

Gelelektroforese

FORSIDE / UNDERVISNINGSMATERIALE / GYMNASIALE PROJEKTER / GENTEKNOLOGI / GELELEKTROFORESE

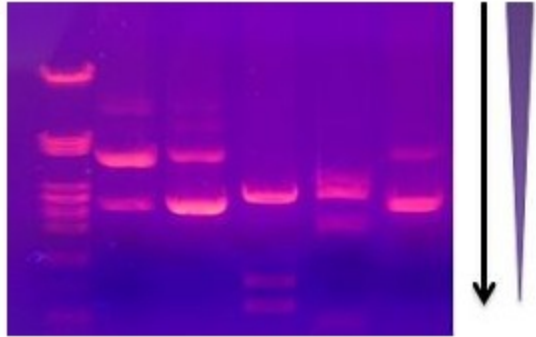
Denne underside hører til Biotech Academy's gymnasie projekt **Moderne Genteknologi**

Gelelektroforese

Gelelektroforese: Adskillelse af DNA eller protein

Gelelektroforese er en adskillesesteknik, der kan bruges til at separere forskelligt DNA eller protein i en gel. Det g r det bl.a. muligt forholdsvis præcist at måle enten antallet af basepar i en DNA-prøve eller længden af forskellige proteiner.

Adskillelse af forskellig DNA og proteiner er også nyttigt til oprensning fra en prøve. Fx kan man mindske risikoen for at bruge fejldannet DNA ved gensplejsning med DNA, man selv har fremstillet, hvor der samtidig er blevet dannet andre længder DNA end det korrekte; man adskiller simpelthen de forskellige længder og skærer den rigtige længde ud af gelen. Gelelektroforese bruges derfor ofte på flere forskellige stadier i udviklingen af en ny genmodificeret organisme.



Figur 28. Resultat af gelelektroforese med DNA. Hver lodrette bane er en DNA-prøve, der er løbet fra toppen mod bunden. DNA'et er adskilt i de forskellige længder i lysende bånd, så de korteste er løbet længst ned gennem gelen. (Foto: [Mnolf](#), [GFDL](#)).

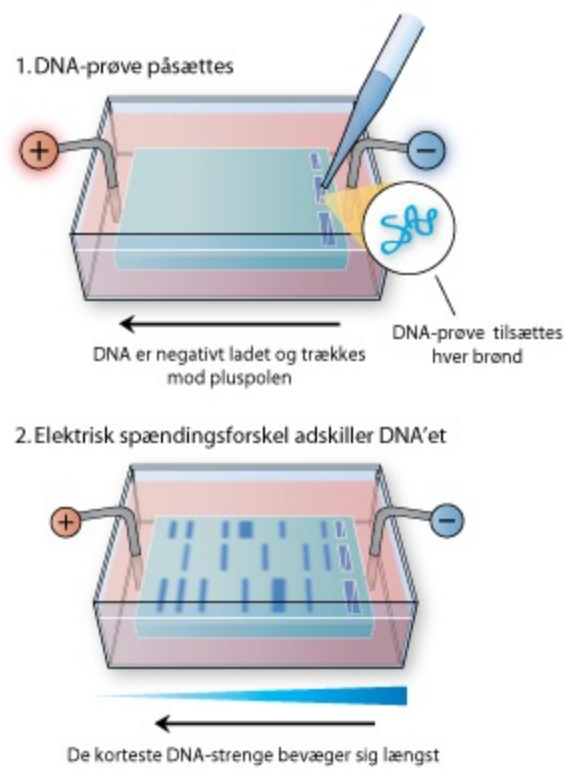
Adskillelse af DNA

I gelelektroforese af DNA udnyttes den negative ladning, som DNA har, til at adskille DNA af forskellig længde i en prøve. Den negative ladning stammer fra fosfatgrupperne i hvert nukleotid af DNA'et. De geler, der bruges, er faste og gennemsigtige. De støbes ud fra en opl sning af nogle særlige molekyler fx agarose.

DNA-prøven tilsættes i en brønd (fordybning) for enden af en gel, og der tilsluttes derefter elektrisk spændingsforskel. Herved skabes en frastødende negativ pol ved DNA-prøven og en tiltrækkende, positiv pol i den anden side af gelen (figur 29). DNA'et vil altså nu trække gennem gelen mod den positive side. De mikroskopiske huller i gelen g r bevægelsen sværere for DNA'et, jo længere det er. Derfor l ber de korte DNA-molekyler hurtigere igennem end de længere.

Efter en gelelektroforese vil DNA'et derfor ligge sorteret i forskellige bånd efter antal basepar (alle, der er 600 basepar, ligger fx lige oven i hinanden).

Flere forskellige stoffer kan gøre DNA'et synligt for fotografering. Ofte brugt er ethidiumbromid, som binder sig til DNA'et, der herved bliver synligt i ultraviolet lys, som bruges ved fotograferingen af den færdige gel. Man kan køre flere prøver ved siden af hinanden i en gelelektroforese, hvor den yderste typisk vil være en mark r, der indeholder nogle allerede kendte længder, så man kan sammenligne med prøverne.



Figur 29. Princippet i DNA gelelektroforese, hvor de forskellige st relser DNA adskilles i en gel. Gelen ligger i et kar med en buffer-væske.

Adskillelse af protein: SDS-PAGE og pI

Gelelektroforese af protein bruges til at adskille forskelligt protein, fx efter proteinernes længde.

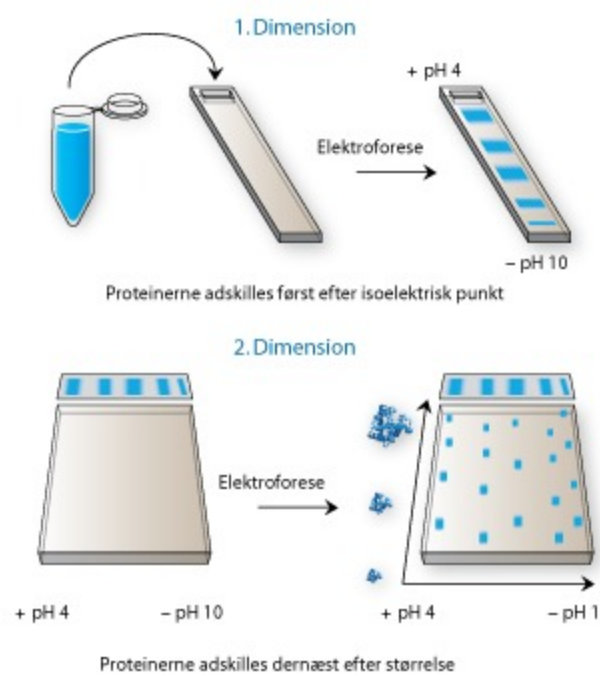
Modsat DNA har proteiner ofte meget indviklede tredimensionelle strukturer, der derfor vil være afgørende for, hvor hurtigt de forskellige proteiner bevæger sig igennem gelens mikroskopiske huller. For at kunne bestemme længden, skal det imidlertid kun være proteinernes længde, der afg r hastigheden, og man foretager derfor en **denaturering** af proteinet med SDS (natriumdodecylsulfat). I denatureringen udfolder SDS-molekylerne proteinet og binder sig jævnt langs det. Da SDS er et negativt ladet molekyle, f r hver proteink de en negativ ladning svarende til dens længde. Den nye, negative ladning overdøver i styrke klart en evt. positiv ladning, som proteinet havde inden. Dermed resulterer SDS-behandlingen i et udfoldet protein, hvis længde kan måles.

Man bruger en polyakrylamid-gel (PAGE) til gelelektroforese af protein, men princippet er det samme som ved DNA-gelelektroforese: En negativ og positiv elektrisk pol driver proteinpr ven gennem gelen, og hastigheden gennem de mikroskopiske huller afhænger af proteinets længde. Derfor opnår man en l ngdeafh ngig adskillelse, som giver sig til syne, n r proteinerne til slut farves. St relsen af proteiner opgøres gerne i kDa (kilodalton), som svarer til massen i kilogram af et **mol** af proteinet.

Adskillelse ved isoelektrisk punkt pI

Proteiner har andre forskellige egenskaber, som kan bruges til at sortere og adskille dem i en gelelektroforese.  n er deres isoelektriske punkt (pI), som er den pH-værdi, hvor proteinets amino-syrer samlet set vil være neutrale i ladning. Hvis pH i opl sningen kommer under dette punkt, bliver der flere positive ladninger end negative på proteinet, og proteinet vil fremstå positivt. Modsat bliver proteinet samlet set negativt, hvis opløsningens pH kommer over pI.

Man kan adskille forskellige proteiner efter deres pI-værdi i en gel, hvor pH-værdien på langs gradvist stiger fra lav til høj. I den lave pH-ende sætter man en positiv elektrisk pol, og i den høje pH-ende en negativ pol. For n r et protein befinder sig ved pH-værdier over dets pI, er det som nævnt negativt i samlet ladning, og det vil derfor automatisk drive mod dets pI-værdi (der jo er i retning mod den positive pol og lavere pH-værdier). Denne drivning vil fortsætte, lige indtil proteinet n r den pH, der er lig dets pI-værdi. Ved denne pH er dets samlede ladning nul, og proteinet ligger derfor stille, upåvirket af elektrisk tiltrækning! Dermed vil proteinerne altså langsomt placere sig på den position i gelen, hvor pH er lig dets pI.



Figur 30. Princippet i en 2D elektroforese af protein, hvor proteinerne først adskilles i 1. dimension efter deres isoelektriske punkt og dernæst i 2. dimension efter deres st relse med SDS.

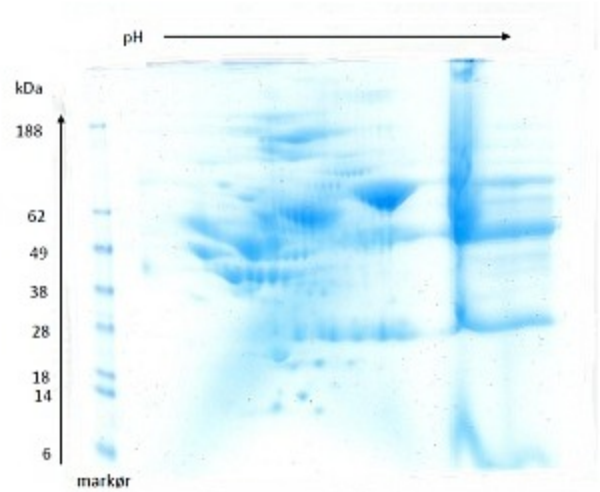
I en 2D gelelektroforese kan man adskille en proteinpr ve efter både pI og længde. På den ene led af gelen adskiller man først efter pI-værdi, og n r proteinerne er sorteret efter det, vender man gelen og tilsætter SDS, så de nu på den anden led kan blive adskilt efter længde (figur 30 og 31).

Resultatet er således en gel med prøvens forskellige proteiner principielt spredt ud over hele gelen. Hvis to forskellige proteiner i prøven fx havde samme pI-værdi og derfor ikke blev adskilt efter denne egenskab, er det sandsynligt, at de har forskellig længde og derfor vil blive adskilt på den anden led.

Eksempler på brug af gelelektroforese:

Gelelektroforese er meget ofte brugt i arbejde, hvor DNA eller protein håndteres eller synliggøres. Den anvendes fx ved:

- Southern blotting (DNA)
- Western blotting (Protein)
- Restriktionssk ring
- PCR



Figur 31. 2D gelelektroforese af proteiner fra humant blodplasma. Proteinerne er på horisontalt led adskilt efter isoelektrisk punkt (pH) og på vertikalt led adskilt efter st relse (kDa). Gel fra Institut for Systembiologi, DTU.