

Elektromigrační metody

Podstata

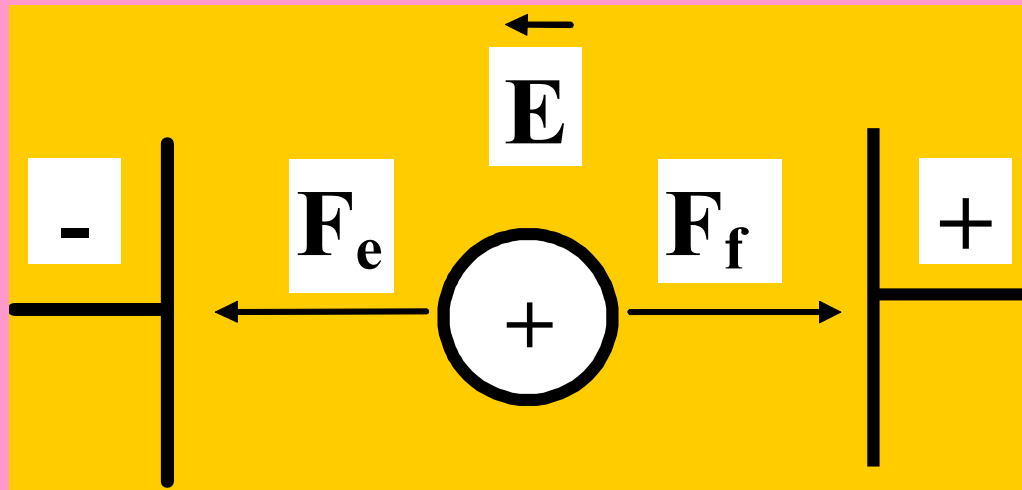
*„Pohyb elektricky nabitých částic
v elektrickém poli“*

Historický přehled

- 1880 - první elektroforetické separace Smirnow, Hardy**
- 1897 - regulační frunkce Kohlrausch**
- 1930 - volná elektroforéza Tiselius**
(1948 Nobelova cena)
- 1962 - izoelektrická fokusace Vesterberg, Svensson**
- 1967 - kapilární elektroforéza v rotující**
1 - 3 mm křemenné kapiláře Hjerten
- 1970 - SDS PAGE Laemmli**
- 1975 - 2D-elektroforéza O Farrell**
- 1976 - isotachoforéza Everaerts, Mikkers**

Teoretické aspekty elektromigračních metod

Mobilita



Elektrická síla F_e

$$F_e = q \times E$$

E = intenzita elektrického pole [V/m]

Q = náboj částice = $z_i \times e$ []

Frikční síla F_f

$$F_f = f \times v$$

v = rychlost částice

f (frikční koeficient) = $6\pi \cdot \eta \cdot r$

Ustálený stav

$$E \times \mathcal{Q} = v \times f$$



$$v = \frac{E \times \mathcal{Q}}{f}$$

mobilita \implies

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{\mathcal{Q}}{f}$$

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

Vliv velikosti molekuly na mobilitu

$$\mu = \frac{Q}{f}$$

$$\mu = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

$$\frac{1}{r} \approx M_r^{-1/3}$$

η - viskozita prostředí

r – poloměr částice

Vliv iontové síly na mobilitu

$$\mu = u_0 - (0.23|\mu_0 z z_c| + 31.3 \times 10^{-9} |z|) \times \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}$$

z = náboj iontu

z_c = náboj protiiontu

I – iontová síla

Vliv teploty na mobilitu

$$\mu_T = \mu_{T_0} \times [1 + 0.02 \times (T - T_0)]$$

T_0 = standardní teplota

T = pracovní teplota

Sekundární jevy

- **Jouleovo teplo**
- **Elektroosmóza**

Jouleovo teplo

$$P = \frac{E \times S}{\kappa} = \frac{i^2 S}{\kappa}$$

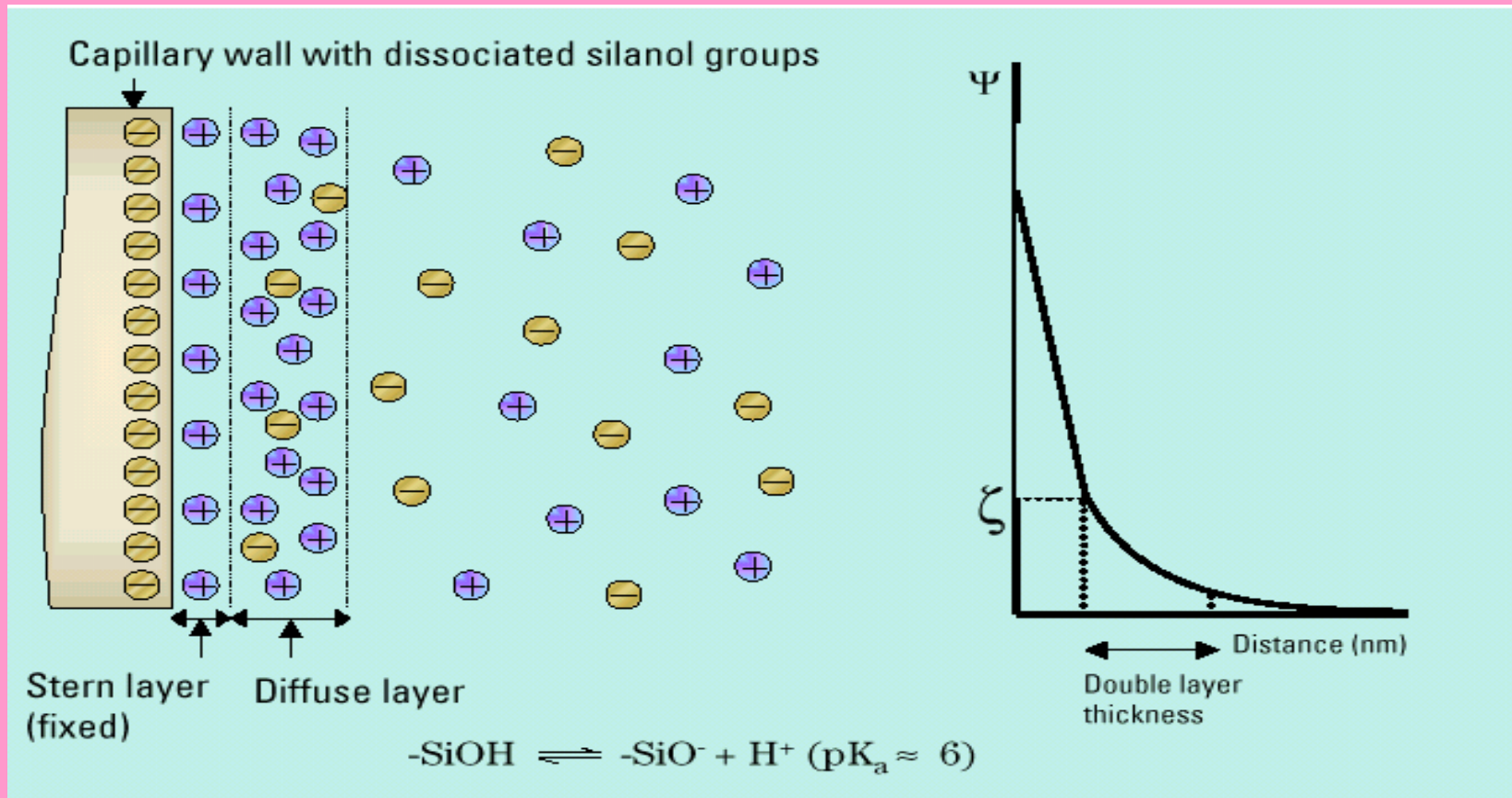
P = výkon [W.m⁻³]

S = průřez [m²]

κ = vodivost [Ω^{-1} .m⁻¹]

i = elektrický proud [A]

Elektroosmotický tok



Elektroosmotický tok

$$\xi = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\varepsilon}$$

ξ = potenciál Helmholtzovy dvojvrstvy

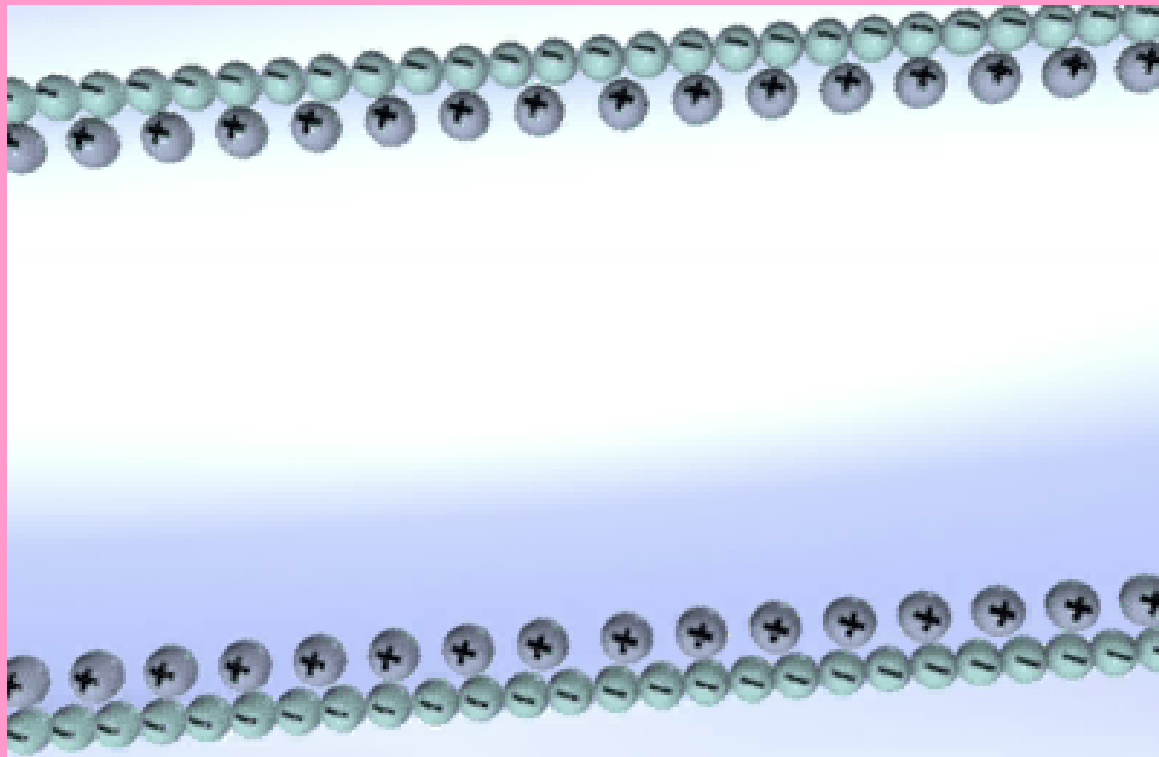
η = viskozita

ε = dielektrická konstanta

μ_{eo} = elektroosmotická mobilita

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \times E \xi$$

Původ elektroosmotického toku



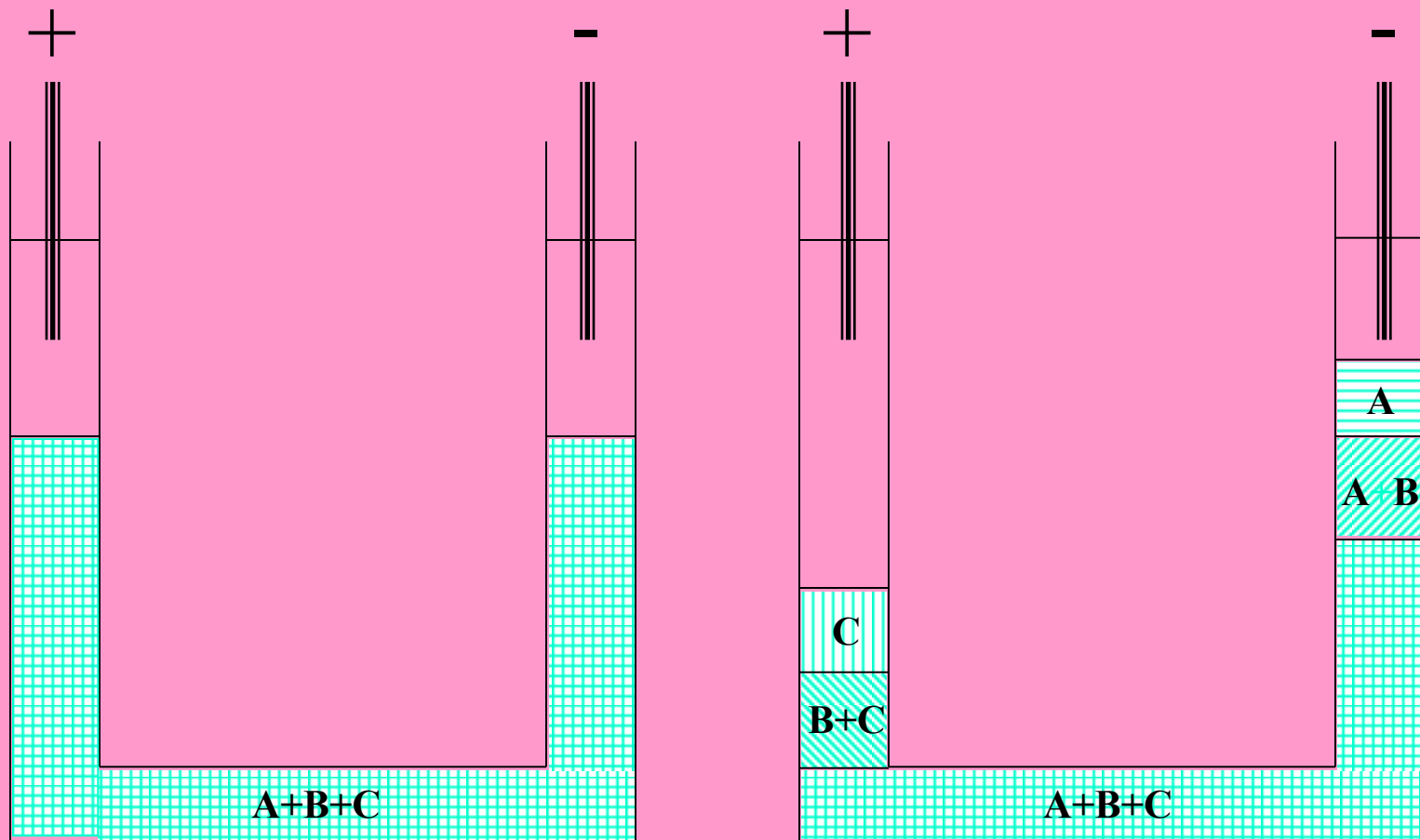
Elektroforéza

*„Dělení nabitých částic na základě
rozdílných elektroforetických
mobilit“*

Elektroforéza

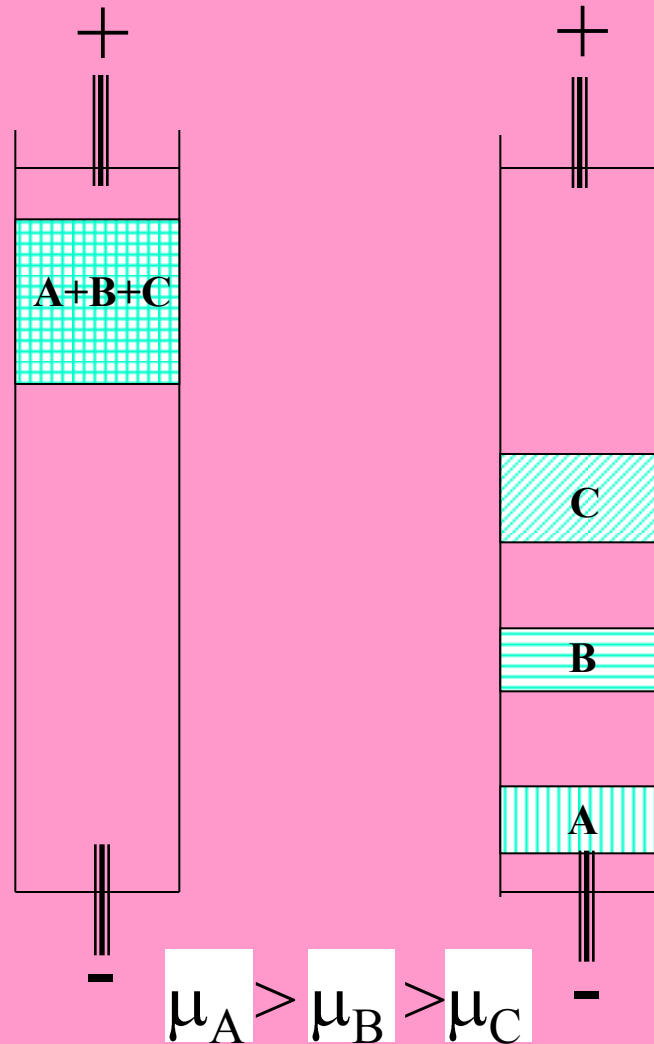
- Volná
- Zónová

Volná elektroforéza



$$\mu_A > \mu_B > \mu_C$$

Zónová elektroforéza



Stabilizace

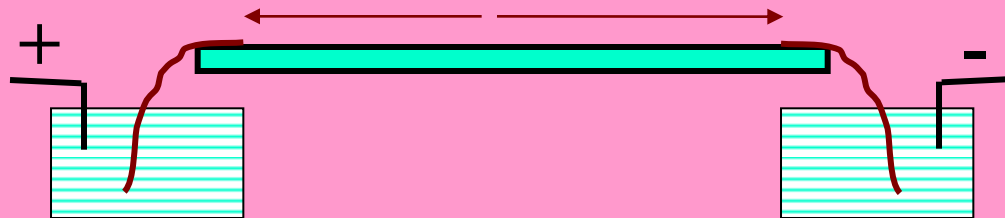
- Rotací
- Gradienty hustoty
- Porézními medii
- Kapilárou

Požadavky na porézní media

- Homogenita
- Inertnost - nespecifické interakce
 - nulový EOF
- Reprodukovatelná a snadná příprava
- Mechanická pevnost
- transparentnost

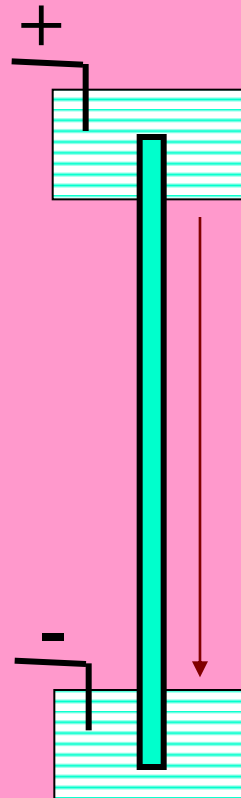
Upořádání

Horizontální



Upořádání

Vertikální



Chromatografický papír

Složení – celulosa

- Nehomogenní
- Přítomnost ionogenních skupin
- Špatně se chladí – pálí se

Použití : téměř už se nepoužívá

Agar a agarosa

Složení – kopolymer galaktosy a anhydrogalaktosy

- Přítomnost ionogenních skupin – silný EOF
- + Velké pory
- + Snadná příprava

Použití : imunoelektroforetické metody
elektroforéza NK

Acetát celulosy

Složení – acetát celulosy

- + Komerčně dostupný
- + Dobré mechanické vlastnosti

Použití : imunoelektroforetické metody
klinické aplikace

Škrob

Složení – hydrolyzovaný škrob

- + poprvé se uplatňuje efekt molekulového síta
- Špatné mechanické vlastnosti
- Komplikovaná a nereprodukovatelná příprava
- Není transparentní

Použití : izoenzymová analýza

Sypané vrstvy

Složení – Sephadex – zesíťovaný dextran

+ uplatňuje efekt molekulového síta

Použití : preparativní

Polyakrylamid

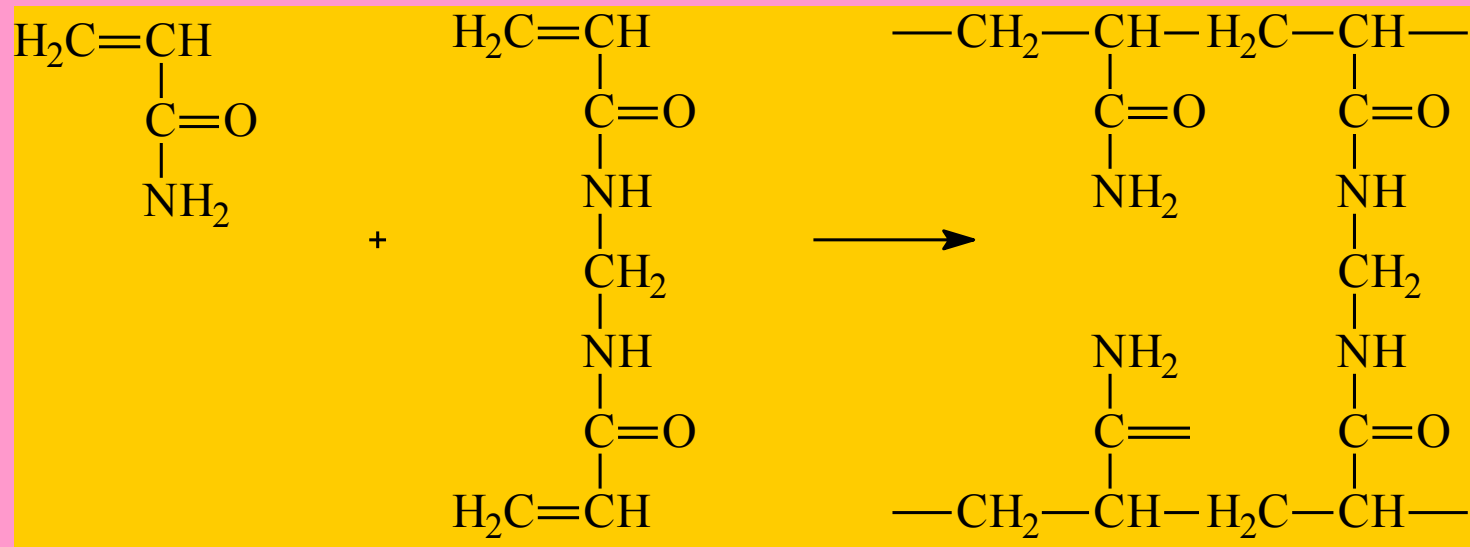
Složení – kopolymer akrylamidu a
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

- Monomery jsou neurotoxiny !!!!!!!

Použití : analýza bílkovin

Polyakrylamid



Polyakrylamid - příprava

Radikálová polymerace

- Katalyzátor – tetramethylethyldiamin
TEMED
- Iniciátor - chemicky – $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- fotochemicky – ribloflavin + UV

Polyakrylamid - složení

$$T = \frac{a + b}{m} \times 100\%$$

$$C = \frac{b}{a + b} \times 100\%$$

a – akrylamid (g)

b – methylenbisakrylamid (g)

m – objem (ml)

Fergussonova rovnice

PAGE není pouze pasivním nosičem, ale podílí se na separaci efektem molekulového síta.

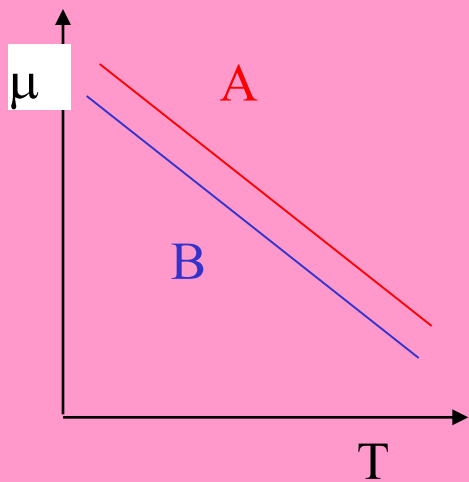
$$\log \mu = \log \mu_0 + K_r \left[\frac{r}{r_0} \right]$$

μ - mobilita

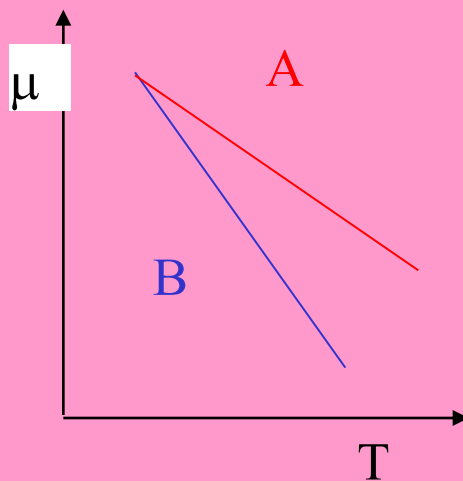
μ_0 - mobilita při limitním zředění

K_r – retardační koeficient

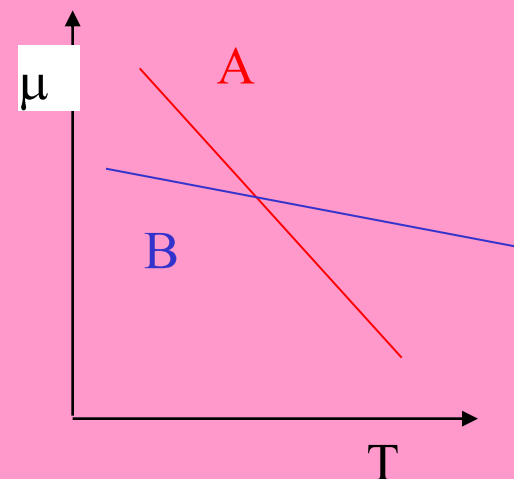
Uplatnění Fergussonovy rovnice



$$\begin{aligned} Mr_A &= Mr_B \\ pI_A &\neq pI_B \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} Mr_A &\neq Mr_B \\ pI_A &= pI_B \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} Mr_A &\neq Mr_B \\ pI_A &\neq pI_B \end{aligned}$$

Provedení PAGE

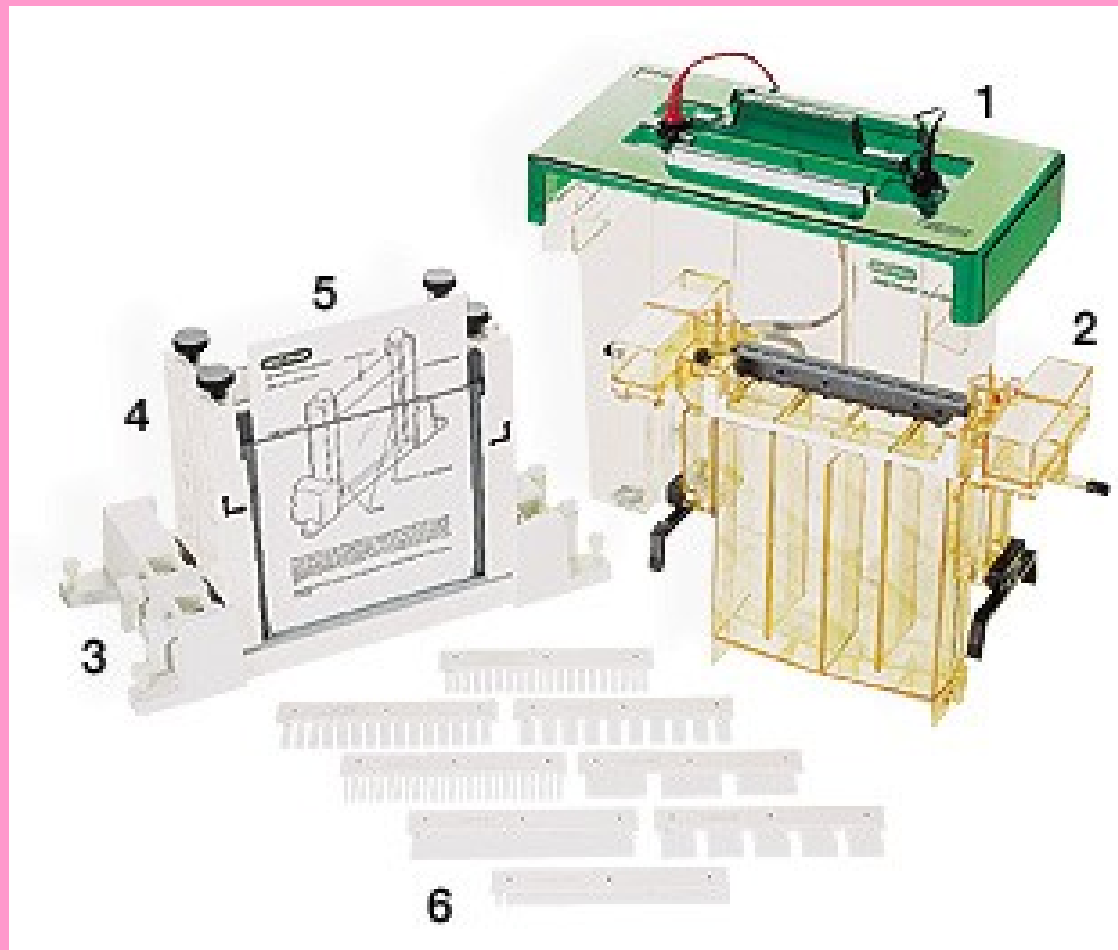
vertikální x horizontální

deskové x trubičkové

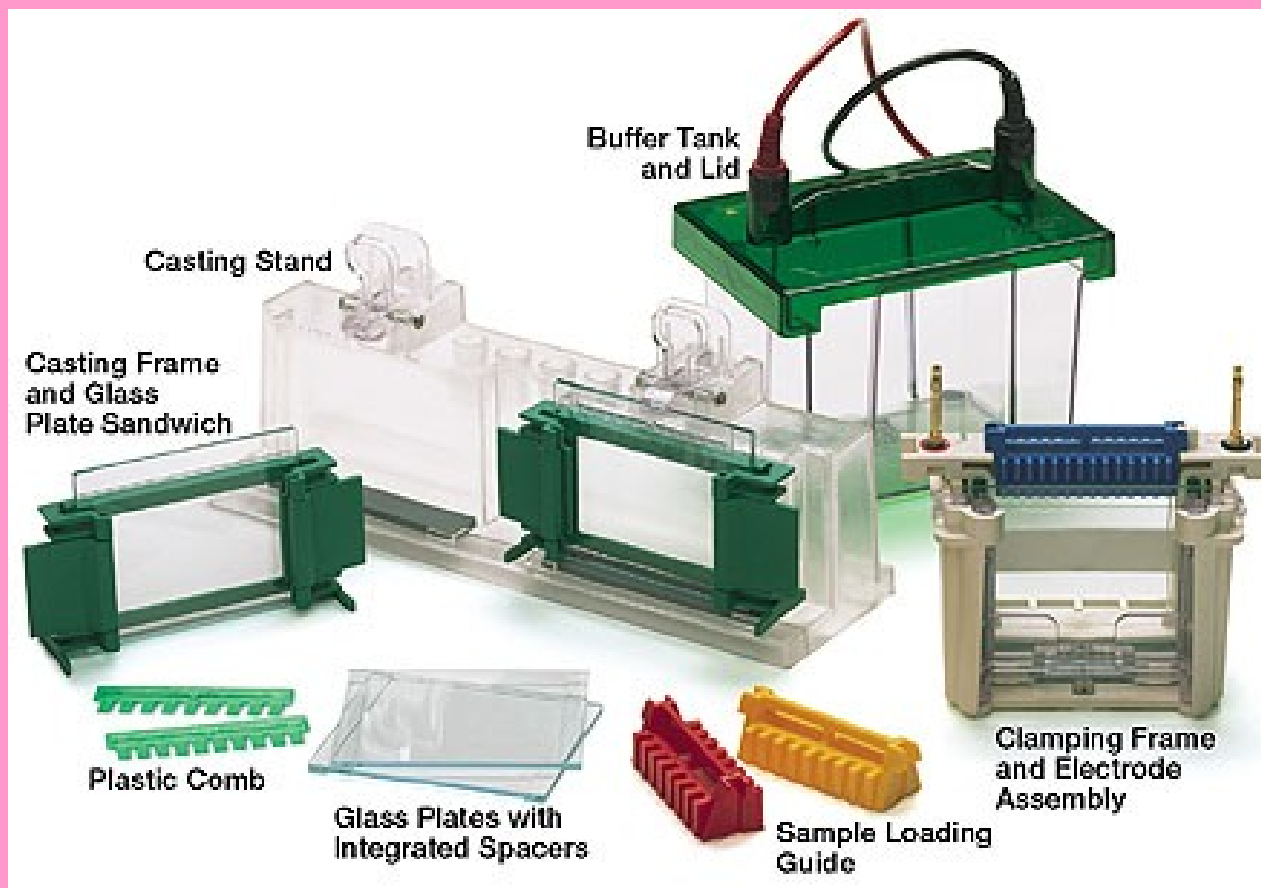
homogenní x gradientové

kontinuální x diskontinuální

Provedení PAGE

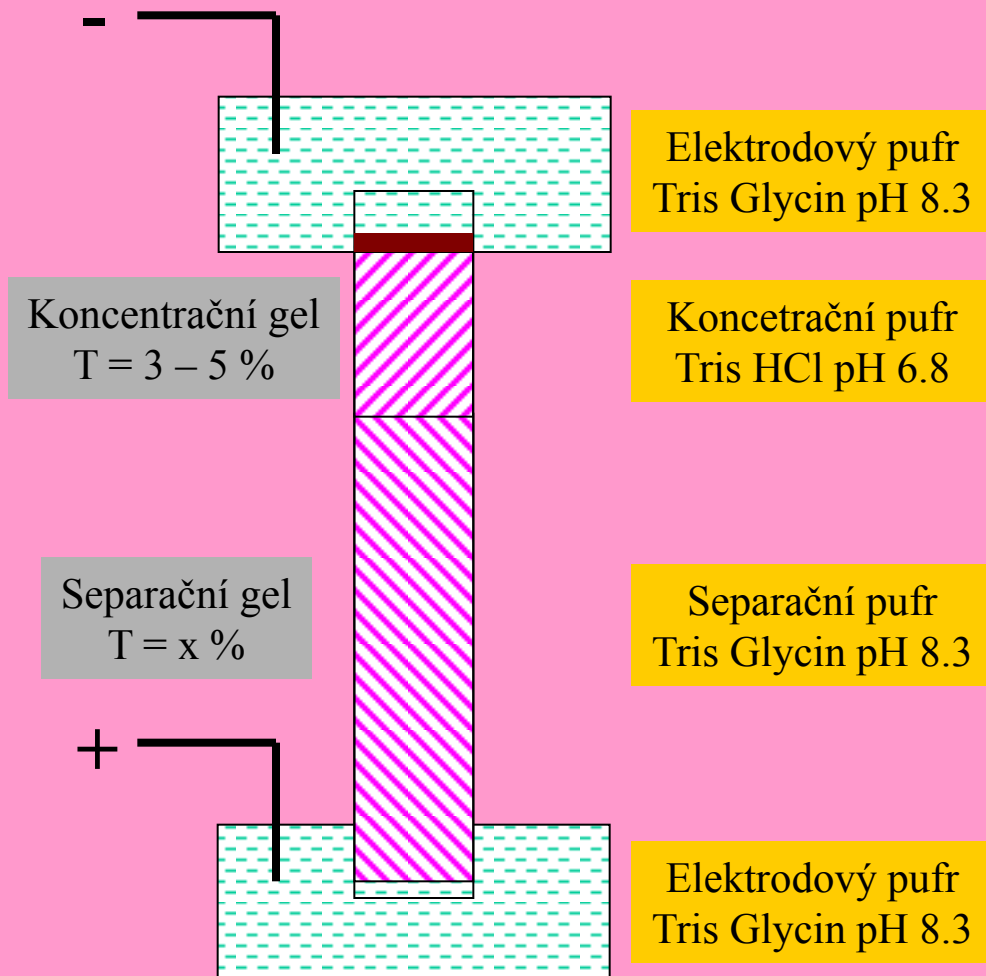


Provedení PAGE

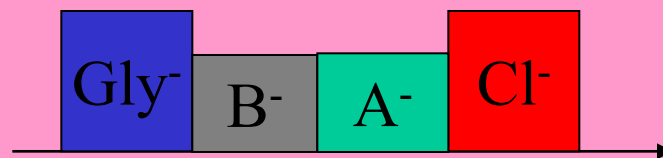


Diskontinuální PAGE

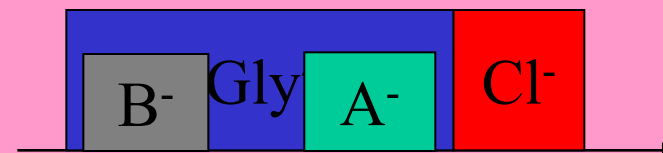
Orstein, Davis



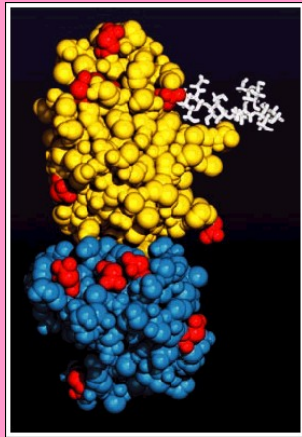
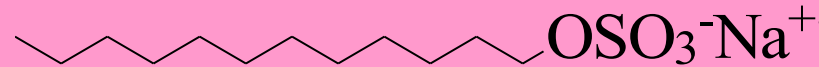
Koncentrační gel
Izotachoforéza



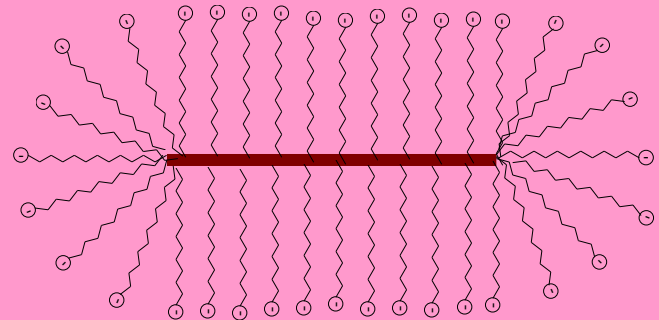
Separační gel
Zónová elektroforéza



SDS PAGE

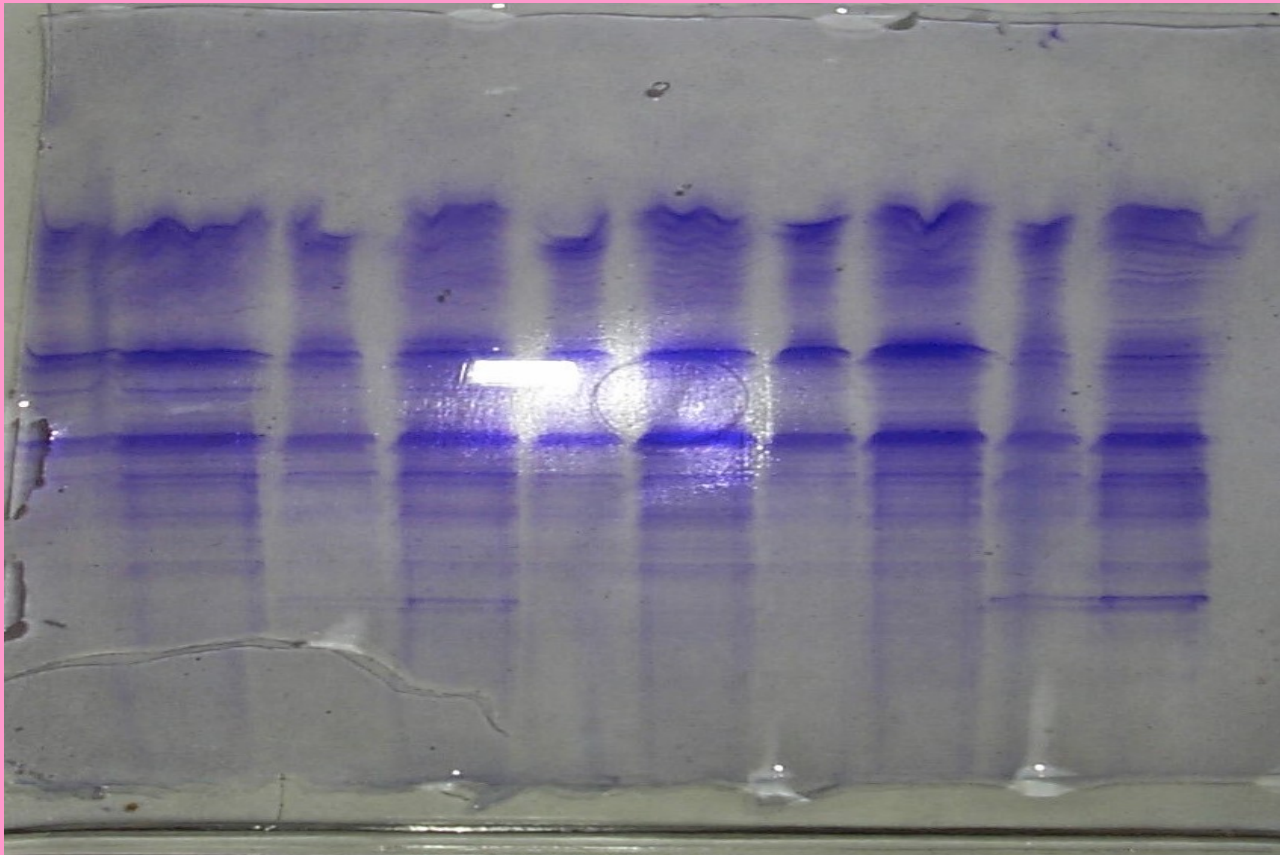


+

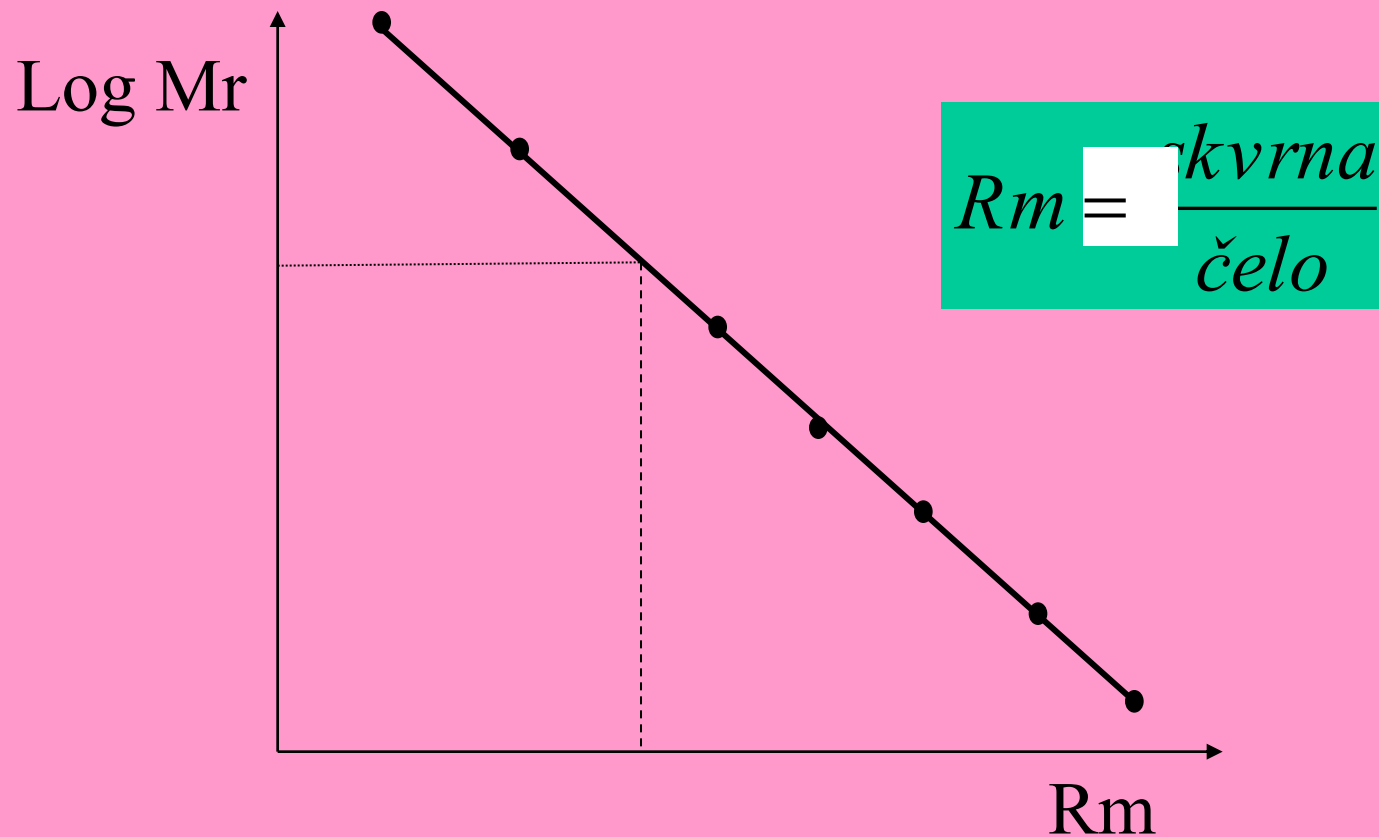


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

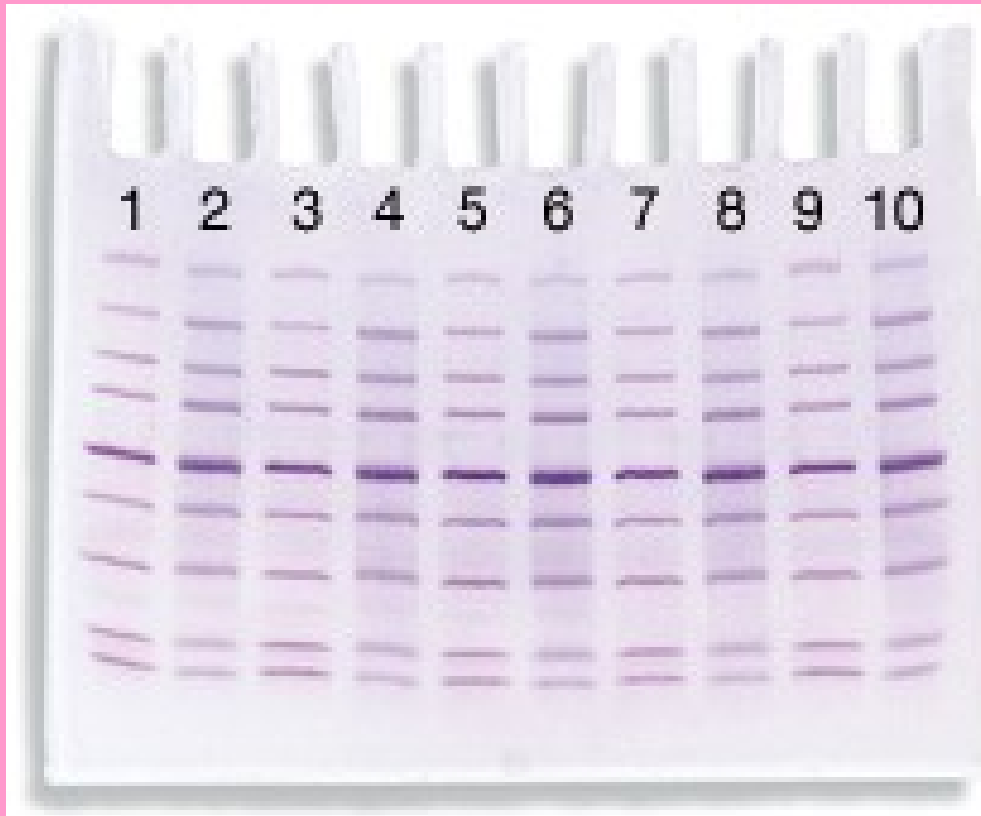
SDS PAGE



Stanovení Mr pomocí SDS PAGE

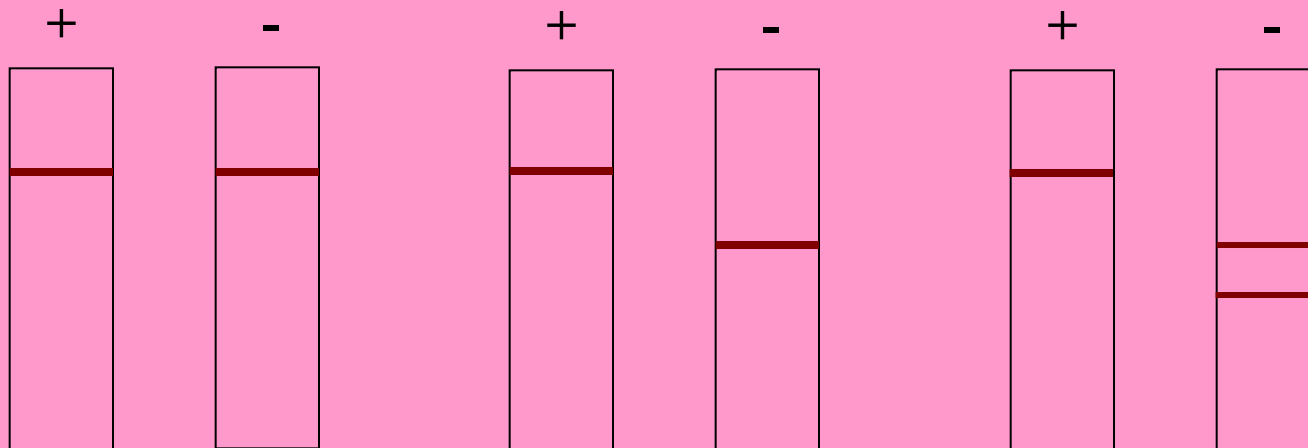


Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy

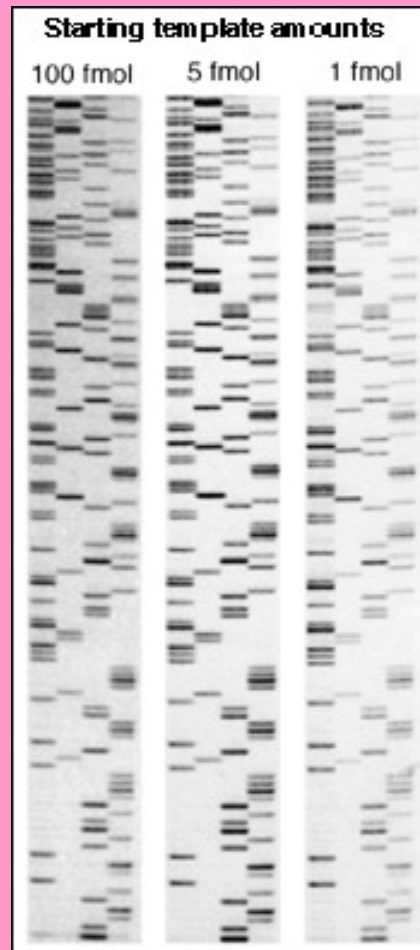


Použití SDS PAGE

- Stanovení M_r
- Analýza komplexních směsí
- Sledování purifikace bílkovin
- Stanovení podjednotkového složení

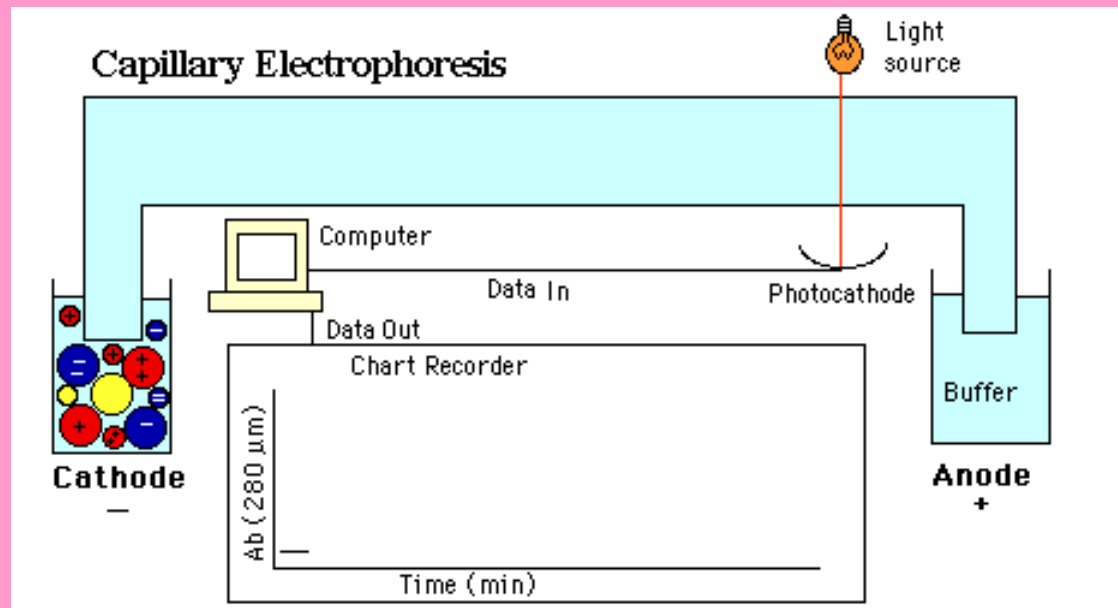


PAGE - sekvenace DNA

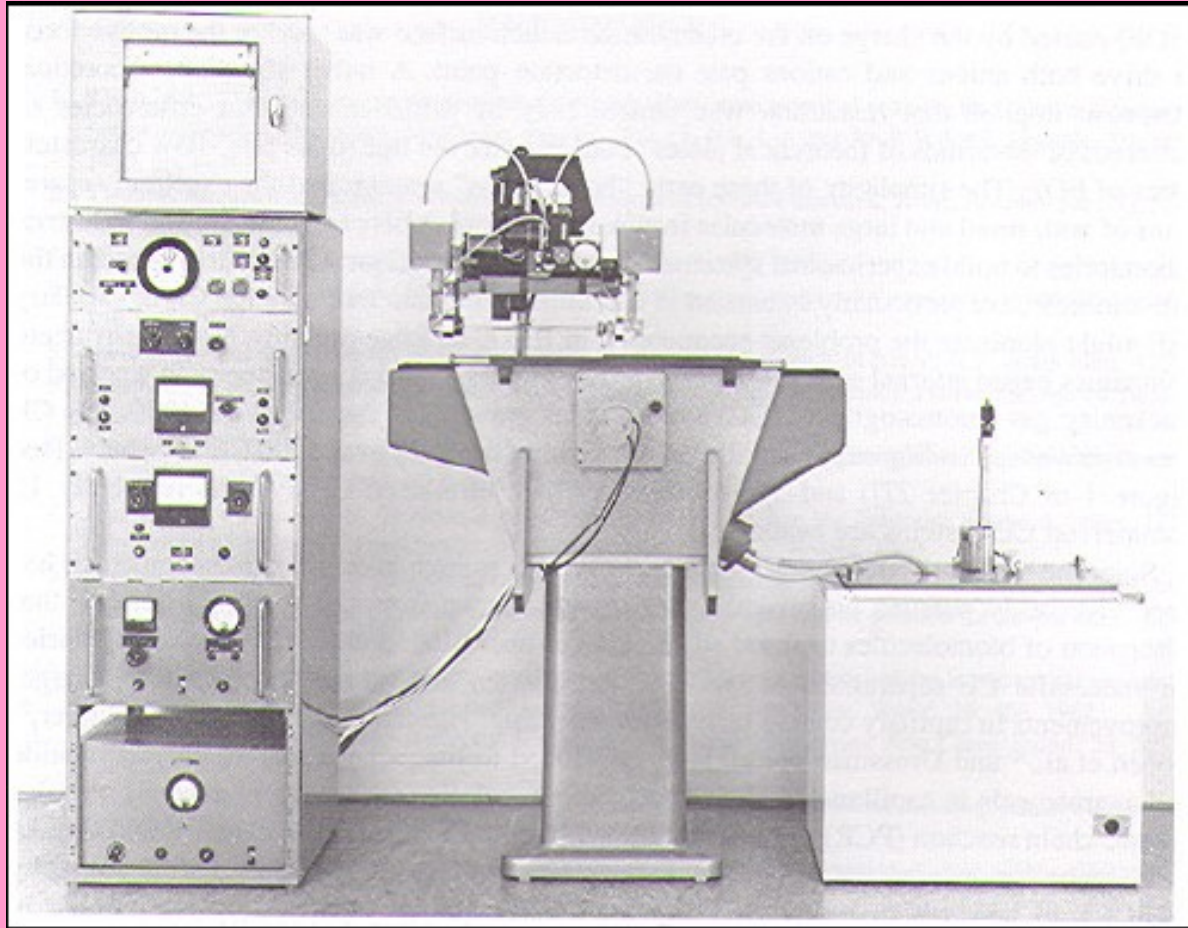


Kapilární zónová elektroforéza

CZE



Hjerten 1967



1981 - Jorgenson Lukacsová



CLIN. CHEM. 27/9, 1551-1553 (1981)

Free-Zone Electrophoresis in Glass Capillaries

James W. Jorgenson and Kryn DeArman Lukacs

A simple theory of zone electrophoresis in open-tubular capillaries is developed. According to this theory, to achieve the highest resolution of zones, tubes with as small an inside diameter as possible should be used in combination with as high an applied voltage as feasible. To test this approach, we performed electrophoresis in glass capillaries with an internal diameter of $75\ \mu\text{m}$ and a length of 100 cm. A special fluorescence detector was used to detect fluorescent zones while they migrated inside the capillary. With the application of 30 kV potentials to this system, rapid and efficient separations of amino acids, peptides, and urinary amines were demonstrated. In all cases fluorescent derivatives were necessary for detection. Preliminary results are encouraging, and with further development of sensitive detection devices, applications in clinical analyses may be feasible.

small diameter simultaneously facilitates heat transfer as well as stabilizes the medium. Regardless of the diameter, some radial temperature gradient will persist. However, this temperature gradient is undesirable only to the extent that a significant fraction of the solute molecules making up a zone spend longer than average times migrating within "cool" or "hot" regions of the tube radius. Here a more subtle effect of reduced tube diameters comes into play. If the diameter is small enough that solute molecules diffuse back and forth across the tube many times during their migration, then the probability that a significant fraction of molecules will spend excessive amounts of time in any one portion of the tube radius is greatly reduced. Thus the solute molecules have an excellent chance of traveling throughout all portions of the tube radius, and any variations in migration velocity will tend to average out.

To summarize, the possible advantages of performing zone electrophoresis in open tubes of small diameter are:

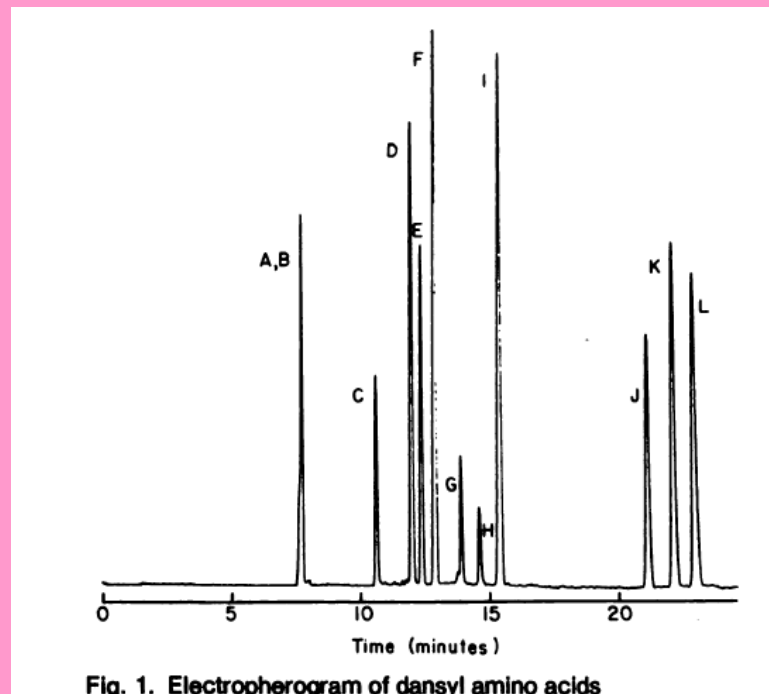


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

Beckman 1987

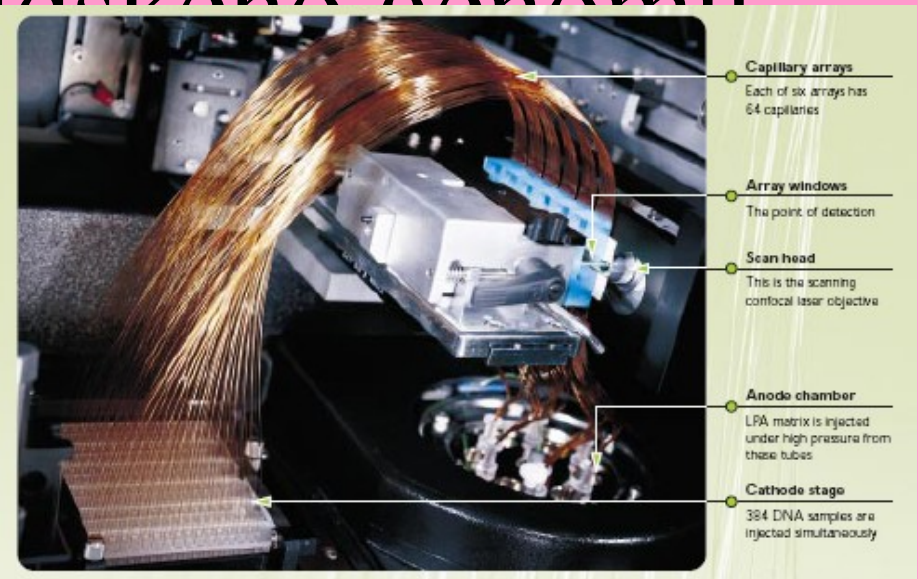


2002 Projekt lidského genomu

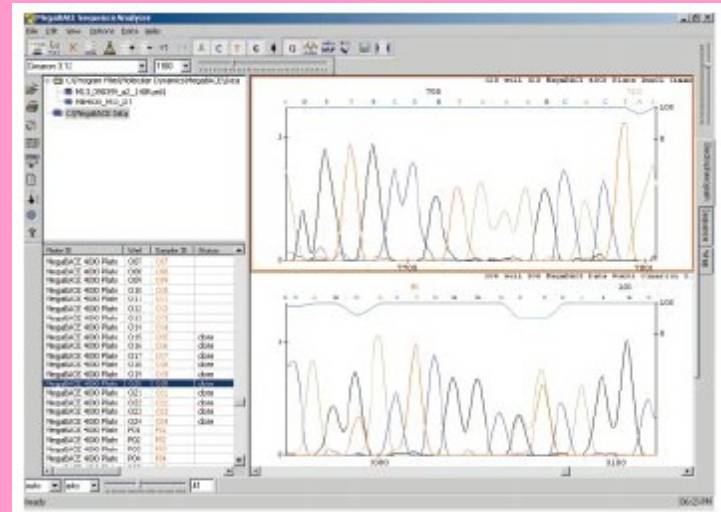


384
MEASURE THE DIFFERENCE

- Four times the throughput
- Lowest sequencing cost per base
- More genomes per week
- Better efficiencies: less labor and less space



- Capillary arrays**
Each of six arrays has 64 capillaries
- Array windows**
The point of detection
- Scan head**
This is the scanning confocal laser objective
- Anode chamber**
LPA matrix is injected under high pressure from these tubes
- Cathode stage**
384 DNA samples are injected simultaneously



Proč CE a biochemie ?

Výhody CE

- Aplikační diverzita

nabité i neutrální látky

nízkomolekulární i vysokomolekulární látky

chirální i achirální látky

bakterie i viry

Výhody CE

- Aplikační diverzita
- Jednoduchá instrumentace

Výhody CE

- Aplikační diverzita
- Jednoduchá instrumentace



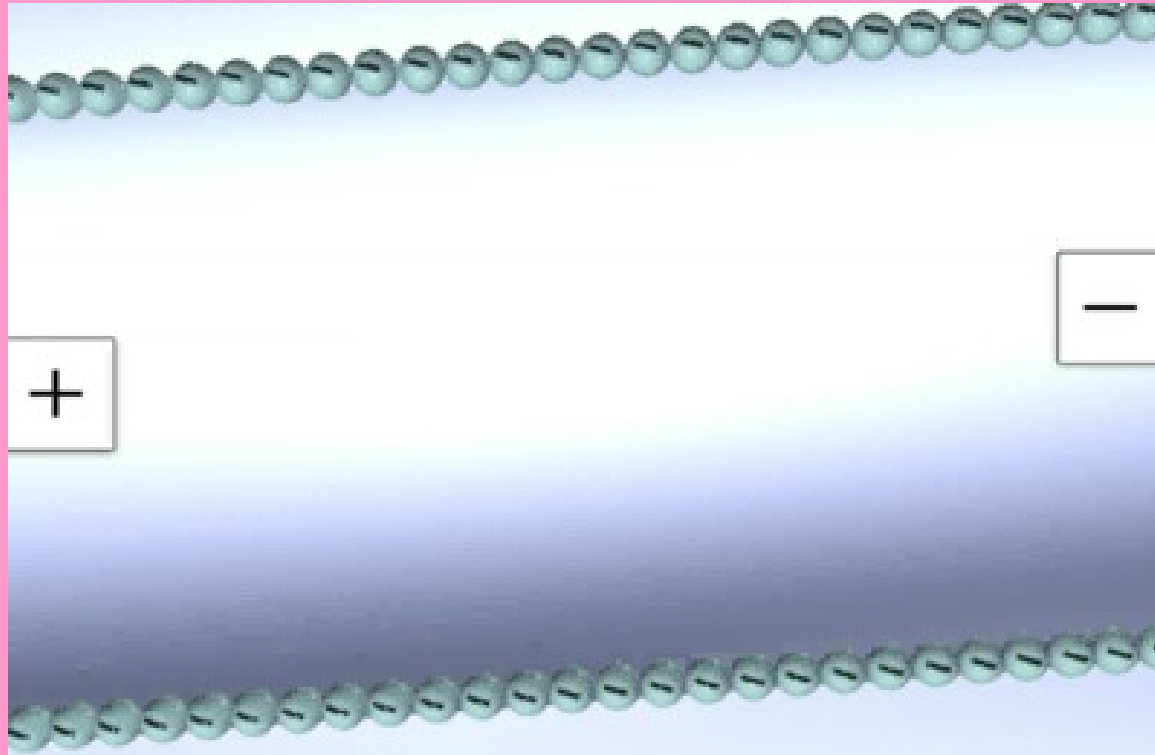
Výhody CE

- Aplikační diverzita
- Jednoduchá instrumentace
- Vysoké rozlišení a účinnost separací
- Malá spotřeba vzorku
- Rychlost analýzy
- Malá spotřeba chemikálií a malé množství odpadů

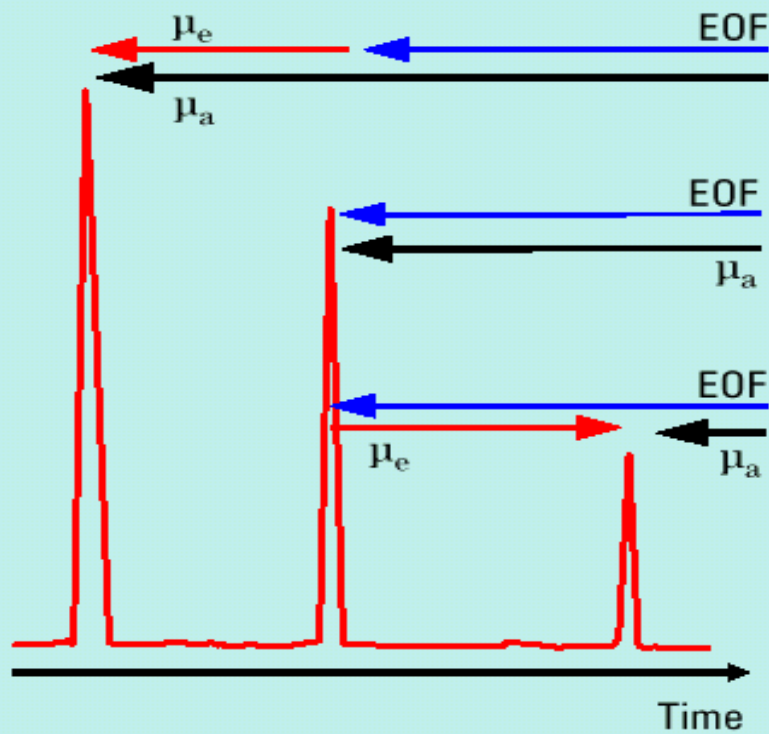
Módy CZE

Use CE Mode...	For Analysis of...
Capillary zone electrophoresis (CZE)	Ions, etc.
Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)	Neutral and ionic analytes
Chiral capillary electrophoresis (CCE)	Chiral molecules
Capillary electrochromatography (CEC)	Small molecules
Capillary gel electrophoresis (CGE/SDS-PAGE)	DNA/RNA size/protein MW
Capillary isoelectric focussing (CIEF)	Protein/peptide isoelectric point
Capillary isotachopheresis (CITP)	Ions

Kapilární zónová elektroforéza ve volné kapiláře



Výsledná mobilita částic při CZE



cation — positive μ_e

neutral — zero μ_e

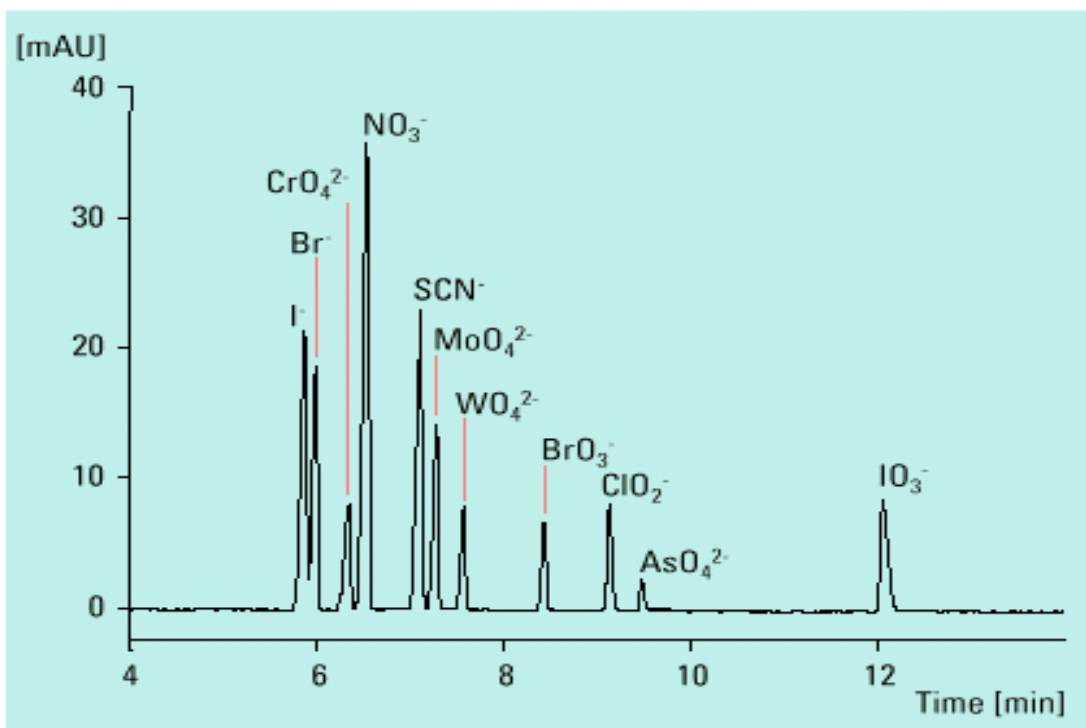
anion — negative μ_e

$$\mu_a = \mu_{\text{EOF}} + \mu_e$$

μ_a = apparent mobility

μ_e = effective mobility

Separace aniontů pomocí CZE



Sample

100 mg/l each analyte

Buffer

20 mM phosphate, pH 8.0

Capillary

DB WAX (J&W)

l = 56 cm

L = 64.5 cm

id = 50 μm

Injection

200 mbar · s

Temperature

20 °C

Electric Field

230 V/cm, reversed polarity

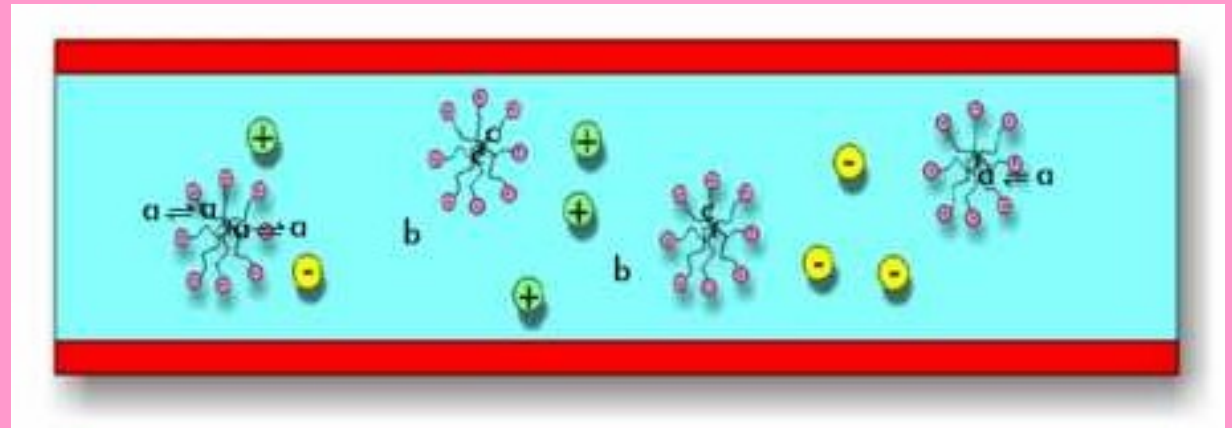
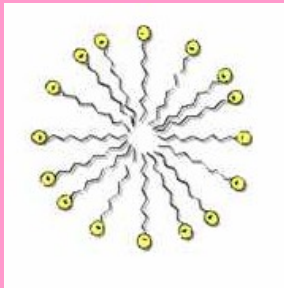
Detection

Signal 200, 10 nm

Reference 450, 80 nm

Princip MEKC

Micela

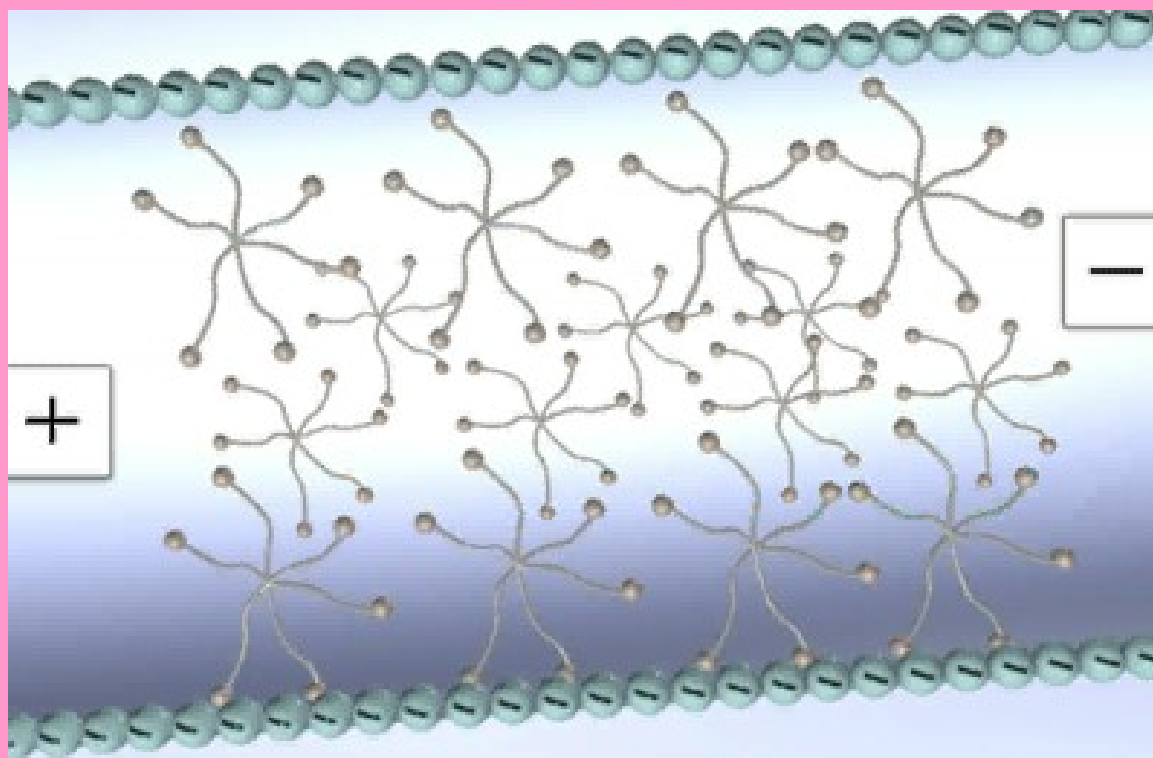


a – střed – rozpustná v obou

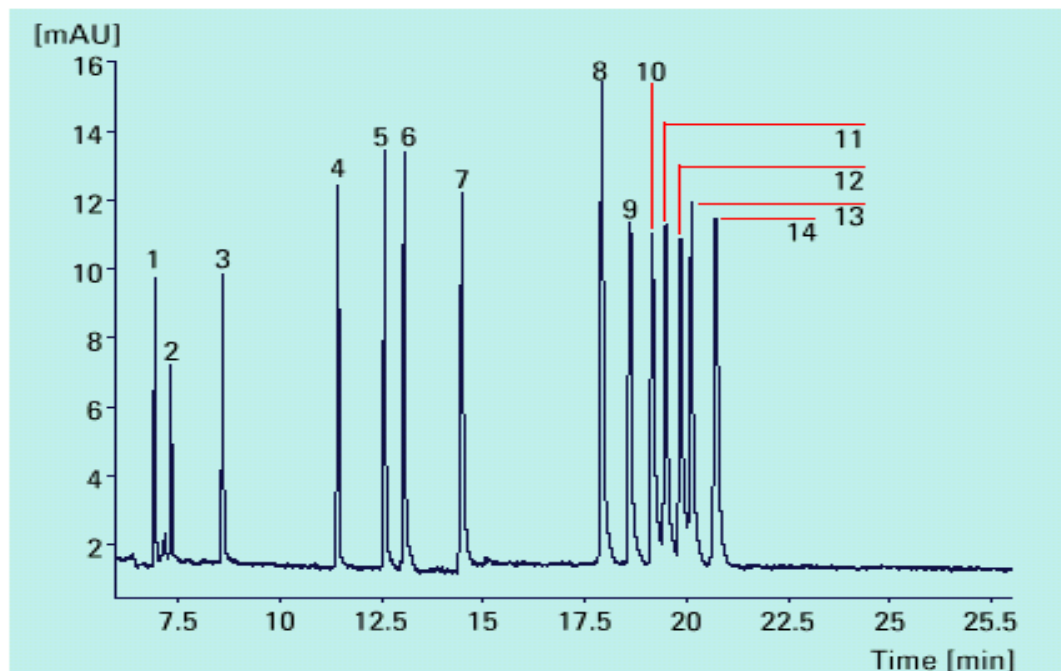
b – silně hydrofilní – nerozpustná v
micelle

c – silně hydrofóbní – nerozpustná ve
vodné fázi

Micelární elektrokinetická chromatografie



Separace fenolů a alkoholů pomocí MEKC



- | | |
|---|----------------------------------|
| 1 | 4-hydroxybenzyl alcohol (18 ppm) |
| 2 | 3-hydroxybenzyl alcohol (9 ppm) |
| 3 | Phenol (26 ppm) |
| 4 | 2-hydroxybenzyl alcohol (18 ppm) |
| 5 | m-cresol (19 ppm) |

- | | |
|---|-------------------------|
| 6 | p-cresol (32 ppm) |
| 7 | 2-chlorophenol (22 ppm) |
| 8 | 2,6-xylenol (36 ppm) |
| 9 | o-ethylphenol (23 ppm) |

- | | |
|----|----------------------|
| 10 | 2,3-xylenol (20 ppm) |
| 11 | 2,5-xylenol (22 ppm) |
| 12 | 3,4-xylenol (23 ppm) |
| 13 | 3,5-xylenol (19 ppm) |
| 14 | 2,4-xylenol (27 ppm) |

Buffer

90 mM borate, pH 8.6, 70 mM SD

Capillary

PVA-coated (no EOF)

l = 56 cm

L = 64.5 cm

id = 50 μ m BF 3

Injection

20 mbar \cdot s

Electric Field

465 V/cm

Temperature

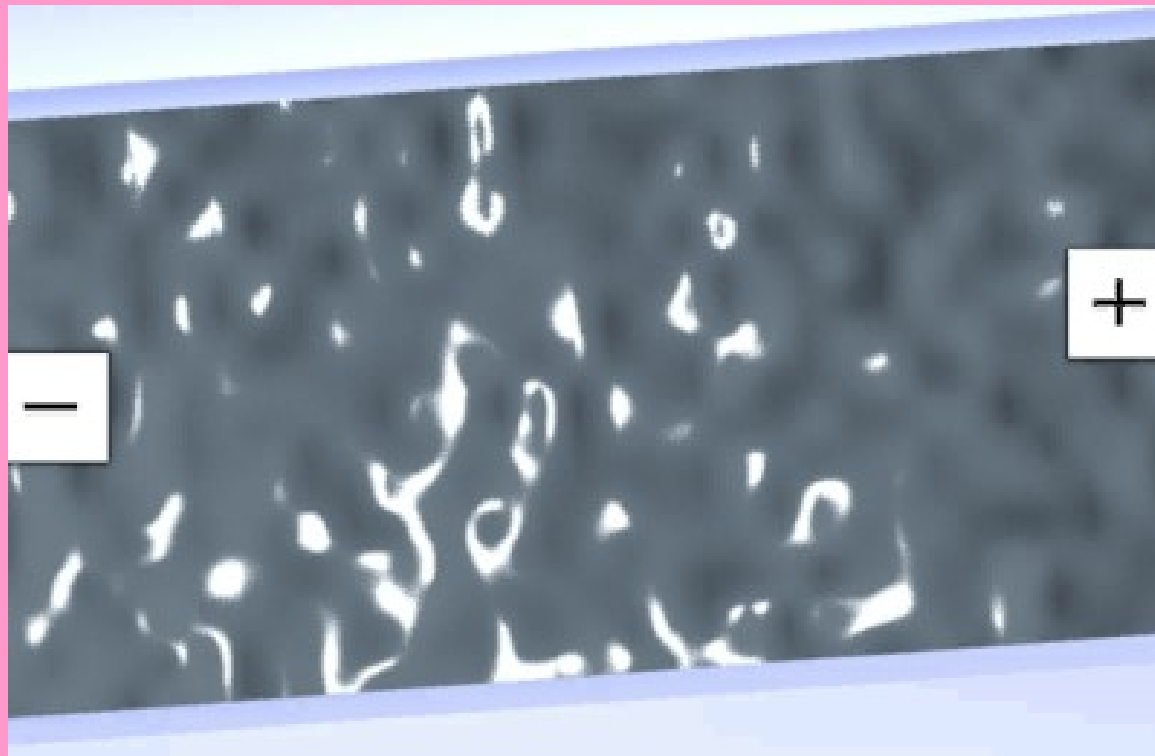
Capillary 12 $^{\circ}$ C

Detection

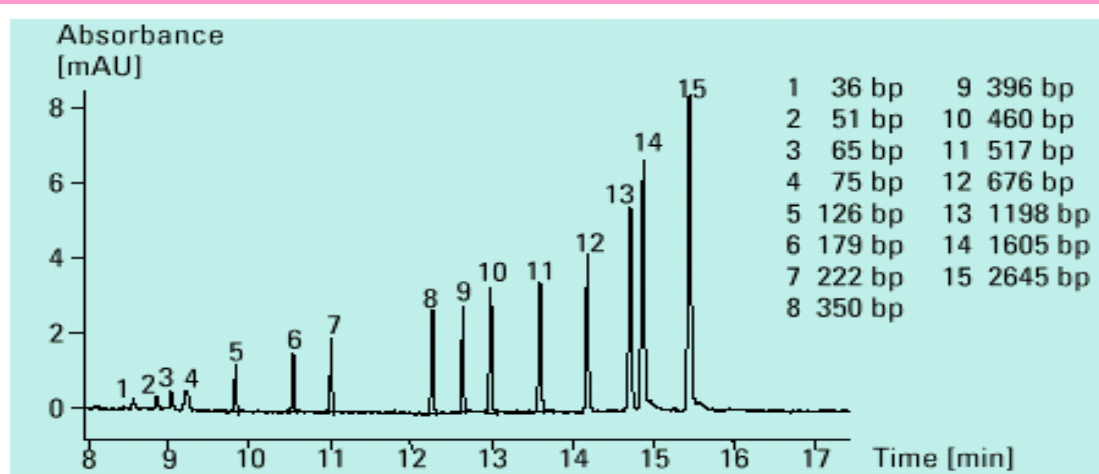
Signal 200/10 nm

Reference 350/80 nm

Kapilární gelová elektroforéza



CGE fragmentu dsDNA



Capillary:

CEP Coated Capillary,
l/ L 40/48.5 cm, i.d. 75 μm

Sample:

pGEM DNA Markers, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Buffer:

DNA Buffer + 1.5%

Electrokinetic Injection:

-5 kV, 4 s

Voltage:

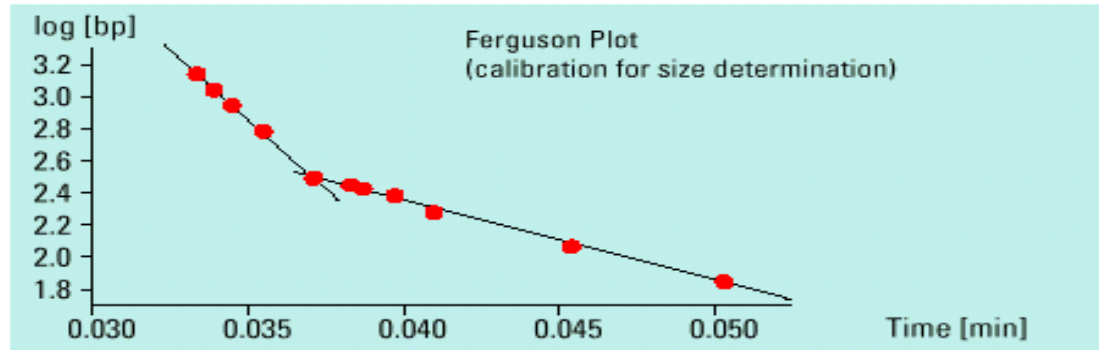
-16.5 kV

Temperature:

25 $^{\circ}\text{C}$

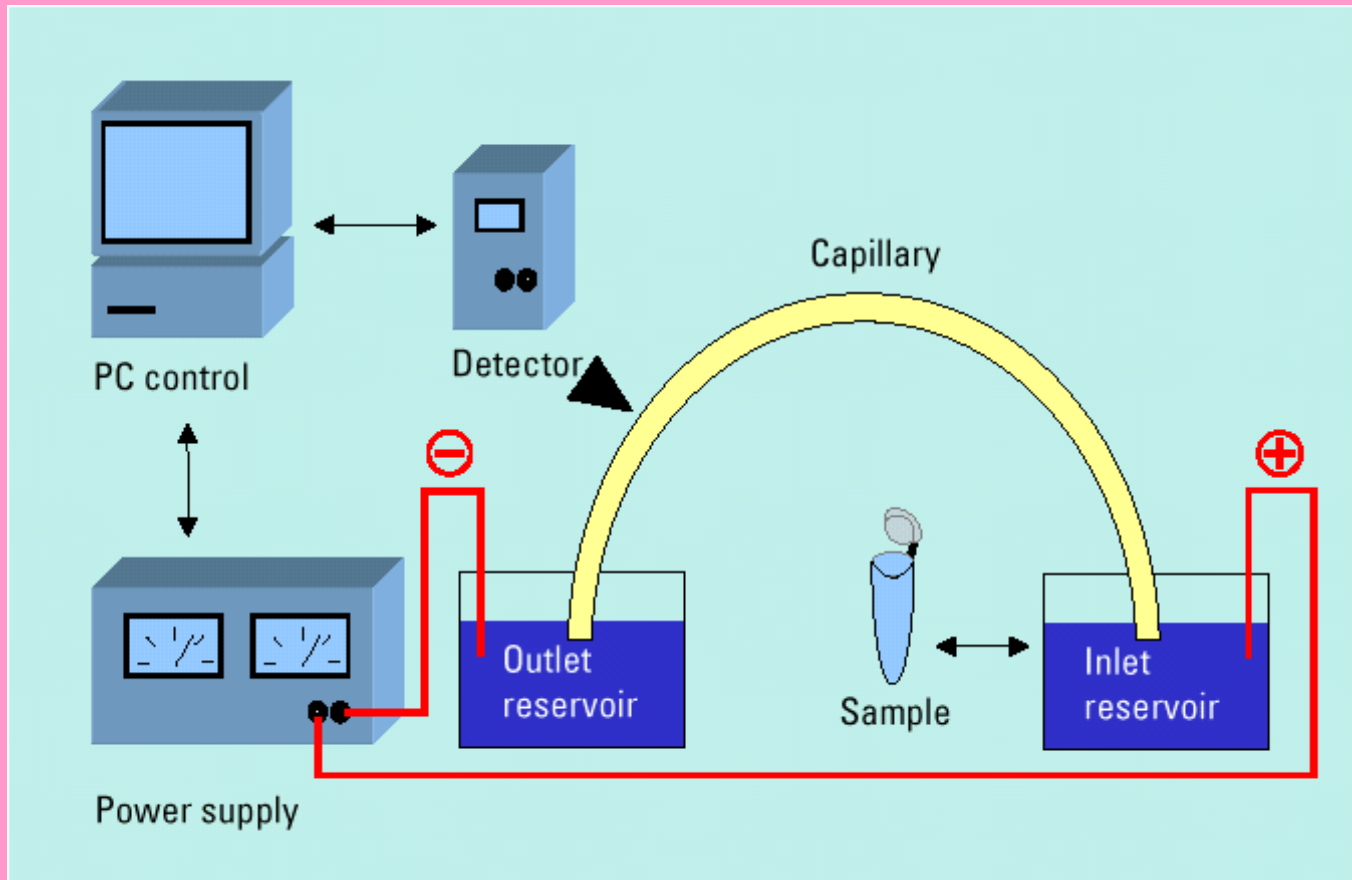
Detection:

260 nm with DAD filter for
260 nm
(optional)



Instrumentace CZE

Schéma zařízení pro CZE

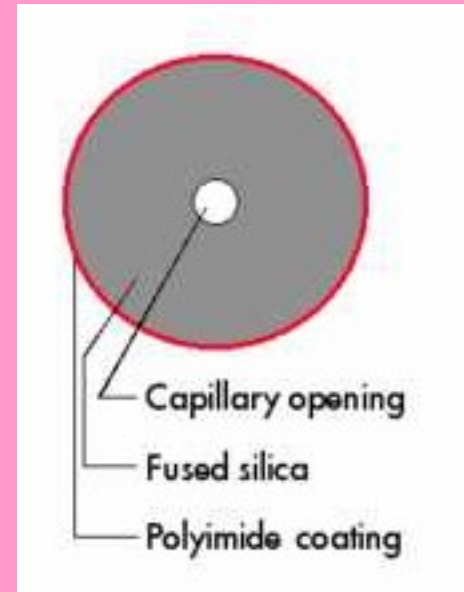


Napájecí zdroj

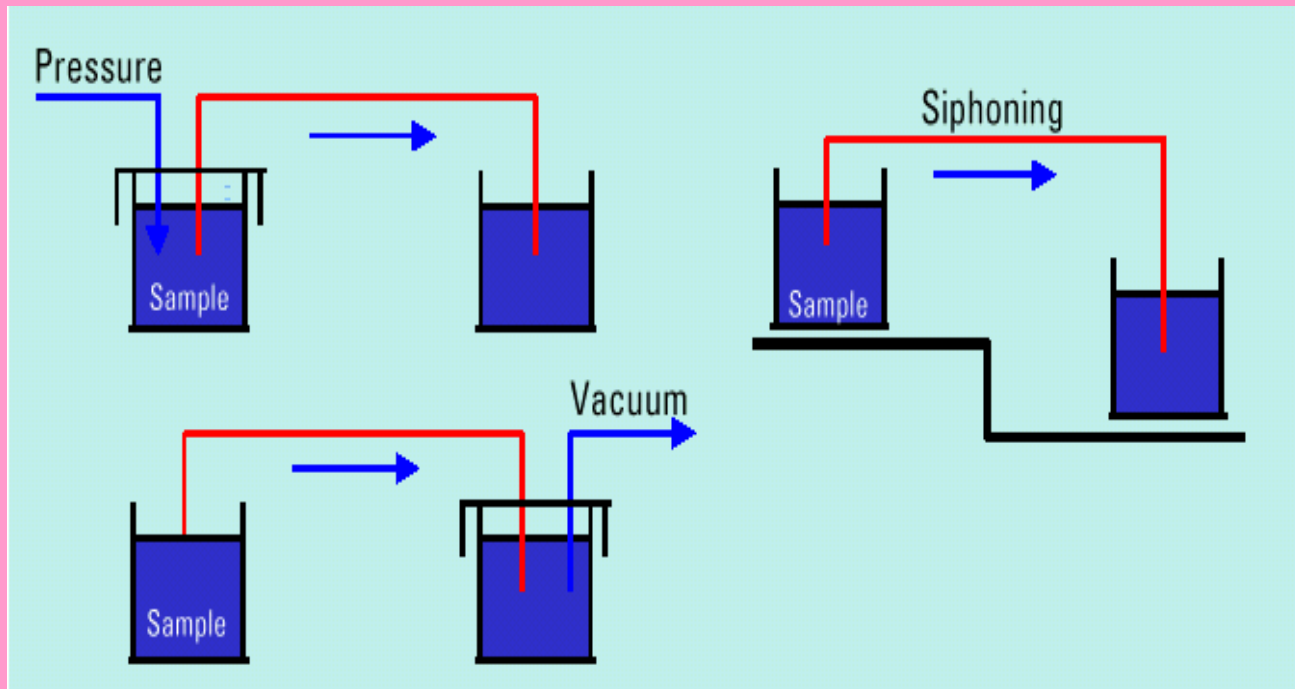
- **stabilizovaný 30 kV 300 μ A**
- **konstantní napětí nebo proud**
- **obojí polarita**
- **ochrana obsluhy**

Kapilára

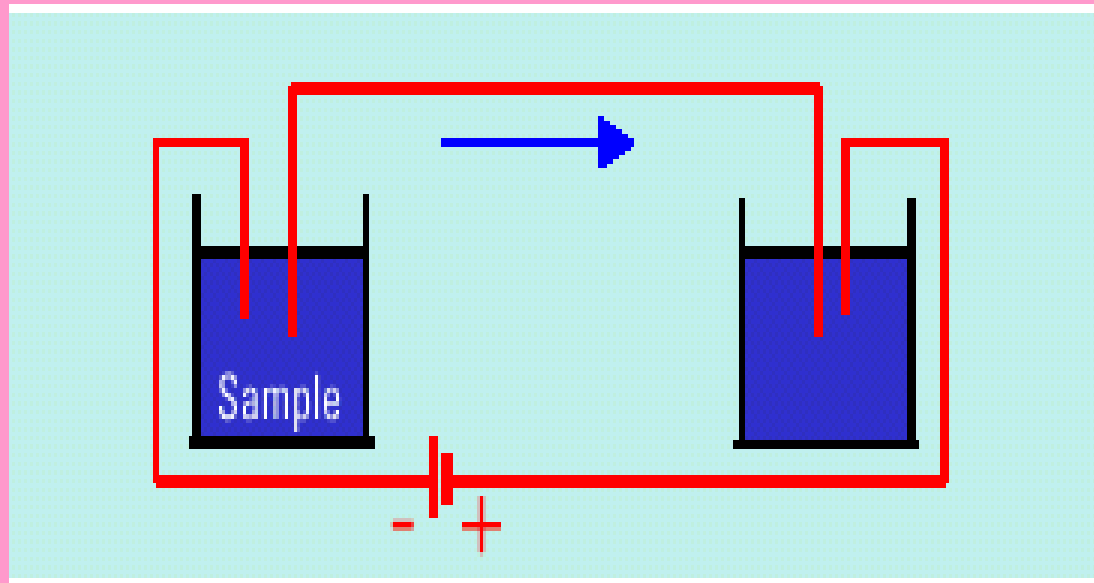
- **křemenná - 25 -100 μm i.d
- 350 μm o.d.**
- **délka až 100 cm délka**
- **polyimidové vnější pokrytí**



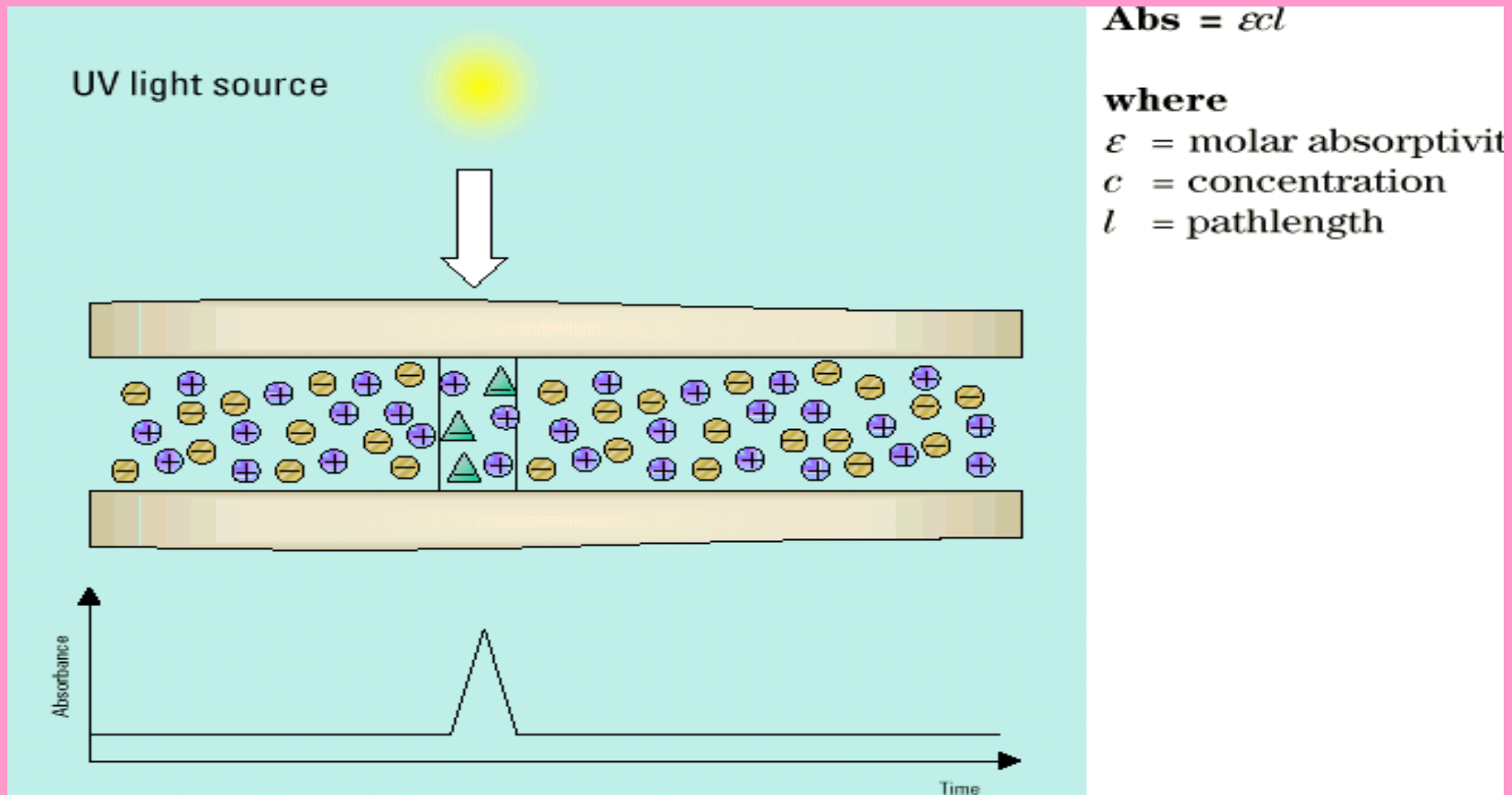
Dávkování - hydrodynamické



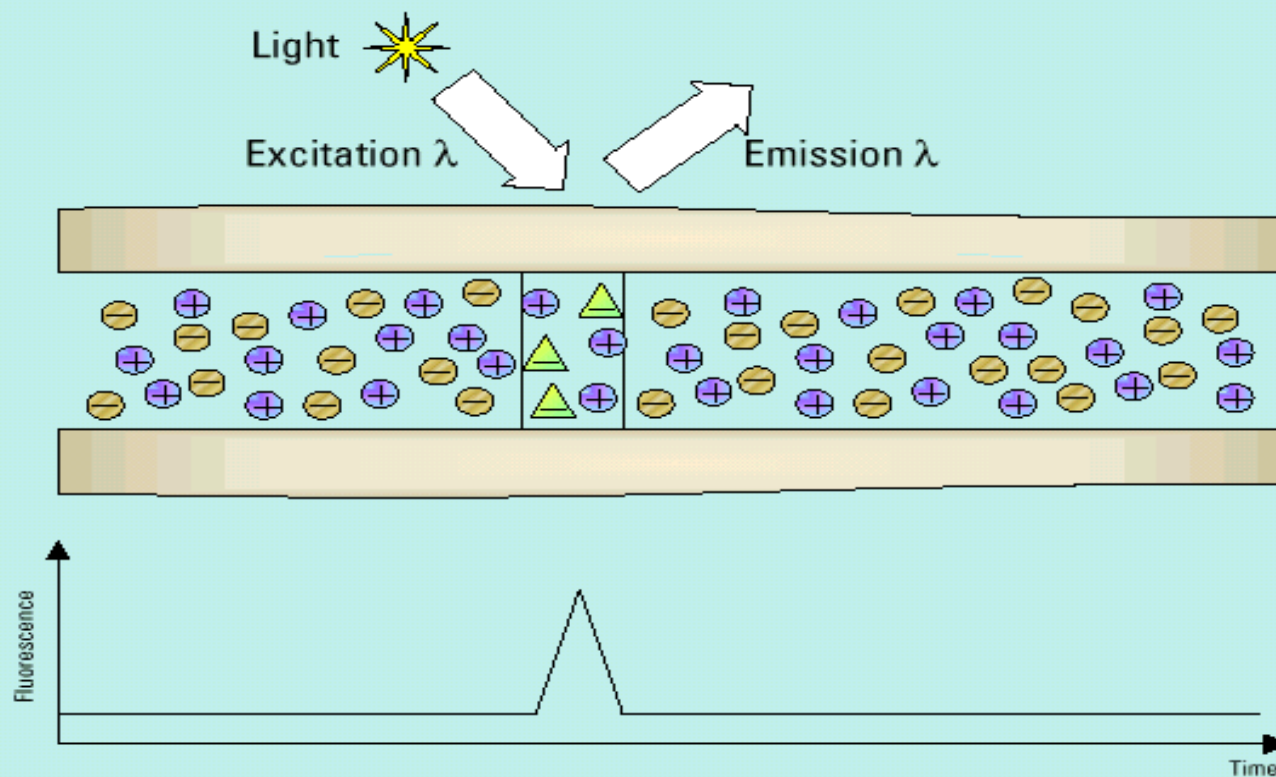
Dávkování - elektrokinetické



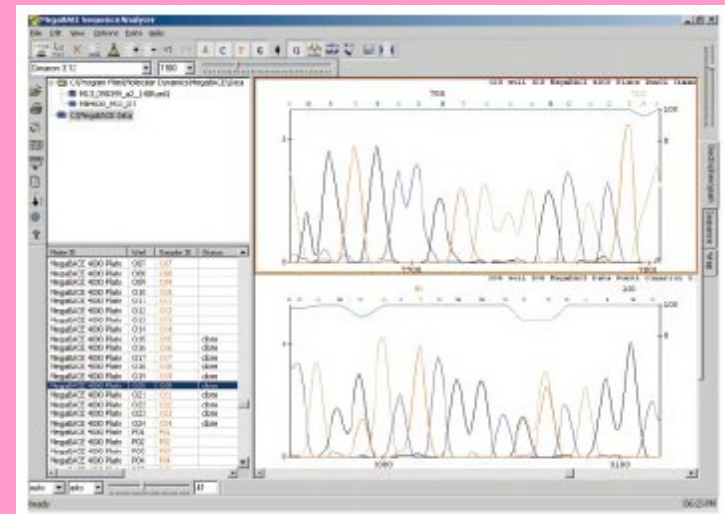
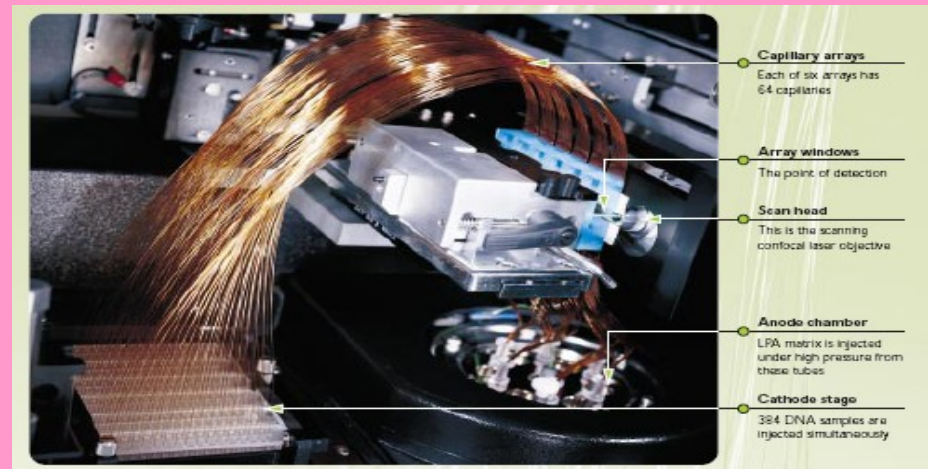
Detekce spektrofotometrická



Detekce fluorescenční



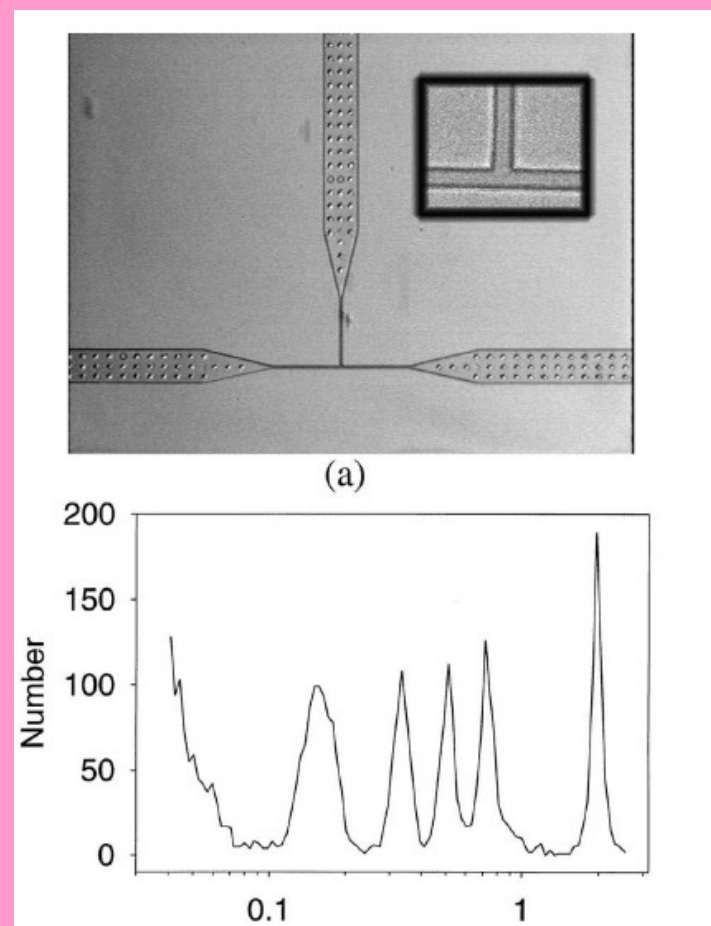
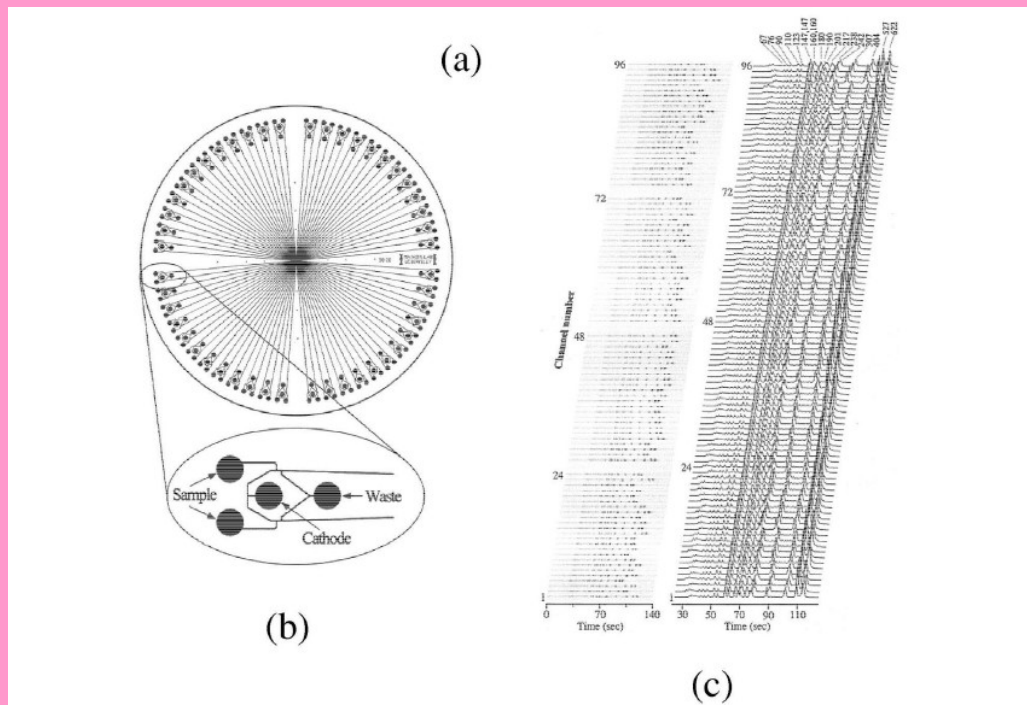
2003 - Projekt lidského genomu



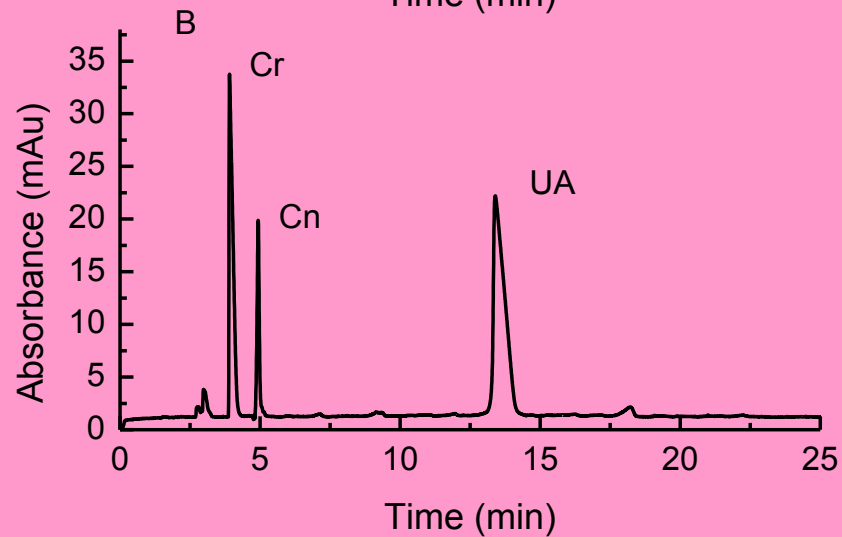
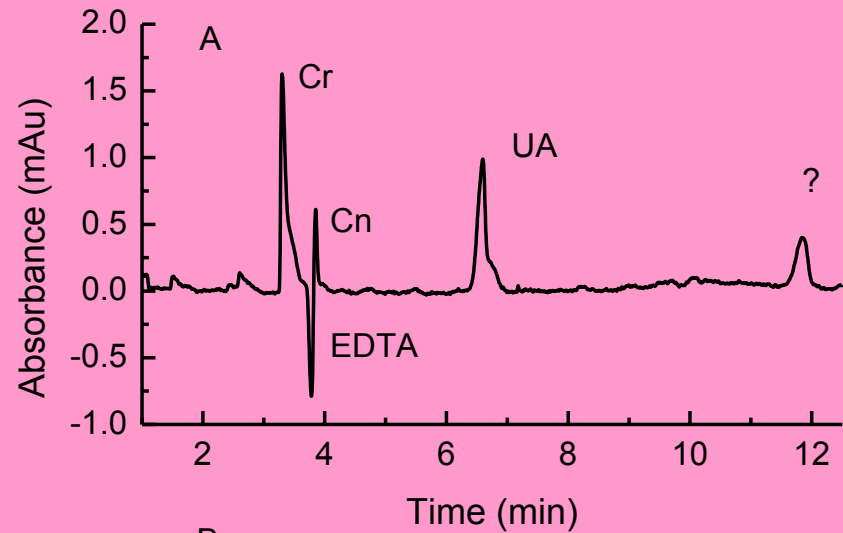
3730xl DNA Analyzer Applied Biosystems



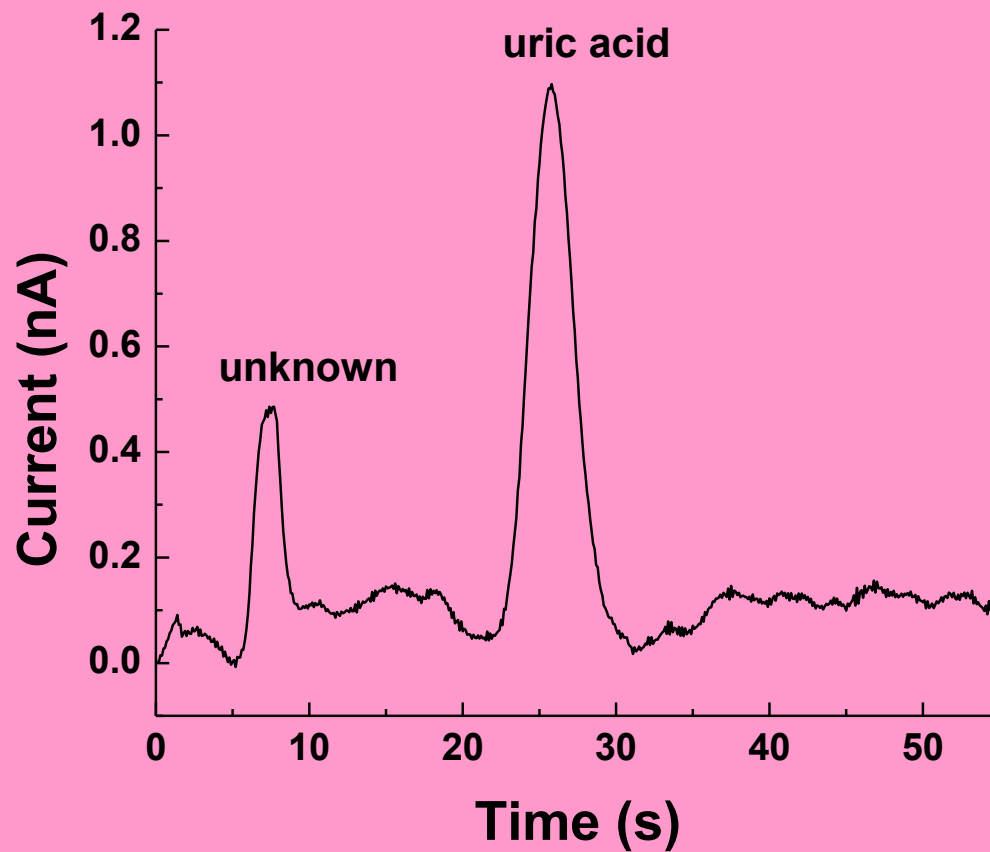
1997 μ CE



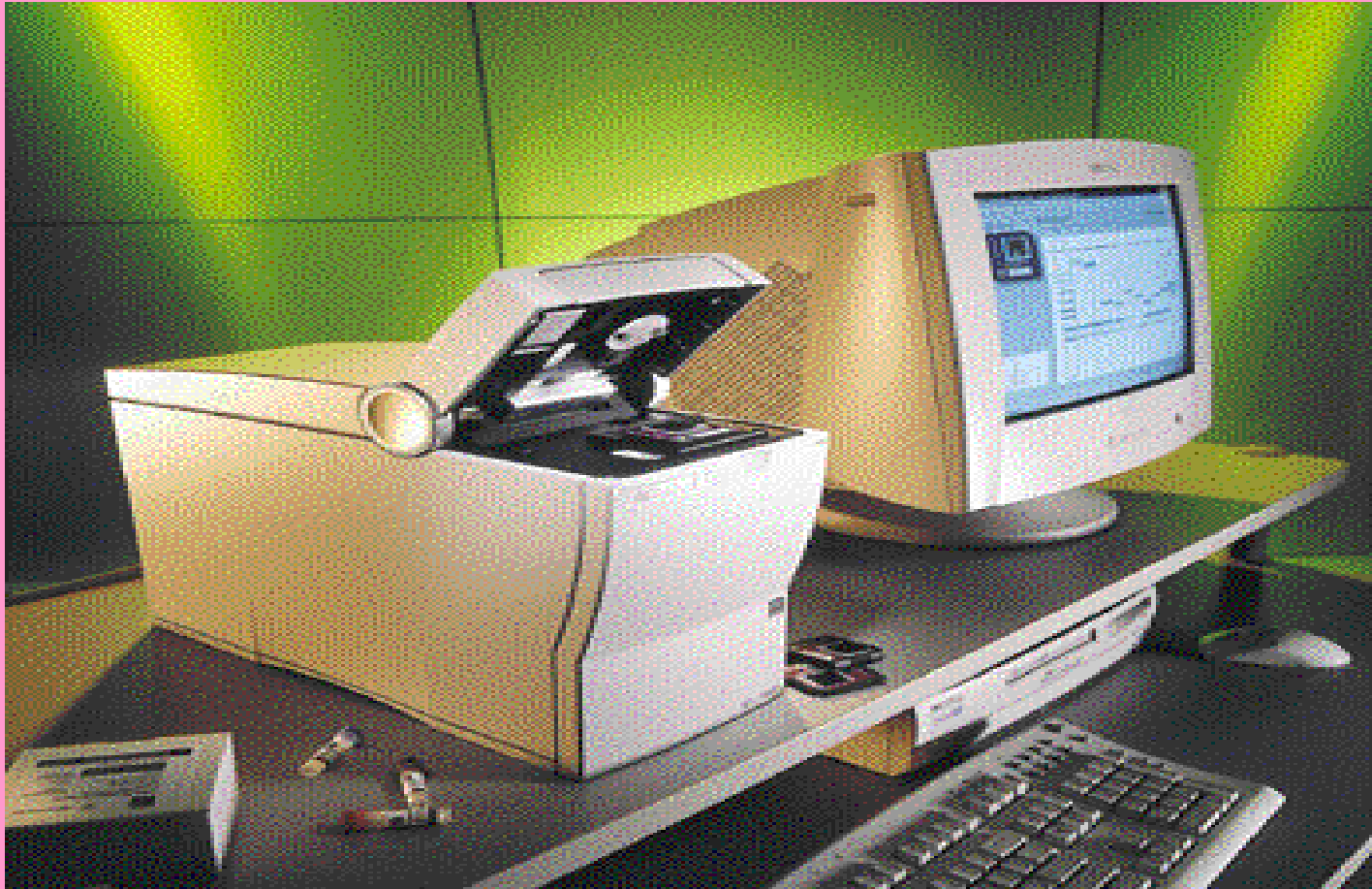
Klasická CZE



Microchip CZE

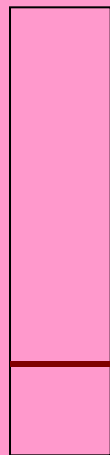


Bioanalyser Agilent 2100

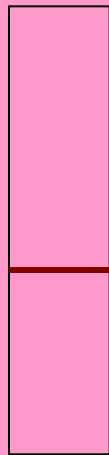


Afinitní elektroforéza

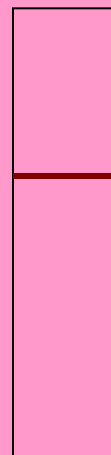
„V inertní matrici je imobilizován ligand, se kterým specificky interaguje separovaný biopolymer“



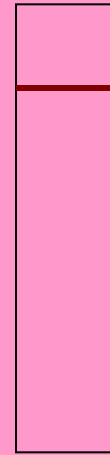
$$c_L = 0$$



$$c_L = n$$



$$c_L = 2n$$



$$c_L = 4n$$

Ligandy

Biopolymery	Ligandy
Enzymy	substrát, koenzym, inhibitor
Hormony	receptory
Lektiny	sacharidy
NK	NK

Imobilizace ligandu

- Chemická – kovalentí vazba
- Fyzikální – ligand vázán na makromolekulu

Použití :

Studium interakce mezi ligandem a biomakromolekulou

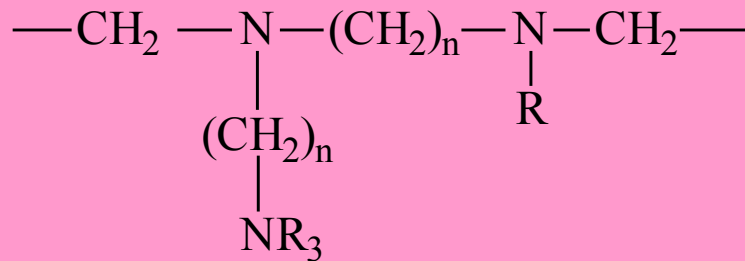
Izoelektrická fokusace

*„Elektroforéza v gradientu pH,
částice jsou separovány podle
svých pI“*

Tvorba gradientu

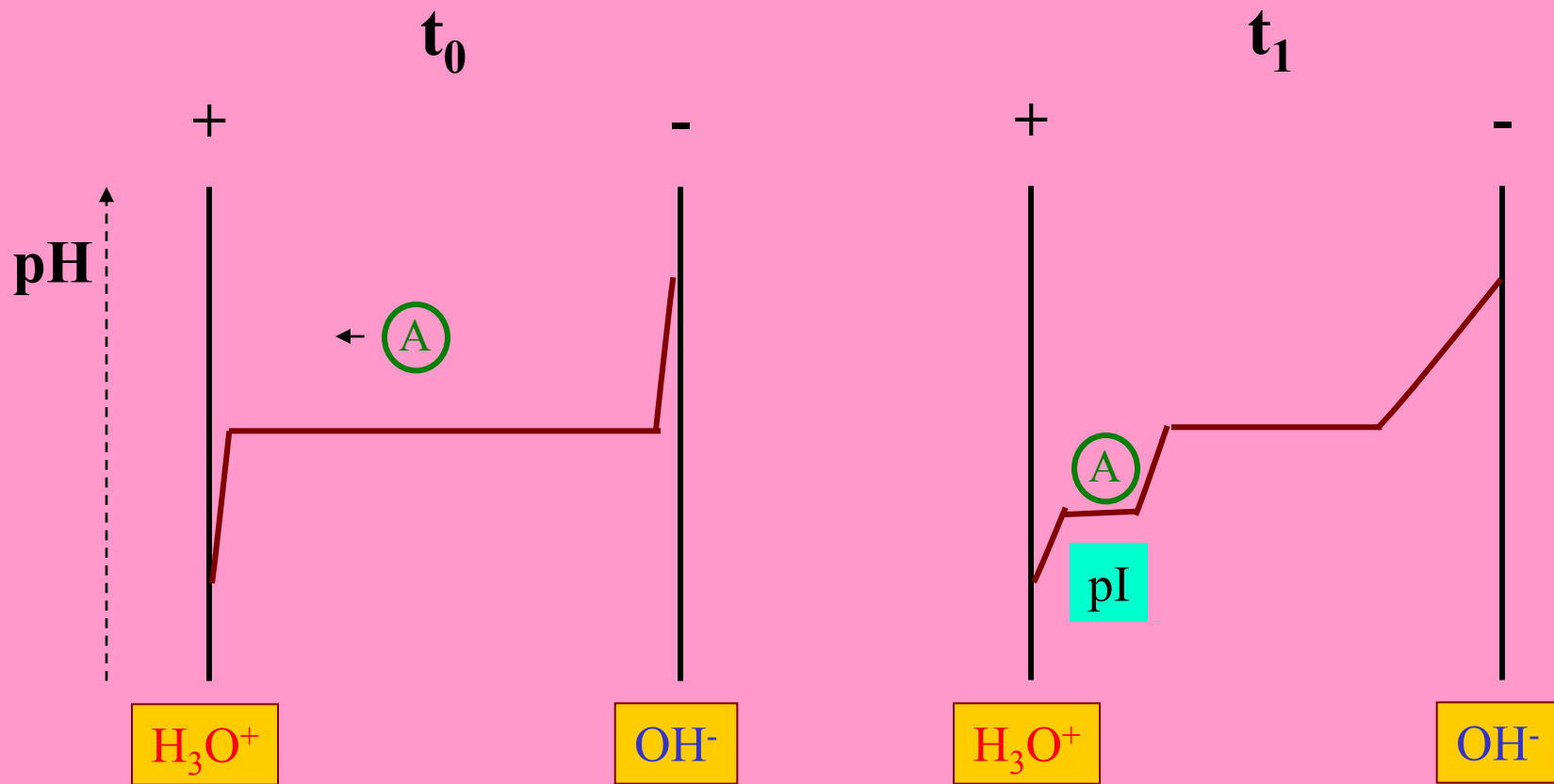


Ampholyty

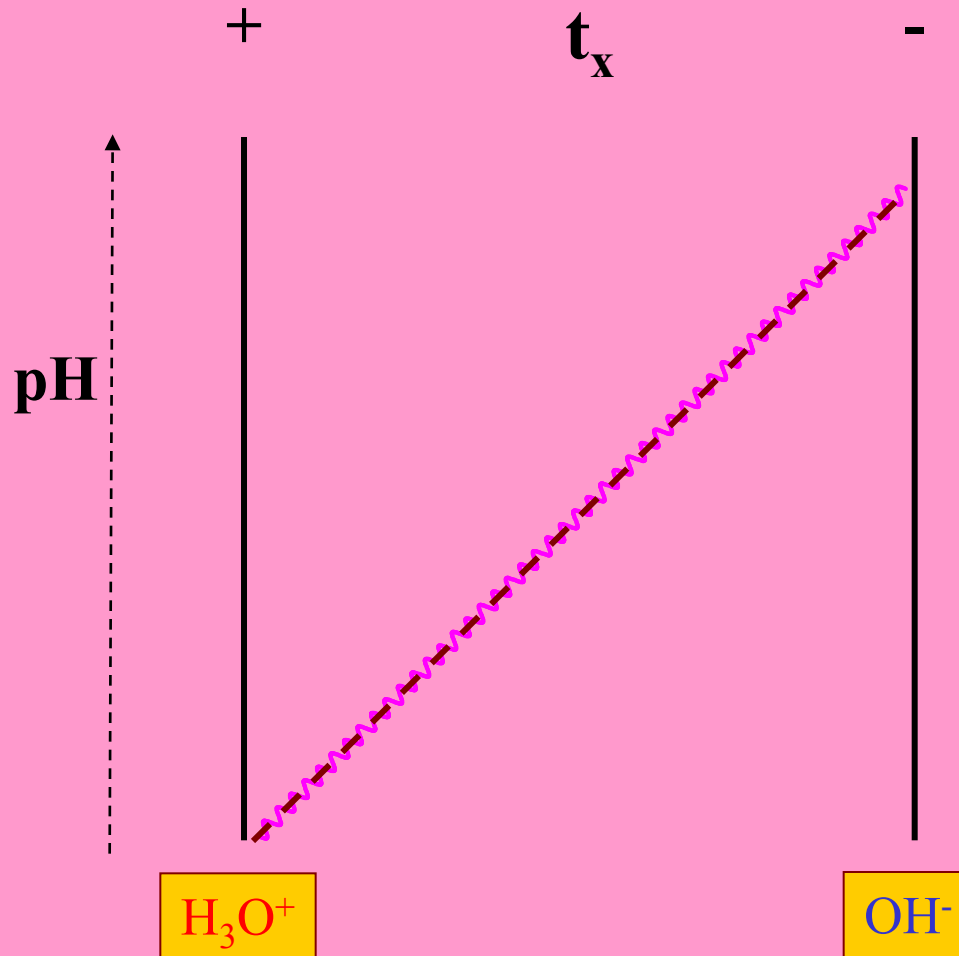


- R - CH₃
- CH₂COOH
- H

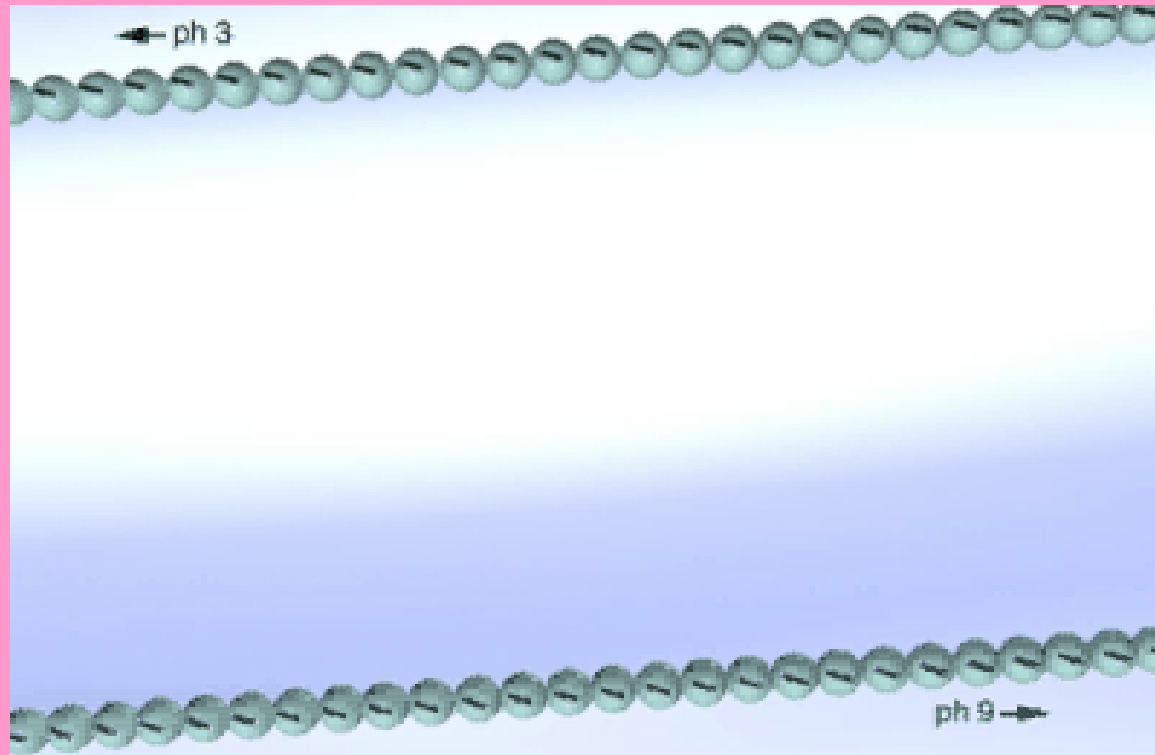
Izoelektrická fokusace



Izoelektrická fokusace



Kapilární izoelektrická fokusace



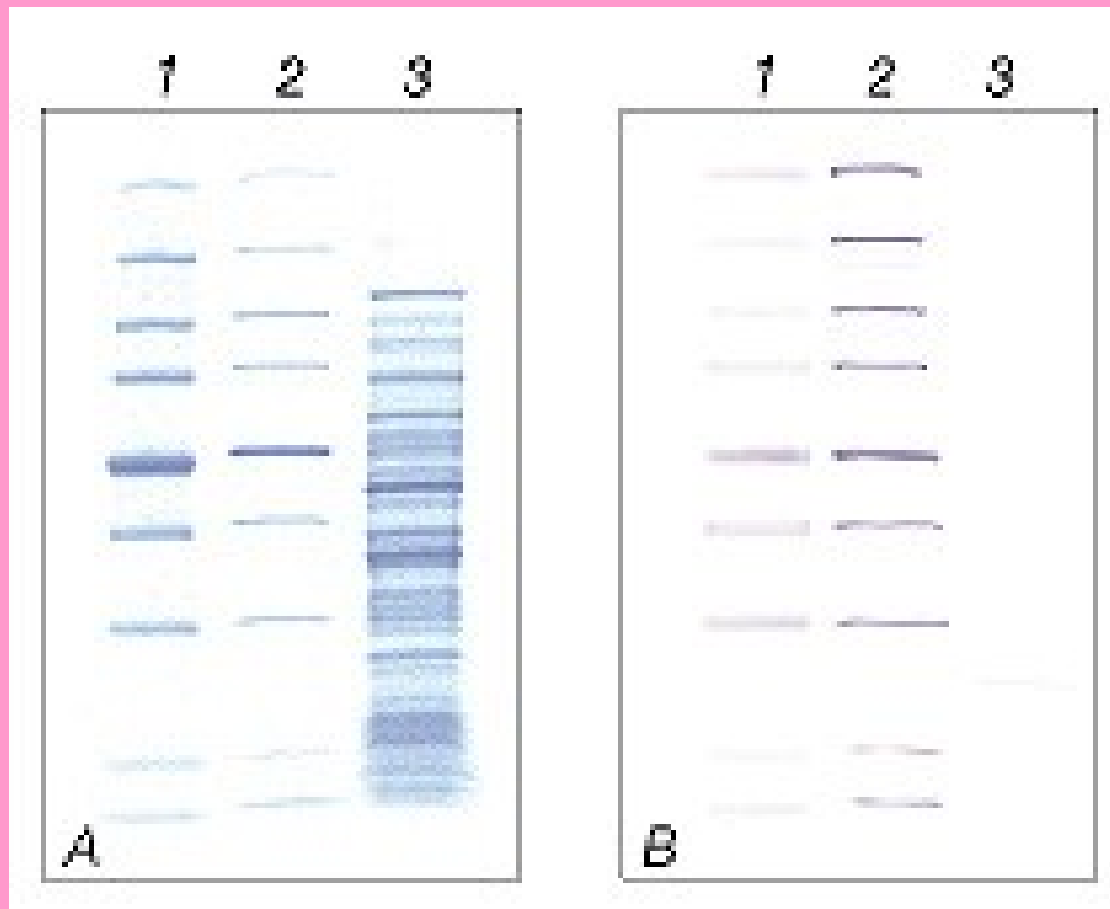
Izoelektrická fokusace analytická

- Provedení - v gelech – PAGE, agarosa
- Použití - sledování komplexních směsí
 - izoenzymové složení
 - stanovení pI – rozřezání a eluce
 - μ pH elektrody
 - pI standardy

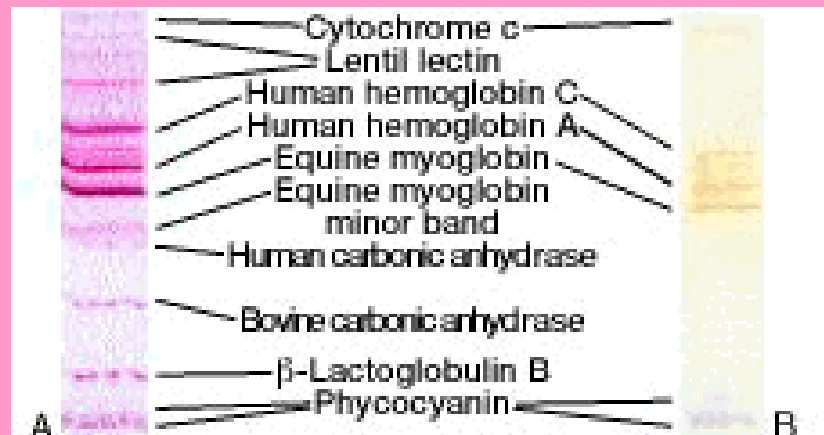
Izoelektrická fokusace analytická



Izoelektrická fokusace analytická



Izoelektrická fokusace analytická - standardy



IEF Standards for accurate pI calibration of native IEF gels. A. 5 μ l of the standards were stained with Coomassie blue R-250 dye and crocein scarlet. B. 5 μ l of the standards were left unstained.

Izoelektrická fokusace preparativní

- Provedení - v sypaných vrstvách – Sephadex
 - v gradientech hustoty – sacharoza
 - rotací – Rotofor (BioRad)

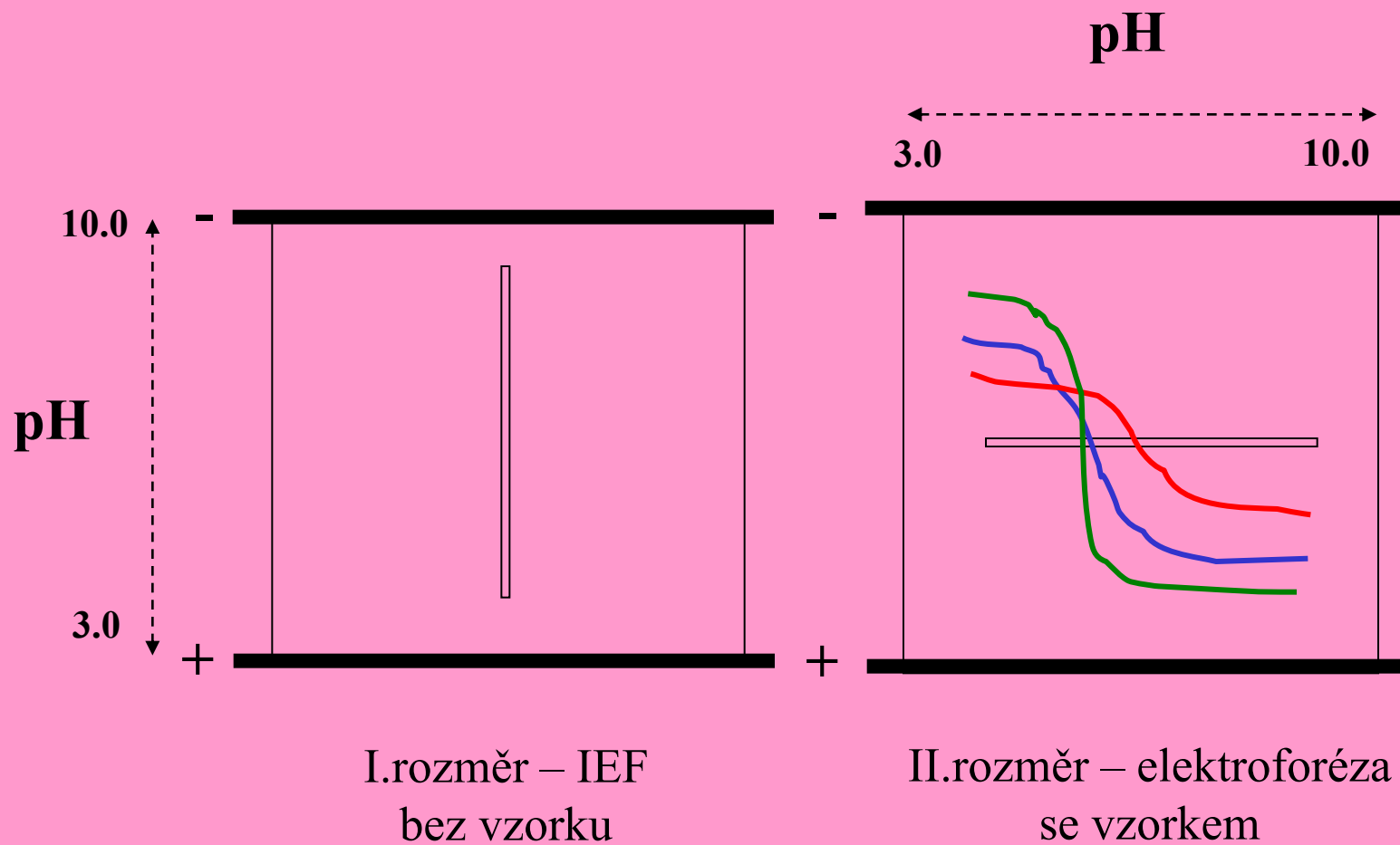


- Použití – izolace bílkovin

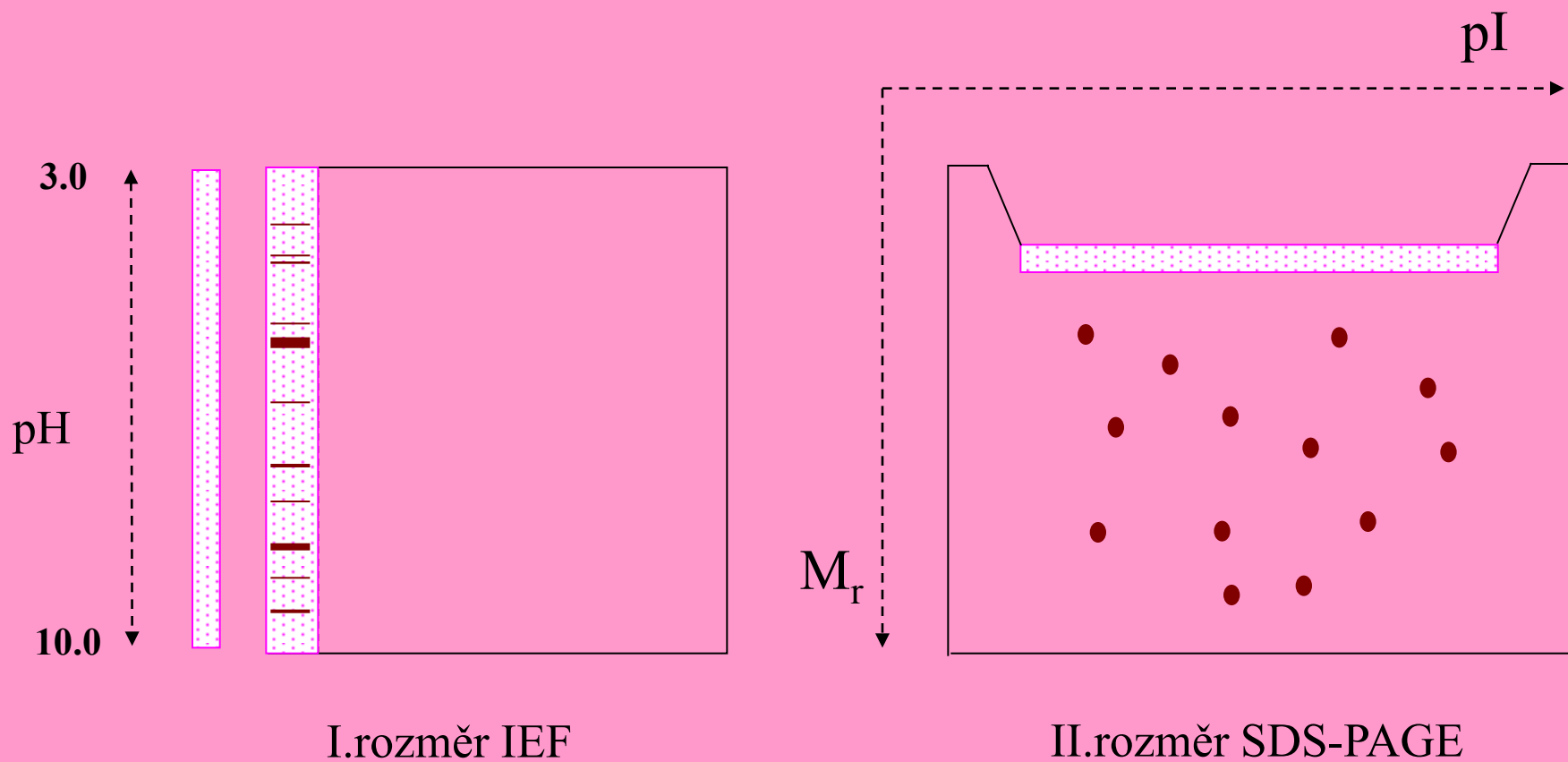
Dvourozměrné metody

- Metoda titračních křivek
- Dvourozměrná elektroforéza

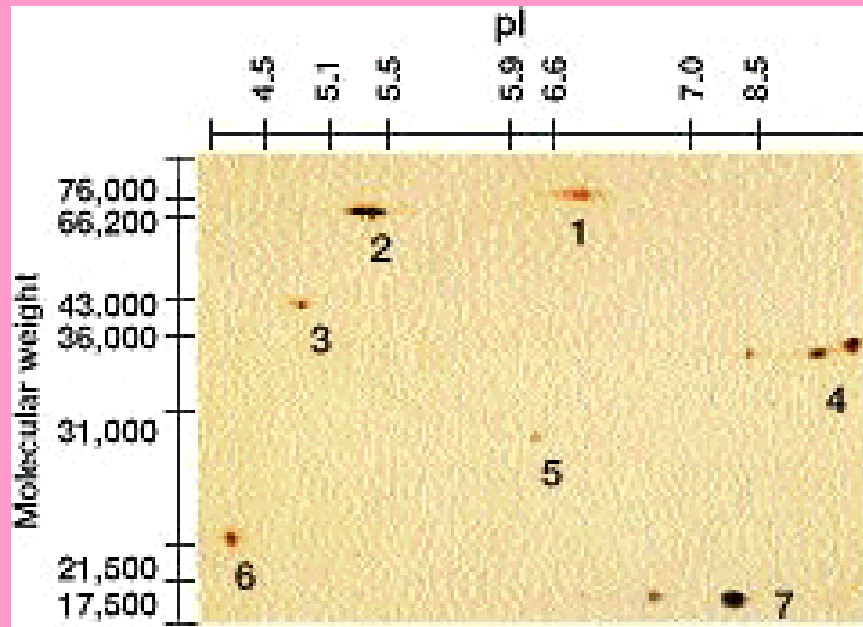
Metoda titračních křivek



Dvojměrná elektroforéza



Dvojrozměrná elektroforéza



Two-dimensional electrophoretic pattern of the 2-D SDS-PAGE Standards separated on the Mini-PROTEAN II cell. 2.5 μ l were applied to a 3.5% tube gel crosslinked with piperazine diacrylamide containing 9 M urea and 2% Bio-Lyte ampholytes (1 part 3/10, 2 parts 5/7). The tube gel was run on a 15% continuous slab gel crosslinked with bis and silver stained. For details, see references 21, 22, and 23.

Dvojměrná elektroforéza

pI

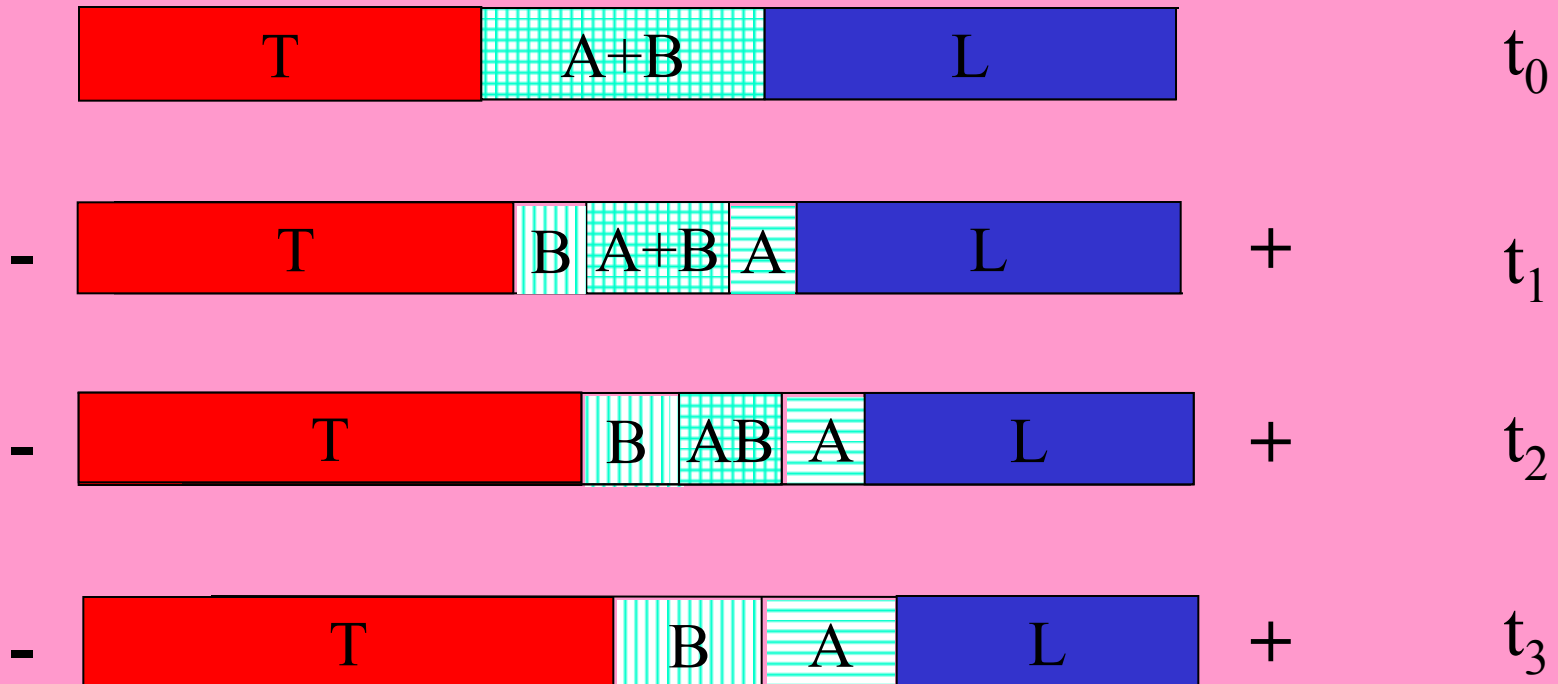
M_r



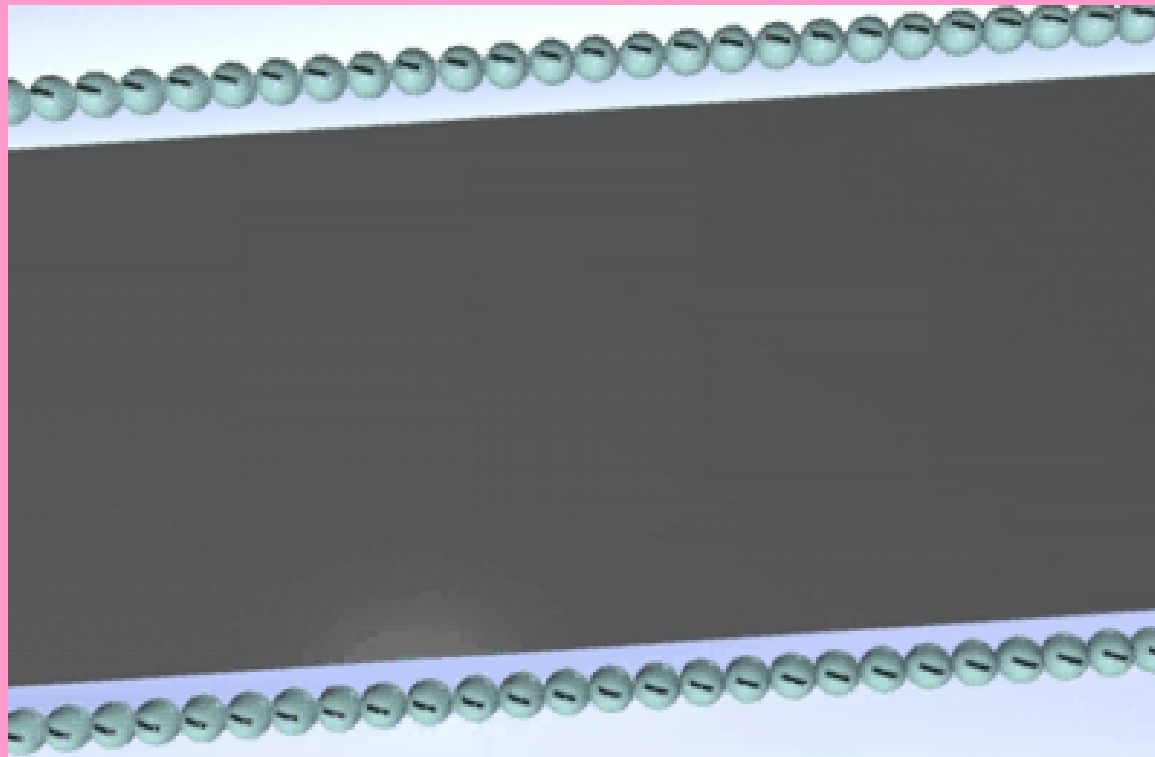
Izotachoforéza

„Vzorek je umístěn mezi dva elektrolyty : vedoucí L (leading) s nejvyšší mobilitou a - uzavírající T (terminating) s nejmenší mobilitou“

Izotachoforéza



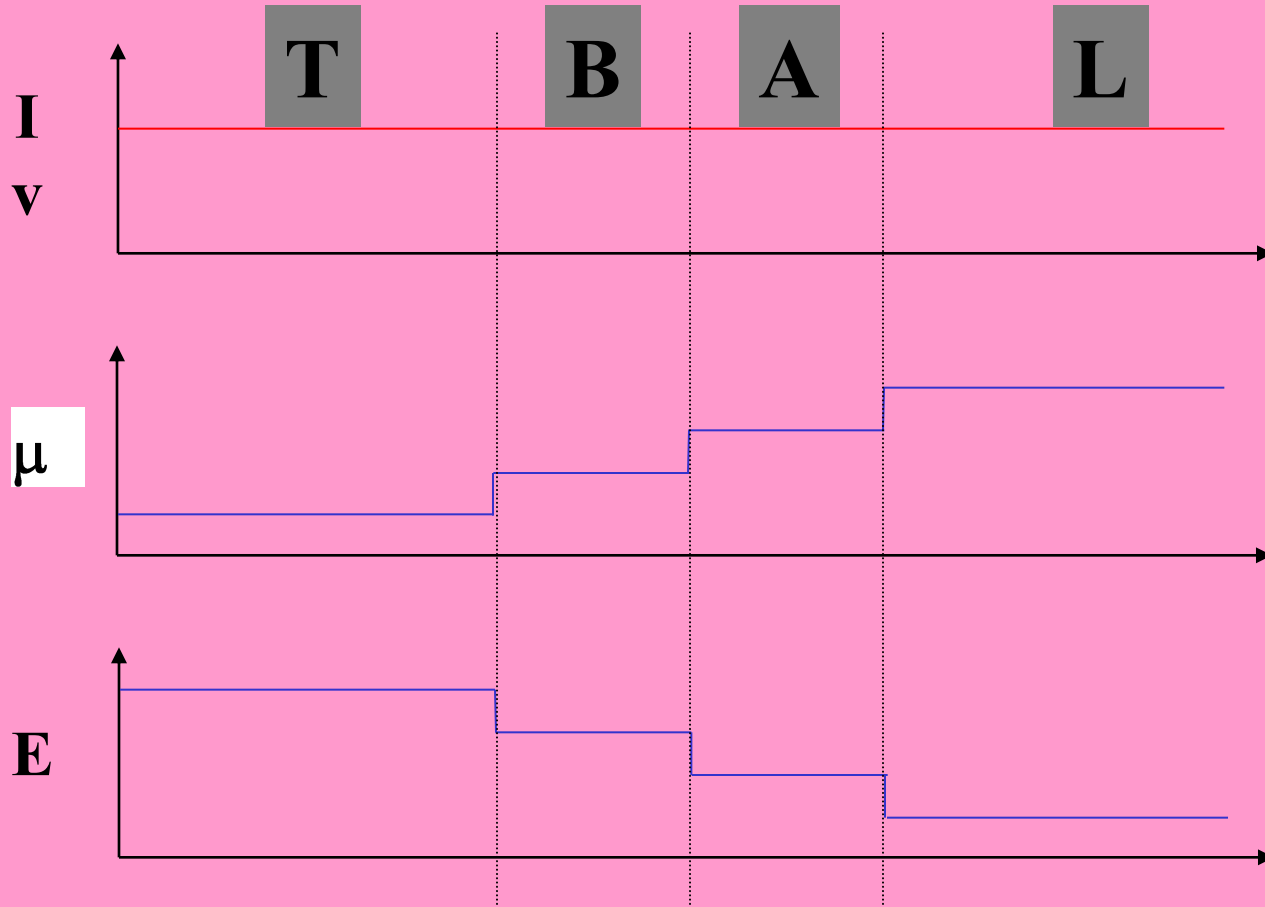
Izotachoforéza



Izotachoforéza

$$\mu_L > \mu_A > \mu_B > \mu_T$$

$$\mu = \frac{\gamma}{E}$$

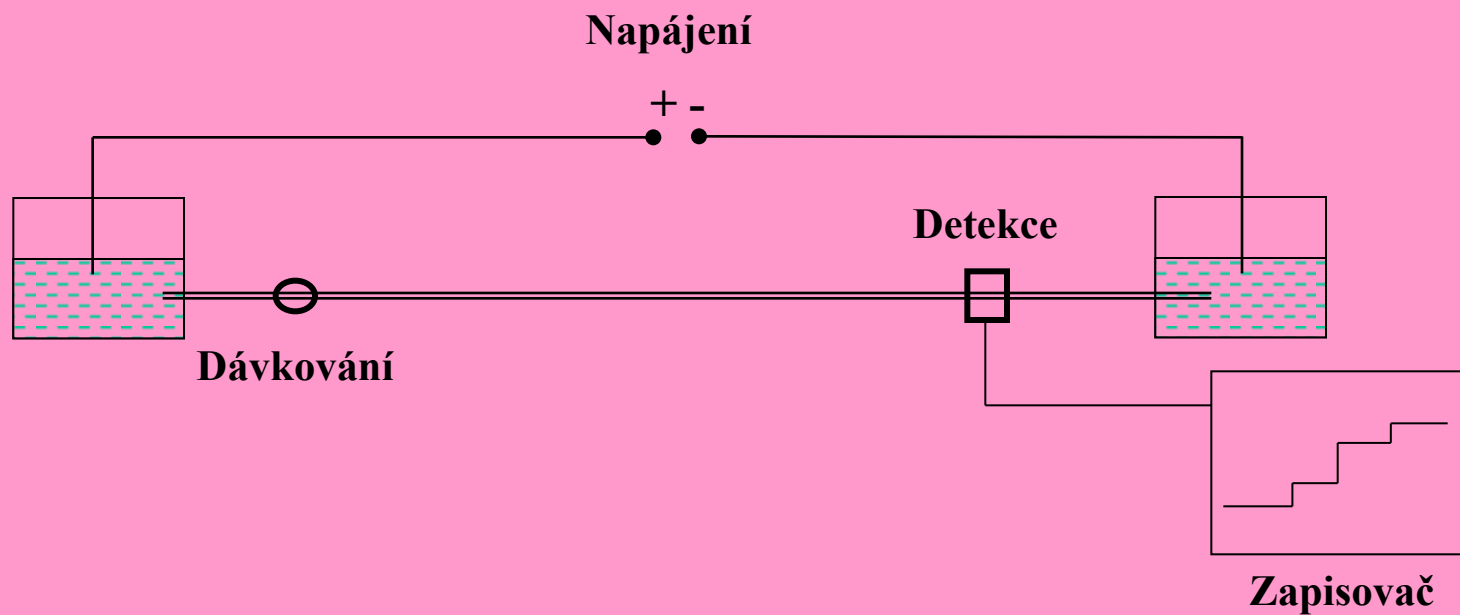


Kohlrauschova regulační funkce

$$\sum_i \sum_z \frac{C_i}{\mu} = K_x$$

$$C_i = C_L \cdot \frac{\mu + \mu}{\mu} \cdot \frac{\mu}{\mu + \mu} \cdot \frac{Z_L}{Z_i}$$

Analytická ITP

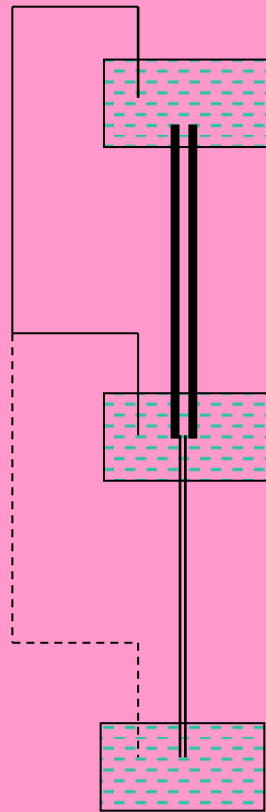


Analytická ITP instrumentace

- Napájení - stejnosměrné 30 kV 0,2 – 0,5mA
- Kapilára 0,1 – 2 mm
- Dávkování - dávkovací ventil
- Detekce - universální – konduktometrická
 - potencialně
 - gradientová
 - selektivní – UV-VIS

Analytická ITP

Metoda spojování kapilár



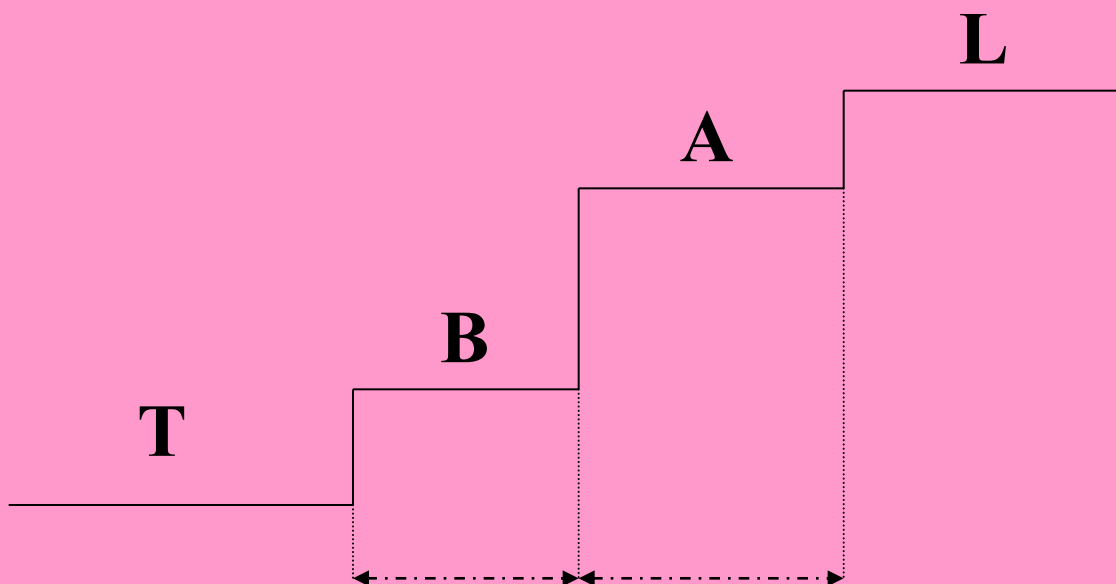
Předseparační kapilára – 2 mm



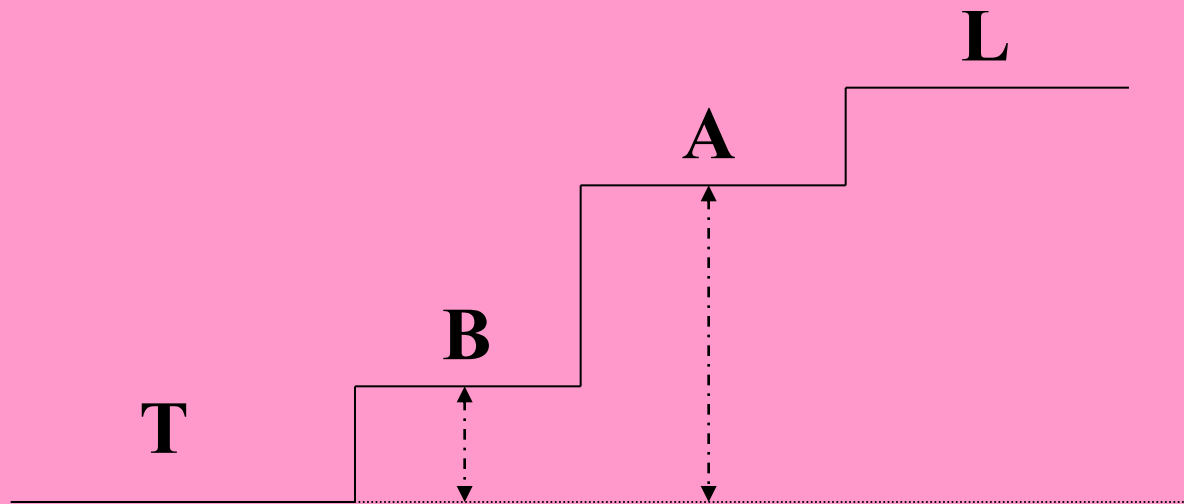
Analytická kapilára – 0.1 mm



Izotachoforetický záznam kvantita

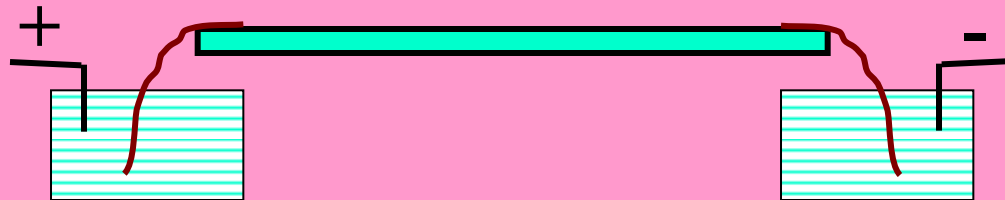


Izotachoforetický záznam kvalita



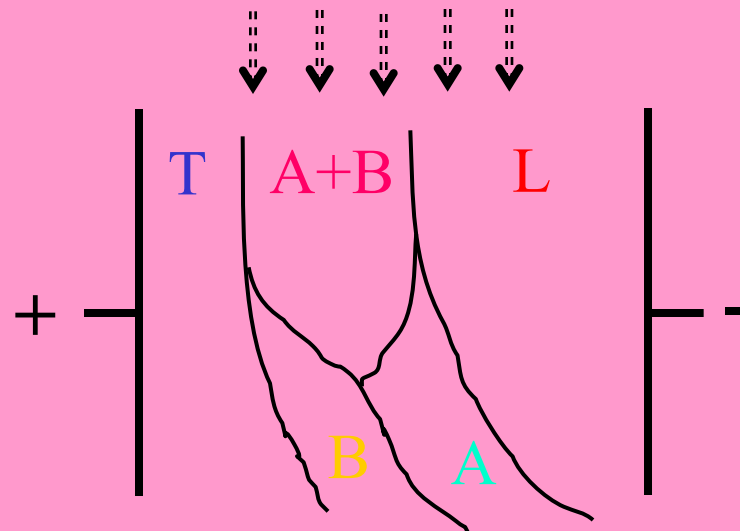
Preparativní ITP

V gelech - Sephadex

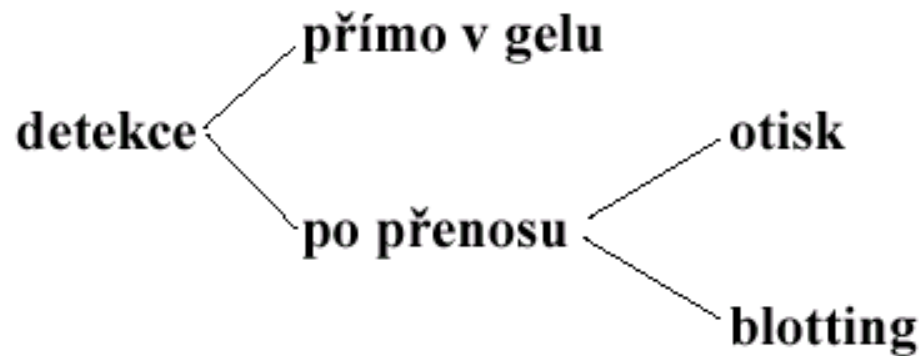


Preparativní ITP

Kontinuální plošná



Detekce po elektroforéze a izoelektrické fokusaci



Nespecifická detekce

Reakce s barvičkou

Postup : **A. Fixace**
 B. Barvení
 C. Odbarvování

Používané barvičky

Amido Black 10 B

Coomassie Brilliant Blue R 250

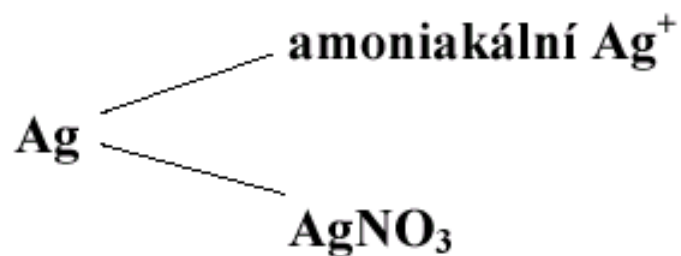
Coomassie Brilliant Blue G 250

Fast Green

Ponceau S

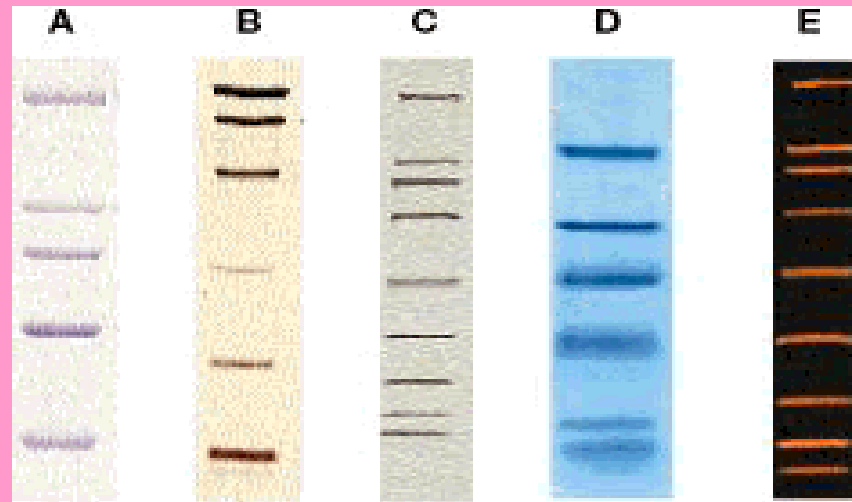
Nespecifická detekce

Barvení Ag



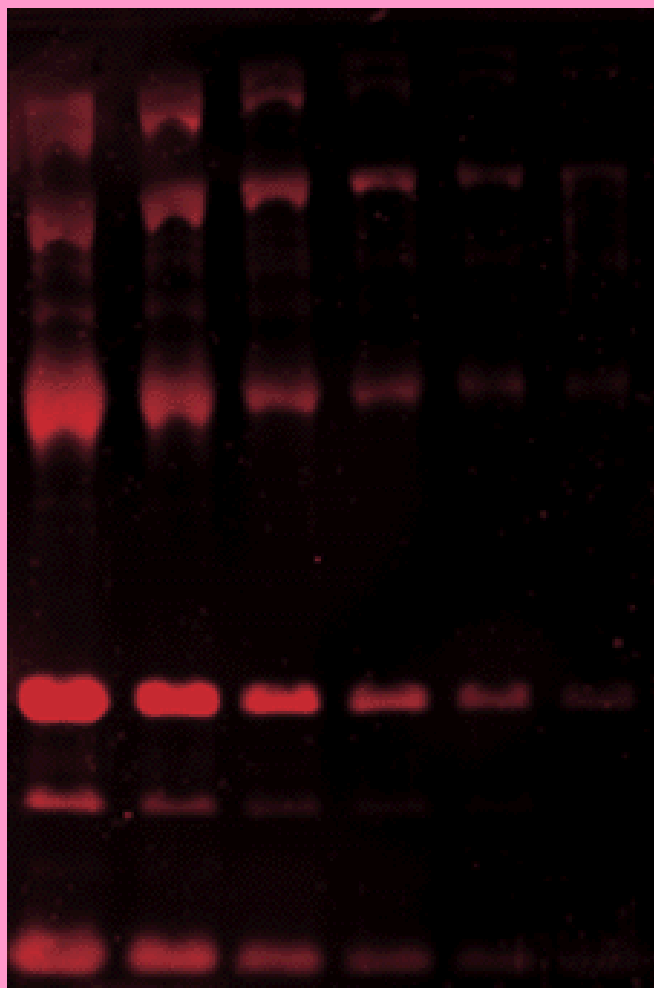
Postup : **A. Navázání Ag^+ na bílkovinu**
 B. Redukce Ag^+ na Ag^0

Nespecifická detekce



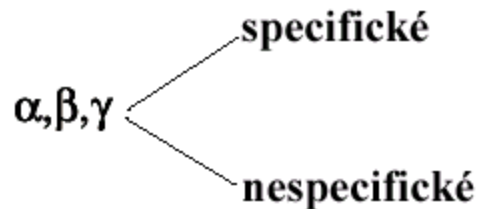
SDS-PAGE Standards provide accurate molecular weight determinations. A. High range SDS-PAGE Standards run on a 7.5% gel and stained with Coomassie blue R-250 dye. B. Low range Silver Stain SDS-PAGE Standards run on a 12% gel and stained with Bio-Rad's Silver Stain Kit. C. Broad range Biotinylated SDS-PAGE standards run on a 4-20% gradient gel, blotted to nitrocellulose, and detected with Avidin-AP. D. Polypeptide SDS-PAGE Standards run on a 16.5% tricine gel and stained with Coomassie blue G-250 dye. E. Broad range SDS-PAGE standards for SYPRO Orange staining run on a 4-20% gel and stained with SYPRO Orange.

Fluorescenční detekce



Specifická detekce

Radioaktivní značení



A. Autoradiografie

$^{32}\text{P}, ^{125}\text{I}$

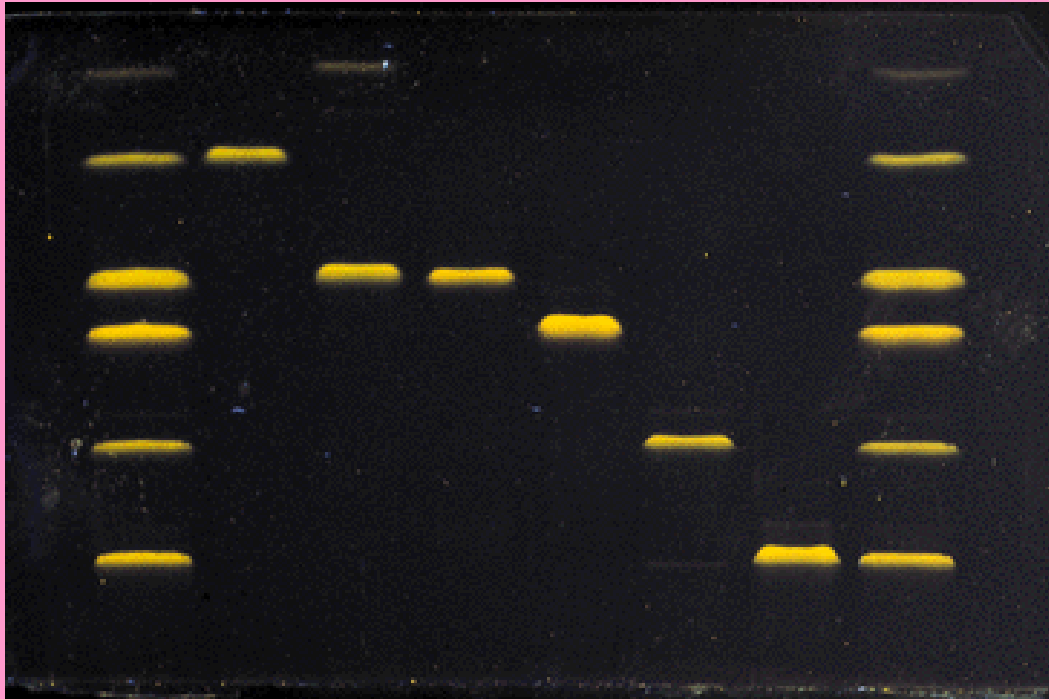
značený protein → rentgenový film

B. Fluorografie

$^3\text{H}, ^{14}\text{C}, ^{35}\text{S}$

značený protein → fluorofor → rentgenový film

Autoradiografie

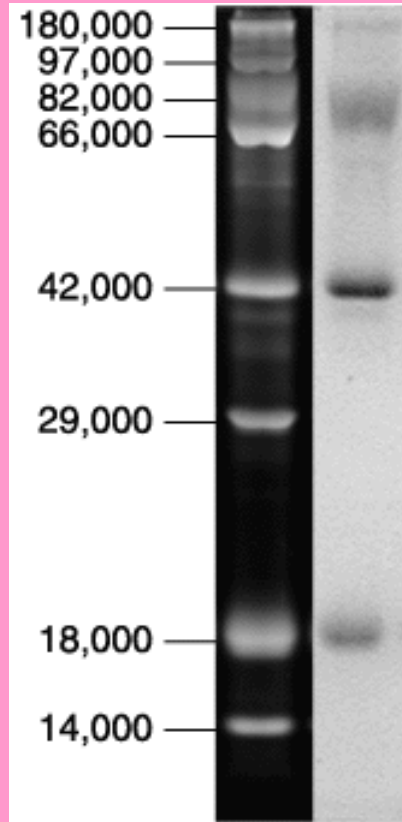


Specifická detekce

Detekce různých skupin bílkovin

glykoproteiny	-	Schiffova reakce (oxidace s HJO_4 , reakce s Schiffovým činidlem - bazický fuchsin)
lipoproteiny	-	Sudan B
hemoproteiny	-	peroxidázová aktivita (hem + benzidin + H_2O_2)
Cu^{2+}	-	alizarin
Fe^{3+}	-	fenantrolin

Detekce glykoproteinů



Detekce na základě biologické aktivity

Detekce na základě enzymové aktivity

Rozdělení

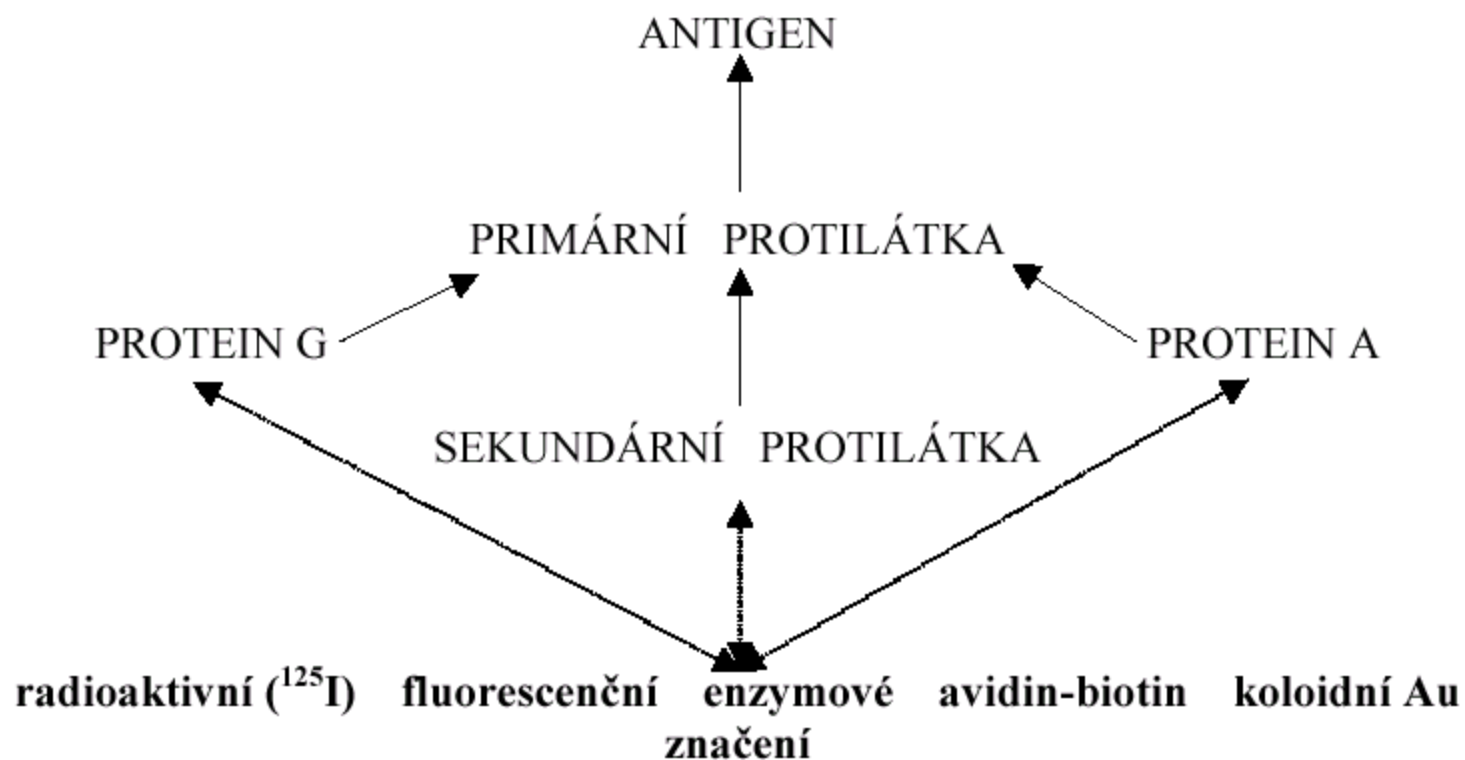
- A. bezbarvý substrát → barevný produkt
- B. barevný substrát → bezbarvý produkt
- C. bezbarvý substrát → bezbarvý produkt
→ barevný produkt
- D. auxiliární enzymy → barevný produkt

Detekce

- přímo v gelu
- přímo v gelu se zapolymerovanými substráty
- otisk - zymogram
- indikátorové gely

Detekce na základě biologické aktivity

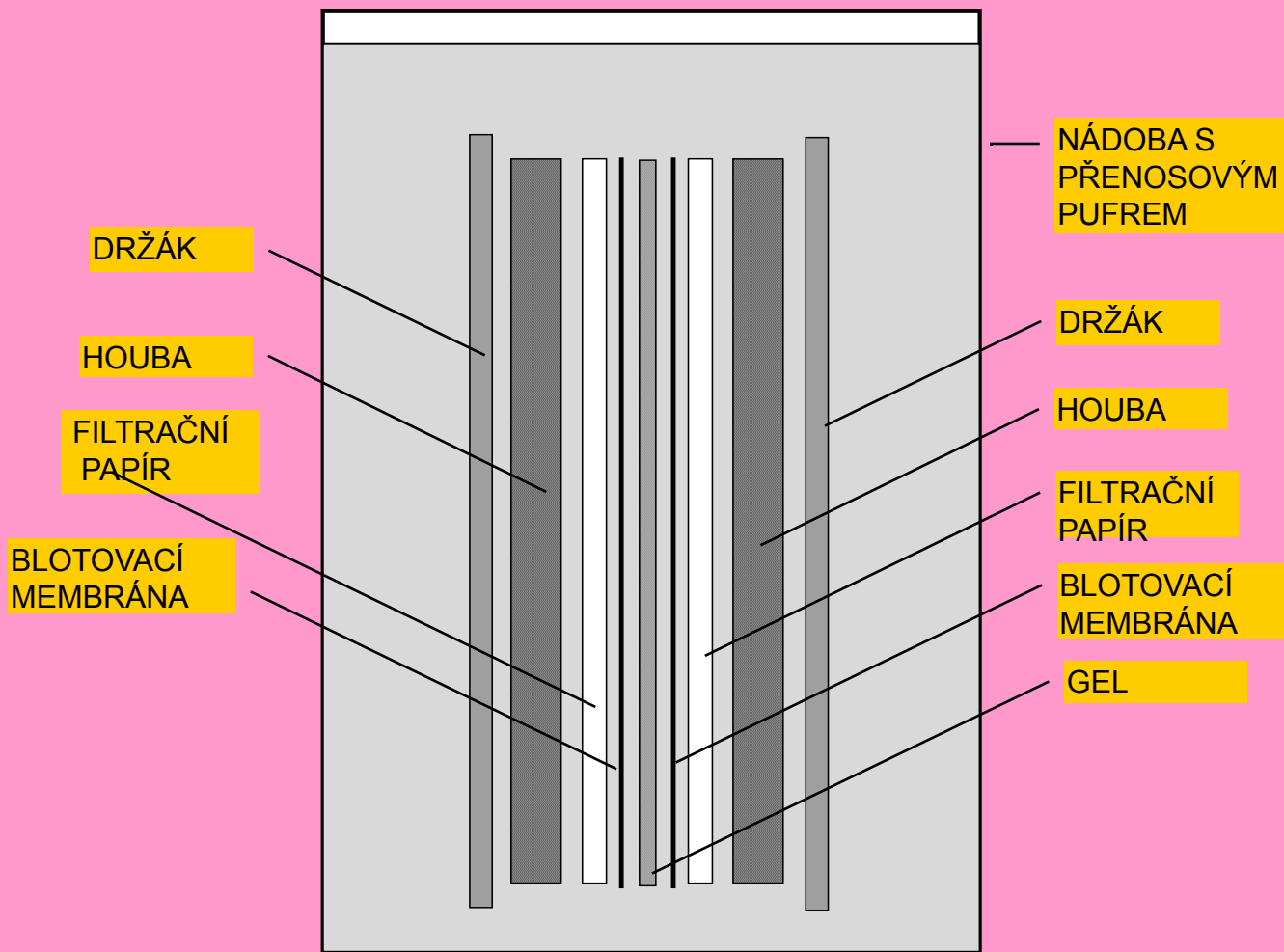
Imunodetekce



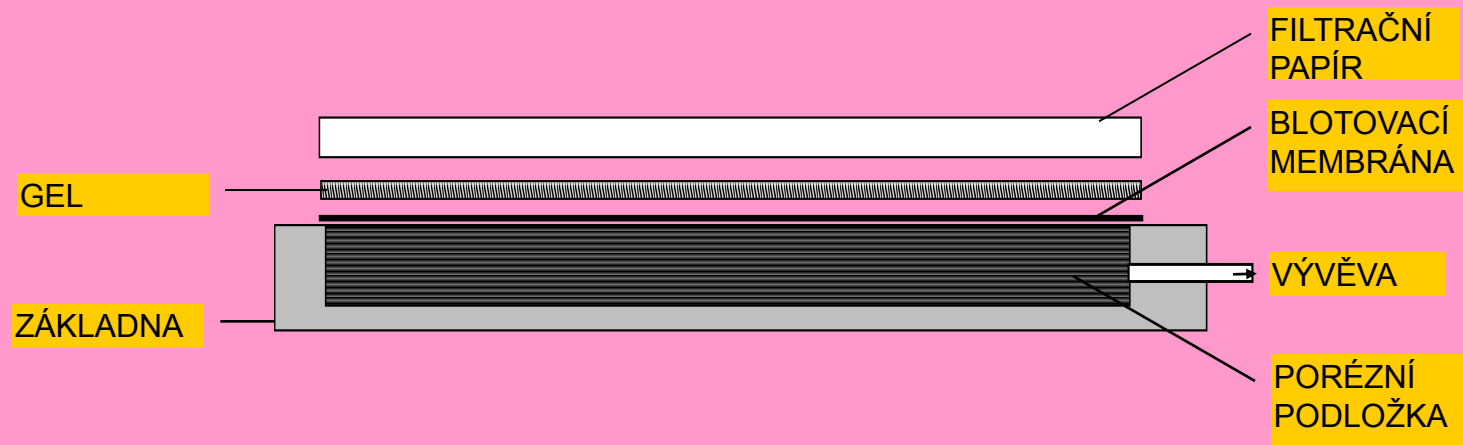
Blotting

- Southern – DNA
- Northern – RNA
- Western - bílkoviny

Difuzní blotting



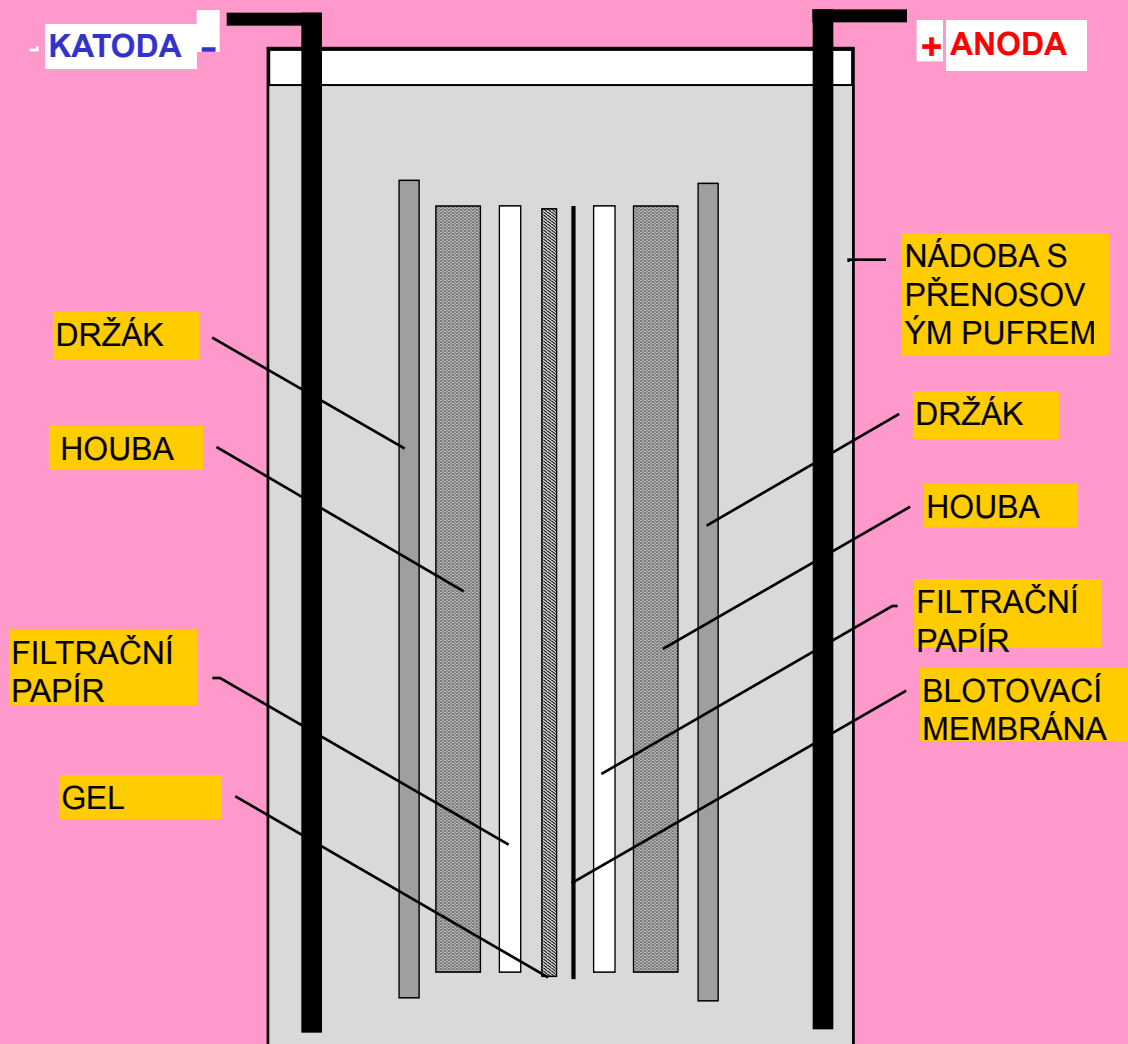
Vakuový blotting



Kapilární blotting



Tankový elektroblotting



Tankový elektroblotting

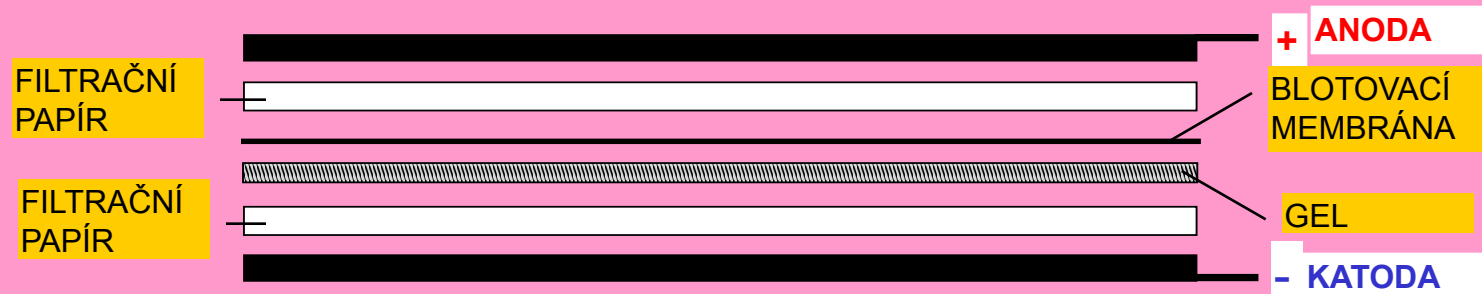


Tankový elektroblotting

Mini Protean Trans Blot Cell



„Semi dry“ blotting



„Semi dry“ blotting



Kapkovací dot blotting

