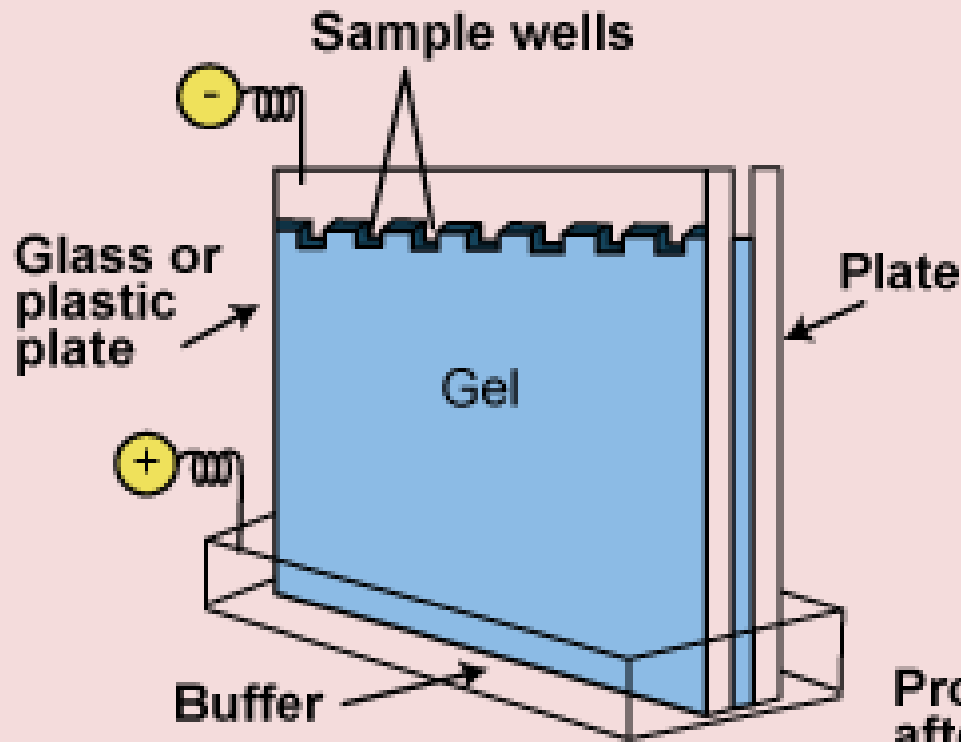


# ***POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZA (PAGE)***

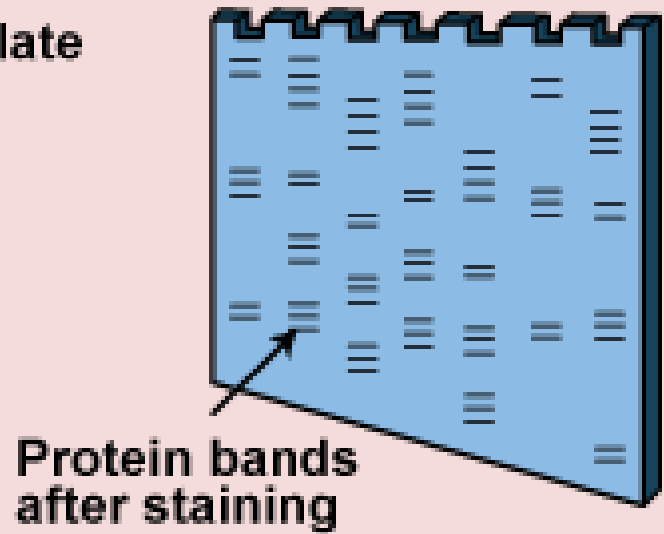
- Najsvestranija metoda za analizu proteina
- Reproducibilni rezultati

Proteini u vodenim otopinama su negativno ili pozitivno nabijeni ioni, u ovisnosti o pH okoliša. Za vrijeme elektroforeze, ioni se guraju kroz mrežu formiranu unutar hidrofilnog gela unakrsno križanog poliakrilamida. Brzina migracije ovisi o količini naboja molekule, veličine pora gela, mogućim interakcijama poliakrilamida i molekula, te jačini električnog polja.

Uz poliakrilamid, za elektroforezu se koriste i agarozni gelovi, papir ili celulozni acetat.



(a)

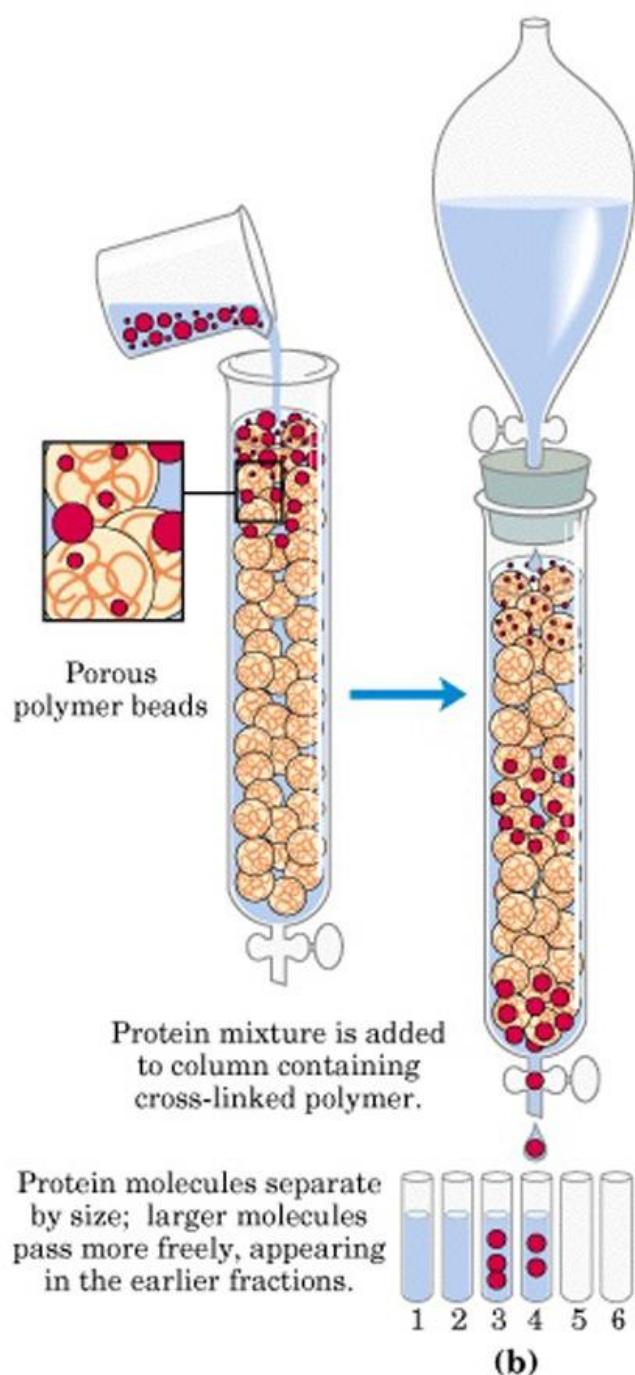


(b)

# ***GEL KROMATOLOGRAFIJA***

- Tehnika koja služi za odvajanje kemijskih tvari na osnovi razlike u brzini prolaska kroz sloj porozne, polukrute tvari (gela)
- Najblaža od svih kromatografskih tehnika.
- Omogućuje izbor različitih pufera za vrijeme separacije, tako da ne dolazi do promjene strukture i funkcije proteina.

- Molekule penetriraju u šupljine makroporoznih čestica za podršku
- (najčešće hidrofilni gelovi dekstrana, agaroze, poliakrilamida i dr.). Molekule sa promjerom manjim od promjera pore difundiraju u
- matricu, dok su veće molekule blokirane. U gruboj aproksimaciji, promjer proteina je proporcionalan njegovoj molarnoj masi, te se na taj način gel filtracija koristi za odjeljivanje po molekularnoj težini, odnosno veličini čestica.



# ***SPEKTROFOTOMETRIJA I KOLORIMETRIJA***

- Grupa tehnika koje se baziraju na interakciji elektromagnetskog zračenja i tvari. Rezultati su u stvari kvantitativna analiza elektromagnetskog spektra
- U ovisnosti o metodi i molekularnim interakcijama, dijelimo ih na:
  - ***apsorpcijske***
    - atomi (ioni, molekule) apsorbiraju svjetlo, te prelaze u više energestko stanje

- - svjetlo prolazi kroz uzorak, te se mjeri količina apsorbirane svjetlosti
- - mjerenja se vrše u UV, IC i vidljivom području
- ***emisijske***
  - otpuštanjem fotona atom prelazi u niže energetske stanje
  - mjeri se količina emitiranog svjetla
- ***fluorescentne***

***Vrsta pobuđivanja atoma/molekule ovisi o valnoj duljini elektromagnetskog zračenja:***

1. UV i vidljiva svjetlost prebacuje elektrone u više energetska stanja
2. Infracrvena svjetlost dovodi do vibracije atoma
3. Mikrovalovi dovode do rotacije atoma i molekula

***UV/Vis spektrofotometrija***

- Područje analize je od 400 – 700 nm
- Najviše se koristi u kolorimetriji
- Analizom se dobiva krivulja spektralne refleksije



## ***UV i IR spektrofotometrija***

- Emitirana svjetlost prolazi kroz monokromator, koji izabire i podešava određenu valnu duljinu iz spektra
- Svjetlost tada prolazi kroz uzorak do detektora
- Fotodioda ili druga vrsta senzora detektira intenzitet preostale svjetlosti, te se iz tih podataka računa transmitancija za određenu valnu duljinu

# *High performance liquid chromatography (HPLC)*

- Tekućina (mobilna faza) se pod visokim pritiskom pušta u kolonu
- Analit prolazi kroz kolonu napunjenu sa česticama sa određenim površinskim svojstvima
- Uzorak za analizu se ubacuje u tok mobilne faze, te je brzina njegove retardacije ovisna o kemijskim i fizikalnim interakcijama sa stacionarnom fazom

- Vrijeme zadržavanja je vrijeme potrebno da se specifični analit eluira iz kolonu.
- Za veću rezoluciju kromatograma potrebno je da analit brže eluira (manje vrijeme zadržavanja), što se izvodi povećanjem linearne brzine analita uz pomoć visokog tlaka

# Block diagram showing the components of an HPLC instrument

