

6. Gelelectroforese

6.1 Inleiding

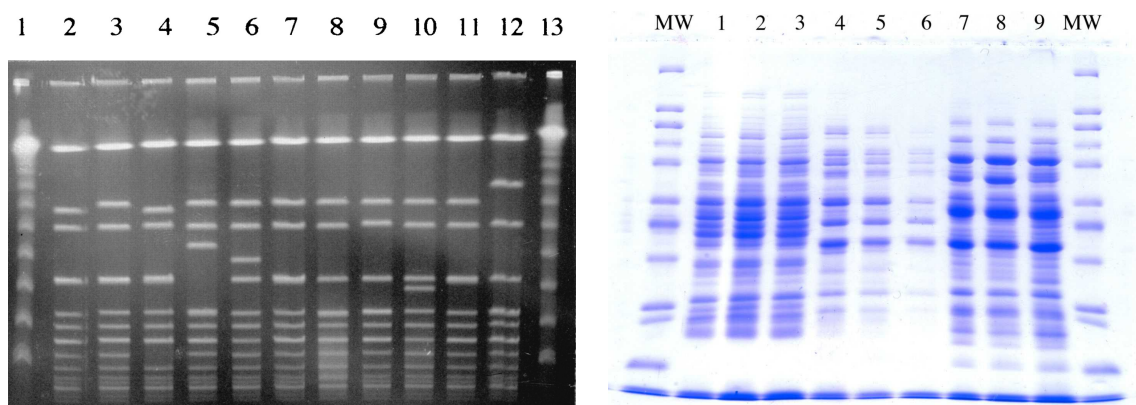
Zonder twijfel een van de meest gebruikte analysemethoden voor biologische mengsels is electroforese. Bij deze techniek worden componenten (DNA/RNA-moleculen, eiwitten) van elkaar gescheiden door middel van een elektrisch veld. Scheiding gebeurt meestal op basis van grootte en/of lading, maar soms ook op complexere criteria zoals structuur. Na scheiding is eventueel verdere analyse mogelijk (meestal met *blotting*-technieken). Electroforese vindt meestal plaats in een gel-medium. Twee belangrijke toepassingen van deze gelelectroforese zijn analyse van DNA en identificatie van eiwitten.

Waarschijnlijk de meeste bekende toepassing van gelelectroforese is het maken van DNA profielen in forensisch onderzoek. Hierbij worden minieme hoeveelheden DNA afkomstig van bijvoorbeeld haren, huidcellen of sperma vermeerderd met behulp van een PCR (*polymerase chain reaction*). Vervolgens wordt het DNA in fragmenten van verschillende lengte geknipt met restrictie-enzymen. Deze fragmenten worden voorzien van een kleurstof en gescheiden met gelelectroforese. Het resulterende patroon is uniek voor ieder individu, en kan dus gebruikt worden om aan te tonen of het gevonden DNA toebehoort aan de verdachte van een misdrijf. Of om te controleren wie de biologische ouders van een kind zijn.

In het recente verleden werden ook DNA-sequenties nog handmatig uitgeplozen met behulp van gelelectroforese. Tegenwoordig is dat proces deels geautomatiseerd met de komst van DNA-sequencers, maar ook deze werken intern nog steeds op basis van electroforese.

Een andere belangrijke toepassing is de identificatie van eiwitten. Bijvoorbeeld antistoffen of prionen in bloed, om te kijken of mensen of dieren besmet zijn (geweest) met bepaalde ziekteverwekkers. Bovendien kan het 'eiwitbeeld' van het bloed informatie geven over in welk ziekte-stadium iemand zich bevindt. Tenslotte is gelelectroforese belangrijk voor identificatie van eiwitten in metabolische processen, en wordt het veel gebruikt als *protein purity assay*.

In deze proef zullen we kennis maken met een van de meest gebruikte vormen van gelelectroforese, SDS-PAGE. We zullen deze techniek gebruiken voor een relatief eenvoudige toepassing, om de molecuulmassa van de eiwitten uit proef 5 te bepalen.



Figuur 6.1 Links een DNA-profiel van *Staphylococcus aureus* bacteriën, geïsoleerd uit vijf verschillende infectie-sites (rijen 2-11, in duplo). Rechts een SDS-PAGE eiwit-profiel van drie verschillende soorten melkzuur-bacteriën (in triplo). In beide profielen heeft links en rechts een rij met marker-moleculen meegelopen. *Uit:* Booth et al. (2001) en Piraino et al. (2002).

6.2 Achtergrond en theorie

Principe

Letterlijk betekent elektroforese het voortbewegen van deeltjes door elektrische kracht. In een elektrisch veld zullen negatief geladen deeltjes zich bewegen richting de positieve pool (de anode), en positieve deeltjes zich bewegen richting de negatieve pool (de kathode). De snelheid van beweging neemt toe met de lading van de deeltjes en de sterkte van het veld. Dit levert ruimtelijke scheiding op basis van lading: verschillend geladen deeltjes bewegen met verschillende snelheden, hun onderlinge afstand neemt dus geleidelijk toe. Afhankelijk van het medium waarin de deeltjes zich bewegen kan grootte en vorm (structuur) ook van invloed zijn op de bewegingssnelheid.

DNA-ketens zijn in principe negatief geladen vanwege hun negatief geladen fosfaat-deoxyribose 'ruggengraat'. Bij eiwitten is het wat ingewikkelder, aangezien deze zijn opgebouwd uit aminozuren die zowel positief als negatief geladen kunnen zijn. Bovendien is de lading van deze aminozuren ook afhankelijk van pH. Dit komt doordat ieder molecuul een zogenaamd *isoelectrisch punt* (pI) heeft, de pH-waarde waarbij de netto lading van het molecuul nul is. Als de pH lager is dan de pI van een eiwit dan wordt het positief geladen door binding van H^+ -ionen. Als de pH hoger is dan de pI dan wordt het eiwit negatief geladen, omdat het H^+ -ionen kwijtraakt aan de omgeving.

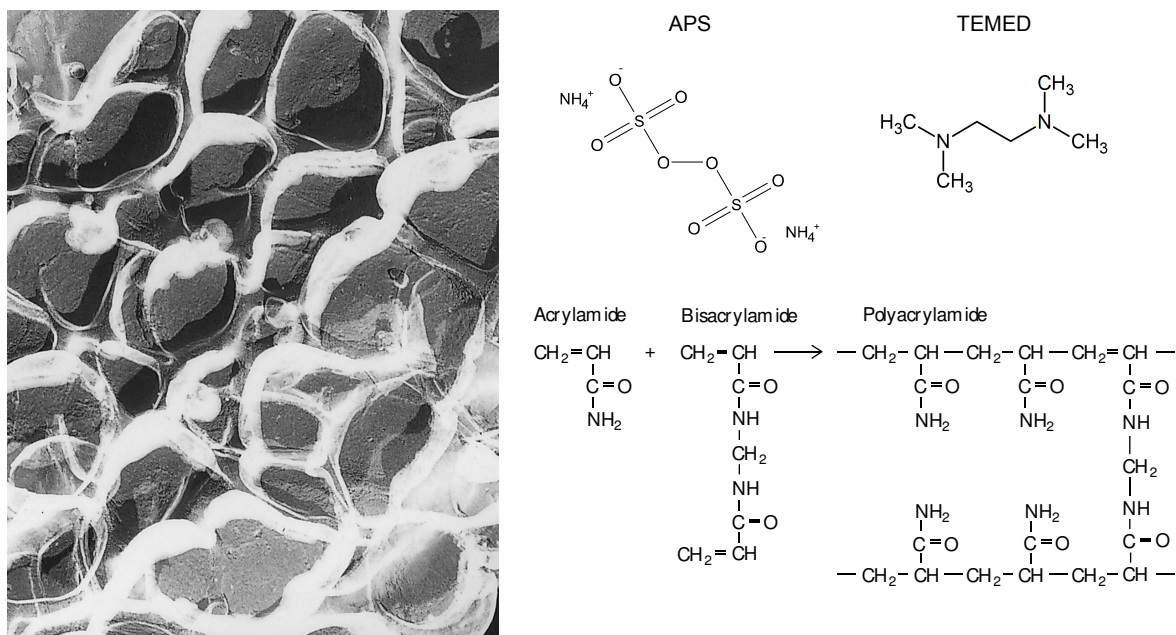
Lading van moleculen in een elektrisch veld is de drijvende kracht bij elektroforese, maar afhankelijk van het medium kunnen andere factoren ook de snelheid van het molecuul beïnvloeden. In het geval van een gel-medium bewegen geladen moleculen zich door een netwerk van ketens, een soort moleculaire zeef. Bij lange 'staafvormige' moleculen zal de migratiesnelheid dus ook afhangen van de lengte van het molecuul.

Naast lengte is ook de secundaire, tertiaire en quaternaire structuur van invloed op de snelheid. Als we macromoleculen enkel willen scheiden op lading en/of grootte dan moeten de moleculen eerst gedenameerd worden. Verhitting, toevoeging van detergens en/of toevoeging van een sterke reductor zorgen ervoor dat ketens van DNA en eiwitten ontvouwen worden en dat eventuele complexen uiteenvallen in subunits.

Medium

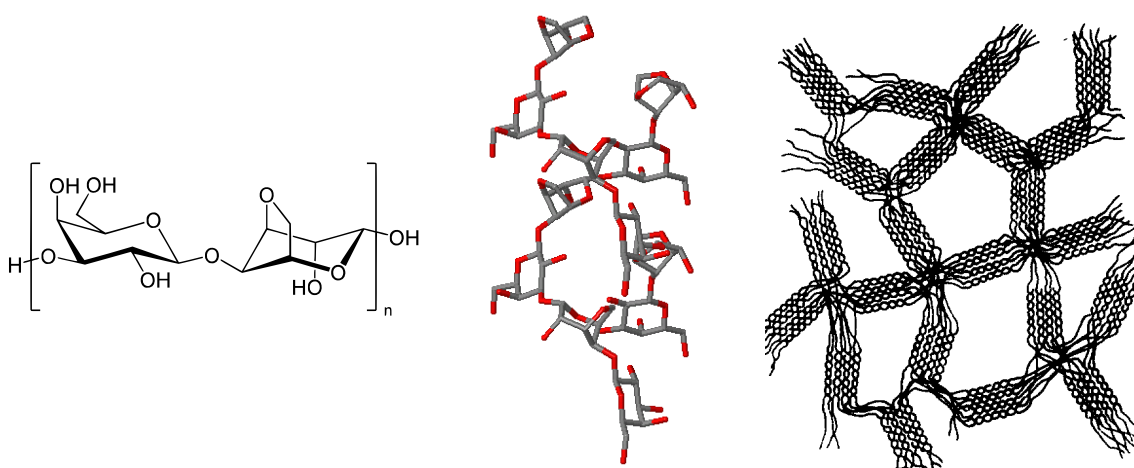
Het medium moet ervoor zorgen dat moleculen zich kunnen voortbewegen met voldoende verschillende snelheden, zodat een goede scheiding plaatsvindt. Het moet vast genoeg zijn, zodat de moleculen niet meteen diffunderen, maar ook poreus zodat ze zich wel kunnen bewegen. De eerste gelelectroforese methodes vanaf ongeveer 1930 gebruikten gel op basis van sucrose als medium, en vanaf de jaren '50 ook gel op basis van zetmeel. In 1959 werden polyacrylamide-gels geïntroduceerd, en vanaf de jaren '70 worden ook agarose-gels gebruikt, met name voor DNA.

Polyacrylamide-gel wordt het meest gebruikt als medium voor eiwit-elektroforese. Het bestaat uit acrylamide-ketens, die kruislings verbonden zijn door methyleenbisacrylamide ("bis") moleculen. Polymerisatie van de gel wordt op gang gebracht door toevoeging van APS (ammonium persulfaat, een sterke radiacaalvormende oxidator) en TEMED (tetramethylethyleendiamine, nodig als katalysator). De voordelen van acrylamide-gel zijn dat het hitte-bestendig is en dat de grootte van de poriën tot op zekere hoogte te regelen is door de verhouding acrylamide (3-30%) ten opzichte van bisacrylamide te variëren. Meer acrylamide betekent dat er relatief minder crosslinks zijn, dus de poriën zullen dan kleiner worden. Het grootste nadeel van acrylamide is dat het giftig is: het is een sterk neurotoxicum en bovendien licht carcinogeen.



Figuur 6.2 Links een *Transmission Electron Microscope* (TEM) foto van de structuur van polyacrylamide-gel. Rechts de sterke oxidator ammonium persulfaat, de katalysator TEMED, en de polymerisatie van acrylamide en methyleenbisacrylamide.

Bij polyacrylamide-gel is de maximale grootte van de poriën beperkt, bij minder dan ongeveer 3% acrylamide zou de gel namelijk vloeibaar worden. Voor elektroforese met kleine DNA-fragmenten wordt acrylamide wel gebruikt, maar voor DNA-moleculen zwaarder dan 200 kDa wordt meestal agarose gebruikt als medium. Dit is een natuurlijke polysaccharide dat onderdeel uitmaakt van agar, het materiaal waarop ook bacteriën gekweekt worden. Het werd oorspronkelijk gewonnen uit rode zeewieren van de familie *Rhodophyceae*, maar wordt tegenwoordig synthetisch geproduceerd.



Figuur 6.3 Agarose (links) is een suiker-polymeer, en vormt onder normale omstandigheden een dubbele helix (midden, PDB: 1aga). Agarose-gel bestaat uit dikke, gekoppelde bundels van agarose-helices, schematisch weergegeven in het figuur rechts. In realiteit kunnen deze bundels 10-10000 dubbele helices per bundel bevatten.

Kleuring

Voor het bepalen van hun positie op de gel moeten macromoleculen na (of soms voor) elektroforese zichtbaar gemaakt worden. Dit gebeurt meestal met behulp van kleuring (*staining*). Voor DNA moleculen wordt traditioneel de (kankerverwekkende) kleurstof ethidium bromide gebruikt, die sterk fluorescent wordt na binding aan DNA. Voor eiwitten wordt meestal Coomassie Brilliant Blue gebruikt (zie proef 5). Echter, als eiwitten fluorescent zijn, of gebonden zijn aan fluorescente markers dan kunnen ze uiteraard ook direct zichtbaar gemaakt worden zonder kleuring. Voor het volgen van de voortgang tijdens elektroforese, en voor het maken van een ijklijn erna, zijn kant-en-klaar gekleurde marker-moleculen (ijkeiwitten) verkrijgbaar met een bekende molecuulmassa.

Voor kleuring met Coomassie Brilliant Blue wordt de gel na elektroforese enige tijd (10-30 minuten) in een oplossing gelegd van 0.1% Coomassie in 40% methanol en 10% azijnzuur. De eiwitbandjes kleuren hierbij blauw, echter de gel helaas ook. De gel moet dus weer ontkleurd worden met met 40% methanol en 10% azijnzuur, waarna de bandjes zichtbaar worden.

Technieken voor eiwitscheiding

Isoelectric Focusing (IEF) is een elektroforese-techniek waarbij moleculen enkel gescheiden worden op lading. Bij eiwitten wordt de lading vooral bepaald door de relatieve aanwezigheid van zure (Asp, Glu) versus basische (Arg, Lys, His) aminozuren. Scheiding gebeurt door het aanleggen van zowel een elektrisch veld als een pH gradiënt over de gel. Bij de anode (+) heerst een lage pH. Deze is beneden het isoelectrisch punt (pI) van eiwitten. Hierdoor zijn alle moleculen positief geladen, en bewegen ze zich richting de kathode (-). Naarmate de moleculen dichterbij de kathode komen neemt de pH toe, en dus neemt de lading van het eiwit af. Zodra de bereikte pH gelijk is aan de pI van een bepaald eiwit zal de lading neutraal worden en het molecuul dus niet verder bewegen.

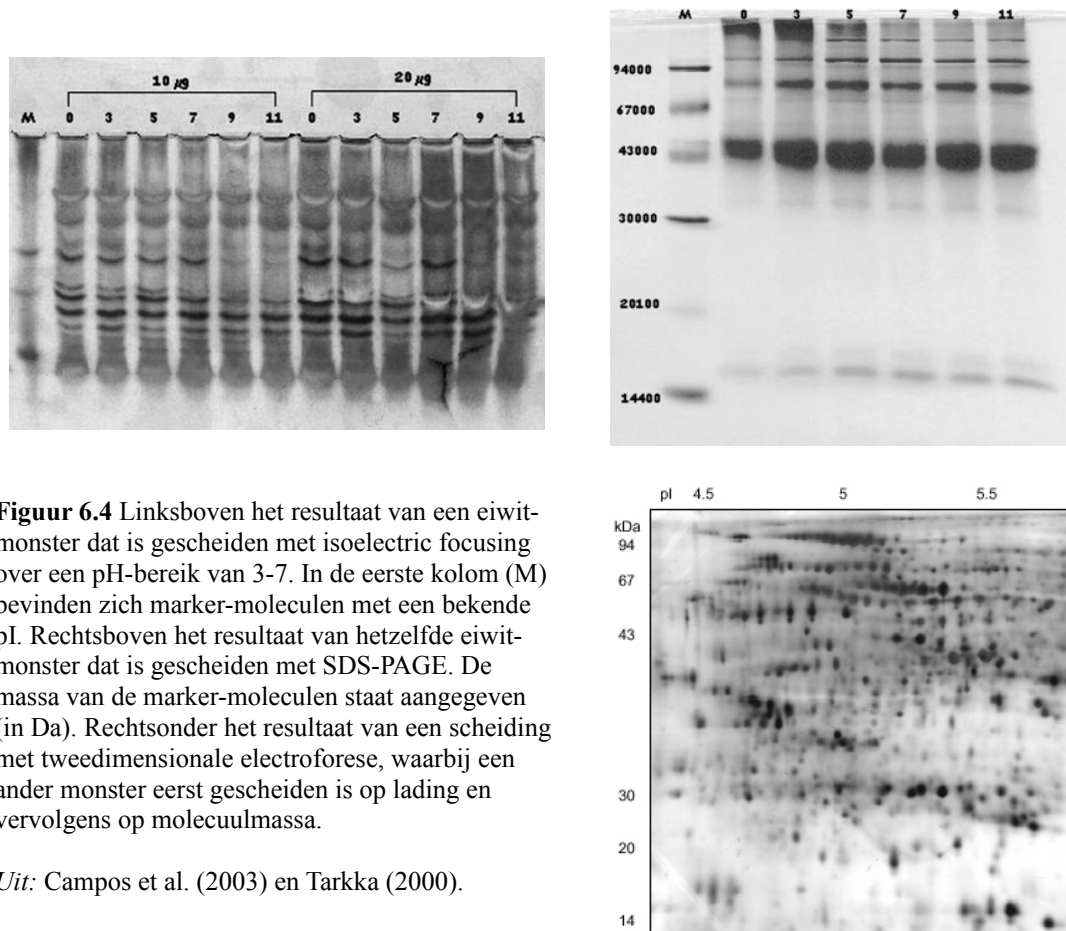
SDS-PAGE is een elektroforese-techniek waarbij moleculen enkel gescheiden worden op grootte (massa). De term staat voor *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*. SDS is ook wel bekend onder de naam natrium lauryl sulfaat. Het is een van de meest gebruikte detergentia (aniogene oppervlakte-actieve stoffen) en komt voor in allerlei huishoudelijke producten zoals zeep, shampoo, tandpasta en scheerschuim. Toevoeging van SDS aan een eiwit-oplossing zorgt voor denaturatie (het ontvouwen van de tertiaire eiwit-structuur). Bovendien bindt SDS aan eiwitten in een min of meer vaste verhouding (ongeveer 1.4 g SDS per gram eiwit), waardoor de eiwitten een negatieve lading krijgen evenredig met hun grootte. Vaak wordt naast SDS nog een sterke reductor toegevoegd, bijvoorbeeld DTT (ditiotrietol). Dit wordt wel *reducing SDS-PAGE* genoemd. DTT zorgt voor verdere denaturatie van de eiwitten door het verbreken van zwavelbruggen (disulfidebindingen).

Native PAGE is een term die veel gebruikt wordt voor polyacrylamide gelelektroforese bij een vaste pH en zonder toevoeging van SDS of DTT. Hierbij blijven de tertiaire structuur en eventuele complexen van het eiwit dus in principe intact. Dit maakt verdere analyse mogelijk na scheiding, bijvoorbeeld met behulp van enzymen of immunoassays. Scheiding gebeurt op basis van zowel grootte als structuur, en moet worden uitgevoerd bij een hoge pH (> 8.0) zodat alle eiwitten negatief geladen zijn.

Tweedimensionale gelelektroforese (2-DE) is een combinatie van twee van de hierboven beschreven technieken. In de eerste stap worden eiwitten gescheiden met bijvoorbeeld isoelectric focussing of met native PAGE. In de tweede stap wordt meestal SDS toegevoegd en worden de eiwitten gescheiden op grootte. De richting van de tweede scheiding is loodrecht op de eerste, dus de uiteindelijke tweedimensionale positie op de gel geeft een unieke combinatie van eigenschappen weer (bijvoorbeeld lading en grootte of structuur en grootte).

Bij **gradiëntgelen** varieert percentage acrylamide over de gel. Hierdoor neemt de grootte van de

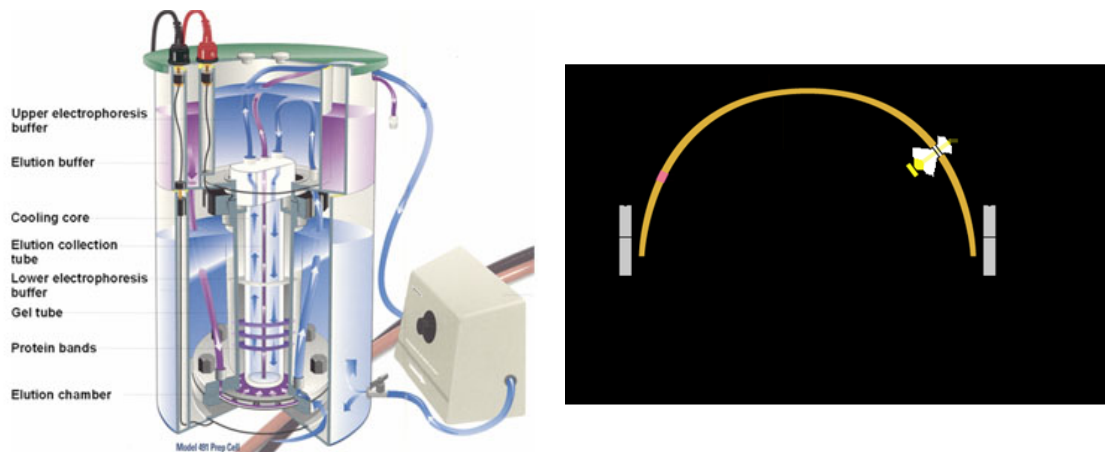
poriën gelijdelijk af. Gradiëntgelen worden bijvoorbeeld gebruikt als een eiwit zowel grote als kleine subunits heeft (denk aan ATPase).



Figuur 6.4 Linksboven het resultaat van een eiwitmonster dat is gescheiden met isoelectric focusing over een pH-bereik van 3-7. In de eerste kolom (M) bevinden zich marker-moleculen met een bekende pI. Rechtsboven het resultaat van hetzelfde eiwitmonster dat is gescheiden met SDS-PAGE. De massa van de marker-moleculen staat aangegeven (in Da). Rechtsonder het resultaat van een scheiding met tweedimensionale electroforese, waarbij een ander monster eerst gescheiden is op lading en vervolgens op molecuulmassa.

Uit: Campos et al. (2003) en Tarkka (2000).

Naast bovengenoemde technieken bestaan er nog een aantal meer geavanceerde methodes voor eiwit-electroforese. Voorbeelden hiervan zijn *QPNC-PAGE* (voor het scheiden van metalloproteinen of grotere hoeveelheden oplossing), en extreem hoge-resolutie methodes zoals *capillaire electroforese* (CE) en *isotachoforese* (ITP). Capillaire electroforese wordt onder meer gebruikt in de meeste moderne DNA sequencers. De methode is zo gevoelig dat ze in staat is om eiwitten te scheiden die slechts verschillen in één aminozuur!



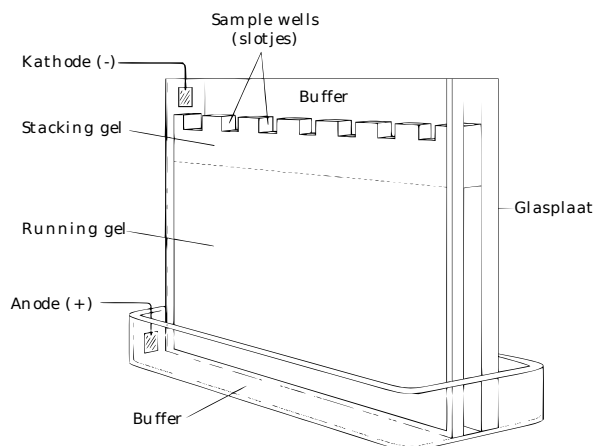
Figuur 6.5 Links een zogenaamde “Prep Cell” voor continue preparatieve elektroforese (QPNC-PAGE). Rechts schematisch het principe van capillaire elektroforese.

6.3 Over de proef

Met behulp van de *reducing SDS-PAGE* methode gaan we de molecuulmassa bepalen van de drie fluorescerende eiwitten GFP, YFP en CFP uit proef 5.

PAGE gel

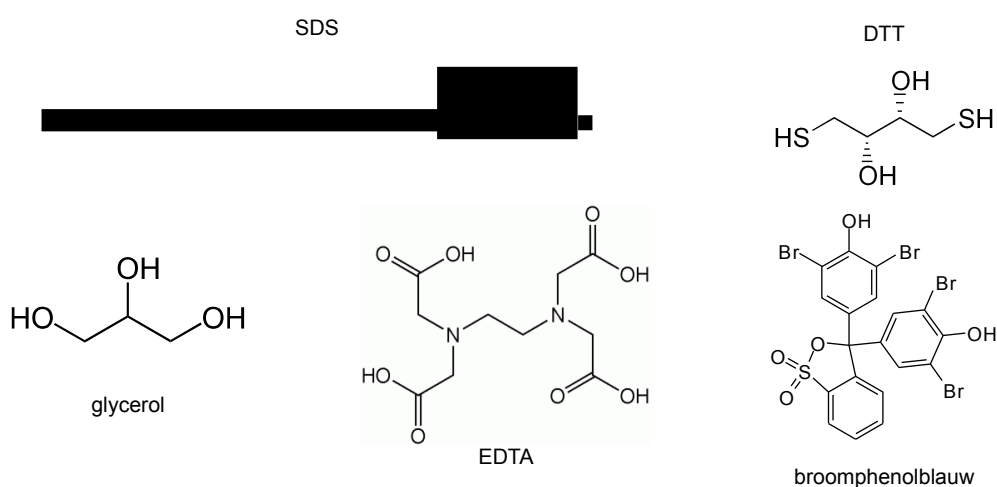
Bij de standaard SDS-PAGE wordt de gel tussen twee glasplaten gegoten. De gel bestaat uit twee delen, een zogenaamde *stacking gel* (ook wel *spacer gel*) waar de samples op worden gepipetteerd, en een *running gel* (ook wel *resolving gel* of *separating gel*) waarin de daadwerkelijke scheiding plaatsvindt. De stacking gel heeft grotere poriën dan de running gel, en dient om de eiwitten te concentreren in smalle bandjes voordat de daadwerkelijke scheiding begint. Op de stacking gel wordt een *kam* geplaatst, die slotjes in de gel maakt waarin de monsters makkelijk gepipetteerd kunnen worden. De afstand tussen de glasplaten is te variëren, een dikkere gel maakt het mogelijk om meer materiaal te scheiden maar geeft een slechter resultaat. Na het gieten van de gel wordt deze in een bak met elektroforesebuffer geplaatst en worden de samples in de slotjes op de stacking gel gepipetteerd (met een speciale lange, dunne Gelsaver tip). In de bak wordt de gel blootgesteld aan een elektrisch veld van 300 V, en zullen de samples de running gel in lopen.



Figuur 6.6 Een eenvoudige elektroforese-bak met daarin een PAGE gel.

Sample buffer

Voordat ze worden opgebracht worden de te analyseren monsters opgelost in een sample-buffer. Deze bevat SDS en DTT, en zorgt dus voor denaturatie en een negatieve lading van de eiwitten. Daarnaast bevat de sample-buffer glycerol, EDTA en broomphenolblauw. Glycerol wordt in laboratoria veel gebruikt om eiwitoplossingen te conserveren in de vriezer, maar dient hier vooral om de samples te verzwaren zodat ze goed in de slotjes zakken. EDTA is een metaalchelator, het bindt tweewaardige metaal-kationen. Dit remt afbraak van eiwitten door *metalloprotease*-enzymen in de samples, die voor hun werking afhankelijk zijn van metaal-ionen. Broomphenolblauw (BPB) tenslotte is een kleurstof. Deze kleurstof heeft een kleine molecuulmassa en is negatief geladen bij een pH boven 4.6. Broomphenolblauw zal dus voor de meeste eiwitten uit lopen in de gel, en kan daardoor gebruikt worden om de voortgang van de elektroforese in de gaten te houden.



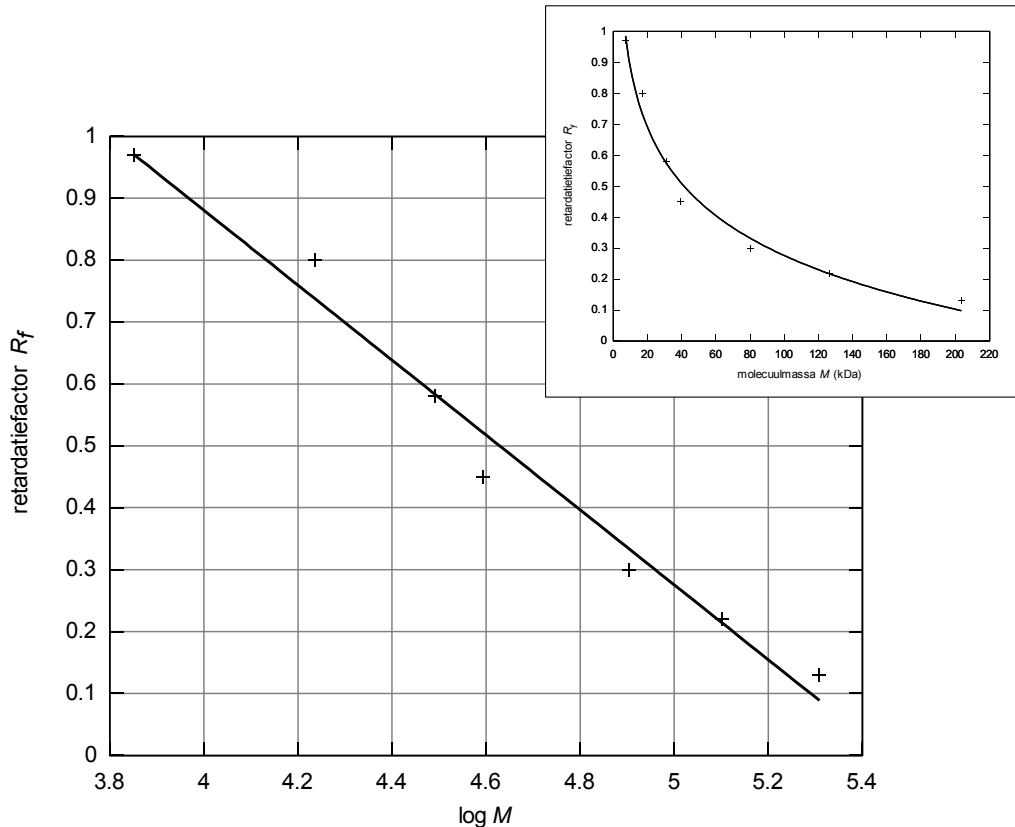
Figuur 6.7 Belangrijke stoffen in de sample-buffer voor SDS-PAGE.

Bepaling van molecuulmassa

Met SDS-PAGE worden de eiwitten op de gel gescheiden op grootte, en dus op molecuulmassa. Echter, om de molecuulmassa te kunnen bepalen hebben we een referentie nodig. Hiervoor gebruiken we kant-en-klaar gekleurde marker-eiwitten, met een bekende massa. De relatieve afstand van de eiwit-bandjes ten opzichte van de totale lengte van de gel geeft de *relatieve mobiliteit* van ieder eiwit. Dit wordt uitgedrukt in de *retardation factor* (ook wel *retention factor*) R_f . In tegenstelling tot wat die naam suggereert is dit een maat voor de migratiesnelheid van een eiwit, genormaliseerd naar de lengte van de gel.

$$R_f = \frac{\text{migratie-afstand eiwit}}{\text{totale migratie-afstand oplossing}}$$

Deze maat is afkomstig uit de chromatografie, waar de R_f -waarde specifiek is voor een bepaalde stof (onder gegeven omstandigheden). Bij SDS-PAGE is de R_f -waarde specifiek voor een bepaalde molecuulmassa. Echter, het verband tussen molecuulmassa en relatieve mobiliteit in de gel is niet lineair. Grote moleculen zijn exponentieel langzamer dan kleine moleculen, dus de R_f -waarde van een eiwit is recht evenredig met $\ln(M)$, het natuurlijk logaritme van de molecuulmassa. Door de R_f -waardes van de marker-eiwitten uit te zetten tegen $\ln(M)$ krijgen we een ijklijn. Deze ijklijn kunnen we vervolgens gebruiken om de molecuulmassa's van de overige eiwitten af te lezen.



Figuur 6.8 De retardatiefactor R_f uitgezet tegen de massa van markermoleculen (rechtsboven). Omdat kleinere moleculen relatief veel sneller door de gel migreren is dit verband logaritmisch. Daarom zetten we voor de ijklijn meestal R_f uit tegen het logaritme van de molecuulmassa (linksonder), of gebruiken we een logaritmische schaal voor de x-as.

6.4 Handleiding

Benodigheden

Voor het maken van de gel staan de volgende oplossingen klaar:

- resolutiebuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- stackbuffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)
- acrylamide / bisacrylamide oplossing (AA-bisAA)
(40% acrylamide, de verhouding acrylamide tot bisacrylamide is 29 : 1)
- SDS 10% (10 g natrium dodecyl sulfaat per 100 ml demiwater)
- APS 10% (10 g ammonium persulfaat per 100 ml demiwater)
- TEMED (tetramethylethyleendiamine, ruikt enigszins onprettig naar vis)

Voor het vullen van de elektroforesebak staat een buffer-oplossing klaar:

- elektroforesebuffer (pH 8.0), bestaande uit:
 - 3.0 g Tris

- 14.4 g glycine
- 10 ml SDS (10%)

Voor het oplossen van de eiwit-samples staat eveneens een buffer-oplossing klaar:

- samplebuffer (5x geconcentreerd), bestaande uit:
 - 250 mM Tris (pH 8)
 - 5% SDS
 - 25 mM DTT (ditiotreitol)
 - 50% glycerol
 - 2.5 mM EDTA (ethyleendiaminetetraazijnzuur)
 - 0.002% BPB (broomphenolblauw)

Verder is nodig:

- eiwit-samples voor analyse (CFP, GFP en YFP uit proef 5)
- marker-eiwitten ter referentie
- glasplaten, houder, kam, electroforesebak
- pipetten, puntjes, Gelsaver-tips
- linealen (normaal en fluoriserend)

Werkwijze

- Controleer allereerst of de CFP, GFP en YFP samples verdund moeten worden. We gebruiken een gel met een dikte van 0.75 mm. Per slotje kan in dit geval maximaal 50 µg eiwit opgebracht worden, anders loopt de gel dicht. Gebruik de resultaten van proef 5 om te berekenen hoeveel microgram eiwit er in 20 µl sample zit. Bereken de benodigde verdunning indien dit meer is dan 50 µg.

We beginnen vervolgens met het mengen en gieten van de running gel (5 ml, 12% acrylamide) en de stacking gel (2.5 ml, 4% acrylamide):

- Meng onderstaande oplossingen voor de running gel. APS en TEMED zorgen voor polymerisatie, voeg deze dus als laatste toe. **Let op: acrylamide is giftig!** Werk dus voorzichtig en draag handschoenen.
 - 2.175 ml demiwater
 - 1.25 ml resolutiebuffer
 - 1.5 ml AA-bisAA
 - 50 µl SDS 10%
 - 25 µl APS 10%
 - 10 µl TEMED
- Pipetteer met een P1000 het running gel mengsel tussen de glasplaten (0.75 mm dik), tot ongeveer 2 cm van de bovenkant. Pipetteer met een P200 voorzichtig een laagje

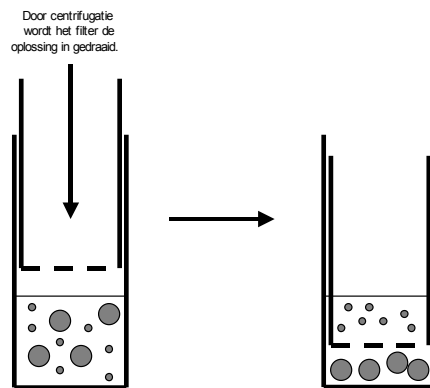
- demiwater op het gel-mengsel, zodat het oppervlak mooi glad wordt.
- Als de running gel gepolymeriseerd is kun je de stacking gel mengen:
 - 1.59 ml demiwater
 - 0.63 ml stackbuffer
 - 0.25 ml AA-bisAA
 - 25 μ l SDS 10%
 - 18 μ l APS 10%
 - 6 μ l TEMED
 - Pipetteer met een P1000 het stacking gel mengsel op de running gel, en schuif voorzichtig de kam met slotjes tussen de glasplaten.
 - Tijdens de polymerisatie van de stacking gel kunnen de te analyseren eiwit-samples verdund worden met sample buffer. Bepaal op basis van je eerdere berekening welke verdunning je nodig hebt. Ieder sample moet een totaalvolume krijgen van 25 μ l, en moet minimaal 5 μ l sample buffer bevatten.
 - Als de stacking gel gepolymeriseerd is (bedenk hoe je dit kunt zien!), kan de kam verwijderd worden. De gel wordt in de houder en vervolgens in de elektroforesebak gemonteerd. Vul de twee compartimenten van de bak geheel met elektroforesebuffer.
 - Vul met een Gelsaver-tip de slotjes van de gel met de verdunde eiwit-samples. Gebruik 10-15 μ l sample per slotje. Vergeet niet de slotnummers en samples in je labjournaal te noteren.
 - Vul een slotje met 5 μ l marker-eiwit oplossing.
 - Doe de deksel op de elektroforesebak sluit de anode (rood, +) en kathode (zwart, -) aan en stel het voltage in op 300 V.
 - Schakel na ongeveer 25 minuten stroom uit en controleer de gel. Als het broomphenolblauw voldoende ver richting de anode is gemigreerd kan de gel tussen de glasplaten uitgehaald worden.
 - Meet de migratie-afstanden van de marker-eiwitten met een liniaal.
 - Meet onder UV-licht de migratie-afstanden van de bandjes met CFP, GFP en YFP met een fluoriserende liniaal.

Uitwerking

- Bereken de *retention factor* R_f voor alle eiwitten. Deze waarden geven de relatieve mobiliteit van ieder eiwit.
- De relatieve mobiliteit van een eiwit is bij SDS-PAGE evenredig met het logaritme van zijn molecuulmassa (M , meestal uitgedrukt in kiloDalton). Maak op grafiekpapier een plot van R_f tegen $\ln(M)$ van de marker-eiwitten en teken een ijklijn.
- Bepaal met behulp van de ijklijn de molecuulmassa van de eiwitten GFP, CFP en YFP in kiloDalton (kDa).
- Zorg dat alle resultaten en de ijklijn genoteerd zijn in het labjournaal.

6.5 Vragen

1. Er bestaan units voor ultrafiltratie of bioscheiding. Een unit bestaat uit twee buisjes, een gewone buis en een binnenbuis, de binnenbuis heeft als bodem een membraan. De poriegrootte van de membraan bepaalt welke moleculen doorgelaten kunnen worden. Ionen en moleculen kleiner dan een bepaald volume (evenredig met massa) kunnen de membraan passeren. Eiwitten van verschillende grootte in één oplossing kunnen hierdoor gescheiden worden. Ook wordt dit systeem toegepast voor het concentreren van (met name) eiwitten.



Er zijn filters met poriën voor moleculen van 5, 10, 30, 50 en 100 kDa te koop. Een onderzoekster krijgt een mengsel van GFP, CFP en YFP. Kan ze de drie eiwitten scheiden met behulp van ultrafiltratie en zo ja welke filters heeft ze dan nodig?

2. YFP en CFP zijn kunstmatige mutanten van het originele Green Fluorescent Protein GFP. De genen die coderen voor deze eiwitten verschillen slechts in enkele puntmutaties van elkaar. Hoe kun je dit terugzien in de resultaten?
3. Gelelektroforese en gelfiltratie (proef 4) zijn beiden methodes die gebruikt kunnen worden om biologische mengsels te scheiden op molecuulmassa. Vergelijk de methodes, voor welke toepassingen is gelfiltratie het meest geschikt? En voor welke toepassingen kun je beter gelelektroforese gebruiken?

6.6 Referenties

Smithies, O. (1955), 'Early Days of Gel Electrophoresis', *Genetics* **139**(1), 1-4.

Shapiro, A. L.; Viñuela, E. & Maizel, J. V. (1967), 'Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.', *Biochem Biophys Res Commun* **28**(5), 815—820.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987), 'Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa', *Analytical Biochemistry* **166**(2), 368—379.

Schägger, H.; Aquila, H. & Von Jagow, G. (1988), 'Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis', *Analytical Biochemistry* **173**(1), 201—205.

Schägger, H. (2006), 'Tricine-SDS-PAGE', *Nat. Protocols* **1**(1), 16—22.

Voet, Voet & Pratt, 'Fundamentals of Biochemistry', Section **5-2D** (*Protein Purification and Analysis*), Section **24-3** (*Fractionation of Nucleic Acids*).

