

Elektromigrační metody

Jsou založeny na pohybu nabitých částic v elektrickém poli

Základní síla vyjádřena Coulombovým zákonem

$$F_e = k \cdot Q_1 \cdot Q_2 / r_{12}^2$$

F_e = síla působící na částice o nábojích Q_1 a Q_2
o souřadnicích 1 a 2, r_{12} = jejich vzdálenost

$k = 1/4\pi\epsilon_0$, kde ϵ_0 je permitivita prostředí

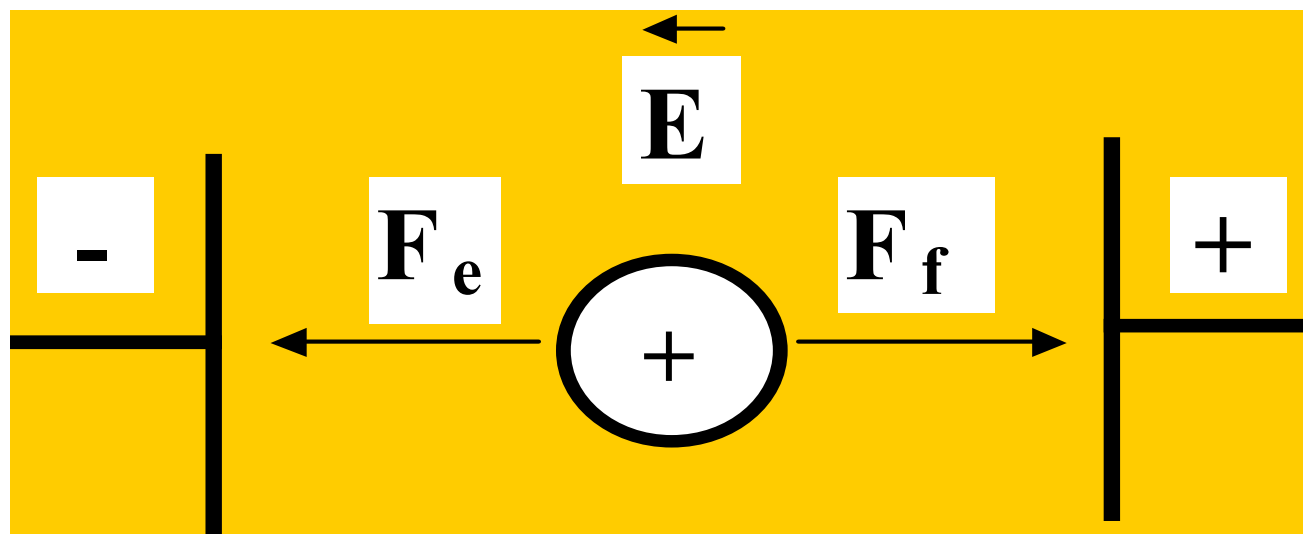
$$\mathbf{F}_e = Q \cdot \mathbf{E}$$

Kde E = intenzita elektrického pole ($V \cdot m^{-1}$)

F_e uděluje částici zrychlení, zvyšující se rychlost vyvolá zvýšení frikční síly F_f opačného směru

$$F_e = m \cdot a, F_f = v \cdot f = v \cdot 6\Pi\eta.r$$

Kde m je hmotnost a r poloměr částice (pro kouli), v její rychlost, f frikční koeficient a η viskozita prostředí



Částice dosahuje rychlosti, kdy se vyrovnají obě síly

$$E \cdot Q = v \cdot f, \text{ pak } v = E \cdot Q / f$$

Vliv E eliminujeme vyjádřením elektroforetické mobility jako rychlosti při jednotkové intenzitě elektrického pole

$$\mu = v/E = Q/f = Q/6\Pi\eta.r$$

Rychlost i mobilita jsou přímo úměrné náboji a nepřímo úměrné velikosti částice

Sekundární jevy

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

Jouleovo teplo

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

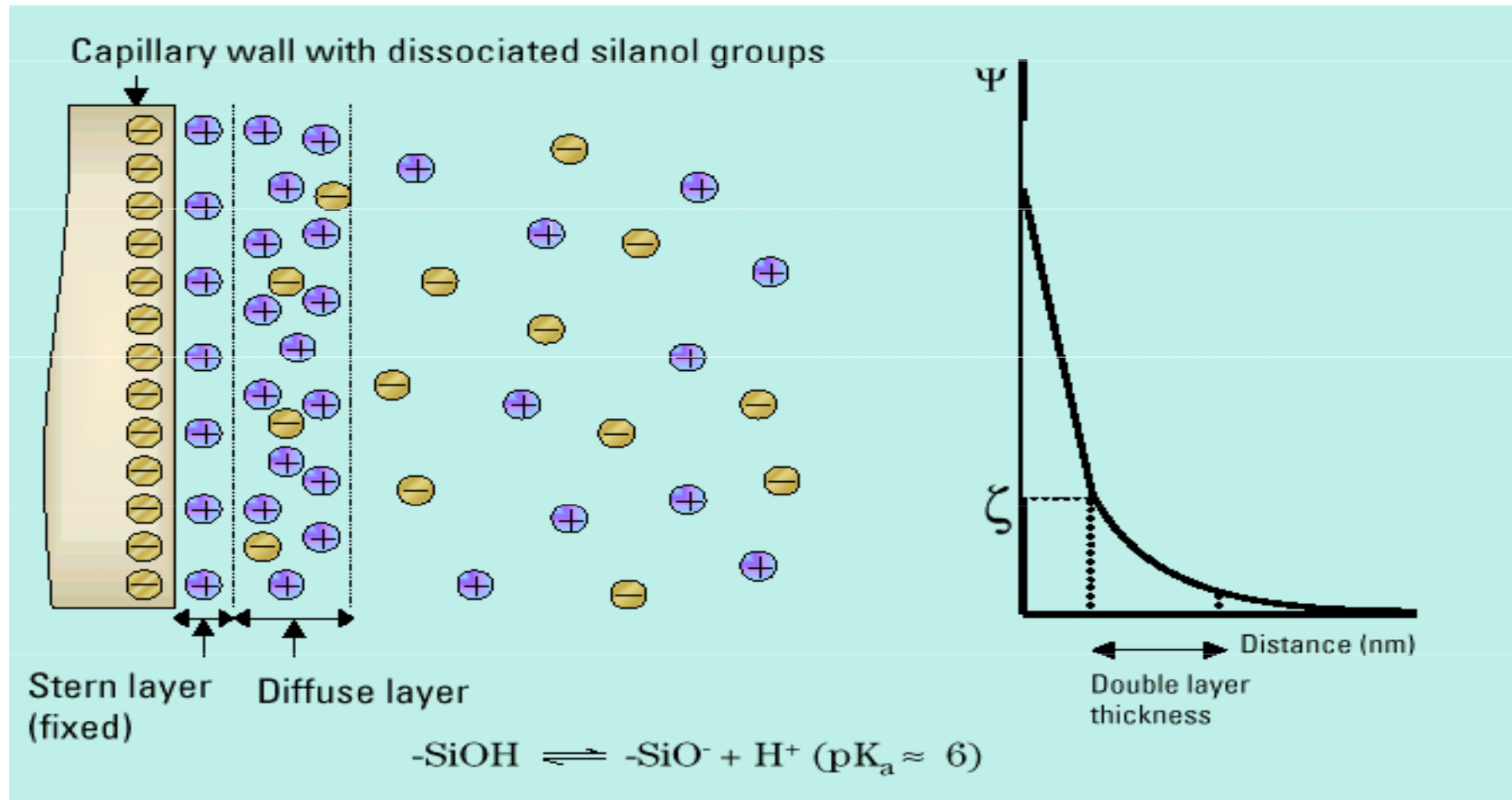
P = výkon [W.m⁻³]

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

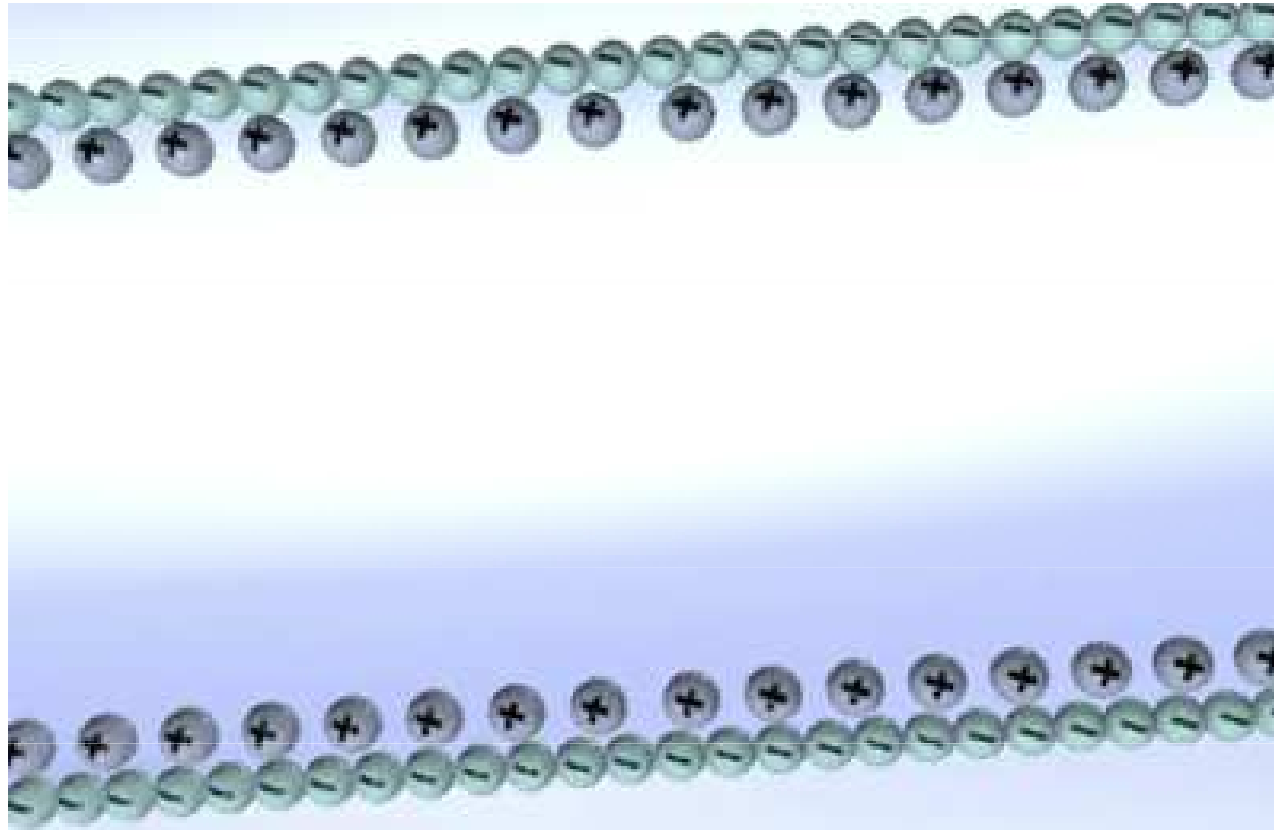
η = viskozita

ε = dielektrická konstanta

μ_{eo} = elektroosmotická mobilita

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

Původ elektroosmotického toku



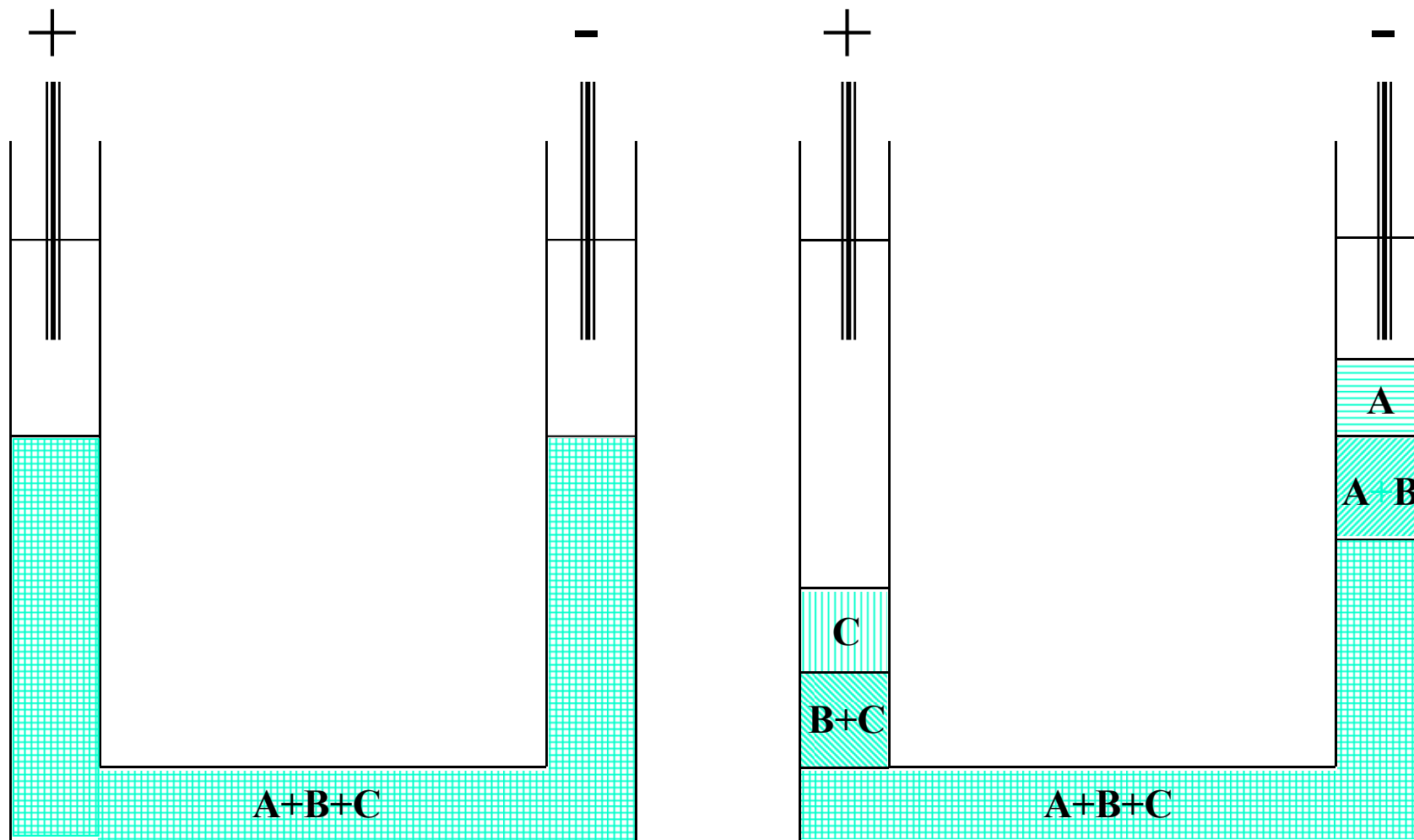
Elektroforéza

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

Elektroforéza

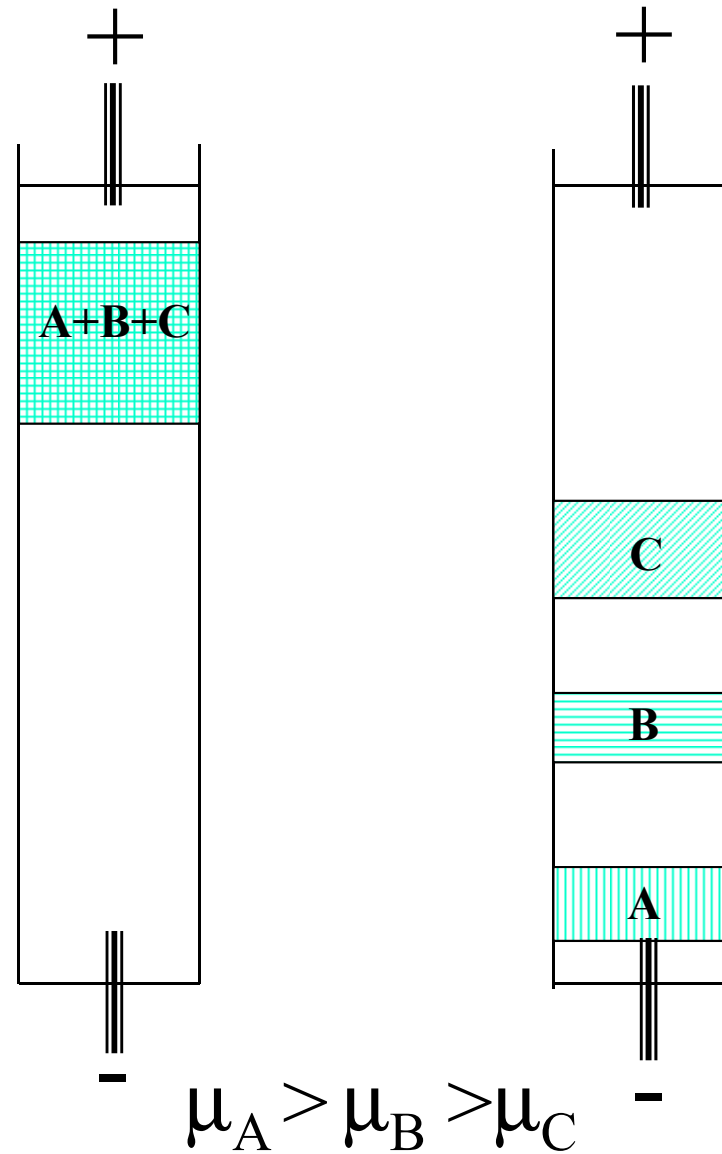
- Volná
- Zónová

Volná elektroforéza



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

Zónová elektroforéza



Stabilizace

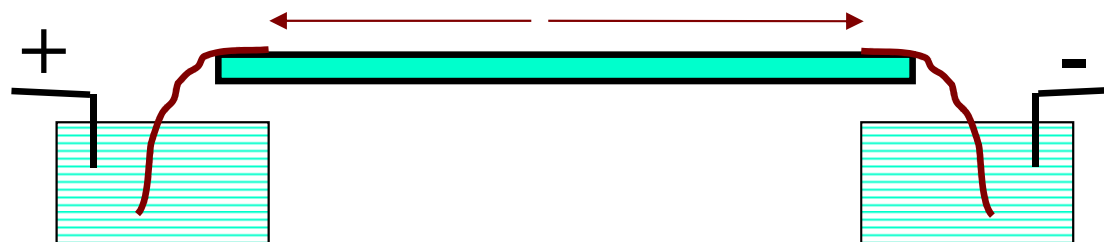
- Rotací
- Gradienty hustoty
- Porézními medii
- Kapilárou

Požadavky na porézní media

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

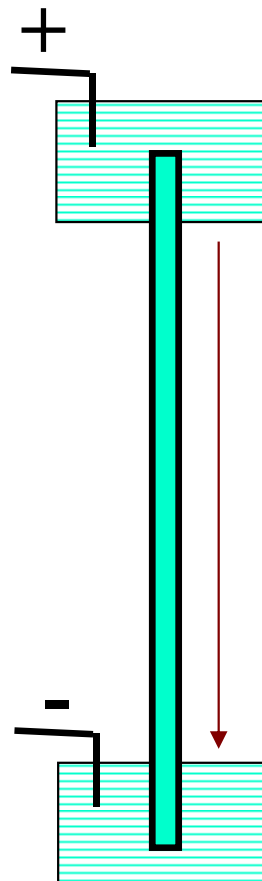
Upořádání

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

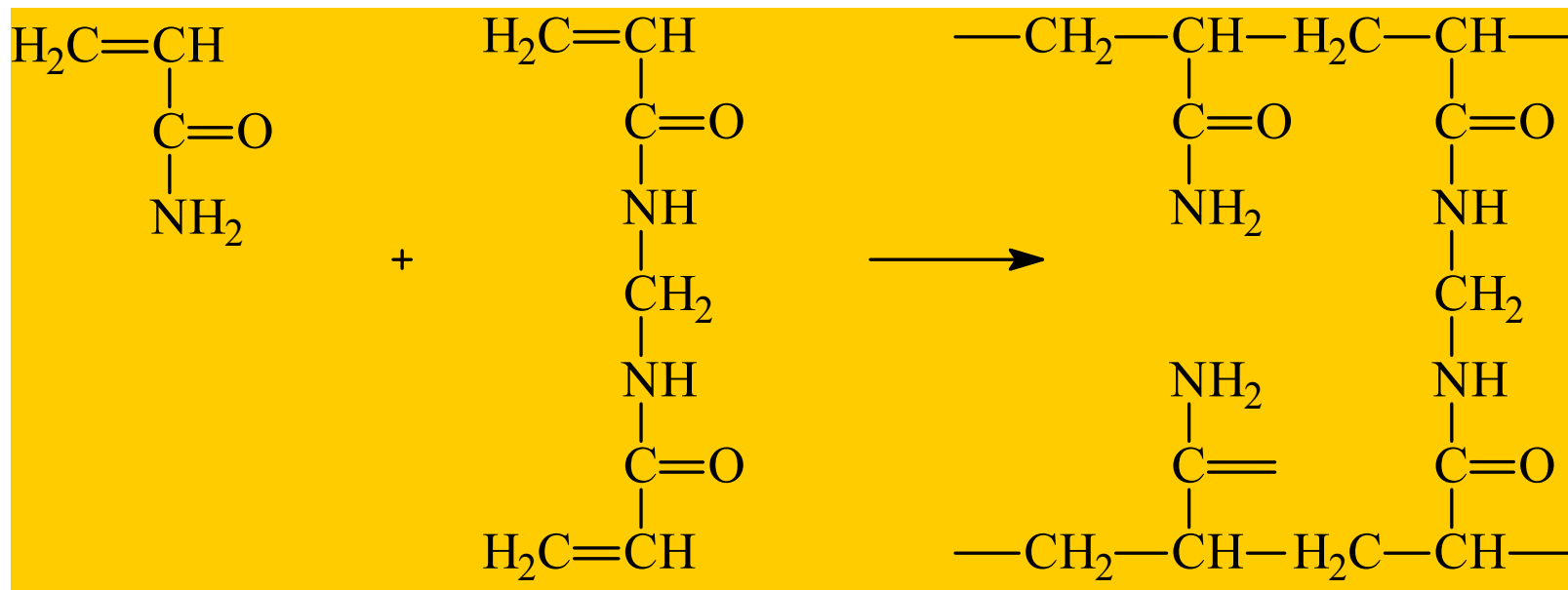
Složení – kopolymer akrylamidu a
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

- **Monomery jsou neurotoxiny !!!!!!!**

Použití : analýza bílkovin

Polyakrylamid



Polyakrylamid - příprava

Radikálová polymerace

- Katalyzátor – tetramethylethylenediamin
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)

Provedení PAGE

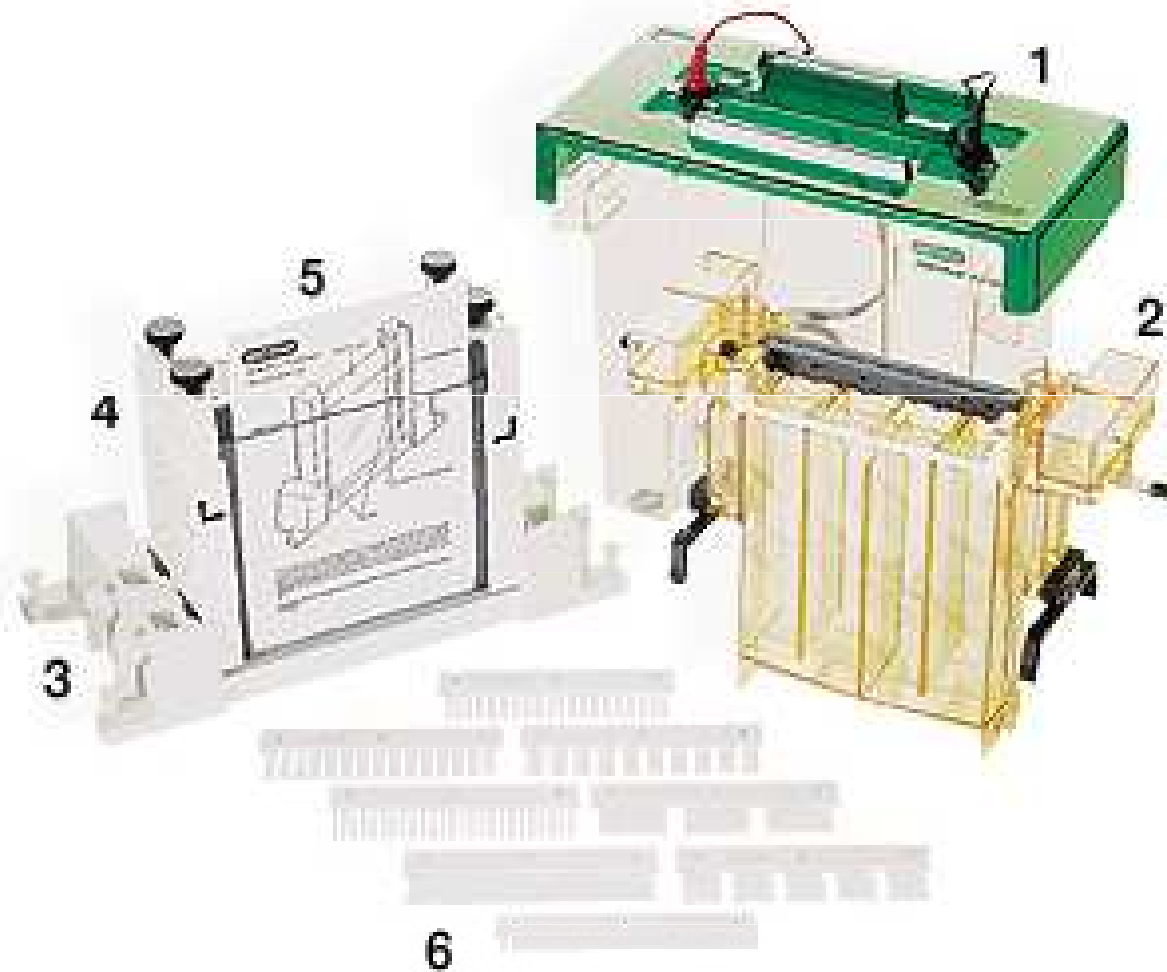
vertikální x horizontální

deskové x trubičkové

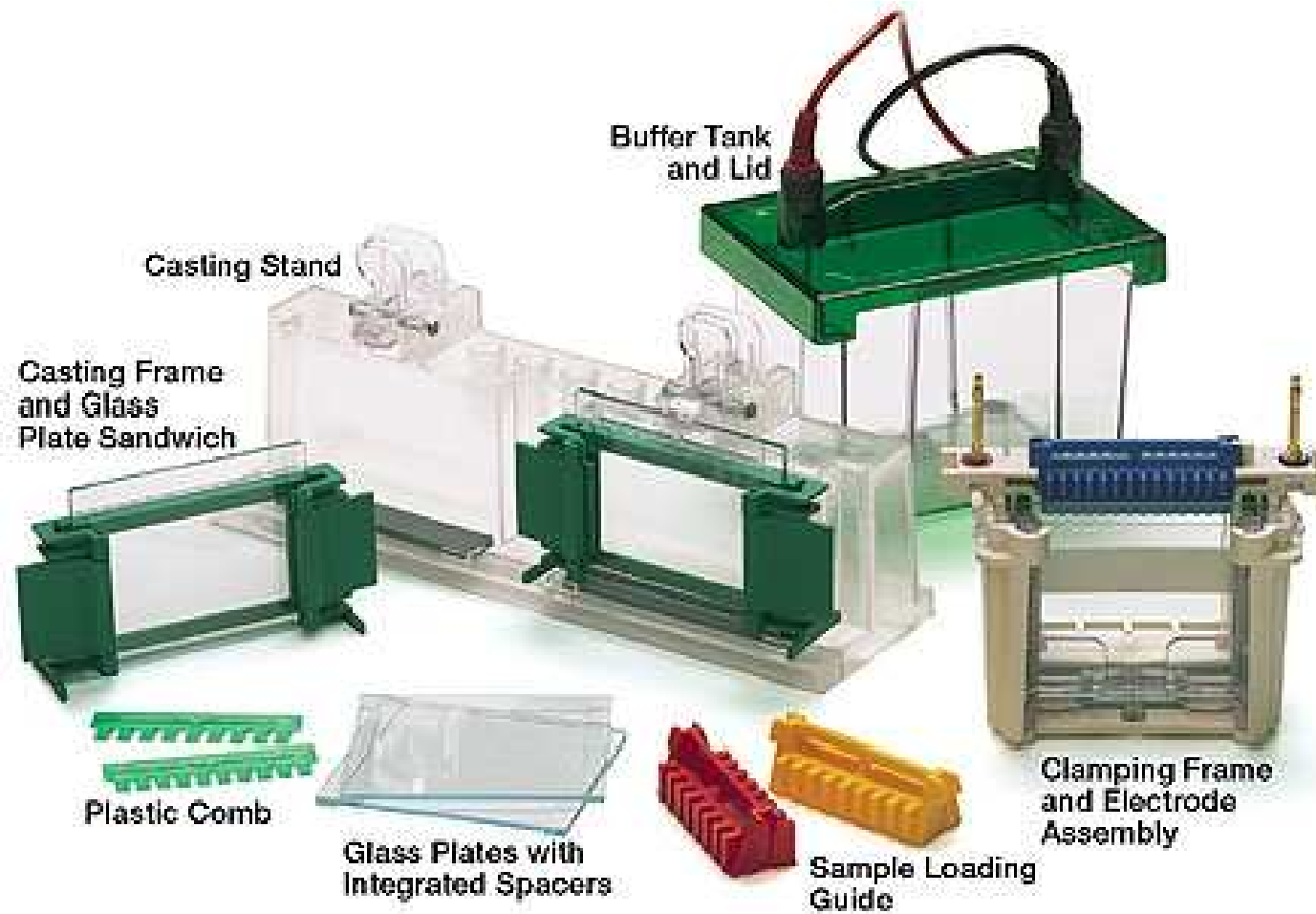
homogenní x gradientové

kontinuální x diskontinuální

Provedení PAGE

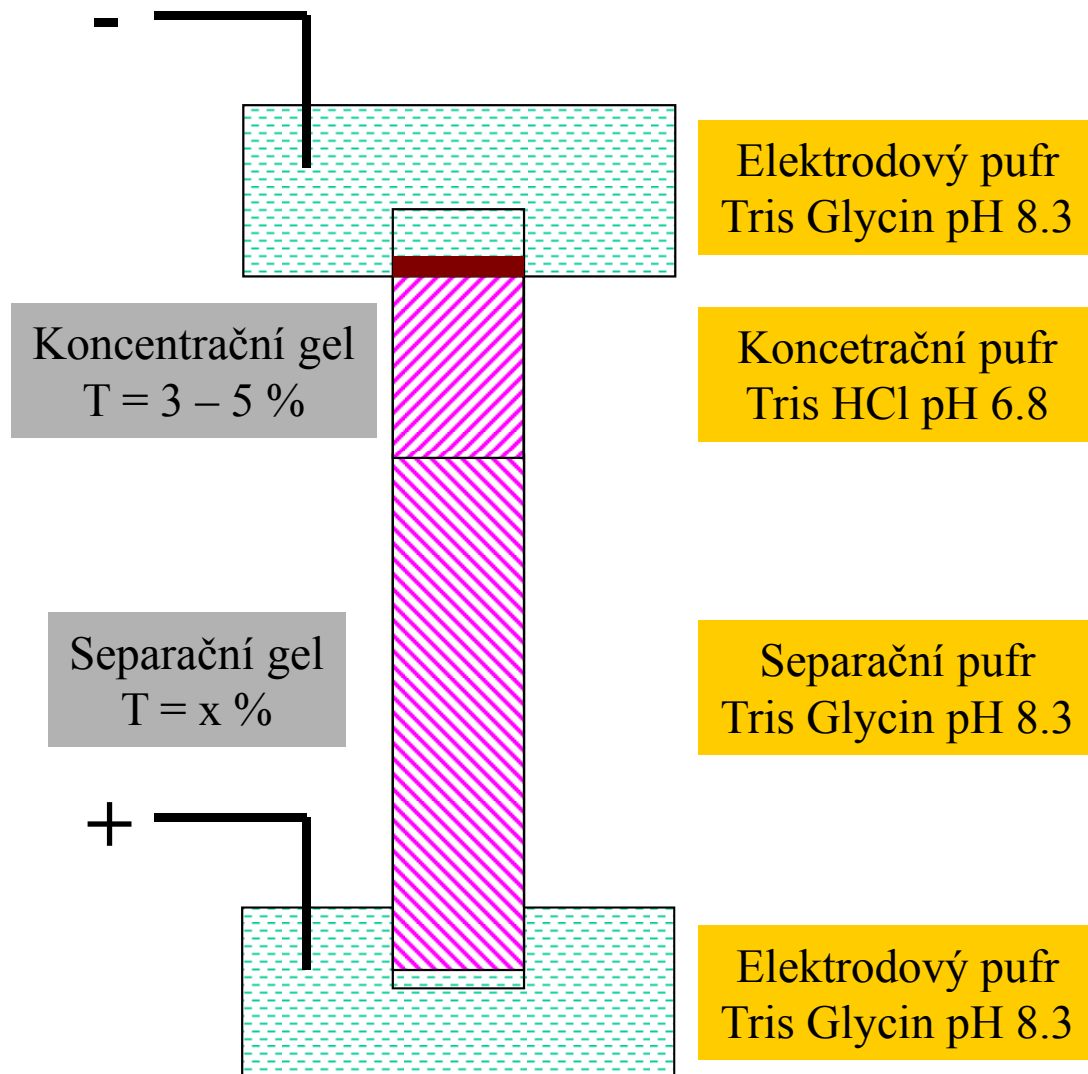


Provedení PAGE

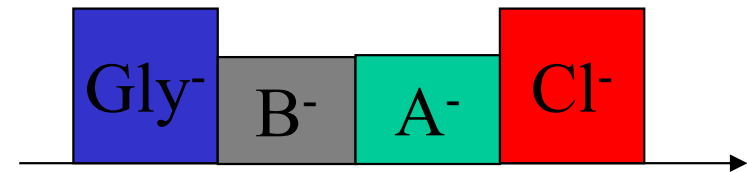


Diskontinuální PAGE

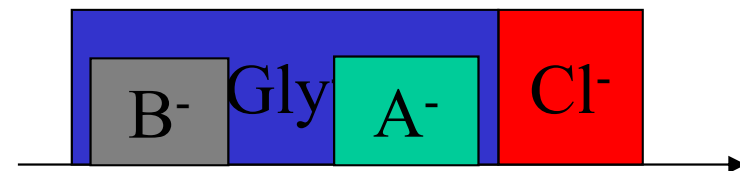
Orstein, Davis



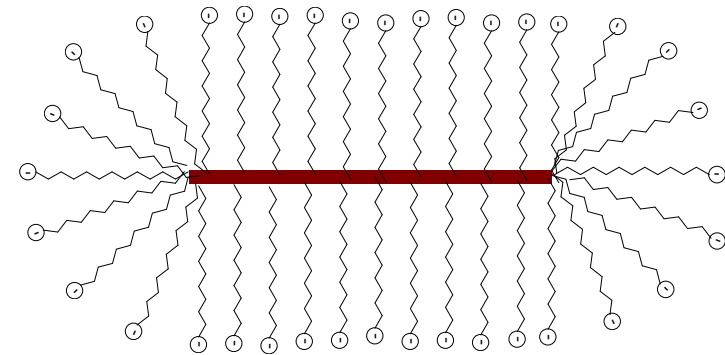
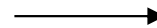
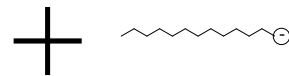
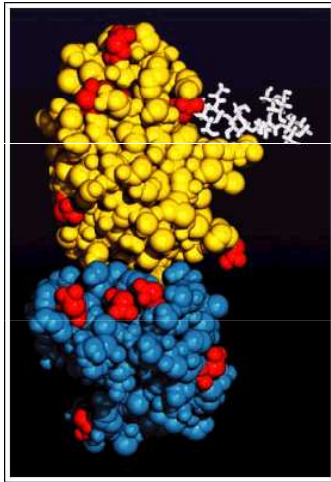
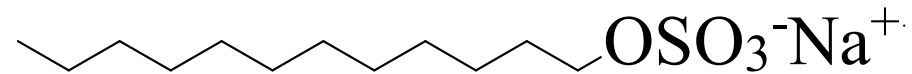
Koncentrační gel
Izotachoforéza



Separační gel
Zónová elektroforéza

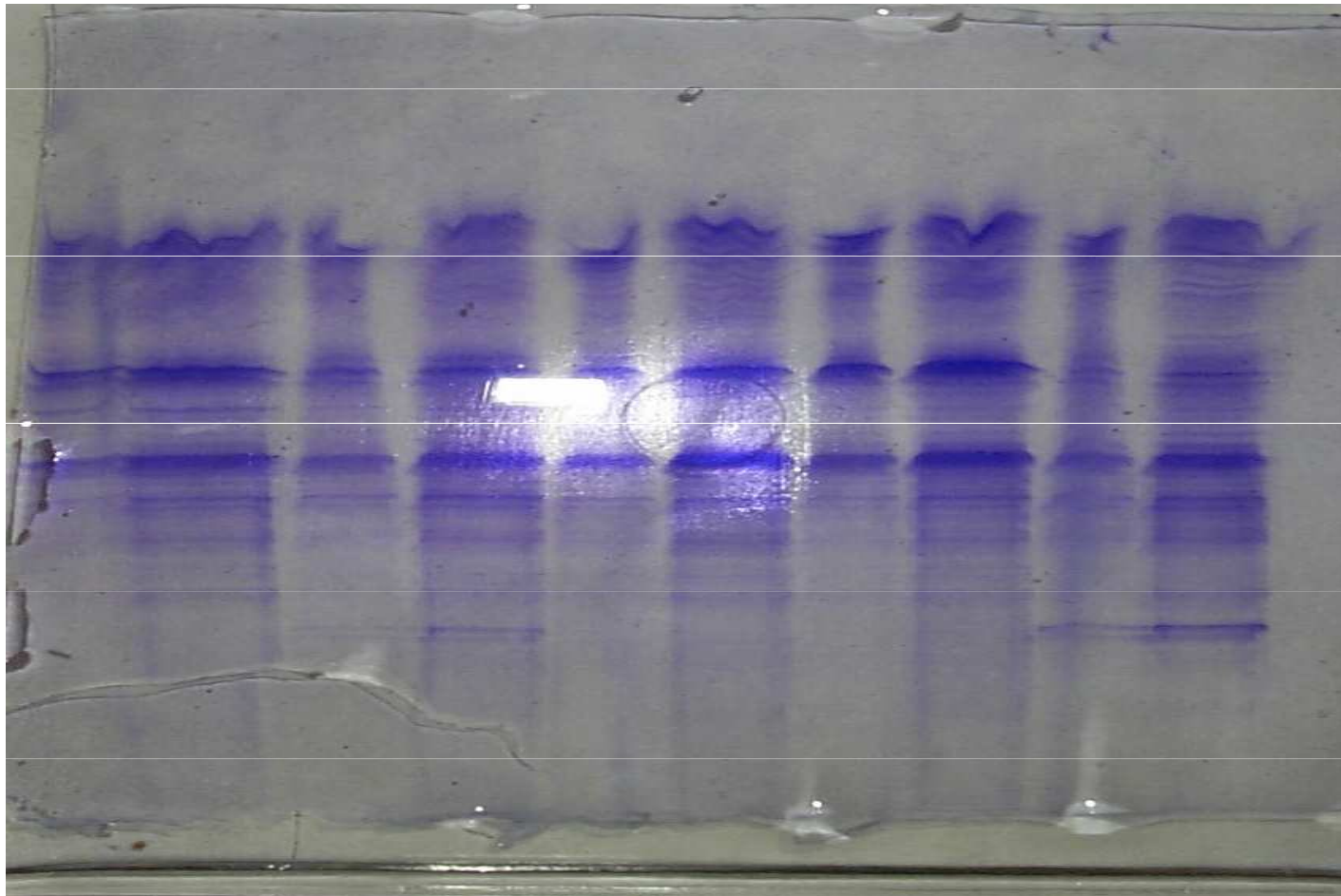


SDS PAGE

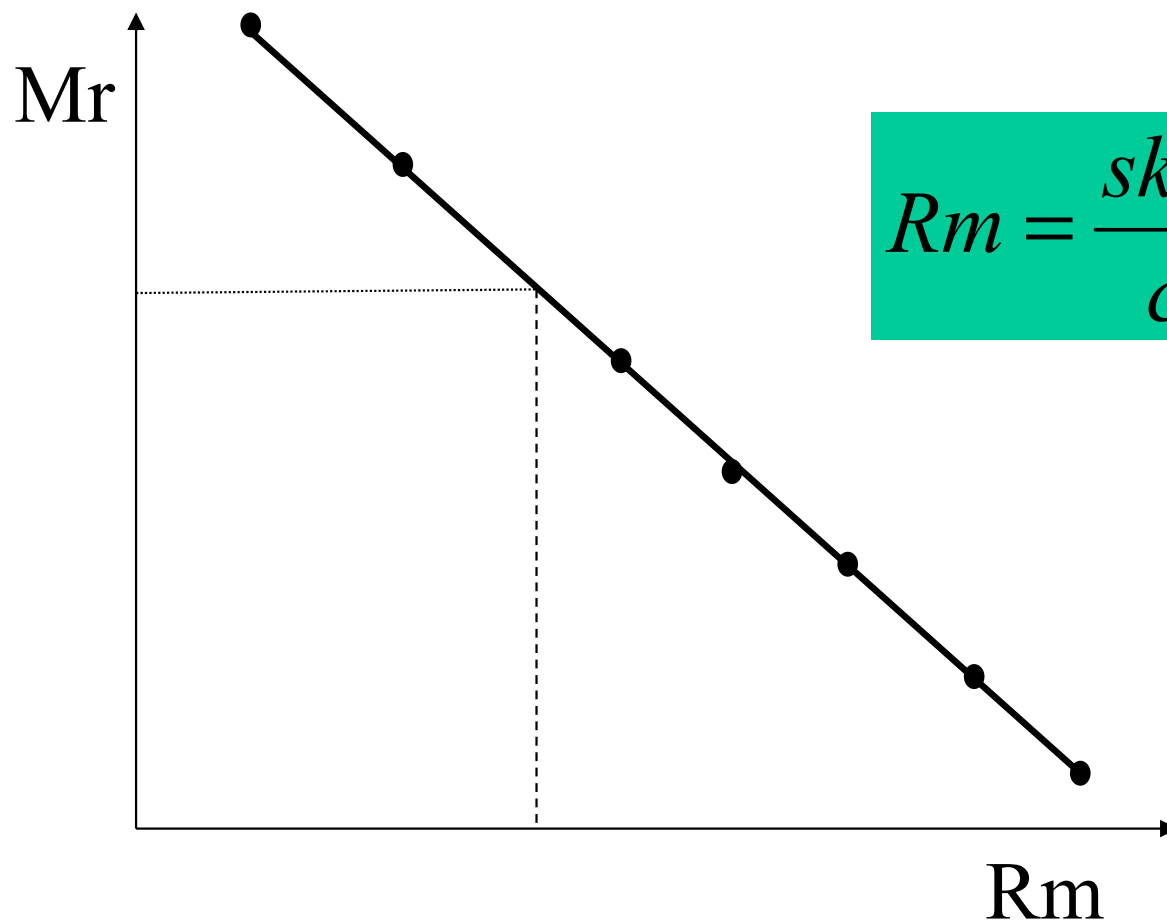


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

SDS PAGE

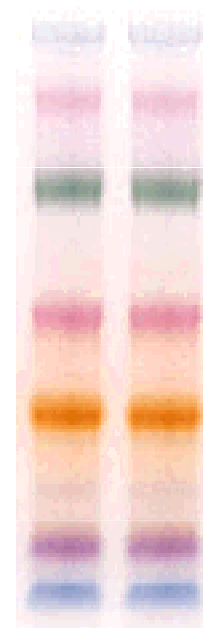
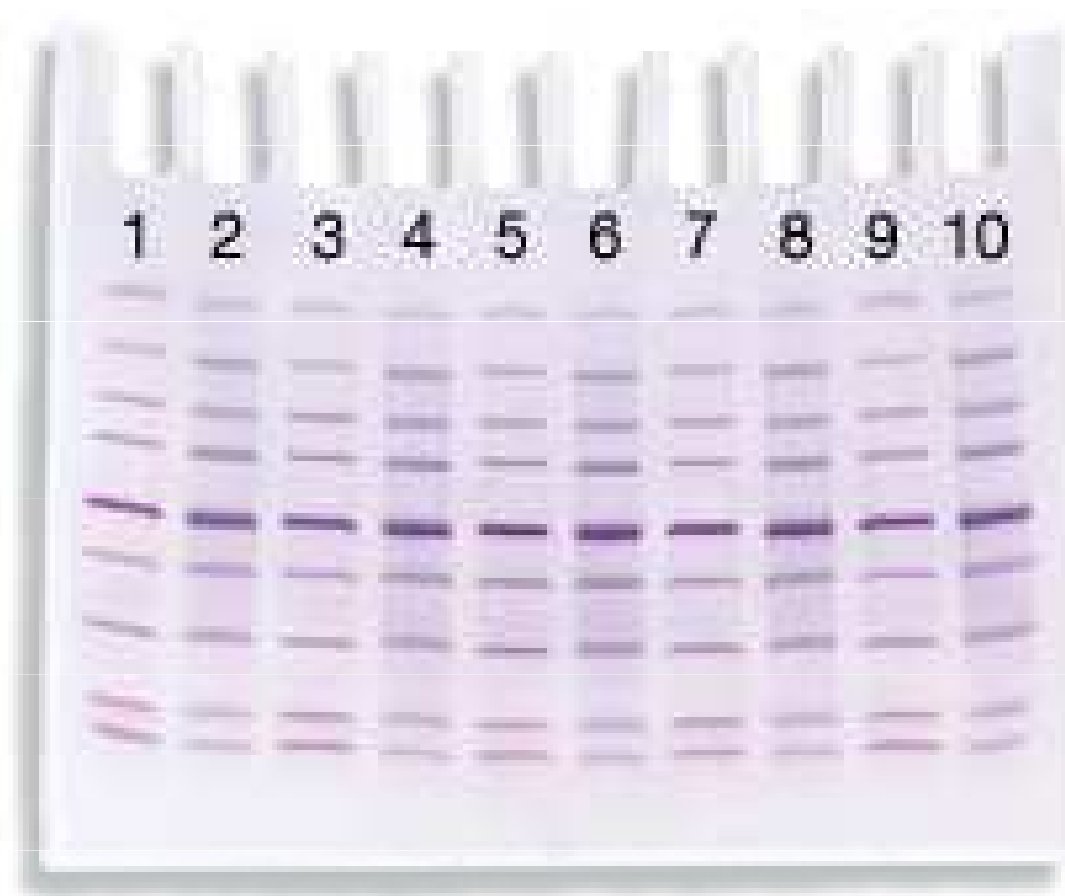


Stanovení M_r pomocí SDS PAGE



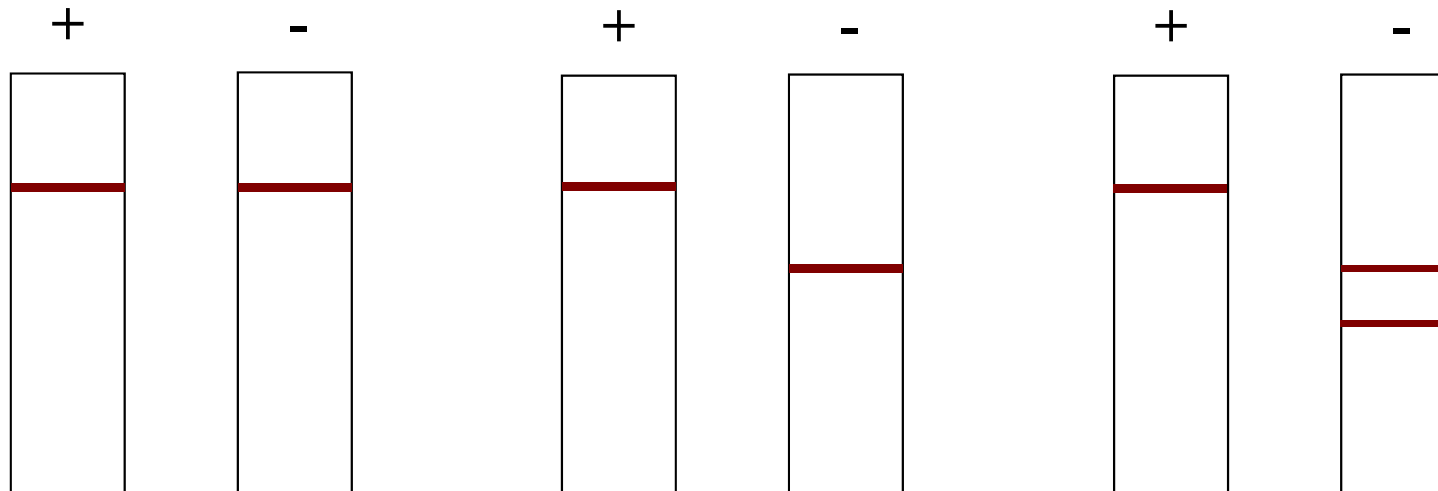
$$R_m = \frac{\text{skvrna}}{\text{čelo}}$$

Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy

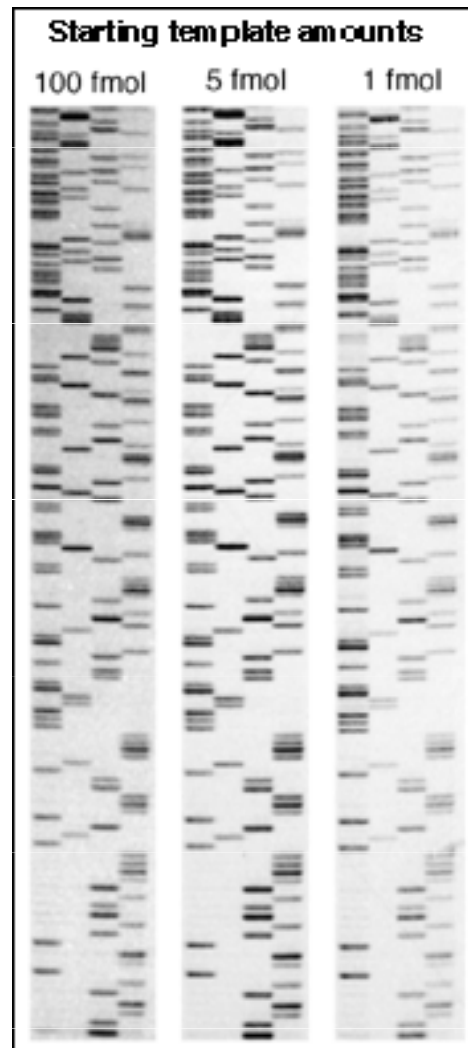


Použití SDS PAGE

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



PAGE - sekvenace DNA



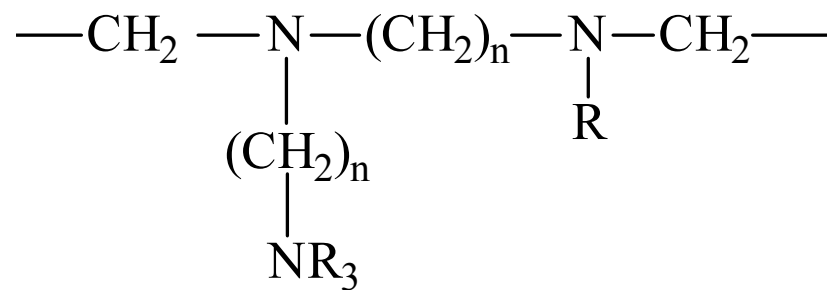
Izoelektrická fokusace

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

Tvorba gradientu

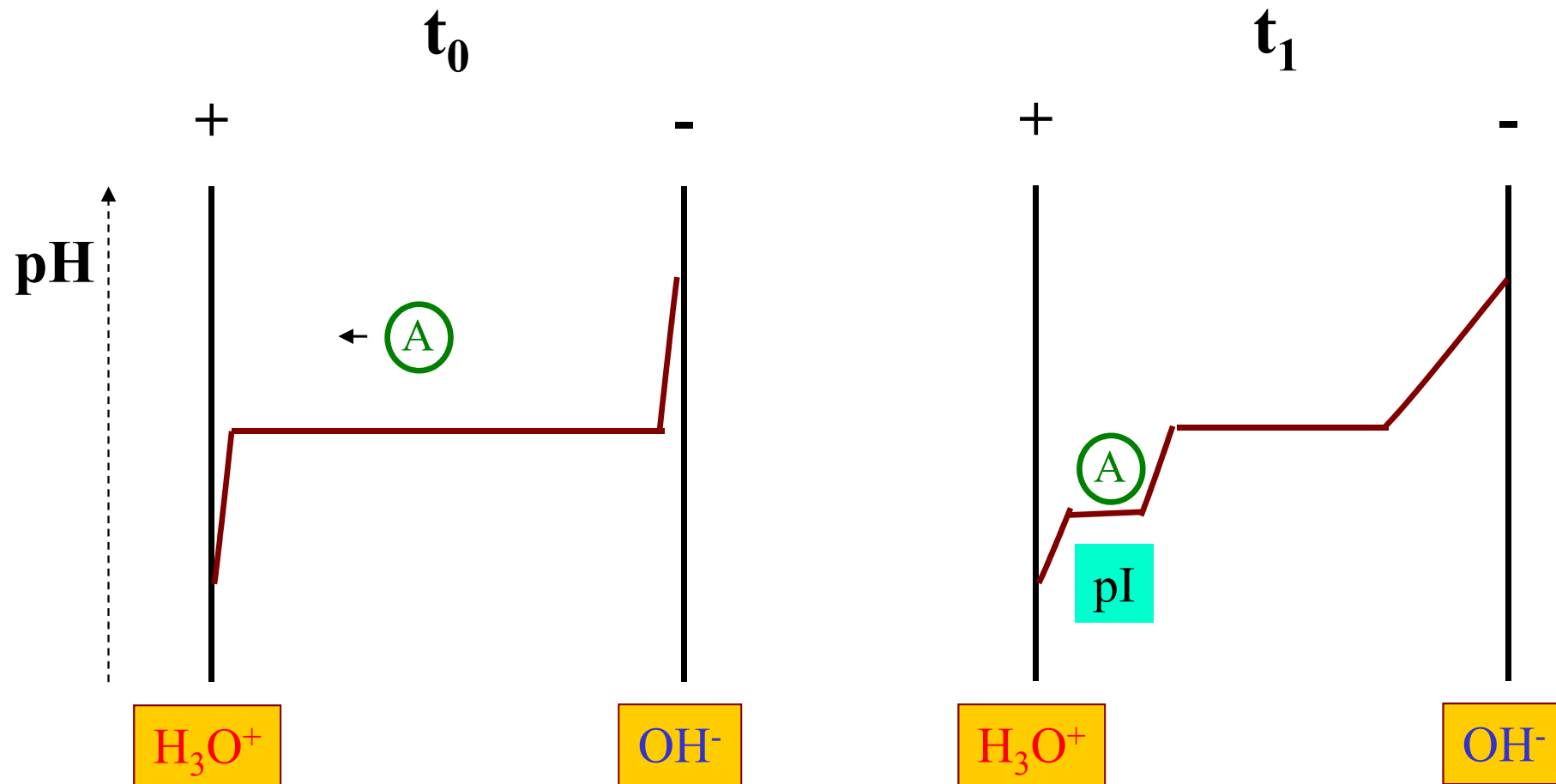


Ampholyty

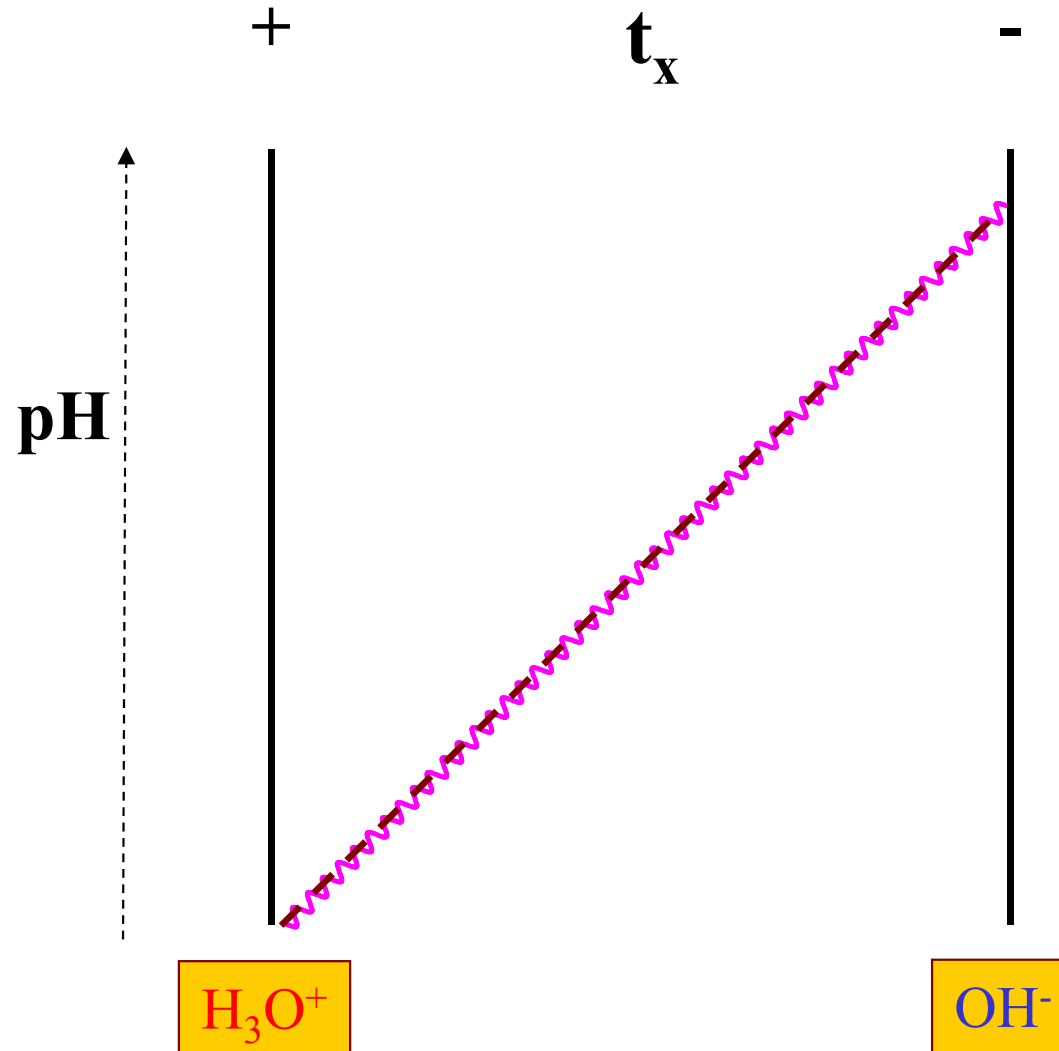


- R - CH₃
- CH₂COOH
- H

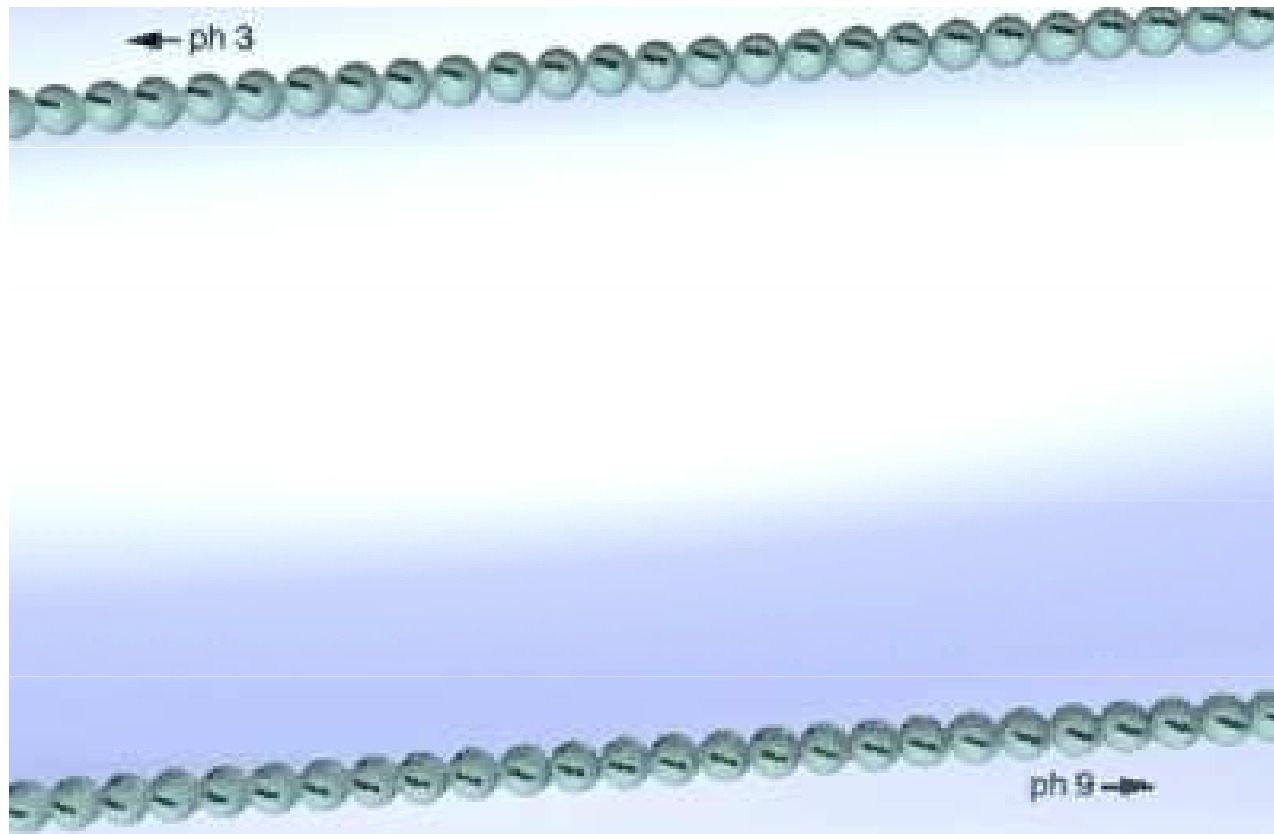
Izoelektrická fokusace



Izoelektrická fokusace



Kapilární izoelektrická fokusace



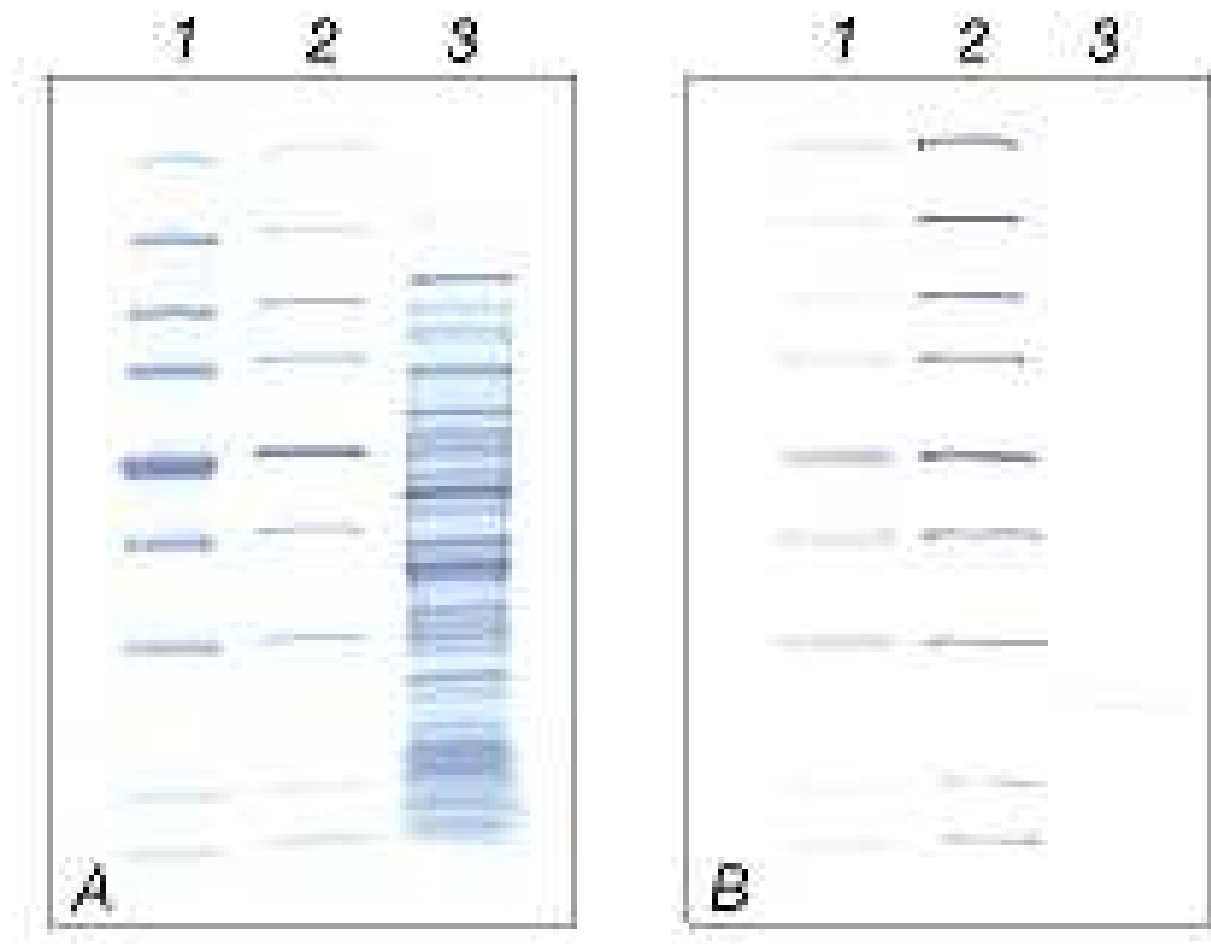
Izoelektrická fokusace analytická

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

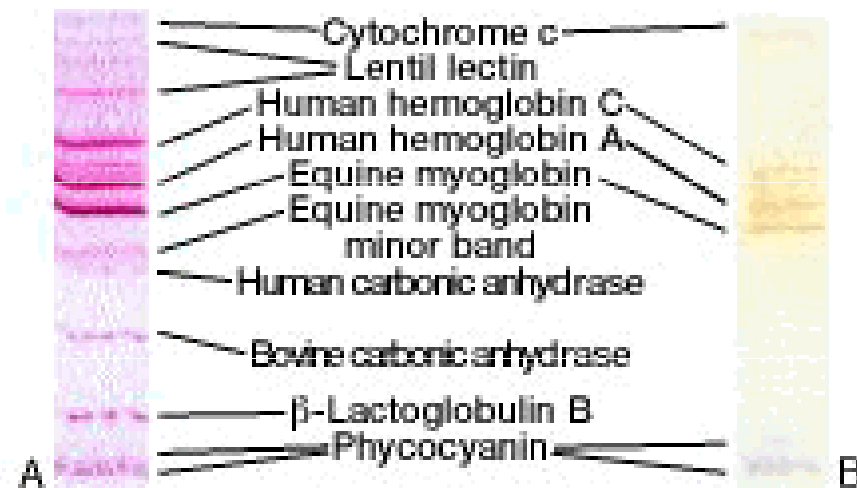
Izoelektrická fokusace analytická



Izoelektrická fokusace analytická



Izoelektrická fokusace analytická - standardy

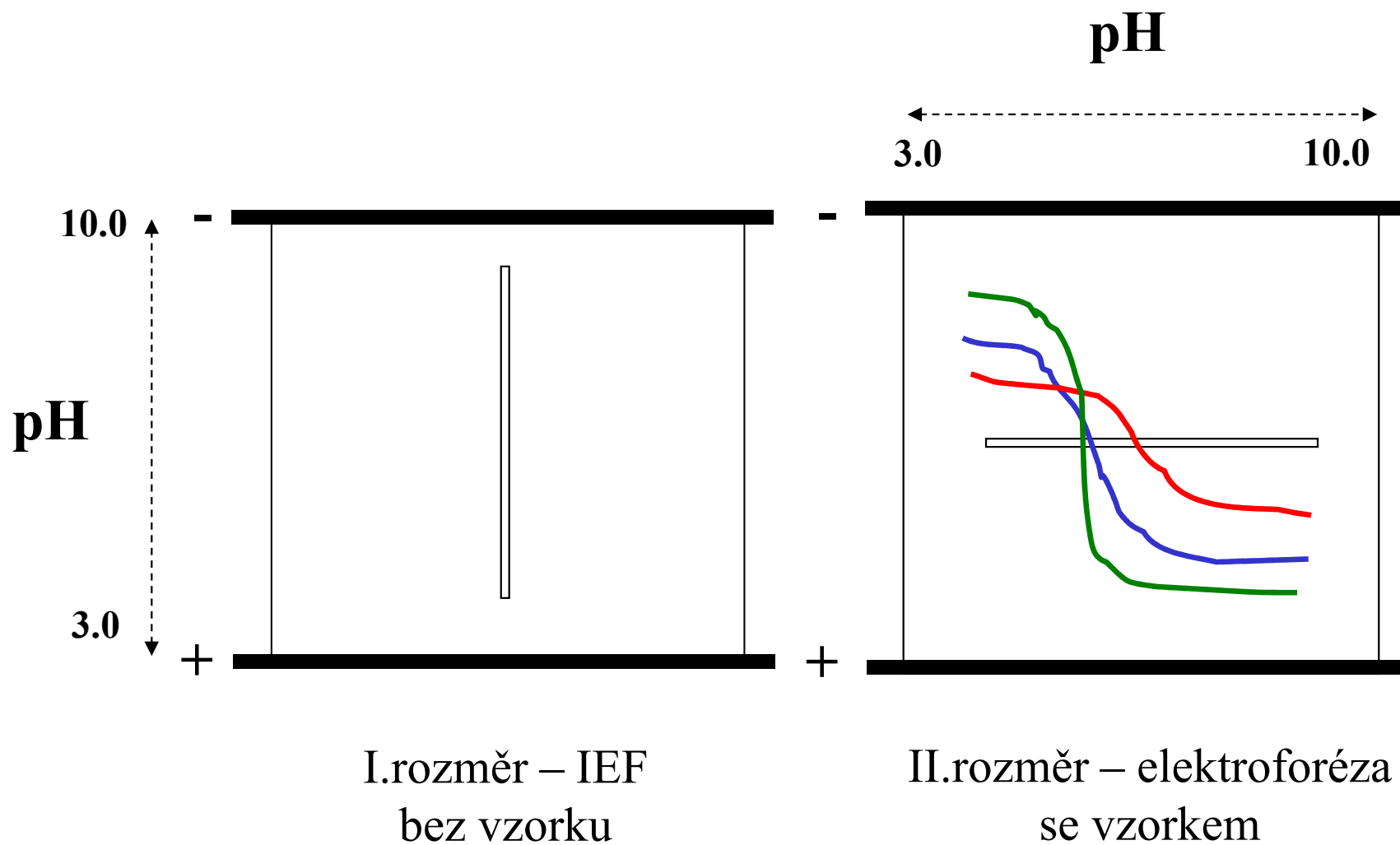


IEF Standards for accurate pI calibration of native IEF gels. A. 5 μ l of the standards were stained with Coomassie blue R-250 dye and cresyl scarlet. B. 5 μ l of the standards were left unstained.

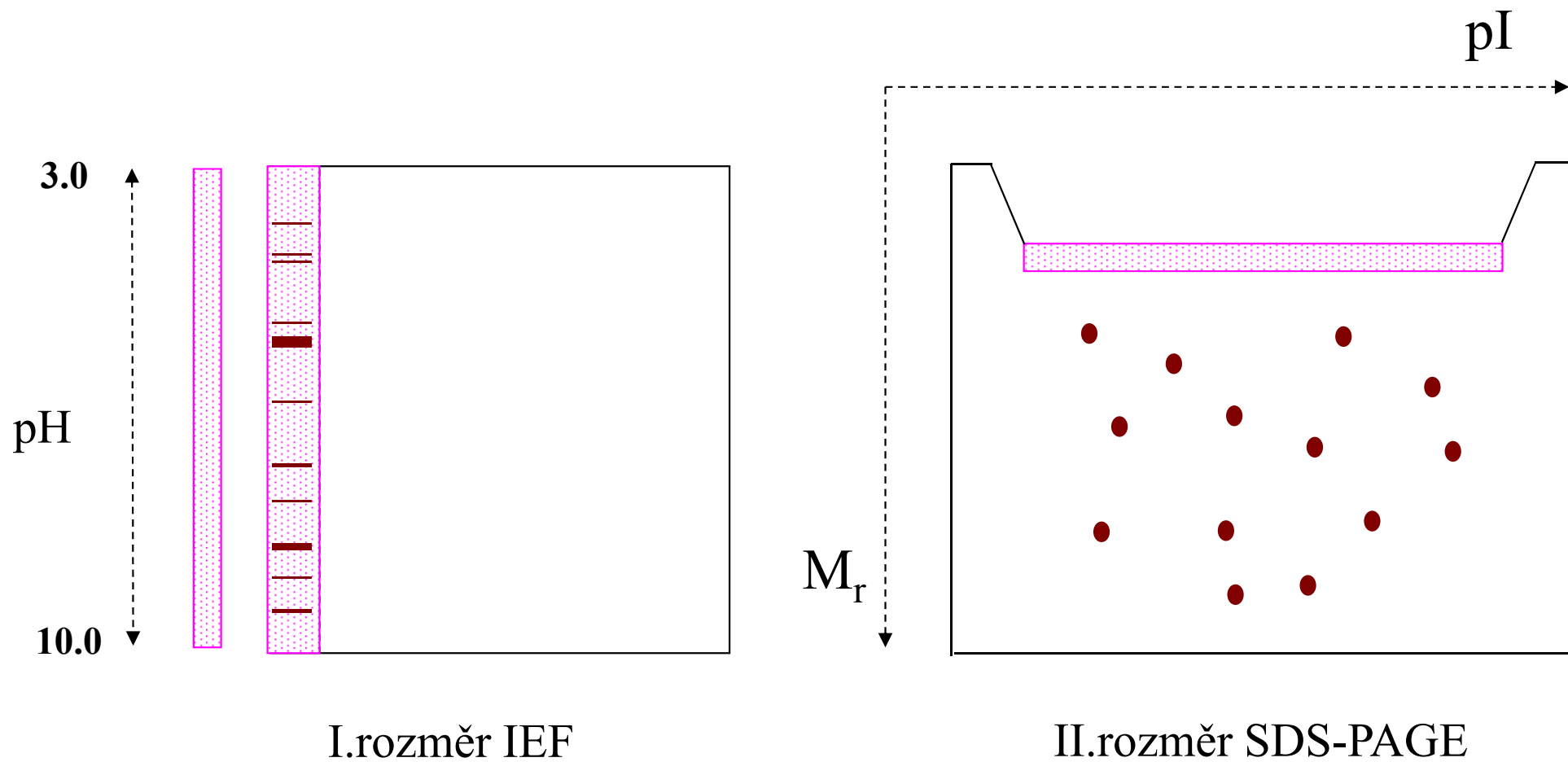
Dvourozměrné metody

- Metoda titračních křivek
- Dvourozměrná elektroforéza

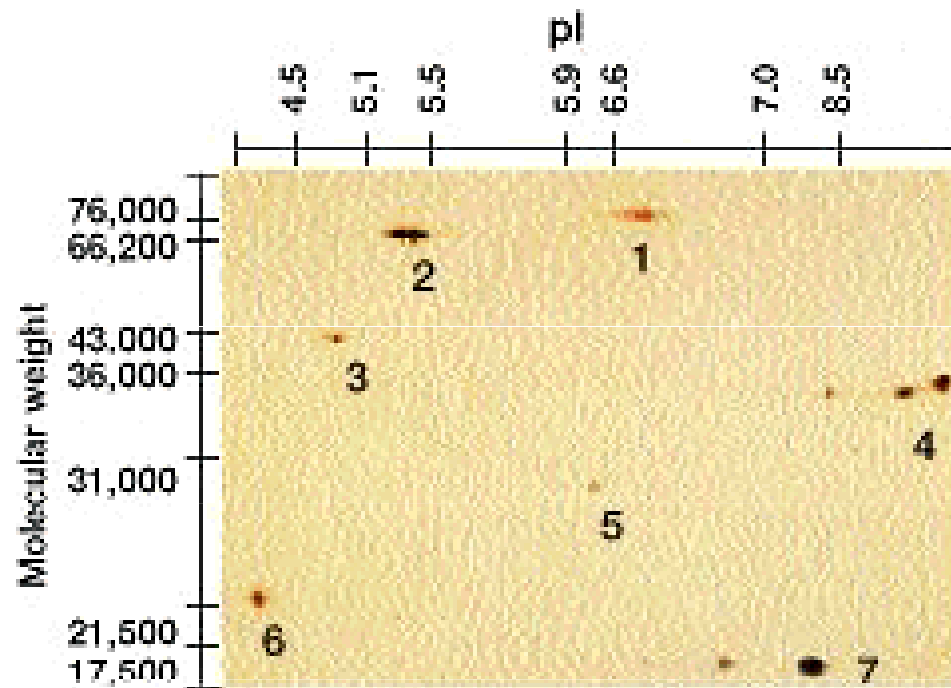
Metoda titračních křivek



Dvojrozměrná 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

