

# Elektroforetické techniky

David Zeman

OKB FN u sv. Anny v Brně

E-mail: [david.zeman@fnusa.cz](mailto:david.zeman@fnusa.cz)

2023

## 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:

$$F_E = F_{fr}$$
$$q \cdot E = f_c \cdot v$$
$$v = \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E$$

$u$  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)

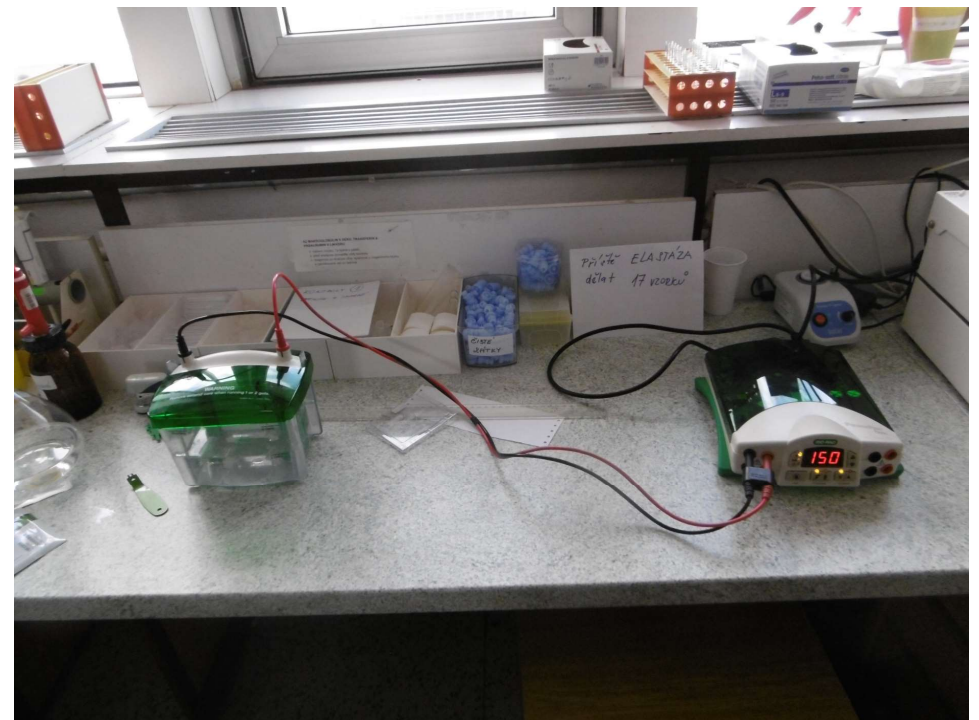
U slabých kyselin a zásad je pro rychlost migrace rozhodující efektivní mobilita  $u_{ef}$  daná vztahem

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

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

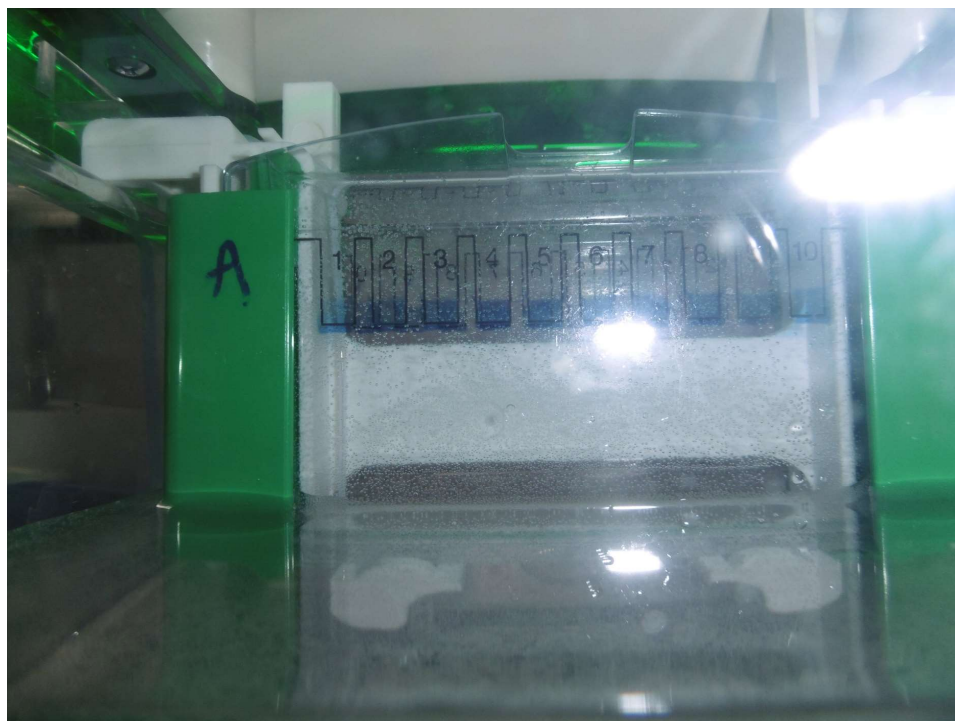
### **vertikální**

- 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 pufrům místo velkých objemů tekutých pufrů
- 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

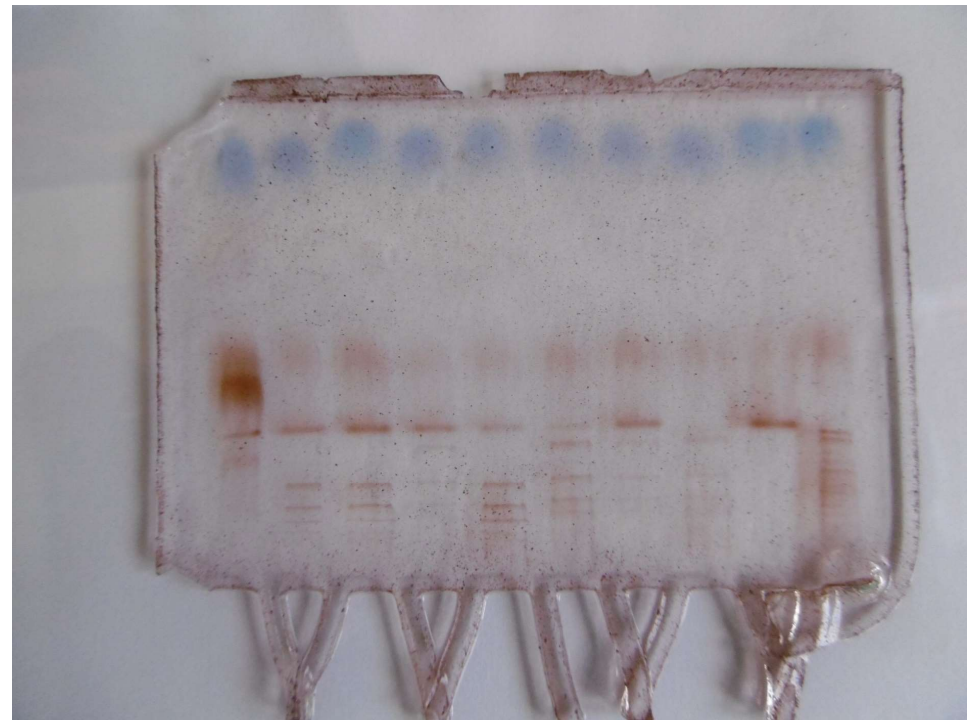




## Průběh vertikální elektroforézy

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

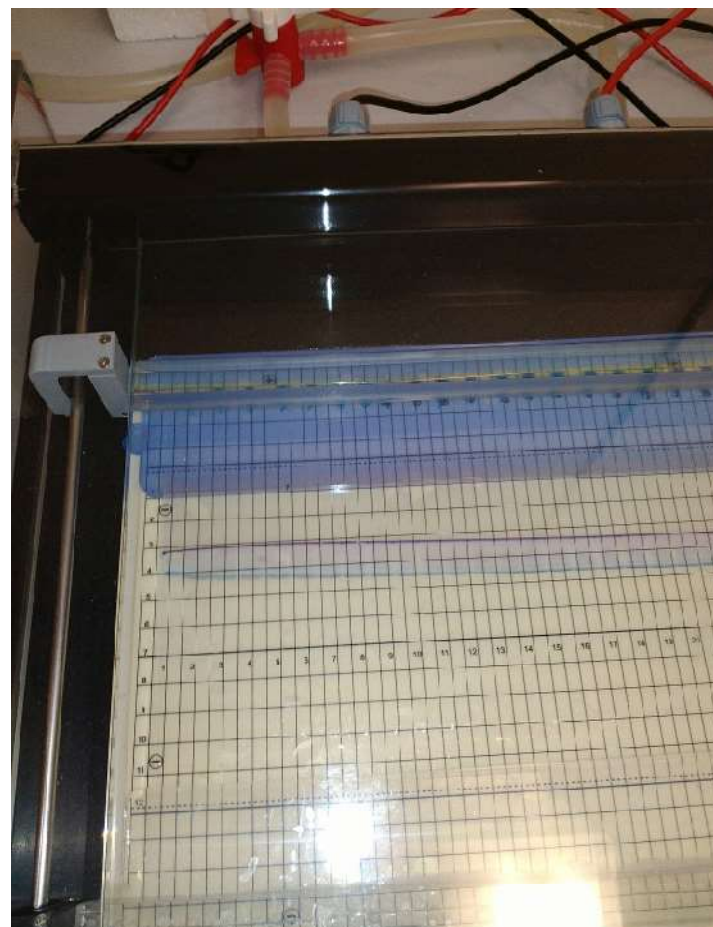
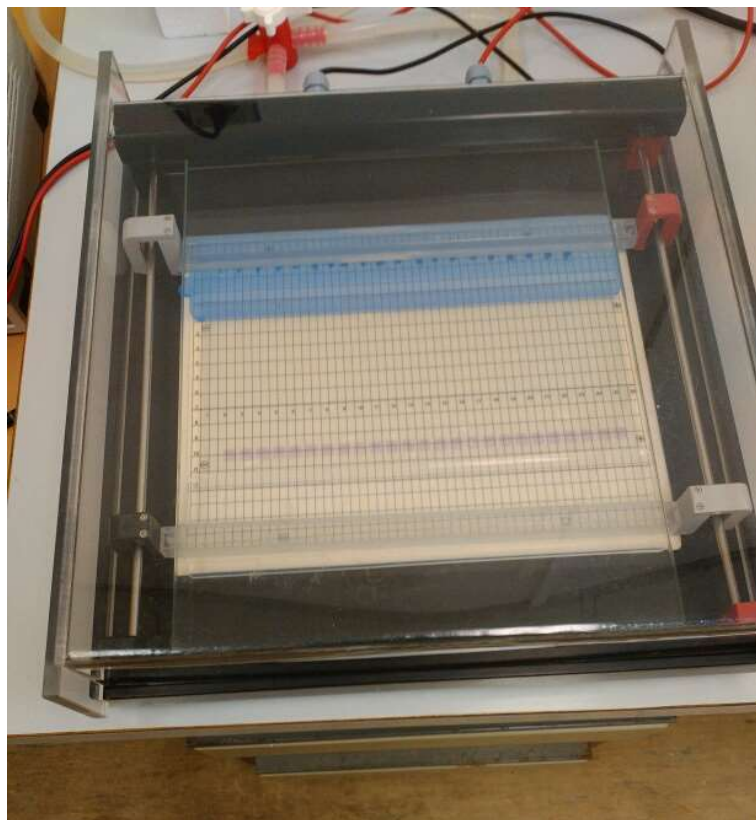
Stanovení fenotypu haptoglobinu v 7,5% polyakrylamidovém gelu (Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, Bio-Rad), 150 V, 2,5 hod



## 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)*

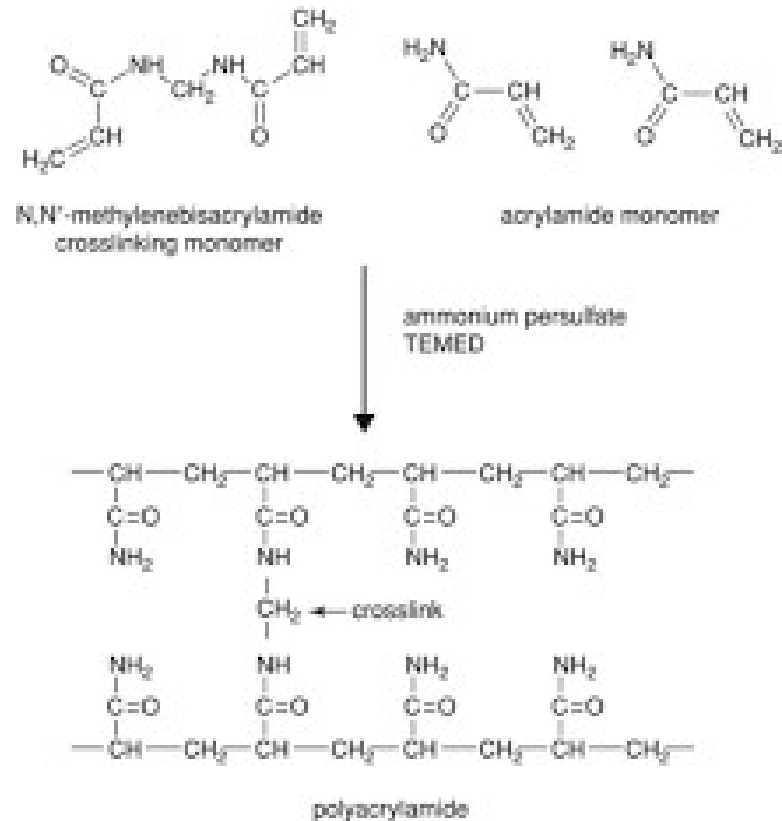
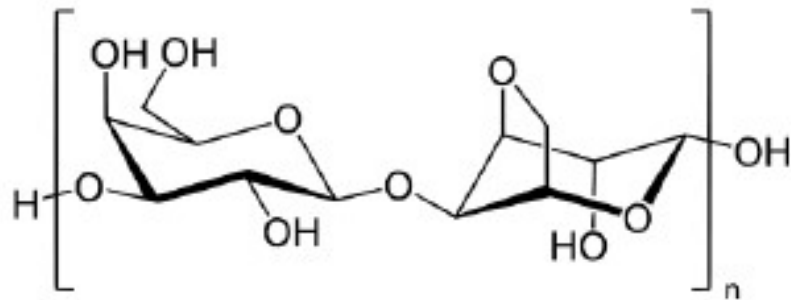
*V zaostřujícím gelu migrují bílkoviny na izotachoforetickém principu v pořadí podle svých mobilit. Na hranici se separačním gelem se prudce zvýší odpor pro velké molekuly bílkovin, glycin získá záporný náboj a „přeskočí“ proteiny, které se v separačním gelu dělí podle náboje a velikosti*

*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):

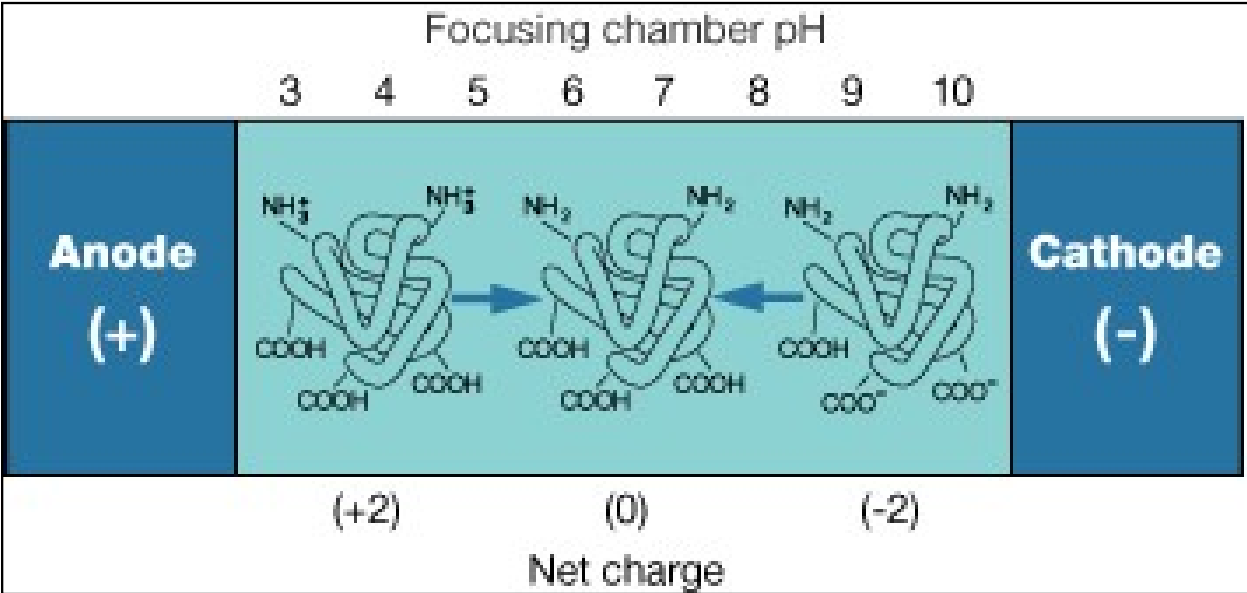
$$c_A = c_L \cdot \frac{\mu_A(\mu_L + \mu_Q)}{\mu_L(\mu_A + \mu_Q)}$$

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:

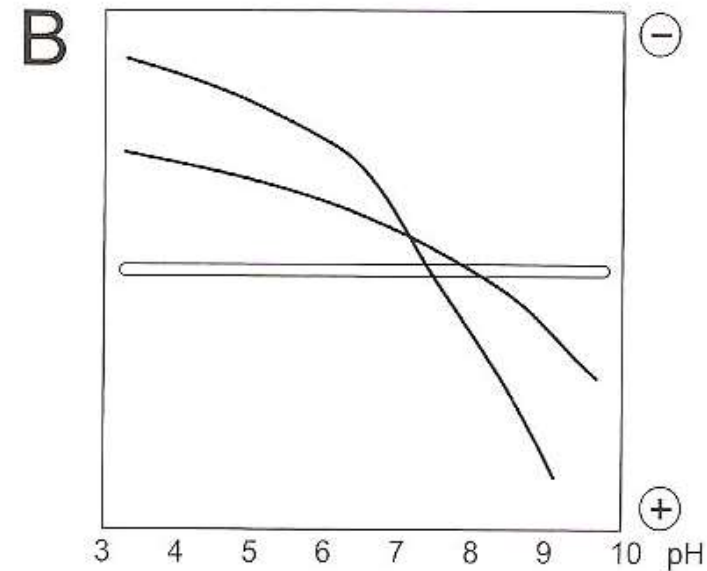
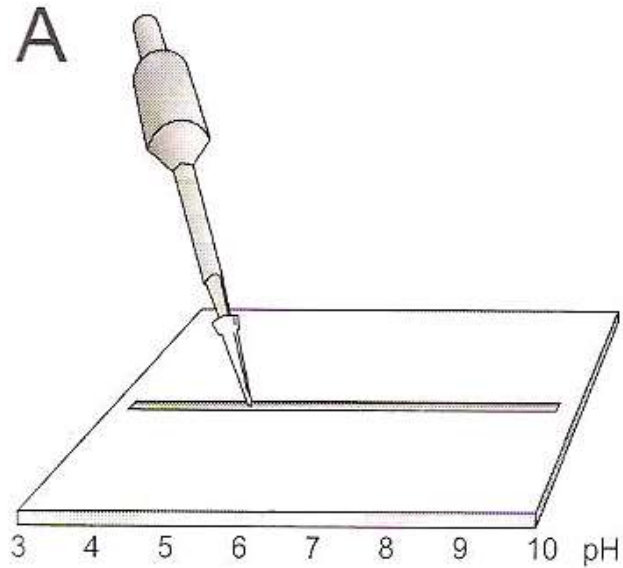
$$pH = pK_A + \log \frac{c_B}{c_A - c_B}$$

# 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 amfolyty - 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.

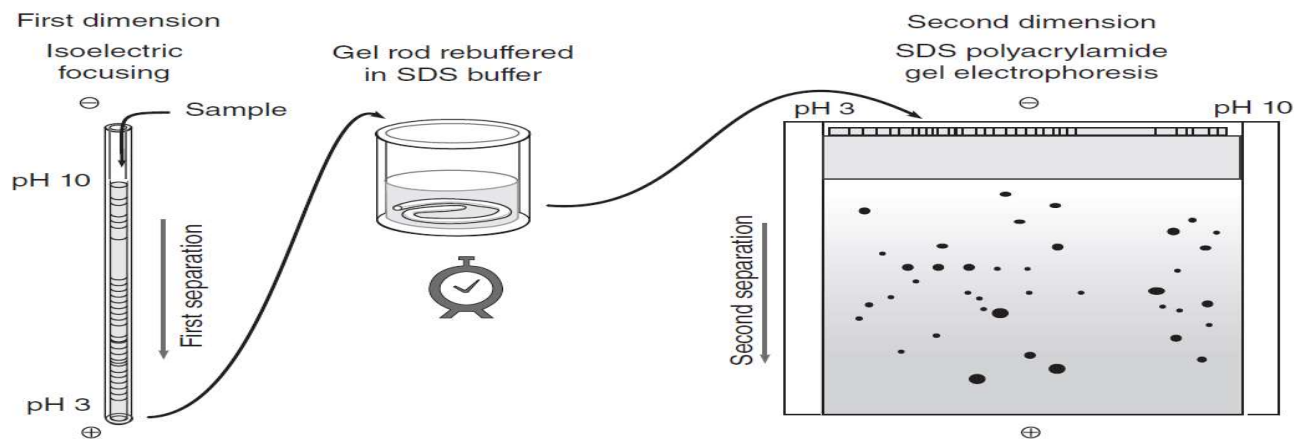
**Proteomika** je obor, který se zabývá **globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem)**, rovněž však **zkoumá strukturu a interakce proteinů.**



# Dvozměrná 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).

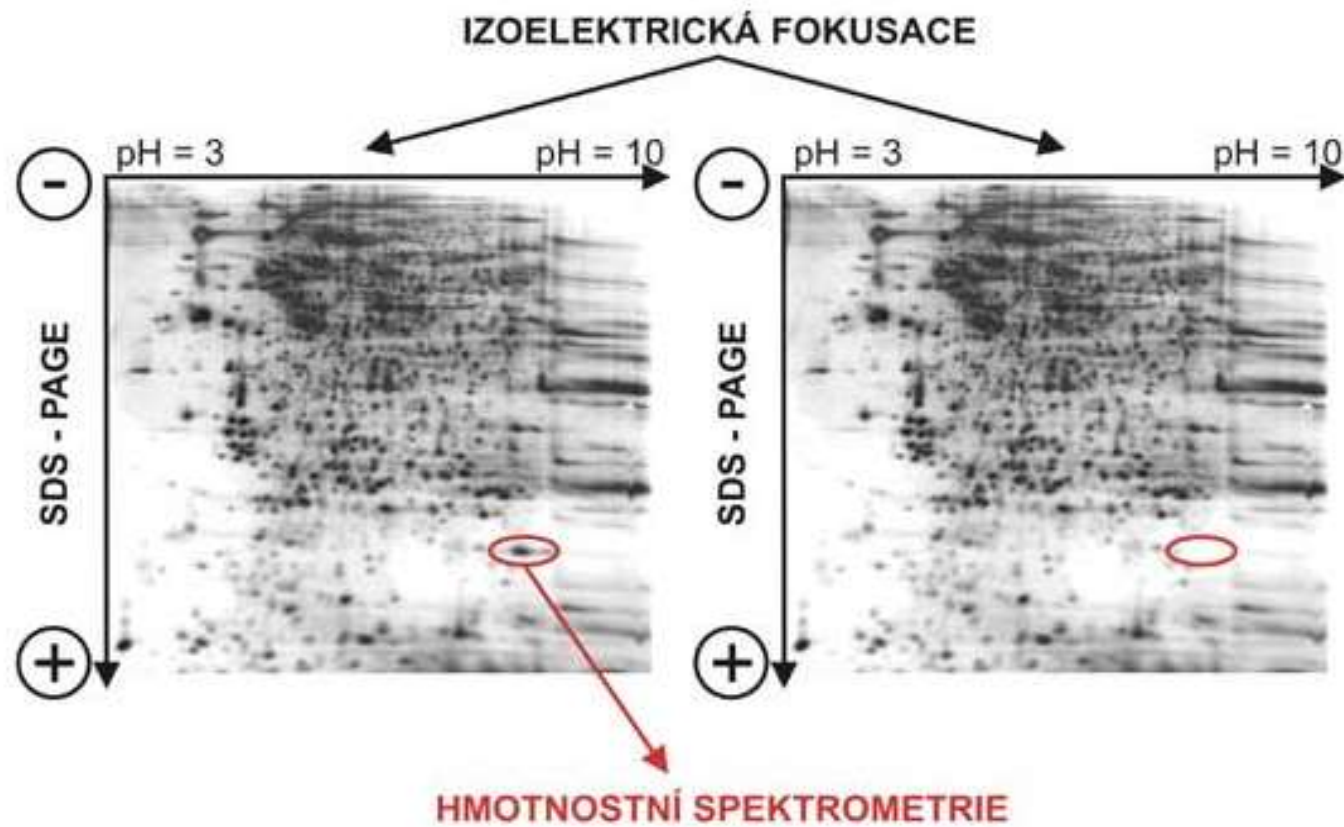


# Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

## 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)



## 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)

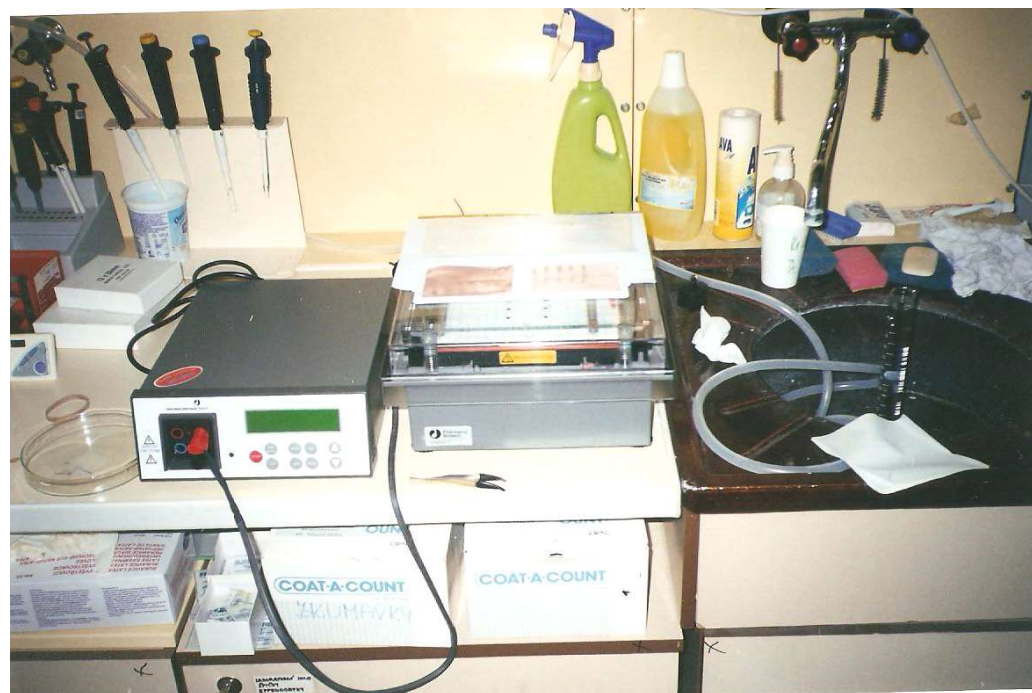
# Elektroforetický přístroj Hydrasys2 (Sebia) – pro elektroforézu a izoelektrickou fokusaci



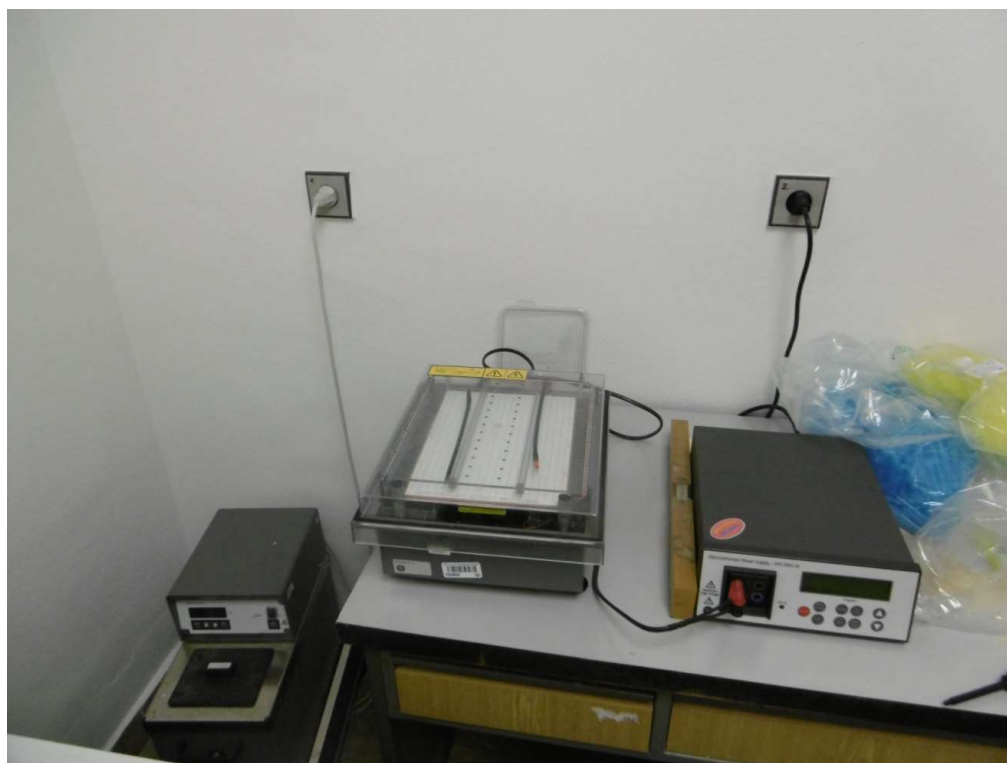
## Phast System™ † (GE Healthcare)



*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)



## 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

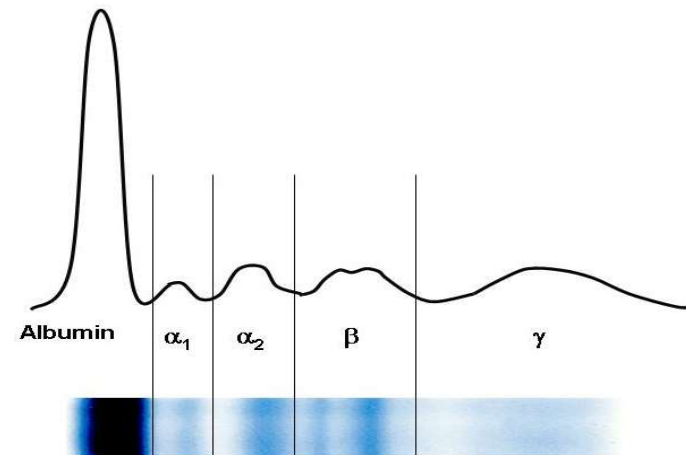
- Kvantitativní hodnocení intenzity zbarvení
- Měření absorpce světla jednotlivými zónami (pásy)
- Pohyblivý světelný zdroj (laser nebo lampa s bílým světlem s filtry) je veden nad gelem a na každém místě gelu je měřena a počítačově zpracována absorpce
- U jednorozměrných gelů získáváme křivku extinkce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



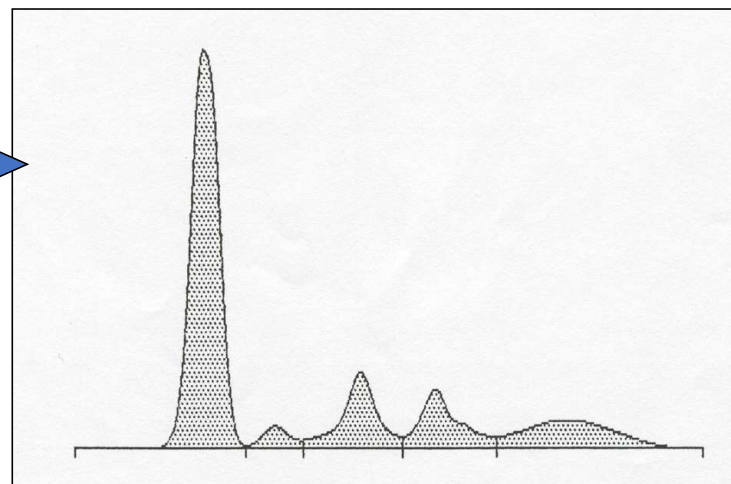
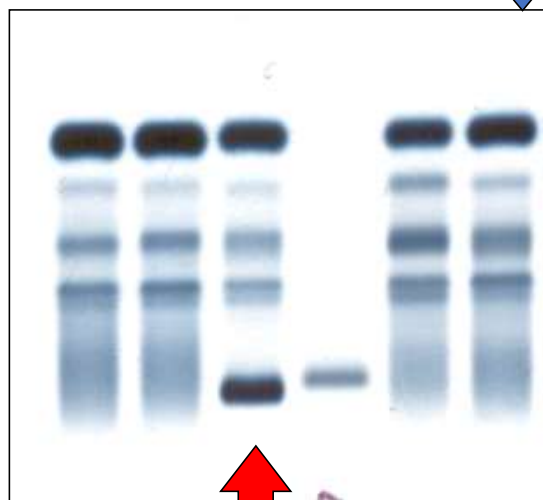
# Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

- 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.

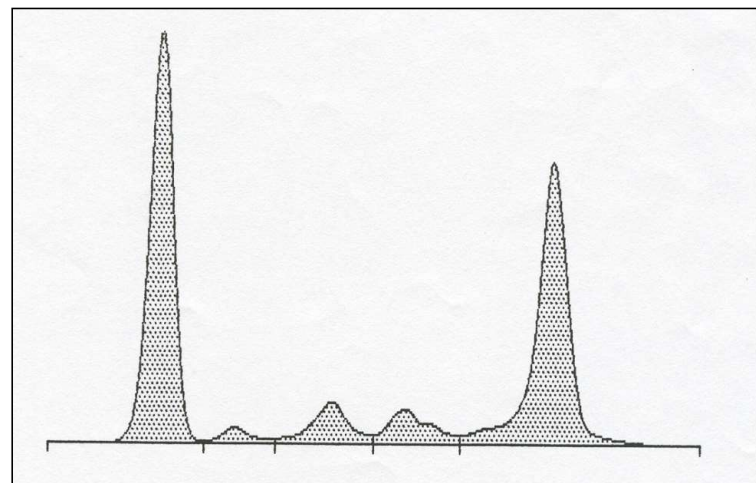
Barva	$\lambda_{\max}$ [nm]
Amidočerň 10B	620
Coomassie Brillant Blu R-250	590
Coomassie Brillant Blu G-250	595
Fast Green	610
Acid violet	
Alcian Blu	630
Basic Fuschin	550
Methyl Green	635
Ethidium Bromide (Fluorimetrická detekce)	
Bromcresol Green	
Methylene Blue	665
Pyrimin Y	510
Toluidine Blu O	620

# Denzitometrické vyhodnocení

Normální nález



„M“ gradient





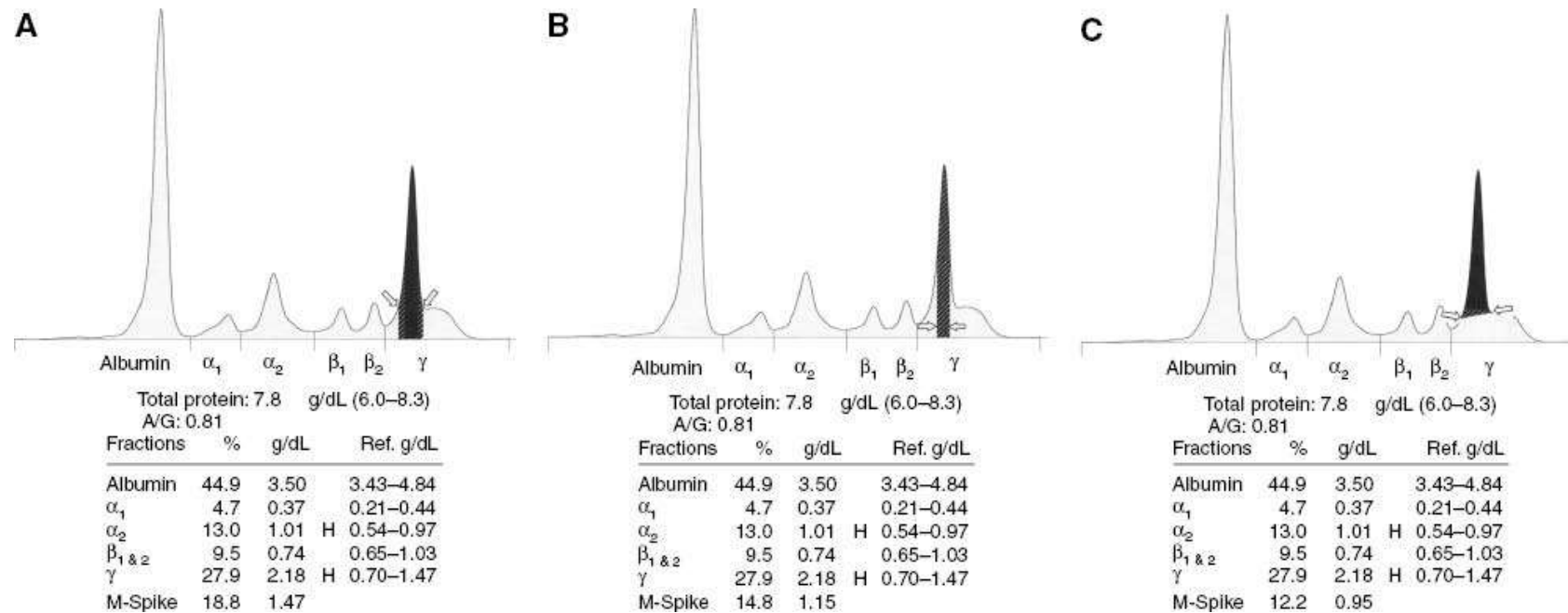
# Metody pro kvantifikaci M-komponenty

- 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 imunosubtrakci – zatím nelze používat v rutinní praxi*

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

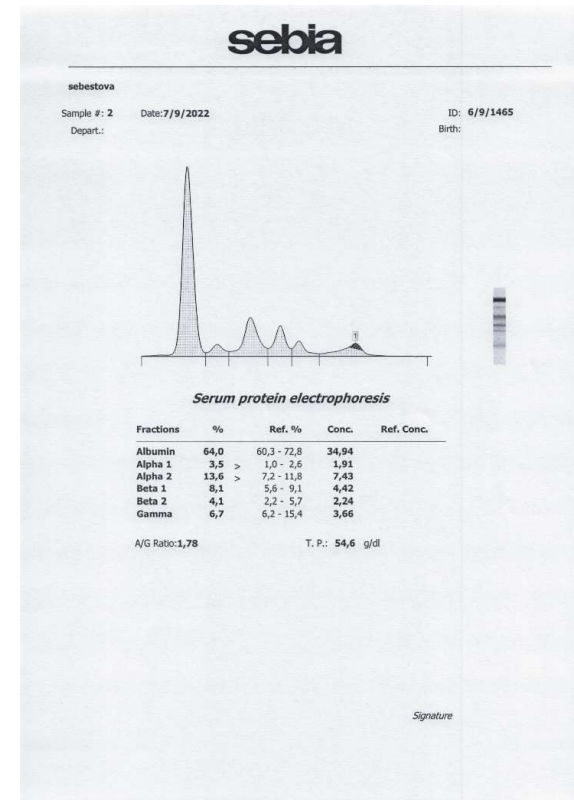
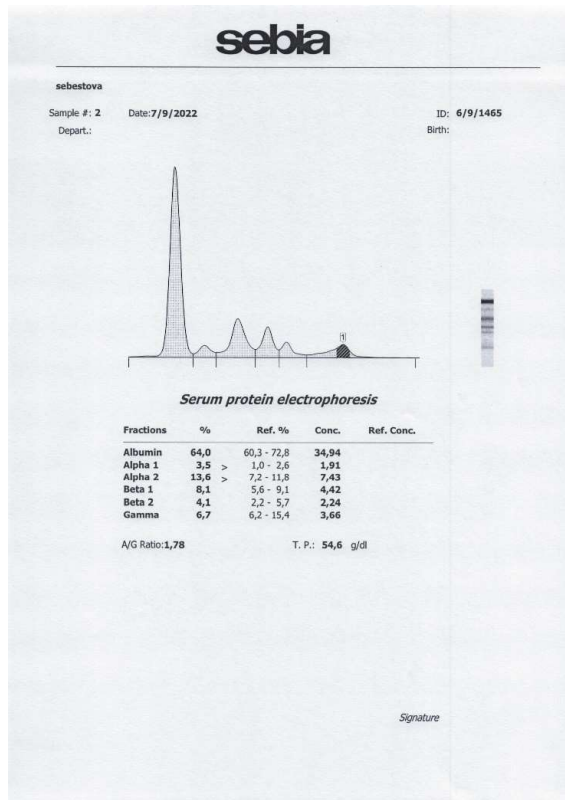
Keren DF, Schröder L. *Clin Chem Lab Med* 2016



# Kvantifikace M-komponenty

vlevo: perpendicular drop

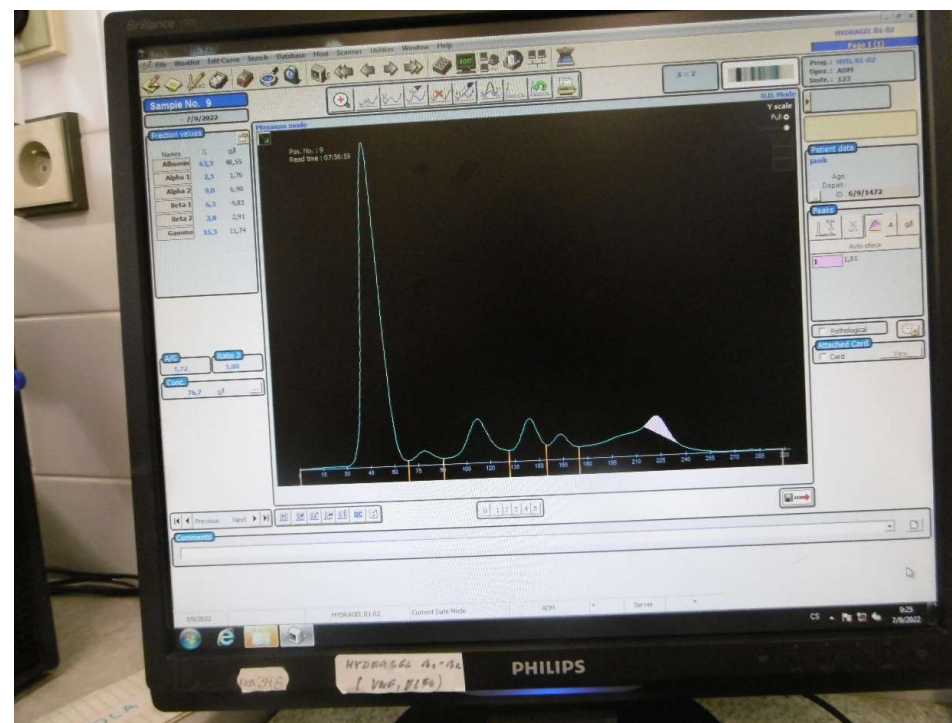
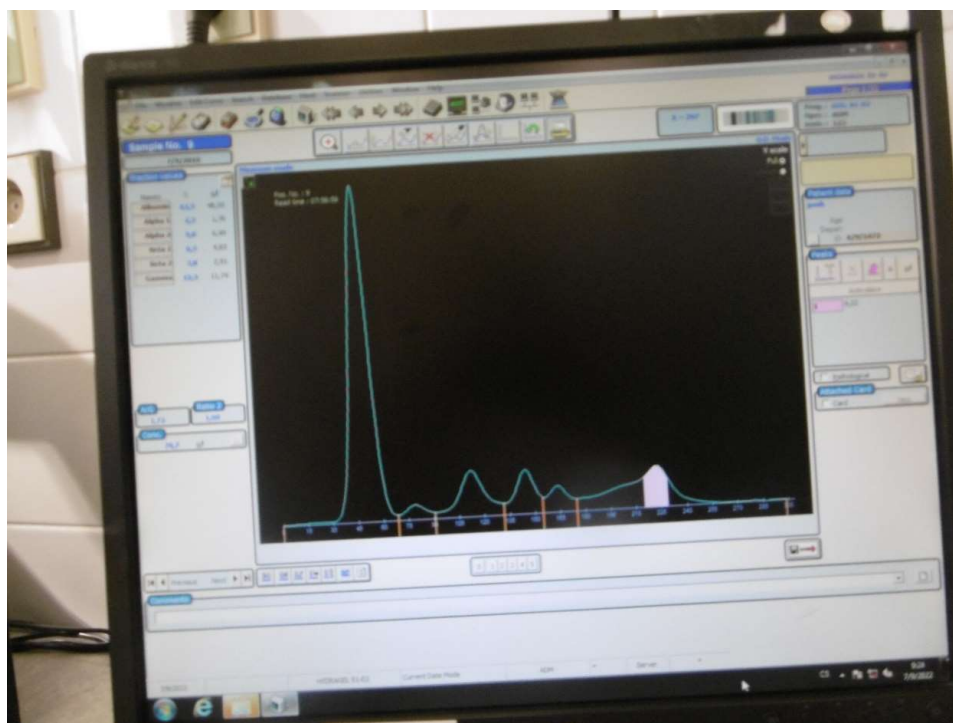
vpravo: tangent skimming



## Kvantifikace monoklonální komponenty

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

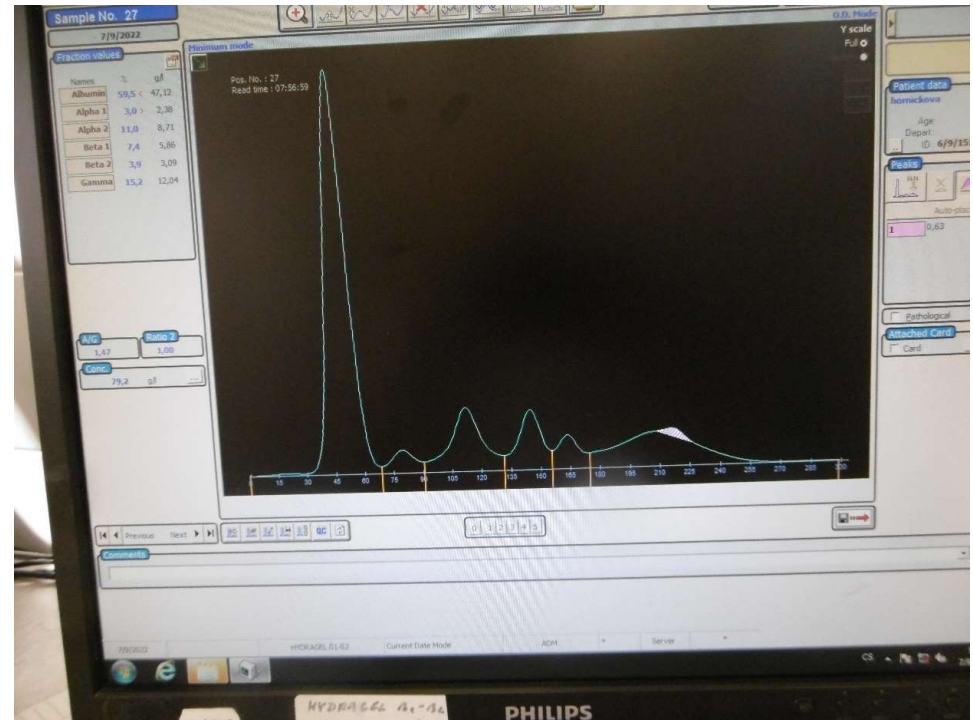
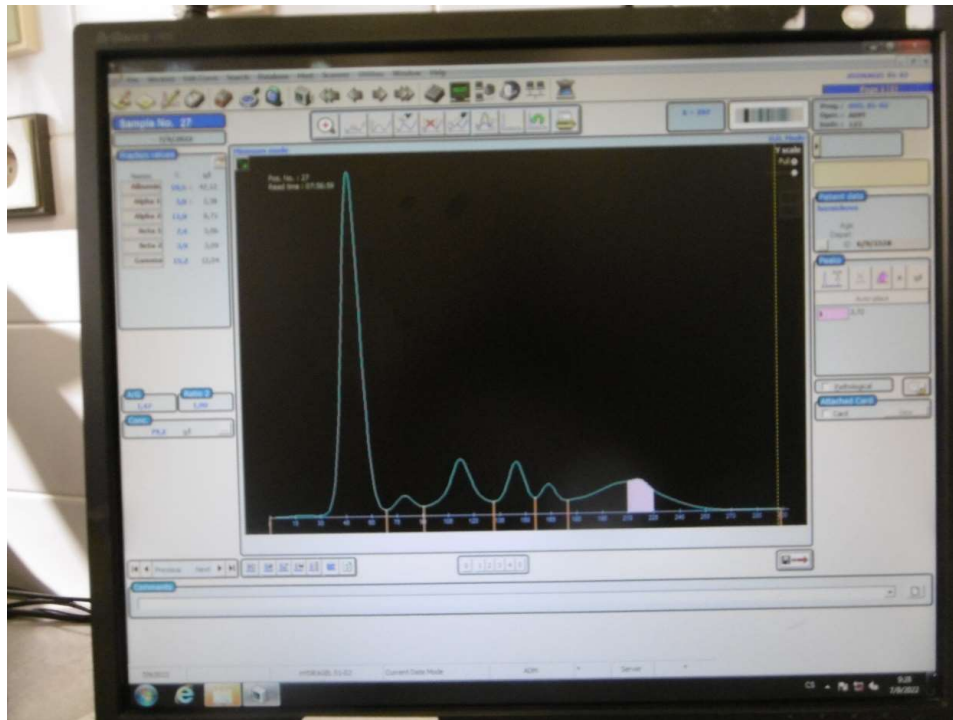
*vpravo*: ohraničení zdola úsečkou mezi body, kde M-pík nasedá na polyklonální pozadí („tangent skimming“): 1,6 g/L



# Ohraničení monoklonální komponenty – problém polyklonálního pozadí

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

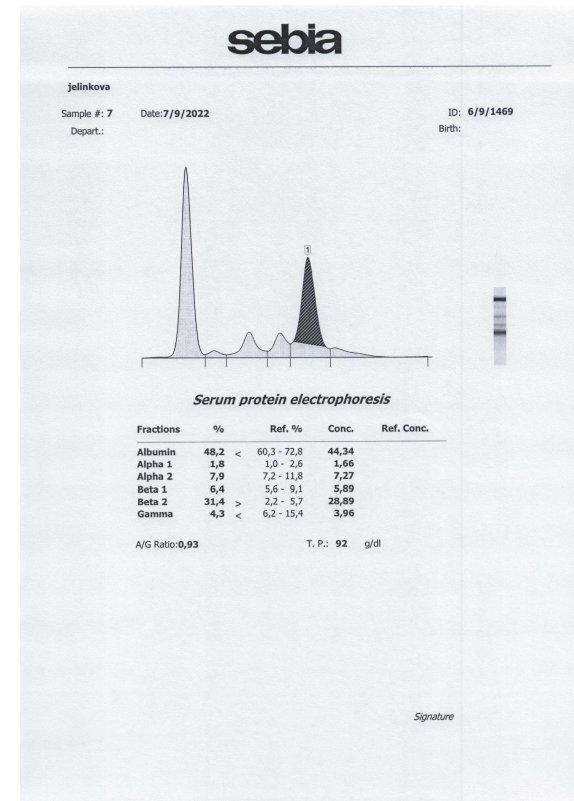
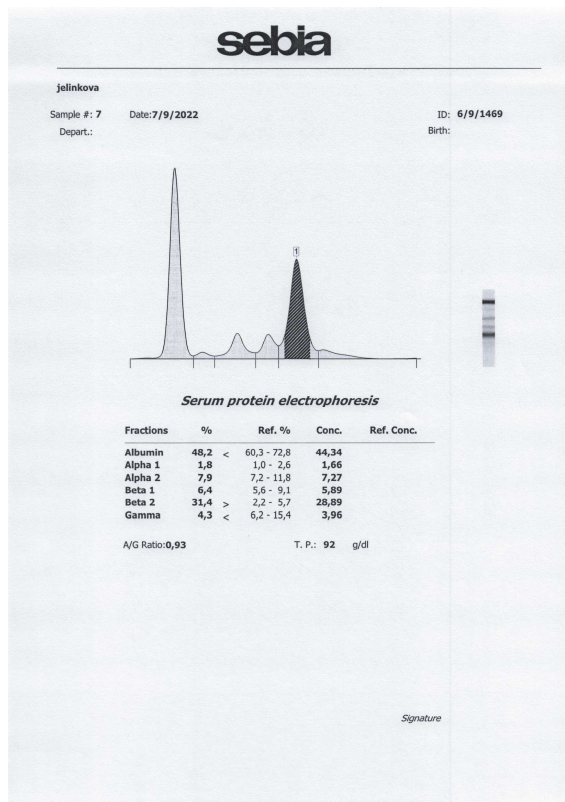
*vpravo*: ohraničení zdola úsečkou mezi body, kde M-pík nasedá na polyklonální pozadí („tangent skimming“): 0,6 g/L



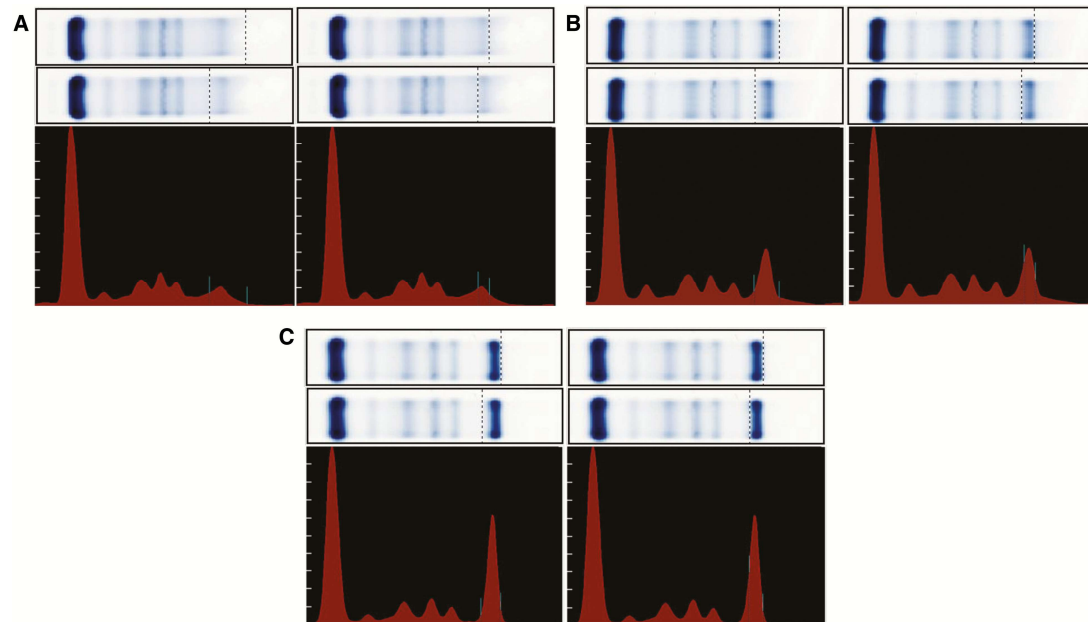
## M-komponenta v $\beta_2$ frakci

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 imunsubtrakční elektroforéza (CE) – typizace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)
- SDS elektroforéza bílkovin moče – diferenciální diagnostika proteinurií (glomerulární, tubulární, postrenální)
- Elektroforéza hemoglobinů – detekce abnormních 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.

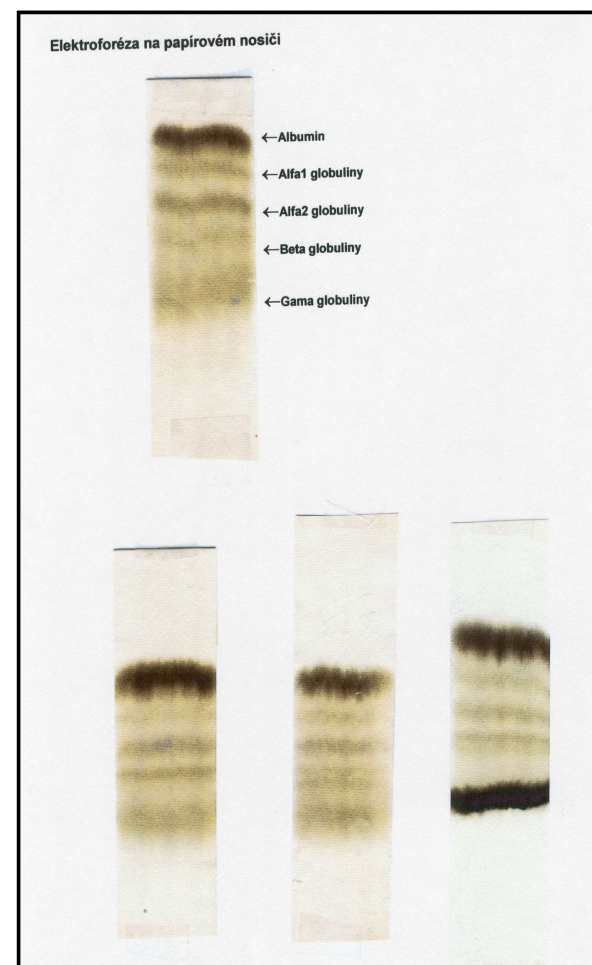
☞ Změny v tomto obrazci souvisí s různými druhy onemocnění nebo s různými patologickými stavy.

Bílkoviny se dělí na 5 – 6 hlavních frakcí:

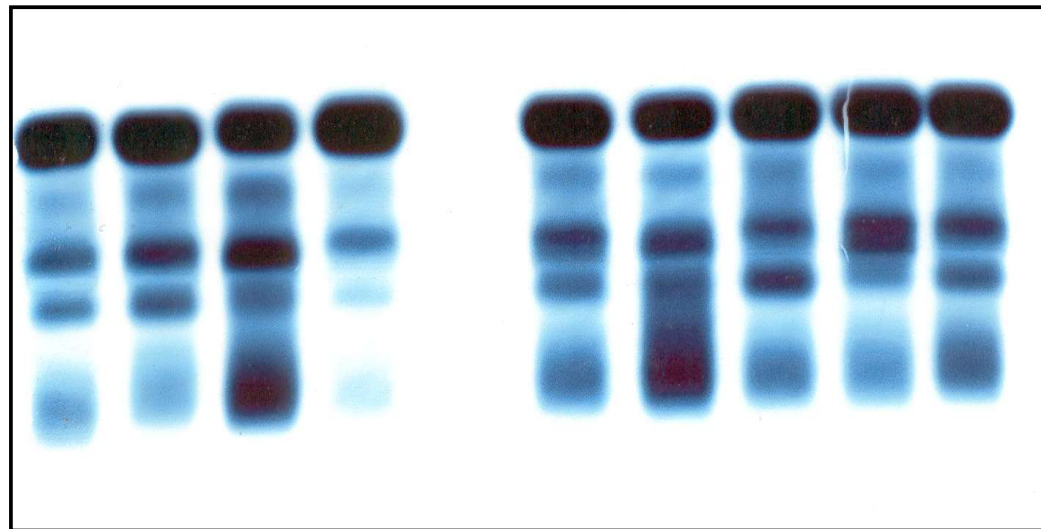
✦	Albumin	56 – 66 %
✦	$\alpha$ 1 globuliny	2 – 3 %
✦	$\alpha$ 2 globuliny	8 – 12 %
✦	$\beta$ globuliny ( $\beta$ 1, $\beta$ 2)	7 – 10 %
✦	$\gamma$ globuliny	10 – 18 %

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

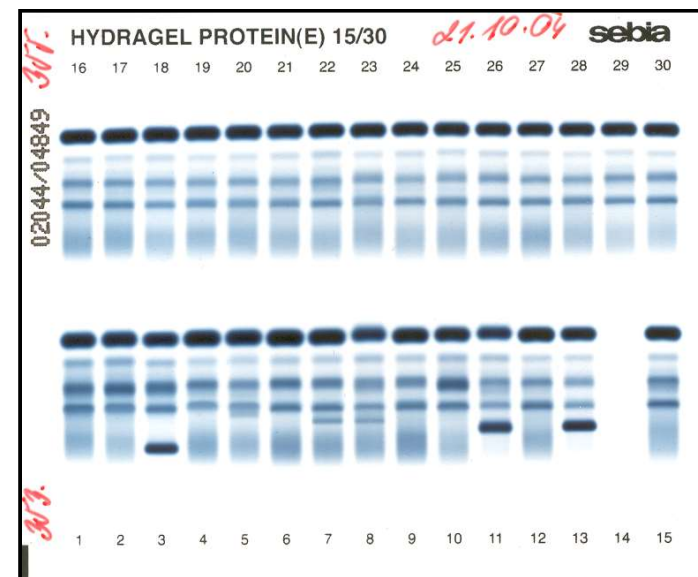
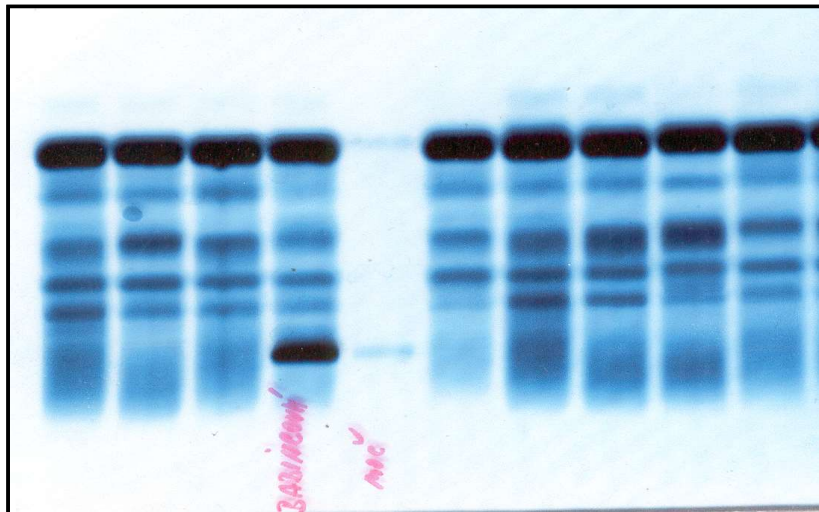
Denaturace: kyselina pikrová

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 (výroba esterifikací celulózy směsí acetanhydridu a kyseliny octové)

Nanášení: speciální tiskátko

Denaturace: kyselina trichloroctová

Barvení: anionická barviva

Odbarvení: směs – methanol + kyselina octová

Hodnocení: denzitometricky (po zprůhlednění)

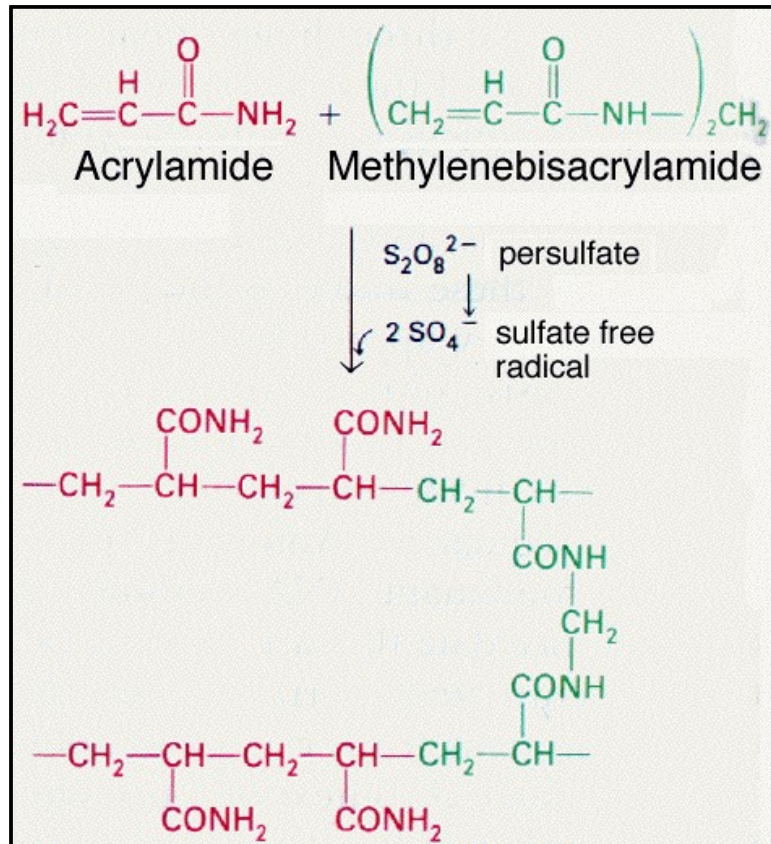
Poznámka: dovozové fólie

Zprůhledňovací směs:

Methanol 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 3-5% celkového množství akrylamidu.
- ☐ Podpurná matrice je prakticky nenabita.

**barvičky:**

Amidočerň 10 B,

Coomassie Brilliant Blue,

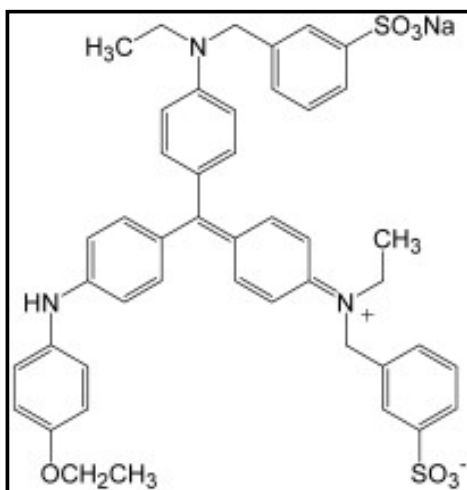
Ponceau S,

Bromfenolová modř,

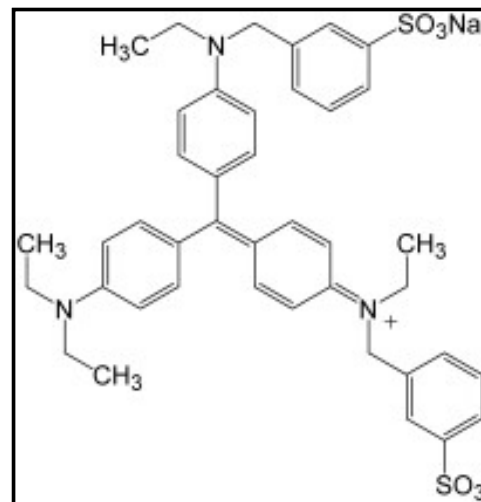
Kyselá violeť,

barvení stříbrem (není kvantitativní, ale je 50x citlivější než coomassie:  $\text{Ag}^+$  ionty se v proteinech vážou na  $-\text{SH}$  a  $-\text{COOH}$  skupiny)

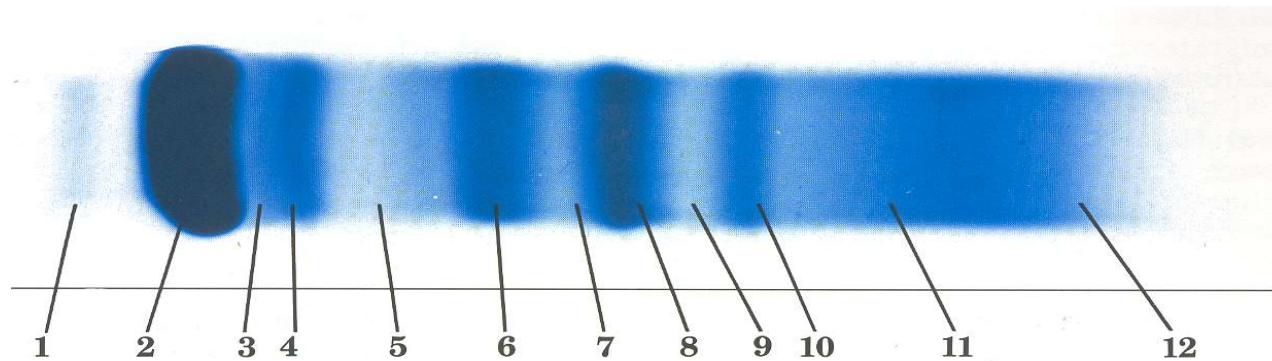
Coomassie Brilliant Blue R-250



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

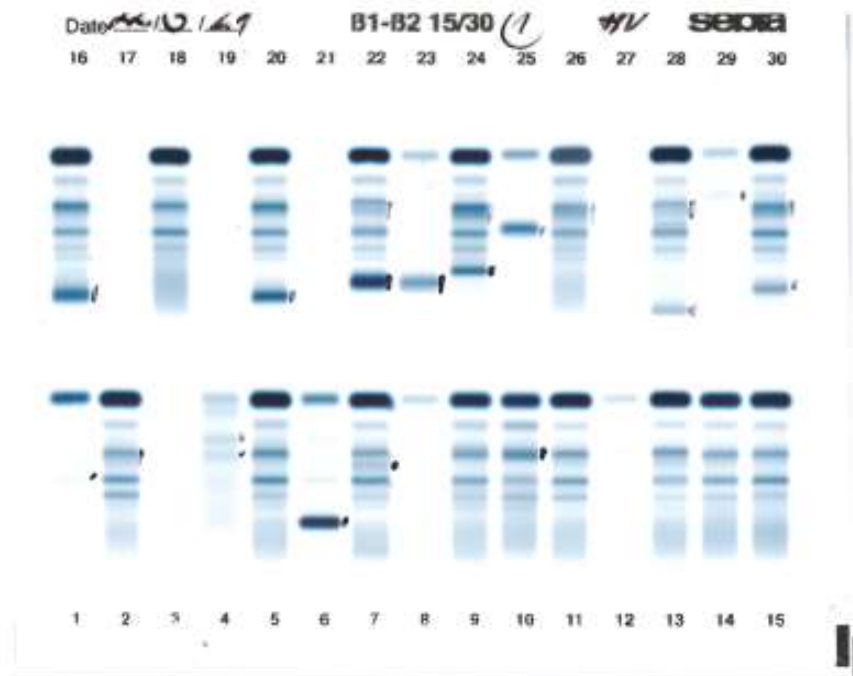
8.	Transferin
9.	Beta-lipoprotein
10.	C3
11.	IgA, IgM, fibrinogen, „M“, VLŘ
12.	IgG, CRP, „M“, VLŘ

## 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 %

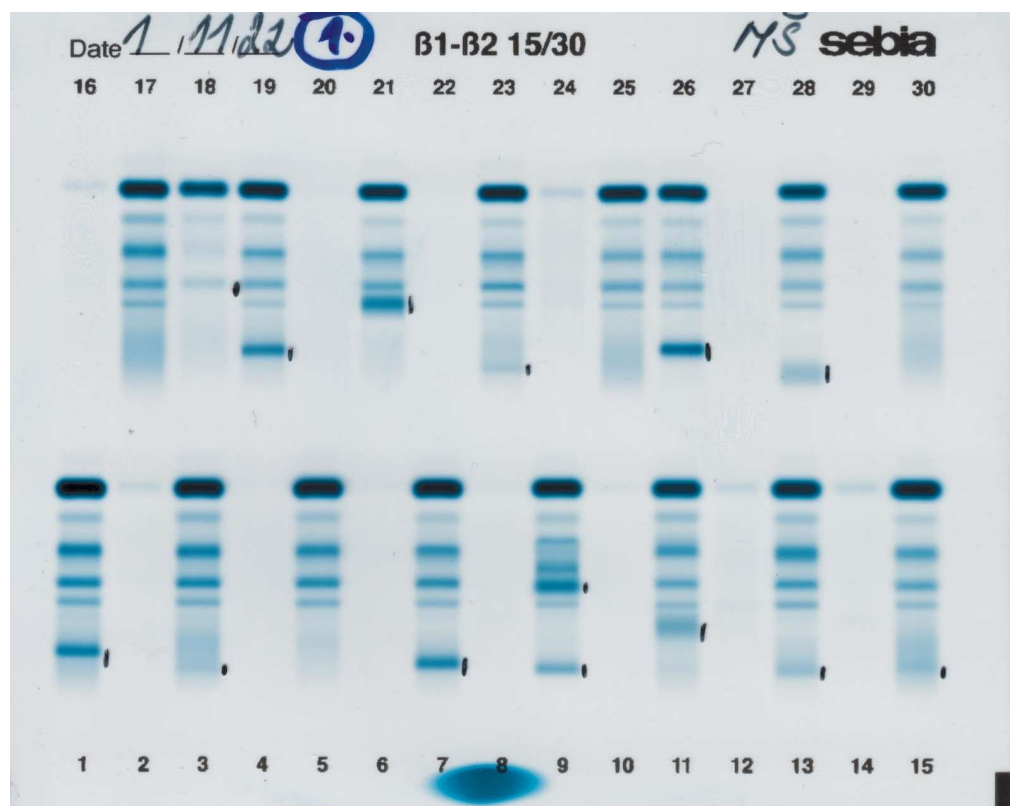
**Elektroforéza bílkovin séra (pozice 2, 5, 7, 9-11, 13-16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30) a moče (pozice 1, 3, 4, 6, 8, 12, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29) – Hydragel  $\beta$ 1- $\beta$ 2 15/30 (Sebia)**

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)

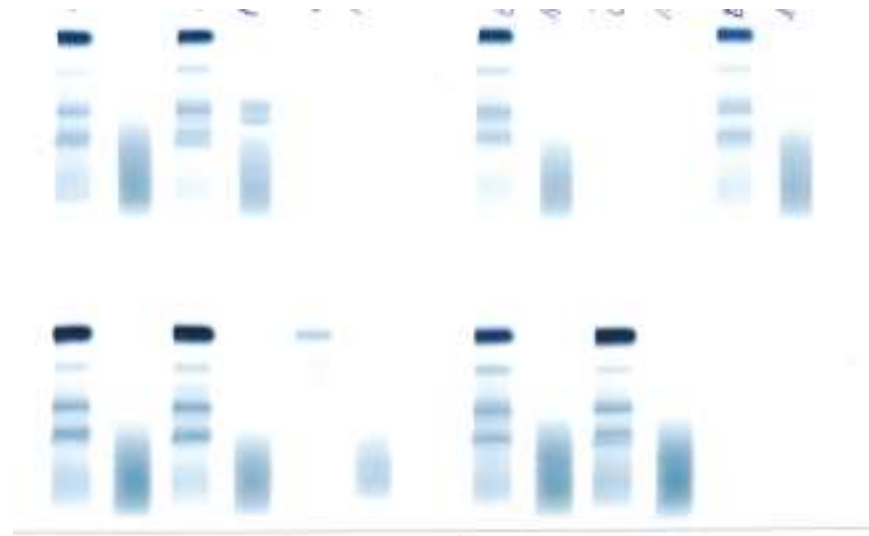
Paraproteiny v pozicích 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 19, 23, 26 a 28 v gama zóně, v pozici 21 v beta2 zóně. V pozici 9 je silně hemolytický vzorek s patrným zastřením alfa2-beta1 interzóny Hb-Hp komplexu, v této interzóně linie imitující paraprotein; výrazné zesílení beta1-zóny volným hemoglobinem může rovněž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



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

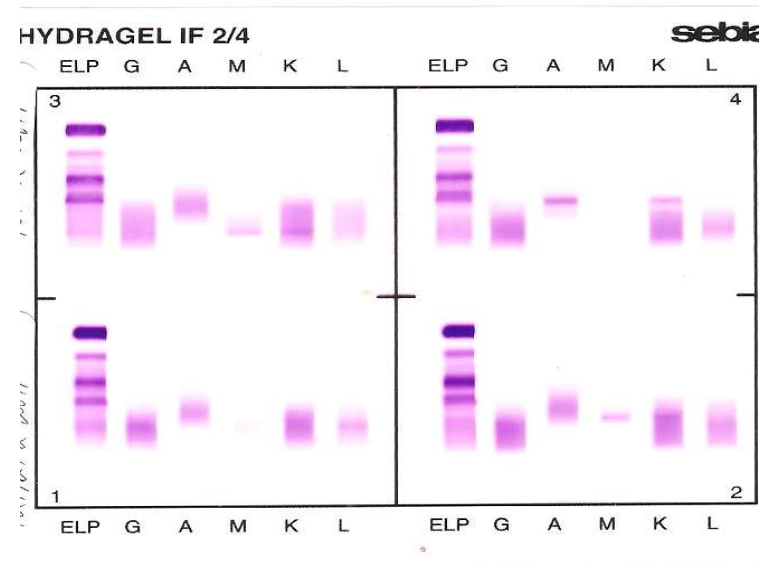
Elektroforetická stopa a vpravo od ní stopa stejného vzorku fixovaného s pentavalentním  
antisérem (G, A, M, kappa, lambda)

*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



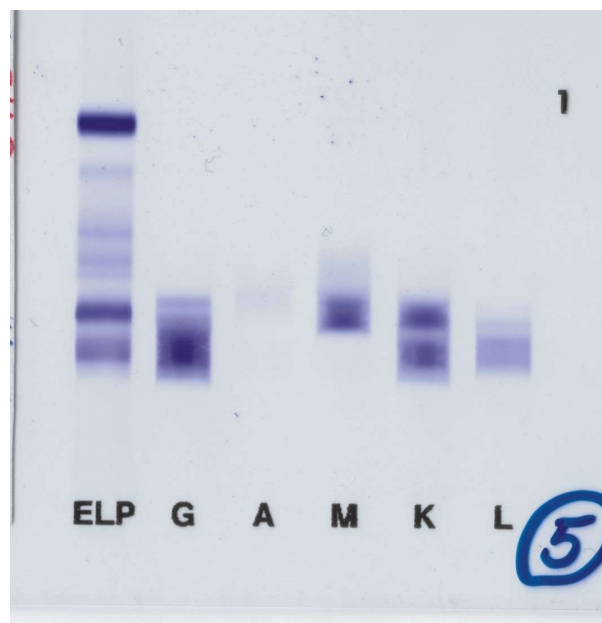
## Imunofixace – problematické nálezy

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

IF s Fluidilem



IF s beta-merkapttoethanolem





# Polyklonální hypergamaglobulinémie

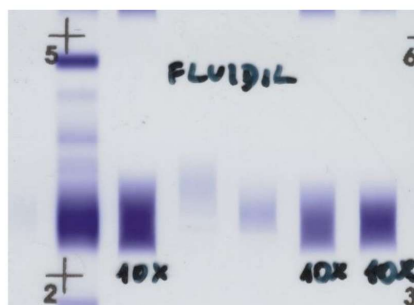
A – elektroforéza (vlevo bez, vpravo s použitím Fluidilu)

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/)

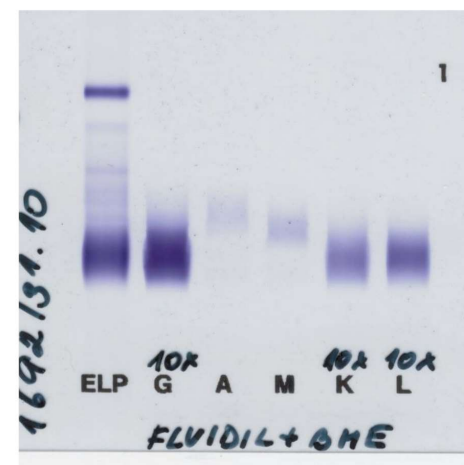
**A**



**B**



**C**



# 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?

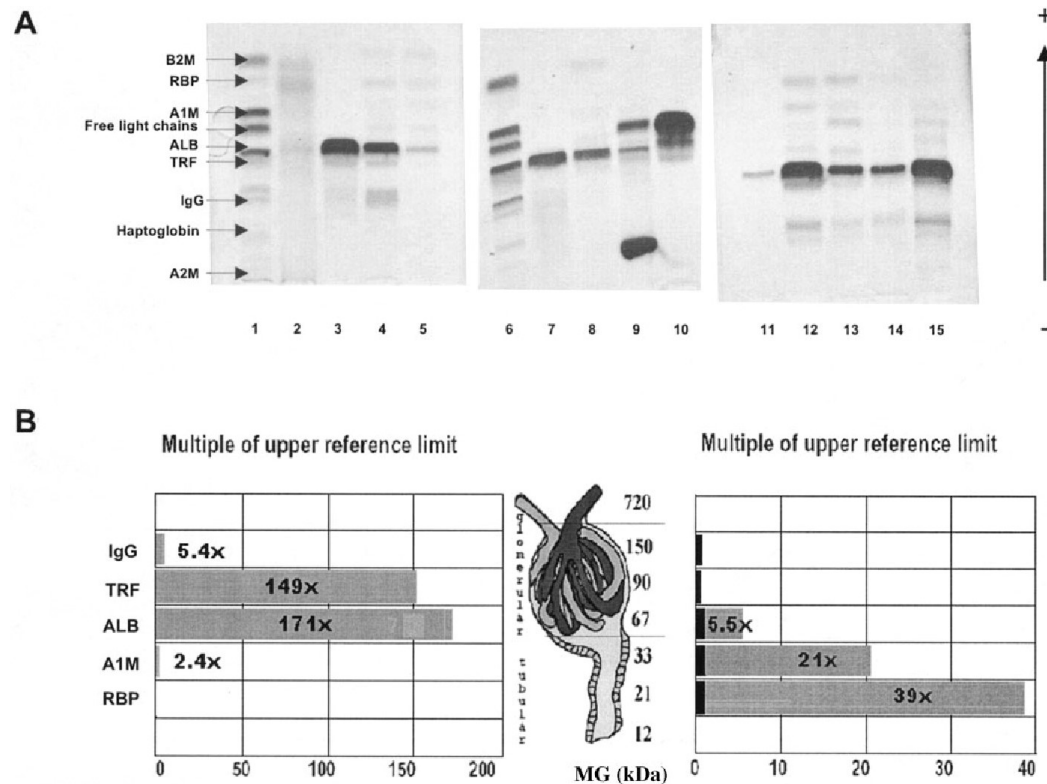
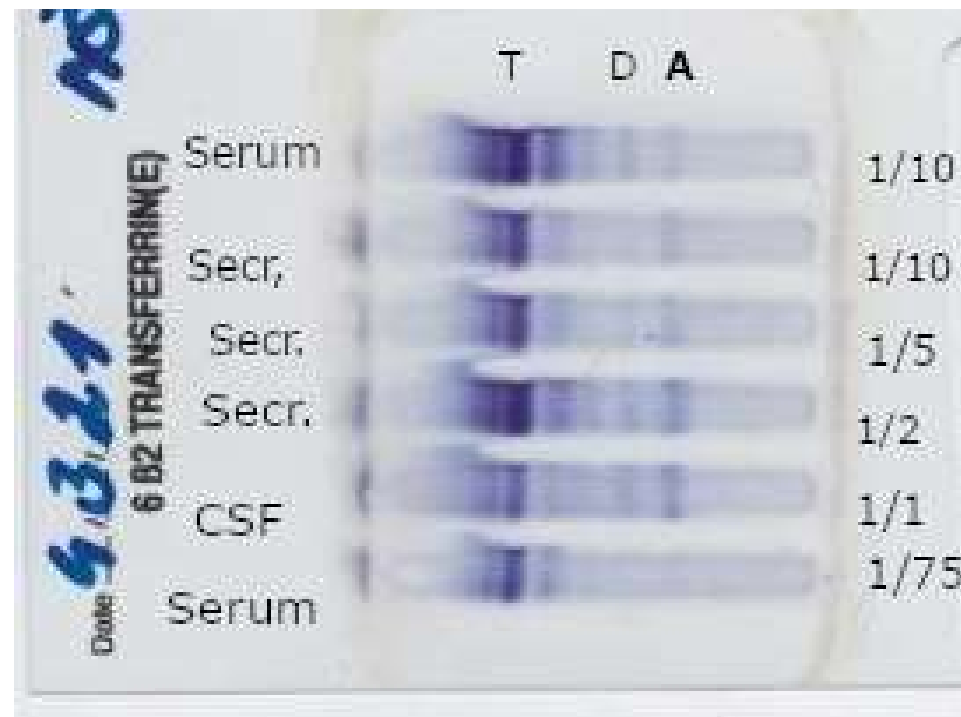


Fig. 1. Selected electrophoretic patterns obtained with Hydrasis SDS gels (A) and reproductions of marker proteins profiles (B)

## 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

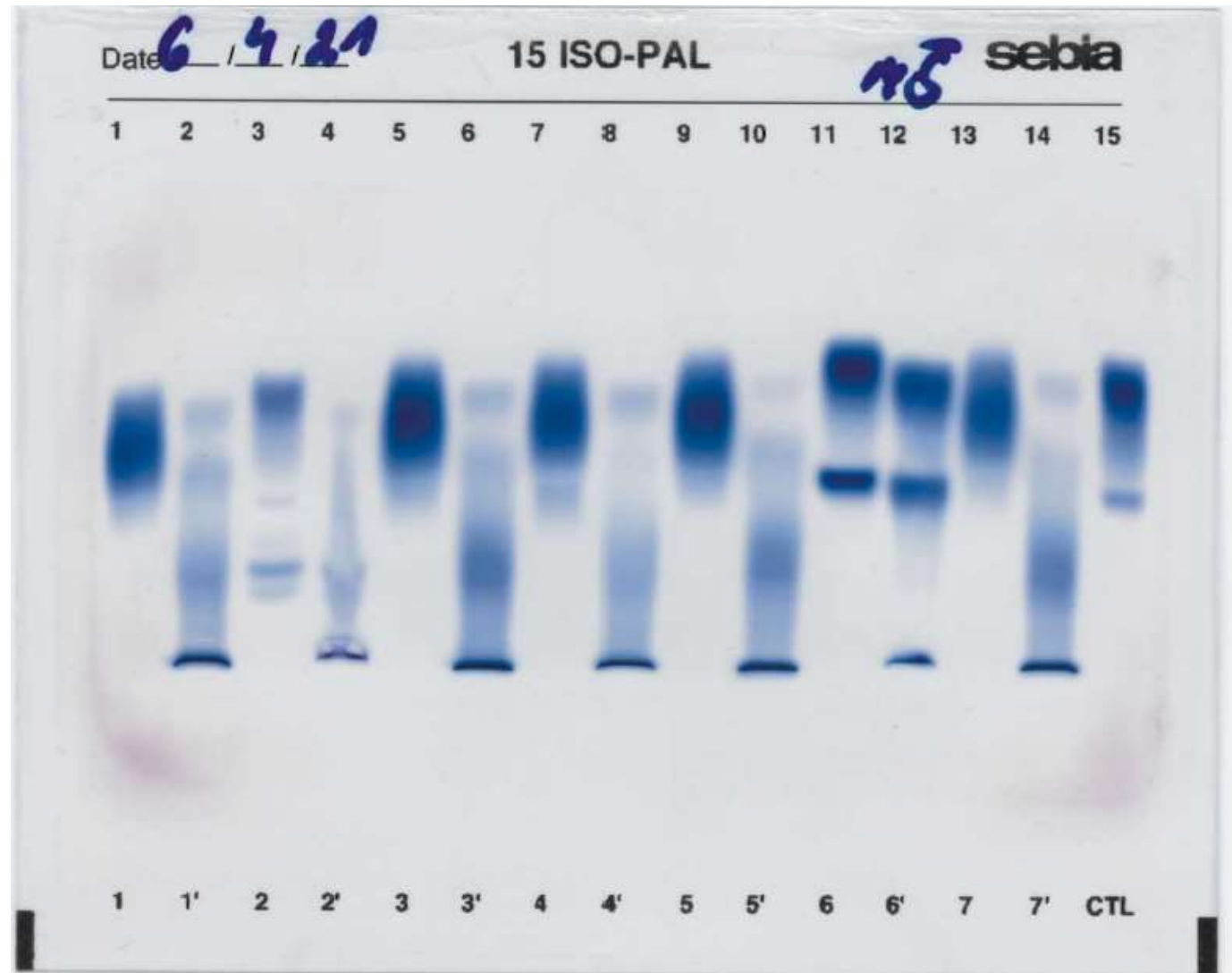


**Elektroforéza izoenzymů  
alkalické fosfatasy  
(Hydragel 15 ISO-PAL, Sebia)**

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

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

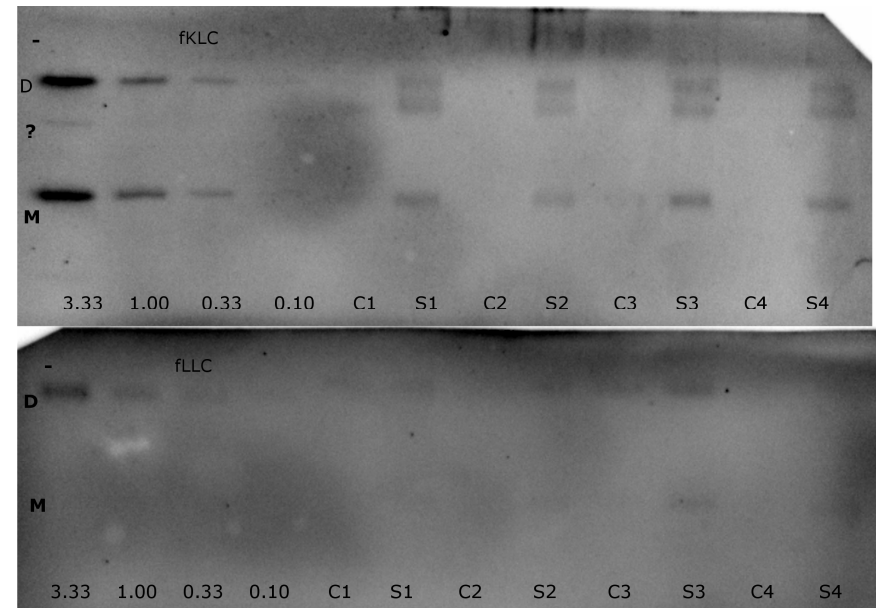
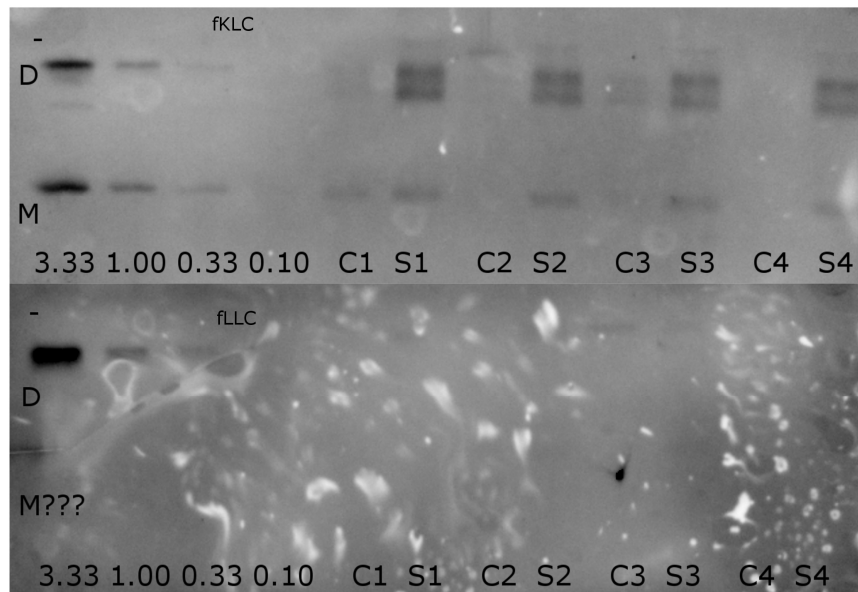
v pozicích 11, 12 je výrazná  
druhá jaterní frakce (L2)



## SDS-elfo

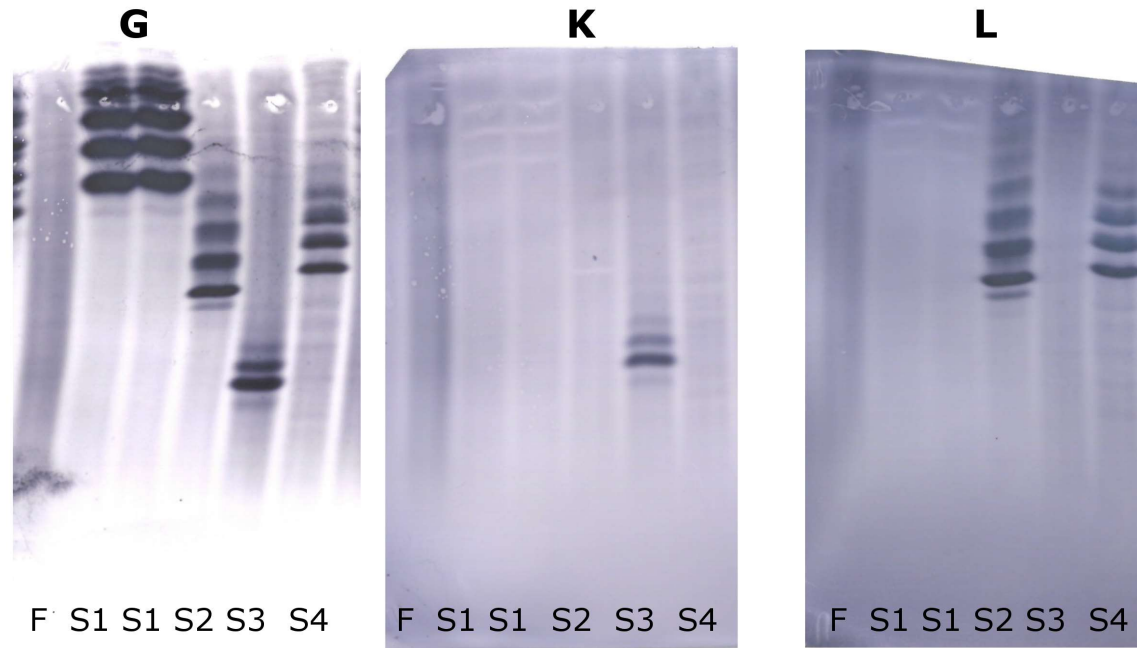
vzorky smíchaný s SDS (sodium dodecyl sulfate – laurylsíran sodný), který se váže na bílkoviny za tvorby negativně nabitých micel (v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny). Často se používají denaturační podmínky (inkubace vzorků s  $\beta$ -ME nebo DTT, zahřátí – redukce disulfidových vazeb). SDS (0,1%)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

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



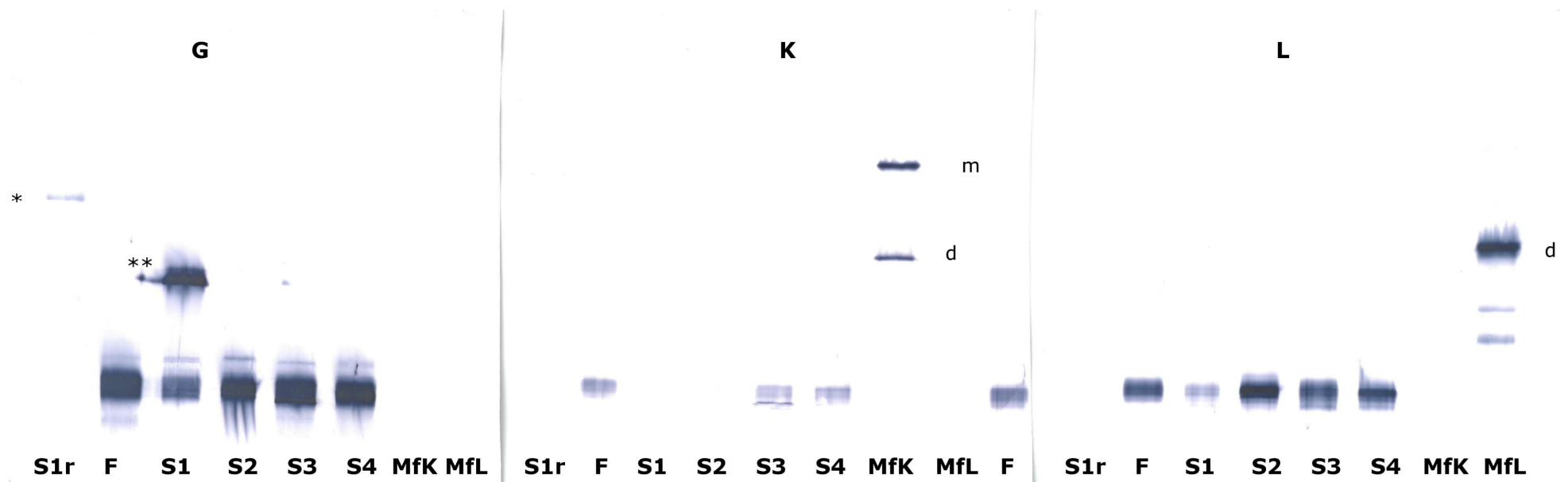
# IEF/AIB: typizace LŘ v Ig jako pomoc v diagnostice nemoci těžkých řetězců

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



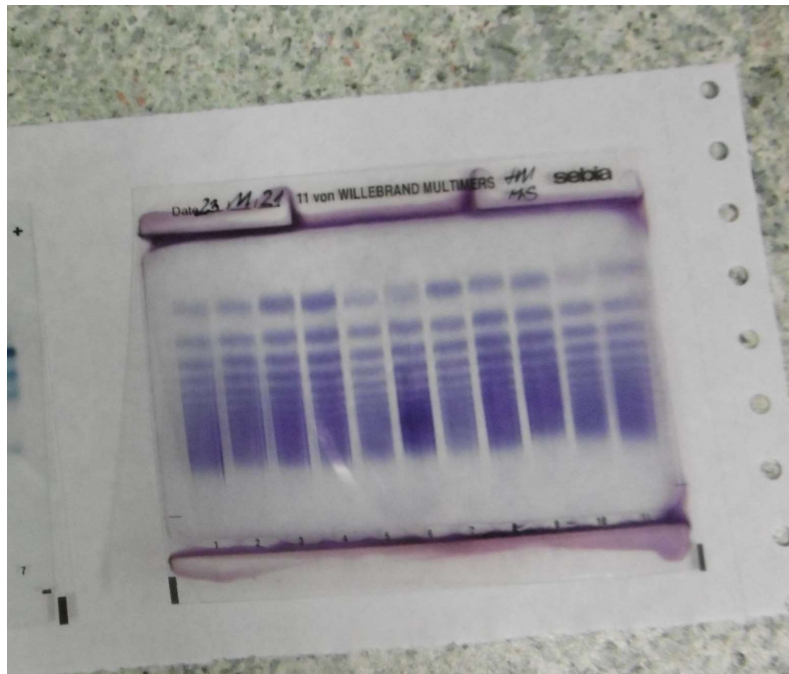
# SDS elfo jako pomoc v diagnostice nemoci těžkých řetězců

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

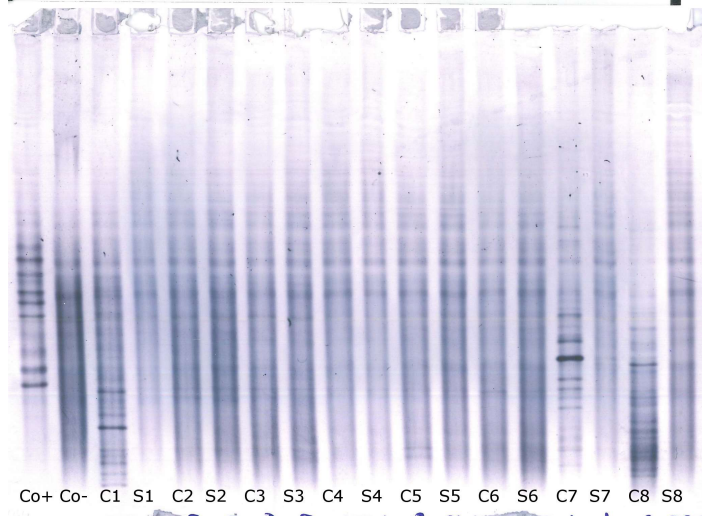
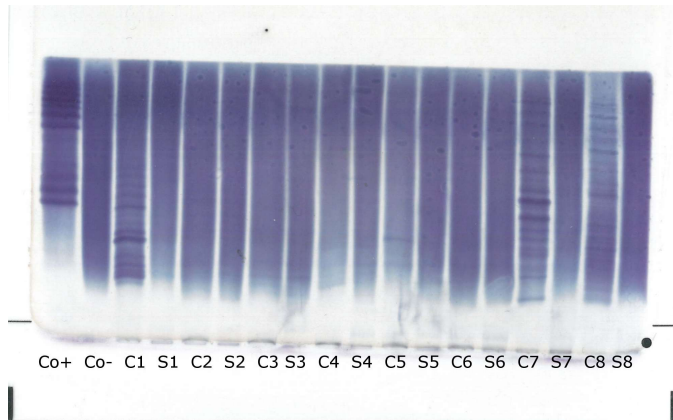




## Detekce multimerů vWF (SDS elfo v agarose, Sebia)



- 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

## Detekce intrathekální protilátkové odpovědi: Historie

- 1921 – zlatosolová křivka (C. Lange)
- 1942 – elektroforéza v roztoku (moving boundary electrophoresis – A. Tiselius 1930): zmnožení gamaglobulinů v likvoru pacienta s neurosyfilis, úvaha o jejich intrathekálním původu (E. Kabat)
- **1959** – elektroforéza v agarovém gelu: denzitometricky detekovaná heterogenita gamaglobulinů likvoru u pacienta s SSPE (D. Karcher et al.)
- 1960 – elektroforéza v agarovém gelu: vizuálně detekovaná heterogenita gamaglobulinů likvoru u pacientů s RS, neurosyfilis, SSPE a neurotrypanosomiázou (A. Lowenthal et al.)
- 1971 – izoelektrická fokusace (IEF) likvorových bílkovin v polyakrylamidovém gelu: charakteristický obraz v gamaglobulinové oblasti u pacientů s RS, vyšší senzitivita oproti elektroforéze v agarovém gelu (P. Delmotte)

## **Zlatosolová křivka**

(Likvorologická laboratoř Hennerovy Neurologické kliniky VFN a 1. LF UK v Praze, 1997)

„Zlatosol mění barvu podle stupně dispersity koloidních částic. Jsou-li v roztoku koloidní částice malých rozměrů, zůstává purpurově červená barva zlatosolu nezměněna. Čím jsou koloidní částice hrubší, tím více se mění barva zlatosolu přes červeně fialovou, modrofialovou, modrou, modrobílou až bílou za současné tvorby sedimentu. Na změnu barvy zlatosolu mají vliv globuliny, zejm. gama frakce.“ (Hanzal, Skaličková, Viklický: *Mozkomíšni mok v klinické a laboratorní praxi*. Praha, SZN 1963.)



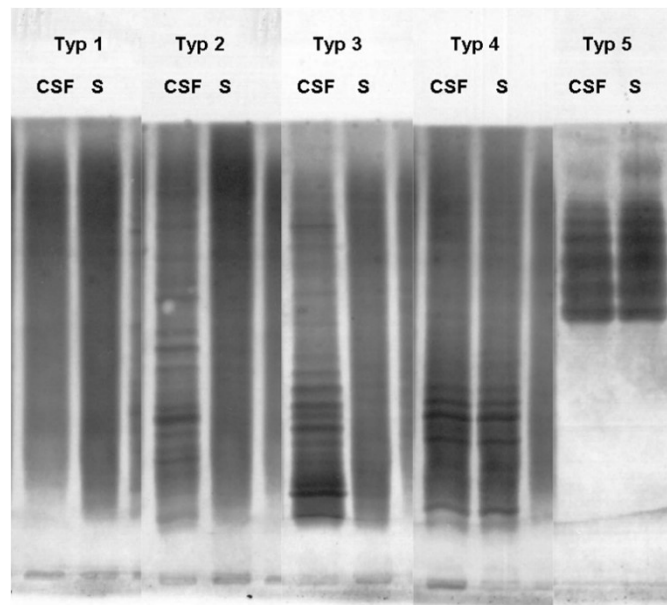
## Oligoklonální pásy

- 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

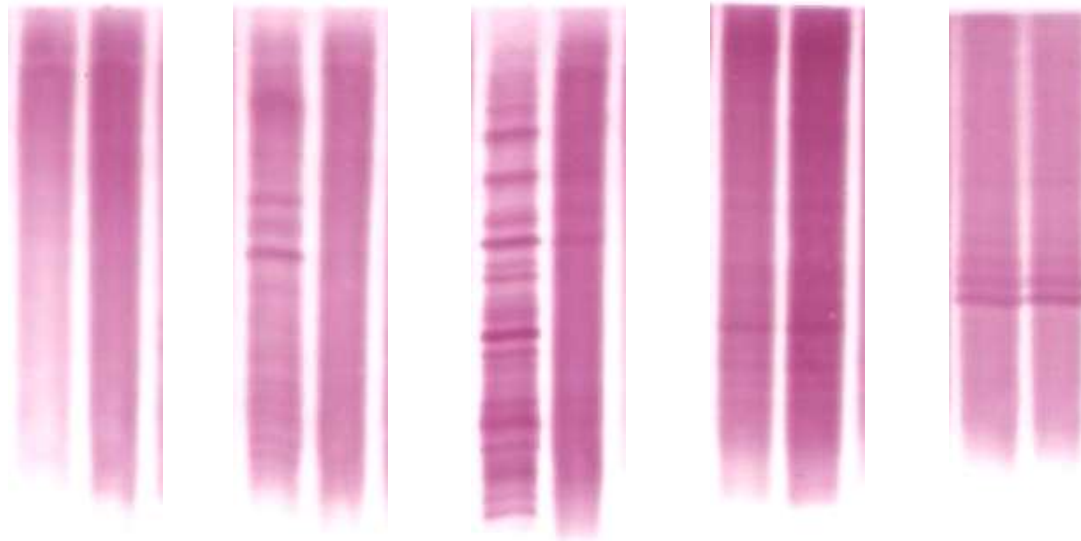


- **Typ 1:** jen „polyklonální“ IgG v likvoru i séru
- **Typ 2:**  $\geq 2$  IgG pásy v likvoru, jen „polyklonální“ IgG v séru
- **Typ 3:** IgG pásy shodné v likvoru i séru + IgG pásy přítomné pouze v likvoru
- **Typ 4:** IgG pásy shodné v likvoru i séru
- **Typ 5:** monoklonální IgG v likvoru i séru

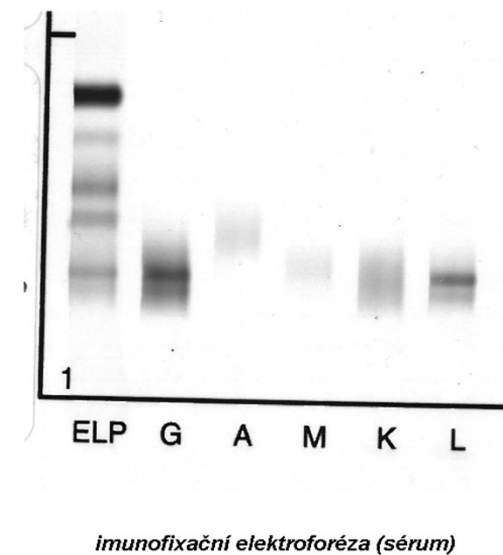
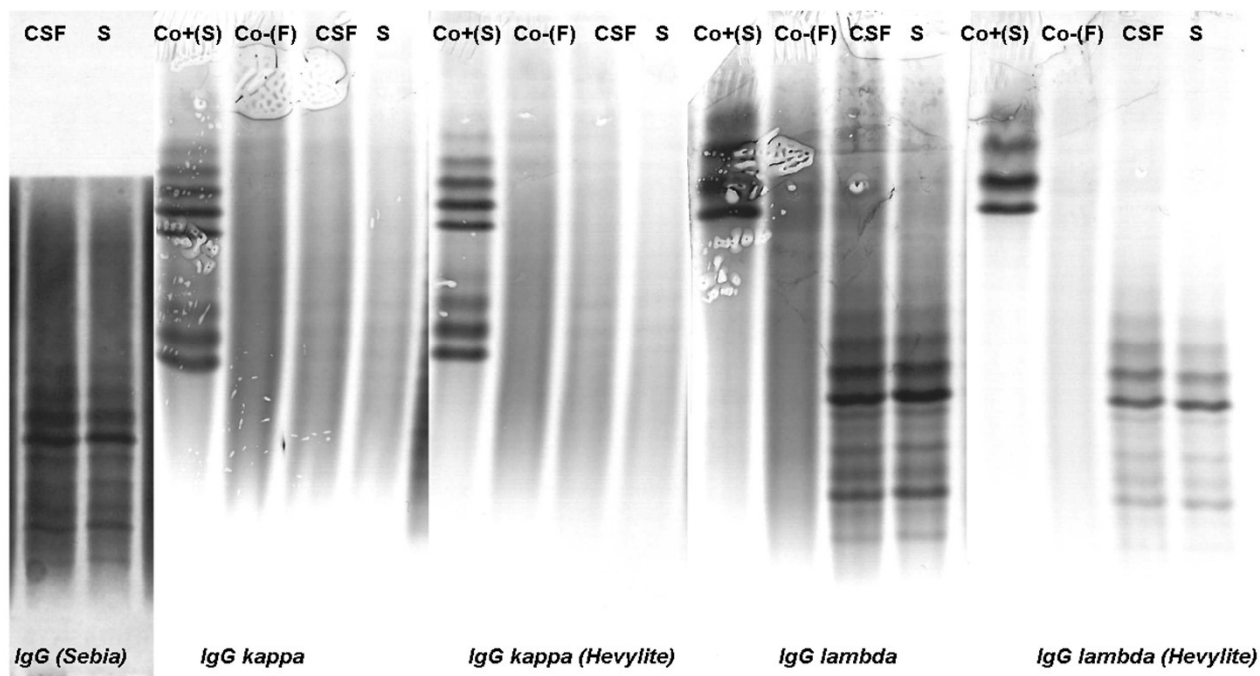
## Oligoklonální IgG - typy IEF nálezu: IEF/IF (Sebia)

typ 1 – typ 2 – typ 3 – typ 4 – typ 5

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



# Vzorek EHK (SEKK 2/2016): Typ 4 nebo Typ 5?

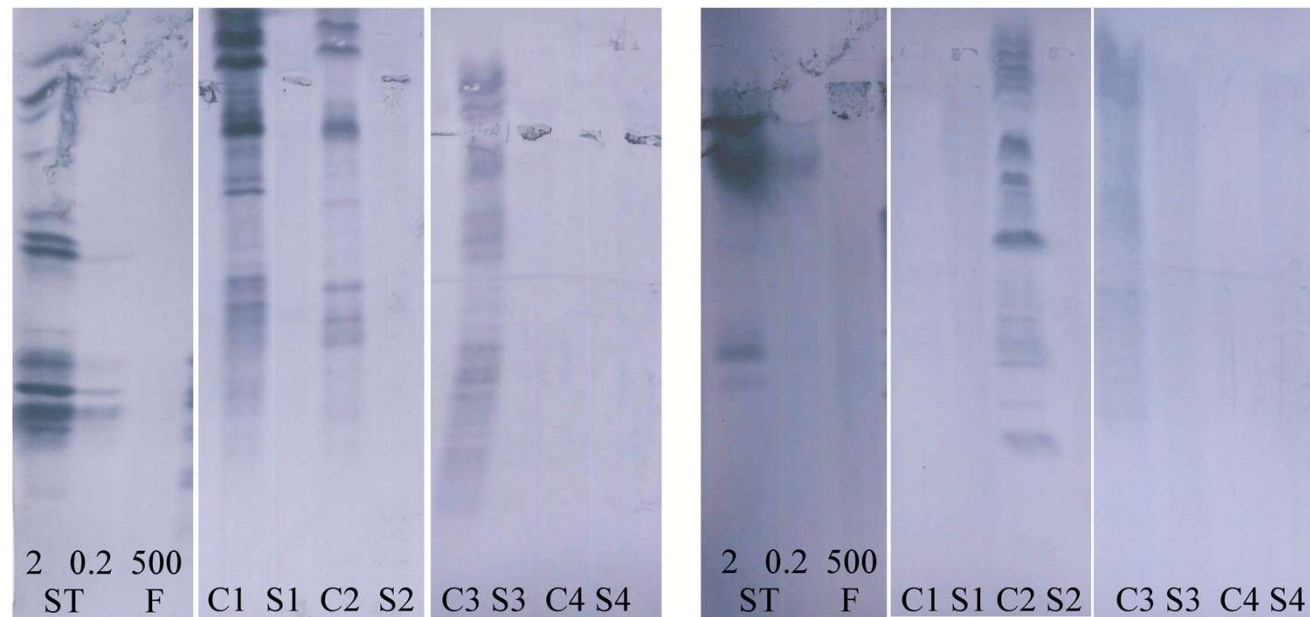






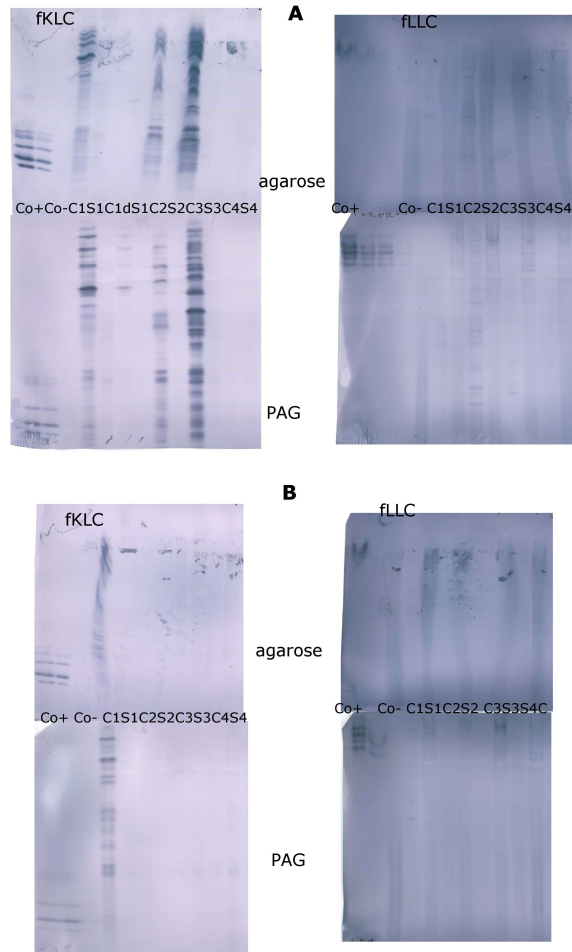
# Oligoklonální volné lehké řetězce (o-fLC)

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



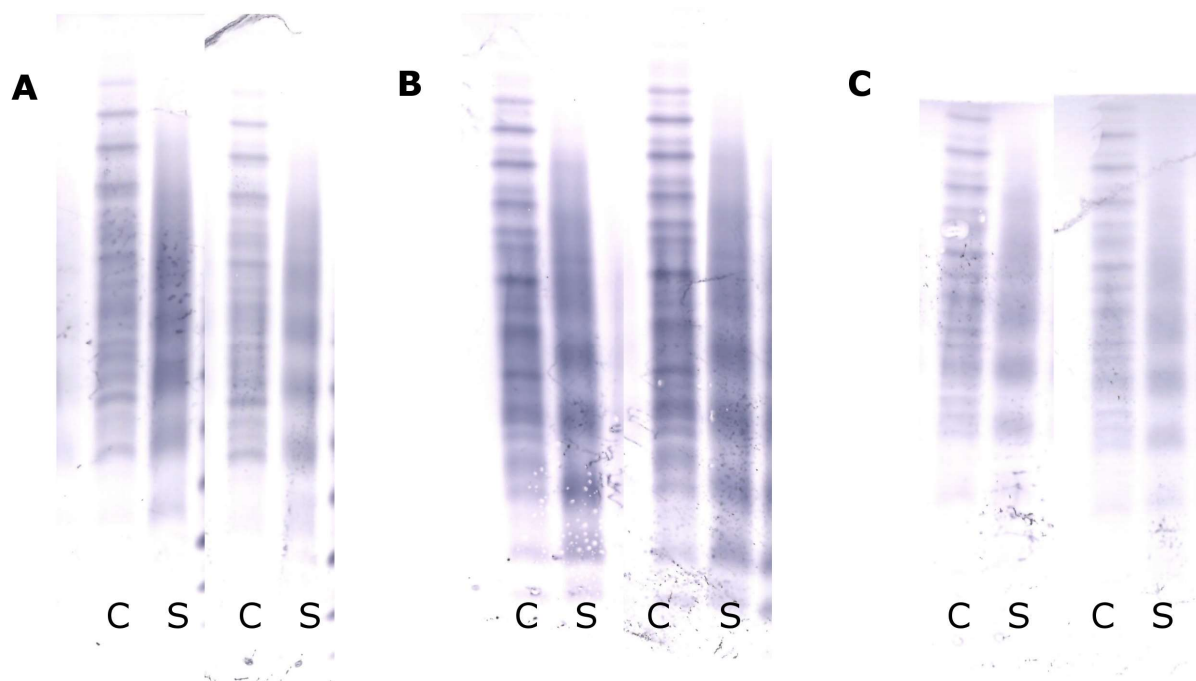
## Oligoklonální volné lehké řetězce (fLC): agarózový vs. polyakrylamidový gel

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



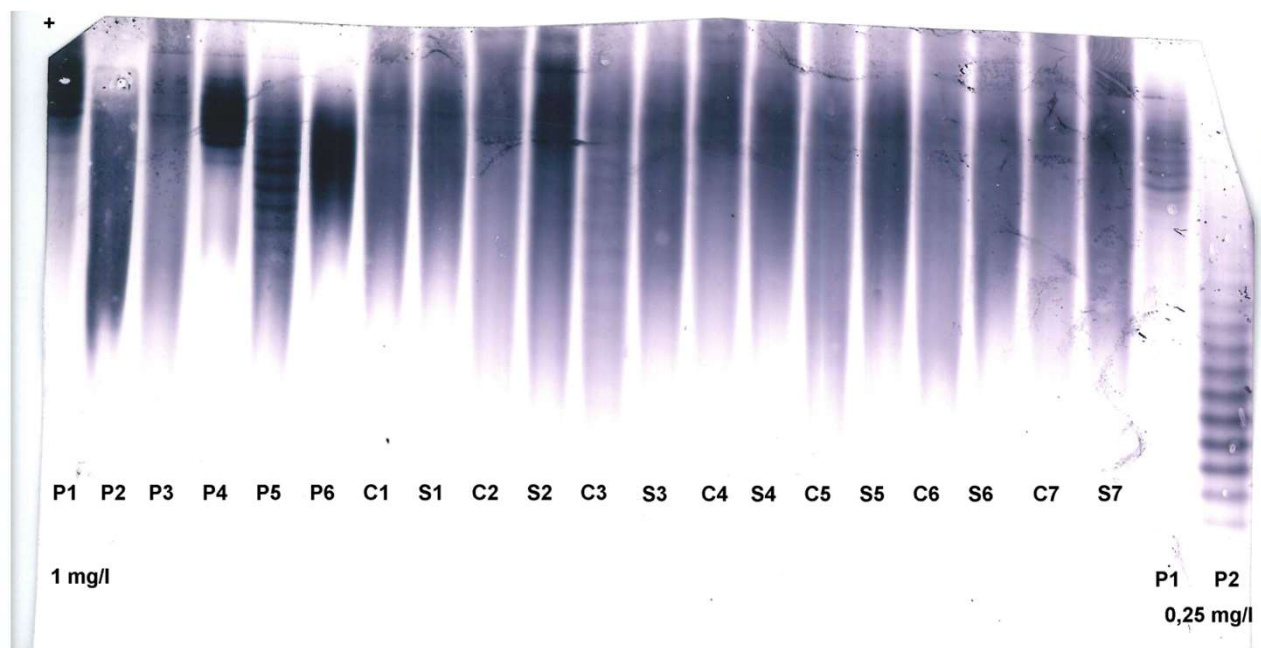
- 48 vzorků
- Výtečná shoda mezi separací v agarózovém a polyakrylamidovém (PAG) gelu ( $\kappa > 0,8$  pro všechna srovnání)
- Počet pásů poněkud vyšší v PAG
- Klinické korelace lepší v PAG (cut-off 6 o-fKLC pásů)
- Výtečná shoda mezi hodnotícími ( $\kappa > 0,9$  pro všechna 4 srovnání)

**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

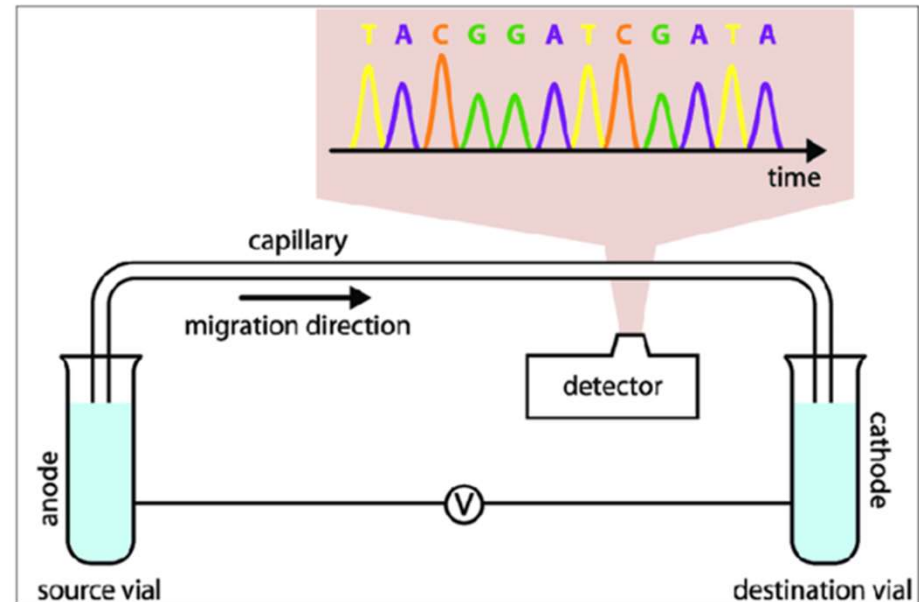
pH gradient 4-8, anodická aplikace, bez prefokusace  
pozitivní nález ve vzorku 3 (pacientka s CIS)



# Kapilární elektroforéza (CE) – princip

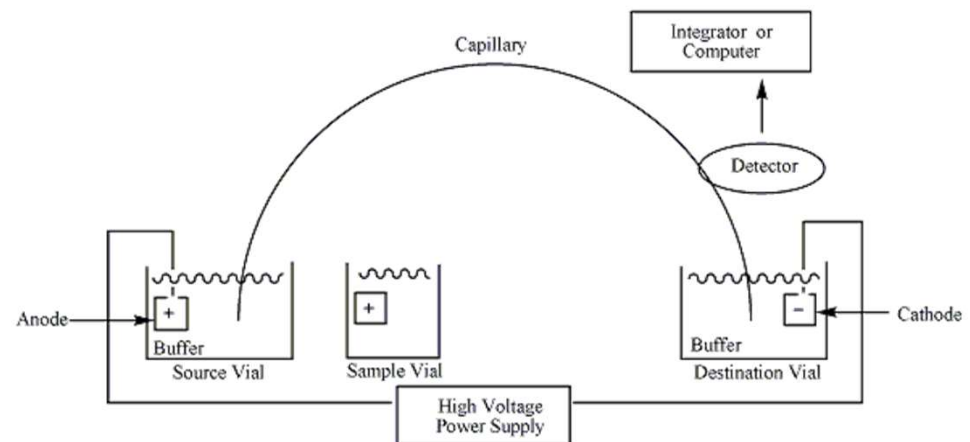
(obrázek převzatý z <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/capillary-electrophoresis-technology.html>)

- Dělení v křemenných kapilárách
- Dvě elektrody
- Dva rezervoáry pro pufry
- 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

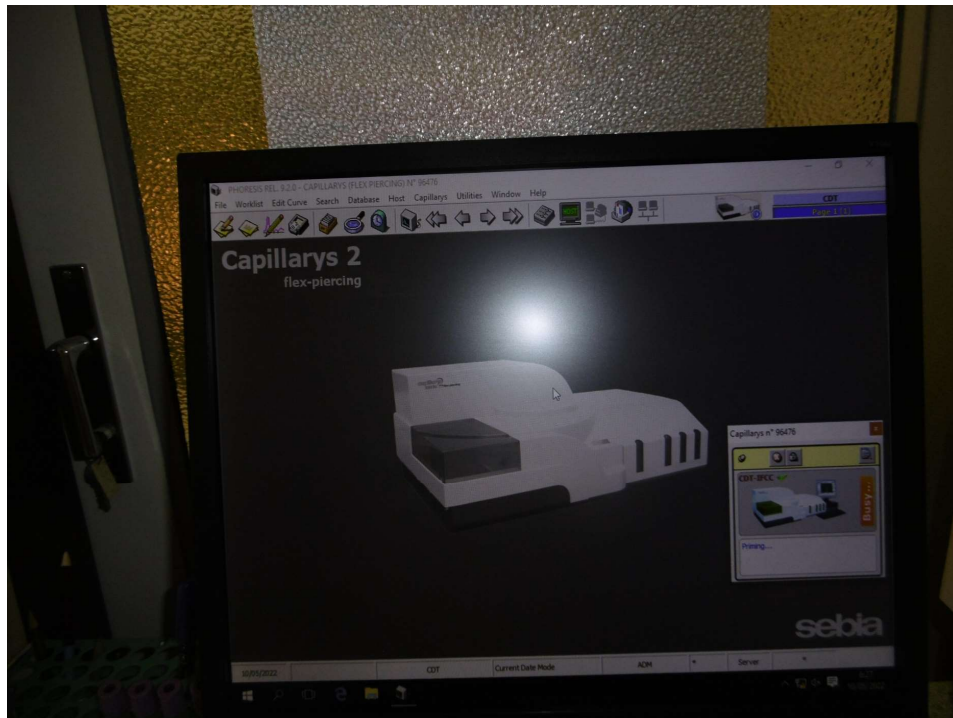


# Kapilární elektroforéza

- 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	Náboj (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

# 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>

DĚKUJI ZA POZORNOST.

