

Poliakrilamid gélelektroforézis

1. Mi a szerepe a bisz-akrilamidnak a gélben? (rövid leírás)

Keresztkötő ágens, azaz a hosszú poliakrilamid láncok között **hidak (cross-link)** képződnek, és **térhálós szerkezetű gél** jön létre. (A **PÓRUSMÉRET SZABÁLYOZHATÓ** EZZEL!) Az elektroforézis során a fehérjéket ebben a gélben vándoroltatjuk. A **gél mechanikus tulajdonságai függnék a mennyiségétől**.

További haszna, hogy nem zavarja a fehérjék detektálására szolgáló festési reakciókat, valamint kompatibilis a legtöbb puffer rendszerrel.

2. Milyen részekre bontható az akrilamid gél és azokban (röviden) hogyan viselkednek a minták? (2 rész - 2 magyarázat)

1. **koncentráló/tömörítő gél:** fehérjék vándorlása **felgyorsul**, míg el nem érik az **ionokban gazdag klorid-ion frontot**. Itt a fehérjék **sebessége csökken**, a front mögött **összetorlódva, vékony sávban vándorolnak** a futtató gél felszínéig.
2. **szeparáló/futtató gél:** a fehérjék **különböző fajlagos töltésük** miatt **eltérő sebességgel** vándorolnak, ezzel szeparálhatók.

3. Mi a szerepe a futtatópufferben található SDS-nek? (1)

Szétcsavarja, denaturálja a fehérjéket és **méretarányosan kötődik hozzájuk**, lehetővé téve, hogy az elektroforézis során a fehérjék **szeparálódása csak a méretüktől** függjön.

4. Mi a szerepe a futtatópufferben található Trisnek? (2)

- ezzel lehet **pufferelni**, feladata **állandó értéken tartani a pH-t**.
- **vezetőképességet** biztosít mert só → ionokra bomlik.

5. Mi a szerepe a Laemmli pufferben a glicerinnek? (1)

A glicerin azért szükséges a pufferbe, hogy a **minta lesüllyedjen a zsebekbe**.

6. Gyakran használunk agaróz gél is elektroforetikus elválasztásra. A mai gyakorlaton miért nem ezt alkalmazzuk? (1 fontos ok)

A fehérjék esetében **szükséges a poliakrilamiddal létrehozható jóval kisebb pórusméret**. Az agarózt **DNS-fragmensek elválasztására** alkalmazzuk.

7. Mi a leggyakrabban használt festék, amit a mintához adunk? (1)

Brómfenolkék

8. Mi a leggyakrabban használt festék, amivel futás után megfestjük a gél? (1)

Coomassie Brilliant Blue R 250

9. Milyen lépései vannak a fehérjeminta előkészítésének? (2 fontos)

- **inkubáljuk 95°C-on**
- néhány percig **jégen** inkubáljuk
- **-20°C-on** tároljuk

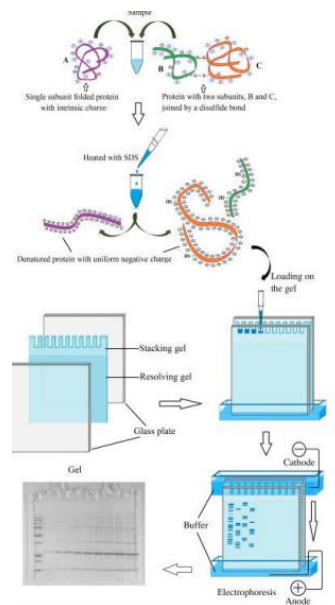
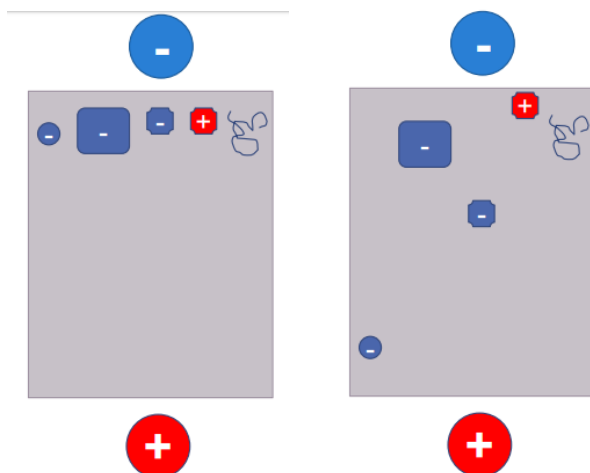
10. Miért fontos, hogy a fehérjéket denaturáljuk a futtatáshoz? (rövid leírás)

A denaturáció során a **fehérjék letekerednek** és **azonos töltést vesznek fel**, így csak a **tényleges méret alapján** választódnak szét (**töltés és globularitás nem befolyásolják az elektroforézist**).

11. Miért lehet előnyös a natív gélelektroforézis? (rövid leírás)

Ha az elektroforézist **nem denaturáló közegben**, **alacsony hőmérsékleten** végezzük, számos **enzim megőrzi natív szerkezetét** és így **enzimaktivitását, kötési kialakítására való képességét**, amik alapján ezek a **gélben specifikusan kimutathatók** és szétválaszthatók (ezt nevezzük általában **natív PAGE-nak**).

12. Sematikusan ábrán szemléltesse a gélelektroforézis elvét! (ábra)



13. AC/DC? Miért? (indokkal)

Egyenáramot kapcsolunk a gélre. Ennek hatására a **kationok az elektronfelesleggel rendelkező, negatív kád felé** vándorolnak és **ott redukálódnak**, míg az **anionok az elektronhiányos, pozitív töltésű anód felé** vándorolnak és **ott oxidálódnak**

14. Miért szükséges a gél a futtatás után festeni, amikor már a futtatópufferhez is adtunk festéket? (rövid leírás)

Azért, hogy **futtatás után látható legyen a fehérje**. A festék **hozzáköt a fehérjéhez**, és a mi célunk, hogy **lehetőleg az összes fehérjét kimutassuk a gélben**. A **futtató pufferhez adott festék a futási frontot jelzi, gyorsabb a gélben mint a fehérje**.

15. Mit nevezünk létrának? Miért van rá szükség? (rövid leírás)

Kell egy **sztenderd fehérje sorozat**, mely **gélelektroforézis alatti viselkedését ismerjük** → **referenciaként** szolgál. Ez alapján **becsülhetjük a fehérjénk méretét**. Erre előre gyártott **fehérjelétrák** állnak rendelkezésünkre.

16. Mi EGFP-vel dolgozunk, amiről tudjuk, hogy zöld. Mit történik az EGFP oldat színével a folyamat során? Soroljuk fel, milyen színeket látunk! (össz. 4 a zölddel együtt)