

## OSNOVI TEORIJE ELEKTROFOREZE I MOGUĆNOSTI PRIMENE\*\*

S. Trenkovski<sup>1\*</sup>, R. Cmiljanić<sup>1</sup>, T. Smiljaković<sup>1</sup>, G. Marinkov<sup>1</sup>,  
Lj. Stojanović<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za stočarstvo, Beograd-Zemun, 11080 Zemun, Srbija

Corresponding author:

\*Snežana Trenkovski, e-mail: [strenki3@yahoo.com](mailto:strenki3@yahoo.com)

\*\*Revijalni rad – Review paper

Rad je finansiran od strane Ministarstva nauke i zaštite životne sredine R. Srbije u okviru projekta TR - 6885 B

**Apstrakt:** Cilj ovog rada je da se opiše teorija elektroforeze, da se da podela i opišu mogućnosti njene primene. Za uspešnu primenu elektroforeze u različitim fiziološkim, biohemijskim, genetskim ispitivanjima neophodno je poznavanje teorijskih osnova elektroforeze da bi mogli da se menjaju uslovi ispitivanja i dobiju ciljani rezultati.

**Ključne reči:** elektroforeza, razne tehnike, genetske varijante, DNK, geni.

### Uvod

Proteini i proteidi imaju izuzetan značaj u fiziološkim procesima i kao enzimi i kao supstrati. Ta činjenica stalno povećava interes za njihovo istraživanje. Belančevine su supstance reaktivne u fiziološkim uslovima, a još veću osetljivost i labilnost pokazuju sa hemijskog aspekta kada ih istražujemo ili pokušavamo da ih izolujemo u čistom stanju. Mnoge od tih supstanci postojane su samo u rastvoru određenog pH i pri niskoj temperaturi. Kad se istalože povećanjem koncentracije neutralnih soli, menjaju se ne samo fizička svojstva nego nastaju često i dublje promene unutrašnje strukture. Zato je od velike važnosti da se istraživač koji se posvećuje istraživanju belančevina koristi metodama fizičke hemije. Kombinacijom ovih proverenih metoda belančevine se mogu karakterisati i mogu im se odrediti najvažnija svojstva bez opasnosti da će se pri eksperimentu hemijski promeniti. Najnovijim istraživanjima isti zahtevi su se javili i za samu DNK, gene, egzone. Najvažnija takva metoda je elektroforeza (*Berkeš 1951*).

Elektroforeza je elektrokinetička pojava, metoda i proces. Kao elektrokinetička pojava podrazumeva kretanje naelektrisanih čestica pod

dejavom homogenog električnog polja prema katodi ili anodi kroz rastvor slabog elektrolita. Nazivamo je metodom jer može da služi za razdvajanje proteina iz smeše kako u preparativne tako i u analitičke svrhe. Može da se nazove i proces jer možemo da menjamo uslove pod kojima se radi da bi dobili ciljane rezultate. Kao proizvod elektroforeze dobija se elektroforegram. U literaturi se sreće i pojam zimogram za elektroforetsku sliku izoenzima, a takodje i za samu sliku se kaže da je elektroforeza.

Kao što kod atomske spektrofotometrije atom kad iz pobudjenog stanja prelazi u osnovno stanje daje svoju sliku, tako kod elektroforeze svaki protein, sama DNA, gen i egzon daje svoju sliku koja se može uporediti sa genetskim otiskom prsta.

Za razliku od elektrolize, kod elektroforeze ne dolazi do hemijske promene na elektrodama. Za primenu elektroforeze u razdvajanju proteina Anre Tisellius je dobio Nobelovu nagradu 1948 godine.

## Teorijski prikaz

Teorijski prikaz koji iznosimo je veoma pojednostavljen. Tokom elektroforeze se kreću naelektrisane čestice. One mogu da budu: koloidne čestice, proteini, imunoglobulini, jedinjenja proteinske prirode, aminokiseline, nukleotidi, geni i egzoni. Tokom elektroforeze naelektrisane čestice kreću se odredjenom brzinom. Brzina kretanja jedne naelektrisane čestice zavisi od: naelektrisanja čestice, veličine i oblika naelektrisane čestice, jačine električnog polja, karakteristike potporne sredine, temperature.

Ako se dve elektrode povežu sa izvorom jednosmerne struje odredjenog napona izmedju njih se stvara električno polje sposobno da deluje nekom silom  $F$  na česticu svernog oblika, a čija je količina naelektrisanja  $q$ . Ova sila  $F$  je osnovna pogonska sila i data je izrazom:

$$F = E q \quad (1)$$

Suprotno od pogonske sile na česticu koja se kreće deluje sila trenja data Štoksovim zakonom:

$$F_t = 6 \pi \eta r V \quad (2)$$

U trenutku kada se ove dve sile izjednače čestica se kreće konstantnom brzinom  $V$  koja se može izraziti relacijom:

$$V = \frac{E q}{6 \pi \eta r} \quad (3)$$

$\eta$  - viskozitet rastvora  
 $V$  - brzina kretanja  
 $r$  – poluprečnik čestice

Iz izraza se vidi da brzina zavisi upravo proporcionalno od jačine polja  $E$  i naelektrisanja čestice, a obrnuto proporcionalno od radijusa čestice i viskoziteta sredine, što znači da brzinu možemo da povećavamo ako povećavamo jačinu polja odnosno napon medju elektrodama. Jačina električnog polja  $E$  znači pad ili razliku potencijala na svakom santimetru izmedju elektroda i dobija se deljenjem napona izvora struje  $U$  na elektrodama sa udaljenostima medju elektrodama  $d$ .

$$E = \frac{U}{d}$$

Da bi se brzina čestica u poljima različite jačine mogla uporediti svaka se izmerena brzina preračunava na vrednost koja se dobija u polju jačine

$$\frac{1 \text{ Volt}}{m}$$

Brzina čestice u polju jačine  $\frac{1 \text{ V}}{m}$  zove se njena pokretljivost ( $V = \text{Volt}$ ).

$$\mu = \frac{V}{E} \quad (4) \quad V = \frac{l}{t} \quad E = \frac{U}{d}$$

$\mu$  - pokretljivost  
 $t$  – vreme  
 $V$ - brzina

$$\mu = \frac{L \cdot d}{U \cdot t} \quad 1 \text{ JEFP} = 1 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}$$

V – Volt

s – sekund

$$\text{Albumin ima elektroforetsku pokretljivost } 2,67 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} \text{ JEFP}$$

Pokretljivost naelektrisane čestice može da se definiše, ispiše simbolima i obračuna. Ona predstavlja fizičku konstantu za datu naelektrisanu česticu.

Koloidna čestica naprotiv nikad ne dostiže brzinu predviđenu formulom koja ustvari predstavlja maksimalnu pokretljivost. Naelektrisanje koloidne čestice proizilazi iz jona adsorbovanih na površini čestice. Iz rastvora se privuku slobodni joni i stvara se dvostruki jonski sloj. Taj spoljni sloj u izvesnoj meri umanjuje stvarni iznos naelektrisanja koloidne čestice. Stvara se dvostruki električni sloj na granici čvrste faze i tečnosti.

Kao posledica stvaranja dvostrukog jonskog sloja sa njegovom posebnom strukturom na granici između čvrste i tečne faze javljaju se dva potencijala: termodinamički i ceta potencijal. Za analitičare je ovaj drugi važniji.

Karakteristična je pojava elektroendosmoze kada naelektrisana čestica povlači sa sobom i rastvarač te imamo katodno pomeranje elektroforetskih bendova.

Elektrokinetički potencijal (P) čestica, povezan je teorijski sa naelektrisanjem čestice q, njenim radijusom r i debljinom jonskog dvostrukog sloja d i dat je izrazom:

$$P = \frac{q \cdot d}{\epsilon \cdot r^2} \quad \epsilon \text{ -dielektrična konstanta rastvarača}$$

Elektroforeza se izvodi kroz rastvor slabog elektrolita (pufer).

Ako izvršimo elektroforetski eksperiment i odredimo pokretljivost jedne vrste proteina, dobijena vrednost je efektivna pokretljivost (M). Matematički ova stvarna ili efektivna pokretljivost može se dobiti kao razlika maksimalne, praktično nedostižne, pokretljivosti  $\mu$  i  $\mu'$  koja je rezultat navedenih uticaja.

$$M = \mu - \mu'$$

Formulom (4) smo matematički izrazili pokretljivost  $\mu = \frac{V}{E}$

odakle  $V = \mu \cdot E$

Pošto je pod definisanim uslovima pokretljivost konstantna, brzina kretanja proporcionalna je jačini polja. Nju možemo da povećamo ako povećamo jačinu električnog polja, odnosno napon između elektroda. Kako je provodljivost sistema u skladu sa Omovim zakonom

$$J = \frac{U}{R}$$

U - napon

J - jačina struje

R – otpor

kada se poveća napon povećava se i jačina struje, dakle i ukupna snaga, oslobadja se toplota (Džulov efekat) i zagrevanje sistema je jače. Usled preteranog zagrevanja dolazi do promene otpora u sredini, isparavanja, pa čak i denaturacije proteina. Zbog toga je neophodno da se održava konstantna temperatura u sistemu (obezbedjenja sistema za hladjenje).

Da bi se dobilo dobro elektroforetsko razdvajanje proteina potrebno je da se vodi računa o otporu, naponu, jačini struje, koncentraciji pufera, temperaturi, vremenu trajanja elektroforeze.

Za izvođenje elektroforeze veoma je bitan pH rastvora. Ukupno naelektrisanje proteina je zbir svih pozitivnih i negativnih naelektrisanja u molekulima proteina. Ona pH vrednost pri kojoj je ukupno naelektrisanje proteina ravno nuli, naziva se izoelektrična tačka (pI) i tada čestice u polju se ne kreću. Zavisno od pH, naelektrisana čestica (protein) putuje u jednom pravcu, može da stane ili da ide u suprotnom pravcu. Po pravilu koncentrovaniji puferi imaju povećan broj jona (veću jonsku jačinu) i daju oštrije frakcije. Pošto je povećan broj jona provodljivost sistema je povećana, velika je i jačina struje pa mora da se radi pri nižem naponu da ne bi došlo do pregrevanja. Usled toga je vreme razdvajanja duže nego sa puferima manje koncentracije. Pokretljivost naelektrisane čestice obrnuto je proporcionalna kvadratnom korenu jonske jačine struje (J), što znači da je pokretljivost manja ako je jonska jačina struje veća.

$$\mu \sim \frac{1}{\sqrt{J}}$$

Puferi niskih jonskih jačina omogućavaju veliku pokretljivost uz neznatni toplotni efekat. Provodljivost pufera zavisi od njihove jonske jačine koja je definisana izrazom:

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot C_m \cdot z^2$$

$C_m$ - molarna koncentracija rastvora  
z-naelektrisanje pojedinih vrsta jona

pH pufera obezbeđuje ukupno naelektrisanje naelektrisanih čestica u zavisnosti od disocijacije slabih kiselina, slabih baza i amfoternih jedinjenja.

## Podela elektroforeze

Zavisno od toga dali ima nosač ili ne deli se na: slobodnu (istorijski značaj) i zonsku. Prema naponu deli se na standardnu i visokonaponsku, prema načinu postavljanja komore za elektroforeze deli se na horizontalnu i vertikalnu. Zavisno u kojoj dimenziji se radi može biti jednodimenzionalna ili dvodimenzionalna.

### *Podela zonske elektroforeze*

1. Elektroforeza na papiru.
2. Elektroforeza na celuloza acetatu (CAGE).
3. Elektroforeza na skrobnom gelu.
4. Elektroforeza na agar gelu (AGE).
5. Elektroforeza na poliakril amidnom gelu (PAGE).
6. Elektroforeza (SDS PAGE).
7. Izoelektrično fokusiranje na poliakril amidnom gelu (PAGEIF) na stubu ili na gelu.
8. Disk elektroforeza, i
9. Najnoviji pravci razvoja kreću se ka kapilarnoj elektroforezi.

Da bi se izneo teorijski prikaz i podela korišćena je sledeća literatura (*Gordon 1975, Andvers 1986, Bier 1967, Catsimpoalas 1978*).

## Mogućnosti elektroforeze

Elektroforeza je vrlo moćna laboratorijska metoda i njene mogućnosti uglavnom zavise od vrste koja se koristi. Osnovni cilj je da se primenom ove metode sazna više o fiziološkim i metaboličkim procesima koji su povezani sa osnovnim funkcijama organizma, ishranom, zdravstvenim stanjem i genetikom. Ova metoda služi za razdvajanje proteina kako u preparativne tako i u analitičke svrhe, kao i za određivanje njihovih genetskih varijanti. Jedinke na molekularnom nivou znatno se više razlikuju nego što to na prvi pogled izgleda. Metodama elektroforeze koje nam stoje na raspolaganju možemo da otkrijemo samo jedan deo nasledne promenljivosti, jer mnoge promene koje se dešavaju na nivou molekula, pre svega promene u sekvenci neutralnih aminokiselina koje ne dovode do promene električnog opterećenja, ne mogu da se otkriju (*Sretenović 1985*).

Elektroforeza se u medicini, farmaciji, veterini i stočarstvu primenjuje za ispitivanje telesnih tečnosti kao što su: krv, serum, plazma, urin, cerebrospinalni likvor, hormoni, izoenzimi i hidrolizati mišića. U najnovije vreme ispituju se samo DNA, njeni delovi i geni.

Elektroforezom na skrobnom gelu određene su genetske varijante hemoglobina (*Petrović i sar., 1998*) kod ovaca koje su u korelaciji sa proizvodnim osobinama ovaca. Određene su takodje na skrobnom gelu i genetske varijante hemoglobina kod goveda (*Smiljaković i sar. 2002*). Na skrobnom gelu određene su i genetske varijante transferina kod goveda (*Sretenović 1985*). Koristeći elektroforetske tehnike (*Kalimanovska, 1989*) je odredila genetske varijante izoenzima kod ljudi. *Stoiljković (1992)* je odredila izoelektričnim fokusiranjem na poliakril amidnom gelu genetki polimorfizam alfa-1 anti tripsin inhibitora i povezala ga sa zdravstvenim stanjem kod ljudi i pojavom emfizema pluća. *Erceg i sar. (1999)* su radili na otkrivanju genoma kod ovaca pomoću Random amplifikovane polimorfne DNK (RAPD), PCR-fingerprinting i PAGE, što se može koristiti za identifikaciju genotipova kod ovaca, čime se skraćuje put i povećava efikasnost selekcije ovaca u željenom smeru. Na nivou DNA i gena radili su takodje (*Glišić 1992, Dedović 1995, Šekarić 1996*). *Smiljaković (2001)* je radila na onko genima kod ljudi i koristila je više PCR tehnika.

Kada se zna struktura genoma, koja se utvrđuje navedenim tehnikama, dobija se mozaička slika kretanja genetskih frekvenci što omogućava konstruisanje genetskih mapa. Genetska mapa se povezuje sa proizvodnim i zdravstvenim osobinama domaćih životinja, omogućuje se brža i pouzdanija ocena priplodne vrednosti jedinki i u ranom uzrastu (*Petrović 1997*). Takodje mogu da se selekcioniraju životinje zdravstveno

otpornije kao i da se prepoznaju i konzerviraju pojedini retki geni, naravno zahvaljujući genetskim markerima (*Jovanović 1997*).

Još je *Berkeš (1951)* istakao da u farmaceutskoj industriji elektroforeza služi kao kontrolna metoda za ispitivanje čistoće preparata za vreme proizvodnje, a i konačnog proizvoda, na primer hormonskih preparata (insulin), aminokiselina (histidin), pri izolovanju izoenzima, u bromatologiji (ovo albumin, proteini mleka i žitarica, određivanje anti tripsin inhibitora i drugih anti nutritivnih materija proteinske prirode, u proizvodnji preparativnih proteina plazme u imunologiji (serumi i antitoksini), u bakterijologiji (ispitivanje bakterija i alergena). Najnovija saznanja na nivou DNA i gena koriste se i danas u farmaciji.

O mogućnostima elektroforeze u stočarstvu *Trenkovski i sar.(1998)* publikovali poseban rad.U tom radu je istaknuto šta je uradjeno pomoću elektroforeze i genetskih markera u stočarstvu skoro kod svih vrsta domaćih životinja, a iz dobijenih rezultata može da se zaključuje o poreklu životinja,povezanosti sa proizvodnim osobinama,zdravstvenom stanju životinja i tačnosti izdatog pedigrea.

Elektroforeza se koristi kod ispitivanja kvaliteta stočne hrane (određivanje anti nutritivnih materija) i njenog uticaja na nivo i kvalitet animalnih proizvoda *Cmiljanić i sar. (2001., 2002, 2003, 2004, 2005, 2006.)*

## Zaključak

Na osnovu napred iznetog može se zaključiti sledeće:

- Elektroforeza je fizičko-hemijska, elektrokinetička pojava, proces i metoda, koja omogućava da se radi sa živim nepromenjim biološkim materijalom.
- Poznavanje teorije elektroforeze je neophodno da bi moglo da se radi i menjaju parametri tokom rada i tako dobije realnija slika.
- Zajedno sa PCR-om, elektroforeza omogućava da se otvori genom i pomoću markera naprave genetske mape za pojedine rase ljudi i životinja.
- Osnovni cilj je da se primenom ove metode sazna više o fiziološkim i metaboličkim procesima koji su povezani sa osnovnim funkcijama organizma, ishranom, zdravstvenim stanjem i genetikom.



# THEORY OF ELECTROPHORESIS AND APPLICATION POSSIBILITIES

*S. Trenkovski, R. Cmiljanić, T. Smiljaković, G. Marinkov,  
Lj. Stojanović*

## Summary

In this paper, simplified theory of electrophoresis is presented. The effect of certain factors on course of electrophoresis. Presented theoretical elements enable easier work and obtaining of more reliable data. Based on medium used, voltage, direction and dimensions categorization of electrophoresis is presented. Also, possibilities for use of electrophoresis in livestock production, medicine, veterinary science and pharmacy are also presented in the paper. It is stressed that by application of electrophoresis genetic variants related to certain production trait can be determined, which enables better selection in livestock production. Also, by application of this method in investigation of biological material we can find out more about physiological and metabolic processes related to main functions of the organism, nutrition, health condition and genetics.

**Key words:** electrophoresis, different techniques, genetic variants, DNA, genes.

## Literatura

ANDREWS A.T.(1986): Elektroforezis – Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications ( second edition ). Oxford Science Publications,1986.

BERKEŠ I. (1951): Elektroforeza u medicini i farmaciji. Farmaceutski glasnik br.7,12-S14.

BIER M.(1967): Elektroforezis – Theory Methods and Applications Vol.II, Academic Press New York and London.

CATSIMPOOLAS N.(1978): Proceeding of the International Conference on Elektroforezis, Massachusetts, Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, April 19-21,1978.

CMILJANIĆ R., SRETENOVIĆ LJ., TRENKOVSKI S., MARINKOV G. (2001): Systems of poultry nutrition and their effect on production traits and

quality of product. *Biotechnology in Animal Husbandry* 17, 5-6), 179-185. 6<sup>th</sup> International Symposium (Systems of animal breeding and economic of animal production at the beginning of the New Millenium).

CMILJANIĆ R., SUPIĆ B., PAVLOVSKI Z., TRENKOVSKI S. ŽUJOVIĆ M. (2002): Novi propisi Evropske Unije vezano za ishranu domaćih životinja i kvalitet animalnih proizvoda." *Savremena Poljoprivreda* " Vol.51 (3-4),329-332 Novi Sad.

CMILJANIĆ R., ŽUJOVIĆ M., TRENKOVSKI S., PAVLOVSKI Z. (2003):Uticaj tipa ishrane na proizvodne rezultate kod jagnjadi u tovu. *Biotehnologija u stočarstvu*. Vol.19(3-4),37-41.

CMILJANIĆ R., ŽUJOVIĆ M., PAVLOVSKI Z., TRENKOVSKI S. (2004): Optimalizacija ishrane jagnjadi u brdsko-planinskom području Srbije. *Biotehnologija u stočarstvu*, vol. 20 (1-2), p. 89-92.

CMILJANIĆ R., PAVLOVSKI ZLATA, TRENKOVSKI S., LUKIĆ, M. (2005): New trends in poultry nutrition. 8th International Symposium "Modern Trends in Livestock Production", Belgrade-Zemun, 5-8. October 2005. (uvodni referat), *Biotechnology in Animal Husbandry*, Vol. 21 (5-6), 241-245.

CMILJANIĆ R., PAVLOVSKI Z., TRENKOVSKI S., LUKIĆ M. (2006) : Effects of application of enzyme preparation in poultry nutrition. 4<sup>th</sup> International Scientific Conference "Urgent Biological Problems in Animal Production"5-7 Sept. 2006, Borovsk, Rusija, Materijal Conference, 356-357.

DEDOVIĆ B. N. (1995): Aktivacija ras protoonkogeni u benignim i malignim tumorima glave i vrata.Magistarska teza.Beograd.

ERCEG S., PETROVIĆ P.M., TRENKOVSKI S., ALAVANTIĆ D.,(1999):The identification of breed - specific and individual - specific rapid markers in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry* 15, 1-2,p.11 – 20.

GORDON A. H.(1975): Elektroforezis of Proteins in Polyacrylamide and Starch gels.North – Holland Publisny Company, Amsterdam, Oxford, American Elsevier. Publ.Comp.,Inc. New York.

GLIŠIĆ S. (1992): Polimorfizam DNK na 3 kraju gena apolipoprotein B i nivoi ukupnog holesterola u LDL Holesterolu u serumu: Studija normolipidemičnih osobina.Magistarski rad,Beograd.

JOVANOVIĆ S.,SAVIĆ M.,TRAILOVIĆ R.,(1997): Genetska otpornost životinja na bolesti i mogućnost selekcije. *Biotehnologija u stočarstvu*, (3-4),33-39.

KALIMANOVSKA V. (1989): Polimorfizam eritrocitnih enzima kod pojedinih etničkih grupacija u Jugoslaviji. Doktorska disertacija, Beograd.

---

PETROVIĆ P.M., ŽUJOVIĆ M., NEGOVANOVIĆ D., VLAHOVIĆ M., MEKIĆ C., ALAVANTIĆ D.,(1997): Stanje i oplemenjivanje ovaca. Biotehnologija u stočarstvu, (3-4),83 –87.

PETROVIĆ P. M., JOVANOVIĆ S., VLAHOVIĆ M., TRENKOVSKI S., STRSOGLAVEC S.,(1998): Genetski polimorfizam hemoglobina nekih genotipova ovaca. Biotehnologija u stočarstvu, (1-2),39-45.