

Elektromigrační metody

Podstata

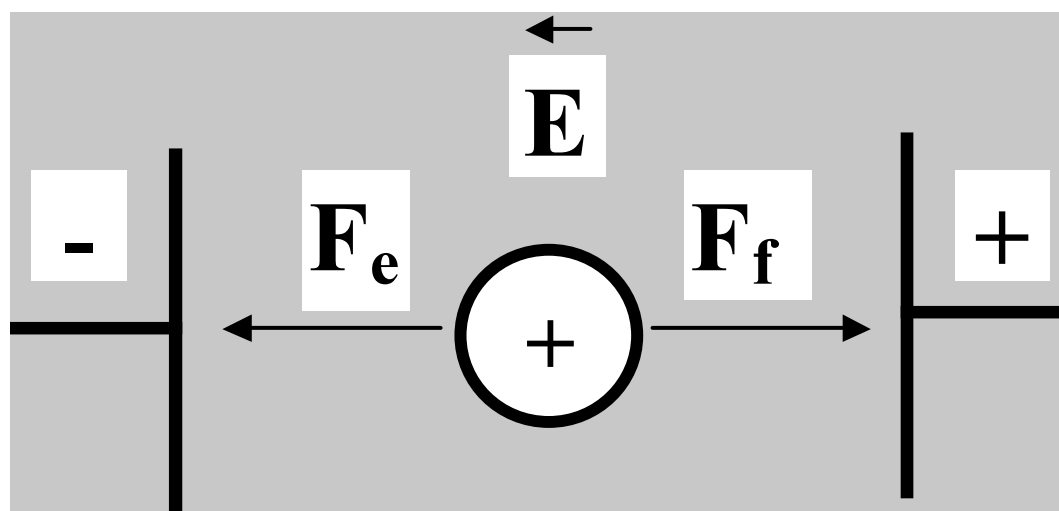
*„Pohyb elektricky nabitých částic
v elektrickém poli“*

Historický přehled

- 1880** - první elektroforetické separace **Smirnow, Hardy**
- 1897** - regulační funkce **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

$$F_e = E \times Q$$

E = intenzita elektrického pole [V/m]

Q = náboj částice = $z_i \times e$ []

Frikční síla F_f

$$F_f = v \times f$$

v = rychlost částice

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

Ustálený stav

$$E \times Q = v \times f$$



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

mobilita $\implies \mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{f} \quad [\text{m}^{-2} \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$

Sekundární jevy

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

Jouleovo teplo

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

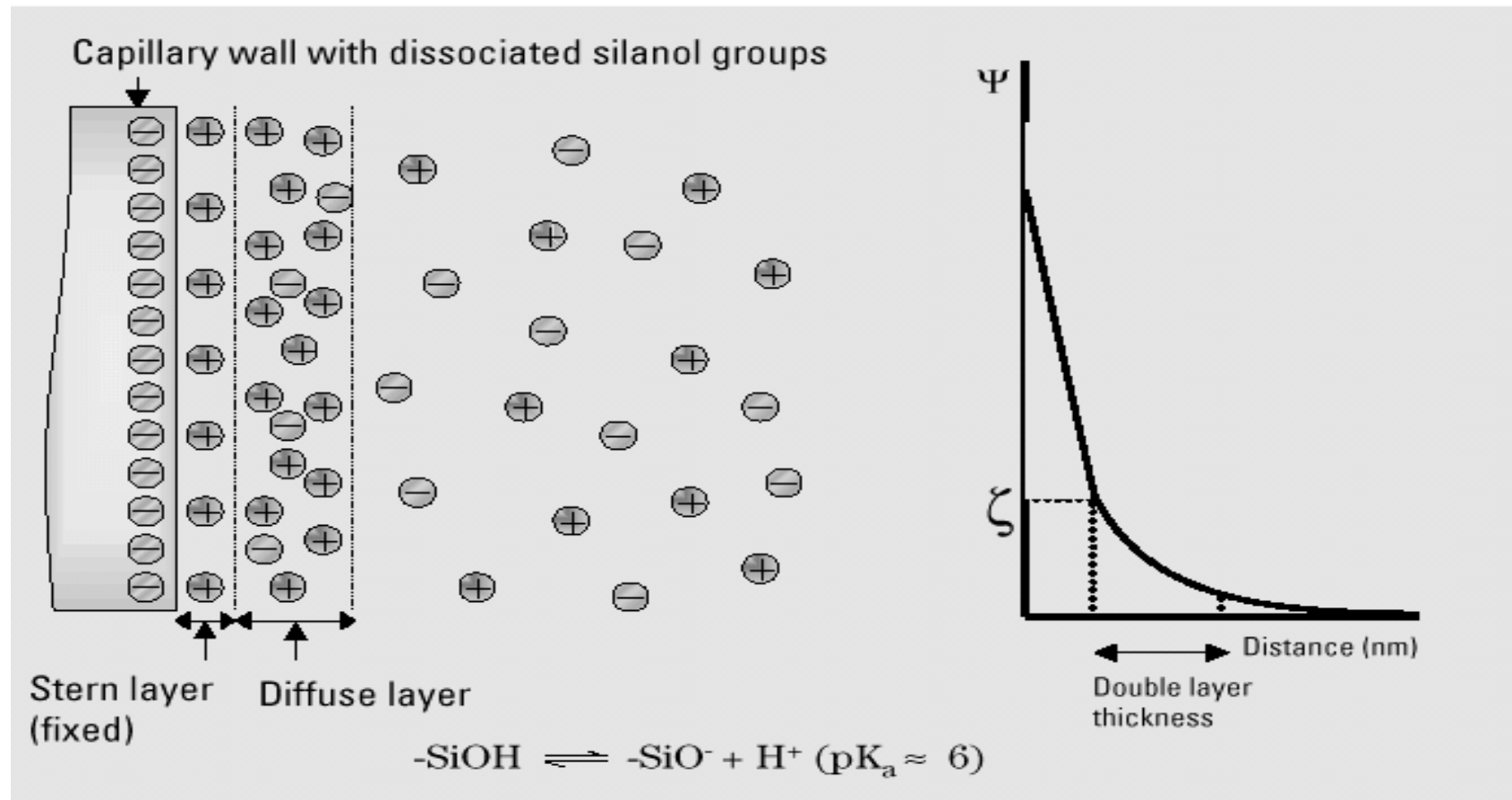
$P = \text{výkon [W.m}^{-3}\text{]}$

$S = \text{průřez [m}^2\text{]}$

$\kappa = \text{vodivost [\Omega}^{-1}\text{.m}^{-1}\text{]}$

$i = \text{elektrický proud [A]}$

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



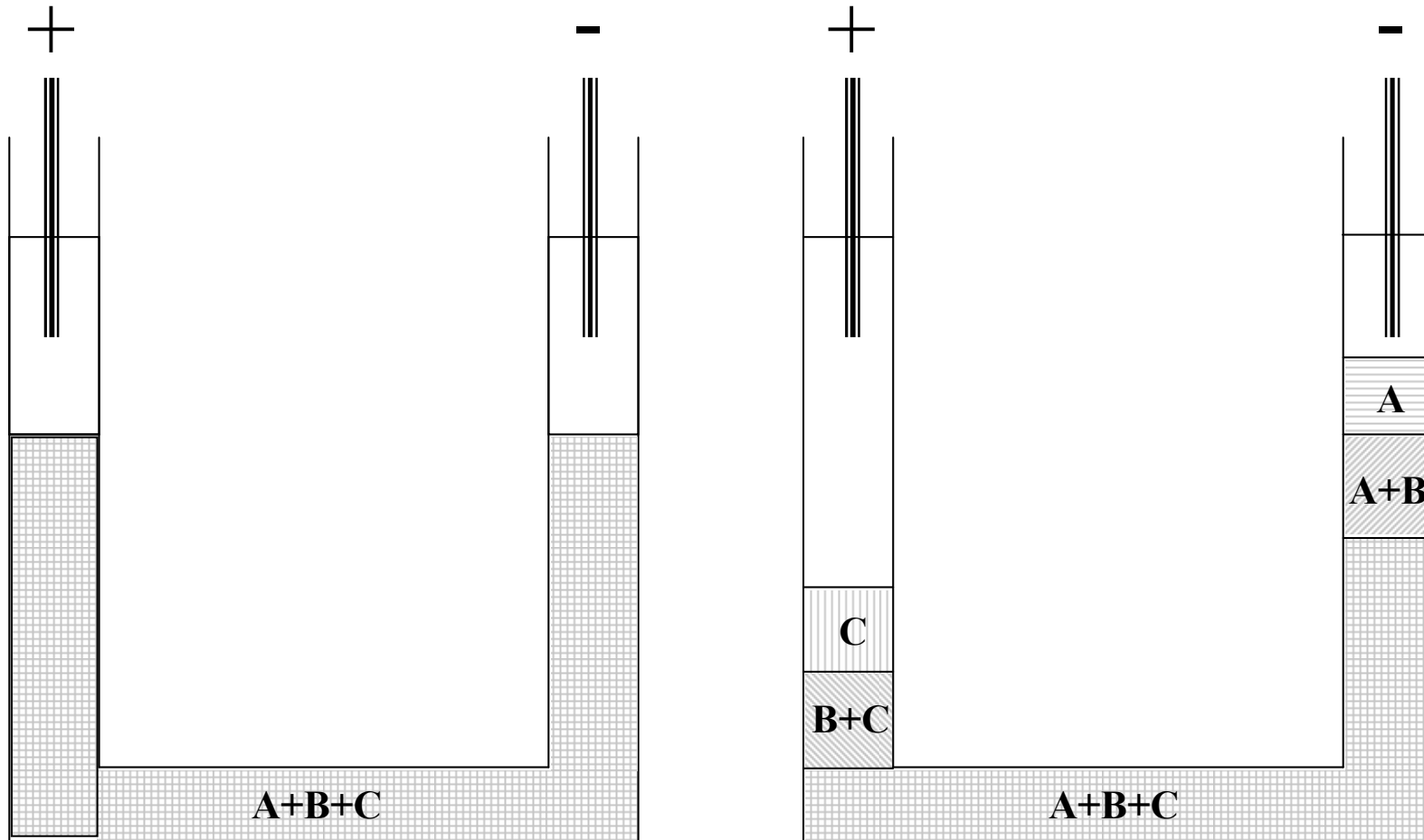
Elektroforéza

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

Elektroforéza

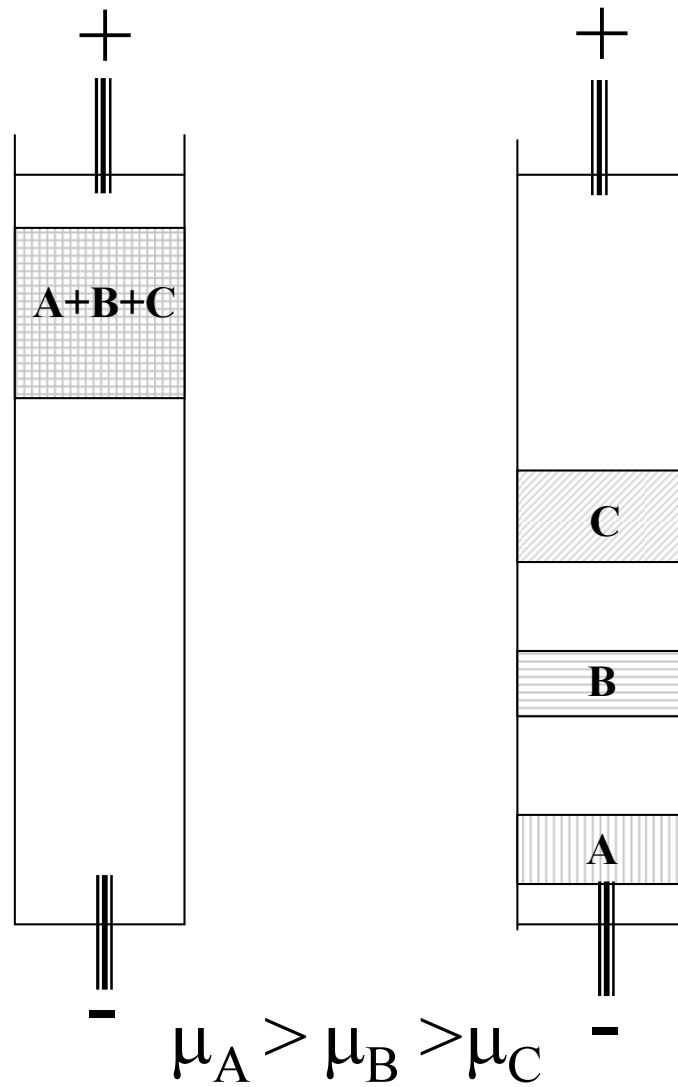
- Volná
- Zónová

Volná elektroforéza



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

Zónová elektroforéza



Stabilizace

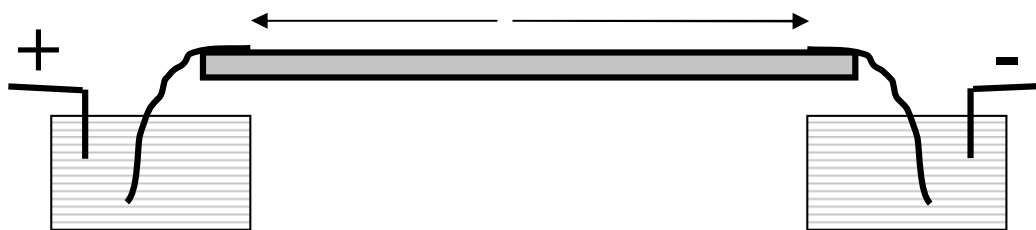
- Rotací
- Gradienty hustoty
- Porézními medii
- Kapilárou

Požadavky na porézní media

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

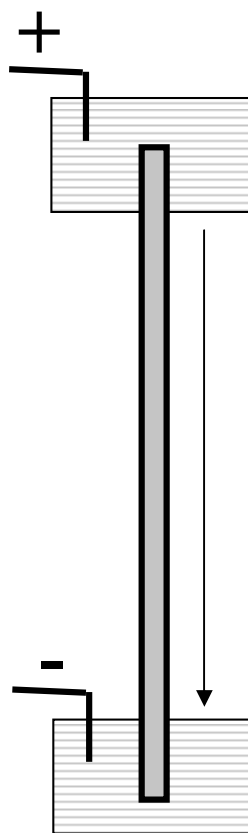
Upořádání

Horizontální



Upořádání

Vertikální



Chromatografický papír

Složení – celuloza

- 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

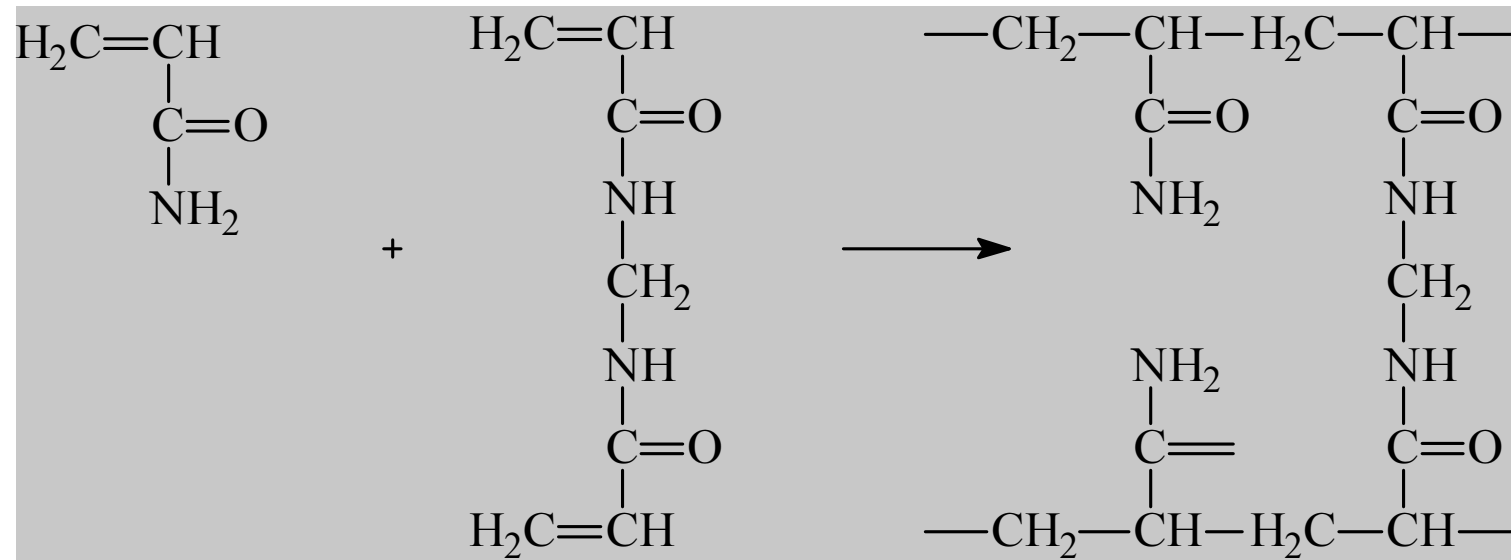
Polyakrylamid

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.

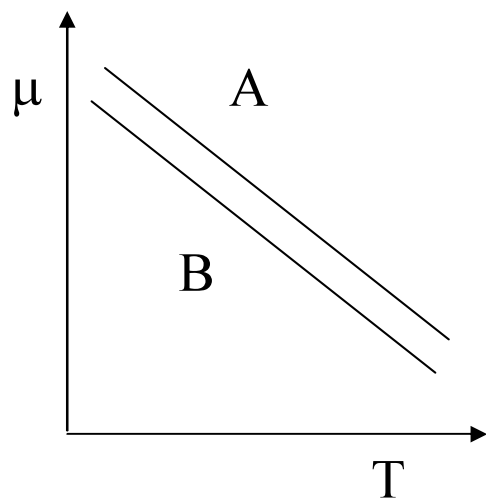
$$\log \mu = \log \mu_0 + K_r [T]$$

μ - mobilita

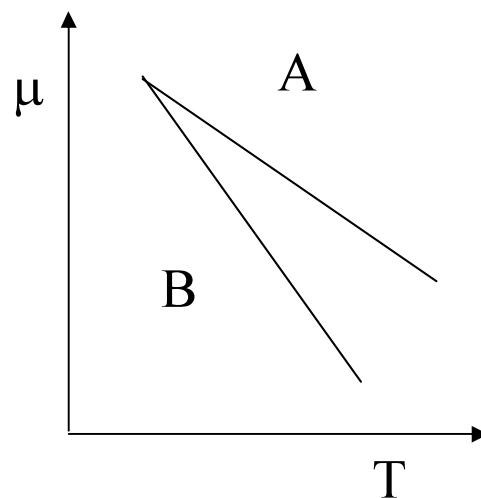
μ_0 - mobilita při limitním zředění

K_r – retardační koeficient

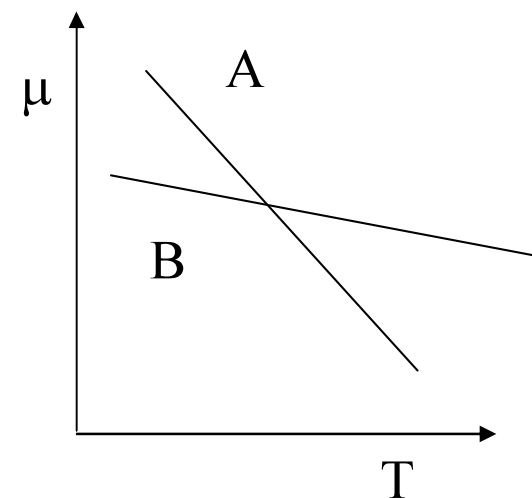
Uplatnění Fergussonovy rovnice



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



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



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

Provedení PAGE

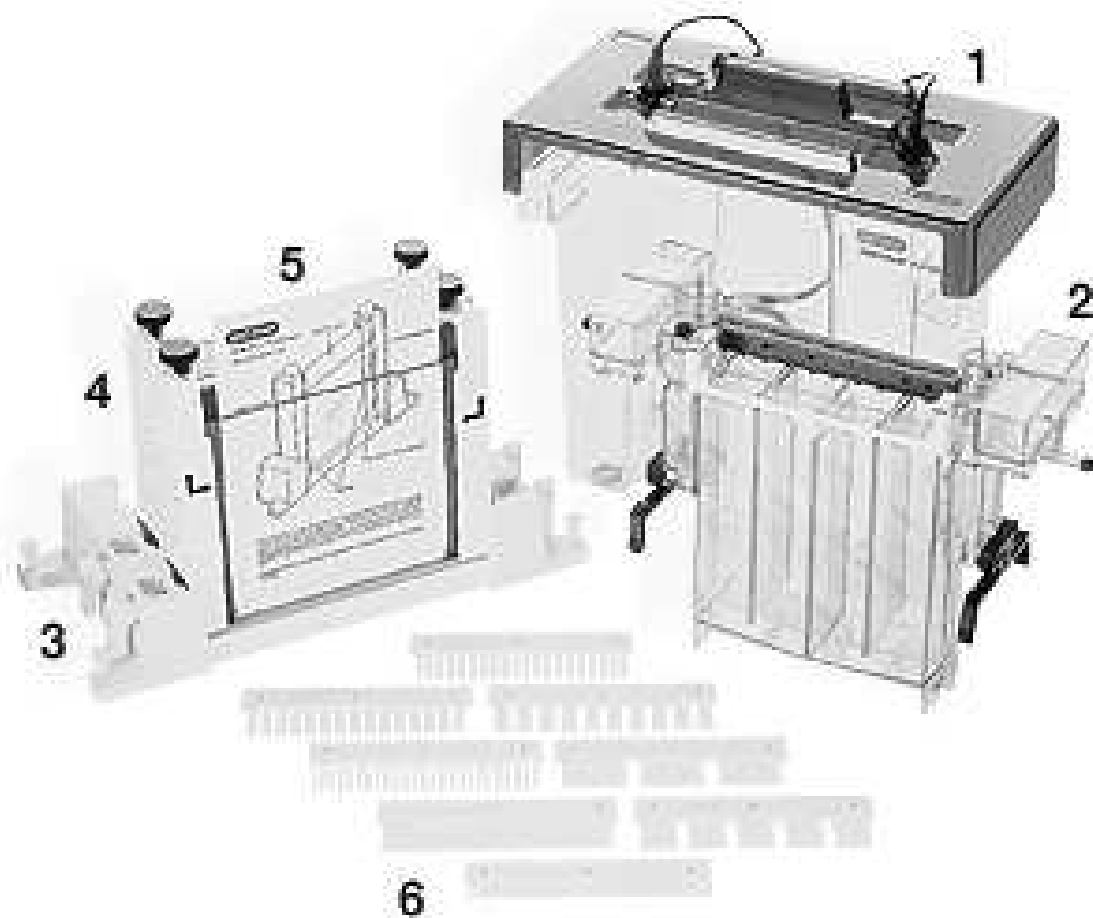
vertikální x horizontální

deskové x trubičkové

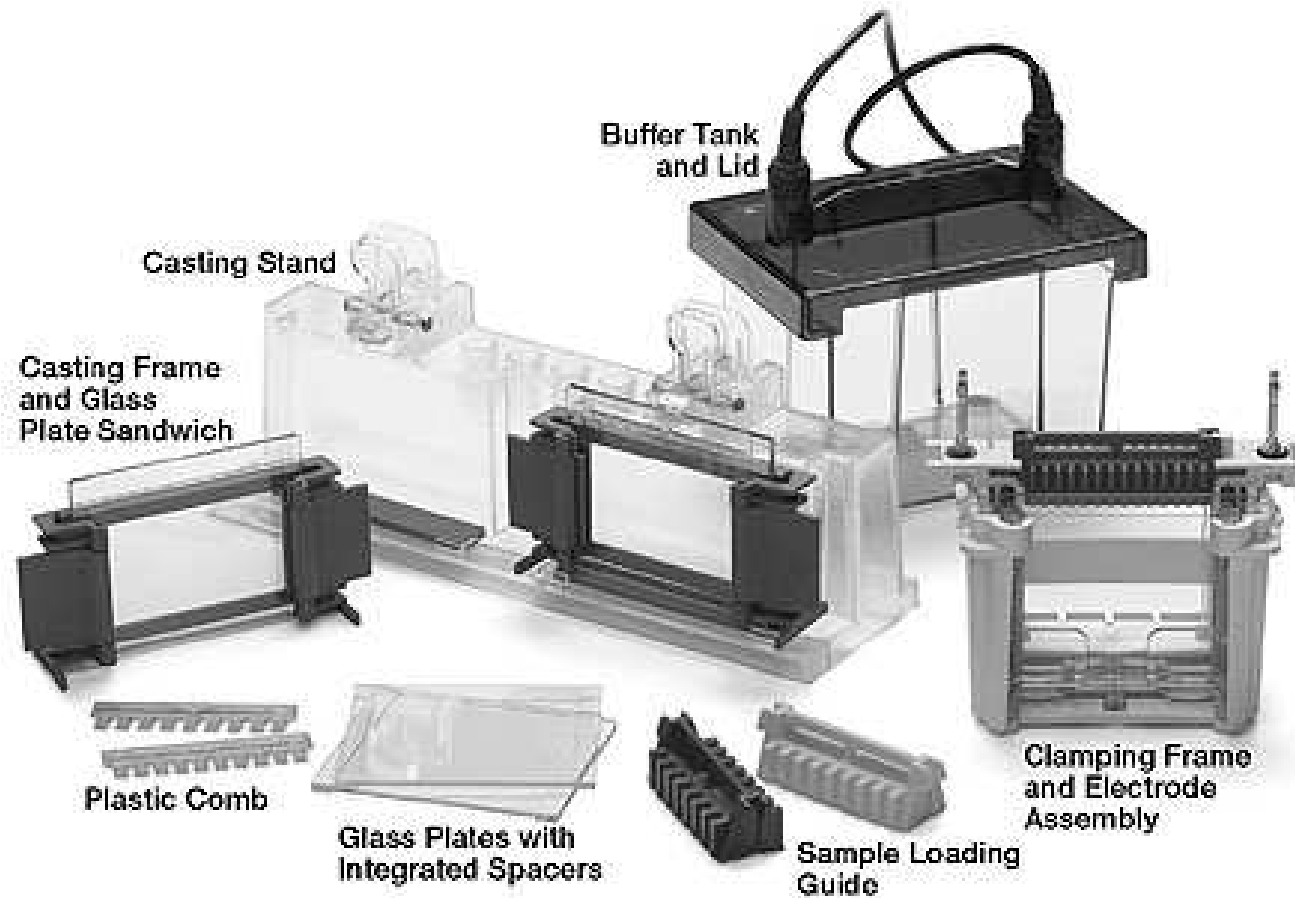
homogenní x gradientové

kontinuální x diskontinuální

Provedení PAGE

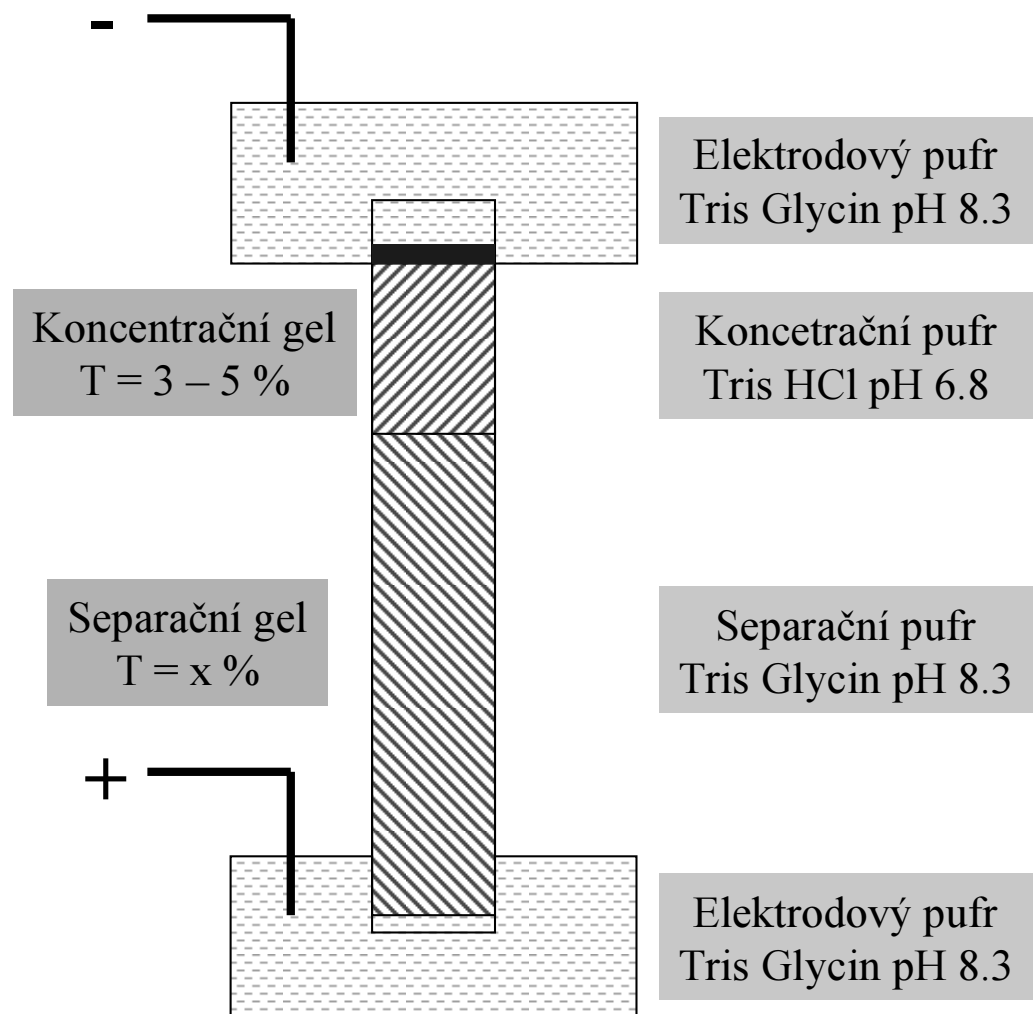


Provedení PAGE

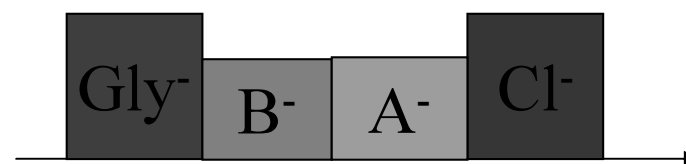


Diskontinuální PAGE

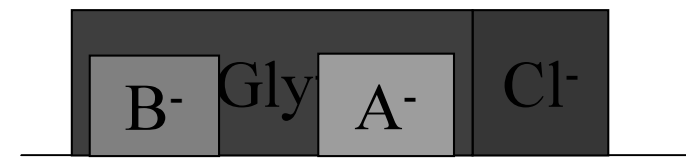
Orstein, Davis



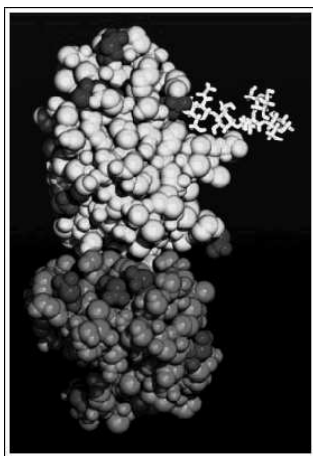
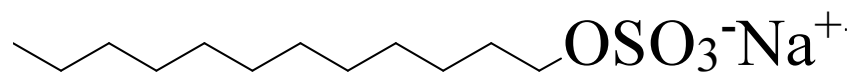
Koncentrační gel
Izotachoforéza



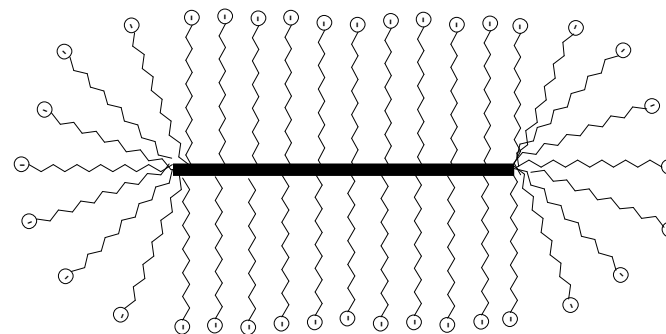
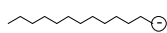
Separační gel
Zónová elektroforéza



SDS PAGE

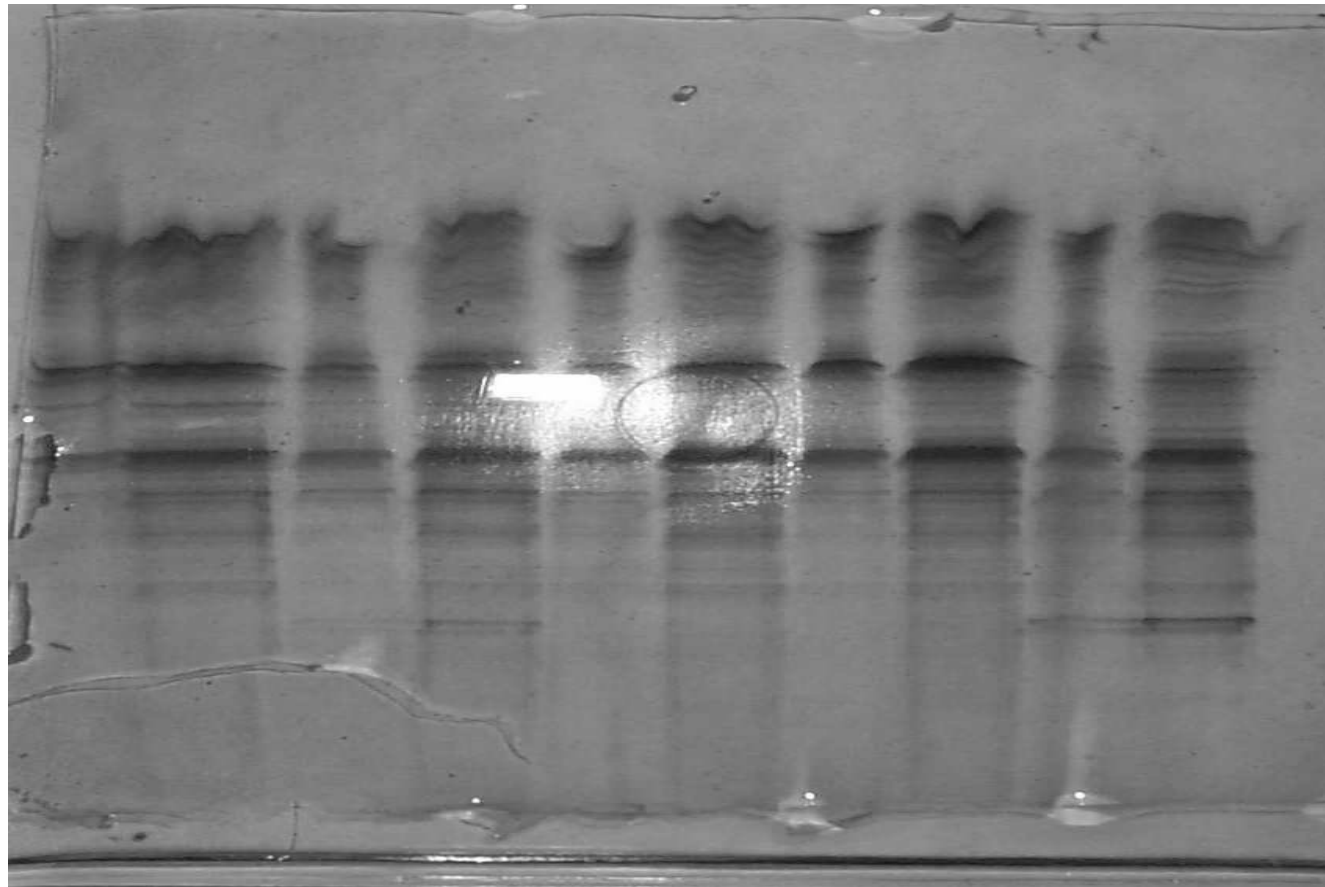


+

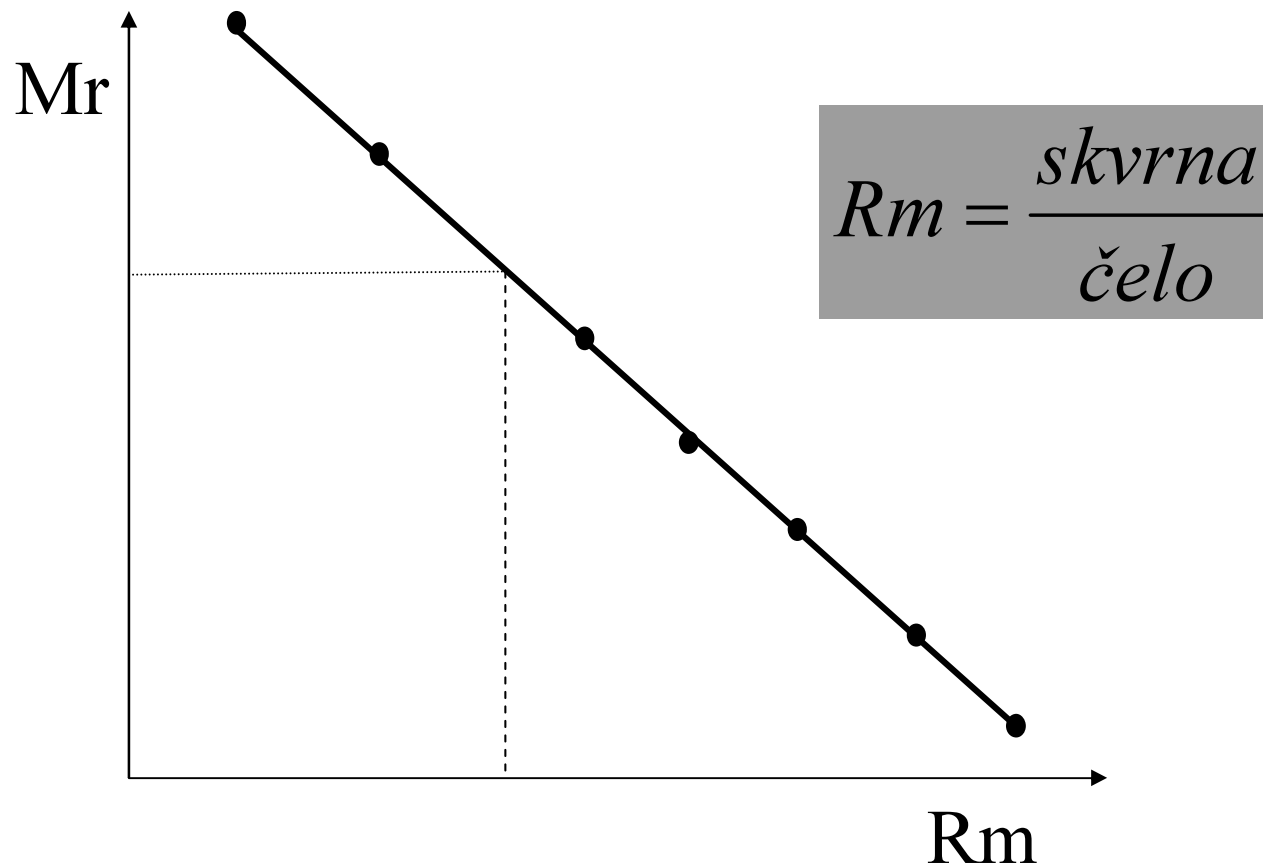


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

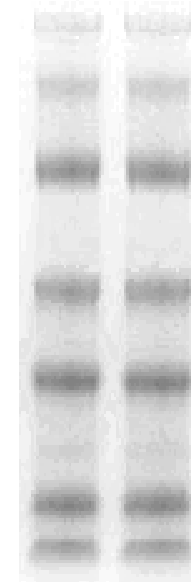
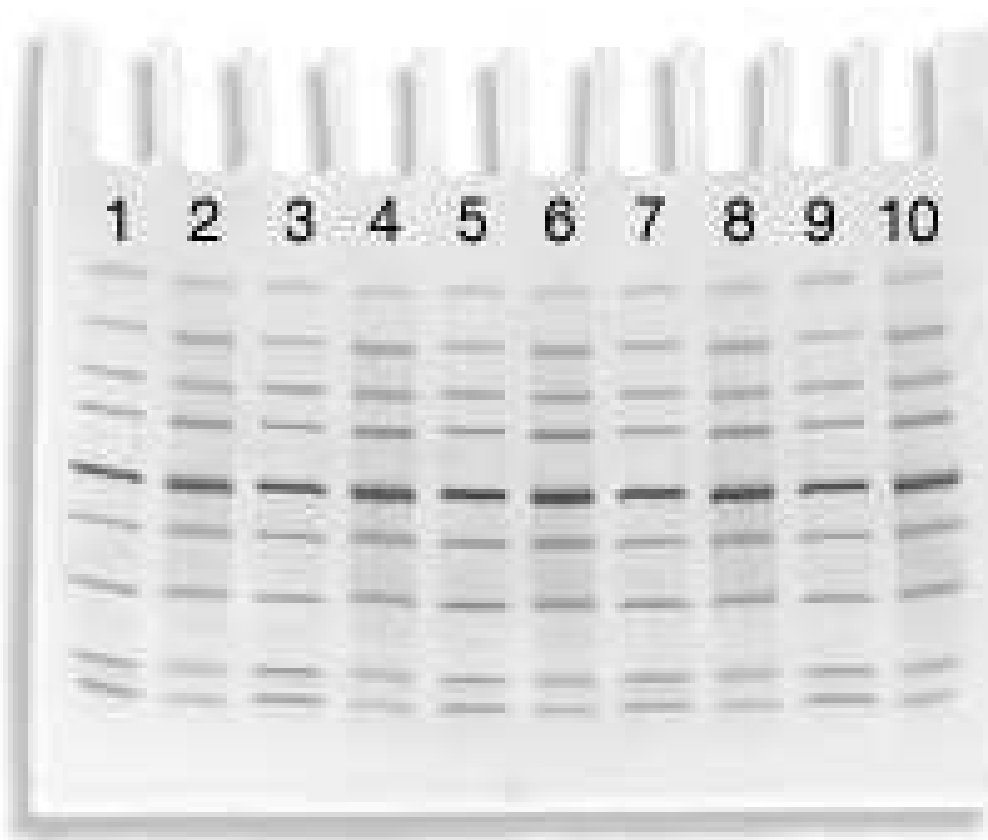
SDS PAGE



Stanovení Mr pomocí SDS PAGE

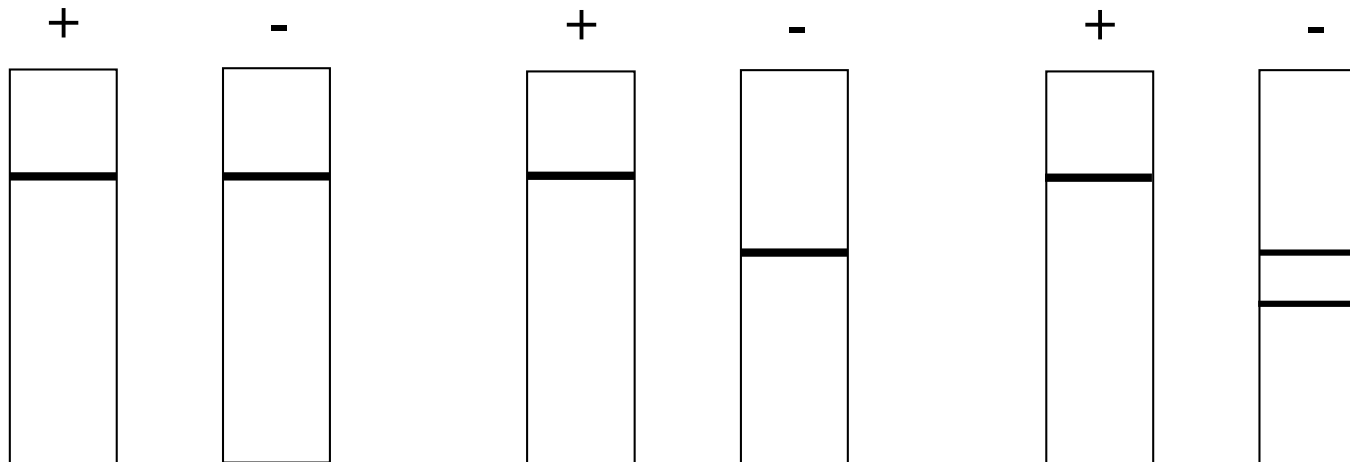


Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy

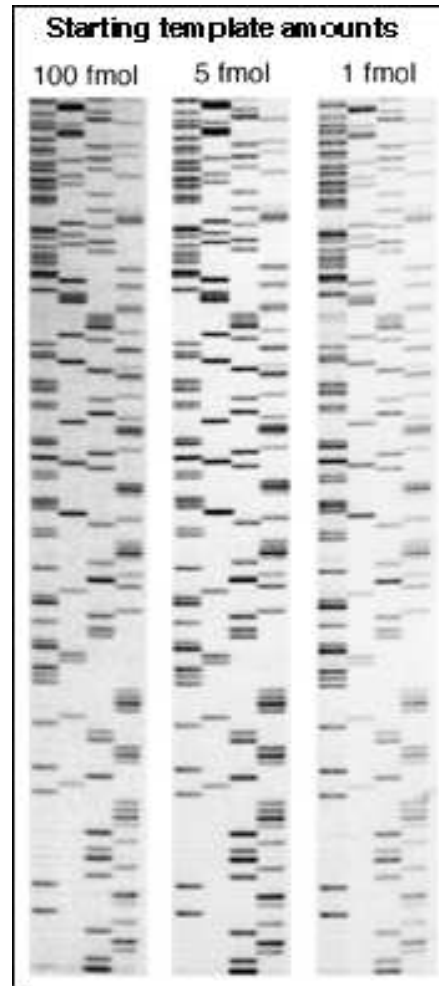


Použití SDS PAGE

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

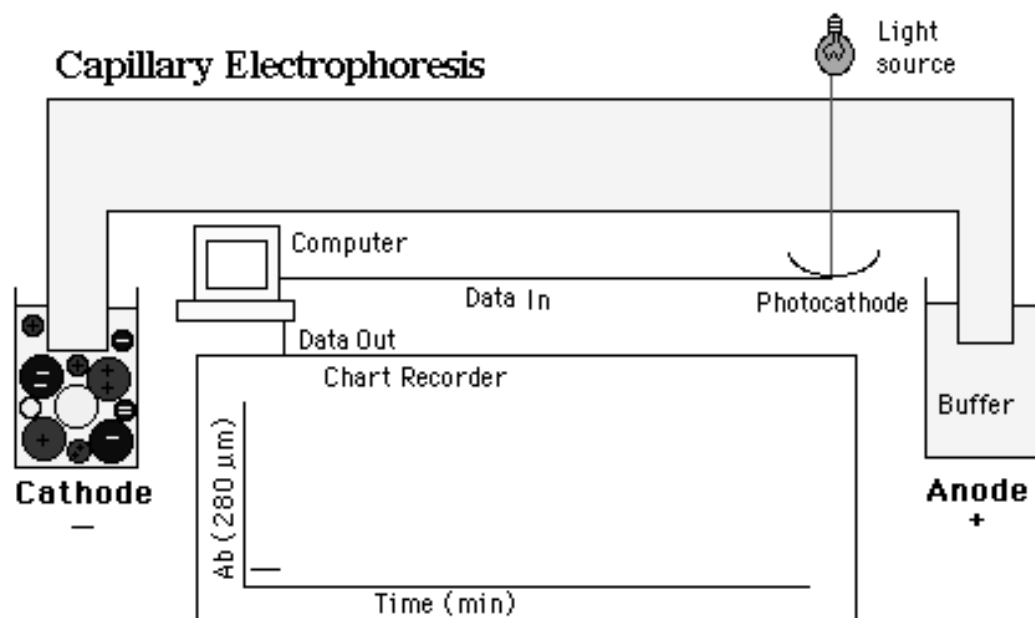


PAGE - sekvenace DNA



Kapilární zónová elektroforéza

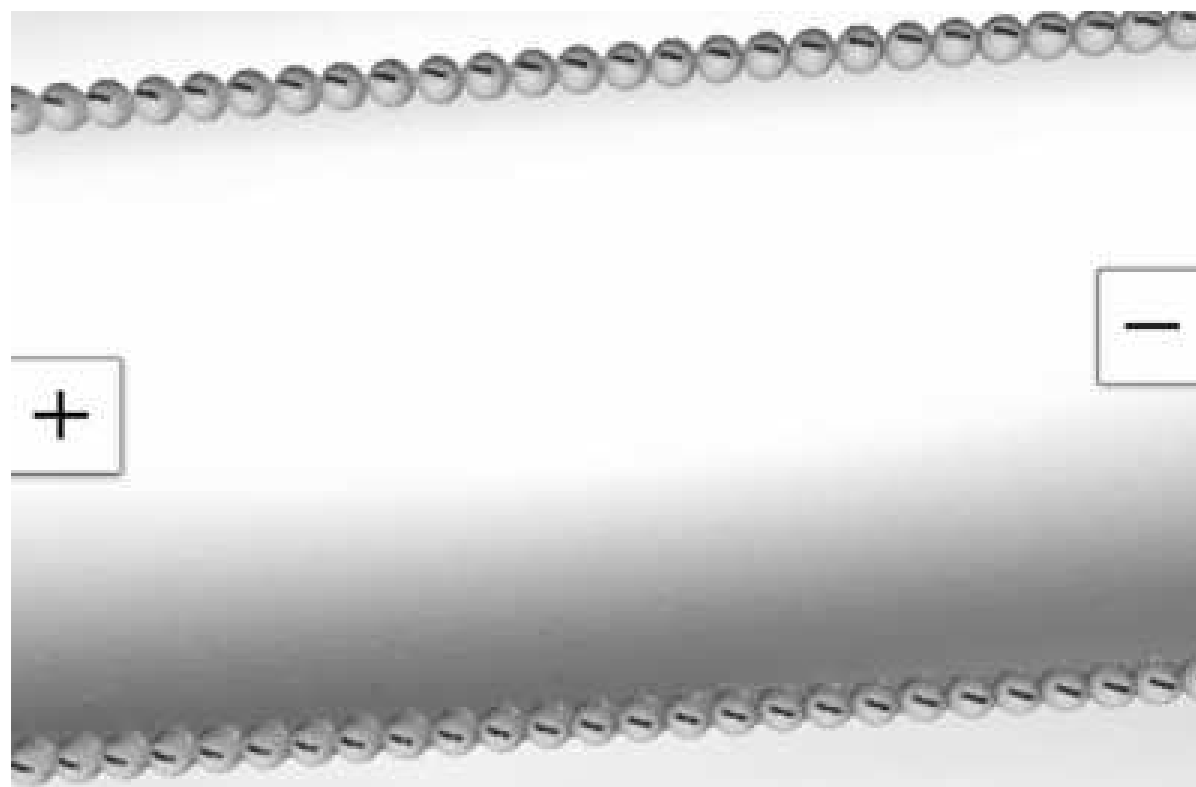
CZE



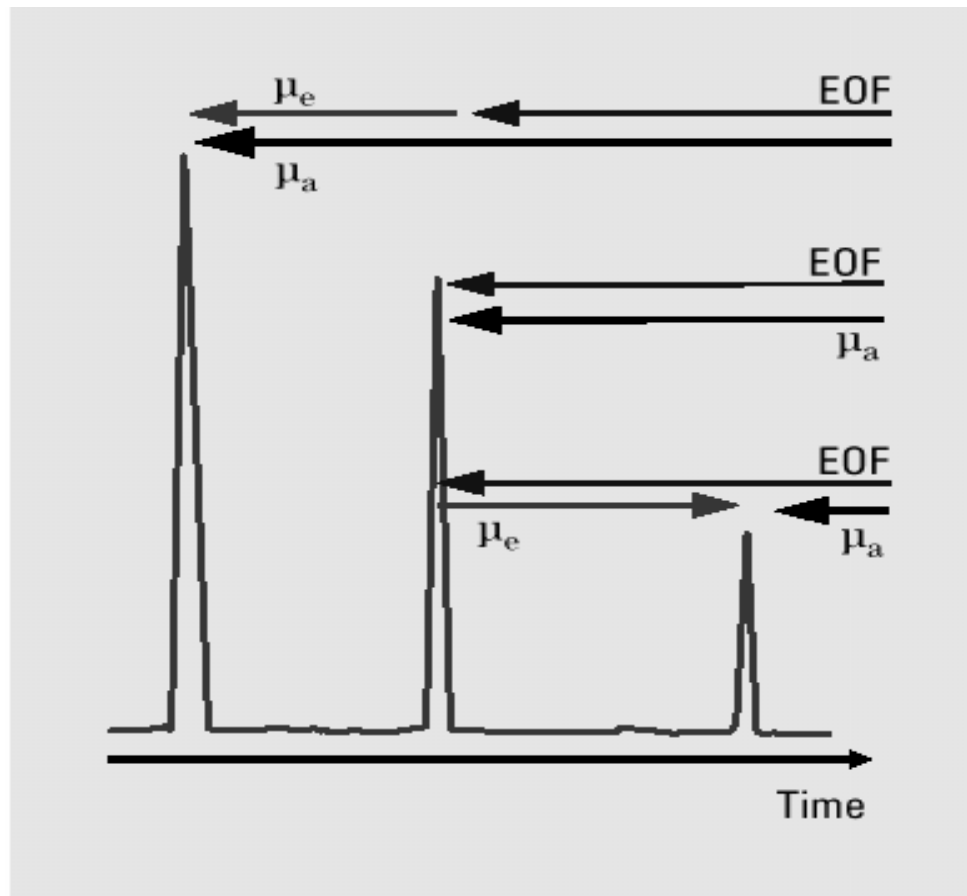
Módy CZE

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

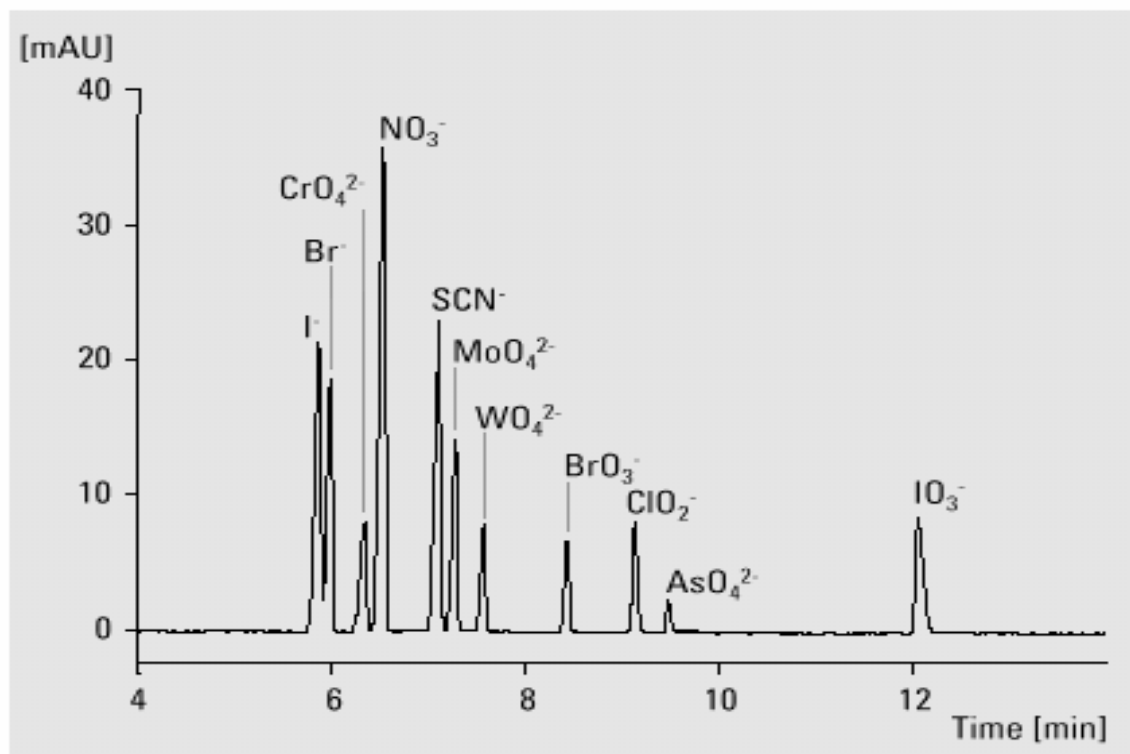
anion — negative μ_e

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

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

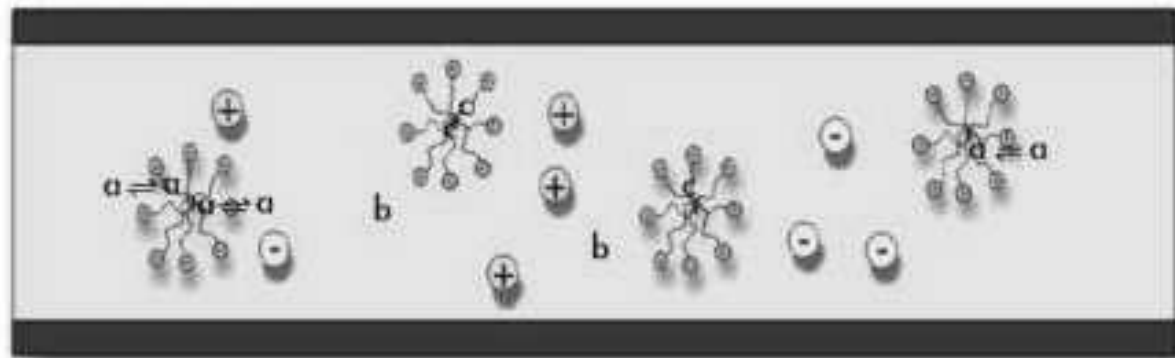
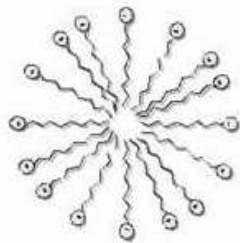
Detection

Signal 200, 10 nm

Reference 450, 80 nm

Princip MEKC

Micela

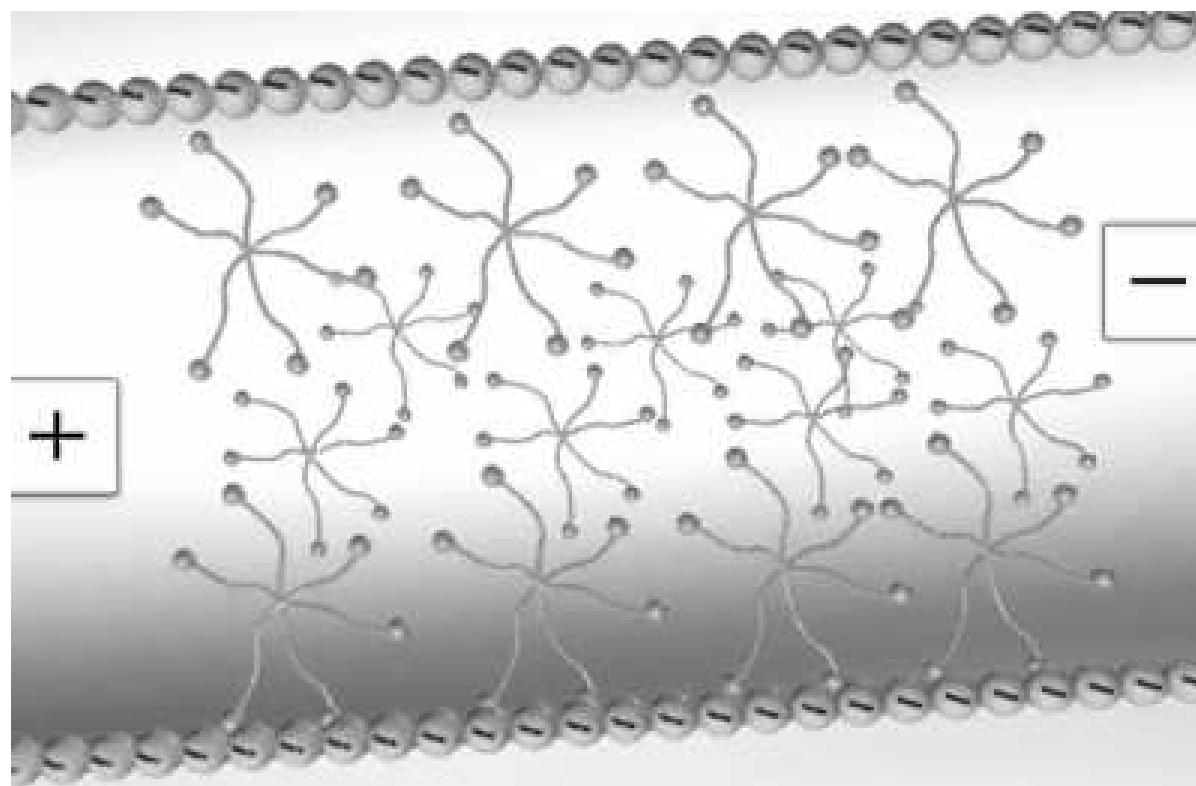


a – střed – rozpustná v obou

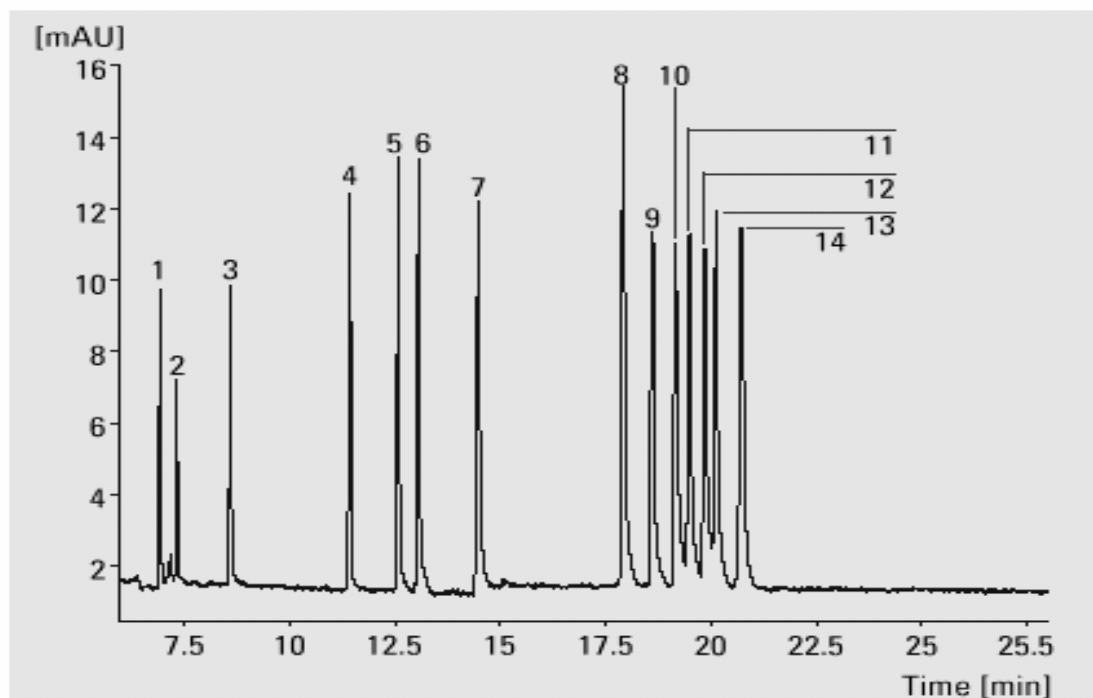
b – silně hydrofilní – nerozpustná v
micelle

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 μm BF 3

Injection

20 mbar · s

Electric Field

465 V/cm

Temperature

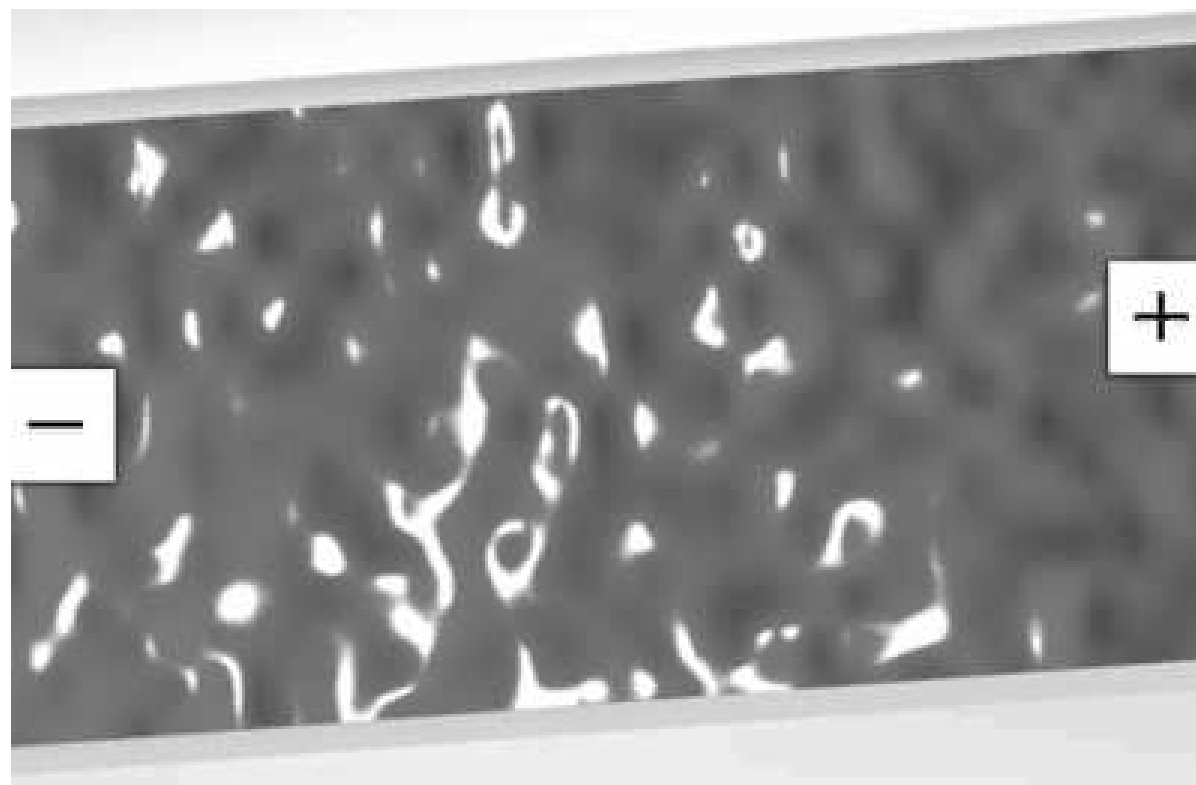
Capillary 12 °C

Detection

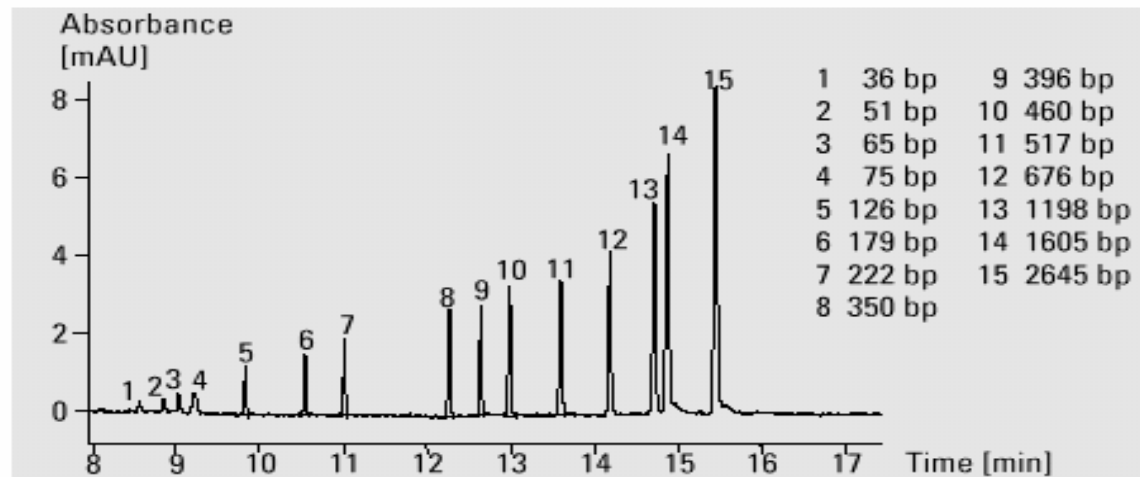
Signal 200/10 nm

Reference 350/80 nm

Kapilární gelová elektroforéza



CGE fragmentu dsDNA



Capillary:
CEP Coated Capillary,
l/ L 40/48.5 cm, i.d. 75 μ m

Sample:
pGEM DNA Markers, 1 μ g/ μ L

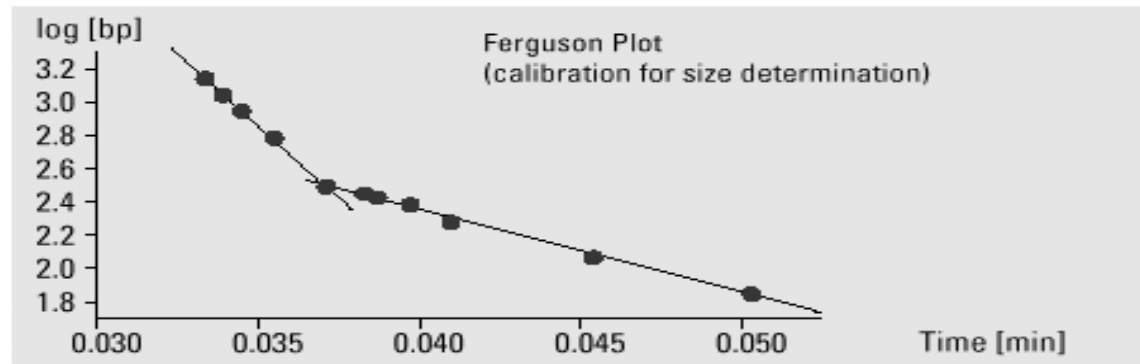
Buffer:
DNA Buffer + 1.5%

Electrokinetic Injection:
-5 kV, 4 s

Voltage:
-16.5 kV

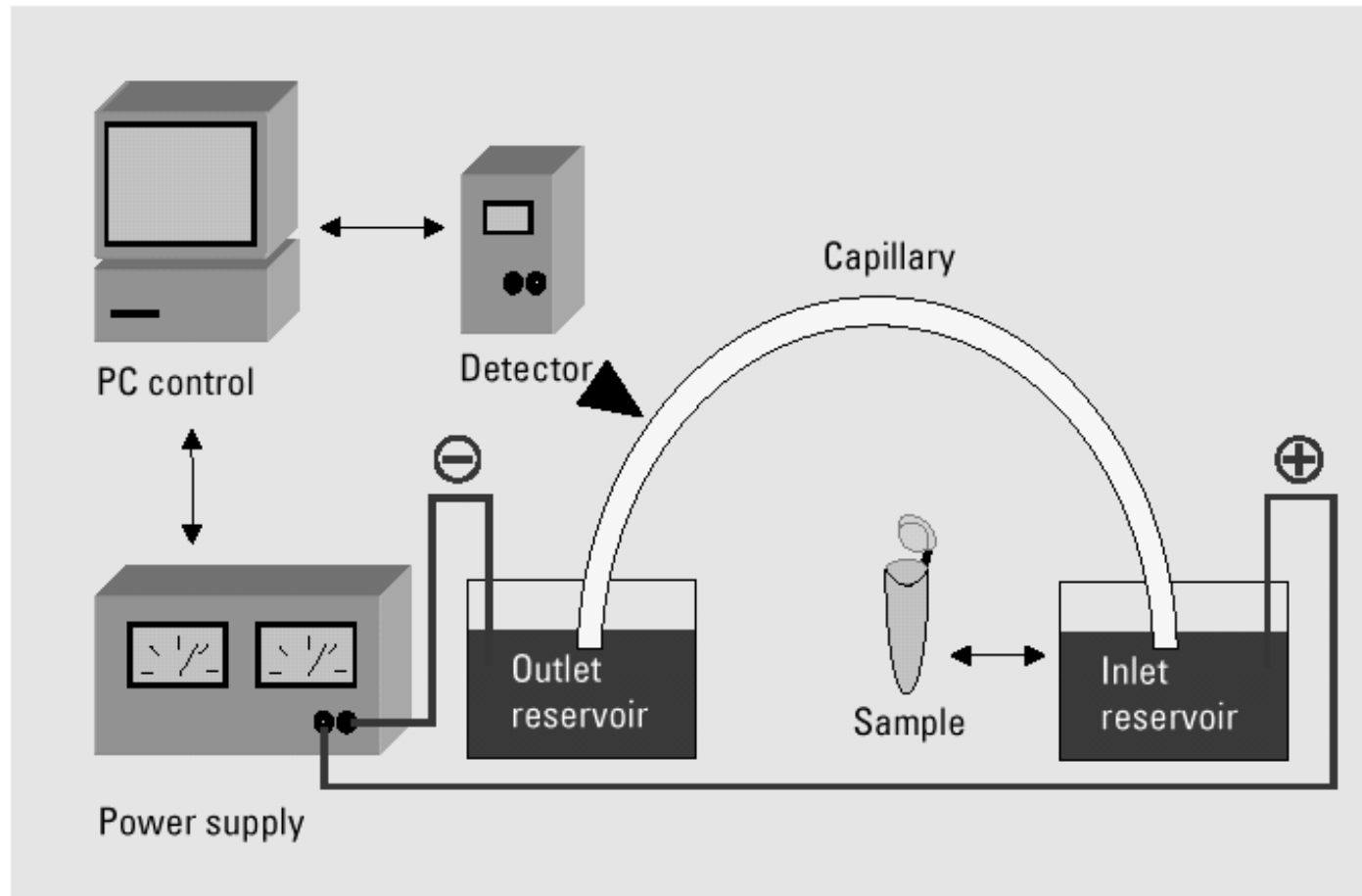
Temperature:
25 $^{\circ}$ C

Detection:
260 nm with DAD filter for
260 nm
(optional)



Instrumentace CZE

Schéma zařízení pro CZE

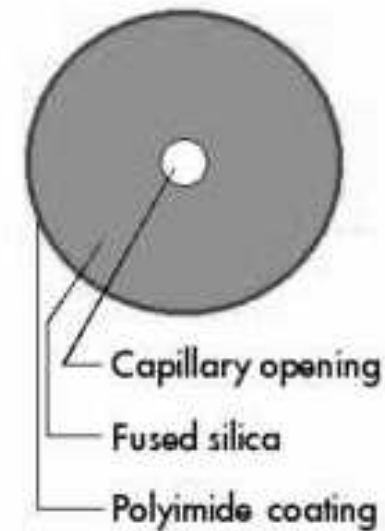


Napájecí zdroj

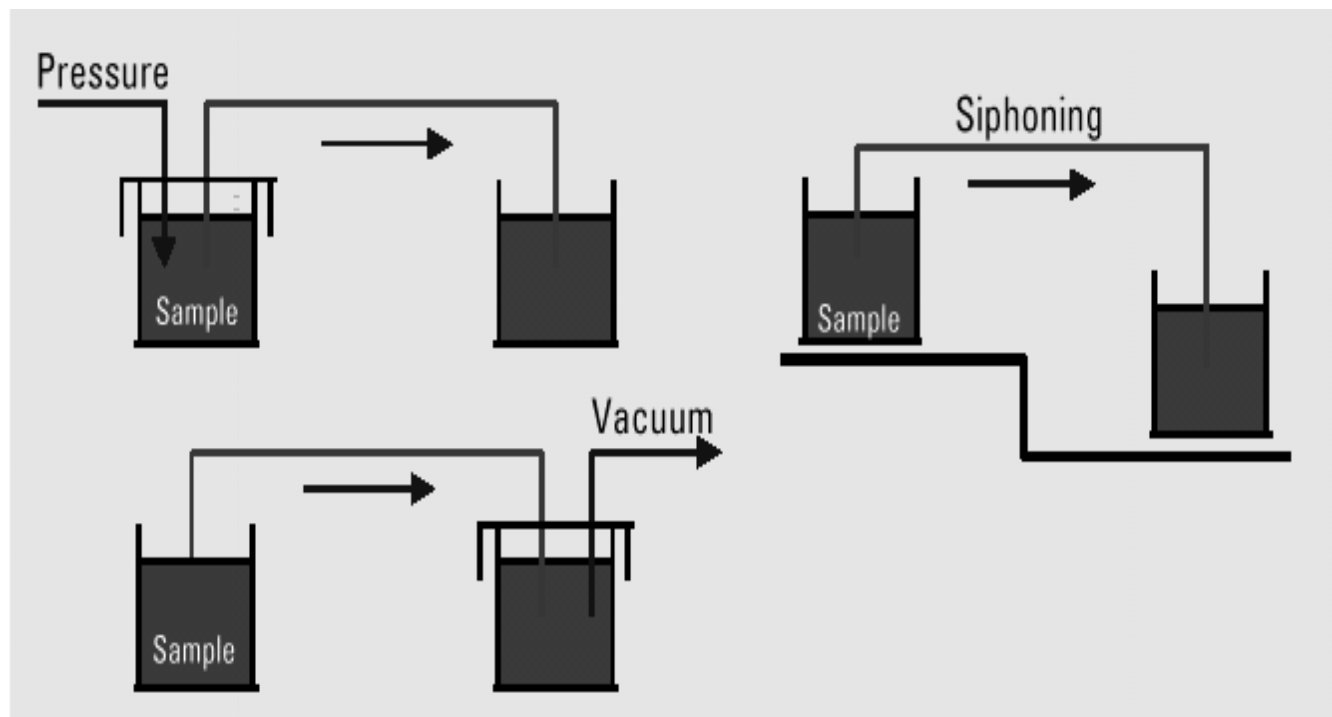
- **stabilizovaný ± 30 kV 300 μ A**
- **konstantní napětí nebo proud**
- **obojí polarita**
- **ochrana obsluhy**

Kapilára

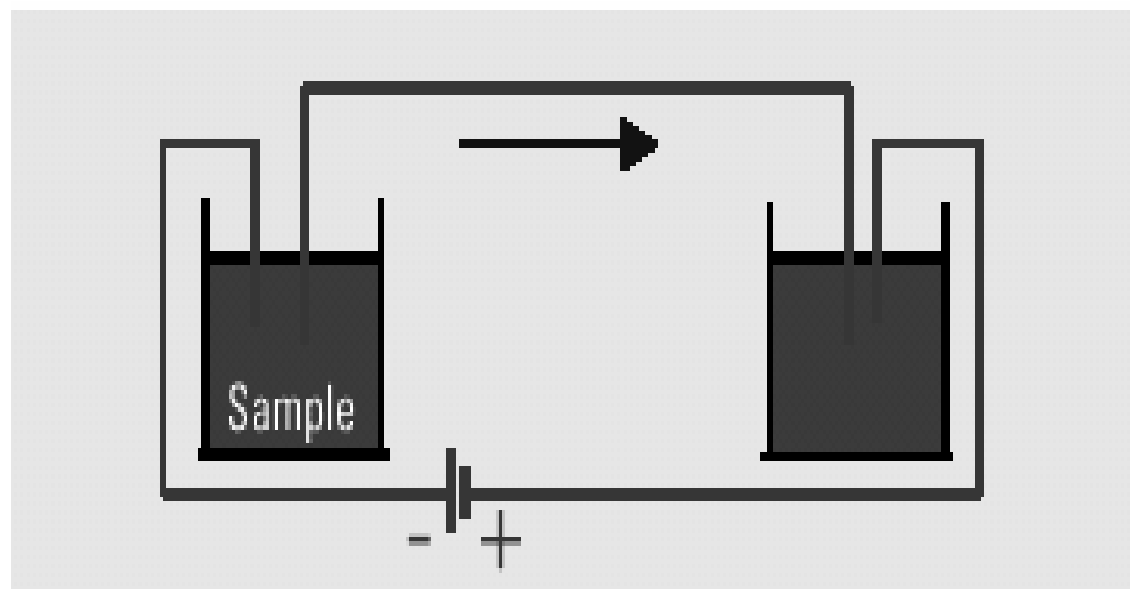
- **křemenná - 25 -100 μm i.d
- 350 μm o.d.**
- **délka až 100 cm délka**
- **polyimidové vnější pokrytí**



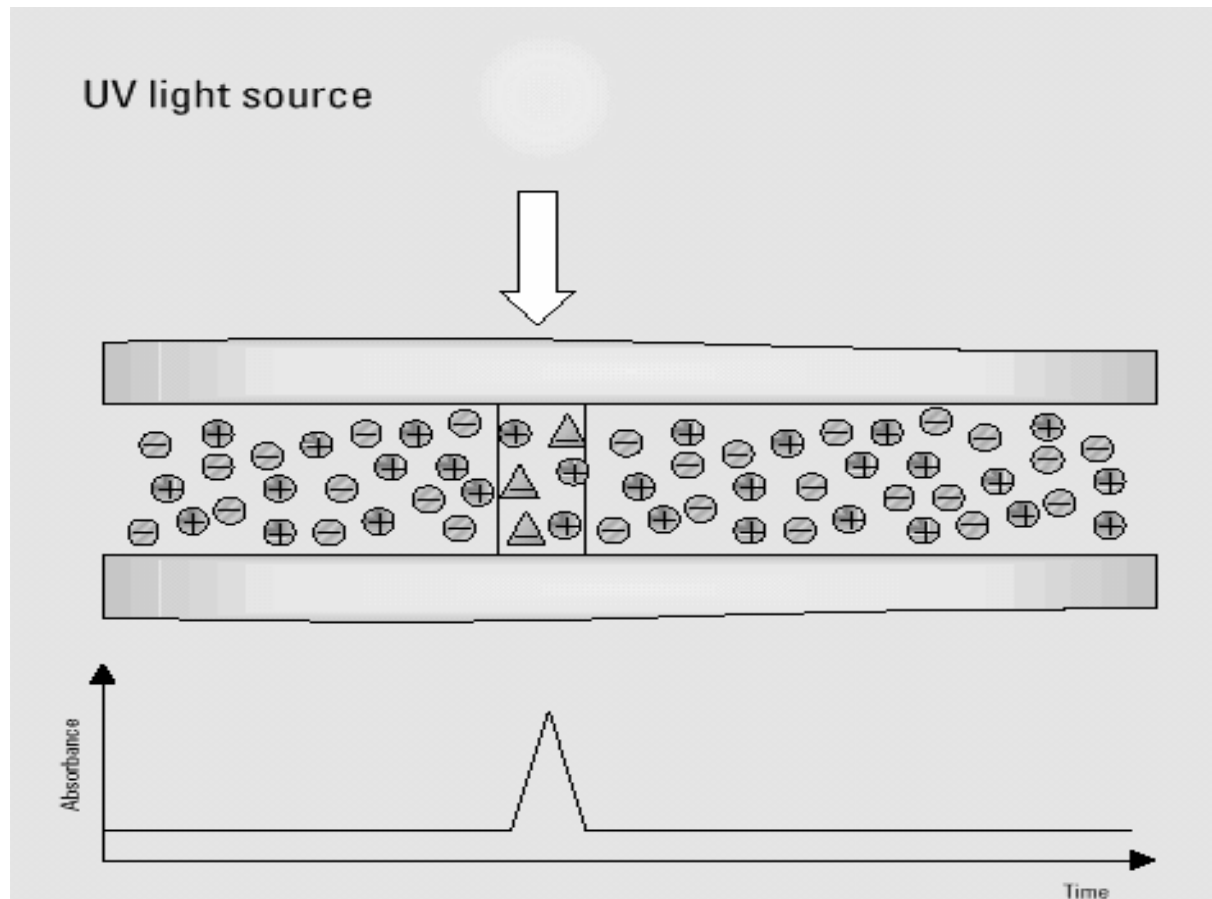
Dávkování - hydrodynamické



Dávkování - elektrokinetické



Detekce spektrofotometrická



$$\text{Abs} = \epsilon cl$$

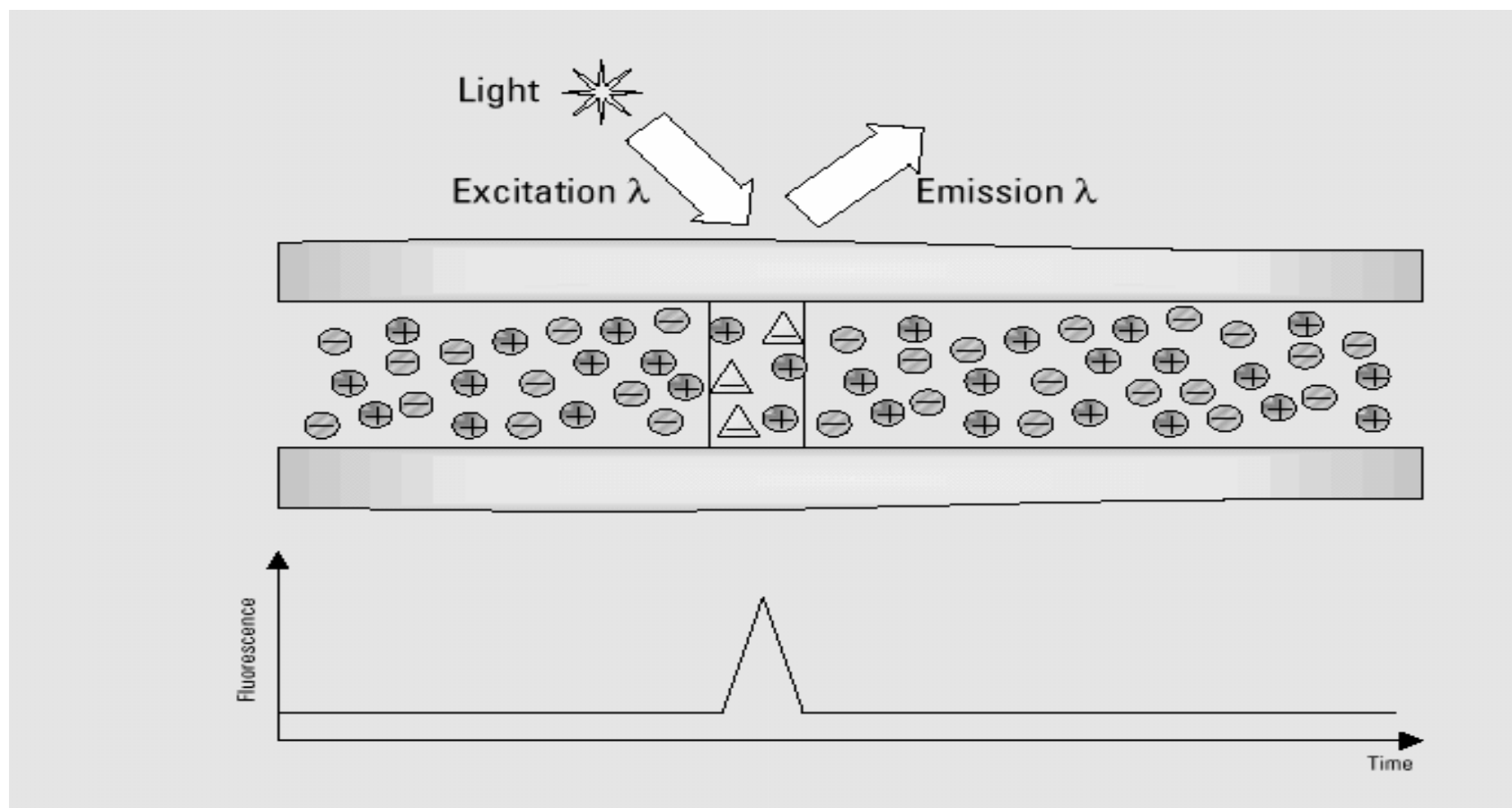
where

ϵ = molar absorptivity

c = concentration

l = pathlength

Detekce fluorescenční



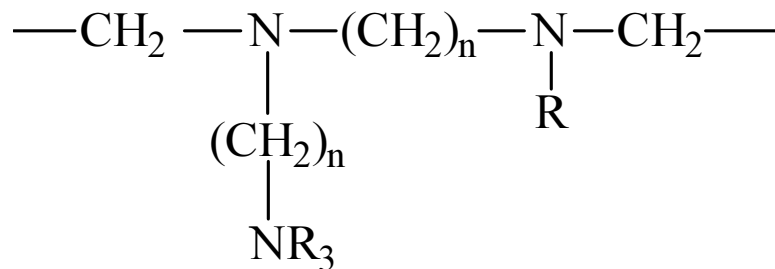
Izoelektrická fokusace

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

Tvorba gradientu

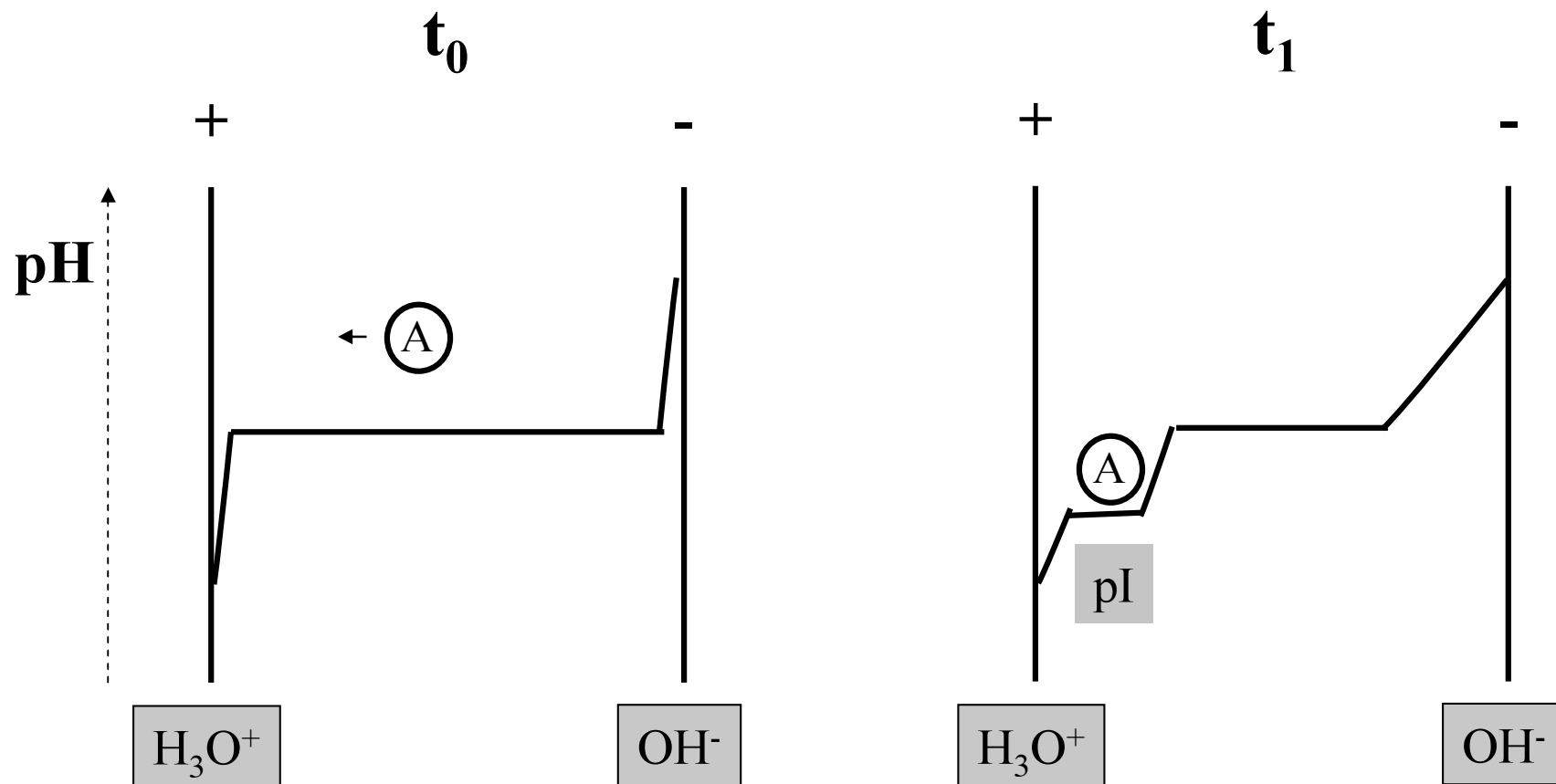


Ampholyty

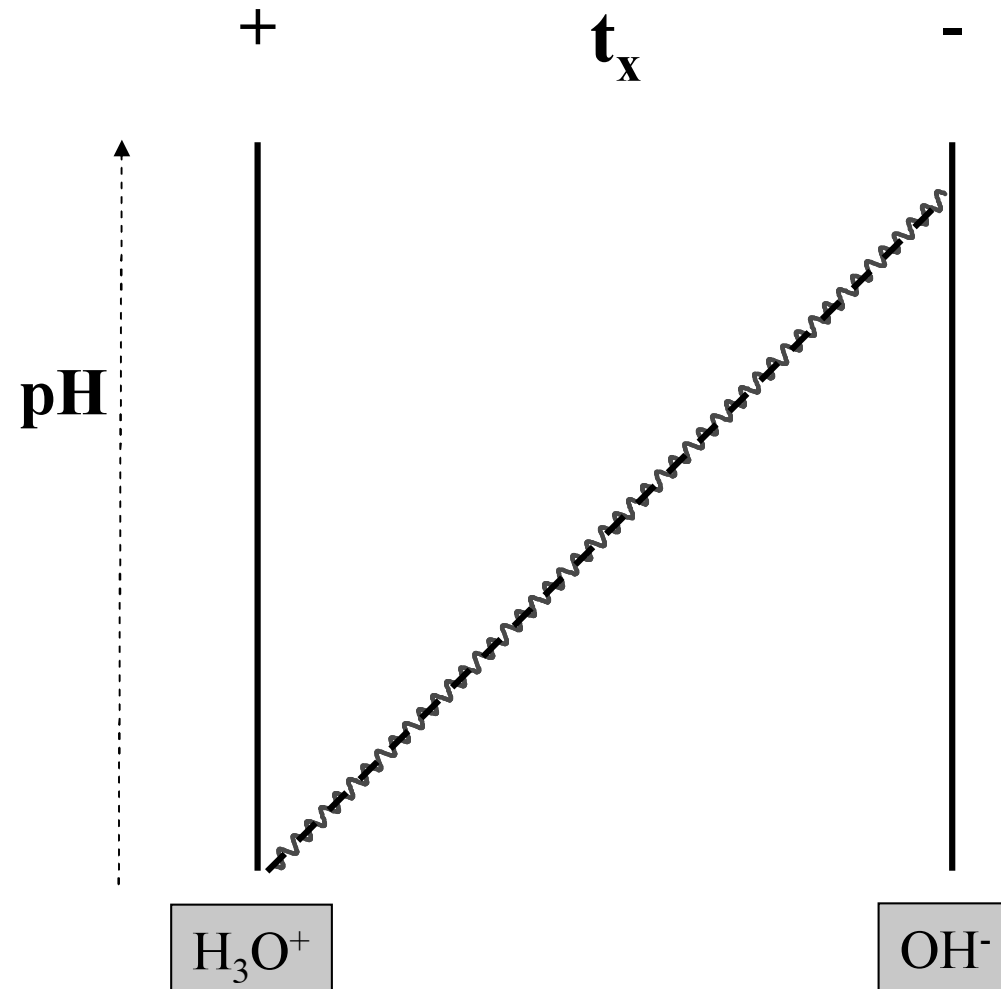


- R - CH₃
- CH₂COOH
- H

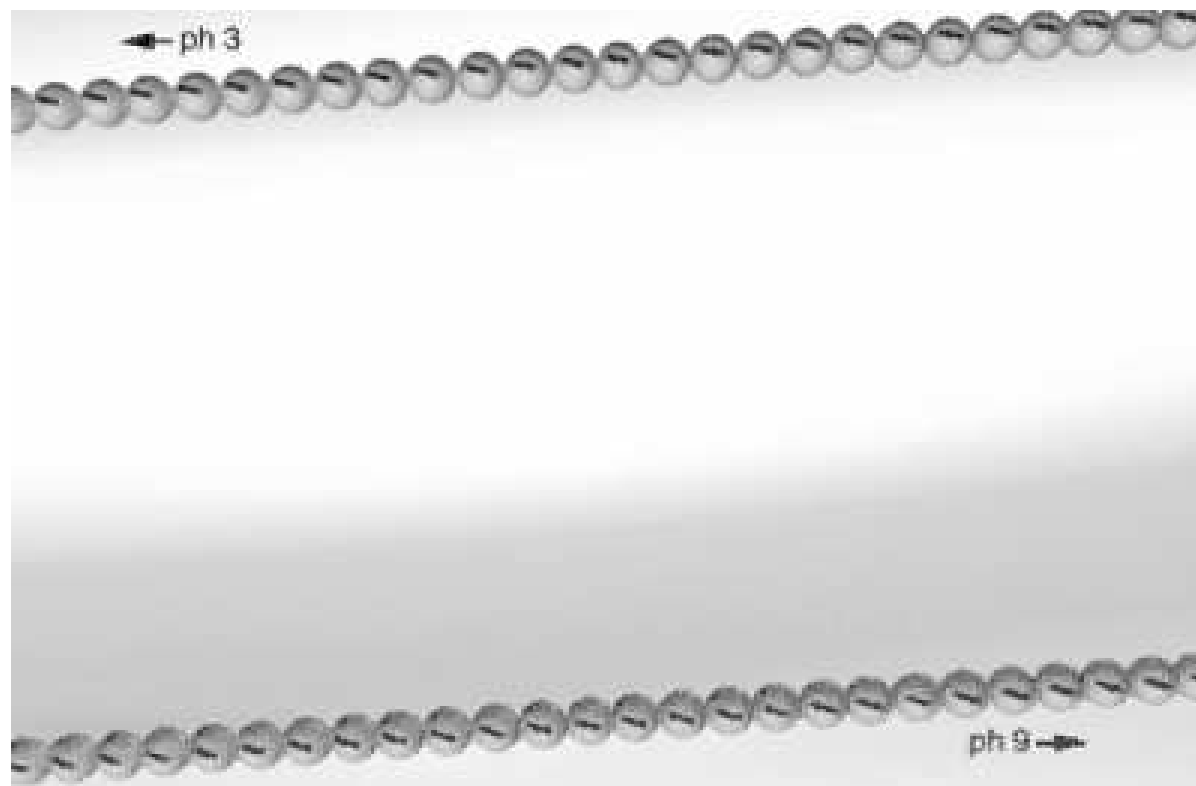
Izoelektrická fokusace



Izoelektrická fokusace



Kapilární izoelektrická fokusace



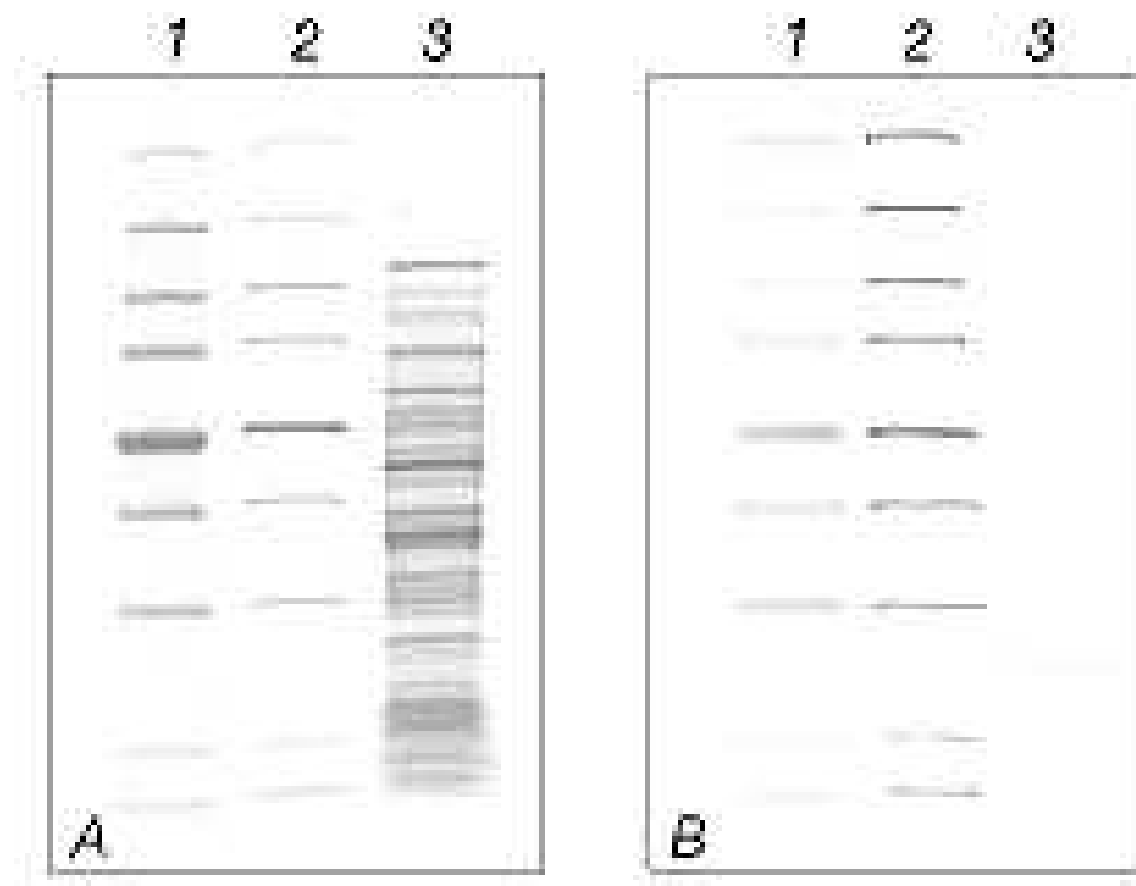
Izoelektrická fokusace analytická

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

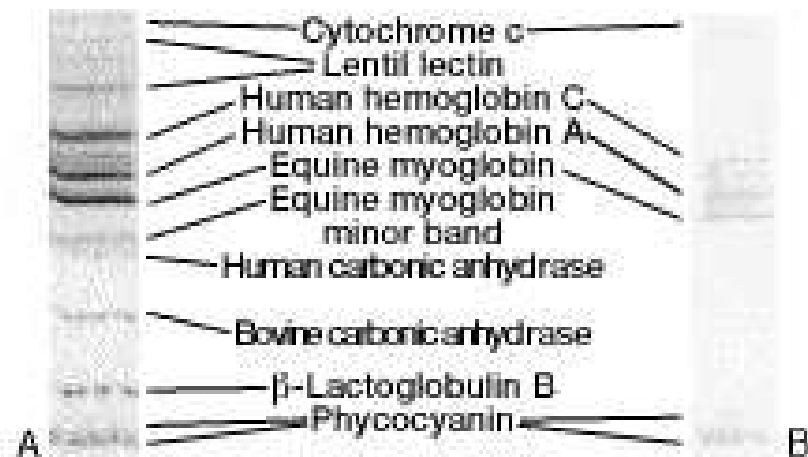
Izoelektrická fokusace analytická



Izoelektrická fokusace analytická



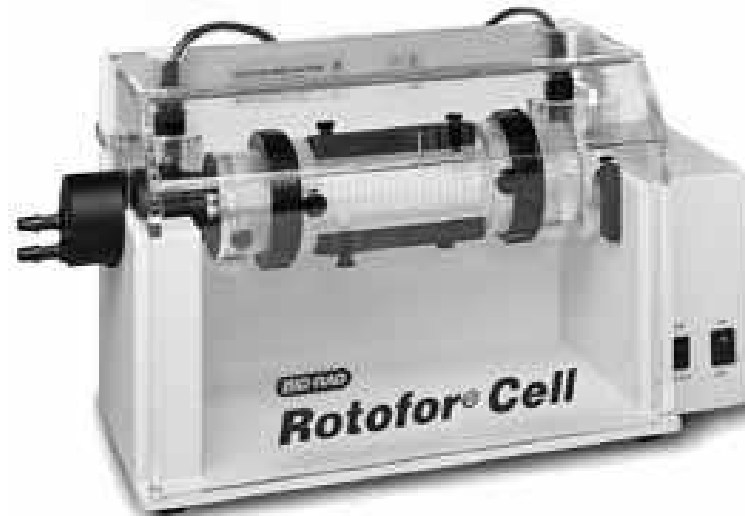
Izoelektrická fokusace analytická - standardy



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)

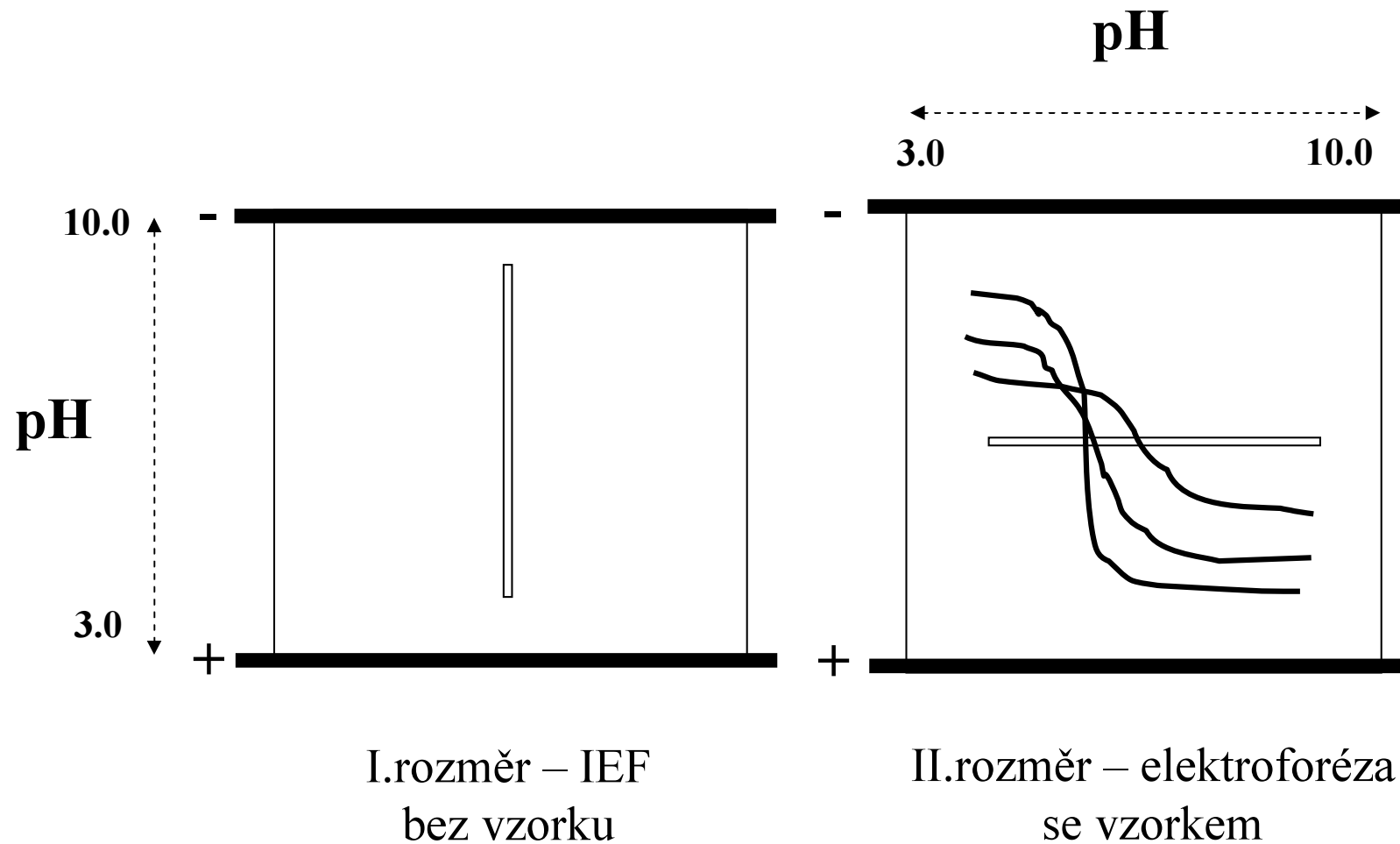


- Použití – izolace bílkovin

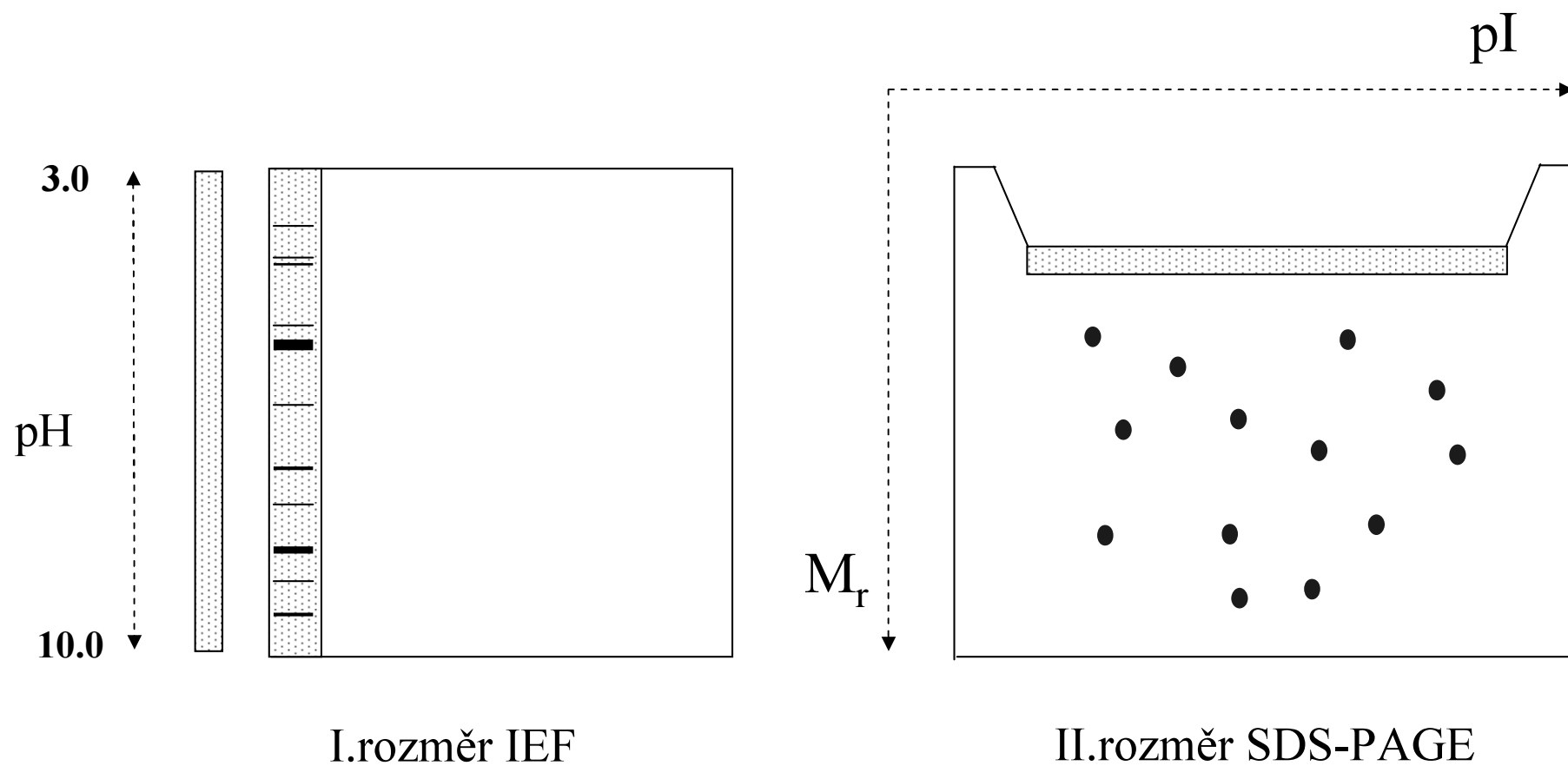
Dvourozměrné metody

- Metoda titračních křivek
- Dvourozměrná elektroforéza

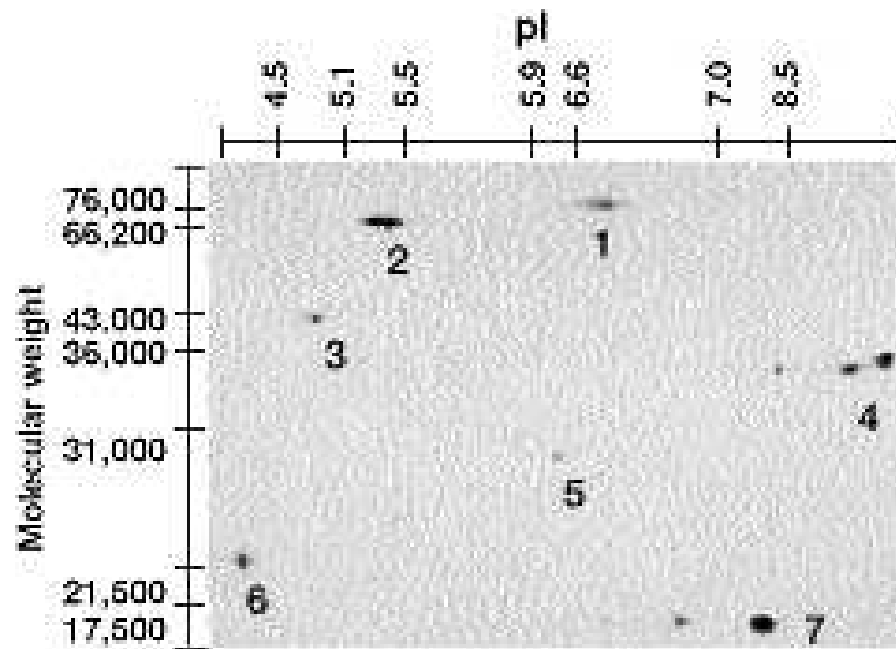
Metoda titračních křivek



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.

Dvojrozměrná elektroforéza

pI

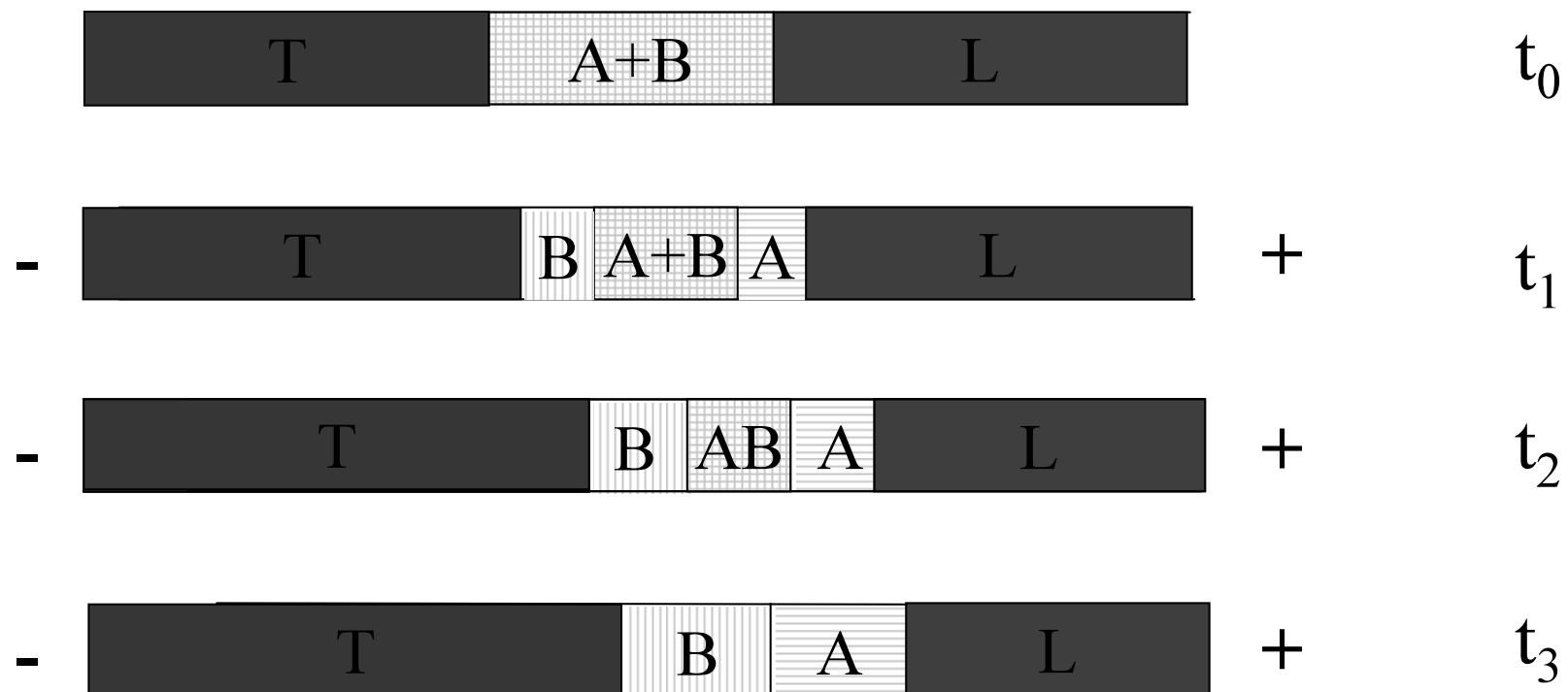
M_r



Izotachoforéza

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

Izotachoforéza



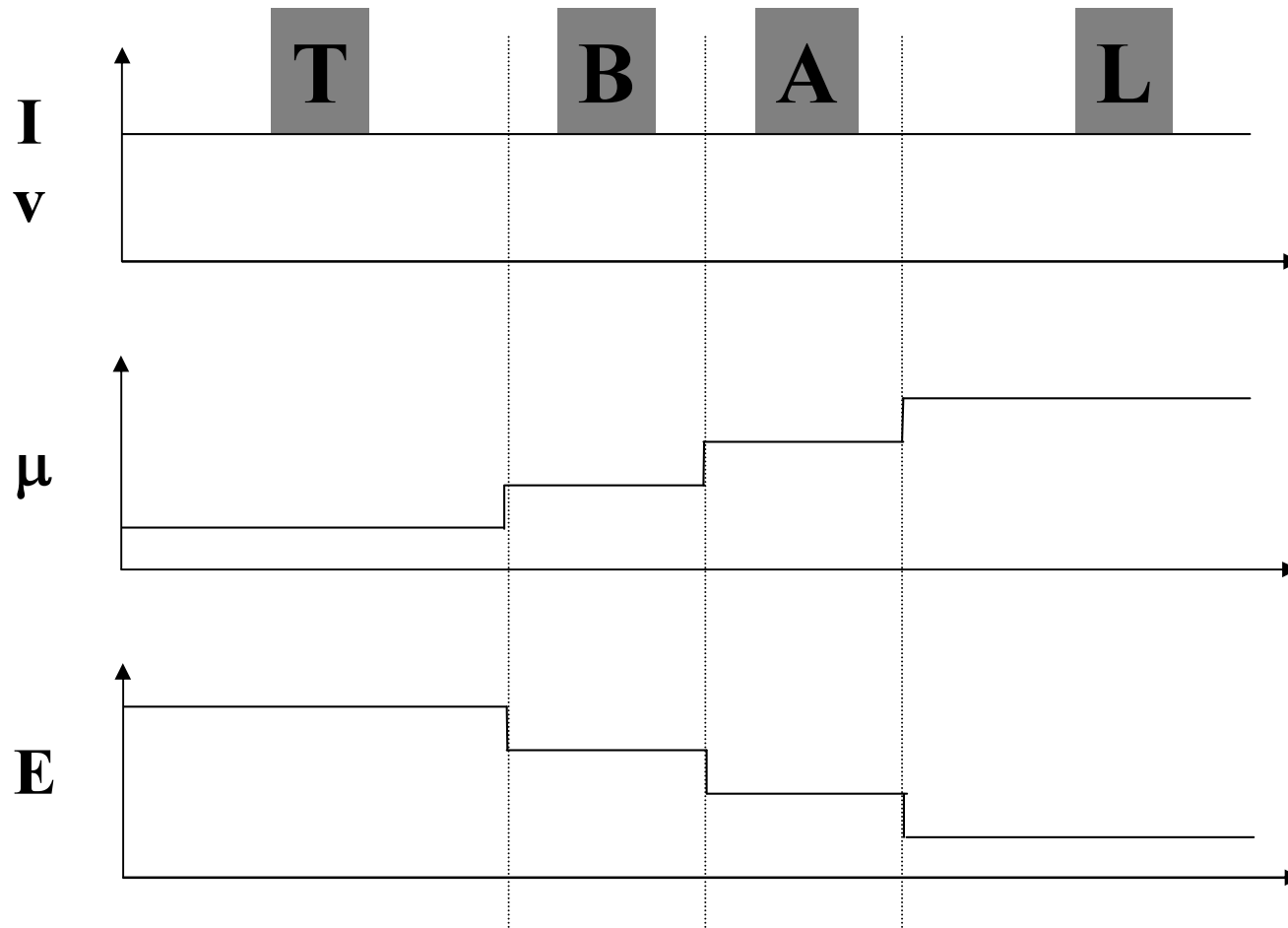
Izotachoforéza



Izotachoforéza

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

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

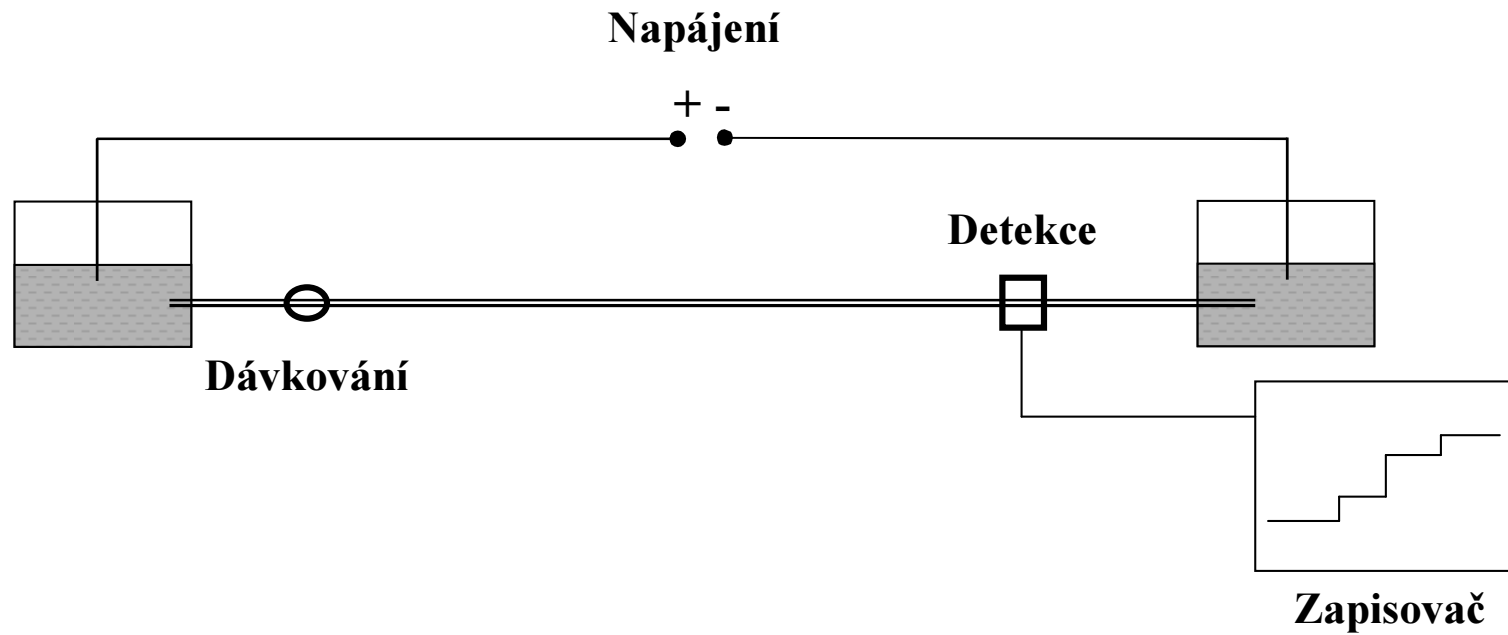


Kohlrauschova regulační funkce

$$\sum_i \sum_z \frac{|z| c_i}{\mu_i} = K_x$$

$$c_i = c_L \cdot \frac{\mu_L + \mu_R}{\mu_L} \cdot \frac{\mu_i}{\mu_{ii} + \mu_R} \cdot \frac{z_L}{z_i}$$

Analytická ITP

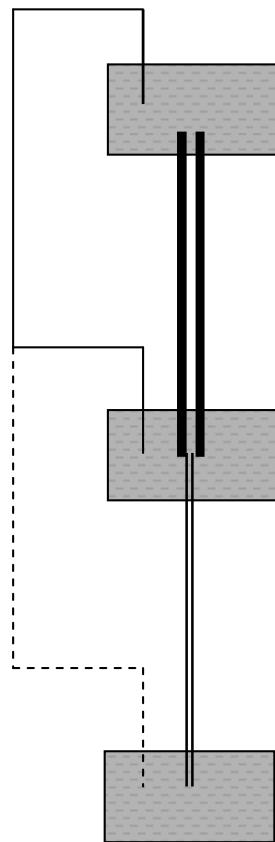


Analytická ITP instrumentace

- 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



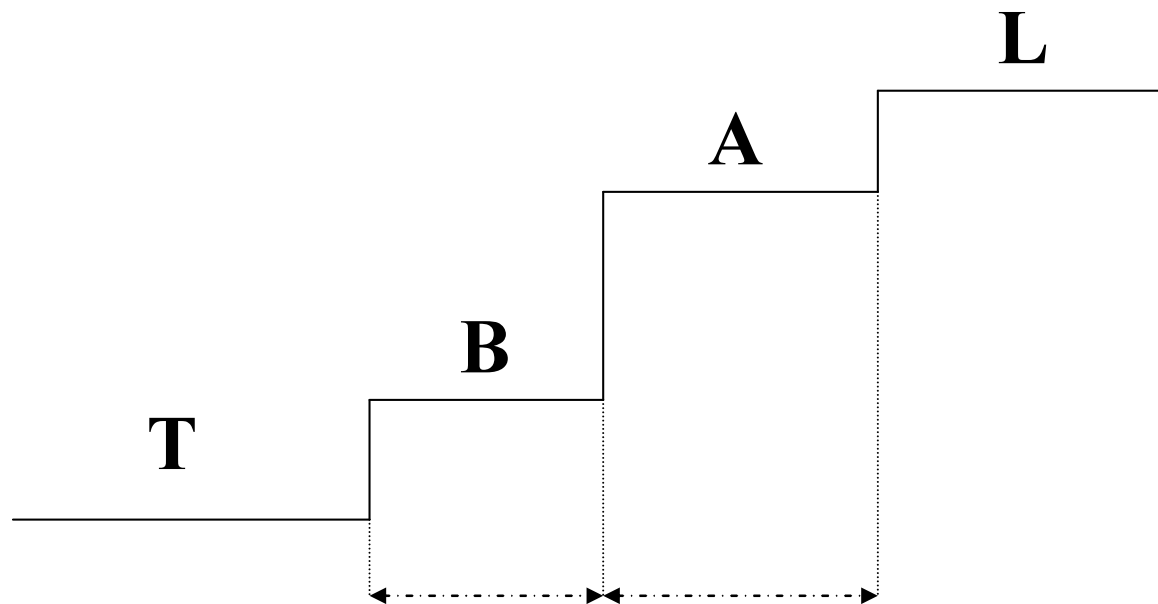
Předseparační kapilára – 2 mm



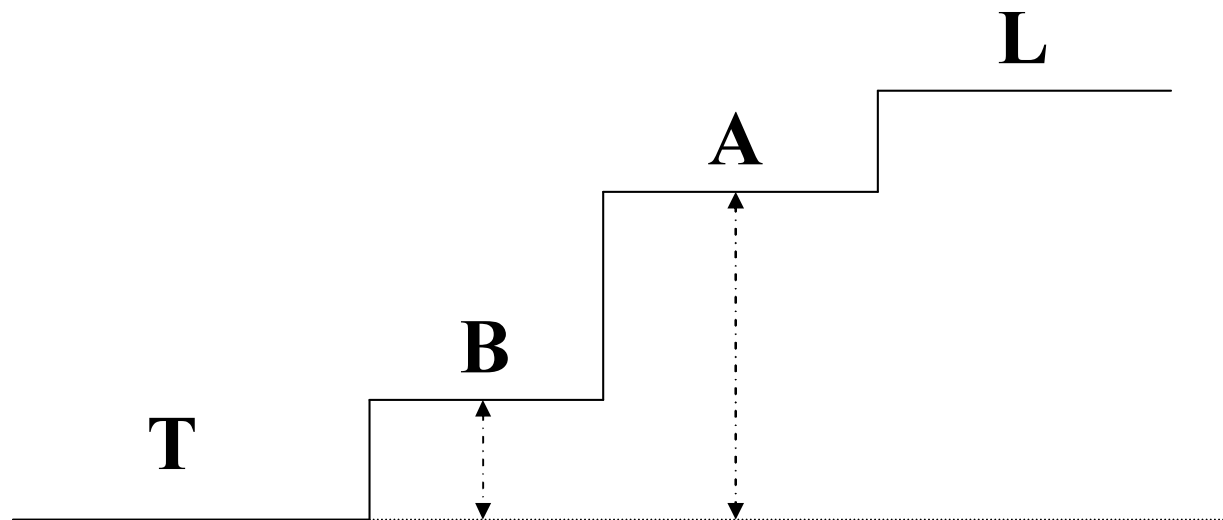
Analytická kapilára – 0.1 mm



Izotachoforetický záznam kvantita

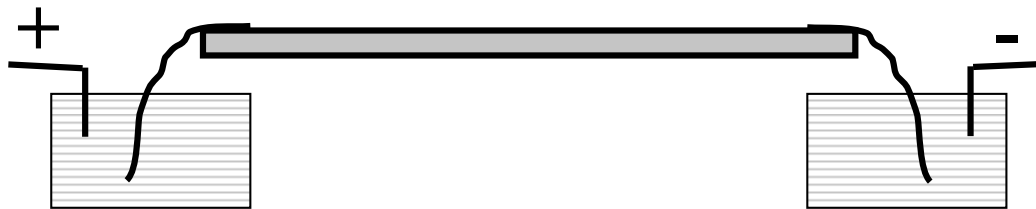


Izotachoforetický záznam kvalita



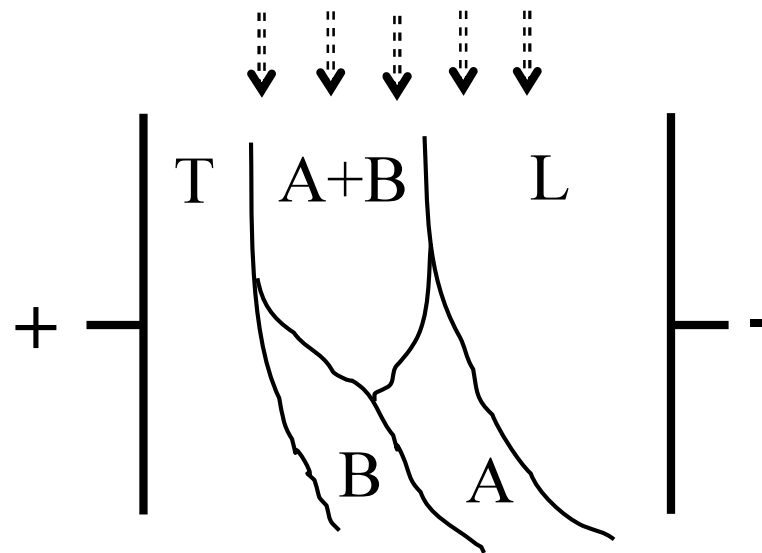
Preparativní ITP

V gelech - Sephadex

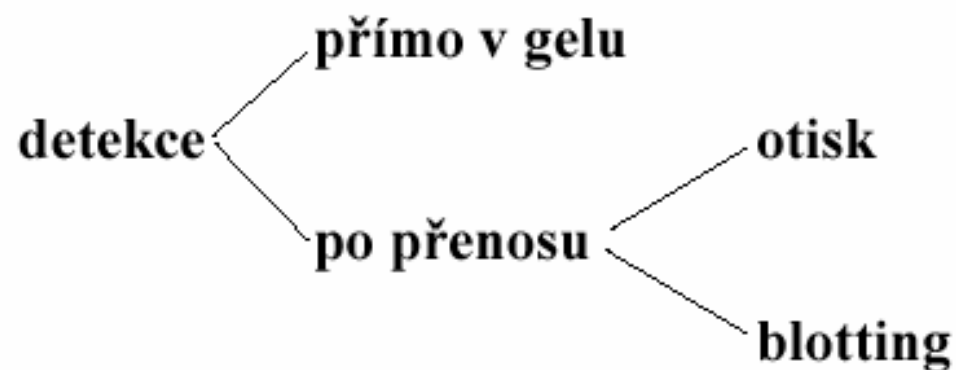


Preparativní ITP

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

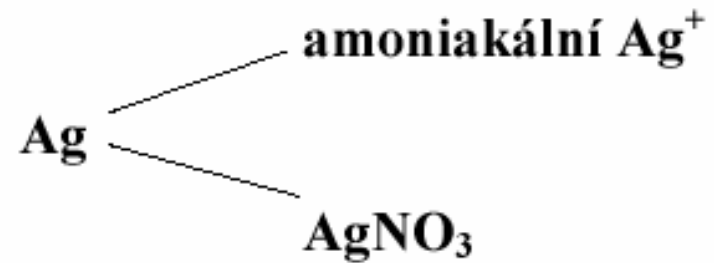
Coomassie Brilliant Blue G 250

Fast Green

Panceau S

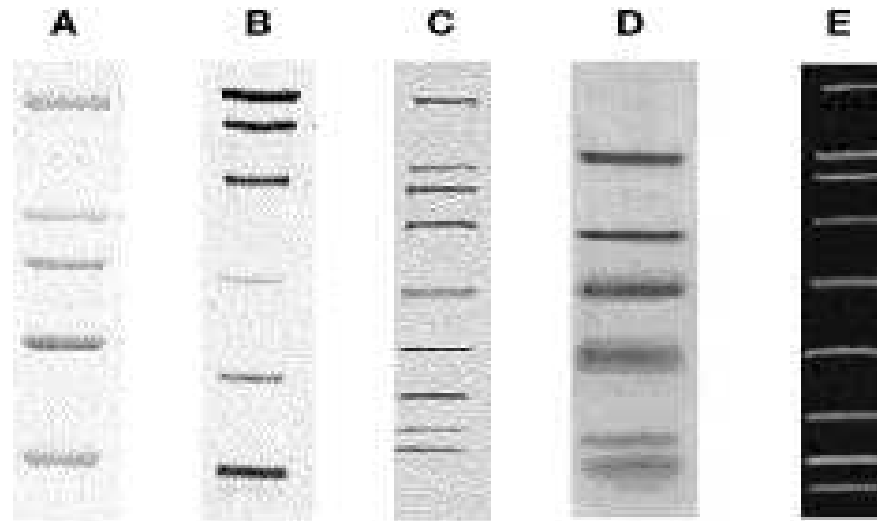
Nespecifická detekce

Barvení Ag



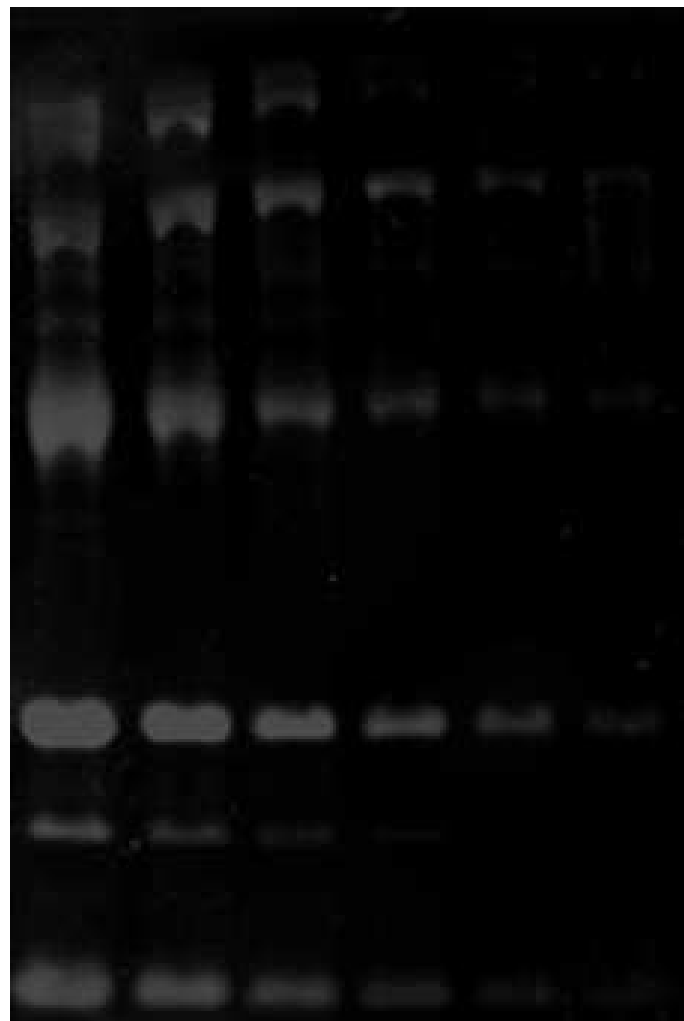
Postup : **A. Navázání Ag^+ na bílkovinu**
 B. Redukce Ag^+ na Ag^0

Nespecifická detekce



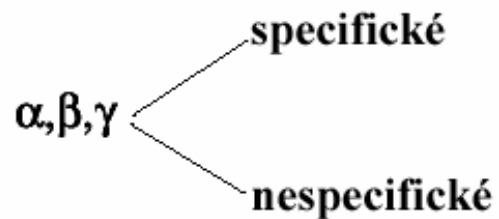
SDS-PAGE Standards provide accurate molecular weight determinations. A. High range SDS-PAGE Standards run on a 7.5% gel and stained with Coomassie blue R-250 dye. B. Low range Silver Stain SDS-PAGE Standards run on a 12% gel and stained with Bio-Rad's Silver Stain Kit. C. Broad range Biotinylated SDS-PAGE 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

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

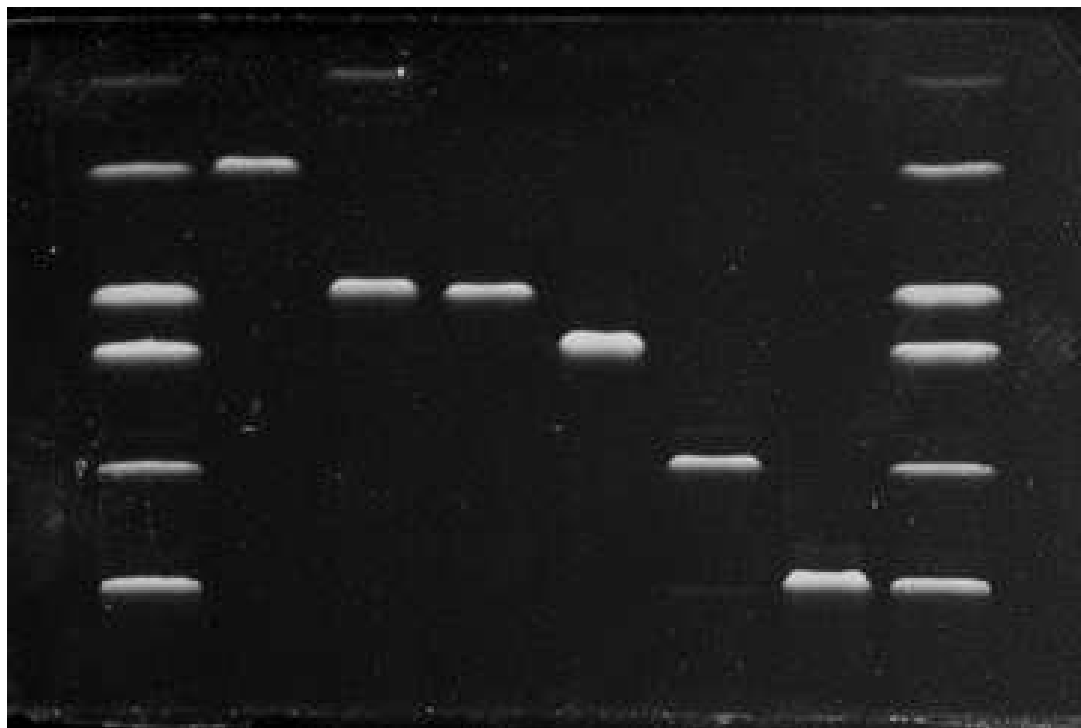
značený protein → rentgenový film

B. Fluorografie

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

značený protein → fluorofor → rentgenový film

Autoradiografie

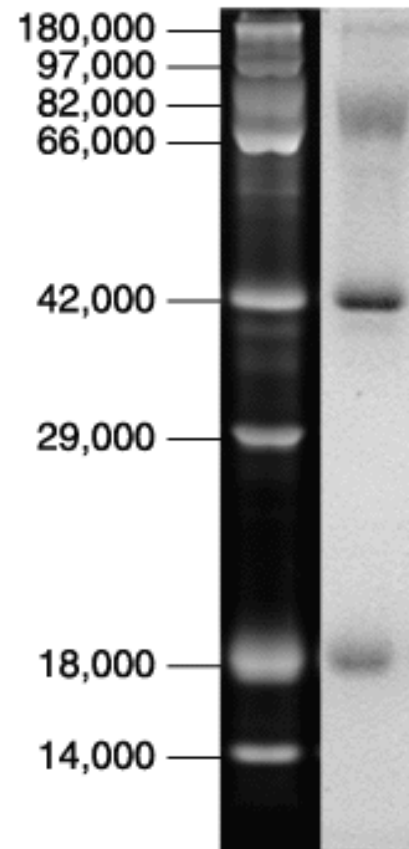


Specifická detekce

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

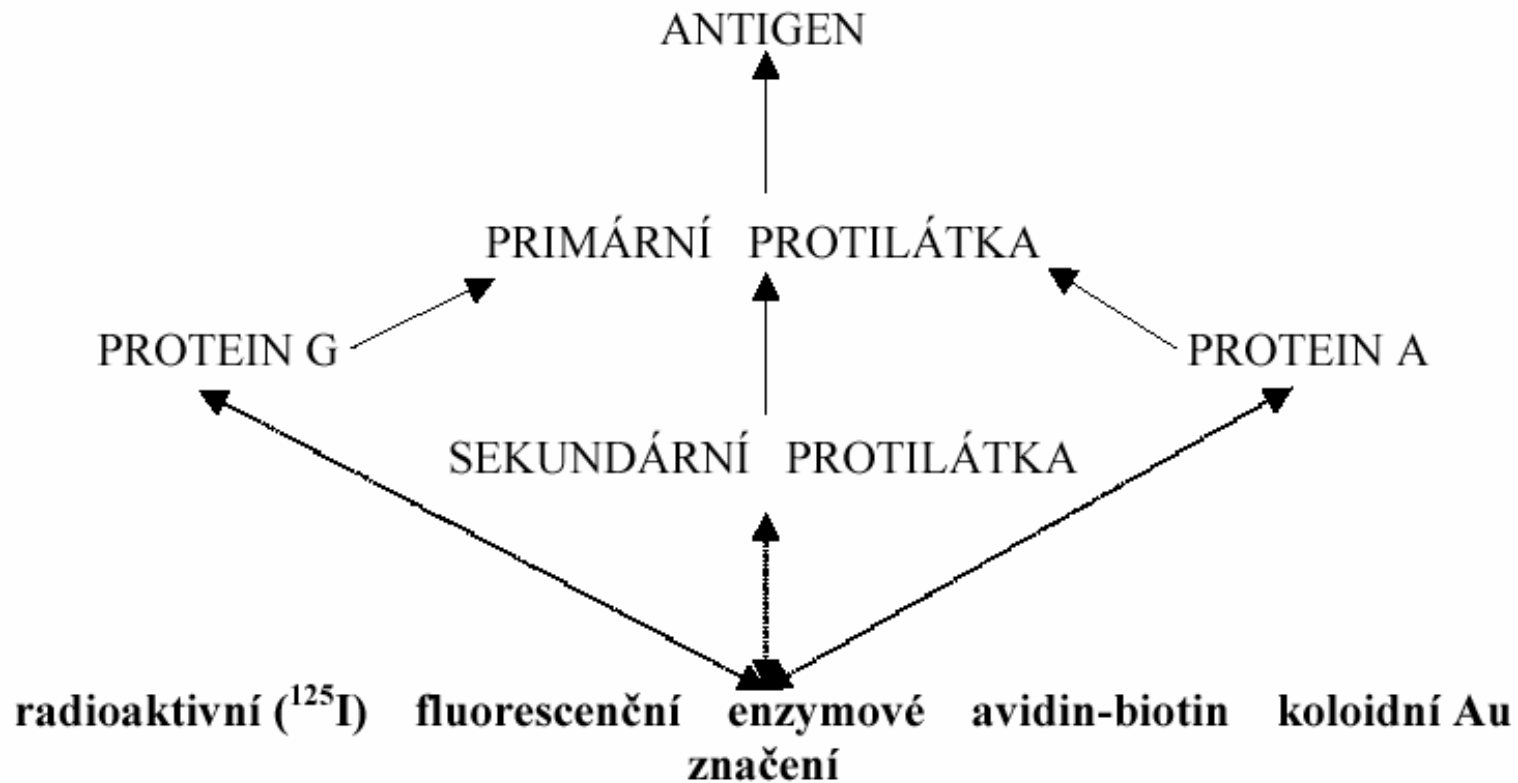
- A. bezbarvý substrát → barevný produkt
- B. barevný substrát → bezbarvý produkt
- C. bezbarvý substrát → bezbarvý produkt
→ barevný produkt
- D. auxiliární enzymy → barevný produkt

Detekce

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

Detekce na základě biologické aktivity

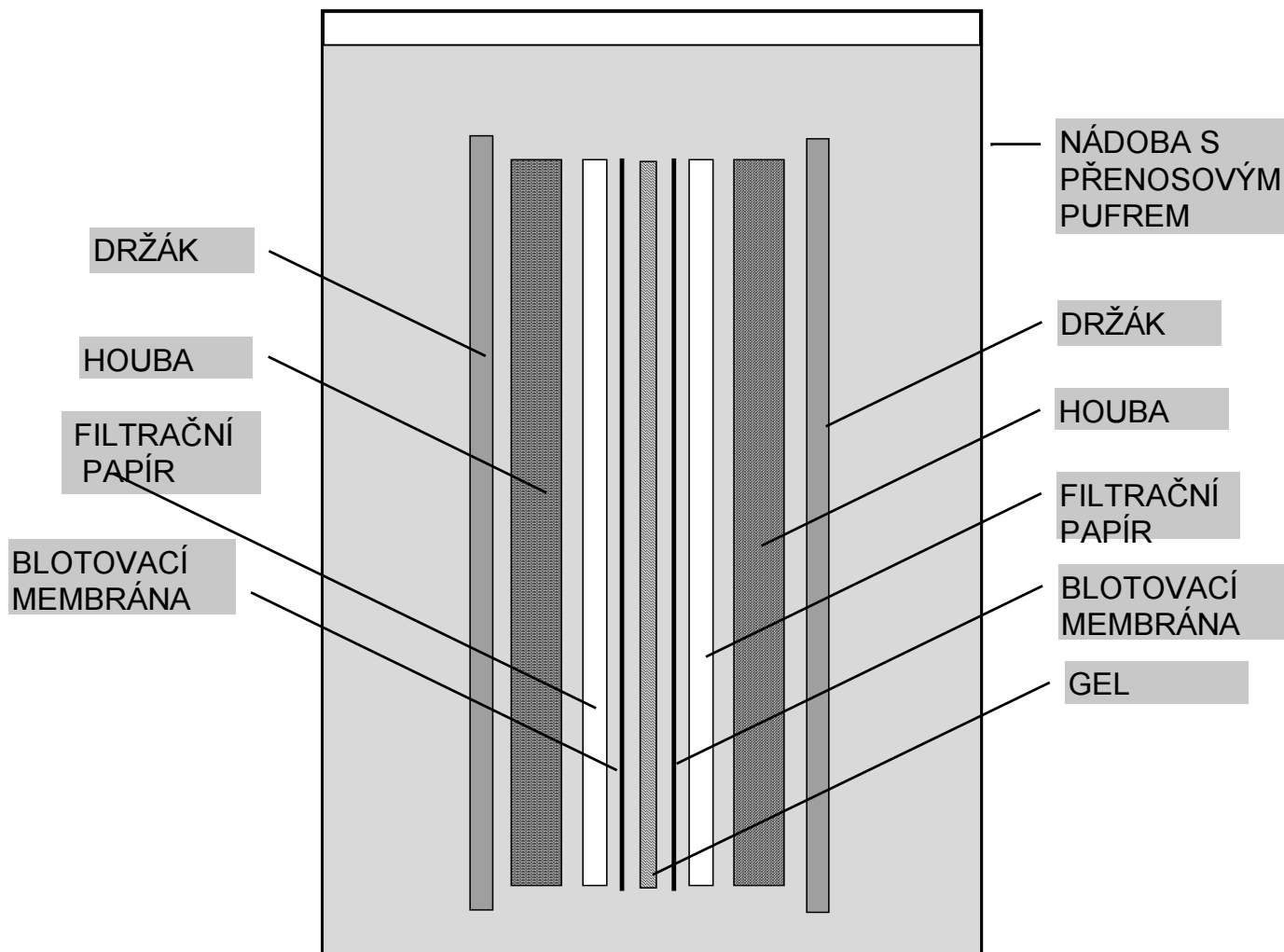
Imunodetekce



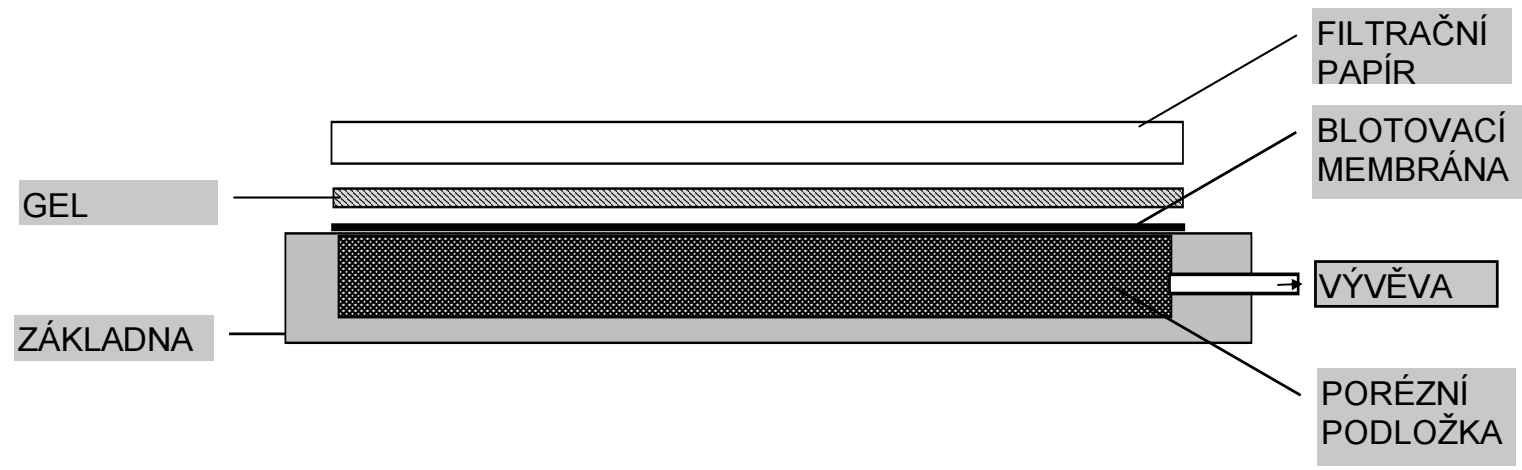
Blotting

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

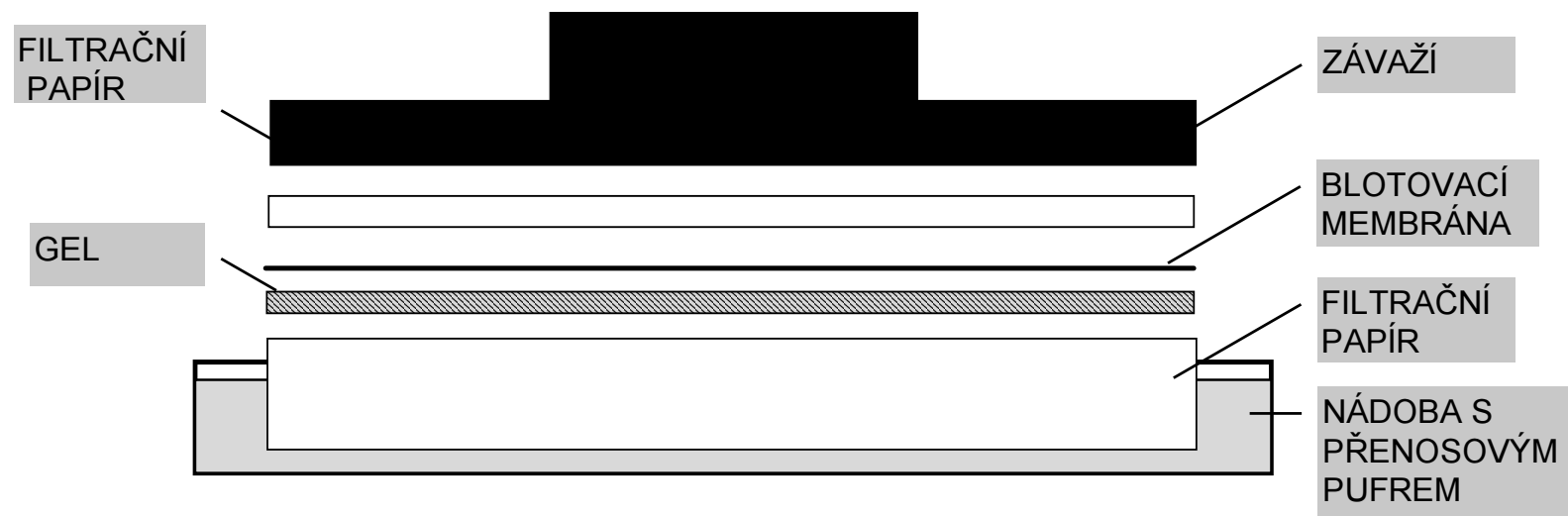
Difuzní blotting



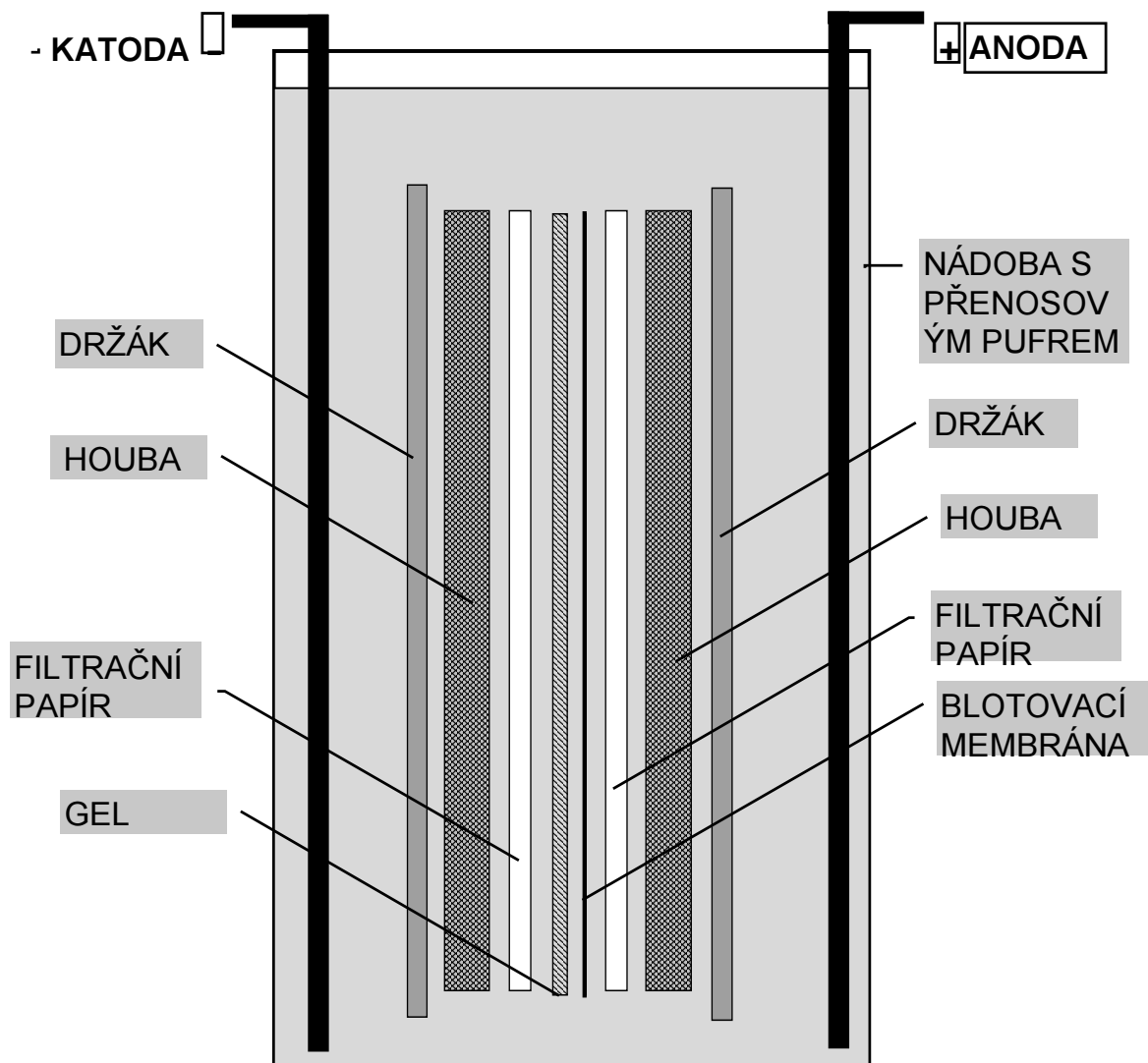
Vakuový blotting



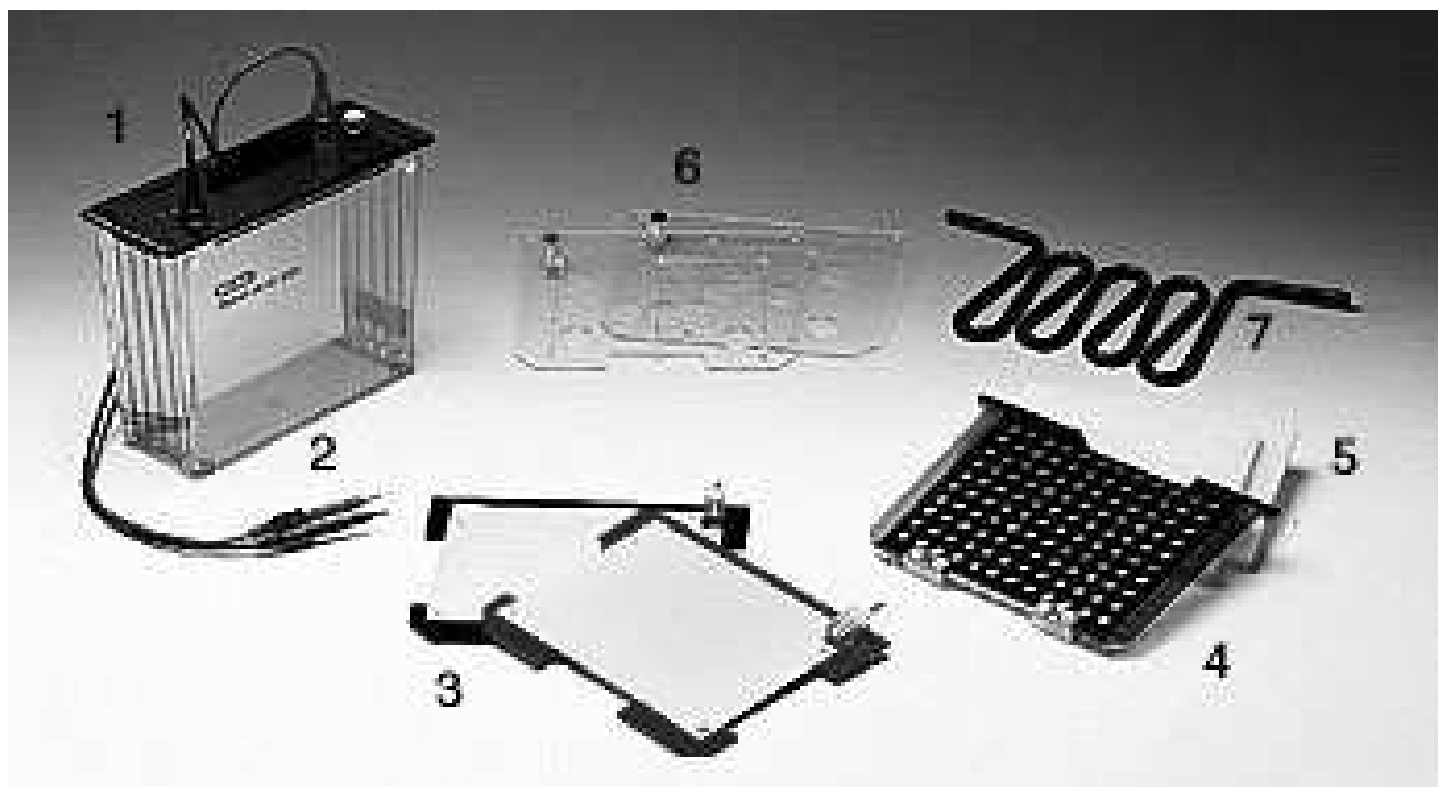
Kapilární blotting



Tankový elektroblotting



Tankový elektroblotting

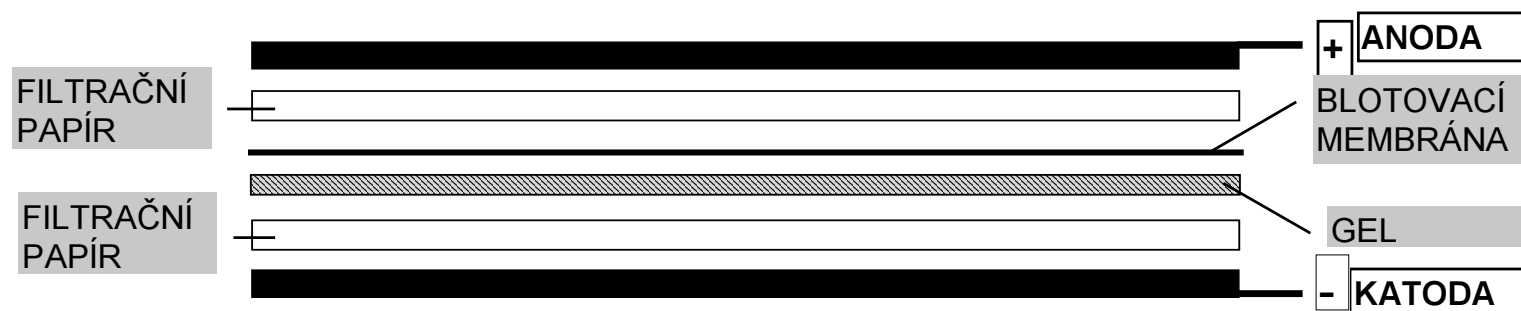


Tankový elektroblotting

Mini Protean Trans Blot Cell



„Semi dry“ blotting



„Semi dry“ blotting



Kapkovací dot blotting

