

# Elektroforetické techniky

David Zeman

2024

s využitím výukových materiálů prim. RNDr. Ludmily Nováčkové (1957-2011, FN Ostrava) a Mgr. Jany Gottwaldové (MOÚ Brno)

## Pojmy a definice

- Elektroforéza = pohyb nabitých částic v elektrickém poli; 3 základní techniky:
- **Zónová elektroforéza:** homogenní pufovací systém – konstantní pH; migrační vzdálenosti během definované doby dělení odpovídají elektroforetickým mobilitám dělených látek; lze aplikovat na neamfoterní i amfoterní molekuly; difúze snižuje senzitivitu detekce i rozlišení
- **Izotachoforéza (ITP):** dělení v diskontinuálním systému pufrů, ionizovaný vzorek migruje mezi vedoucím elektrolytem s vysokou mobilitou a terminálním elektrolytem s nízkou mobilitou; lze dělit buď pouze kationty, nebo pouze anionty (ne obojí současně); všechny složky směsi se pohybují stejnou rychlostí; složky směsi jsou rozdělené podle svých elektroforetických mobilit
- **Izoelektrická fokusace (IEF):** dělení v gradientu pH, lze použít pouze pro amfoterní látky (peptidy a bílkoviny); molekuly migrují do svých izoelektrických bodů; samozaostřující (fokusační) efekt brání difúzi
- Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis, CE)

## Teoretické základy elektroforetických metod

- $F_E = q \cdot E$  ( $q = z \cdot e$ )
- $F_{fr} = f_c \cdot v$
- V rovnováze:

$$\begin{aligned}F_E &= F_{fr} \\q \cdot E &= f_c \cdot v \\v &= \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E\end{aligned}$$

$u$  je **mobilita** neboli **elektroforetická pohyblivost** nabité částice, tj. rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Je to veličina charakteristická pro danou látku. V průběhu separace se dostávají dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost, a opožďují se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k oddělení složek směsi.

## Elektroforetická pohyblivost částice $u$

- Pro kulovitou částici platí:

$$u = \frac{q}{f_c} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

- Peptidy a proteiny však nejsou kulovité. Mobilita  $u$  je u nich nepřímo úměrná molekulové hmotnosti podle vztahu

$$u = \frac{q}{M^{2/3}}$$

(exponent ve jmenovateli je udáván různě mezi 1/3 a 2/3)

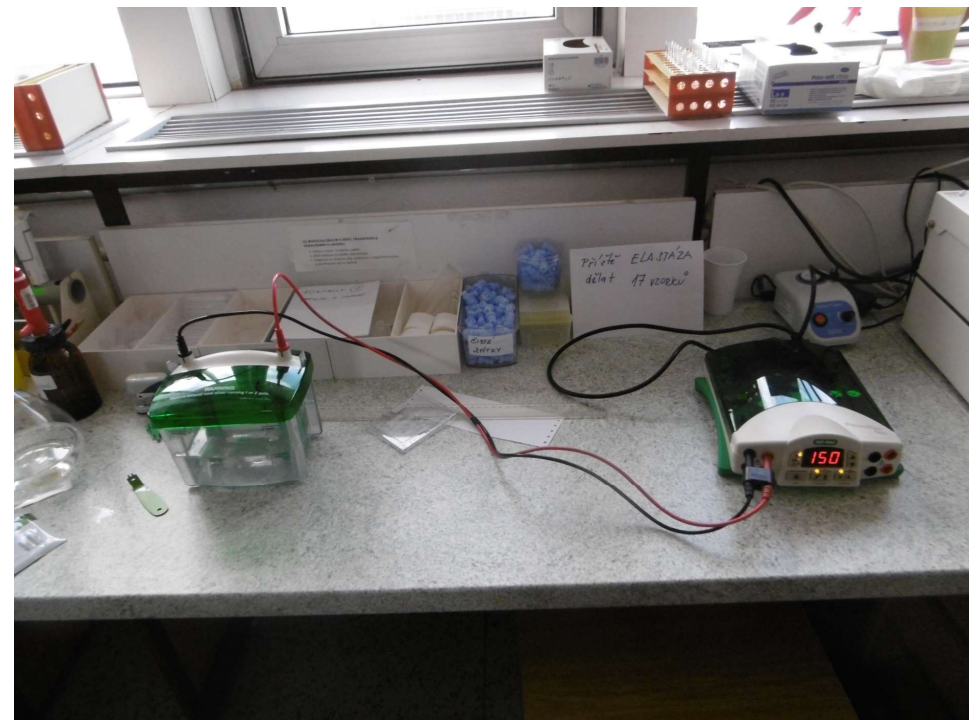
U slabých kyselin a zásad je pro rychlost migrace rozhodující efektivní mobilita  $u_{ef}$  daná vztahem

$$u_{ef} = \sum_i \alpha_i \cdot u_i$$

Kde  $\alpha_i$  je stupeň disociace. Ten lze ovlivnit vhodnou volbou pH elektrolytu.

# Instrumentace – 3 základní komponenty:

- Zdroj stejnosměrného napětí
- Chlazení (termostat)
- Elektroforetická vana/deska
  
- Uspořádání
  - horizontální
  - vertikální



## Elektroforetické komory dle uspořádání

### **vertikální**

- Gely ve skleněných trubičkách nebo mezi skleněnými deskami obklopeny pufrem
- Vzorky se dávkuje shora (aplikační jamky vytvořené pomocí hřebíků)

### **horizontální**

- Gely na inertních fóliích, povrch není uzavřený
- Vzorky se pipetují přímo do aplikačních jamek nebo do aplikátorů (event. na proužky filtračního papíru)
- Na gel se aplikují proužky filtračního papíru s koncentrovaným pufrem
- Lze použít tenčí gely na fóliích, které lze účinněji chladit než vertikální gely – rychlejší dělení s ostřejšími zónami

## Srovnání vertikálních a horizontálních systémů

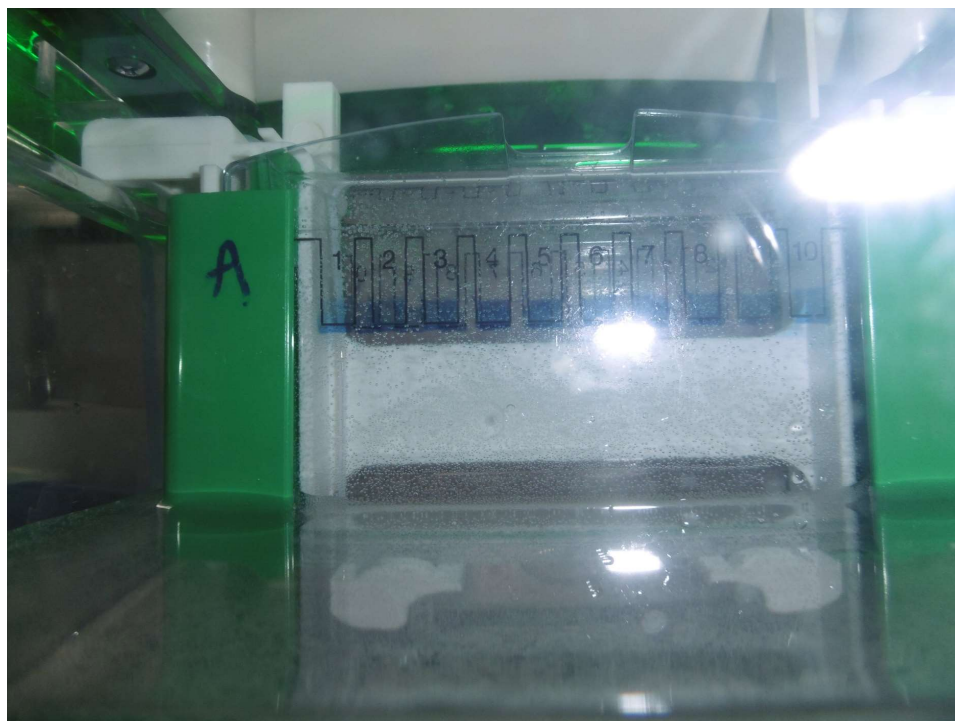
### **vertikální**

- Lze použít gely větší tloušťky, proto lze aplikovat větší množství vzorku
- Chlazení z obou stran
- Snazší blotting z gelů o větší tloušťce
- Lze separovat paralelně na více gelech
- Komplikovaná aplikace vzorku u tenčích gelů
- Nevhodné pro IEF

### **horizontální**

- Nelze použít gely větší tloušťky, protože je lze chladit jen zespodu
- Lze separovat jen na 1 gelu/přístroj
- Univerzální pro nejrůznější metody, ideální pro IEF
- Stripy nasycené pufrem místo velkých objemů tekutých pufců
- Snadný provoz a čištění
- Vyšší elektrická bezpečnost

Průběh vertikální elektroforézy (Mini-PROTEAN Tetra Cell system, Bio-Rad)  
začátek – aplikace obarvených vzorků do jamek  
v průběhu separace migruje k anodě nejrychleji barvivo

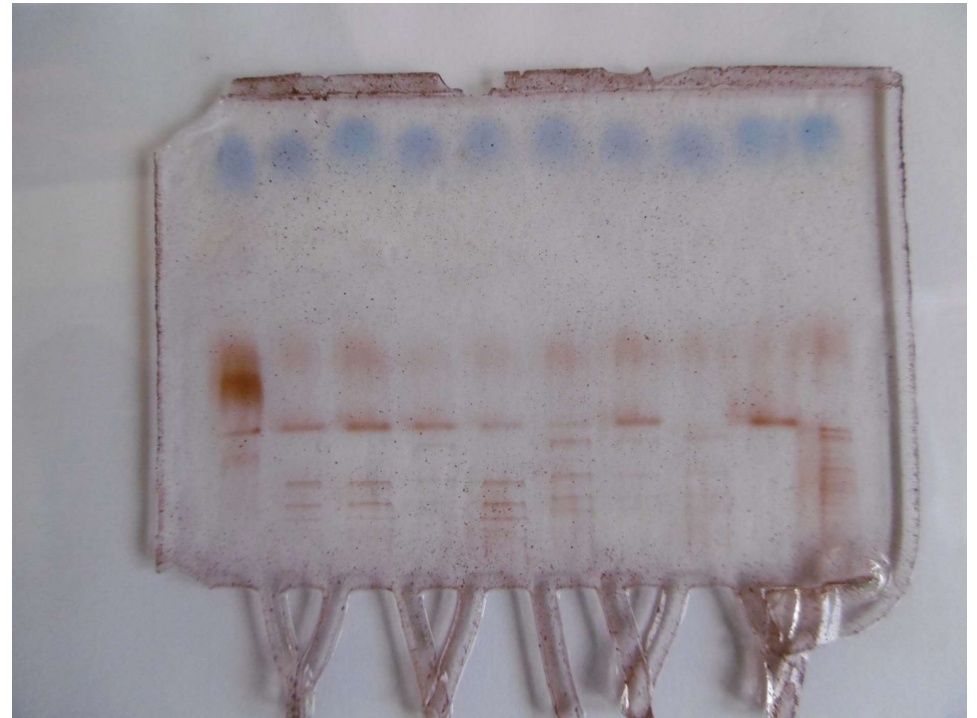




## Průběh vertikální elektroforézy

Když barvivo doputuje k anodickému konci gelu, separaci zastavíme. Gel vyjmeme a barvíme.

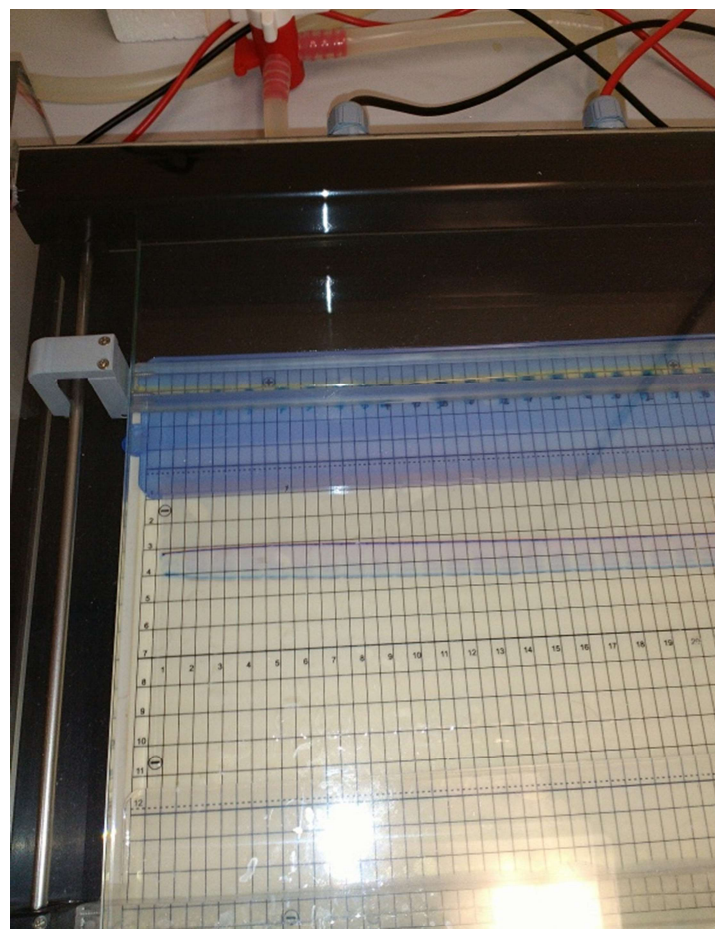
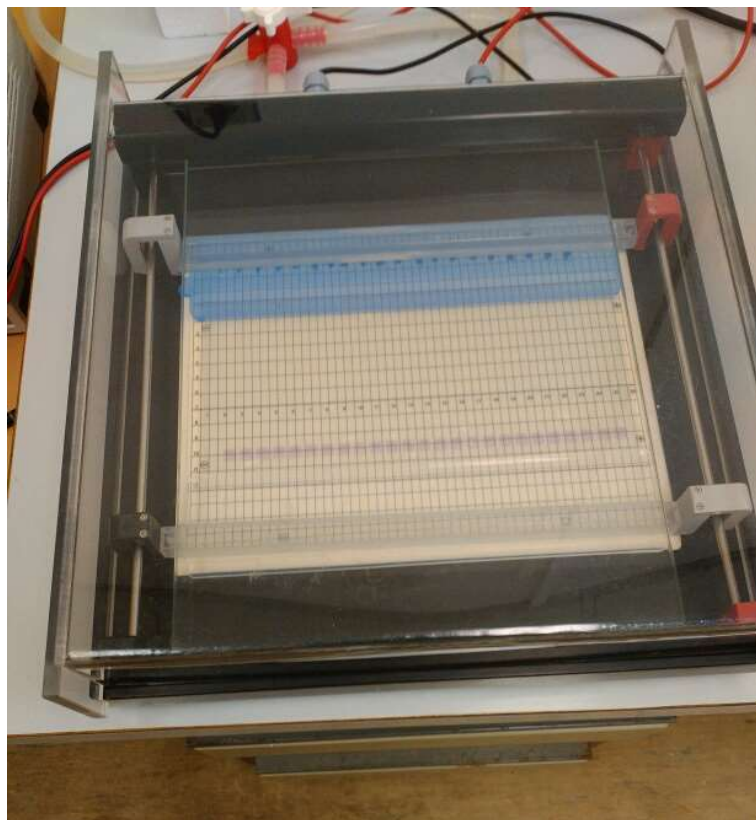
Stanovení fenotypu haptoglobinu v 7,5% polyakrylamidovém gelu (Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, Bio-Rad), 150 V, 2,5 hod



## Horizontální elektroforéza

SDS elfo v polyakrylamidovém gelu, aplikace obarvených vzorků ke katodě, elektrody položeny na katodickém (bezbarvém) a anodickém (modrém) gelovém stripu. V průběhu elektroforézy migruje bromfenolová modř (BPB), která je součástí vzorkového pufru, těsně před SDS.

Když je BPB kompletně v anodovém stripu, separaci ukončíme. (Lépe: použít předobarvenou sadu markerů molekulové hmotnosti – když je marker 10 kDa těsně před anodovým stripem, STOP.)



# Zónová elektroforéza

- **Nativní** – dělení bílkovin podle náboje, v gelech se síťovým efektem přistupuje faktor velikosti a tvaru molekuly
- **SDS-elektroforéza** – dělení bílkovin podle velikosti molekuly (SDS = dodecylsírán sodný – váže se na bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, uděluje jim negativní náboj – všechny bílkoviny migrují k anodě, malé molekuly rychleji, velké molekuly pomaleji); v redukujícím prostředí (beta2-merkapt ethanol, dithiothreitol) se bílkoviny rozpadají na podjednotky a z SDS elfo lze dobře odhadnout M.h.

- **Kontinuální uspořádání** – 1 gel, 1 pufr
- **Diskontinuální uspořádání** (Ornstein a Davis, 1964) – koncentrace vzorku na startu pomocí koncentrujícího gelu na izotachoforetickém principu – zlepšení rozlišení

*Zaostřující („stacking“) gel má větší póry a obsahuje 0,125 mol/L Tris-HCl pufr o pH 6,8*

*Separační gel s malými póry obsahuje 0,375 mol/L Tris-HCl pufr o pH 8,8*

*Elektrodový pufr obsahuje pouze glycin (pI 6,7 – při pH 6,8 téměř nenabitý – nízká pohyblivost)*

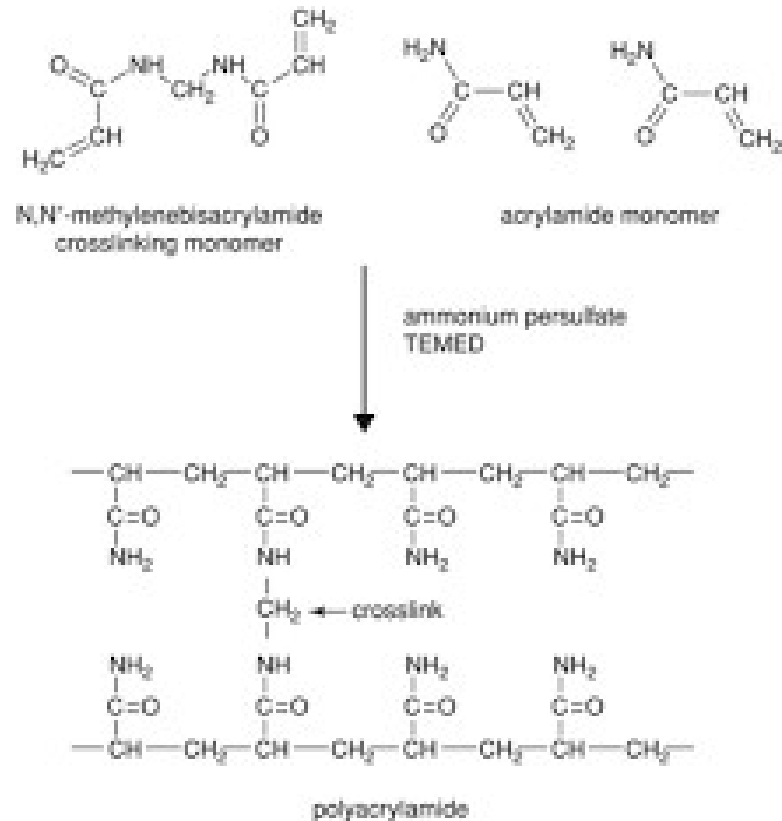
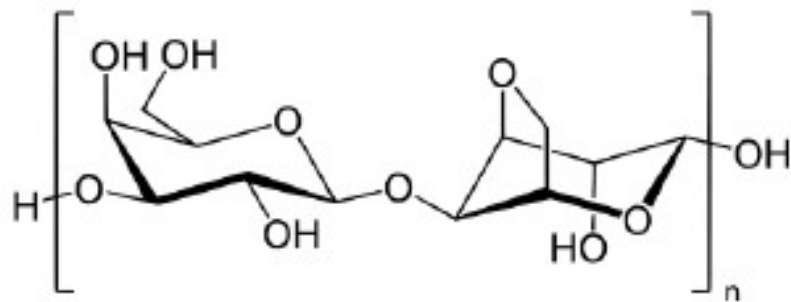
*V zaostřujícím gelu migrují bílkoviny na izotachoforetickém principu v pořadí podle svých mobilit. Na hranici se separačním gelem se prudce zvýší odpor pro velké molekuly bílkovin, glycin získá záporný náboj a „přeskočí“ proteiny, které se v separačním gelu dělí podle náboje a velikosti*

*Pozn.: pro bílkoviny s pI >7 je nutné použít jiný pufrový systém*

## Média pro zónovou elektroforézu

- Papír
- Škrob
- Acetylcelulóza
- Agar
- Agaróza
- Polyakrylamid

# Agaróza (vlevo) a polyakrylamid (vpravo – znázorněn princip přípravy z akrylamidu a N, N'-methylenbisakrylamidu)



## Výhody a nevýhody agarózových a polyakrylamidových gelů

	Agarózový gel	Polyakrylamidový gel
Výhody	<p>Netoxické</p> <p>Jednoduchá příprava</p> <p>Ideální pro dělení vysokomolekulárních bílkovin (&gt;500 kDa)</p> <p>Velké póry (150 nm u 1% agarózy) – do nich mohou difundovat imunoglobuliny, proto je možný specifický průkaz bílkovin přímo v gelu pomocí imunofixace</p>	<p>Velmi stabilní a průhledné</p> <p>Téměř žádná elektroendoosmóza</p> <p>Dobrý síťový efekt (malé póry – 5,3 nm v gelu s 5% T a 3% C; 3,3 nm v gelu s 20% T a 3% C)</p> <p>Jednoduchá manipulace s gelem po separaci</p> <p>Vhodné pro řadu barvicích metod</p>
Nevýhody	<p>Vždy přítomna určitá elektroendoosmóza</p> <p>Malý síťový efekt pro bílkoviny o M.h. &lt;100 kDa</p> <p>Nejsou zcela průhledné</p> <p>Některá barvení (např. stříbření) jsou obtížně proveditelná (dochází k silnému zbarvení pozadí)</p>	<p>Monomery jsou toxické</p> <p>Velikost pórů limituje velikost molekul, které lze dělit (proteiny o M.h. &gt;800 kDa nevstoupí do gelu)</p> <p>Zásadité gely mohou být skladovány jen krátkou dobu (časem dochází k jejich hydrolýze)</p>

# Detekce separovaných bílkovin

- **V gelu:**
- Fixace (chemicky – např. 20% TCA, teplem – sušení gelu – denaturace proteinů, zamezení difúze; použitím specifického antiséra s následným odmytím ostatních bílkovin)
- Barvení:
  - Coomassie Blue
  - Amidočerň
  - Kyselá violeť
  - Stříbření
  - Fluorescenční barvení (např. SYPRO Ruby)
- **Na membráně** (nitrocelulózkové, PVDF) po přenosu proteinů z gelu („western blotting“)
  - Možnost imunodetekce s chromogenní, fluorescenční nebo chemiluminiscenční koncovkou (protilátka značená peroxidasou → přídavek substrátu - bezbarvého chromogenu, který se v přítomnosti  $H_2O_2$  oxiduje na barevný produkt, který musí být nerozpustný (např. diaminobenzidin; nebo: oxidace luminolu → luminiscence)

*Po odmytí přebytku barviva se gel suší.*

**Elfo bílkovin séra - postup heslovitě: MIGRACE - SUŠENÍ – BARVENÍ – ODBARVENÍ - SUŠENÍ**

# Izotachoforéza

řecky *isos* = stejný, *tachos* = rychlost

- Všechny ionty migrují stejnou rychlostí
- Složky směsi jsou rozděleny v „iontovém vlaku“
- Samozaostřovací efekt
- Efekt regulující koncentraci (Kohlrauschova regulační funkce):

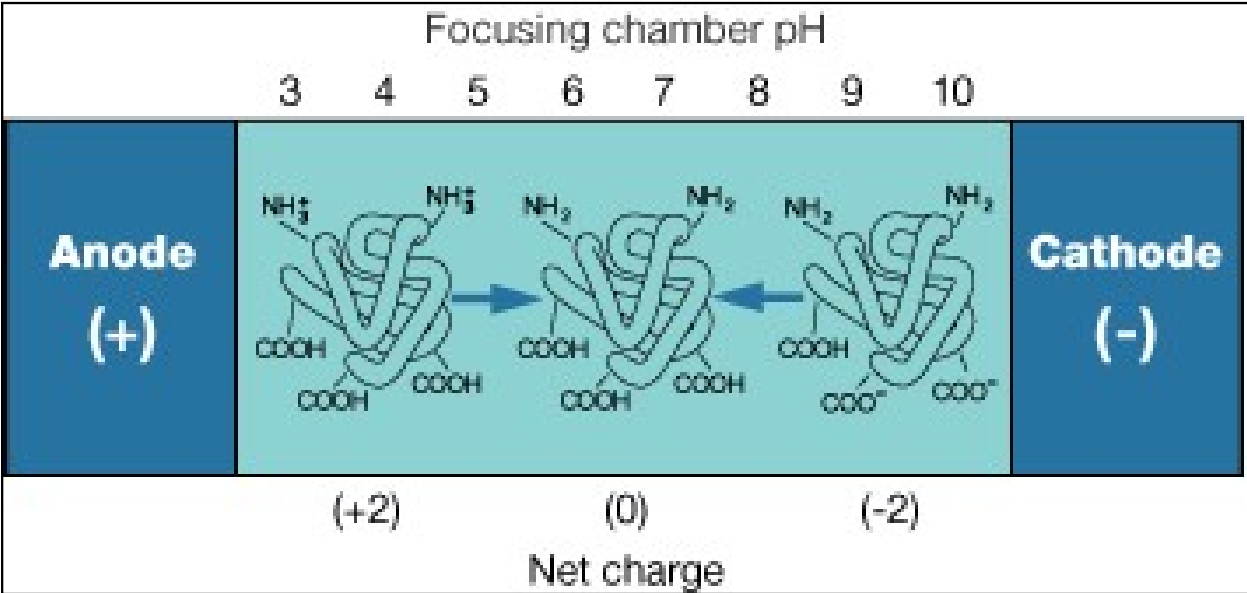
$$c_A = c_L \cdot \frac{\mu_A(\mu_L + \mu_Q)}{\mu_L(\mu_A + \mu_Q)}$$

kde  $c_A$  = koncentrace analytu;  $c_L$  = koncentrace vedoucího elektrolytu;  $\mu$  = pohyblivost (mobilita) analytu (A), vedoucího elektrolytu (L) resp. protiiontu (Q)

- Předpokladem ITP separace je **diskontinuální pufrovací systém** s vedoucím (leading, L) a terminačním (terminating, T) elektrolytem
- U běžnější separace aniontů je L (příklad:  $Cl^-$ ) na anodické a T (příklad:  $Gly^-$ ) na katodické straně. Protiion je společný (příklad:  $Tris^+$ )



# Izoelektrická fokusace (IEF)



## Izoelektrická fokusace

- Dělení amfoterních látek (peptidů, proteinů) podle jejich izoelektrického bodu

- Vysoké rozlišení:  $\Delta pI = \sqrt{\frac{D[d(pH)/dx]}{E[-du/d(pH)]}}$

$\Delta pI$  = rozlišovací schopnost

D = difúzní koeficient bílkoviny

E = síla elektrického pole (V/cm)

$d(pH)/dx$  = pH gradient

$du/d(pH)$  = směrnice mobility bílkoviny v izoelektrickém bodu

## Způsoby provedení IEF podle účelu

- **ANALYTICKÁ IEF** (pro analýzu peptidů a proteinů)
  - agarózový gel
  - polyakrylamidový gel
    - s nosičovými amfolyty (oligoamino-oligokarboxylové kyseliny)
    - s imobilizovaným pH gradientem (bifunkční /nikoliv amfoterní!/ akrylamidové deriváty s pufrující skupinou /karboxyskupina nebo terc. amin/ navázanou na dusík aminoskupiny)
- **PREPARATIVNÍ IEF** (cílem je získat relevantní množství daného peptidu/proteinu po jeho separaci ze směsi)
  - Dextranový gel s nosičovými amfolyty
  - Izoelektrické membrány (polyakrylamid s Imobiliny – každá membrána má příslušnou hodnotu pH)
  - Off-gel IEF: na IPG – proužcích (frakcionační rámeček s 24 komůrkami se přiloží na povrch IPG proužku)

**IPG-gely získáme při nalévání gelu kontinuální změnou míšícího poměru Imobilinů (podobně jako při nalévání gelu s gradientem velikosti pórů) – principem je acidobazická titrace, aktuální hodnota pH je definována Henderson-Hasselbachovou rovnicí:**

- Je-li pufrujícím Imobilinem zásada:

$$pH = pK_B + \log \frac{c_B - c_A}{c_A}$$

- Je-li pufrujícím Imobilinem kyselina:

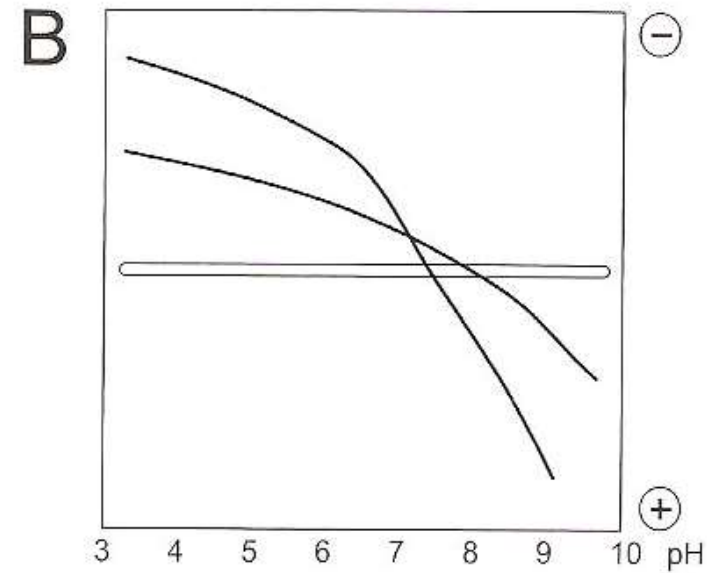
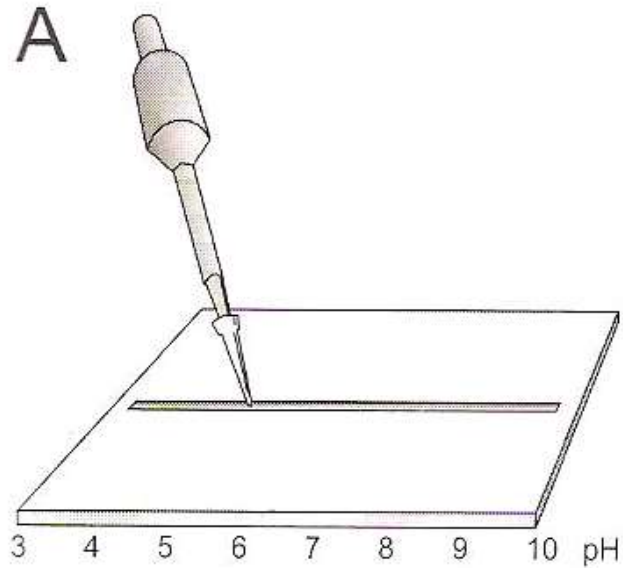
$$pH = pK_A + \log \frac{c_B}{c_A - c_B}$$

# 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
- $\text{pI}$  = 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  $\text{pK}$  „na obě strany“ od elektroneutrálního zwitteriontu ( $\text{pI}$  leží mezi hodnotami  $\text{pK}$  zwitteriontu a jeho konjugované kyseliny)
- Při fyziologickém  $\text{pH}$  je většina bílkovin záporně nabitá

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

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



# Vysokorozlišovací dvourozměrná elektroforéza

- 1. krok: IEF na IPG-proužcích
- 2. krok: SDS-PAGE

## 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'Farrellem a Klosem), rozšířena byla až s rozvojem proteomiky v posledních letech.

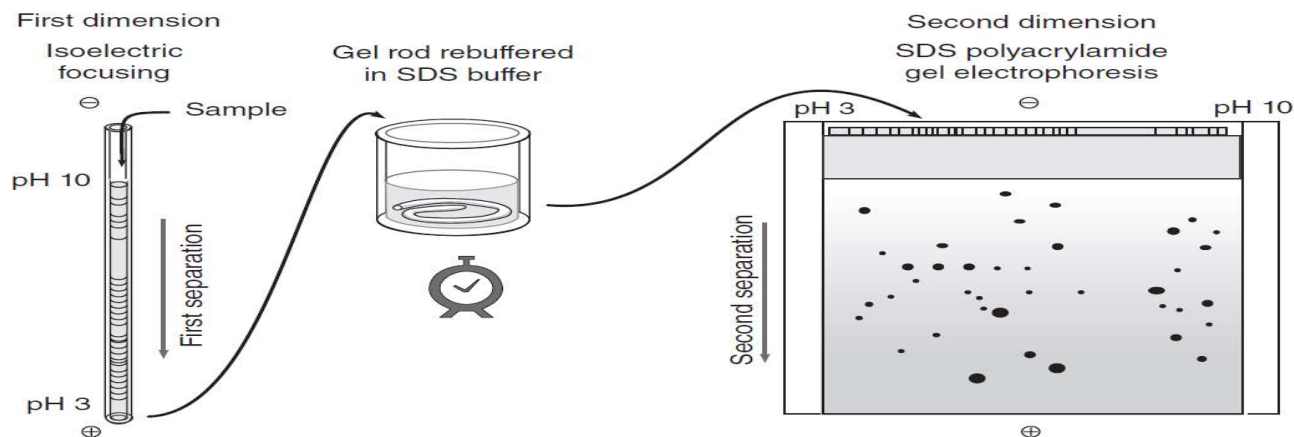
**Proteomika** je obor, který se zabývá **globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem)**, rovněž však **zkoumá strukturu a interakce proteinů.**



# 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 (IEF)
- **v druhém rozměru** se proteiny dělí v závislosti na jejich **molekulové hmotnosti** použitím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a SDS (SDS -PAGE).

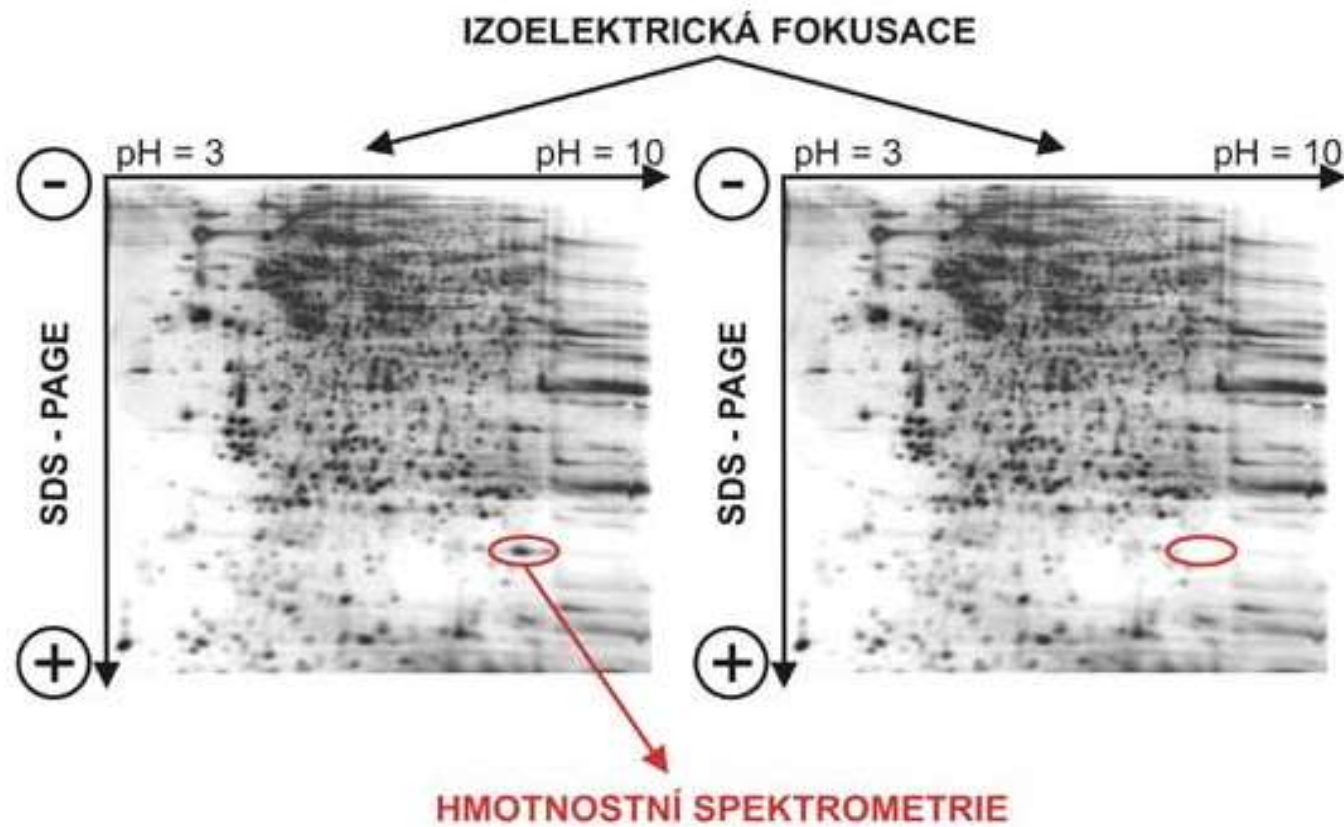


# Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

## **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)



## Komerčně dostupné elektroforetické systémy pro použití v klinické laboratorní diagnostice

- Firma Sebia (založena 1967, nadřízená organizace: Montagu Private Equity)
- [www.sebia.com](http://www.sebia.com)
- Firma Helena Laboratories (založena 1966)
- [www.helena.com](http://www.helena.com)

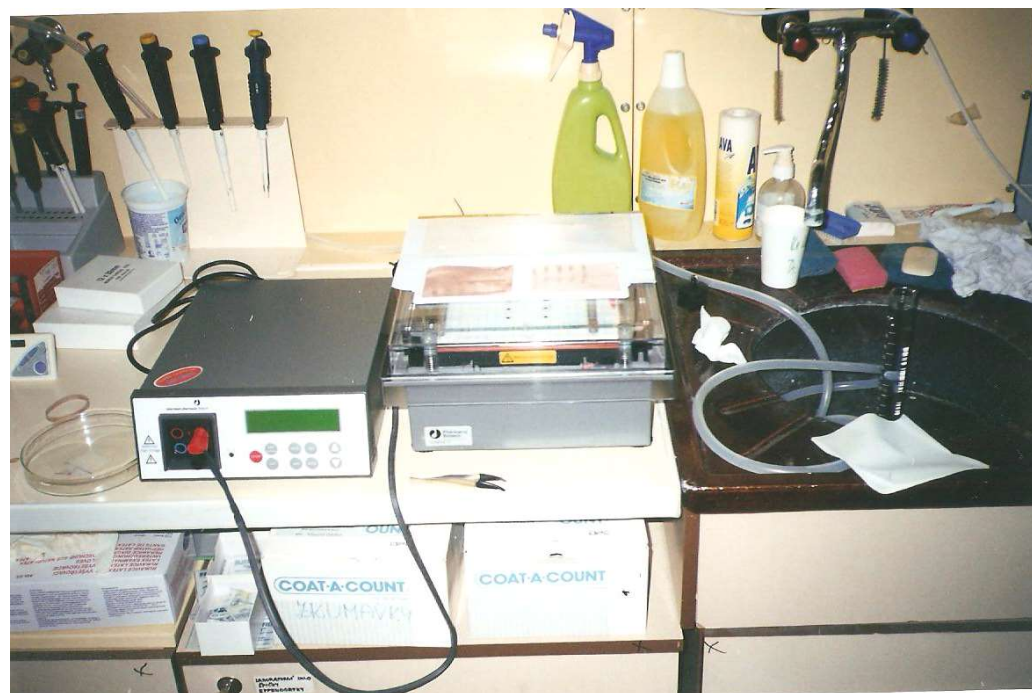
# Elektroforetický přístroj Hydrasys2 (Sebia) – pro elektroforézu a izoelektrickou fokusaci



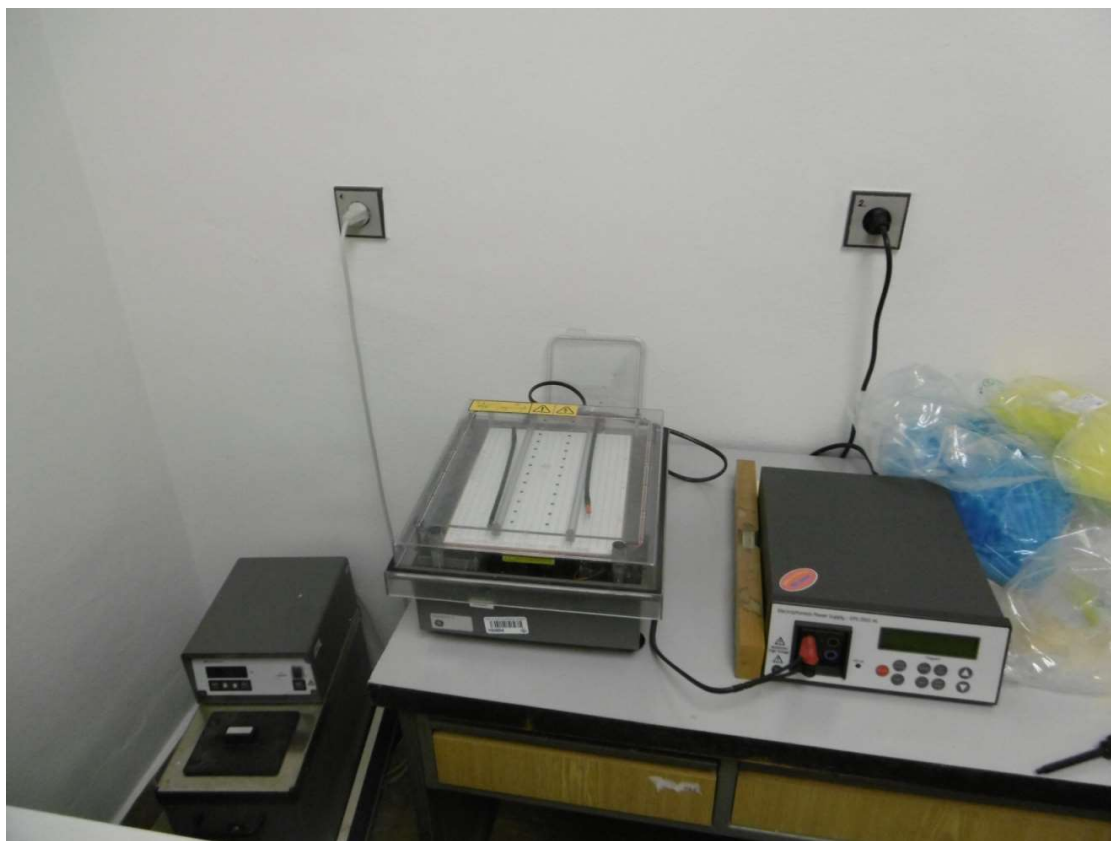
## Phast System™ † (GE Healthcare)



*Multiphor II † (GE Healthcare) s vysokovoltážním zdrojem,  
chlazený vodovodní vodou (nevhodné!)*



Elektroforetický přístroj Multiphor II † (uprostřed) se zdrojem (vpravo) a termostatickým cirkulátorem MultiTemp III (vlevo)





Elektroforetický přístroj Flatbed Professional (EDC, uprostřed) se zdrojem (Consort, vlevo) a termostatickým cirkulátorem (Huber, vpravo)



Elektroforetický přístroj HPE™ Blue Horizon System  
(Serva Electrophoresis GmbH; termostatický cirkulátor firmy Huber) – *FN Brno*



## Hodnocení elektroforeogramů („elektroferogramů“) v gelech a na membránách

- *Převod signálu na digitální signál*
- **Denzitometry** (mobilní fotometry – viz dále; výsledný záznam = diagram s píky – denzitogram; plochy pod píky mohou být kvantifikovány – např. detekce zón albuminu,  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-,  $\gamma$ -globulinů při elektroforéze sérových bílkovin)
- **Videokamery** (pro viditelné a UV světlo; chlazené CCD kamery mají velmi vysoké rozlišení; výhoda: možnost akumulace signálu po určitou dobu – detekce slabých signálů)
- **Stolní scannery** (levnější než denzitometry, rychlé, vysoké rozlišení, mohou skenovat v transmittančním i reflektančním módu)
- Výsledky jsou zpracovány počítačově s pomocí vhodného softwaru – kvantitativně/kvalitativně

# Denzitometrie

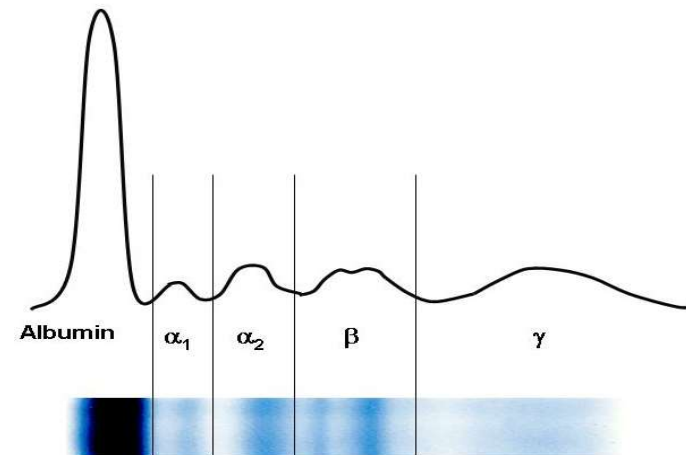
- Kvantitativní hodnocení intenzity zbarvení
- Měření absorpce světla jednotlivými zónami (pásy)
- Pohyblivý světelný zdroj (laser nebo lampa s bílým světlem s filtry) je veden nad gelem a na každém místě gelu je měřena a počítačově zpracována absorpce
- U jednorozměrných gelů získáváme křivku extinkce  $\ln I_0/I$  ( $I_0$  = 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

# Denzitometrie



# 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.  $\alpha_1$  globuliny=0,03)
- používají se %  
(př.  $\alpha_1$  globuliny=3%)
- přepočítání na g/L z S-CB



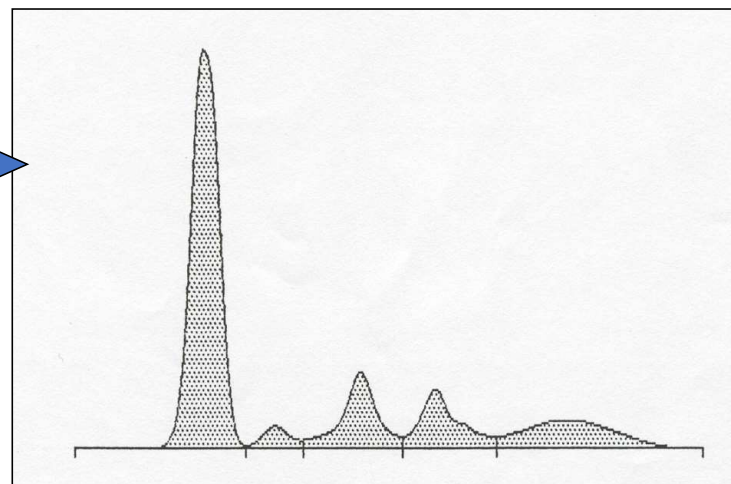
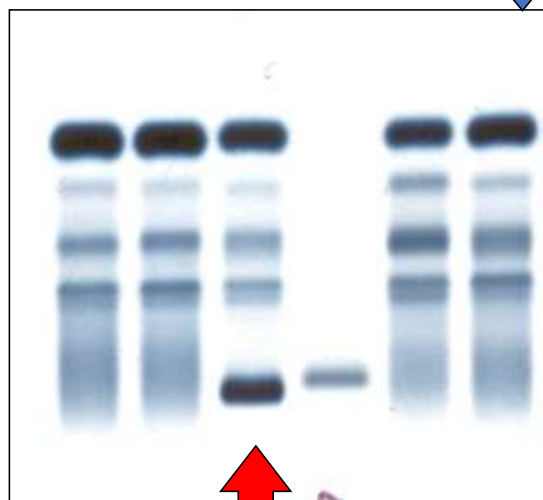
# Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad šěrbinou, 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.

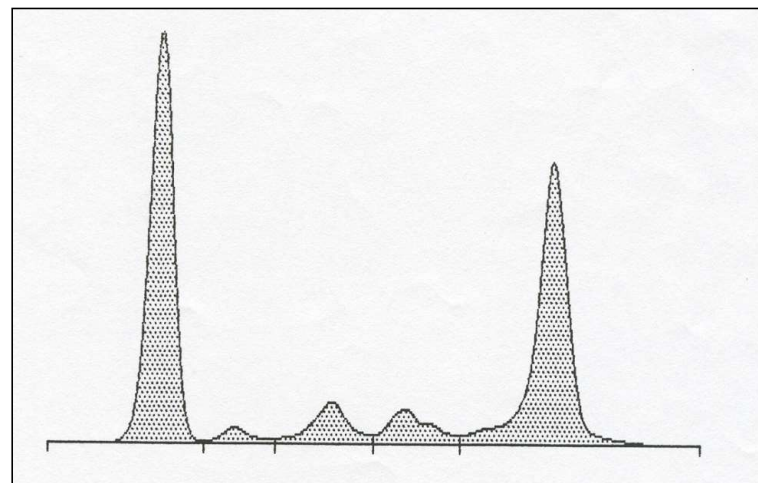
Barva	$\lambda_{\max}$ [nm]
Amidočerň 10B	620
Coomassie Brillant Blu R-250	590
Coomassie Brillant Blu G-250	595
Fast Green	610
Acid violet	
Alcian Blu	630
Basic Fuschin	550
Methyl Green	635
Ethidium Bromide (Fluorimetrická detekce)	
Bromcresol Green	
Methylene Blue	665
Pyrimin Y	510
Toluidine Blu O	620

# Denzitometrické vyhodnocení

Normální nález



„M“ gradient





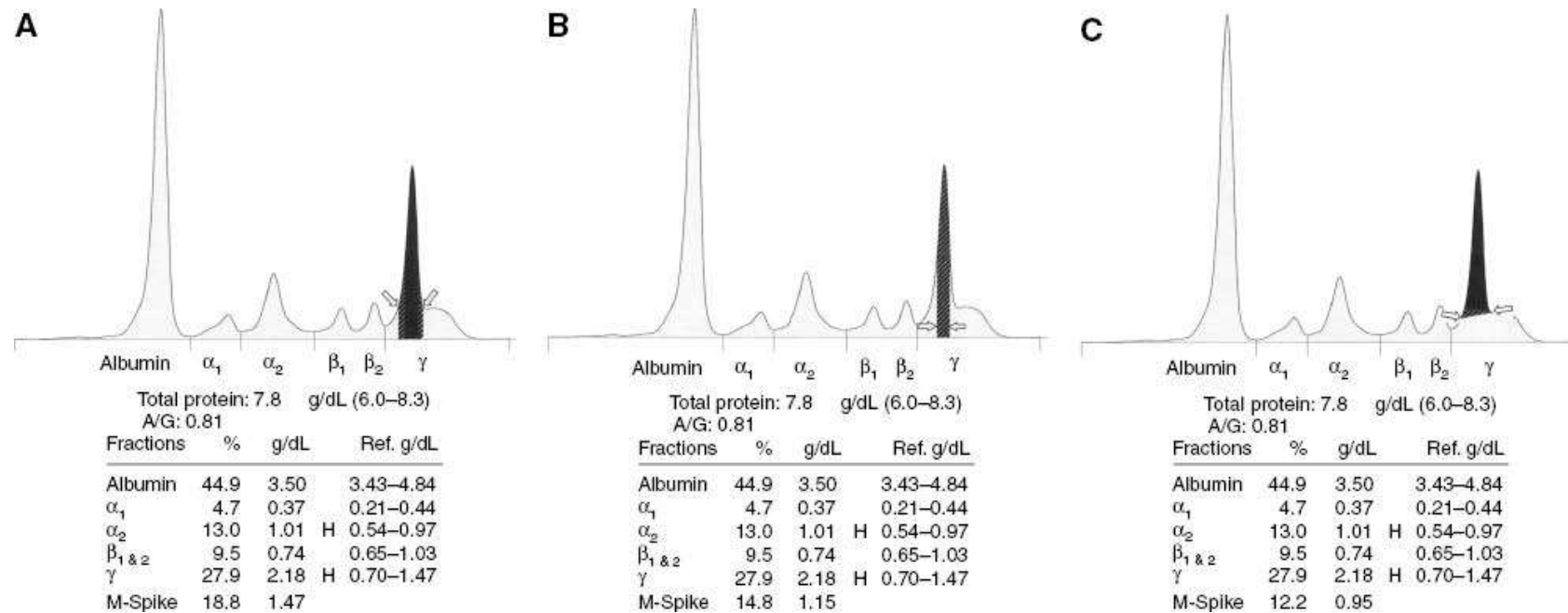
# Metody pro kvantifikaci M-komponenty

- Odečet z elektroforézy
  - „**Perpendicular drop**“: ohraničení kolmicemi k ose x v místech, kde M-komponenta „nasedá“ na polyklonální pozadí
  - „**Corrected perpendicular drop**“: ohraničení kolmicemi k ose x, v případě polyklonálního pozadí se pokoušíme toto pozadí kompenzovat zúžením měřené oblasti (velmi subjektivní)
  - „**Tangent skimming**“: ohraničení M-komponenty zdola úsečkou spojující body, kde M-komponenta „nasedá“ na polyklonální pozadí

*Další možností je odečet z kapilární elektroforézy po imunsubtrakci – zatím nelze používat v rutinní praxi*

# Kvantifikace M-komponenty: 3 používané metody elektroforeogramy z kapilární elektroforézy

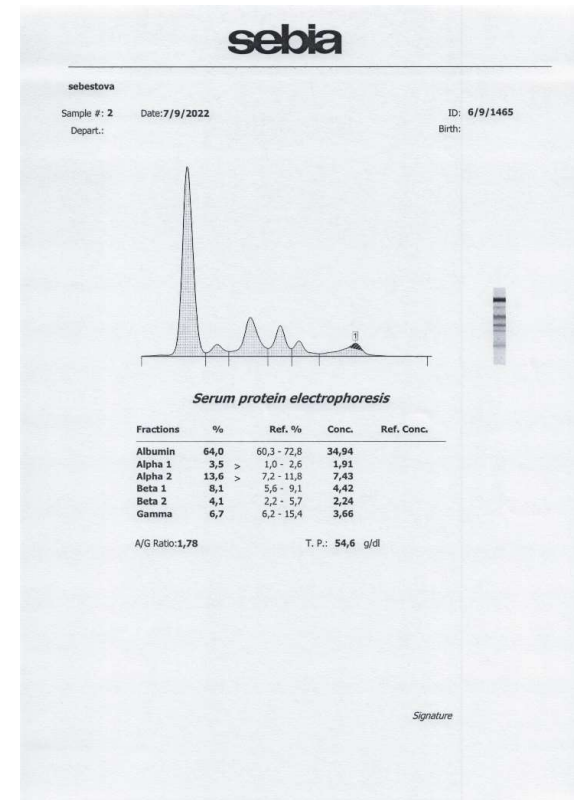
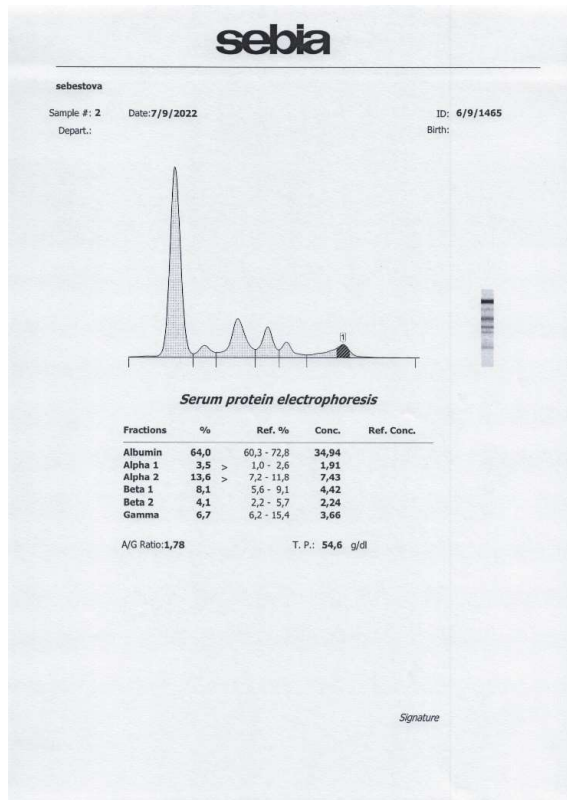
Keren DF, Schröder L. *Clin Chem Lab Med* 2016



# Kvantifikace M-komponenty

vlevo: perpendicular drop

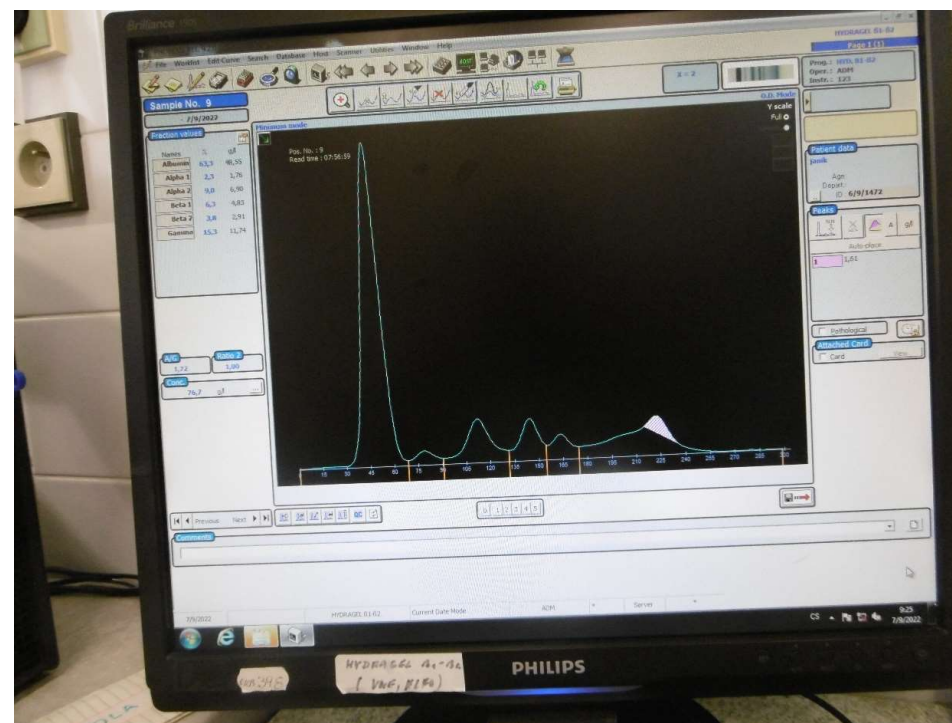
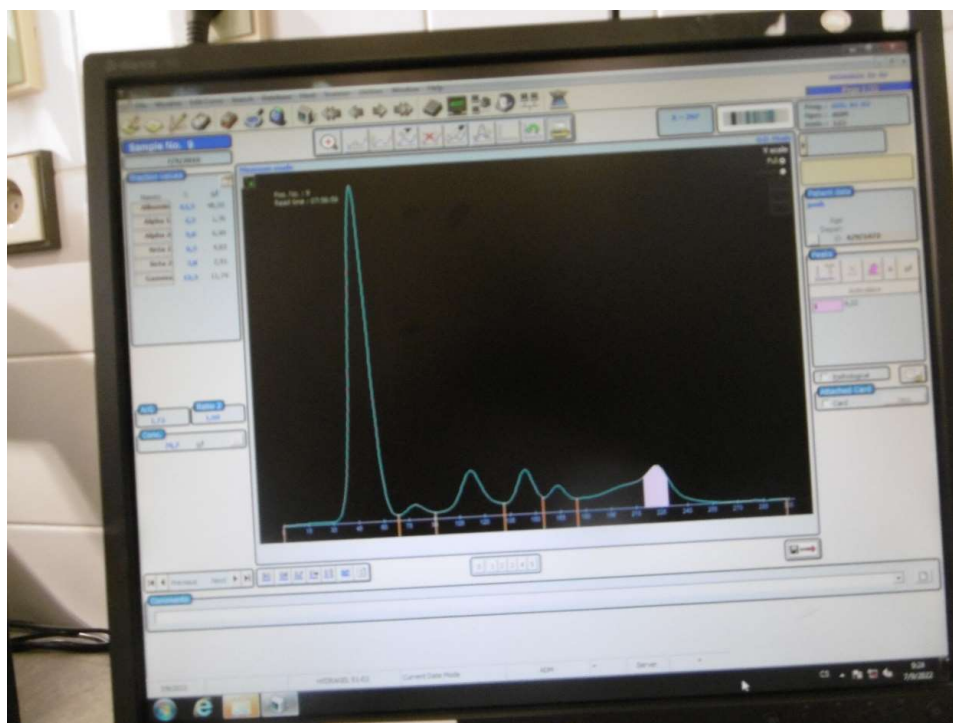
vpravo: tangent skimming



## Kvantifikace monoklonální komponenty

*vlevo*: ohraničení kolmicemi k ose x („perpendicular drop“): 4,2 g/L

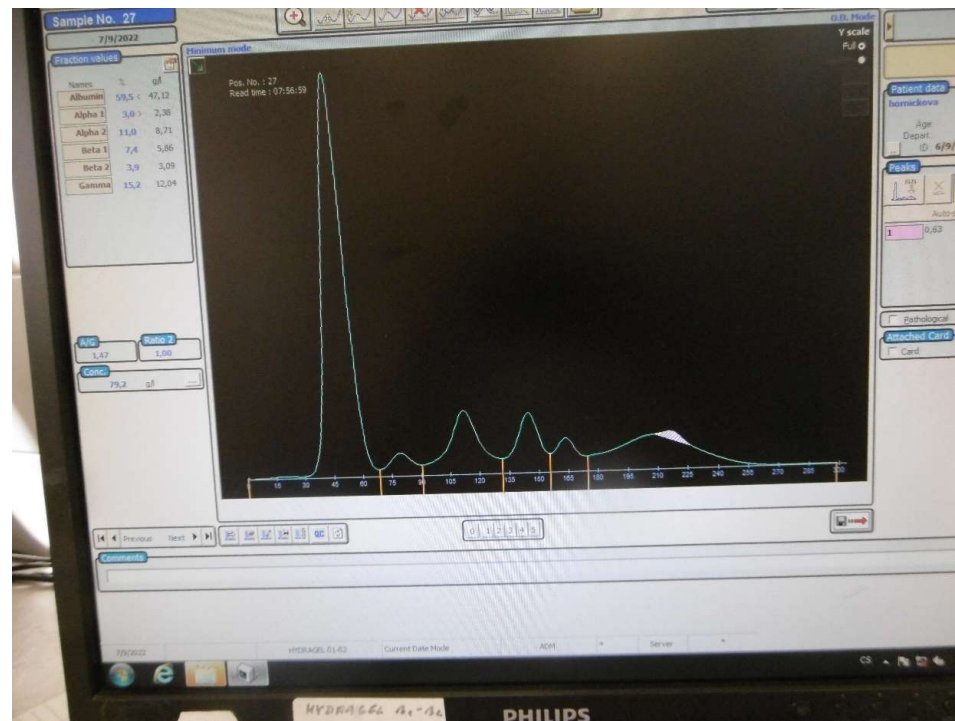
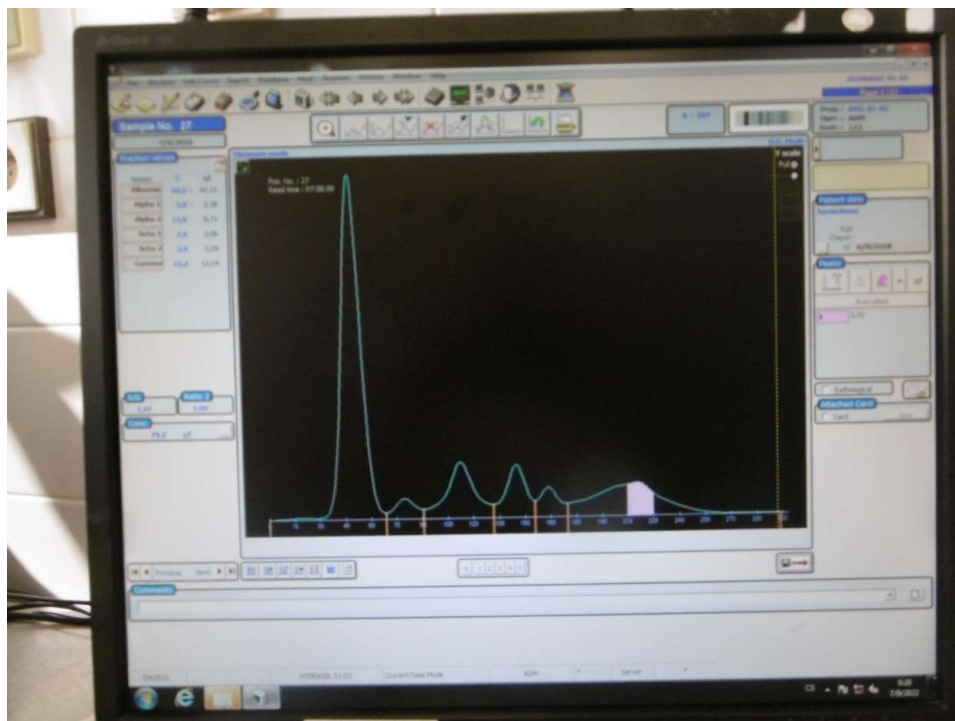
*vpravo*: ohraničení zdola úsečkou mezi body, kde M-pík nasedá na polyklonální pozadí („tangent skimming“): 1,6 g/L



# Ohraničení monoklonální komponenty – problém polyklonálního pozadí

*vlevo*: ohraničení kolmicemi k ose x („perpendicular drop“): 3,7 g/L

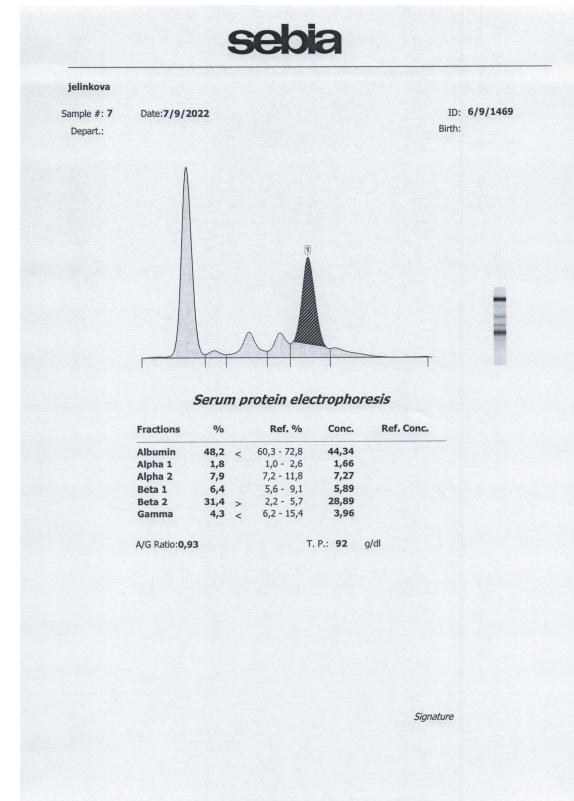
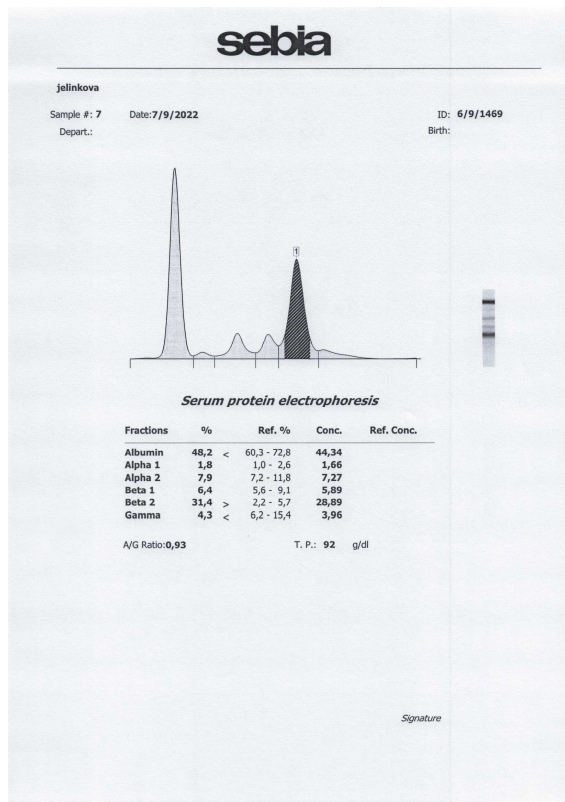
*vpravo*: ohraničení zdola úsečkou mezi body, kde M-pík nasedá na polyklonální pozadí („tangent skimming“): 0,6 g/L



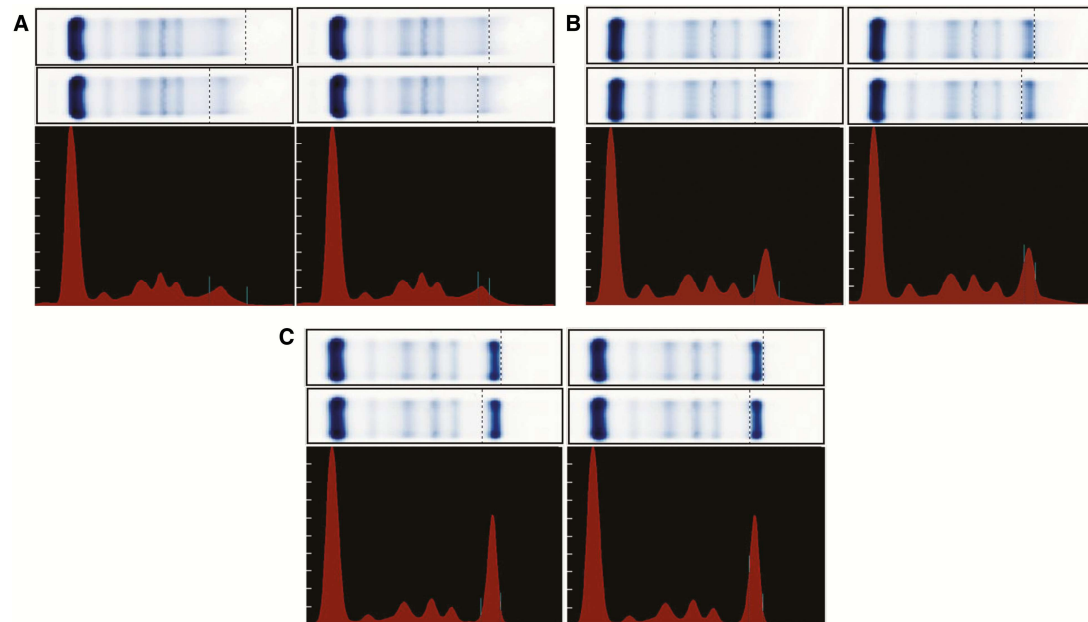
## M-komponenta v $\beta_2$ frakci

vlevo: perpendicular drop (26,1 g/L)

vpravo: tangent skimming (21,0 g/L) – pro paraproteiny migrující v  $\beta$  frakci se nedoporučuje



**Figure 1** Serum protein electrophoresis and densitometric scanning: A, Low-level, broad-based monoclonal immunoglobulin ...



# Elektroforetické metody v klinické laboratoři

- Elektroforéza bílkovin séra a moče (agaróza, CE) – zejména screening monoklonálních gamapatií
- Imunofixační elektroforéza bílkovin séra a moče (agaróza) NEBO imunosubtrakční elektroforéza (CE) – typizace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)
- SDS elektroforéza bílkovin moče – diferenciální diagnostika proteinurií (glomerulární, tubulární, postrenální)
- Elektroforéza hemoglobinů – detekce abnormálních hemoglobinů
- Elektroforéza izoform některých enzymů – ALP, LDH, CK
- Elektroforéza lipoproteinů
- Izoelektrická fokusace – detekce oligoklonálních pásů (zejm. IgG) v likvoru u chronických zánětlivých onemocnění CNS (zejm. roztroušené sklerózy); fenotypizace alfa1-antitrypsinu
- Elektroforéza nebo izoelektrická fokusace s detekcí izoform transferinu (průkaz likvoru v sekretech – v likvoru je přítomna kompletně desialovaná frakce, tzv.  $\beta$ 2-transferin neboli asialotransferin; CE pro relativní kvantifikaci CDT – disialofrakce, popř. s mono- a asialofrací)



## Elektroforéza bílkovin

se provádí s cílem **zjistit abnormality bílkovin krevního séra.**

☞ Bílkoviny jsou rozděleny podle svých elektroforetických pohyblivostí do skupin (frakcí), které vytvářejí charakteristický obrazec.

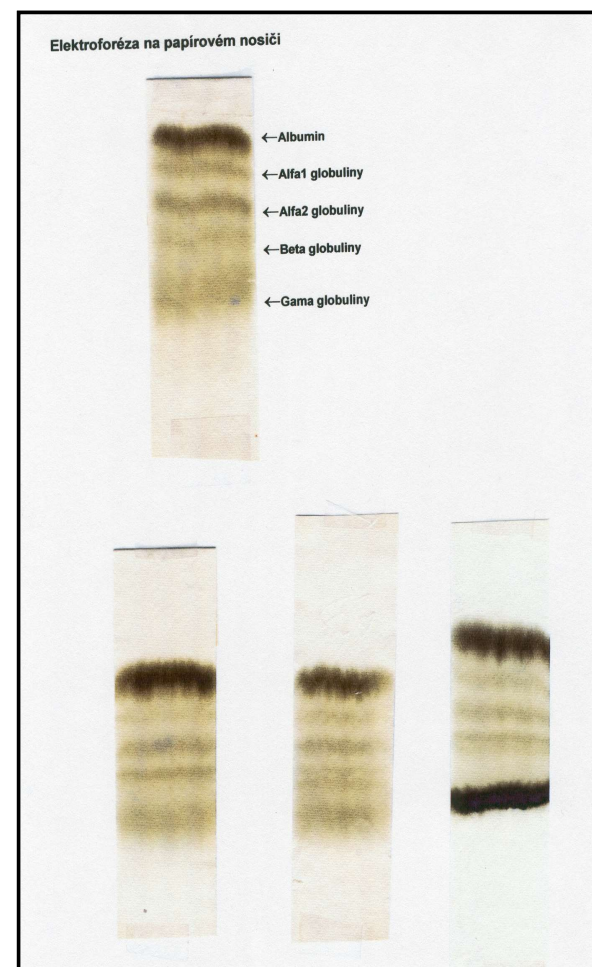
☞ Změny v tomto obrazci souvisí s různými druhy onemocnění nebo s různými patologickými stavy.

Bílkoviny se dělí na 5 – 6 hlavních frakcí:

✦	Albumin	56 – 66 %
✦	$\alpha$ 1 globuliny	2 – 3 %
✦	$\alpha$ 2 globuliny	8 – 12 %
✦	$\beta$ globuliny ( $\beta$ 1, $\beta$ 2)	7 – 10 %
✦	$\gamma$ globuliny	10 – 18 %

Typ: **ELFO na papíře**  
Nosič: chromatografický papír  
Nanášení: mikroskop. podložní sklo  
Denaturace: tepelná  
Barvení: amidočerň 10B  
Odbarvení: zředěná kyselina octová  
Hodnocení: fotometricky  
Poznámka: dlouhá doba dělení

První typ elektroforézy  
používaný v klinické praxi



Typ: **ELFO na agaru**

Nosič: agaróza + agaropektin

Nanášení: papír, hřeben, fólie

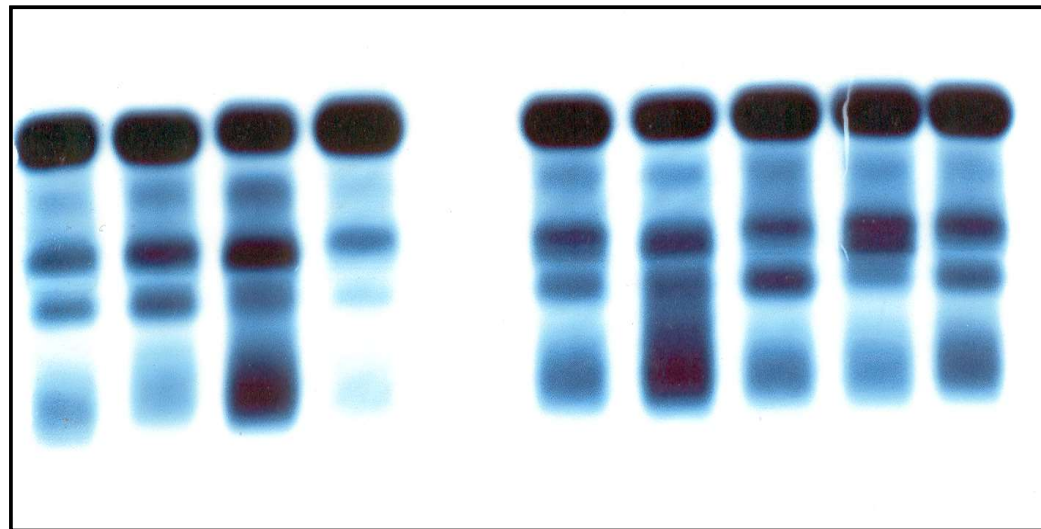
Denaturace: kyselina octová

Barvení: anionická barviva

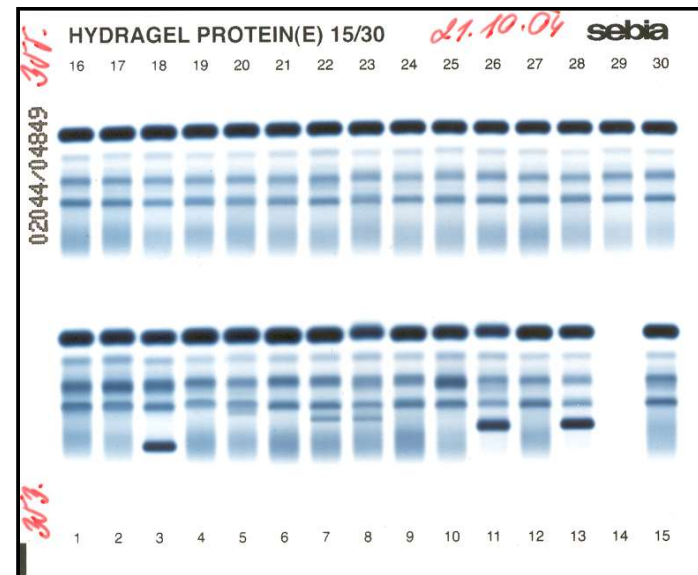
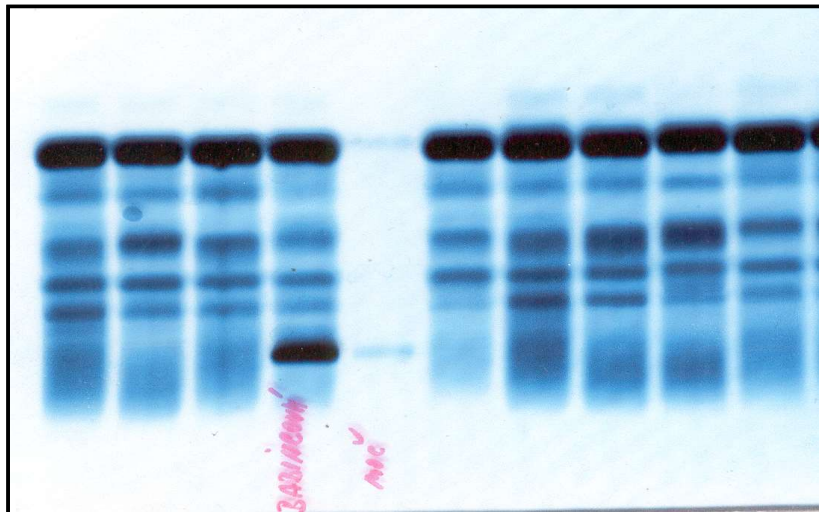
Odbarvení: kyselina octová

Hodnocení: vizuálně

Poznámka: elektroendoosmóza



Typ: **ELFO na agaróze**  
Nosič: agaróza  
Nanášení: hřeben, fólie  
Denaturace: kyselina pikrová  
Barvení: anionická barviva  
Odbarvení: kyselina octová  
Hodnocení: vizuálně nebo denzitometricky  
Poznámka: automatizace



## Agaróza

Agaróza je polysacharid z mořských řas.

- ★ Jde o lineární polymer galaktózy a 3,6 – anhydrogalaktózy.
- ★ Rozpouští se v horké vodě a po ochlazení tuhne.
- ★ Tvoří dvoušroubovice ve svazcích, které se spojují do trojrozměrné struktury. Vodíkové vazby.
- ★ Vysoké koncentrace agarózy generují gel s malými póry a naopak. 1% gel má póry 150 nm.

Agarózový gel má větší póry než PAG – větší molekuly snadněji putují v agaróze.

Přítomnost reziduálních nábojů generuje elektroendoosmózu (použít extrémně čistou)

Typ: **ELFO na acetylcelulóze**

Nosič: acetylcelulóza (celulóza + acetanhydrid)

Nanášení: speciální tiskátko

Denaturace: kyselina trichloroctová

Barvení: anionická barviva

Odbarvení: směs – metanol + kyselina octová

Hodnocení: denzitometricky (po zprůhlednění)

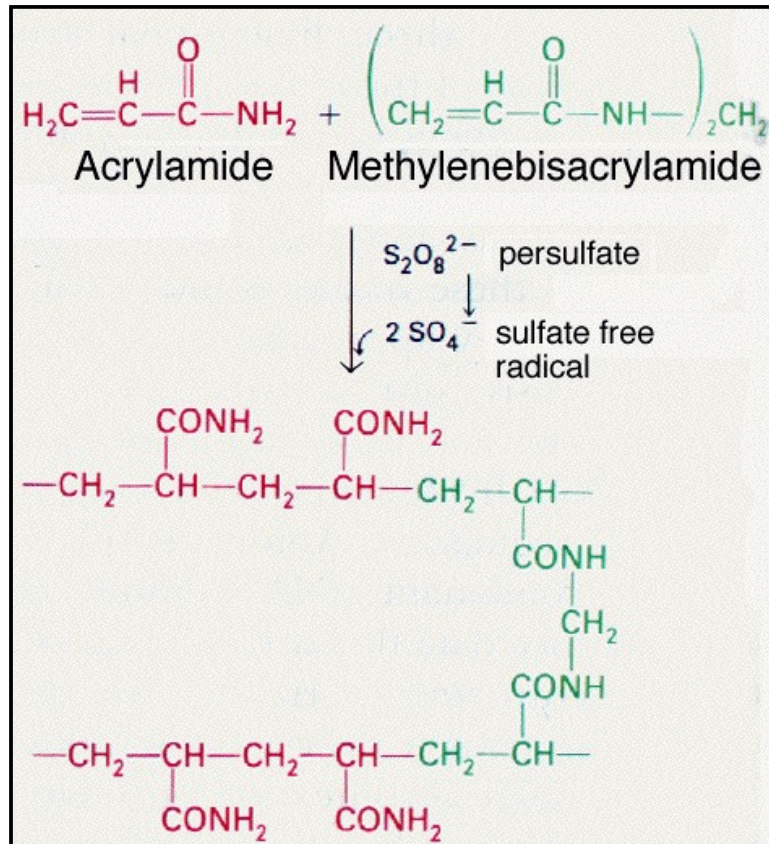
Poznámka: dovozové fólie

Zprůhledňovací směs:

Metanol s ledovou kyselinou octovou

Cyklohexanol

## Typ: ELFO na polyakrylamidu



## Polyakrylamidový gel

Tvořen polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu v pufru, zahájenou volnými radikály.

Ty vzniknou při rozkladu persíranu amonného nebo při rozložení riboflavinu v přítomnosti  $\text{O}_2$ .

Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm zesíťování.

- ☐ Nejčastěji používané koncentrace polyakrylamidu jsou 5-10%.
- ☐ Koncentrace N,N'-metylenbisakrylamidu je obvykle 5% celkového množství akrylamidu.
- ☐ Podpurná matrice je prakticky nenabita.

**barvičky:**

Amidočerň 10 B,

Coomassie Brilliant Blue,

Ponceau S,

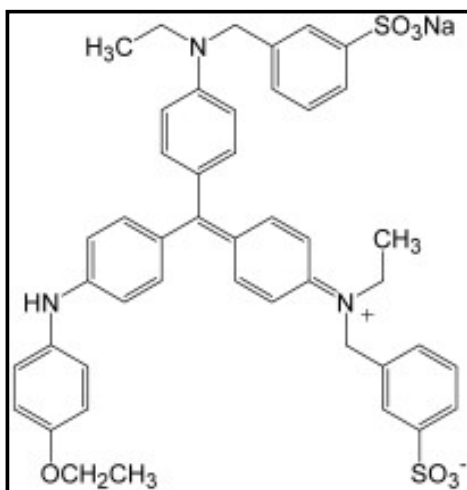
Bromfenolová modř,

Kyselá violeť,

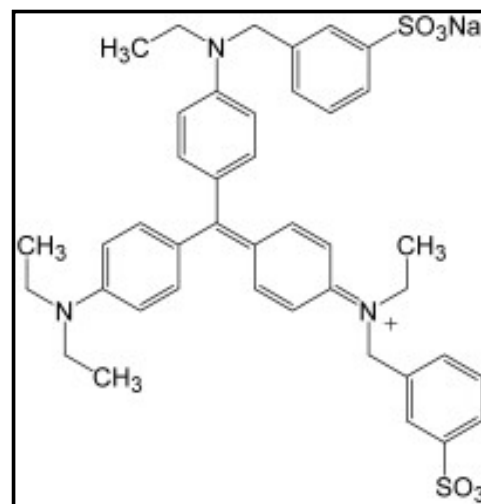
barvení stříbrem (není kvantitativní, ale je 50x citlivější než

Coomassie:  $\text{Ag}^+$  ionty se v proteinech vážou na  $-\text{SH}$  a  $-\text{COOH}$  skupiny)

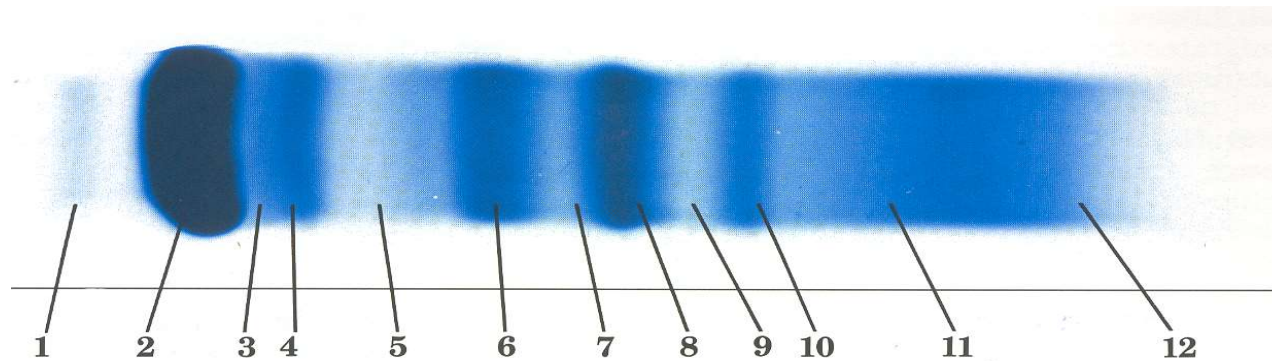
Coomassie Brilliant Blue R-250



Coomassie Violet R - 150







1.	prealbumin
2.	albumin
3.	$\alpha$ -lipoprotein, $\alpha$ -fetoprotein
4.	A1AT, orosomukoid
5.	$\alpha_1$ antichymotrypsin, Gc globulin
6.	A2M, Hp
7.	hemoglobin

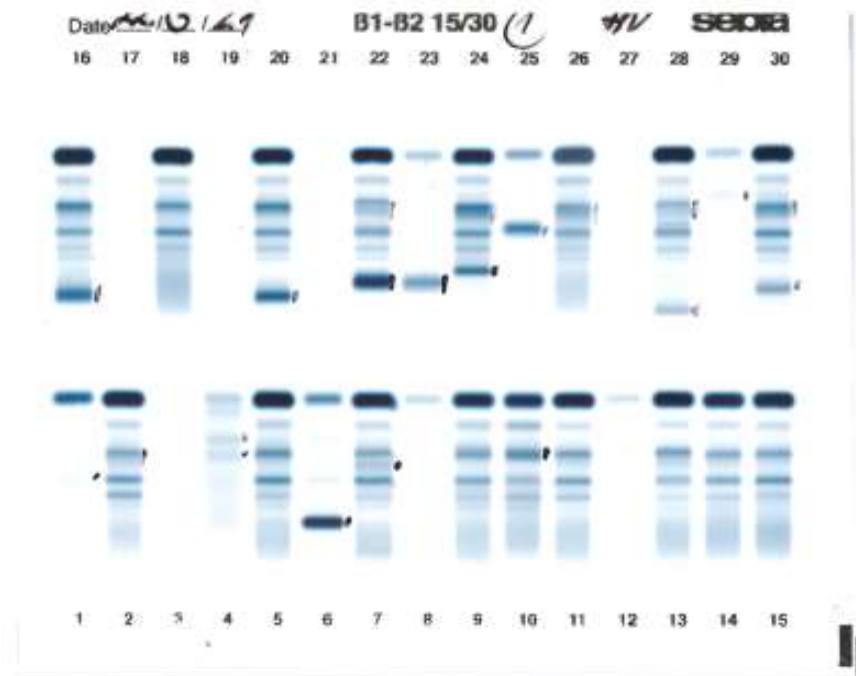
8.	Transferin
9.	Beta-lipoprotein
10.	C3
11.	IgA, IgM, fibrinogen, „M“, VLŘ
12.	IgG, CRP, „M“, VLŘ

## Bílkoviny, které reálně ovlivňují tvar a intenzitu zón elektroforeogramu sérových bílkovin

<b>zóna</b>	<b>Bílkoviny podílející se na tvaru zóny</b>	<b>Referenční meze (pro kity Hydragel <math>\beta</math>1-<math>\beta</math>2 firmy Sebia)</b>
albumin	Albumin	60,3 – 72,8 %
$\alpha$ 1-globuliny	$\alpha$ 1-antitrypsin	1,0 – 2,6 %
$\alpha$ 2-globuliny	$\alpha$ 2-makroglobulin, haptoglobin	7,2 – 11,8 %
$\beta$ 1-globuliny	Transferin (+Hb u hemolyzovaných vzorků)	5,6 – 9,1 %
$\beta$ 2-globuliny	C3 (+ IgA)	2,2 – 5,7 %
$\gamma$ -globuliny	IgG (+ IgM)	6,2 – 15,4 %

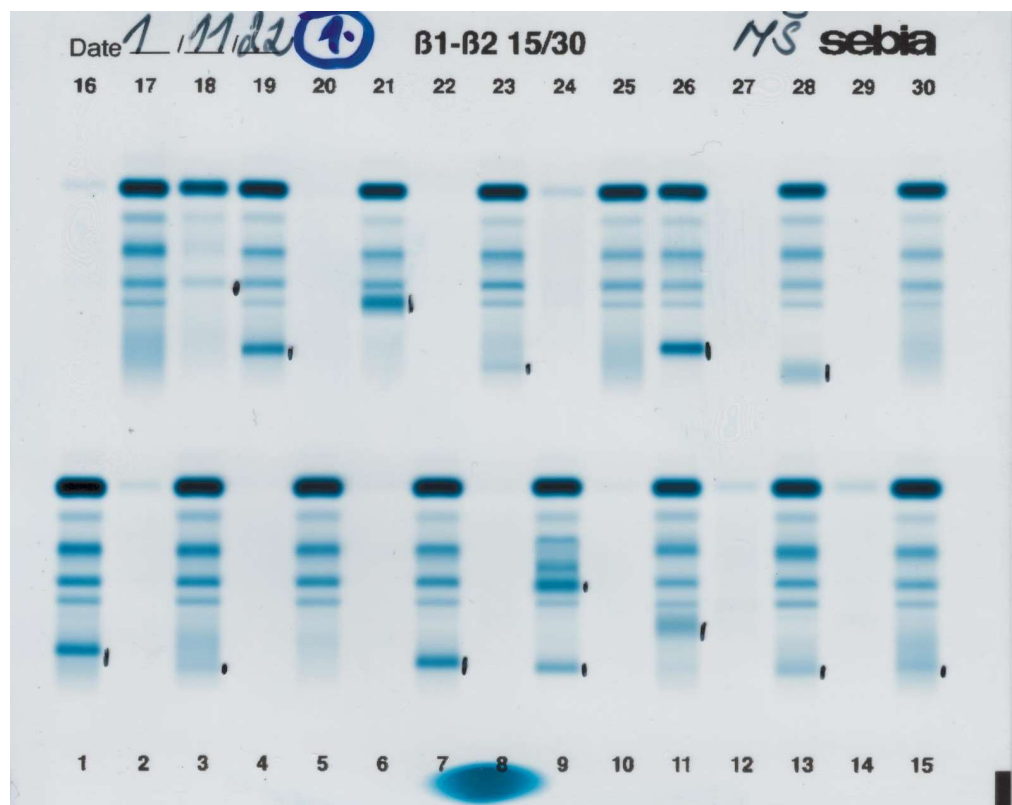
**Elektroforéza bílkovin séra (pozice 2, 5, 7, 9-11, 13-16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30) a moče (pozice 1, 3, 4, 6, 8, 12, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29) – Hydragel  $\beta$ 1- $\beta$ 2 15/30 (Sebia)**

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)



## Elektroforéza bílkovin séra (pozice 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 26, 28, 30) a moče (pozice 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 27, 29) – Hydragel $\beta$ 1- $\beta$ 2 15/30 (Sebia)

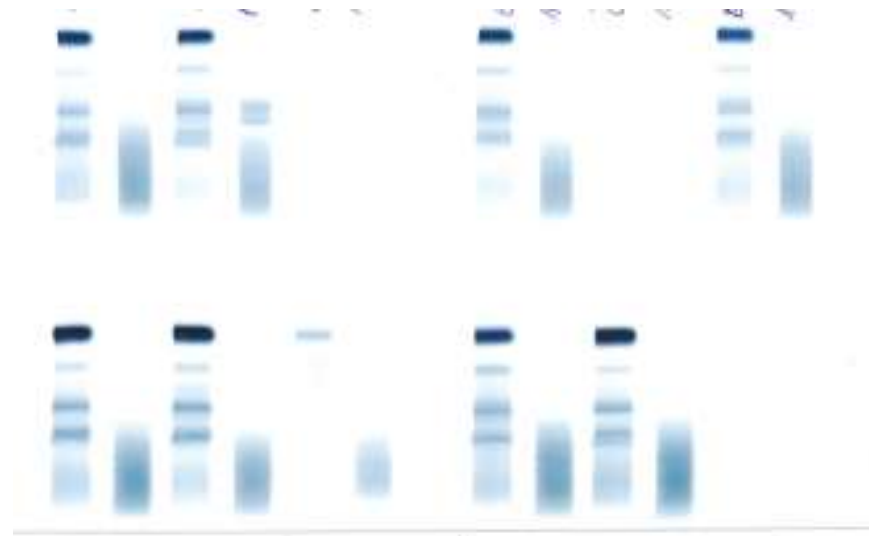
Paraproteiny v pozicích 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 19, 23, 26 a 28 v gama zóně, v pozici 21 v beta2 zóně. V pozici 9 je silně hemolytický vzorek s patrným zastřením alfa2-beta1 interzóny Hb-Hp komplexu, v této interzóně linie imitující paraprotein; výrazné zesílení beta1-zóny volným hemoglobinem může rovněž mylně imponovat jako paraprotein



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

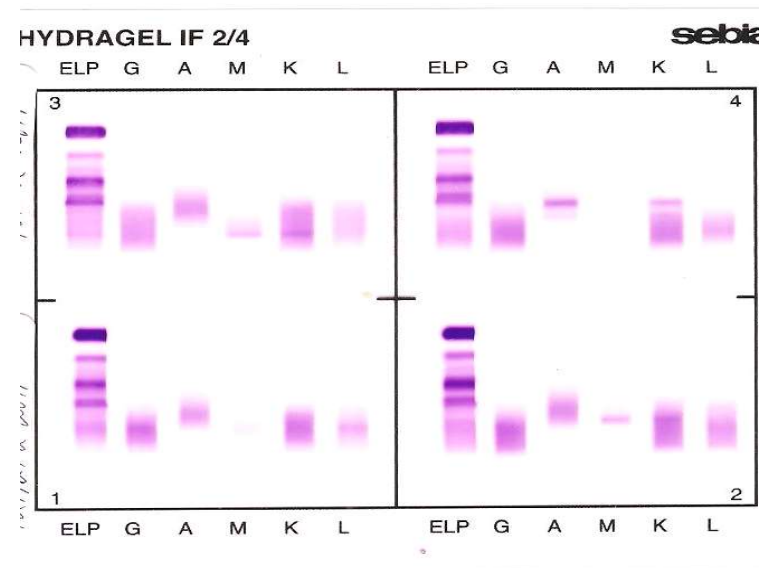
Elektroforetická stopa a vpravo od ní stopa stejného vzorku fixovaného s pentavalentním  
antisérem (G, A, M, kappa, lambda)

*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*



# Paraproteiny - typizace

- A) *imunoelektroforéza*  
(dnes se již téměř nepoužívá)
- B) *imunofixace* – antiséra anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda (dle potřeby lze použít i anti-IgD, anti-IgE, anti-free kappa, anti-free lambda) po elektroforéze „fixují“ paraprotein dané třídy v gelu, ostatní proteiny se odmyjí a gel se poté obarví



# Typizace paraproteinů – elektroforéza s následnou imunofixací

ELP – elektroforéza s fixací všech bílkovin; G, A, M, K, L – stopy se selektivní fixací antiséry proti řetězcům  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$

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



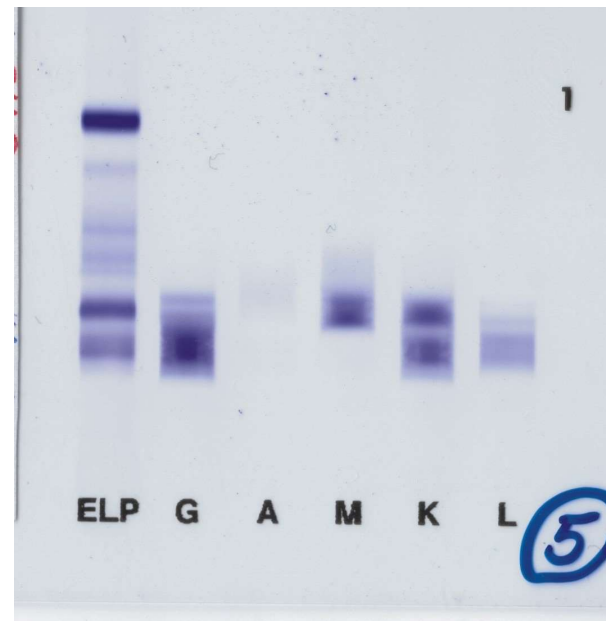
# Imunofixace – problematické nálezy

*monoklonální IgM kappa s aktivitou revmatoidního faktoru (RF 129 IU/mL)*

IF s Fluidilem



IF s beta-merkapttoethanolem

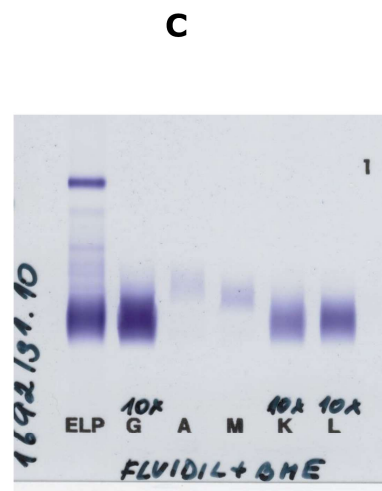
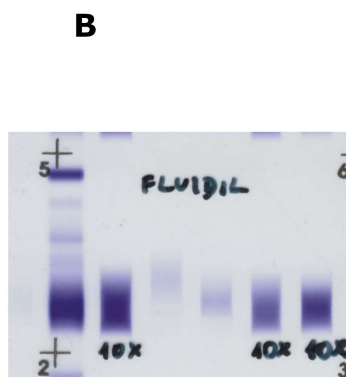
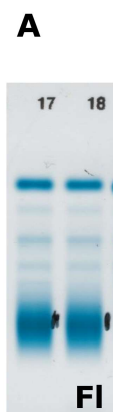




# Polyklonální hypergamaglobulinémie

A – elektroforéza (vlevo bez, vpravo s použitím Fluidilu)

B, C – imunofixační elektroforéza (nestandardní /vyšší/ ředění ve stopách IgG, kappa a lambda; B – s použitím Fluidilu, C – s použitím fluidilu a beta-merkaptoethanolu /BME/)



# Posouzení typu proteinurie – separace močových bílkovin SDS-PAGE nebo SDS-elfo v agarose je (starší) alternativou ke kvantitativní analýze markerových proteinů (Maachi M et al., *Clin Chem* 2004)

Zopakujte si: Podle jaké vlastnosti se bílkoviny při této elektroforetické metodě dělí?

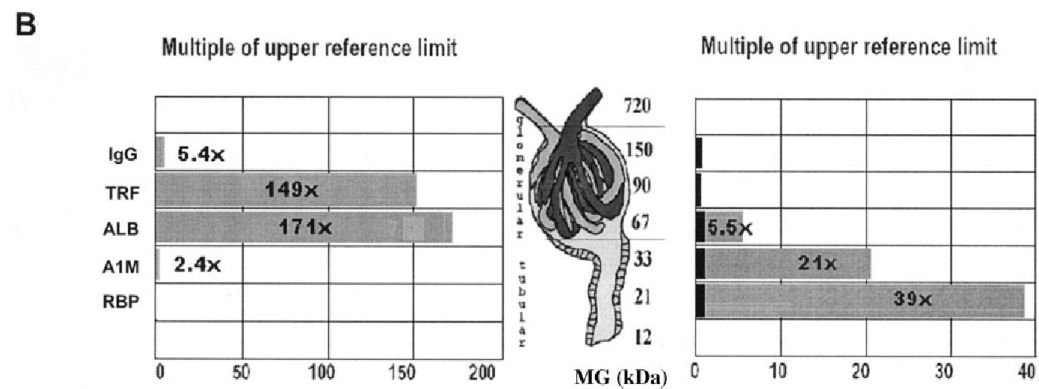
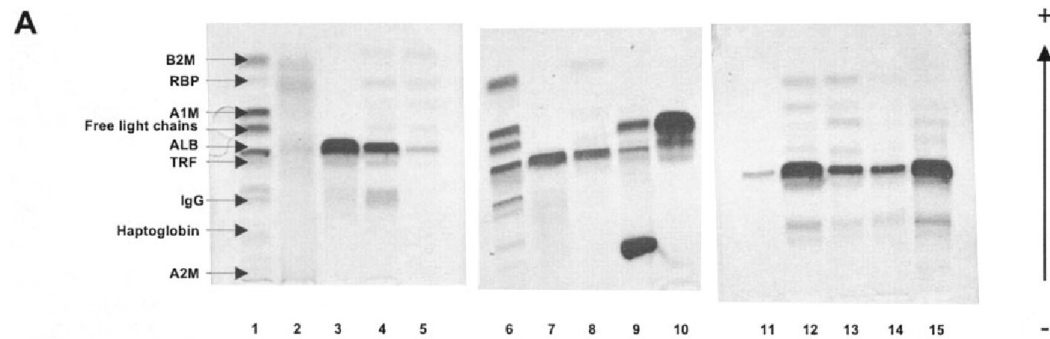
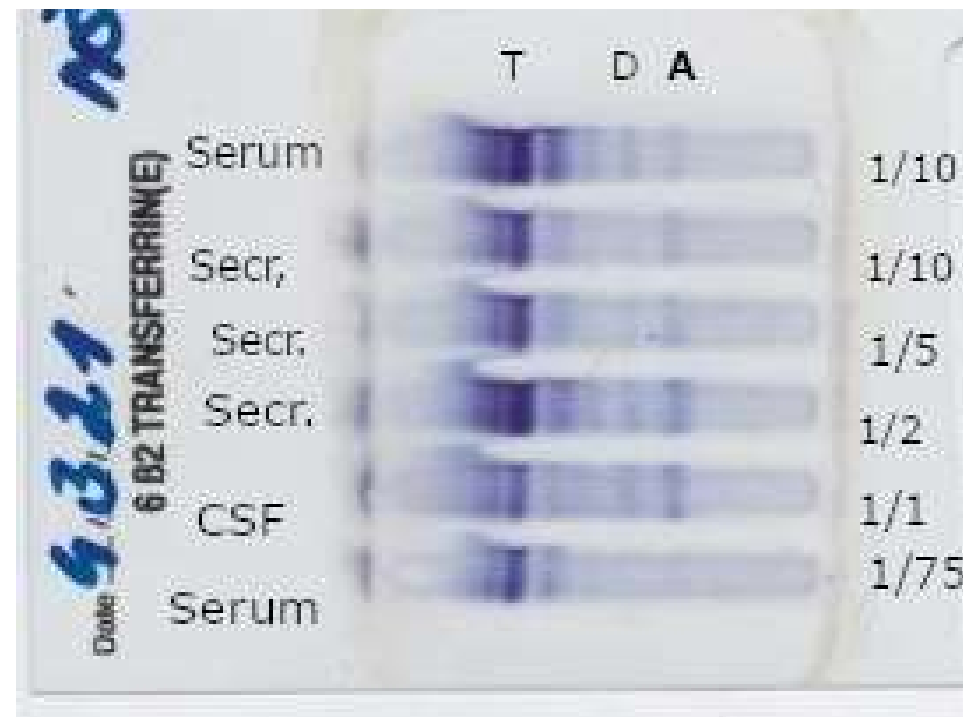


Fig. 1. Selected electrophoretic patterns obtained with Hydrasis SDS gels (A) and reproductions of marker proteins profiles (B).

## Průkaz asialotransferinu (elfo s imunofixací – Sebia)

Metoda používaná k průkazu přítomnosti likvoru v sekretech. V likvoru je poměr A/D > 1, v séru <1; poměr A/D v sekretu s příměsí likvoru je vyšší než v séru.



## Elektroforéza hemoglobinu

Hydragel 7 Hemoglobin(e),  
Sebia

vzorky 1 a 2: frakce HbA<sub>2</sub> >  
15%, což značí  
pravděpodobnou přítomnost  
HbC nebo HbE  
vzorky 3-6: normální nález  
vzorek 7: kontrola

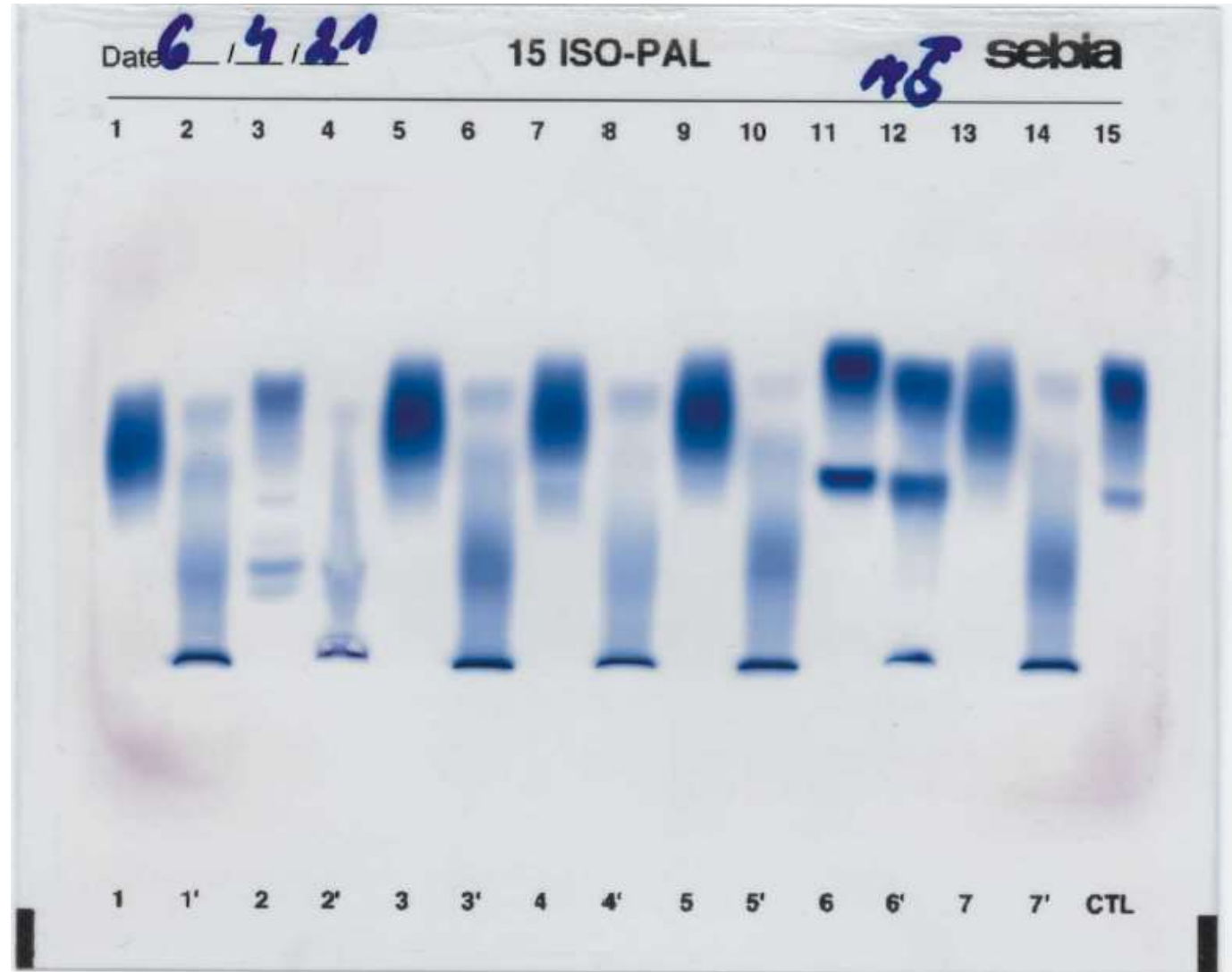


**Elektroforéza izoenzymů  
alkalické fosfatasy  
(Hydragel 15 ISO-PAL, Sebia)**

v pozicích 2, 4, 6, ... je kostní  
izoenzym vyvázan přítomným  
lektinem blízko startu

v pozicích 3, 4 je patrná  
střevní frakce (I)

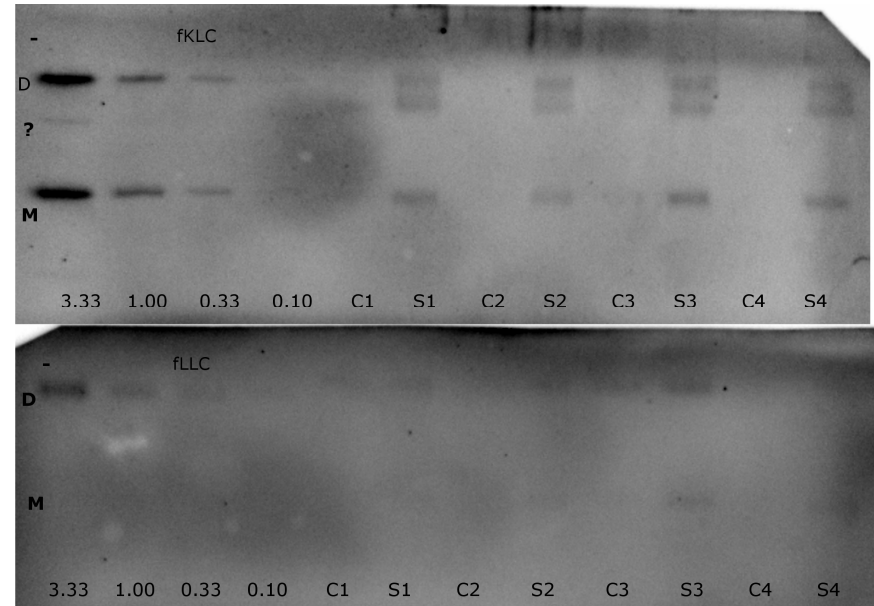
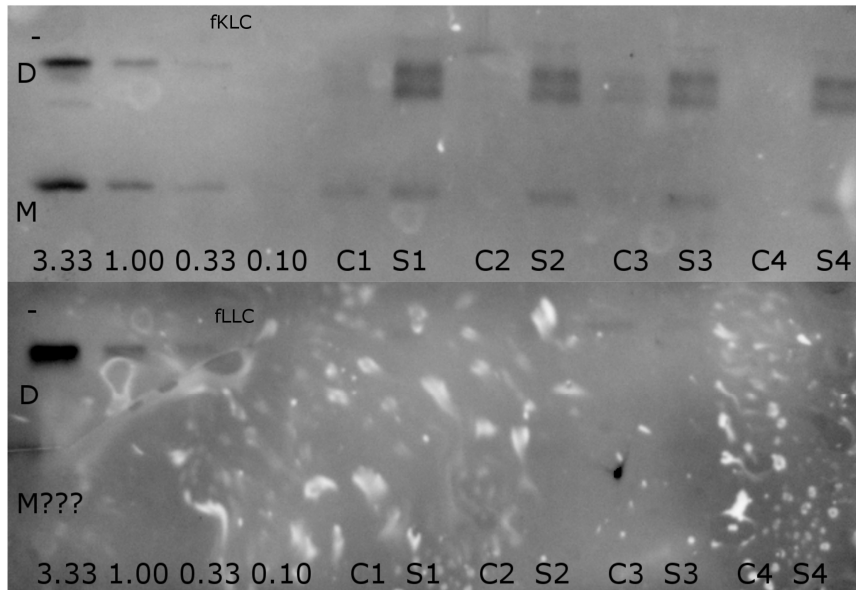
v pozicích 11, 12 je výrazná  
druhá jaterní frakce (L2)



## SDS-elfo

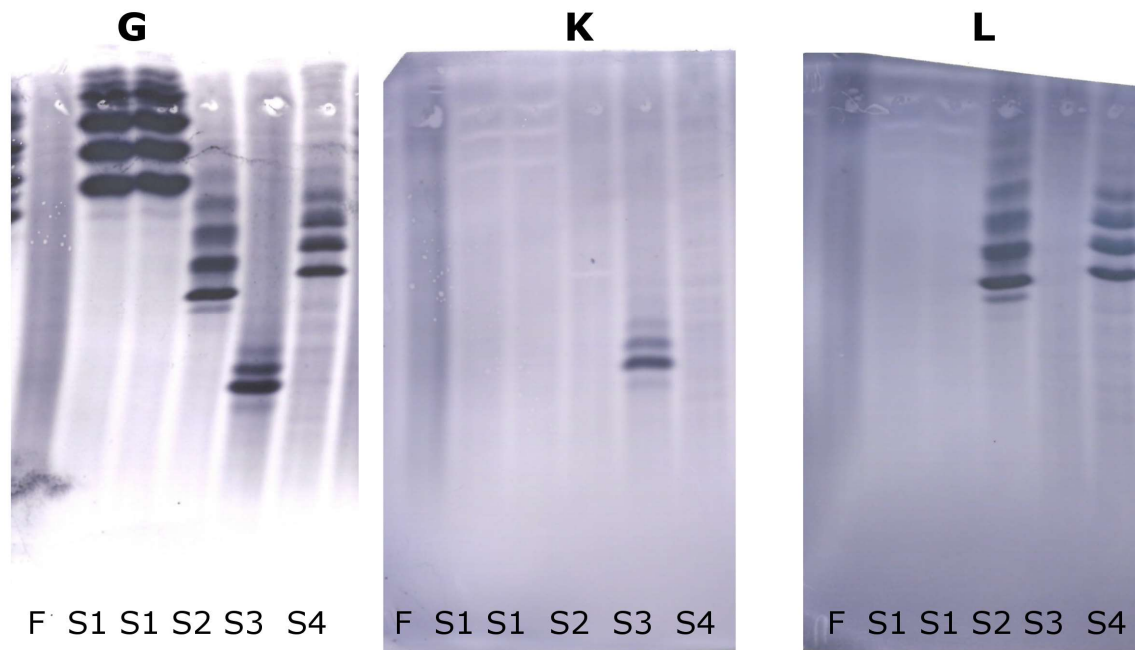
vzorky smíchány s SDS (sodium dodecyl sulfate – laurylsíran sodný), který se váže na bílkoviny za tvorby negativně nabitých micel (v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny). Často se používají denaturační podmínky (inkubace vzorků s  $\beta$ -ME nebo DTT, zahřátí – redukce disulfidových vazeb). SDS (0,1%) je i v gelu (zprav. polyakrylamidovém). Mezi log M a relativní pohyblivosti bílkoviny je pak v určitém rozsahu M přibližně lineární vztah.

*Obr.: Monomery a dimery fLC, SDS-PAGE v neredukujících podmínkách/AIB, chemiluminiscenční detekce (2018)*



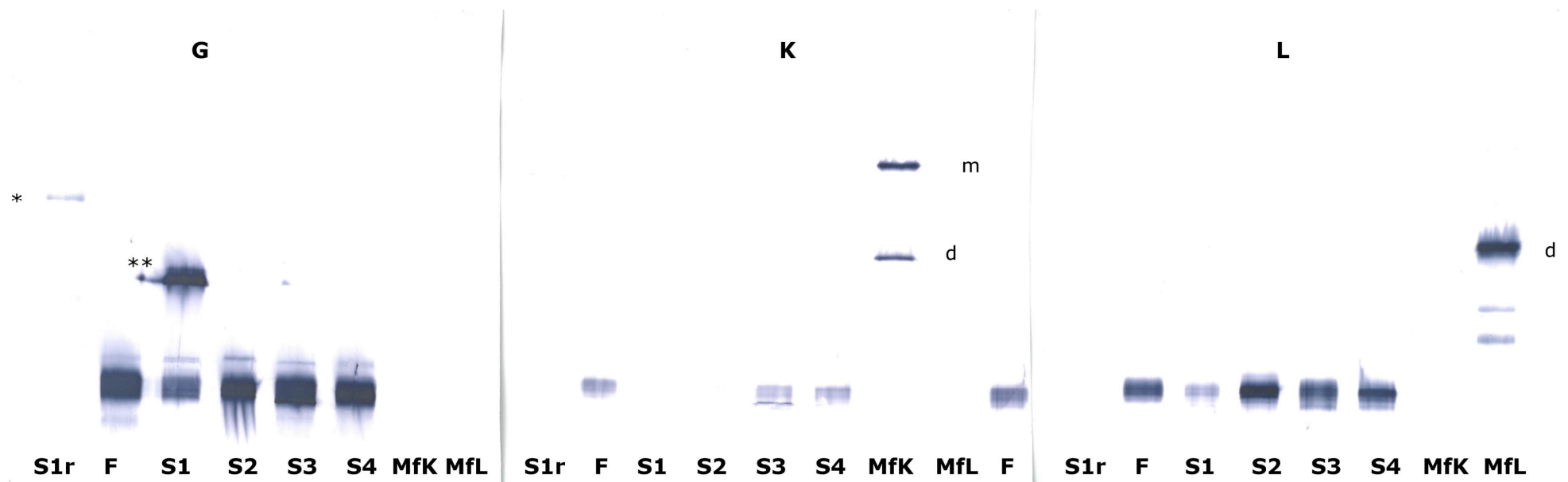
# IEF/AIB: typizace LŘ v Ig jako pomoc v diagnostice nemoci těžkých řetězců

Kušnierová et al. *Klin Onkol* 2020; 33(4): 280-5



# SDS elfo jako pomoc v diagnostice nemoci těžkých řetězců

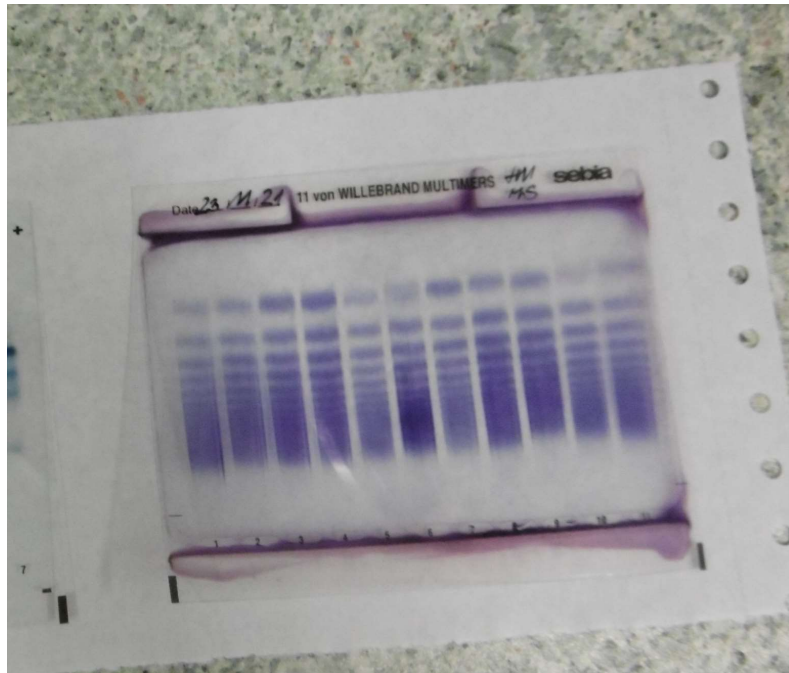
Kušnierová et al. *Klin Onkol* 2020; 33(4): 280-5



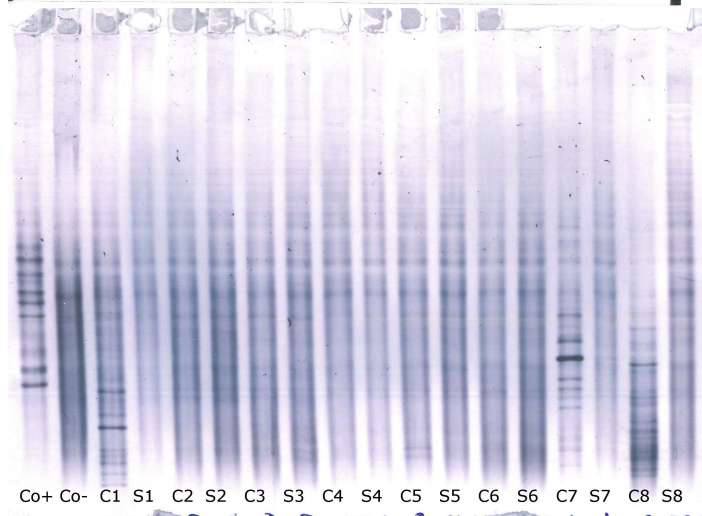
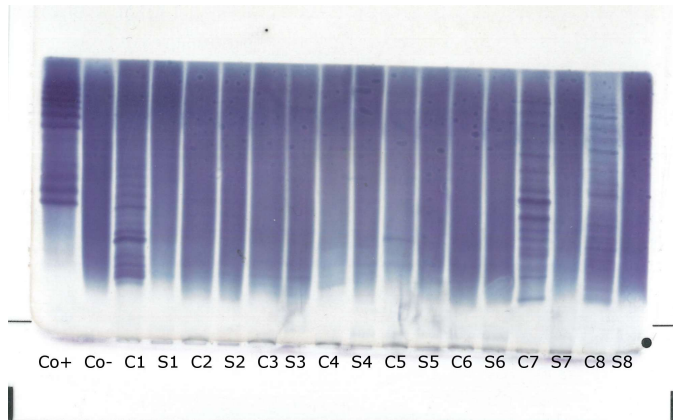


# Detekce multimerů vWF

(SDS elfo v agarose, Sebia)



- Multimery vWF jsou sníženy nebo chybí u některých případů von Willebrandovy nemoci (typ II)
- Na obr. vlevo nálezy bez hrubé patologie; vysokomolekulární formy v gelu dole (migrují nejpomaleji)



## IEF a detekce o-IgG: Metody

Zeman D et al. *Ces Slov Neurol N* 2019;82/115(1):68-75

- Agarosový gel, imunofixace v gelu (Hydrasys, Sebia) – AGA IEF/IF
- Polyakrylamidový gel (Flatbed Professional, EDC), imunoblotting – PAG IEF/IB
- Obě metody poskytly prakticky shodné kvalitativní výsledky

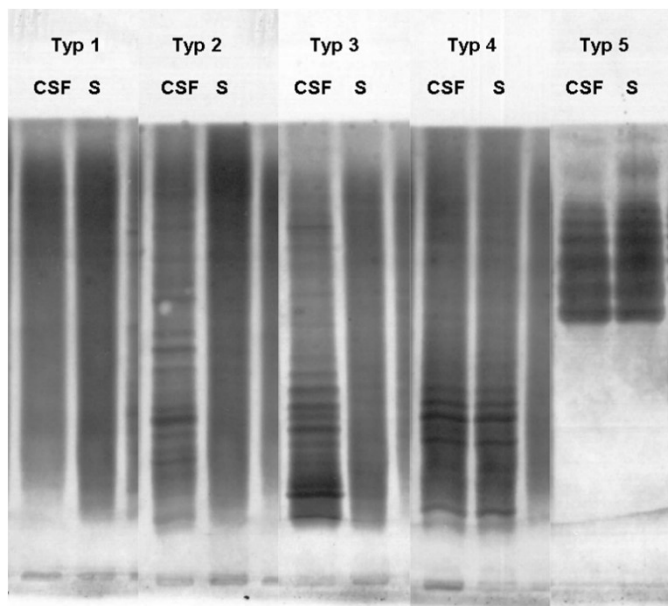
## Oligoklonální pásy

- Pokus o definici: pásy (imunoglobulinových molekul, volných lehkých řetězců) produkováné několika málo (oligo-) klony B lymfocytů, resp. plazmatických buněk
- Detekovány po separaci bílkovin likvoru a paralelně vyšetřeného séra elektroforetickými metodami (preferovaná metoda pro o-IgG: izoelektrická fokusace)
- Starší metody s nespecifickou detekcí měly potenciál detekovat oligoklonální pásy IgG, IgA i volných lehkých řetězců (bez možnosti rozlišení), ale také non-Ig proteiny v alkalické oblasti (beta trace, gama trace aj.)
- Metody se specifickou detekcí používané v běžné klinické praxi detekují pouze IgG (při použití protilátky proti Fc fragmentu IgG), popř. také volné lehké řetězce (při použití protilátky proti celé molekule nebo Fab fragmentu IgG)
- Metody se specifickou detekcí jiných imunoglobulinů/volných lehkých řetězců jsou používány vzácně a spíše výzkumně

# Klasifikace nálezů o-IgG – 5 typů podle mezinárodních doporučení

Andersson M et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902

Freedman MS et al. *Arch Neurol* 2005;62:865-70

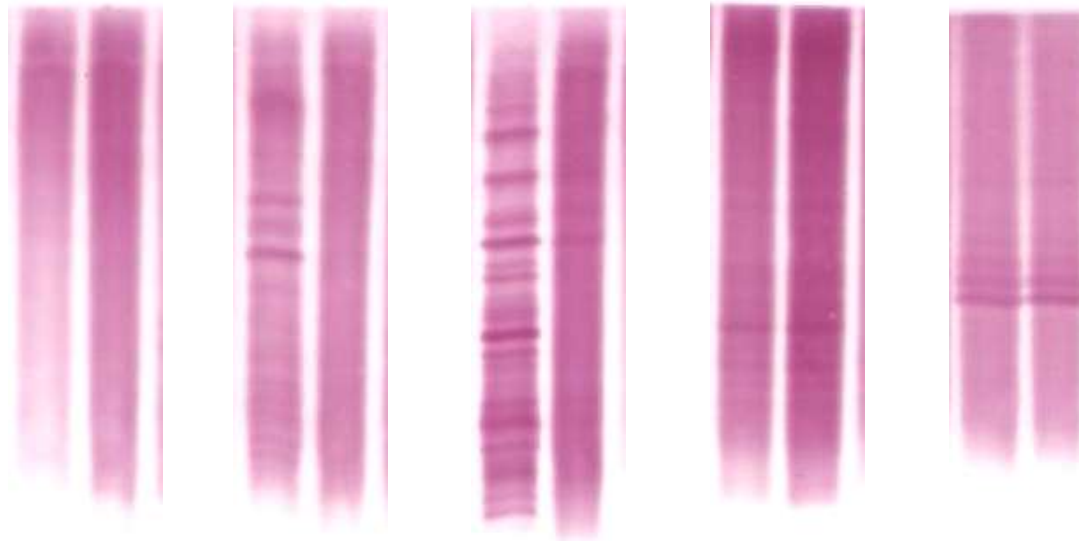


- **Typ 1:** jen „polyklonální“ IgG v likvoru i séru
- **Typ 2:**  $\geq 2$  IgG pásy v likvoru, jen „polyklonální“ IgG v séru
- **Typ 3:** IgG pásy shodné v likvoru i séru + IgG pásy přítomné pouze v likvoru
- **Typ 4:** IgG pásy shodné v likvoru i séru
- **Typ 5:** monoklonální IgG v likvoru i séru

## Oligoklonální IgG - typy IEF nálezu: IEF/IF (Sebia)

typ 1 – typ 2 – typ 3 – typ 4 – typ 5

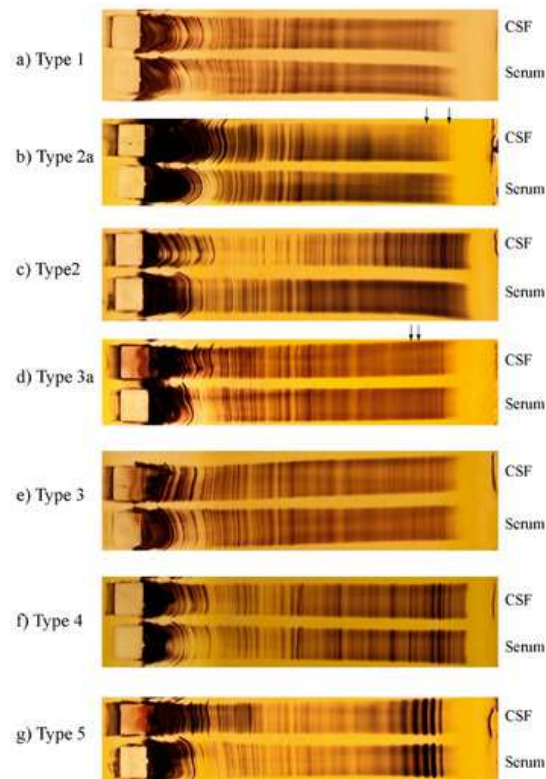
*dvojice likvor (vlevo), sérum (vpravo)*



# IEF v polyakrylamidovém gelu

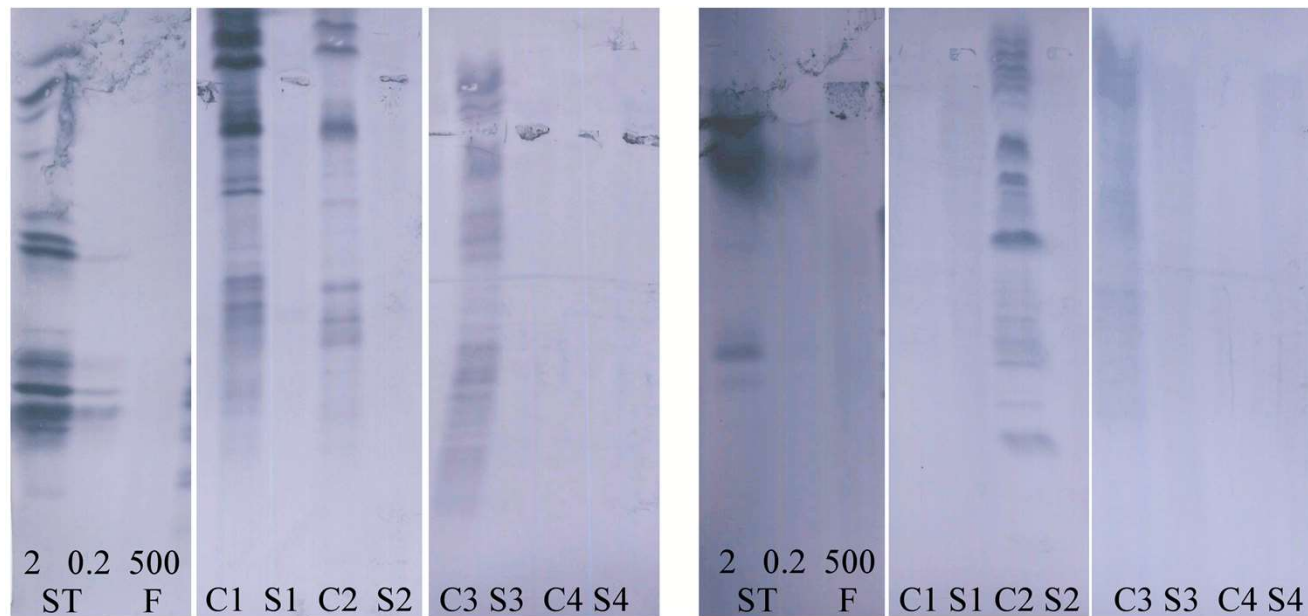
(Pannewitz-Makaj K et al, *Diagnostics* 2021, 11(1): 37)

OCB patterns



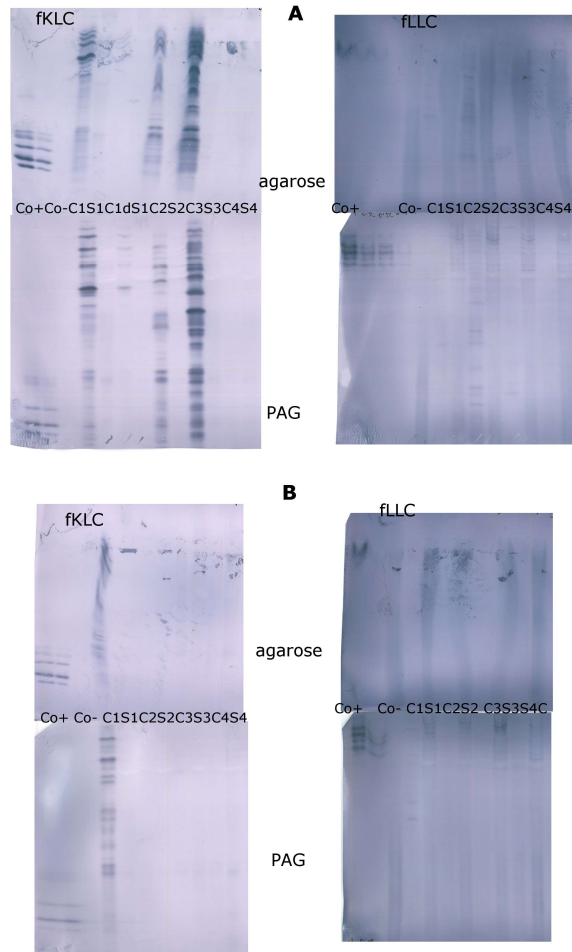
# Oligoklonální volné lehké řetězce (o-fLC)

Zeman D et al., *PLoS ONE* 2016;11(11):e0166556



## Oligoklonální volné lehké řetězce (fLC): agarózový vs. polyakrylamidový gel

Zeman et al. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 81/115(1):68-75



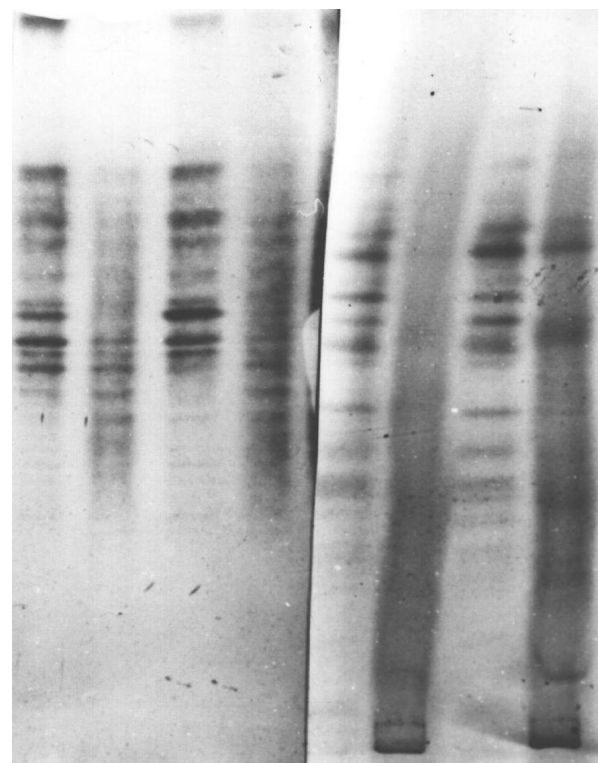
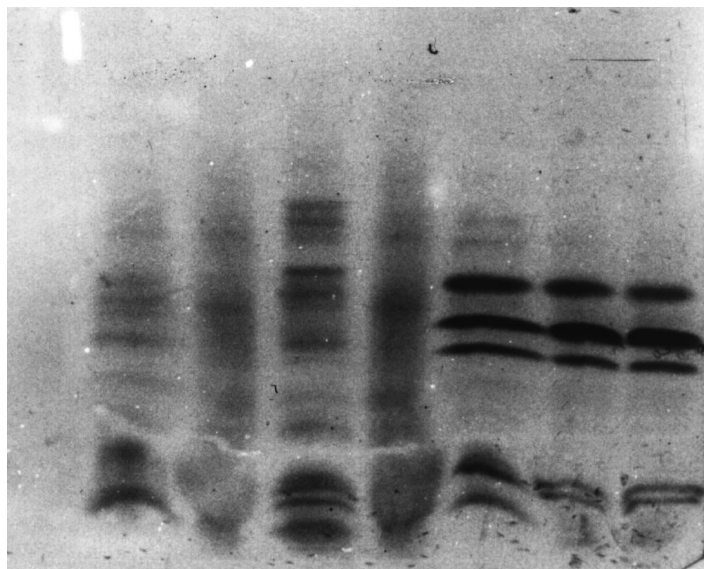
- 48 vzorků
- Výtečná shoda mezi separací v agarózovém a polyakrylamidovém (PAG) gelu ( $\kappa > 0,8$  pro všechna srovnání)
- Počet pásů poněkud vyšší v PAG
- Klinické korelace lepší v PAG (cut-off 6 o-fKLC pásů)
- Výtečná shoda mezi hodnotícími ( $\kappa > 0,9$  pro všechna 4 srovnání)



# Oligoklonální fκLC (vpravo IgG a fκLC)

ÚKBLD VFN a 1. LF UK v Praze, 2002

metoda prof. K. Lamerse (1. Ab: anti-fκLC, 2. Ab/HRP: anti-(f+b)κLC)



# IEF/AIB FLC v monitorování pacientů s mnohočetným myelomem

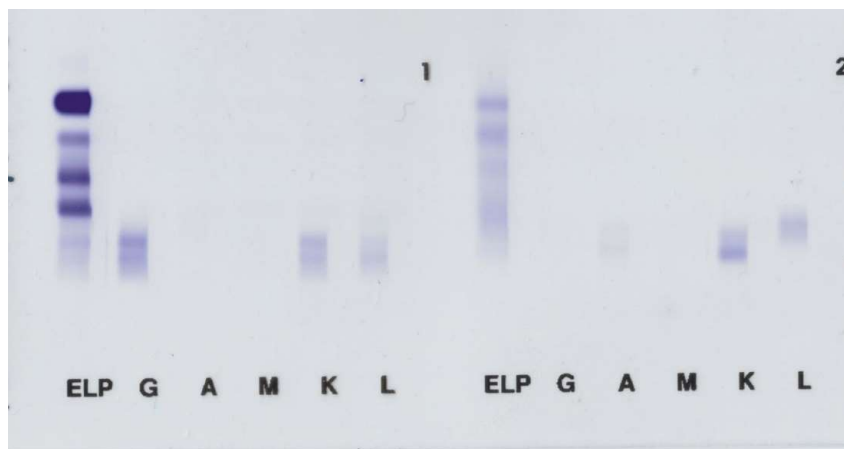
## Pacient s MM (původní paraprotein: FLC lambda)

FLC kappa 5.46 mg/L, FLC lambda 59.23 mg/L, **FLCr 0.092**

IF v séru a moči poskytla zcela konfušní závěr a to nejdůležitější – perzistující monoklonální FLC lambda – přesvědčivě neodhalila

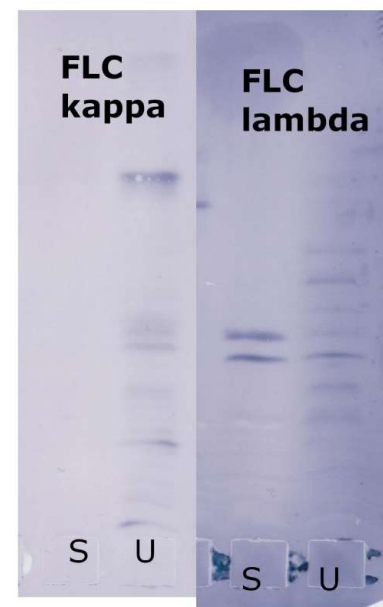
### IF

S – stopa IgG kappa (2x – 1 z linií odpovídá Isatuximabu); U – stopa FLC kappa

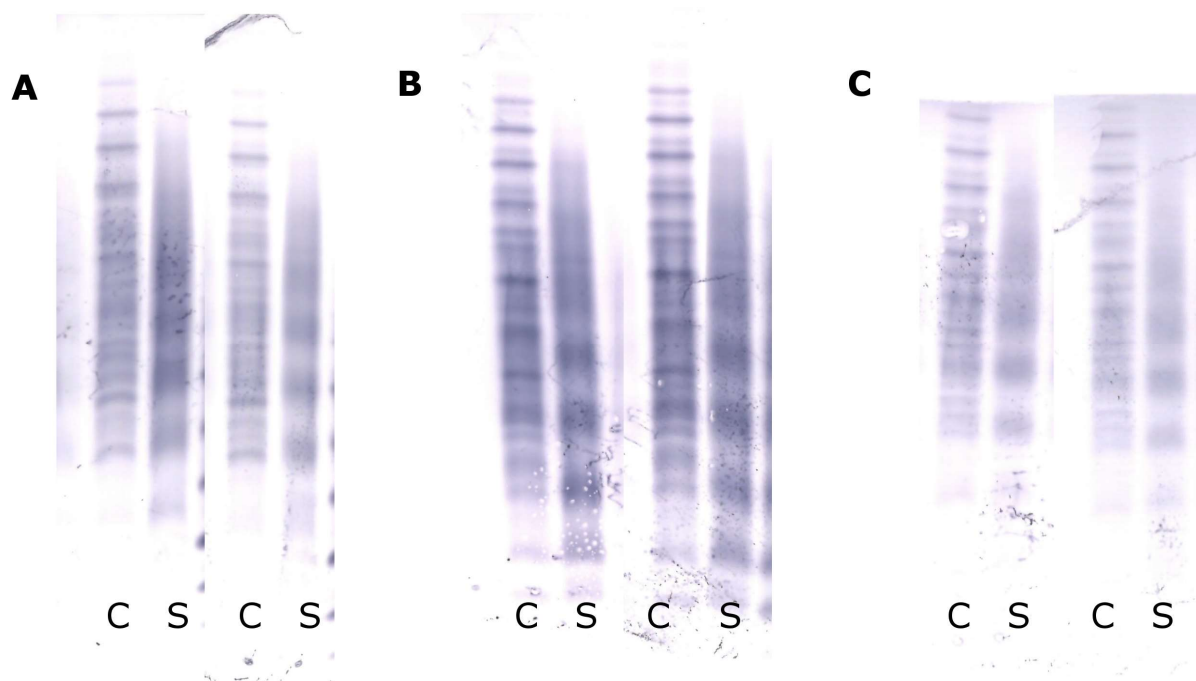


### IEF/AIB FLC (PAG24S)

S – monoklonální FLC lambda; U – obtížně interpretovatelný oligoklonální profil FLC obou typů

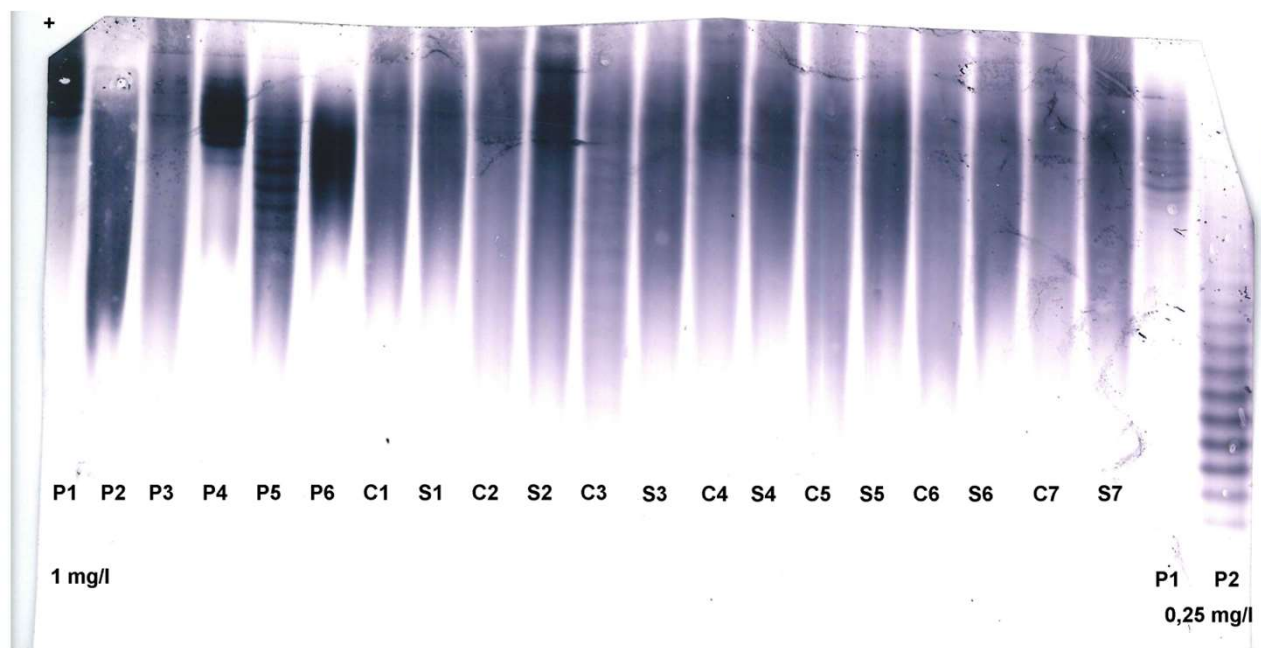


**o-IgM** u pacientky s RS při diagnostické LP (A), po 18 měsících bezprostředně před AHSCT (B) a po dalších 12 měsících (C)



# Oligoklonální IgA

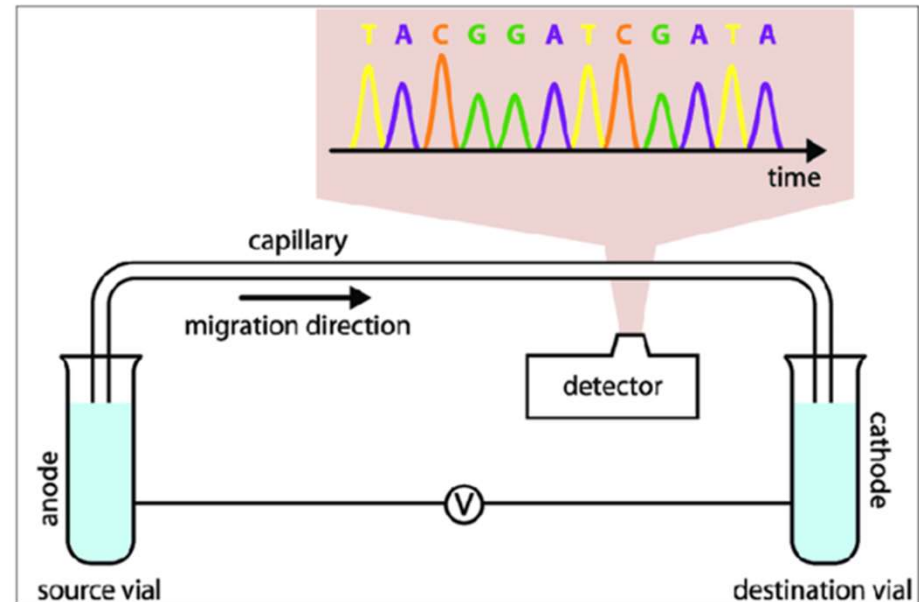
pH gradient 4-8, anodická aplikace, bez prefokusace  
pozitivní nález ve vzorku 3 (pacientka s CIS)



# Kapilární elektroforéza (CE) – princip

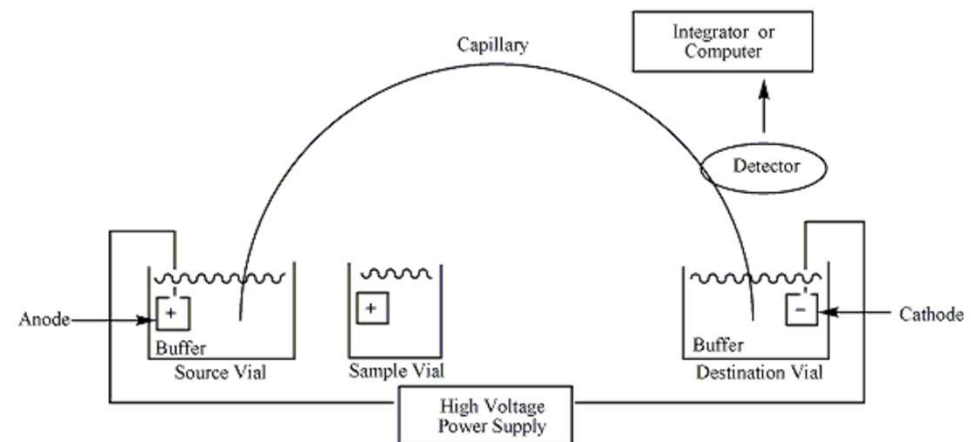
(obrázek převzatý z <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/capillary-electrophoresis-technology.html>)

- Dělení v křemenných kapilárách
- Dvě elektrody
- Dva rezervoáry pro pufr
- Zdroj vysokého napětí (+/- 30 kV)
- *On-column* detektor
- V obvyklém uspořádání: Aplikace k anodě, detekce u katody; vlivem elektroosmózy migrují nakonec ke katodě i kladně nabitě částice

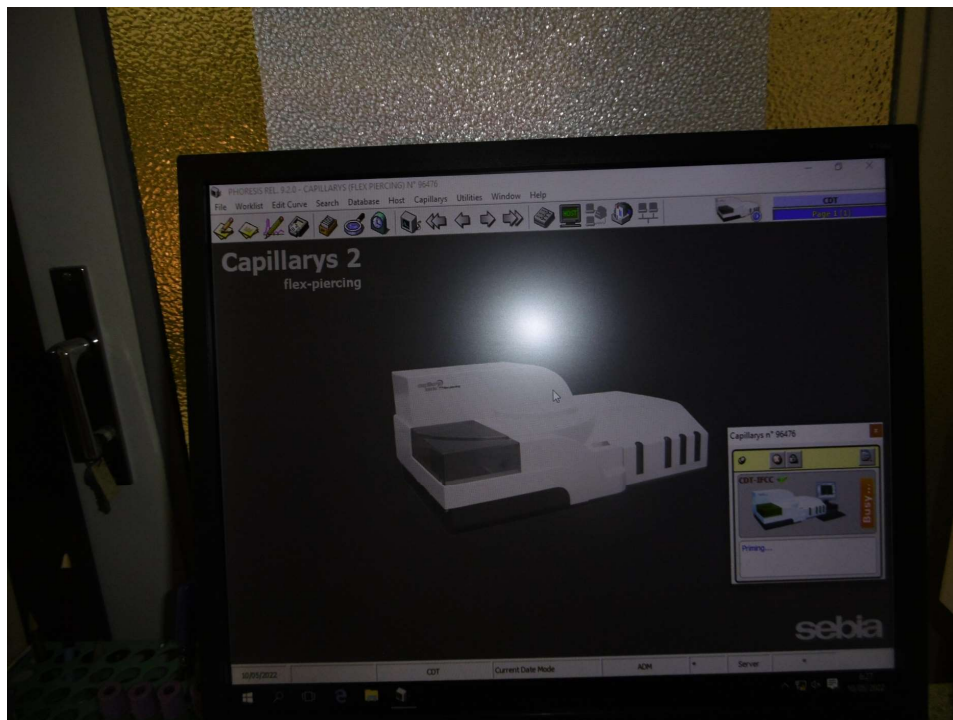


# Kapilární elektroforéza

- Tenké křemenné kapiláry (vnitřní průměr 25 – 75  $\mu\text{m}$ , délka 20 – 100 cm), na jejich povrchu jsou záporně nabitě silanolové skupiny – způsobí elektroosmotický tok kladně nabitých iontů pufru ke katodě – všechny složky vzorku nakonec dorazí ke katodě, kde jsou detekovány
- Detekce nejčastěji UV/VIS (200 nm – peptidová vazba; 280 nm – aromatické zbytky)



OKB FN Brno: Příklad Capillarys 2 Flex-piercing  
využití: 1) stanovení HbA1c, 2) stanovení CDT (%)



## Přístroje pro kapilární elektroforézu firmy Sebia

Volume of tests	Low	Medium	High		
Configuration	Standalone	Standalone	Standalone	Workcell	On Track
Instrument	MINICAP FLEX-PIERCING	CAPILLARYS 3 OCTA	CAPILLARYS 3 TERA	CAPILLARYS 3 TERA MC 1, 2 or 3	CAPILLARYS 3 TERA TLA
Number of capillaries	2	8	12	12 to 36	12
Available menu	HbA1c, Hemoglobin, CDT, Serum Protein, Urine Protein, Serum Immunotyping, Urine Immunotyping				HbA1c, Serum Protein, Serum Immunotyping



## Odkazy na internetové stránky dvou hlavních výrobců

- Sebia: <https://www.sebia.com/solutions/instruments/>
- Helena: <https://www.helena-biosciences.com/en/clinical-electrophoresis/>

## Kapilární elektroforéza (CE) - metody

metoda	zkratka	Dělení podle	Aplikace
Kapilární zónová elektroforéza	CZE	velikosti/náboje (mobility)	Malé ionty, peptidy, proteiny
Izotachoforéza	ITP	velikosti/náboje (mobility)	Malé ionty, proteiny
Kapilární afinitní elektroforéza	ACE	velikosti/náboje (mobility)	Interakce ligandů
Bezvodá kapilární elektroforéza	NACE	velikosti/náboje (mobility)	Malé ionty s malou rozpustností ve vodě
Micelární elektrokinetická chromatografie	MEKC/MECC	hydrofobicity/náboje	Neutrální částice
Kapilární gelová elektroforéza	CGWE	velikosti	Proteiny, DNA
Kapilární elektrochromatografie	CEC	chromatografická retardace	Malé ionty a neutrální částice
Izoelektrická fokusace	CIEF	náboje (izoelektrický bod)	Proteiny

# Kapilární elektroforéza (CE) - detektory

- Absorpční
  - *UV-detektor*
  - *detektor diodového pole*
- Fluorescenční
  - *excitace lampou*
  - *excitace indukovaná laserem*
- Hmotnostní spektrometr
- Elektrochemický
- Radioizotopový
- Vodivostní
- Indexu lomu
- Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie

# Monitorování paraproteinů metodou hmotnostní spektrometrie v rutinní praxi – blížící se realita



- **EXENT® solution** – Thermo Fisher Scientific
- IVDR certifikovaný, plně automatizovaný systém pro měření, kvantifikaci a sledování endogenních M proteinů a terapeutických monoklonálních protilátek v séru
- Zahrnuje 3 integrované moduly:
  - EXENT-iP 500 pro přípravu vzorků
  - EXENT-iX 500 (MALDI-ToF MS)
  - EXENT-iQ software
- Ve spojení s analyzátozem Optilite poskytuje přesnou kvantifikaci M proteinu
- *Vítejte v EXENTové době – možná uvidíte i slony létat*

# Literatura

- R. Westermeier: Electrophoresis in Practice. 4. přepracované a rozšířené vydání. Wiley-WCH, Weinheim, 2005. ISBN 3-527-31181-5
- R. Westermeier, A. Görg: Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.) Bioanalytik. 3. vydání. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2012. Str. 269-302.
- P. Schmitt-Koplin, C. Schwer: Kapillarelektrophorese. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.) Bioanalytik. 3. vydání. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2012. Str. 303-333. ISBN 978-3-8274-2942-1.
- Keren DF, Schröder L. Challenges in measuring M proteins in serum. *Clin Chem Lab Med* 2016, 54: 947-961
- Engliš M. Interpretace elektroforézy plazmatických bílkovin v agarózovém gelu. Praha, Avicenum 1992.
- Tichý M. Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů). FINIDR, Český Těšín 1997.
- Maisnar V., Tichý M. a kol. Monoklonální imunoglobuliny – výskyt, význam a možnosti jejich průkazu. Nucleus HK 2012.
- Štern P. Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii. Dostupné na: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>
- Přednášky Mgr. Jany Gottwaldové (t.č. v laboratoři Masarykova onkologického ústavu) - s poděkováním za laskavé svolení

## Internetové stránky výrobců

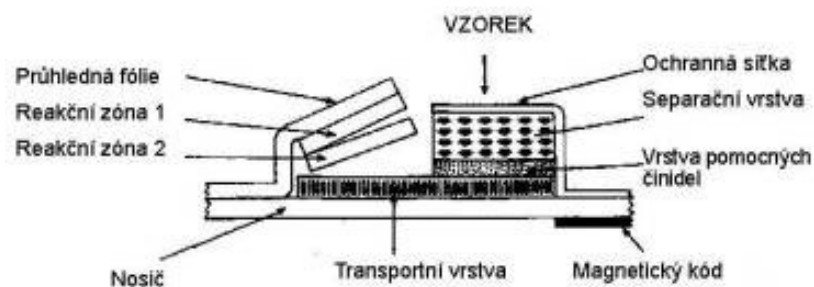
- Firmy **Sebia** a **Helena** s dominantním podílem na trhu v oblasti rutinních klinických aplikací elektroforézy – viz výše
- Serva Electrophoresis GmbH: <https://www.serva.de/>
- Cytiva Life Sciences: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/protein-analysis/electrophoresis-and-isoelectric-focusing>
- Bio-Rad: <https://www.bio-rad.com/en-cz/category/electrophoresis-blotting?ID=1616a788-c555-4b35-a33d-2735071ebd65>
- Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis.html>
- Electrophoresis Development & Consulting (Dr. Hanspeter Schickle, Wolfgang Gstrein): <https://www.electrophoresis-development-consulting.de/index.html>

# Reflexní fotometrie

- měří záření odražené od homogenně zbarvené podložky
  - Matrice: **impregnovaná vlákna** nebo **vícevrstvý** (želatinový) **film** (homogenní matrice)
  - *Zdroj světla*: žárovka s halogenovou atmosférou, Xe výbojka s interferenčním filtrem nebo LED (světlo emitující diody)
  - *Detektor*: **fotonásobič** (citlivější) nebo **fotonka**, na níž je veškeré odražené světlo z reagenčního políčka fokusováno bílým kulovým reflektorem (vyduté zrcadlo - Ulbrichtova koule)
- 
- Vzorek: plná krev, sérum, plazma, moč
  - Suchá činidla aktivovaná vodou obsaženou ve vzorku
  - Použití zejména v glukometrech – suchá chemie
  - močová analýza
  - denzitometrické hodnocení tenkovrstevných chromatogramů

# Reflexní fotometrie – testovací proužky („suchá chemie“)

<https://www.dastacr.cz/dasta/hypertext/JVABM.htm>



*Schéma konstrukce proužku pro Reflotron 71*



## 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

## Pojmy absorbance (A) a optická denzita (OD)

- **Absorbance (A)**

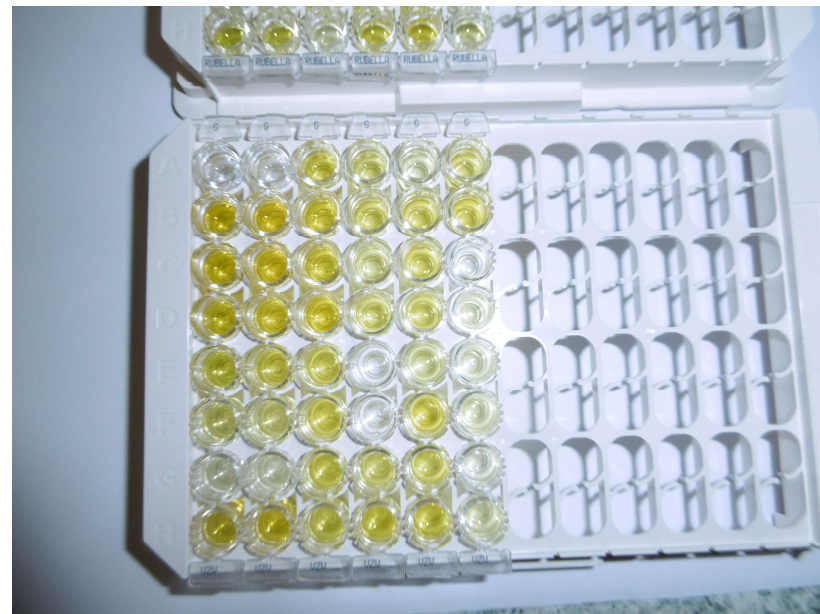
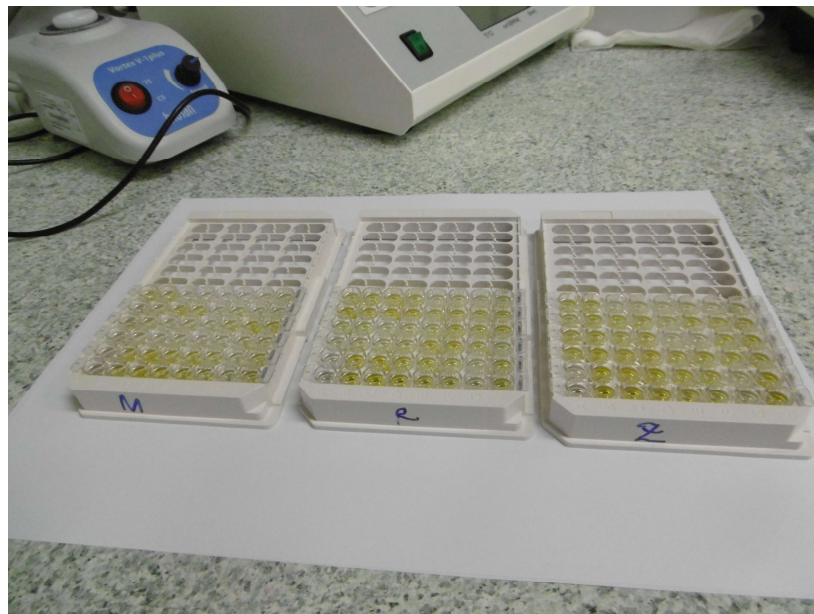
- $A = \log(1/T)$
- Zeslabení paprsku po průchodu reakčním prostředím způsobené absorpcí = pohlcením fotonu spojeným s excitací molekuly do vyššího energetického stavu
- Ve zředěných roztocích platí pro A Lambertův-Beerův zákon:  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ , tj. lze předpokládat lineární závislost A na koncentraci stanovovaného analytu

- **Optická denzita (OD)**

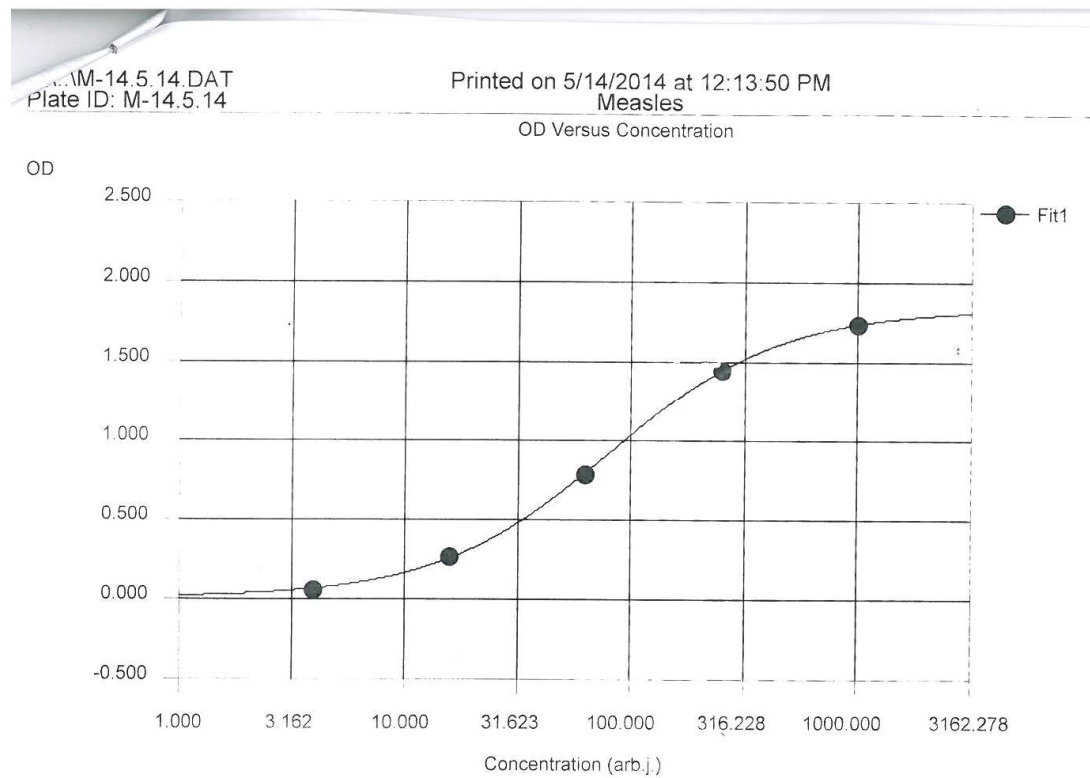
- $OD = \log(1/T)$
- Zeslabení paprsku po průchodu reakčním prostředím způsobené absorpcí, rozptylem světla aj.
- OD je pojem nadřazený pojmu A
- Pro OD obecně neplatí Lambertův-Beerův zákon, tj. nelze **obecně** předpokládat lineární závislost OD na koncentraci stanovovaného analytu  $\Rightarrow$  často třeba vícebodová kalibrace

# Kvantitativní ELISA – příklad: MRZ reakce

detekce specifických IgG protilátek proti virům spalniček (measles), zarděnek (rubella) a varicella zoster v likvoru a séru k průkazu jejich intrathekální syntézy



# MRZ reakce – kalibrační křivka



# ELISA - instrumentace

**promývačka**



**ELISA reader iMark (Bio-Rad)**



## Automatizace: ELISA analyzátor DSX (Dynex)



DĚKUJI ZA POZORNOST.

