

Elektroforetické techniky

Mgr. Jana Gottwaldová
OKB FN Brno

Osnova

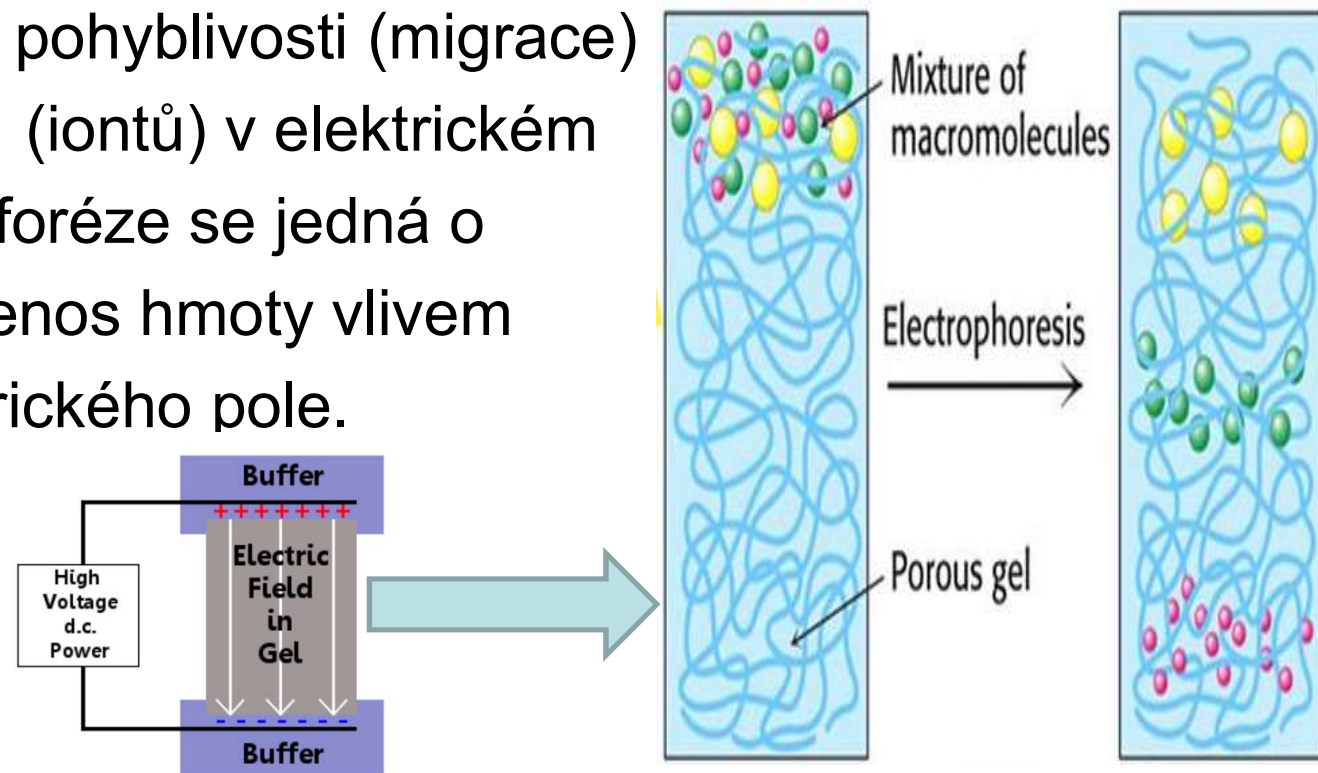
1. Princip elektroforézy
2. Popis základního technického vybavení
3. Rozdělení elektroforetických technik (volná a na nosičích)
4. Zónová elektroforéza – gelová (AGE, PAGE)
5. Hlavní typy gelové elektroforézy (nativní, denaturační, kontinuální, diskontinuální....)
6. Zpracování gelu po separaci
7. Základní elektroforetické techniky (IEF, CE.....)
8. Praktické využití elektroforetických technik v klinické zdravotnické laboratoři

Elektroforéza

Elektromigrační separační metoda

Princip:

využití rozdílné pohyblivosti (migrace) nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Při elektroforéze se jedná o mechanický přenos hmoty vlivem působení elektrického pole.

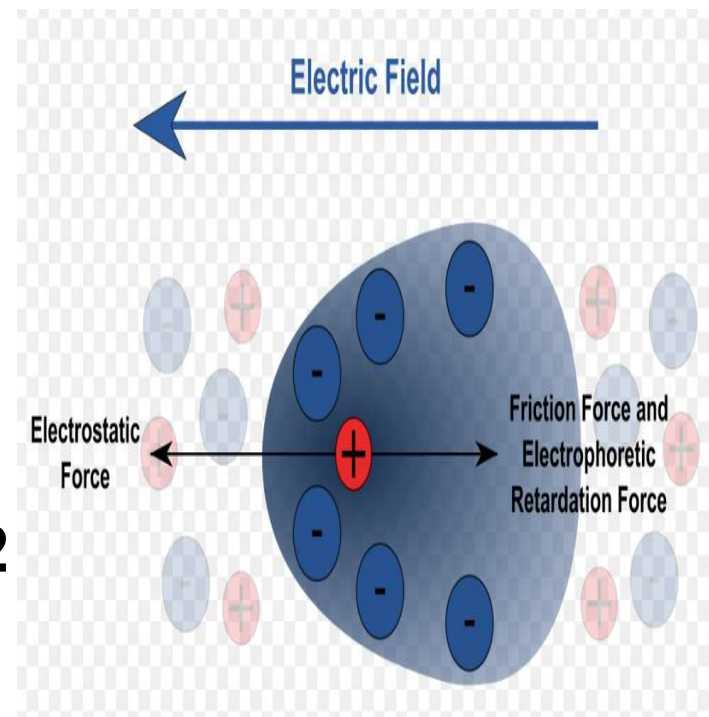


Princip elektroforézy

Elektroforéza využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Toto elektrické pole je vytvořeno vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody .

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly:

- **elektrostatická síla F_1** - která jí uvádí do pohybu
- **odpor viskózního prostředí F_2** který jí brzdí



Princip elektroforézy

- hnací silou pohybu částice je rozdíl mezi elektrostatickou silou **F1** a odporem prostředí **F2**.
- v počátečním okamžiku je rychlost **v** nulová, částice je uvedena do pohybu elektrostatickou silou **F1**.
- s rostoucí rychlostí **v** roste síla **F2** (odpor prostředí) tak dlouho, až se obě síly působící na částici vyrovnají a nastane **stacionární stav**:

$$\mathbf{F1 = F2 ; QE = kv}$$

Elektroforetická pohyblivost - μ

Rychlost pohybu určité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě je definována jako **elektroforetická pohyblivost μ**

Ve stacionárním stavu: $F_1 = F_2$; $QE = kv$,

kde: $k=6\pi r\eta$ a $E=1$ [Volt/cm] \rightarrow elektroforetická pohyblivost: μ

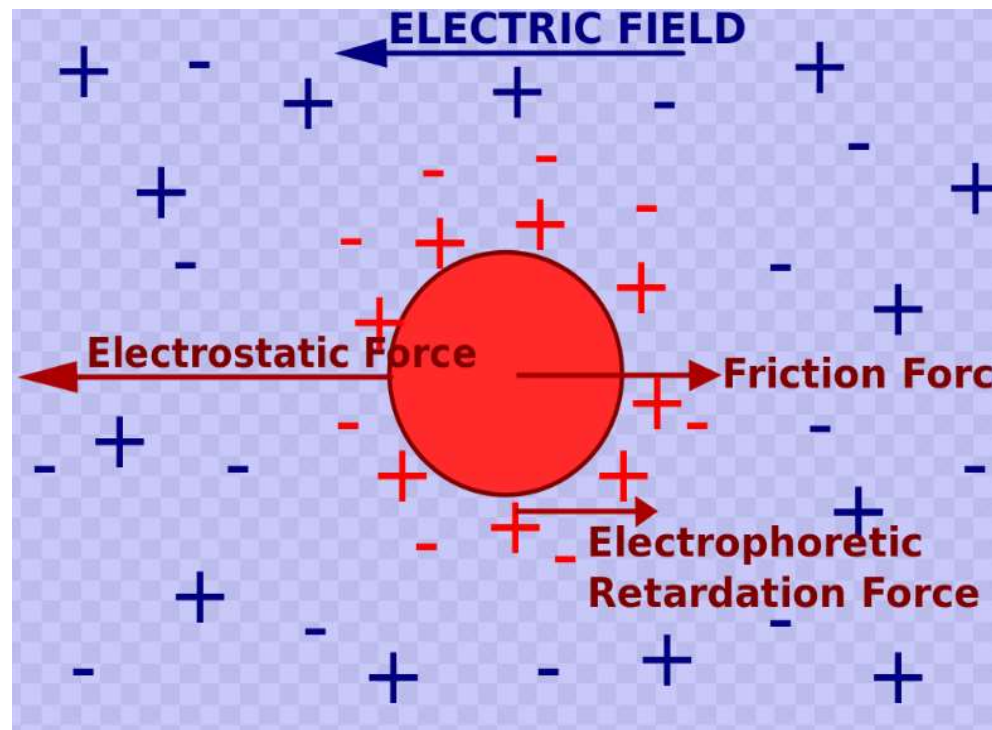
$$\mu = Q / 6\pi r\eta$$

[$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$]

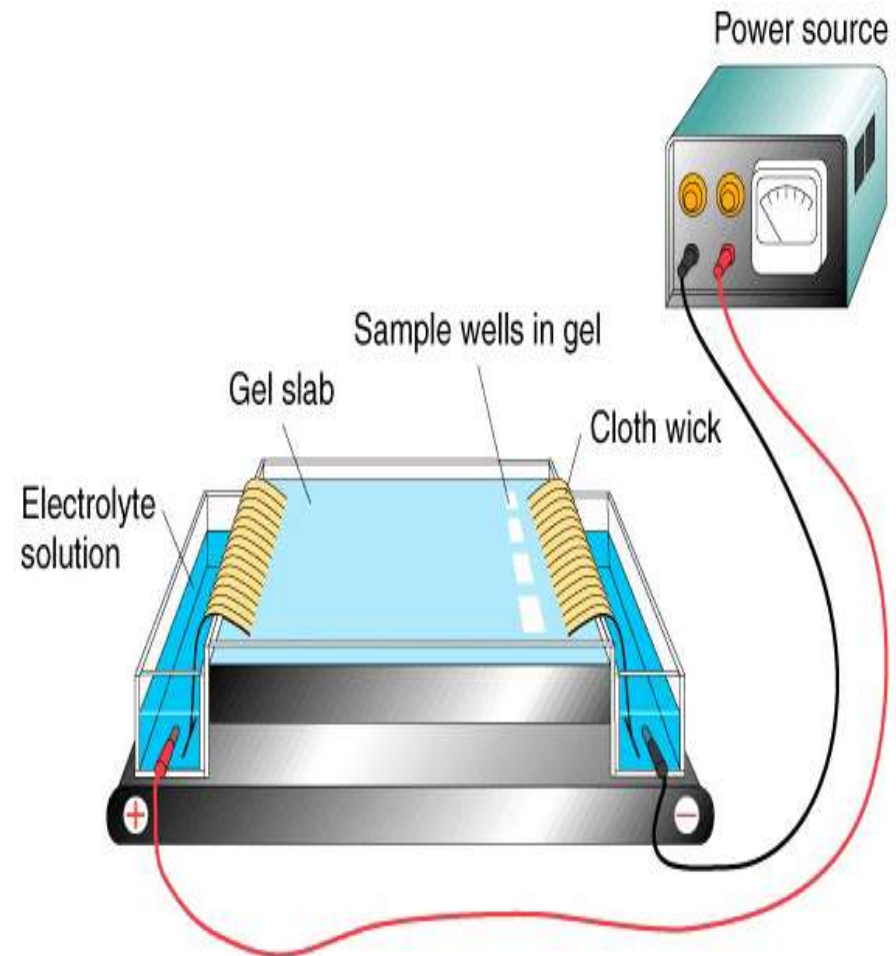
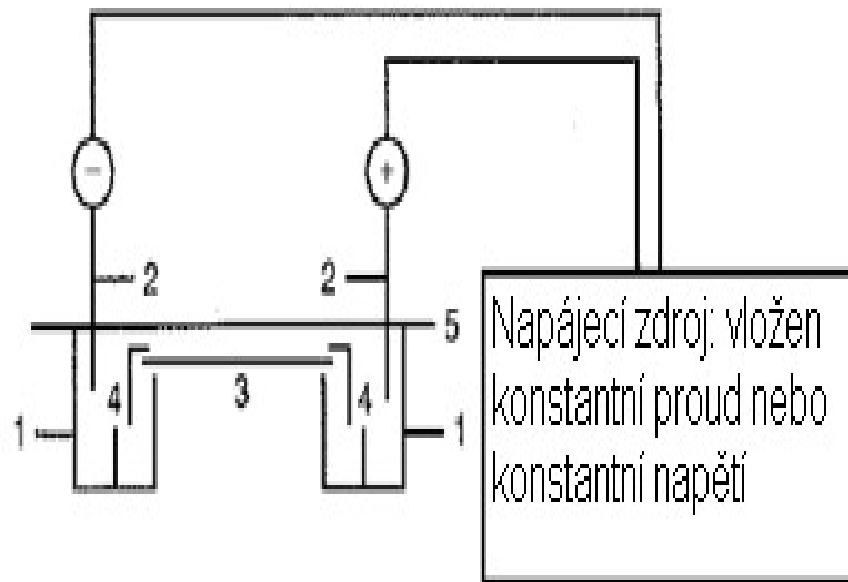
Q...náboj

r... poloměr částice

η ...vizkozita prostředí



Technické uspořádání elektroforetické aparatury



Napájecí zdroj

- **Funkce:** dodání elektrické energie.
- napájecí zdroje umožňují provoz v podmínkách **konstantního proudu, napětí nebo výkonu**, které jsou nastavitelné.
- Parametry $E=240\text{ V}$, $I=10\text{ mA}$ na 1 cm
- Při průtoku proudu elektrolytem vzniká tzv. **Jouleovo teplo**: Q nebo H (heat) = $E \cdot I \cdot t$
Kde: E = napětí (V), I = proud (A), t = čas (s)

Pufry při elektroforéze

Funkce pufry:

- nese vložený proud
- stanoví pH, při kterém probíhá elektroforetické dělení
- určuje výsledný elektrický náboj rozpuštěné látky

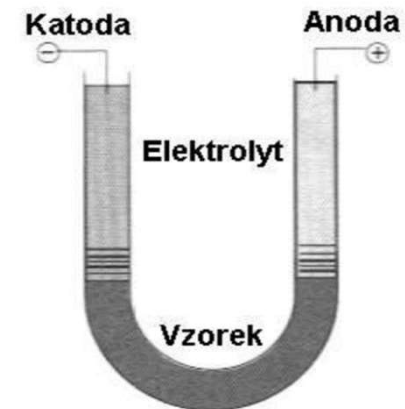
Iontová síla pufry ovlivňuje :

- vodivost nosného média
- tloušťku iontové atmosféry okolního náboje molekuly
- rychlost migrace
- ostrost elektroforetických zón

Rozdělení elektroforetických technik

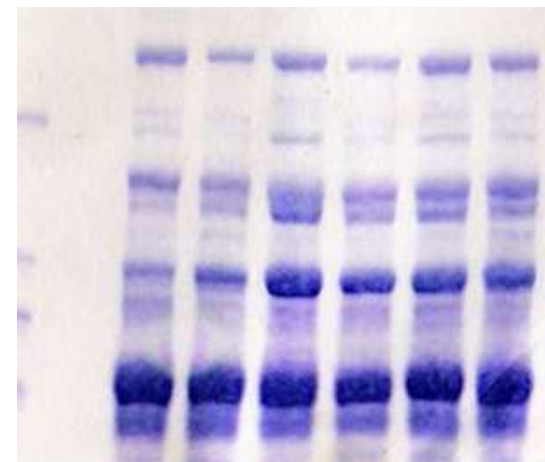
- **Volná elektroforéza**

provádí se ve vodných roztocích, kde částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou.



- **Elektroforéza na nosičích**

chromatografický papír, škrob, acetylcelulóza, agar, agaróza, polyakrylamid - gely mají dvojí funkci: 1) brání rozšíření píků vlivem teploty (antikonvekční efekt), 2) fungují jako molekulární síto (zejm. PAG – síťový efekt)



Zónová elektroforéza

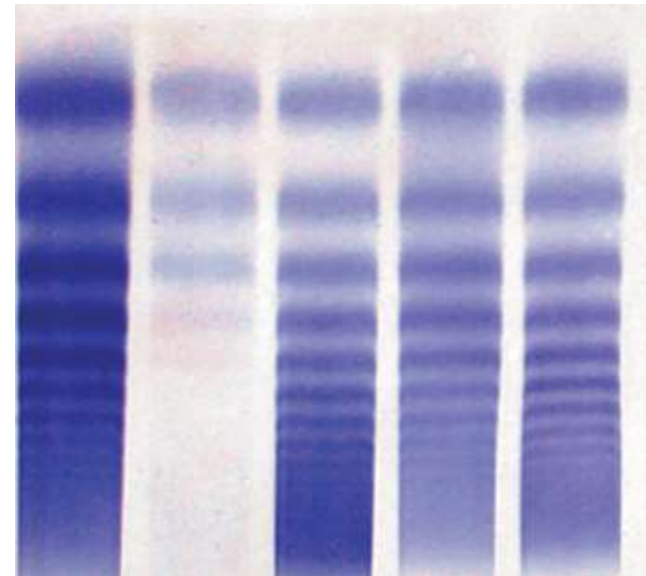
- **nosiče** pro zónovou elektroforézu jsou nerozpustné ve vodě, porézní, s co nejmenšími absorpčními schopnostmi
- prvními použitými nosiči byly neklížený (chromatografický) papír, acetát celulózy, škrob a celulóza
- v současné době se jako nosiče používají hlavně gely – **agarózový (AGE) a polyakrylamidový gel (PAGE)**

Při přípravě gelu je možné ovlivňovat stupeň polymerace (zesíťování) - tedy velikost pórů.

Zónová elektroforéza

Rychlost migrace proteinů závisí na těchto faktorech:

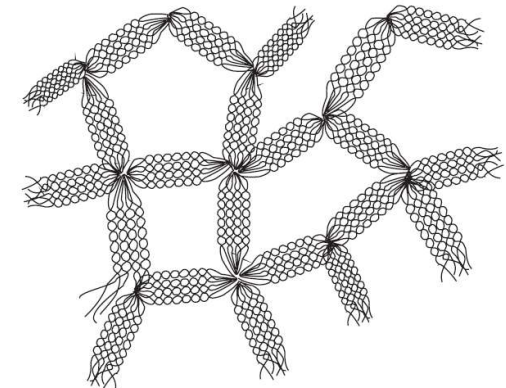
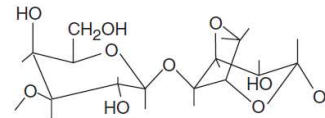
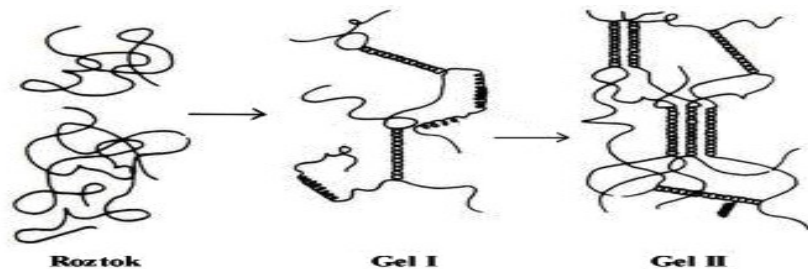
- Elektrický náboj molekuly
- Velikost a tvar molekuly
- Síla elektrického pole
- Vlastnosti nosného média
- Teplota



Proteiny s rozdílnou pohyblivostí migrují v gelu jako **pásy (bandy)**.

Elektroforéza v agarózovém gelu

- lineární **polysacharid**, jehož základní strukturní jednotka je složena z **D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy**
- příprava tzv. **gelifikací agarózy**: agaróza má za nižších teplot podobu gelu, gelifikuje působením vyšší teploty.
- **Bod tání** závisí na koncentraci a typu agarózy asi 85-100 ° C, **gelifikace** při poklesu teploty pod 45-50 ° C.
- nejčastěji se používá 1-2 % gel agarózy
- **velikost pórů** v gelu závisí na koncentraci agarózy, typicky se pohybuje mezi 100 - 300 nm.



Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány **podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm jeho zesíťování.**
- nejčastěji používané **koncentrace polyakrylamidu jsou 5-15%**, přičemž koncentrace n, n' -**methylenbisakrylamidu je obvykle 3-5%** celkového množství akrylamidu.
- **nevýhodou je vysoká toxicita akrylamidu a n, n' -metylenbisakrylamidu.**

Hlavní typy gelové elektroforézy

Gelová nedenačnická elektroforéza

- *Nativní gelová elektroforéza*

Gelová denačnická elektroforéza

- *SDS gelová elektroforéza*

Kontinuální zónová elektroforéza

Diskontinuální zónová elektroforéza

Gelová nedenaturační elektroforéza

Nativní gelová elektroforéza

- probíhá **bez denaturačních** činidel
- někdy jsou používány relativně vysoké, nebo nízké hodnoty pH
- **migrace** proteinů gelem závisí na jejich **náboji, velikosti a tvaru**.
- **citlivost elektroforézy** je dána charakterem pórů gelu

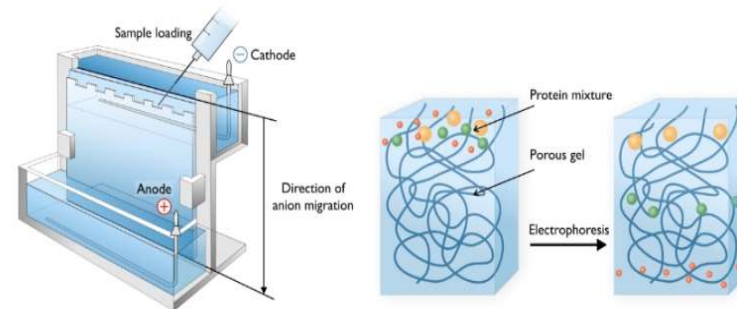
Nativní gelová elektroforéza

Faktory ovlivňující mobilitu proteinů v nativním gelu:

1. náboj proteinu:

- sekvence aminokyselin – počet kyselých a bazických zbytků
- pH roztoku
- třírozměrná struktura proteinu

2. velikost a tvar proteinu



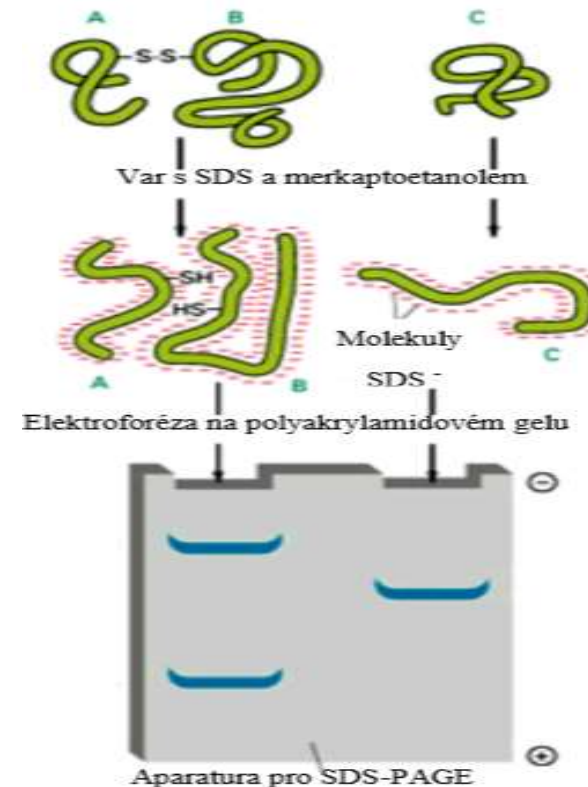
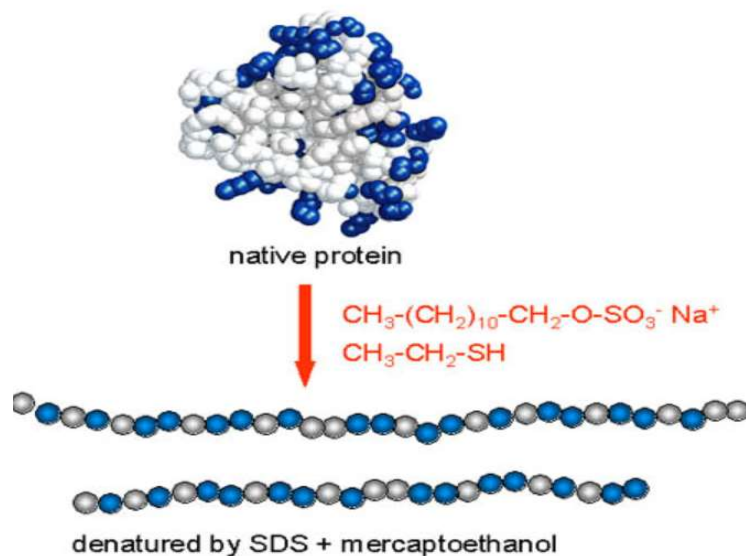
3. koncentrace a stupeň zesíťování gelu

- gel obecně snižuje mobilitu proteinů, v závislosti na jejich volné pohyblivosti (bez přítomnosti gelu)
- větší molekuly jsou gelem ovlivněny více než menší molekuly
- složení gelu může být ovlivněno tak, že dělení probíhá na základě rozdílné velikosti molekul

Gelová denaturační elektroforéza

SDS gelová elektroforéza :

- proteiny jsou **denaturovány** dodecylsíranem sodným (SDS) a β - merkптоethanolem
- Proteiny jsou **separovány podle své molekulové hmotnosti**

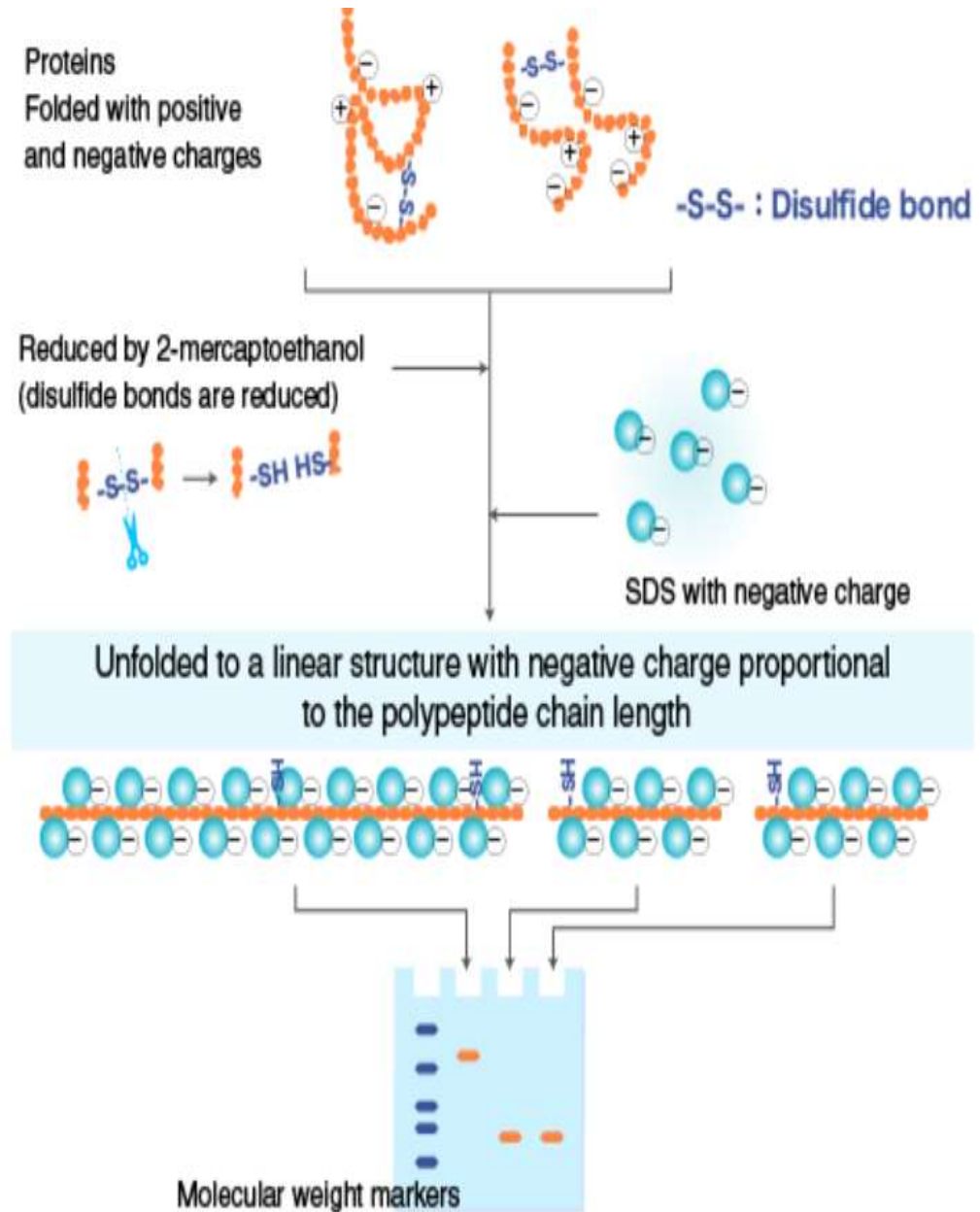
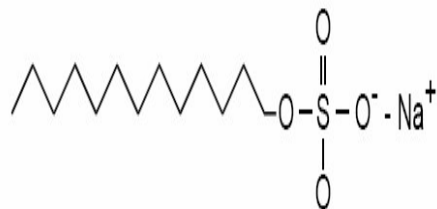


SDS gelová elektroforéza

SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, které se potom pohybují v gelu jen podle velikosti.

Vzorek proteinu se zpracuje s tzv. **vzorkovým pufrem** - obsahuje SDS a redukční činidlo β -merkaptoethanol.

Působením těchto látek dojde k rozrušení kvarterní, terciární a do značné míry i sekundární struktury.

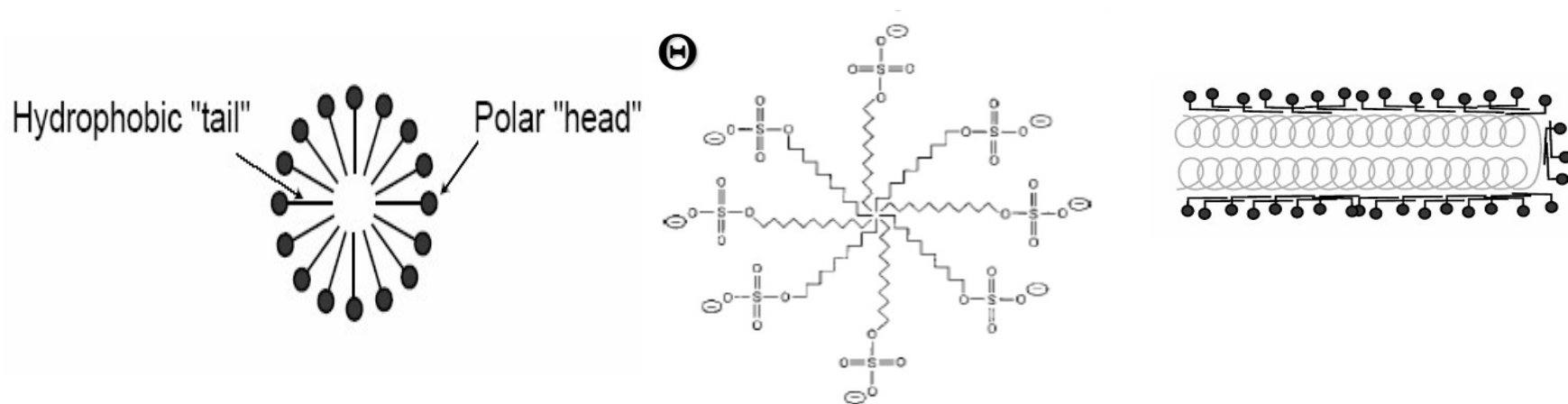


SDS gelová elektroforéza

Všechny bílkoviny váží SDS v konstantním poměru, asi **1,4g SDS na 1g bílkoviny**, a tím charakteristicky mění svou konformaci.

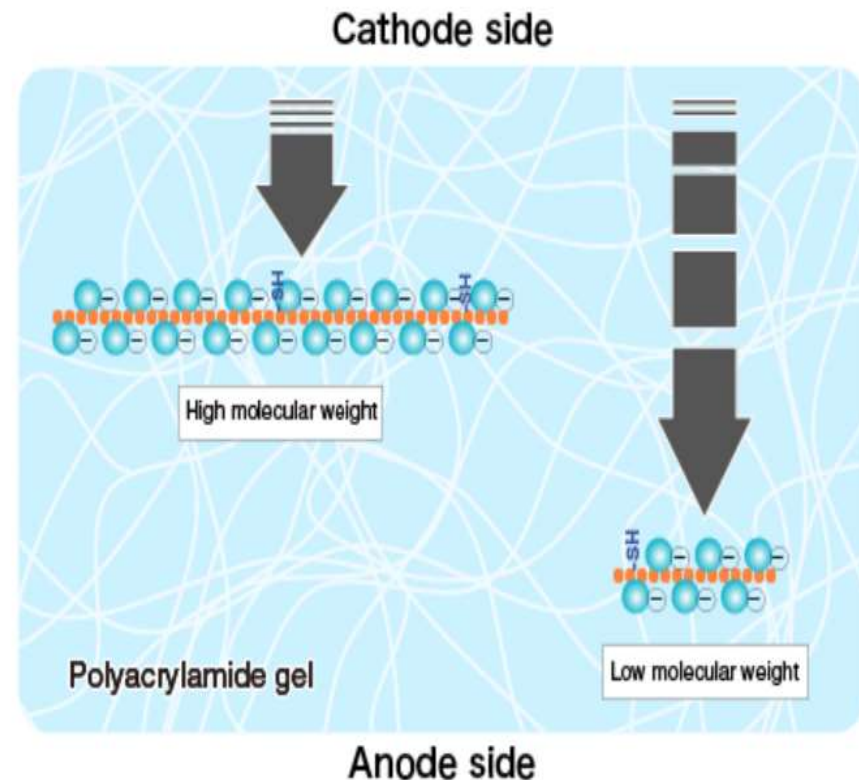
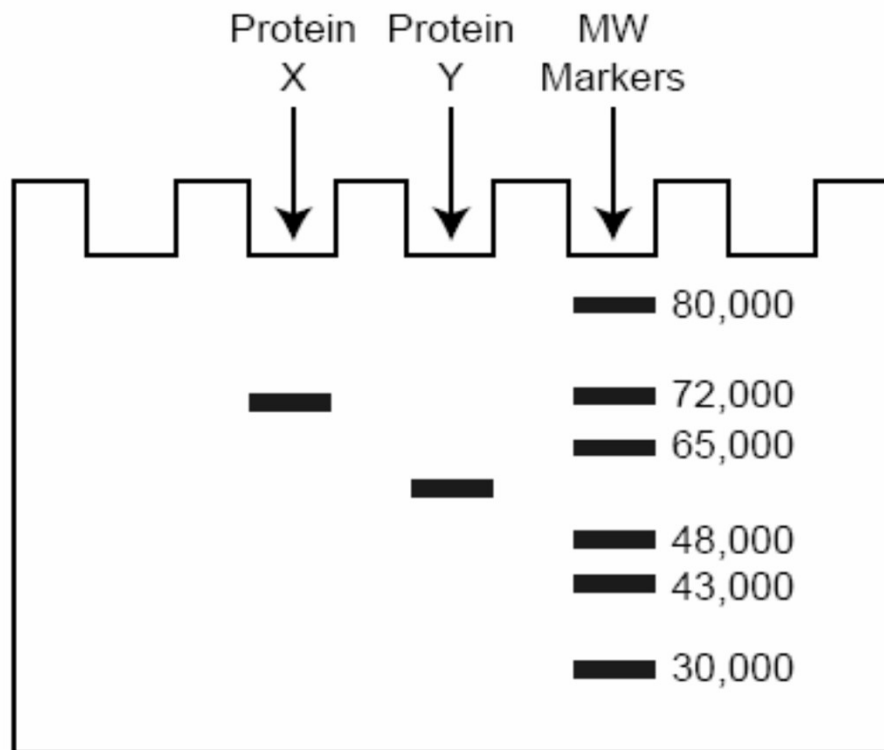
Výsledné komplexy SDS-bílkovina:

- mají stejnou hodnotu povrchového **náboje**
- **konformace** bílkovin se do jisté míry unifikuje
- **relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS.**



SDS gelová elektroforéza

Pro vlastní odhad molekulové hmotnosti neznámého proteinového vzorku se používají komerční směsi proteinů standardy.



Hlavní typy gelové elektroforézy

Kontinuální zónová elektroforéza

- Jde o nejběžnější typ elektroforézy, kdy vlastní separace probíhá v jednom médiu a většinou v jediném typu pufru

Diskontinuální zónová elektroforéza

- Pro separaci se používají gely o různé koncentraci, pufrů s gradientem pH

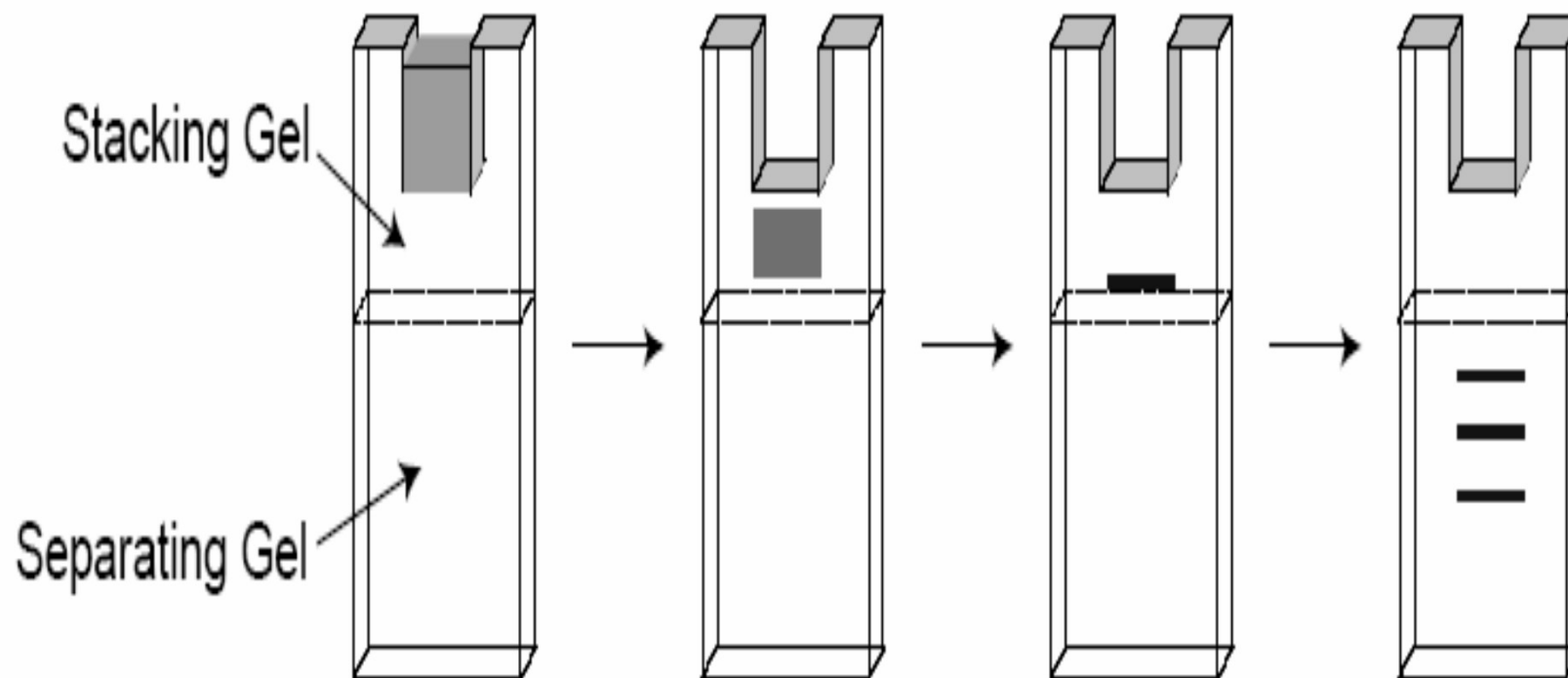
Kontinuální zónová elektroforéza

- proteiny migrují v zóně, která je minimálně tak široká jako je výška vzorku v gelové jamce při nanesení. Z toho důvodu jsou pak **proteinové pásy v konečném výsledku hůře rozlišené.**
- **složení elektrodového a gelového pufru je stejné.** tuto techniku nelze použít pro velmi zředěné vzorky.
- kontinuální elektroforéza může probíhat na kterémkoliv typu gelu - **typická je především pro agarózové gely**

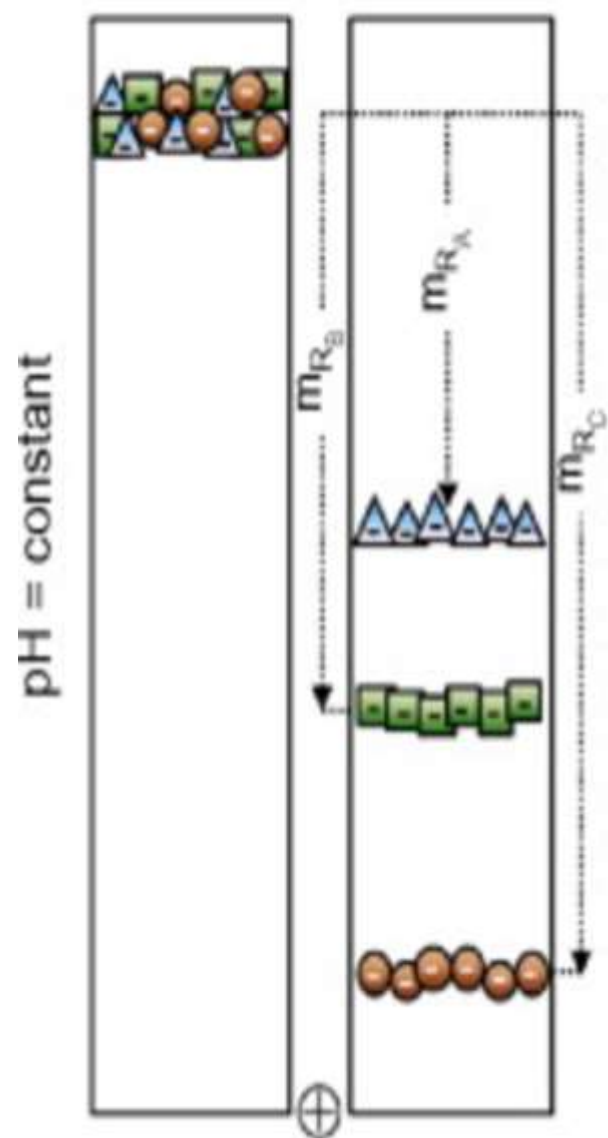
Diskontinuální zónová elektroforéza

- diskontinuita může být jak **v koncentracích gelu, tak především v pH a iontové síle.**
- dnes hlavní elektroforetickou technikou pro analýzu proteinů
- oproti kontinuální elektroforéze má vysoké rozlišení a citlivost.
- používá se dvou gelů tzv. **koncentrujícího („stacking“)** gelu nahoře a **separačního („running“)** gelu dole.
- **typická je především pro polyakrylamidové gely**

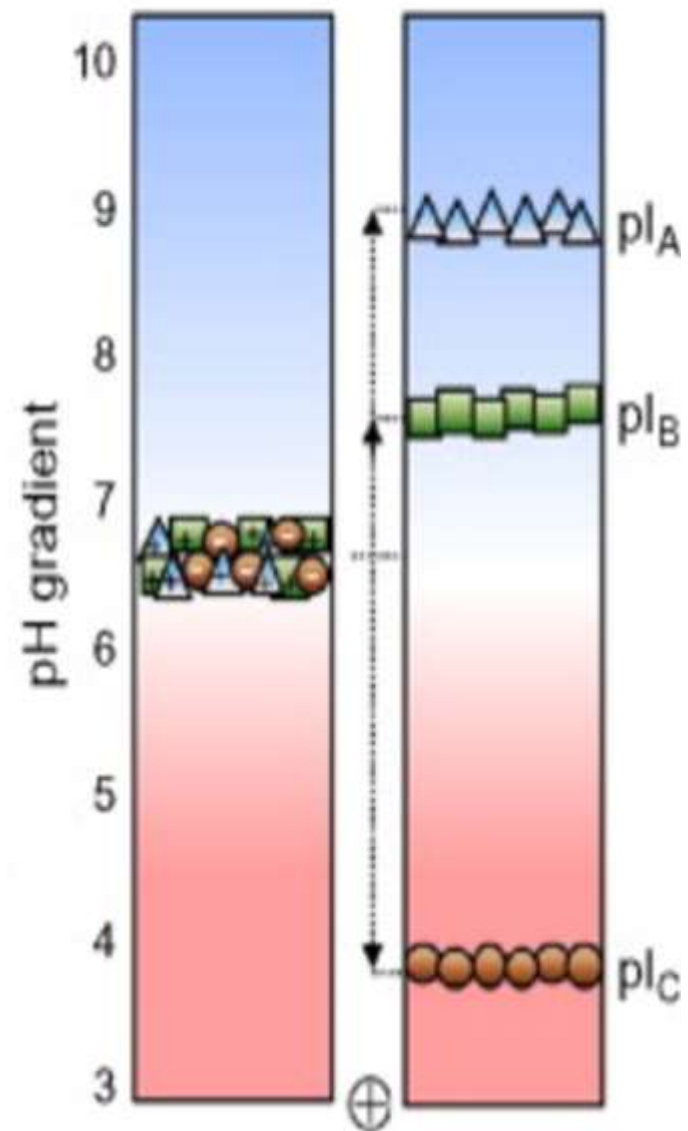
Diskontinuální zónová elektroforéza



A Zone electrophoresis

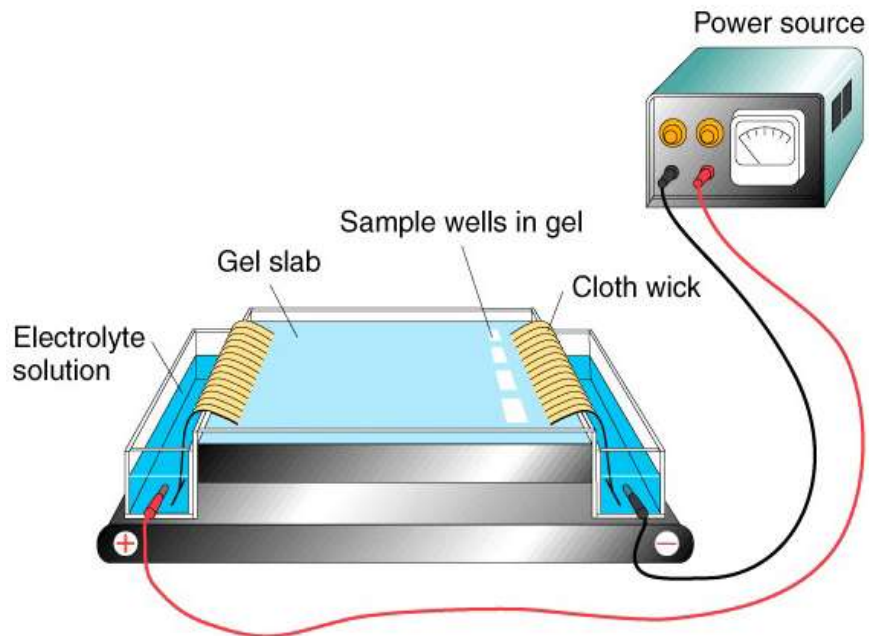


Isoelectric focusing



Rozdělení dle uspořádání (orientace nosného média)

- ***Vertikální gelová elektroforéza***
- ***Horizontální gelová elektroforéza***



Zpracování gelu po separaci - barvení gelů

- Po proběhnuté elektroforéze je nutné gel rychle **sušit** **nebo fixovat fixačním roztokem** (obsahuje kyselinu, např. kys. octová)- dojde k denaturaci proteinů a jejich imobilizaci v nosném médiu, aby se zabránilo difúzi jednotlivých zón.
- Dále je nutné gel **obarvit**, aby došlo k vizualizaci jednotlivých proteinových frakcí. Po odmytí přebytku barviva se gel suší.
- **Množství barviva**, které se během barvení váže na proteiny, záleží na mnoha faktorech. Je ovlivněno typem proteinu nebo stupněm denaturace při fixaci.

Zpracování gelu po separaci - barvení gelů

Barva	Použití	A _{max} (nm)
Amidočerň 10B		620
Coomassie Brilliant Blue G250	barvení proteinů	590
Coomassie Brilliant Blue R250		595
Fast Green		610
Acid Violet	imunoelektroforéza, imunofixace	
Alcian Blue	glykoproteiny	630
Basický fuchsin	glykoproteiny bohaté na sialovou kyselinu, nukleové kyseliny	550
Methyl Green		635
Ethidium bromid, SYBR Green (fluorimetrická detekce)	DNA	
Bromcresol Blue		
Methylene Blue		665
Pyronine Y	RNA	510
Toluidine Blue Y		620

Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

Po elektroforetické separaci a barvení, je možné kvantifikovat jednotlivé zóny jako procentuální podíl přímou ***denzitometrii***.

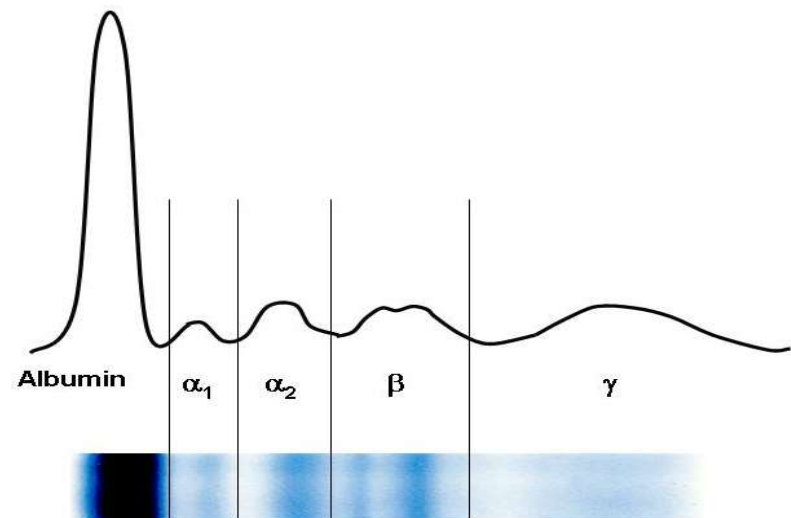
Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení (liší se v uspořádání), zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení.

Denzitometrie

- Kvantitativní hodnocení intenzity zbarvení
- Měření absorpce světla jednotlivými zónami (pásy)
- Pohyblivý světelný zdroj (laser nebo lampa s bílým světlem s filtry) je veden nad gelem a na každém místě gelu je měřena a počítačově zpracována absorpce
- U jednorozměrných gelů získáváme křivku extinkce $\ln I_0/I$ (I_0 = intenzita světla ze zdroje, I = intenzita měřená detektorem) podél elektroforetické stopy; u dvourozměrných gelů je extinkce zobrazena jako funkce povrchu gelu
- Neplatí zde Lambertův-Beerův zákon! (proč?)
- Závislost absorpce na koncentraci bílkoviny při extinkci $>2,5$ (lampa s bílým světlem) nebo >4 (laser) se stává hyperbolická nebo sigmoidní
- Slabé pásy/stopy jsou často nadhodnocené, proteiny ve vysoké koncentraci podhodnocené

Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

- Při denzitometrii se měří intenzita záření procházejícího průhlednou plochou, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- Jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru.
- Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi
- doporučené jednotky (ČSKB):
jedniny (př. α_1 globuliny=0,03)
- používají se %
(př. α_1 globuliny=3%)
- přepočítání na g/L z S-CB



Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky (400 – 700 nm), v místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor.
- Po zpracování signálu integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí.

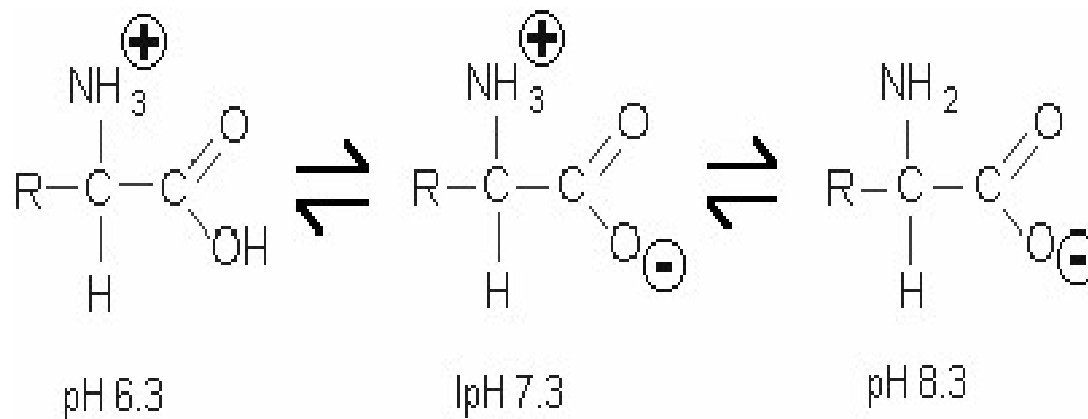
Barva	λ_{max} [nm]
Amidočerň 10B	620
Coomassie Brilliant Blue R-250	590
Coomassie Brilliant Blue G-250	595
Fast Green	610
Acid violet	
Alcian Blue	630
Basic Fuchsin	550
Methyl Green	635
Ethidium Bromide (Fluorimetrická detekce)	
Bromcresol Green	
Methylene Blue	665
Pyranin Y	510
Toluidine Blue O	620

Základní elektroforetické techniky

- **Izoelektrická fokusace (IEF)**
- **Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)**
- **Kapilární elektroforéza (CE = capillary electrophoresis)**

Izoelektrická fokusace (IEF)

- Metoda IEF se používá k separaci **amfoterních látek - aminokyseliny, peptidy a proteiny**.
- V závislosti na pH mají amfoterní molekuly kladný nebo záporný celkový náboj („net charge“).
- Pro posouzení tohoto náboje při různých hodnotách pH je důležitá **hodnota izoelektrického bodu (pI)**.

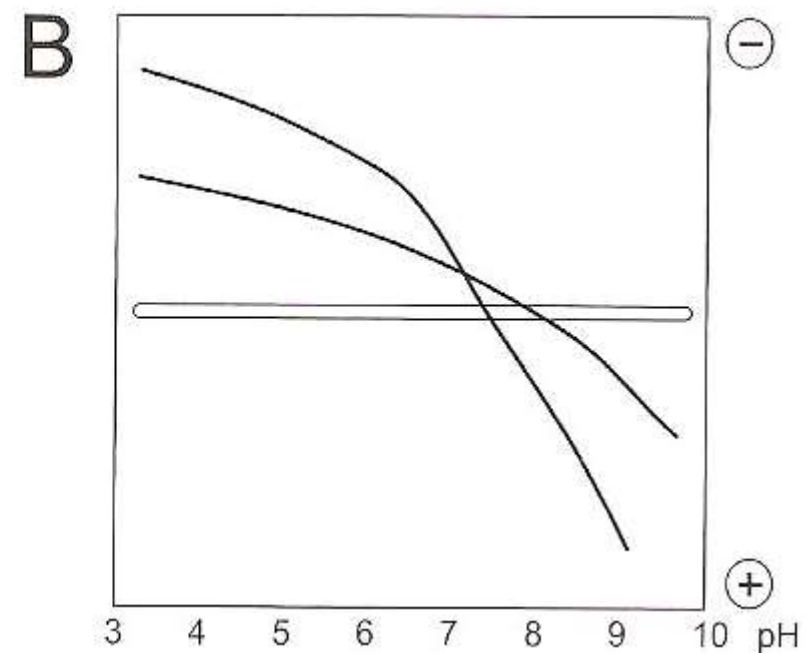
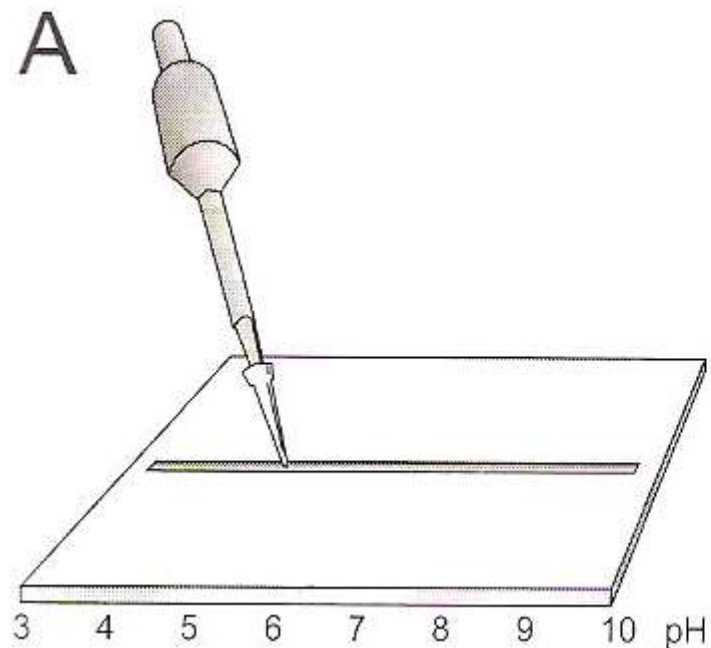


Nábojové vlastnosti AK a bílkovin

- Při $\text{pH} < \text{pI}$ jsou kationty
- Při $\text{pH} = \text{pI}$ jsou amfolyty navenek elektroneutrální
- Při $\text{pH} > \text{pI}$ jsou anionty
- Disociační konstanty K_1 a K_2 jsou vyjadřovány logaritmicky jako $\text{pK} = \text{pH}$, při kterém se v roztoku nacházejí stejná množství protonovaných (asociovaných) a neprotonovaných (disociovaných) forem
- $\text{pI} = \text{izoelektrický bod} = \text{pH}$, při které molekula existuje jako amfolyt s nulovým výsledným nábojem
- **$\text{pI} = \frac{1}{2} [\text{pK}_1 + \text{pK}_2]$** ; u AK s ionizovatelnou skupinou v postranním řetězci uvažujeme hodnoty pK „na obě strany“ od elektroneutrálního zwitteriontu (pI leží mezi hodnotami pK zwitteriontu a jeho konjugované kyseliny)
- Při fyziologickém pH je většina bílkovin záporně nabitá

Analýza titračních křivek: gel s amfolyty - po IEF (vytvoření pH gradientu) otočíme gel o 90° a do žlábků naneseme analyzované bílkoviny, necháme probíhat elektroforézu. Kde je pI hledané bílkoviny?

obr. z: Westermeier R. Electrophoresis in practice. Wiley-VCH, Weinheim 2005



Izoelektrická fokusace (IEF)

- využívá **gely s velkými póry**, které obsahují směs syntetických alifatických polyamino-polykarboxylových skupin, které se označují jako **nosné amfolyty**.
- jsou voleny tak, že pokrývají široký rozsah izoelektrických bodů. Jakmile gel připojíme ke zdroji elektrického napětí, amfolyty vytvoří stabilní **lineární gradient pH, s nejnižší hodnotou pH při anodě a nejvyšší při katodě**.
- Stabilita amfolytů v gelu je zajišťována silnou kyselinou (anoda) a silnou zásadou (katoda).
- **Anodový roztok je kyselý** (k. fosforečná, k. octová, kyselý pufr), **katodový roztok je bazický** (NaOH, triethylamin, bazický pufr)

Izoelektrická fokusace (IEF)

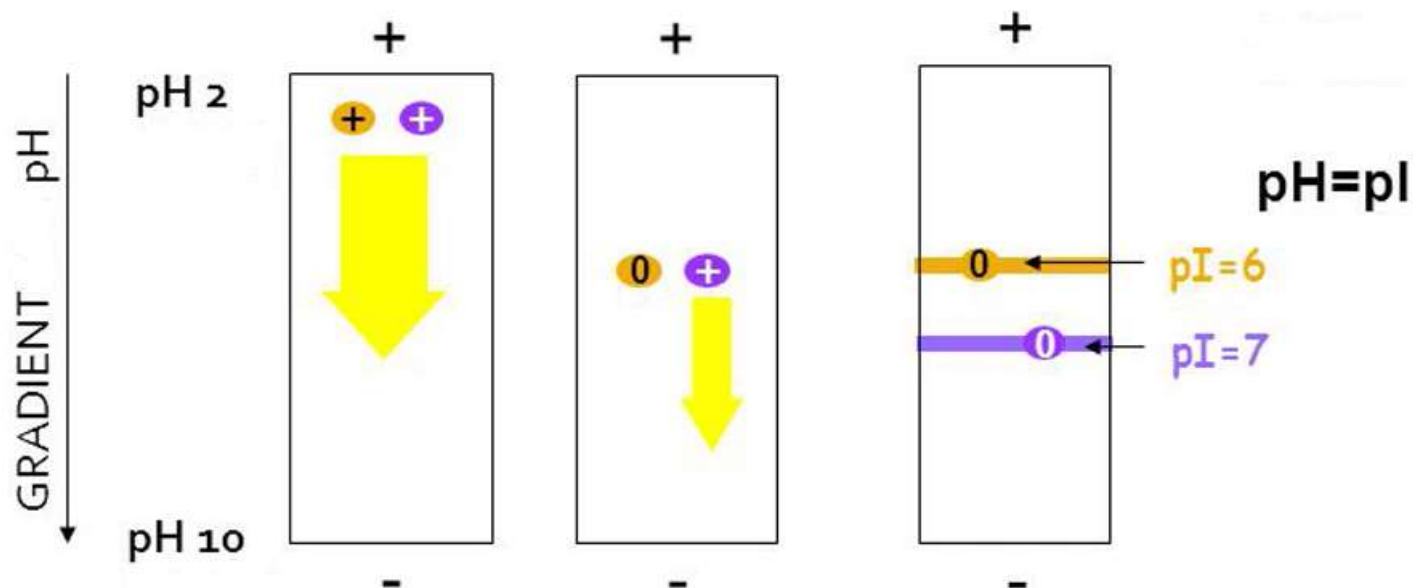
- Proteiny se po nanesení na gel budou pohybovat pH gradientem až do míst, kde se pH gelu vyrovná s jejich **izoelektrickým bodem (pI)**.
- V tomto bodě je protein elektricky neutrální – jakmile by se z této polohy vychýlil na jakoukoli stranu, získal by kladný, nebo záporný náboj a vrátil by se zpět.
- Výsledkem jsou velmi úzké zóny na gelu (odtud název „fokusace“ - „zaostřování“).
- **rozlišovací schopnost** této metody je vysoká a lze jí oddělit i proteiny, lišící se o **0,01 jednotky svých pI**.
- Proteiny, které se liší nábojem, ale mají prakticky stejnou molekulovou hmotnost (např. izoenzymy), lze separovat pouze IEF.

Izoelektrická fokusace (IEF)

- IEF se obvykle provádí v **3-4% polyakrylamidových gelech, nebo v agaróze.**
- Do roztoku pro přípravu gelu se přidávají **amfolyty v koncentraci 2-2.5%**
- Jedná se o směs nízkomolekulárních oligoamino-oligokarboxylových kyselin, které mají rozdílné pI hodnoty.
- Gradienty se tvoří nejčastěji **v rozmezí pH 3-10**, nebo v užším.
- Jinou možností tvorby gradientu je **použití immobilinů**. Gradient je v tomto případě immobilizován v gelu, toho se dosahuje použitím akrylamidových derivátů obsahujících ionizovatelné skupiny s pufrujícími vlastnostmi.

Izoelektrická fokusace (IEF)

- Izoelektrická fokusace se provádí ve vertikálním nebo horizontálním uspořádání.
- Hotové IEF gely s amfolyty nebo immobiliny se dodávají komerčně spolu s přístroji pro automatizovanou IEF.
- Vzorky se obvykle nanášejí na katodové straně.



Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

- je analytická a preparativní technika
- metoda je schopná účinně **separovat komplexní směsi bílkovin.**
- 2-DE je klíčovou technikou ***proteomiky***

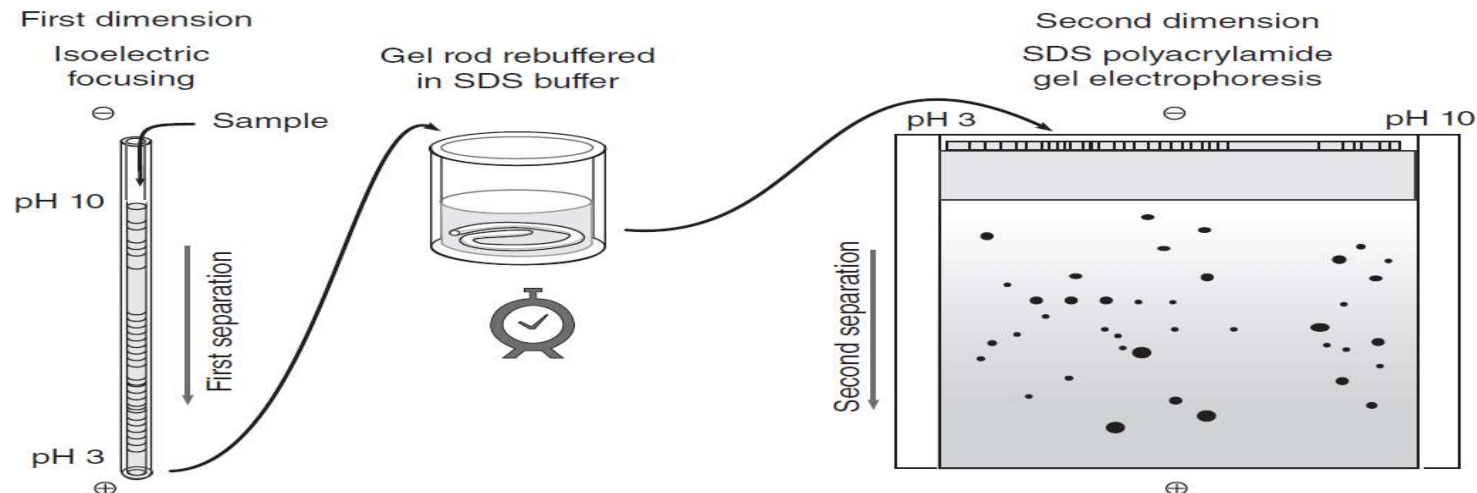
Poprvé byla popsána již v r. 1975 (O'Farrelem a Klosem), rozšířena byla až s rozvojem proteomiky v posledních letech.

Proteomika je obor, který se zabývá **globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem)**, rovněž však **zkoumá strukturu a interakce proteinů.**

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Podstatou 2-DE je využití dvou odlišných fyzikálně chemických vlastností proteinů:

- **v prvním rozměru** jsou proteiny rozděleny **podle jejich izoelektrického bodu (pI)** - pomocí izoelektrické fokusace (IFE)
- **v druhém rozměru** se proteiny dělí v závislosti na jejich **molekulové hmotnosti** použitím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a SDS (SDS -PAGE).

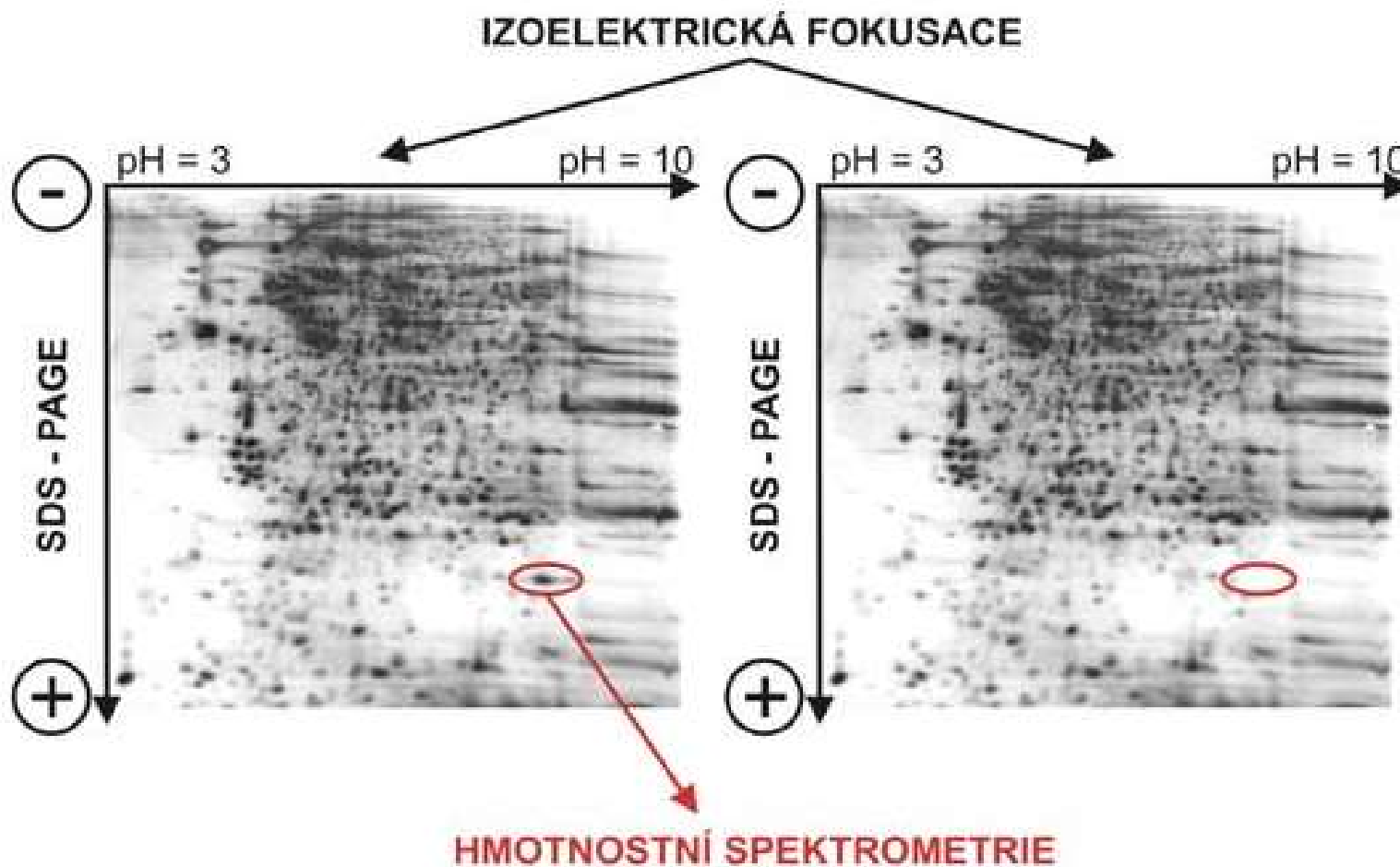


Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Vizualizace: barvení 2-DE gelů

- *proteiny jsou vizualizovány některou z barvicích či značících metod (chemických nebo radioaktivních).*
- *Výsledné "mapy" proteinů lze porovnávat např. mezi experimentálním a kontrolním vzorkem nebo mezi vzorky odebranými od pacientů s konkrétním onemocněním oproti zdravým kontrolám a identifikovat tak odlišně exprimované proteiny, které mohou mít souvislost s patogenezí daného onemocnění.*
- *Proto je třeba ověřit identitu těchto odlišně exprimovaných proteinů, nejčastěji pomocí "vyříznutí" oblasti gelu vykazující odlišnost a její následné analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie.*

Dvozměrná elektroforéza (2-DE)



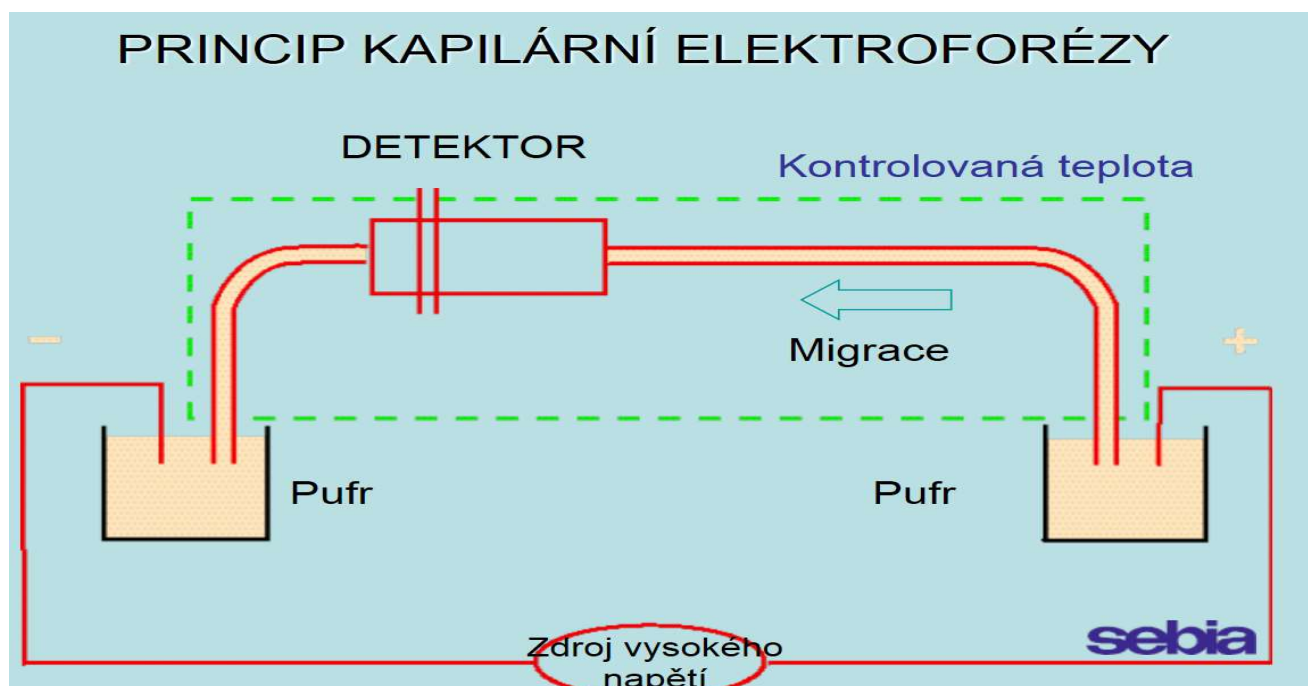
Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Nevýhody:

- problematická analýza: velmi zásaditých proteinů, proteinů málo rozpustných ve vodné fázi a membránových proteinů
- senzitivita (proteiny přítomné ve velmi nízkých koncentracích vyžadují speciální typy barvení),
- reprodukcibilita mezi gely
- špatná automatizovatelnost - ve srovnání s obdobnými technikami pro nukleové kyseliny

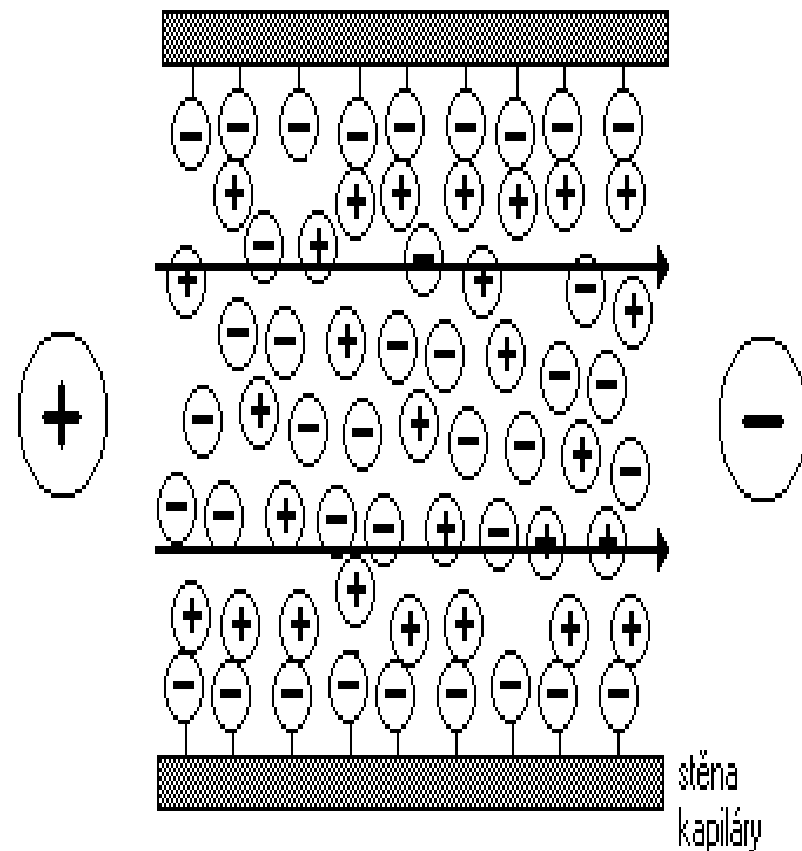
Kapilární elektroforéza (CE = capillary electrophoresis)

Zvláštním způsobem elektroforézy je tzv. kapilární elektroforéza, která vyžívá **elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek** uvnitř kapiláry.



Kapilární elektroforéza - Elektroosmotický tok (EOF)

- Povrch křemenné kapiláry obsahuje negativně nabitě funkční skupiny, které přitahují pozitivně nabitě ionty.
- Pozitivně nabitě ionty migrují k negativní elektrodě a unášejí molekuly rozpouštědla stejným směrem.
- Tento celkový pohyb kapaliny je nazýván elektroosmotický tok.
- Během separace se neutrální molekuly pohybují stejným směrem jako EOF (s nepatrnou vzájemnou separací).
- Pozitivně nabitě ionty jsou EOF urychlovány, negativně nabitě naopak zpomalovány.



Kapilární elektroforéza - Elektroosmotický tok (EOF)

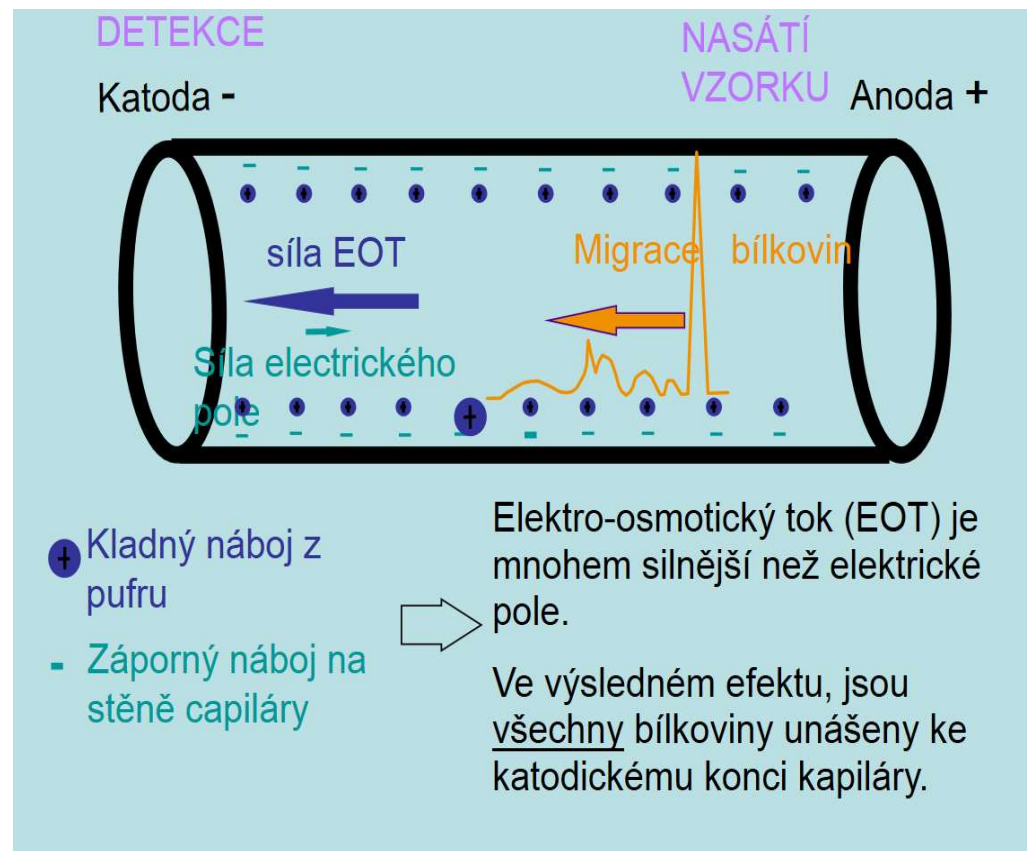
Nejdůležitější praktické důsledky EOF:

- elektrolyt je pumpován od anody ke katodě

Různě nabitě molekuly v separovaném vzorku se pohybují různými směry podle náboje, ale všechny jsou **neseny ve směru katody** díky elektroosmóze.

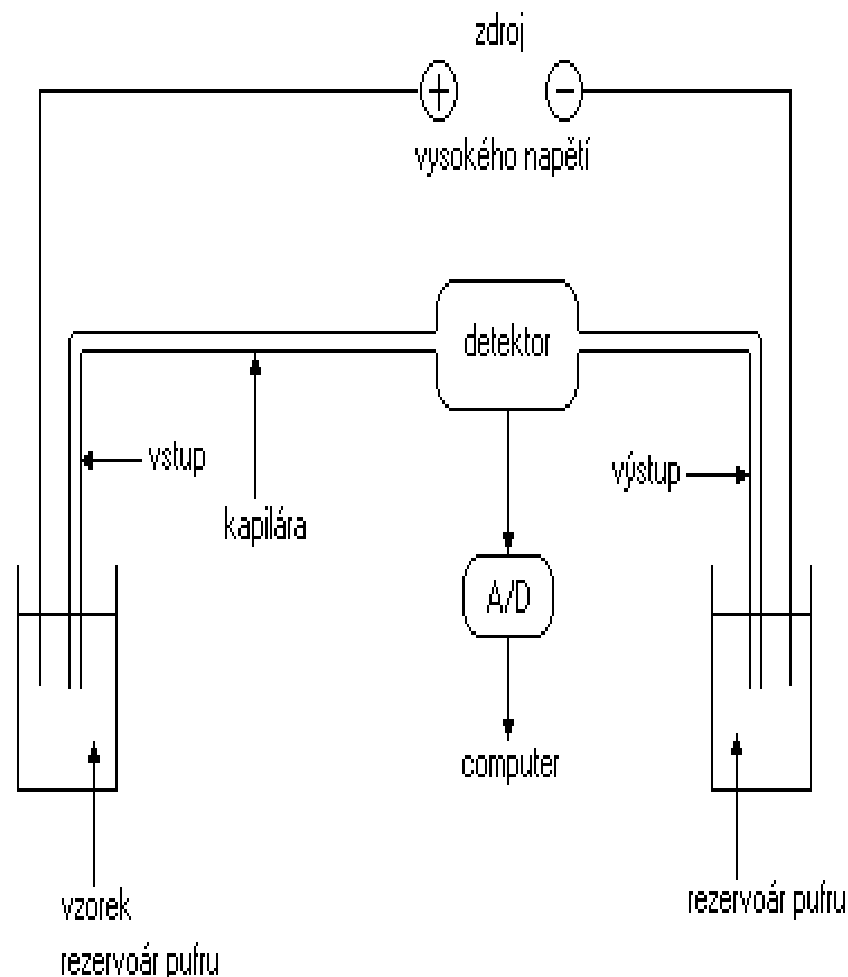
Kladně nabitě molekuly dosáhnou katody jako první, neboť elektroforetická migrace i elektroosmotický tok mají stejný směr.

Směr elektroosmotického toku však může být změněn přidáním povrchově aktivních chemických aditiv do elektrolytu.



Kapilární elektroforéza – technické uspořádání

- křemenné kapiláry (čistý oxid křemičitý) s malým průměrem, které jsou vně potažené tenkou vrstvou polyimidu
- hydroxylové skupiny křemene mohou disociovat a nabíjet tak vnitřní stěnu kapiláry
- vnější průměr je obvykle 180 – 375 μm
- vnitřní průměr se pohybuje mezi 20 -180 μm .
- Celková délka kapiláry je 20 cm až několik metrů.
- Kapiláry slouží jako elektroforetická komora, která je terminálním koncem připojena na detektor
- přes rezervoár s pufrem je napojena na vysokonapěťový zdroj.



Kapilární elektroforéza – technické uspořádání

Největší výhodou CE oproti tradičním elektroforetickým technikám je **možnost účinného odvodu tepla** během separace. To umožňuje použití vysokého napětí v rozmezí 25 – 30 kV, což vede k **zvýšení separační účinnosti a redukci doby separace**, v některých případech až pod 1 min.

1. Elektroforézu řadíme mezi: separační – optické – elektrochemické metody
2. Elektroforetická pohyblivost je vyšší: s rostoucím nábojem částice - s větší velikostí částice
3. Jaká je funkce pufru: snižuje Jouleovo teplo – nese vložený proud - udává výsledný náboj separovaných částic
4. Koncentrace agarózového gelu je obvykle: 1-2% - 5-7% - 10-11%
5. Co se používá k fixaci proteinů v gelu: vyšší teplota - roztok kyseliny - roztok zásady
6. Jak se provádí vizualizace proteinů v gelu: barvení gelu – sušení gelu – promytí gelu
7. Jak se provádí kvantifikace jednotlivých frakcí na gelu?
8. V jakých jednotkách se uvádí kvantita jednotlivých frakcí po elektr. separaci?
% - jedniny – g/L
9. Jaké jsou faktory ovlivňující separaci u SDS elektroforézy: náboj a tvar molekuly – molekulová hmotnost
10. Princip izoelektrické fokusace – využívá k separaci proteinů rozdílné: pH – pI – náboj
11. Dvojměrná elektroforéza používá dvě rozdílné elektroforézní techniky:
CE + IEF – IEF+SDS-PAGE
12. Kapilární elektroforéza - EOF (běžné uspořádání se záporně nabitou stěnou kapiláry): pozitivně nebo negativně nabité ionty jsou urychlovány ?

Praktické využití elektroforetických technik v klinické zdravotnické laboratoři

- Elektroforéza **bílkovin krevního séra**
- Elektroforéza **bílkovin moče**
- Elektroforéza **bílkovin mozkomíšního moku**
- Elektroforéza **bílkovin v sekretu**

Elektroforéza bílkovin krevního séra

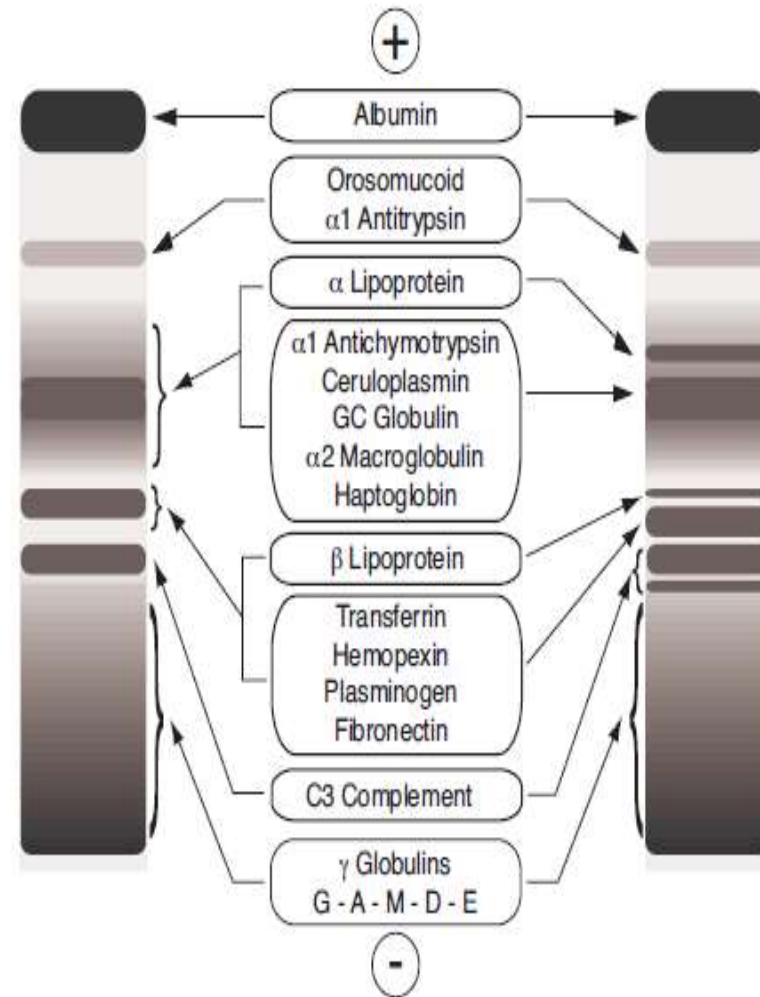
- Gelová elektroforéza
- Vysokorozlišovací gelová elektroforéza (HR elektroforéza)
- Gelová elektroforéza s následnou imunofixací

Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

- vzorky nanášeny v blízkosti katodického konce nosného média, které je saturováno **alkalickým pufrem (pH 8,6)** s nízkou iontovou silou (asi 0,05M)
- Jako nosné médium se nejčastěji používá **agarózový gel**
- Nosné médium je spojeno s dvěma elektrodami a proud prochází nosným médiem k separovaným proteinům.
- Typické parametry při elektroforetické migraci jsou **proud 10 mA na 1 cm šířky gelu s časem migrace asi 10 min.** (napětí 240 V, teplota 20 °)
- **Všechny hlavní sérové proteiny nesou při pH 8,6 negativní náboj a migrují k anodě.**
- Při standardně používané SPE se **sérové proteiny dělí na 5-6 proteinových frakcí.**

Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

- Každá zóna obsahuje jeden a více sérových proteinů.
- Nejvíce anodicky putuje albumin, následují α 1-globuliny, α 2-globuliny, β 1-globuliny, β 2-globuliny a gamaglobuliny.
- Šířka proteinového bandu frakce závisí na počtu proteinů, které jsou ve frakci přítomny.

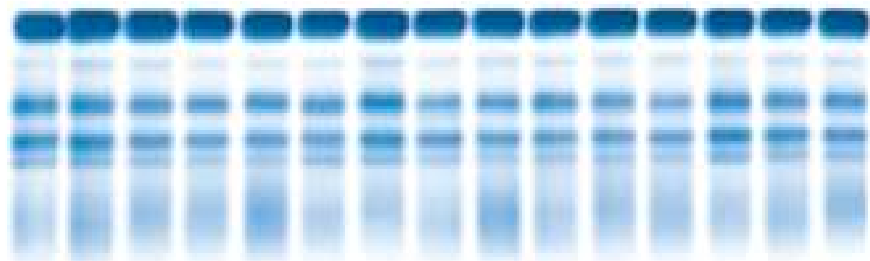
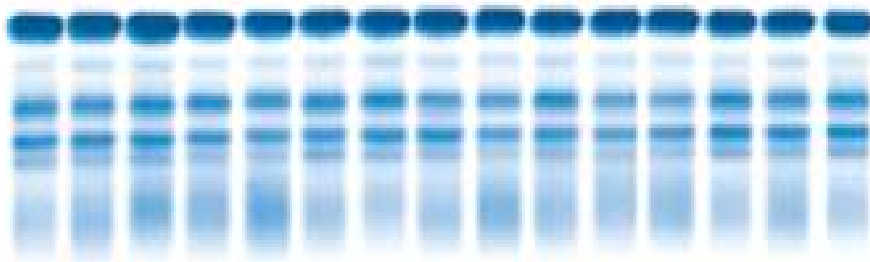


Elektroforéza bílkovin krevního séra - Gelová elektroforéza - SPE

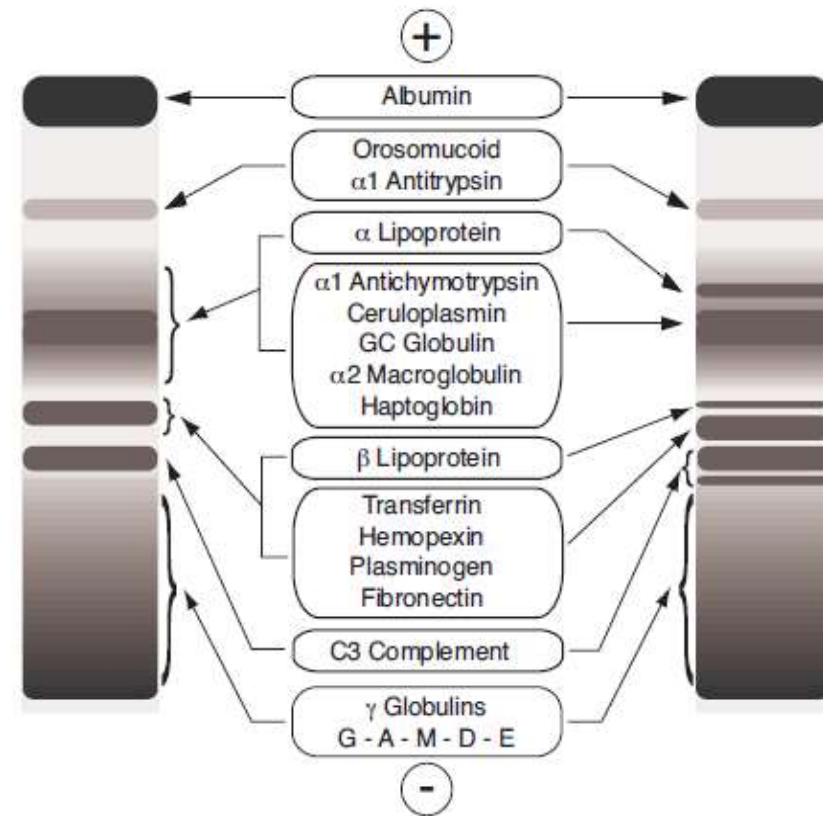
HYDRAGEL 01-02 15/30

sebia

10 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



Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

Po elektroforetické separaci jsou proteinové frakce:

- 1. zafixovány** v nosném médiu ponořením do kyselého fixačního média (např. kys. octová):
 - dojde k denaturaci proteinů a
 - jejich imobilizaci v nosném médiu.
- 2.** v dalším kroku jsou proteiny **vizualizovány** barvením. Nejčastěji se jako barvivo používá Amidočerň 10B nebo Coomassie blue.

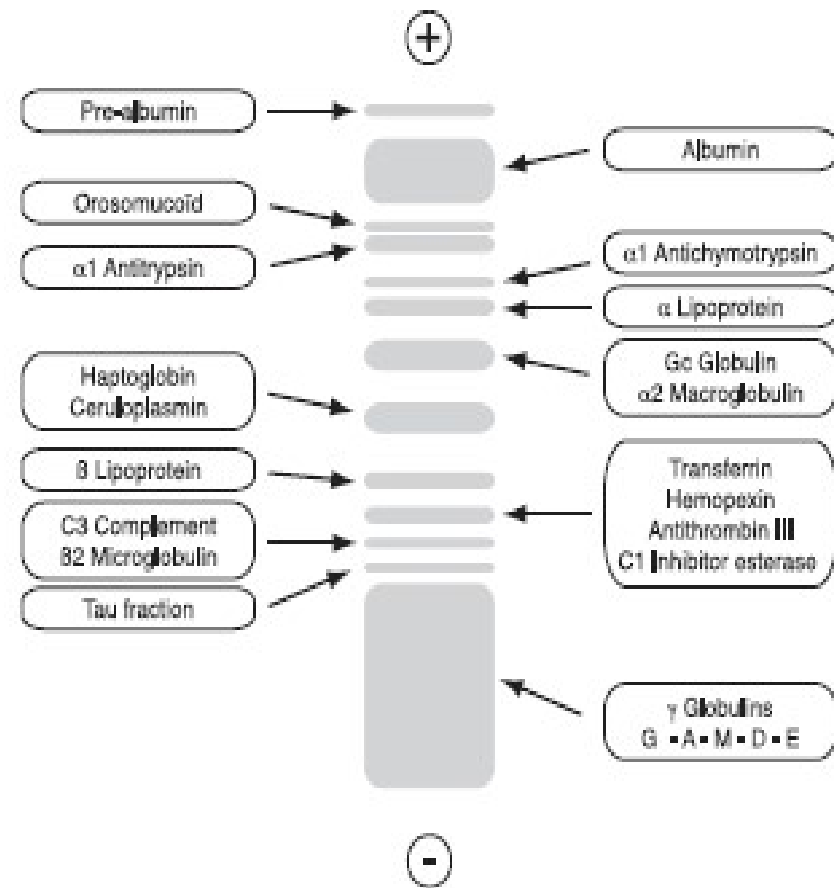
Elektroforéza bílkovin krevního séra: ***Vysokorozlišovací elektroforéza (HR elektroforéza)***

- Bílkoviny séra dělí na přibližně 10 frakcí.
- Každá frakce obsahuje jeden a více sérových proteinů.
- Složení gelu, podmínky elektroforézy a volba barvičky dovoluje vynikající rozlišení a vysokou senzitivitu zvláště v gama zóně.
- Gely je možné obarvit amidočerní nebo kyselou violetí.
- Obarvené elfogramy lze vyhodnotit vizuálně a denzitometrií.

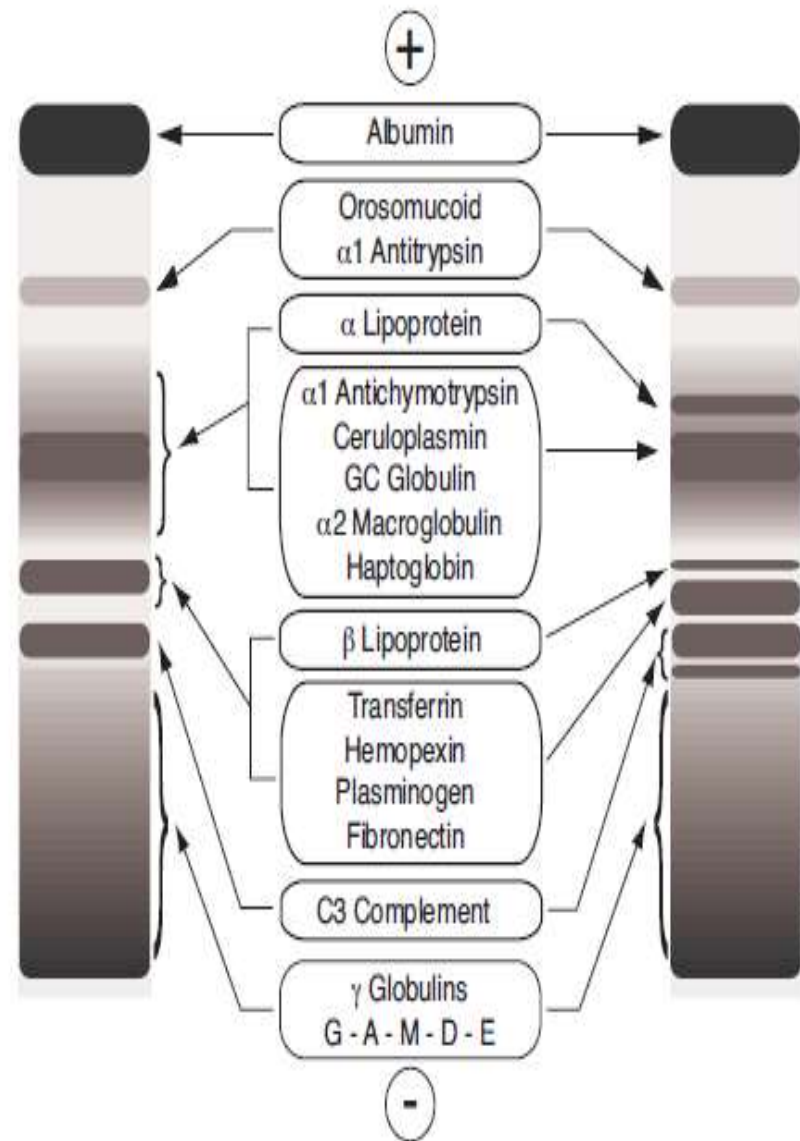
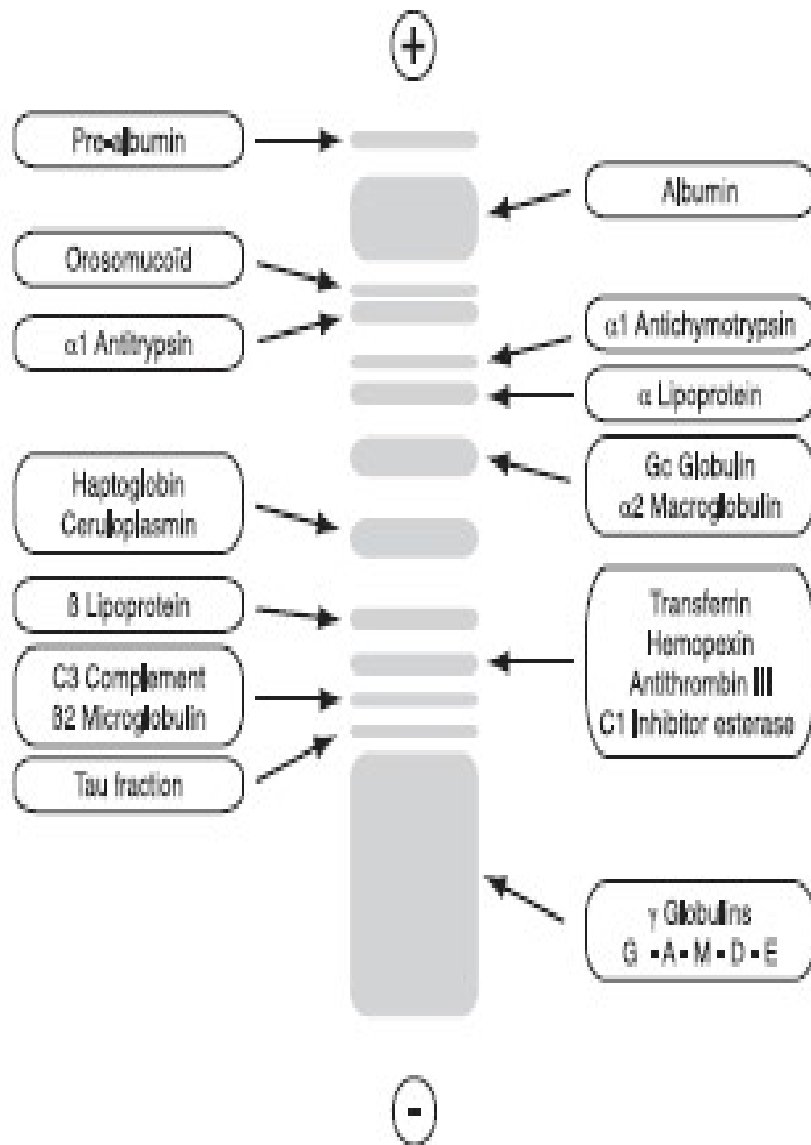
Vysokorozlišovací elektroforéza (HR elektroforéza)

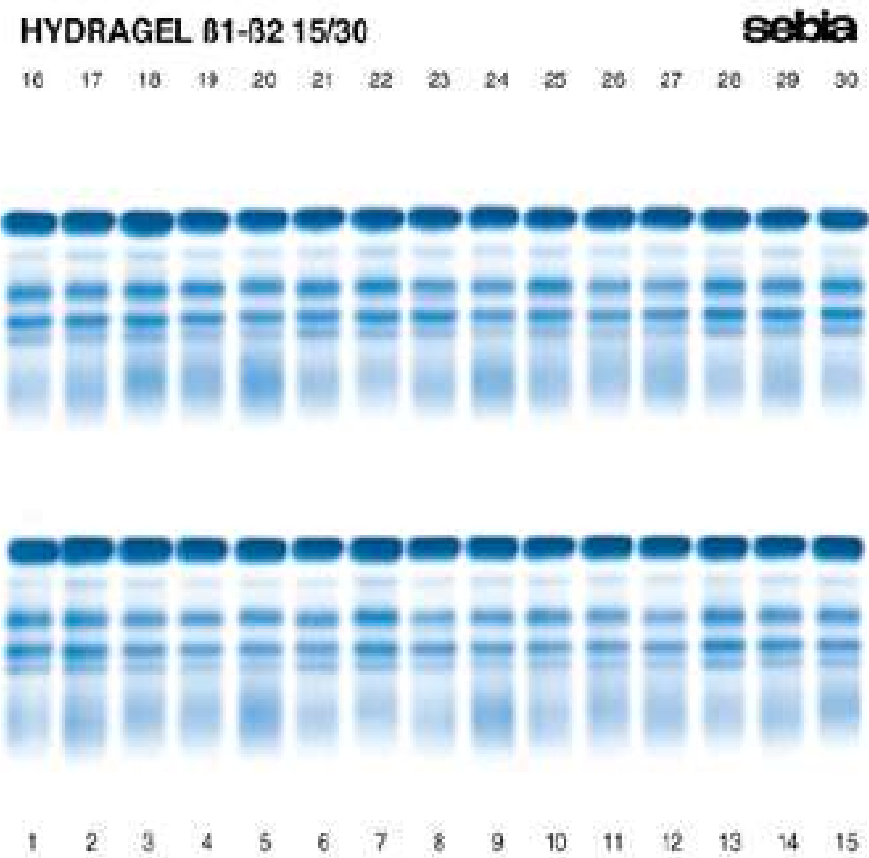


Elektroforeogram - HR elektroforéza



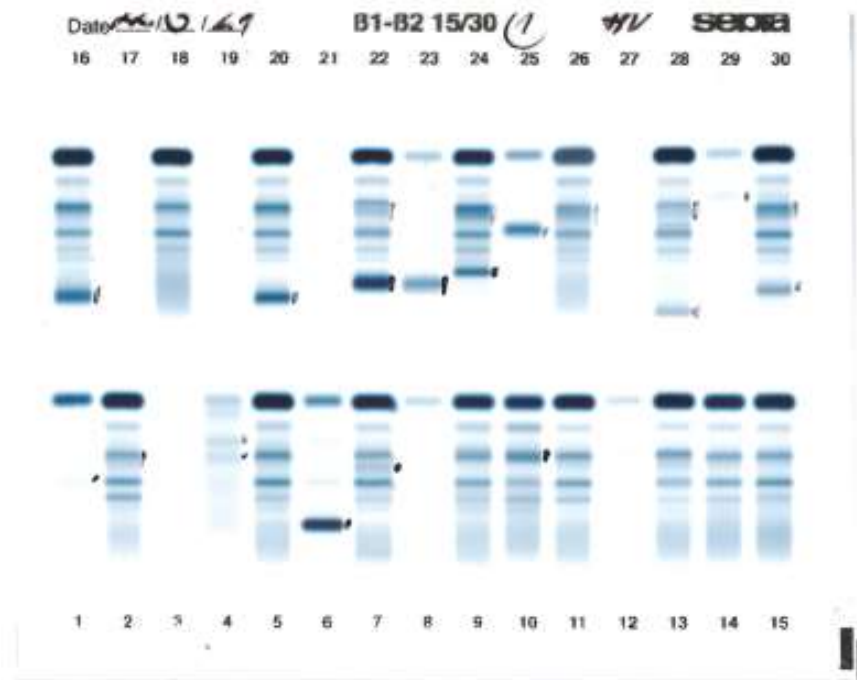
Elektroforeogram - HR elektroforéza





Elektroforéza bílkovin séra (pozice 2, 5, 7, 9-11, 13-16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30) a moče (pozice 1, 3, 4, 6, 8, 12, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29) – Hydragel β 1- β 2 15/30 (Sebia)

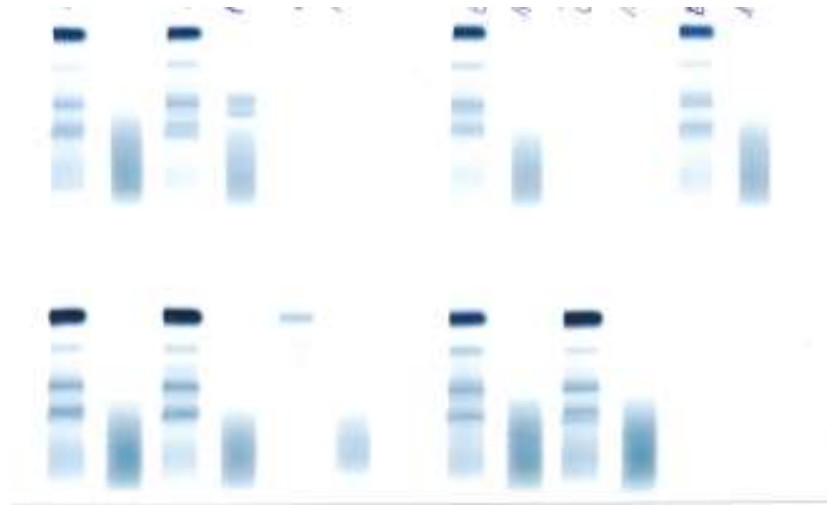
Paraprotein v pozicích 6 (moč), 16 (sérum), 20 (sérum), 22 (sérum), 23 (moč), 24 (sérum), 25 (moč – v beta frakci), 28 (sérum) a 30 (sérum); v sérech na pozicích 20, 22, 28 a 30 je patrná výrazná redukce polyklonálních gamaglobulinů; zvýšená frakce alfa2-globulinů v pozicích 2, 10, 24, 30 (séra)



Screeningová imunofixace (Hydragel Penta 6/12 IF, Sebia)

Elektroforetická stopa a vpravo od ní stopa stejného vzorku fixovaného s pentavalentním antisérem (G, A, M, kappa, lambda)

pozitivní výsledek imunofixace M-Ig atypicky migrujícího v zóně alfa2-globulinů (horní řada, 4. stopa zleva – sérum), ve všech ostatních vzorcích je výsledek screeningové imunofixace negativní



Elektroforéza bílkovin krevního séra: **Elektroforéza s následnou imunofixací**

- Proteiny separované elektroforézou na alkalicky pufovaných agarózových gelech jsou inkubovány se specifickými antiséry proti těžkým řetězcům Ig G, Ig A, Ig M a lehkým volným i vázaným kappa a lambda řetězcům.
- Po odstranění nezreagovaných bílkovin jsou precipitáty obarveny kyselou violetí nebo amidočerní.
- Elektroforeogramy se hodnotí vizuálně a pátrá se po přítomnosti monoklonálních bílkovin.

Elektroforéza s následnou imunofixací

Provádí se ve čtyřech krocích:

- 1. Separace proteinů elektroforézou na agarózovém gelu.
- 2. Imunofixace (imunoprecipitace) proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty jednotlivými antiséry. Antiséra difundují do gelu a precipitují přítomné antigeny. Proteiny v referenční stopě jsou fixovány fixačním roztokem.
- 3. Neprecipitované, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny odsátím a promytím. Komplex antigen-protilátka zůstává v gelové matrix.
- 4. Precipitované proteiny jsou vizualizovány obarvením.

Elektroforéza s následnou imunofixací

- Elektroforetické dělení vzorku probíhá simultánně v šesti stopách. Po elektroforéze – první stopa (ELP) slouží jako referenční. Zbývajících 5 stop je použito k nanesení specifických antisér – proti těžkým řetězcům (G, A, M) a anti-kappa a anti-lambda volným a vázaným lehkým řetězcům.
- Imunofixační proužky jsou porovnány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku – odpovídající proužek by měl mít stejnou migrační pozici.

Typizace paraproteinu – elektroforéza s následnou imunofixací

ELP – elektroforéza s fixací všech bílkovin; G, A, M, K, L – stopy se selektivní fixací antiséry proti řetězcům γ , α , μ , κ , λ

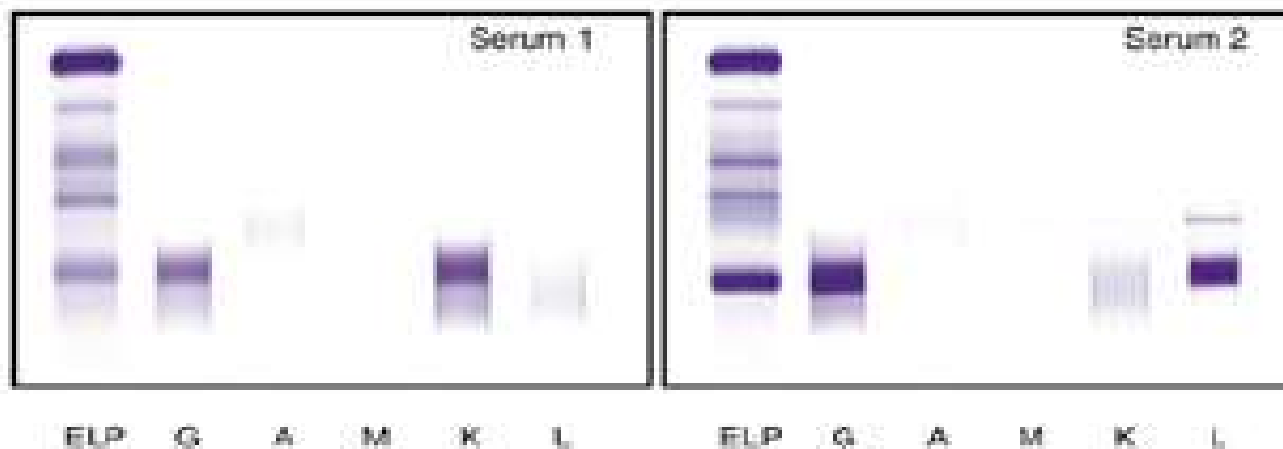
vlevo dole: volné kappa v moči; *vpravo dole*: fyziologický nález (polyklonální Ig); *vlevo nahoře*: paraprotein IgM κ v séru; *vpravo nahoře*: volné κ v moči u téhož pacienta



Elektroforéza s následnou imunofixací

HYDRAGEL 2 IF

sebia



Elektroforéza bílkovin moče (UPE = urine protein electrophoresis)

- **Elektroforeogram bílkovin moče je podobný rozdělení bílkovin v séru** - intenzita frakcí závisí na filtrační schopnosti ledvin.
- K analýze používáme **zahuštěné nebo nezahuštěné vzorky moče**.

Zahuštění se provádí na koncentraci bílkoviny asi 15 - 20 g/L pomocí koncentračních zkumavek (Vivaspin 2, Sartorius):

- Tyto zkumavky obsahují speciální hydrofilní membránu, což znesnadňuje vazbu proteinů.
- Membrána je vyrobena z polyethylensulfonátu (PES), triacetátu celulózy (CTA) nebo ze stabilizované celulózy (Hydrostat), má cutoff hodnotu podle molekulové hmotnosti pro kterou je nepropustná (5, 10 a 30 kDa).
- Stabilita moče pro vyšetření elektroforézy je minimálně 1 týden při teplotě 2 – 8 °C, není doporučeno vzorky mrazit.

Elektroforéza bílkovin moče (UPE = urine protein electrophoresis)

Přehled nejvíce používaných elektroforetických technik:

- *Gelová elektroforéza UPE (urine protein electrophoresis)*
- *Gelová elektroforéza s následnou imunofixací (uIFE=urine immunofixation electrophoresis)*
- ***Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s protilátkami proti vybraným proteinům***
- ***SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)***

Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s protilátkami proti vybraným proteinům

Postup: Vzorek **zahuštěné moče** je současně podroben elektroforéze v 9 stopách na alkalicky pufovaném agarózovém gelu (pH 9.1) :

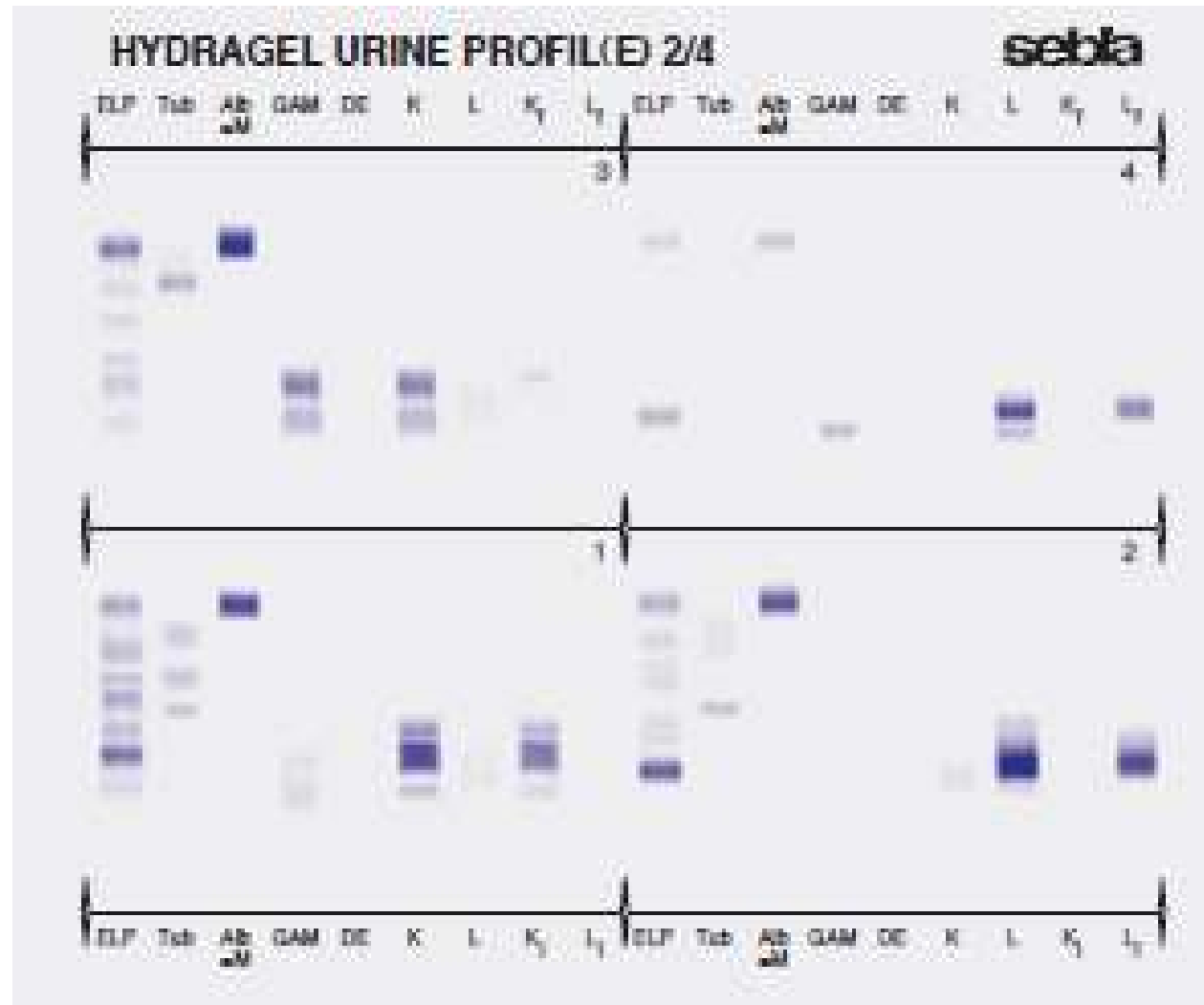
- po elektroforéze slouží jedna stopa (ELP) jako referenční pro znázornění elektroforetického uspořádání bílkovin ve vzorku.
- zbývajících osm stop je imunofixováno příslušným antisérem.
- nevysrážené, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny pomocí odsávání a promývání.
- precipitovaný komplex antigen-protilátka je zachycen v matrici gelu.
- vysrážené bílkoviny jsou vizualizovány barvením kyselou violetí, přebytečné barvivo se odstraňuje kyselým roztokem.

Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s protilátkami proti vybraným proteinům

Bílkoviny jsou imunofixovány specifickými antiséry proti :

- tubulární proteiny: β 2 mikroglobulin, protein vázající retinol (RBP) a α 1 mikroglobulin,
- glomerulární proteiny: albumin a α 2 mikroglobulin,
- těžké řetězce gama, alfa a mu (s trivalentním antisérem),
- lehké řetězce Kappa, volné i vázané,
- lehké řetězce Lambda, volné i vázané,
- lehké volné řetězce Kappa ,
- lehké volné řetězce Lambda.

Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s protilátkami proti vybraným proteinům



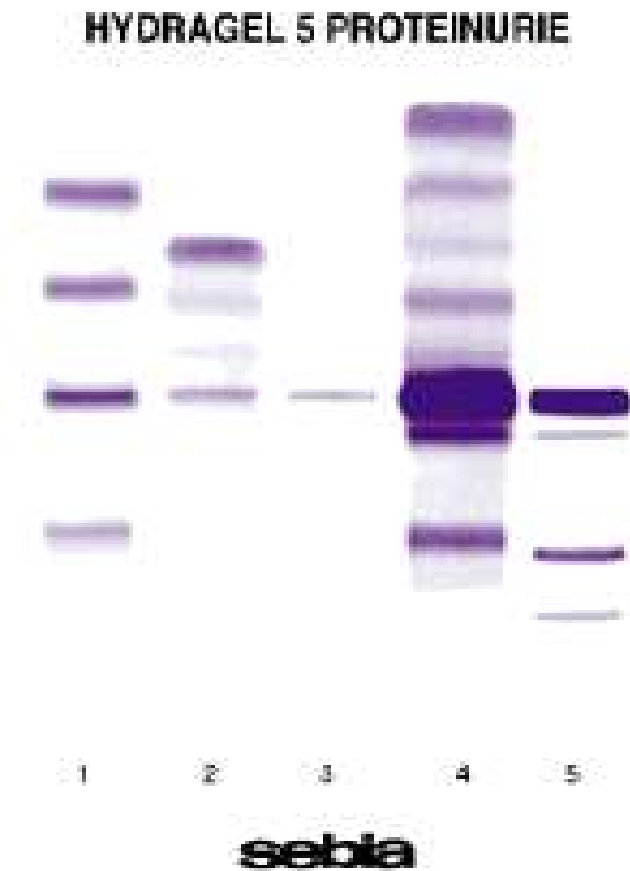
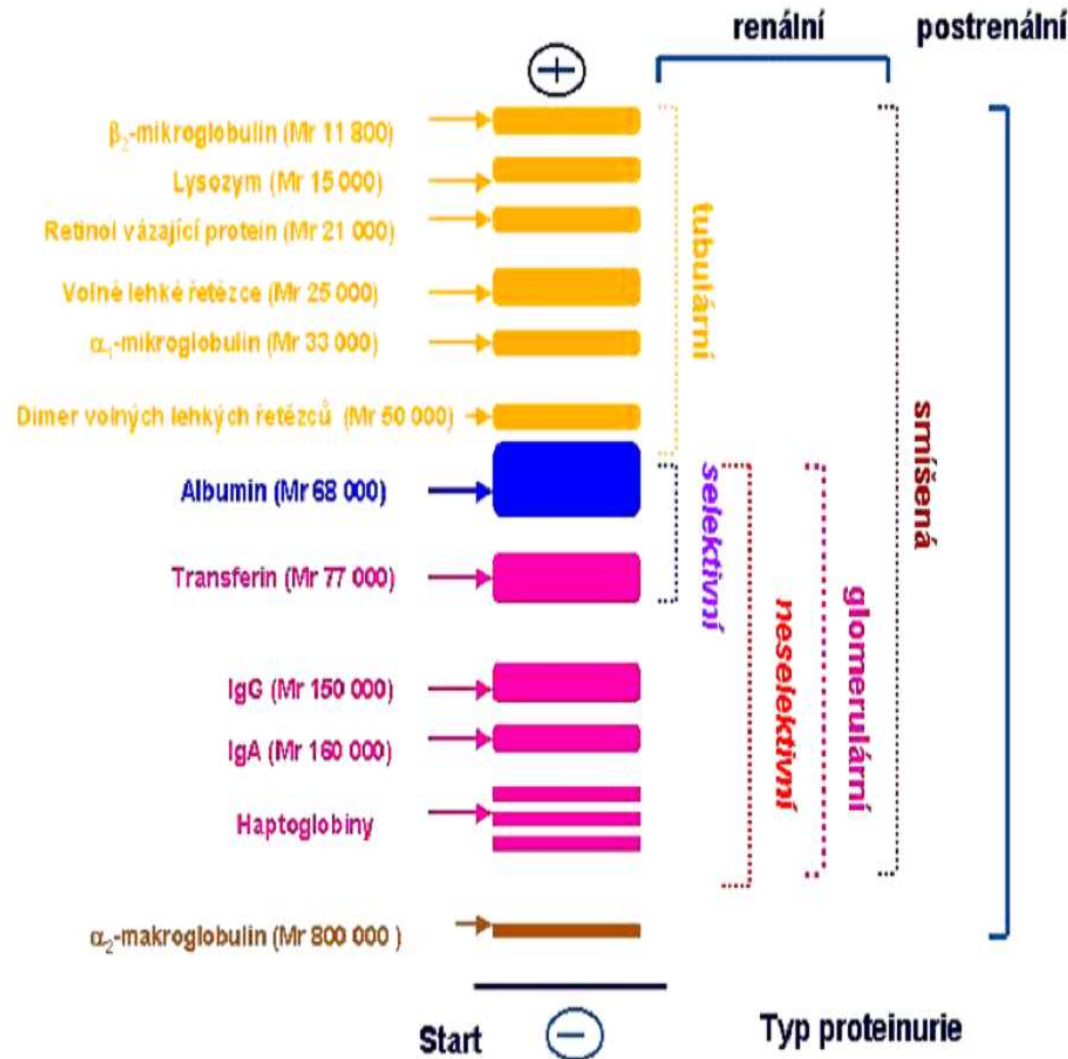
SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)

- Používají se neutrálně pufované SDS gely - separují močové bílkoviny podle jejich molekulové hmotnosti a zcela jasně odlišuje bílkoviny tubulární od bílkovin glomerulárního původu.
- Výsledek elektroforetického dělení proteinů obarvených kyselou violetí je vizuálně porovnáván s proteinovými markery v referenční stopě.
- provádí se v nezahuštěné moči,
- minimální detekční hladina je 15 mg/L na frakci.

SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)

- V přebytku detergentu SDS jsou bílkoviny změněny v komplexy, kde dochází k rozrušení nativní struktury bílkovin a zaujetí uniformní struktury o stejném negativním elektrickém náboji na jednotku hmotnosti.
- Používají se gely s vysokou koncentrací – 10%, kde dochází k rozdělení močových bílkovin dle jejich molekulární hmotnosti.
- Jednotlivé bílkoviny tubulárního původu ($M.V. < 65 - 70$ kDa) jsou jasně odlišeny od glomerulárních ($M.V. > 65 - 70$ kDa).

SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)



Elektroforéza bílkovin moče – klinický význam

- Poskytuje kvalitativní pohled na proteinurii.
- užitečnou informací při diagnostikování selhání ledvin.
- Identifikace hlavních bílkovin v moči pomáhá přesně určit typ poškození ledvin (tubulární, glomerulární nebo smíšený)
- dále pomáhá při identifikaci monoklonálních gamapatií (Bence Jonesovy bílkoviny).

Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

- **Izoelektrická fokusace s detekcí oligoklonálních IgG pásů:**

metoda zahrnuje izoelektrofokusaci na agarózovém gelu, následovanou immunofixací s anti-IgG antisérem.

Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.

Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování.

Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

Test se provádí ve dvou stupních :

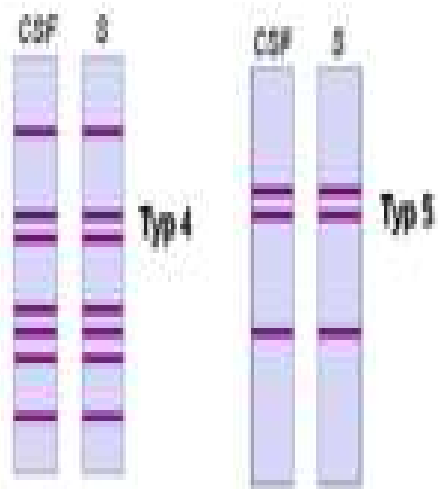
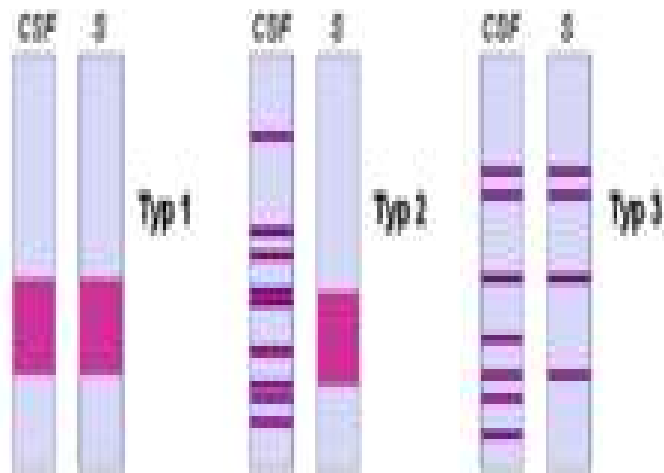
1. Izoelektrofokusace na agarózovém gelu k rozdělení proteinů ve vzorcích CSF a séra.
 2. Immunofixace anti IgG antisérem značeným enzymem (peroxidáza) určeným k detekci IgG oligoklonálních proužků a demonstrace rozdílů nebo nepřítomnosti IgG v CSF a v séru.
- K potvrzení intrathekální syntézy Ig je nutno analyzovat sérum a mozkomíšní mok paralelně ve stejných koncentracích IgG, aby byl demonstrován rozdíl v distribuci IgG.

HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

sebia

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





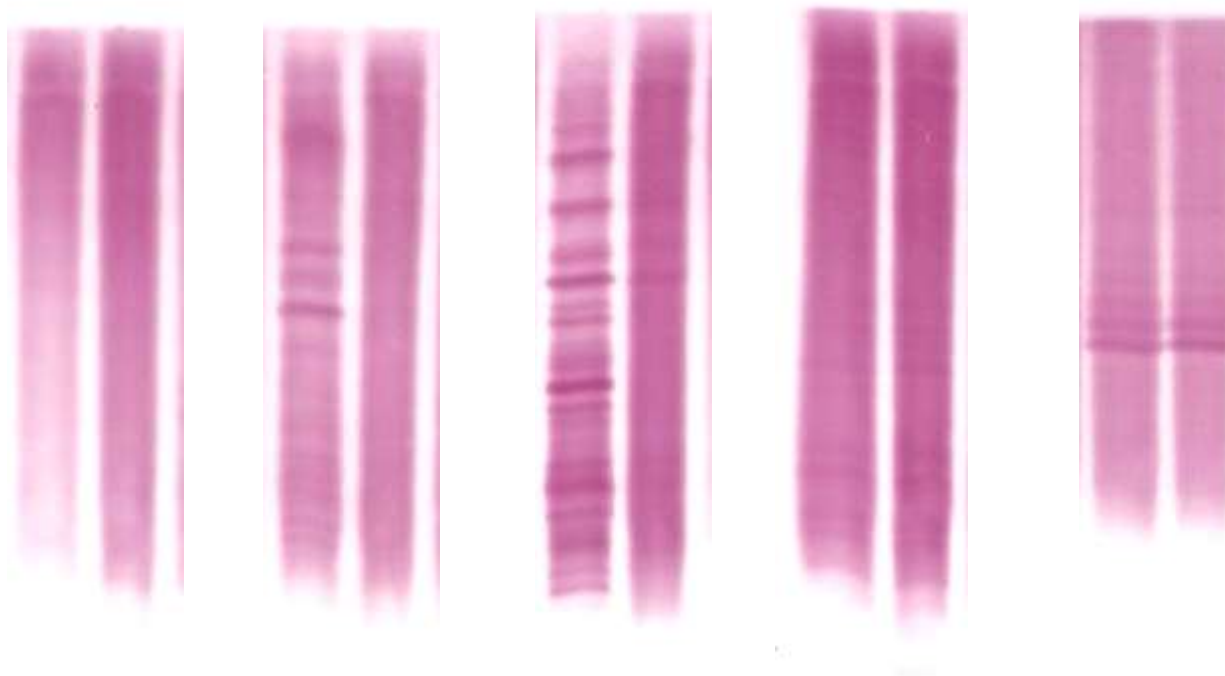
Základní typy :

- **Typ 1** – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;
- **Typ 2** – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u [roztroušené sklerózy](#));
- **Typ 3** – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (např. chronická infekce CNS, roztroušená skleróza);
- **Typ 4** – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;
- **Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu ([myelom](#), [monoklonální gamapatie](#))

Typy IEF nálezu: IF (Sebia)

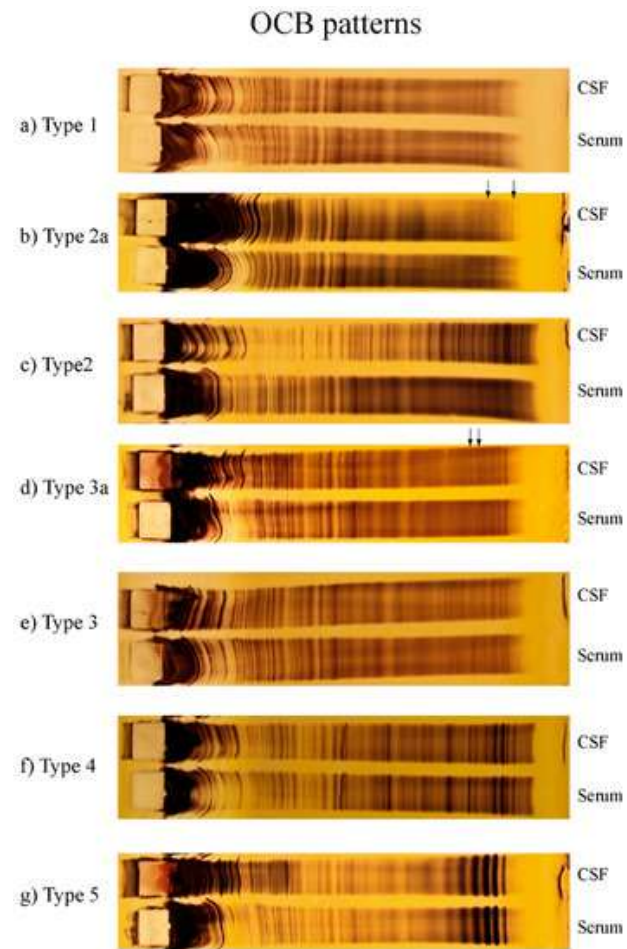
typ 1 – typ 2 – typ 3 – typ 4 – typ 5

dvojice likvor (vlevo), sérum (vpravo)



IEF v polyakrylamidovém gelu

(Pannewitz-Makaj K et al, *Diagnostics* 2021, 11(1): 37)



Elektroforéza bílkovin v sekretu – průkaz likvorey

- **průkaz přítomnosti mozkomíšního moku** (likvorey) provádíme v tekutině z ucha, nosu, úst nebo z operační rány
- nejčastěji se jedná o pacienty po úrazech, operacích nebo po komplikovaných infekčních zánětech centrálního nervového systému
- dříve se pro detekci likvorey využívalo stanovení glukózy nebo celkové bílkoviny
- mezi specifické markery patří elektroforetické stanovení **beta 2 transferinu = asialotransferinu = „ τ -transferinu“**
- Alternativně lze použít kvantitativní stanovení „beta-trace proteinu“ v sekretu a séru (BTP >1,3 mg/L nebo poměr koncentrací v sekretu a séru >2 svědčí pro přítomnost likvoru ve vyšetřovaném vzorku)

HYDRAGEL 6 β 2 TRANSFERRIN (SEBIA)

Princip: elektroforéza s následnou imunofixací s ANTI-Transferin –PER

- **množství vzorku:** 10 μ l bez předchozí úpravy, zároveň analýza séra pacienta (kontaminace příměsí krve)
- **stabilita:** při 2 až 8 °C 1 týden
- **doba analýzy:** 2,5 hod.
- **mez detekce:** 80-100 μ g/l
- **vyhodnocení:**

kvalitativní, kvantitativní



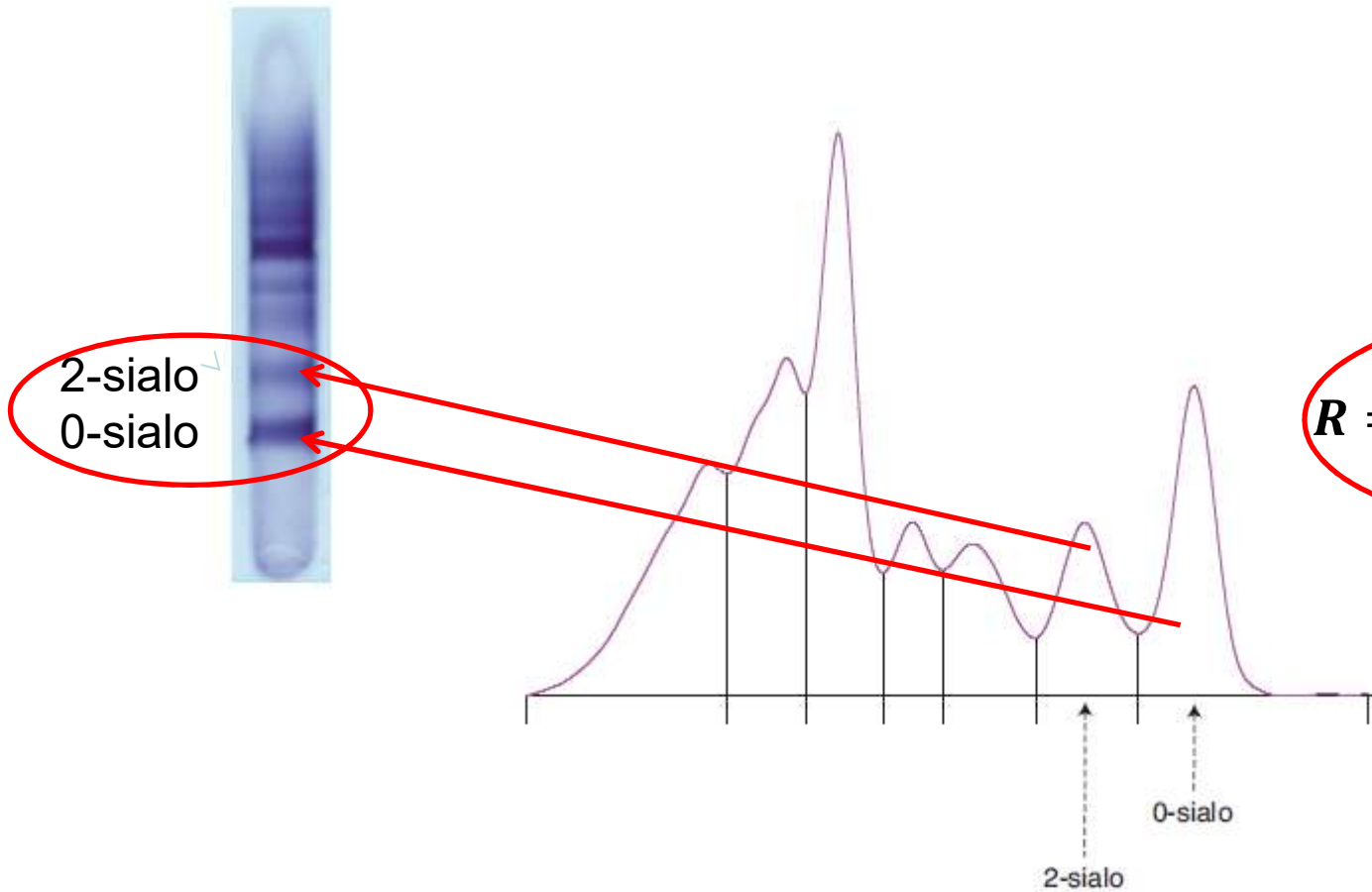
Kvantitativní hodnocení

Frakce

2 - sialo = 9,7 %

0 - sialo = 14,4 %

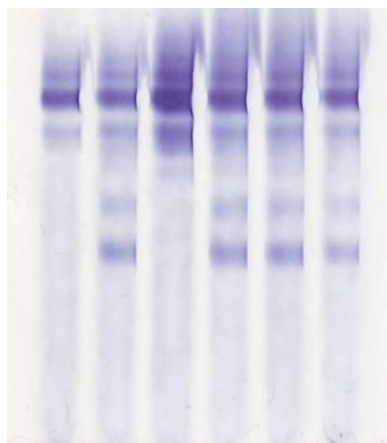
$$R = \frac{0 - sialo}{2 - sialo} = 1,48$$



Hodnocení

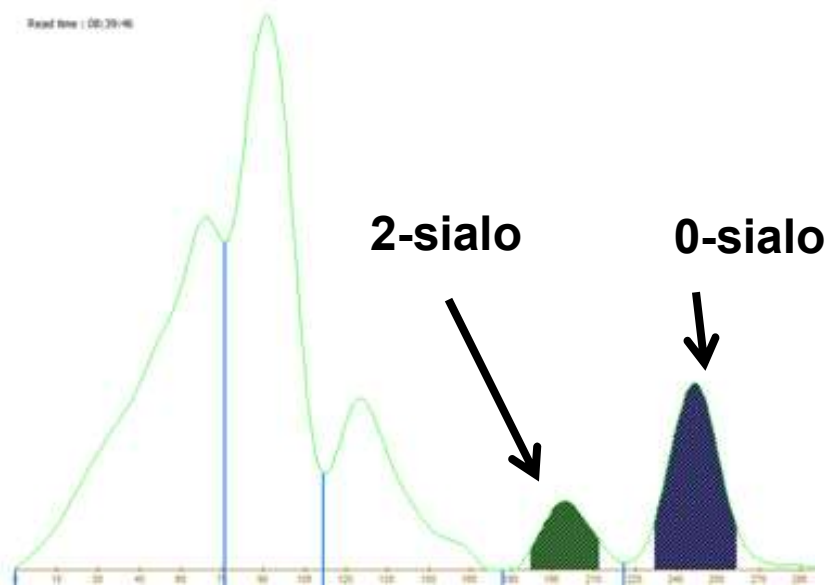
poměr	vzorek sekretu	vzorek séra	hodnocení
asialo/disialo - transferin	> 1	analýza není požadována	pozitivní
asialo/disialo - transferin	≤ 1	poměr asialo/disialo – transferin ze séra \geq poměr asialo/disialo – transferin ze vzorku sekretu	negativní (znečištění plazmou)
		poměr asialo/disialo – transferin ze séra $<$ poměr asialo/disialo – transferin ze vzorku sekretu	pozitivní (část asialo – transferinu pochází z CSF)

Vzorek č.1 – sekret z ucha



- 1- neg. kontrola – sérum
75x řed'.
- 2 - poz. kontrola – likvor
- 3 - sérum pacienta: 10 řed'.
- 4 - sekret pacienta: neř.**
- 5 - sekret pacienta: řed'. 1:1
- 6 - sekret pacienta: řed'. 1:2

1 2 3 4 5 6



2-sialo = 3,6 %
0-sialo = 10,5%
 $R = 0\text{-sialo}/2\text{-sialo} = 2,9$

4

Poměr 0-sialo/ 2-sialo TRF v sekretu > 1- pozitivní

Vertikální fotometrie

- uspořádání absorpční fotometrie, při které paprsek prochází kyvetou vertikálně

- Použití pro měření v mikrotitračních destičkách
- Světlovody (skleněná vlákna) vedou světlo do více (zprav. osmi) jamek současně a další světlovody odvádějí prošlé světlo k detektoru
- Při konstantní ploše kruhové základny je pro stejnou koncentraci konstantní součin absorbance a délky optické dráhy roztokem:

$$A_1 \cdot l_1 = A_2 \cdot l_2$$

- Při krátké optické dráze (cca 3 mm) tak lze docílit solidních výsledků i navzdory malým nepřesnostem v pipetování multikanálovou pipetou

Reflexní fotometrie

- měří záření odražené od homogenně zbarvené podložky
- Matrice: impregnovaná vlákna nebo vícevrstvý (želatinový) film
- Vzorek: plná krev, sérum, plazma, moč
- Suchá činidla aktivovaná vodou obsaženou ve vzorku
- Použití zejména v glukometrech

Děkuji za pozornost