

Elektroforetické metody

Petr Breinek

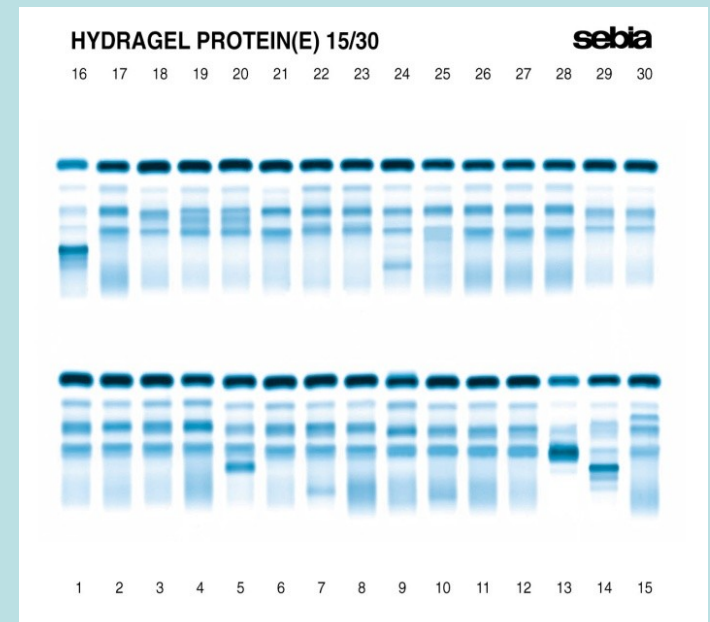


Elektroforéza-I 2012

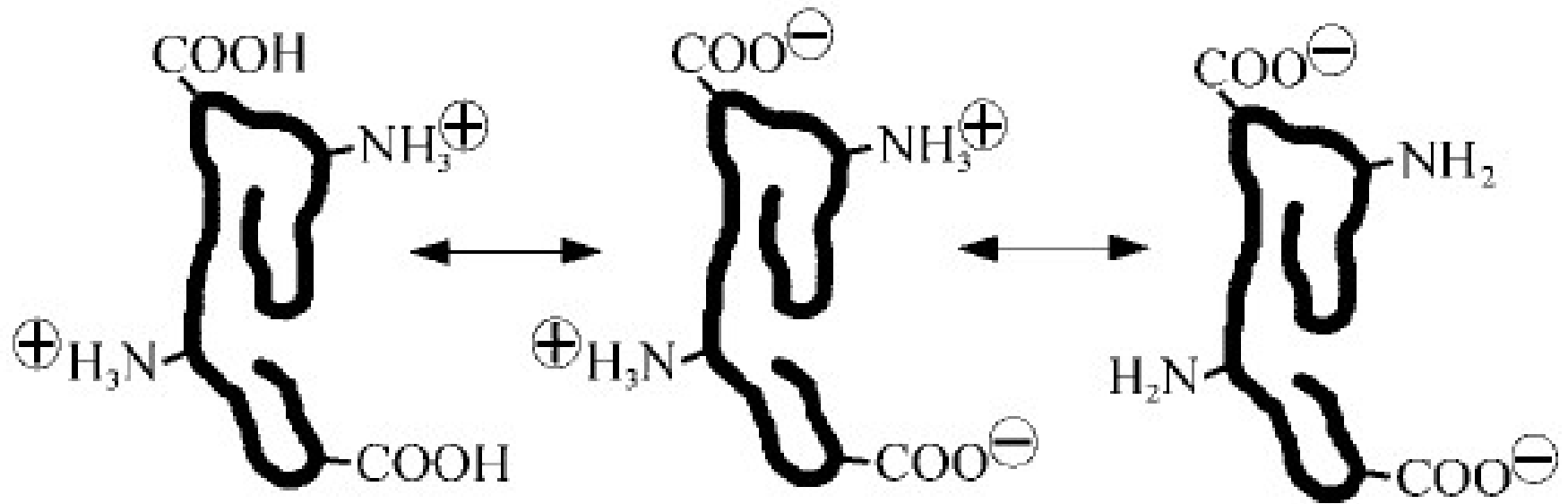
Elektroforéza je analytická metoda založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli v tekutém mediu.

Pohyblivost částic závisí na:

- velikosti náboje
- velikosti a tvaru částice
- hmotnosti částice
- vlastnostech prostředí



Bílkoviny: elektrický náboj



pH < pI
bílkovina je
polykation

pH = pI
výsledný náboj
bílkoviny je nulový

pH > pI
bílkovina je
polyanion

Při pH = 8,6 putují bílkoviny od katody (-) k anodě (+)

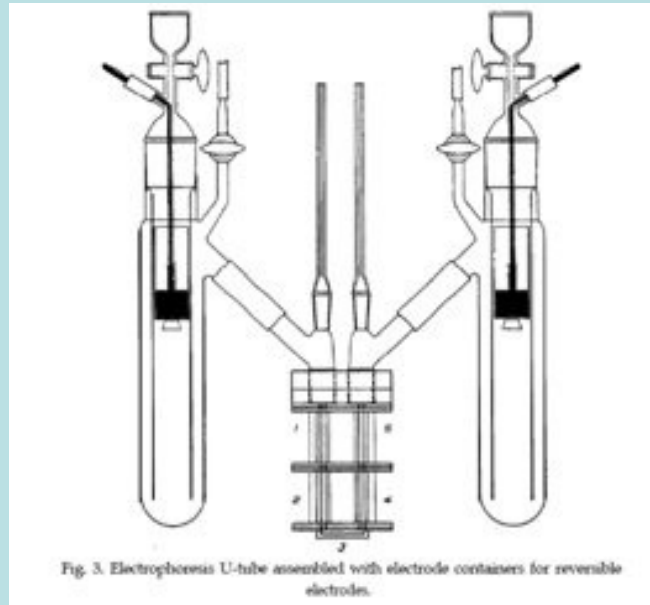
Rozdělení elektroforetických technik

1. Volná (Arne W. Tiselius – Nobelova cena; 1948)

Vodné roztoky (elektrolyty)

Částice putují k elektrodě s opačnou polaritou

Problém: vznikající teplo,....



Rozdělení elektroforetických technik

1. Volná

2. Zónová na nosičích

Izoelektrická fokuzace (IEF)

SDS gelová elektroforéza

Dvojrozměrná (two-dimensional, 2-DE))

Kapilární elektroforéza (CE)

Izotachoforéza

Nosiče

- Papír
- Acetátcelulózová folie
- Gel

Agarózový gel

Škrobový gel

PAGE - SDS

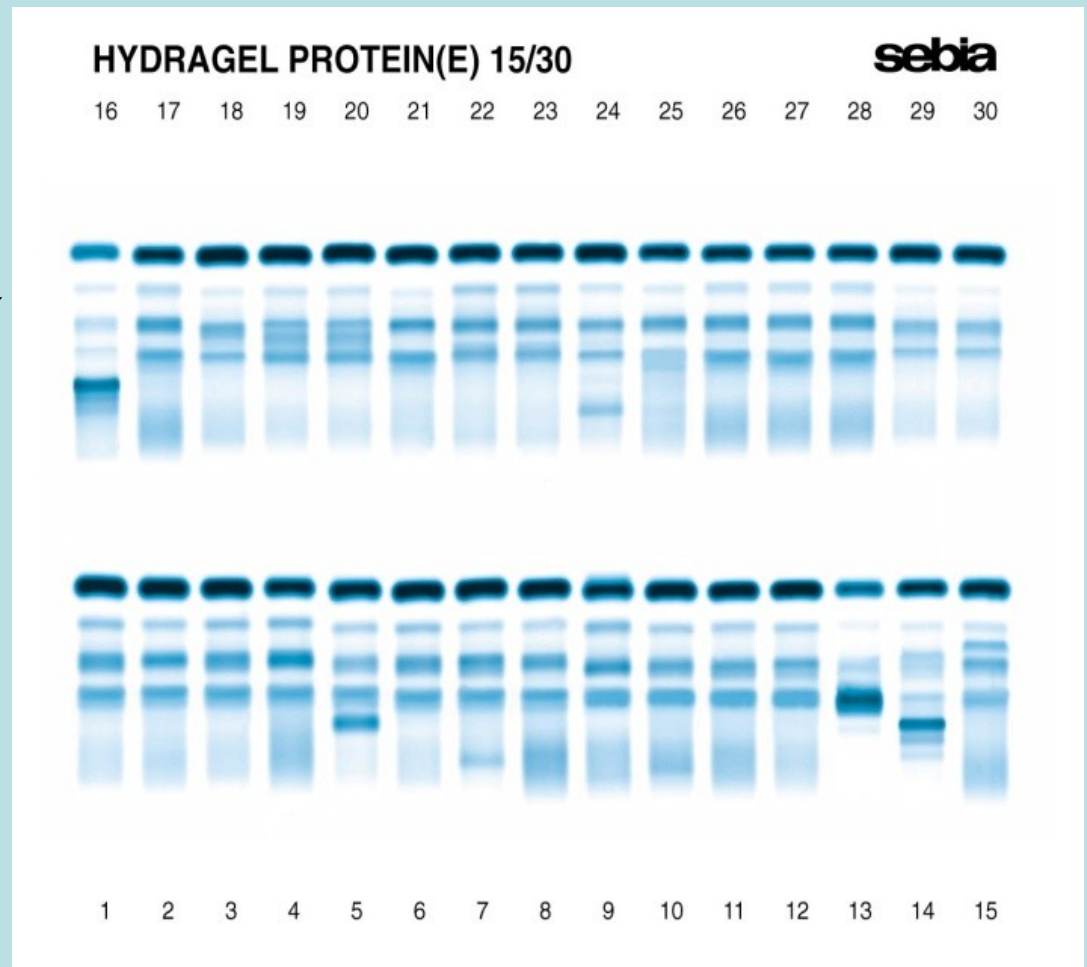
Polyakrylamidový gel (PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis)

sítový efekt; endoosmóza,...

Elektroforéza bílkovin v krevním séru

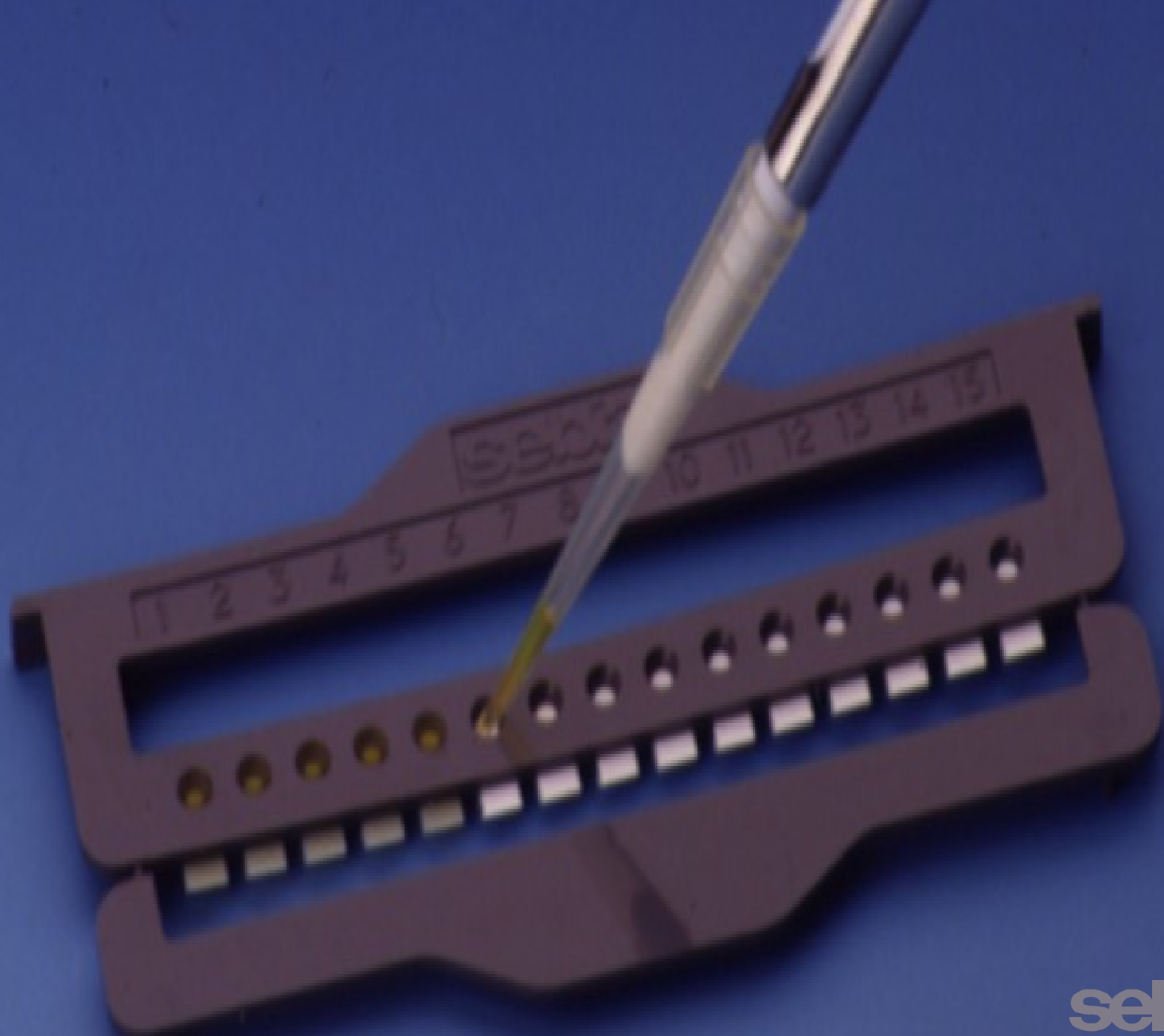
Postup (zjednodušeně):

- Aplikace vzorků
- Dělení
- Fixace a barvení
- Odbarvení
- Sušení
- Vyhodnocení
- pH = 8,6

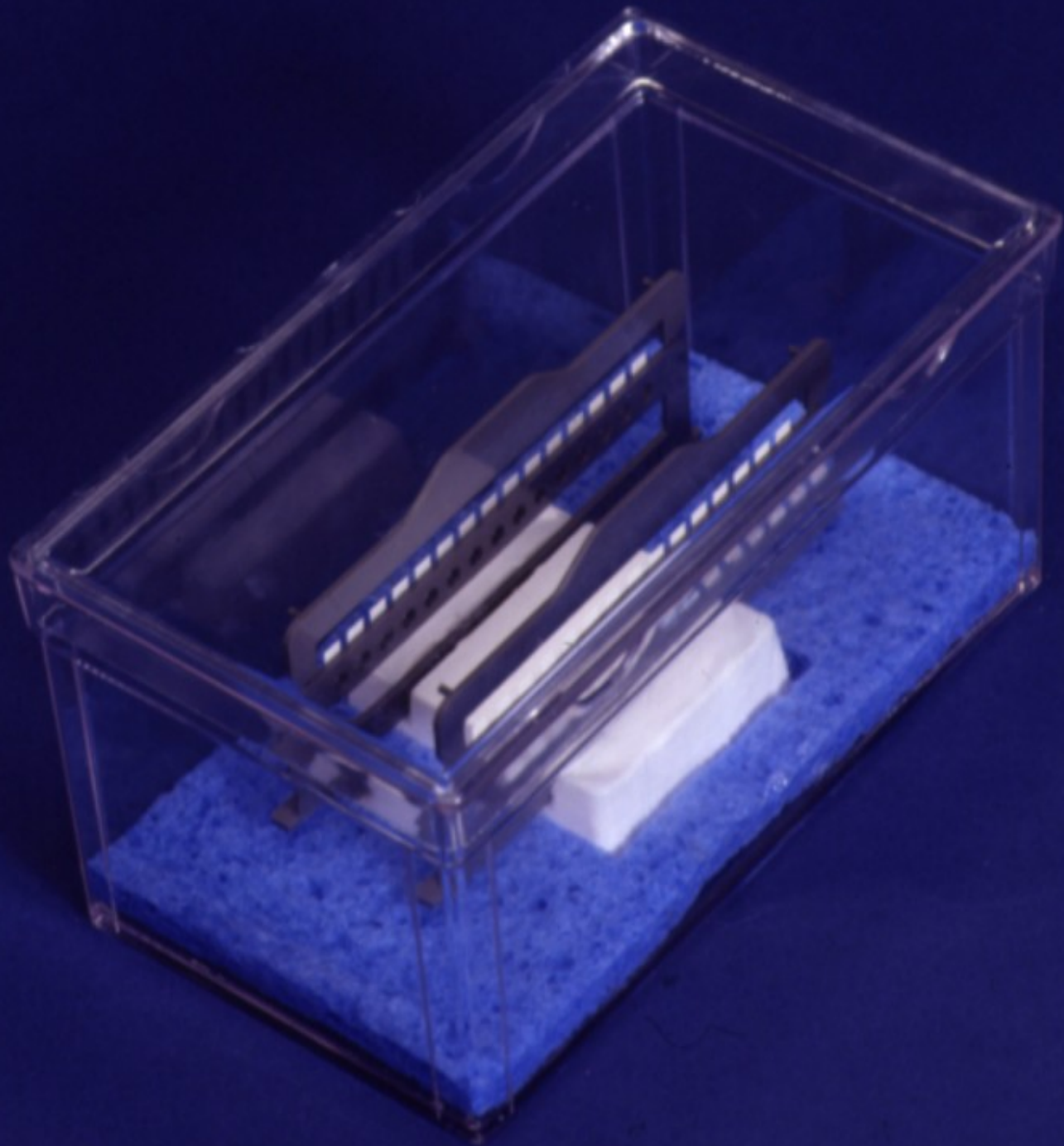


Automatický elektroforetický přístroj Hydrasys (Sebia, Francie)

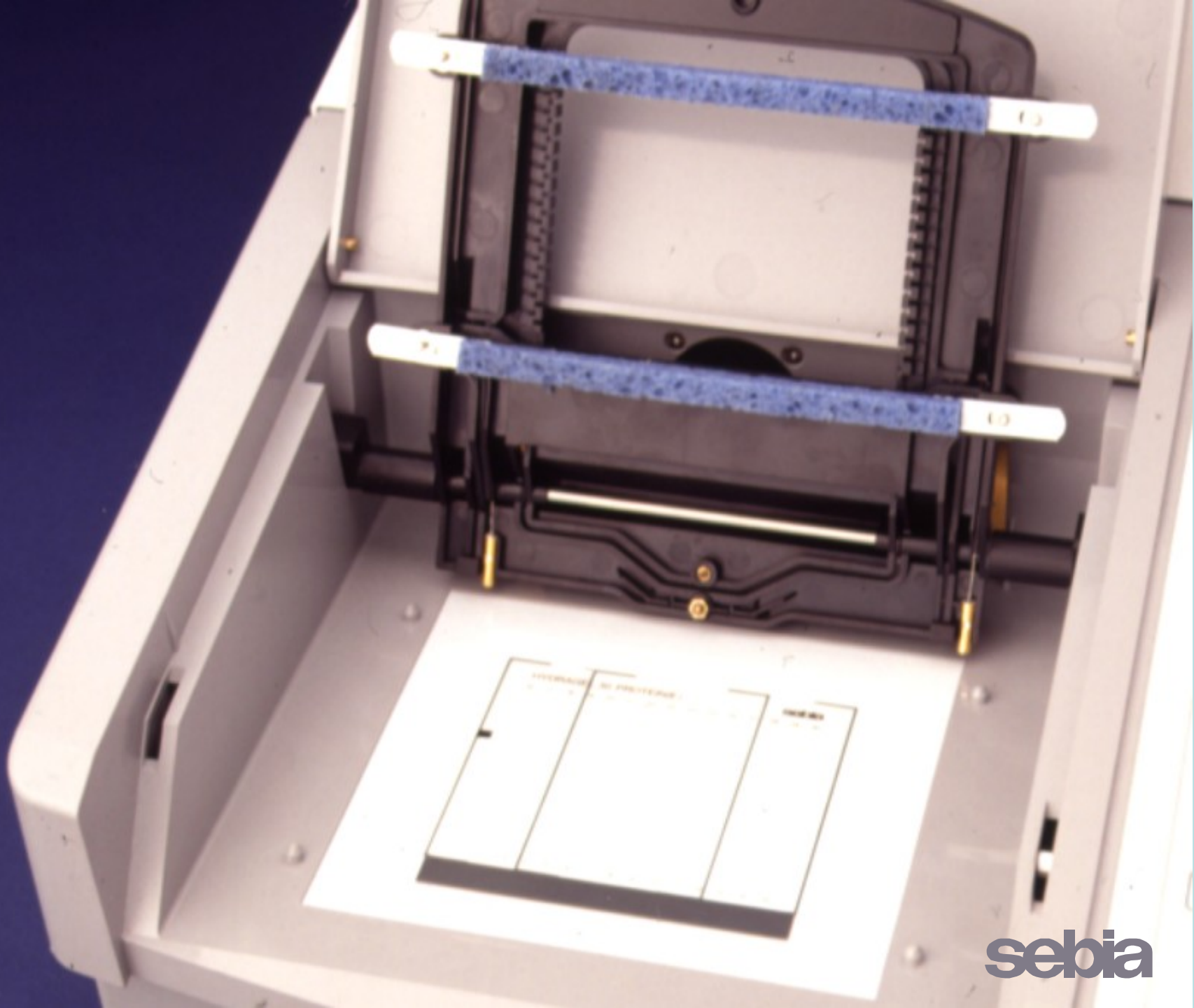




sebia



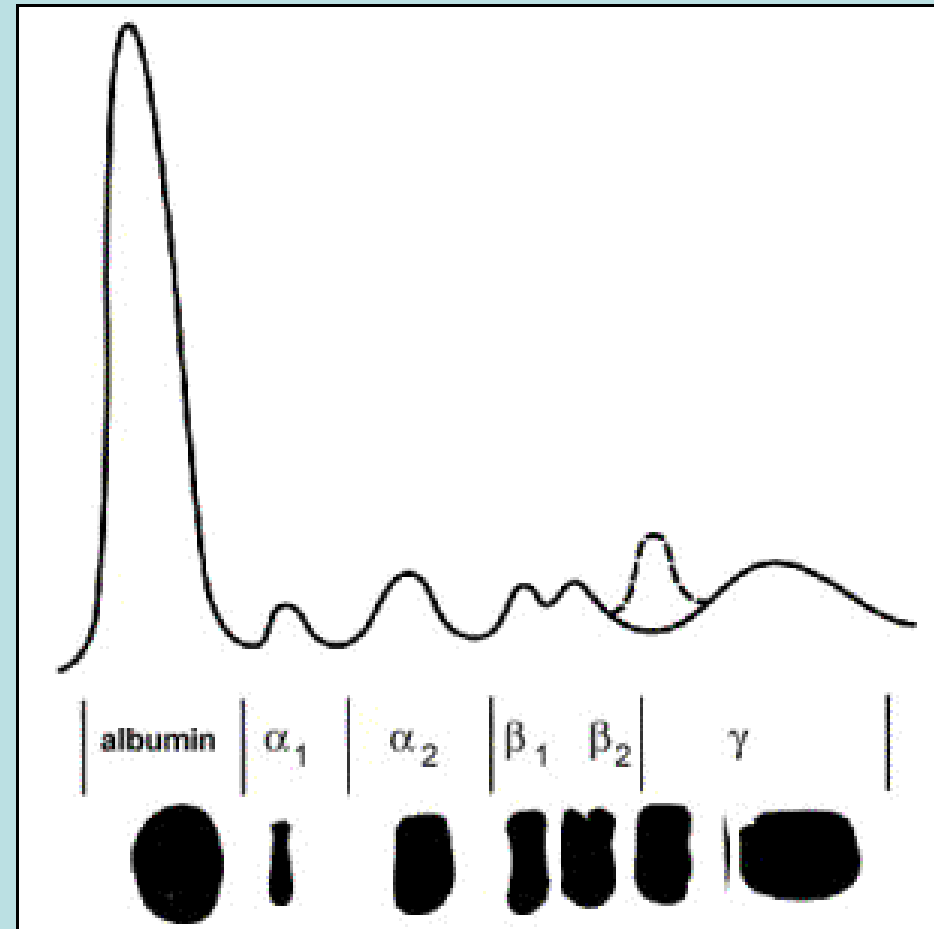
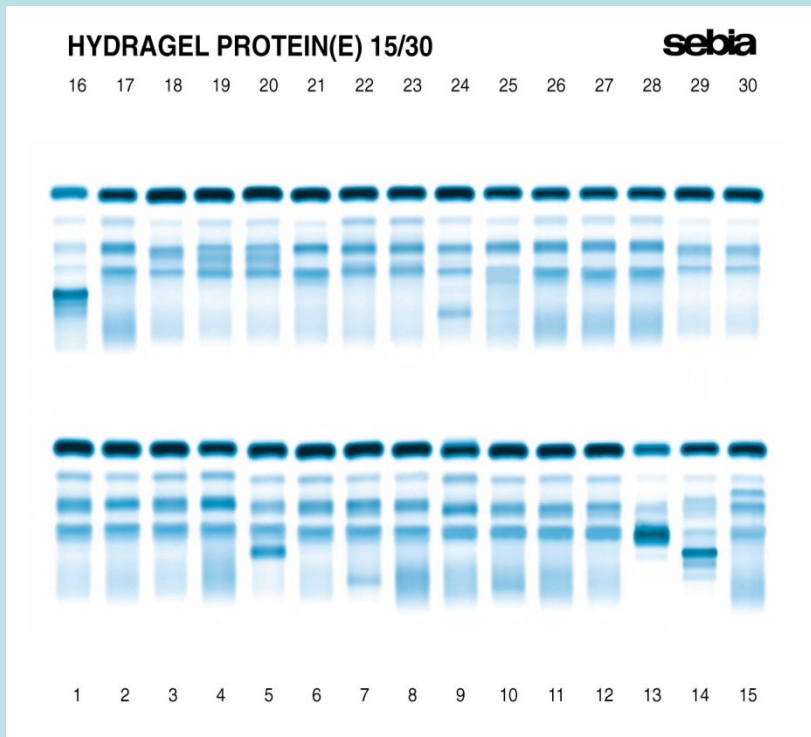
sebia



sebia

Vyhodnocení elektroforeogramů

- ❖ vizuální hodnocení
- ❖ denzitometricky
- ❖ skener
- ❖



IZOENZYMY

HYDRAGEL ISO CK/LD 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



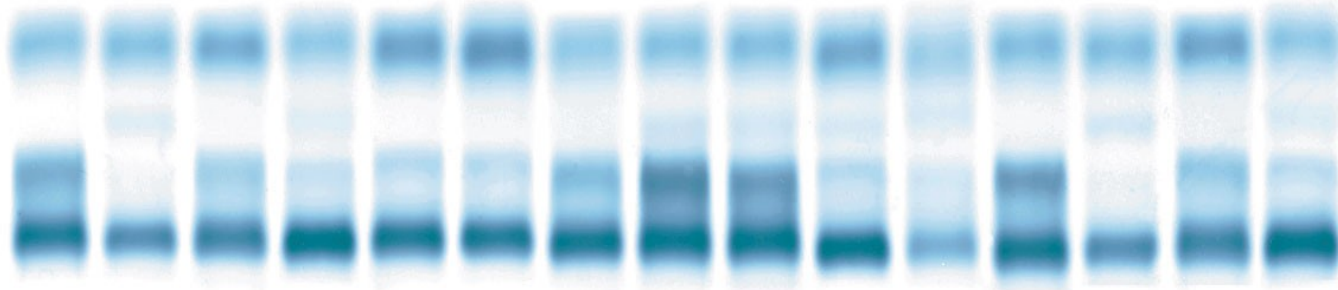
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

LIPOPROTEINY

HYDRAGEL LIPO + Lp(a) 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

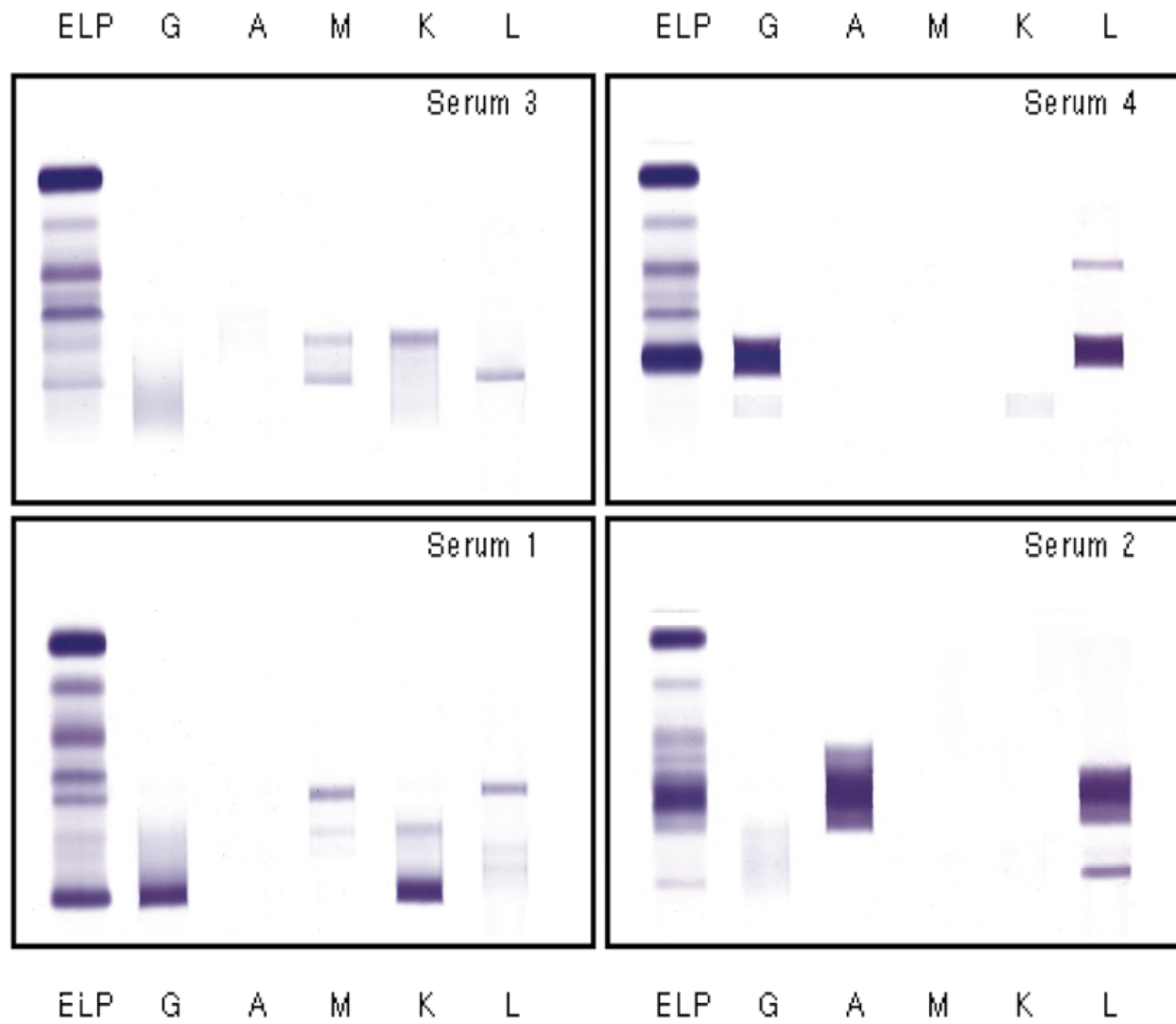


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

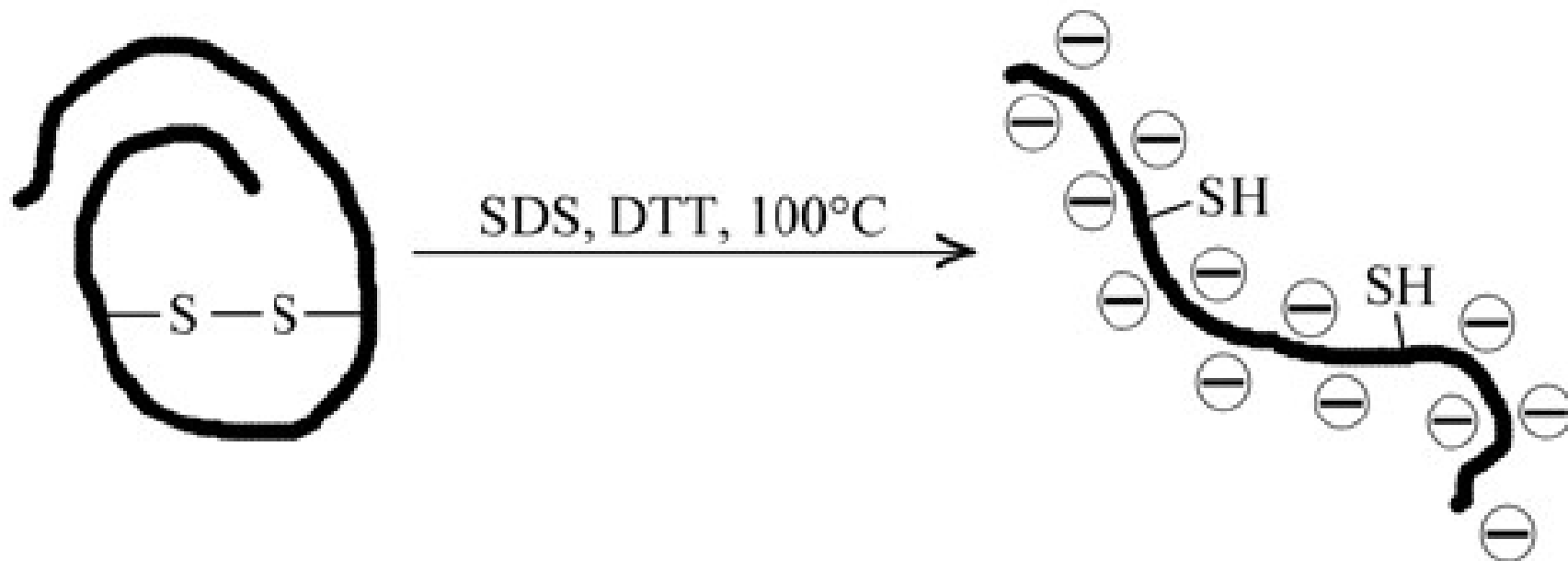
IMMUNOFIXACE

HYDRAGEL 4 IF

sebia



PAGE SDS elektroforéza

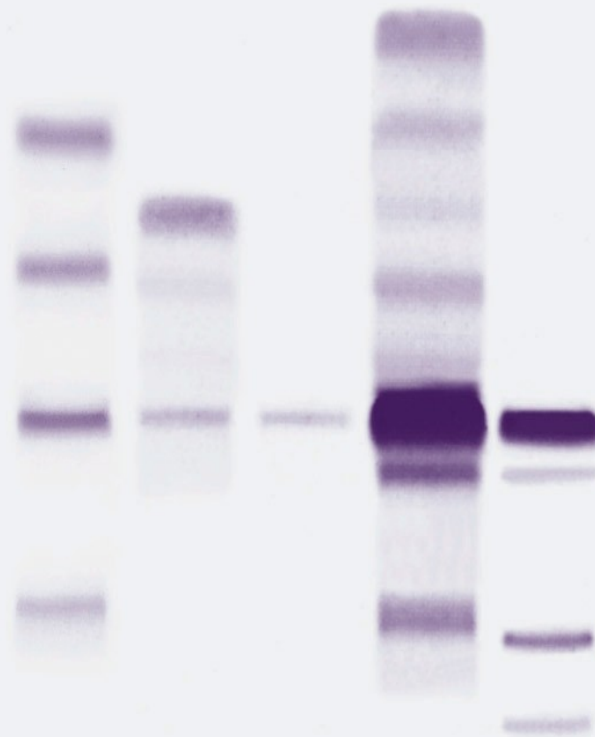


SDS = dodecylsírán sodný

Zrušení disulfidických vazeb, bílkoviny získají stejný elektrický náboj, pohyblivost závisí na molekulové hmotnosti

PROTEINURIE

HYDRAGEL 5 PROTEINURIE



1

2

3

4

5

sebia

Izoelektrická fokuzace (IEF)

IEF je technika rozdělující bílkoviny podle jejich **izoelektrických bodů (pI)**

- **Dělení probíhá v gelu s lineárním pH gradientem vytvořeným směsí amfolytů (100-200), každý amfolyt má jiný izoelektrický bod**

Příklad využití IEF

Stanovení oligoklonálních pásů IgG v likvoru

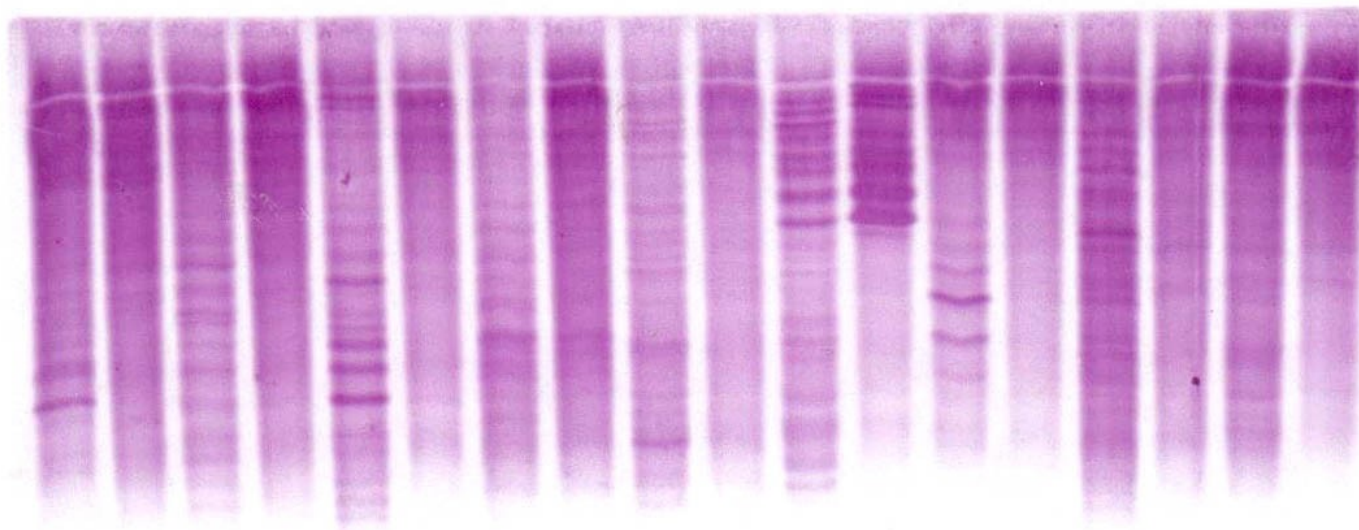
- Bez zahuštění likvoru
- Současně se analyzuje sérum a likvor (ve stejné koncentraci)
- Imunochemická detekce a barvení

Stanovení oligoklonálních IgG pásů v likvoru a v krevním séru metodou izoelektrické fokuzace s následným imunofixačním barvením umožňuje kvalitativní vyjádření intratekální syntézy IgG.

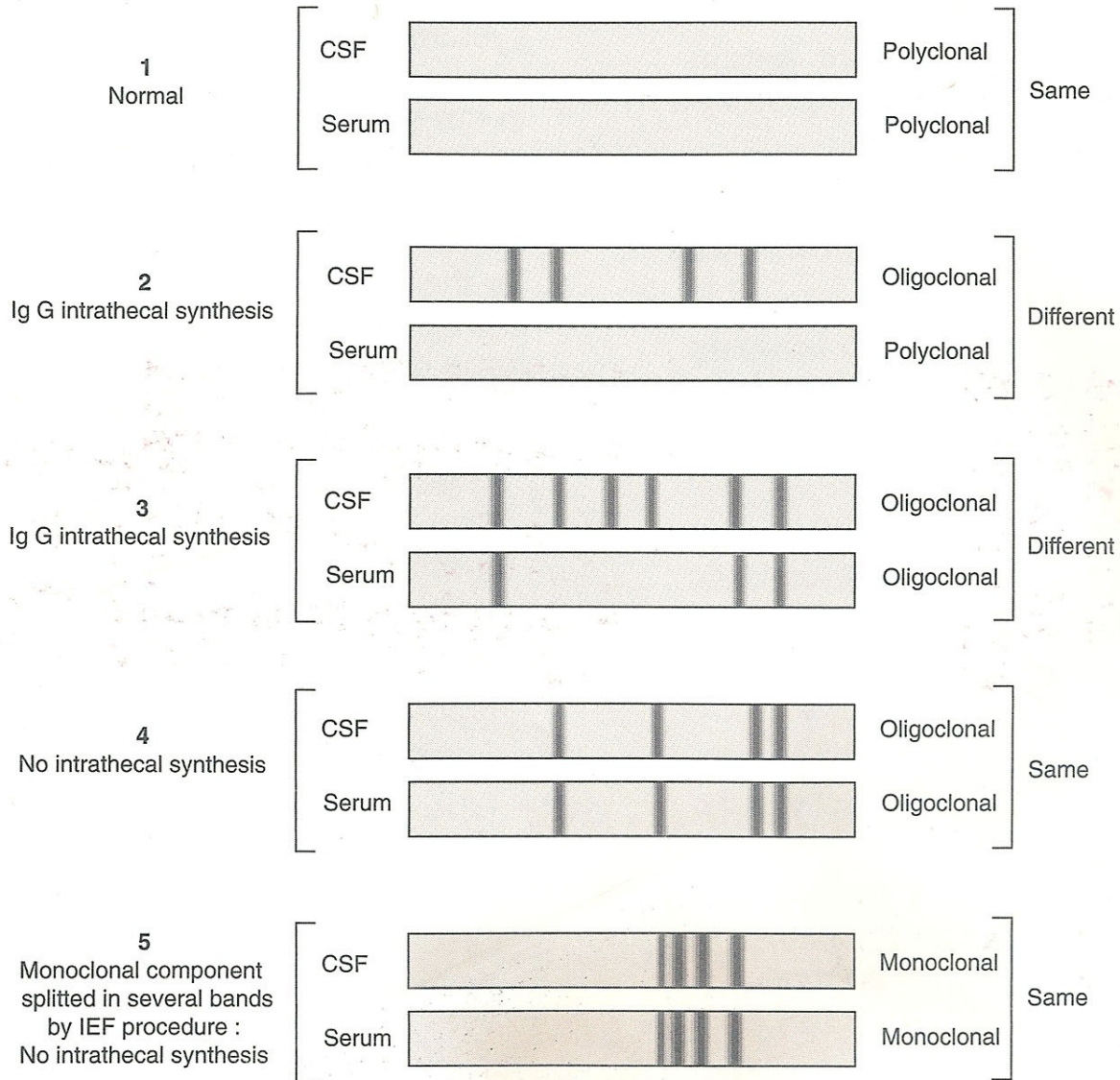
HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

sebia

1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 7 7' 8 8' 9 9'



5 TYPES OF OLIGOCLONAL PATTERNS

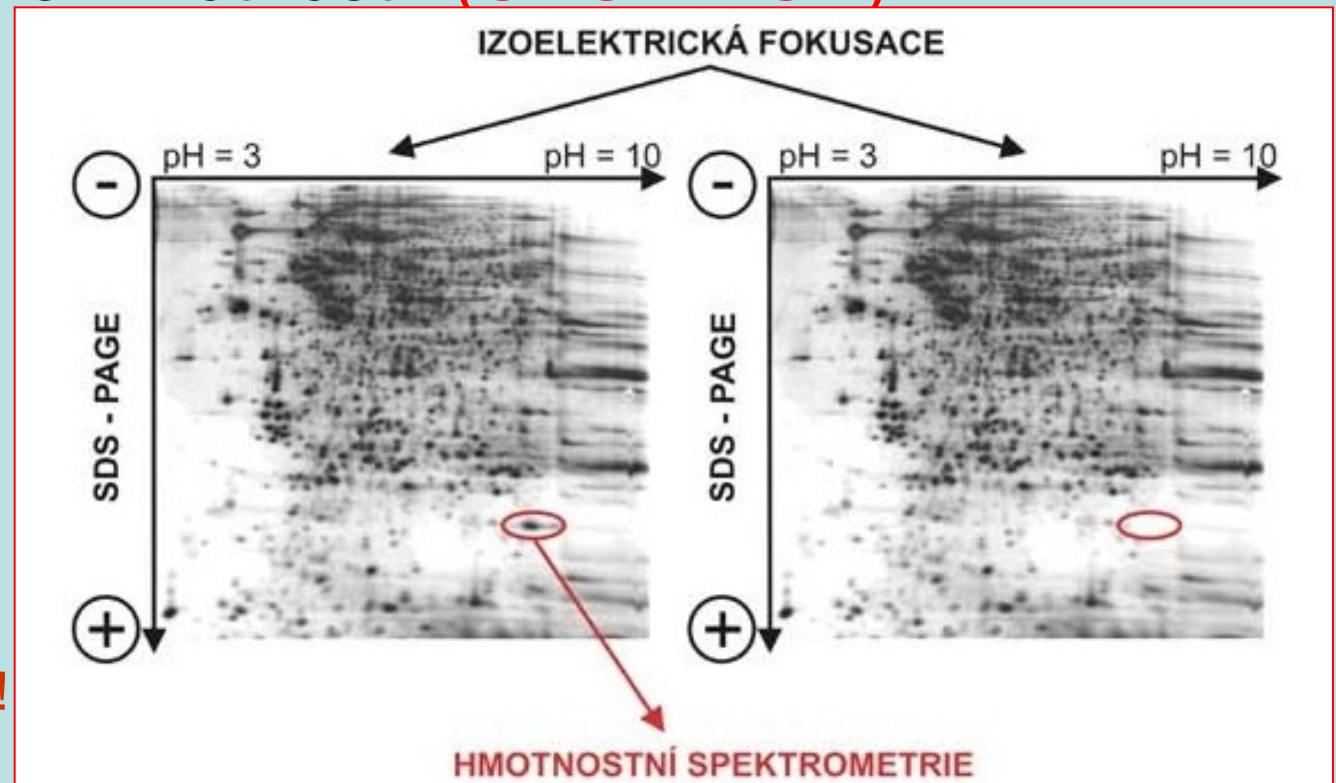


Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

- ✓ Nejdříve jsou proteiny rozděleny podle svých izoelektrických bodů (IEF)
- ✓ a následně se proteiny dělí v závislosti na jejich molekulové hmotnosti (SDS-PAGE)

Použití:

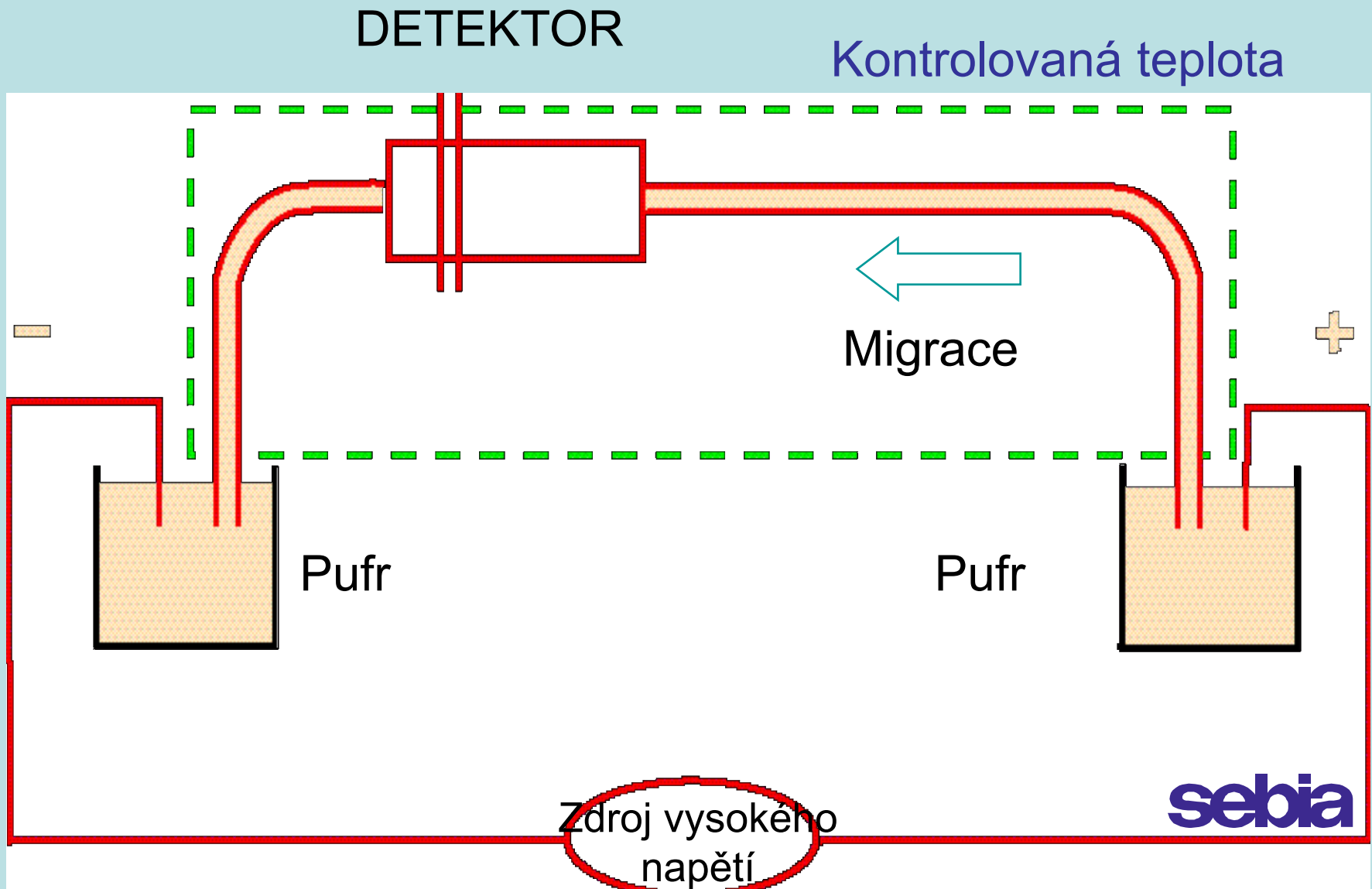
Separace
komplexních
směsí
bílkovin
(proteomika)
Až několik tisíc
proteinových skvrn!



Kapilární elektroforéza

- Je technika založená na principu elektrokinetické separace v kapiláře malého vnitřního průměru (10 až 100 μm), dlouhé 20 až 200 cm; naplněné elektrolytem při vysokém napětí (7 700 V)
- Různé provedení (gel, IEF, volná,...)
- Výsledkem je rychlá a velice účinná separace molekul s výborným rozlišením.
- Roztok putuje kapilárou najednou

PRINCIP KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

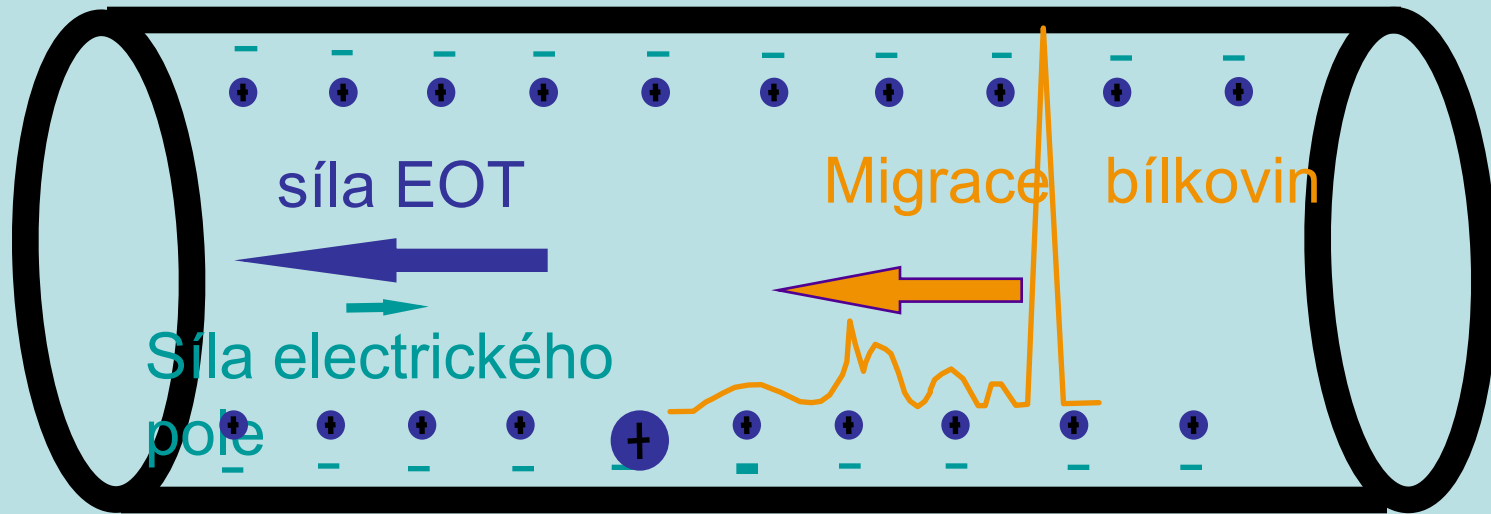


DETEKCE

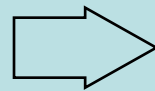
NASÁTÍ
VZORKU

Katoda -

Anoda +



- ⊕ Kladný náboj z pufru
- Záporný náboj na stěně capiláry



Elektro-osmotický tok (EOT) je mnohem silnější než elektrické pole.

Ve výsledném efektu, jsou všechny bílkoviny unášeny ke katodickému konci kapiláry.



CAPILLARYS

