

1. KRATKA ZGDOVINA

V začetkih 70-tih let sta bili odkriti dve tehniki, in sicer *Zone elektroforeza* (predhodnica današnje NaDS Page), ki je zelo hitro postala popularna in *denaturirano izoelektrično fokusiranje*. Prva uspešna združitev zgoraj omenjenih metod, je bila leta 1975, saj je imela od vseh ostalih 2D tehnik, zelo dobro resolucijo.

2. PRIPRAVA VZORCA

V vzorcu ne smemo spremeniti naboja (ker se pri IEF ločuje na podlagi neto vezavnega naboja), za ekstrakcijo iz biološkega vzorca pa uporabimo kombinacijo nevtralnih detergentov in kaotropov (npr. Urea). Kaotropi so snovi, ki zelo dobro topijo proteine in jih obenem tudi denaturirajo. Za skoraj vsaj tip vzorca obstajajo različni protokoli priprave in čiščenja vzorca.

3. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE (IEF)

Pri IEF poteka ločevanje na podlagi celokupnega naboja proteina. Pri tej metodi se ohrani nativna konformacija (tudi kvartarna struktura) in proteini so še vedno biološko aktivni. Uporabljamo imobilizirane pH gradiente (ki so imeli v preteklosti izjemen prodor v znanosti in nam omogočajo ponovljivost eksperimentov) in pa amfiole, ki jih uporabimo pri predpripravi gela - izoelektrično predfokusiranje. Pri IEF so velike napetosti do 170V/cm. Tukaj nam vzorci ne morejo »pobegniti« ven iz gela in čas fokusiranja ni pomemben.

4. RAVNOTEŽJE MED DIMENZIJO IN NaDS ELEKTROFOREZO

Cilj je proteine, ki smo jih ločili z IEF, namočiti v pufru z NaDS (anionski detergent), da se denaturirajo, dobijo negativen naboj na celotni površini. Poleg tega morajo postati zopet mobilni v drugi dimenziji – NaDS Page elektroforeza. Proteini nadaljujejo ločevanje samo na podlagi velikosti.

5. DETEKCIJA PROTEINOV

Detektiramo lahko samo kar smo analizirali; izberemo si nekaj točk/pik in jih naprej analiziramo. Pri detekciji je pomembna občutljivost, linearnost, homogeni odgovor in kompatibilnost z nadaljnjimi tehnikami detekcije. Ločimo 3 vrste detekcij: z organskimi barvili (Commasie modro), s fluorescenco (nekovalenta, kovalentna vezava) in s srebrom obarvanjem.

6. UPORABA V PROTEOMIKI

Po uspešno opravljenem izoelektričnem fokusingu in SDS-PAGE sledi detekcija proteinov v gelu, pri čemer vsaka pika predstavlja posamezen protein. Protein, ki ga želimo preučiti nato izrežemo in prenesemo v t.i. prebavni gel, v katerem se največkrat nahaja tripsin. Nastale peptide eluiramo in jih analiziramo z masno spektrometrijo, kar vodi do identifikacije in karakterizacije proteina.

7. PREDNOSTI 2D ELEKTROFOREZE

- Analizirati je mogoče (potrebno) le majhen del proteinov v vzorcu (koristno pri primerjalnih študijah s ponovitvami)
- Zaradi visoke ločljivosti 2D gela lahko za identifikacijo uporabimo zelo preproste in poceni metode masne spektrometrije

8. POGOSTA UPORABA IN OMEJITVE

Največkrat uporabljamo 2D gelsko elektroforezo v toksikologiji, mikro-encimologiji in imunoproteomiki. Zelo uporabna je za odkrivanje in prepoznavanje post-translacijskih modifikacij, bodisi s pomočjo detekcije s protitelesi ali pa opazujemo razlike v pI in/ali molekulski masi (drugačna lega proteina v 2D gelu). Omejitve se pojavijo pri zelo majhnih količinah proteinov, ker jih ne moremo detektirati, kar je velik problem pri evkariontskih celicah, kjer lahko zaznamo samo približno 10% vseh proteinov v celici.

9. PRIHODNJE USMERITVE

Zaradi velikega pomena post-translacijskih modifikacij bo 2D gelska elektroforeza vsekakor ostala ena najpomembnejših tehnik proteomike v 21. stoletju, saj omogoča visoko ločljivost med proteini in preprosto določanje post-translacijskih modifikacij.