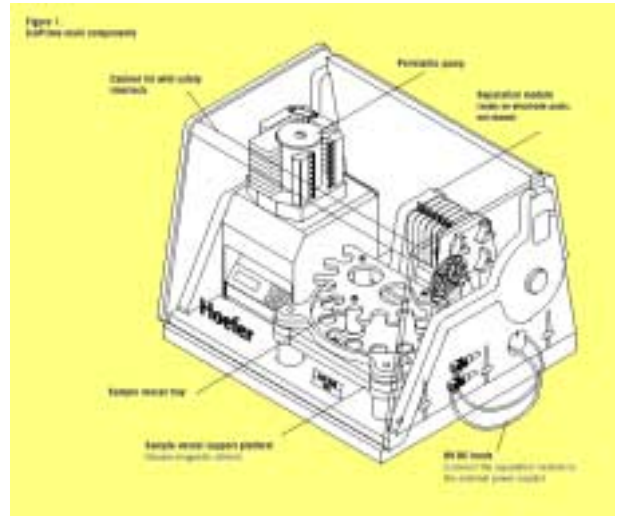


# Izoelektrická fokusace

1. Úvod
2. Popis přístroje
3. Přípravná purifikační fáze
4. Příprava isoelektrických membrán
5. Systematické stanovení pI
6. Purifikace
7. Postup měření



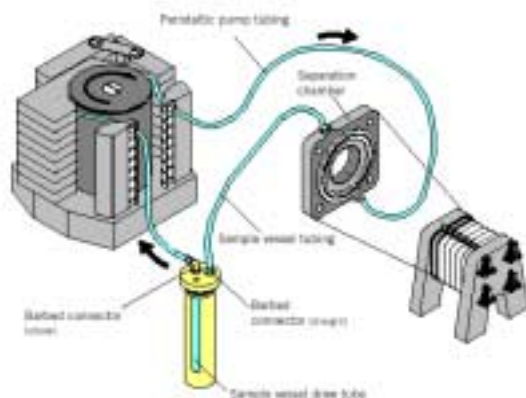
**PI 8 IsoPrime™ multikomorová elektroforetická jednotka** je integrovaný systém pro preparativní protein purifikace s využitím PriME – principu.

**PriME** ( Preparative Isoelectric Membrane Electrophoresis) poskytuje vysoké rozlišení isoelektrické fokusace na imobilizovaných pH gradientových gelech.

**PriME** – je jednoduchá technika, která isoelektricky čistí proteiny v roztoku. Gely, obsahující imobilizovaný pH gradient, mohou být tvořeny kopolymerizací akrylamidu s různými akrylamidovými pufrů. Protože je pufr kovalentně vázán na gel, nosiče jako jsou amfolyty, nejsou vyžadovány k udržení pH-gradientu. Se správným výběrem pufrů a jejich objemů, lze separovat na gelech proteiny lišící se pI o 0,005pH-jednotku.

## Základní části přístroje:

- separační modul
- cirkulační systém
- bezpečnostní obvod



Obr. Separační a cirkulační systém

### *Přístroj je schopen analyzovat:*

- isoformy proteinů o stejné molekulární hmotnosti
- degradační a modifikované produkty proteinů
- proteiny s molekulární hmotností < 300kD

### *Limity přístroje:*

- k rozpuštění proteinů nepoužívat roztoky solí
- stabilní enzymy v daném pH – prostředí
- proteiny s molekulární hmotností >300kD neprocházejí

### *Přípravná purifikační fáze:*

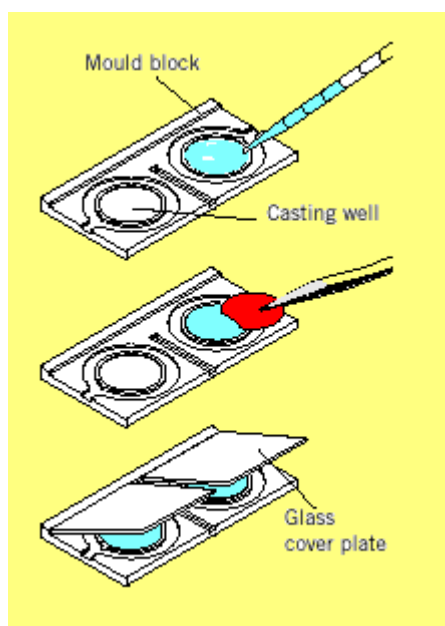
- odsolení vzorku
- stabilizace proteinu v roztoku

CHAPS	1-2%
CHAPSO	1-2%
Digitonin	1-2%
NP-40	1-2%
Tween 20	1-2%
Zwittergent	1-2%
b-Octyl glucosid	1-2%
N-Octyl-b-D-glycopyranoside	1-2%
Urea	až 8M
Tetramethyl urea	až 6M
Sorbitol/Mannitol	až 40%
Glycerol	5-40%
Ethylene glycol	5-40%
Propylene glycol	5-40%
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	až 40%

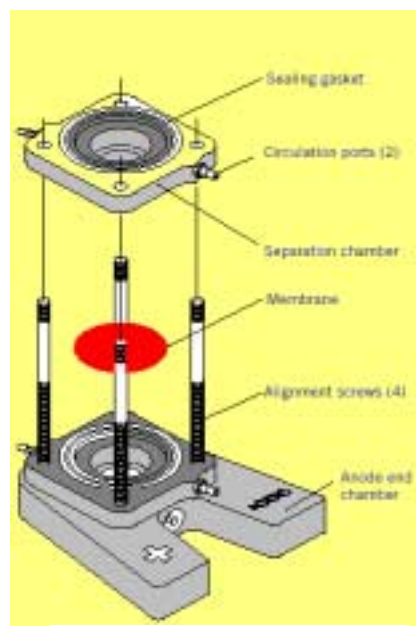
Obr. Rozpouštějící reagenty

### *Příprava isoelektrických membrán*

Ideální pH membrán je takové, kdy je hodnota pI proteinu nejvíce vzdálená od hodnot pH sousedních membrán. K tvorbě membrán o různém pH se používají akrylamidové pufrы o různém pK.



Obr. Tvorba membrán



Obr. Vložení membrány

## **Promytí přístroje**

- 30ml vody do všech nádobek
- startovní proud je 10mA a klesá
- startovní napětí je 500-900V a roste

## **Postup měření:**

1. provést purifikaci konvenčními metodami
2. odsolit vzorek
3. rozpustit protein
4. stanovit pI proteinu
5. vybrat membrány o vhodném pH
6. připravit isoelektrické membrány
7. spustit měření