza vode, ti procesi na elektrodama u elektroforezi nisu važni. Budući da se električno polje između elektroda u elektroforezi uspostavlja razlikom potencijala odnosno naponom od nekoliko stotina volta, zanemariv je napon od nekoliko volta potreban za elektrolizu vode na elektrodama u odnosu prema uspostavljenom vanjskom električnom naponu. Stoga je praktično ukupni napon elektroforeze djelatan kroz sloj otopine između jedne i druge elektrode elektroforetske ćelije.

Povijesno se naziv elektroforeza rabio za migraciju električki nabijenih koloidnih čestica. Danas se rabi u širem značenju. Dakle, elektroforezom nazivamo migraciju električki nabijenih čestica bile one jednostavni ili makromolekulski ioni ili koloidne čestice odnosno nakupine (agregati) većeg broja čestica. Budući da brzina migracije električki nabijene čestice kroz otopinu, pod utjecajem električne sile, ovisi o električnom naboju čestice i njezinom obliku i veličini, elektroforeza omogućuje separaciju, tj. razdvajanje električki nabijenih čestica temeljem razlike u brzini putovanja pojedine vrste čestica kroz otopinu. Zbog svoje jednostavnosti metode elektroforeze nalaze široku primjenu u kemijskoj analizi, ali i u preparativnim tehnikama. Naročito je važna njezina primjena u biokemiji i molekularnoj biologiji u analizi, razdvajanju i pročišćavanju velikih molekula, kao što su molekule proteina i nukleinskih kiselina, u separaciji jednostavnih molekulskih vrsta, tj. električki nabijenih molekula šećera, aminokiselina, peptida, nukleotida i jednostavnih iona.

Koncentracija elektroforezom razdvojenih čestica u stupcu otopine, odnosno na ploči ili valjku drugog (netekućeg, polučvrstog) medija, između

elektroda utvrđuje se različitim, danas brojnim, metodama detekcije. Određivanjem nazočnosti i koncentracije pojedine vrste čestica dobivaju se kvalitativni i kvantitativni analitički pokazatelji o razdvojenim česticama analita.

Načelo elektroforeze može se razabrati iz slike 1.1.



Slika 1.1. Načelo elektroforeze

U slobodnoj otopini pod utjecajem električnog polja čestice istog radijusa a većeg naboja prevaljuju u određenom vremenu dulji put. Čestice manjeg radijusa a istog naboja putuju brže. Oblik čestice utječe na brzinu migracije. Između dviju elektroda koje su uronjene u otopinu elektrolita uspostavlja se razlika potencijala s pomoću vanjskog električnog izvora.

Između elektroda, tj. kroz elektrolitnu otopinu, uspostavlja se *električno polje* kojemu jakost (E) ovisi o uspostavljenom naponu i međusobnoj udaljenosti elektroda. Električno polje djeluje na električki nabijenu česticu u elektrolitnoj otopini električnom silom (F) koja je jednaka umnošku električnog naboja čestice (q) i jakosti električnog polja ($F=qE$). Zbog djelovanja električne sile ubrzavaju se električki nabijene čestice. Putovanju čestice suprotstavlja se sila trenja u otopini kroz koju čestice putuju. Sila trenja ovisi o viskoznosti otopine i o veličini i brzini putovanja čestice. Porastom brzine povećava se sila trenja.

Kada se električna sila i sila trenja izjednače, električki nabijena čestica putuje određenom stalnom (konačnom) brzinom prema elektrodi elektroforetske ćelije. Električki nabijene čestice u otopini mogu biti jednostavni ioni ili veće čestice koje, kada su dovoljno velike, imaju svojstvo koloidnih čestica.

Za putovanje manje, solvatizirane odnosno hidratizirane, električki nabijene čestice kroz slobodnu otopinu, što možemo predočiti kao putovanje kuglaste materijalne čestice kroz otopinu, sila trenja, koja je posljedica viskoznosti otopine, prema Stokesovu zakonu jednaka je $6\pi\eta rv$, gdje je η viskoznost otopine, r radijus a v brzina čestice. Električna sila koja djeluje na česticu jednaka je umnošku naboja čestice i jakosti električnog polja (qE).

Kada čestice dostignu konačnu brzinu kretanja, električna sila jednaka je sili trenja. Omjer konačne brzine migracije i jakosti električnog polja naziva se električna odnosno elektroforetska pokretljivost čestice (u_{ef}):

$$\frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} = u_{ef} \quad (1-1)$$

Na površini veće čvrste, koloidne, električki nabijene čestice stvara se električni dvostruki sloj. Njega čini sloj slobodnih (električki nekompensiranih) električnih naboja na površini koloidne čestice i odgovarajući broj iona suprotnog naboja u otopini tik uz površinu koloidne čestice. Taj električni dvostruki sloj istovjetan je dvosloju koji se stvara na dodirnoj površini kovinske elektrode u otopini elektrolita.

Električni naboji na površini koloidne čestice i ioni u otopini privlače se Coulombovim (električnim) silama. Solvatizirani odnosno hidratizirani ioni koji čine sloj električnog naboja dvosloja u otopini mogu se približiti površini čvrste koloidne čestice na udaljenost vanjske Helmholtzove ravnine. Zbog termičkog gibanja čestica u otopini električni sloj u otopini nije kompaktan nego je dijelom i difuzan. Dakle, dio naboja elektrokemijskog dvosloja u otopini nalazi se u tzv. Gouy-Chapmanovu difuzijskom sloju.

Postoje li u otopini i ioni koji se mogu specifično adsorbirati na čvrstoj površini koloidne čestice, težište njihova naboja nalazi se na udaljenosti unutarne Helmholtzove ravnine i svojim nabojem pridonose naboju površine čvrste koloidne čestice.

Budući da su u elektrokemijskom dvosloju razdvojeni električki naboji između površine koloidne čestice i otopine, uspostavlja se razlika električnog potencijala. Ta se razlika potencijala između površine čvrste koloidne čestice i otopine ostvaruje kroz kompaktni (Helmholtzov) i difuzni (Gouy-Chapmanov) sloj.

Uzmemo li da je električni potencijal u sloju otopine izvan elektrokemijskog dvosloja nula, onda je sloj u otopini na vanjskoj Helmholtzovoj ravnini na potencijalu V . Taj električni potencijal ovisi o količini naboja u difuznom dijelu elektrokemijskog dvosloja i o permitivnosti odnosno dielektričnosti otopine (ϵ). Taj se potencijal često u razmatranju elektrokinetičkih pojava odnosno u kemiji koloida naziva *zeta potencijal* (ζ). Ako ne postoji difuzni dio elektrokemijskog dvosloja odnosno ako se sveukupni električni naboj dvosloja na strani otopine nalazi u vanjskoj Helmholtzovoj ravnini, onda je zeta potencijal jednak nuli. Vanjsko električno polje nema učinka na takvu koloidnu česticu i ona neće očitovati elektrokinetičko gibanje.

Debljina difuznog sloja naboja na strani otopine ovisi o sastavu elektrolitne otopine, poglavito o njezinoj ionskoj jakosti. Tako u elektrolitnoj otopini monovalentne soli koncentracije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ debljina difuznog sloja iznosi 3 nm, u otopini koncentracije $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ iznosi 30 nm, a u vrlo

razrjeđenim otopinama može biti do 100 nm. Prema Debye-Hückelovu modelu tumačenja elektrokemijskog dvosloja u jakim elektrolitima debljina difuznog dijela dvosloja jest κ^{-1} . To je veličina koju nazivamo Debyeova duljina i iskazana je relacijom:

$$\frac{1}{\kappa} = \left(\frac{\varepsilon RT}{2FI} \right)^{1/2} \quad (1-2)$$

gdje je ε - permitivnost odnosno dielektričnost otopine ($F\ m^{-1}$), F – Faradayeva konstanta, R – opća plinska konstanta, T – termodinamička temperatura, a I – ionska jakost otopine iskazana relacijom:

$$I = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + c_3 z_3^2 + \dots) \quad (1-3)$$

gdje c_i predstavlja koncentraciju, a z_i nabojni broj pojedine vrste iona u otopini.

Na električni naboj u difuznom dijelu dvosloja (q_d) vanjsko električno polje jakosti E djeluje silom jednakom umnošku naboja u difuznom sloju i jakosti električnog polja ($q_d E$).

Pretpostavimo li da je koloidna čestica kuglastog oblika radijusa r s difuznim slojem naboja debljine κ^{-1} i da je $r \ll \kappa^{-1}$, onda je s kinetičkog stajališta radijus čestice koja se kreće u mediju praktično jednak debljini difuznog sloja odnosno jednak je κ^{-1} . Električnoj sili putovanja čestice suprotstavlja se sila trenja, koja je prema Stokesovu zakonu jednaka $6\pi\eta\kappa^{-1}v$, gdje je η viskoznost otopine a v brzina čestice. Elektrokinetički potencijal odnosno ζ . (zeta) potencijal u odnosu prema električnom naboju u difuznom dijelu dvosloja uz navedeni pretpostavljeni oblik i veličinu koloidne čestice iskazan je relacijom:

$$\zeta = \frac{q_d}{\varepsilon\kappa^{-1}} \quad (1-4)$$

Električna sila iskazana zeta potencijalom jednaka je $\zeta\varepsilon\kappa^{-1}E$. Kada se sila trenja i električna sila izjednače, koloidna čestica putuje konačnom brzinom. Za to ustaljeno stanje (eng. steady state) omjer brzine putovanja koloidne čestice i jakosti električnog polja naziva se elektroforetska pokretljivost (u_{ef}) čestice.

$$u_{ef} = \frac{v}{E} = \frac{\zeta\varepsilon}{6\pi\eta} = f \frac{\zeta\varepsilon}{\pi\eta} \quad (1-5)$$

Numerički faktor (f) vrijednosti jest $1/6$ prema izvodu iz Stokesova zakona. Međutim, može imati i vrijednost do $1/4$. Naime, njegova vrijednost ovisi o odnosu radijusa čestice i debljine difuznog sloja. Za veće vrijednosti r/κ^{-1} , tj. ako je radijus čestice znatno veći od debljine difuznog sloja, numerički faktor uvijek je $1/4$, bez obzira na oblik koloidne čestice. Međutim, ako je radijus čestice manji u odnosu prema debljini difuznog sloja, f je $1/4$ za cilindričnu česticu, a $1/6$ za kuglastu česticu.

Prevaljeni put čestice jednak je umnošku njezine brzine i vremena migracije ($l = v t$). Iskaže li se u relaciji 1-5 brzina kao omjer puta i vremena migracije, dobije se da je prevaljeni put iskazan relacijom:

$$l = u_{ef} E t \quad (1-6)$$

gdje su: l - prevaljeni put čestice a t - trajanje elektroforetskog procesa odnosno migracije.

Iz relacije 1-6 vidljivo je da je migracijski put čestice proporcionalan elektroforetskoj pokretljivosti čestice. Držimo li jakost električnog polja i vrijeme migracije konstantnim, mjerenjem migracijskog puta različitih čestica utvrđujemo njihovu relativnu elektroforetsku pokretljivost. Odnosno, poznajemo li međusobne odnose elektroforetskih pokretljivosti različitih čestica pri zadanim eksperimentalnim uvjetima, možemo izračunati utjecaj jakosti električnog polja i vremena migracije i tako izabrati najbolje uvjete za njihovo razdvajanje. To vrijedi za migraciju čestica u slobodnoj otopini, i to približno, jer na migraciju čestica utječu još neki čimbenici, posebice učinak temperature zbog topline oslobođene tokom električne struje kroz medij.

Medij kroz koji protječe električna struja predstavlja električni otpor (R). Električni otpor medija izravno je razmjernan razmaku između elektroda (l), a obrnuto razmjernan umnošku površine presjeka kojim teče električna struja (A) i električne provodnosti otopine (κ); ($R = l/\kappa A$).

Pod utjecajem uspostavljenog napona kroz medij protječe električna struja kojoj je jakost prema Ohmovu zakonu jednaka omjeru napona i električnog otpora medija ($I = U/R$).

Umnožak napona i jakosti struje predstavlja snagu (P) koja se prolaskom struje kroz otpor medija očituje kao oslobođena toplina i iskazana je relacijom:

$$P = U I = \frac{U^2}{R} = I^2 R \quad (1-7)$$

Omjer jakosti električne struje i površine kojom teče struja jest gustoća električne struje ($J = I/A$). Jakost električnog polja iskazana je omjerom uspostavljenog napona i razmaka između elektroda ćelije.

Iskažemo li otpor kako je navedeno, slijedi da je jakost električnog polja omjer gustoće električne struje (J) i električne provodnosti otopine; $E = U/l = IR/l = I/A \kappa = J/\kappa$, odnosno brzina migracija ($v = u_{ef} E$) jest $v = u_{ef} J/\kappa$. Dakle, brzina migracije čestica izravno je razmjerna umnošku elektroforetske pokretljivosti čestica i gustoće električne struje, a obrnuto razmjerna električnoj provodnosti elektrolitne otopine

Promjena temperature medija u elektroforetskoj ćeliji, uzrokovana toplinom koja se oslobađa tokom električne struje kroz medij u ćeliji, utječe na sve veličine koje određuju brzinu migracije.

Kako je vidljivo iz relacija 1-4, 1-5 i 1-6, elektrokinetički potencijal, a time i elektroforetska pokretljivost čestica obrnuto je razmjerna drugom korijenu ionske jakosti. Što je manja ionska jakost, veća je brzina migracije. Pri većoj ionskoj jakosti brzina migracije manja je, međutim, pokazano je da pri razdvajanju uz veću ionsku jakost razdvojene zone bolje su odijeljene nego pri manjoj ionskoj jakosti. Što je veća ionska jakost, veća je električna provodnost elektrolitne otopine, pa je veća, uz konstantni napon, i jakost električne struje kroz elektroforetsku ćeliju. Uz jaču električnu struju oslobađa se više topline pa raste temperatura medija u ćeliji. Porastom temperature smanjuje se viskoznost otopine pa se povećava brzina difuzije iona i tako se smanjuje i električni otpor otopine. Uz konstantan napon elektroforeze i dalje raste jakost struje i time i oslobođena toplina.

Porast temperature medija uzrokuje povećanu brzinu isparavanja otapala, ali i konvekciju (miješanje) medija, napose pri elektroforezi u slobodnoj otopini, pa se miješaju granice razdvajanja i smanjuje rezolucija razdvajanja čestica različitih elektroforetskih pokretljivosti.

Sadrži li ispitivani sustav temperaturno osjetljive molekulske vrste, povećana temperatura može uzrokovati i kemijske promjene analita, npr. denaturaciju proteina ili smanjenje enzimске aktivnosti.

Problemi vezani na oslobođenu toplinu mogu se smanjiti radom uz manju električnu snagu. Uz manju električnu snagu trajanje separacije, za iste duljine puta migracije, mora biti znatno dulje. Međutim, uz dulje vrijeme separacije oštrina razdvojenih vrpce manja je, i to zbog difuzije molekula iz vrpce u okolnu otopinu. Stoga se za svaku vrstu analita moraju eksperimentalno utvrditi optimalni uvjeti elektroforeze.

Odvodenje oslobođene topline, postupkom hlađenja, jedan je od znatnih problema u mnogim metodama elektroforeze. Hlađenjem se neizbježno uspostavlja razlika temperature između dijelova medija u ćeliji koji su bolje odnosno slabije hlađeni. Postojanje gradijenta temperature uzrokuje razlike u brzini migracije istovrsnih čestica, a time i distorziju njima pripadajućih vrpce separacije. Pri elektroforezi u cilindričnom gelu ili gelu u ploči, hlađenje je učinkovitije uz stijenku cilindra ili ploče. Zato je uz stijenku brzina migracije manja nego u središtu pa nastaju zakrivljene (nasmijane) vrpce separacije. Zato je nužno elektroforezu provoditi uz konstantnu i kontroliranu temperaturu, što se postiže primjernim sustavom hlađenja.

Kao izvori električne snage u elektroforezi rabe se električne naprave koje omogućuju regulaciju jedne električne veličine, i to: ili napona ili jakosti električne struje ili električne snage. Koja se električna veličina kontrolira, ovisi o elektroforetskim uvjetima, poglavito o čimbenicima koji utječu na promjenu električnih svojstava medija tijekom elektroforeze. Tako se, u pravilu, pri separaciji proteina rabe naprave za kontrolu jakosti električne struje, a pri separaciji nukleinskih kiselina naprave za kontrolu napona. U postupku separacije proteina metodom izoelektričnog sabiranja (vidi poslije) primjenjuju se električni izvori koji omogućuju kontrolu električne snage.

Čini li se elektroforeza u otopini koja je stabilizirana na poroznom nosaču odnosno matrici (eng. matrix), na brzinu putovanja čestica, uz spomenute čimbenike, utječu mnogi dodatni čimbenici.

Kao stabilizirajući medij, koji zapravo sprječava termalnu konvekciju otopine, rabe se papir, celulozni acetat, fino usitnjena krutina ili gel od poliakrilamida, agaroze ili škroba. Pod utjecajem električnog polja električki nabijene čestice prisutne u analitu putuju, otopinom na nosaču, različitom brzinom. Brzina migracije ovisi o njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti ali i o interakciji (međusobnom djelovanju) putujućih čestica s materijalom nosača. Ovisno o kemijskom sastavu odnosno vrsti nosača, interakcija se može ostvariti mehanizmom *adsorpcije* putujućih čestica na površinu materijala nosača, zatim *ionskom izmjenom* s električki nabijenim skupinama na nosivom materijalu. Nehomogenost nosača također utječe na migraciju čestica.

Postojanje električki nabijenih skupina na površini čvrstog nosača uzrokuje i pojavu *elektroosmoze*, tj. pojavu putovanja otapala prema negativnoj elektrodi elektroforetske ćelije. Tako npr. papir kao nosač sadrži malu površinsku koncentraciju karboksilnih skupina, a agarozu sulfonske skupine. Obje imaju svojstvo slabih kiselina. Kao slabe kiseline one će u neutralnom ili lužnatom mediju ionizirati. Time na čvrstom nosaču nastaju negativni električni naboji, koji su nepokretni. Ionizacijom nastali vodikovi ioni u otopini kao hidratizirani H_3O^+ ioni putuju prema negativnoj elektrodi, povlačeći za sobom molekule vode.

Elektroosmotski tok otapala utječe na brzinu migracije električki nabijenih čestica. Pozitivnima će brzina putovanja porasti, a negativnima će se smanjiti, jer putuju u suprotnom smjeru od toka otopine. Međutim, i električki nenabijene čestice (npr. molekule uree, saharoze ili deoksiriboze) zajedno s otapalom koje ih povlači putovat će prema negativnoj elektrodi. Elektroosmotski tok otapala u mediju može se vizualno pratiti s pomoću električki nenabijenih plavo obojenih molekula dextransa (Bluedextran) koje dodamo otopini u elektroforetskoj ćeliji.

U elektroforezi u gelu poliakrilamida i agaroze nosač djeluje i kao molekularno sito. Molekularno sito, veličinom pora, različito utječe na putovanje čestica, ovisno o radijusu (veličini) čestica.

Dakle, mnogi i različiti čimbenici utječu na migraciju čestica u elektroforezi, što je rezultiralo razvojem velikog broja različitih tehnika elektroforeze.

Nastoji se iskoristi jedan ili više čimbenika za što brže, što potpunije i bolje razdvajanje molekulskih vrsta sadržanih u analitu. Izbor metode ovisi o prirodi analita.

Metode elektroforeze primjenjuju se u kvantitativnoj analizi supstancija ili njihovih smjesa, u kontroli čistoće supstancija i u preparativne svrhe. Primjenjuju se u analizi koloida i cijelih bioloških stanica, u analizi proteina, nukleinskih kiselina, peptida, aminokiselina, organskih kiselina i baza, u analizi lijekova, pesticida i anorganskih aniona i kationa, dakle svih molekulskih vrsta koje imaju električni naboj.

Najvažnije tehnike elektroforeze opisane su u nastavku.

2. ELEKTROFOREZA U SLOBODNOJ OTOPINI

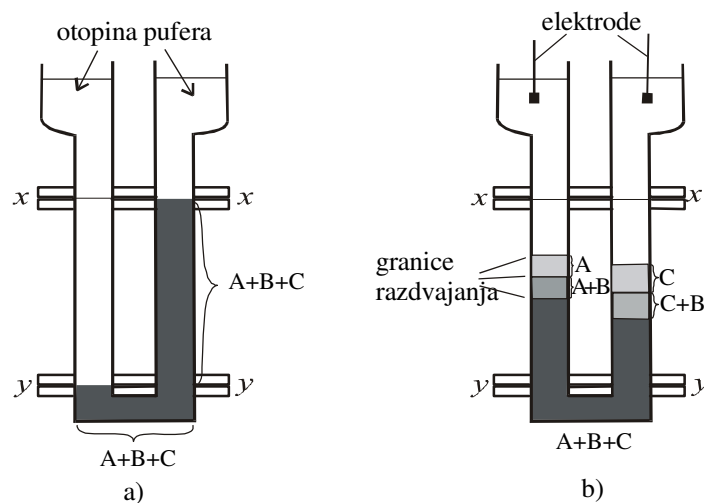
2.1. Elektroforeza pomičnih granica

Razdvajanje ionskih vrsta iz otopine analita može se učiniti tako da se uspostavi migracija iona iz otopine analita u drugu otopinu, koja je u izravnom kontaktu s otopinom analita. Putujući različitim brzinama kroz drugu otopinu ionske vrste iz analita razdvajaju se. Razdvajanje možemo uočiti praćenjem pomicanja granica stupca otopina pojedinih ionskih vrsta. Tu metodu elektroforeze u otopini (eng. moving boundary electrophoresis) razvio je Tiselius¹, rabeći je u razdvajanju proteina. Način provedbe metode vidi se na slici 2.1., na kojoj je prikazana skica tzv. Tiseliusove ćelije.

Ćelija, u obliku U cijevi, ima tri sekcije koje se mogu klizati uz ravnine $x-x$ i $y-y$ i neovisno puniti elektrolitnom otopinom (otopina pufera) i otopinom analita. Tako se mogu ostvariti oštre granice između čiste otopine pufera i otopine analita. Presjek U-cijevi kvadrat je (ćelija je načinjena lijepljenjem staklenih ili kvarcnih pločica). Mala širina kanala ćelije (3 mm) onemogućava konvekciju otopine, a veća dubina (25 mm) osigurava dovoljno veliki optički put za detekciju pomicanja granica putujućih čestica uzduž središnjeg, vertikalnog, dijela ćelije.

U ispitivanju otopina ionskih vrsta, od kojih su neke pozitivnog a druge negativnog naboja, otopinom analita puni se samo donja sekcija ćelije. Pod utjecajem električnog polja pozitivne čestice putuju u jednom smjeru, a negativne u drugom, pa se pomicanje njihovih granica može pratiti u jednoj odnosno drugoj vertikalnoj cijevi središnjega dijela ćelije. Imaju li sve čestice isti naboj, otopinom analita puni se donja sekcija i jedna cijev središnje sekcije. Na slici je pokazano razdvajanje triju vrsta makromolekula (A, B, C) istovrsnog naboja, od kojih najveću električnu pokretljivost imaju čestice tvari A, manju tvari B, a najmanju tvari C. Pod učinkom električnog polja najvećom brzinom putuju čestice tvari A i tako se izdvajaju iz smjese u lijevoj cijevi centralne sekcije ćelije. Najsporije migriraju čestice tvari C i one se, zaostajanjem, odvoje iz smjese u desnoj cijevi centralne sekcije.

¹ A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, **33** (1937) 524.



Slika 2.1. Shematski prikaz ćelije za elektroforezu u slobodnoj otopini prema Tiseliusu. a) ćelija napunjena otopinom pufera i otopinom analita, b) isto nakon elektroforeze

Mjeri se brzina pomicanja granica između otopina različitog sastava s obzirom na sadržane makromolekulske ione. Izvorno je pomicanje granica praćeno mjerenjem indeksa loma odnosno registracijom gradijenta indeksa loma između čiste otopine i otopina s makromolekulama. Mjerenjem brzina pomicanja granica kroz otopinu pufera utvrđuje se elektroforetska pokretljivost odnosno elektroforetska obilježja pojedine molekulske vrste. Uz to, međusobno razdvojeni sastojci analita mogu se izvaditi iz ćelije s pomoću pipete s kapilarnim vrškom. Tako se u opisanom primjeru iz lijeve vertikalne cijevi može izvaditi otopina u kojoj je tvar A, a iz desne otopina s tvari C. Ispod sloja otopine s česticama tvari C nalazi se sloj otopine u kojoj su čestice tvari B i C. Iz te otopine čista tvar B može se dobiti ponovljenim postupkom elektroforeze s otopinom koja sadrži tvari B i C, izvađenom pipetom iz elektroforetske ćelije. Tako se mogu izolirati molekulske vrste i slijedno koristiti za određivanje njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava.

Bolje razdvajanje granica otopina, u opisanoj ćeliji, može se učiniti tako da tijekom elektroforeze kroz ćeliju kontinuirano protječe čista otopina pufera, prikladnom brzinom. Tok otopine pufera utječe na brzinu pomicanja granica. Učinak usporavanja putovanja molekulskih iona, protjecanjem otopine pufera, veći je za čestice manje brzine nego za čestice veće brzine. Tako se povećavaju područja otopina s razdvojenim makromolekulskim ionima. Električno polje kroz ćeliju uspostavljeno je s pomoću dviju elektroda srebro - srebrov klorid. Pri uporabi kovinske elektrode drugog reda ne dolazi do elektrolize vode i razvijanja plinova koji mogu dodatno

povećati konvekciju otopine u ćeliji. U većini metoda rabe se kovinske inertne elektrode, najčešće od platine.

Opisana metoda elektroforeze u slobodnoj otopini, primijenjena u ispitivanju bjelančevina znatno je pridonijela razvoju biokemije. (Za taj rad A. Tiselius 1948. g. dobio je Nobelovu nagradu.) Međutim, zbog eksperimentalnih problema, koji nastaju zbog miješanja otopine u stupcu, ta metoda ima ograničenu primjenu. Zbog termalne konvekcije miješaju se granice otopina u kojima su razdvojene molekulske vrste. Konvekcija nastaje zbog zagrijavanja otopine u ćeliji. Naime, zbog električnog otpora otopine kroz koju protječe električna struja dio električne energije pretvara se u toplinu. Zato u stupcu otopine, koji nije ravnomjerno hlađen, nastaje temperaturni gradijent i gradijent gustoće, što uzrokuje miješanje otopine u ćeliji. Miješanje nastaje i zbog mehaničke vibracije elektroforetske ćelije. Sve to onemogućuje detekciju granica otopina pojedine vrste čestica u stupcu otopine, napose kad analit sadrži velik broj različitih vrsta molekulskih iona. Uz probleme miješanja, za detekciju pomičnih granica potreban je složeni optički detektor, čime se dodatno ograničava šira primjena te metode elektroforeze u slobodnoj otopini.

2.2. Elektroforeza u protočnoj otopini

Drugi način razdvajanja električki nabijenih čestica u slobodnoj otopini jest postupak u kojem se razdvajanje provodi u otopini pufera koji kontinuirano protječe između elektroda ćelije². Mlaz elektrolitne otopine, laminarno, u tankom sloju, protječe između dviju, hlađenih, staklenih ploča (500 mm × 100 mm), razmaknutih međusobno 0,5 do 1 mm. Okomito na smjer protoka otopine uspostavlja se električno polje jakosti od 100 do 150 V cm⁻¹ kojim se, temeljem razlika u električnom naboju, razdvajaju električki nabijene čestice analita. Otopina odnosno suspenzija analita uštrcava se kontinuirano tankim mlazom u protočnu otopinu, i to na strani ulaska elektrolitne otopine (najčešće je to otopina pufera) u ćeliju. Tok elektrolitne otopine pokreće se s pomoću crpke.

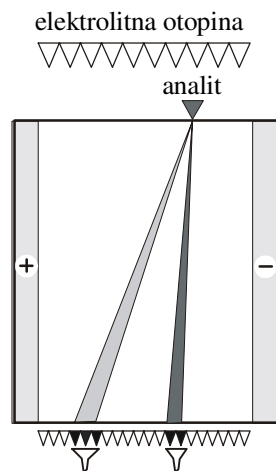
Električki nabijene čestice iz analita nosi struja elektrolitne otopine prema drugoj strani ćelije. Međutim, tijekom prolaza kroz ćeliju na čestice djeluje i električna sila, i to okomito na smjer toka otopine.

² K. Hannig, *Electrophoresis*, **3** (1982) 235

H. Wagner, R. Kuhn, S. Hofstetter, u: H. Wagner, E. Blasius, Ed. *Praxis der elektroforetischen Trennmethoden*, Springer Verlag, Heidelberg (1989) 223.

Budući da su smjer i jakost električne sile ovisni o predznaku i količini naboja, električki nabijene čestice analita tijekom protoka razdvajaju se i tako razdvojene izlaze iz ćelije. Prostorni oblik koji zauzimaju čestice, tijekom razdvajanja, u sloju protočne otopine, ima zbog 1difuzije čestica oblik uske piramide s bazom na izlazu iz ćelije (slika 2.2.).

Primjenom te metode mogu se učiniti razdvajanja topljivih ionskih vrsta, ali i razdvajanja čvrstih odnosno polučvrstih, netopljivih, mikročestica odnosno koloida. Rabi se u identifikaciji, pročišćavanju i izolaciji organela i membrana bioloških stanica, u razdvajanju cijelih bioloških stanica, kao što su eritrociti, leukociti, stanice tkiva. Naime, prisutnost karboksilnih, sulfatnih, fosfatnih, amino i drugih električki nabijenih skupina uzrokuje električni naboj na površini biološke stanici, a time i određeni zeta (.) potencijal koji uzrokuje migraciju u električnom polju. Budući da se i najmanje razlike u površinskom električnom naboju čestica mogu iskoristiti za razdvajanje čestica, ta metoda vrlo je učinkovita.



Slika 2.2. Shematski prikaz ćelije za elektroforezu u protočnoj otopini

Elektroforetske ćelije za razdvajanje u protočnoj otopini mogu biti različitih dimenzija. Za razdvajanje bioloških stanica rabe se ćelije od kvarcnog stakla ($30 \times 18 \times 0,35$ mm), u kojima se tok razdvajanja može pratiti promatranjem s pomoću mikroskopa.

Elektroforeza u kapilari ispunjenoj čistom otopinom elektrolita samo je jedna od metoda elektroforeze u kapilari. S obzirom na raznovrsnost i brojnost te posebnosti u načinu izvođenja, metode elektroforeze u kapilari opisane su u posebnoj poglavlju (vidi poglavlje 12.).

3. ELEKTROFOREZA U OTOPINI NA NOSAČU

3.1. Elektroforeza na čvrstom nosaču

Nedostatci u metodama elektroforeze u slobodnoj otopini potječu poglavito od konvekcije otopine u kojoj se čini elektroforetsko razdvajanje električki nabijenih čestica. Taj učinak može se znatno smanjiti ako otopinu stabiliziramo na čvrstom ili polučvrstom (želatinoznom) nosaču. Kao stabilizirajući mediji rabe se papir, celulozni acetat, fino usitnjena krutina ili gel od poliakrilamida, agaroze ili škroba. Papir kao nosač otopine u elektroforezi, premda prije rabljen u separaciji proteina i drugih makromolekula, danas se rijetko rabi. Papir nema jednoličnu veličinu pora, a mnoge makromolekule, osobito proteini, adsorbiraju se na površinu papira. Relativno mala moć upijanja otopine uzrokuje i mali kapacitet prijema analita. Danas se još rabi u separaciji manjih molekula, kao što su aminokiseline, peptidi i nukleotidi. Membrana celuloznog acetata ima veću homogenost pora nego papir i na njoj se proteini slabije adsorbiraju. Zbog toga se postiže bolja rezolucija razdvajanja od one na papiru. Celulozni acetat ima velike pore i u separaciji makromolekula nema ulogu molekularnog sita. Tako se razdvajanje makromolekulskih iona temelji isključivo na gustoći električnog naboja iona.

Postupak razdvajanja provodi se tako da se vrpca membrane položi na horizontalni nosač između dvije posudice s otopinom pufera u koje su uronjeni krajevi vrpce. Na vrpce se nanese mali volumen otopina analita i s pomoću kovinskih elektroda uronjenih u otopine pufera uspostavlja se električno polje i čini elektroseparator. Tijekom razdvajanja nije potrebno hladiti membranu. Ta metoda rutinski se rabi u kliničkoj analizi, npr. u analizi seruma i izoenzima. Budući da membrana celuloznog acetata ima velike pore koje omogućuju difuziju makromolekula, u razdvajanju se postiže slabija rezolucija i manja osjetljivost detekcije nego na poliakrilamidnom gelu.

Silikagel kao čvrsti nosač u elektroforezi rabi se u obliku tankog sloja u plitici elektrolitski povezanoj s posudicama s pufferom. Rabi se u analizi polisaharida velike molekulske mase i lipopolisaharida, koji zbog veličine čestica mogu začepiti pore u poliakrilamidnom gelu.

Budući da su spomenute nosače otopine u elektroforezi danas praktično potpuno istisnuli nosači sa strukturom gela, načini provođenja elektroforeze, detekcija razdvojenih makromolekulskih vrsta te njihova izolacija bit će opisani u primjerima elektroforeze u gelu.

3.2. Elektroforeza u gelu

Uporabom gela kao nosača elektrolitne otopine omogućena je kontrola veličine pora kroz koje migriraju molekularni ioni i na taj način kontrola učinaka molekularnog sita u razdvajanju makromolekula u elektroforezi.

Gel zapravo čini prostorno umrežene molekule u kojem su šupljine, pore, ispunjene elektrolitnom otopinom, najčešće otopinom pufera.

Danas se najčešće rabi poliakrilamidni gel, manje gel od agaroze i vrlo rijetko gel od škroba.

Analit se u gel unosi tako da se mali volumen otopine analita, mikropipetom, unese nadsvodno na štap gela ili u jažice na ploči gela.

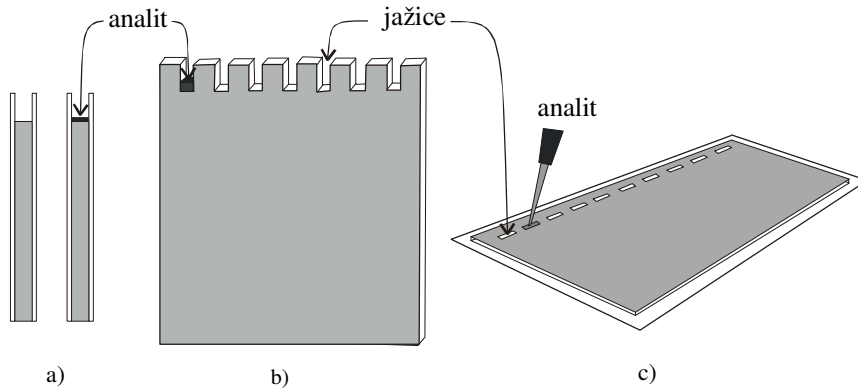
U ploči gela može se učiniti veći broj jažica i tako istovremeno razdvajati veći broj uzoraka istog analita ili veći broj različitih analita.

Makromolekulski ioni iz otopine analita pod učinkom električnog polja migriraju kroz gel različitim brzinama i tako se razdvajaju.

Ako su pore gela velike u odnosu na veličinu makromolekula u analitu, molekularni ioni putovati će kroz gel bez zapreke, kao u slobodnoj otopini. U tom slučaju makromolekulski ioni analita putuju kao paketići istovrsnih čestica. Prostorni geometrijski oblik putujućih paketića preslika je geometrijskog oblika otopine analita. U gelu u obliku štapa to su valjci visine jednake visini sloja otopine u cijevi u kojoj se nalazi gel. U ploči gela to se kocke ili kvadri ili valjci ako su jažice na horizontalnoj ploči gela učinjene u obliku valjka. Promatrano bočno ti volumeni razdvojenih makromolekula izgledaju kao uske zone, odnosno vrpce. Govorimo, stoga, o *elektroforezi putujućih zona*, odnosno *vrpci*. Budući da je migracijski put ograničen (obično 10 cm), bolja rezolucija razdvajanja ostvaruje se, osobito ako analit sadrži velik broj različitih molekularskih vrsta, kada su te zone uske pa se međusobno ne preklapaju. Širina zona ovisi o visini sloja otopine u jažici. Što je sloj otopine analita u jažici manji, to su zone razdvajanja uže. Dakle, poželjno je elektroforezu činiti malim volumenom što koncentriranijeg analita. Međutim, to se često, zbog slabe topljivosti makromolekula, ne može učiniti.

Zato se, da bi se ostvarile vrlo uske zone separacije, primjenjuje postupak u kojem se makromolekule iz analita prije ulaska u separacijski gel *nagomilavaju* (eng. stacking) u vrlo tanki (uski) sloj. Tako koncentrirane ulaze u separacijski gel (vidi poslije).

Na slici 3.1. pokazani se geometrijski oblici gela rabljeni u elektroforetskoj separaciji.



Slika 3.1. Geometrijski oblici gela u elektroforezi: a) gel u obliku štapa (cilindrični gel), b) gel u obliku vertikalne ploče, c) horizontalna ploča gela na staklenoj ploči ili plastičnoj foliji

Uz rečeno, na širinu zona utječe i difuzija makromolekula iz zone u susjedni prostor, zbog difuzije zone postaju šire što je trajanje razdvajanja dulje. U gelu sa svojstvom molekularnog sita i taj će učinak utjecati na širinu separiranih zona.

Jažice na horizontalnoj ploči gela mogu se učiniti na jednom kraju gela (kao na slici) ili u sredini ploče gela. Iz analita u jažici u sredini ploče gela može se učiniti razdvajanje i električki pozitivnih i negativnih sastojaka jer kroz separacijski gel mogu putovati i prema anodi i prema katodi. U gelu u obliku valjka i vertikalne ploče mogu se u jednom pokusu razdvajati samo sastojci istog električnog naboja. Sastojci suprotnog naboja razdvajaju se u drugom nezavisnom pokusu.

Budući da je većina makromolekulskih vrsta koje razdvajamo u elektroforezi bezbojna, njihovo putovanje kroz gel ne može se vizualno izravno pratiti. Da bi se odredilo trajanje separacije, u otopinu analita dodaje se bojilo kojem je elektroforetska pokretljivost veća od elektroforetske pokretljivosti sastojaka analita. Bojilo putuje kroz gel u vlastitoj zoni ispred zona sastojaka analita. Budući da putovanje bojila kroz gel možemo vizualno pratiti, postupak elektroforeze prekidamo kad zona bojila dostigne (suprotnu) granicu separacijskoga gela. Na taj način određuje se trajanje elektroforeze.

U razdvajanju proteina koji imaju negativni naboj i migriraju prema pozitivnoj elektrodi kao bojila rabe se bromfenol plavo, ksilencianol i narančasto G. U razdvajanju električki pozitivnih makromolekula koje u elektroforezi putuju prema negativnoj elektrodi kao pokazno bojilo rabe se bromkrezol zeleno, pironin Y ili metilensko plavo.

3.2.1. Škrobni gel

Škrobni gel čini se od hidrolizata škroba krumpira¹, koji se otapa u vrućoj vodi i lijeva u ploče debljine 5 do 10 mm. Hlađenjem otopine nastaje gel. Veličina pora može se mijenjati promjenom koncentracije škroba u otopini.

Međutim škrob, kao prirodni (nativni) produkt, ima nestalni omjer količine amilaze i amilopektina od kojih je građen. To uzrokuje slabu ponovljivost svojstava gela. Gel ima slaba mehanička svojstva.

Uporabom škrobnoga gela učinjen je veliki napredak u rezoluciji razdvajanja makromolekula u odnosu na elektroforezu na papiru. Međutim, danas se praktično malo rabi zbog neusporedivih prednosti koje pruža gel od poliakrilamida.

3.2.2. Agarozni gel

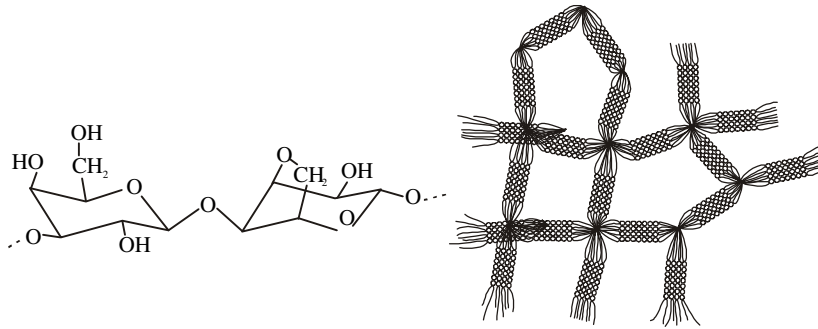
Agaroz je visoko pročišćeni prirodni polisaharid koji se dobiva iz agara.

Agar, dobiven iz morskih trava, prva je rabljena tvar kojom se sprječavala konvekcija otopine u elektroforezi. Uporabom gela od agara ostvarena je bolja separacija proteina od separacije učinjene u slobodnoj otopini. Međutim, agar uz agarozu sadrži i druge komponente, koje imaju sulfatne i karboksilne skupine, koje u neutralnom i lužnatom mediju disociraju i tako uzrokuju elektroosmotski tok otapala prema negativnoj elektrodi. Osim toga, neki proteini vežu se na agar.

Pročišćavanjem agara, navlastito uklanjanjem agaropektina, dobiva se agaroz. Na tržištu je više vrsta agaroze različite čistoće. Razlikuju se u temperaturi tališta (od 35 °C do 95 °C), razini elektroosmoze, čvrstoći i optičkoj prozirnosti gela. Za primjenu u elektroforezi agaroz treba imati što nižu razinu elektroosmoze i visoku optičku prozirnost gela.

Gel od agaroze nastaje hlađenjem vodene otopine agaroze učinjene otapanjem agaroze (bijeli prah) u kipućoj vodi. Pri hlađenju na određenim dijelovima jedinica agaroze nastaju odsječci s dvostrukom uzvojnicom. Time se umrežavaju molekule i nastaju vlaknaste polimerne strukture. Između polimernih vlakana, u porama, zadržava se voda odnosno otopina elektrolita i tako nastaje gel. Veličina pora u gelu ovisi o koncentraciji agaroze.

¹ O. Smithies, *Biochem. J.*, **61** (1955) 629.



Slika 3.2. Kemijska struktura jedinica agaroze i struktura polimera u gelu

Premda je primjena gela od agaroze potisnuta uporabom poliakrilamidnog gela, u dva je područja gel od agaroze nezamjenjiv. To su primjena u imunoelektroforezi (vidi kasnije) i u separaciji vrlo velikih molekula kojima je hidrodinamički radijus veći od 10 nm.

3.2.3. Poliakrilamidni gel

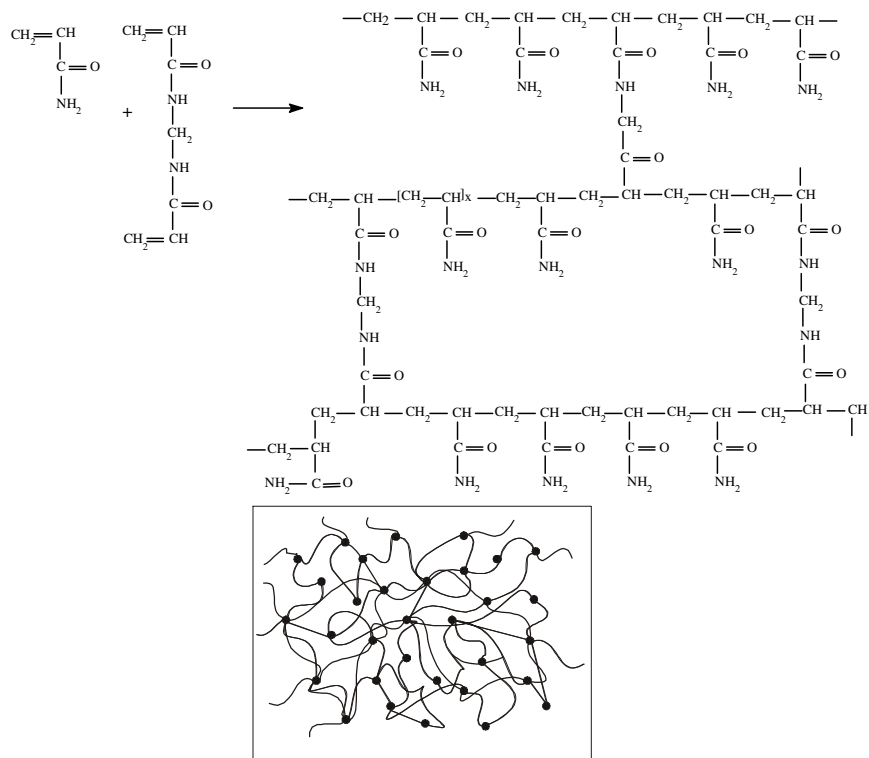
U elektroforezi se danas najčešće rabi gel od poliakrilamida. Prvi je put primijenjen¹ 1960. g. Kemijski je inertan, ima jednoličnu strukturu i homogena svojstva i može se brzo i jednostavno prirediti.

Prostorna struktura poliakrilamidnog gela može se kontrolirano modificirati i tako prilagoditi željenoj primjeni. Poliakrilamidni gel nastaje vinilnom polimerizacijom u otopini, akrilamidnog monomera $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, u duge poliakrilamidne lance i umreživanjem tih lanaca s pomoću otopine bifunkcijskog komonomera. Kao umreživalo najčešće se rabi N,N'-metilen-bis-akrilamid (akronim: Bis) $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Umreživalo reagira s funkcijskim skupinama u prostoru nepravilno orijentiranih polimerizacijom nastalih lanaca poliakrilamida, međusobno ih kovalentno povezuje pa nastaje trodimenzijska struktura gela, kao što pokazuje slika 3.3.

Koncentracija akrilamida određuje duljinu polimernih lanaca, a koncentracija umreživala stupanj kovalentne umreženosti.

Oba ta čimbenika određuju fizička svojstva nastalog gela, tj. njegovu gustoću, elastičnost, čvrstoću i veličinu pora unutar gela.

¹ S. Raymond, V. J. Wang, *Anal. Biochem.* **1** (1960) 39.



Slika 3.3. Kemijska struktura poliakrilamidnoga gela nastalog kopolimerizacijom monomera akrilamida s N,N'-metilen-bis-akrilamidom kao umreživalom i prostorni raspored polimernih niti kovalentno vezanih umreživalom

Uobičajen način opisivanja svojstava gela predložio je Hjertén², u kojem se ukupan sadržaj krutine, tj. monomera i komonomera, tj. akrilamida i umreživala (Bis) iskazuje veličinom T^3 , tj. u gramima krutine u 100 mL otopine, a veličinom C maseni udio umreživala u odnosu na ukupnu masu monomera i komonomera, tj. u masenim postotcima.

²S. Hjertén, *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* **1** (1962) 147.

³ Veličina T iskazana je kao ukupna masena koncentracija (g/100 mL), i u literaturi o elektroforezi gotovo uvijek iskazuje se kao $T\%$ (w/V), što nije korektno, jer su maseni ili volumni udjeli iskazani kao postotci bezdimenzijske veličine. Zato će se veličina T iskazivati u g/100 mL, a ne u postotcima.

$$T = \frac{(a+b) \times 100}{V} \quad C = \frac{b \times 100}{a+b} [\%]$$

gdje su: a - masa akrilamida u gramima, b - masa metilen-bis-akrilamida u g i V - volumen otopine u mL.

Kao umreživala za poliakrilamidni gel rabe se i drugi bifunkcijski komonomeri, kao što su etilendiakrilat (EDIA), N,N'-dialiltartardiamid (DATD), N,N'-bisakrilcisteamin (BAC) i N,N'-(1,2-dihidroksietilen) bisakrilamid (DHEBA), koji se rabe u specifičnim primjenama. Tako N,N'-bisakrilcisteamin (BAC) sadrži disulfidne veze koje se mogu tiolnim reagensima cijepati. Zato se poliakrilamidni gel umrežen s BAC-om može nakon elektroforeze prevesti u topljivi oblik i na taj se način mogu razdvojene molekulske vrste kvalitativno i kvantitativno analizirati.

Vinilna polimerizacija akrilamida u vodenoj otopini teče mehanizmom slobodnog radikala i mora se inicirati (pobuditi) kemijski ili fotokemijski. Dodatkom katalizatora ubrzava se reakcija polimerizacije. Kao peroksidni inicijator (pobudnik) rabi se najčešće amonij-persulfat, iz kojeg homolitičkim cijepanjem nastaju slobodni radikali kisika koji iniciraju reakciju polimerizacije. Reakcija polimerizacije ubrzava se katalitičkim djelovanjem baze. Kao katalizator primjenjuje se kvarterni amin; N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED).

Pri fotokemijskoj polimerizaciji kao inicijator se rabi riboflavin uz djelovanje ultravioletnog svjetla većih valnih duljina. Fotokemijska polimerizacija odvija se fotodekompozicijom riboflavina na leukoflavin, koji se reoksidira tragovima kisika u vodenoj otopini, pri čemu se stvaraju kisikovi slobodni radikali, koji iniciraju reakciju polimerizacije. Kao katalizator i pri fotokemijskoj polimerizaciji rabi se TEMED.

Za razliku od kemijske inicijacije amonijevim persulfatom pri fotokemijskoj polimerizaciji u otopini moraju biti prisutni tragovi iz zraka otopljenog kisika. Otopljeni atmosferski kisik čistač je slobodnih radikala i njegova prevelika prisutnost u otopinama za pripremu gela inhibira reakciju polimerizacije, kako uz kemijsku tako i uz fotokemijsku inicijaciju. Zato se otopinama monomera prije miješanja i polimerizacije mora smanjiti količina otopljenog kisika. To se čini provođenjem inertnog plina kroz otopine ili sniženjem tlaka zraka iznad otopine vakuumiranjem odnosno radom u inertoj atmosferi.

Fotokemijska polimerizacija rabi se u pripravi gela s elektrolitom male ionske jakosti pošto je gelu dodaju vrlo male količine riboflavina (0,5 mg na 100 mL otopine) i također u ispitivanju proteina osjetljivih na amonijev persulfat odnosno produkte peroksidnog inicijatora.

Polimerizacija monomera može se inicirati i svjetlom, zato otopinu monomera treba držati u tamnim bocama podalje od izvora svjetla.

Veličina pora poliakrilamidnog gela određena je veličinama T i C . Utvrđeno je da, uz konstantnu vrijednost C , veličina pora obratno je razmjerna ukupnoj koncentraciji monomera, tj. vrijednosti T . Također je pokazano da se za bilo koju vrijednost T minimalna veličina pora postiže uz $C = 5 \%$, a uz manju i veću vrijednost C veličina pora raste. Za tipične vrijednosti $T = 5 \text{ g/100 mL}$ i $C = 5 \%$ veličina pora poliakrilamidnog gela jest oko 20 nm. Uz velike vrijednosti C (30-50 %) brzina polimerizacije smanjuje se, nastali gel grudast je i veličina mu je pora od 500-600 nm. Grudice gela dovoljno su velike te rasipaju svjetlost, stoga je takav gel neproziran.

Optimalna temperatura pripreme gela jest 25-30 °C.

Budući da se polimerizacijom oslobađa toplina, zbog posljedične konvekcije mogu nastati nepravilnosti u strukturi gela. Mogu i popucati cijevi odnosno ploče kalupa u kojima se stvara gel. Pretjerano zagrijavanje može se izbjeći prikladnom koncentracijom inicijatora i katalizatora, takvom da vrijeme polimerizacije bude od 20 do 60 minuta.

Monomeri su toksični. Apsorpcijom kroz kožu iritiraju kožu odnosno udisanjem čestica akrilamidne prašine uzrokuje poremećaje centralnog živčanog sustava. Formirani poliakrilni gel relativno je netoksičan i siguran za rukovanje. Ipak se preporučuje uporaba zaštitnih rukavica i izbjegavanje pretjerano dugog kontakta.

4. ELEKTROFOREZA U HOMOGENOM POLIAKRILAMIDNOM GELU UZ HOMOGENI PUFER

Elektroforeza uz uporabu poliakrilamidnog gela (akronim PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis) provodi se na više različitih načina s obzirom na strukturu (homogenost pora) gela, vrste rabljenog pufera, prethodnu obradu analita itd. Jedna od metoda jest elektroforeza s homogenim poliakrilamidnim gelom i homogenim puferom. U toj metodi rabi se gel s homogenom, jednoličnom, veličinom pora i uz primjenu jednog pufera. Primjenjuje se za separaciju makromolekula iz smjesa: proteina, lipoproteina, glikoproteina, mukopolisaharida, peptida, nukleinskih kiselina i drugih. Pri tom je potrebno vrlo malo, samo nekoliko mikrolitara analita.

4.1. Električni naboj elektroforetskih jedinki

Proteini su amfoterne molekulske vrste, zapravo zwitter ioni koje sadržavaju kationska i anionska središta, odnosno kisele i bazne funkcijske skupine, pa ionizacijom u otopini postižu pozitivni ili negativni električni naboj. Električni naboj proteina posljedica je ionizacije karboksilnih skupina ($-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$) odnosno amino skupina ($-\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3^+$) pokrajnih lanaca bjelančevina.

Te ionizacije ovise o pH okolne otopine pa će naboj čestice proteina ovisiti o pH okolnog elektrolita te o broju i tipu aminokiselina koje nose karboksilne odnosno amino skupine. Naboj im ovisi i o sadržaju električki nabijenih i nenabijenih šećera, sulfhidrilnom umrežavanju i blokiranju amino skupina i karboksilnih skupina.

Pojedina vrsta proteina ima, pri određenom pH, neto električni naboj nula. Pri tom pH na čestici proteina postoji jednaki broj ionizacijom stvorenih pozitivnih i negativnih naboja pa je efektivni električni naboj nula. To je tzv. *izoelektrična točka* proteina, pI, karakteristična za svaki protein. Tako je pI humanog hemoglobina pri pH = 7,07, a β-laktoglobina pri pH = 5,34. U otopini kojoj je pH veći od pI, čestica proteina ima neto negativni električni naboj i putovat će prema pozitivnoj elektrodi elektroforetske

ćelije, a pri pH manjem od pI imat će pozitivni naboj i putovat će prema negativnoj elektrodi ćelije.

Nukleinske kiseline nisu amfoterne. Imaju negativni električni naboj pri svim pH vrijednostima rabljenim u elektroforezi, i to zbog jakog kiselog obilježja fosfatnih skupina na čestici nukleinske kiseline.

4.2. Kontrola električnog naboja elektroforetskih jedinki

Budući da električni naboj amfoternih molekulskih vrsta izravno ovisi o pH elektrolitne otopine u kojoj se čini razdvajanje makromolekulskih iona, prijeko je potrebno održavati stabilni pH otopine u separacijskom gelu. To se čini uporabom otopine pufera u kojem se čini i polimerizacija gela. U elektroforezi u poliakrilamidnom gelu primjenjuju se puferi kojima je pH od 2,0 do 11,0.

Za svaku pojedinu vrstu analita treba obaviti ispitivanje elektroforetske separacije pri različitim vrijednostima pH i tako odabrati optimalni pH za učinkovito elektroforetsko razdvajanje. Potrebno je utvrditi raspadaju li se ili talože, pri određenom pH, neki sastojci ispitivanog analita.

Budući da pri $\text{pH} < 3$ odnosno $\text{pH} > 10$ može doći do deamidacije i hidrolize proteina, i taj čimbenik treba uzeti u obzir pri izboru pH za elektroforetsko razdvajanje. Budući da se na elektrodama elektroforetske ćelije zbog elektrolize vode generiraju H^+ odnosno OH^- ioni, i otopine u komorama za elektrode odnosno kontaktne vrpce moraju sadržavati pufer. U preliminarnom ispitivanju nepoznatih analita poželjno je najprije raditi pri visokim pH-vrijednostima, pri kojima sve čestice ispitivanog uzorka imaju negativni električni naboj te sve putuju u jednom smjeru, tj. prema pozitivnoj elektrodi. Nakon toga se pri manjim pH vrijednostima utvrde uvjeti najboljeg razdvajanja. Bazni proteini, npr. histoni, najbolje se razdvajaju pri nižim pH-vrijednostima.

Većina proteina, koji su slabe kiseline, i kojima su izoelektrične točke u granicama pH od 4 do 7,5, najbolje će se razdvajati u lužnatom mediju pri pH od 8 do 9.

Stabilnost pH poliakrilamidnog gela postiže se odgovarajućim kapacitetom rabljenog pufera. Pri tom ionska jakost pufera ne smije biti prevelika.

Tijekom elektroforeze ioni pufera migriraju kroz gel, ovisno o naboju, prema pozitivnoj ili negativnoj elektrodi i tako sudjeluju u prijenosu električne struje, a time i zagrijavanju gela. Zato ionska jakost pufera mora biti što je moguće manja ali ipak dovoljna da osigura stabilnost pH u gelu tijekom migracije ionskih vrsta analita. Osim toga velika koncentracija iona, mehanizmom isoljavanja, smanjuje topljivost molekulskih vrsta u analitu.

Međutim, uz višu ionsku jakost smanjuje se brzina difuzije čestica pa se tako povećava rezolucija razdvajanja. Veća ionska jakost uzrokuje manju električnu otpornost gela a time, i uz određeni radni napon, jaču električnu struju kroz gel. Uz jaču struju kroz gel oslobađa se više topline. Međutim, uklanja li se oslobođena toplina na adekvatan način, tj. ako se spriječi pregrijavanje gela tijekom razdvajanja, uz višu ionsku jakost medija postiže se bolja rezolucija razdvajanja s oštrijim (užim) zonama razdvojenih molekularnih vrsta.

Ako se ne može postići adekvatno hlađenje gela, da se gel ne bi pregrijao, treba primijeniti niži radni napon. Međutim, uz niži napon vrijeme elektroforeze dulje je. Predugo vrijeme elektroforeze uzrokuje viši stupanj denaturacije makromolekula analita i uz to širenje vrpce zbog duljeg vremena difuzije čestica. Zato se u preliminarnim ispitivanjima moraju utvrditi optimalni uvjeti elektroforeze za svaku vrstu analita.

U elektroforezi s poliakrilamidnim gelom s homogenim pH kao osnovne supstancije za pripremu pufera rabe se slabe kiseline odnosno slabe baze.

Za područje $2,6 \leq \text{pH} \leq 3,6$ rabi se limunska kiselina kojoj je $\text{pK}_a = 3,13$, dakle, otopina koja sadrži limunsku kiselinu i njezinu konjugiranu bazu, tj. citrat ion u jednakoj množinskoj koncentraciji ima pH 3,13. Promjenom odnosa koncentracije kiseline i njezine konjugirane baze neutralizacijom otopine limunske kiseline s otopinom NaOH ostvaruje se potreban pH pufera. Što je veća koncentracija kiseline i njezine konjugirane baze, to je veći kapacitet pufera.

Mravlja (metan) kiselina s $\text{pK}_a = 3,75$, i dijelom neutralizirana otopinom NaOH, rabi se za pufer s pH od 3,0 do 4,3.

Octena (etan) kiselina s $\text{pK}_a = 4,76$, dijelom neutralizirana s NaOH ili s tris-(hidroksimetil)-aminometan (akronim; tris), rabi se za pufer s pH od 4,0 do 5,5.

Malonska kiselina, $\text{pK}_a = 5,68$, dijelom neutralizirana s NaOH ili trisom, rabi se za pufer s pH od 5,2 do 7,0.

Za pufer s pH od 6,0 do 8,0 primjenjuje se KH_2PO_4 ili NaH_2PO_4 odnosno H_2PO_4^- ion kao kiselina s $\text{pK}_a = 7$ uz dodatak NaOH. Za isto pH područje rabi se Na-dietilbarbiturat (veronal)¹ uz dodatak otopine HCl.

Tris, dijelom neutraliziran otopinom HCl ili 2-aminoocetenom kiselinom (glicin) rabi se za pufer s pH od 7,2 do 9,0.

Boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) uz dodatak HCl ili NaOH rabi se za pufer s pH od 8,5 do 10.

Glicin, dijelom neutraliziran s NaOH, rabi se za pufer s pH od 9,0 do 10,5. NaHCO_3 , tj. HCO_3^- kiselina s $\text{pK}_a = 10,3$ uz dodatak NaOH rabi se za pufer s pH od 9,0 do 11,0.

¹ Uporaba barbiturne kiseline danas se, iz medicinskih razloga, ne preporučuje.

Najčešće su rabljene koncentracije pufera od 0,05 do 0,1 mol/L. Primjenjuju se i koncentracije pufera do 1 mol/L odnosno manje od 0,025 mol/L. Koncentracije pufera iznad 0,5 mol/L rabe se za pripravu jako kiselih pufera. Za pripremu pufera rabe se kiseline koje su slabo ionizirane. Pri niskim pH ravnotežna koncentracija rabljene kiseline malena je. Stoga, da bi se postigla zadovoljavajuća ionska jakost pa time i kapacitet pufera, koncentracija pufera mora biti dovoljno velika.

Treba naglasiti da je ionska jakost pufera veličina koja određuje njegovu električnu vodljivost, to jest ionizirani dio pufera, a ne njegova ukupna količinska koncentracija iskazana u mol/L. Slabo ionizirani pufferi, premda više koncentracije, ne uzrokuju prevelike struje elektroforeze pa se tako ne pregrijava gel.

4.3. Učinak veličine pora

Veličina pora poliakrilamidnog gela utječe, učinkom molekularnog sita, na brzinu migracije molekulskih iona kroz gel, a time i na njihovo razdvajanje.

Svojstva analita upućuju na izbor uvjeta za dobru separaciju. Tako se npr. u ispitivanju visokomolekularnih virusnih proteina i nukleinskih kiselina rabi gel s velikim porama, a to će biti poliakrilamidni gel u kojem je $T < 5$ g/100 mL. Uz velike pore učinak molekularnog sita vrlo je malen. U ispitivanju niskomolekularnih polipeptida ili histona rabi se poliakrilamidni gel u kojem je T od 15 do 20 g/100 mL i viši. Uporabom gela malih pora, zbog učinka molekularnog sita, jače su izražene male razlike u molekulskoj masi ispitivanih čestica. Želimo li da se razdvajanje čini isključivo na razlici u naboju čestica, primijenit ćemo gel velikih pora i u razdvajanju malih molekula.

Pretpostavimo razdvajanje dviju molekulskih vrsta od kojih vrsta manje molekulske mase ima i manji neto električni naboj. Primijenimo li gel velikih pora (manji T), veće molekule, koje imaju i veći naboj, putovat će brže i tako se razdvajati od manjih. Uporabom gela manjih pora (veći T) učinak molekularnog sita bit će veći za velike molekule, koje će putovati sporije. Taj učinak može biti toliki da iznad određene vrijednosti T veće molekule, bez obzira na veći naboj, putuju sporije od manjih molekula s manjim nabojem. Pri određenoj vrijednosti T brzina putovanja i manjih i većih čestica bit će jednaka pa će u elektroseparatori nastati samo jedna zona odnosno vrpca. Dakle postojanje jedne zone odnosno vrpce nije siguran dokaz da u ispitivanom uzorku postoji samo jedna molekulska vrsta. Ako manja čestica ima veći električni naboj, ona će putovati brže od velike i povećanjem koncentracije gela (veći T) povećavat će se razlika u brzini,

zbog jačeg učinka molekularnog sita na veće čestice, i tako pri elektrosepaparaciji nastaju dvije dobro razdvojene zone.

Uporabom poliakrilamidnog gela s vrijednošću T od 3 do 5 g/100 mL postiže se optimalna separacija čestica relativne molekulske mase veće od 100 000, uz T od 5 do 12 g/100 mL za čestice relativne molekulske mase od 20 000 do 150 000, uz T od 10 do 15 g/100 mL za separaciju čestica relativne molekulske mase od 10 000 do 80 000 odnosno s T od 15 g/100 mL i više za separaciju čestica relativne molekulske mase manje od 15 000.

Vrijednost veličine C određuje fizička svojstva gela. Ako je C veći od 10 %, gel je krk i neproziran, a uz C manji od 1 %, gel je ljepljiv i tako neprikladan za manipulaciju. Za postizanje gela optimalnih manipulativnih svojstva preporučuje² se vrijednost C izračunata prema relaciji; $C = 6,5 - 0,3 T$.

Očito je da mnogi čimbenici utječu na elektroforetsko razdvajanje molekulske iona. Međutim, određeni stupanj razdvajanja može se postići u širokom rasponu pH vrijednosti elektrolita, uz različite vrijednosti T i C poliakrilamidnog gela, različitu ionsku jakost i različite električne uvjete elektroforeze te različito trajanje razdvajanja. Optimalni uvjeti razdvajanja utvrđuju se nizom preliminarnih mjerenja uz promjenu čimbenika koji utječu na razdvajanje. Svojstva analita određuju optimalne uvjete razdvajanja sastojaka.

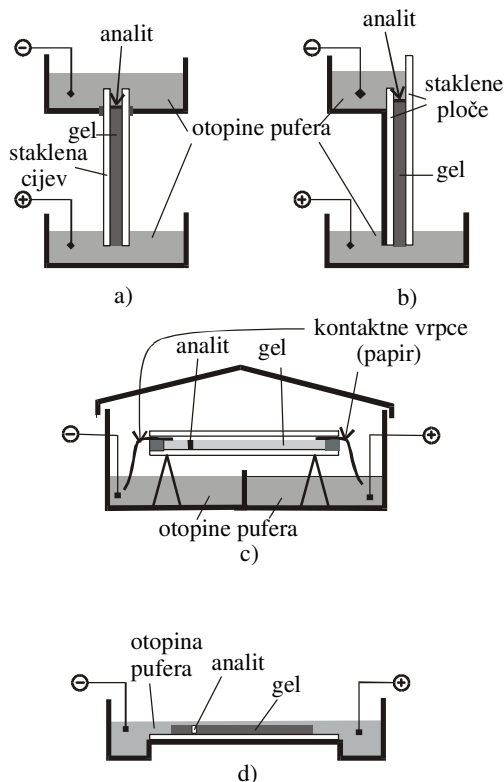
4.4. Naprave za elektroforezu

U elektroforezi s poliakrilamidnim gelom rabe se tri geometrijska oblika gela, i to u obliku horizontalne ploče, vertikalne ploče odnosno vertikalnog valjaka (cilindara). Za elektroforezu u gelu različitog geometrijskog oblika rabe se i različite naprave. Na tržištu se nalaze različite tvornički izrađene naprave za elektroforezu, a mnoge se izrađuju u laboratorijima za specifičnu primjenu. Na slici 4.1. pokazane su skice naprava za elektroforezu u gelu. Svaka od rabljenih naprava odnosno tehnika elektroforeze ima određene prednosti i mane.

Najjednostavnije su naprave za rad s horizontalnom pločom gela. Gel se polaže na hladenu horizontalnu staklenu ili keramičku ploču. Električni kontakt između elektroda i otopine u gelu uspostavlja se s pomoću kontaktnih vrpca (vrlo čisti filtrirni papir), koje su jednim krajem uronjene u otopine pufera u komorama za elektrode a drugim krajem položene na krajeve gela (kao na slici 4.1.c), ili samo polaganjem, na krajeve ploče gela, uskih kontaktnih vrpca namočenih u otopinu pufera, na koje se polažu

² E. G. Richards, J. A. Coll, W. B. Gratzer, *Anal. Biochem.* **12** (1965) 452.

metalne elektrode. Imaju prednost i zbog toga što se iste naprave mogu primijeniti u elektroforezi s drugim nosačima medija (škrob, gel agara, papir ili celulozni acetat) i u drugim metodama elektroforeze (vidi kasnije).



Slika 4.1. Skice naprave za elektroforezu u gelu: a) aparat s gelom u obliku valjka, b) s vertikalnom pločom, c) s horizontalnom pločom, d) s horizontalnom pločom gela uronjenom u pufer

Pri uporabi horizontalne ploče otopina analita unosi se u gel pipetiranjem u urezanu jažicu u gelu ili s pomoću komadića filtrirnoga papira na koji se nakapa izmjereni volumen analita. Papirić natopljen otopinom analita stavlja se na površinu (lice) gela. Prednost je horizontalne ploče što se analit može unijeti na bilo koje mjesto na ploči. Unošenjem ispitivanog uzorka u sredinu ploče može se pratiti migracija prema jednoj i drugoj elektrodi u jednom eksperimentu. Na horizontalnoj ploči može se napraviti veći broj slijednih jažica u koje se mogu unijeti različiti uzorci, ispitati i usporediti pri jednakim elektroforetskim uvjetima. Obavlja li se ispitivanje s istom vrstom uzoraka, nastale jednake vrpce separiranih čestica mogu se ispitati odnosno detektirati različitim tehnikama detekcije.

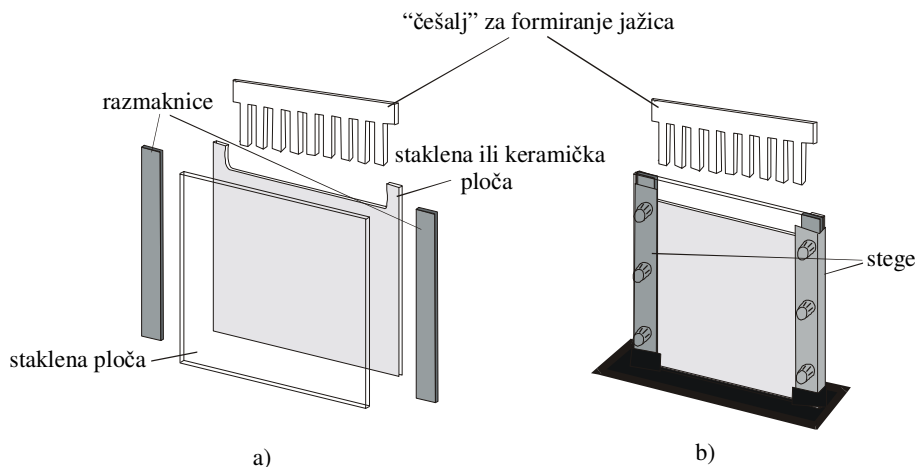
Pri uporabi tehnike s vertikalnom pločom ili valjkom, električni kontakt uspostavlja se preko otopina pufera u gornjoj i donjoj komori za elektrode. Otopina analita nanosi se na jedan kraj ploče ili valjka. Tako se u jednom eksperimentu može odrediti migracija čestica prema samo jednoj od elektroda. Migracija prema drugoj elektrodi može se ispitati u drugom pokusu s obratnim polaritetom elektroda. Kao vertikalne ploče ili valjci lakše se pripremaju gelovi s višefaznim puferima (vidi kasnije). Rezolucija koja se postiže na ploči ili valjku jednaka je. U radu s pločom može se primijeniti veća količina uzorka, zato se ta tehnika rabi u preparativnoj elektroforezi. Primjenjuju se valjci odnosno ploče poliakrilamidnog gela različitih dimenzija (veličina), ovisno o željenom razmaku razdvajanja zona i količini ispitivanog uzorka.

4.5. Priprava gela

Ploče odnosno valjci gela čine se lijevanjem smjese otopina monomera akrilamida i bis-akrilamida, pufera, TEMED-a i amonijeva persulfata u kalupe u kojima se čini polimerizacija. Tako za pripravu 100 ml otopine za polimerizaciju, u kojoj je $T = 10 \text{ g}/100 \text{ mL}$ a $C 5 \%$, treba 9,5 g akrilamida, 0,5 g bisakrilamida, 0,05 ml TEMED-a i 0,05 g amonijeva persulfata. Najprije se pomiješaju potrebni volumeni izvornih otopina monomera i pufera. Deaeriranjem se u otopini smanji sadržaj otopljenog kisika i tada se dodaju potrebni volumeni otopine amonijeva persulfata i TEMED-a. Smjesa se odmah zatim lijeva u kalup.

Za vertikalnu ploču gela smjesa se ulijeva između dvije staklene ploče međusobno odijeljene umetnutim razmaknicama. (slika 4.2.). U gornjem dijelu jedne od ploča urezan je utor koji omogućava elektrolitni kontakt s otopinom pufera gornje komore elektroforetske ćelije. Danas se sve više kao jedna od ploča kalupa rabi keramička ploča. Naime vrste keramika temeljene na aluminijevu oksidu provode toplinu mnogo bolje nego staklo. Na taj način učinkovitije se odvodi toplina, koja se oslobađa pri polimerizaciji odnosno elektroforezi, u okolinu. Veličina staklenih ploča odnosno pripremljenog gela može biti od nekoliko kvadratnih centimetara (lijevanih između mikroskopskih stakala) do nekoliko stotina centimetara kvadratnih. Razmak između staklenih ploča može biti manji od 0,05 mm pa do više od 5 mm. Najčešće se rabe razmaknice (od lucita) debljine od 0,5 do 1,5 mm. Bočne strane i donja strana staklenog kalupa (sendvič) vodonepropusno se zalijepu, obično rastezljivom folijom parafinskog voska (Parafilm[®]) ili rastaljenom 1,5 %-tnom otopinom agara.

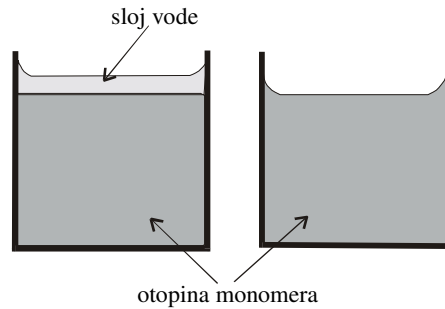
Nakon ulijevanja otopina za polimerizaciju u gornji dio kalupa umeće se plastični (teflon) češalj kojim se u poliakrilamidnom gelu oblikuju pravilne jažice ravnoga dna.



Slika 4.2. Kalup za lijevanje i polimerizaciju ploče gela za vertikalnu elektroforezu: a) sastavnice kalupa, b) sastavnice kalupa formirana sa stegama u kalup, na vertikalnom nosaču

Nakon polimerizacije uklanja se ljepljiva vrpca s donje strane staklenog sendviča i ploča s gelom pripravljena je za elektroforezu. Obično se gel lijeva 24 sata prije uporabe i u međuvremenu se čuva u vlažnoj komori ili u plastičnoj vrećici u kojoj je i nekoliko mL otopine pufera. Valjak poliakrilamidnog gela pripravlja se lijevanjem smjese za polimerizaciju u staklenu cijev duljine 5 do 25 cm i unutarnjeg radijusa od 1 do 5 mm, koja je na jednom kraju začepljena (parafilm). U preparativnoj elektroforezi rabe se valjci radijusa i do 10 cm.

U elektroforezi vrlo malih količina uzorka, za brzu separaciju i veliku rezoluciju, rabe se kapilarne cijevi duljina 30 do 100 cm i unutarnjeg dijametra od 50 do 100 μ m. Najčešće se rabe staklene cijevi unutarnjeg radijusa 4 do 5 mm. Smjesa za polimerizaciju ulijeva se do visine od 10 do 15 mm od visine cijevi. Da bi se dobila ravna površina gela, na otopinu monomera nadsvodno se dodaje 5 mm debeli sloj vode ili 5 %-tne otopine etanola ili izobutanola. Time se sprječava nastajanje meniska na površini gela, što bi za posljedicu imalo zakrivljene vrpce u forezogramu. Taj postupak primjenjuje se i u pripravi vertikalne ploče gela ako se ne rabi plastični češalj za formiranje jažica. Ploča poliakrilamidnog gela za horizontalnu napravu čini se kao i za vertikalnu napravu, polimerizacijom između para staklenih ploča. Time se isključuje učinak kisika iz zraka koji inhibira polimerizaciju.



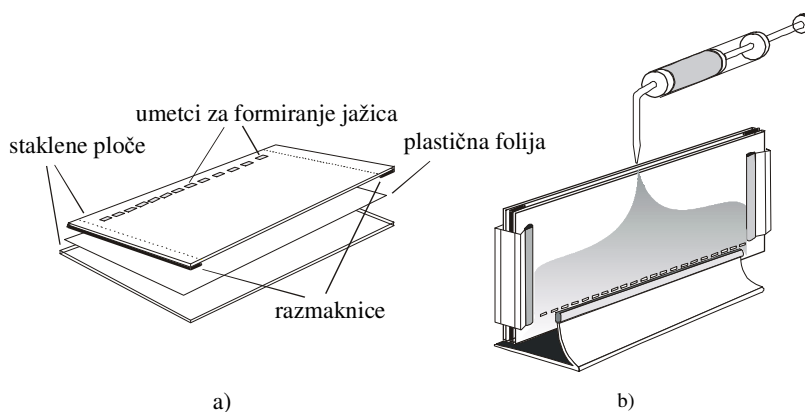
Slika 4.3. Slojem vode na otopini za polimerizaciju sprječava se nastajanje meniska i tako stvara ravna površina na koju se nanosi otopina analita

Nakon polimerizacije jedna se staklena ploča uklanja i tako otvara lice gela na kojem se čine (bušenjem) jažice. Površina staklene ploče na kojoj ostaje gel hidrofilna je, a ona koja se uklanja hidrofobna, što se postiže nanošenjem tankog sloja silana (Repel Silane[®]). Danas se sve više lijeva gel na plastičnu foliju (Gel Bond Page Film[®]), na koju se poliakrilamidni gel kovalentno veže. Tako se mogu učiniti vrlo tanki gelovi koji bi inače nevezani na plastičnu foliju bili lomljivi i neprikladni za manipulaciju. Na staklenu ploču koja se uklanja mogu se nalijepiti komadići ljepljive plastične folije (parafilm) za formiranje jažica, kao što se vidi na slici 4.4. Uporabom vrlo tankih ploča gela može se postići bolja kontrola temperature, učinkovitije ispiranje, bojenje, eventualno sušenje i rehidracija (vidi poslije). Rabe se horizontale ploče gela različitih dimenzija od $2,5 \times 5 \text{ cm}^2$ do $20 \times 30 \text{ cm}^2$ i debljine od 0,05 do 10 mm.

U metodama vertikalne elektroforeze ploče odnosno valjci s pripremljenim gelom u staklenoj cijevi ili između staklenih ploča umeću se u vertikalnu aparaturu za elektroforezu tako da je donji kraj ploče odnosno valjka uroni u donju komoru s puferom u kojoj je jedna elektroda. Gornji kraj ploče odnosno valjka u elektrolitnom je kontaktu s otopinom pufera u gornjoj komori aparature preko sloja otopine pufera u gornjoj komori za elektrodu.

Otopina analita unosi se u jažice ploče odnosno na površinu gela u valjku s pomoću mikrošprice (eng. microsyringe) ili mikropipete kroz sloj pufera koji prekriva površinu gela.

Gustoća otopine analita mora biti veća od gustoće pufera tako se otopina analita zadrži na dnu jažice, tj. uz površinu gela. Povećanje gustoće otopine uzorka postiže se dodatkom saharoze (2-10 %) ili glicerola (5-10 %). Otopina analita ne smije sadržavati suspendirane čvrste čestice niti nakupine masnoće koje bi začepile pore u matrici gela. One se prije elektroforeze uklanjaju iz otopine analita centrifugiranjem. U otopinu analita unosi se, redovito, i bojilo kojim se prati tok migracije kroz gel.



Slika 4.4. Lijevanje gela na plastičnu foliju za horizontalnu aparaturu: a) sastavnice kalupa za lijevanje, b) «sendvič» za lijevanje učvršćen štipaljkama i unošenje otopine za polimerizaciju

Kada vrpca bojila dospije do oko 5 mm od dna gela, proces elektroforeze treba zaustaviti. Često se vrpca pokaznog bojila rabi kao referentna točka za iskazivanje brzina migracije makromolekula kroz separacijski gel. Odmah nakon unošenja otopine analita počinje elektroforeza, da bi se smanjilo vrijeme difuzije i tako gubitak sastojaka analita u otopinu pufera u gornjoj komori aparature.

Najpovoljniji električni i ostali uvjeti separacije utvrđuju se eksperimentalno. Obično je napon separacije uz uporabu valjkastog gela od 30 do 50 volta po centimetru duljine valjka, što uz radijus od 5 mm rezultira jakošću struje od 1-3 mA. Uz duljinu valjka gela od 7 cm proces separacije traje od 40 do 120 min. Uz uporabu gela u obliku ploče duljine 20 cm primjenjuju se naponi od 3 do 5 volta po centimetru duljine uz vrijeme separacije od 15 i više sati (preko noći).

Održava li se temperatura gela konstantnom, vrijeme separacije proporcionalno je gradijentu uspostavljenog napona. Separacija se provodi uz konstantan napon. Nastaje li znatno zagrijavanje odnosno porast temperature gela zbog omskog zagrijavanja, smanjuje se viskoznost medija i povećava brzina migracije i difuzije čestica. Tada je bolje raditi uz konstantnu struju separacije.

Suvremeni komercijalni električni izvori za elektroforezu imaju mogućnost regulacije napona, jakosti električne struje odnosno kontrole snage.

Načela rada električnih izvora za elektroforezu opisana su u poglavlju 13.

4.6. Detekcija i kvantifikacija razdvojenih molekulskih vrsta

Nakon završetka elektroforetskog razdvajanja makromolekulskih iona gel se vadi iz cijevi odnosno skida sa staklene ploče za kvalitativnu odnosno kvantitativnu analizu sastavnica analita. Detekcija i kvantifikacija razdvojenih vrpca čini se mjerenjem određenog fizikalno-kemijskog svojstva molekula u vrpca. Najčešće se to čini mjerenjem apsorpcije elektromagnetskog zračenja u vidljivom i ultravioletnom dijelu spektra.

Budući da su većina proteina i sve nukleinske kiseline bezbojne i nisu izravno vidljive u gelu, vizualnost zona pojedine makromolekulske vrste u gelu postiže se *bojenjem*. To se čini vezanjem organskih bojila na makromolekule u gelu ili nanošenjem fino dispergiranih čestica srebra, slično fotografskom razvijanju. Čini li se bojenje pod kontroliranim uvjetima, količina vezanog bojila proporcionalna je količini molekulske vrste u vrpca. Usporedbom rasporeda zona na forezogramu analita s rasporedom zona na forezogramu učinjenom sa smjesom poznatih molekulskih vrsta (standardi) čini se kvalitativna analiza analita. Mjerenjem određenog fizikalno-kemijskog svojstva (npr. apsorpcije svjetla) molekulske vrste u zoni čini se kvantitativna analiza sastojaka analita, uvijek usporedbom sa standardom.

4.6.1. Bojenje makromolekula

U literaturi su opisana različita bojila i postupci bojenja makromolekula organskim bojilima. Neka bojila primjenjiva su za velik broj različitih molekulskih vrsta, a neka specifično samo za određenu molekulsku vrstu. Makromolekule u gelu boje se uranjanjem gela u otopinu bojila.

Nakon bojenja obavlja se *odbojivanje* odnosno ispiranje bojila s matrice samog gela. Na taj način gel na kojem nema vrpca makromolekula postaje prozirnim i na smeta u optičkoj detekciji vrpca. Međutim zbog difuzije makromolekula iz vrpca u gelu u otopinu za bojenje i odbojivanje nastaju gubitci makromolekula u vrpca, a time se smanjuje i točnost kvantitativnog određivanja.

Da bi se ti gubitci smanjili, makromolekule u vrpca *učvršćuju* se (fiksiraju). To se postiže tako da se učvršćivač (npr. trikloroctena kiselina, učvršćuje taloženjem) dodaje u otopinu za bojenje te se proces učvršćivanja i

bojenja odvija istovremeno ili se gel prije bojenja uranja u otopinu učvršćivača, što se čini pri bojenju srebrom, ali i pri bojenju organskim bojilima, osobito ako gel sadrži nisko molekularne vrste koje lako difundiraju i tako se gube. Njihovo učvršćivanje obavlja se prije bojenja. Uvjeti bojenja, tj. sastav otopine za bojenje, vrijeme bojenja, temperatura i dr. moraju biti kontrolirani i jednaki u ponovljenim postupcima, napose za kvantitativno određivanje. Isto vrijedi i za postupak odbojivanja. Danas se najčešće postupak bojenja obavlja na automatskim uređajima, u kojima su svi čimbenici postupka strogo kontrolirani, automatski vođeni. To je osobito važno u bojenju srebrom, koje se čini stupnjevito u većem broju slijednih (dionih) procesa.

Sadrži li gel biološki aktivne molekulske vrste (enzime), tijekom učvršćivanja i bojenja obično se gubi biološka aktivnost tih makromolekula. Želi li se sačuvati biološka aktivnost makromolekula u vrpci, primjenjuju se posebni postupci bojenja kojima se vizualizira pojedina molekulska vrsta ili utvrdi tip ili vrsta enzimatske aktivnosti.

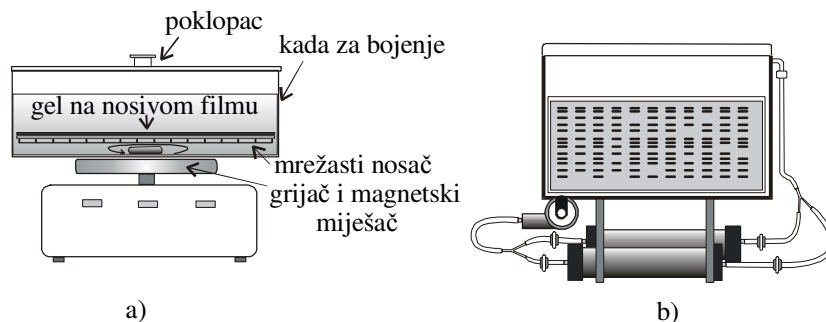
Biološka aktivnost makromolekula u vrpci može se utvrditi i postupkom kontaktnog preslikavanja. Na list papira ili tanki sloj agaroze ili poliamida na staklenoj ploči prenese se dio aktivne molekulske vrsta iz vrpce na gelu. To se čini tako da se list prisloni uz gel i drži određeno vrijeme na prikladnoj temperaturi. Na listu ili sloju gela na staklenoj ploči veže se dio makromolekula iz vrpce gela. Zatim se list (odnosno staklena ploča) odvoji i na njemu zadržane molekulske vrste ispituju na enzimatsku aktivnost uobičajenim postupkom za dotičnu vrstu enzima. Utvrđivanje prisutnosti biološki aktivne tvari u vrpci može se odrediti i tako da se gel razreže na dijelove. Dijelovi gela zatim se homogeniziraju u prikladnom puferu i analiziraju na biološku aktivnost sadržanih makromolekula.

Bjelančevine se najčešće boje modrim bojilom (Coomassie® Blue R 250). Bojilo se veže na molekule proteina na gelu, tvoreći elektrostatsku vezu s NH_3^+ grupama i (nekovalentnu) Van der Waalsovnu vezu s nepolarnim dijelovima proteinske molekule.

Učvršćivanje makromolekula na gelu provodi se taloženjem otopinom trikloroctene ili sulfosalicilne kiseline odnosno imobilizacijom i kemijskim vezanjem na gel s pomoću formaldehida. Metoda vezanja s formaldehidom naročito je prikladna za vezanje peptida, glikopeptida i jako bazičnih proteina, koji se slabije učvršćuju taloženjem kiselinama. Uz normalno oblikovanu vrpcu na gelu, bojenjem tim bojilom postiže se osjetljivost detekcije od 1 :g po vrpce.

Za bojenje bjelančevina rabe se mnoga bojila, a najranije je rabljeno amido crno 10B koje se i danas rabi napose za kvalitativno određivanje. Jednaka osjetljivost postiže se bojenjem s Xylene Cyanine Brilliant G uz simultano učvršćivanje s metanolnom otopinom trikloroctene kiseline, pri čemu nastaje jaka denaturacija i učvršćivanje makromolekula. U kiselom mediju to je bojilo u leuko-obliku i potpuno je bezbojno. Uranjanjem gela u

otopinu, bojilo se veže na proteine u gelu i postaje plavo, zbog promjene konstante disocijacije (pK). Ostali dio gela na kojem nema bjelančevina ostaje bezbojan. Gel zbog toga ne treba odbojivati za kvantitativno mjerenje inteziteta obojenosti. Manja osjetljivost u kvantitativnom određivanju bjelančevina (20 μg po vrpci) postiže se obilježavanjem fluorescentnim tvarima.



Slika 4.5. Naprava za bojenje (a) i obezbojivanje (b) gela

To su molekulske vrste koje apsorbiraju ultravioletno zračenje i slijedno emitiraju elektromagnetsko zračenje u vidljivom dijelu spektra. Emitirano zračenje iz prisutnih vrpca na gelu, na koje se vezala fluorescentna tvar, vidi se i tako otkriva mjesto pojedine vrpce. Emitirano svjetlo može se registrirati fotografski ili s pomoću fotodetektora i tako kvantificirati. Kao fluorescentni obilježivači rabe se anilinaftalen sulfonat (ANS) ili o-ftaldialdehid (OPA). Postupak detekcije brz je jer već nakon nekoliko minuta uranjanja u otopinu obilježivača gel se može ispitati pod UV-lampom i tako otkriti vrpce makromolekula. Pri tom postupku obilježivanja fluorescentnim tvarima ne nastaje denaturacija makromolekula i tako se održi njihova biološka odnosno enzimatska ili antigenetska aktivnost. One se slijedno mogu ekstrahirati iz gela i ispitati na biološku aktivnost.

Bojenjem makromolekula u gelu srebrom¹ postiže se i stotinu puta veća osjetljivost od osjetljivosti uz bojenje organskim bojilima.

Opisani se mnogi postupci bojenja srebrom. Svi se temelje na vezanju iona srebra na makromolekule (proteine i druge) u vrpcama gela. Ti vezani ioni srebra središnja su mjesta na kojima se taloži fino dispergirano kovinsko srebro pri slijednoj kemijskoj redukciji srebrenih iona iz otopine. Postupak bojenja provodi se tako da se gel nakon učvršćivanja makromolekula uranja u otopinu srebrova nitrata ili amonijakalnu otopinu srebrova nitrata te zatim u otopinu za razvijanje koja sadrži reducens, najčešće je to formaldehid. Izlučivanje srebra traje određeno vrijeme i prekida se otopinom kiseline (glicin ili acetana kiselina). Načini provođenja postupaka bojenja srebrom u

¹ R. C. Switzer, C. R. Merrill and S. Shifrin, *Anal. Biochem.*, **98** (1979) 231

kojima se postiže velika osjetljivost i reprodukcija bojenja detaljno su opisani².

Bojenje srebrom uspješno se primjenjuje i na već obojenom gelu s Coomassie plavim, napose ako postoji velika razlika u koncentraciji makromolekula u vrpcama gela. Naknadnim bojenjem srebrom mogu se uočiti i one vrpce koje sadrže vrlo male količine makromolekula koje nisu bile uočljive pri bojenju organskim bojilom.

Uz spomenute opće postupke, specifični se postupci bojenja rabe za bojenje fosfoproteina, lipoproteina, glikoproteina, ribonukleinske kiseline (RNA) i deoksiribonukleinske kiseline (DNA) za detekciju i razlikovanje od drugih molekulskih vrsta.

Najčešće rabljeni postupak bojenja (zapravo obilježavanja) nukleinskih kiselina (RNA i DNA) jest bojenje etidium bromidom. Ta fluorescentna tvar slabo fluorescira slobodna u otopini. Vezana na nukleinske kiseline i pobuđena ultravioletnim svjetlom fluorescira intenzivno narančastim svjetlom. Bojenjem etidium bromidom mogu se odrediti mase od 10 do 50 ng u vrpici dvostruke uzvojnice DNA, uz pobudu UV-svjetlom valne duljine 300 nm. Etidium bromid *mutagena* je tvar i treba ga rabiti uz mjere zaštite.

Uz metodu bojenja za detekciju makromolekula u vrpcama gela rabi se i metoda obilježavanja makromolekula radioaktivnim izotopima. Tom metodom postiže se velika osjetljivost detekcije. Pri tome nema denaturacijskog učinka pa se makromolekule mogu nakon detekcije ekstrahirati u biološki aktivnom obliku. Označivanje radioaktivnim izotopima redovito se obavlja prije postupka elektroforeze, međutim, može se obaviti i nakon separacije na samom gelu, npr. tretiranjem proteina radioaktivnim jodom³.

Tijekom bojenja jedan dio bojila veže se i na poliakrilamidni gel na kojem nisu vrpce makromolekula. Ta obojenost gela smanjuje rezoluciju pri kvalitativnom i kvantitativnom ispitivanju vrpce gela. Bojilo iz gela uklanja se ispiranjem, tj. difuzijom bojila iz gela u pogodno otapalo. To je dugotrajan proces (24 sata). Da bi koncentracija ispranog bojila u otopini za ispiranje bila što niža, i tako se ubrzala difuzija bojila iz gela, izmjenjuje se otopina za ispiranje ili se iz otopine za ispiranje uklanja bojilo provođenjem otopina za ispiranje kroz kolonu napunjenu aktivnim ugljenom ili izmjenjivačem iona, kao što je pokazano na sl. 4.5.b.

Drugi način jest uklanjanje bojila migracijom u električnom polju, tj. elektroforezom. Pri elektroforetskom obezbojivanju električki nabijene molekule bojila iz gela uklanjaju se u električnom polju. Štap odnosno ploče

² J. Heukeshoven, R. Dernick. u: B. J. Radola Ed., *Electrophoresis-Forum*, **86** (1986) 22.,

C. M. Merrill, D. Goldman, S. A. Sedman, M. H. Ebert, *Science*, **211** (1981) 1437.,
H. Blum, H. Beie, H. J. Gross, *Electrophoresis*, **8** (1987) 93.

³ A. R. Christopher, M. L. Nagpal, A. R. Carroll, J. C. Brown, *Anal. Biochem.*, **85** (1978) 404.

gela uronjene u otapalo stavljaju se između elektroda tako da je električno polje okomito na štap odnosno ploču. Otapala u koja se uranja gel ista su ili slična otapalima koja se rabe pri uklanjanju boje difuzijom. Pri elektroforetskom uklanjanju bojila rabe se niži naponi od napona rabljenih pri primarnoj elektroforezi. Obično se rabe naponi do 50 V, uz veće jakosti struje i do 1 A. Tim postupkom obezbojivanje je brzo i potpuno. Međutim, može se primijeniti samo ako se separirane makromolekule mogu lako i potpuno učvrstiti na gel tijekom prethodnog postupka bojenja. Inače, uz nepotpuno učvršćivanje gubi se materijal iz samih vrpca. U kvantitativnom određivanju najčešće se rabi postupak obezbojivanja gela difuzijom tj. ispiranjem.

4.6.2. Kvantifikacija denzitometrijom

Količina pojedine makromolekulske vrste u vrpca može se odrediti različitim metodama s većom ili manjom točnošću. Najjednostavniji postupak jest vizualna usporedba rasporeda razdvojenih zona i njihova intenziteta obojenosti s forezogramom učinjenim s poznatim količinama standarda na jednakom gelu.

Mnoga veća točnost postiže se mjerenjem intenziteta obojenosti vrpce ili njezine fotografske ili autoradiografske (vidi poslije) preslike s pomoću *denzitometra*. U denzitometru se kroz štap ili ploču gela propušta tanki snop elektromagnetskog zračenja određene valne duljine. Štap ili ploča gela neprekidno se, u koracima, pomiču tako da snop svjetla prođe kroz sve slojeve (točke) uzduž štapa odnosno dijela ploče na kojem su separirane zone makromolekula. Vezano bojilo na makromolekulama gela ili same makromolekule, u neobojenom gelu, apsorbiraju dio zračenja. Što je veća apsorpcija odnosno što je veća količina bojila odnosno veća koncentracija makromolekule u određenom sloju gela, to će biti manji intenzitet svjetla koje prođe kroz gel. Mjerenjem odnosa jakosti toka svjetlosti koji prolazi kroz gel i referentnog toka utvrđuje se *apsorbancija* tvari u zoni u gelu.

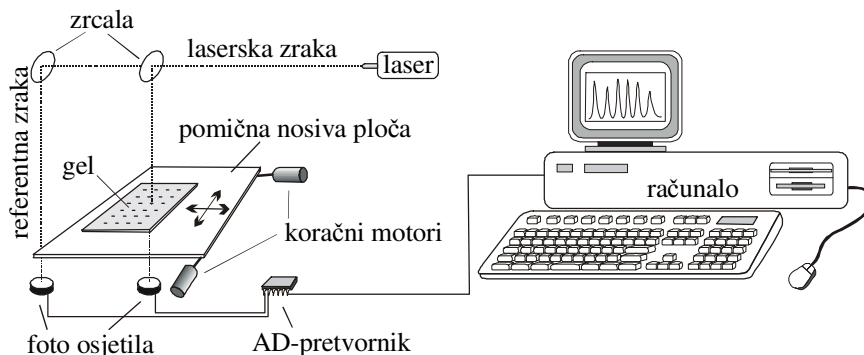
Uobičajeno je govoriti o mjerenju *optičke gustoće* vrpca na gelu. Kažemo da optičku gustoću 1 ima ona količina tvari koja otopljena u 1 mL otopine u kiveti s optičkim putem od 1 cm ima apsorbciju 1. U elektroforezi visoke rezolucije separirane zone mogu imati optičku gustoću do 4. U kvantitativnoj analizi potreban je linearan odnos između optičke gustoće i koncentracije tvari u vrpca. Budući da svaka supstancija ima vlastiti apsorpcijski spektar, tj. ovisnost apsorpcije o valnoj duljini svjetla, optička gustoća ovisi o koncentraciji tvari vrpca i o valnoj duljini, u mjerenju, rabljenog svjetla. Da bi se postigla dobra reprodukcija mjerenja i dobra rezolucija malo razmaknutih vrpca u gelu, potrebno je mjerenje činiti

monokromatskim svjetlom, velikog intenziteta zračenja u obliku uskog snopa.

Uporabom optičkog filtra može se iz kontinuiranog spektra, koji emitira žarulja sa žarnom niti, propustiti kroz gel snop svjetla koji je približno monokromatski. Uporabom lasera kao izvora potpuno monokromatskog svjetla postiže se optimalna reprodukcija i bolja linearnost odnosa optičke gustoće i koncentracije tvari u zoni u gelu.

Uporabom lampe kao izvora vidljivog svjetla može se postići linearnost do optičke gustoće od 2,5, a uporabom lasera do optičke gustoće 4.

Denzitometrija se može primijeniti na obojeni ili neobojeni gel ili na njegovu presliku odnosno na gel obilježen fluorescentnim bojilom. Elektromagnetsko zračenje koje prođe kroz ispitivani sloj gela, odnosno svjetlo koje emitiraju makromolekule obilježene fluorescentnom bojom, pušta se u detektor zračenja. Intenzitet tog zračenja mjeri se s pomoću osjetila za elektromagnetsko zračenje, npr. s pomoću fotoćelije ili fotomultiplikatora.



Slika 4.6. Skica aparature za denzitometriju uz uporabu lasera kao izvora svjetla i uporabu računala za prikupljanje, obradu i prikaz izmjerenih veličina

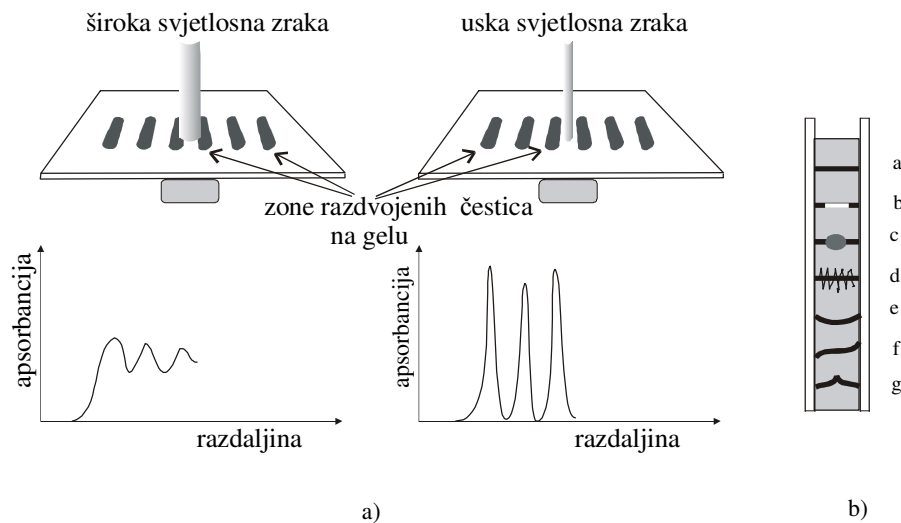
Osjetilo zračenja daje električni odziv u obliku slijednih vrhova (pikova), a svaki se odnosi na pojedinu vrpču u štapu odnosno ploči gela. Taj analogni električni odziv može se izravno iscrtati s pomoću pisala (pisača) ili se u digitaliziranom obliku unosi u računalo s pomoću kojeg se obavlja sakupljanje, matematička obrada odziva i njegov prikaz na monitoru ili pisalu kao *denzitogram*.

Svaki pojedini protein ima specifični afinitet vezanja bojila različit od drugih proteina. Zato se u elektroforezi i kvalitativna i kvantitativna analiza temeljni na usporednom snimanju forezograma učinjenom s poznatim količinama čistih tvari (proteini obilježivači, markeri) u istim eksperimentalnim uvjetima. Dakle, uvijek je mjerenje relativno prema standardima.

Kao standardi u elektroforezi u poliakrilamidnom gelu rabe se bjelančevine; lizozim, citokrom C, ciotripsinogen, ribonukleoza, mioglobin, eritroagrutin, inzulin, β -laktoglobulin, ovalbumin, alkalna fosfataza, α -laktoalbumin.

Točnost kvantitativnog određivanja tvari sadržane u vrpce ovisi o učinkovitosti i reproducibilnosti bojenja, učinkovitosti učvršćivanja (fiksiranja) ali i o kvaliteti (obliku) i razdvojenosti separiranih zona u gelu.

Vrpce se mogu izobličiti zbog nehomogenosti gela, prisutnosti mjehurića zraka, prisutnosti čvrstih čestica u uzorku, nepravilnog dna u jažicama gela i razlike u temperaturi površine i unutrašnjosti gela nastale zbog omskog zagrijavanja tijekom elektroforeze. Loš i nepouzdan denzitogram nastaje snimanjem gela s iskrivljenim vrpce i zonama koje se preklapaju.



Slika 4.7. a) Shematski prikaz učinka širine snopa svjetla u denzitometriji malo razdvojenih zona u gelu. Uz užu snop postiže se bolje razlučivanje zona i točnije mjerenje. b) Mogući oblici vrpce u gelu: a - idealna vrpca, obojena po čitavoj dubini, b - vrpca kojoj centar nije dobro obojen (vrijeme bojenja prekratko), c - vrpca s aureolom posljedica je slabog učvršćivanja ili prevelike količine uzorka, d - isprugana vrpca zbog prisutnosti čvrstih čestica u uzorku, e - zakrivljena vrpca posljedica nejednoličnosti gela ili češće temperaturne razlike vanjskog i unutarnjeg sloja gela, f - zakrivljena vrpca zbog neravnog dna jažice za uzorke, g - deformacija vrpce uzrokovana prisutnošću mjehurića zraka u gelu.

Mjerenje apsorpcije u denzitometriji najčešće se čini u jednoj dimenziji tako da zraka svjetla prelazi (u malim koracima) preko vrpce smjerom razdvajanja i tako registrira širinu i optičku gustoću vrpce

Drugi način jest da se mjerenje čini u dvije dimenzije, a veličina i optička gustoća vrpce izračunava se uporabom odgovarajućeg programa osobnim računalom. Taj način kvantifikacija primjenjuje se i u kvantifikaciji preslike vrpce gela učinjene digitalnim preslikačem ili videokamerom (vidi poslije).

Za kvantifikaciju neobojenih vrpce rabi se ultravioletno svjetlo valnih duljina od 250 do 300 nm. Ultravioletno zračenje apsorbiraju aminokiseline tirozin i triptofan, sadržane u proteinima. Maksimum je apsorpcije pri 280 nm. Međutim, njihov faktor apsorpcije malen je i iznosi samo 3 do 5 % onog faktora koji imaju nukleinske kiseline kojima je maksimum apsorpcije pri 260 nm. Osim toga poteškoće pri kvantifikaciji UV-svjetlom nastaju i zbog apsorpcija nekih komponenata pufera u gelu i rasipanju svjetla na česticama odnosno precipitatima u uzorku.

Kvantifikacija UV-svjetlom na cilindričnom gelu u kvarcnoj cijevi obavlja se odmah nakon elektroforeze bez vađenja gela iz cijevi.

Denzitogrami dobiveni kvantifikacijom obojenog i neobojenog gela razlikuju se. Razlog tome jest razlika u kapacitetu vezanja boje različitih proteina i razlika u sadržaju tirozina i triptofana.

Zbog slabe apsorpcije UV-svjetla veća osjetljivost kvantifikacije proteina postiže se denzitometrijom obojenih vrpce nego denzitometrijom neobojenih vrpce.

Za kvantifikaciju vrpce obilježenih fluorescentnim tvarima mjerni uređaj mora imati dodatak kojim se filtrira UV-zračenje pobude. Na detektor se propušta samo emitirano fluorescentno (vidljivo) zračenje. U tom slučaju intenzitet zračenja koji dolazi u detektor bit će veći što je veća količina adsorbiranog obilježivača odnosno količina makromolekula u vrpce.

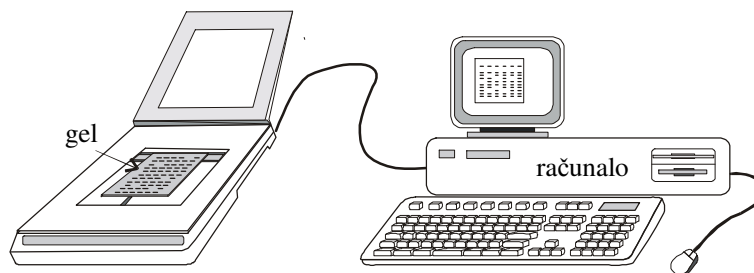
Mjerenjem visine ili točnije površine ispod vrhova denzitograma određuje se količina makromolekula u vrpce gela. To se čini uspoređivanjem s veličinama dobivenim sa čistim proteinima – standardima, dobivenim uz iste uvjete separacije, bojenja i detekcije i uz uporabu standardnih krivulja.

Kvantifikacija makromolekula u vrpce gela može se učiniti i denzitometrijom negativa fotografske preslike vrpce gela. Ta metoda naročito se rabi u kvantifikaciji fluorescentnih vrpce ako denzitometar nema dodatka za fluorescentna mjerenja ili je samo fluorescencija kratkotrajna. Uvjeti izrade negativa preslike, tj. osvjetljenje, kamera, filtri, film i dr., moraju biti isti da bi se rezultat denzitometrije mogao usporediti sa standardom odnosno prethodno izrađenom standardnom krivuljom.

Preslika je trajni zapis rezultata elektroforeze. Međutim, rezolucija i točnost određivanja uz uporabu fotografske preslike manja je od one dobivene izravnim mjerenjem obojenog ili neobojenoga gela.

4.6.3. Kvantifikacija videokamerom i digitalnim preslikačem

U kvantifikaciji vrpce u gelu danas se sve više rabe metode kvantifikacije preslike gela učinjene s pomoću *videokamere* ili s pomoću *digitalnog preslikača* (skenera). Videokamere s velikom rezolucijom snimanja uz uporabu vidljivog i UV-svjetla rabe se poglavito u dvodimenzionalnoj elektroforezi (vidi poslije) i elektroforezi nukleinskih kiselina u gelu od agaroze uz bojenje etidium bromidom. Digitalni preslikači povezani s osobnim računalom omogućuju vrlo brzo preslikavanje uz veliku rezoluciju. Kvalitativna i kvantitativna analiza preslike čini se s pomoću osobnog računala uz uporabu odgovarajućih računalnih programa. Matematičkom obradom čini se integracija površina ispod vrhova, korekcija za promjene osnovne linije denzitograma, određivanje relativne pokretljivosti i relativne molekulske mase, određivanje izoelektrične točke te koncentracije pojedine molekulske vrste usporedbom sa standardom.



Slika 4.8. Načelo uporabe digitalnog preslikača i osobnog računala u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi preslike separiranih zona u gelu

4.6.4. Detekcija i kvantifikacija radiometrijom

Većina makromolekula može se obilježiti radioaktivnim izotopima. Rabe se izotopi ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{131}I i drugi. Ugradnjom prikladnih radioaktivnih izotopa u makromolekule ne mijenja se njihova biološka odnosno enzimatska aktivnost, niti se mijenja molekularni naboj pa time ni elektroforetska svojstva. Molekulske vrste koje sadrže radioaktivne izotope mogu se otkriti i kvantificirati s pomoću *scintilacijskog brojača*, *autoradiografski* ili *fluoregrafski*. Te metode mjerenja vrlo su osjetljive i točne. Za kvantifikaciju s pomoću scintilacijskog brojača makromolekulama

obilježenim radioaktivnim izotopima dodaju se scintilatori. To su tvari koje emitiraju pulseve elektromagnetskog zračenja u vidljivom ili ultravioletnom području (fluorescentno odnosno scintilacijsko zračenje) kada su bombardirani radioaktivnim česticama ili gama zrakama. Mjerenje se provodi tako da se gel nareže na tanke kriške (0,5-1 mm). Radioaktivnost a time i količine molekulske vrste obilježene radioaktivnim izotopom pojedine kriške gela posebno se mjeri.

Za molekulske vrste obilježene izotopom ugljika ^{14}C kriška se gela osuši na komadiću filtrirnoga papira i zajedno s papirom, uz dodatak određenog volumena smjese scintilatora, umeće u posudicu scintilacijskoga brojača. Emitirano scintilacijsko zračenje iz posudice s radioaktivnim materijalom ulazi kroz propusnu fotokatodu u fotomultiplikator i tu se pretvara u električni signal (električni impuls). Svaka radioaktivna čestica (β -zraka) uzrokuje scintilacijom emisiju većeg broja fotona. Taj broj ovisi o energiji čestice. Veći broj fotona stvara veći broj fotoelektrona, a time jači izlazni signal (el. struja) fotomultiplikatora. Tako se postiže velika osjetljivost mjerenja prisutnosti radioaktivnog izotopa u uzorku.

Drugi postupak kvantifikacije radioaktivnog gela jest *autoradiografija*. Metoda se temelji na izravnoj dodirnoj ekspoziciji rendgenskoga filma β - i (γ -zrakama emitiranim iz radioaktivnoga gela. Tom metodom postiže se osjetljivost i 1 000 puta veće nego bojenjem. Pri uporabi radioizotopa velike energije (^{32}P , ^{59}Fe , ^{64}Cu , ^{131}I) ploča ili dužinski odrezak valjkastoga gela prekriju se tankim listom polietilena i na to se stavlja film osjetljiv na x-zračenje.

Prisutnost vode u gelu smanjuje intenzitet zračenja pa se za autoradiografsku detekciju radioizotopa manje energije, npr. ^{14}C , gel prethodno suši. Da ne bi tijekom sušenja nastalo pucanje i savijanje, gel se postavlja na ploču od stakla ili pleksiglasa i prekrije se slojem želatine ili celofana i tako prekriven suši pri sobnoj temperaturi (želatina, 24 h) ili u peći (celofan, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30-120 min). Osušeni gel odlijepi se od staklene odnosno pleksiglasne podloge i na njega se izravno stavlja rendgenski film. Ovisno o količini radioaktivnog izotopa, dodirna ekspozicija traje od nekoliko sati do nekoliko dana. Film se nakon ekspozicije razvija na uobičajen način. Zacrtnjenja na filmu mjere se denzitometrom i kvantificiraju prema standardu.

Zbog male energije β -zraka koje emitira ^3H , one se gotovo potpuno apsorbiraju u samom gelu, zato se kvantifikacija ^3H ne može učiniti izravno autoradiografski. To se može učiniti tako da se gel prethodno impregnira sa scintilatorskom tvari i onda prislanja uz rendgenski film. Film nije sada pod utjecajem β -zraka koje emitira ^3H nego pod utjecajem fluorescentnog zračenja koje emitiraju molekule scintilatora pobuđene β -zrakama ^3H , s kojima su u neposrednom dodiru. Tim načinom postiže se velika osjetljivost mjerena. Zbog zdravstvenih se razloga radiometrijska mjerenja danas nastoje izbjeći.

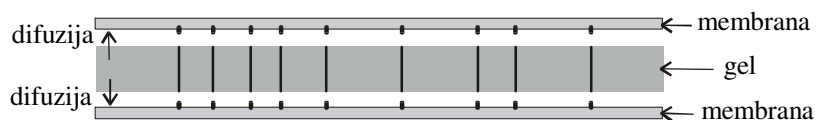
4.7. Prijenos makromolekula iz gela na površinu membrane

Elektroforezom razdvojene makromolekule nalaze se na vrpčama po cijeloj debljini gela. Za izravno ispitivanje dostupan je samo mali dio molekula koje su na površini gela. Da bi se molekule oslobodile iz matrice gela za ispitivanje, npr. reaktivnosti proteina na antitijela i sl., čini se *prijenos* makromolekula iz gela, kroz njegovu bočnu stranu, na površinu membrane na kojoj se makromolekule iz gela vežu (eng. Blotting). Prenesene, vezane i tako imobilizirane makromolekule na površini membrane dostupne su za neposredno ispitivanje i detekciju.

Materijali za izradu membrana na koje se prenose makromolekule iz gela jesu nitroceluloza, različiti oblici modificiranog i nemodificiranog najlona, kemijski modificirani papir (diazopapir, ion izmjenjivački papir), polivinilidenflorid i površinski aktivirano stakleno pletivo. Izbor materijala membrane ovisi o vrsti analita i o svojstvima sustava za detekciju i kvantifikaciju. Najčešće se rabe membrane od nitroceluloze s veličinom pora od 0,05 μm do 0,45 μm na koje se dobro vežu i proteini i nukleinske kiseline (DNA i RNA). Prijenos vrpci iz gela na površinu membrane može se učiniti difuzijom, ispiranjem kapilarnim protokom pufera i učinkom električnog polja, tj. s pomoću poprečne elektroforeze.

4.7.1. Prijenos difuzijom

Prijenos difuzijom najjednostavniji je ali i najdugotrajniji način prijenosa. U ovom postupku gel se umeće između dva lista navlaženih (imobilizirajućih) membrana. Sa svake strane još se dodaju dva lista spužve ili nekoliko listova upijajućeg papira i sve stisne u sendvič s pomoću dvije mreže od nehrđajućeg čelika ili najlona. Sve se uroni u otopinu pufera.



Slika 4.9. Dvosmjerni prijenos difuzijom makromolekula iz gela na membrane

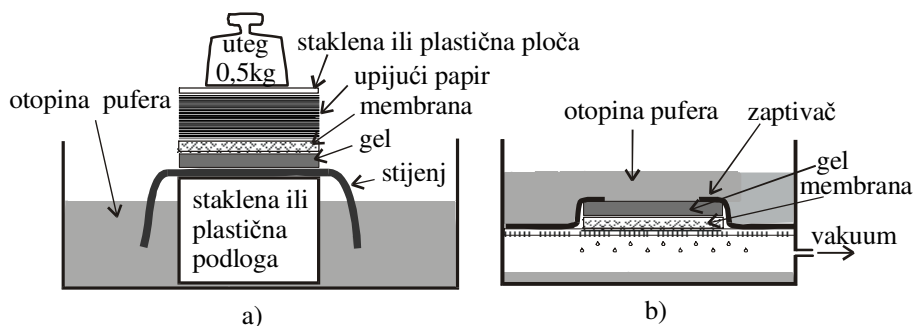
Makromolekule iz gela difundiraju (24 –48 h) na jednu i drugu stranu i vežu se na obje imobilizirajuće membrane. Tako dobijemo dvije replike vrpce iz gela za daljnju analizu.

4.7.2. Prijenos ispiranjem kapilarnim protokom otopine pufera

Prijenos kapilarnim protokom otopine pufera (Southern¹ «Southern blot») standardna je metoda prijenosa za slijednu hibridizaciju u separaciji DNA.

Prijenos molekula RNA na film ili membranu od Nylona² (eng. «Northern blot») temelji sa na istom načelu prijenosa. Rabi se i u prijenosu proteina iz gela velikih pora³.

Prijenos se temelji na ispiranju makromolekula iz gela kapilarnim protokom pufera. Otopina pufera teče kroz gel i membranu zbog upijajućeg djelovanja suhog filtrirnog papira koji je stisnut uz gornju površinu imobilizirajuće membrane. Pufer se upija iz stijenja (ili filtrirnog papira) koji se nalazi na donjoj strani gela. Stijenje je uronjen u otopinu pufera. Otopina pufera teče kapilarno kroz gel i membranu i prenosi makromolekule iz gela na površinu membrane, gdje se imobiliziraju. Prijenos traje desetak sati i mnogo je brži i učinkovitiji od prijenosa difuzijom.



Slika 4.10. Prijenos kapilarnim protokom pufera upijanjem (a); prijenos protokom otopine pufera pod učinkom sniženog tlaka (b)

Može se i ubrzati kapilarnim tokom otopine pufera pod utjecajem sniženoga tlaka⁴.

¹ E. M. Southern, *J. Mol. Biol.*, **98** (1975) 503.

² J. C. Alwine, D. J. Kemp, J. R. Stark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** (1977) 5350.

³ B. G. Olsson, B. R. Weström, B. W. Karlsson, *Electrophoresis*, **8** (1987) 377.

⁴ E. Olszewska, K. Jones, *Trends. Gen.*, **4** (1988) 92.

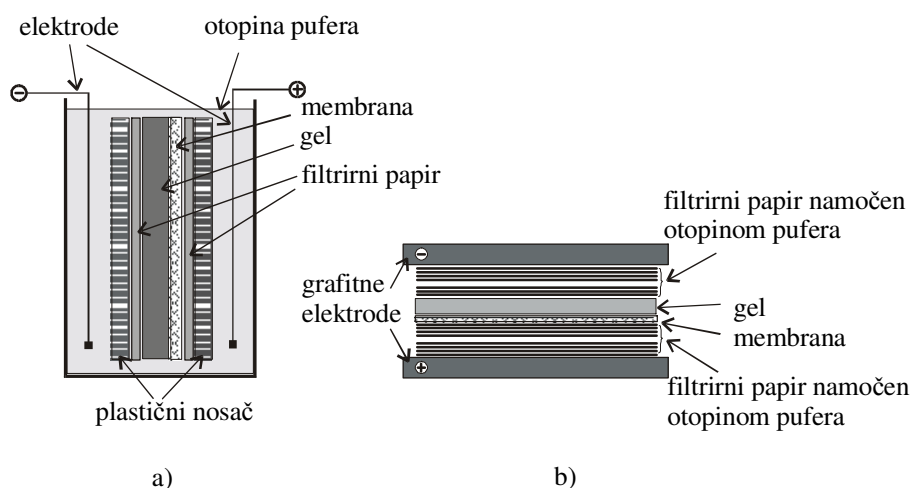
Uz tok pufera uz sniženi tlak (20 do 40 cm vodenog stupca) prijenos se može učiniti za 30 do 40 minuta.

4.7.3. Prijenos tlačanjem

Prijenos iz gela od agaroze lijevanog na plastičnoj foliji (Gel Bond film[®]) može se tlačanjem učiniti vrlo jednostavno i brzo⁵. Na gel se položi navlažena membrana na koju se položi nekoliko slojeva filtrirnoga papira, staklena ploča i uteg kojim se čini tlak od 1 kg na 100 cm² površine ploče. Prijenos tlačanjem traje samo nekoliko sekundi i može se učiniti i nekoliko replika vrpce s gela. Metoda se može primijeniti i za prijenos s tankog poliakrilamidnoga gela uz dulje vrijeme prijenosa (1 sat).

4.7.4. Prijenos elektroforezom

Najčešće primjenjivani način prijenosa jest prijenos pod učinkom električnog polja, tj. putem poprečne elektroforeze (eng. electroblotting). Gel uz koji je prislonjena imobilizirajuća membrana umeće se između dva lista filtrirnoga papira i stisnut u plastičnom držaču uranja se u otopinu pufera između dviju elektroda.



Slika 4.11. Prijenos poprečnom elektroforezom uranjanjem u otopinu pufera (a), elektroforetski prijenos u polusuhim uvjetima (b)

⁵ F. X. Desvaux, B. David, G. Peltre, *Electrophoresis*, **11** (1990) 37.

Pod učinkom uspostavljenog električnog polja uz napon od 5-10 V molekularni ioni iz gela migriraju na površinu membrane, gdje se imobiliziraju. Taj način prijenosa najčešće se rabi u SDS-elektroforezi proteina⁶ (vidi poslije). Taj način prijenosa brži je i traje od 30 minuta do 2 sata, što ovisi o debljini i vrsti gela, ali i o veličini makromolekula i njihovom električnom naboju. Za prijenos elektroforezom rabe se otopine pufera manje ionske jakosti. Imobilizirajuća membrana treba biti na onoj strani gela prema kojoj migriraju molekularni ioni, tj. na strani negativne ili pozitivne elektrode ovisno o električnom naboju makromolekulskih iona u gelu. Danas se više rabi elektroforetski prijenos u polusuhim uvjetima⁷. To se čini tako da se gel i membrana umeću između dva deblja sloja namočenog filtrirnoga papira i stisnu između pločastih grafitnih elektroda (slika 4.11.b). Zbog malog razmaka između elektroda postiže se velika jakost električnog polja i zato je kratko vrijeme prijenosa. Taj način prijenosa omogućuje uporabu diskontinuiranog pufera. Jedan sloj papira sadrži pufer određenog pH, a drugi ima različit pH. Time se postiže tzv. izotahoforetski učinak (vidi poslije), zbog čega svi molekularni ioni migriraju iz gela na membranu istom brzinom. Sustav s grafitnim elektrodama nije potrebno hladiti. Primjenjuju se jakosti električne struje od 0,8 do 1 mA /cm² površine gela. Uz veće jakosti struje zbog pregrijavanja može doći do precipitacije proteina. Prijenos traje oko 1 h. Istovremeno se može učiniti i veći broj prijenosa, u kojima se gelovi i membrane slažu jedni iznad drugih s umetnutim slojevima papira namočenim u otopinu pufera.

4.8. Detekcija i kvantifikacija makromolekula na membrani

Makromolekule izdvojene iz gela i fiksirane na površini membrane mogu se obojiti, obilježiti i kvantificirati istim postupcima kao u kvantifikaciji na gelu. Proteini se boje različitim bojilima, ali najčešće s amido crnim ili sa Coomassie plavim. Trajanje bojenja i ispiranja znatno je kraće (nekoliko minuta). Može se učiniti bojenje srebrom. Bojenjem srebrom može se detektirati i nekoliko nanograma proteina. Nukleinske kiseline boje se etidium bromidom. Molekule obilježene radioizotopima mogu se izravno kvantificirati autoradiografski. Mala debljina membrane omogućuje neposredniji kontakt makromolekula s rendgenskim filmom. Tako se postiže veća osjetljivost i bolja rezolucija detekcije. Specifičnim imunološkim

⁶ H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (1979) 4350.
W. N. Bunette, *Anal. Biochem.*, **112** (1981) 195.

⁷ J. Kyhse-Andersen, *J. Biochem. Biophys Methodes*, **10** (1984) 203.
E. R. Tovey, B. A. Baldo, *Electrophoresis*, **8** (1987) 384.

reakcijama karakteriziraju se i detektiraju proteini, glikoproteini i lipopolisaharidi. Nukleinske kiseline mogu se detektirati reakcijama hibridizacija. Prije specifičnih reakcija na membrani *blokiraju* se slobodna vezna mjesta, i to makromolekulama koje ne sudjeluju u reakcijama vizualizacije prenesenih molekulskih vrta. U analizi nukleinskih kiselina rabi se otopina tzv. Denhardt pufera¹, u analizi proteina za blokiranje slobodnih veznih mjesta najčešće se rabi (volovski) albumin, obrano mlijeko, riblja želatina i neionski deterdžent Tween 20. U detekciji fragmenata DNA rabe se radioaktivne sonde DNA ili RNA, koje se vežu s komplementarnom DNA ili RNA, na membrani. Rabe se i neradiokativne sonde temeljene na biotin-streptavidinu ili dioksigenu. Nativni enzimi preneseni i imobilizirani na membrani ne difundiraju u okolinu pa se uspješno može učiniti njihova analiza temeljena na (relativno sporoj) reakciji enzim–supstrat.

U analizi proteina imunološkim reakcijama primjenjuju se specifična vezanja imunoglobulina ili monoklonalnih antitijela na proteine u zonama nakon učinjenog blokiranja. Za vizualizaciju tako stvorenih imunoprecipitata rabe se proteini pokazivači (markeri). Prijenos proteina na membranu omogućuje studij interakcije proteina s ligandima, izravne sekvencije proteina, čime je učinjen veliki napredak u kemiji proteina i molekularnoj biologiji. Najčešće se za prijenos rabe membrane od nitroceluloze.

Mehanizam vezanja bjelančevina na nitroceluloznu membranu nije potpuno objašnjen. Važnu ulogu ima hidrofobna interakcija jer se vezane makromolekule lako eluiraju s površine uz dodatak neionskog deterdženta, kao što je Triton X-100. Kapacitet vezanja relativno je velik (primjerno 80–100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Iz jednog gela mogu se učiniti sukcesivni prijenosi na nekoliko membrana, koje se onda mogu ispitati različitim tehnikama detekcije. Međutim, treba naglasiti da u bilo kojem obliku prijenosa tok makromolekula iz gela na površinu membrana ovisi o molekularnoj masi. Molekule manje mase izmiču se iz gela brže od većih. Tako će pri slijednom prenošenju na više listova membrane više manjih molekula biti na prvom listu nego u drugom i tako redom. Detekcija će na slijednim listovima biti samo polukvantitativna. Međutim, prijeđe li se kapacitet vezanja, manje molekule koje su slabije vezane prolaze kroz membranu, a na njoj se povećava količina većih molekula, što smanjuje vjerodostojnost prijenosa. Učinkovitost prijenosa ovisi i o strukturi gela odnosno učinku molekularnog sita. Na prijenos utječe i pH otopine pufera.

Makromolekule kojima je izoelektrična točka (pI) jednaka pH otopine pufera u elektroforetskom prijenosu neće uopće migrirati iz gela na membranu. Bolja adsorpcija glikoproteina, lipida i ugljikohidrata postiže se tako da se prethodno nitrocelulozna membrana prekrije ligandom². Membrane od polivinildenfluorida (PVDF) na teflonskoj osnovi imaju veliki

¹ D. Denhardt, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **20** (1966) 641.

² E. Handmann, H. M. Jarvis, *J. Immunol. Methods*, **83** (1985) 113.

kapacitet vezanja i dobru mehaničku čvrstoću. Rabe se pri izravnoj sekvenciji proteina³. Na kemijski modificirani papir (diazobenziloksimetil, diazofeniltioeter) molekule se vežu elektrostatski i kovalentno. Membrane od najlona imaju veliki kapacitet vezanja, i to elektrostatskim učinkom. Zato se na membrane od najlona vežu anionska bojila pa se uobičajeni načini bojenja ne mogu primijeniti. Rabi se bojenje koloidima željeza⁴. Za izravnu sekvenciju proteina prijenos se čini na stakleno pletivo (tkaninu) kojoj je površina aktivirana. Za aktivaciju površine staklenih niti primjenjuju se ove metode: tretiranje s bromcianoidom, prekrivanje površine s pozitivno nabijenim silanima⁵ ili hidrofobiziranje površine prekrivanjem sa silikonima⁶. Ne postoji idealna membrana na kojoj bi se sve molekule analita potpuno vezale. Potrebno je, u ovisnosti o analitu i metodi detekcije, eksperimentalno utvrditi vrstu membrane i najpovoljnije uvjete prijenosa.

4.9. Primjene elektroforeze na homogenom poliakrilamidnom gelu uz homogeni pufer

Elektroforeza na homogenom poliakrilamidnom gelu uz homogeni pufer zbog jednostavnosti široko se rabi u separaciji električki nabijenih makromolekula. U analizi je potrebna vrlo mala količina analita. Primjenjuje se u analizi makromolekula iz smjesa proteina, lipoproteina, glikoproteina, mukopolisaharida, peptida, nukleinskih kiselina i drugih, s dobrom rezolucijom razdvajanja. Primjenjuje se u separaciji makromolekula, u kojoj je potrebno održavati konstantan pH pufera u gelu tijekom elektroforeze. Tako se može održati, na promjenu pH osjetljiva, enzimatska ili druga biološka aktivnost razdvojenih molekulskih vrsta. Primjenjuje se u elektroforezi u kojoj je iz gela potrebno ukloniti katalizator za polimerizaciju, koji može inaktivirati makromolekulske vrste, što se čini prethodnim postupkom elektroforeze prije unošenja otopine analita.

Budući da je širina zona razdvojenih vrpca izravno ovisna o visini stupca otopine analita u jažicama, ta se metoda rabi u analizi manjeg broja sastojaka analita u kojoj nije potrebna velika rezolucija razdvajanja. Primjenjuje se i u preparativne svrhe.

³ P. J. Matsudaira, *J. Biol. Chem.*, **262** (1987) 10035.

⁴ M. Moeremans, M. De Raeymaeker, G. Daneels, De Mey, *J. Anal. Biochem.*, **153** (1986) 18.

⁵ R. H. Aebersold, D. Teplow, L.E.Hood, S. B. H. Kent, *J. Biol. Chem.*, **261** (1986) 4229.

⁶ C. Eckerskorn, W. Mewes, H. Goretzki, F. Lottspeich, *Eu. J. Biochem.*, **176** (1988) 509.

5. ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNOM GELU UZ DISKONTINUIRANE UVJETE

U separaciji na poliakrilamidnom gelu s homogenim puferom širina razdvojenih zona na ploči odnosno valjku gela ovisi o visini sloja otopine analita u jažicama na ploči gela, odnosno o visini sloja otopine analita u cijevi s gelom u obliku valjka. Debljina sloja otopine analita izravno određuje širinu zona na separacijskom gelu. Da bi ostvarili bolje razdvajanje makromolekula u užim separacijskim zonama, u separacijskom postupku na poliakrilamidnom gelu uz homogeni pufer rabe se vrlo mali volumeni otopine analita, samo nekoliko μL .

Bolje razdvajanje zona ostvaruje se primjenom postupka koncentriranja makromolekula odnosno njihovim *nagomilavanjem* u tanki sloj prije razdvajanja na separacijskom gelu. Primjenom postupka nagomilavanja makromolekula moguć je rad s većim volumenima razrijeđenih otopina analita. Uz nagomilavanje mogu se ostvariti vrlo uske (oštre) zone razdvajanja i unošenjem u jažice i volumena analita većih od 0,1 mL.

5.1. Načelo nagomilavanja

Nagomilavanje makromolekula u tanki sloj postiže se primjenom *višefaznog pufera*, tj. pufera različitog kemijskog sastava i različitih vrijednosti pH.

Koncentriranje se može ostvariti u (slobodnoj) otopini samog analita ili uporabom gela za nagomilavanje (eng. *stacking* ili *spacer gel*) koji se u tankom sloju nalazi iznad separacijskoga gela. Postupak s gelom češći je.

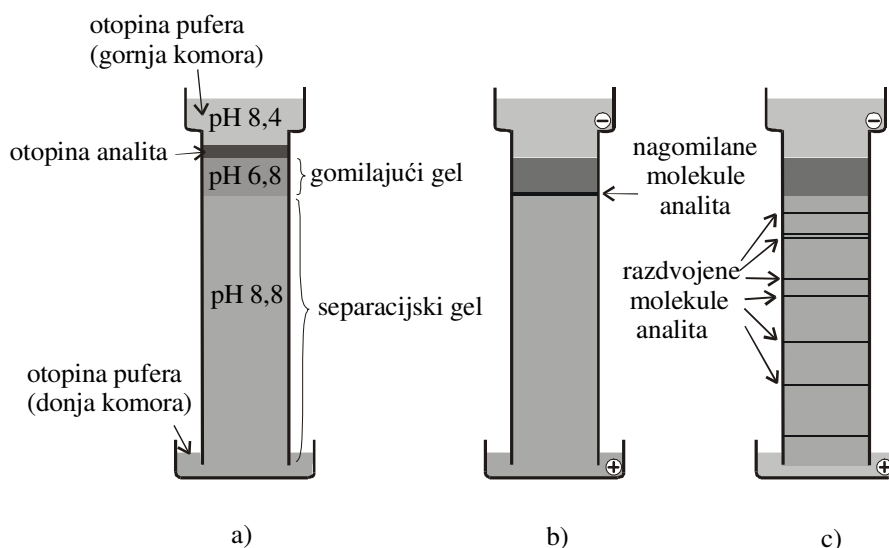
Budući da se nagomilavanje makromolekula analita i njihovo razdvajanje čini u sustavu s diskontinuitetima, i to u sastavu i ionskoj jakosti pufera i strukturi gela, govori se o *diskontinuiranoj elektroforezi* (eng. *Discontinuous*, «Disc», *electrophoresis*).

U metodi koju su izvorno predložili Ornstein¹ i Davis² ostvaruju se vrlo uske separacijske zone makromolekula, što omogućava dobru rezoluciju i osjetljivost detekcije.

Metoda se može činiti na poliakrilamidnom gelu u obliku valjka. Danas se sve više rabi gel u obliku ploče za vertikalnu ili horizontalnu aparaturu. Sve se više rabe vrlo tanki gelovi u obliku ploče, primjenom kojih se postiže brže razdvajanje, bolje oformljene separacijske zone, brže bojenje uz veću učinkovitost bojenja i veću osjetljivost detekcije. Metoda se rabi u analizi nativnih proteina i proteina denaturiranih aditivima (vidi poslije).

Kao što je rečeno, proteini kao zwitter ioni mogu se separirati migracijom u električnom polju kao anioni ili kao kationi, što ovisi o pH otopine u kojoj se čini razdvajanje. U opisu načina nagomilavanja i separacije proteina uz višefazni pufer pretpostavit ćemo pH otopine pufera pri kojem su proteini u anionskom obliku. Budući da je pI većine proteina u rasponu pH = 4 do 7, potreban pH otopina u kojem će proteini biti u anionskom obliku, što možemo učiniti uporabom tris-(hidroksimetil)-aminometana («tris») kao slabe baze koja dijelom neutralizirana s otopinom kiseline (HCl odnosno druga kiselina), daje otopine pufera s pH u granicama od pH = 7 do pH = 9.

Na slici 5.1. pokazan je raspored otopina pufera, gomilajućeg i separacijskoga gela u napravi za *vertikalnu diskontinuiranu elektroforezu*.



Slika 5.1. Raspored otopina pufera u vertikalnoj aparaturi za diskontinuiranu elektroforezu

¹ L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121** (1964) 321.

² B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121** (1964) 404.

Počevši odozgo, prvi sloj čini otopina pufera u gornjoj komori za elektrodu. Kemijski sastav ove otopine pufera razlikuje se od kemijskog sastava drugih pufera. Naime, potreban pH (8,4) učinjen je neutralizacijom trisa s glicinom. Ta otopina pufera sadrži dakle tris, kationski oblik trisa, molekule glicina s neto nabojem nula i njegovu konjugiranu bazu, tj. glicinat ion (anion). Niže uz ovaj sloj nalazi se sloj otopine analita u kojem su makromolekule u anionskom obliku. Potreban pH = 6,8 učinjen je smjesom trisa i solne kiseline. Niže od otopine analita nalazi se sloj gela za nagomilavanje. To je poliakrilamidni gel s velikim porama (mali T) i bez učinka molekularnog sita na putujuće makromolekule. Gel za nagomilavanje sadrži isti pufer kao i otopina analita. Niže od otopine analita nalazi se sloj gela za nagomilavanje. Slijedi separacijski gel s puferom istog molekulskoga sastava (tris i HCl) kao u gelu za nagomilavanje, ali različitog molarnog omjera sastojaka pufera tako da je pH separacijskog gela 8,8, tj. za dvije pH jedinice viši od onog u gelu za nagomilavanje. Dakle, na granici slojeva gela za nagomilavanje i separacijskoga gela postoji *skokovita* promjena pH.

Kao separacijski gel rabi se poliakrilamidni gel s manjim porama (veći T) u kojem se makromolekule razdvajaju zbog razlike u električnoj pokretljivosti ali i pod učinkom gela kao molekularnog sita. Otopina pufera u donjoj komori za elektrode nema učinka na proces nagomilavanja i separacije. Služi za uspostavljanje elektrolitnoga kontakta s metalnom elektrodom i može biti istog sastava kao i otopina u gornjoj komori.

Dakle u stupcu otopina i gela u diskontinuiranoj elektroforezi postoje diskontinuiteti u strukturi gela, pH otopina pufera, ionskoj jakosti i kemijskom sastavu pufera. Svi slojevi u stupcu imaju pH koji osigurava anionski oblik makromolekula tijekom procesa nagomilavanja i separacije.

U procesu nagomilavanja makromolekulskih iona u vrlo tanki sloj temeljnu ulogu imaju glicinat ioni (anion) u gornjem sloju i kloridni ioni u slijednim slojevima pufera. Naime, glicinat ion konjugirana je baza vrlo slabe kiseline glicina s kojom je u dinamičkoj ravnoteži. Položaj ravnoteže, tj. odnos koncentracija glicinat iona i neioniziranoga glicina u otopini ovisi od pH otopine, a on je pak ovisan o odnosu koncentracije trisa i glicina u otopini pufera. Kao u svim slabim elektrolitima, omjer koncentracija glicina i glicinat iona određuje *efektivnu* električnu pokretljivost glicinat iona. Što je manja koncentracija glicinat iona odnosno veća koncentracija neioniziranoga glicina, to će stvarna električna pokretljivost glicinat iona biti manja. Dakle, promjenom pH mijenja se efektivna električna pokretljivost glicinat iona.

Za razliku od glicinat iona, kloridni ioni konjugirana su baza vrlo jake solne kiseline. Zato je u širokom području pH prisutna zanemarivo mala ravnotežna koncentracija neionizirane HCl. Dakle, kloridni ioni u otopini nalaze se kao «slobodni» ioni, i na njihovu stvarnu električnu pokretljivost praktično ne utječe promjena pH otopine. Budući da stvarnu električnu pokretljivost glicinat iona možemo mijenjati promjenom pH medija, izborom

pH otopine pufera možemo uspostaviti stanje u kojem glicinat ioni imaju manju efektivnu električnu pokretljivost od makromolekulskih iona analita.

Slobodni kloridni ioni imaju veliku električnu pokretljivost i oni će migrirati najbrže. U procesu nagomilavanja kloridni ioni imaju ulogu *vodećih* iona, a glicinat ioni *sljedni* su odnosno *prateći* ioni.

Uspostavimo li električni napon između kovinskih elektroda elektroforetske ćelije tako da je gornja elektroda negativna a donja pozitivna, kroz sve slojeve medija (otopine pufera i gelovi) poteći će električna struja. U svakom sloju u stupcu uspostavlja se električno polje, gradijent kojega ovisi o ionskoj jakosti odnosno električnoj vodljivosti dotičnoga sloja. Sve negativne molekulske vrste, tj. glicinat ioni, kloridni ioni i makromolekulski ioni migriraju prema pozitivnoj elektrodi, tj. u našem primjeru prema dolje. Na granici gornje otopine za elektrodu i otopine analita postoji elektrolitni kontakt dviju različitih otopina pufera. Uz zajednički «tris» gornji sloj sadrži glicinat ione, a pufer otopine analita kloridne ione.

Pod učinkom električnog polja kloridni ioni migriraju brzo prema dolje, glicinat ioni ne mogu ih slijediti. Iza migrirajućih klorid iona na rečenoj granici nastaje sloj otopine s viškom pozitivnog naboja, odnosno razdvajaju se električni naboji. Time se uz postojeću razliku stvara *dodatna razlika električnog potencijala* kroz taj sloj otopine. Ta povećana razlika električnog potencijala ubrzava glicinat ione. Istovremeno smanjuje brzinu migracije klorid iona na granici toga sloja otopine. Razlika električnog potencijala u toj granici rast će dok brzina migrirajućih glicinat iona ne dostigne brzinu klorid iona. Uspostavlja se stabilno, *ustaljeno* stanje, s *dvije ravnine naboja*. Prvu čini sloj klorid iona koju slijedi na maloj udaljenosti sloj glicinat iona. Te dvije granice, koje se često nazivaju Kohlrauschove granice (vidi poslije poglavlje Izotahoforeza), čine s jedne strane sloj vodećih klorid iona i na drugoj strani sloj sljednih, *pratećih* glicinat iona koji migriraju sada istom brzinom.

Između tih granica nalazi se vrlo tanki sloj otopine koji s granicama čini tzv. *elektroforetsku zonu*. U tom sloju otopine gradijent električnog potencijala različit je od gradijenta potencijala u drugim dijelovima medija.

Migrirajući prema dolje prednja granica elektroforetske zone pretiče migrirajuće makromolekulske ione analita. Makromolekulski ioni ulaze u elektroforetsku zonu. Zbog razlike električnog potencijala u elektroforetskoj zoni povećava se njihova brzina migracija i makromolekulski ioni u zoni migriraju sada istom brzinom kao i elektroforetska zona. Ulazak makromolekula u elektroforetsku zonu nastavlja se uzduž cijelog sloja otopine uzorka i kroz sloj gela za nagomilavanje. Tako makromolekulski ioni dolaze na granicu gela za nagomilavanje i separacijskoga gela nagomilani u vrlo tankom sloju, tj. u elektroforetskoj zoni između granica vodećih klorid iona i *pratećih* glicinat iona. Debljina sloja nagomilanih makromolekula samo je nekoliko mikrona. Budući da makromolekulski ioni svojim nabojem mijenjaju električne uvjete unutar elektroforetske zone,

količina nagomilanih makromolekula u elektroforetskom sloju izravno ovisi o koncentraciji klorid iona. Na granici gela za nagomilavanje i separacijskoga gela skokovita je promjena pH. Ta promjena pH uzrokuje naglo povećanje brzine migracije glicinat iona. Glicinat ioni zbog povećane brzine migracije prestižu sloj nagomilanih makromolekulskih iona i zajedno s klorid ionima brzo migriraju ispred makromolekulskih iona kroz separacijski gel. Dakle na granici nagle promjene pH *nestaju* Kohlrauschove granice oko nagomilanih makromolekula (eng. akronim: unstacking) i oslobođene makromolekule nezavisno jedna od druge migriraju kroz separacijski gel.

U separacijskom gelu pH i gradijent električnog polja konstantni su. Budući da su veličine pora ovoga gela male, djelatan je učinak molekularnog sita pa će brzina putovanja makromolekulskih iona ovisiti o njihovu naboju, obliku i veličini. Tijekom prolaska kroz separacijski gel nastaje razdvajanje makromolekula u vrlo tanke separacijske zone u kojima su pojedine vrste makromolekula oštro razdvojene jedne od drugih, ovisno o njihovu naboju i veličini. Tako učinkovito razdvojene u uske separacijske zone mogu se lakše detektirati i kvantitativno odrediti.

U opisanom primjeru svi proteini kojima je pI veći od 6,8 migrirat će prema negativnoj elektrodi i tako se u separaciji izgubiti. Za separaciju tih proteina treba izabrati druge sustave pufera.

Nagomilavanje i separacija makromolekula u kationskom obliku obavlja se prema istom načelu i s istim rasporedom slojeva u cijevi odnosno ploči gela. pH i sastav otopina pufera u slojevima je različit, ali u svim slojevima mora biti takav da se makromolekule tijekom nagomilavanja i separacije nalaze u kationskom obliku. U stvaranju elektroforetske zone u kojoj se gomilaju makromolekulski kationi, kao prateći ioni rabi se kationski oblik slabe baze, npr. \exists -alanina ili glicina. (Glicin kao aminokiselina može biti anion u lužnatom mediju, u kojem se ionizira karboksilna skupina, i kation u kiselom mediju, u kojem se proton veže na amino skupinu glicina.) Pufer gornje komore temeljen je na smjesi \exists -alanina i acetatne kiseline ili glicina i acetatne kiseline. U tom puferu mala je koncentracija kationa \exists -alanina odnosno glicina. Efektivna brzina migracija kationskih iona β -alanina i glicina ovisi od pH medija i oni imaju ulogu slijednih iona u stvaranju elektroforetske zone. Kao vodeći rabe se kalijevi ioni, pa se puferi otopine uzorka i slijedni u gelovima pripravlja smjesom acetatne kiseline i otopine KOH u različitim molarnim omjerima za postizanje diskontinuiteta pH u slojevima. Efektivna električna pokretljivost K^+ iona ne ovisi o pH medija. Kalijevi ioni vrlo su slaba konjugirana kiselina jake baze.

5.2. Višefazni pufer

Prethodni opis samo je kvalitativni opis mehanizma nagomilavanja makromolekula u tanki sloj prije separacije. Preliminarne teorijske osnove

elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz višefazni pufer dao je Ornstein¹, koji je istovremeno s Davisom² i prvi primijenio metodu.

Detaljnju teoriju postavio je Jovin³, koji je primijenio i proširio od prije poznatu teoriju *putujućih granica* u slabim elektrolitima⁴ i temeljem termodinamičkih veličina sastavnica pufera, tj. koncentracije i električne pokretljivosti, pK slabih kiselina i slabih baza kao sastavnica pufera i električne provodnosti medija, matematički izračunao i predložio nekoliko stotina sustava pufera za elektroforezu uz višefazni pufer pri različitim vrijednostima pH. Međutim, u praksi se u separaciji bjelančevina rabi samo nekoliko sustava.

U separaciji proteina s relativnom molekularnom masom $<10^4 > 10^6$ u anionskom obliku za otopinu pufera u komorama za elektrode rabi se glicin i tris kao sastavnice pufera (pH = 8,3), tris i HCL kao sastavnice pufera separacijskoga gela (pH = 8,9), tris i fosfatna kiselina za gel za nagomilavanje (pH = 6,9) i tris i HCL za pufer otopine analita (pH = 8,3).

U separaciji proteina, posebno enzima, koji su nestabilni ili gube aktivnost pri visokim pH vrijednostima za otopinu pufera u komorama rabe se tris i dietilbarbiturna kiselina (pH = 7,0), tris i HCl za pufer separacijskog gela (pH = 7,5), tris i fosfatna kiselina (pH = 5,5) kao sastavnica pufera za nagomilavanje i tris i HCl za otopinu analita.

U separaciji bazičnih proteina lizozima, tripsina, histona kao kationa za pufer komore elektrode rabe se \exists -alanin i octena kiselina (pH = 4,5), za separacijski gel octena kiselina i KOH (pH = 4,3), tris i KOH za gel za nagomilavanje (pH = 6,7). Isto vrijedi za pufer otopine analita (pH = 5,0).

U separaciji jako baznih proteina, histona, triptofan enzima, ribonukleaza kao kationskih vrsta, sastavnice otopine pufera komore za elektrode jesu octena kiselina i glicin (pH = 4,0), a octena kiselina i otopina KOH za separacijski gel (pH = 2,9) i gel za nagomilavanje (pH = 5,9) te kao pufer otopine uzorka (pH = 4,0).

5.3. Postupak i naprava

Uređaj za elektroforezu uz diskontinuirani pufer jednak je uređaju rabljenom uz jednolični pufer. U pripremi vertikalnog valjka ili ploče gela najprije se priređuje separacijski gel. Smjesa sastojaka za polimerizaciju

³ T. M. Jovin, *Biochemistry*, **12** (1973) 871., 879., 890., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209** (1973) 477.

⁴ R. A. Alberty, *J. Amer. Chem. Soc.*, **72** (1950) 2361., E. B. Dismukes R. A. Alberty, *J. Amer. Chem. Soc.*, **76** (1954) 191., J. C. Nichol, E. B. Dismukes R. A. Alberty, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80** (1958) 2610.

lijeva se u staklenu cijev ili između staklenih ploča. Smjesa se lijeva 15 mm do gornje granice cijevi ili ploče.

Smjesa u cijevi odnosno između ploča prelije se tankim slojem vode ili 5-15 %-tnom otopinom etanola. Tako nastaje ravna gornja površina gela. Nakon polimerizacije odlije se supernatant. Na formirani separacijski gel nadolijeva se smjesa gela za nagomilavanje. Sloj toga gela debeo je 5-10 mm. U taj se sloj na ploči odmah umeće «češalj» za formiranje jažica odnosno u cijevi se gel prelije vodom ili otopinom etanola da bi nastala ravna površina gela.

U pripremi separacijskoga valjkastoga gela najčešće se primjenjuje kemijska, a za gel za nagomilavanje fotokemijska polimerizacija akrilamida. Budući da uz fotokemijsku polimerizaciju uz niske vrijednosti T i visoke koncentracije Bisa nastaje gel s jednoličnom veličinom velikih pora. Gel s velikim porama nema učinak molekularnoga sita, nego svojom strukturom sprječava konvekciju tijekom procesa nagomilavanja.

Pri kemijskoj polimerizaciji u poliakrilamidnom gelu ostaju tragovi persulfat iona, koji kao jaki oksidansi mogu kemijski reagirati s makromolekulama osjetljivim na oksidaciju.

Gel za nagomilavanje priređen fotopolimerizacijom ne sadrži persulfat ione i izolira makromolekule uzorka od oksidacijskoga djelovanja ostataka amonijeva persulfata u separacijskom gelu. U slučaju velike osjetljivosti makromolekula na tragove persulfat iona, prije formiranja gela za nagomilavanje ostatci persulfat iona iz separacijskoga gela uklanjaju se postupkom prethodne elektroforeze. Pri tom postupku kao elektrolitna otopina u komorama za elektrode rabi se otopina pufera kojom je priređen i separacijski gel. Tijekom procesa persulfat ioni migriraju kroz separacijski gel i tako se uklanjaju.

Nakon prethodne elektroforeze s gornjega sloja gela uklanja se otopina pufera, površina se suši i na nju se lijeva smjesa za polimerizaciju gela za nagomilavanje. Sloj se prekrije vodom ili otopinom etanola za izravnavanje površina i fotopolimerizira se.

Gel za nagomilavanje lijeva se neposredno prije uporabe. Naime, dužim stajanjem zbog difuzije iona iz jednog gela u drugi izgubila bi se potrebna skokovita promjena pH na granici gela. U uporabi gela u obliku ploča obično se provodi kemijska polimerizacija za pripremu separacijskoga gela i gela za nagomilavanje. Tako se radi zbog poteškoća u ravnomjernoj ekspoziciji elektromagnetskom zračenju sloja gela za nagomilavanje tijekom fotopolimerizacije.

U pripremi široko poroznoga gela za nagomilavanje rabe se smjese sastojaka za polimerizaciju s niskim vrijednostima T (3-6 g/100 mL) i visokim vrijednostima C (5-20 %). Za separacijski gel rabe se vrijednosti T od 3 do 30 g/100 mL, ovisno o veličini makromolekula u uzorku. Najmanja veličina pora, uz različite vrijednosti T , postiže uz C od 5 %.

5.4. Priprava otopine analita

U izvornom obliku metode s višefaznim gelom i višefaznim puferom² sloj analita bio je u obliku gela. Gel s makromolekulama formiran je fotopolimerizacijom kao treći sloj nakon gela za nagomilavanje. Istog je sastava i veličine pora kao i gel za nagomilavanje. Time se smanjuje termalna konvekcija u sloju uzorka i tako se postiže nešto bolja rezolucija. Međutim, vrijeme pripreme sustava dulje je te postoji mogućnost kemijske reakcije makromolekula sa slobodnim radikalima koji nastaju tijekom polimerizacije, što uzrokuje denaturaciju makromolekula. Stoga se danas analit unosi u sustav u obliku otopine makromolekulskih iona u odgovarajućem puferu.

Otopini analita dodaje se saharoza za povećanje njezine gustoće. Otopina uzorka veće gustoće bolje priliježe na površinu gela i ima oštru granicu s otopinom pufera gornje komore za elektrodu. Uzorcima s makromolekulama sklonim agregaciji ili taloženju u otopinu analita dodaju se neionski deterdžent ili urea. Najčešće se rabi urea u koncentraciji od 6 do 8 mol L⁻¹, koja djeluje kao blago disocijacijsko sredstvo. Urea se dodaje i u separacijski gel i u gel za nagomilavanje u koncentraciji od 4 do 5 mol L⁻¹. Na taj se način, tijekom nagomilavanja i separacije makromolekule održavaju u disociranom obliku (i sprječava se njihova agregacija). Budući da često i disulfidna veza između aminokiselina makromolekula uzrokuje njihovu agregaciju, taj učinak agregacije uklanja se dodatkom slabih (neioniziranih) redukcijskih sredstava u otopinu analita. Najčešće se rabe 2-merkptoetanol u koncentraciji 0,1 mol L⁻¹ ili ditiotreitrol u koncentraciji 0,02 mol L⁻¹.

Pokazno bojilo, kojom se vizualno može pratiti tok migracije kroz separacijski gel umjesto u otopinu analita može se staviti u otopinu pufera gornje elektrode. Pokazna bojila, npr. metilensko plavo, metilensko zeleno, bromfenol plavo ili pironin Y, koncentriraju se također u elektroforetskoj zoni i kao tanki sloj bojila pristižu na separacijski gel. Migrirajući brže od makromolekula kroz separacijski gel, vrpca boje indicira prednju frontu putujućih makromolekulskih iona na gelu.

Nagomilavanje makromolekula u elektroforetsku zonu može se ostvariti u samom sloju otopine analita. Dakle, nagomilavanje i separacija mogu se učiniti i bez sloja gela za nagomilavanje. Gel za nagomilavanje, svojim kemijskim sastavom i pH, određuje potreban odnos efektivnih brzina migracije vodećih i pratećih iona, a svojom strukturom sprječava termalnu konvekciju u sloju. Međutim, ako su pH i ionska jakost otopine uzorka takvi da osiguravaju stvaranje stabilne elektroforetske zone, učinkovito nagomilavanje ostvarit će se u samom sloju otopine uzorka.

Uz volumen otopine analita od 10 do 20 μL , migracija elektroforetske zone kroz sloj otopine analita traje samo nekoliko sekundi pa je učinak termalne konvekcije zanemariv. Makromolekulski ioni pristižu na granicu separacijskoga gela nagomilani slično kao i uz primjenu gela za nagomilavanje. Tako se i bez gela za nagomilavanje postiže približno jednaka rezolucija separacije.

Može li se, u konkretnom slučaju, izbjeći uporaba gela za nagomilavanje, potrebno je utvrditi eksperimentom. Ako je to moguće, primjena elektroforeze uz višefazni pufer nije ništa eksperimentalno složenija i vremenski dulja od elektroforeze uz istovrsni pufer. Međutim, elektroforezom uz višefazni pufer ostvaruje se znatno bolja rezolucija razdvajanja makromolekula u stupcu separacijskoga gela.

5.5. Selektivno nagomilavanje

Izborom kemijskog sastava pufera i varirajući pH u gelu za nagomilavanje može se provesti i selektivno nagomilavanje. Tako se mogu nagomilati potrebne makromolekulske vrste, a ostale vrste, koje su nečistoće, ostaju izvan elektroforetske zone ili obratno. Nagomilane molekulske vrste skupljene u elektroforetskom sloju brže migriraju i odvojene od ostalih sastojaka pristižu na granicu separacijskoga gela.

Postupak selektivnog nagomilavanja naročito je koristan u preparativnoj elektroforezi uz višefazni pufer.

5.6. Električni uvjeti elektroforeze

U diskontinuiranoj elektroforezi najčešće se rabi postupak uz kontrolu jakosti električne struje. Naime, migracija ionskih granica kroz slojeve u stupcu uzrokuje promjenu električne otpornosti, što uz kontrolirani napon elektroforeze ima za posljedicu znatne fluktuacije jakosti struje, a time i nestalnost oslobođene topline te promjenjivost zagrijavanja u stupcu. Zato se u elektroforezi uz višefazni pufer rabi električni izvor koji omogućuje kontrolu jakosti električne struje. Danas se sve više rabe električni izvori koji omogućuju kontrolu električne snage.

Detekcija vrpca u stupcu separacijskoga gela, tj. bojenje, kvantifikacija makromolekula u vrpca i prijenos na drugu membranu, obavlja se istim metodama koje su opisane u poglavlju elektroforeze na poliakrilamidnom gelu uz istovrsni pufer.

5.7. Primjena

Elektroforeza uz višefazni pufer tehnika je velike rezolucije i široko se rabi u analizi i preparativnom razdvajanju makromolekula iz (njihovih) smjesa. Rabi se u analizi različitih električki nabijenih molekulskih vrsta. Za analizu je dostatno samo nekoliko :g uzorka. Rabi se u separaciji proteina, lipoproteina, glikoproteina, mukopolisaharida, nukleinskih kiselina, peptida itd., uz znatno višu rezoluciju od rezolucije koja se može ostvariti u elektroforezi na poliakrilamidnom gelu uz istovrsni pufer. Metoda se primjenjuje i u preparativnoj elektroforezi. Temeljem velike rezolucije rabi se u analizi heterogenosti makromolekula pri reakcijama asocijacije (agregacije) i disocijacije, u reakcijama vezanja liganada, studiju varijanata proteina i glikoproteina, u utvrđivanju gradbene raznolikosti u sadržaju sialinske kiseline, fosfatnih i amido skupina, u utvrđivanju promjena nastalih kemijskim ili enzimatskim reakcijama, u detekciji konformacijskih izomera, odnosno izoenzima. Primjenjuje se u sudbenoj (forenzičkoj) znanosti zbog mogućnosti separacije i detekcije sličnih makromolekula iz vrlo malih količina uzorka, te u kliničkoj dijagnozi različitih oboljenja. Metodom elektroforeze uz višefazni pufer mogu se utvrditi promjene na makromolekulama proteina i nukleinskih kiselina nastale tijekom sporih procesa evolucije ili brzim promjena u industrijskoj obradi biološkog materijala. Tako analiza proteina krvi i mlijeka nalazi primjenu u taksonomiji nestalih i živućih bioloških vrsta, kao jedna od metoda određivanja razvojnog stabla evolucije. Naročito široku primjenu ima u analizi brzih promjena na makromolekulama tijekom industrijskih preradbenih procesa u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji, posebice u kontroli kvalitete. Brzo se mogu utvrditi pojave bakterijske razgradnje proteina. Mogu se utvrditi promjene zbog kvarenja prehrambenih proizvoda tijekom dugotrajnijeg skladištenja, a koje uzrokuju termičko otporni bakterijski enzimi, tj. proteaze i lipaze ostale u namirnici nakon termičke obrade biološkoga materijala i razaranja bakterija, promjena na makromolekulama zbog kemijskih reakcija među sastojcima proizvoda (npr. Maillardove reakcije). Široko se primjenjuje pri utvrđivanju patvorina u prehrambenim proizvodima, npr. sadržaj kravljeg mlijeka u deklariranim kozjim ili ovčjim sirevima, u identifikaciji varijeteta sastojaka, npr. tvrde ili meke pšenice, varijeteta krumpira, vrsta (kultivara) leguminoza te različitih vrsta mesa i ribe. Kvantitativnim mjerenjem količine makromolekula u elektroforetskim vrpcama mogu se odrediti kvantitativni odnosi sastojaka u miješanim prehrambenim artiklima, npr. sadržaj jaja u kolačima ili proteina soje u mesnim proizvodima.

6. ODREĐIVANJE RELATIVNE MOLEKULSKE MASE ELEKTROFOREZOM NA POLIAKRILAMIDNOM GELU

Veličina molekula odnosno relativna molekulska masa molekula od velike je važnosti u molekularnoj biologiji. Veličina molekule proteina neizravno upućuje na broj sadržanih gena odnosno veličinu slijednih ribonukleinskih kiselina (mRNA). Promjena u veličini molekula određene vrste upućuje na namjerne ili nenamjerne reakcije u kojima ta vrsta sudjeluje tijekom postupka pridobivanja ili pročišćavanja. Eksperimentalno određena relativna molekulska masa kriterij je i čistoće dotične molekulske vrste.

U elektroforetskoj separaciji na poliakrilamidnom gelu na brzinu migracije makromolekula kroz separacijski gel utječu električni naboj čestice i njezina veličina. Električni naboj čestice proteina ovisi o kemijskoj građi, tj. o broju i stupnju ionizacije kiselih odnosno baznih funkcijskih skupina na makromolekuli. Stupanj ionizacije ovisi o pH medija. Održavanjem stalne vrijednosti pH u svim dijelovima medija kroz koji čestica prolazi održava se konstantnim i njezin stvarni električni naboj.

Prirodni naboj molekula proteina može se promijeniti denaturacijom, tj. reakcijom proteina s anionskim deterdžentom. Pri tom se anionski deterdžent veže na polipeptidne lance proteina. Nastaju kompleksne čestice s konstantnim odnosom naboja i mase odnosno naboja i duljine polipeptidnog lanca proteina. Naboj takvih kompleksnih vrsta nije ovisan o prirodnom naboju molekule proteina (vidi kasnije). Učinak veličine molekule proteina na brzinu migracije kroz gel ovisi o odnosu veličine molekule prema veličini pora gela.

Teorijske osnove za određivanje veličine makromolekula elektroforezom dao je Ferguson¹, i to izvorno uz uporabu gela od škroba. Kasnije je to primijenjeno na poliakrilamidni gel². Drži li se stvarni električni naboj čestice konstantnim, mjerenjem brzine odnosno prijedena puta migracije čestice kroz gel različite veličine pora i uspoređivanjem te brzine s brzinom migracije molekula slične ali poznate veličine odnosno poznate relativne molekulske mase, može se odrediti nepoznata relativna molekulska masa ispitivanih molekula.

¹ K. A. Ferguson, *Metabolism*, **13** (1964) 985.

² J. L. Hedrick, A. J. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, **126** (1968) 155.

6.1. Fergusonov prikaz

Struktura i veličina pora poliakrilamidnoga gela ovisi o ukupnoj koncentraciji monomera, tj. o veličini T i o prostornoj umreženosti ovisnoj o veličini C . Dakle, veličine T i C utječu na učinak gela kao molekularnog sita na brzinu migracije čestica kroz gel.

Drže li se uvjeti elektroforeze konstantnim, brzina putovanja molekula kroz gel može se iskazati duljinom prijednoga puta molekula tijekom trajanja elektroforeze. Brojčanu vrijednost toga puta iskazanog u milimetrima nazivamo, uobičajeno, *mobilnost* (m) te molekulske vrste. Relativnom mobilnošću naziva se omjer toga prijednoga puta i prijednog puta molekula obilježivača.

Ulogu obilježivača može imati pokazno bojilo koje se uobičajeno rabi za praćenje toka elektroforeze ili neki protein (standard) male molekulske mase s migracijom većom od analiziranih molekulskih vrsta.

Mobilnost odnosno relativna mobilnost čestica ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su pH, ionska jakost, temperatura, kemijski sastav pufera, uvjeti polimerizacije gela i dr. Drže li se sve te čimbenike konstantnim, mjerenjem mobilnosti ili relativne mobilnosti, mogu se utvrditi učinci strukture i veličine pora odnosno veličina T i C na migraciju molekula različitih molekulskih mase.

Na temelju eksperimentalnih mjerenja pokazano³ je da uz konstantnu vrijednost T postoji linearan odnos između logaritma mobilnosti (zapravo brojčane vrijednosti mobilnosti izražene u mm) i dugog korijena veličine C u poliakrilamidnom gelu. Drži li se veličina C konstantnom, mjerenjem mobilnosti pojedine molekulske vrste može se utvrditi učinak promjene veličine T na migraciju te molekulske vrste kroz gel.

Pokazano je da uz konstantni C postoji linearan odnos između logaritama mobilnosti i koncentracije monomera, tj. veličine (T). Dakle, pravac je grafički prikaz logaritma (brojčane vrijednosti) mobilnosti ili relativne mobilnosti i veličine T .

U Fergusonovu prikazu m je odrezak na ordinati. K_R je *koeficijent usporavanja*, što kvantitativno iskazuje učinak gela kao molekularnoga sita na migraciju molekule određene veličine i proporcionalan je relativnoj molekulskoj masi dotične molekulske vrste. Na Fergusonovu prikazu iskazan je nagibom pravca.

³ W. Thorun and H. R. Maurer, u: *Disc electrophoresis and related Techniques of polyacrylamide gel electrophoresis* (Ed. H. M. Maurer), str. 4. Walter de Gruyter, Berlin, New York (1971).

Iskazano matematičkom relacijom:

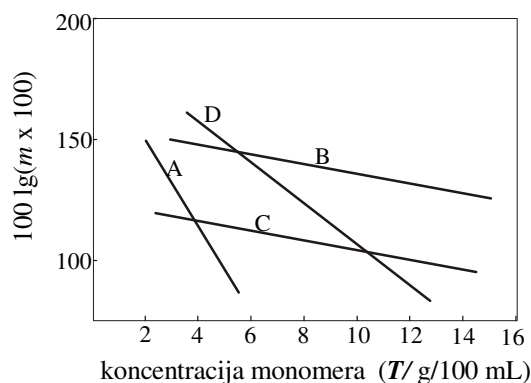
$$\lg m = \lg m_o - K_R T \quad (6-1)$$

odnosno

$$\lg m_r = \lg m_{r,o} - K_R T \quad (6-2)$$

gdje su: m_o i $m_{r,o}$ mobilnost odnosno relativna mobilnost uz $T = 0$. To su zapravo mobilnost odnosno relativna mobilnost u slobodnoj otopini.

Na slici 6.1. pokazan je Fergusonov prikaz ovisnosti mobilnosti za četiri vrste molekula, od kojih molekule A imaju najveći radijus i najveći električni naboj, molekule B i C istog su radijusa, ali različitog naboja. Molekule B imaju veći električni naboj od molekula C, molekule D imaju električni naboj koji je između naboja molekula A i B, a radijus im je veći od radijusa molekula B.



Slika 6.1. Fergusonov prikaz ovisnosti logaritma mobilnosti o koncentraciji monomera (T). Nagib pravca za velike molekule (A) pokazuje pretežiti učinak molekularnoga sita na migraciju. Ta vrsta molekula ne može migrirati kroz gel ako je $T >$ od 6 g/100 mL. Na molekule (B i C) učinak molekularnoga sita manji je i njihova migracija poglavito je određena stvarnim električnim nabojem molekula. Jednaki učinak (paralelni pravci) molekularnog sita na molekule B i C upućuje na to da su im radijusi molekula jednaki. Naboj molekula D veći je od molekula B, ali i radijus im je znatno veći, što se očituje u znatnom učinku molekularnog sita.

Eksperimentalno je utvrđen linearan odnos između koeficijenta usporavanja i relativne molekulske mase čestica. Koeficijent usporavanja pojedine molekulske vrste može se odrediti iz Fergusonova prikaza iz izmjerenih mobilnosti te molekulske vrste uz različite vrijednosti T.

Odrede li se, pod istim eksperimentalnim uvjetima, koeficijenti usporavanja većeg broja proteina poznate molekulske mase, utvrdit će se

linearan odnos između vrijednosti K_R proteina (standarda) i njihove relativne molekulske mase (M_r). Prikaz tog linearnog odnosa jest *baždarni pravac* s pomoću kojeg se može, iz izmjerenog koeficijenta usporevanja, očitati M_r nepoznatog proteina.

Dakle, za eksperimentalno određivanje relativne molekulske mase nepoznatog proteina potrebno je odrediti koeficijent usporevanja tog proteina pod istim uvjetima pri kojima su određeni koeficijenti usporevanja veće broja proteina standarda poznate relativne molekulske mase. Pokazano je da je za točno izračunavanje koeficijenta usporevanja potrebno obaviti mjerenje uz najmanje 7 različitih vrijednosti T . Iz izmjerenih vrijednosti mobilnosti (ili relativne mobilnosti) statistički se izračunava regresijski pravac. Njegov nagib koeficijent je usporevanja (K_R) za određenu molekulsku vrstu.

Potrebno je naglasiti da je linearan odnos K_R i M_r eksperimentalno utvrđena činjenica i zasada bez teorijskog objašnjenja.

Mjerenje K_R proteina standarda i nepoznatog uzorka moraju se obaviti pod istovjetnim eksperimentalnim uvjetima. Upozoreno je i na neka odstupanja od linearnosti odnosa K_R i M_r uzrokovana odstupanjem specifičnog volumena proteina od tipične prosječne vrijednosti od 0,73 - 0,74 ml g⁻¹, te zbog većeg odstupanja od kuglastog oblika molekula i postojanja različitih konformacijskih oblika molekule proteina. Prisutnost ugljikohidrata (npr. u glikoproteinima), lipida (npr. u lipoproteinima) ili drugih prostetskih skupina (grupa) može uzrokovati odstupanja od linearnosti. Uz sva ograničenja linearan odnos logaritma mobilnosti prema vrijednosti veličine T u Fergusonovu prikazu eksperimentalno je utvrđen za vrijednosti T od 3 do 30 g/100 mL i vrijednosti C u granicama od 1 do 5 %. To vrijedi za molekulske vrste s M_r od 45 000 do 670 000.

U mjerenju se rabi pH pufera od 3,6 do 10,2. Dakle, metoda je primjenjiva za određivanje relativne molekulske mase proteina u kationskom ili anionskom obliku. Zbog poteškoća, uočenih u nekim slučajevima, u izračunavanju M_r iz linearnog odnosa K_R i M_r predložena je uporaba i eksperimentalno utvrđenog linearnog odnosa između drugoga korijena K_R i radijusa makromolekule za izračunavanje relativne molekulske mase⁴.

Osim za određivanje M_r , Fergusonov prikaz može se rabiti za utvrđivanje najpovoljnijih uvjeta pri elektroforetskoj separaciji dviju različitih molekulskih vrsta. Naime, nagib pravca koji iskazuje linearan odnos između logaritma mobilnosti i vrijednosti veličine T najčešće je različit za različite vrste molekula. Iz međusobnih odnosa pravaca jedne i druge vrste mogu se očitati vrijednosti veličine T pri kojoj su razlike u migraciji najveće. Pri tim vrijednostima T elektroforetska separacija bit će najbolja, odnosno može se očitati vrijednost T pri kojoj su im migracije

⁴ D. Rodbard, A. Chrambach and G. H. Weiss, u: *Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel* (Ed. R. C. Allen and H. R. Maurer), str. 62. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1974.

jednake. To je vrijednost T pri kojoj se pravci u Fergusonovu prikazu sijeku. Uz tu vrijednost T te se dvije molekulske vrste ne mogu elektroforetski separirati.

6.2. Gel s gradijentom poroznosti

Budući da je migracija molekula kroz gel ovisna o veličini (odnosno radijusu) molekula i veličini pora gela, bolja separacija, osobito u analizi smjesa s velikim rasponom veličine molekula, može se učiniti primjenom gela s *gradijentom poroznosti*. U tom se gelu veličina pora od gornje strane gela naniže postupno smanjuje.

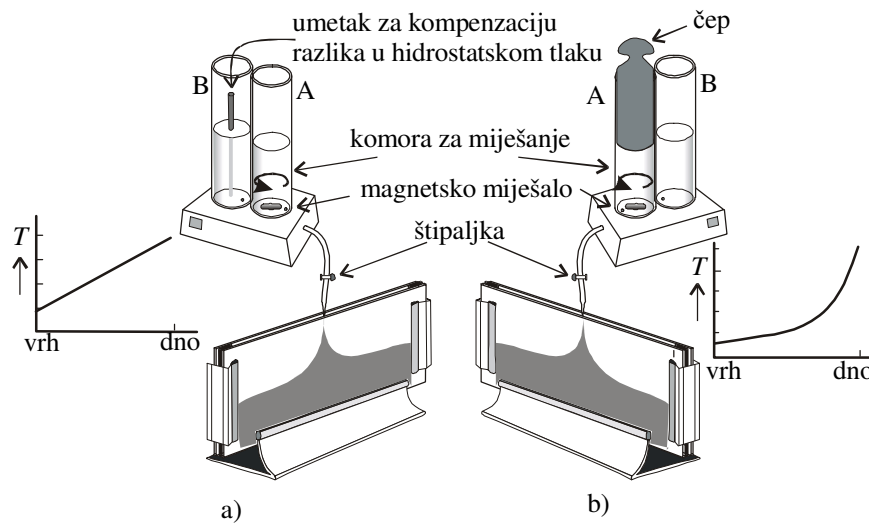
U separaciji na gelu s gradijentom poroznosti brzina migracije molekula tijekom elektroforeze opada s vremenom. Naime, kada molekule određene veličine dostignu graničnu veličinu pora, one se usporavaju. Makromolekule proteina nisu kompaktne čestice nepromjenjivoga kuglastog oblika (klupko), već se mogu izdužiti i tako deformirane migrirati kroz pore koje su manjeg radijusa od njihova Stokesova radijusa koji imaju u slobodnoj otopini. Tako molekule mogu migrirati i kroz gel kojem su pore manje od njihova Stokesova radijusa, ali manjom brzinom. Kada sve molekule analita dostignu graničnu veličinu pora, one migriraju sporije i pri tom održavaju stabilan redosljed zona (vrpci) razdvojenih molekulskih iona u gelu.

Uporabom gela s gradijentom poroznosti postiže se bolja separacija s užim zonama razdvajanja. Razlog je tome što molekule na prednjoj granici zone putuju kroz koncentriraniji gel od molekula na zadnjoj granici. Zbog većeg otpora migraciji na prednjoj granici smanjuje se širina zone. Uz uže zone međusobno razdvajanje zona bolje je. Postoje i druge prednosti gela s gradijentom poroznosti. Budući da se nakon početnog «prosijavanja» molekula u dijelu gela s većim porama uspostavlja stabilan raspored separiranih vrpci, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu s gradijentom poroznosti može se učiniti uz manje rigorozne električne uvjete. Nije prijeko potrebno rabiti električne izvore s kontrolom napona ili kontrolom jakosti struje odnosno električne snage. Dostatan je izvor istosmjerne struje s izlaznim naponom od 50 do 300 V. Obično vrijeme separacije jest 4 do 8 sati ili dulje. Budući da separirane makromolekule dostignu granične veličine pora, gdje im je brzina difuzije znatno smanjena, gel se nakon elektroforeze može čuvati i nekoliko dana a da pri tom ne nastane znatni gubitak rezolucije odnosno miješanja (prekrivanja) vrpci. U tom vremenu mogu se obaviti različita preliminarna ispitivanja na gelu prije nego se odluči o konačnom načinu detekcije i kvantifikacije.

Gel s gradijentom poroznosti čini se polimerizacijom gela s gradijentom koncentracije monomera. Gradijent koncentracije monomera u gelu može biti linearan, konkavan, konveksan ili drugog oblika, ovisno o ciljevima koje se žele postići u separaciji. Najčešće se rabi gel s linearnim ili slabo konkavnim gradijentom koncentracije. Gradijent veličine pora nije istovjetan s gradijentom koncentracije. Veličina pora funkcija je $1/\sqrt{T}$.

6.3. Priprava gela s gradijentom poroznosti

Gel s gradijentom poroznosti može se pripremiti u obliku valjka ili u obliku ploče. Čini se lijevanjem smjese dviju otopina različitih koncentracija monomera u kalup za polimerizaciju. Budući da se elektroforeza u gelu s gradijentom poroznosti praktično uvijek čini usporedno s elektroforezom molekula standarda, to je bolje učiniti na gelu u obliku ploče. Uz uporabu gela u obliku ploče usporedba se čini na istom gelu, a to znači pod potpuno jednakim uvjetima s obzirom na gradijent poroznosti i ostale uvjete separacije. Zbog poteškoća u pripremi više gelova s potpunim jednakim gradijentom poroznosti to se ne može postići s gelovima u obliku valjka. Elektroforeza na gelu s gradijentom poroznosti čini se na vertikalnoj ili horizontalnoj aparaturi za elektroforezu.



Slika 6.2. Shematski prikaz naprave za pripremu poliakrilamidnog gela s linearnim (a) i s konkavnim gradijentom koncentracije (b)

Za pripravu gela s gradijentom poroznosti rabi se jednostavna naprava koja omogućuje kontinuirano miješanje dviju otopina različitih koncentracija monomera. U dvije posudice jednakog oblika nalaze se dvije otopine različitih koncentracija monomera. Otopina niže koncentracija (npr. $T = 4$ g/100 mL) u posudici je B. Otopina više koncentracija (npr. $T = 26$ g/100 mL) u posudici je A. Posudice su povezane međusobno s uskom cijevi (kanalom) s ventilom na dnu posudica. S tom cijevi održava se hidrostatska ravnoteža otopina u posudicama, tj. održava se isti hidrostatski tlak otopina na dnu u obje posude. Rabe se jednaki volumeni otopina, koje uz monomere sadrže i ostale sastojke, osim katalizatora, koji se dodaje neposredno prije lijevanja gela. Volumeni otopina određeni su volumenom činjenoga gela.

Da bi hidrostatski tlak u obje posude bio isti, umetkom se podiže razina otopine manje gustoće i tako se kompenzira razlika u gustoći (slika 6.2.a).

Da bi se smanjilo miješanje slojeva otopina različitih koncentracija u kalupu za polimerizaciju otopinama, povećava se gustoća i viskoznost dodatkom saharoza ili glicerola. U lijevanju otopina za polimerizaciju za vertikalnu ploču gela otopini veće koncentracije monomera dodaje se više glicerola ili saharoze (do 25 %), a otopini manje koncentracije manje (npr. 2 %). Tako se gustoća otopine u kalupu za polimerizaciju smanjuje od dna prema vrha kalupa isto kako se smanjuje i koncentracija monomera u gelu. Uspostavljanjem gradijenta gustoće u otopini za polimerizaciju postiže se pravilniji (jednolični) gradijent koncentracije odnosno poroznosti po cijeloj širini ploče gela.

U napravi za miješanje otopina najprije se puni posudica B s otopinom manje koncentracije. Kratkotrajnim otvaranjem ventila na spojnoj cijevi između posudica ispuni se istom otopinom. Zatim se puni posudica A s otopinom veće koncentracije. U obje otopine se, uz miješanje, tada dodaje otopina katalizatora.

Otvaranjem ventila u cijevi između posudica i štipaljke na izlaznoj cijevi otopina iz posudica A istječe u kalup za polimerizaciju. Istjecanjem otopine iz posude A, istovremeno iz posude B teče razrijeđena otopina spojnom cijevi u posudicu A. Volumen otopine koja iz posude B isteče u posudu A pola je volumena otopine koja iz posude A oteče u kalup za polimerizaciju. Tako se razine otopina u obje posudice ravnomjerno smanjuju. Tim načinom miješanja otopina, koncentracija otopine u posudici A, koja se neprekidno miješa, smanjuje se linearno. Tako i gel učinjen ovim načinom ima linearni gradijent koncentracije odnosno linearnu promjenu veličine T (slika 6.2.a)

Začepi li posudica A kao što je pokazano na slici 6.2.b, ostaje ista razina tekućine u posudici A iz koje istječe otopina. Koliko tekućine istječe iz posudice A, toliko pretiče iz posudice B u posudicu A. Koncentracija se u posudici A mijenja nelinearno, a takav je i gradijent koncentracije gela dobivenog lijevanjem u kalup.

Kalup za polimerizaciju može se puniti ulijevanjem odozgo (načelo prikazano na slici 6.2.) ili potiskivanjem otopine kroz kalup odozdo prema gore. Rabi li se taj drugi način, onda u posudicama raspored otopina mora biti obratan, tj. koncentriranija otopina u posudici B, a razrjeđenija u posudici A. Taj se način lijevanja rabi u istovremenom punjenju većeg broja cijevnih ili pločastih kalupa smještenih u komore za lijevanje. U jednom i u drugom načinu punjenja koncentracija gela raste odozgo prema dolje. Istim smjerom smanjuje se veličina pora.

Opisane su mnoge varijante pripreve gela s gradijentom. Uporabom i treće posudice može se pripraviti gel s konveksnim gradijentom koncentracije.

Rabe se i mnogi komercijalni uređaji za lijevanje gela s gradijentom koncentracije, temeljeni na opisanom načelu. Međutim, danas se sve više rabe višekanalne peristaltičke pumpe, s pomoću kojih se promjenom kapaciteta pumpanja otopina u komoru za miješanje i kapaciteta pumpanja u kalupe za polimerizaciju mogu dobiti gelovi s linearnom, konveksnom ili konkavnim gradijentom koncentracije.

Odmah nakon lijevanja gela, u gornji sloj gela umeće se češalj kojim se formiraju jažice za unošenje otopine analita. Ako se želi nanijeti i sloj gela za nagomilavanje, onda se nadsvodno na gel unese sloj vodene otopine izopropanola. Time se spriječi prodor kisika iz zraka u gel (inhibira polimerizaciju) i postiže ravna gornja površina gela. Nakon završene polimerizacije površinski se sloj ispiranjem ukloni i na separacijski gel lijeva se gel za nagomilavanje u koji se umeće češalj za formiranje jažica.

Na tržištu se mogu nabaviti gotovi poliakrilamidni gelovi sa stabilnim i reproducibilnim gradijentom poroznosti koji sadrže i specificiranu vrstu pufera. Izvorni pufer može se promijeniti prethodnom elektroforezom u željenom puferu prije unošenja otopine analita u jažice na gelu.

Raspon granica veličine T ovisi o vrsti analita. Za većinu proteinskih uzoraka prikladne su koncentracije (T) od 4 do 30 g/100 mL. Za proteine relativne molekularne mase od 100 000 do 500 000 i za nukleinske kiseline do 30 S gelovi koncentracije od 2,5 do 16 g/100 mL. Vrijednost C redovito je 5 %, i to u jednoj i drugoj otopini za pripremu gela.

Elektroforeza na gelu s gradijentom poroznosti traje od 15 sati do 24 sata uz napon od 100 do 150 V, a 3 do 6 sati uz napon od 300 V, što su orijentacijski uvjeti. Stvarni se uvjeti moraju utvrditi pokusom. Elektroforeza se čini sve dok sve molekulske vrste analita u razdvajanju ne dostignu graničnu veličinu pora.

Bojenje i detekcija razdvojenih vrpca na gelu s gradijentom poroznosti čine se na isti način kao na homogenom poliakrilamidnom gelu.

Uporabom gela s gradijentom koncentracije olakšano je približno određivanje relativne molekulske mase makromolekula.

Naime, to se može činiti samo jednim elektroforetskim mjerenjem. Utvrđeno⁵ je da, uz uporabu gela s linearnim gradijentom koncentracije i uz uvjet da su u razdvajanju molekule dostigle granične veličine pora, postoji linearan odnos između logaritma mobilnosti određene molekulske vrste i logaritma njezine relativne molekulske mase (M_r). To vrijedi za gelove s granicama koncentracije 5 do 30 g/100 mL, i to za molekule kojima je M_r od 32 000 do 480 000. U širem području taj je odnos sigomidan. Za određivanje pojedinačne relativne molekulske mase u smjesi proteina dovoljno je u ispitivani uzorak dodati dvije molekulske vrste standarda poznatih M_r . Iz linearnog odnosa logaritma duljine puta migracije i $\lg M_r$ molekula standarda temeljem mjerenja duljine puta migracije analiziranih molekula može se procijeniti M_r sastojaka analita. Točnost određivanja M_r na gelu s gradijentom koncentracije jednaka je točnosti koja se postiže pri određivanju iz serije mjerenje na gelovima jednolične koncentracije.

Određivanje M_r makromolekula temeljem Fergusonova prikaza, tj. primjenom serije mjerenje na gelovima s različitim vrijednostima T ili primjenom gela s gradijentom koncentracije mogu se odrediti M_r nukleinskih kiselina, proteina i glikoproteina u rasponu M_r od 13 000 do 900 000.

Određivanjem veličine makromolekula u njihovom prirodnom (nativnom) obliku, tj. bez prethodne denaturacije i mjerenjem uz blage uvjete denaturacije, mogu se odrediti različite vrste agregacija odnosno vezanje liganada na makromolekule.

⁵ G. G. Slater, *Anal. Chem.*, **41** (1969) 1039.

7. ELEKTROFOREZA NA POLIAKRILAMIDNOM GELU U PRISUTNOSTI ADITIVA

Analit za elektroforetsku analizu na gelu mora biti u otopini. U analizi bioloških tkiva, stanica i membrana rabe se različite metode otapanja sadržanih lipida i proteina. Za otapanje, inače u vodi netopljivih makromolekula, rabe se otapala koja sadrže fenol, octenu kiselinu ili ureu u velikoj koncentraciji. Danas se u pripravi otopina bioloških materijala rabe neionski, amfoterni zwitterionski, kationski i anionski deterdženti. Deterdženti cijepaju veze između proteina i lipida te između proteina i proteina, i tako omogućuju topljivost. Nemaju učinak na ionske veze i ionske interakcije. Na ionske interakcije može se utjecati promjenom pH otapala. Deterdženti se rabe pojedinačno ili u smjesi.

Disulfidne veze između pobočnih lanaca aminokiselina, koje održavaju trodimenzionalnu strukturu bjelančevina, cijepaju se redukcijom sa slabim redukcijskim sredstvima. Kao slaba redukcijska sredstva najčešće se rabe 2-merkaptoetanol ili ditiotreitol (DTT).

Deterdženti zajedno sa slabim redukcijskim sredstvima denaturiraju proteine. Potpunom denaturacijom i disocijacijom proteina razara se kvarterna (agregacije) i terciarna struktura proteina, uz stvaranje ogoljenih polipeptidnih lanaca i nastajanje konfiguracije tzv. slučajnog klupka. Natrijev dodecilsulfat (SDS), anionski deterdžent jako je denaturirajuće sredstvo koje se i veže na polipeptidne lance. Djelovanjem SDS, uz redukciju disulfidnih veza, cijepaju se intramolekulske i intermolekulske vodikove veze, poništavaju se hidrofobne interakcije, sprječava se agregacija proteina te se razmatavaju polipeptidni lanci (poništava se sekundarna struktura) i formiraju se elipsoidne strukture polipeptidnih lanaca na koje su vezani ioni SDS-a. Vezanjem SDS-a na polipeptidne lance nastaju kompleksi negativnog električnog naboja. Broj iona deterdženta koji se vežu na peptidni lanac jednak je polovici broja preostalih aminokiselina na lancu. Približno 1,4 g SDS veže se na 1 g proteina. Količina vezanog SDS nije ovisna o sekvenciji baza peptidnog lanca odnosno vrsti proteina. Svojim nabojem i velikom količinom SDS praktično poništi prirodni naboj proteina. Polipeptidni lanci na koje su vezani ioni SDS-a postaju negativno nabijeni prutići s konstantnim odnosom naboja i mase, tj. konstantnom gustoćom

naboja odnosno konstantnim nabojem po jedinici duljine lanca. U elektroforezi kompleksne čestice (polipeptid-SDS) migriraju prema pozitivnoj elektrodi. Brzina migracije ovisi o efektivnom, Stokesovu, radijusu čestice. On je pak proporcionalan relativnoj molekularnoj masi kompleksne specije – čestice.

Za pripremu otopina bioloških uzoraka za elektroforezu rabe se neionski deterdženti Lubrol W, Brij 35, Tween 80 i Triton (najčešće Triton X-100); kationski cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) i cetilpiridinium klorid (CPC); zwitterionski 3-[(3-kolamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propan sulfonat (CHAPS); anionski deoksikolat (DOC) i najčešće natrijev dodecilsulfat (SDS).

Neionski deterdženti redovito ne denaturiraju proteine. Ne utječu na nativni naboj proteina tako da razdvajanje proteina u elektroforezi u prisutnosti neionskih deterdženata ovisi o nativnom električnom naboju i masi (veličini) molekula proteina. Nalaze primjenu u metodama izoelektričnog sabiranja (vidi poslije).

Kationski deterdženti rabe se u elektroforezi jako kiselih i bazičnih proteina koji se ne mogu uspješno razdvojiti uz SDS.

Zwitterionski deterdženti blažeg su djelovanja, ne utječu na nativni naboj proteina, rabe se u otapanju membranskih proteina i nalaze primjenu kao i neionski deterdženti u razdvajanju pri izoelektričnom sabiranju.

Deterdženti jačeg djelovanja poništavaju enzimsku ili hormonsku aktivnost makromolekula. Uz uporabu deterdženta slabijeg djelovanja mogu se održati neke biološke aktivnosti. Učinak deterdženta na biološku aktivnost ne može se predvidjeti i može se utvrditi samo pokusom.

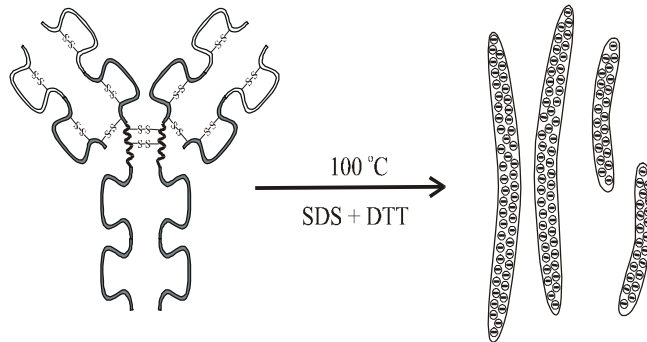
7.1. SDS-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

U analizi proteina najčešće se rabi SDS, a primjenu su predložili Shapiro i sur¹. U SDS-elektroforezi (eng. akronim SDS PAGE electrophoresis) razdvajanje makromolekula temelji se isključivo na razlici u masi molekula. Naime, kompleksne strukture SDS-protein imaju istu gustoću (negativnog) električnog naboja.

Razaranjem, djelovanjem SDS-a, tercijarne i sekundarne strukture molekula proteina poništava se i učinak oblika molekula na brzinu migracije. Migracija ovisi samo o masi čestice. Sve kompleksne strukture, protein-SDS, imaju elipsoidnu strukturu s identičnom centralnom osi.

¹ A. L. Shapiro, E. Viñuela, J. V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28** (1967) 815.

Kvalitativna analiza sastojaka analita u SDS-elektroforezi temelji se na određivanju relativne molekulske mase sastojaka analita u usporedbi s molekulskim masama poznatih molekula standarda. Već je pokazano da se, mjerenjem migracije ili relativne migracije pojedine molekulske vrste na većem broju gelova različitih koncentracija, može iz Fergusonovih prikaza izračunati koeficijent usporavanja (K_R) pojedine molekulske vrste. Iz empirijski utvrđenog linearnog odnosa $\lg K_R$ prema $\lg M_r$ odnosno linearnog odnosa $\lg K_R$ prema efektivnom radijusu molekula može se odrediti M_r , odnosno efektivni (Stokesov) radijus, analizirane molekulske vrste, i to usporedbom sa standardima poznate M_r .



Slika 7.1. Shematski prikaz učinaka SDS i redukcijskog sredstva DTT na molekule proteina pri 100 °C

Molekule s konstantnom gustoćom naboja kao što su kompleksi SDS-protein, nukleinske kiseline i serija homolognih proteina pokazuju specifična svojstva u migraciji na gelu.

Pokazano je² da se pravci linearnog odnosa $\lg m$ odnosno $\lg m_r$ i koncentracije gela (g/100 mL, T) u Fergusonovu dijagramu, za različite proteine tretirane sa SDS, sijeku gotovo u istoj točki pri vrijednosti $T = 0$. Dakle, molekule različitih radijusa odnosno različite mase imaju istu slobodnu mobilnost (m_o) odnosno relativnu slobodnu mobilnost ($m_{o,r}$) pri $T = 0$. To znači da je slobodna mobilnost odnosno relativna slobodna mobilnost određena gustoćom naboja (omjer naboja i mase) i nije izravno ovisna o masi same čestice. Budući da su $m_{o,r}$ i m_o za određenu vrstu gela (određena vrijednost C određeni pH) praktično konstantni za sve molekule s istom gustoćom naboja, za izračunavanje koeficijenta usporavanja ispitivane molekulske vrste nije potrebno mjeriti migraciju te vrste na više gelova različite koncentracije nego samo na jednom poznate koncentracije (T).

² D. M. Neville, *J. biol. Chem.*, **246** (1971) 623.

D. M. Neville and H. Glossmann, *J. biol. Chem.*, **246** (1971) 6328.

Prethodno je potrebno odrediti m_0 kao zajedničku točku na dijagramu za sve molekulske vrste iste gustoće naboja. Za izračunavanje se zapravo rabi srednja vrijednost m_0 utvrđena nizom nezavisnih mjerenja migracije većeg broja molekulskih vrsta standarda.

Izračunavanjem nagiba pravca koji prolazi točkama $m_{0,r}$ ($T = 0$) i m_r određenog mjerenjem dobiva se koeficijent usporavanja K_R ispitivane molekulske vrste. Točnost izračunavanja K_R ovisi o odstupanju prave vrijednosti $m_{0,r}$ ispitivane molekulske vrste i rabljene srednje vrijednosti m_r . Iz linearnog odnosa $\lg K_R$ prema $\lg M_r$ većeg broja molekula standarda različitih i poznatih M_r utvrđenog pri jednakim uvjetima, procjenjuje se M_r ispitivane molekulske vrste.

Pretpostavka uspješne primjene jest jednaka gustoća naboja na molekulama analita i proteina standarda, tj. jednaka količina vezanog deterdženta po gramu proteina analita i proteina standarda. Izbor proteina za standard ovisi o procjeni vrijednosti molarne mase sastojaka analita. Praktično je utvrđeno² da linearan odnos između $\lg K_R$ i $\lg M_r$ vrijedi za molekule relativne molekulske mase od 15 000 do 70 000. Postoje proteini kojima se $m_{0,r}$ znatno razlikuje od prosječne vrijednosti. To su ribonukleaze, deoksiribonukleaze, cimotoripsinogeni hemoglobulin i proteini relativne molekulske mase manje od 15 000. U određivanju relativne molekulske mase standardi i analit obrađuju se na jednak način, tako da se postigne maksimalna i uz to reproducibilna količina vezanog SDS na molekule standarda i analita.

U tablici 7.1. navedeni se proteini koji se u elektroforezi primjenjuju kao standardi. Osim izvornih molekulskih vrsta kao standardi se rabe i polimeri prirodnih proteina koji nastaju kemijskim umrežavanjem proteina. Tako se umrežavanjem proteina male molekulske mase (lizozima, hemoglobina, albumina i dr.) s pomoću glutaraldehida kao umreživača mogu pripremiti u vodi topljivi polimeri relativne molekulske mase od $3 \cdot 10^4$ do $2 \cdot 10^7$. Nakon tretiranja sa SDS primjenjuju se kao standardi na uobičajeni način. U elektroforetskom određivanju relativne molekulske mase sastojaka analita rabe se najmanje četiri različita proteina kojima je molarna masa približna (pretpostavljenoj) molarnoj masi sastojaka analita odnosno nešto manja i nešto veća. Za uspješnu usporedbu važno je da i konformacija molekula standarda i analita budu jednake.

Mjeri se migracija (prijeđeni put) molekula standarda i molekula analita u potpuno jednakim eksperimentalnim uvjetima elektroforetskog razdvajanja. To se lakše postiže u elektroforezi u ploči gela. U uporabi gelova u obliku valjka uvijek postoje male razlike u svojstvima gelova lijevanih u više cijevi. Zato u radu s gelovima u obliku valjka, uz odvojeno mjerenje migracije standarda i analita u odvojenim cijevima, čini se i mjerenje u kojem se analitu dodaje jedan standard koji služi kao unutarnji standard za ocjenu istovjetnosti eksperimentalnih uvjeta migracije u više valjkastih gelova.

Prema uobičajeno rabljenoj «standardnoj metodi»³ otopina analita za SDS-elektroforezu čini se tako da se 1 ml otopine proteina ($\approx 0,5$ mg/ml) i 9 ml otopine fosfatnog pufera (pH = 7), u kojoj je 1 % SDS-a i 1% merkaptoetanol, zagrijava u epruveti u vodenoj kupelji 2 minute.

Tablica 7.1. Proteini koji se rabe kao standardi u SDS elektroforezi

Protein	M_r	Protein	M_r
Bacitracin	1 480	Fumaraza, mišićna	49 000
Glukagon	3 500	Dehidrogenaza glutaminske kiseline	53 000
Inzulin (reducirani)	6 600	Katalaza, jetra	57 000
∇ -laktoalbumin	14 176	Albumin, volovski serum	66 290
Ribonukleaza B	14 700	Transferin	76 000
Hemoglobin	15 500	Plazminogen	81 000
Mioglobin	17 200	Laktoperoksidaza	93 000
Tripsin inhibitor, soja	20 095	Fosforilaza, mišićna	100 000
Anhidraza karbonatne kiseline	28 739	Ceruloplazmin	124 000
Pepsin	34 700	Serum albumin dimer	132 580
Laktat- dehidrogenoza, mišićna	36 180	Imunoglobulin A, nereducirani	160 000
Aldolaza, mišićna	38 994	Miozin	220 000
Alkohol- dehidrogenaza, jetra	39 805	Tireoglobulin	355 000
Enolaza, mišićna	41 000	∇_2 -makroglobulin, nereducirani	380 000
Ovalbumin	43 000	Imunoglobulin M, nereducirani	950 000

Nakon hlađenja otopine, za povećanje gustoće, dodaje se 2-10 % saharoze ili glicerola i najčešće bromfenol plava kao pokazno bojilo. Tako pripremljena otopina analita izravno se aplicira u jažice gela.

³ K. Weber, J. R. Pringle., M. Osborn, *Meth. Enzymol.*, **26** (1972) 3.
K. Weber, M. Osborn, u: *The proteins*, Eds. H. Neurath, R. L. Hill, C. L. Boeder,
Vol. 1. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975.

Za uspješnu detekciju potrebno je od 10 do 100 μg od svake ispitivane molekulske vrste analita. Time je određen volumen analita apliciranog na gel. Alternativno pokazna boja može se staviti u pufer gornje komore za elektrode u elektroforezi u vertikalnoj aparaturi.

Ako je otopina proteina veće ionske jakosti, otopljene soli uklanjaju se, prije tretmana s SDS-om, npr. dijalizom prema otopini fosfatnog pufera ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$). Izbor koncentracije gela za SDS-elektroforezu ovisi o M_r analita. Za M_r od 10 000 do 60 000 rabi se gel kojem je $T = 15 \text{ g}/100 \text{ mL}$. Za M_r od 10 000 do 100 000 gel s $T = 10 \text{ g}/100 \text{ mL}$ i za M_r od 20 000 do 300 000 gel s $T = 5 \text{ g}/100 \text{ mL}$. Gel uz uobičajene sastojke sadrži i SDS ($0,1 \%$). Puferi komora za elektrode isti su kao pufer gela i oni sadrže 1% SDS.

Tablica 7.2. pokazuje potrebne količine komponenata za pripremu 100 mL otopine za polimerizaciju za gelove različite koncentracije monomera odnosno različite poroznosti. TEMED i amonijev persulfat dodaju se u otopinu nakon deaeracije odnosno uklanjanja otopljenog kisika neposredno prije lijevanja u kalup(e).

Tablica 7.2. Sastav otopine za lijevanje SDS gelova različite poroznosti

Komponenta	$T = 5$	$T = 7,5$	$T = 10$	$T = 15$
Akrlamid /g	4,85	7,28	9,70	14,55
Bis /g	0,15	0,22	0,30	0,45
Pufer gela (NaH_2PO_4 , $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,2$)/ mL	50	50	50	50
SDS/g	1,0	1,0	1,0	1,0
H_2O do 95 mL, zatim dodati				
TEMED /mL	0,15	0,15	0,15	0,15
Amonijev persulfat ($1,5\%$)/ mL	5	5	5	5

SDS-elektroforeza uz homogeni pufer na vertikalnoj napravi najčešće se čini uz kontrolu jakosti električne struje.

U SDS-elektroforezi na poliakrilamidnom gelu uz jednolični pufer rabe se i postupci s višefaznim puferom na gelu jednolične poroznosti ili s gradijentom poroznosti separacijskoga gela. Uz primjenu višefaznog pufera postižu se oštrije vrpce razdvajanja, a time i bolja rezolucija¹⁴. Uporabom gela s gradijentom koncentracije akrilamida ostvaruje se bolja rezolucija i oštrina vrpce. Naročito dobro razdvajaju se male molekule. Osim toga, na jednom gelu mogu se analizirati makromolekule širokog raspona masa, što bi inače trebalo učiniti uz uporabu većeg broj gelova različitih koncentracija monomera. Ploče gela s gradijentom poroznosti, za vertikalnu napravu čine se na način kako je već opisano (vidi str. 62.). Prethodnom elektroforezom u gel se unosi SDS u odgovarajućoj otopini pufera.

¹⁴ U. K. Laemmli, *Nature* (London), **227** (1970) 680.

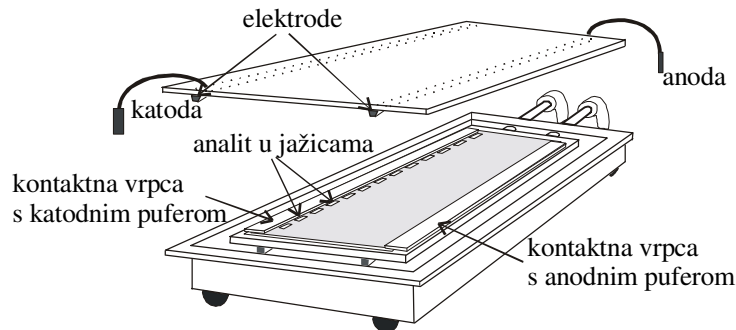
Danas se sve više primjenjuje metode SDS-elektroforeze na horizontalnoj napravi. Rabe se vrlo tanki poliakrilamidni gelovi lijevani na plastičnoj foliji na koju se gel kovalentno veže. Gel se čini lijevanjem otopina za polimerizaciju u kalup učinjen s dvije staklene ploče. Na jednu staklenu ploču prilijepi se plastična folija (GelBond PAG film[®]), i to s hidrofobnom stranom prema staklu. To se čini pritiskom folije, s pomoću gumenog valjka, na navlaženu površinu stakla. Tanki sloj vode adhezijom veže plastičnu foliju uz površinu stakla. Na drugu staklenu ploču zalijepi se niz kvadratića ljepljive vrpce debljine 0,25 mm s pomoću kojih se formiraju jažice na gelu. Ta se ploča hidrofobizira s hidrofobnim sredstvom (Repel Silane[®]) i nakon sušenja i ispiranja, uz umetanje razmaknica, složi s drugom pločom te učvrsti štikaljkama ili stegama u kalup.

Gel se lijeva u dva sloja, koji se lijevaju slijedno. Najprije se lijeva sloj gela velikih pora, u kojem su jažice i koji osim za aplikaciju otopine analita može imati ulogu gela za nagomilavanje. Taj sloj gela čini se lijevanjem malog volumena otopine velike gustoće. To se čini na način kako pokazuje slika 4.4. Uz sastojke za poliakrilamidni gel ($T = 5 \text{ g}/100 \text{ mL}$, $C = 3 \%$) ta otopina sadrži 38 volumna % glicerola, što je čini «super gustom».

Na taj sloj gela lijeva se separacijski gel s gradijentom pora. To se čini lijevanjem smjese dviju otopina za polimerizaciju učinjene s pomoću naprave za miješanje prikazane na slici 6.2. Za razliku od lijevanja ploče gela s gradijentom poroznosti za vertikalnu napravu, ovdje se u posudicu A naprave za miješanje stavlja otopina niže koncentracije monomera ($T = 8 \text{ g}/100 \text{ mL}$, $C = 2\%$) koja sadrži 25 % glicerola. Sadržaj glicerola čini je «guščom» otopinom od otopine veće koncentracije monomera ($T = 20 \text{ g}/100 \text{ mL}$, $C = 2\%$) koja ne sadrži glicerol (otopina male gustoće). Otopina manje gustoće, ali veće koncentracije monomera, stavlja se u posudu B. Miješanjem tih otopina i lijevanjem u kalup na način pokazan na slici 6.2.a čini se gel s linearnim gradijentom poroznosti. Lijevanjem smjese otopina iz mješača, na gel učinjen sa super gustom otopinom nadsvodno se slažu slojevi otopina sve manje gustoće, ali veće koncentracije monomera, čime se sprječava njihovo miješanje u kalupu za polimerizaciju. Počevši od granice gela za nagomilavanje, veličina pora separacijskoga gela smanjuje se. Sve tri otopine za polimerizaciju sadrže isti pufer (npr. Tris titiran s HCl do pH = 8,8) i 0,5 % SDS-a. Katalizator za polimerizaciju dodaje se u otopine neposredno prije lijevanja u kalup. Nakon polimerizacije uklanjaju se staklene ploče.

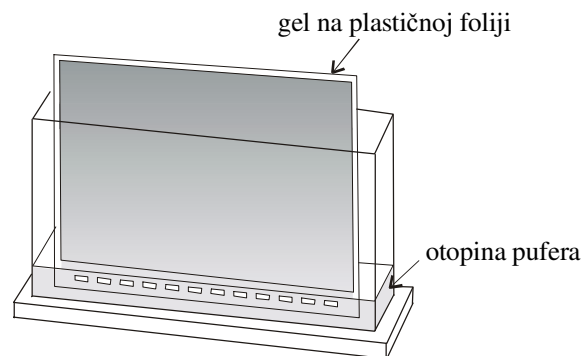
U naprave za horizontalnu elektroforezu, na hladenu ploču stavlja se gel s plastičnom folijom prema dolje i stranom na kojoj su jažice uz katodu. Za bolje prilijeganje plastične folije, a time učinkovitije hlađenje gela, površina hladne ploče naprave navlaži se petrolejem ili silikonskim uljem. Papirne kontaktne vrpce (PaperPool[®]) natopljene otopinom pufera polože se uz rubove ploče gela. Ako se čini elektroforeza uz jednolični pufer, katodni i anodni pufer istog su sastava kao i pufer u gelu.

U elektroforezi s diskontinuiranim puferom potrebni pH otopine katodnog pufera ostvaruje se neutralizacijom Trisa s glicinom, koji je «slijedni» ion u procesu nagomilavanja molekulskih iona analita (vidi str. 50.).



Slika 7.2. Naprava za horizontalnu SDS-elektroforezu s hladenom podlogom za polijeganje gela i kontaktnim vrpčama natopljenim otopinama katodnog odnosno anodnoga pufera

U elektroforezi uz diskontinuirani pufer potrebno je osigurati skokovitu promjenu pH na granici gela za nagomilavanje i separacijskoga gela. U opisanom primjeru gela to se postiže izmjenom pufera koji je rabljen u pripravi gela s puferom nižeg pH i manje ionske jakosti (npr. Tris-HCl pH = 6,7 + 0,1 % SDS).



Slika 7.3. Načelo selektivne izmjene pufera u dijelu gela za nagomilavanje u diskontinuiranoj elektroforezi na horizontalnoj ploči poliakrilamidnog gela na plastičnoj foliji

Neposredno prije početka elektroforeze u jažice se unose (mikropipetom) otopine analita. Električni kontakt uspostavlja se polaganjem elektroda na kontaktne vrpce.

U napravi pokazanoj na slici to se čini stavljanjem zaštitnog poklopca, na kojem su elektrode, na kadu naprave. Elektroforeza se čini uz napon do 1000 V (1 do 2 sata).

Za identifikaciju i kvantifikaciju vrpce na separacijskom gelu primjenjuju se isti postupci kao i u separacije bez SDS-a. Za kvalitativnu detekciju i za određivanje relativne molekulske mase kvaliteta bojenja nije kritična. Najčešće se bojenje čini u kadi za bojenje (slika 4.5.a) s Coomassie R-350 (0,02 % u 10 %-tnoj acetatnoj kiselini) 15 min na 50 °C. Obezbojivanje gela čini se u napravi za obezbojivanje i ispiranje (slika 4.5.b) otopinom acetatne kiseline (10 %). Nakon ispiranja gel se, radi stabilnosti, umače u otopinu glicerola (volumnog udjela 9 %) i suši na zraku. Obezbojivanje gela može se činiti i elektroforetski. Primjenjuje se i postupak koloidnog bojenja nakon kojeg nije potrebno obezbojivanje gela⁵. Nakon učvršćivanja makromolekula na gelu umakanjem 1 h u otopinu za fiksaciju (12 % trikloroctena kiseline, TCA), bojenje se čini (12 h) u koloidnoj otopini bojila (0,1 % Coomassie R-250, 2 % H₃PO₄, 10 % amonijev persulfat). Tim načinom bojenja postiže se veća osjetljivost detekcije (oko 30 ng po vrpce). Bojenje se izvodi i srebrom⁶.

Bolje kvantitativno, denzitometrijsko, mjerenje vrpce obojenih srebrom postiže se «plavim toniranjem» srebrom obojenoga gela⁷. Nakon bojenja srebrom i slijednog ispiranja gel se umače (2 min) u vodenu otopinu u kojoj je 0,5 % FeCl₃, 0,3 % oksalne kiseline i 0,3 % kalijeva heksacianoferata, što poboljšava kvalitetu obojenosti vrpce za kvantitativno mjerenje. Nakon toniranja i ispiranja gel se umače u otopinu glicerola i suši na zraku.

Male molekule koje nisu čvrsto vezene za gel (mali proteini, glikoproteini i peptidi) mogu se tijekom bojenja i obezbojivanja isprati iz gela. Postoje li takve molekulske vrste na gelu, one se prije bojenja fiksiraju. To se čini uranjanjem gela 30 min u 10 %-tnu otopinu sulfosalicilne kiseline. Alternativno istovremeno bojenje i fiksiranje može se obaviti s otopinom Coomassie plavom, koja sadrži etanol i formaldehid⁸. Razdvojene molekule u SDS-elektroforezi mogu se elektroforetski prenijeti na imobilizirajuću membranu za specifičnu analizu proteina (npr. imunološku). Odnos između $\lg M_r$ i T proporcionalan je za bilo koji oblik gradijenta koncentracije⁹.

Ako se rabi gel s linearnim gradijentom koncentracije, onda je i odnos između migracije (tj. duljine puta migracije) i $\lg M_r$ linearan.

⁵ V. Neuhoff, R. Stamm, H. Eibl, *Electrophoresis*, **6** (1985) 427.

⁶ J. Heukeshoven, J. Dernik. U: B. J. Radola Ed. *Electrophrese-forum*, **86** (1986) 22.

⁷ G. Berson, *Anal. Biochem.*, **134** (1983) 230.

⁸ G. Steck, P. Leuthard, R. R. Bürk, *Anal. Biochem.*, **107** (1980) 21.

Nakon SDS-elektroforeze analita na poliakrilamidnom gelu i utvrđivanja položaja vrpce na gelu relativna molekulska masa makromolekula analita može se iskazati relacijom:

$$\lg M_r = a \cdot \lg T + b \quad (7-1)$$

gdje je T koncentracija gela na mjestu do kojeg je određena molekulska vrsta migracijom dospjela, a i b nagib su i odsječak na ordinati pravca linearne regresije utvrđene mjerenjem migracije većeg broja molekula standarda u isto vrijeme na istom gelu.

Pokazana⁹ je uspješna primjena u određivanju M_r u opsegu M_r od 13 000 do 1 000 000 uz uporabu gela s intervalom T od 3 do 30 g/100 mL. U mnogim slučajevima ne može se utvrditi istovjetnost proteina samo na temelju određene relativne molekulske mase. Za utvrđivanje istovjetnosti odnosno razlike između dvaju proteina iste (točnije približne) molekulske mase čini se djelomično cijepanje (digestija) proteina proteolitičkim enzimima. Nastale smjese peptida separiraju se SDS-elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Iz dobivenih forezograma utvrđuje se istovjetnost odnosno razlika između dva proteina iste molekulske mase. Naime, raspored i odnos vrpce karakterističan je za određeni protein i uporabljeni proteolitički enzim. Za analizu je potrebno samo od 5 do 10 μg proteina.

SDS se ne može rabiti za jako bazne proteine (npr. protamini) i neke jako kisele proteine (npr. feredoksini). Prvi se s SDS-om talože a drugi pokazuju anomalije u elektroforetskoj separaciji s SDS-om. Za analizu tih proteina u pripravi otopine analita rabe se kationski deterdženti, kao što je cetiltrimetil amonijev bromid u kiselom mediju uz pH otopine pufera od 3 do 5. Tretiranjem proteina tim deterdžentom nastaju kationski kompleksi koji migriraju prema negativnoj elektrodi. Uz uporabu toga deterdženta pokazan je¹⁰ linearan odnos m_r prema $\lg M_r$ za veliki broj molekula standarda u rasponu relativne molekulske mase od 10 000 do 40 000. Kationski deterdženti manje od SDS-a denaturiraju proteine, stoga se rabe u elektroforetskoj analizi proteina u nativnom obliku¹¹.

Mnogi membranski proteini i enzimi mogu se otopiti uporabom neionskih deterdženata. Najčešće se rabe Tween 80 ili Triton X-100, koji cijepaju agregate proteina uz održavanje njihove biološke odnosno enzimatske aktivnosti. S obzirom na neionsku strukturu deterdženta, otopljeni proteini zadržavaju svoj prirodni električni naboj (ovisan o pH) i u elektroforezi na poliakrilamidnom gelu separiraju se temeljem razlike naboja i razlike u masi. Tako se proteini približno iste molekulske mase mogu razdvojiti temeljem razlika u naboju. To nije moguće pri uporabi ionskih

⁹ P. Lambin, *Anal. Biochem.*, **85** (1978) 114.

¹⁰ J. G. Williams and W. B. Gratzer, *J. Chromatogr.*, **57** (1971) 121.

¹¹ D. T. Atin, R. Shapira, J. M. Kinkade, *Anal. Biochem.*, **145** (1985) 170.

deterdženata. Međutim, budući da različiti proteini nemaju istu gustoću naboja relativne molekulske mase, ne može se elektroforetski odrediti primjenom samo jednoga gela, nego se mora učiniti na isti način kao i pri određivanju u odsutnosti deterdženta, tj. uporabom većeg broja gelova različite koncentracije (vidi str. 60.).

U posljednje vrijeme deterdženti su našli široku primjenu u otapanju bioloških sustava, kao što se stanične membrane, dijelovi virusa, dijelovi tkiva itd. Uz uporabu deterdženata jednostavnije je određivanje relativne molekulske mase makromolekula proteina. Međutim, jako denaturirajući deterdžent SDS u prisutnosti reducirajućih sredstava (2-merkaptetanola ili ditiotreitola) uzrokuje potpunu denaturaciju i disocijaciju na osnovne jedinice koje izgrađuju prirodnu strukturu proteina.

Relativna molekulska masa proteina određena uz nativne uvjete razlikuje se od one utvrđene uz uporabu SDS-a. Izmjerena relativna masa uz uporabu SDS zapravo je relativna molekulska masa osnovnih jedinica koje nastaju disocijacijom prirodnog proteina. Isto tako za proteine koji sadrže disulfidne veze, razlikovat će se relativna masa utvrđena bez prisutnosti i uz prisutnost reducirajućih sredstava. Reducirajuća sredstva cijepaju disulfidne veze između polipeptidnih lanaca (interpolipeptidne disulfidne veze), nastaje disocijacija makromolekule i stoga stanovito smanjenje eksperimentalno izmjerene relativne molekulske mase. Za proteine koji su građeni od samo jednog polipeptidnog lanca nema razlike u eksperimentalno određenoj relativnoj molekulskoj masi uz prisutnost ili bez prisutnosti reducirajućih sredstava. Međutim cijepanjem disulfidnih veza unutar polipeptidnog lanca (intrapolipeptidne disulfidne veze) izdužuje se zavojnica polipeptidnog lanca, što omogućuje vezanje veće količine SDS-a i promjenu u gustoći naboja nastale čestice. To izaziva promjenu u migraciji i *prividnu* promjenu u relativnoj molekulskoj masi.

Usporedbom migracije određene molekulske vrste uz primjenu i bez primjene reducirajućih sredstava mogu se utvrditi čimbenici koji upućuju na strukturu ispitivane molekulske vrste. Informacije o molekularnoj strukturi složenih proteina mogu se dobiti usporedbom forezograma učinjenih uz blagi neionski deterdžent, koji ne razara terciarnu strukturu složenih proteina, i uz jaki deterdžent koji tu strukturu razara. Uporabom blagih deterdženata zadržava se prirodna molekularna struktura proteina pa je time očuvana i biološka, tj. enzimatska odnosno imunološka aktivnost. Određena relativna molekulska masa jednaka je prirodnoj, određenoj bez uporabe deterdženata.

Budući da se separacija uz SDS temelji na razlici u masi, ta metoda razdvajanja rabi se kao prva faza u dvodimenzijskoj elektroforezi, u kojoj se u drugoj fazi molekule odnosno njihove podjedinice razdvajaju temeljem razlike u električnom naboju (vidi poslije).

8. ELEKTROFOREZA NA GELU OD AGAROZE

Gel od agaroze rabi se u analizi visokomolekularnih proteina i izoenzima kojima je hidrodinamički radijus veći od 10 nm. Primjenjuje se u separaciji lipoproteina, imunoglobulina i nukleinskih kiselina, napose u imunoelktroforezi. Za razliku od poliakrilamidnoga, gel od agaroze neotrovan je i mnogo se jednostavnije pripravlja. Međutim, ima slabija mehanička svojstva (elastičnost i čvrstoću) pa se njime teže rukuje. U pripravi gela, agarozu se otapa u otopini pufera uz zagrijavanje na vodenoj kupelji. Hlađenjem bistre otopine agaroze, ulivene u kalup, formira se gel željenog oblika i debljine. Agarozu se nabavlja kao suhi prašak različite čistoće. Čistoća komercijalne agaroze očituje se u razlici u temperaturi tališta (od 35 do 95 °C) i razini elektroosmoze.

Uobičajena koncentracija agaroze u gelu jest od 0,4 do 2,5 g u 100 mL. Veličina pora ovisi o koncentraciji agaroze u gelu. Uz koncentraciju agaroze od 1 g/100 mL veličina je pora oko 150 nm, a uz 0,16 g/100 mL 500 nm. Najčešće se rabi gel u obliku ploče. Gel u obliku ploče rabi se u vertikalnoj i u horizontalnoj elektroforetskoj napravi. U pripravi gela od agaroze rabe se sve vrste pufera kao u elektroforezi na poliakrilamidnom gelu. Ionska jakost otopine pufera jest između 0,03 i 0,1.

Gel od agaroze za elektroforezu proteina lijeva se na hidrofilnu plastičnu foliju (Gel Bond film[®], poliesterska folija kojoj je jedna strana prekrivena slojem suhe agaroze), što olakšava rukovanje gelom. Plastična se folija, s navlaženom hidrofilnom stranom gore, umeće na dno kalupa za lijevanje. Topla smjesa agaroze lijeva se u kalup i pokrije staklenom ili plastičnom pločom i ostavi hladiti. Debljina gela ovisi o ulivenom volumenu otopine agaroze. Gel se formira kad temperatura padne na približno 45 °C. Jednom formiran gel stabilan je do približno 100 °C.

Za pripravu gela potpuno jednolične debljine, ploča gela čini se lijevanjem u kalup od dvije staklene ploče. Na jednu ploču se, s unutarnje strane prilijepi plastična folija. Unutarnja strana druge ploče i umetnute razmaknice učini se hidrofobnom prekrivanjem slojem hidrofobnog sredstva (Repel Silane[®]). U formirani i zagrijani (75 °C) kalup lijeva se vruća otopina agaroze. Gel formiran unutar staklene cijevi teško se iz nje vadi pa se rjeđe rabi.

8.1. Metode imunoelektroforeze

Metode imunoelektroforeze imunoanalitičke su tehnike koje se primjenjuju poglavito u analizi normalnih proteina krvi kao i proteina unesenih u organizam iz organizama uzročnika bolesti. Proteini bakterija ili virusa uneseni u ljudsko ili životinjsko tkivo, pod određenim uvjetima, ponašaju se kao antigeni na koje organizam imunološki reagira proizvodnjom protutijela (antitijela). Antigen koji je prouzročio proizvodnju antitijela specifično reagira s tim antitijelom.

Antitijela pripadaju grupi proteina krvne plazme nazvanih imunoglobulini. Antigeni se mogu ciljano ubrizgavati u životinje da bi se dobila antitijela. Krvna plazma imuniziranih životinja koja sadrži antitijela naziva se antiserum. Različite varijante antiseruma komercijalno se proizvode.

Svako antitijelo ima dva spojna područja pa se može vezati s jednom ili dvije molekule antigena. Molekula antigena spaja se s molekulama antitijela preko dijela koji se naziva *antigenska determinanta*. Antigen može imati jednu, dvije, tri ili više antigenskih determinanti. Svaka od njih može se specifično vezati na različito spojno područje antitijela, stvarajući antitijelo–antigen kompleks. Budući da antitijela imaju dva mjesta vezanja, reakcijom s antigenima koji imaju dvije ili više determinantnih grupa, nastaju visoko molekularni umreženi, netopljivi, kompleksi ... antigen–antitijelo–antigen–antitijelo... koji se talože iz reakcijske smjese što se naziva *imunoprecipitacija*.

Stvaranje imunoprecipitata čini temelj imunoanalitičkih tehnika. Imunoprecipitacija nastaje kada se količine antigena i antitijela u reakcijskoj smjesi nalaze u ekvivalentnom omjeru (točka ekvivalencije), tada su sve molekule antigena i antitijela vezane u netopljivi kompleks. Ako je prisutan višak antitijela ili antigena, nastaju niže molekularni, topljivi kompleksi.

Identifikacija i kvantifikacija antigena imunoprecipitacijom može se učiniti tako da se određena količina antigena unose u niz epruveta s otopinom antitijela različitih koncentracija ili obratno: određena se količina antitijela unese u niz epruveta s otopinama antigena različite koncentracije. Imunoprecipitacija će nastati u epruveti s ekvivalentnim omjerom količina antigena i antitijela. Imunoprecipitacija ne nastaje u epruvetama u kojima je u znatnom višku antigen ili antitijelo. Nastajanjem imunoprecipitata identificiramo ispitivani antigen (ili antitijelo), a njegovu količinu iz koncentracije otopine u epruveti u kojoj je stvoren imunoprecipitat.

Gradijent koncentracije antitijela odnosno antigena, umjesto u nizu epruveta, može se ostvariti *difuzijom* antitijela odnosno antigena kroz gel.

Difuzijom kroz gel jednog ili oba reaktanta kontinuirano se mijenja koncentracija reaktanata od točke izvora, tj. mjesta gdje su unijeti reaktanti u gel.

U određenoj točki gela koncentracije reaktanata u ekvivalentnom su omjeru i na tom mjestu nastaje imunoprecipitat. Na prozirnog gelu to se očituje kao imobilizirani *neprozirni opalni talog*. Vidljivost imunoprecipitata može se pojačati bojenjem proteina.

Oblik neprozirnog taloga na gelu ovisi o načinu unošenja reaktanata u gel i može imati oblik kruga, crte ili luka. Ovisno o načinu unošenja reaktanata u gel razlikuje se više različitih kvalitativnih i kvantitativnih analitičkih metoda *imunodifuzije*¹.

Stvaranje imunoprecipitata na gelu temelj je i različitih metoda *imunoelektroforeze*, u kojima se imunoprecipitat stvara u migraciji jednog ili oba reaktanata učinkom električnog polja, tj. elektroforeze. Najčešće su metode u kojima samo antigen migrira kroz gel koji sadrži određenu koncentraciju antitijela.

Migracija antitijela kroz gel spriječi se uporabom gela s pH pri kojem je efektivni električni naboj antitijela praktično jednak nuli. Tako koncentracija antitijela u gelu ostaje ravnomjerna i nepromjenjiva tijekom elektroforeze.

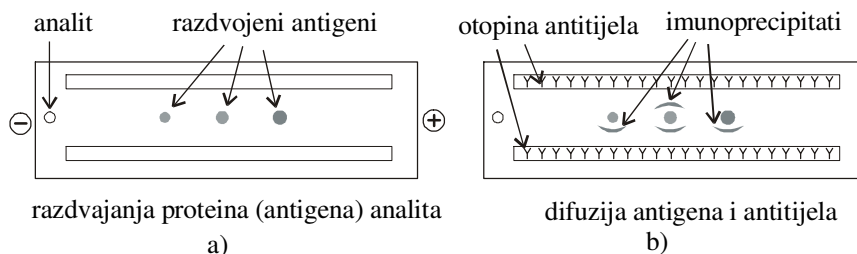
U imunoelektroforezi najčešće se rabi gel s 1 do 2 g/100 mL agaroze u obliku horizontalna ploče. Na tom gelu učinak molekularnog sita zanemariv je pa se migracija i difuzija molekula odvija nesmetano kao u slobodnoj otopini. Međutim, u gelu od komercijalnih agarozama pri pH gela od 6 do 9 očituje se slabi elektroosmotski tok. Budući da je pI (-globulina (antitijela) približno 8, u imunoelektroforezi na gelu od agaroze rabe se puferi s pH oko 8,5. Pri takvom pH učinci se elektroosmoze (pomak elektrolitne otopine prema negativnoj elektrodi, katodi) poništavaju slabom migracijom antitijela prema pozitivnoj elektrodi (anodi). Na taj način koncentracija antitijela ostaje ravnomjerna i nepromijenjena tijekom elektroforeze. Pri tim uvjetima mogu se analizirati proteini koji pri tom pH imaju efektivni električni naboj koji uzrokuje njihovu migraciju prema pozitivnom polu ćelije. Tu pripada većina proteina krvnog seruma.

Kad je potrebno, efektivni negativni električni naboj proteina može se povećati kemijskom modifikacijom acetiliranjem, formiliranjem ili karbamilacijom prije elektroforeze. Učinak elektroosmoze može se smanjiti pročišćavanjem agaroze postupkom ion-izmjenjivačke kromatografije. U nastavku će biti opisane neke od najčešće rabljenih metoda imunoelektroforeze.

¹ G. Mancini, A. O. Carbonara, J. F. Heremans, *Immunochemistry*, **2** (1965) 235.
Y. Sakai i dr., *Anal. Biochem.*, **137**(1984)1.
Ö. Ouchterlony, L. Å. Nilsson, u: Ed. D. M. Veir, *Handbook of experimental immunology*, Vol 1, st. 190., Blackwell, Oxford, 1978.

8.1.1. Metoda prema Grabaru i Williamsu

U metodi² se najprije provodi elektroforetsko razdvajanje proteina (antigena) a zatim imunodifuzija uz nastajanje imunoprecipitata. Načelo metode pokazuje slika 8.1.



Slika 8.1. Načelo imunoelektroforeze prema Grabaru i Williamsu. Nakon elektroseparatorije (a) omogućuje se difuzija antigena i antitijela kroz gel, pri čemu u gelu nastaju lukovi imunoprecipitata (b).

Analiza se čini na ploči gela od agaroze. Gel veće površine priprema se lijevanjem u kalup s dvije paralelne staklene ploče, a gel manje površine izravno na površinu horizontalne staklene ploče ili na plastičnu foliju. U gelu se izbuše jažice (zdenci) veličine 1-2 mm, i to 2,5 cm od ruba gela koji će biti uz negativni pol u horizontalnoj elektroforetskoj napravi. Uz jažice se skalpelom urežu i korita (kanali) u gelu, i to uzduž crte razdvajanja sastojaka analita. U korita se nakon separacije unosi otopina antitijela. Bušenje jažica i urezivanje korita obično se čini uz pomoć šablona.

Nakon punjena jažice(a) s otopinom antigena (~1 μL) ploča s gelom polaže se na hladenu ploču naprave za horizontalnu elektroforezu. Tijekom separacije temperatura gela približno je 10 °C. Elektrolitni kontakt s elektrodama čelije čini se s pomoću namočenih papirnih kontaktnih vrpce. Da bi se spriječilo površinsko isparavanje (sušenje), gel se pokrije staklenom pločom ili providnim plastičnim pokrovom. Elektroforetsko razdvajanje čini se uz jakost električnog polja od 6 do 10 V/cm. Separacija traje dok pokazno bojilo (obično Bromfenol plava) ne migrira do kraja gela nasuprot jažicama za analit (~45 min).

Nakon separacije iz ploče gela izvade se dijelovi gela iz urezanih korita koji su tijekom elektroforeze ostali na ploči. U korita se pipetom unosi otopina antitijela (~20 μL) i gel se 15 do 24 sata ostavlja u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Zbog difuzije antigena i antitijela kroz gel u

² P. Grabar, C. A. Williams, *Biochim. biophys. Acta*, **10** (1953) 193.

graničnom području između separiranih antigena i antitijela stvaraju se lukovi imunoprecipitata. Imunoprecipitat nastat će samo uz razdvojene zone one molekulske vrste analita koja specifično reagira s antitijelima unesenim u korita uz jažicu analita. Tako se čini detekcija pojedinog antigena sadržanog u analitu. U pravilu se radi s većim pločama gela, na koje se ureže veći broj jažica za uzorke analita i uz njih korita za otopinu antitijela. U jažice se unosi otopina analita različitih koncentracija odnosno otopine poznatih proteina koji služe kao usporedni standardi. U korita koja se nalaze uz pojedinu jažicu unose se otopine iste vrste ili različitih vrsta antitijela. Analizom nastalih imunoprecipitacijskih lukova može se identificirati određeni antigen u analitu odnosno obilježja primijenjenih antitijela koja su monoklonalna ili poliklonalna.

8.1.2. Metoda prema Laurellu

Za kvantitativno određivanje antigena rabi se tzv. «rocket» metoda³, koja se temelji na elektroforetskoj migraciji antigena (protein) kroz gel koji sadrži monoklonalna protutijela. Migracija antitijela koja se nalaze u gelu sprječava se pripremom gela s pH pri kojem je efektivni naboj molekula antitijela nula. Tijekom elektroforeze odnosno migracije antigena koncentracija antitijela u gelu ostaje ravnomjerna i nepromijenjena.

Gel s umiješanim antitijelima čini se tako da se otopina antitijela unosi u ohlađenu (55 °C) otopinu gela prije lijevanja otopine gela u kalup, na elastičnu foliju ili staklenu ploču. Gel može biti dimenzija od 70 do 200 × 100 mm i debljine 1 do 2 mm. Migracija se provodi uzduž 10 centimetarske dimenzije ploče.

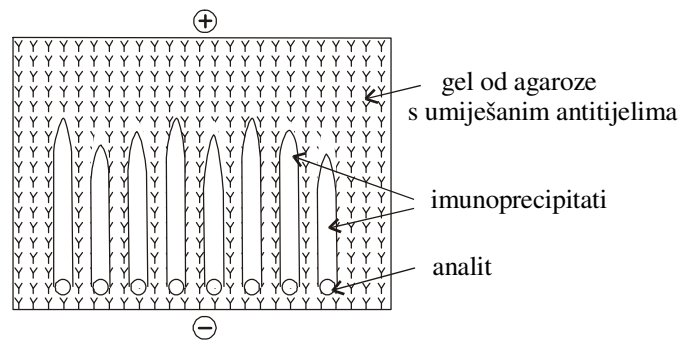
Posebnim bušačima rupica, kojim se uklanja i izrezani dio gela, na 2 cm udaljenosti od ruba uzduž druge dimenzije ploče u gelu se izrežu jažice, i to na međusobnoj udaljenosti od 7 do 10 mm. Ovo se čini u pravilu uporabom komercijalnih šablona za raspored rupica i uporabom komercijalnih bušača rupica. U jažice promjera od 2 do 4 mm stane od 3 do 10 μL otopine antigena. Da bi se smanjila difuzija antigena u gel, otopina antigena unosi se u jažice neposredno prije početka elektroforeze.

Elektroforeza se provodi pri temperaturi od 10 °C uz jakost električnog polja od 10 V/cm. U početku migracije antigena, koji u jažicama zauzimaju prostor diska, postoji višak antigena u disku analita od koncentracije antitijela u gelu u koji disk analita putuje. Tako nastaju topljivi antigen-antitijelo kompleksi. Na bočnim stranama i iza putujućega diska antigena

³ C. B. Laurell, *Anal. Biochem.*, **10** (1965) 358.

C. B. Laurell, *Anal. Biochem.*, **15** (1966) 45.

uspostavlja su ekvivalentni omjer antigena i antitijela i tako počevši od dna stvara se imunoprecipitacijska mreža u obliku oštrog vrha «rakete». Koncentracija antigena u putujućem disku smanjuje se i pri određenoj visini vrha koncentracija antigena ekvivalentna je koncentraciji antitijela u gelu. Kad vrh dostigne tu visinu, sav antigen iz uzorka istaložen je u precipitacijskoj mreži unutar rakete.



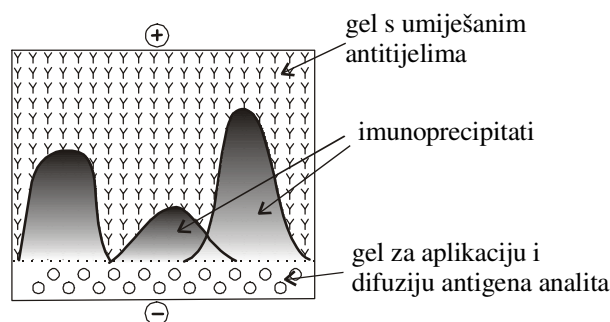
Slika 8.2. Metoda imuno elektroforeze prema Laurellu, «rocket» metoda

Gel se nakon elektroforeze ispire, preša, suši i boji za kvantitativnu detekciju antigena. Količina antigena u uzorku izravno je proporcionalna površini vrha (rakete) i utvrđuje se planimetrijski ili kao umnožak visine i širine vrha u poluvisini. Kvantitativno se količina antigena utvrđuje usporedbom s površinom vrha dobivenog unošenjem u jažice niza otopine standarda s poznatom količinom ispitivanog antigena. U rutinskoj analizi rabe se prethodno izrađene standardne krivulje. Zadovoljavajuća točnost određivanja postiže se usporedbom samo visina vrhova analita i standarda

Varijanta ove metode (eng. akronim Fused-rocket immunoelectrophoresis) rabi se za određivanje čistoće i identifikaciju frakcija proteina u separacijskim metodama gel filtracije odnosno kromatografije temeljene na izmjeni iona. U metodi se rabi gel od agaroze s umiješanim nespecifičnim (polispecifičnim) antitijelima. Na ploči gela izbuši se veći broj (40 i više) jažica na manjem razmaku (3-4 mm), i to u pravilu u dva reda u cik-cak redoslijedu.

Uzorci za ispitivanje unose se u jažice redom kako izlaze iz separacijske kolone. Tok frakcija iz kolona za separaciju najčešće se prati UV detektorom, što omogućuje izbor frakcije za slijednu imuno elektroforetsku detekciju. Nakon unošenja uzoraka u jažice, gel se ostavi 30 min pri sobnoj temperaturi ili 1 sat pri 10 °C. Difuzijom proteina iz jažica uspostavlja se njihov kontinuirani koncentracijski profil u gelu oko jažica. Nakon difuzije povodi se elektroforeza uz jakost polja od 2 V/cm u trajanju 10 i više sati. Nakon prešanja, ispiranja, sušenja i bojenja na ploči gela vide se kontinuirane krivulje precipitacije u obliku širokih vrhova. Pojedina krivulja

(vrh) pripada navlastitom (svakom pojedinom) antigenu u ispitivanom uzorku. Čistoća proteina u uzorku može se procijeniti po broju krivulja (vrhova). Vertikalna udaljenost krivulje od određene jažice s uzorkom pokazuje količinu dotičnog proteina u otopini analita u jažici.



Slika 8.3. Oblik krivulja imunoprecipitata u «fused rocket» imunoelektroforezi

Ako je koncentracija antigena u uzorcima analita malena, onda se znatni dio antigena gubi tijekom difuzije zbog imunoprecipitacije oko samih jažica. U tom se slučaju rabi metoda⁴ u kojoj se uzorci unose u jažice na gelu koji ne sadrži antitijela. Nakon difuzije s ploče se odstrani sav gel, osim vrpce koja sadrži jažice s analitom. Na površinu odstranjenoga gela na ploču se izlije gel od agaroze, u kojem su umiješana antitijela. Nakon očvršćivanja gela provodi se elektroforeza. Tijekom elektroforeze molekule antigena migriraju kroz tanki sloj gela bez antitijela prije nego uđu u gel s antitijelima u kojem se formiraju imunoprecipitacijske krivulje.

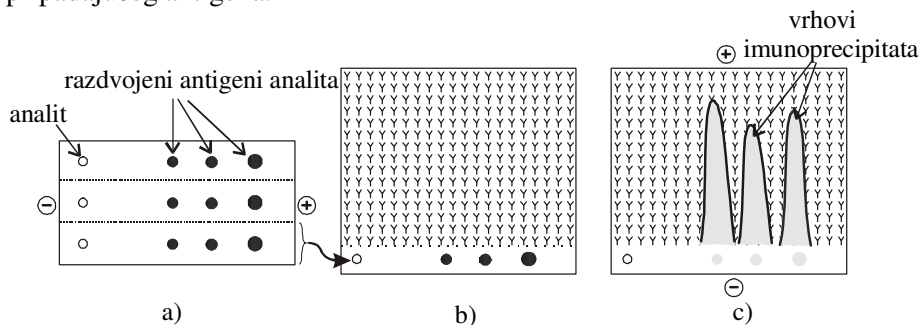
8.1.3. Unakrsna imunoelektroforeza

U unakrsnu imunoelektroforezu zapravo su spojene dvije prethodno opisane metode⁵. Najprije se čini elektroforetsko razdvajanje antigena u gelu od agaroze koji ne sadrži antitijela. Slijedno se čini elektroforetska migracija razdvojenih antigena u drugoj dimenziji, tj. pod pravim kutom u odnosu na prvu. To se čini u gelu u kojem su umiješana antitijela. U postupku se otopina analita, koji sadrži smjesu antigena, unosi u jažice izbušene u ploči gela od agaroze. U otopinu analita obično se dodaje i pokazno bojilo kojim se indicira potrebno trajanje razdvajanja.

⁴ P. J. Svendsen, u: *A manual of quantitative immunoelectrophoresis* (eds. N. H. Axelsen, J. Krpl and B. Weeke) Universitetsforlaget, Oslo, 1973.

⁵ H. M. G. Clarke, T. Freeman, *Clin. Sci.*, **35** (1968) 403.

Razdvajanje se čini uz jakost električnog polja od 8-10 V/cm (~1 sat) (slika 8.4.a). Gel se zatim izreže u vrpce širina 20 –25 mm. Vrpca se položi uz rub čiste staklene ploče na koju se nasuprot vrpci izlije gel od agaroze u kojem se umiješana polivalentna (poliklonalna) antitijela koja reagiraju sa svim antigenima analita (slika 8.4.b). Nakon očvršćivanja gela, okomito na položenu vrpцу gela s razdvojenim antigenima, provodi se migracija antigena iz vrpce u gel s antitijelima. To se čini uz jakost polja od 1-2 V/cm i traje 10–15 sati. Putujući u gel koji sadrži antitijela, antigeni reagiraju s antitijelima i tako nastaju imunoprecipitati u obliku vrhova (raketa, slika 8.4.c). Broj vrhova upućuje na broj antigena u analitu. Površina imunoprecipitata ispod pojedinog vrha proporcionalna je količini pripadajućeg antigena.



Slika 8.4. Načelo unakrsne imunoelktroforeze

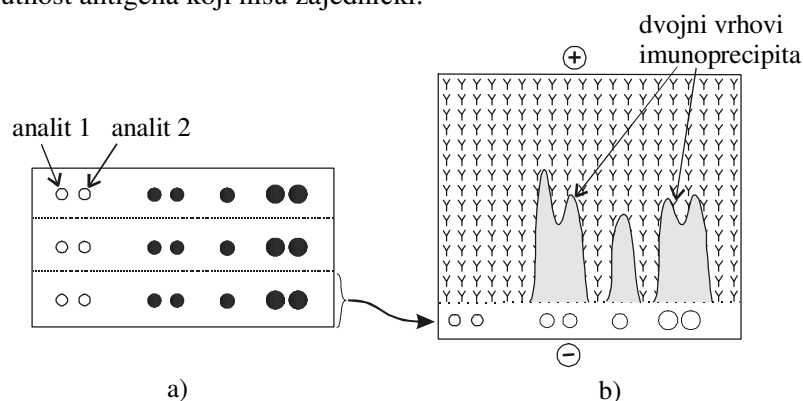
Kvantitativno se količina pojedinog antigena može odrediti usporedbom s površinom vrha dobivenog pod istim uvjetima s poznatom količinom proteina-standarda. Obično se radi sa smjesom proteina-standarda u kojoj su poznate količine pojedinog antigena koje sadrži i analit. Isto se može učiniti i s pomoću unutarnjeg standarda koji se dodaje izravno u analit.

8.1.4. Dvojna unakrsna imunoelktroforeza

Metoda se provodi na isti način kao i unakrsna imunoelktroforeza, ali se u separacijskom gelu buše po dvije jažice za uzorke, jedna uz drugu na razmaku od 6 do 8 mm u smjeru migracije antigena u separacijskom gelu. U metodi (eng. akronim: tandem-crossed immunoelectrophoresis) izravno se uspoređuju dvije smjese antigena koje se unose u jednu odnosno drugu jažicu. Tako se može utvrditi istovjetnost ili različitost u vrsti sadržanih antigena i međusobni količinski odnos antigena u smjesama. Tijekom elektroforetskog razdvajanja istovrsni antigeni sadržani u jednoj i drugoj jažici ulaze u separacijski gel istom brzinom, ali slijedno u razmaku koji

odgovara razmaku između jažica. Različiti antigeni migriraju različitom brzinom i tako nastaje separacija različitih antigena koji se u separacijskom gelu raspoređuju kao parovi diskova istovrsnih antigena.

Nakon razdvajanja izrežu se vrpce gela koji sadrži separirane antigene i stavljaju se na čistu staklenu ploču. Uz vrpce gela sa separiranim antigenima izlije se gel od agaroze u koji se umiješana antitijela. Nakon očvršćivanja provodi se elektroforetska migracija separiranih antigena iz separacijske vrpce u gel s antitijelima. Iz parova istovrsnih antigena nastaju imunoprecipitacijom u gelu dvostruki vrhovi. Visina pojedinog vrha u sraslim vrhovima upućuje na odnos količina dotičnog antigena u prvoj odnosno drugoj jažici. Sadrži li uzorak ili standard antigen kojeg nema u drugoj jažici, nastaju jednostavni precipitacijski vrhovi. Tako se može izravno utvrditi prisutnost istovrsnih antigena u analitu i standardu odnosno prisutnost antigena koji nisu zajednički.



Slika 8.5. Dvojna unakrsna imunoelektroforeza

Jedna komponenta analita može se identificirati unošenjem poznate količine čistog referentnog proteina (antigena) u jažicu pored jažice analita. Iz razlike u visini stvorenog dvostrukog vrha imunoprecipitata može se odrediti odnos količina identificiranog antigena u analitu i referentnog proteina.

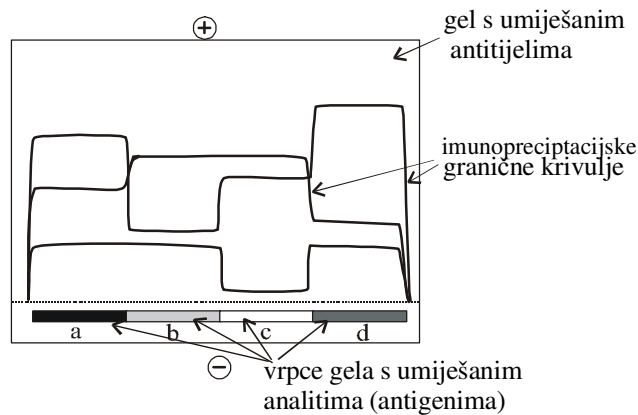
8.1.5. Linijska imunoelektroforeza

U toj metodi analit koji sadrži smjesu antigena umiješa se u gel. Maleni kvadri gela s umiješanim analitom umeću se u korito u ploči gela bez antitijela.

Ploča s umetnutim kvadrima zareže se uz samu granicu umetnutih komadića gela s umiješanim analitom i s ploče se odstrani preostali gel. Na

mjesto uklonjenoga gela izlije se gel koji sadrži polivalentni antiserum odnosno serum koji sadrži više različitih vrsta antitijela.

Nakon očvršćivanja provodi se elektroforetska separacija okomito na liniju položenih kvadara gela s analitom. U elektroforezi antigeni iz umetnutih kvadara gela s analitom migriraju u gel s antiserumom. Reakcijom pojedinog antigena sadržanog u analitu s odgovarajućim antitijelom iz antiseruma nastaju pravokutni vrhovi imunoprecipitata paralelni s linijom umetnutih uzoraka analita. Sadrže li svi ispitivani uzorci iste antigene, frontalne linije imunoprecipitata bit će povezane, a udaljenost fronte linije pojedinog vrha od osnovne crte pokazuje koliki je sadržaj tog antigena u uzorku nasuprot vrhu.

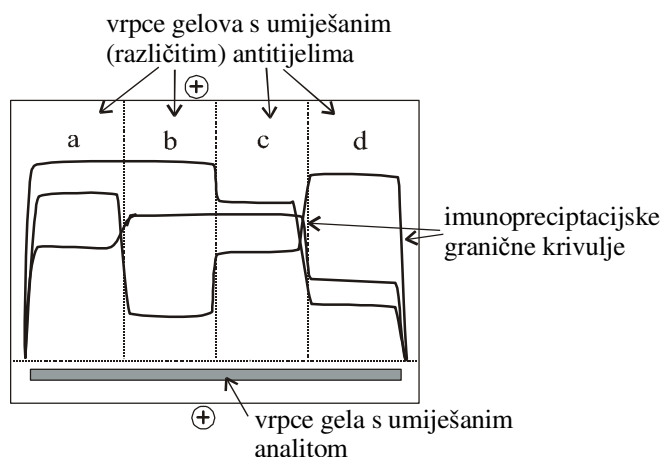


Slika 8.6. Linijska imunoelektroforeza; imunoprecipitacijski odziv četiriju različitih uzoraka antigena (a), (b), (c), (d) prema istom antiserumu

S pomoću ove metode mogu se izravno uspoređivati različite smjese antigena prema istom antiserumu.

Pojedini razdvojeni antigen može se dobiti izrezivanjem površine gela s precipitatom tog antigena. Tako izolirani antigen može se rabiti za imunizaciju odnosno proizvodnju specifičnog antiseruma. Metoda se može rabiti i za uspoređivanje različitih antiseruma prema određenom antigenu.

Tada se u gel na ploči unosi samo jedna kvadratna vrpca gela u koju je umiješan analit s antigenom. Nasuprot vrpce s antigenom lijevaju se pravokutne površine gela u koje se umiješani različiti antiserumi. Tijekom migracija antigena iz vrpce u gelove s različitim antiserumima nastaju imunoprecipitati u obliku pravokutnih vrhova. Iz oblika i povezanosti frontalne linije vrhova kvalitativno se može zaključiti o vrsti antitijela sadržanih u pojedinom antiserumu. Iz visine vrhova određuju se kvantitativni odnosi.



Slika 8.7. Linijska imunoelektroforeza; imunoprecipitacijski odziv jedne vrste antigena prema četiri vrste antiseruma

8.1.6. Metoda polaganja

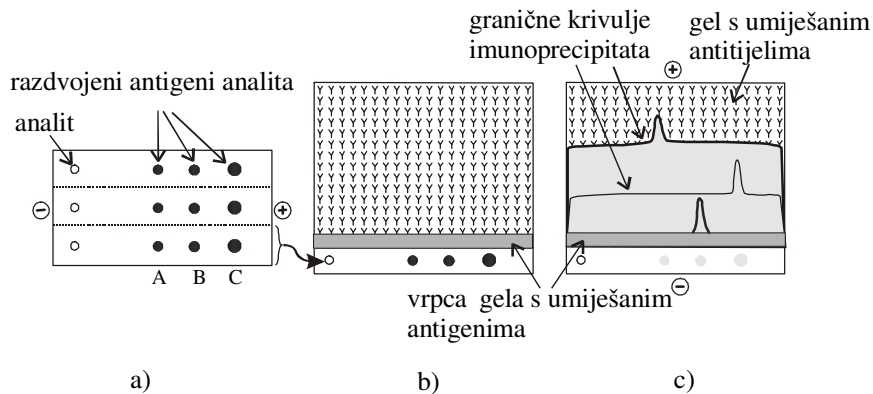
Unošenje na gelu razdvojenih antigena u gel bez antitijela, umjesto umetanjem, može se učiniti i metodom polaganja (eng. akronim: Laying-on Technique). Vrpca koja sadrži razdvojene antigene, a to može biti vrpca poliakrilamidnoga gela ili vrpce celuloznog acetata ili nekog drugog medija u kojem je učinjeno razdvajanje antigena, polaže se «licem» na usku vrpcu agarozna gela bez antitijela uz koju je gel s polivalentnim antitijelima (precipitacijski gel). Pod učinkom električnog polja antigeni migriraju iz vrpce okomito u gel s antitijelima. Reakcijom antigena s antitijelima u gelu nastaju imunoprecipitati u obliku vrhova. Širina vrhova ovisi o širini zona razdvojenih antigena na vrpki s razdvojenim sastojcima analita. Slika vrhova imunoprecipitata slična je slici u metodi po Laurellu. Iz površina odnosno visina vrha može se odrediti količina pojedinog antigena u analitu.

8.1.7. Metode intermedijarnoga gela

U tim metodama između vrpki gela s razdvojenim antigenima i gela s umiješanim polivalentnim antiserumom izlije uska vrpca gela u koji je umiješan jedan poznati antigen ili smjesa antigena istih onima koje želimo identificirati u analitu. Elektroforezom, tj. pod učinkom električnog polja antigeni iz separacijskoga gela i intermedijarnoga gela migriraju u gel s

polivalentnim antitijelima. Budući da se vrpca gela s poznatim antigenima proteže uzduž cijele ploče, imunoprecipitacijom nastaje jedan ili više, ovisno o broju umiješanih antigena, pravokutnih vrhova koji se jedan iznad drugog protežu uzduž cijele ploče. Postojanje određenog antigena u separacijskom gelu očituje se kao oštri vrh (raketa) na gornjoj crti pravokutnog vrha istovrsnog antigena sadržanog u intermedijarnom gelu.

Ako intermedijatni gel ne sadrži antigen koji se inače nalazi u analitu, tada se stvara imunoprecipitacijski vrh koji počinje od osnovne crte odnosno granice intermedijacijskog i precipitacijskoga gela.



Slika 8.8. Imunoelektroforeza s intermedijarnim gelom, intermedijacijski gel sadrži antigene A i C, a ne sadrži antigen B

Površina (ili visina) oštrog vrha iznad frontalne linije pripadajućeg pravokutnog vrha pokazuje količinu antigena u analitu. Tako se mogu identificirati antigeni sadržani u analitu i njihove koncentracije.

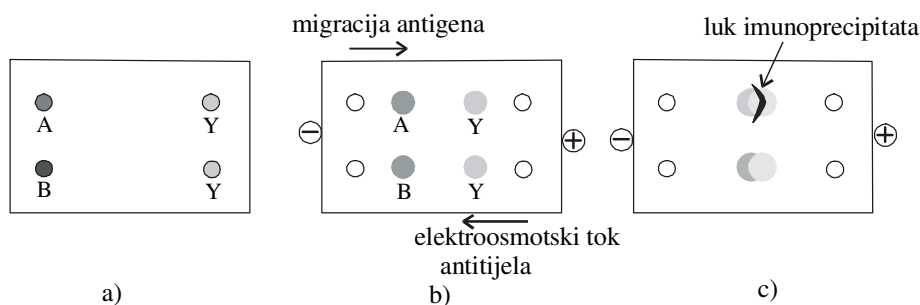
8.1.8. Protusmjerna imunoelektroforeza

Protusmjerna elektroforeza⁶ (eng. akronim Counter (crossed-over) immunoelectrophoresis) provodi se u gelu od agara. Za razliku od agaroze, agar sadrži skupine koji ionizacijom uzrokuju, u gelu od agara, elektroosmotski tok molekula vode prema negativnoj elektrodi elektroforetske ćelije. Tok otapala prema anodi vuče sa sobom i električki nenabijene molekule. U protusmjernoj elektroforezi otopine antigena i antitijela unose se u jažice promjera 1,5 do 2 mm, izbušene u ploči gela na oko 5 mm razmaka. Na ploči se obično buši veliki broj parova jažica. Na taj

⁶ B. J. Culliford, *Nature* (Lond.), **201**(1964)1092.

način može se analizirati veliki broj uzoraka analita s antigenima odnosno antitijelima.

Gel od agara čini se u puferu s pH pri kojem antigeni imaju negativni električni naboj. Antigeni pod učinkom električnoga polja migriraju kroz gel u smjeru pozitivne elektrode. U suprotnom smjeru elektroosmotski tok otapala povlači električki nenabijene molekule antitijela iz jažice prema migrirajućim antigenima u gelu (sl. 8.9.b). Na mjestu susreta migrirajućeg diska antigena i diska antitijela vučenog tokom otapala prema katodi nastaju neprozirni imunoprecipitacijski lukovi ako odnosni antigen specifično reagira s dotičnim antitijelom (sl. 8.9.c).



Slika 8.9. Protusmjerana imunoelektroforeza; antigen A reagira s antitijelom Y i nastaje imunoprecipitacijski luk; antigen B ne reagira

U toj metodi analize potrebna je vrlo mala količina antigena i antitijela. Određivanje traje samo 15 do 20 minuta. Zato je metoda prikladna za brzo kvalitativno određivanje velikog boja nepoznatih antigena ili antitijela.

8.1.9. Detekcija imunoprecipitata

Nastajanje opalnog imunoprecipitata u gelu od agaroze može se vizualno uočiti. U kvalitativnoj analizi dostatna je vizualna detekcija nebojenog imunoprecipitata. Bolja vidljivost neprozirnog imunoprecipitata u gelu u svim opisanim metodama imunoelektroforeza postiže se bojenjem. Budući da su antigeni proteini, svi se imunoprecipitati mogu bojiti uobičajenim metodama za bojenje proteina. Najprije se iz gela moraju ukloniti kompleksno nevezani antigeni i antitijela. Uklanjanjem nevezanih antigena i antitijela gel na kojem nema imunoprecipitata ostaje nakon bojenja nebojen i zato proziran.

Ispiranje gela čini se otopinom $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ ili otopinom koja uz NaCl sadrži i fosfatni pufer ($0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl} + 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ natrijeva

fosfata, pH = 7,1). Gel se ispiri više sati uz promjenu otopine za ispiranje. Nakon ispiranja gel se prekrije filtrirnim papirom i suši preko noći pri sobnoj temperaturi. Brže uklanjanje nevezanih antigena i antitijela iz gela postiže se ispiranjem uz prešanje.

Nakon elektroforeze na gel se položi navlaženi filtrirni papir iznad kojeg se postavi 2-3 cm debeo sloj mekanog papira za upijanje (filtrirni papir ili staničevina). Na vrh se postavi staklena ploča koja se optereti utegom kojim se postiže tlak od oko 10 g cm^{-2} . Nakon 15 min prešanja, pri čemu se debljina gela znatno smanji, gel se ispiri dva puta po 15 min otopinom $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl. (Katkad je ispiranje potrebno provoditi i više sati da bi slobodan gel nakon bojenja bio potpuno proziran.) Gel se zatim ispiri destiliranom vodom (15 min) te se ponovi postupak prešanja jednom ili dvaput. Nakon prešanja gel se potpuno posuši strujom toplog ili hladnog zraka s pomoću sušila za kosu ili na vrućoj ploči pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Prešanjem smanjena debljina gela omogućuje brzo bojenje i odbojivanje. Staklena ploča koja nosi prešani gel ostavlja se u otopini za bojenje 10 do 15 min. Ispire se destiliranom vodom, a zatim se drži 30 min u otopini za odbojivanje (otopina za odbojivanje prema potrebi se mijenja). Nakon odbojivanja gel se suši kako je rečeno.

Donja granica detekcije većine proteina antigena bez bojenja jest oko $5\text{--}10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ otopine analita, a bojenjem se osjetljivost povećava najmanje za 10 puta. Za bojenje se najčešće rabi modro bojilo (Coomassie® R 350), ali i druga (Xylene Brilliant cyanine G i Amido Black 10B). Ako se želi još veća osjetljivost detekcije, suhi gel boji se srebrom.

U detekciji imunoprecipitata rabe se i tehnike fluorescencije i radiometrije. U pripremi otopine analita za imunoelektroforeze, odnosno za povećanje topljivosti proteina membrana stanica te za sprječavanje agregacije i nespecifičnog taloženja tijekom elektroforeze, u gel od agaroze dodaju se urea u koncentraciji do $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ i neionski deterdženti ($0,1$ do 2 g/100 mL). Imunoelektroforeza nalazi široku primjenu u kliničkoj dijagnostici i farmaceutskoj industriji, kao službene (zakonom propisane) metode primjenjuju se u detekciji patvorina i uporabi zabranjenih aditiva u prehrambenoj industriji.

U imunoelektroforezi detekcija proteina temelji se na specifičnoj reakciji protein (antigen) – antitijelo u kojoj nastaje imunoprecipitat. Mnoge druge makromolekulske vrste specifično reagiraju. Lecitini kao proteini i glikoproteini reagiraju s drugim glikoproteinima, enzimi reagiraju sa supstratima, odnosno enzimi s inhibitorima. Temeljem tih specifičnih reakcija razvijene su metode afinitetne elektroforeze⁷. Analiza se čini na isti način kao u imunoelektroforezi.

⁷ T. C. Bøgg-Hansen, J. J. Hau, *Chrom. Librery*, **18B** (1981) 219.

8.2. Elektroforeza proteina

U kliničkoj analizi proteina seruma rabi se gel od agaroze koncentracije od 0,7 do 1 g/100 mL. Gel od agaroze rabi se i u analizi izoenzima važnih u medicinskoj dijagnostici (npr. laktat dehidrogenaze i kreatin kinaze). Najčešće se rabi gel u obliku ploče za horizontalnu napravu. U analizi proteina na gelu od agaroze primjenjuju se metode uz homogeni pufer i metoda diskontinuirane elektroforeze. Za detekciju i kvantifikaciju razdvojenih proteina primjenjuju se postupci istovjetni postupcima u detekciji i kvantifikaciji separiranih zona proteina na poliakrilamidnom gelu.

Bojenje proteina čini se nakon fiksiranja proteina u gelu. Fiksacija se čini umakanjem gela u otopinu trikloroctene kiselina (20 g/100 mL). Nakon ispiranja i sušenja pod tlakom (vidi gore) čini se bojenje gela (10 min u otopini s 0,5 g/100 mL Coomassie R-350 u 10 %-tnoj acetatnoj kiselini sa 25 % metanola). Nakon ispiranja (10 % octena kiselina, 25% metanol) gel se suši u komori s toplim zrakom. U detekciji i kvantifikaciji proteina na gelu od agaroze rabi se i metoda fluorescencije uz uporabu o-ftaldialdehida, i to na suhom ili vlažnom gelu.

Za specifičnu (pojedinačnu) detekciju proteina razdvojenih u gelu od agaroze rabi se metoda imunofiksacije (eng. immunofixation). To se čini tako da se na gel nakon razdvajanja nanese sloj otopine antitijela. Difuzijom u gel antitijela specifično reagiraju s nekim proteinima uz nastajanje netopljivog imunoprecipitata u gelu. Nakon imunofiksacije ostali proteini mogu se iz gela isprati.

Za specifičnu detekciju rabi se i metoda imunopreslikavanja (eng. immunoprinting), koje se čini tako da se na gel sa separiranim proteinima položi gel od agaroze koji sadrži antitijela ili membrana od acetata celuloze impregnirana s antitijelima. Proteini iz separacijskoga gela (antigeni) difundiraju na membranu s antitijelima. Proteini koji specifično reagiraju s antitijelima na membrani stvaraju imunoprecipitate temeljem kojih se onda mogu identificirati.

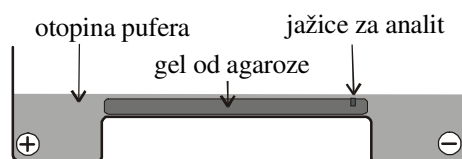
8.3. Elektroforeza nukleinskih kiselina

U neutralnoj i slabo lužnatoj otopini nukleinske kiseline, različite molekulske mase, imaju približno jednaku gustoću negativnog električnog naboja, tj. jednak električni naboj po jedinici mase. Zbog toga se u slobodnoj otopini ne mogu elektroforetski razdvojiti. Samo primjenom učinka molekularnog sita u mediju za separaciju mogu se međusobno razlučiti

temeljem veličine i oblika molekula. Izbor strukture i svojstava gela za separaciju nukleinskih kiselina ovisi o rasponu njihovih relativnih molekulskih masa. U razdvajanju velikih molekula rabi se gel od agaroze (ili miješani gel agaroze i poliakrilamida), a za separaciju malih molekula rabi se poliakrilamidni gel s vrijednošću T i do 20 g/100 mL.

Relativna molekulska masa nukleinskih kiselina može biti od 350 (pojedinačna baza), 1 000 do 2 000 (za male enzimske fragmente) do 10^8 .

Intaktne nativne (prirodne) molekule DNA separiraju se na gelu od agaroze. Gel od agaroze najčešće u obliku horizontalne ploče rabi se standardno u analizi i pročišćavanju DNA i RNA fragmenata veličina od 1 000 do 23 000 parova baza¹. U separaciji se rabi gel od agaroze uronjen izravno u otopinu pufera (eng. akronim «submarine» gel) kako pokazuje slika 8.10. Analit se unosi u jažice učinjene umetanjem «češlja» okomito u ploču gela prije njegova otvrdnjivanja. U otopinu analita dodaje se pokazno bojilo i saharoza (8 %) za povećanje gustoće otopine analita.



Slika 8.10. Načelo naprave za separaciju nukleinskih kiselina na gelu od agaroze uronjenom u otopinu pufera

Za detekciju vrpca DNA rabe se, najčešće, fluorescentna bojila (Etidium bromid ili SYBR[®] zeleno). Vrpce obojene fluorescentnim bojilom vidljive su pod pobudom UV-svjetla. Osjetljivost je detekcije između 100 pg i 1 ng po vrpca.

Bojila se interkaliraju u uzvojnici (spiralu) molekula pa osjetljivost detekcije ovisi o veličini molekule. Bojenje se može učiniti tijekom same elektroforeze² dodatkom bojila (etidium bromid, 0,5 µg/mL) u otopinu pufera ili nakon elektroforeze. Etidium bromid je *mutagen*, primjenjivati ga treba uz potrebne mjere zaštite.

U bojenju u otopini pufera za elektroforezu, osvjetljavanjem gela UV-svjetlom može se pratiti tijekom elektroforetskog razdvajanja. Detekcija se obavlja odmah nakon separacije. Za trajni zapis forezograma čini se fotografska slika odnosno danas češće videodokumentacija činjenjem preslike na termopapiru ili unošenjem podataka u računalo.

U separaciji DNA rabi se gel od agaroze debljine 1 do 10 mm koji se lijeva na podlogu propusnu (transparentnu) za UV-zračenje. Nakon

¹ D. Rickwood, B. D. Hames, *Gel electrophoresis of nucleic acids*, IRL Press Ltd. (1982).

² P. A. Sharp, B. Sugden and J. Sambrook, *Biochemistry*, **12** (1973) 3055

elektroforeze postupak bojenja i obezbojivanja gela od agaroze može se ubrzati prethodnim sušenjem gela. Gel od agaroze nakon elektroforetske separacije postavlja se na staklenu ploču i prekrije listom filtrirnoga papira. Uz pritisak na filtrirni papir gel se suši strujom toplog zraka. Gel lijevan na plastičnu foliju (Gel Bond Film) suši se izravno bez upijanja i pritiska s filtrirnim papirom. Na ovako pripremljenom gelu bojenje i obezbojivanje traje, najčešće, samo nekoliko minuta. Nakon obezbojivanja gel se može potpuno osušiti za dulju pohranu.

Suhi gel od agaroze vrlo slabo apsorbira UV-zračenje. Detekcija i kvantifikacija vrpca na suhom gelu može se učiniti i bez bojenja vrpca, izravnim mjerenjem apsorpcije UV-zračenja. Naime, nukleinske kiseline apsorbiraju UV-svjetlo u području valne duljine od 260 nm (mnogo jače nego proteini) pa se može učiniti izravna detekcija i kvantifikacija separiranih vrpca nukleinskih kiselina, na suhom gelu od agaroze, denzitometrom. Osjetljivost detekcije jest do 0,05 µg po vrpca.

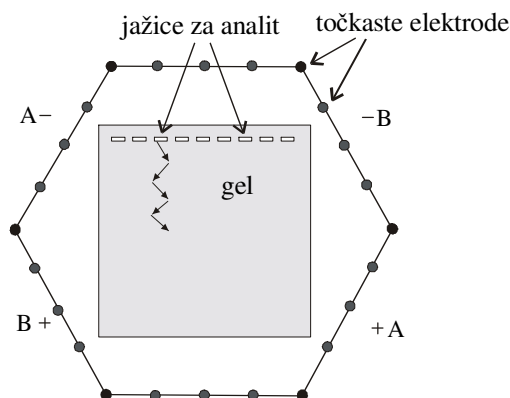
Lijevanjem gela od agaroze na malo nagnutu površinu može se učiniti gel od agaroze s promjenjivom debljinom od jednog do drugog kraja. Jakost električnog polja kroz gel funkcija je električnog otpora gela. Električni otpor gela obrnuto je razmjernan površini poprečnog presjeka gela. U gelu različite debljine, pri uspostavi vanjskog električnog napona, kroz gel će se uspostaviti *gradijent jakosti električnog polja*. Na gelu s gradijentom jakosti električnog polja mogu se separirati fragmenti DNA s velikim rasponom veličine molekula, slično kao i na poliakrilamidnom gelu s gradijentom koncentracije monomera. U separaciji nukleinskih kiselina rabi se gel s homogenim (najčešće) ili višefaznim puferom.

U razdvajanju kromosoma primjenjuje se i metoda elektroforeze s *pulsirajućim električnim poljem*³ na gelu od agaroze uronjenom u otopinu pufera. Velike molekule DNA s više od 20 000 parova baza orijentiraju se uzdužno u smjeru migracije i putuju istom brzinom te se ne mogu razdvojiti u klasičnoj elektroforezi s jednosmjernim električnim poljem.

U gelu pod učinkom pulsirajućeg električnog polja moraju mijenjati orijentaciju putovanja. Promjena smjera migracije odvija se uz stezanje i rastezanje molekula. Vrijeme relaksacije (eng. viscoelastic relaxation time) ovisi o veličini molekula. Tako dolazi do razlike u brzini migracije i razdvajanja molekula DNA.

Pulsiranje električnog polja kontrolira se, najčešće, računalom i izabire prema veličini separiranih makromolekula. Kut između električnih polja najčešće je 110 do 120 °. Trajanje pulsa može biti od 1 sekunde do 90 min, ovisno o veličini molekula koje se razdvajaju. Veće molekule bolje se razdvajaju uz dulji impuls.

³ D. C. Schwartz, C. R. Cantor, *Cell*, **37** (1984) 67.



Slika 8.11. Načelo elektroforeze s pulsirajućim električnim poljem

Elektroforetsko razdvajanje uz pulsirajuće električno polje može trajati i nekoliko dana. Toplina oslobođena tijekom separacije odvodi se cirkuliranjem, hladene, otopine pufera u kojem je uronjen gel. Unošenje otopina analita u jažice, detekcija i kvantifikacija razdvojenih vrpca makromolekula čini se isto kao i klasičnoj elektroforezi u gelu od agaroze.

U detekciji nukleinskih kiselina često se rabi metoda *hibridizacije*. Metoda hibridizacije rabi se za lokaciju i DNA i RNA molekula i njihovih fragmenata prenesenih na (imobilizirajuću) membranu. Temelji se na sposobnosti separiranih DNA i RNA da hibridiziraju, tj. da se uparuju u dvostruku uzvojnici, s radioaktivnom DNA odnosno RNA probom (npr. ^{32}P -označena T4 DNA). Vezanjem radioaktivne komponente omogućena je radiološka detekcija separiranih vrpca. Pokazano je da se metoda hibridizacije može izravno primijeniti za detekciju DNA i RNA i njihovih fragmenata na gelu od agaroze bez prenošenja na imobilizirajuću membranu⁴.

U analizi nukleinskih kiselina uz gel od agaroze rabe se i miješani gelovi agaroze i poliakrilamida. Miješani gel može se pripremiti tako da se zagrijanoj otopini agaroze dodaju svi sastojci za pripremu poliakrilamidnog gela. Temperatura smjese održava se na vrijednosti većoj od 35 °C. Najprije polimerizira poliakrilamidni gel. Smjesa se zatim ohladi i tako slijedno zgusne gel od agaroze. Može se učiniti i tako da se smjesa sastojaka oba gela ohladi da se zgusne gel od agaroze, a zatim unutar gela od agaroze slijedno polimerizira poliakrilamidni dio miješanoga gela.

⁴ M. Purrello, I. Balazs, *Anal. Biochem.*, **128** (1983) 393.

8.3.1. Separacija ribonukleinskih kiselina (RNA)

U separaciji nisko molekularnih RNA (tj. S-RNA, t-RNA i fragmenata većih molekula RNA) rabi se poliakrilamidni gel. Ovisno o rasponu veličine molekula primjenjuju se gelovi s različitim T od 10 g/100 mL za separaciju 4S- i 5S-RNA do 15 g/100 mL za separaciju manjih RNA molekula i fragmenata RNA do veličine malih oligonukleotida. U separaciji većih molekula, npr. 28S-RNA rabi se poliakrilamidni gel u kojem je $T = 2,5$ g/100 mL. Uporabom toga gela mogu se separirati molekule koje se razlikuju u veličini za samo jedan S. U separaciji većih molekula RNA rabe se kompozitni gelovi ili najčešće gel od agaroze. S obzirom na veliki opseg veličina RNA molekula, u separaciji se rabe i poliakrilamidni gelovi s gradijentom koncentracije s $T 2-10$ g/100 mL ili 2-20 g/100 mL.

Separacija molekula RNA provodi se i u prisutnosti denaturirajućih aditiva. Tako se sprječava agregacija molekula RNA, njihova adsorpcija na matricu gela te uklanjaju konformacijske razlike koje se očituju u separaciji na poliakrilamidnom gelu. Kao denaturirajuća sredstava u gel se dodaju urea (6-8 mol L⁻¹), formamid, formaldehid (2,2 mol L⁻¹), SDS (0,1 g/100 mL).

Elektroforetska separacija DNA kao i separacija RNA molekula ovisi ne samo o veličini i naboju čestice, nego i o konformaciji molekula.

Za određivanje relativne molekulske mase DNA i RNA molekula temeljem mjerenja migracije u separacijskom gelu potrebno je elektroforezu provesti u prisutnosti denaturirajućih sredstava; na taj se način poništava učinak agregacije i konformacijskih razlika molekula na migraciju, a time i na određenu (prividnu) relativnu molekulsku masu. Pokazan je⁵ linearan odnos između migracije (apsolutne i relativne) i logaritma M_r za RNA molekule relativne mase od $5 \cdot 10^5$ do $5 \cdot 10^6$ na gelu agaroze (1,5 g/100 mL), koji je sadržavao 5-8 mol L⁻¹ uree. Ispitani su učinci denaturacije s različitim tvarima u određivanju relativne molekulske mase RNA molekula⁶.

8.3.2. Sekvencija DNA molekula

Poznavanje građe i redoslijeda baza u molekulama DNA od temeljnog je značenja u biologiji i biokemijskom inženjerstvu. Karta sekvencija DNA pokazuje male razlike između vrlo sličnih molekula DNA. Izradom karata

⁵ K. P. Dudov, M. D. Dabeva, A. A. Hadjiolov, *Anal. Biochem.*, **76** (1976) 250.

⁶ H. Lehrach, D. Diamond, J. M. Wozney, H. Boedtker, *Biochemistry*, **16** (1977) 4743.

sekvencija mogu se utvrditi odsutnosti, dodavanja, reorganiziranja ili supstitucije segmenata DNA molekule.

Tako se mogu utvrditi i male evolucijske promjene ili rekombinacije između bliskih srodnika. Karta sekvencije DNA molekula podloga je za rekonstrukciju i kloniranje DNA molekula.

Poznavajući sekvenciju nukleotida virusa nekih bolesti (npr. slinavke ili šapa), rabeći tehnologiju rekombinacije DNA molekula mogu se sintetizirati umjetni peptidi koji se mogu rabiti za imuniziranje životinja protiv bolesti uzrokovanih dotičnim virusom. Utvrđena sekvencija nukleotida u DNA molekuli omogućuje utvrđivanje sekvencije aminokiselina u srodnim proteinima (koji su kodirani s DNA), što olakšava analizu mnogo složenijih molekula proteina.

Prvi korak u analizi DNA molekule jest njezino cijepanje na fragmente ili sinteza fragmenata komplementarnih određenom dijelu niti analizirane DNA i slijedno utvrđivanje mape fragmenata.

U izvornoj metodi sekvencije DNA sintezom fragmenata⁷ odnosno metodi s kemijskim cijepanjem⁸ DNA molekula, razdvajanje i identifikacija fragmenata čini se elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti denaturirajućih aditiva. Fragmenti obilježeni (markirani) radioaktivnim izotopima ³²P ili ³⁵S detektirani su autoradiografski na osušenom gelu male debljine (0,5 mm). Iz slike rasporeda vrpce razdvojenih fragmenata utvrđuje se sekvencija analizirane DNA što se čini s pomoću računala. Vrijeme potrebno za elektroforetsku separaciju (12 sati) i vrijeme za autoradiografsku identifikaciju te vrijeme za obradu rezultata čini ovaj postupak dugotrajnim.

Danas se u sekvenciji DNA molekula najčešće rabi Sangerova⁷ (eng. dideoxy chain-terminating methods). Izvorna metoda, za automatsku analizu sekvencije DNA molekula, modificirana⁹ je zamjenom radioaktivnih obilježivača fluorescentnim bojilima. U metodi se najprije čini sinteza malih molekula oligonukleotida (klica, početnica, eng. primer) komplementarnih s određenim dijelom niti analizirane DNA. Danas se početnice (primer) mogu komercijalno nabaviti.

Reakcijom niti DNA molekule i početnice nastaju segmenti dvostruke niti (uzvojnice). Djelovanjem DNA polimeraze segmenti se produžuju.

Vezenjem nukleotid trifosfata na kraj početnica, klica stvaraju se fragmenti komplementarni analiziranoj molekuli DNA. Prekid širenja segmenta čini se dodatkom male količine dideoksinukleozid trifosfata, koji se preko trifosfatne grupe vežu na rastući lanac fragmenta. Budući da dideoksinukleozid trifosfat nema hidroksilnu skupinu na 3'-kraju na koju bi se mogli vezati slijedni nukleotidi, širenje lanca fragmenta prekida se.

Tako se ovim reakcijama proizvode fragmenti različitih veličina koji su komplementarni s analiziranom molekulom DNA. Tako generirani DNA

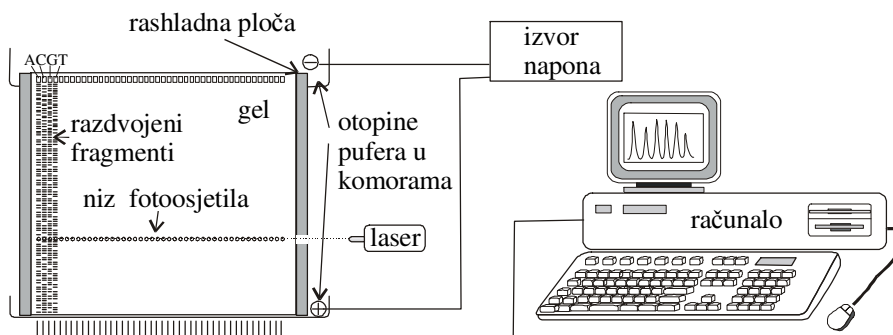
⁷ F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.*, **94** (1975) 441.

⁸ A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74** (1977) 560.

⁹ L. M. Smith i dr., *Nature*, **321** (1986) 674.

fragmenti (sekvencijske ljestve, eng. sequencing ladder) mogu se elektroforetski razdvojiti i tako detektirati.

Za detekciju fragmenta u automatskoj analizi obilježavanje segmenata čini se fluorescentnim bojilima. Budući da u građi DNA molekula sudjeluju četiri različita nukleotida, postoje i četiri različita dideoksinukleotida sa završnim A, C, G i T bazama.



Slika 8.12. Shema naprave za automatsku određivanje sekvencije DNA molekula

U automatskoj t.z. četvorotračnoj analizi sekvencije DNA metodom razdvajanja segmenata na ploči poliakrilamidnoga gela analiza se čini tako da se iz analizirane DNA načine četiri vrste segmenata. To se čini uz pomoć početnice (primer) koja se obilježi fluorescentnim bojilom (npr. fluoresceinom), DNA polimeraze i četiri različita dideoksinukleotida. Fragmenti učinjeni različitim dideoksinukleotidima imaju različite, tj. A, C, G i T završne baze. Uzorci se razdvajaju na poliakrilamidnom gelu u četiri paralelne vrpce.

Detekcija razdvojenih segmenata detektira se pobudom fluorescentnoga bojila interkaliranog u fragmentu s pomoću zrake UV-svjetla iz lasera. Fluorescencijom emitirano svjetlo bojila na fragmentu detektira se fotoosjetilom (fotodioda).

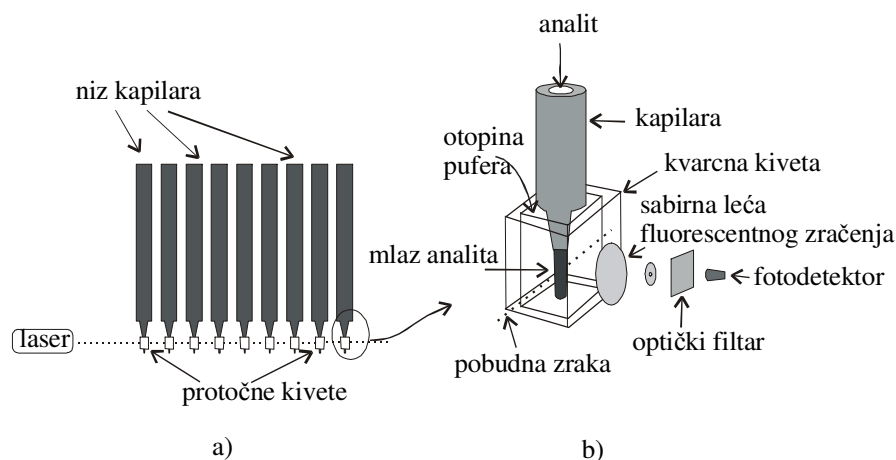
Fotoosjetila raspoređena su u nizu po širini separacijskoga gela. Pojedino fotoosjetilo registrirat će slijed fragmenata na pojedinoj vrpici razdvajanja onako kako migracijom dospiju do mjesta detekcije. Električni odzivi fotodetektora sakupljaju se i obrađuju s pomoću računala, tako se stvara automatska slika sekvencija analizirane DNA.

Komercijalno je razvijena automatska naprava za analizu DNA fragmenata temeljena na razdvajanju u vrlo tankoj ploči gela od agaroze¹⁰ debljine 190 μm .

¹⁰ A. Gutman, *LC-GC*, 7 (1999) 1020.

Bojenje fragmenata čini se fluorescentnim bojilom u separacijskom puferu tijekom migracije. Detekcija se čini pobudom bojila UV-zrakom iz lasera. Zraka iz lasera u detekcijsku se napravu dovodi optičkim kablom. U detekcijskoj napravi, koja se u koracima iznad gela pomiče širinom ploče, nalazi se i optički sklop koji fluorescentno zračenje skuplja i optičkim kablom dovodi u pretvornik koji optički signal prevodi u digitalni električni signal koji se vodi u računalo. Iz sabranih podataka crta se slika sekvencije analiziranog DNA. U metodi se postiže osjetljivost detekcije od 0,04 ng, a u uobičajenoj metodi na ploči poliakrilamidnog gela postiže se osjetljivost od 0,2 ng.

Treba naglasiti da je migracija fragmenata u gelu od agaroze ovisna isključivo o veličini fragmenta, a u poliakrilamidnom gelu ovisi i o sekvenciji baza. Fragmenti bogatiji na A i T bazama migriraju sporije od drugih.



Slika 8.13. Način detekcije fragmenata DNA razdvojenih elektroforezom u kapilari

Veliki napredak učinjen je razdvajanjem fragmenata DNA u kapilari ispunjenoj neumreženim, linearnim poliakrilnim gelom. Razdvajanje četiriju vrsta fragmenata čini se u nizu paralelnih kapilara u dvije dimenzije¹¹.

Na izlazu iz kapilara nalaze se protočne mikrokivete u kojima se čini pobuda fluorescentnoga bojila vezenog na fragmentima i slijedno sabiranje fluorescentnoga zračenja i kvantificiranje.

Uz mlaz analita iz kapilare kroz kivetu protječe (laminarno) i otopina pufera. Tako se smanjuju učinci refleksije i refrakcije svjetla na stijenkama kapilare. Električni signali odziva fotodetektora sakupljaju se i pohranjuju u računalo. Obradom prema prikladnom programu iscrtava se slika sekvencija

¹¹ J. Zhang, M. Yang, X. Puyang, Y. Fang, L. M. Cook, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, **73** (2001) 1324.

analizirane molekule DNA. Kako se čini elektroforeza u kapilari, detaljnije je opisano u poglavlju Elektroforeza u kapilari (vidi poslije).

Na području određivanja svojstava DNA molekula (eng. DNA typing) razvijene su mnoge elektroforetske tehnike koje se temelje na umnažanju fragmenta DNA putem PCR[®] tehnologije¹².

Veličina fragmenata u analizi jest od 50 do 1500 parova baza. Za ovu veličinu čestica mala je rezolucija razdvajanja na gelu od agaroze jer su pore u gelu prevelike za uspješno «prosijavanje» fragmenata, slaba je i osjetljivost detekcije zbog male količine interkaliranog fluorescentnog bojila (etidium bromid). Uporabom poliakrilamidnog gela uz bojenje sa srebrom postiže se bolja rezolucija i velika osjetljivost od samo 15 pg po vrpci¹³. Koriste se ploče gela za vertikalnu i horizontalnu napravu. U uporabi ultra tankog gela lijevanog na plastičnoj podlozi prednost ima horizontalna naprava.

Za brzo određivanje DNA polimorfizma različitih organizama, npr. bakterija, gljiva, biljaka ili životinja, razvijena je metoda (eng. Random amplified polymorphic DNA, RAPD)¹⁴ u kojoj se za umnažanje fragmenata genomske DNA koristi jedna kratka klica.

Modificira metoda (eng. DNA amplification fingerprinting, DAF)¹⁵ koristi kraću klicu za umnažanje fragmenata DNA različitih veličina. Time se postiže bolja rezolucija i osjetljivost pa se mogu preciznije ustanoviti varijeteti organizama. Metoda (RAPD) čini se u gelu od agaroze uz uporabu etidium bromida kao bojila ili na poliakrilamidnom gelu uz bojenja sa srebrom.

Za utvrđivanje samo aktivnih gena u velikom broju ukupnih gena stanice (≈ 1 milijun) koristi se DDRT metoda (eng. Differential display reverse transcription)^{16, 17} s autoradiografskom detekcijom.

Brža, efikasnija i neradioaktivna metoda (eng. rapid, efficient, nonradioactive, REN)¹⁸ čini se na horizontalnoj ploči gela na plastičnoj podlozi uz bojenje srebrom vrpce DNA za slijedno umnožavanje.

U studiju mutacija DNA najpouzdanija je, skupa i dugotrajna, metoda sekvencije DNA. Razvijene su mnoge, brže, metode za utvrđivanje mutacije koje su detaljno opisane u literaturi¹⁹

¹² PCR proces zaštićen je USA patentom 4,683,195 i 4,683,32 u posjedu Hoffman La Roche Inc.

¹³ B. J. Bassam, G. Caetano-Annollés, P. M. Gresshoff, *Anal. Biochem.*, **196** (1991) 80.

¹⁴ J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey, *Nucleic Acids Res.*, **18** (1990) 6531.

¹⁵ G. Caetano-Annollés, B. J. Bassam, P. M. Gresshoff, *Bio Technology*, **9** (1991) 553.

¹⁶ P. Liang, A. B. Pardee, *Science*, **257** (1992) 967.

¹⁷ D. Bauer, H. Müller, J. Reich, H. Riedel, V. Ahrenkiel, P. Warthoe, M. Strauss, *Nucleic Acid Res.*, **21** (1993) 4272.

¹⁸ J. Lohmann, H. P. Schickle, T. C. G. Bosch, *BioTechniques*, **18** (1995) 200.

¹⁹ U. Landegren , Ed. *Laboratory Protocols for Mutation Detection*, Oxford University Press (1996)

9. IZOELEKTRIČNO SABIRANJE (FOKUSIRANJE)

Metoda izoelektričnog sabiranja (eng. akronim: Iso-electric focusing) može se primijeniti samo na molekule koje imaju efektivni pozitivni ili negativni električni naboj. Rabi se za razdvajanje (separaciju) amfoternih molekula proteina, peptida i enzima. Te molekule, ovisno o koncentraciji vodikovih iona u mediju, imaju pozitivni ili negativni električni naboj, a pri izoelektričnoj točki, tj. određenom pH, efektivni (neto) električni naboj nula im je. Budući da se razdvajanja spomenutih molekulskih vrsta temelje samo na razlici u efektivnom električnom naboju, a ne na molekularnoj masi čestica, izoelektrično sabiranje čini se u mediju bez učinka molekularnog sita, tj. u slobodnoj otopini s gradijentom gustoće, poliakrilamidnom gelu velike poroznosti (mali T), agaroznom gelu ili na podlozi s granulama (npr. Sephadex granule).

Izoelektričnim sabiranjem postiže se vrlo visoka rezolucija razdvajanja makromolekula kojim se izoelektrične točke razlikuju za samo $\Delta\text{pH} = 0,001$.

Osim u analizi i identifikaciji makromolekula, izoelektrično sabiranje rabi se za identifikaciju genetskih varijacija i utvrđivanje kemijskih, fizičkih i bioloških učinaka na proteine, enzime i hormone za izolaciju proteina i u preparativne svrhe.

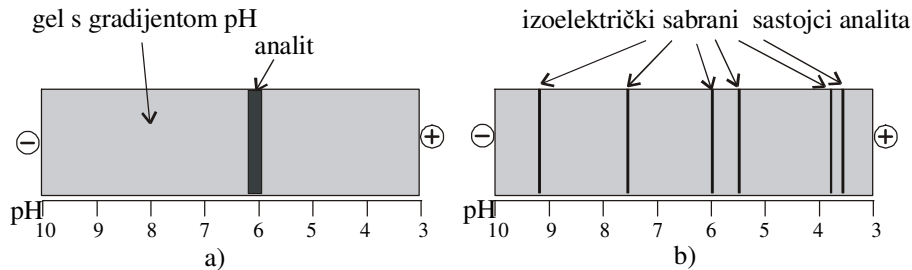
9.1. Načelo metode

Metoda se temelji na migraciji makromolekula u mediju u kojem je uspostavljen *gradijent koncentracije vodikovih iona odnosno gradijent pH*.

Migracija se čini uspostavljanjem električnog polja, pri čemu komponente analita migriraju, ovisno o električnom naboju, prema anodi ili katodi. Putuju do mjesta u mediju na kojem je pH jednak izoelektričnoj točki date (odnosne) molekulske vrste (pI). Migracija čestica prestaje na mjestu u kojem je pH medija jednak vlastitom pI. Na tom mjestu čestica postiže električni naboj nula, primajući ili predavajući vodikove ione puferu na tom mjestu u mediju. Ako se molekula difuzijom udalji od tog mjesta, opet postaje električki nabijena pozitivno ili negativno ovisno o smjeru difuzije i

migrira natrag do mjesta u mediju na kojem je pH jednak njezinoj pI. Ovo nazivamo *učinkom sabiranja* (eng. focusing effect).

Budući da se migracija odvija učinkom električnog polja i da prestaje nakon što različite molekulske vrste analita dosegnu mjesta u mediju na kojima je pH jednak pI pojedine molekulske vrste, izoelektrično sabiranje možemo smatrati *elektroforezom koja se odvija unutar granica pH gradijenta*.



Slika 9.1. Načelo izoelektričnog sabiranja; a) nanošenje uzorka analita na gel u kojem je uspostavljen gradijent pH, b) razdvojene i sabrane komponente analita

Izoelektričnim sabiranjem postiže se velika osjetljivost detekcije, jer se makromolekule koncentriraju u usku zonu u mediju na mjestu na kojem je pH jednak njihovoj izoelektričnoj točki.

Rezolucija određivanja može se povećati primjenom medija u kojem raspon gradijenta iznosi samo nekoliko pH jedinica.

Nakon što su se makromolekule analita razdvojile i sabrale u zone u kojima je pH jednak pojedinačnom pI, njihov raspored više se s vremenom ne mijenja. Kažemo da je izoelektrično sabiranje završna (eng. end point) metoda.

Najmanja razlika u izoelektričnoj točki (ΔpI) dviju molekulskih vrsta koja se može detektirati pri izoelektričnom sabiranju ovisi o mnogim čimbenicima i prema Svenssonu¹ iskazana je relacijom:

$$\Delta pI = \sqrt{\frac{D [d(pH)/dx]}{E [-du/d(pH)]}} \quad (9-1)$$

gdje su: D difuzijski koeficijent makromolekule, E jakost električnog polja (V/cm), $d(pH)/dx$ gradijent pH medija i $du/d(pH)$ brzina promjene električne pokretljivosti makromolekule prema promjeni pH u području izoelektrične točke. To je obilježje dotične molekulske vrste i učinkom vanjskih čimbenika ne može se mijenjati.

¹ H. Svensson, *Acta Chem. Scand.*, **15** (1961) 325.

Dakle, rezolucija se može povećati: smanjenjem brzine difuzije, npr. smanjenjem temperature ili pora medija, smanjenjem gradijenta pH, tj. uporabom medija u kojem je promjena pH od nekoliko jedinica uzduž ukupnog puta razdvajanja, te povećanjem jakosti električnog polja. Povećanje jakosti električnog polja, zbog sigurnosti mjeritelja i tehničkih mogućnosti, ograničeno je.

Metode izoelektričnog sabiranja čine se najčešće na horizontalnoj ploči gela lijevanog na plastičnoj foliji. Pri izoelektričnom sabiranju potrebno je učinkovito kontrolirati temperaturu što se najlakše postiže na horizontalnoj keramičkoj ploči horizontalne naprave za elektroforezu hladene protokom vode. Otopina analita nanosi se na gel nakon uspostavljenog gradijenta pH. U mjestu nanošenja analita pH medija ne smije uzrokovati agregaciju odnosno precipitaciju pojedinih sastojaka analita. Izbor mjesta nanošenja analita moguće je učiniti samo na horizontalnom gelu s otvorenim i dostupnim licem gela.

Izoelektrično sabiranje u primjeni za analitičke svrhe provodi se na poliakrilamidnom gelu ili na gelu od agaroze. Rabe se vrlo tanki gelovi u obliku horizontalne ploče lijevani na plastičnu foliju. Međutim, rabe se i postupi uz primjenu gela u obliku valjka lijevani u staklenoj cijevi. Preduvjet dobrog razdvajanja i reproducibilnosti u izoelektričnom sabiranju jest stabilan, kontinuirani gradijent pH uzduž smjera razdvajanja u gelu s visokim kapacitetom pufera i dobrom električnom vodljivošću.

9.2. Oblikovanje gradijenta pH

Dva su načina uspostavljanja gradijenta pH u gelu. U jednom se gradijent uspostavlja s pomoću amfoternih pufera, *tz. prijenosnih amfolita* (eng. carrier ampholytes), koji se u električnom polju strukturiraju (raspoređuju) u gelu između anode i katode prema vlastitom pI i tako formiraju gradijent pH uzduž gela. Drugi je način formiranja gradijenta pH s pomoću *imobiliziranih pufera* koji su sastavnice polimerne strukture samoga gela.

Prirodni amfoterni spojevi, kao što su aminokiseline i peptidi, mogu se rabiti u izoelektričnom sabiranju. Nedostatak im je što pri izoelektričnoj točki imaju mali puferski kapacitet, što uzrokuje ograničenu primjenu.

Danas se praktično isključivo rabe sintetski amfoterni spojevi (amfoliti) koji dolaze pod različitim trgovačkim imenima, ovisno o proizvođaču (Ampholine[®], Pharmalyte[®], Servalyte[®], Biolyte[®]).

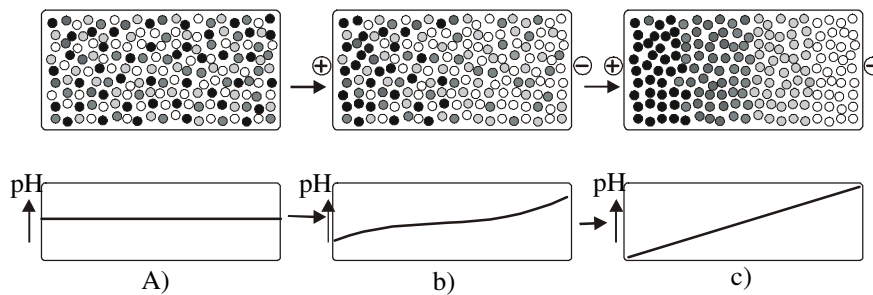
To su zapravo smjese od 600 do 700 homologa amfoternih spojeva s izoelektričnim točkama od 3 do 10. U električnom polju amfoliti se, prema pripadajućim vrijednostima pI, raspoređuju između anode i katode i tako

stvaraju gradijent pH u mediju kojem su umiješani. U izoelektričnoj točki imaju veliki kapacitet pufera, to jest mogu primiti ili dati stanovitu količinu vodikovih iona a da se pri tom pH, mjerljivo, ne promjeni.

Relativna im je molekulska masa između 300 i 900. Zbog velike hidrofilnosti ne vežu se na proteine. Uporabom sintetskih amfolita može se učiniti gradijent pH od $\text{pH} = 3$ do $\text{pH} = 10$. Priređuju se smjese s malim intervalom pH (jedna ili dvije jedinice pH). One se rabe u separaciji makromolekula kojima se izoelektrična točka malo razlikuje i za postizanje bolje rezolucije u razdvajanju.

Ampholine se proizvode reakcijom alifatskih oligoamina s akrilnom kiselinom, a *Pharmalyte* su kopolimerizati glicina, glicilglicina, amina i epiklorhidrina. Pokazano je da imaju slična svojstva².

U vodenoj otopini smjese amfolita električni naboj pojedinog homologa ovisi o pH otopine. Pri pH jednakom izoelektričnoj točki homologa (pI) njegov električni naboj jest nula, on je električki nenabijana molekula (HA), pri nižem pH u kationskom je obliku (H_2A^+), odnosno pri višem pH jest anion (A^-). Dakle, u smjesi, koja ima određeni, prosječni, pH, homolozi su u kationskom, anionskom ili električki nenabijenom obliku. Kada se gel u kojem su umiješani amfoliti postavi u električno polje, molekulski ioni amfolita s negativnim nabojem, tj. s nižim pI, migriraju prema pozitivnom polu (anodi) a oni s pozitivnim nabojem, tj. višim pI, prema negativnom polu. Ostali homolozi raspoređuju se, prema njihovom pI, između onih s najnižim i najvišim pI.



Slika 9.2. Dijagram formiranja gradijenta pH u gelu s pomoću umiješanih amfolita; a) prije uspostavljanja električnog polja, b) tijekom strukturiranja amfolita, c) konačno stanje uspostavljenoga gradijenta

Uz migraciju homologa migriraju i vodikovi odnosno hidroksid ioni. Migracija homologa amfolita prestaje na mjestu u gelu gdje je pH okoline jednak pI tog homologa. Tako se kroz gel uspostavlja gradijent pH u granicama određenim rasponom vrijednosti pI primijenjenih amfolita.

² T. LÅÅs, I. Olsson, *Electrophoresis*, 2 (1981) 235.

Što je veći broj homologa u smjesi amfolita u mediju, to je jednoličniji (monotoniji) gradijent pH.

Budući da rabljeni amfoliti imaju malu relativnu molekulsku masu, neprestano difundiraju izvan područja pripadajućeg pI, postaju električki nabijeni te migriraju natrag u područje vlastitog pI. Na taj se način održava konačno stanje gradijenta pH. Za bolju postojanost gradijenta pH između gela i elektroda polažu se vrpce filtrirnoga papira namočene u otopinu za elektrode. Kisela otopina rabi se za anodu, a lužnata (bazna) za katodu. Ako difuzijom granični amfoliti dospiju do anode odnosno katode, postaju negativno odnosno pozitivno nabijeni te migriraju natrag. Tako se poboljšava stabilnost granica gradijenta.

Poteškoća se očituje s gradijentom pH ostvarenim s prenosivim amfolitima kada se postupak razdvajanja sabiranjem mora činiti dulje, a to se događa ako je uzorak analita jako viskozan, npr. zbog sadržaja aditiva uree ili neionskog deterdženta; tada se gradijent pH razvlači prema katodi i anodi, posebice prema katodi. U sredini gela pojavljuje se zaravnanje gradijenta u kojem je smanjena električna vodljivost.

Zato je uz korištenje prenosivih amfolita potrebno ograničiti vrijeme separacije analita i provoditi mjerenja usporednih uzoraka analita pod reproducibilnim uvjetima.

Kontrola uspostavljenog gradijenta pH u gelu može se učiniti izrezivanjem segmenata gela uzduž crte razdvajana. Izrezani segmenti homogeniziraju se u malom volumenu deionizirane vode i u dobivenoj suspenziji mjeri se pH uz uporabu kombinirane staklene mikroelektrode. Brže i jednostavnije izravno je mjerenje pH-metrom s pomoću elektrode s ravnom plosnatom membranom koja se polaže izravno na lice gela. Mjerenje je potrebno učiniti pri istoj temperaturi pri kojoj se čini razdvajanje analita, jer pH ovisi o temperaturi. Poteškoću u mjerenju čini CO₂ iz zraka, koji difundira u gel, gdje reakcijom s vodom nastaju karbonat ioni, koji u lužnatom području medija smanjuju pH gela. Taj učinak može se izbjeći tako da se mjerenje i razdvajanje čini u atmosferi inertnog plina (npr. dušika).

Da bi se izbjegle pogreške koje se javljaju pri mjerenju pH, najbolje je rabiti proteine poznatog pI, koji se unose u gel i služe kao obilježivači (markeri) gradijenta pH. Tako se pI sastojaka analita mogu odrediti uporabom kalibracijske krivulje pH temeljene na poznatim pI primijenjenih proteina obilježivača.

Neki od rabljenih proteina koji se mogu, u vrlo čistom obliku, naći na tržištu jesu: pepsin pI = 2,9, glukoza-oksidaza pI = 4,2, anhidraza karbonatne kiseline pI = 5,9, mioglobin pI = 6,8, tripsinogen pI = 8,7, ribonukleaza pI = 9,3, lizozim pI = 10.

9.3. Nanošenje otopine analita

Pri izoelektričnom sabiranju na ploči gela otopina analita nanosi se na površinu gela. To se može učiniti tako da se otopina uzorka nakapa na komadiće filtrirnoga papira ili pamuka, koji se razmaknuto polažu na gel. Više se rabi način s pomoću vrpce silikonske gume sa zdencima-otvorima, koja se položi na površinu gela. U zdence se na vrpi unose uzorci (do 40 :L) s pomoću mikropipete. Tako se na ploču gela širine 25 cm može nanijeti i do 50 uzoraka analita za usporednu analizu. pH medija na mjestu nanošenja uzorka ne smije uzrokovati taloženje odnosno agregacije proteina analita. Najpovoljnije mjesto unošenja uzorka utvrđuje se pokusom. To se čini tako da se uzorak analita nanosi na različita mjesta uzduž gradijenta pH i tako odredi najpovoljnije mjesto na kojem ne nastaje precipitacija ili agregacija proteina analita.

U preparativne svrhe (veća količina analita) uzorak se nanosi na jednom i drugom kraju gradijenta pH. Pri unošenju analita kroz gel se održava mala jakost električnoga polja. Tako se sprječava agregacija makromolekula. Pri uporabi valjkastog gela otopina uzorka unosi se na vrh stupca. Na sloj otopine analita pažljivo se nadsvodno nalije stupac 5 %-tne otopine saharoze. Na taj se način otopina analita razdvaja od izravnog dodira s otopinom pufera u komorama za elektrodu, u kojima su ekstremne vrijednosti pH.

Velika količina soli u analitu uzrokuje slabo razdvajanje komponenata. Osim toga velik sadržaj iona odnosno električki nabijenih aditiva povećava vodljivost medija, time i jakost električne struje, a slijedno i jače zagrijavanje tijekom razdvajanja. Zato se prije separacije iz analita uklanjaju otopljene soli gel filtracijom, ultrafiltracijom, dijalizom i drugim metodama.

Topljivost hidrofobnih proteina analita postiže se dodatkom uree (do 8 mol L⁻¹) odnosno neionskih deterdženata (Tween 80, Triton X-100, itd., 1-2%). Međutim velika koncentracija uree i drugih aditiva koji pospješuju topljivost može uzrokovati disocijaciju polimernih proteina na sastavne podjedinice i tako denaturirati proteine analita.

9.4. Izoelektrično sabiranje u poliakrilamidnom gelu

Poliakrilamidni gel ima vrlo mali elektroosmotski učinak, veliku mehaničku i kemijsku stabilnost i dobru prozirnost. U izoelektričnom

sabiranju najčešće se rabi poliakrilamidni gel, u kojem je $T = 5$ g/100 mL, a C od 3 do 5 % i veličina pora oko 5 nm. Takav gel ima dobra mehanička svojstva i veličinu pora koja ne uzrokuje separaciju molekula prema njihovoj veličini.

U pripravi gela primjenjuje se kemijska, a ne fotokemijska polimerizacija.

Priprema gela čini se na uobičajeni način, ali se monomer i umreživač ne otapaju u puferu nego u vodi ili 10 %-tnoj otopini sorbitola. U otopinu monomera dodaje se 1- 2 % amfolita. Nakon deaeracije u smjesu se dodaje katalizator. Prema potrebi u otopinu za polimerizaciju umiješa se urea i drugi aditivi. Smjesa za polimerizaciju lijeva se u staklenu cijev za valjkasti gel ili u kalup sa staklenim pločama za pločasti gel. Rabe se gelovi male debljine 0,5 do 1 mm. Budući da je, uz određeni napon razdvajanja, jakost struje proporcionalna površini presjeka gela, što je manja debljina gela, to je i struja manja, a time i zagrijavanje. Hlađenje je također učinkovitije, što je gel tanji. Zato se uz korištenje tanjega gela može primijeniti viši napon separacije, što znatno povećava rezoluciju razdvajanja i skraćuje vrijeme separacije. Uz to je i bojenje i odbojivanje tankoga gela brže i potrošnja kemikalija manja, posebice skupih amfolita.

Međutim, tanki gel lako se cijepa, zato se lijeva tako da se veže na plastičnu foliju (GelBond PAG film[®]) koja se pri izravnom lijevanju položi na horizontalnu podlogu. Pri lijevanju u kalup folija se umeće uz unutarnju površinu jedne staklene ploče kalupa za lijevanje. Za vezanje gela rabi se *silanizirana* staklena ploča. Za silanizaciju se na staklenu ploču nanese tanki sloj 0,1 %-tne otopine Silana A-174 u acetonu i osuši se na zraku. Tako stvoreni sloj na staklu sadrži reaktivne dvostruke veze na koje se poliakrilamidni gel kemijski veže. Druga staklena ploča kalupa premaže se otopinom silikona da se lakše odvoji od gela pri rastavljanju kalupa.

Danas se sve više rabe tvornički pripremljeni, osušeni, poliakrilamidni gelovi, iz kojih su ispiranjem uklonjeni ostatci katalizatora i nevezanog monomera. Prije uporabe takav gel rehidrira se u otopini koja sadrži 10 % etilenglikola, vodu i 2 % amfolita. U gel se mogu unijeti i potrebni aditivi, kao što je urea i neionski deterdženti radi topljivosti hidrofobnih proteina.

Izoelektrično sabiranje u poliakrilamidnom gelu čini se na uobičajenoj aparaturi za elektroforezu. Komora za negativnu elektrodu puni se s $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH a za pozitivnu elektrodu s $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4 ili H_3PO_4 . U iste svrhe za gel s gradijentom od 2 - 3 jedinice pH komore stavlja se 2 %-tna otopina komercijalnog amfolita (npr. Ampholine), prikladnog pH, i to u jednu ili drugu komoru ili u obje komore. U radu s gelom gradijenta pH od 4 do 7 u komoru za anodu stavlja se $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ octena kiselina, a za lužnati gel s gradijentom pH = 8,5- 11,0, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ otopina histidina.

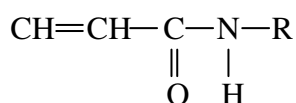
Za formiranje gradijenta pH rabe se naponi od 200 do 400 V (15 do 20 min), a za izoelektrično sabiranje naponi od 1 000 do 2 000 V (oko 2 sata) uz

uobičajeni razmak elektroda od 10 cm. Točni radni uvjeti dati su u protokolima koje proizvođači amfolita daju uz proizvod.

9.5. Poliakrilamidni gel s nepomičnim gradijentom pH

Zbog ograničenja i nedostataka u formiranju i postojanosti gradijenta pH učinjenog s pomoću prenosivih amfolita razvijana je metoda¹ pripreme poliakrilamidnoga gela s nepomičnim gradijentom pH (engl. akronim Immobilized pH gradients). Nepomični pH gradijent linearan je i postojan bez obzira na prisutne soli, pufer odnosno proteine analita i u njemu se postiže bolja reprodukcija razdvajanja makromolekula.

Gradijent pH stvara se s pomoću derivata akrilamida kemijske strukture:



U spojevima je R karboksilna ili tercijarna aminoskupina. Te slabe kiseline odnosno baze, *imobilini* (Immobilines[®]), ugrađuju se kopolimerizacijom u matricu gela zajedno s akrilamidom i umreživačem.

Komercijalno su dostupne dvije vrste kiselih derivata s pK = 3,6 i pK = 4,6 i četiri bazna s pK = 6,2, pK = 7,0, pK = 8,5, pK = 9,3.

Gradijent pH formira se s pomoću najmanje dva derivata, jednog veće kiselosti i drugog manje kiselosti, od kojih jedan ima pK blizu središnje vrijednosti opsega željenog pH gradijenta. Dvije otopine monomera, imobilina, umreživača i katalizatora miješaju se pri lijevanju u kalup na isti način kao i pri pripremi gela s gradijentom poroznosti (vidi str. 62.). Dodatkom glicerola jednoj se otopini poveća gustoća.

S dostupnih šest komercijalnih vrsta imobilina moguće je pripremiti sve vrste gradijenta, od onih sa širokim opsegom pH do onih s vrlo uskim opsegom pH. Gelovi (najčešće debljine 0,5 mm) lijevaju se u kalup s plastičnom folijom (GelBond PAG film) na koju se pri polimerizaciji gel veže. Nakon očvršćivanja gel se ispiri s vodom i suši. Prije uporabe rehidrira se u vodi ili otopini uree i neionskoga deterdženta.

Komercijalno su dostupni već gotovi gelovi s nepomičnim pH gradijentom (Immobiline DrayPlates[®]), koje treba samo prije uporabe rehidrirati. U izoelektričnom sabiranju s tom vrstom gela električni kontakt uspostavlja se izravnim polaganjem elektroda na krajeve gela ili preko kontaktnih papirnatih vrpca namočenih vodom. Ta vrsta gela ima manju

¹ B. Bjellqvist i dr., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **6** (1982) 317.

električnu provodnost pa se mogu rabiti i viši naponi izoelektričnog fokusiranja (do 3500 V) a da se pri tom gel ne pregrije.

Otopina analita nanosi se na gel uz primjenu komadića filtrirnoga papira ili maske od silikonske gume. Vrijeme izoelektričnog sabiranja jest 5 sati i dulje (preko noći).

U primjeni ove vrste gela može se povećati rezolucija sabiranja tako da se elektrode, nakon početnog sabiranja, premjeste bliže jedna drugoj na područje gela u kojem se nalaze proteini s kojima želimo postići bolju rezoluciju razdvajanja. Približavanjem elektroda postiže se veća jakost električnog polja, a time i bolje razdvajanje.

Poliakrilamidni gelovi s nepomičnim gradijentom pH nalaze široku primjenu u dvodimenzijskoj elektroforezi (vidi kasnije).

Budući da pK pufera kojim se ostvaruje gradijent pH (imobilini, amfoliti) i pI analiziranih molekulskih vrsta ovise o temperaturi, izoelektrično sabiranje treba činiti pri konstantnoj, kontroliranoj, temperaturi. Najčešće se radi pri 10 °C .

9.6. Izoelektrično sabiranje u gelu od agaroze

Gel od agaroze jednostavnije je pripremiti nego poliakrilamidni gel. Za razliku od poliakrilamidnoga gela, on nije otrovan i ne sadrži katalizator koji može interferirati u procesu razdvajanja. U 1 %-tnom gelu od agaroze veličina je pora oko 150 nm. Zbog velikih pora gel od agaroze nema u razdvajanju makromolekula učinak molekularnog sita i u njemu se mogu razdvojiti i molekule kojima je relativna molekulska masa 10^7 i veća. Danas je komercijalno dostupna posebno počišćena i preparirana agarozna s vrlo malim elektroosmotskim učinkom, prikladna za pripravu gela s gradijentom pH za izoelektrično sabiranje. Najčešće se rabi gel u obliku ploče koji se lijeva izravno na površinu staklene ili plastične ploče ili fleksibilanu plastičnu foliju. Potpuno jednolična debljina gela postiže se lijevanjem u kalup u kojem je na jednu ploču priljepljena fleksibilna plastična folija (GelBond film®).

Najčešće se rabi gel s 0,8 % agaroze, 2,7 % amfolita (Ampholine ili Pharmalyte) i 10 % sorbitola (sorbitol daje bolja mehanička svojstva gelu i smanjuje elektroosmotski tok vode). Sorbitol i agarozna otopina otupe se, uz miješanje, u vodi zagrijanoj blizu točke vrenja. U otopinu ohlađenu na 60 – 80 °C dodaje se otopina amfolita i smjesa se lijeva izravno na horizontalnu podlogu ili u kalup. Najčešće se rabe gelovi debljine 1 do 1,5 mm. Budući da je za potpuno formiranje matrice gela potrebno duže vrijeme, gel od agaroze najčešće se rabi drugi dan nakon priprave, a ne odmah nakon očvršćivanja.

Pri izoelektričnom sabiranju u gelu od agaroze kao elektrolitna otopina za katodu rabi se $0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, a za anodu $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ili $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ octena kiselina.

Gradijent pH u gelu od agaroze strukturira se uz napon do 1400 V kroz 30 min. Nakon nanošenja otopine analita izoelektrično sabiranje čini se uz napon do 1500 V, 30 do 60 minuta.

Razdvajanje i izoelektrično sabiranje proteina u gelu od agaroze često se rabi kao prvi stupanj analize u imunoelektroforezi.

9.7. Detekcija proteina

Nakon izoelektričnoga sabiranja u gelu razdvojeni proteini kvalitativno se i kvantitativno detektiraju nakon izravnog bojenja ili bojenja nakon imunoprecipitacije ili se prenose na imobilizirajuću membranu. Najčešće se za bojenje rabi Coomassie plava. Prije bojenja razdvojene proteine treba učinkovito fiksirati (vezati) na matricu gela i iz gela isprati amfolite. Fiksiranje se čini umakanjem gela u 20 %-tnu otopinu trikloroctene kiseline. Gel od agaroze nakon fiksiranja se ispire, suši filtrirnim papirom pod pritiskom, a zatim vrućim zrakom u komori. Nakon sušenja bojenje se čini umakanjem (10 min) u otopinu koja sadrži 0,5 % Coomassie R-350, 10 % octene kiseline, 25 % metanola. Nakon bojenja, odbojivanje matrice gela čini se ispiranjem vodenom otopinom koja sadrži 10 % octene kiseline i 25 % metanola dok gel ne postane potpuno proziran.

Nakon sušenja, kvalitativna detekcija čini se uspoređivanjem s rasporedom razdvojenih zona proteina–obilježivača koji se separiraju i sabiru pri istim uvjetima kao i proteini analita. Kvantitativno se količina pojedinoga proteina određuje denzitometrijski.

Kada se želi detektirati proteine koji tvore imunoprecipitate s određenom vrstom antitijela, onda se fiksiranje tih proteina u gelu čini tako da se površina gela prekrije vodenom otopinom antitijela i ostavi u vlažnoj komori pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ da se difuzijom stvori imunoprecipitat (90 min). Nakon ispiranja i sušenja pod tlakom čini se bojenje imunoprecipitata s Coomassie plavom i odbojivanje matrice kako je već opisano.

Bojenje i detekcija razdvojenih proteina u poliakrilamidnom gelu čini se različitim bojilima. Nakon fiksiranja i ispiranja amfolita primjenjuju se Coomassie plava, Amido crna, Xylene Cyanine Brilliant i druge. Veća osjetljivost detekcije postiže se bojenjem srebrom koje se može primijeniti za gel od agaroze i za poliakrilamidni gel.

9.8. Izoelektrično sabiranje za preparativne svrhe

Razdvajanje i izoelektrično sabiranje i izolacija proteina može se učiniti u različitim medijima. Danas se to najčešće čini u horizontalnim plitkim koritima ispunjenim granuliranim gelom.

Za pripremu granuliranoga gela rabi se dekstran ili Sephadex. Dekstran je ugljikohidratni, u vodi netopljivi, polimer s linearnim lancima glukopiranozilnih ostataka (M_r od 60 000 do 90 000). Sephadex je također umreženi dekstran. Dekstran u vodi bubri stvarajući granulirani gel. Granulirani gel vrlo čistog dekstrana miješa se s prenosivim amfolitima (Ampholine[®] ili Pharmalyte[®]) i ulijeva u korito. Učinkom električnoga polja kroz gel se strukturira gradijent pH.

Za unošenje otopine proteina za separaciju, dio gela u izabranom području gradijenta pH vadi se i miješa s otopinom proteina te vraća natrag u korito. Razdvajanje i izoelektrično sabiranje čini se uz napon do 2 000 V tijekom više sati.

Tok i učinak razdvajanja i sabiranja utvrđuje se tako da se na površinu gela položi vrpca suhog filtrirnoga papira ili vrpca membrane celuloznog acetata. Vrpca se pažljivo skine nakon što papir upije malu količinu tekućina iz gela. Vrpca nosi malu količinu razdvojenih proteina koji su preslika njihova rasporeda u gelu. Nakon fiksiranja u otopini trikloroctene kiseline, ispiranja, bojenja i odbojivanja vrpce, dobije se otisak rasporeda separiranih zona u granuliranom gelu.

Nakon separacije i sabiranja gel se, temeljem otiska na papiru, utiskivanjem okomitih pregrada podijeli na segmente, frakcije, koje se lopaticom vade iz korita. Iz izdvojenog dijela gela elucijom s malim volumenom otopine pufera izolira se pojedina molekulska vrsta.

Izolacija i pročišćavanje čistog proteina iz eluata koji sadrži i otopljene amfolite čine se ispljavanjem ili taloženjem proteina odnosno gel filtracijom. Otopljeni elektroliti mogu se ukloniti dijalizom ili kromatografijom s ionskim izmjenjivačima. Masa, na taj način izoliranih proteina može biti i do 1 g.

Za razdvajanje i izoelektrično sabiranje te izolaciju manjih količina proteina rabi se i poliakrilamidni gel. Nakon sabiranja i utvrđivanja rasporeda separiranih vrpce gel se reže u dijelove iz kojih se izoliraju separirane molekulske vrste. Budući da se proteini čvrsto vežu na matricu gela, mora se primijeniti elektroforetska elucija.

U izolaciji peptida rabi se poliakrilamidni gel s nepomičnim gradijentom pH. Naime, peptidi i prenosivi amfoliti slične su relativne molekulske mase. Izoelektričnim sabiranjem na gelu s prenosivim amfolitima separirani peptid ima i isti električni naboj kao i homolog amfolita na mjestu sabiranja pa se nakon elucije ne mogu separirati. Uporabom gela s nepomičnim gradijentom pH, vezani imobilini, pri eluciji peptida, ostaju u gelu i tako se izolira čisti peptid.

9.9. Izoelektrične membrane

Za separaciju i izolaciju proteina u otopini danas se rabe membrane s ugrađenim imobilinima¹. Nosivi materijal, npr. tkanina od staklene vune, umače se u poliakrilamidnu otopinu za polimerizaciju u kojoj se umiješani imobilini izabrane vrijednosti pH. Polimerizacijom nastaje membrana s umreženim imobilinima, zapravo membrana s ugrađenim puferom. Uronjena u vodenu otopinu takva membrana ima određeni pH.

U električnom polju kroz takvu membranu prema negativnoj elektrodi mogu migrirati i prolaziti samo oni proteini kojima je pI manji od pH membrane, tj. proteini koji i pri pH membrane imaju efektivni pozitivni električni naboj. Prema pozitivnom polju mogu migrirati i prolaziti kroz membranu oni proteini kojima je pI veći od pH membrane jer pri pH membrane imaju negativan električni naboj. To svojstvo izoelektričnih membrana rabi se za separaciju i izolaciju proteina².

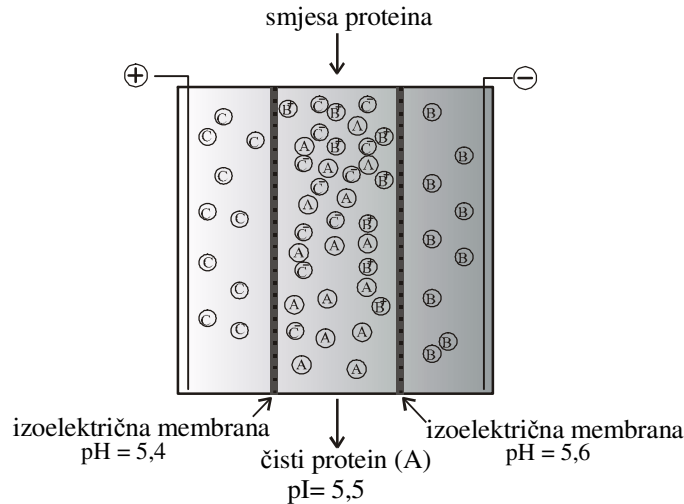
Na slici 9.3. prikazano je načelo pročišćavanja (purifikacije) proteina s pomoću naprava s tri komore koje su međusobno razdvojene dvjema membranama. pH jedne membrane malo je veći od izoelektrične točke proteina koji želimo pročititi, a pH druge membrane malo je manji.

U vodenoj otopini smjese proteina kojoj je pH jednak izoelektričnoj točki proteina koji želimo pročititi taj protein nema efektivnog električnog naboja. Svi ostali proteini kojima je pI veći ili manji od pI rečenog proteina u ionskom su obliku. Dakle imaju efektivni negativan ili pozitivan naboj. Propušta li se otopina smjese proteina između izoelektričnih membrana, smještenih u električnom polju, električki nabijene čestice proteina (i druge) migriraju, ovisno o naboju, prema pozitivnom ili negativnoj elektrodi. Kroz membranu kojoj je pH malo veći od pI pročišćavanog proteina u katodni prostor migriraju proteini s pozitivnim električnim nabojem. U anodni prostor, kroz membranu manjeg pH migriraju proteini negativnog naboja. U središnjoj komori ostaje protein kojem je pI između vrijednosti pH

¹ P. Wenger, M. de Zuanni, P. Javet, P. G. Righetti, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **8** (1987) 29.

² P. G. Righetti, E. Wenisch, M. Faupel, *J. Chromatogr.*, **475** (1989) 293.

primijenjenih membrana. Taj protein ne može niti difuzijom proći kroz jednu odnosno drugu membranu. Naime, u dodiru s membranom višeg pH protein postaje negativno nabijen i električno polje vraća ga natrag u središnji prostor. Obratno, u doticaju s membranom nižeg pH postaje pozitivno nabijen i opet se pod učinkom električnog polja vraća u središnji prostor.



Slika 9.3. Načelo purifikacije proteina (A) uz primjenu izoelektričnih membrana; svi proteini iz smjese kojima je $pI > 5,6$ i $< 5,4$ migriraju kroz jednu od membrana iz središnjega prostora omeđenog dvjema membranama

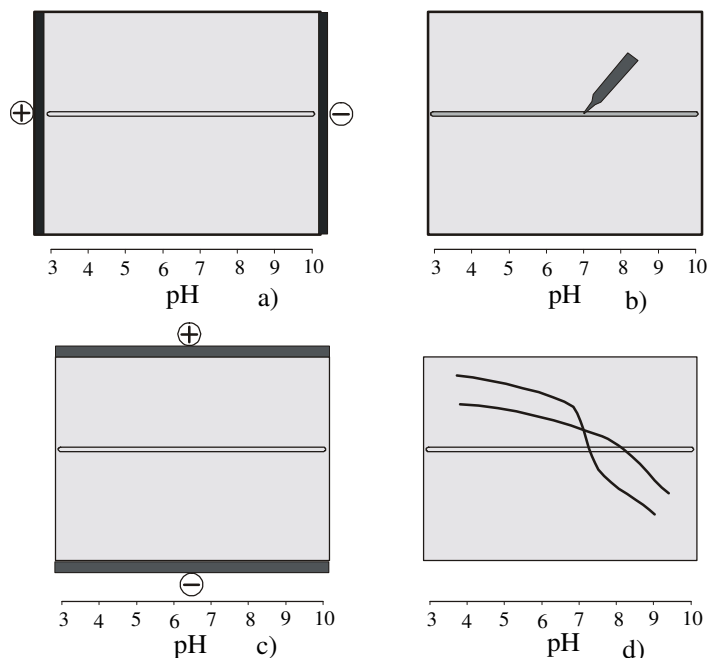
9.10. Ovisnost elektroforetske pokretljivosti proteina o pH

Obilježja migracije proteina u smjesi uz različite pH vrijednosti medija mogu se utvrditi primjenom gela s gradijentom pH. Najprije se u poliakrilamidnom gelu velike poroznosti s umiješanim amfolitima (2 %) električnim poljem strukturira gradijent pH. To se čini tako da na krajeve pločastoga gela (debljine 2 mm) postavite vrpce filtrirnoga papira namočene za katodu u otopinu NaOH (1 mol L^{-1}), a za anodu u otopinu H_3PO_4 (1 mol L^{-1}). Električnim naponom uspostavljenim između katode i anode (do 900 V, 90 min) uspostavlja se gradijent pH.

Gradijent pH ostaje neko vrijeme stabilan i nakon prestanka djelovanja električnog polja. Naime, u uspostavljenom gradijentu pH električni naboj amfolita u gelu jest nula pa nema međusobnog električnog djelovanja. Nakon uspostavljanja gradijenta pH, izrežu se i uklone dijelovi gela na kojima su položene kontaktne vrpce za elektrode. Rezanje se čini uzduž

unutarnjeg ruba vrpce. Gel se okrene za 90° i na krajeve ploče gela se, okomito na gradijent pH, polože nove vrpce za elektrode umočene u iste otopine. U korito koje leži okomito na gradijent pH ulije se otopina analita.

Korito 1 mm širine i 1 mm dubine te 10 cm duljine formira se u pripravi (lijevanju) ploče gela s pomoću valjkastog umetka. Nakon unošenja otopine analita provodi se elektroforeza, i to 15 do 30 min uz napon od 600 do 700 V.



Slika 9.4. Migracija proteina iz smjese u ovisnosti o pH gela (titracijske krivulje proteina); a) uspostavljanje gradijenta pH u gelu, b) unošenje analita u korito u gelu, c) elektroforetska migracija molekula analita okomito na gradijent pH, d) krivulje ovisnosti migracije proteina o pH

Tijekom elektroforeze proteini zbog razlike u naboju i masi migriraju iz korita, različitim brzinama, u smjeru pozitivne odnosno negativne elektrode. Budući da proteini migriraju različitim smjerom i različitom brzinom ovisno o pH, kao rezultat elektroforeze koja se čini okomito na gradijent pH u gelu se formiraju krivulje koje pokazuju migraciju pojedine vrste proteina. Krivulje presijecaju korito za analit na mjestu gdje je pH gela jednak pI odnosa proteina.

Zbog sličnosti s klasičnim kiselo-baznim krivuljama titracije govori se o titracijskim krivuljama proteina.

Stvarni tok gradijenta pH u gelu utvrđuje se nakon elektroforeze. To se čini tako da se iz ploče gela izrežu dvije vrpce, širine 5-6 mm, paralelno s

koritom za analit odnosno uzduž gradijenta pH. Zatim se vrpce izrežu u komadiće 5 mm duljine. Ti komadići gela homogeniziraju se u malom volumenu vode (0,5 mL) i mjeri se pH s pomoću kombinirane staklene mikroelektrode. Tako se utvrđuje stvarni gradijenta pH u gelu odnosno tok promjene pH u rabljenom gelu.

Gel za vizualzaciju krivulja boji se uobičajenim načinom s Coomassie plavom.

Oblik krivulja pokazuje kako se mijenja električna pokretljivost pojedinog proteina u ovisnosti od pH. Poznavajući ovisnost migracije o pH, može se utvrditi optimalni pH za razdvajanje smjese proteina u preparativnoj elektroforezi. Iz oblika krivulja mogu se utvrditi ovisnost o pH i drugim obilježima proteina.

Općenito metode izoelektričnog sabiranja makromolekula u mediju s gradijentom pH, osim u analitičke i preparativne svrhe, široku primjenu nalaze u studiju svih učinaka koji utječu na efektivni električni naboj makromolekula. Rabe se za određivanje izoelektrične točke (pI) makromolekula, u studiju vezanja liganda na proteine i učinka toga vezanja na konformacijske promjene koje ovise o pH, u studiju strukture podjedinica polimernih proteina, u praćenju promjena u mikroheterogenosti proteina uzrokovanih prirodnim ili induciranim učincima, u utvrđivanju genetskih razlika proteina te u druge svrhe.

10. IZOTAHOFOREZA

U izotahoforezi razdvajanje molekula temelji se na razlici u električnoj pokretljivosti. Provodi se u mediju bez učinka molekularnog sita. Primjenjuje se u analitičke svrhe, napose u razdvajanju i detekciji malih molekula, metabolita i dr. To se čini u slobodnoj otopini u kapilari ili poliakrilamidnom gelu u obliku valjka ili ploče. Za preparativne svrhe čini se u većim kolonama ispunjenim gelom ili tekućinom s gradijentom gustoće ili u napravi s više komora ispunjenih puferom.

10.1. Načelo metode

Metoda se temelji na činjenici koju je davne 1897 g. F. Kohlrausch teorijski obradio i matematički iskazao s pomoću tzv. *regulirajuće funkcije* (njem. Beharrliche Funktion, eng. Regulating function). Relacija opisuje stanje elektrolitne granice otopina dviju soli pri migraciji u električnom polju.

Kada otopine dvije soli K^+V^- i K^+P^- koje imaju istovrstan kation dovedemo u elektrolitni kontakt u mediju ili posudi u kojoj je onemogućena termalna konvekcija odnosno miješanje (kapilarna cijev ili gel) i postavimo u električno polje, tj. između elektroda, pod učinkom električnog polja, kationi soli migriraju prema negativnoj a anioni prema pozitivnoj elektrodi. Pretpostavimo li da je električna pokretljivost aniona V^- (vodeći ioni) veća od električne pokretljivosti aniona P^- (prateći, slijedni ion), onda je, pri uspostavi ustaljene (stacionarne) migracije elektrolitne granice na kojoj se dodiruju otopine soli, odnos koncentracija aniona na granici iskazan Kohlrauschovom relacijom:

$$\frac{c_{V^-}}{c_{P^-}} = \frac{u_{V^-}}{u_{V^-} + u_{K^+}} \cdot \frac{u_{P^-} + u_{K^+}}{u_{P^-}} \cdot \frac{z_{V^-}}{z_{P^-}} \quad (10-1)$$

gdje su: u - električna pokretljivost, a z – nabojni broj označene ionske vrste.

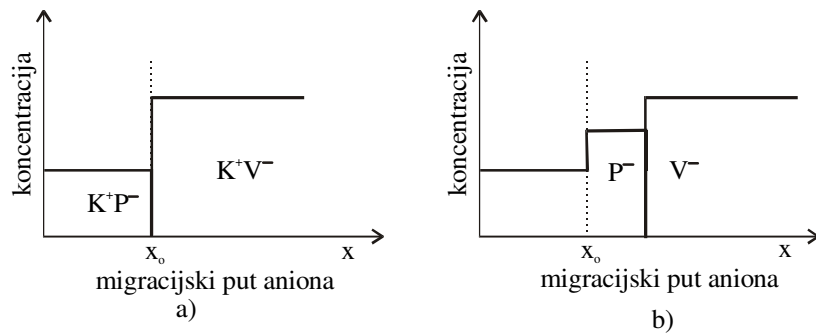
Relacija vrijedi za jake, potpuno ionizirane elektrolite, u suprotnom se moraju unijeti korekcije.

U našem primjeru nabojni broj ionskih vrsta jest jedan, a električna mobilnost svih iona, pri zadanim uvjetima, konstantna je, pa relaciju (10-1) možemo izraziti:

$$c_{V^-} = c_{P^-} \cdot \text{konst.} \quad (10-2)$$

Dakle, pri *ustaljenim* uvjetima migracije, koncentracija pratećeg iona u graničnoj plohi dviju elektrolitnih otopina izravno je ovisna o koncentraciji vodećeg iona. Ako je koncentracija u otopini pratećeg iona niža od one vodećeg iona, onda će ona na granici porasti na vrijednost iskazanu relacijom (10-2). Međutim, to povećanje koncentracije pratećeg iona na samoj granici ima za posljedicu i promjene koncentracije otopine pratećeg elektrolita u neposrednoj blizini granice. Naime, teče li električna struja kroz stupac otopine koji čine dvije ili više zona otopina različite električne provodnosti, onda kroz pojedinu zonu postoji određeni «pad napona» odnosno napon.

Električna provodnost otopine ovisi o koncentraciji i električnoj pokretljivosti iona u otopini. Suma svih napona po zonama čini ukupan radni napon uspostavljen između katode i anode. Ukupni napon određuje jakost električne struje kroz stupac otopine. Što je manja električna provodnost, to je veći pad napona kroz zonu te otopine. Ovisno o širini pojedine zone u svakoj se uspostavlja određena jakost električnog polja (V/cm). Povećanje koncentracije pratećeg iona na granici otopina vodećeg i pratećeg elektrolita prema relaciji 10-2 uzrokuje smanjenje koncentracije pratećeg iona u sloju otopine uz granicu, jer ioni iz tog sloja prelaze u granični sloj.



Slika 10.1. Načelo izotahoforeze; odnos koncentracija aniona u početnom (a) i ustaljenom stanju (b) pri migraciji granice između dviju elektrolitnih otopina soli s istovrsnim kationom

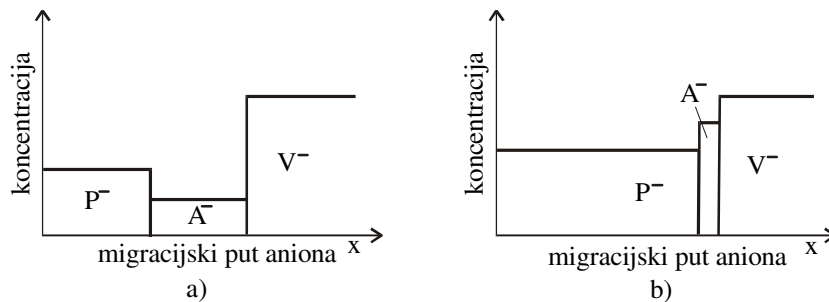
U tom susjednom sloju otopine smanjuje se električna vodljivost i slijedno povećava jakost električnog polja. Budući da je debljina toga sloja vrlo mala, reda veličine radijusa molekula, to je povećanje jakosti električnog polja vrlo veliko. Ta povećana jakost električnog polja povećava brzinu migracije pratećih iona iz slijedećeg susjednog sloja prateće otopine, što ima za posljedicu povećanje koncentracije pratećeg iona i u prvom sloju uz granicu. Isto se ponavlja kroz sve slijedne slojeve prateće otopine.

Budući da se dodirna granica otopina pomiče smjerom migracije, koncentracija pratećeg iona u otopini, od mjesta početnog dodira dviju otopina do granice u migraciji, bit će jednaka onoj na samoj granici odnosno koncentraciji koja je iskazana relacijom 10-2.

Učinak toga zorno se može vidjeti na primjeru kada u graničnu zonu umetnemo i treći elektrolit (K^+A^-), kojemu je električna pokretljivost aniona (A^-) između vrijednosti vodećeg i pratećeg aniona ($u_P < u_A < u_V$). Pri migraciji se stvaraju dvije granice. Prva između vodećeg elektrolita (K^+V^-) i umetnutog trećeg elektrolita (K^+A^-) i druga između elektrolita K^+A^- i K^+P^- . Elektrolit K^+P^- sada je prateći elektrolit umetnutog K^+A^- elektrolita. U cijelom sustavu on je krajnji elektrolit. Za obje granice vrijedi Kohlrauschova jednadžba.

Pretpostavimo da je koncentracija umetnutog trećeg elektrolita malena, a njegov volumen između vodećeg i pratećeg aniona velik (široka zona), tada pri uspostavljenom ustaljenom (ravnotežnom) stanju migracije koncentracija aniona A^- u zoni otopine između otopina vodećeg i pratećeg aniona mora zadovoljiti relaciju (10-2).

Budući da je koncentracija vodećeg iona puno veća od koncentracije umetnutog elektrolita, onda će, u ustaljenom stanju migracije, koncentracija aniona A^- u pripadajućoj zoni porasti do razine koju iskazuje relacija 10-2. To se može ostvariti samo ako se volumen zone u kojoj se nalazi elektrolit K^+A^- smanji, tj. zona u kapilari (mediju) suzi. To je *učinak koncentriranja*, koji omogućuje analizu vrlo razrijeđenih otopina analita.



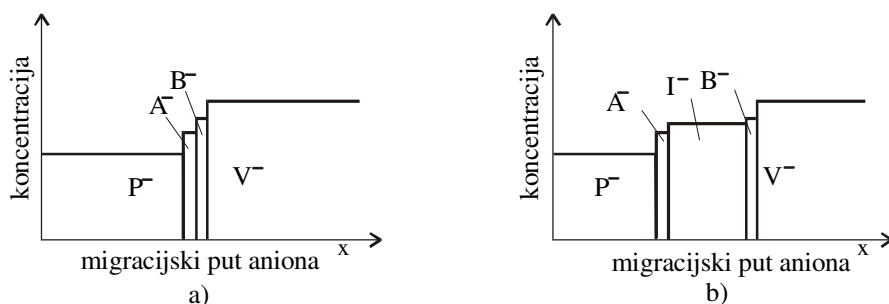
Slika 10.2. Odnos koncentracija aniona u početnom (a) i ustaljenom stanju (b) pri migraciji dviju granica između triju elektrolitnih otopina soli s istovrsnim kationom

Što je veća razlika u koncentraciji, to će suženje umetnute zone biti veće odnosno koncentracija analita u zoni veća. Isto se ravnotežno stanje odnosa koncentracija ostvaruje na granici otopina elektrolita K^+A^- i pratećeg elektrolita K^+P^- .

Migracija zajedničkoga kationa (K^+) teče u suprotnom smjeru, i to različitim brzinama u pojedinoj zoni ovisno o jakosti pripadajućeg električnog polja uzrokujući *električnu neutralnost* otopine u zoni.

Ako u prostor između vodećeg i pratećeg elektrolita unesemo dvije otopine različitih soli K^+A^- i K^+B^- , kojih anioni imaju električnu pokretljivost između električne pokretljivosti vodećeg i pratećeg aniona, tj. $u_P < u_B < u_A < u_V$, i ako su im količine relativno malene, onda će se pri ustaljenom stanju migracije, stvoriti dvije uske, vrlo koncentrirane, zone tih elektrolita između vodeće i prateće otopine (slika 10.3.a). Za male količine tvari pripadajuće zone mogu biti vrlo uske, širine nekoliko mikrona (10^{-6} m). Osim toga one su međusobno priljubljene. Želimo li molekulske vrste detektirati, pri detekciji se teško mogu razlučiti. Međutim, ako se unese i peti elektrolit s anionom, kojem je električna pokretljivost između one aniona A^- i aniona B^- , a količina veća, onda se pri ustaljenom stanju migracije između vodećeg i pratećeg elektrolita učine tri zone.

Između zone elektrolita K^+A^- i K^+B^- naći će se zona (*intervalnog*) *razmaknog* elektrolita K^+I^- , širina koje će ovisiti o količini tog elektrolita. Ovim razmakni elektrolit razmiče zone aniona A^- i B^- , što olakšava njihovu detekciju.



Slika 10.3. Ustaljeno stanje pri migraciji vodećeg i pratećeg elektrolita između kojih se nalaze male količine druga dva elektrolita s anionima kojima je električna pokretljivost između one vodećeg i pratećeg iona (a), isto s unesenim razmaknim elektrolitom kojeg anion (I^-) ima električnu pokretljivost između one koju imaju anioni A^- i B^-

Učinak intervalnog elektrolita u razdvajanju zona analiziranih makromolekulskih iona široko se primjenjuje u preparativnoj i analitičkoj izotahoforezi.

Istaknimo da jednom kada se uspostavi ustaljena migracija pri kojoj su komponente potpuno razdvojene u zonama, a njihova koncentracija iskazana relacijom 10-2, sve granice zona migriraju *jednakom brzinom* (grč. izotaho = jednakom brzinom, otud ime metode). Rečeno vrijedi uz uvjet da su ostali čimbenici koji utječu na električnu pokretljivost konstantni (jakost el. struje, pH i dr.).

Nakon uspostavljene ustaljene migracije širina pojedine zone izravno je proporcionalna količini pripadajućeg elektrolita. Granice zona vrlo su oštre jer se ioni koji difuzijom uđu u susjednu zonu vraćaju natrag zbog učinka razlike u jakosti električnog polja u susjednoj zoni. Ovisno o tome difundiraju li u prethodnu ili slijednu zonu, razlika u jakosti električnog polja smanji im ili povećava brzinu migracije u odnosu na brzinu migracije u vlastitoj zoni. Tako se ioni vraćaju u vlastitu zonu. To je učinak «*oštrenja zone*».

Jakost električne struje pri ustaljenom stanju migracije kroz čitav sustav elektrolita jednaka je. U svakoj od zona elektrolita postoji određeni pad električnog napona koji pomnožen s jakošću električne struje daje električnu snagu, koja se, kao toplinska energija, oslobađa u pojedinoj zoni otopine.

Zbog razlike u gradijentu napona, temperature otopina u pojedinoj zoni razlikuju se. Zapravo temperatura se skokovito mijenja od jedne do druge zone. Ta činjenica rabi se za detekciju odnosno mjerenje širine pojedine zone s pomoću detektora temperature (npr. termopara).

Sve što je rečeno za migraciju granica različitih aniona uz istovrstan kation, vrijedi i za migraciju granica različitih kationa uz istovrstan anion.

Treba istaknuti da električna pokretljivost iona jakih elektrolita ne ovisi o pH medija. Međutim, efektivna (učinkovita) električna pokretljivost iona slabih elektrolita ovisi o pH medija. Zapravo ovisi o stanju dinamičke ravnoteže toga iona i njemu pripadajuće slabe kiseline odnosno slabe baze.

Kao razmakni elektroliti rabe se amfoterni elektroliti kojima električna pokretljivost ovisi o pH (aminokiseline i dr.). Široku primjenu nalaze amfolini kao smjese pufera. Uporabom amfolina odnosno smjese pufera u migracijskom području između vodećeg i pratećeg iona uspostavlja se gradijent pH, što utječe na efektivnu električnu pokretljivost pojedine molekulske vrste i njihovo razdvajanje u zone.

Rezolucija razdvajanja u izotahoforezi ovisi o mnogim čimbenicima, najviše o količini analita, jakosti električne struje, svojstvima protuiona (kation u razdvajanju aniona odnosno anion u razdvajanju kationa) i pH. Velika količina bilo kojeg sastojka analita rezultira pri ustaljenoj migraciji širokom zonom. Širina zone izravno je proporcionalna količini analita.

Brzina migracija ovisi o jakosti električne struje kroz medij. Primjenom jače električne struje skraćuje se vrijeme razdvajanja.

Električna provodnost medija ovisi o koncentraciji i električnoj pokretljivosti i aniona i kationa. Uporabom protuiona male električne pokretljivosti skraćuje se vrijeme razdvajanja, a time i same analize te se

poboljšava efikasnost razdvajanja i omogućuje primjena veće količine analita.

Razlika u pH otopine vodećeg elektrolita i pH otopina analita ne smije biti prevelika. U analizi aniona bolja rezolucija i učinkovitost razdvajanja postižu se pri nižim pH otopine vodećeg elektrolita i otopine analita. U razdvajanju kationa pogodniji je viši pH.

U izotahoforezi treba kontrolirati pH, ionsku jakost, električnu pokretljivost vodećeg i pratećeg iona, svojstva intervalnog elektrolita, kapacitet pufera, pH i količinu analita i električne uvjete razdvajanja.

Želimo li izotahoforezom iz analita razdvojiti samo jednu molekulsku vrstu, primijenit ćemo vodeći ion s električnom pokretljivošću malo većom, a prateći ion s malo manjom od električne pokretljivosti molekulske vrste koju želimo razdvojiti. Tako će se u zoni između vodećeg i pratećeg iona sakupiti samo izabrana molekulska vrsta. Sve ostale migrirati će sporije i slijediti će zonu s nagomilanom vrstom.

10.2. Načini izvođenja izotahoforeze

Izotahoforeza najčešće se čini u kapilarnoj cijevi od stakla, teflona ili druge plastike, unutarnjeg promjera od 0,3 do 0,6 mm i duljine od 200 do 800 mm. Kapilara se najprije napuni otopinom vodećeg elektrolita. Mali volumen otopina analita (0,1-50 μL) injektira se s pomoću mikrošprice i zatim se prostor iza analita ispuni otopinom krajnjeg elektrolita. Istosmjernim električnim naponom (i do 35 000 V) pobuđuje se migracija iona kroz kapilaru. Zbog razlike u električnoj pokretljivosti razdvajaju se sastavnice analita i nagomilavanjem (koncentriranjem) u zone između granica vodećeg i krajnjeg elektrolita sukladno relaciji 10-2. Da bi se uspostavila ustaljena migracija i učinila separacija, potrebna je određena duljina kapilare. Što se ustaljeno stanje (ravnotežno) migracije uspostavlja sporije, to je potrebna dulja kapilara.

Međutim, ako se kroz kapilaru s pomoću razlike u hidrostatskom tlaku uspostavi tok medija u suprotnom smjeru od smjera migracija analiziranih makromolekulskih iona, onda se i uporabom kratkih kapilara može učiniti dobra rezolucija razdvajanja. S obzirom na kompleksnost rabe se isključivo komercijalne naprave za izotahoforezu.

U izotahoforezi makromolekula u anionskom obliku, kao komponente vodećeg elektrolita primjenjuju se anioni velike električne pokretljivost: kloridi, sulfati, fosfati i kakodilati. Kao anioni, sastavnice krajnjeg elektrolita primjenjuju se anioni: β -alanina (pH 10), aminokaprnske kiseline, β -aminomaslačne kiseline, glicina i acetat ioni. Kao protuioni, vodećeg i

krajnjeg elektrolita rabe se najčešće kationi: tris-a (trishidroksimetilaminometan), 2-amino-2-metil-1,2-propandiola (amediol).

U razdvajanju kationa kao vodeći kationi rabe se: K^+ ili Ba^{2+} . U krajnjem elektrolitu kationi: tris-a i β -alanina, a kao protuioni u vodećem i krajnjem elektrolitu anioni valina (2-aminoizovalerijanska kis, pH 9,9) i acetat ioni (do pH 5).

Osim u molekularnoj biologiji i biokemiji izotahoforeza nalazi primjenu u analizi metalnih iona. Razlike u električnoj pokretljivosti kationa metala koje omogućuju njihovo izoelektroforetsko razdvajanje čine se dodatkom *stvaraoca kompleksa*, koji s različitim kationima tvore komplekse različite stabilnosti, što utječe na efektivnu električnu pokretljivost kationa.

U analizi tragova rabe se naprave s dvije kapilare. S pomoću prve odvoje se većinski sastojci, a kationi u tragovima separiraju se i detektiraju u drugoj kapilari. Da bi se smanjio učinak elektroosmoze, koji je posebno izražen u staklenoj kapilari, u otopinu analita dodaju se Triton X-100, metilceluloza ili hidroksipropilmetilceluloza, kojima se poveća gustoća analita.

10.3. Detekcija sastojaka analita

Sastavnice analita detektiraju se pri prolazu razdvojenih zona kroz detektor. U detekciji se rabi apsorpcija UV-zračenja, razlike u temperaturi zona, razlike u električnoj vodljivosti elektrolita u pojedinoj zoni, razlike u električnom potencijalu, jer se električni potencijal (napon) skokovito mijenja na granici zona, i detekcija temeljena na fluorescenciji.

Uz primjenu termalnoga detektora (termopar) uočavaju se širine svih zona separiranih makromolekula između granica vodećeg i krajnjeg elektrolita.

Veća osjetljivost detekcije ostvaruje se primjenom UV-detektora. Međutim UV-detektorom mogu se uočiti samo zone koje sadrže molekule koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u ultravioletnom području spektra. Sadrži li analit npr. proteine ili nukleotide i amfoline kao intervalne ione, s pomoću UV-detektora mogu se uočiti samo zone proteina odnosno nukleotida koji apsorbiraju UV-zračenje, dok zone amfolina UV-detektor ne registrira jer amfolini ne apsorbiraju UV-zračenje.

Temperaturni detektor registrirati će sve prisutne zone.

Za mjerenje razlika u električnom potencijalu rabe se visokonaponski detektori. Kao osjetilo napona služi jedna mala kovinska elektroda smještena u kapilari. Ta vrsta detekcije poglavito se rabi u izotahoforezi koja se čini u minijaturnim separacijskim sustavima (veličine čipa).

Kvantifikacija analizirane molekulske vrste čini se mjerenjem širene pripadajuće separacijske zone i usporedbom sa širinom zone poznate

količine istovrsne molekulske vrste (standard) analizirane pod istim uvjetima. Najčešće se za to rabe pripremljene kalibracijske krivulje.

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu u izotahoforezi u kapilari potrebna je vrlo mala količina analita (nekoliko nmol). Veći broj sastojaka analita može se odrediti u jednom mjerenju. Vrijeme mjerenja kratko je (15-60 min). U analizi se mogu rabiti i nevodena otapala (metanol, etanol). Često nije potrebna prethodna obrada analita. Najšire se primjenjuje u analizi malih molekula, kao što su aminokiselina, nukleotidi, metaboliti, anorganske soli, koje se u drugim metodama elektroforeze mnogo teže mogu razdvojiti i kvantificirati ili se uopće ne mogu razdvojiti.

Osim u kapilari, izotahoforetska separacija može se činiti u drugim medijima. U analitičke svrhe rabi se poliakrilamidni gel velike poroznosti u obliku štapa. Unošenje otopine analita, električni uvjeti razdvajanja te detekcija (bojenje) i kvantifikacija razdvojenih vrpca čine se na isti način kao u uobičajenoj elektroforezi u poliakrilamidnom gelu. Razdvajanje proteina u izotahoforezi u poliakrilamidnom gelu praktično se uvijek čini uz dodatak intervalnog elektrolita, npr. amfolita. Međutim, česte su poteškoće u razdvajanju i detekciji. U pravilu u složenom analitu male su koncentracije pojedinog proteina i slijedno vrlo uske separacijske zone. Osim toga u mnogih se proteina i glikoproteina javljaju heterogenosti u električnom naboju uzrokovane genetskim varijacijama, razlikama u stupnju amidacije ili oligosaharidnog dijela, sadržaju sialinske kiseline i dr. Te heterogenosti uzrokuju praktično kontinuirani spektar električne pokretljivosti makromolekula analita, a time i kontinuirani slijed vrlo uskih priljubljenih separacijskih zona, što onemogućuje učinkovitu detekciju.

U preparativne svrhe izotahoforeza se čini u granuliranom gelu u horizontalnom koritu (kadi). Unošenje analita, praćenje razdvajanja i elucija razdvojenih sastavnica čini se na isti način kao u preparativnom izoelektričnom sabiranju. Razlike su u tome što se u izotahoforezi u komore za elektrode stavljaju otopine vodećeg odnosno krajnjeg elektrolita koje se s elektrolitnim vrpcama spajaju s gelom u koritu. Granulirani gel priprema se u otopini vodećeg elektrolita. Kao vodeći elektrolit služi smjesa Trisa i HCl, kojoj je pH = 7,0, a kao krajnji elektrolit smjesa trisa i 6-amino-heksonske kiseline kojoj je pH = 8,7. U prvom dijelu postupka čini se uspostavljanje granice između vodećeg i krajnjeg elektrolita u samom gelu.

Budući da je gel učinjen u otopini vodećeg elektrolita, uspostavljanjem električnog polja granica između vodećeg i krajnjeg elektrolita migrira od kraja gela, tj. mjesta kontakta s vrpcom krajnjeg elektrolita, u sam gel.

To se može uočiti zbog razlike u indeksu loma ili bolje dodatkom boje bromofenol plave koja migrira u granici vodećeg i krajnjeg elektrolita. Nakon što je ta granica migrirala oko 5 cm u gel, u dio gela iza granice umiješa se analit.

Izotahoforetsko razdvajanje čini se uz kontrolu jakosti struje (6 mA), pri čemu napon raste od početnih 250 do 900 V na kraju razdvajanja (~20 sati).

Lokacija razdvojenih zona, njihovo izdvajanje iz gela i elucija makromolekula iz gela čini se na isti način kako je već rečeno (vidi izoelektrično sabiranje).

Preparativna izotahoforeza može se činiti i u vertikalnoj koloni ispunjenoj poliakrilamidnim gelom velike poroznosti (mali T) pripremljenog u otopini vodećeg elektrolita. Otopina analita unosi se na vrh kolone, a iznad nje otopina krajnjeg elektrolita. Otopina analita prethodno se pročišćava dijalizom prema otopini krajnjeg elektrolita i u nju se dodaje razmakni elektrolit i analit. Izotahoforeza se čini uz kontrolu jakosti struje (8 mA, 24 sata). Razdvojene zone sastavnica analita sakupljaju se na dnu kolone s pomoću otopine pufera koji kontinuirano struji na dnu kolone.

Izotahoforeza nalazi primjenu u molekularnoj biologiji i biokemiji, napose u analizi proteina, peptida, aminokiselina i nukleotida, u analizi lijekova i u farmaceutici u analizi organskih i anorganskih kiselina i njihovih soli, u određivanju sadržaja kationa metala i anorganskih aniona u vodi.

U izotahoforezi u kapilari postiže se velika osjetljivost i reproducibilnost određivanja uz relativno kratko vrijeme mjerenja te brzu i jednostavnu detekciju sastavnica analita. Uvjeti razdvajanja, izbor razmaknih elektrolita, izbor pufera i drugih čimbenika koji određuju razdvajanja sastavnica analita, danas se izračunavaju i simuliraju uz pomoć računala.

11. DVODIMENZIJSKA (2D) ELEKTROFOREZA VELIKE REZOLUCIJE

Metodom elektroforeze u jednoj dimenziji moguće je, u povoljnim eksperimentalnim uvjetima, analit razlučiti na 50-60 diskretnih zona. Pri tom se makromolekule razdvajaju temeljem jednog od svojih obilježja, npr. neto električnog naboja, izoelektrične točke, veličine odnosno mase molekule itd. U analizi kompleksnih analita, koji mogu sadržavati i više tisuća različitih makromolekulskih vrsta, unutar diskretne zone može se naći veći broj različitih molekulskih vrsta. Njihovo daljnje razdvajanje može se učiniti elektroforezom u drugoj dimenziji, tj. okomito na smjer razdvajanja u prvom stupnju. Na taj način ostvaruje se slika razdvojenih molekulskih vrsta u dvije dimenzije (mapa, tlocrt), koja omogućuje identifikaciju i determinaciju velikog broja sastavnica analita.

Poznate su mnoge metode elektroforeze u dvije dimenzije u kojima se razdvajaju makromolekule temeljem različitih obilježja. Već opisane neke imunoelektroforetske metode pripadaju u dvodimenzijske metode. Ovdje će biti opisana metoda elektroforeze u dvije dimenzije u kojoj se ostvaruje velika rezolucija razdvajanja (eng. High resolution 2D electrophoresis). To je jedina metoda kojom se mogu razlučiti vrlo kompleksne smjese proteina. Danas je, razvojem primjene računala u identifikaciji i kvantifikaciji velikog broja razdvojenih nakupina (točke, zone), postala temeljna metoda u analizi proteinskih molekulskih vrsta cijelih stanica pa čak i tkiva u tzv. Proteome analizama (prema eng. analysis of the entire PROTEin complement expressed by genOME, or by cell or tissue).

11.1. Način izvođenja metode

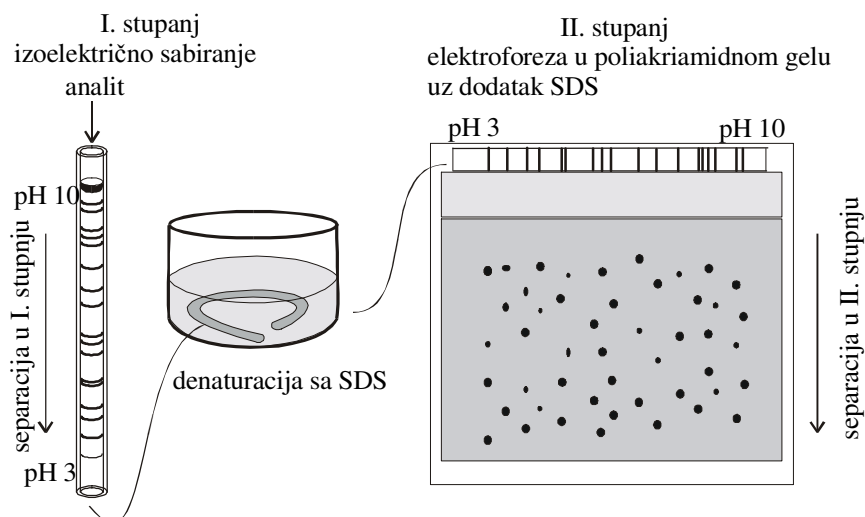
Metodu je 1975 g. uveo O'Farrell¹, pokazavši mogućnost metode, razdvojivši 1100 proteina stanice *Escherichia coli* na jednoj separacijskoj (plohi) ploči. Razdvajanje u prvoj dimenziji činjeno je izoelektričnim

¹ P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, **250** (1975) 4007.

sabiranjem u vertikalnom cilindričnom poliakrilamidnom gelu, a zatim u dugoj dimenziji razdvajanjem na vertikalnoj ploči poliakrilamidnog gela.

Budući da je to analiza ukupnih proteina, u oba stupnja razdvajanja primijenjena su i denaturirajuća sredstva koja omogućuju otapanja najvećeg dijela proteina stanice, u prvoj dimenziji neionski deterdženti i urea, a u drugoj SDS. U izvornoj metodi poliakrilamidni gel za izoelektrično sabiranje u prvom stupnju lijevan je u staklenoj cijevi unutarnjeg promjera 2,5 mm i duljine 13 cm. U otopinu za polimerizaciju, uz uobičajene sastavnice poliakrilamidnog gela, dodan je i neionski deterdžent (Nonidet p-40) i otopina amfolita (Ampholines[®]), s pomoću kojih je uspostavljen gradijent pH.

Nakon polimerizacije u napravi za vertikalnu elektroforezu s otopinom NaOH u gornjoj komori za elektrode i otopine H₃PO₄, u donjoj komori uspostavljen je, stupnjevitim povećanjem električnog napona, gradijent pH. Uz prekid napona, na gornju površinu gela uštrcana je otopina analita i nad nju otopina uree i amfolita. Izoelektrično sabiranje učinjeno je uz iste otopine u komorama za elektrode, najprije uz napon od 400 V (12 sati), zatim uz napon od 800 V (1 sat). Gel je zatim istisnut iz staklene cijevi i uronjen u otopinu pufera koja sadrži i SDS (30-120 min).



Slika 11.1. Načelo «klasične» dvodimenzijaska elektroforeze prema O'Farrellu

U drugom stupnju razdvajanja rabljen je poliakrilamidni gel u obliku ploče s gradijentom pora s (T od 5 do 22,5 g/100 mL). Iznad separacijskog gela izliven je sloj gela za nagomilavanje. U gornjoj površini gela za nagomilavanje, stavljanjem umetka, prije polimerizacije, formiran je kanal u koji je, nakon otvrdnjivanja, umetnut valjkasti gel iz prvog stupnja

razdvajanja. Valjkasti gel zalijepljen je na gel za nagomilavanje s pomoću gela od agaroze (1 %).

Elektroforeza u drugom stupnju provedena je uz kontrolu struje, uz bromfenol plavo kao pokaznu boju toka razdvajanja. Rezultat elektroforeze sustav je točaka (otočića) razdvojenih molekula u ploči gela.

Detekcija razdvojenih proteina označenih radioaktivnim izotopima čini se radiometrijski (autoradiografski), a drugih bojenjem, najčešće srebrom.

Za identifikaciju i detekciju od iznimne je važnosti dobra reprodukcija rasporeda točaka u ponovljenom mjerenju. Naime, identifikacija se najčešće čini usporedbom prema mapi rasporeda točaka dobivenih razdvajanjem smjese poznatih molekulskih vrsta uz iste uvjete razdvajanja.

U primjeni cilindričnoga gela u prvom stupnju razdvajanja očituju se poteškoće u reprodukciji mjerenja zbog nestabilnosti gradijenta pH pri duljem trajanju razdvajanja (razvlačenje gradijenta!), te zbog gubitka proteina koji migriraju iz gela ili uopće ne uđu u gel. Osim toga, bazični homologni amfoliti tvore komplekse s SDS–om, što uzrokuje prekrivanje (zamagljivanje) dijela mreže razdvojenih točaka u drugom stupnju separacije. Učinjene su mnoge modifikacije izvorne metode radi poboljšanja reprodukcije.

11.2. Razdvajanje analita u prvom stupnju u gelu s nepomičnim gradijentom pH

Uporabom gela s nepomičnim gradijentom pH postiže se mnogo bolja reprodukcija razdvajanja neovisna o trajanju razdvajanja i vrsti rabljenoga pufera. Može se primijeniti široki raspon pH od 2,5 do 11, što omogućuje detekciju praktično svih proteinskih vrsta sadržanih u biološkoj stanici ili tkivu, i to na jednoj ploči separacijskoga gela. Ovisno o vrsti uzorka u prvom stupnju razdvajanja rabe se rasponi pH gradijenta od samo jedne jedinice pH pa do maksimalne. Najčešće se rabe rasponi pH od 4 –10, 4 – 7 i 7- 10.

Gel se pripravlja lijevanjem smjese dviju otopina, učinjene s pomoću naprave za pripremu gradijenta koncentracije, u kalup s umetnutom plastičnom folijom. Uz akrilamid, umreživač (Bis), katalizator (TEMED) i glicerol (za gustoću otopine), ovisno o željenom rasponu gradijenta pH, svaka otopina sadrži smjesu kiselih odnosno baznih imobilina, miješenjem kojih se postiže potrebni raspon pH u gelu. Nakon polimerizacije gel se ispire, suši i pohranjuje uz zamrzavanje (-20 °C).

Danas se sve više rabi tvornički pripremljeni poliakrilamidni gelovi s gradijentom pH (Immoboline DryPlates) i potrebni puferi (IPG puferi, amfoliti).

Za izoelektrično sabiranje u prvom stupnju analize, suhi gel izrezuje se u uske vrpce širine 3 mm (najviše 5 mm) i prije upotrebe rehidrira, pri čemu, upijanjem vode, nabubri na izvornu debljinu (najčešće rabljena 0,5 mm). Kao otopina za rehidrataciju može poslužiti i otopina uzoraka (analita). Time se istovremeno čini rehidratacija i unošenje analita u gel.

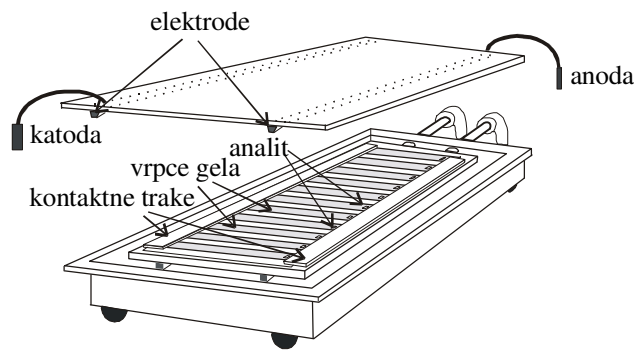
U dvodimenzijaskoj elektroforezi kompleksne smjese proteina bioloških stanica i tkiva, uključivo i prisutne hidrofobne proteine, od temeljne je važnosti njihovo potpuno otapanje. To se postiže s pomoću aditiva kojima se dezintegriju multimolekularni kompleksi i agregacije proteina i razmataju polipeptidni lanci. Razmatanje polipeptidnih lanaca omogućava se uklanjanjem disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca. To se čini redukcijom s pomoću merkaptioetanol ili ditiotreitola (DTT). Urea kao aditiv denaturira protein i sprječava stvaranje agregata. Dodatkom deterdženata smanjuju se jakosti hidrofobnih međudjelovanja i tako omogućuje otapanje hidrofobnih proteina. Prisutni amfoliti slabe ionske interakcije i olakšavaju otapanje proteina. Osim toga amfoliti povećaju ravnomjernost pH gradijenta.

Danas se najčešće za otapanje kompleksnih smjesa proteina rabi otopina² koja sadrži: ureu (8 mol L^{-1}), zwitterionski deterdžent (CHAPS, 2 %), 2-merkaptioetanol (2%), prenosni amfolit (Pharmalyte pH 3 do 10, 0,8 %) i inhibitor proteaze (PMSF, 8 mmol L^{-1}).

Optimalna koncentracija proteina u otopini uzorka za izoelektrično sabiranje jest oko 100 mg/ mL . Da bi se spriječilo stvaranje agregata proteina pri njihovu ulasku u gel, otopina uzoraka miješa se s granuliranim gelom dekstrana i tako u obliku smjese nanosi na gel. Rehidratacija vrpce gela i slijedno izoelektrično sabiranje čini se na različite načine. Prema uobičajenoj praksi rehidratacija gela čini se odvojeno u vertikalnim ili horizontalnim kazetama. Otopina za rehidrataciju sadrži ureu (8 mol L^{-1}), neionski deterdžent (CHAPS), amfolite i ditiotreitola. Nakon rehidratacije gel se ispiri s vodom i kratkotrajno suši između dva lista filtrirnoga papira. Pri uporabi uobičajene naprave za horizontalnu elektroforezu s ugrađenom pločom za hlađenje, vrpce se polažu, jedna pored druge, izravno na hladenu podlogu elektroforetske ćelije, s licem gela prema gore. Uzduž krajeva vrpce gela polože se papirne kontaktne vrpce navlažene vodom za kontakt s elektrodama. Uz granicu s anodom stavlja se vrpca od silikonske gume u kojoj su male šalice (kupe) u koje se unose otopine analita (najčešće $20 \mu\text{L}$). Na površinu gela, prema potrebi, nanosi se tanki sloj silikonskog ulja, koji sprječava pristup kisika iz zraka prema, na oksidaciju osjetljivim, molekulskim vrstama u gelu.

Na površinu kontaktnih vrpce polože se elektrode i uspostavi potreban električni napon. Unošenje analita u gel i izoelektrično sabiranje čini se u nekoliko stupnjeva.

² A. GŁrg i dr., *Electrophoresis*, **16** (1995) 1079.



Slika 11.2. Izoelektrično sabiranje na pojedinačnim vrpčama gela položenim izravno na hladenu podlogu horizontalne naprave za elektroforezu

Najprije se pri nižem naponu (150 V, 30 min, a zatim 300 V, 1 sat) učini elektroforetski ulazak molekularnih vrsta iz otopine analita u gel. Slijedno se čini električno sabiranje uz napon od 3 000 V (5 ili više sati ovisno o duljini vrpce gela). Električni uvjeti (napon) reguliraju se tako da električna snaga po jednoj vrpci gela na prelazi 0,2 W.

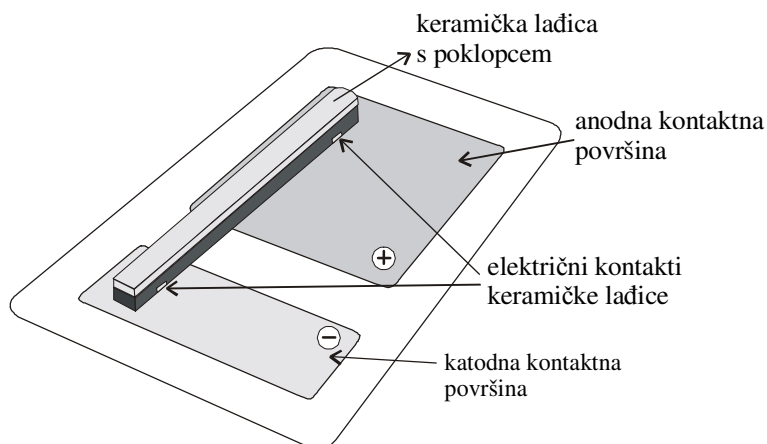
Primjenjuje se i način u kojem se rehidracija i izoelektrično sabiranje čini pojedinačno u keramičkim ladicama u koje se umeću vrpce gela. To su uska korita izrađena od toplinski vodljive keramike s ugrađenim platinskim elektrodama i prozirnim poklopcem. Izrađuju se u više dimenzija duljine 7, 11, 13, 18 i 24 cm, za različite duljine vrpce gela. Ladice se izrađuju od keramike, temeljene na aluminijskom oksidu, kojoj je toplinska vodljivost 3 000 puta veća od one plastičnih materijala. Zbog izvanredne toplinske vodljivosti brzo je odvođenje topline u okolinu. Tako se ne stvaraju «vruće točke» u vrpci gela tijekom elektroforeze. Otopina analita se, mikropipetom, izravno unosi u korito zajedno s otopinom pufera za rehidraciju. Na otopinu u koritu polaže se vrpca gela s licem prema dnu korita, a plastičnom folijom gore.

Druga vrsta keramičkih ladića ima pomične elektrode (za različite duljine gela) koje se nataknu u korito odozgo. Na položenu vrpca gela s licem gela prema gore unosi se otopina analita i pufera s pomoću pomične plastične posudice (kupe).

Keramičke ladice polože se na hladenu platformu podijeljenu na manju katodnu i veću anodnu kontaktnu površinu.

Preko platinskih elektroda, kojima se dio nalazi na vanjskoj površini ladice, uspostavlja se električni kontakt s otopinom u ladici. Nakon određenog vremena rehidracije čini se, uz niži električni napon, višefazni elektroforetski unos analita u gel i slijedno izoelektrično sabiranje uz

primjenu visokog napona (do 8 000 V). Regulacija (kontrola) i vođenje čitavog postupka, najčešće, čini se s pomoću računala.



Slika 11.3. Hlađena elektrodna platforma za provođenje izoelektričnog sabiranja uz primjenu keramičkih nosača (lađica) vrpca gela

11.3. Razdvajanje u drugom stupnju

Nakon izoelektričnog sabiranja, a prije elektroforeze u drugoj dimenziji, proteini u vrpici gela denaturiraju se s natrij dodecilsulfatom (SDS). Taj anionski deterdžent veže se na polipeptidne lance stvarajući komplekse negativnog električnog naboja. Nastale kompleksne čestice proteina imaju, praktično, jednaku gustoću negativnog električnog naboja (C/g). Tako, sve molekulske vrste u drugom stupnju elektroforeze migriraju prema pozitivnom polu ćelije. Brzina migracije čestica ovisi o njihovoj masi.

Potpuna denaturacija proteina na separacijskoj vrpici čini³ se u dva stupnja. Najprije se vrpce gela stavljaju (15 min) u epruvete u otopinu pufera (50 mmol L⁻¹ Tris + HCL, pH = 6,8) koji sadrži SDS (2 %), EDTA (0,1 mmol L⁻¹), pokazno bojilo (Bromfenol plava, 0,01%), glicerol (30 %) i reducens (DTT, 60 mmol L⁻¹) koji se dodaje otopini neposredno prije uporabe. U drugom stupnju (10 min) u otopinu se dodaje jodoacitamid (270 mmol L⁻¹) koji neutralizira reducens (DTT). Nakon ekvibracije vrpce gela, savijene u oblik slova C, kratkotrajno se polože bočno na suhi filtrirni papir,

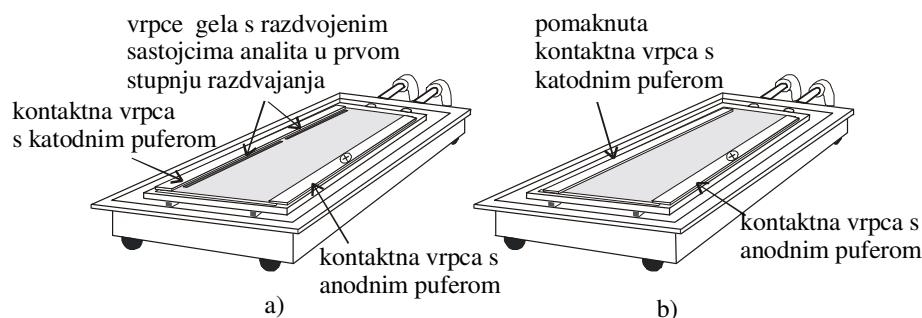
³A. GZrg i dr. *Electrophoresis*, **8** (1987) 45., 122.

da se ukloni višak otopine, a zatim se polažu na ploču poliakrilamidnoga gela za drugi stupanj razdvajanja.

U drugom stupnju razdvajanje makromolekula analita (sada u obliku kompleksa sa SDS) temelji se na razlikama u masi čestica. Zato se u razdvajanju u drugoj dimenziji rabi poliakrilamidni gel s gradijentom veličine pora. Najčešće se rabi gel s linearnim gradijentom veličine pora, ali rabe se i drugi oblici (konkavni, konveksni) ovisno o vrsti analita.

Elektroforeza se može činiti u vertikalnoj ili horizontalnoj napravi. Češće se rabi horizontalna naprava. Budući da se u izoelektričnom sabiranju, učinjenom u prvom stupnju razdvajanja, razdvojene molekulske vrste nalaze u uskim zonama u gelu, zapravo u obliku tankih kvadara debljine jednake debljini gela (0,5 mm), širine jednake širini vrpce gela (3 mm) i visine jednake širini zone, potrebno ih je prije slijednog razdvajanja nagomilati (koncentrirati) u što manji volumen. Time se smanjuju površine točaka (zona, otočića) razdvojenih makromolekula u separacijskom gelu u drugom stupnju razdvajanja. Nagomilavanje makromolekula u mali volumen čini se u gelu za nagomilavanje na način kako je već opisano. Dakle, ploča poliakrilamidnoga gela za drugi stupanj razdvajanja sastoji od užeg dijela (1 cm) u kojem se čini nagomilavanje makromolekula i dijela gela s gradijentom veličine pora (10 cm), u kojem se čini razdvajanje makromolekula. Gel za nagomilavanje ima velike pore (mali T) jednolične veličine i niži pH od gela za razdvajanje. Uz pufer oba gela sadrže i SDS. Način pripreme ploče poliakrilamidnoga gela s gradijentom poroznosti i dijelom gela za nagomilavanje opisan je na str. 62.

U primjeni horizontalne naprave za elektroforezu ploče poliakrilamidnoga gela polažu se na hladenu površinu prethodno premazanu sa silikonskim uljem, tako da je plastična folija na kojoj je gel lijevan uz hladenu površinu naprave, a lice gela prema gore. Strana ploče gela na kojoj se nalazi sloj gela za nagomilavanje postavlja se prema katodi. Na rubove gela uzduž katodne i anodne strane na gel se polažu kontaktne (papirne) vrpce prethodno namočene u katodni odnosno anodni pufer. Katodni pufer (Tris + HCL, pH = 6,8) sadrži glicin i SDS, a anodni samo pufer (Tris + HCL, pH = 8,4). Na površinu gela za nagomilavanje, uz katodnu kontaktnu vrpce, polaže se vrpce gela iz prvog stupnja razdvajanja, s licem gela prema dolje odnosno prema licu gela za nagomilavanje. Na kontaktne vrpce polože se elektrode i pod učinkom električnog polja najprije se čini unos makromolekula iz vrpce u ploču gela (maks. 200 V, 75 min). Zatim se vrpce gela iz prvog stupnja uklone i katodna kontaktna vrpce pomaknu se tako da prekriju površinu na kojoj su bile vrpce gela iz prvog stupnja razdvajanja. Uz viši električni napon (najviše 800 V) čini se nagomilavanje i slijedno razdvajanje makromolekula dok pokazno bojilo (Bromfenol plavo) koje migrira brže od makromolekula ne dostigne do anodnog ruba separacijskog gela i tako indicira trajanje razdvajanja.



Slika 11.4. Unošenje razdvojenih makromolekula u prvom stupnju razdvajanja iz vrpce gela u ploču gela za slijedno nagomilavanje i razdvajanje u drugom stupnju elektroforeze (a), elektroforetsko nagomilavanje i razdvajanje nakon uklanjanja vrpce gela iz I stupnja razdvajanja i pomicanja katodne kontaktne vrpce (b)

11.4. Identifikacija i kvantifikacija

Nakon razdvajanja čini se identifikacija i kvantifikacija razdvojenih makromolekula koje se nalaze u obliku točkastih nakupina u ploči separacijskoga gela. Kvantifikacija, razdvojenih, točkastih nakupina makromolekula čini se nakon bojenja organskim bojilom ili češće bojenjem srebrom. Za kvantifikaciju najčešće se primjenjuje bojenje modrim bojilom (Coomassie[®] R-350). Gel su uranja u kiselu otopinu bojila (8 min uz miješanje, 50 °C). Odbojivanje samog gela i ispiranje čini se otopinom octene kiseline (10 %, 2 sata). Nakon ispiranja gel se stabilizira uranjanjem u otopinu glicerola (10 %) i suši na zraku.

Veća osjetljivost detekcije postiže se bojenjem srebrom. Rabe se različiti postupci⁴ uz koje se postiže osjetljivost od 0,05 do 0,1 ng/mm². Za bojenje srebrom danas se rabe automatske naprave s kojima se ostvaruje kontrola svih dionih procesa u postupku bojenja srebrom. Nakon bojenja srebrom gel se stabilizira umakanjem u otopinu glicerola i suši na zraku.

Identifikacija razdvojenih makromolekula čini se usporedbom s mapom razdvajanja uzorka poznatog sastava. Često je to vrlo teško vizualno učiniti, napose u analizi kompleksnih analita, kada se na separacijskom gelu nalazi i više tisuća točaka. Zato se to čini s pomoću računala. Forezogram se prevodi

⁴ J. Heukeshoven, R. Dernick, u: B. J. Radola ed., *Electrophoroze-Forum*, **86** (1986) 22.

C. M. Merrill, D. Goldman, S. A. Sedman, M. H. Ebert, *Science*, **211** (1981) 1437.

H. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis*, **8** (1987) 93.

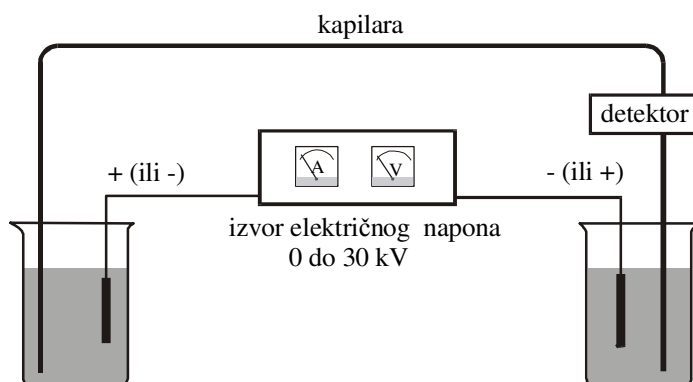
u digitalni oblik. To se čini s pomoću denzitometra, visoko rezolucijskog skenera (preslikača) ili videokamere. Digitalizirana preslika obojenoga gela s pomoću (evaluacijskog) programa uspoređuje se s digitaliziranom slikom standarda ili s bazom podataka iz istog ili drugog laboratorija za kvalitativnu i kvantitativnu analizu.

Specifična detekcija pojedinog proteina može se učiniti nakon prenošenja proteina sa separacijskoga gela na imobilizacijsku membranu (vidi str. 44.). Često se identifikacija proteina čini imunološkim metodama, tj. temeljem reakcije s antitijelima. Za potpunu analizu proteina čini se analiza sadržanih aminokiselina, N-terminalno cijepanje (sekvenciranje) i određivanje molekulske mase s pomoću spektrometra masa. Može se učiniti i rasčinjavanje s tripsinom (eng. tryptic digestion) i fragmente peptida razdvojiti s pomoću HPCL-a ili elektroforeze u kapilari (vidi kasnije) i odrediti masa s pomoću spektrometra masa. Na temelju unaprijed pripremljene baze podataka moguće je identificirati pojedini protein.

12. ELEKTROFOREZA U KAPILARI

Elektroforeza u kapilari analitička je metoda temeljena na migraciji električki nabijenih čestica kroz kapilarnu cijev. U praksi se rabe kapilarne cijevi unutarnjeg promjera od 10 do 250 μm i duljine od 10 do 110 cm, najčešće unutarnjeg promjera 50 do 100 μm . Materijali koji se rabe za izradu kapilarnih cijevi jesu kvarcno staklo, fluorirane ugljikovodične smole (eng. fluoro-hydrocarbon resin) i drugi materijali. Najčešće se rabe kvarcne kapilare vrlo tankih stijenki. Radi zaštite od lomljenja na vanjske stijenke kvarcne cijevi nanosi se sloj toplinski vodljivog polimera (poliimid).

U elektroforezi kapilare mogu biti ispunjene samo elektrolitnom otopinom pufera, otopinom pufera koja sadrži polimere koji povećavaju viskoznost otopine ili mogu biti ispunjene gelom.



Slika 12.1. Načelo naprave za elektroforezu u kapilari

Naprava za elektroforezu u kapilari sastoji se od:

- električnog izvora za kontrolu istosmjernog električnog napona između elektroda odnosno kroz kapilaru s naponom i do 35 000 V,
- dvije posude (dva spremnika) za otopine pufera u koje su uronjene kovinske elektrode. Razina otopina pufera u spremnicima jednaka je; tako se sprječava tok pufera kroz kapilaru zbog razlike u hidrostatskom tlaku,
- separacijske kapilare koja u slučajevima optičke detekcije analita ima pri kraju optički prozor smješten uz osjetilo detektora. Krajevi kapilare

uronjeni su u otopinu u spremnicima za elektrode. Kapilara je napunjena otopinom pufera ili je ispunjena gelom. Pri uštrcavanju (injektiranju) otopine analita ulazni kraj kapilare spaja se na napravu za uštrcavanje,

- detektora za detekciju (otkrivanje) i kvantifikaciju separiranih molekularnih vrsta. Za izravnu detekciju najčešće se rabe detektori temeljeni na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u vidljivom i ultravioletnom dijelu spektra ili fluorescenciji. Rabe se i detektori temeljeni na konduktometriji, amperometriji i masenoj spektrometriji. Za molekulske vrste koje ne apsorbiraju u vidljivom ili ultravioletnom spektru ili nisu fluorescentne primjenjuje se neizravna detekcija. Zapis, integracija i druga matematičko-statistička obrada signala odziva detektora i prikaz rezultata mjerenja danas se čini s pomoću računala, ona su sastavni dio komercijalnih uređaja za elektroforezu u kapilari.

Mali unutarnji presjek kapilare i relativno velika duljina uzrokuju veliku električnu otpornost, pa su jakosti struje kroz kapilaru vrlo malene. Radni naponi elektroforeze u kapilari jesu i do 30 000 V. Veliki radni napon omogućuje vrlo brzu separaciju sastojaka analita. Temperatura medija u kapilari održava se hlađenjem kapilare. Zbog malog volumena elektrolita u kapilari od nekoliko mikrolitara i relativno velike vanjske površine kapilarne cijevi, oslobođena toplina brzo prelazi u rashladno sredstvo koje struji oko kapilare. Većina komercijalnih uređaja za elektroforezu u kapilari ima prisilno strujanje rashladnog sredstva (zrak). Volumen analita za analizu samo je nekoliko nanolitara (10^{-9} L). Kvalitativna analiza temelji se na utvrđivanju vremena migracija sastojaka analita, a kvantitativna na dimenzijama, tj. visini i širini električnog odziva primijenjenog detektora. U kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi čini se *usporedba s odzivom standarda*, tj. iste molekulske vrste, kojoj se migracija utvrđuje pod jednakim eksperimentalnim uvjetima primijenjenim u analizi ispitivanog analita.

12.1. Načelo metode i obilježja (separacijske) kapilare

U elektroforezi u kapilari, temelju ulogu u učinkovitosti separacije, rezoluciji i obilježjima signala odziva detektora, ima primijenjena kapilara. Načelo metode i učinak obilježja kapilare pokazani su na primjeru kapilare od kvarcnog stakla, koja se najčešće rabi. U elektroforezi u kapilari, krajevi kapilarne cijevi koja je ispunjena elektrolitnom otopinom uronjeni su u otopinu pufera. Preko elektroda, iz električnog izvora, uspostavlja se električni napon, koji uzrokuje električno polje kroz kapilaru. Otopina ispitivanog uzorka unosi se na ulaznom kraju kapilarne cijevi. Pod utjecajem električnog polja električki nabijene čestice analita migriraju kroz kapilaru.

Na drugom kraju kapilare nalazi se detektor kojim se otkrivaju molekulske vrste koje migriraju kroz dio kapilare na kojem se nalazi osjetilo detektora.

Elektroforetska pokretljivost (u_{ef}) ovisi o električnom naboju, veličini i obliku čestice analita. Kao što je već pokazano (vidi str. 3.) za migraciju kuglaste čestice u slobodnoj otopini elektroforetska pokretljivost iskazana je relacijom:

$$u_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (12-1)$$

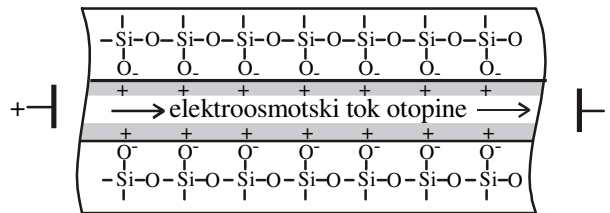
gdje su: q - efektivni naboj čestice, η - viskoznost elektrolitne otopine, r - Stokesov radijus čestice.

Brzina migracije jednaka je umnošku elektroforetske pokretljivosti i jakosti električnog polja (E). Jakost električnog polja jednaka je omjeru narinutog napona i duljine kapilare:

$$v = u_{ef} E = u_{ef} \frac{U}{L} \quad (12-2)$$

gdje su: U - uspostavljeni radni napon, a L - duljina kapilarne cijevi.

To vrijedi ako otopina u kapilari miruje.



Slika 12.2. Prikaz unutrašnje površine kvarcne kapilarne cijevi sa stacionarnim negativnim nabojem na površini stakla i difuznim slojem pozitivnog naboja u otopini koji uzrokuje elektroosmotski tok otopine prema negativnoj elektrodi

Na površini kvarcnoga stakla nalaze se silanolne skupine (-Si-OH). Na unutarnjoj površini kvarcne kapilarne cijevi u kontaktu s elektrolitnom otopinom, kojoj je pH veći od 3 silanolne skupine ioniziraju, tj. oslobađaju se vodikovi ioni. Na unutarnjoj površini kapilare javlja se slobodni negativni električni naboj. Nosioci tog negativnog naboja jesu atomi kisika na površini silikatne tetraedarske strukture kvarcnoga stakla. Zbog toga nepokretnog negativnog naboja na strani otopine nakupljaju se ioni pozitivnog naboja, stvarajući tako električni dvostruki sloj. Sloj pozitivnog naboja na strani otopine može biti dijelom i difuzan. Tada se kroz taj dio otopine javlja elektrokinetički ili *zeta potencijal* (ζ).

Postojanje elektrokinetičkog odnosno zeta potencijala uzrokuje *elektroosmotski tok* otopine prema negativnoj elektrodi.

Budući da su kapilarne cijevi malog unutarnjeg radijusa, difuzni pozitivni naboj na cijeloj vanjskoj površini otopine unutar kapilare vuče cjelokupnu otopinu i sve ono što se u njoj otopljeno ili dispergirano prema negativnoj elektrodi.

Elektroosmotska pokretljivost otopine (u_{eo}) iskazana je relacijom:

$$u_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (12-3)$$

gdje su: ε - dielektrična konstanta otopine pufera u kapilari, ζ - zeta potencijal na unutarnjoj površini kapilarne cijevi i η - viskoznost otopine pufera.

Brzina toka električki nabijenih čestica u kapilari jednaka je umnošku vlastite elektroosmotske pokretljivosti i jakosti električnog polja, dakle:

$$v_{eo} = u_{eo} E = \frac{\varepsilon \zeta U}{\eta L} \quad (12-4)$$

Ovisno o električnom naboju čestice analita migracija čestice i elektroosmotski tok otopine u kapilari mogu biti u istom smjeru (čestica pozitivnog naboja) ili u suprotnom smjeru (čestice negativnog naboja). Putuju li u istom smjeru, stvarna brzina čestice bit će jednaka zbroju elektroforetske brzine čestice i elektroosmotske brzine otopine. Kreću li se u suprotnom smjeru, brzina čestice bit će jednaka razlici između elektroforetske brzine čestice i elektroosmotske brzine otopine.

Dakle brzina putovanja čestice u kapilari iskazana je relacijom:

$$v = v_{ef} \pm v_{eo} \quad (12-5)$$

Ako je brzina elektroosmotskog toka otopine velika u odnosu na elektroforetsku brzinu čestice analita, onda će i pozitivne i negativne čestice analita putovati smjerom putovanja otopine, dakle prema negativnoj elektrodi. Na taj način u jednom elektroforetskom mjerenju u kapilari mogu se razlučiti i detektirati i pozitivne i negativne čestice analita. Vrijeme (t) potrebno da čestice analita prijeđu od ulaznog kraja kapilarne cijevi do točke detekcije (l , efektivna duljina kapilare) iskazano je relacijom:

$$t = \frac{l}{v_{ef} \pm v_{eo}} = \frac{lL}{(u_{ef} \pm u_{eo})U} \quad (12-6)$$

Da bi se postigla dobra reprodukcija separacije kroz kapilaru, elektroforetski tok otopine mora se održavati konstantnim i reproducibilnim. Kontrola pH i ionska jakost pufera temeljne su veličine koju određuju zeta potencijal, a time i elektroosmotski tok otopine. Na elektroosmotski tok utječu i promjene temperature kroz promjenu viskoznosti otopine (2-3 %/°C). Promjena elektroosmotskog toka može se učiniti modifikacijom unutarnje površine kapilare s pomoću organskih modifikatora, isto tako s pomoću kationskih ili anionskih površinski aktivnih tvari, adsorpcijom na površini neutralnih hidrofilnih polimera, odnosno kovalentnim vezanjem modifikatora. U većini mjerenja prisutan je elektroosmotski tok otopine. Međutim, u nekim primjenama potrebno je smanjiti ili potpuno ukloniti elektroosmotski tok otopine.

12.2. Unošenje otopine analita u kapilaru

U elektroforezi u kapilari na ulazni kraj kapilare unosi se mali volumen (nekoliko nL) otopine analita. Što je manji (kraći) valjčić otopine, to je bolje razdvajanje sadržanih molekularnih vrsta u analitu. Zapravo su oštiri i bolje razdvojeni vrhovi odziva koji pripadaju pojedinoj molekularnoj vrsti u električnom signalu detektora. Budući da je optički put za elektromagnetsku detekciju razdvojenih sastojaka analita vrlo kratak (mali promjer kapilare), uz to je i kratko vrijeme prolaza kroz optički prozor za detekciju, koncentracija analita u otopini uzorka mora biti što je moguće veća. Razrađeni su mnogi postupci pretkoncentriranja analita u samoj kapilarnoj cijevi ili izvan kapilare.

Unošenje otopine analita u kapilarnu cijev može se učiniti ili *hidrodinamičkim ubrizgavanjem* (injektiranjem) ili *elektrokinetičkim ubrizgavanjem*. Hidrodinamičko ubrizgavanje temelji se na razlici tlakova na krajevima kapilare. Ta se razlika može učiniti povećanjem tlaka na ulaznom kraju kapilare ili sniženjem tlaka na izlaznom kraju. Uronimo li ulazni kraj kapilare u otopinu analita kojemu je razina viša od otopine pufera na izlazu kapilare, onda, zbog gravitacijskoga djelovanja otopina analita utječe u kapilaru. Volumen otopine analita koji utječe u kapilaru (V) iskazan je Poiseuilleovom relacijom:

$$V = \frac{\rho g \pi r^4 \Delta h t}{8 \eta L} \quad (12-7)$$

gdje su: ρ - gustoća otopine, g - ubrzanja sile teže, r - unutarnji radijus kapilare, Δh - razlika u visina razina otopina na ulazu i izlazu kapilare, t - trajanje utjecanja, η - viskoznost otopine i L - duljina kapilare.

Ovaj jednostavni način ubrizgavanja može se primijeniti za otopine analita male viskoznosti. Vrijeme je utjecanja od 5 do 30 sekundi. Za otopine veće viskoznosti otopina analita utiskuje se u kapilaru tlakom plina u zatvorenoj posudici s otopinom analita spojenoj na ulazni kraj kapilare ili sniženjem tlaka plina (vakuumiranjem) u zatvorenoj posudici s otopinom pufera na izlaznom kraju kapilare. Vakuumiranjem se postiže slabija reproducibilnost injektiranja zbog teže kontrole sniženog tlaka na izlaznom kraju kapilare. Volumen ubrizgane otopine analita ovisi o razlici tlakova na krajevima kapilare i o vremenu injektiranja. Iskazan je relacijom:

$$V = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8 \eta L} \quad (12-8)$$

Elektrokinetičko ubrizgavanje temelji se na migraciji električki nabijenih čestica analita. Čini se tako da ulazni kraj kapilare uroni u otopinu analita. Između otopine analita i otopine pufera na izlaznom kraju uspostavi se velika razlika potencijala. Električki nabijene čestice analita migriraju u kapilaru. Brzina migracije ovisi o električnoj pokretljivosti pojedine molekulske vrste. Zbog toga odnos količina pojedinog sastojka koji su migrirali u kapilaru nije isti kao u izvornoj otopini analita. To je nedostatak ove metode injektiranja. Primjenjuje se za kapilare ispunjene gelom.

Mnogi komercijalni uređaji imaju automatski ubrizgivač analita za sukcesivna elektroforetska mjerenja. Injektirani volumen otopine analita u elektroforezi u kapilari je od 0,5 do 50 nL. Za otopine analita malih koncentracija potrebno je injektirati veći volumen analita. To uzrokuje proširenje razdvojenih zona i slabiju separaciju ali i detekciju zbog male koncentracije sastojaka analita u zonama. Da bi se poboljšala selektivnost i detekcija, čini se nagomilavanje sastojaka analita. To se može učiniti u samoj kapilari. Najjednostavnije se to može učiniti tako da se u kapilaru ubrizgava otopina analita kojoj je ionska jakost mala, znatno manja od otopine pufera u kapilari. Stupac (zona, čep) otopine analita ubrizgan u kapilaru ima veliki električni otpor. Veliki električni otpor otopine analita uzrokuje povećanu jakost električnog polja u toj zoni otopine. Zato čestice analita brzo migriraju kroz taj dio otopine. Dolaskom na granicu pufera veće ionske jakosti odnosno izlaskom iz zone (čepa) otopine analita one se usporavaju, i to zbog manje jakosti električnog polja u otopini pufera veće ionske jakosti. Molekule koje još brzo migriraju kroz zonu otopine analita pristižu one s prednje granice zone i tako na granici otopine analita i pufera dolazi do nagomilavanja sastojaka analita. Zapravo formira se uža zona otopine u kojoj je analit. Time se popravljiva slijedno razdvajanje i olakšava detekcija molekularnih vrsta sada zbijenih u užu vrpce pri prolazu kroz detekcijski prozor kapilare.

Mnogo učinkovitiji način jest da se najprije čini izotahoforeza analita (vidi str. 120.) i slijedno elektroforeza u kapilari. To se može učiniti u jednoj kapilari ili odvojeno u dvije slijedno povezane kapilare.

12.3. Razdvajanje sastojaka analita u kapilari

Nakon unošenja u separacijsku kapilaru molekule analita migriraju različitim brzinama, ovisno o njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti, i tako se razvrstavaju u razdvojene zone. Zbog longitudinalne difuzije molekula nastaje disperzija (širenje) zona. Uzima se da se disperzija zona može opisati kao Gaussova krivulja raspodjele. U idealnom slučaju širenje separacijske zone ovisi samo o longitudinalnoj difuziji molekula analita. U tom slučaju efikasnost separacije može se iskazati brojem teorijskih tavana izračunatih prema relaciji:

$$N = \frac{(u_{ef} \pm u_{eo})Ul}{2DL} \quad (12-9)$$

gdje je D - difuzijski koeficijent analita u otopini separacijskog pufera.

Međutim, mnogi čimbenici utječu na stvarnu efikasnost separacije odnosno disperziju zone separacije. To su duljina stupca injektiranog analita, interakcija čestica analita sa stijenkom kapilare, veličina detekcijske ćelije pri detekciji izvan kapilare, efikasnost hlađenja i dr. Praktično se prividni broj teorijskih tavana izračunava iz eksperimentalnih veličina prema relaciji:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{l_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (12-10)$$

gdje je l_m - duljina uzduž osnovne crte u signalu odziva detektora (forezogram) od točke injektiranja analita do sjecišta vertikale povučene od signala odziva (vrh) pojedinog sastojka analita do osnovne crte forezograma, $w_{1/2}$ - širina pojedinog vrha u polovici njegove visine.

Razdvajanje zona dvaju različitih sastojaka analita iskazuje se kao raščlanjivanje (rezolucija) (R_s) i u odnosu na efikasnost razlučivanja (N) iskazano je relacijom:

$$R_s = \frac{\sqrt{N} [u_{ef}(2) - u_{ef}(1)]}{4(u_{ef} \pm u_{eo})} \quad (12-11)$$

gdje su: $u_{ef}(1)$ i $u_{ef}(2)$ - elektroforetska pokretljivost dviju molekularnih vrsta analita, a \hat{u}_{ef} - njihova srednja vrijednost.

Učinkom na povećanje efikasnosti razdvajanja pojedinog sastojka analita, npr. promjenom elektroforetske pokretljivosti te učinkom na elektroosmotski tok, može se postići optimalna rezolucija mjerenje.

12.4. Elektroforeza u kapilari ispunjenoj otopinom pufera

U kapilari ispunjenoj otopinom pufera molekularne vrste analita, unijete u kapilaru u obliku malog čepa (zone) otopine, razdvajaju se u zone koje putuju kroz kapilaru različitom brzinom. Brzina kretanja pojedine zone ovisi o električnoj pokretljivosti pojedinog analita i o brzini elektroosmotskog toka otopine pufera (vidi relaciju 12-5). Primjenom ovog modela razdvajanja mogu se analizirati male molekule kojima je $Mr < 2\ 000$, i velike kojima je Mr od $2\ 000$ do više od $100\ 000$. Velika moć rezolucije omogućava separaciju i detekciju molekula kojima se mase vrlo malo razlikuju. Mogu se separirati čak i optički (kiralni) izomeri molekula (vidi poslije). U učinkovitosti separacije djelatni su različiti čimbenici. Jedni su vezani na instrumentalna obilježja a drugi na kemijski sastav otopine separacijskoga pufera. Radni električni napon određuje vrijeme separacije. Što je veći radni napon, to je kraće vrijeme separacije. Preveliki napon može, ovisno o električnoj provodnosti pufera, uzrokovati preveliko zagrijavanje u kapilari. Zbog nejednolikog hlađenja u stupcu otopine uspostavlja se poprečni gradijent temperature, a time i gradijent viskoznosti i električne provodnosti otopine pufera u kapilari. To uzrokuje, zbog razlike u brzini migracije u toplijim i hladnijim dijelovima otopine, širenje zona razdvojenih sastojaka analita pa time i smanjenje rezolucije mjerenja.

Dimenzije kapilare, tj. njezina duljina i unutarnji radijus određuju vrijeme i učinkovitost separacije i prihvatljivu (primjenjivu) količinu analita. Povećanjem duljine (efektivne i stvarne) uz konstantni radni napon smanjuje se jakost električnog polja i time produljuje vrijeme separacije. Uz određeni sastav pufera i jakost električnog polja rasipanje (disipacija) oslobođene topline, a time i širenje separiranih zona, ovise o radijusu kapilare. Radijus kapilare uvjetuje i graničnu osjetljivost koja ovisi o volumenu injektiranog analita i metodi detekcije. Adsorpcija molekula analita na površini kapilare

smanjuje selektivnost i učinkovitost separacije. U separaciji molekulskih vrsta koje se adsorbiraju na površini kvarcne kapilare rabi se kapilara s modificiranom ili prekrivenom unutarnjom površinom. Da bi se spriječila adsorpcija, unutarnju površinu kapilare koja nosi negativni električni naboj treba modificirati odnosno prekriti. U analizi proteina razrađene su mnoge metode modifikacije i prekrivanja unutarnje površine kapilare. Modifikacija odnosno prekrivanje može biti dinamička ili permanentna¹.

Pri dinamičkoj modifikaciji u samu otopinu radnog pufera dodaju se kationske površinski aktivne tvari koje se adsorbiraju na unutarnjoj površini kapilare i tako kompenziraju površinski električni naboj. U istu svrhu rabe se i zwitter ioni, metilceluloza, polietilen oksid, polivinil alkohol i dr. U permanentnom prekrivanju površina kapilare prekrije se polimerom koji se kovalentno veže na silanolne skupine na površini kvarca.

Za permanentno prekrivanje površne kapilare rabe i tvari koje se adsorbiraju na površini kapilare. Međutim njih se na površini nakon adsorpcije fiksira sušenjem ili zagrijavanjem. Sloj modifikatora sprječava interakciju molekula proteina s površinom kvarcne kapilare. Za permanentno prekrivanje rabe se celulozni acetati, citosan, polivinil alkohol, polietilen glikol, polietilen amin i dr.

Za različite primjene na tržištu se mogu nabaviti unaprijed modificirane kapilare prekrivene slojem neutralnog hidrofilnog, kationskog ili anionskog polimera.

U separaciji u kapilari temeljnu ulogu imaju obilježja primijenjene otopine pufera. Kapacitet pufera mora biti dovoljno velik da spriječi promjenu pH uzrokovanu migracijom iona. Poželjno je da je električna mobilnost sastavnica pufera mala odnosno da mu je električna provodnost mala. Uz malu električnu provodnost otopine pufera, manja je jakost električne struje kroz kapilaru, a time i oslobođena toplina i pregrijavanje elektrolita u kapilari. Isto tako sastavnice pufera moraju imati slabu apsorpciju elektromagnetskog zračenja u području valne duljine detekcije analita. Bolja selektivnost odnosno manja distorzija vrpce analita postiže se kada sastavnice pufera imaju sličnu električnu pokretljivost kao i ioni analita. pH pufera utječe na separaciju učinkom promjena efektivnog naboja molekula analita odnosno molekula aditiva i učinkom na elektroosmotski tok otopine.

U separaciji proteina i peptida promjenom pH otopine separacijskog pufera od one niže od izoelektrične točke (pI) analita do iznad izoelektrične točke mijenja se efektivni naboj analita od pozitivnoga do negativnoga. U pravilu povećanjem pH pufera povećava se i elektroosmotski tok otopine pufera. Povećanjem ionske jakosti, odnosno koncentracije, pufera, uz jednaki pH, smanjuje se elektroosmotski tok otopine.

¹ D. Belder and G. Schomburg, *J. Chromatogr.*, **666** (1994) 351.

Za povećanje topljivosti analita, u otopinu pufera dodaju se metanol, acetonitril ili urea. U pravilu organska otapala smanjuju elektroosmotski tok, ali utječu i na stupanj ionizacije analita.

U analizi kationa metala, koji ne apsorbiraju u ultravioletnom području, u otopinu pufera dodaju se tvari koje apsorbiraju u tom području, a s kationima metala tvore stabilne komplekse. Time se ostvaruje neizravna detekcija kationa mjerenjem apsorpcije stvaraoca kompleksa. Za to se rabe kreatin, benzilamin, ili imidazol. Za neizravnu detekciju aniona rabe se kromati, ftalati ili benzoati. Bolja selekcija metalnih kationa postiže se dodatkom stvaraoca kelatnih kompleksa, kao što su \forall -hidroksibutirat, laktati, sukcinati i kruna eteri. Za detekciju metalnih kationa rabe se etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) ili cikloetilendiamintetraoctena kiselina (CyDTA) tvari koje apsorbiraju u ultravioletnom području, a tvore vrlo stabilne komplekse s kationima metala.

U separaciji i identifikaciji optičkih izomera u otopinu pufera dodaju se kiralni selektori. To su tvari koji se različito vežu na pojedini od enantiomera. Kao kiralni selektori (odabirači) rabe se ciklodekstrini (\forall -, \exists - ili (-)polidekstrin), modificirani polidekstrini, i to oni s neutralnom (metil, etil, hidroksialkil i dr.) ili ionizabilnom (aminometil, karboksimetil sulfobutileter) grupom. U istu svrhu rabe se kruna eteri, polisaharidi i neki proteini. Separacija enantiomera dolazi zbog razlike pojedinog enantiomera u tvorbi (primatelj (domaćin)-ligand (gost)) kompleksa s kiralnim selektorom, što utječe na brzinu migracije enantiomera.

12.5. Elektroforeza u kapilari ispunjenoj molekularnim sitom

U elektroforezi u kapilari ispunjenoj molekularnim sitom čestice analita separiraju se temeljem gustoće naboja, ali i veličine čestica zbog učinka medija kao molekularnoga sita. Kao molekularna sita u kapilari rabe se prostorno umreženi gelovi od poliakrilamida ili agaroze ili hidrofilni linearni polimeri. Prostorno umreženi gelovi pripremaju se polimerizacijom u samoj kapilari. Otopina monomera, umreživača i ostalih sastojaka za npr. polimerizaciju poliakrilamidnog gela pripremlja se na uobičajeni način. Otopinom se puni kapilara i proces polimerizacije u kapilari traje nekoliko sati. Punjenje kapilare otopinom za polimerizaciju čini se posebnim napravama¹. U analizi fragmenata DNA molekula (sekvenciranje) kapilare se pune s neumreženim poliakrilamidnim gelom, koji se čini bez dodatka umreživača.

¹ Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, Y. Morita, Y. Nishitsu and M. Tshako, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1221.

Za stabilizaciju gela unutar kapilare otopini za polimerizaciju dodaju se bifunkcijski reagensi (npr. metakriloksi-propiltrimetoksisilan) koji vežu gel s unutarnjom površinom kapilare. Budući da je takav gel vezan na površinu kapilare, ne može se iz nje ukloniti bez razaranja kapilare.

Kapilare ispunjene gelom nalaze široku primjenu u analizi proteina, proteina denaturiranih s SDS-om, DNA i fragmenata DNA. Zbog smanjene difuzije analita u gelu, u elektroforezi u kapilari s gelom postiže se izvanredna separacija i onih molekula koje se vrlo malo razlikuju u masi. Uvjeti separacije kontroliraju se izborom pufera i kontrolom poroznosti gela. Ispitani su mnogi učinci koji poboljšavaju karakteristike gela u specifičnim uvjetima primjene, kao što je fotopolimerizacija, polimerizacije pod neoksidirajućim uvjetima, učinak pH na polimerizaciju i dr. Budući da je gel vezan uz stijenkun unutar kapilare i zbog toga nepomičan za unošenje analita u kapilaru, rabi se samo elektrokinetički postupak.

Kao molekularna sita u elektroforezi u kapilari rabe se hidrofilni polimeri, kao što su linearni poliamidi, derivati celuloze, dekstran i drugi. Suspendirani u separacijskom puferu linearni polimeri imaju učinak molekularnoga sita. Pripremaju su posudici izvan kapilare i pod tlakom uštrcavaju u kapilaru. Rabi se kapilara s permanentno prekrivenom površinom da se ukloni elektroosmotski tok medija. Separacijski medij s polimerima može se zamijeniti sa svježim u svakom slijednom postupku separacije. Tako se postiže bolja reprodukcija mjerenja. Učinak molekularnog sita ovog medija može se varirati promjenom koncentracije ili promjenom duljine lanca odnosno molekularne mase rabljenoga polimera. Za unošenje analita u kapilaru s linearnim polimerom rabi se hidrodinamički ili elektrokinetički postupak

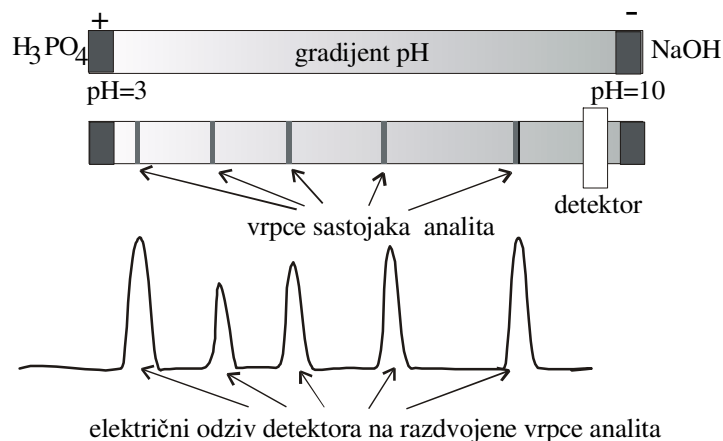
12.6. Elektroforeza u kapilari s izoelektričnim sabiranjem

U elektroforezi u kapilari s izoelektričnim sabiranjem molekularni ioni analita migriraju u kapilari ispunjenoj medijem s gradijentom pH. Pod utjecajem električnog polja molekularni ioni migriraju kroz kapilaru do mjesta na kojem je pH jednak izoelektričnoj točki te molekularne vrste (pI). Na tom mjestu zaustavljaju se jer im pri tom pH električni naboj postaje nula i na njih više ne djeluje električno polje.

Za stvaranje gradijenta pH unutar kapilare rabe se *amfoliti* otopljeni u puferu. Ovisno o vlastitoj pI vrijednosti amfoliti nose pozitivni ili negativni naboj. Oni većeg pI pozitivni su, a oni s manjim pI negativnog su naboja. To se relativno male molekule koje u električnom polju brzo migriraju. Otopljeni u separacijskom puferu amfoliti se, pod utjecajem električnoga polja, raspoređuju slijedom pojedinačne vrijednosti pI i tako se unutar

kapilare stvara medij s gradijentom pH (vidi izoelektrično sabiranje, str. 104.).

Ulazni kraj kapilare uronjen je u otopini niskog pH, a izlazni u otopini s visokim pH. Otopina fosforne kiseline i otopina natrijeva hidroksida najčešće se rabe kao otopine s malim odnosno velikim pH.



Slika 12.3. Načelo stvaranja gradijenta pH i izoelektričnog sabiranja (fokusiranja) analita u kapilari

Uspostavljanje gradijenta pH i separacija molekularnih iona u kapilari može se učiniti na dva načina. U prvom se otopina smjese elektrolita, analita i amfolita tlakom utiskuje u kapilaru. Pod utjecajem električnog polja odnosno uspostavljenog električnog napona čestice amfolita i analita migriraju, unutar kapilare, ovisno o naboju prema negativnoj ili pozitivnoj elektrodi. Molekule amfolita razvrstavaju se u električnom polju u skladu s vlastitom vrijednošću pI i tako se uspostavlja gradijent pH od pozitivne elektrode (niži pH) do negativne elektrode (viši pH). Koncentracija amfolita određuje kapacitet pufera na mjestu pojedine vrijednosti pH. Čestice analita također migriraju ovisno o naboju prema negativnoj ili pozitivnoj elektrodi do mjesta na kojem je pH uspostavljenog gradijenta jednak vrijednosti pI tog sastojka analita.

U dugom načinu u kapilaru se najprije injektira otopina tzv. vodećeg pufera, zatim slijedom otopina amfolita, otopina smjese analita i amfolita, otopina amfolita i na kraju otopina tzv. završnog pufera. Volumen analita mora biti malen da ne bi utjecao na gradijent pH. Uspostavljanjem električnog polja molekule analita i amfolita migriraju do uspostave gradijenta pH i separacije molekula analita prema njihovim pI vrijednostima. Nakon uspostavljanja gradijenta pH i separacije molekule analita i amfolita nemaju električnog naboja i električna struja kroz kapilaru vrlo je mala. Molekule analita razdvajaju se u vrlo uske zone. Molekule koje difuzijom izađu iz zone ulaze u medij s različitim pH, postaju električki nabijene i

učinkom električnoga polja migriraju natrag u zonu odnosno na mjesto u kapilari u kojem je pH jednak pI te molekulske vrste. To je učinak sabiranja (fokusiranja).

Nakon izoelektričnog sabiranja sadržaj kapilare sa stabilnim rasporedom zona analita pomiče se iz kapilare prema prozoru detektora na kraju kapilare. To se može učiniti na tri načina.

Prvi je elektroosmotski način. Učinkom elektroosmotskog toka otapala sadržaj kapilare pomiče se prema kraju kapilare na kojem se nalazi detektor. Taj tok traje i za vrijeme uspostavljanja gradijenta pH i izoelektričnog sabiranja molekula analita. Međutim, ako je brzina elektroosmotskog toka mala u odnosu na brzinu uspostavljanja gradijenta i razdvajanja molekula analita, onda ona neće imati učinak na izoelektrično sabiranje u kapilari. Nakon učinjenog razdvajanja sadržaj kapilare polako putuje zbog elektroosmotskoga toka prema izlazu kapilare. Prolazom kroz detekcijski pozor detektiraju se razdvojene zone sastojaka analita

Drugi je istiskivanje sadržaja kapilare primjenom tlaka na ulazu kapilare.

Trećom metodom pomak se izaziva dodatkom soli u posudicu s katodnom ili anodnom otopinom (ovisno o željenom smjeru pomaka). Pod utjecajem električnoga polja mijenja se pH u kapilari i analiti zajedno s amfolitima pomiču se u smjeru posude sa soli i tako prolaze kroz prozor detektora.

U elektroforezi s izoelektričnim sabiranjem rabe se vrlo visoki radni naponi od 300 do 1 000 V po dužnom centimetru kapilare. Elektroosmotski tok mora se smanjiti ili potpuno ukloniti, ovisno na načinu istiskivanja medija iz kapilare za detekciju. Uporabom kapilara s prekrivenom (modificiranom) površinom smanjuje se elektroosmotski tok medija u kapilari. Komercijalno su dostupne smjese amfolita različitog opsega pH. Amfoliti širokog opsega pH s rabe za približno određivanje pI vrijednosti analita. Za točno određivanje rabe se amfoliti užeg opsega pH.

Kalibracija se obavlja uporabom proteina – standarda poznatog pI.

Elektrolitna otopina pozitivne elektrode (anoda) mora imati niži pH od pI vrijednosti najkiselijeg amfolita, tj. amfolita s najnižim pI. Otopina negativne elektrode mora imati viši pH od pI-a najbazičnijeg amfolita. Kao otopine za elektrode najčešće se rabe otopina fosforne kiseline (pozitivna elektroda) i otopina natrijeva hidroksida (negativna elektroda).

Metoda izoelektričnog sabiranja (fokusiranja) može se primijeniti samo na molekulske vrste koje mogu imati i negativni i pozitivni električni naboj. To su amfoterne molekule proteina, enzima i peptida.

Tijekom izoelektričnog sabiranja u kapilari može nastati taloženje proteina. Ako je potrebno, taloženje se može smanjiti dodatkom aditiva, kao što su glicerol, površinski aktivne tvari, urea ili zwitterionski pufer. Urea, ovisno o koncentraciji, uzrokuje i blagu denaturaciju proteina.

12.7. Elektroforeza u kapilari s elektrolitom i micelama

U elektroforezi u kapilari koja uz elektrolit sadrži i micide površinski aktivnih tvari (deterdženti, emulgatori) separacija se temelji na interakciji čestica analita i micela. Micide su pravilne nakupine površinski aktivnih tvari koje nastaju kad je koncentracija deterdženta veća od *kritične micelarne koncentracije*.

U micelama su molekule deterdženta (50 do 100 molekula) orijentirane tako da su sve polarne, hidrofilne skupine okrenute prema vanjskom, vodenom sloju, a ugljikovodični, liofilni (hidrofobni) dijelovi prema unutarnjem dijelu nakupine (micide). Molekule analita združuju se s micelama temeljem hidrofobne ili elektrostatske interakcije. Zapravo uspostavlja se dinamička ravnoteža između molekula analita u micelama i onih u otopini pufera. Razdiobu molekula analita između micela i otopine, analogno onoj u kromatografiji između stacionarne i mobilne faze, iskazujemo koeficijentom odjeljivanja (eng. partition coefficient). Zato se ta metoda uzima kao hibridna metoda elektroforeze i kromatografije (eng. Micellar electrokinetic chromatography).

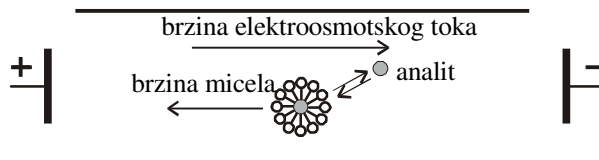
Jedina je elektroforetska metoda u kojoj se mogu separirati uz električki nabijene i električki nenabijene molekule analita. U elektroforezi s micelama najčešće se rabi natrijev dodecilsulfat (SDS) kao anionski deterdžent za formiranje micela negativnog električnog naboja. Rabe se i drugi npr. cetiltrimetil amonijeva sol za kationske micide. Mehanizam razdvajanja u elektroforezi s micelama temelji se na interakciji, zapravo na stvaranju kompleksa između molekula analita i micela.

U kapilari ispunjenoj neutralnom ili lužnatom otopinom pufera, pod utjecajem električnog polja, nastaje snažni elektroosmotski toka otopine pufera prema negativnoj elektrodi. Sadrži li otopina pufera anionski deterdžent (SDS), negativno nabijene (anionske) micide migriraju u suprotnom smjeru, dakle prema pozitivnoj elektrodi. Na brzinu migracije micela utječe stupanj interakcije između micela i molekula analita.

Radi li se neutralnim molekulama analita, brzina migracije micela prema pozitivnoj elektrodi bit će manja što je ta interakcija jača. Ako su čestice analita molekulski ioni (pozitivni ili negativni), onda na migraciju micela na koje su vezani molekulski ioni analita utječe i električni naboj molekula analita. Ako je brzina elektroosmotskog toka veća o brzine migracije micela, onda će i micide nošene otopinom putovati prema izlazu iz kapilare odnosno prema prozoru detektora. Kroz prozor detektora prolazit će i razdvojene zone sastavnica analita. U električnom odzivu detektora vrhovi (pikovi) odziva električki nenabijenih čestica analita bit će između vrha

odziva pokazivača brzine elektroosmotskoga toka i odziva samih micela. Za električki nabijene čestice analita na slijed vrhova odziva utječe i naboj molekula analita.

Kao pokazivač brzine elektroosmotskog toka rabi se metanol, koji ne ulazi u interakciju s micelama i koji putuje kroz kapilaru brzinom elektroosmotskoga toka otopine pufera.



Slika 12.4. Brzina putovanja molekula analita ovisi o brzini elektroosmotskoga toka, brzini migracija micela i jakosti interakcije sastojaka analita i micela

Na separaciju molekula analita u toj metodi utječu mnogi čimbenici. Vrijeme separacije obrnuto je razmjerno uspostavljenom naponu. Preveliki napon može uzrokovati pregrijavanje i stvaranje gradijenta temperature i viskoznosti u stupcu otopine u kapilari, osobito pri uporabi pufera velike električne provodnosti. Promjena temperature utječe i na koeficijente razdiobe sastojaka analita, na kritičnu micelarnu koncentraciju i na viskoznost medija. Sve to utječe na migraciju molekula analita. Uz efikasno hlađenje postiže se bolja reprodukcija mjerenih vremena migracije. Duljina i unutarnji radijus kapilare utječu na vrijeme trajanja i učinkovitost separacije. Vrsta i koncentracija površinski aktivne tvari utječe na rezoluciju i selektivnost separacije.

Promjena pH otopine pufera ne utječe na koeficijent razdiobe električki nenabijenih molekula analita. Međutim, utječe na elektroosmotski tok u kapilarama s neprekrivenom površinom. Snižanjem pH smanjuje se elektroosmotski tok. Produžava se vrijeme elektroforeze i time se u analizi električki nenabijenih molekula analita povećava rezolucija mjerenja.

Za bolju separaciju hidrofobnih analita u otopinu pufera dodaju se organska otapala (metanol, propanol, acetonitril i dr.). U separaciji kiralnih enantiomera u medij se dodaju kiralni odabirači (selektori). Oni mogu biti kovalentno vezani na micela deterdženta ili slobodni u otopini pufera. Za povećanje selektivnosti u analizi hidrofobnih analita u pufer se dodaju ciklodekstrini koji smanjuju interakciju analita i micela. Za istu svrhu rabe se i drugi aditivi.

12.8. Detekcija i kvantifikacija

Otkrivanje (detekcija) razdvojenih molekularnih vrsta u elektroforezi u kapilari čini se izravno u kapilari ili izvan kapilare. Metode detekcije temeljene se na apsorpciji elektromagnetskoga zračenja u području vidljivog

i ultravioletnog svjetla, mjerenju fluorescencije, kemiluminiscencije ili indeksa loma i elektrometrijskim mjerenjima.

Budući da je unutarnji dijametar kapilare do 100 μm , a ukupni volumen otopine do 10 μL , optički prozor za detekciju mora biti uzak da bi se razdvojene zone analita pojedinačno detektirale bez prekrivanja i gubitka učinka razdvajanja. Zbog kratkog optičkog puta osjetljivost određivanja relativno je niska (1 do 0,1 ppm). Na kapilari se prozor za optičku detekciju učini tako što se ukloni, optički nepropustan, zaštitni poliimidni sloj (termički sa žicom ugrijanom do tamnocrvenog žara ili kemijskom razgradnjom s koncentriranom sumpornom kiselinom ili mehanički) i tako otvori prolaz za elektromagnetsko zračenje.

Za izravnu elektrokemijsku detekciju u kapilari mogu se rabiti samo ultramikroelektrode.

U detekciji izvan kapilare rabe se dvije slijedne kapilare, prva za separaciju, a druga za detekciju sastojaka analita. Za detekciju spektrometrom masa odvajanje vrpce analita čini se također izvan separacijske kolone. Nedostatak detekcije izvan kolone jest u tome što nastaje disperzija vrpce analita i time slabije razdvajanje.

Detekcija temeljena na apsorpciji ultravioletnoga zračenja najčešće se primjenjuje usprkos relativno maloj osjetljivosti. Kao izvor ultravioletnog svjetla rabi se vodikova lampa, a red (niz) fotodioda kao detektor apsorpcije. Kao izvor svjetla rabe se i laseri.

Detekcijom temeljenom na fluorescenciji ostvaruje se bolja osjetljivost od one temeljene na apsorpciji ultravioletnoga zračenja. Za detekciju temeljenu na fluorescenciji rabe se različiti uređaji s laserskom pobudom, koja omogućuje sabiranje elektromagnetskoga vala pobude na mali volumen unutar kapilare i tako smanji rasipanje svjetla na stijenkama kapilare. Kapilara, zbog svog oblika, ima učinak optičke leće. Rabi se i metoda uvođenja signala pobude u samu kapilaru putem optičkog vlakna i detekcija emitiranog fluorescentnog zračenja s pomoću fotomultiplikatora postavljenog okomito na detekcijski prozor kapilare². Razvijeno je na desetine različitih tehnika za fluorescentnu detekciju u pojedinačnoj kapilari i u snopu kapilara, u samoj kapilari ili u maloj kivetu na izlazu kapilare³ (vidi sliku 8.13.).

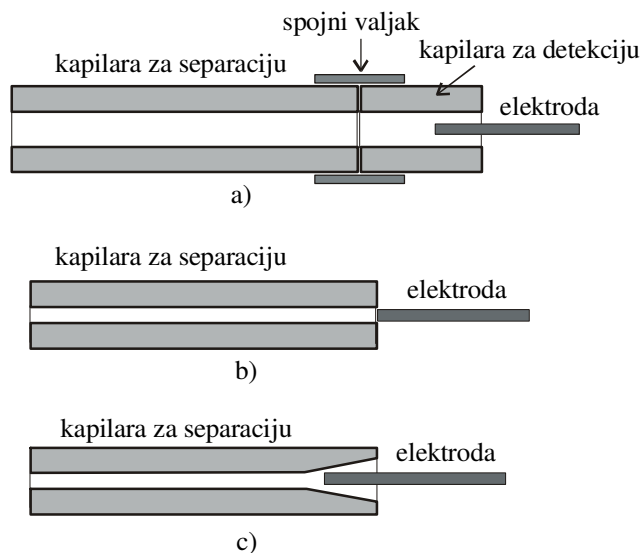
Za detekciju bez izvora svjetla rabi se detekcija temeljena na kemiluminiscenciji. To se obavlja u reakcijskom T nastavku na izlazu kapilare, u kojem se miješaju separirane molekulske vrste analita iz kapilare s otopinom katalizatora. Ovom metodom postiže se za dva do tri reda veća osjetljivost od one pri detekciji apsorpcijom. Velika osjetljivost u detekcije

² J. A. Taylor and E. S. Yueng, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1741.

³ K. Kitagishi, u: Ed. H. Shintani, J. Polosky, *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*, Blackie Academic and Professional, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 1992 str. 86.

proteina postiže se kemiluminiscencijom uz uporabu rodamin B izocijanata ili izomera R tetrametilrodamin izocijanoata⁴

Za detekciju elektrometrijskim metodama, elektrode (detektori) umeću se u kapilaru ili se postavljaju na samom izlazu kapilare. Rabe se amperometrijski, konduktometrijski i potenciometrijski senzori. Najširu primjenu nalaze amperometrijski senzori.



Slika 12.5. Načini detekcije primjenom elektrometrijskih detektora (senzora, elektroda); a) detekcija izvan separacijske kapilare u povezanoj kapilari za detekciju, b) detekcija osjetilom (elektroda) na kraju separacijske kapilare, c) poboľšana detekcija s osjetilom uvučenim u konično izbrušeni kraj separacijske kapilare

U elektrometrijskoj detekciji potrebno je smanjiti odnosno ukloniti učinak visokog električnoga polja separacije na rad elektrometrijskoga detektora. To se može učiniti spajanjem kraja kapilare s drugom, kratkom, kapilaram za detekciju (slika 12.5.a) Oko spoja dviju kapilara umeće se valjak od poroznog stakla, nafiona ili celuloznog acetata. Uklanjanjem ovog spoja u uzemljenu elektrolitnu otopinu, zbog električne vodljivosti spoja, prekida se električna veza između elektrokemijskog detektora i visokog napona separacijske kapilare.

Rabe li se u separaciji vrlo uske separacijske kapilare, onda se može detektor postaviti izravno na izlaz iz kapilare. Naime, zbog malog presjeka kapilare a time i male električne struje, smetnje za amperometrijski detektor zanemarive su (slika 12.5.b). Osjetljivost amperometrijske detekcije može se i povećati konusnim proširenjem izlaza kapilare (slika 12.5.c).

⁴ T. Hara, H. Nishida and T. Nakajima, *Anal. Sci.*, **10** (1994) 823.

Za elektrokemijsku pobudu amperometrijskog senzora najčešće se rabi impulsni naponski signal. U amperometrijskoj detekciji rabe se ultramikroelektrode od 10 μm karbonskog vlakna na izlazu iz kapilare unutarnjeg promjera od 25 μm . Električne smetnje struje separacije smanjuju se visoko impedancijskim mjernim uređajem.

Za konduktometrijsku detekciju primjenjuje se mjerenje u kapilari ili izvan kapilare. U mjerenju promjene vodljivosti u razdvojenim zonama molekularnih vrsta analita, veliku smetnju čini (velika) električna vodljivost separacijskoga pufera. Taj učinak može se smanjiti umetanjem tanke ion-izmjenjivačke membrane između kraja kapilare i ćelije za konduktometrijsku detekciju. Rabe se i ćelije s bifilarnim elektrodama postavljenim na izlazu kapilare.

U potenciometrijskoj detekciji električne smetnje zbog električnoga polja separacije mogu se smanjiti postavljanjem ion selektivne elektrode u konusno proširenje na izlazu kapilare (slika 12.5.c). Ovim načinom detektirane su koncentracije K^+ , Na^+ , Rb^+ , Ca^{2+} , dopamina i histamina u granicama 10^{-5} do 10^{-3} mol L^{-1} odnosno Br^- , I^- , NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- i silikat iona s graničnom osjetljivošću u određivanju ClO_4^- od $5 \cdot 10^{-8}$ mol L^{-1} (5 ppb).

Detekcijom s pomoću spektrometra masa mogu se, osim molarne mase, utvrditi i podaci o kemijskoj strukturi analita. Za detekciju spektrometrom masa sastojci analita razdvojeni u kapilari injektiraju se u spektrograf masa međusklopom koji povezuje kapilaru i spektrograf masa. Najčešće se to ostvaruje s pomoću elektrosprej (elektroraspršivača) ionizatora. Detekcijom s pomoću spektrometra masa može se utvrditi količina analita ispod 10^{-15} mola.

U kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi sastojaka analita rabe se dvije veličine signala odziva detektora. Prva je površina (ili visina) vrha (pika) koja upućuje na koncentraciju odnosno masu analita u separiranoj zoni. Mjerenjem visine ili površine pika utvrđuju se kvantitativni podaci o sastojku u ispitivanom uzorku.

Druga veličina jest vrijeme migracije pojedine zone. Slijed vrhova u signalu detektora upućuje na brzinu migracije pojedinog sastojka kroz kapilaru. Budući da brzina migracije a time i vrijeme migracije do prozora detektora ovisi o električnom naboju i veličini čestice pojedinog sastojka, vremenski slijed vrhova u signalu detektora upućuje na kvalitativni sastav analita. Zapravo upućuje na broj (broj vrhova) i vrstu (vrijeme migracije) sastojaka u ispitivanom uzorku analita.

U kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi u elektroforezi u kapilari uvijek se čini usporedba s poznatim molekularnim vrstama – standardima. Uz uvjet da je odziv detektora linearan, površina vrha upravo je razmjerna količini odnosno masi analita u zoni. Treba naglasiti da separirane molekularne vrste analita ne prolaze istom brzinom kroz detekcijski prozor kapilare. Molekule manje brzine migracije zadržavaju se dulje u prozoru detekcije (širina 0,1 do 0,5 mm) od onih s većom brzinom migracije. Stoga je integrirana površina

vrha (A_i) (pika) za sporije molekule veća, za istu koncentraciju analita, od one molekula veće brzine migracije. Stoga praktično izmjerene površine vrhova ne odgovaraju točno odnosu količina analita u vrpcama. U praksi se rabi tzv. korigirana površina vrha (A_k) iskazana relacijom:

$$A_k = A_i \frac{l}{t_m} \quad (12-12)$$

gdje su: l - efektivna duljina kapilare, t_m - vrijeme migracije zone odnosnog analita.

Budući da se elektroforezom u kapilari postiže iznimno visoka separacija sadržanih molekulskih vrsta, forezogram obično sadrži vrlo velik broj vrhova (pikova) odziva. Analiza forezograma praktično je moguća samo primjenom elektroničke obrade. Električni analogni signal detektora pretvara se analogno-digitalnim pretvornikom u digitalni električni signal. On se različitim matematičko-statističkim postupcima čisti od električnih smetnji i dalje rabi za kvantifikaciju pojedinačnog vrha u signalu odziva.

Metodama elektroforeze u kapilari mogu se, osim kvalitativne i kvantitativne analize, utvrditi i druge veličine karakteristične za određenu molekulsku vrstu. Tako se elektroforezom s izoelektričnim sabiranjem određuje vrijednost izoelektrične točke (pI) analizirane molekulске vrste.

U elektroforezi u kapilari ispunjenoj gelom ili linearnim polimerom može se utvrditi relativna molekulska masa na isti način kako se to čini u SDS-elektroforezi na gelu u obliku ploče.

Mogu se utvrditi konstante asocijacije i disocijacije u kojima je sastojak analita u interakciji s drugom vrstom (npr. kemijska ravnoteža slabe kiseline (ili slabe baze) i njezine konjugirane baze (kiseline), zatim razdioba sastojaka analita između micela i otopine, itd.

12.9. Primjena

Metode elektroforeze u kapilari primjenjuju se u analizi složenih, višekomponentnih analita u kojima se pojedini sastojci malo razlikuju u fizikalno-kemijskim svojstvima. Uzorak otopine za analizu ne smije sadržavati dispergirane krutine. U pravilu se otopina analita prethodno filtrira. Metoda elektroforeze u kapilari može zamijeniti rutinski rabljene metode elektroforeze na gelu za dokazivanje i identifikaciju biomakromolekula, navlastito proteina, a i nukleinskih kiselina, s podjednakom osjetljivošću.

Metoda se rabi u analizi aminokiselina, prirodnih proteina, humanih eritroproteina, sa SDS denaturiranih proteina, enzima, u analizi antitijela, peptida i peptidnih hormona; za studij interakcije između primatelja i liganda, enzima i supstrata, antitijela i antigena; u analizi nukleinskih kiselina; u analizi farmaceutika, antiastmatika, antibiotika, antikarcenozana, antidepresiva, antimigrena, analgetika, lijekova za bolesti srca, (kineskih) biljnih lijekova, biljnih otrova, farmaceutskih pripravaka na bazi proteina i peptida, u medicinskoj analizi hrane, lijekova i tvari (sastojaka) iz okoline.

Rabi se u separaciji i kvantifikaciji optičkih izomera (enantiomera) uporabom optičkih odabirača, u separaciji enantiomera u kapilari s micelama, u praćenju terapijskog učinka lijekova, u biokemijskoj analizi bioloških tkiva, seruma, plazme, urina i drugih bioloških tekućina, u analizi uobičajenih kliničkih testova, u analizi gena i sekvenciranju nukleinskih kiselina, u analizi mutacije gena i sekvenciranju deoksiribonukleinske kiselina (DNA), u analizi urina, krvi, sline i (tekućine) suza, u analizi toksina vezanih na rak i uremiju, u analizi metalnih iona, kelatnih i drugih kompleksa metalnih iona, u analizi drugih anorganskih kationa i aniona, u analizi organskih kiselina i organskih iona, u analizi komponenata sadržanih u hrani: saharida, aminokiselina, peptida i proteina, lipida i hormona, vitamina, drugih prirodnih sastojaka, lijekova, aditiva, toksina i degradacijskih produkata, u separaciji i detekciji ugljikohidrata. Rabi se također u separaciji i detekciji štetnih sastojaka u okolišu; ugljikovodika, fenola i derivata fenola, aromatskih i alifatskih amina, nitrozoamina, karbonila, ftalatnih estera, eksplozivnih spojeva, površinski aktivnih tvari, bojila i njihovih derivata, pesticida i herbicida, organo-metalnih spojeva, također u analizi sintetskih polimera na sadržaj nečistoća i ostataka monomera, u analizi veličine polimernih čestica, separaciji oligomera od homopolimera i kopolimera, za određivanja relativne molekulske mase visoko molekularnih polimera, za određivanje anorganskih polimera, u utvrđivanju kemijske kompozicije polimera te u studiju kinetike polimerizacije.

Primjena elektroforeze u kapilari nalazi sve širu primjenu, posljednja dostignuća dana su u pregledima i monografijama.

13. VISOKONAPONSKI IZVORI ZA ELEKTROFOREZU

U elektroforezi, za uspostavljanje električnog polja u separaciji makromolekulskih ionskih vrsta analita, rabe se električni visokonaponski istosmjerni izvori.

Istosmjerni naponi za klasičnu elektroforezu jesu do 3 000 V, a u elektroforezi u kapilari i do 35 000 V. To moraju biti izvori kojima se izlazni napon, jakost električne struje odnosno snage mogu precizno regulirati. Regulacija se ostvaruje primjenom nekog oblika *povratne veze* kojom se ustanovljuje promjena izlazne veličine te generira signal kojim se poništava promjena izlazne veličine i tako se izlazna veličina (napon, jakost el. struje ili snaga) održava na zadanoj vrijednosti.

Snaga električnih izvora rabljenim u klasičnoj elektroforezi jest do 400 W. U elektroforezi u kapilari, u kojoj su jakosti struje samo do 300 μA , snaga je izvora do 10 W.

Danas se za elektroforezu poglavito rabe izvori temeljeni na primjeni *visokofrekvencijskih pretvarača sa sklopnim načinom rada* (eng. Switchig Power Supplies).

Kod toga se ne primjenjuje transformacija mrežnog napona male frekvencije (50 Hz) na visoki napon i njegovo ispravljanje u istosmjerni napon, kao što se to ranije činjeno u tz. *linearnim izvorima*, nego se visoki izmjenični napon dobije transformacijom pravokutnog izmjeničnog napona visoke frekvencije (20-70 kHz), koji se prethodno dobije iz istosmjernog napona, primjenom sklopnih pretvarača.

U linearnih izvora snage veliki su gubici energije koja se pretvara u toplinu koja treba prikladnim hladilom odvoditi, potrebni su i transformatori velikih dimenzija i za regulaciju je potreban složeni elektronički sklop.

Primjenom pretvarača u sklopnom načinu rada, u suvremenim izvorima snage, ostvarena je veća korisnost djelovanja (manji gubici energije) i smanjena dimenzija i masa izvora. Primjenjuju se kao izvori snage u televizorima, računalima itd.

Kao izvor energije za rad visokonaponskog izvora rabi se sklop s mrežnim transformatorom, kojim se ulazni napon (220 V) transformira na niži izmjenični napon (oko 40 V). Ovaj se ispravlja i služi za napajanje pretvarača u sklopnom načinu rada i za napajanje niskonaponskih sklopova za regulaciju i vođenje cijelog izvora snage.

Ispravljanjem i filtracijom napona sa sekundara mrežnog transformatora dobiva se istosmjerni napon za napajanje pretvarača (≈ 50 V) i stabilizirani i regulirani istosmjerni naponi od ± 15 V za napajanje operacijskih pojačala u sklopovima za regulaciju i +5 V za napajanje digitalnog voltmetra.

U pretvaraču u sklopnom načinu rada istosmjerni napon se s pomoću sklopnih pretvarača pretvara u pravokutni izmjenični napon visoke frekvencije. Pravokutni izmjenični napon, kojem se trajanje impulsa može regulirati, uvodi se u primar visokonaponskog transformatora. Regulacijom širine naponskih impulsa poluperioda izmjeničnog napona izravno se regulira izlazni napon na sekundarima visokonaponskog transformatora, i to za pozitivnu i negativnu poluperidu ulaznog napona.

Promjenom izlaznog napona reguliraju se radna izlazna veličina izvora; napon ili jakost el. struje ili snaga.

Pretvorba istosmjernog napona u pravokutni izmjenični signal visoke frekvencije čini se s pomoću pretvarača sa sklopnom frekvencijom od 20 do 70 kHz. U pretvaračima se kao prekidni elementi rabe tranzistori s efektom polja (FET) odnosno bipolarni tranzistori s izoliranom upravljačkom elektrodom (IGBT) s kojima je postiže efikasnost pretvorbe veća od 90 %.

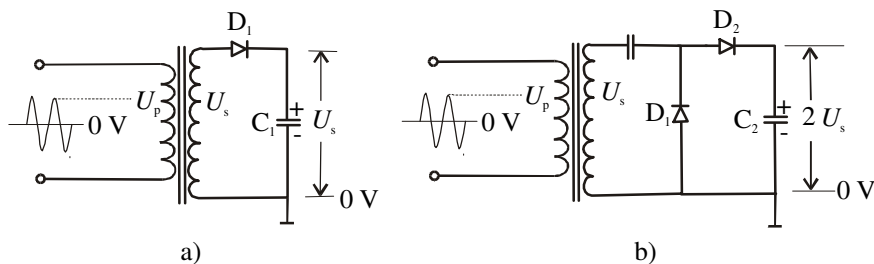
Izmjenični napon iz izmjenjivča s pomoću transformatora pretvara se u viši napon koji se zatim *ispravlja i filtrira*. Tako se čini kod izvora manjeg izlaznog napona do 3 000 V.

Kod izvora vrlo visokog napona (za elektroforezu u kapilari) nakon transformacije se izlazni napon *ispravlja i uvišestručuje* i nakon toga *stabilizira i filtrira*.

U elektroforezi u kapilari, u kojoj se rabi napon i do 35 000 V uz male jakosti električne struje, vrlo visoki izlazni napon dobiva se primjenom *naponskog uvišestručivača* (naponski multiplikator).

Naponski uvišestručivači električni su sklopovi (eng. Cockroft and Walton Circuit) koji izmjenični napon *ispravljaju i uvišestručuju* (multipliciraju). Ovim se sklopovima postiže vrlo visoki istosmjerni naponi bez upotrebe visokonaponskih transformatora. Izmjenični se napon sa sklopom uvišestručivača može *ispraviti i udvostručiti, učetverostručiti* itd.

Shematski prikaz naponskog udvostručivača pokazuje slika 13.1.b.

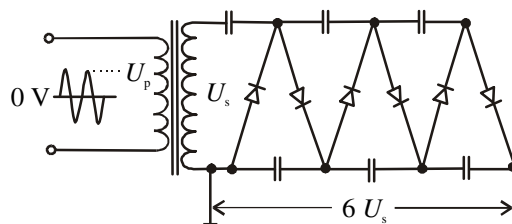


Slika 13.1. Poluvalni ispravljač (a), poluvalni naponski udvostručivač (b)

Sastoji se zapravo od dva poluvalna ispravljača. Djelovanje udvostručivača napona možemo razumjeti analizom rada poluvalnog ispravljača. Naime, narinemo li izmjenični napon na poluvalni ispravljač (u seriji spoj diode i kondenzatora) spajanjem na sekundar transformatora (slika 13.1.a), kondenzator C_1 će se, u poluperiodi pri kojoj je dioda D_1 vodljiva, električki nabiti na napon koji odgovara *vršnom* naponu (U_s) te poluperiode. Zadržat će taj napon i u poluperiodi suprotnog predznaka u kojoj dioda D_1 ne vodi. Tako na kondenzatoru imamo stalni istosmjerni napon jednak vršnom naponu poluperiode ulaznog izmjeničnog napona pri kojem je dioda D_1 vodljiva.

U udvostručivaču napona imamo dva poluvalna ispravljača. U poluperiodi pri kojoj je dioda D_1 vodljiva kondenzator C_1 će se električki nabiti na napon vršnog napona poluperiode. U periodu suprotnog predznaka dioda D_1 ne provodi, ali struju provodi dioda D_2 i kondenzator C_2 će se električki nabiti na napon koji je *dvostruko* veći od vršnog napona izmjeničnog ulaznog signala. Naime, napon koji se javlja na kondenzatoru C_2 jednak je zbroju (stalnog) napona na kondenzatoru C_1 i vršnog napona (druge) poluperiode. Tako će na kondenzatoru C_2 biti istosmjerni napon koji je dvostruko veći od vršnog napona poluperiode izmjeničnog ulaznog signala. Dakle sklop na slici 13.1.b ispravlja i udvostručuje vršni napon poluperiode ulaznog izmjeničnog signala. To je naponski poluvalni udvostručivač.

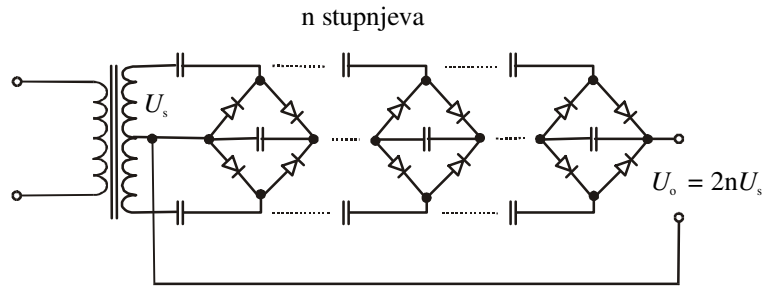
Slijednim povezivanjem većeg broja udvostručivača napona dobijemo *uvišestručivače* napona. Na slici 13.2. shematski je prikazan ušesterostručivač napona koji čine tri u seriju povezana puluvalna udvostručivača.



Slika 13.2. Poluvalni multiplikator s tri stupnja umnožavanja

Izlazni napon tog sklopa ispravljeni je i ušesterostručeni vršni napon poluperiode ulaznog izmjeničnog napona.

Punovalni multiplikator čini se sklopom u seriju vezanih punovalnih udvostručivača kao što shematski pokazuje slika 13.3. Poluvalni odnosno punovalni naponski multiplikatori izrađuju se uporabom visokonaponskih dioda i visokonaponskih kondenzatora.

Slika 13.3. Punovalni naponski uvišestručivač s n stupnjeva umnožavanja napona

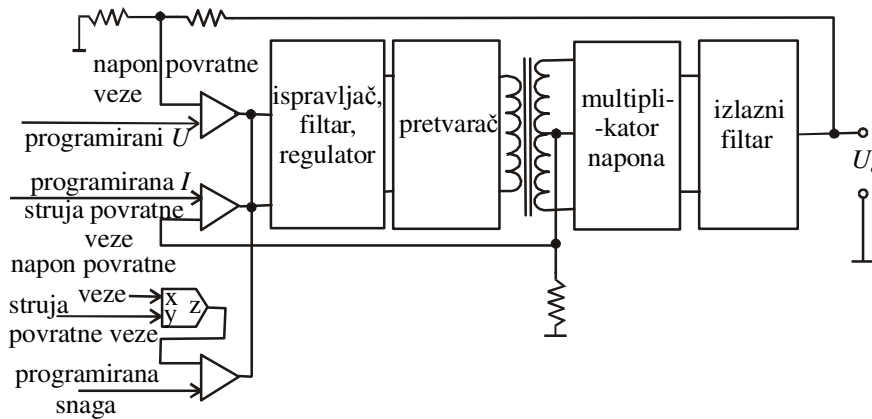
Vrlo visoki istosmjerni napon izvora za elektroforezu u kapilari postiže se primjenom poluvalnog ili punovalnog uvišestručivača.

Dio izvora visokog napona (do 35 000 V) građen je analogno onom za klasičnu elektroforezu (do 3 000 V). Naime, najprije se izmjenični mrežni napon transformira zatim ispravlja i filtrira na istosmjerni napon. Taj ispravljeni i stabilizirani istosmjerni napon izvor je energije za slijedeći stupanj u kojem se istosmjerni napon s pomoću *pretvarača* pretvara u pravokutni izmjenični napon visoke frekvencije. Taj dio izvora sadrži i upravljački dio s kojim se regulira izlazni napon iz pretvarača temeljem signala povratne veze sa senzora kojima pratimo izlaznu veličinu napona ili struje ili snage izvora.

Transformacija pravokutnog izmjeničnog napona iz pretvarača na viši napon (do 6 kV) čini se s pomoću visokonaponskog transformatora. U naponskom multiplikatoru taj izlazni izmjenični napon ispravlja se i multiplicira na željenu vrijednost izlaznog napona izvora.

Izlazni napon iz naponskog uvišestručivača se, zbog sadržanih električnih šumova i valovitosti u amplitudi, filtrira s pomoću električnih filtara (sklopovi zavojnica i kondenzatora).

Regulacija izlaznog napona kojim se kontrolira radni napon elektroforeze ili jakost električne struje koja teče ćelijom odnosno snaga utrošena u elektroforezi čini se usporedbom izlazne veličine izvora, koju ustanovljujemo s pomoću naponskog (djelitelj napona) odnosno strujnog (otpornik) mjernog osjetila (vidi sliku), prema namještenim (programabilnim) vrijednostima napona ili struje. Snaga se regulira istovremenim praćenjem vrijednosti izlaznog napona i izlazne struje izvora. Njihov umnožak uspoređuje se s programiranom vrijednosti snage. Regulacija i kontrola izlaznih veličina čini se s pomoću računala s kojim se biraju i programiraju željene vrijednosti izlazne veličine, tj. izlazni napon ili jakost el. struje odnosno snaga. Temeljem razlike između programirane vrijednosti i vrijednosti signala povratne veze s pomoću električnog sklopa *pojačala greške* mijenja se izlazni napon pretvarača, zapravo širina impulsa pravokutnog izmjeničnog napona i tako postiže željena vrijednost izlazne veličine izvora.



Slika 13.4 Načelna shema visokonaponskog izvora do 35 000 V za elektroforezu u kapilari

Treba naglasiti da se uvijek mijenja *izlazni napon izvora* koji osigurava određen radni napon ili određenu jakost električne struje odnosno električnu snagu primijenjenu na elektroforetsku ćeliju (trošilo).

Izvori snage za elektroforezu mogu se priručno učiniti i uporabom, na tržištu dostupnih, DC/DC pretvarača koji u plastikom zalivenom kućištu (modulu) sadrže pretvarač, visokonaponski transformator i naponski multiplikator. Sklopovi se napajaju istosmjernim naponom iz vanjskog izvora. Izlazni su im naponi od nekoliko volta do 30 kV i snage do 30 W. Izlazni napon može se regulirati primjenom povratne veze s pomoću uobičajenih sklopova s operacijskim pojačalima kojima se upravlja radom ugrađenog pretvarača.

Komercijalni izvori za elektroforezu sadrže uklopni odnosno isklompni sat kojim se može regulirati tijekom rada izvora, npr. trajanje procesa elektroforeze odnosno prijelaz na određeni režim kontrole izlazne veličine.

Primjerice, proces elektroforeze može se činiti na početku uz kontrolu napona a zatim, kroz određeno vrijeme, uz kontrolu jakosti struje i sl.

Uobičajeno ugrađeni digitalni voltmetar pokazuje programirane vrijednosti izlazne veličine izvora.

U izradi i primjeni visokonaponskih izvora veliku pozornost treba usmjeriti na opasnosti koje za korisnika može uzrokovati visoki napon, koji može biti i letalan.

Komercijalni izvori uvijek sadrže i sklopove kojim se automatski vrlo brzo (u vremenu od 0,5 ms), isključuje rad izvora u slučaju strujnog preopterećenja (kratki spoj). Pod djelovanjem ugrađenih optičkih senzora izvor se ne može uključiti u slučaju kada kontaktne utičnice elektroforetske ćelije nisu spojene na izvor odnosno ako je elektroforetska ćelija otvorena i tako dostupna na dodir korisnika.

VAŽNIJE KNJIGE S PODRUČJA ELEKTROFOREZE

1. A.T. Andrews, Electrophoresis, theory techniques and biochemical and clinical applications, Clarendon Press, Oxford, 1986.
2. R. Westermeier, Electrophoresis in Practice, Sec. Ed., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997.
3. H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, Capillary Electrophoresis, Methods and Potentials, F. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mGH, Braunschweig/Wiesbaden, 1996.
4. H. Shintani and J. Polonský Eds., Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Blackie Academic & Professional, An Imprint of Chapman & Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1997.
5. Hoefer Protein Electrophoresis Applications Guide, 1994.
6. R. H. Maurer, Disk-Electrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Electrophorese, W de Gruyter, Berlin, 1968.
7. R. A. Mosher, D. A. Saville, W. Thormann, The Dynamics of Electrophoresis, VCH Weinheim, 1992.
8. B. A. Baldo, E. R. Tovey Ed., Protein blotting, Methodology, Research and diagnostic Applications, Karger, Basel, 1989.
9. A. Chrambach, The practice of quantitative gel electrophoresis, VCH Weinheim, 1985.
10. D. Rickwood, B. D. Hames, Gel electrophoresis of nucleic acids, IRL Press Ltd, 1982.
11. G. Rothe, Electrophoresis of Enzymes, Springer Verlag, Berlin, 1994.
12. H. Wagner, E. Blasius, Ed., Praxis der elektrophoretischen Trennmethoden, Springer Verlag, Heidelberg, 1989.

Popis simbola

A	površina
A_i	integrirana površina vrha
A_k	korigirana površina vrha
C	maseni udio umrežala u odnosu na ukupnu masu monomera i komonomera u gelu
c_i	koncentracija pojedine molekulske vrste
D	difuzijski koeficijent molekulske vrste
$d(\text{pH})/dx$	gradijent pH medija
$du/d(\text{pH})$	brzina promjene električne pokretljivosti makromolekule prema promjeni pH u području izoelektrične točke
E	jakost električnog polja
F	Faradayeva konstanta
g	ubrzanja sile teže
I	ionska jakost otopine
I	jakost električne struje
J	gostoća električne struje
K_a	uvjetna konstanta ravnoteže kiseline
K_b	uvjetna konstanta ravnoteže baze
K_R	koeficijent usporavanja
L	duljina kapilarne cijevi
l	prevaljeni put čestice
l	efektivna duljina kapilare
l_m	duljina uzduž osnovne crte u forezogramu od točke injektiranja analita do sjecišta vertikale povučene od signala odziva (vrh) pojedini sastojka analita do osnovne crte forezograma
m	mobilitnost, vrijednost puta iskazana u mm
m_o	slobodna mobilitnost
$m_{o,r}$	relativna slobodna mobilitnost
M_r	relativna molekulska masa
N	broj teorijskih tavana
pH	negativni logaritam brojčane vrijednosti koncentracija (mol L^{-1}) vodikovih iona
pI	izoelektrična točka, pH pri kojem je efektivni električni naboj molekulske vrste nula
pK _a	negativni logaritam brojčane vrijednosti uvjetne konstante ionizacije kiseline

q	efektivni električni naboj elektroforetske jedinice
q_d	naboj u difuznom dijelu dvosloja
r	radijus
R	opća plinska konstanta
R	električni otpor
T	termodinamička temperatura
T	ukupna masena koncentracija monomera i komonomera u gelu
t	vrijeme trajanja
t_m	vrijeme migracije zone odnosnog analita
U	uspostavljeni radni električni napon elektroforeze
u_{ef}	elektroforetska pokretljivost molekulske jedinice
u_{eo}	elektroosmotska pokretljivost otopine
v	brzina migracije čestice
$w_{1/2}$	širina pojedinog vrha u polovici njegove visine
z_i	nabojni broj pojedine vrste iona u otopini
Δh	razlika u visina razina otopina na ulazu i izlazu kapilare
ρ	gustoća otopine
ε	permitivnost odnosno dielektričnost otopine
η	viskoznost elektrolitne otopine
ζ	zeta odnosno elektrokinetički potencijal

Predmetno kazalo

A

2-aminooctena kiselina (glicin)	23
adsorpcija čestica	7
agar	27
agarozni gel	16
amediol, 2-amino-2-metil-1,2-propandiol	125
amfoliti	106
amfoterna molekulska vrsta	22
amfoterni pufer	105
amino središta	21
amperometrijski senzori	155
Ampholine	106
analit	22
anionski oblik makromolekula	49
ANS, anilinaftalen sulfonat	33
antigen	80
antigenska determinanta	80
antiserum	80
antitijelo–antigen kompleks	80
apsorbancija	35
apsorpcija elektromagnetskog zračenja	31
automatska naprava za analizu DNA	100
autoradiografija	39

B

BAC, N,N'-bisakrilcisteamin	19
bakterijska razgradnja proteina	56
bazni proteini	22
baždarni pravac	60
bifilarne elektrode	156
biološki aktivne tvari	32
Bis, N,N'-metilen-bis-akrilamid	17

blokiranje veznih mjesta	45
bojenja makromolekula	31
bojenja s organskim bojilom	136
bojenje etidium bromidom	34
bojenje koloidima	46
bojenje srebrom	32, 136
bojila	31
bojilo (Coomassie® Blue R250)	32
bojilo amido crno 10B	32
bojilo Xylene Cyanino Brilliant G	32
boraks	23
Brij 35, neionski deterdžent	68
broj teorijskih tavana	145
brzina difuzije	23
brzina migracija	6

C

celulozni acetat	13
CHAPS, 3-[(3-kolamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propan sulfonat	68
Coulombove sile	3
CPC, cetilpiridinium klorid	68
CTAB, cetiltrimetilamonijev bromid	68
CyDTA, cikloetilendiamintetraoctena kiselina	148

D

DATD, N,N'-dialiltartardiamid	19
deaciranje	27

- deamidizacija22
- debljina difuznog sloja.....3
- Debye-Hückelov model4
- Debyeova duljina4
- dekstran.....113
- dekstran, plavi.....7
- denaturacija.....57
- denzitogram39
- denzitogram36
- denzitometar35
- detekcija fragmenata DNA100
- detekcija i kvantifikacija31
- detekcija i kvantifikacija
radiometrijom...39
- detekcija imunoprecipitata.....91
- detekcija spektrometrom masa156
- detekcijski prozor.....154
- detektor temperature123
- deterdženti.....67
- DHEBA, N,N'-(1,2-dihidroksi-
etilen) bisakrilamid.....19
- dideoksinukleozid trifosfat..... 98
- difuzni naboj142
- diskontinuirana elektroforeza47
- disulfidna veza54
- DNA polimeraza98
- DNA, deoksiribonukleinska
kiselina..34
- DOC, deoksikolat.....68
- DTT, ditiotreitol.....67
- dvodimenzijaska elektroforeza .129
- dvojna unakrsna
imunoelektroforeza ...86
- dvostruka uzvojnica DNA34
- E
- EDIA, etilendiakrilat.....19
- EDTA, etilendiamintetraoctena
kiselina..148
- efektivna brzina migracija51
- efektivna električna
pokretljivost ...49
- efikasnost razlučivanja.....145
- elektroforetsko obezbojivanje34
- električna neutralnost otopine.122
- električna otpornost23
- električna pokretljivost9
- električna provodnost otopine.....5
- električna sila2
- električna snaga5
- električni dvostruki sloj3, 141
- električni otpor medija.....5
- električni visokonaponski
istosmjerni izvori. .159
- električno polje1, 2
- elektrode1
- elektrode
od karbonskog vlakna...156
- elektroforetska ćelija.....6
- elektroforetska pokretljivost...3, 6
- elektroforetska zona.....50
- elektroforetski unos analita.....133
- Elektroforeza nukleinskih
kiselina..93
- elektroforeza putujućih zona.....14
- elektroforeza s pulsirajućim
električnim poljem..96
- elektroforeza u kapilari139
- elektroforeza u kapilari
s elektrolitom i micelama...152
- elektroforeza u kapilari
s izoelektričnim sabiranjem.149
- elektroforeza
u protočnoj otopini...11
- elektroforeza, teorijske osnove ...1
- elektroforeza
u otopini na nosaču.13
- elektrokemijska detekcija154
- elektrokemijski dvosloj.....3
- elektrokinetički potencijal ..4, 141
- elektrokinetičko ubrizgavanje.143
- elektrometrijska detekcija.....155
- elektroosmotski tok.....7, 81, 142
- elektroosmoza7, 79
- elektroseparacija82
- elektrosprej ionizator156
- etidium bromid94

F

Fergusonov prikaz.....	58
fluorografija	39
fluorescentna detekcija	154
fluorescentni obilježivači.....	33
fluorescentno (vidljivo) zračenje..	38
fotokemijska polimerizacija.....	19
fotomultiplikator	154
fotopolimerizacija	54
"fused rocket" elektroforeza.....	84

G

Gaussova krivulja raspodjele..	145
Gel Bond film®	43, 111
gel od agaroze	79
gel s gradijentom poroznosti.....	61
gel za nagomilavanje	47, 49
GelBond PAG film®	29, 73
gelovi sa stabilnim i reproducibilnim gradijentom poroznosti..	64
geometrijski oblici gela.....	15
glicinat ion	49
glikoprotein.....	21
Gouy-Chapmanov difuzini sloj...3	
gradijent električnog polja ..50, 51	
gradijent gustoće	63
gradijent jakosti el. polja.....	95
gradijent konc. vodikovih iona	103
gradijent napona.....	123
gradijent pH	103
gradijent temperature	6
granična veličina pora.....	61
granulirani gel.....	113
granulirani gel dekstrana.....	132
gustoća električne struje.....	6
gustoća naboja.....	69

H

Helmholtzov kompaktni sloj.....	3
---------------------------------	---

hidratizirani ioni	3
hidrodinamički radijus.....	79
hidrodinamičko ubrizgavanje .	143
hidrofilni linearni polimeri.	148
histoni	24
horizontalna naprava za elektroforezu .	133

I

identifikacija varijeteta	56
Immobiline Dray Plates®	110
imobilini.....	110
imobilizirajuća membrana	41
imobilizirani puferi	105
imonoifikacija	93
imunoanalitičke tehnike.....	80
imunodifuzija.....	81
imunoelektroforeza, metoda polaganjem...89	
imunoelektroforeza, metoda s intermedijarnim gelom ..	90
imunoelektroforeza.	79
imunoglobulini.....	80
imunoprecipitacija	80
imunoprecipitat	81
ion selektivne elektrode	156
ionska izmjena	7
ionska jakost otopine	4
ionske vrste	9
izoelektrična točka	21, 104
izoelektrične membrane.....	114
izoelektrično sabiranje	103
izoelektrično sabiranje za preparativne svrhe ..	113
izotahoforeza	119
izotopi radioaktivni obilježivači	39
izvori električne snage	7

J

jakost električnog polja.....	6
jažica.....	26

K

kapacitet pufera.....	23
kapacitet vezanja.....	45
kapacitet vezanja boje.....	38
kapilara za detekciju	155
karboksilna skupina	21
kationska i anionska skupina	21
kationski kompleksi	76
kationski oblik makromolekula	51
kemijski modificirani papir.....	46
kemiluminiscencija	155
keramičke lađice	133
kiralni selektori	148
ključna dijagnoza	56
kloniranje DNA molekula.....	98
koeficijent odjeljivanja, (partition coefficient) ..	152
koeficijent razdiobe.....	152
koeficijent usporavanja	58
Kohlrauschova relacija	119
Kohlrauschove granice	50
komonomer	18
konduktometrijski senzori.....	155
konformacija molekula	70
kontaktne vrpce, PaperPool® ..	73, 132
konvekcija.....	6, 7, 13
kovalentna umreženost	17
kritična micelarna koncentracija .	152
kruna eteri	148
krvna plazma.....	80
kvantifikacija denzitometrijom .	35
kvantifikacija skenerom.....	39
kvantifikacija videokamerom....	39
kvarcne kapilare	139

L

laser.....	36
limunska kiselina	23
linearni el. izvori	159
linijska imunoelektroforeza	87

lipoprotein.....	21
longitudinalna difuzija u kapilari ..	145
Lubrol W, neionski deterdžent .	68
lucit	27

M

malonska kiselina.....	23
membranski proteini	76
micelarna elektrokinetička kromatografija..	152
micele.....	152
migracija proteina u ovisnosti o pH..	116
migracijski put	5
mobilitet, iskazan duljinom prijedenog puta .	58
mobilitet, relativna	58
modifikacija unutarnje površine kapilare..	143
molarni omjer sastojaka pufera.	49
molekularno sito	7, 24, 49
molekule s konstantnom gustoćom naboja .	69
monokromatsko svjetlo.....	36
monomer	18
mravlja (metan) kiselina	23
mukopolisaharid	21

N

Na-dietilbarbiturat (veronal).....	23
nagomilavanje.....	14, 47
naprava za horizontalnu SDS-elektroforezu .	74
naprave za bojenje i obezbojivanje gela .	33
naprave za elektroforezu u gelu	26
nepomični pH gradijent	110
neprozirni gel	25
neradiokativne sonde	45
neutralni hidrofilni polimeri ...	143
nisko molekularni polipeptidi ...	24

- nitroceluloza45
 nukleotid trifosfat.....98
- O
- obezbojivanje gela difuzijom....35
 obilježavanje makromolekula
 radioaktivnim izotopima ..34
 obilježavanje fluorescentnim
 tvarima ..33
 octena kiselina.....23
 odbojivanje31
 određivanje relativne
 molekulske mase .57
 Ohmov zakon5
 OPA, o-ftaldialdehid.....33
 opća plinska konstanta4
 optička detekcija154
 optička gustoća35
 optički filter36
 optički put143
 organski modifikator.....143
 oslobođena toplina5
 oštrenje zone123
 oštrina razdvojenih vrpca6
- P
- PAGE, polyacrylamide
 gel electrophoresis ..21
 Parafilm®27
 peptidi21
 peroksidni inicijator19
 Pharmalyte®106
 pobuda UV-svjetlom.....34
 početnice (klice, eng. primer) ...98
 pojačalo greške162
 pokazno bojilo.....54
 poliakrilamid.....17
 poliakrilamidni gel.....17
 poliimid.....139
 polimerizacija.....27
 kompleksne čestice68
 potenciometrijski senzori155
- povratna veza159
 površinska koncentracija7
 površinski aktivne tvari.....143
 prateći, slijedni, ioni119
 pravokutni izmjenični napon ..160
 pretkoncentriranje analita143
 prijenos difuzijom.....41
 prijenos elektroforezom43
 prijenos kapilarnim
 protokom otopine pufera..42
 prijenos makromolekula iz gela 41
 prijenos tlačenjem.....43
 prijenos u polusuhim uvjetima..44
 prijenosni amfoliti.....105
 priprava gela
 s gradijentom poroznosti..62
 prirodni naboj
 molekule proteina .57
 prividni broj teorijskih tavana.145
 prostorna umreženost.....58
 proteini21, 67
 proteini u anionskom obliku48
 proteini, markeri36
 Proteome analiza.....129
 protuion.....123
 protusmjerna
 imunoelektroforeza ..90
 protutijela, antitijala.....80
 pufer.....22
 purifikacija proteina.....115
 PVDF, polivinildenfluorid45
- R
- računalo za prikupljanje, obradu
 i prikaz izmjerenih veličina. 36
 radioaktivne sonde45
 radioaktivni izotopi.....98
 radioizotopi velike energije40
 radioizotopi manje energije40
 ravnine naboja.....50
 razdvajanje u drugom stupnju.134
 razdvajanje u prvoj dimenziji .129
 razmakni elektrolit.....122

razvojno stablo evolucije56
 reakcije vizualizacije.....45
 redukcijska sredstva54
 regulirajuća funkcija119
 relativna pokretljivost39
 Repel Silane[®],
 hidrofobno sredstvo ..29, 73
 reproducibilnost injektiranja ...144
 rezolucija razdvajanja6, 23
 riboflavin.....19
 RNA, ribonukleinska kiselina...34
 «rocket» metoda (Laurell)..... 83
 rodamin B izocijanat.....155

S

scintilacijski brojač39
 scintilacijsko zračenje40
 scintilatori40
 SDS, natrijev dodecilsulfat67
 sekvencija DNA.....97
 selektivna izmjene pufera74
 selektivno nagomilavanje55
 Sephadex113
 separacijske zone48, 51
 separacijski gel.....22, 49, 51
 sila trenja.....2, 4
 silanolne skupine (-SiOH)141
 slijedni, prateći, ioni.....50
 specifični afinitet vezanja bojila36
 specifični volumen proteina.....60
 Stokesov radijus61
 Stokesov zakon4
 strukture molekula proteina68
 sudbena (forenzička) znanost....56
 sulfohidrilno umrežavanje21

T

TEMED, N,N,N',N'-
 tetrametiletildiamin ..19
 teorija putujućih granica52

termalna konvekcija.....54

termičko otporni

 bakterijski enzimi..56
 termodinamička temperatura4
 Tiseliusova ćelija9
 titracijske krivulje proteina.....116
 toplinski vodljiva keramika133
 Tris, tris-hidroksimetil
 - aminometan ..23, 125
 Triton X-100,
 neionski deterdžent .68
 Tween 80, neionski deterdžent .68

U

učvršćivač31
 učvršćivanje, fiksiranje31
 umreživalo18
 unakrsna imunoelktroforeza....85
 unutarjni standard70
 urea54
 ustaljeno stanje4, 50

V

Van der Waalsova veza32
 vanjska Helmholtzova ravnina ...3
 veličina *C*18
 veličina molekula.....57
 veličina pora17
 veličina *T*18
 viskoznost otopine6, 142
 visokofrekvencijski pretvarači
 sa sklopnim načinom rada .159
 višefazni pufer47, 52
 vodeći ioni50, 119

Z

zeta potencijal3, 4, 142
 zwitter ioni.....21, 48