

# Elektromigrační metody



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

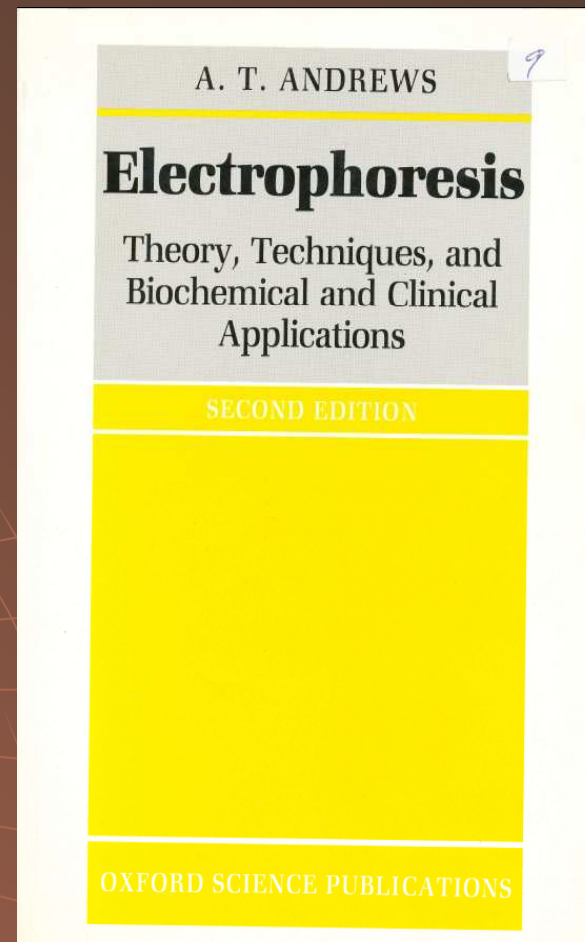
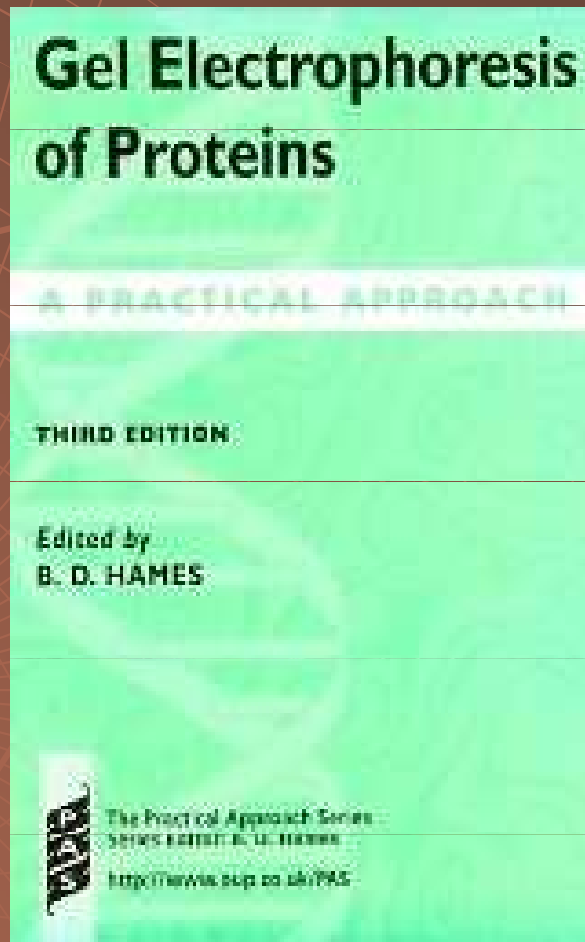
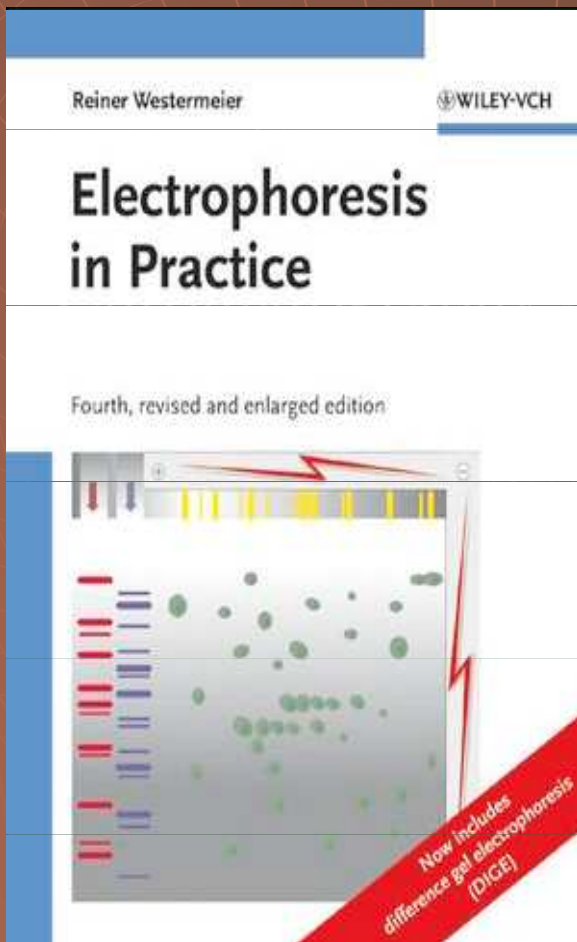


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Literatura



# Historie elektromigračních metod

- ◆ 1906 Reuss  
elektroforéza
- ◆ 1897 Kohlrausch  
regulační funkce
- ◆ 1930 Arne Tiselius  
Volná a zónová elektroforéza (1948 Nobelova cena)

# Historie elektromigračních metod

- ◆ 1962 Vesterberg, (Svensson) Rilbe  
izoelektrická fokusace
- ◆ 1967 Hjerten  
kapilární elektroforéza v rotující 1 - 3 mm  
křemenné kapiláře
- ◆ 1970 Laemmli  
SDS PAGE

# Historie elektromigračních metod

- ◆ 1975 O'Farrell  
2D-elektroforéza
- ◆ 1976 Everaerts, Mikkers  
isotachoforéza
- ◆ 2003 Karger  
Multikapilární CE – lidský genom

# Podstata

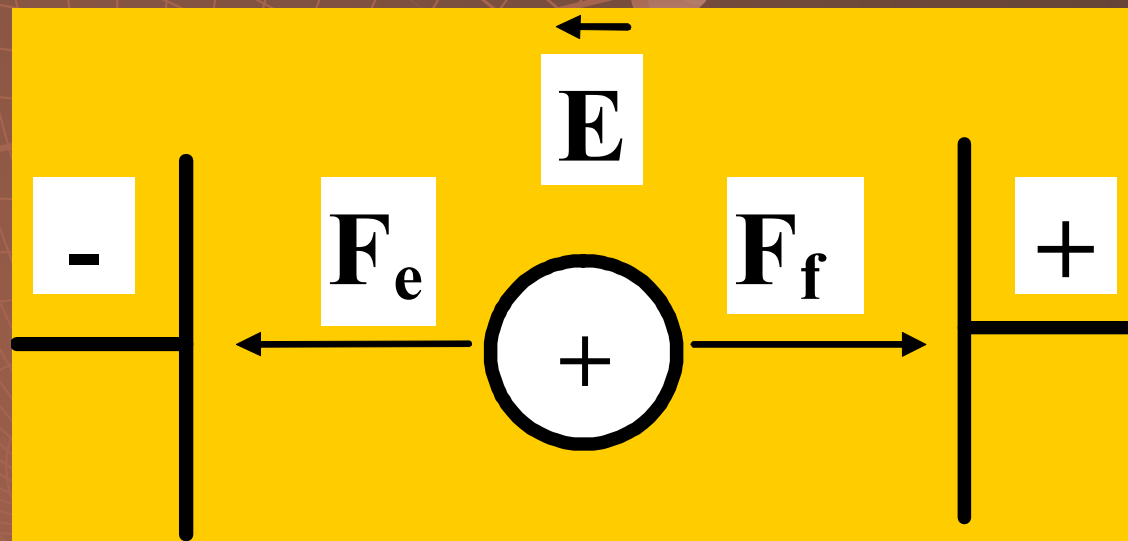
*„Pohyb elektricky nabitých  
částic  
v elektrickém poli“*

The background features a faint, light-brown grid of concentric circles and radial lines, representing an electric field. A small, dark, irregular shape is positioned at the center of the field, likely representing a point charge. The overall color scheme is a gradient of brown tones.



# 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  $\implies$

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

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

# Iontová mobilita

(limitní zředění, teplota 298 K)

<i>KATIONTY</i>	$ \mu_0 .10^9$	<i>ANIONTY</i>	$ \mu_0 .10^9$
H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	362.5	OH <sup>-</sup>	205.5
Li <sup>+</sup>	40.1	F <sup>-</sup>	57.4
Na <sup>+</sup>	51.9	Cl <sup>-</sup>	79.1
K <sup>+</sup>	76.2	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	74.1
Tris <sup>+</sup>	29.5	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	82.9
β-alanin	36.7	k.mléčná	36.5
ethanolamin	44.3	k.octová	42.4
imidazol	52.0	MES	28.0

# Efektivní mobilita

$A_0, A_1, A_2, \dots, A_k$

$\mu_0, \mu_1, \mu_2, \dots, \mu_k$

$$\bar{\mu}_A = \frac{1}{c_A} \times \sum_{i=0}^k c_i \mu_i = \sum_{i=0}^k x_i \mu_i$$

$c_A$  = celková analytická koncentrace látky A

$x_i$  = molární zlomek iontu i

# Závislost efektivní mobility na pH

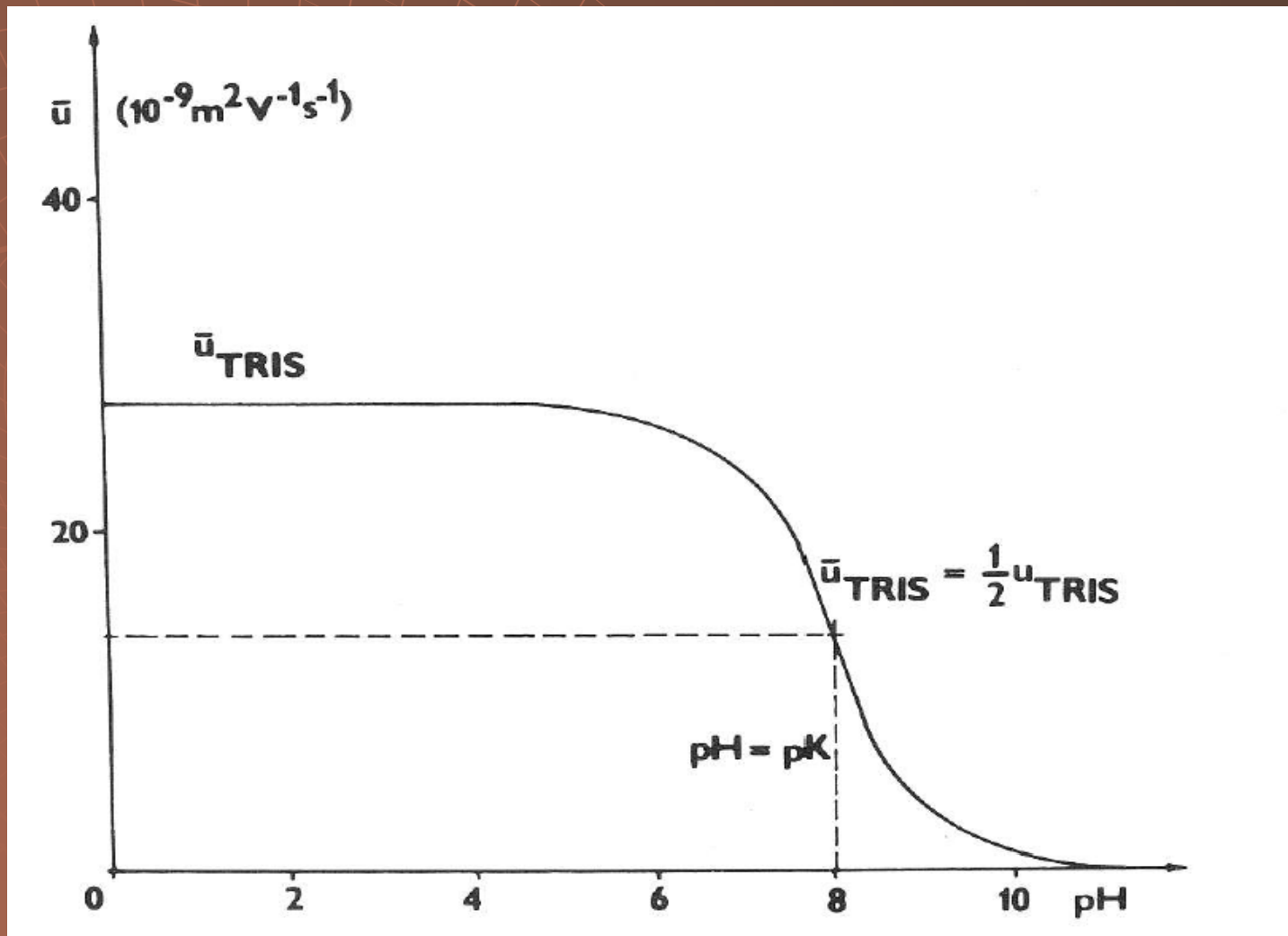
- ❖ pro slabou monovalentní kyselinu

$$\bar{\mu}_A = \frac{[H^+]}{K_{HA} + [H^+]} \times \mu_A$$

- ❖ pro slabou monovalentní zásadu

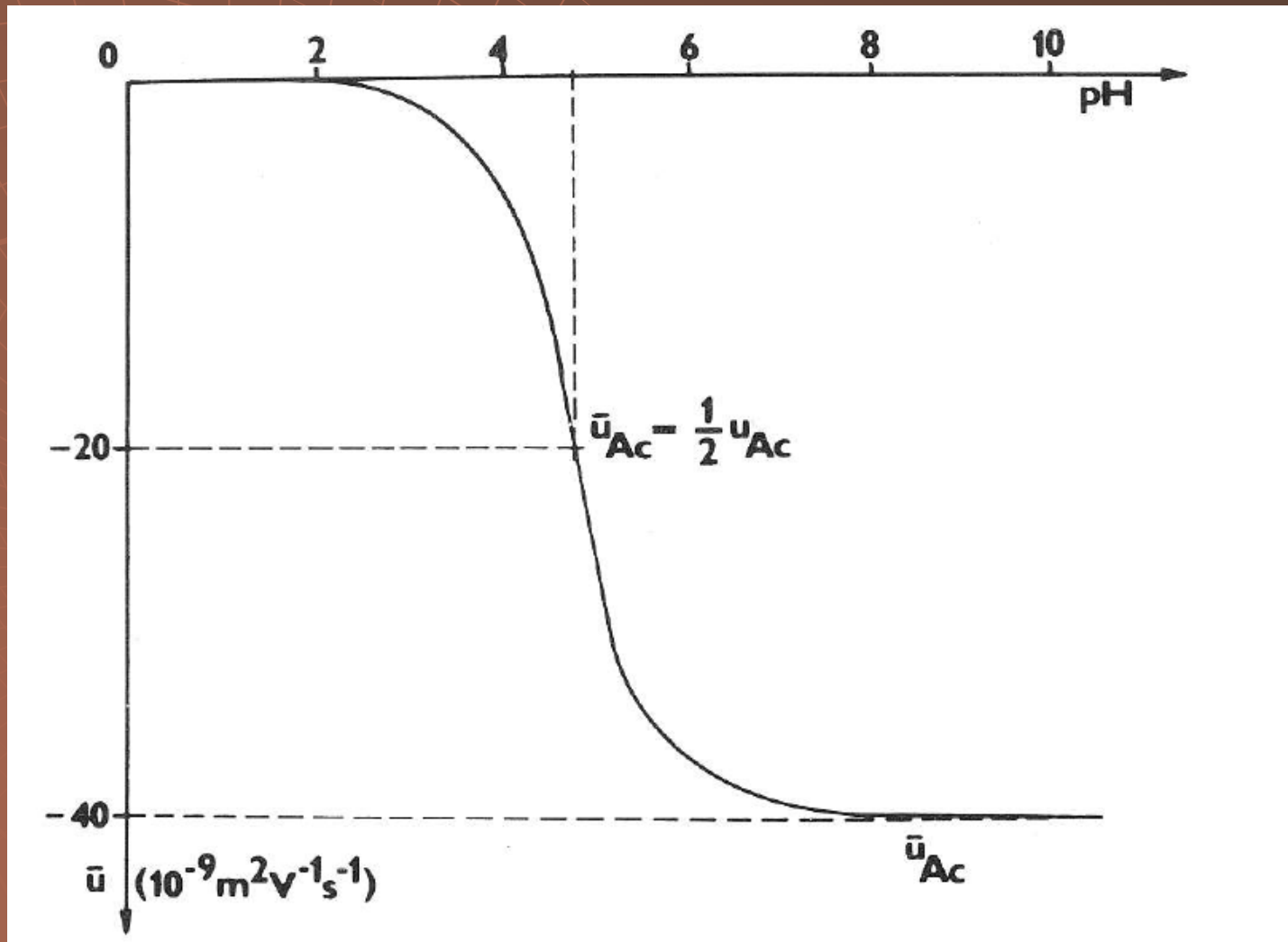
$$\bar{\mu}_B = \frac{[H^+]}{K_{BH} + [H^+]} \times \mu_{BH}$$

# Závislost efektivní mobility na pH pro slabou monovalentní zásadu

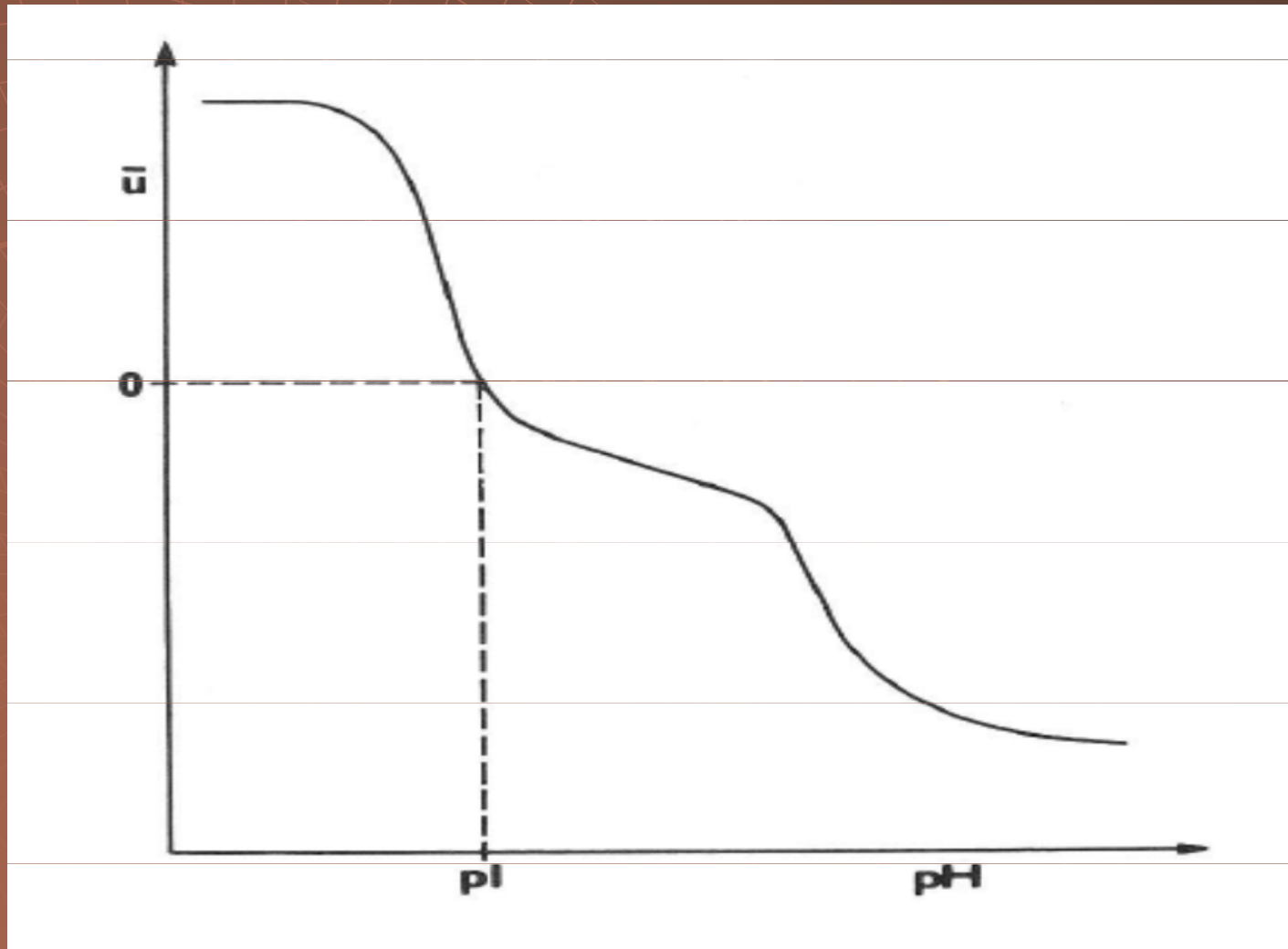


# Závislost efektivní mobility na pH

pro slabou monovalentní kyselinu



# Závislost efektivní mobility na pH pro bílkovinu





# Vliv velikosti molekuly na mobilitu

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

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

$$\frac{1}{r} \approx M_r^{\frac{1}{3}} \cdot \frac{2}{3}$$

$\eta$  - viskozita prostředí

$r$  – poloměr částice

# Vliv iontové síly na mobilitu

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

$z$  = 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
- ◆ Difuze

# Jouleovo teplo

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

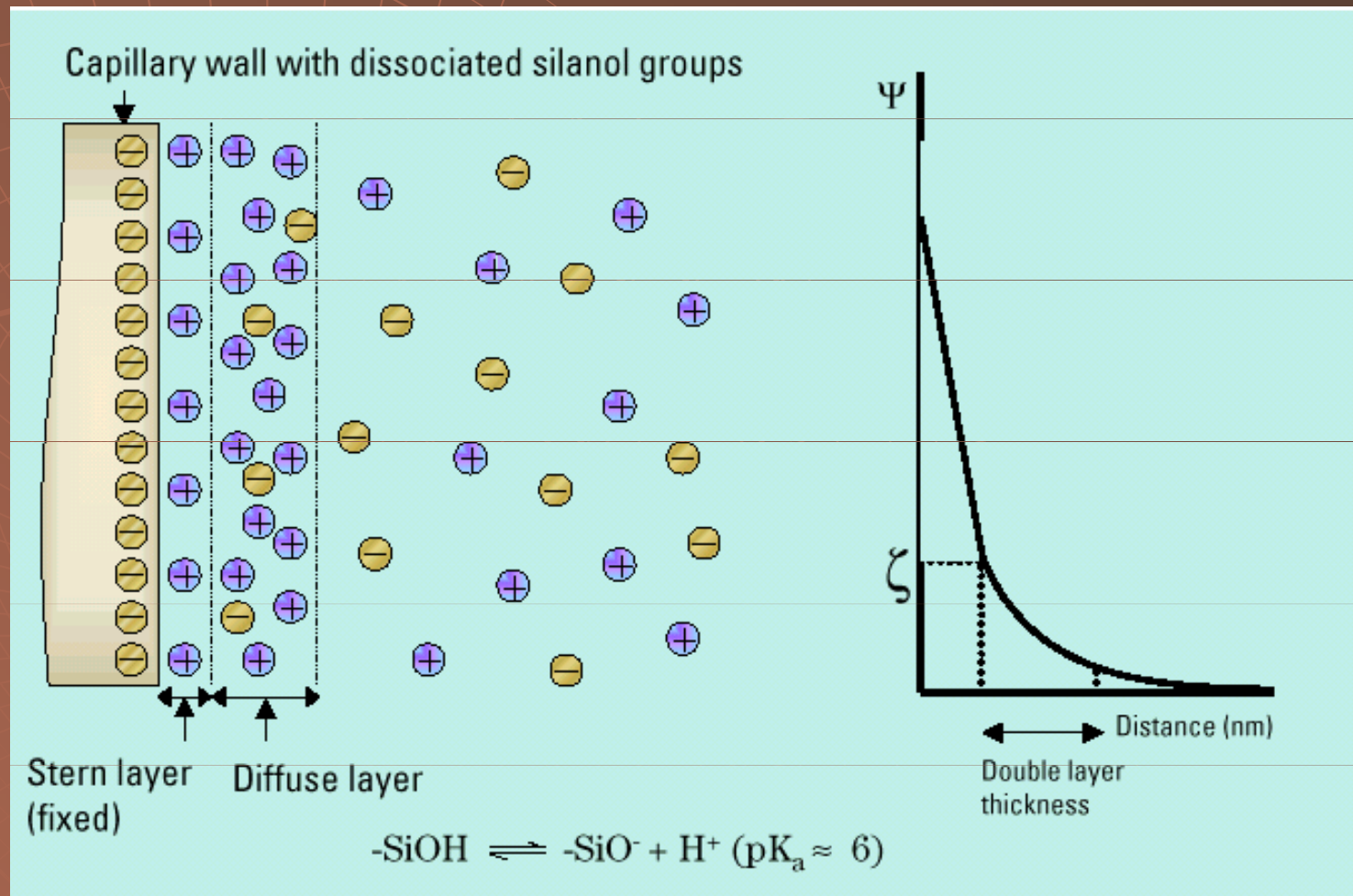
$P$  = výkon [W.m<sup>-3</sup>]

$S$  = průřez [m<sup>2</sup>]

$\kappa$  = vodivost [ $\Omega^{-1}$ .m<sup>-1</sup>]

$i$  = elektrický proud [A]

# Elektroosmotický tok



# Elektroosmotický tok

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

$\xi$  = potenciál Helmholtzovy dvojvrstvy

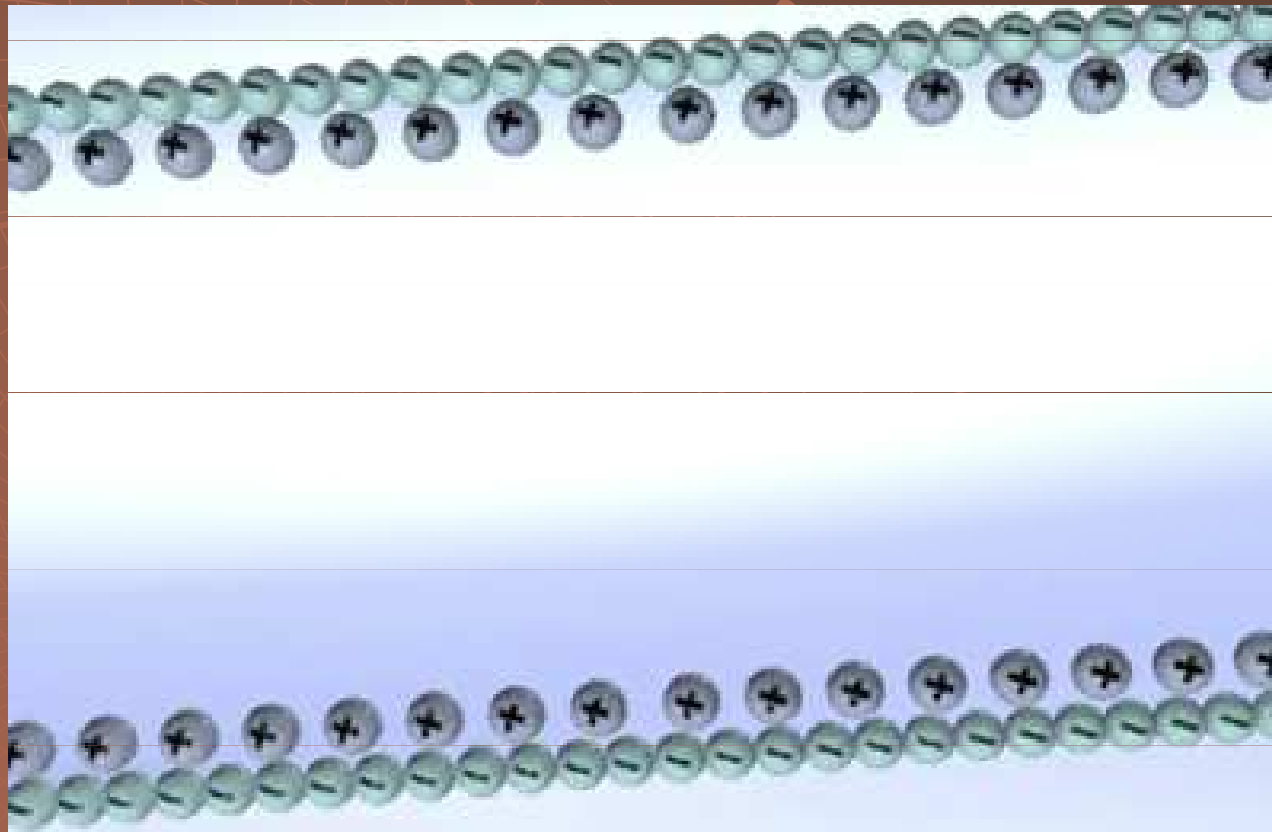
$\eta$  = viskozita

$\varepsilon$  = dielektrická konstanta

$\mu_{eo}$  = elektroosmotická mobilita

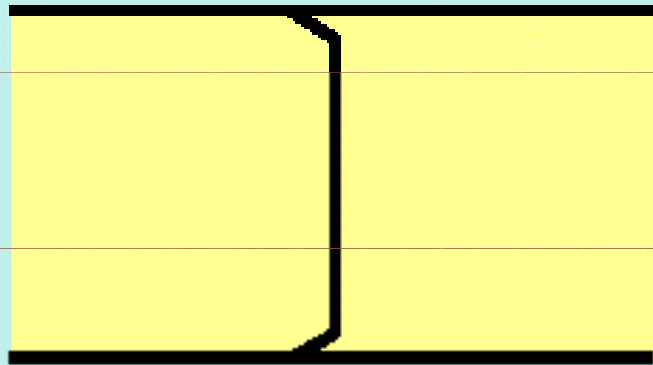
$$v_{eo} = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \times E\xi$$

# Původ elektroosmotického toku

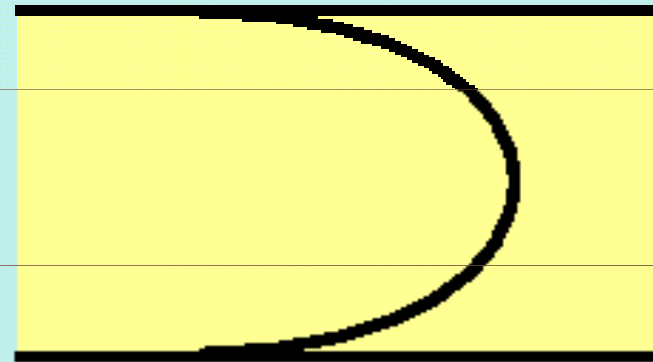




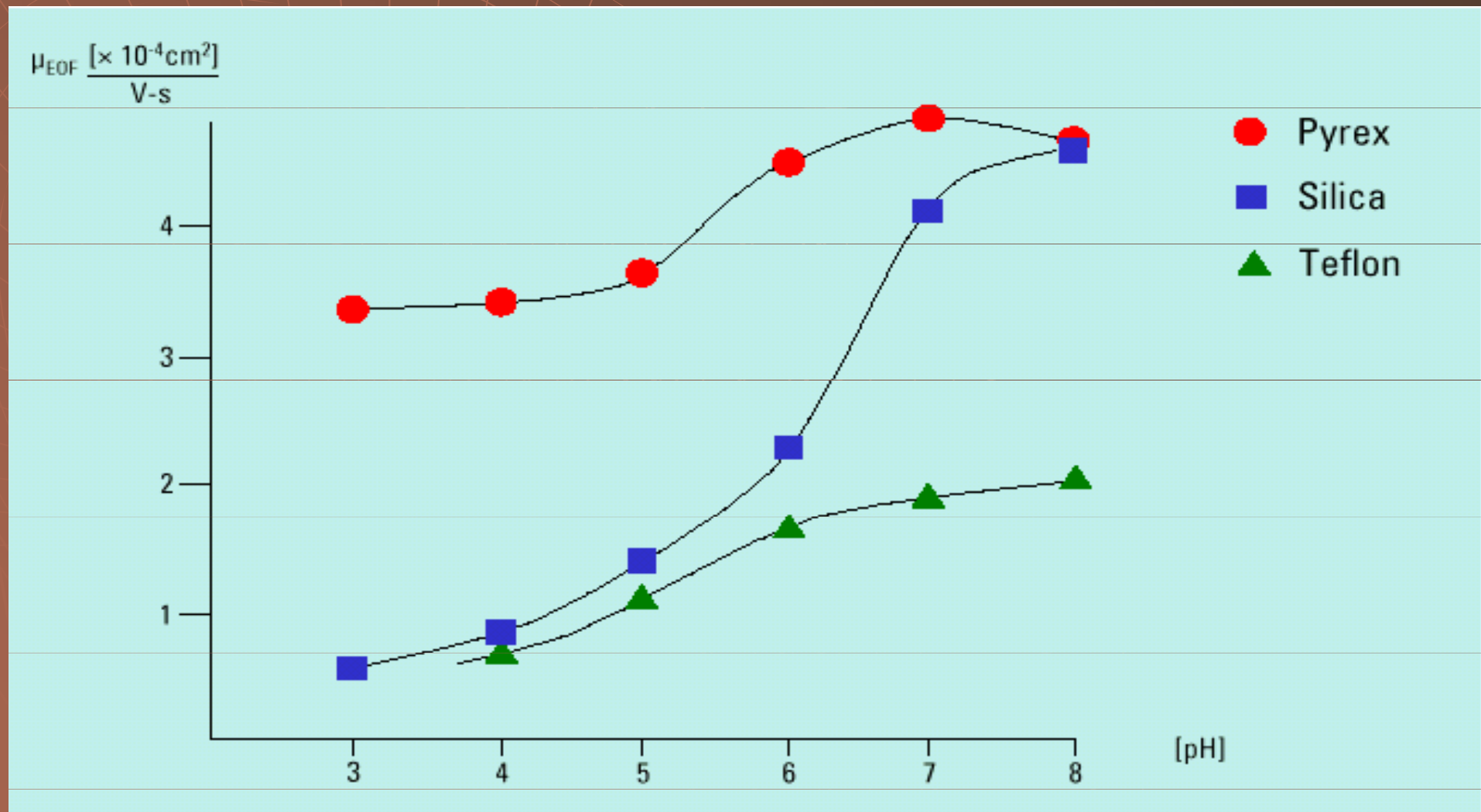
# Elektroosmotický tok



# Laminární tok



# Elektroosmotický tok v různých kapilárách



# Difuze

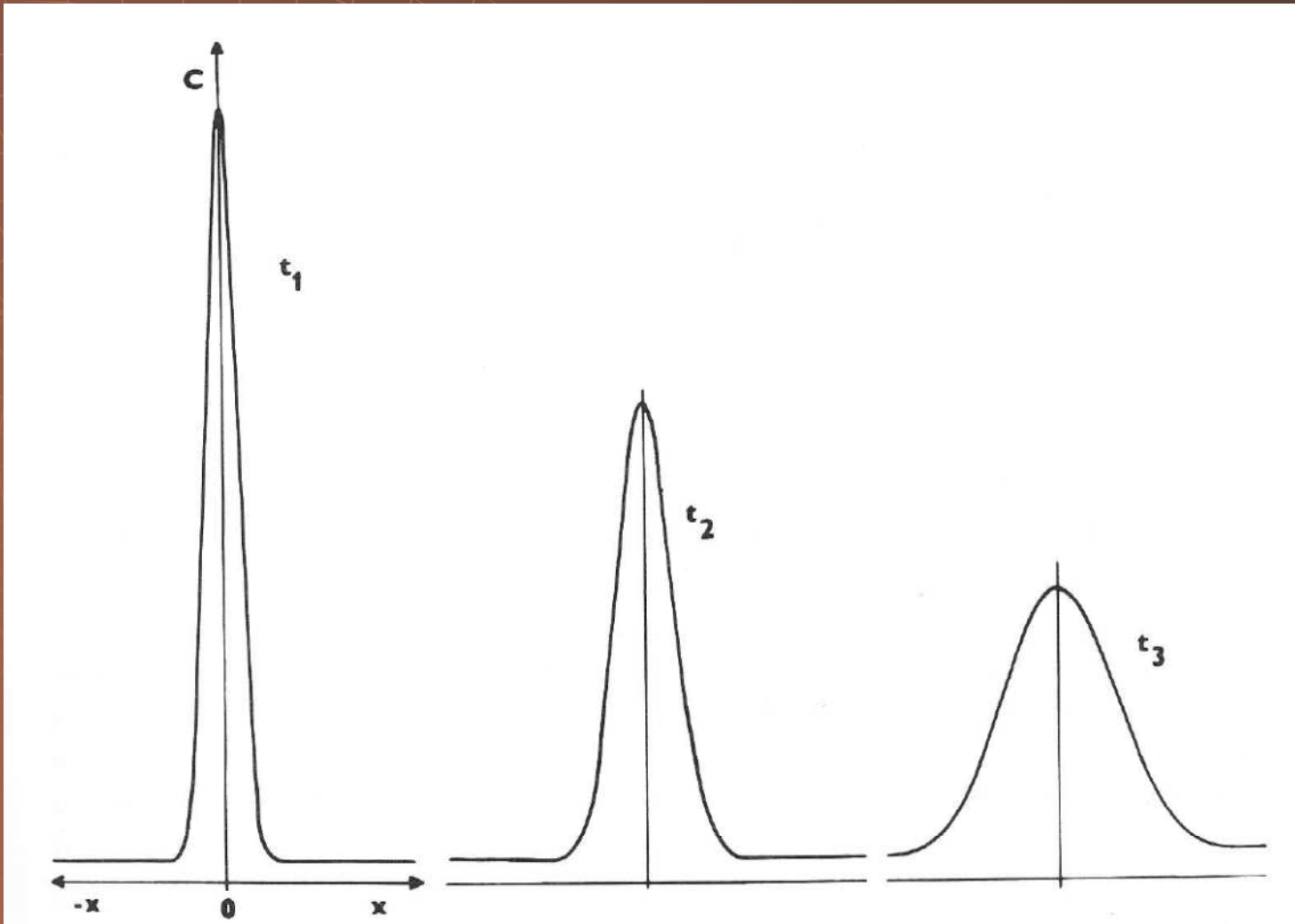
$$c = c_0 e^{-\left(\frac{x^2}{\sigma^2}\right)}$$

$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$

$\sigma^2$  = rozptyl

$D$  = difuzní koeficient

# Difuze



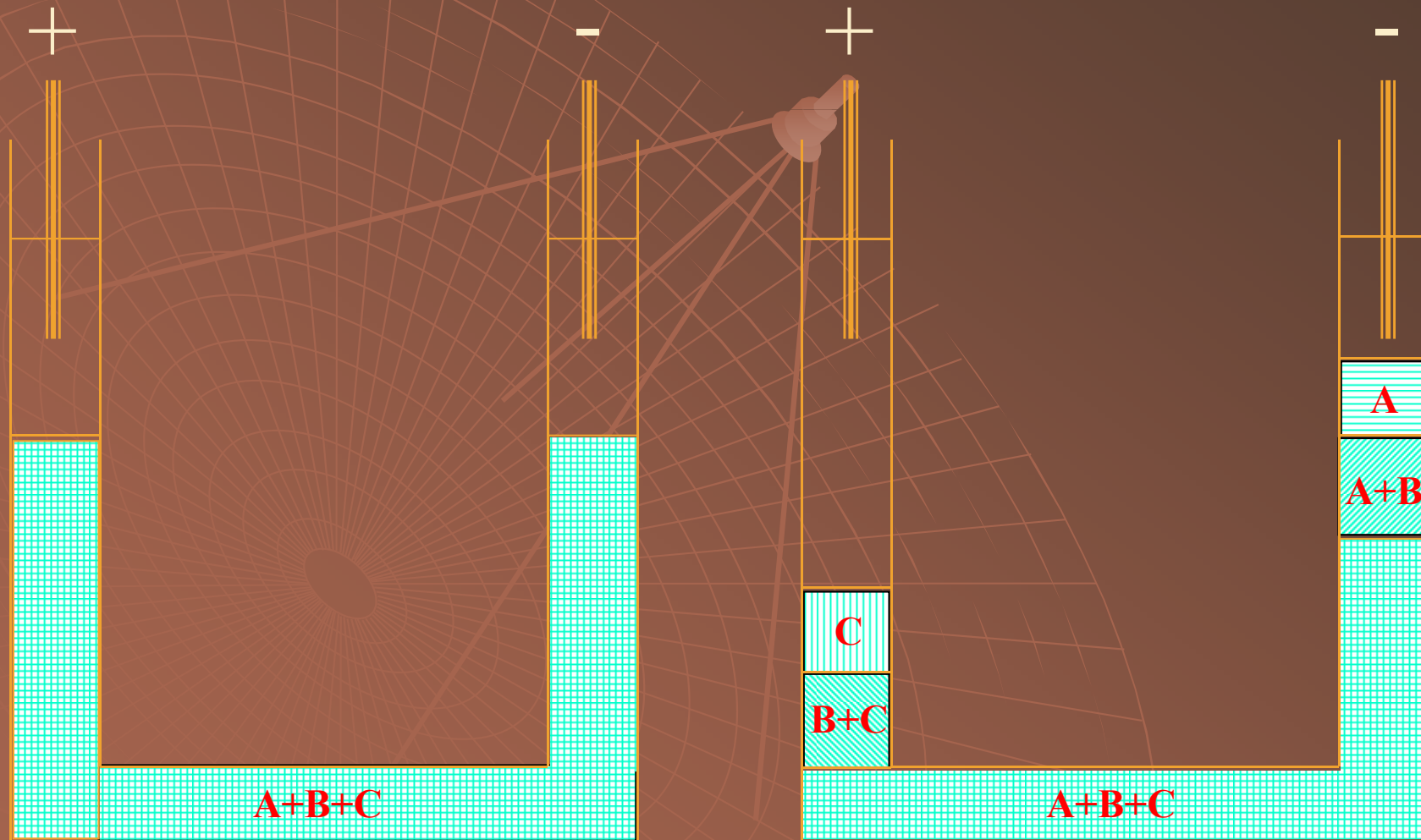
# Elektroforéza

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

# Elektroforéza

- ◆ Volná
  - ◆ Zónová
- 
- The background of the slide features a faint, light-brown grid pattern. This grid is composed of concentric circles and radial lines, resembling a circular gel electrophoresis apparatus. A central dark oval represents the electrode well. Several lines radiate from the center, and a small, light-brown, hand-like icon is positioned near the top right of the grid, pointing towards the center.

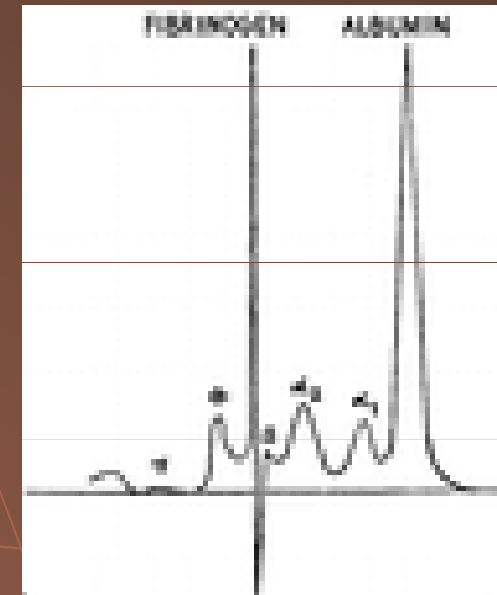
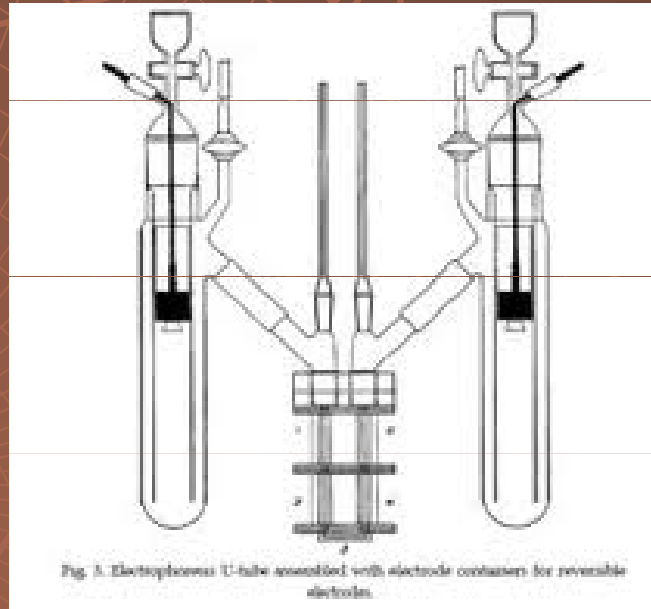
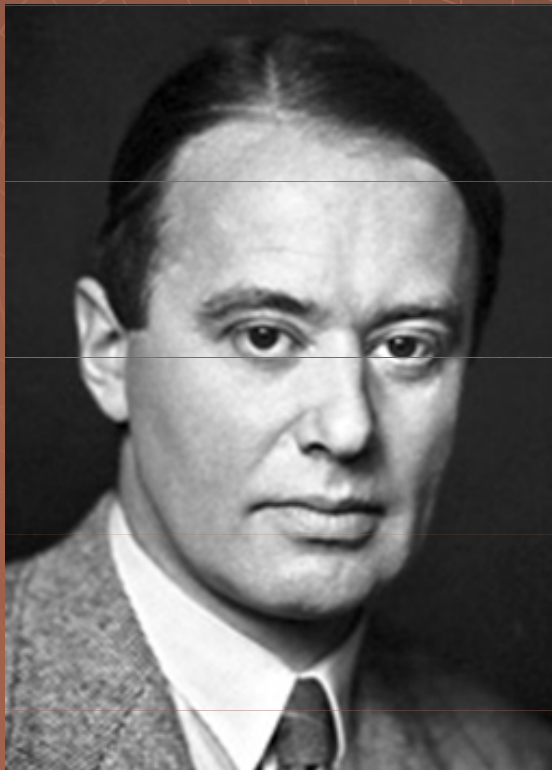
# Volná elektroforéza



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

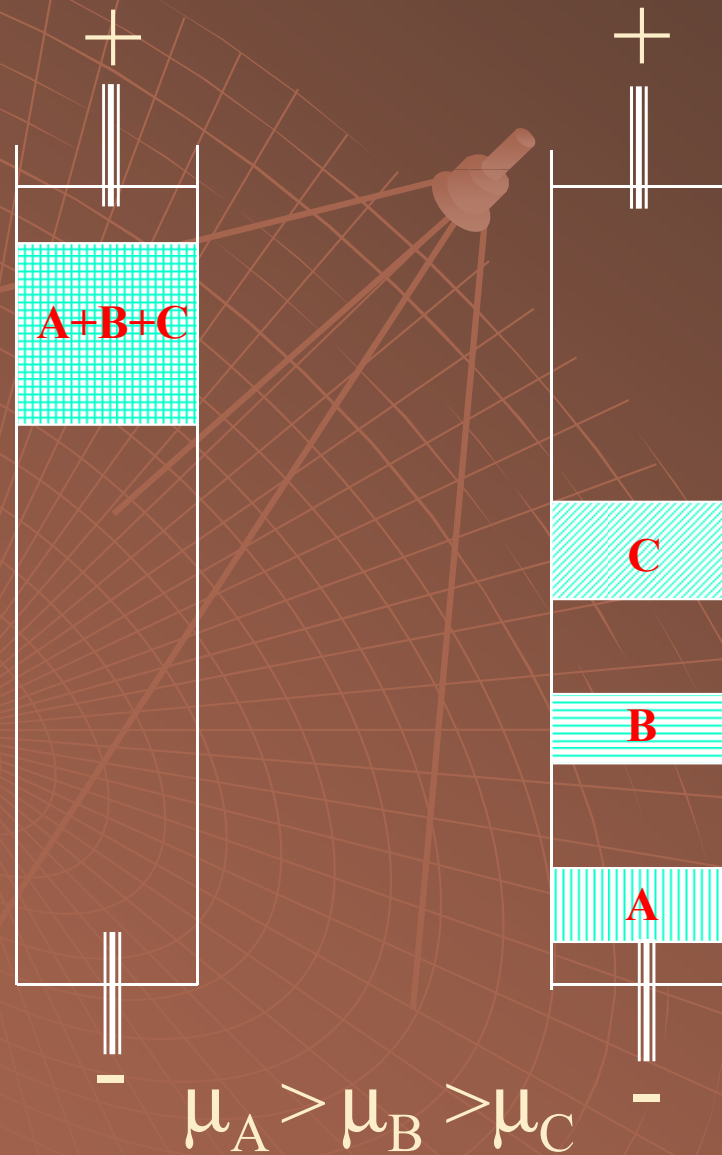
# Volná elektroforéza

## Arne Tiselius





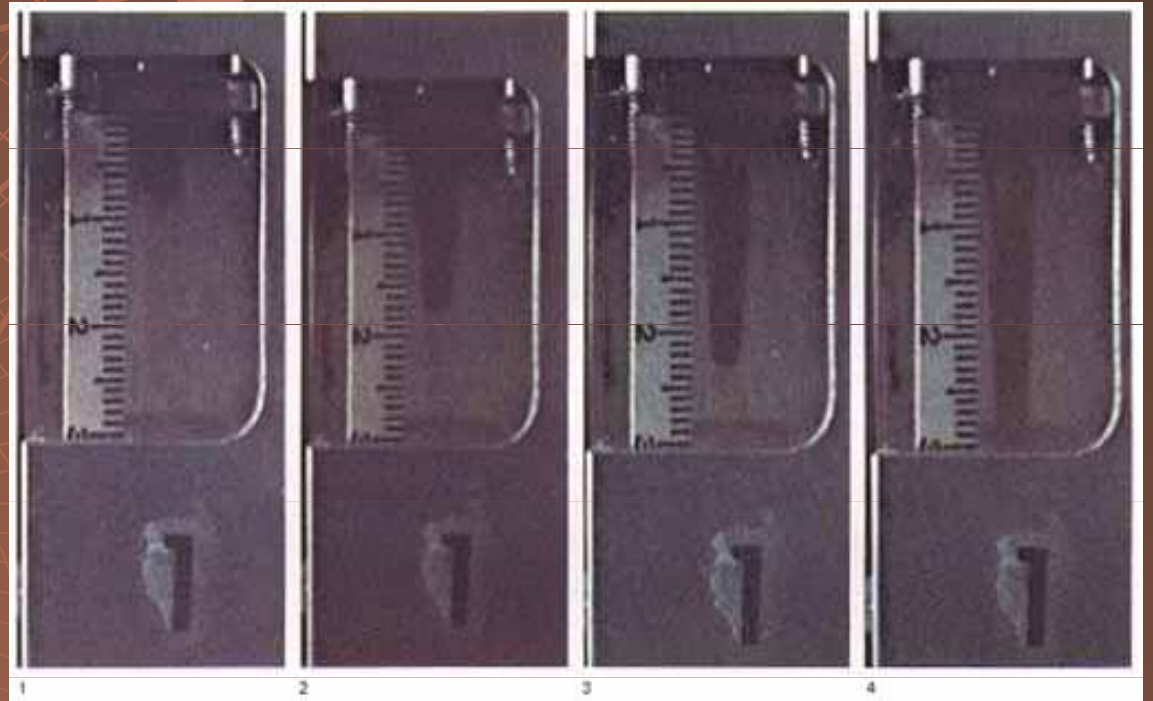
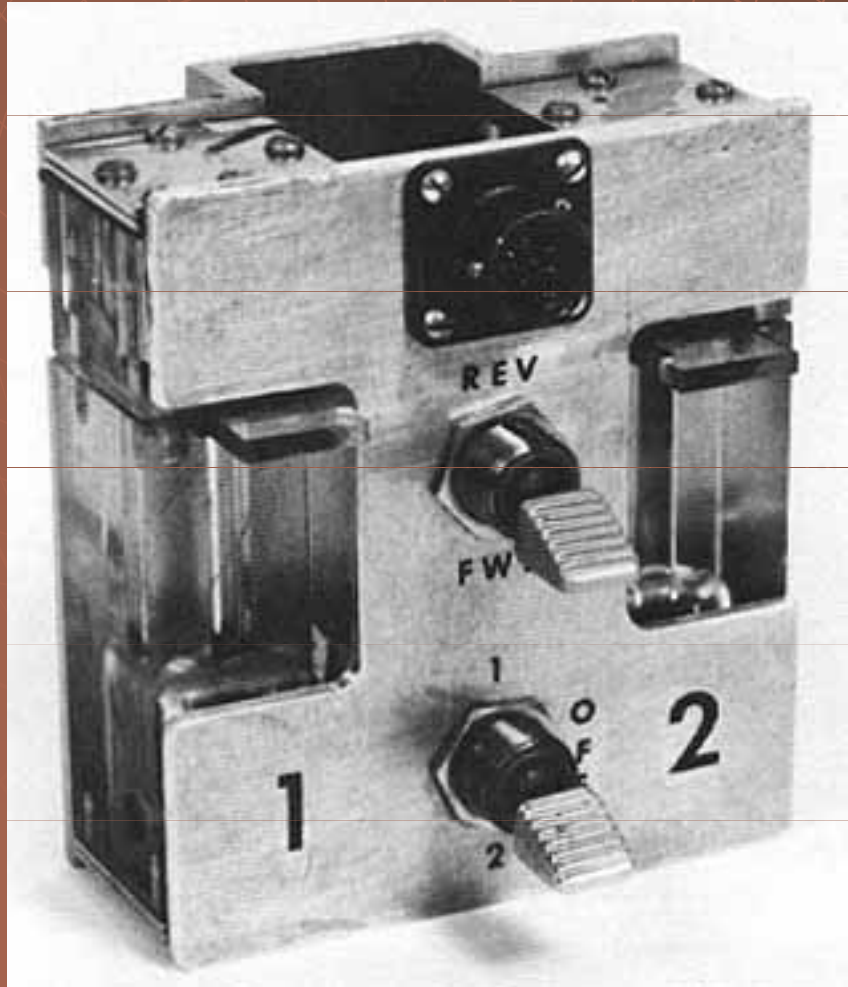
# Zónová elektroforéza



# Skylab



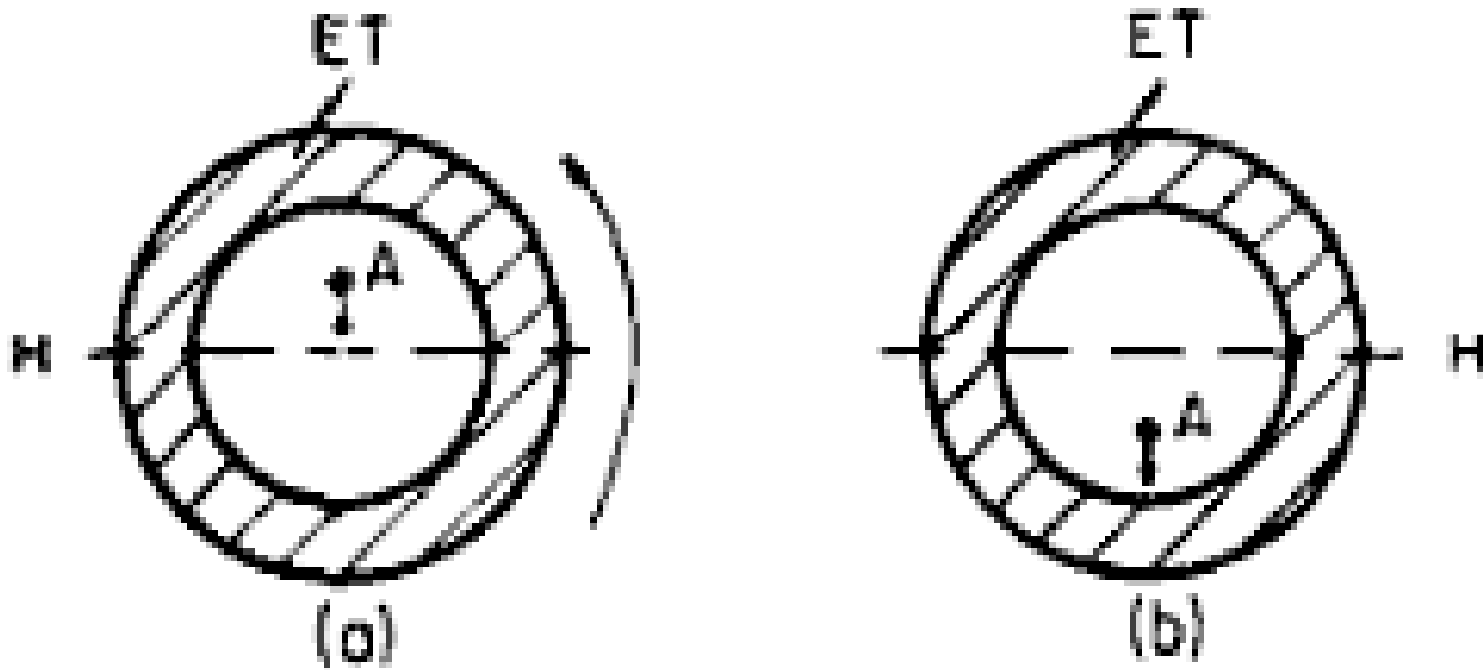
# Skylab



# Stabilizace

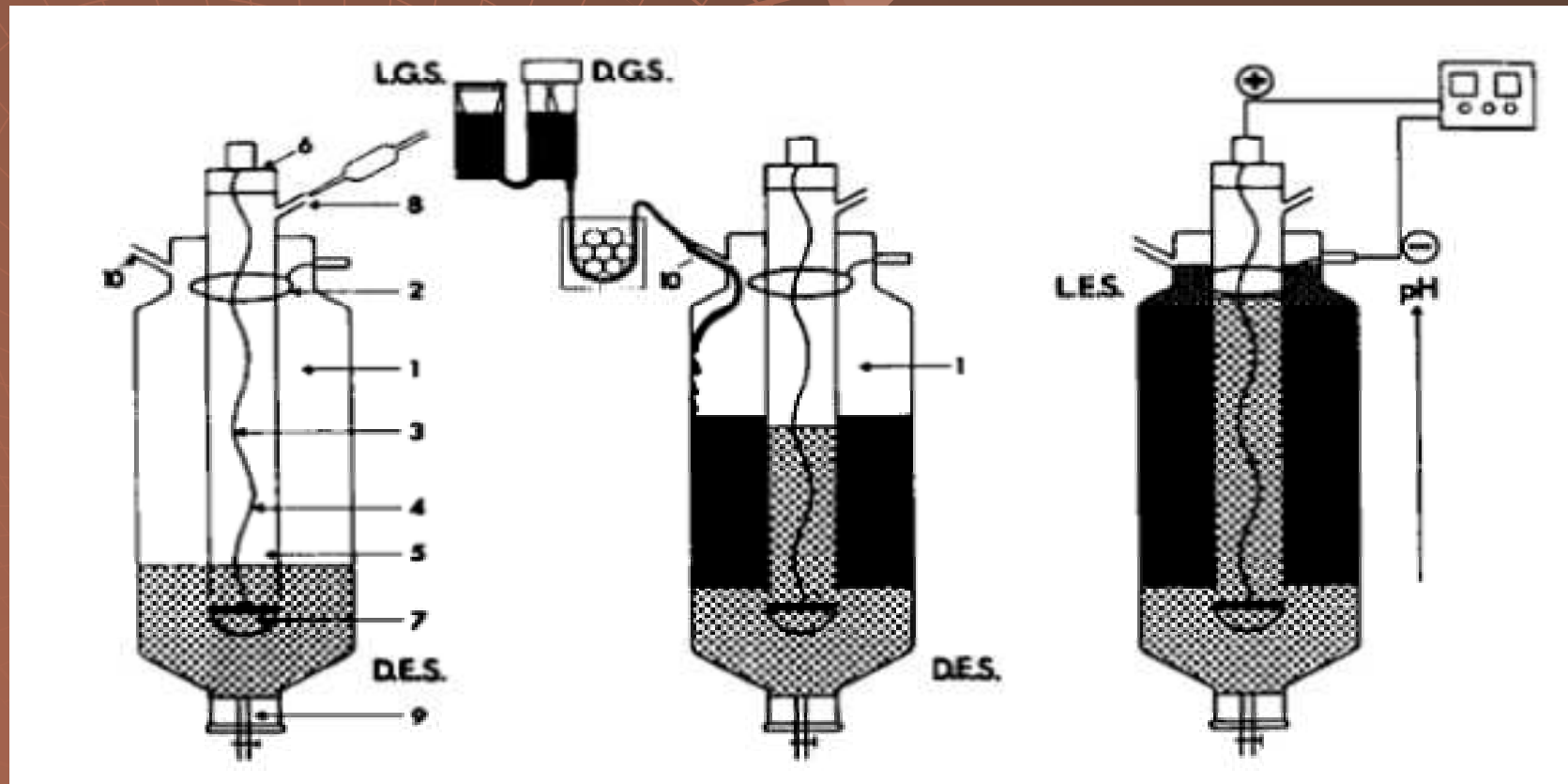
- ◆ Rotací
- ◆ Gradienty hustoty
- ◆ Porézními medii
- ◆ Kapilárou

# Stabilizace Rotací



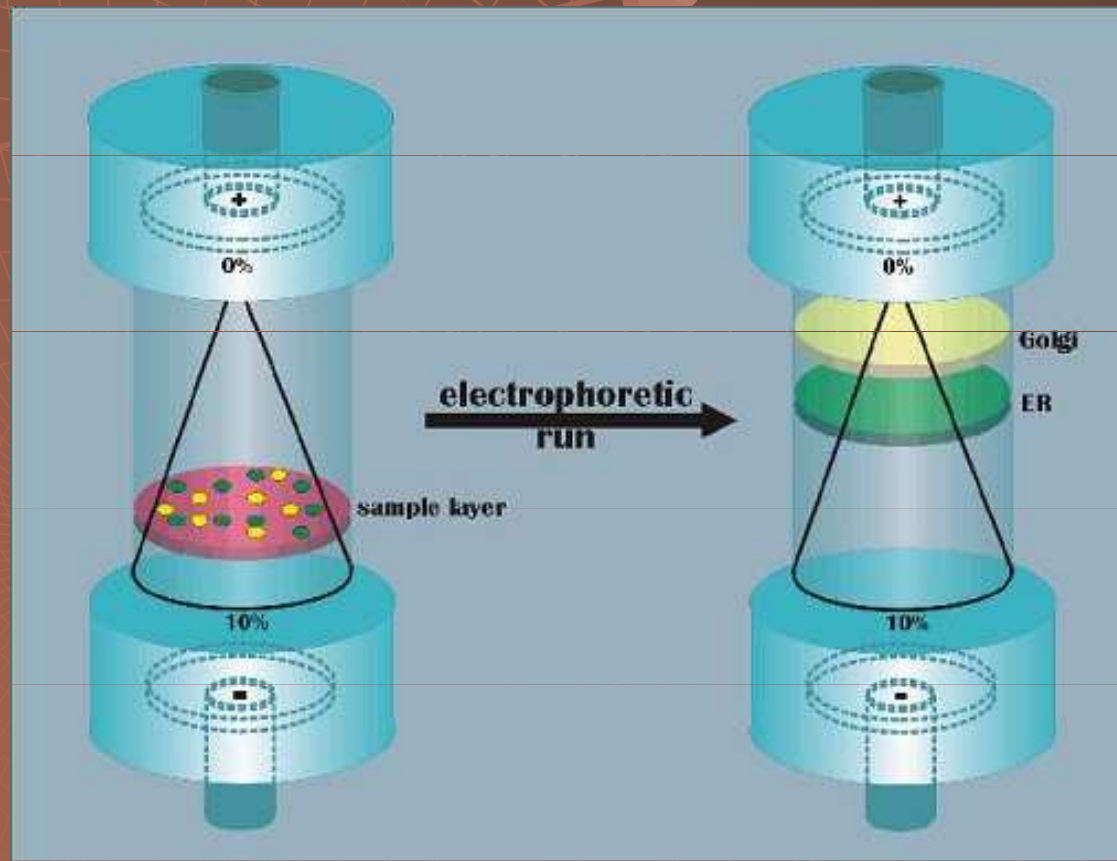
# Stabilizace

## Gradienty hustoty



# Stabilizace

## Gradienty hustoty



# Požadavky na porézní media

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



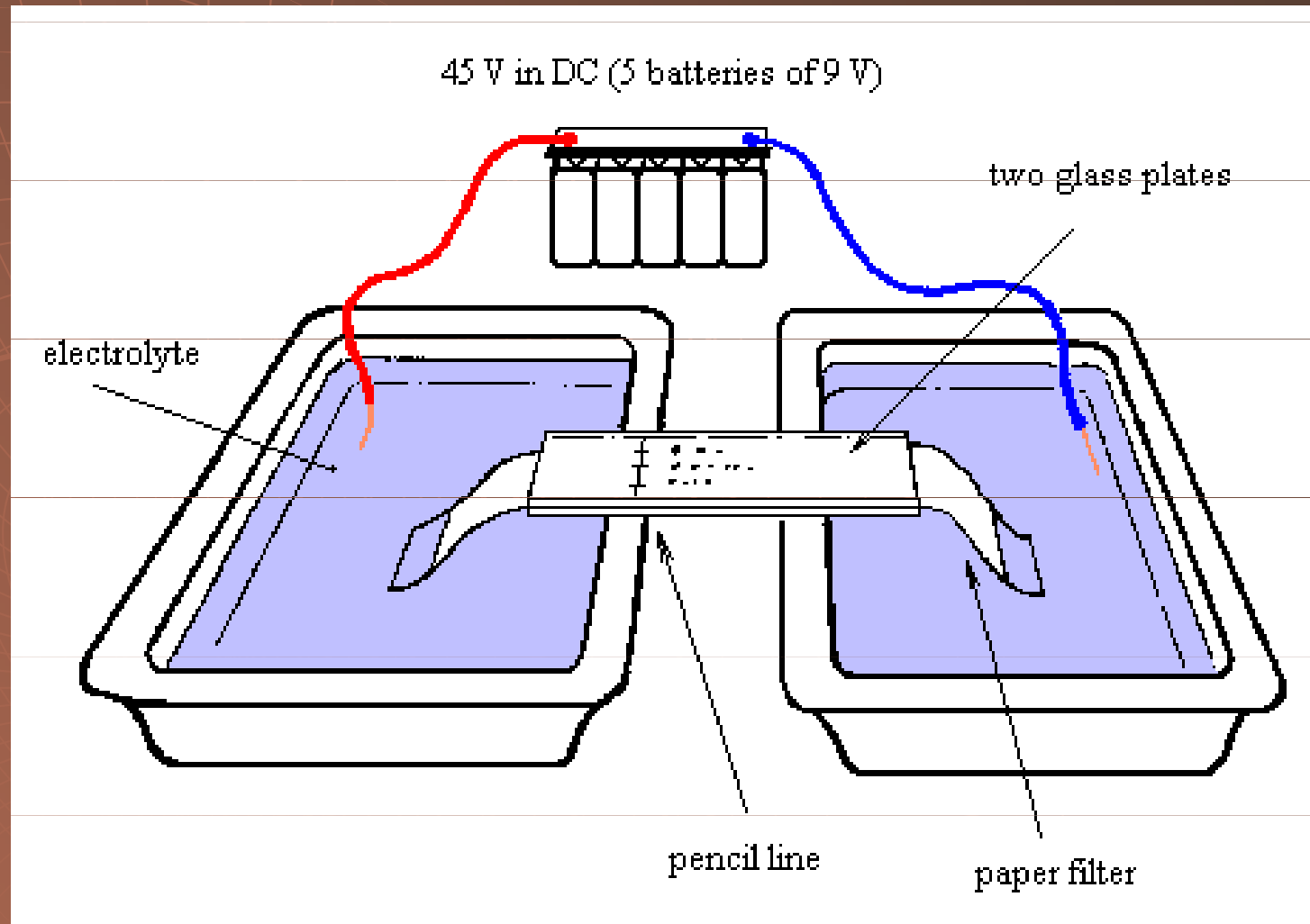
# Chromatografický papír

## Složení – celuloza

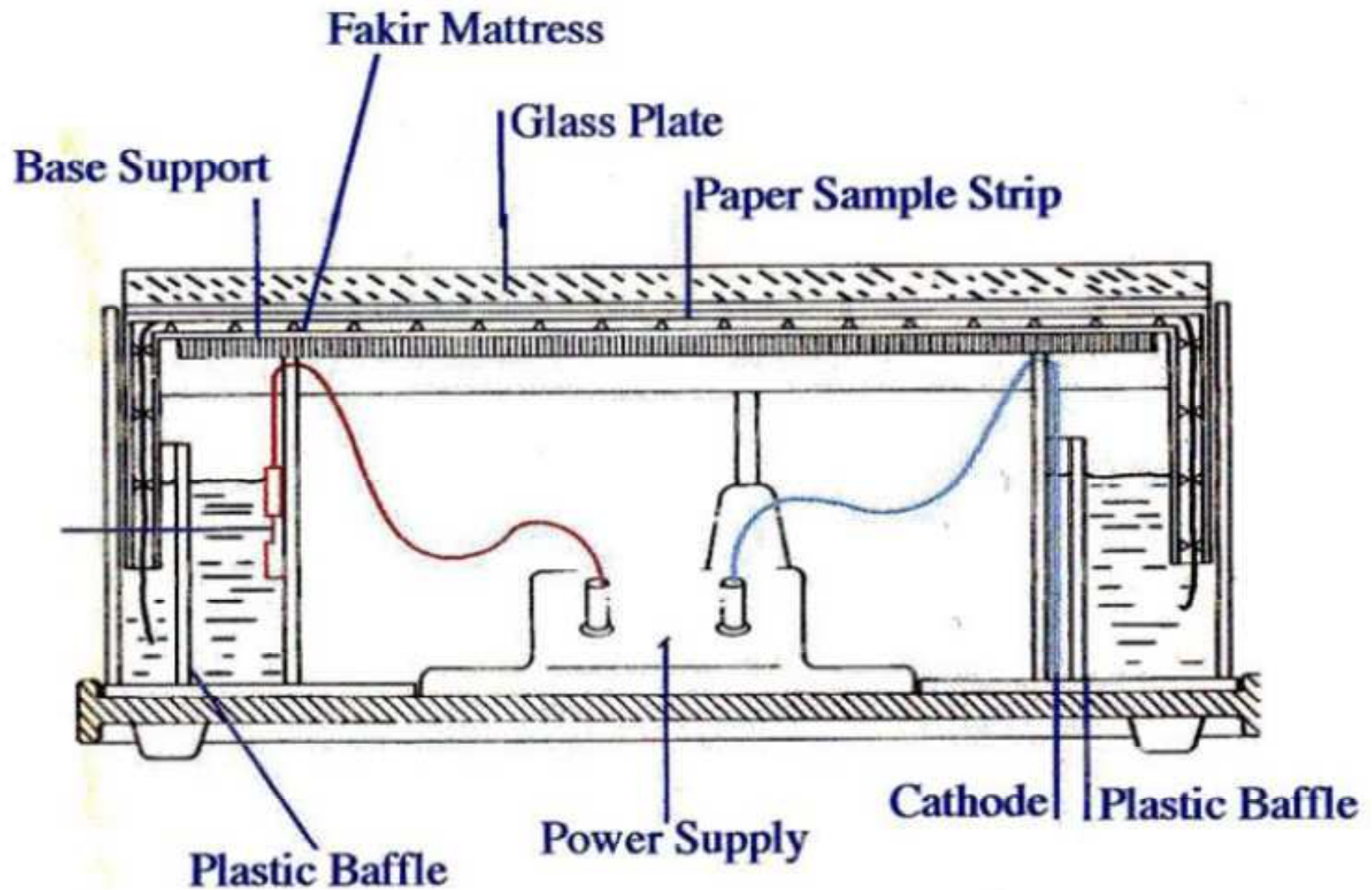
- Nehomogenní
- Přítomnost ionogenních skupin
- Špatně se chladí – pálí se

Použití : téměř už se nepoužívá

# Chromatografický papír



# Chromatografický papír



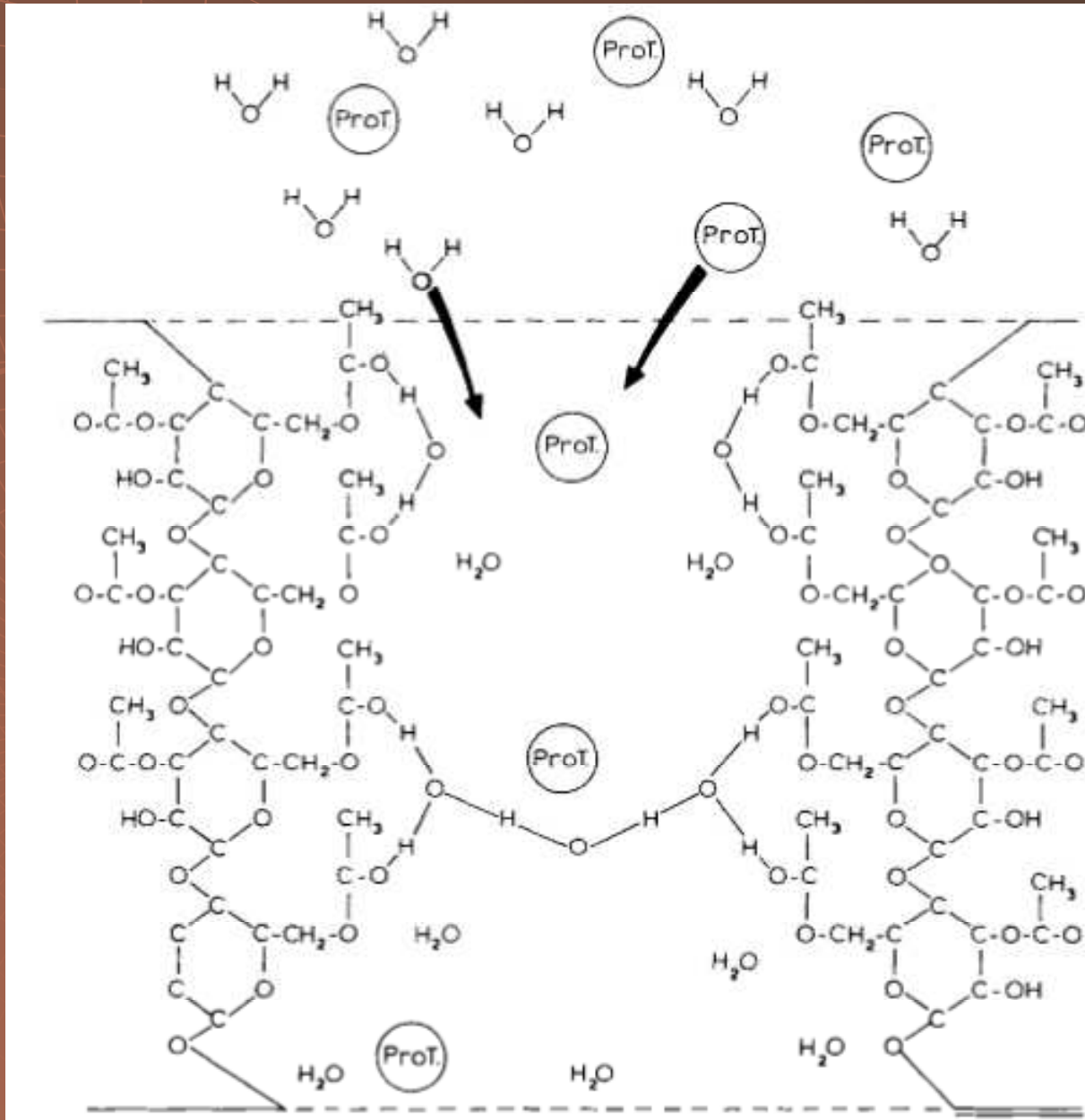
# Acetát celulosy

## Složení – acetát celulosy

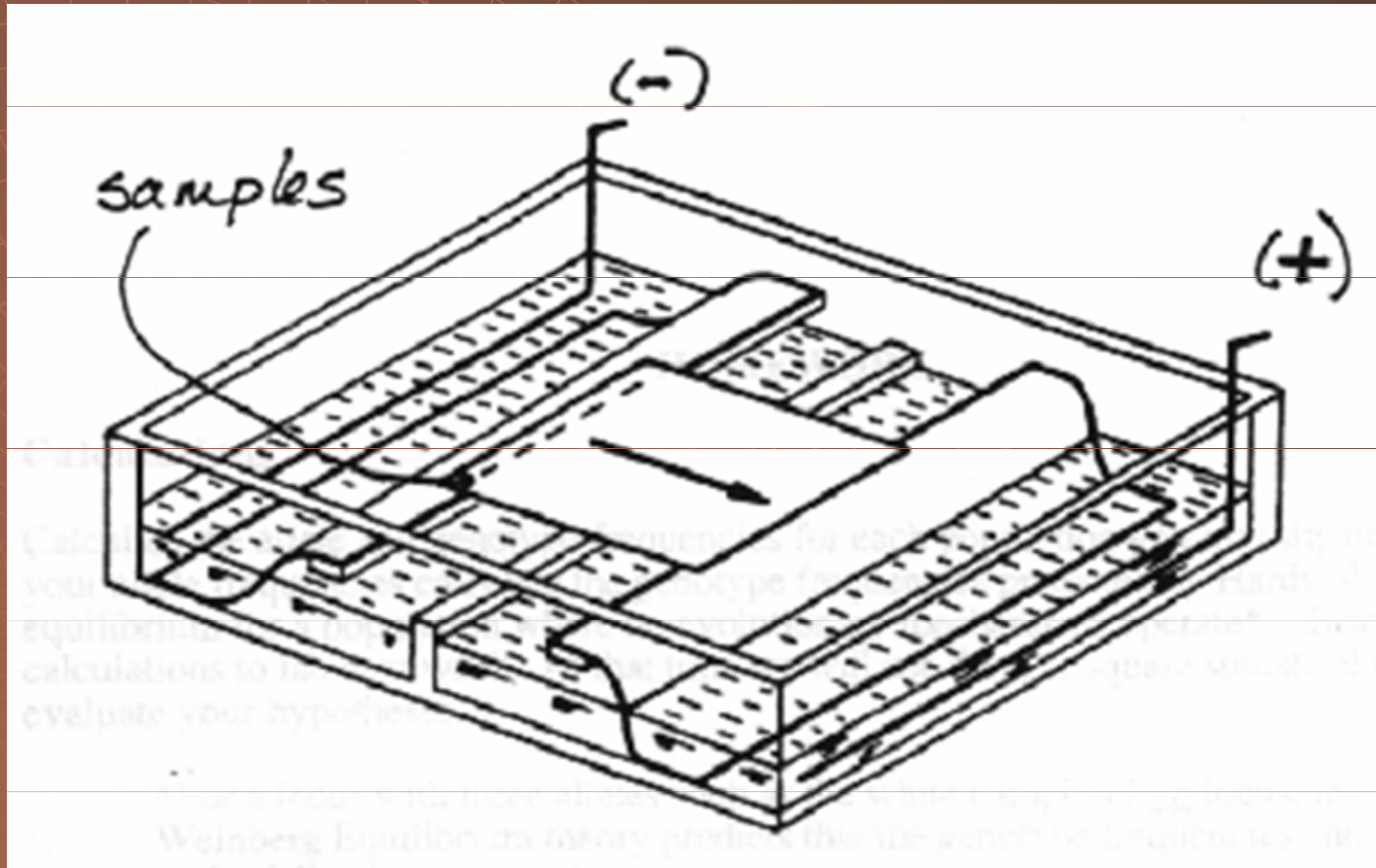
- + Komerčně dostupný
- + Dobré mechanické vlastnosti

Použití : imunoelektroforetické  
metody, klinické aplikace

# Acetát celulosy

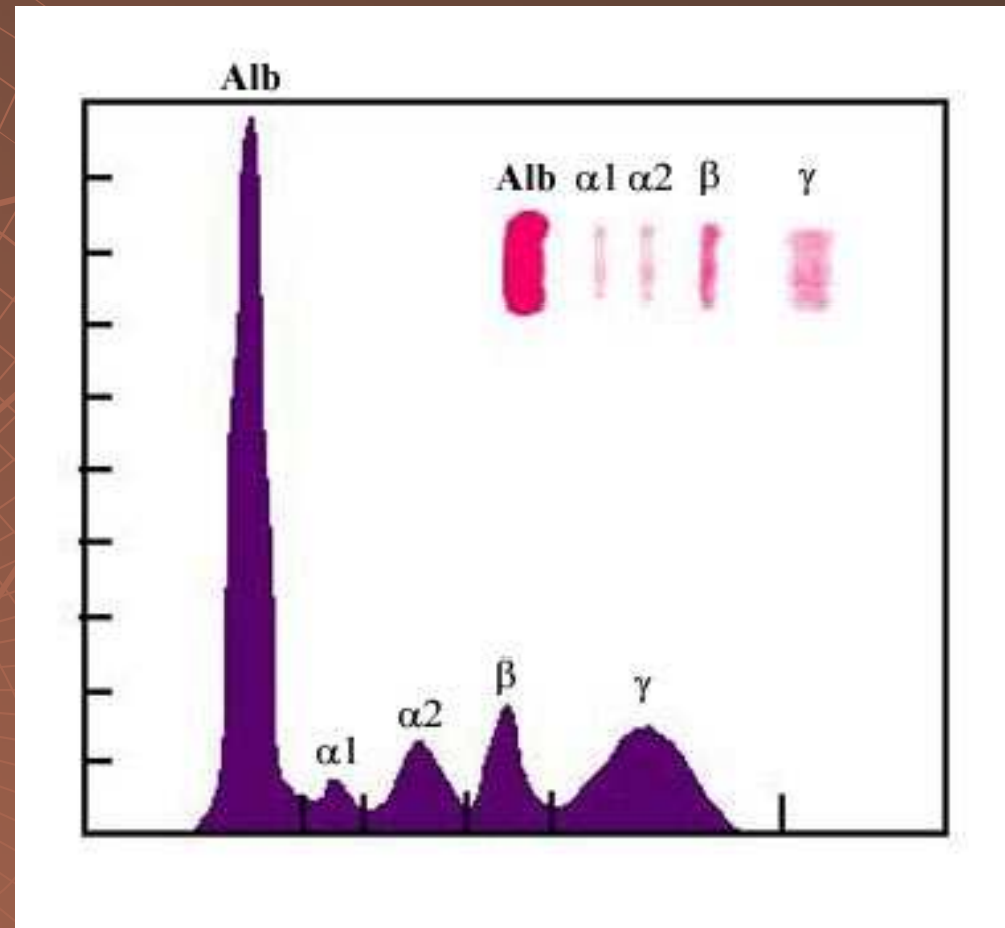
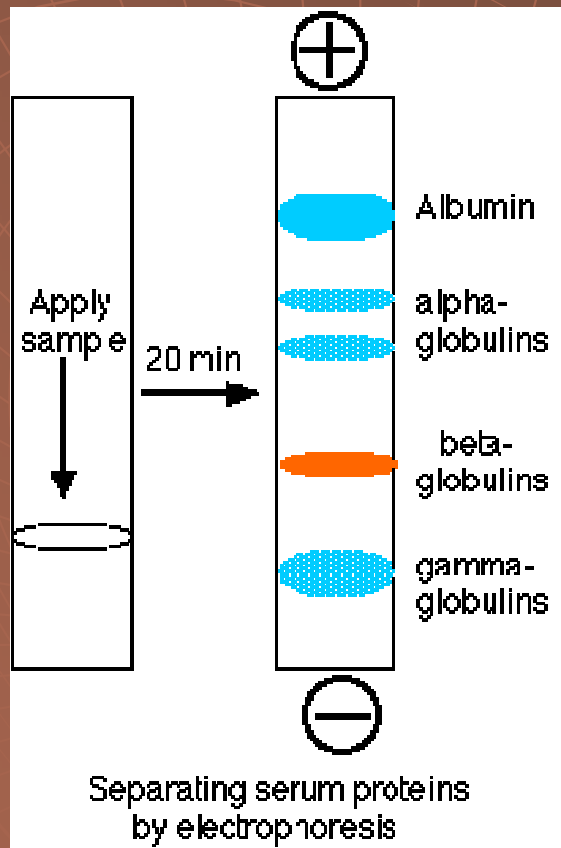


# Acetát celulosy



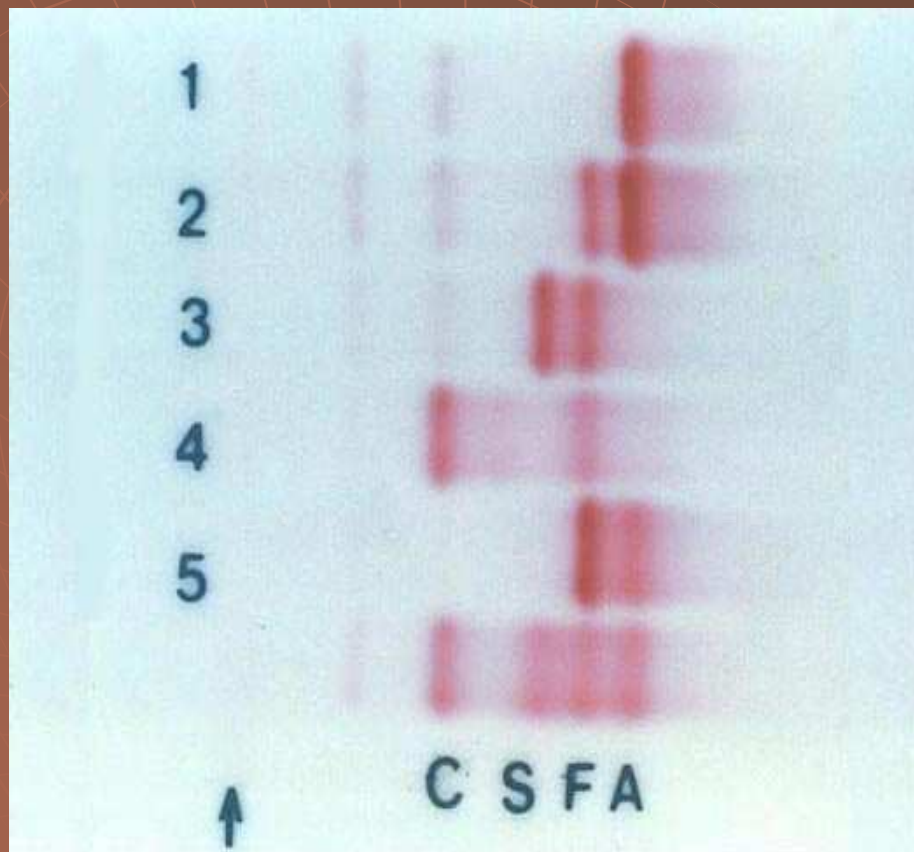
# Acetát celulosy

analýza sérových bílkovin



# Acetát celulosy

hemoglobinu



**HPFH –  
dědičné přetrvávání  
hemoglobinu F (“hereditary  
persistence”)**

pH 8.4

1. Normální dospělý
2. HPFH (heterozygot)
3. Hb S--HPFH
4. Hb C--HPFH
5. Normální novorozenec

Hemoglobin S a C – mutace v primární struktuře, náhrada jedné z aminokyselin za druhou.



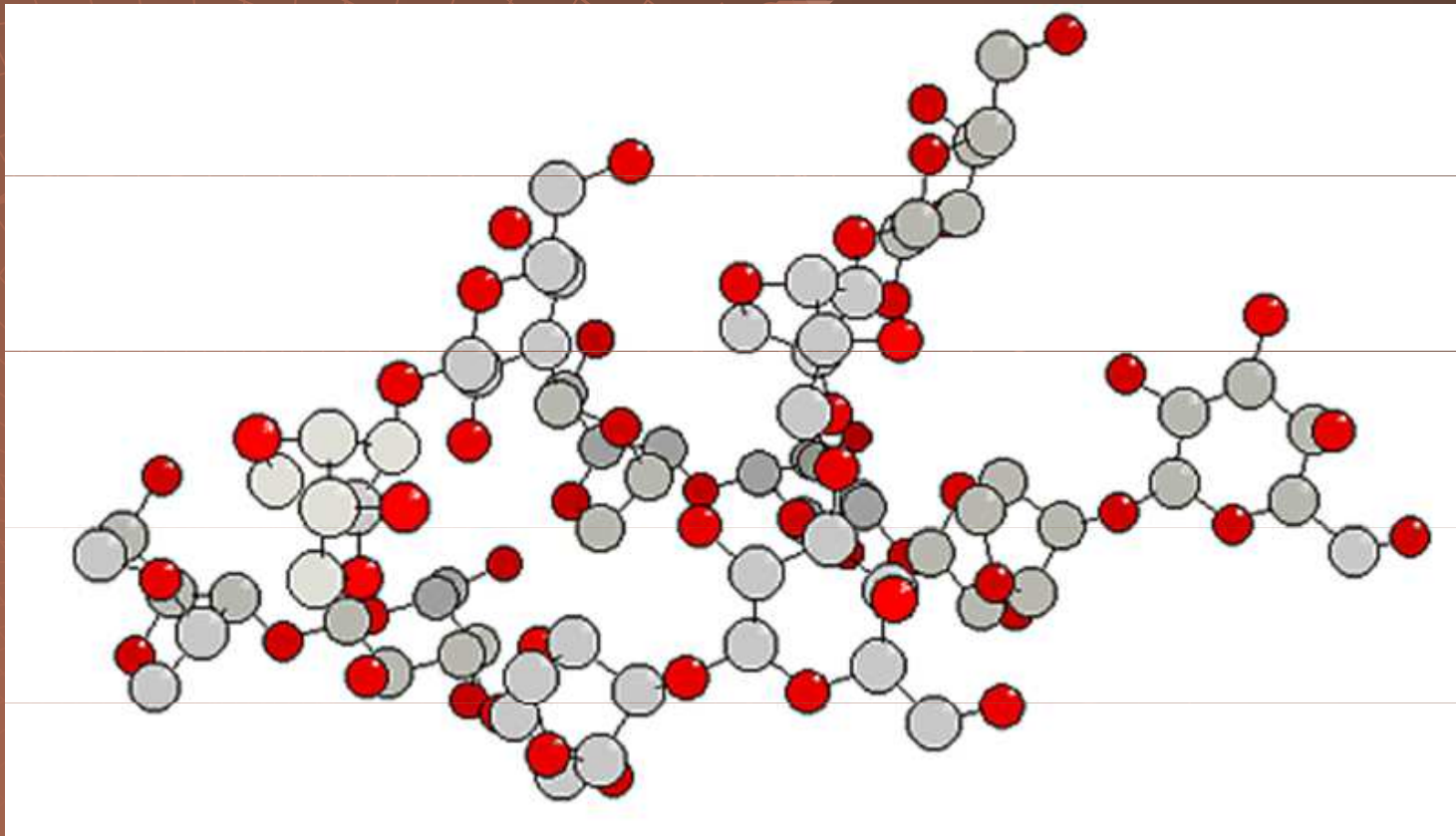
# Agar a agarosa

Složení – kopolymer galaktosy a anhydrogalaktosy

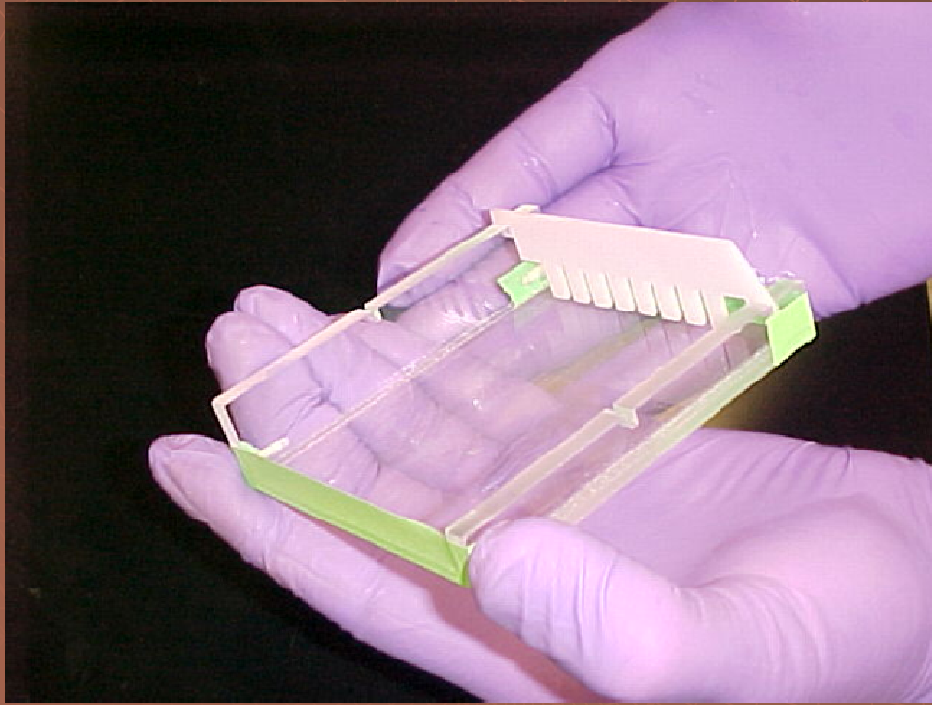
- Přítomnost ionogenních skupin – silný EOF
- + Velké pory
- + Snadná příprava

Použití : imunoelektroforetické metody  
elektroforéza NK

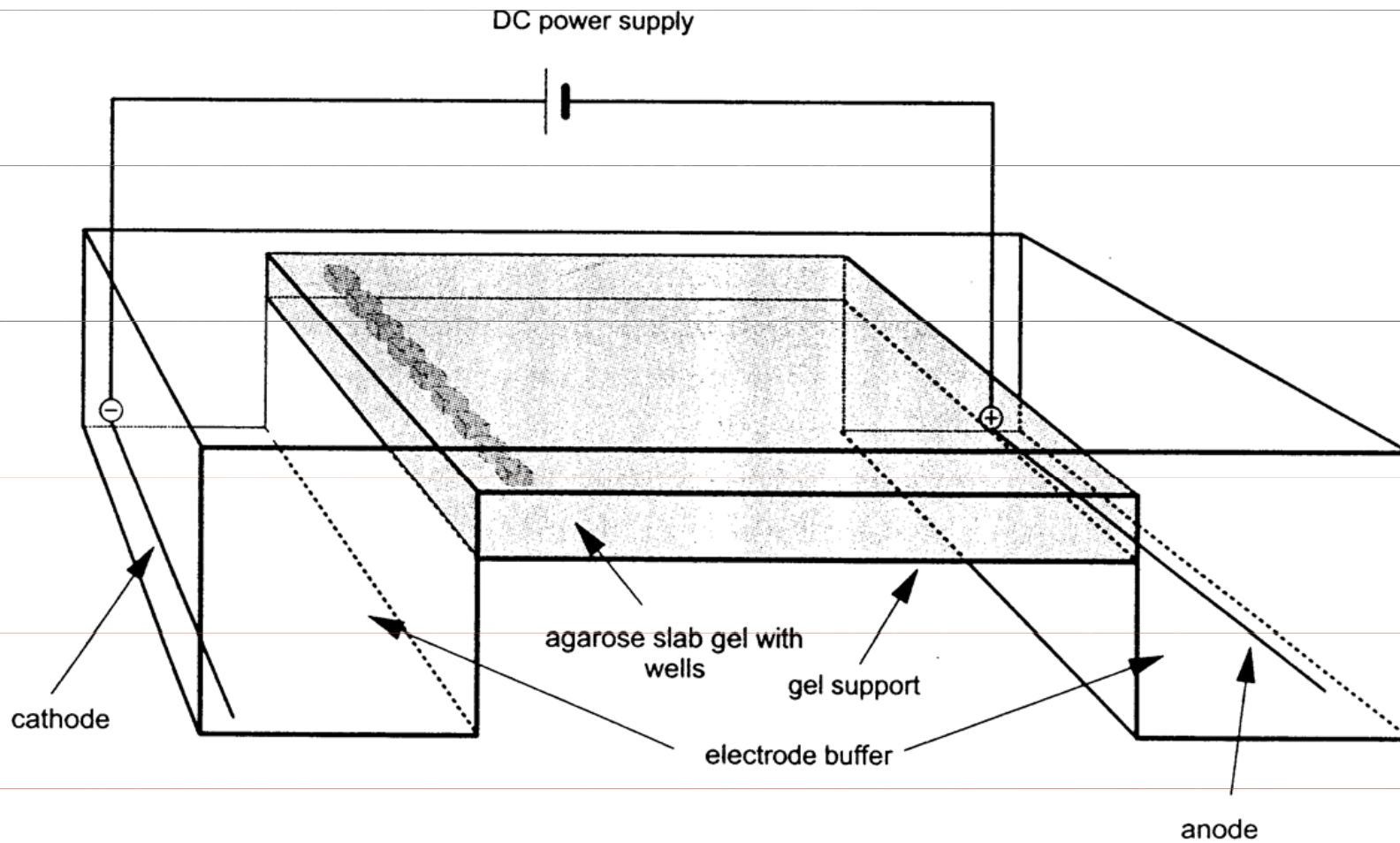
# Agar a agarosa



# Agar a agarosa



# Agar a agarosa

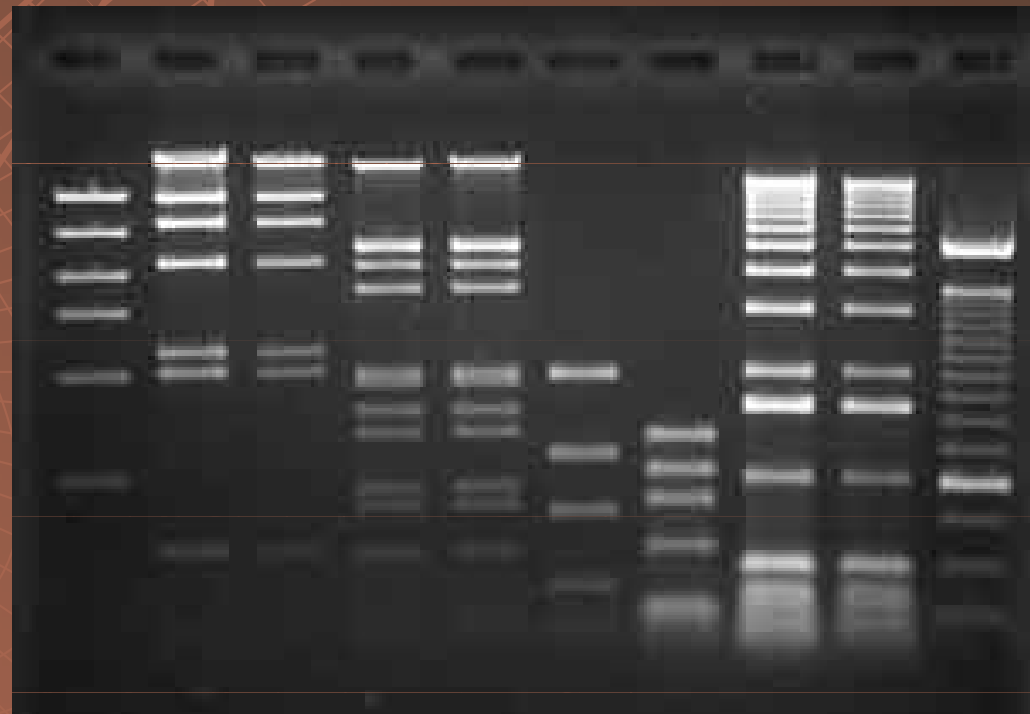
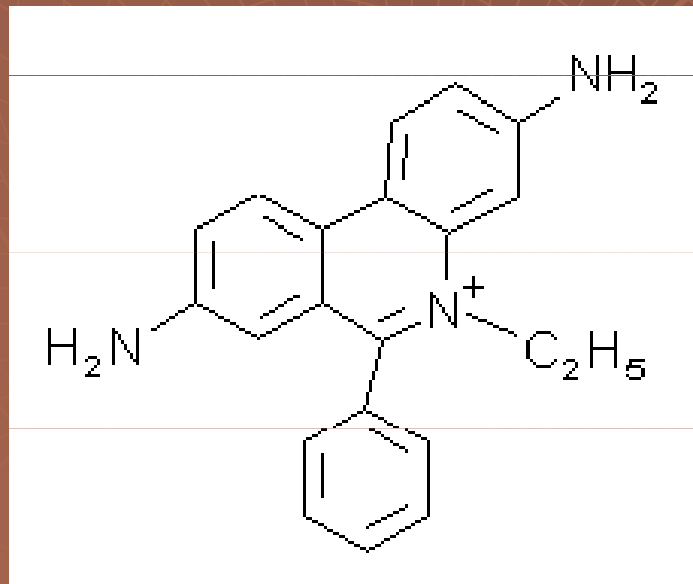


# Agar a agarosa



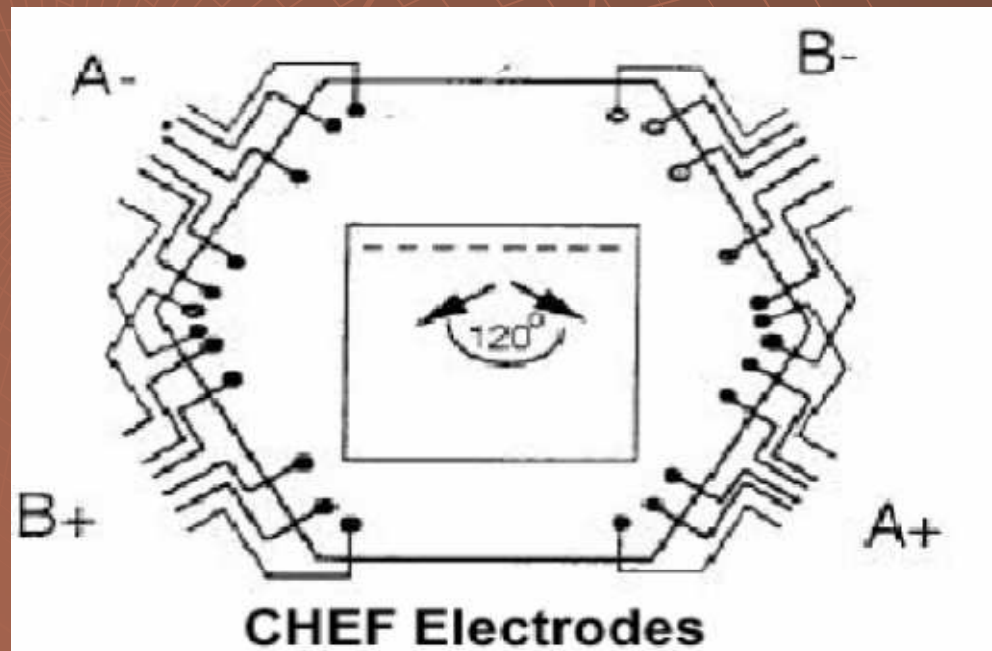
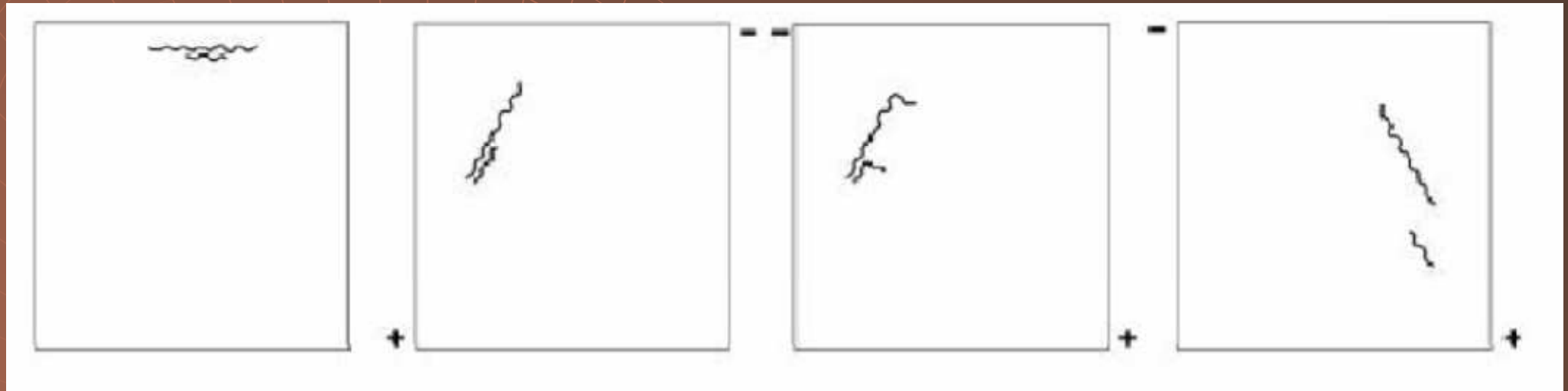
# DNA agarosová elektroforéza

**Ethidiumbromid** - červeně, která v roztoku fluoreskuje pouze slabě, intenzita fluorescence se výrazně zvyšuje vazbou na DNA interkalací mezi páry bází. Excitace při 302 nm, červeno-oranžová emise při 510 nm. Velmi toxická látka!



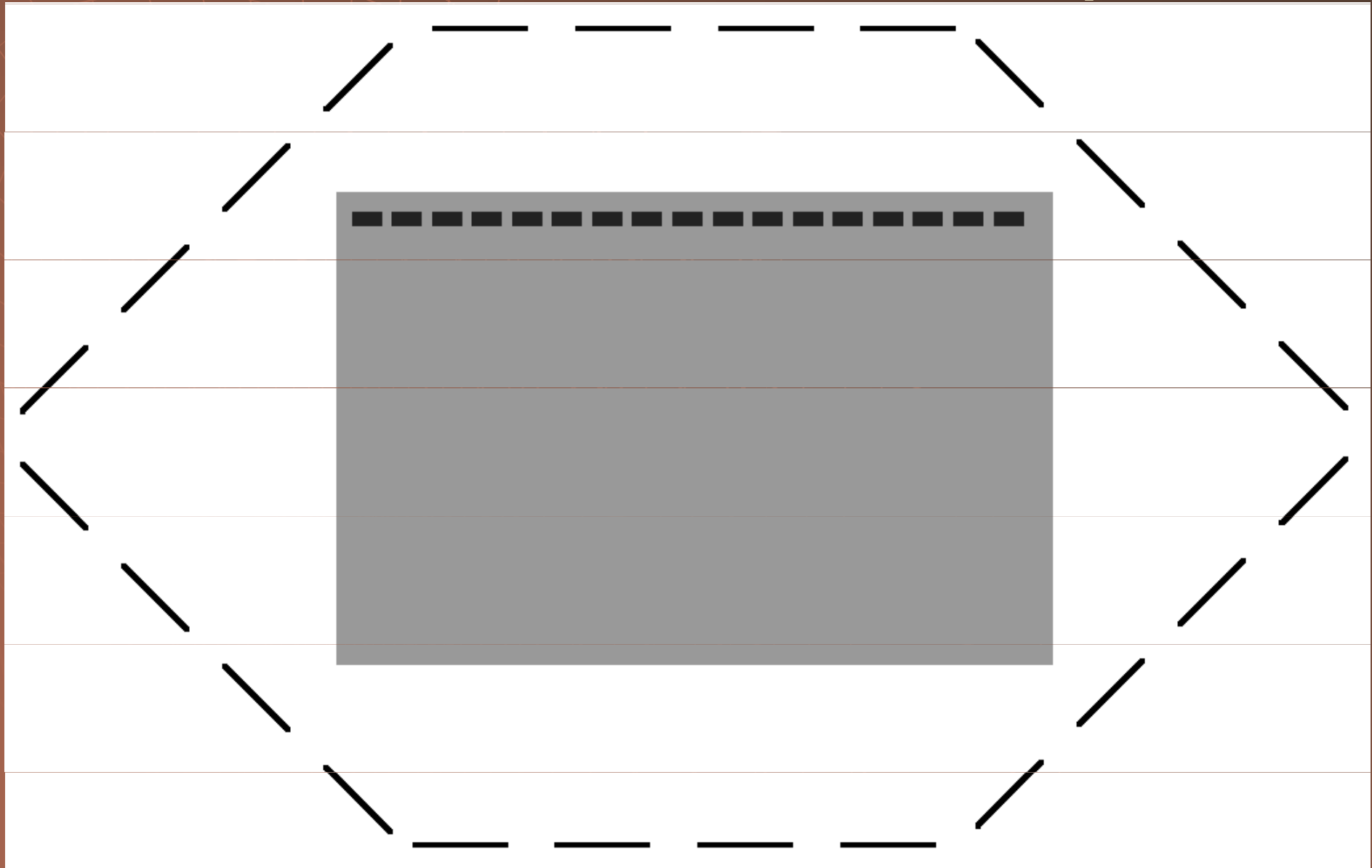
# Pulsní DNA elektroforéza

20 000 – 12 000 000 pb



# Pulsní DNA elektroforéza

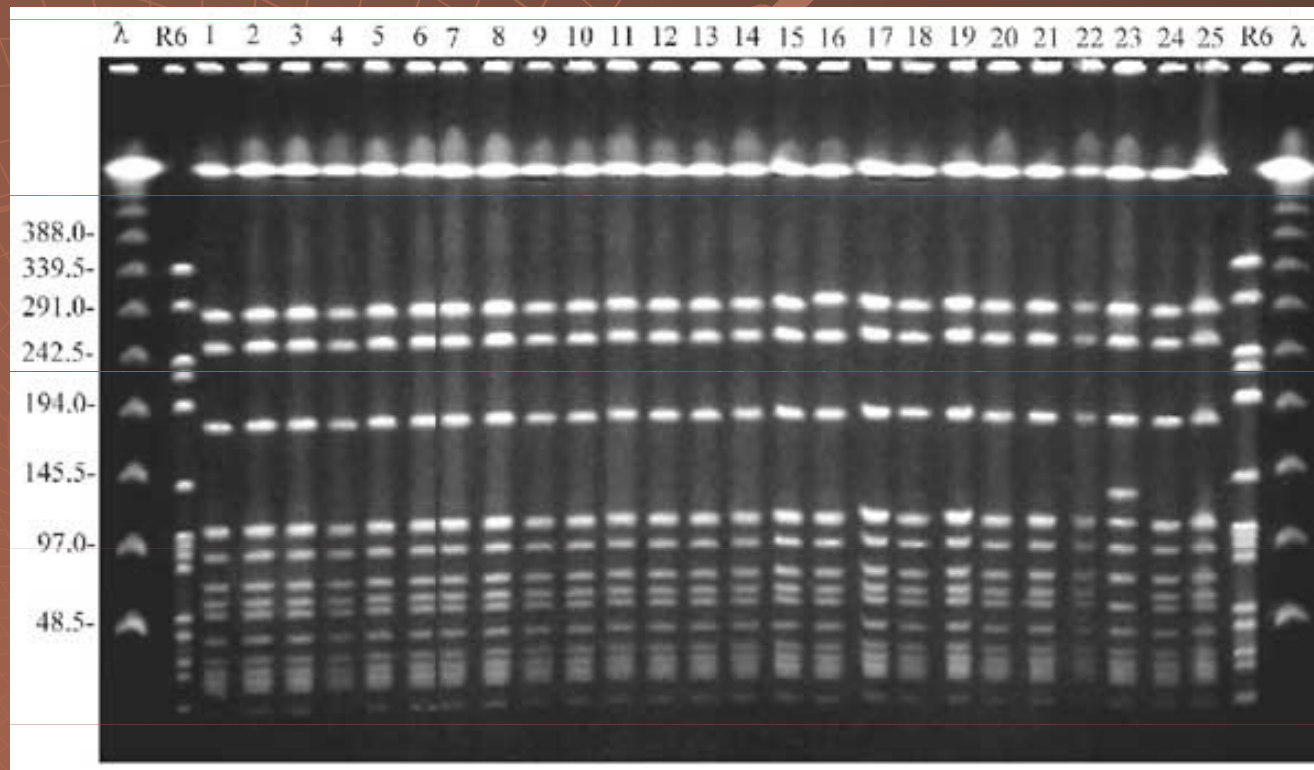
20 000 – 12 000 000 pb



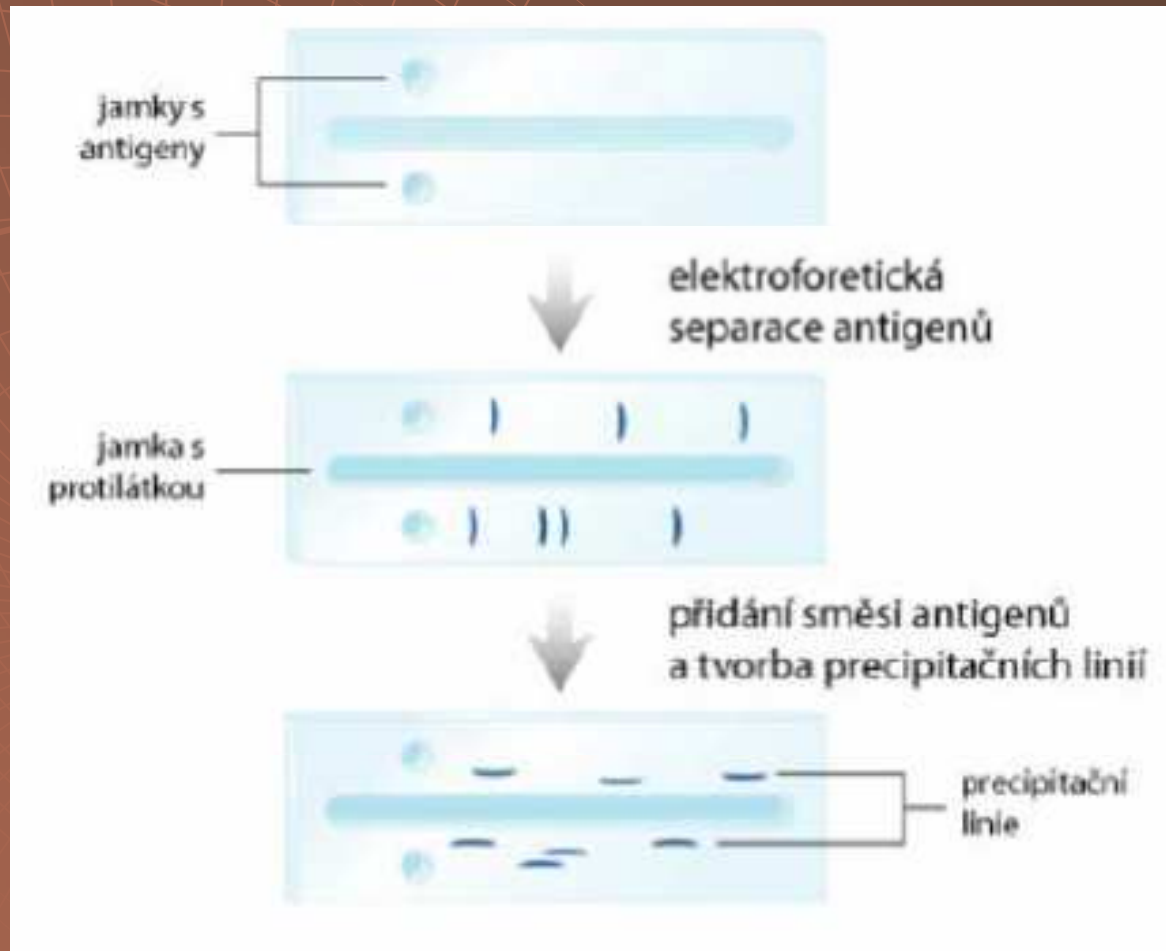


# Pulsní DNA elektroforéza

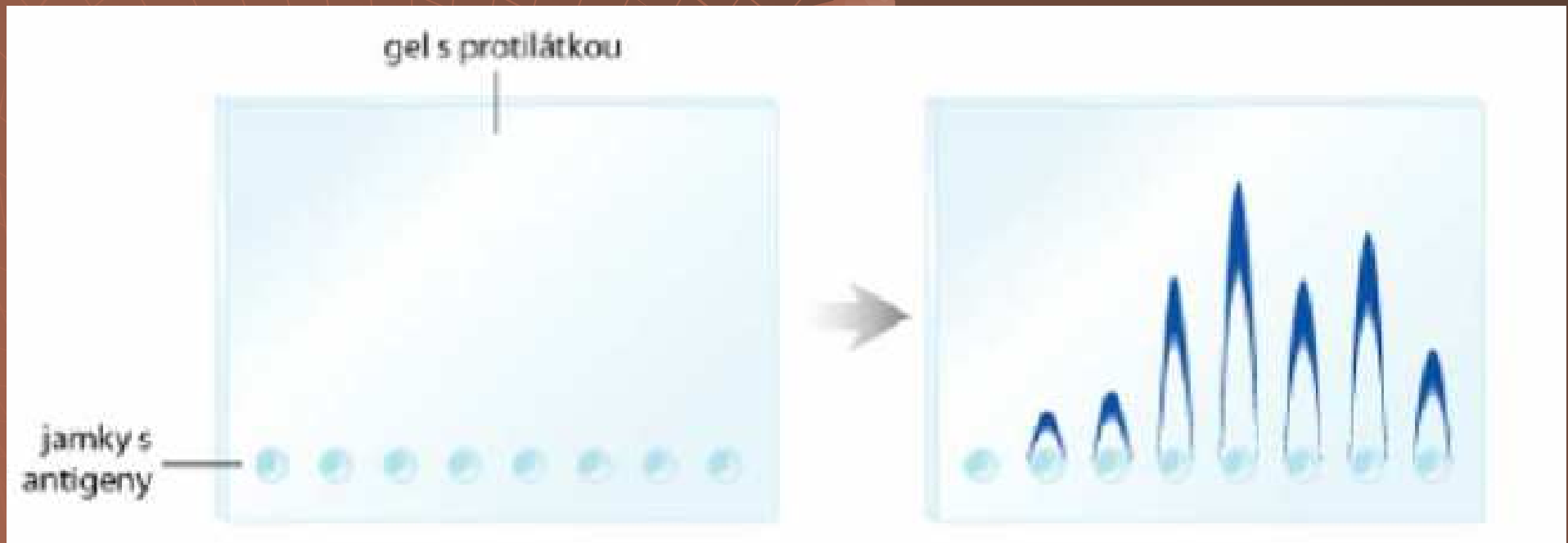
## 20 000 – 12 000 000 pb



# Imunoelektroforéza zónová elektroforéza + difuze



# Imunoelektroforéza raketová



# 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

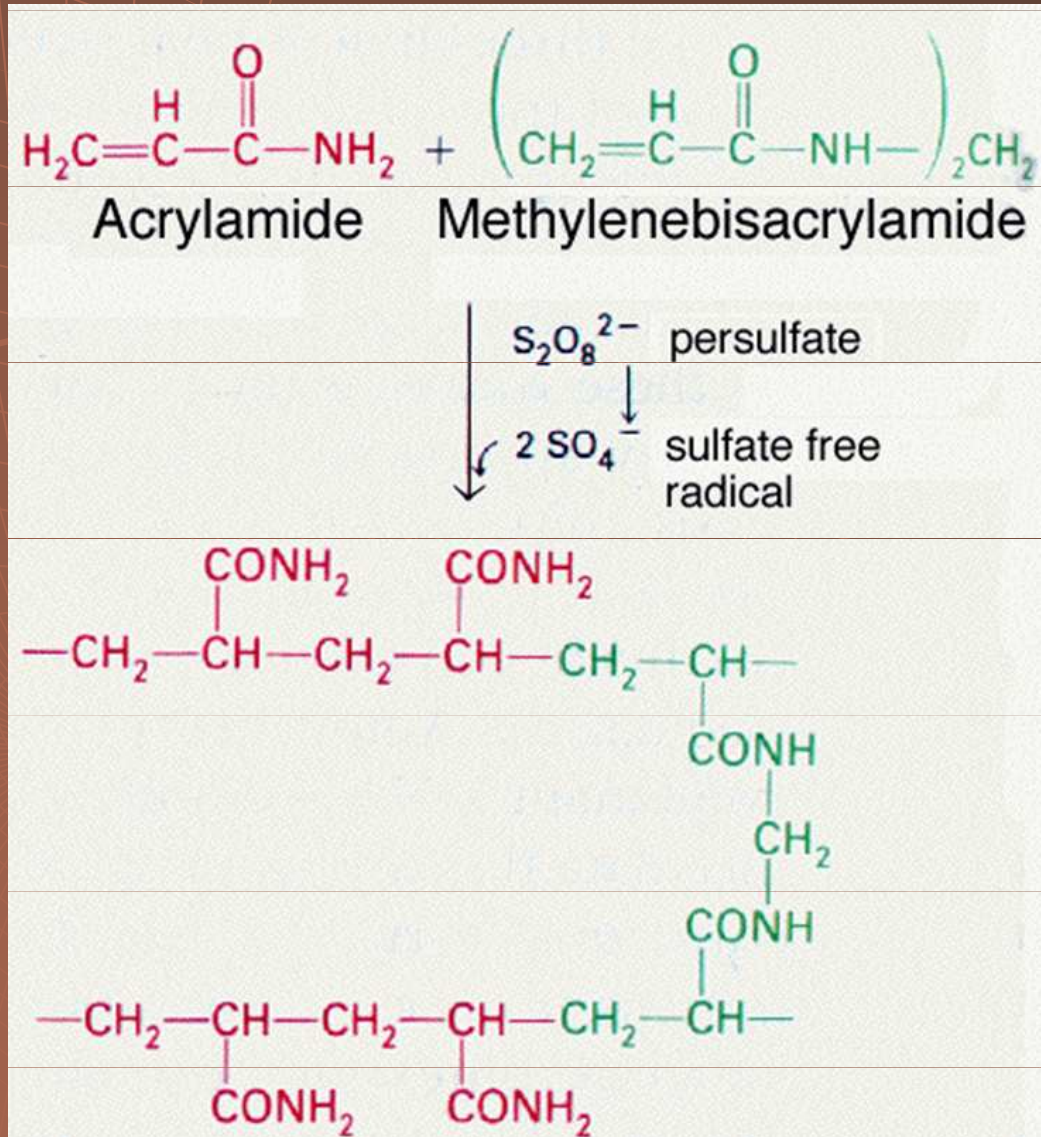
Složení – kopolymer akrylamidu a  
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ 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.

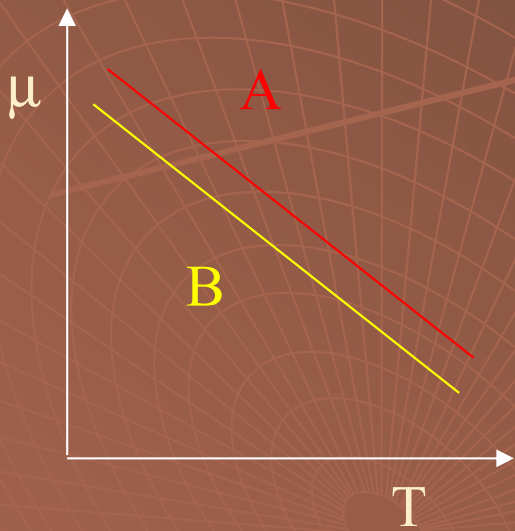
$$\log \mu = \log \mu_0 + K_r [T]$$

$\mu$  - mobilita

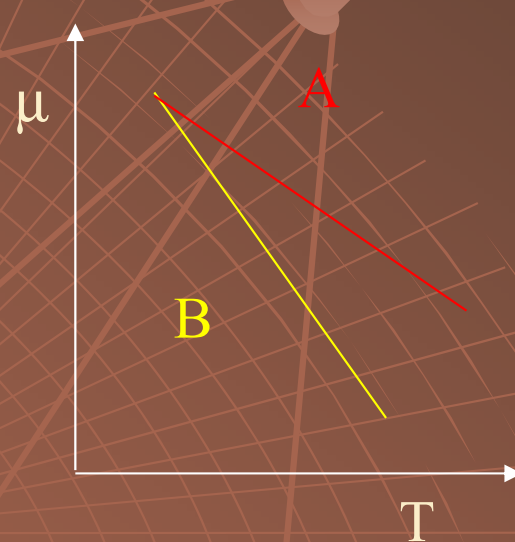
$\mu_0$  - mobilita při limitním zředění

$K_r$  - retardační koeficient

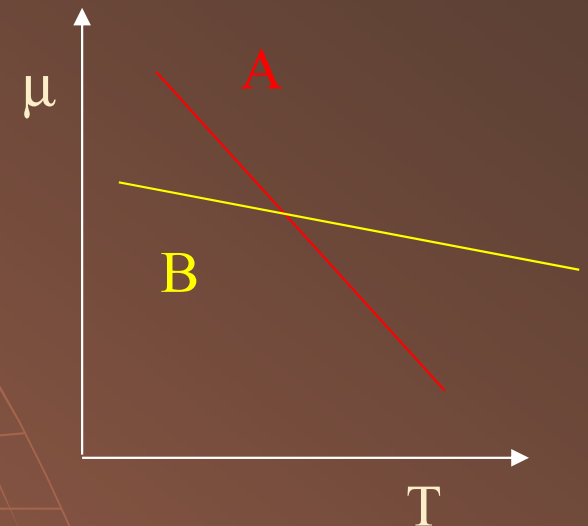
# Uplatnění Fergussonovy rovnice



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



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



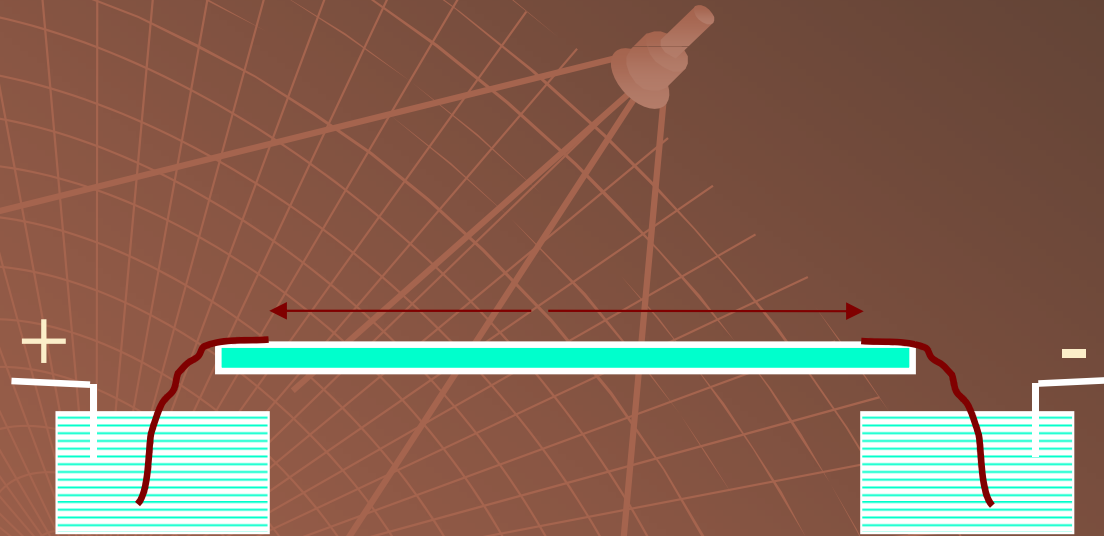
$$\begin{aligned} Mr_A &\neq Mr_B \\ pI_A &\neq pI_B \end{aligned}$$

# Provedení PAGE

vertikální x horizontální  
deskové x trubičkové  
homogenní x gradientové  
kontinuální x diskontinuální  
nativní x SDS PAGE

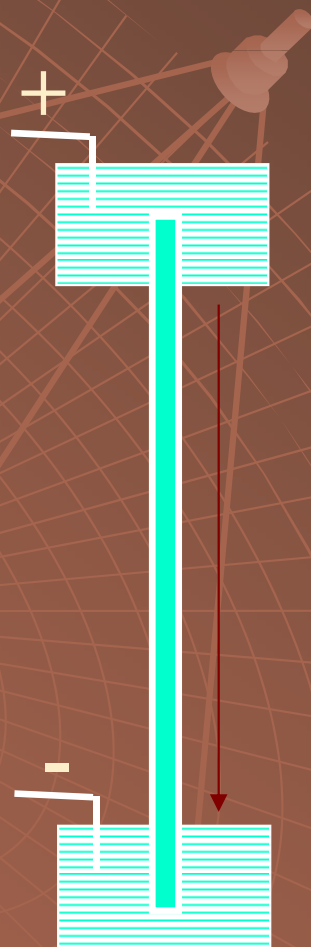
# Upořádání

## Horizontální

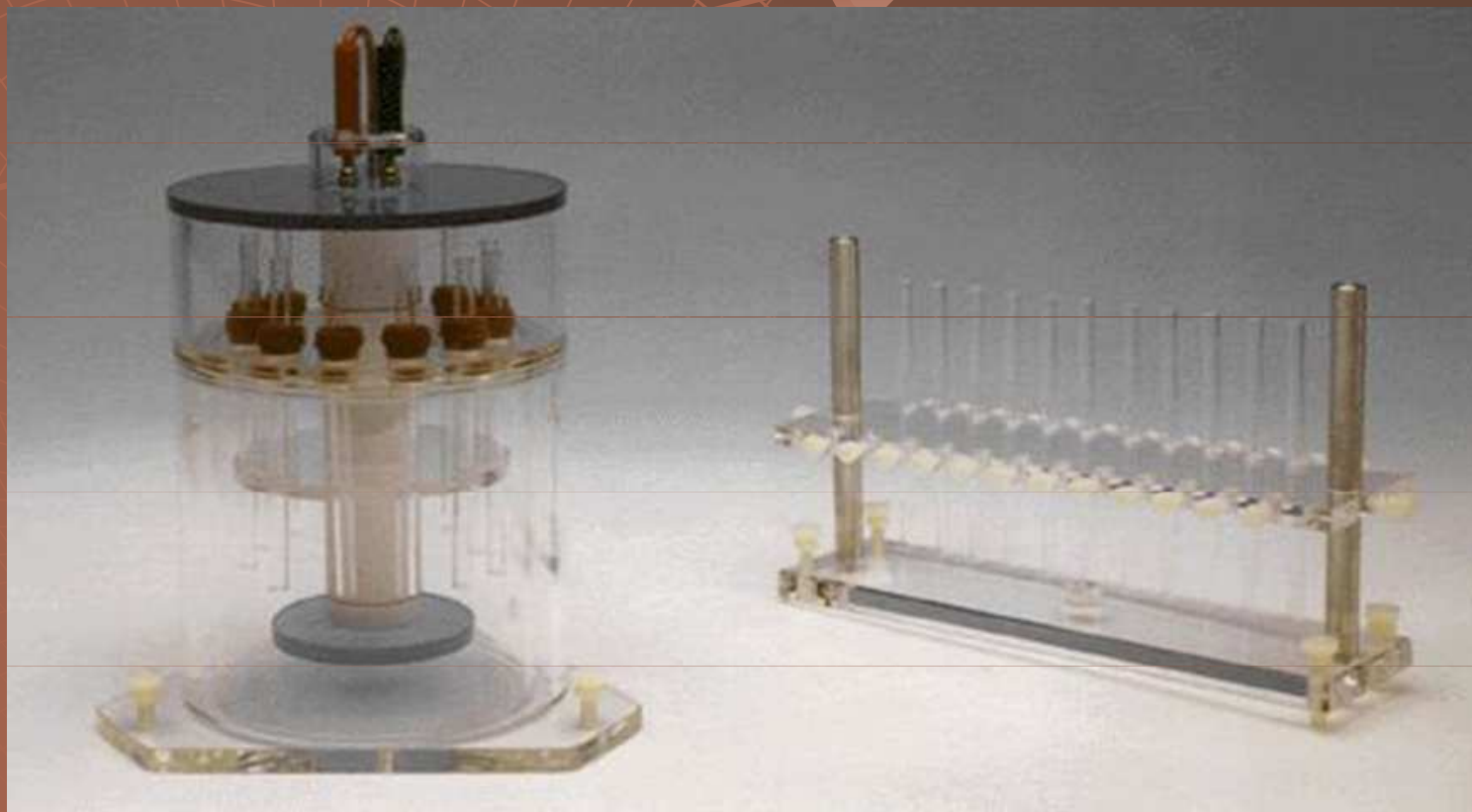


# Upořádání

## Vertikální



# Provedení PAGE deskové x trubičkové

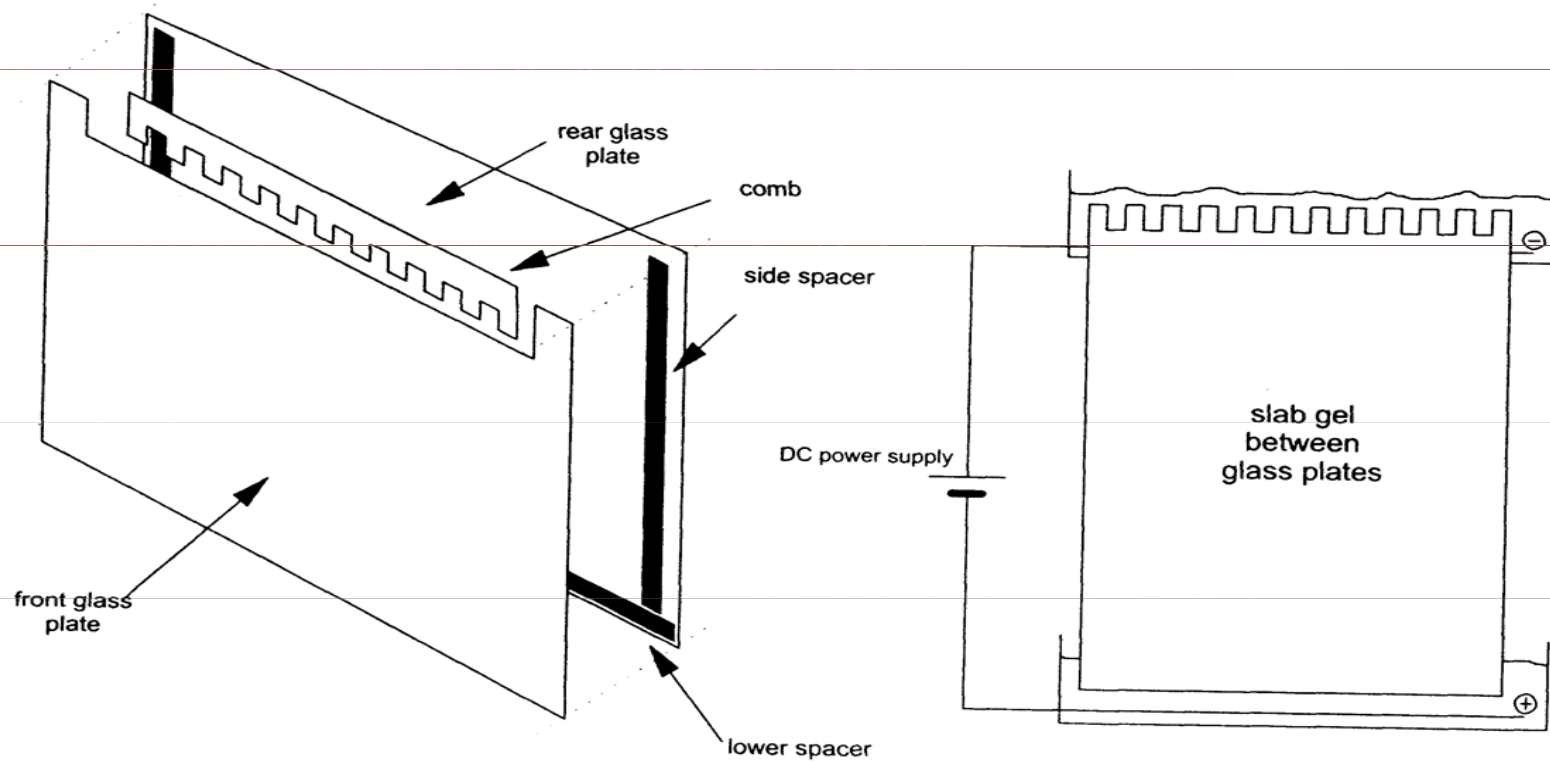


# Provedení PAGE deskové x trubičkové





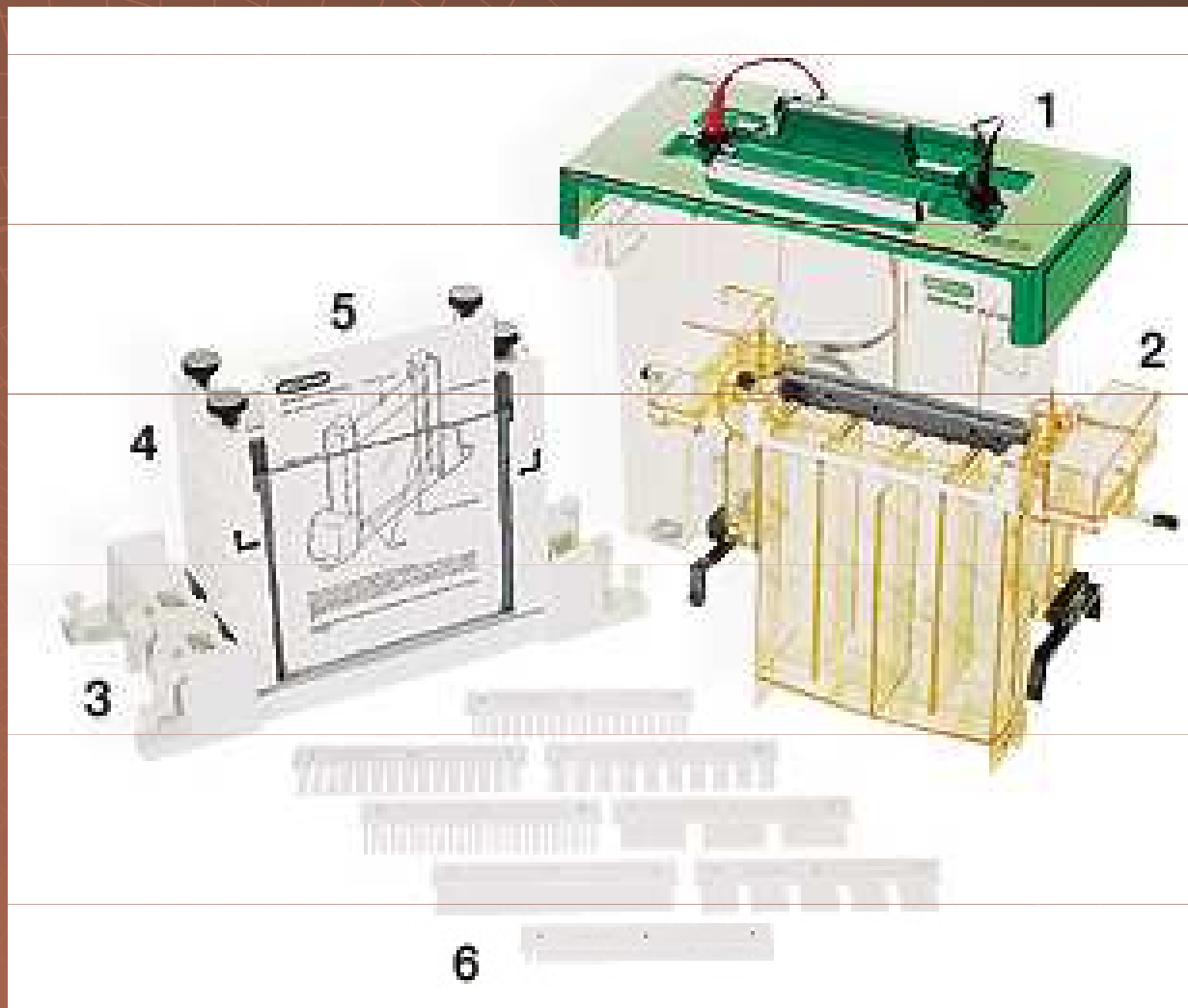
# Provedení PAGE deskové x trubičkové



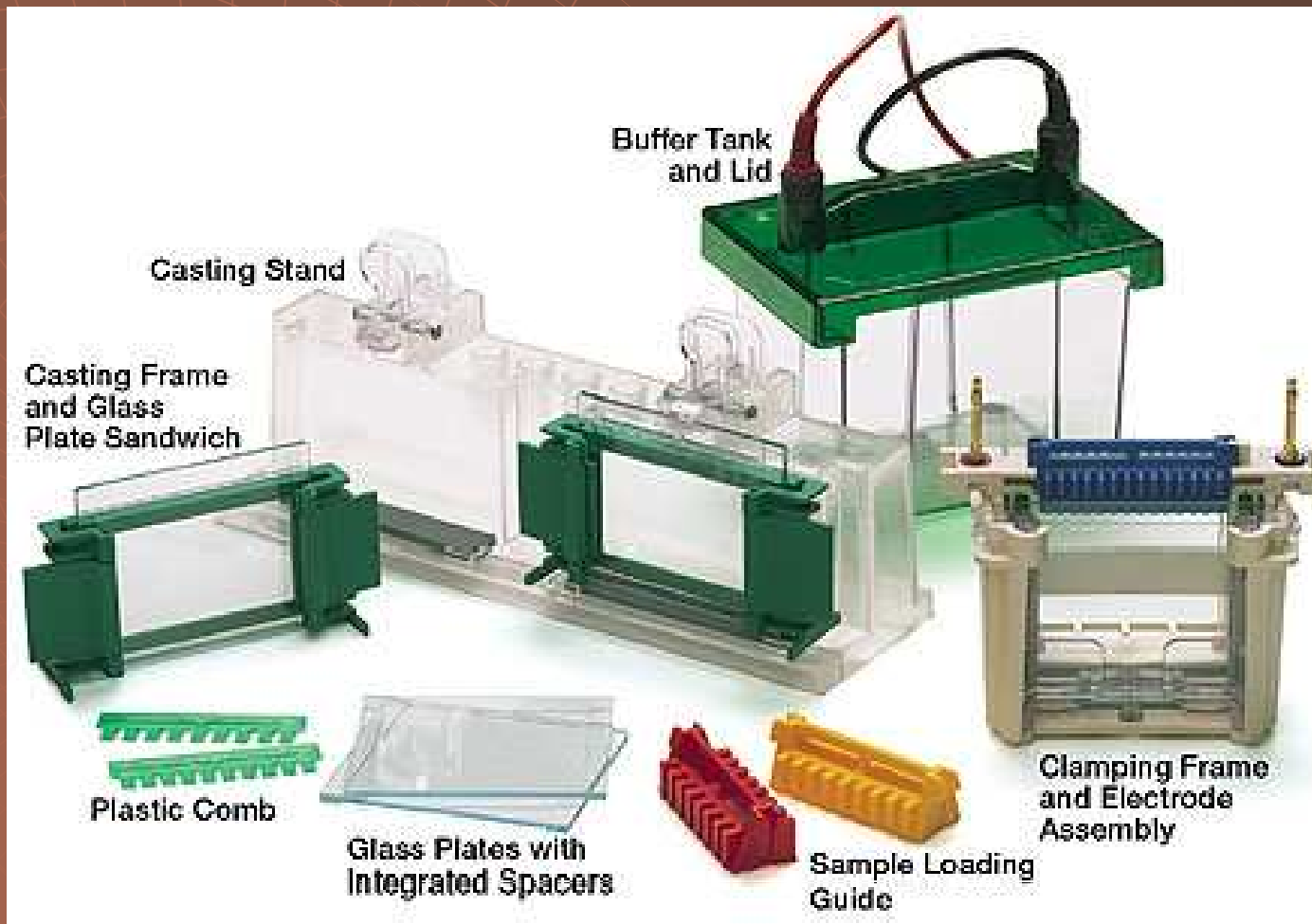
gel cassette

electrophoresis apparatus

# Provedení PAGE deskové x trubičkové

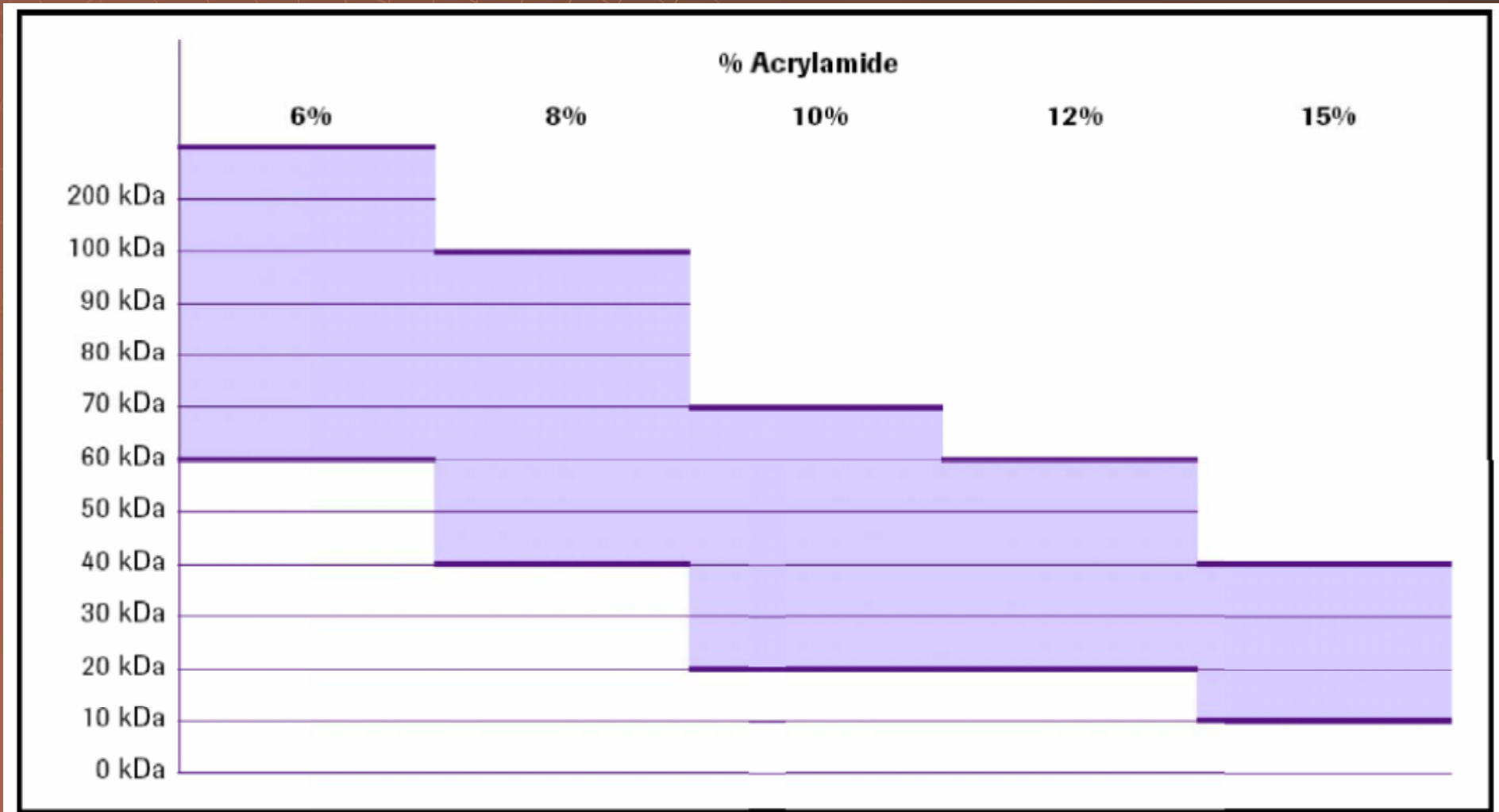


# Provedení PAGE deskové x trubičkové



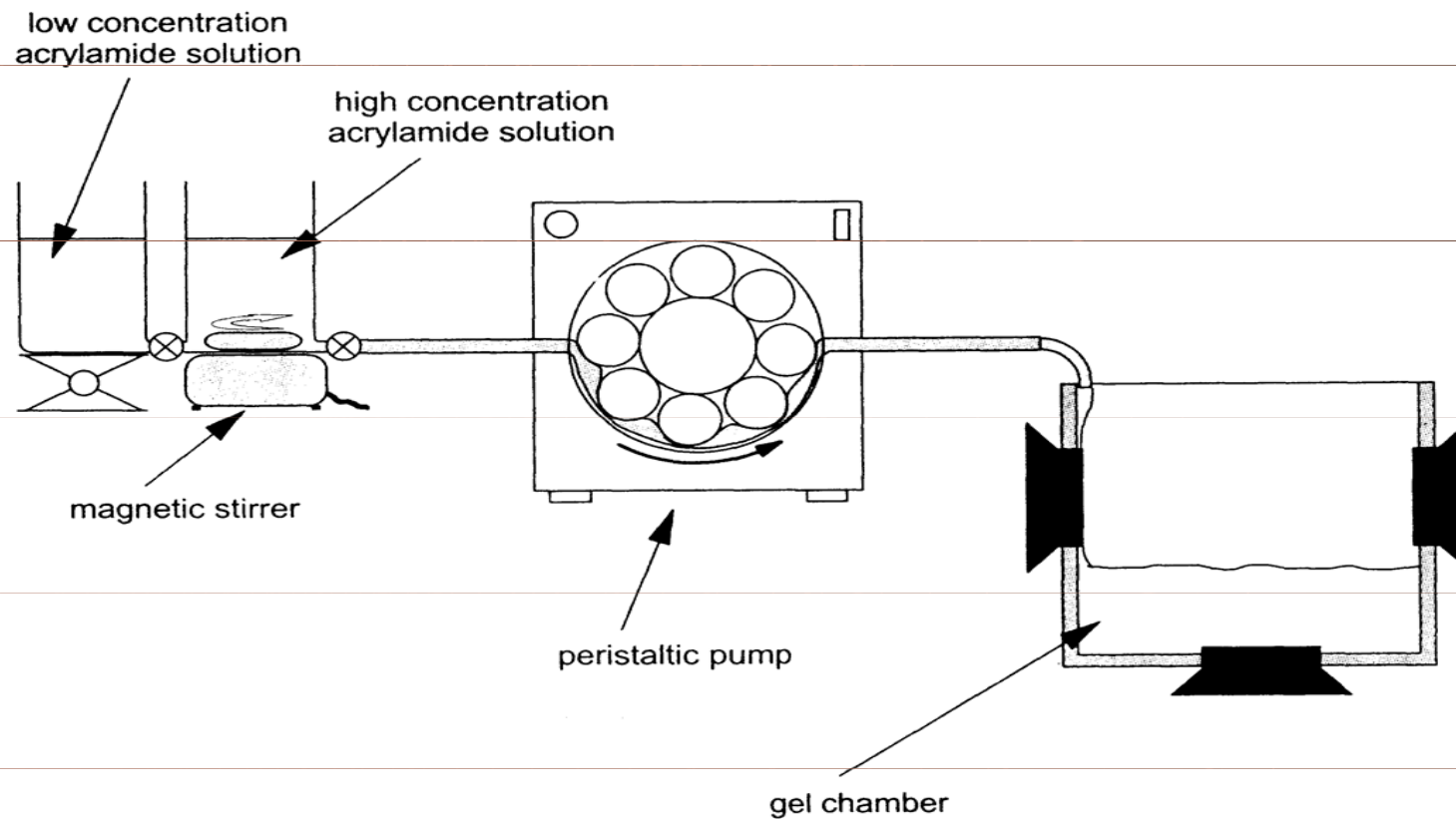
# Provedení PAGE

## homogenní x gradientové



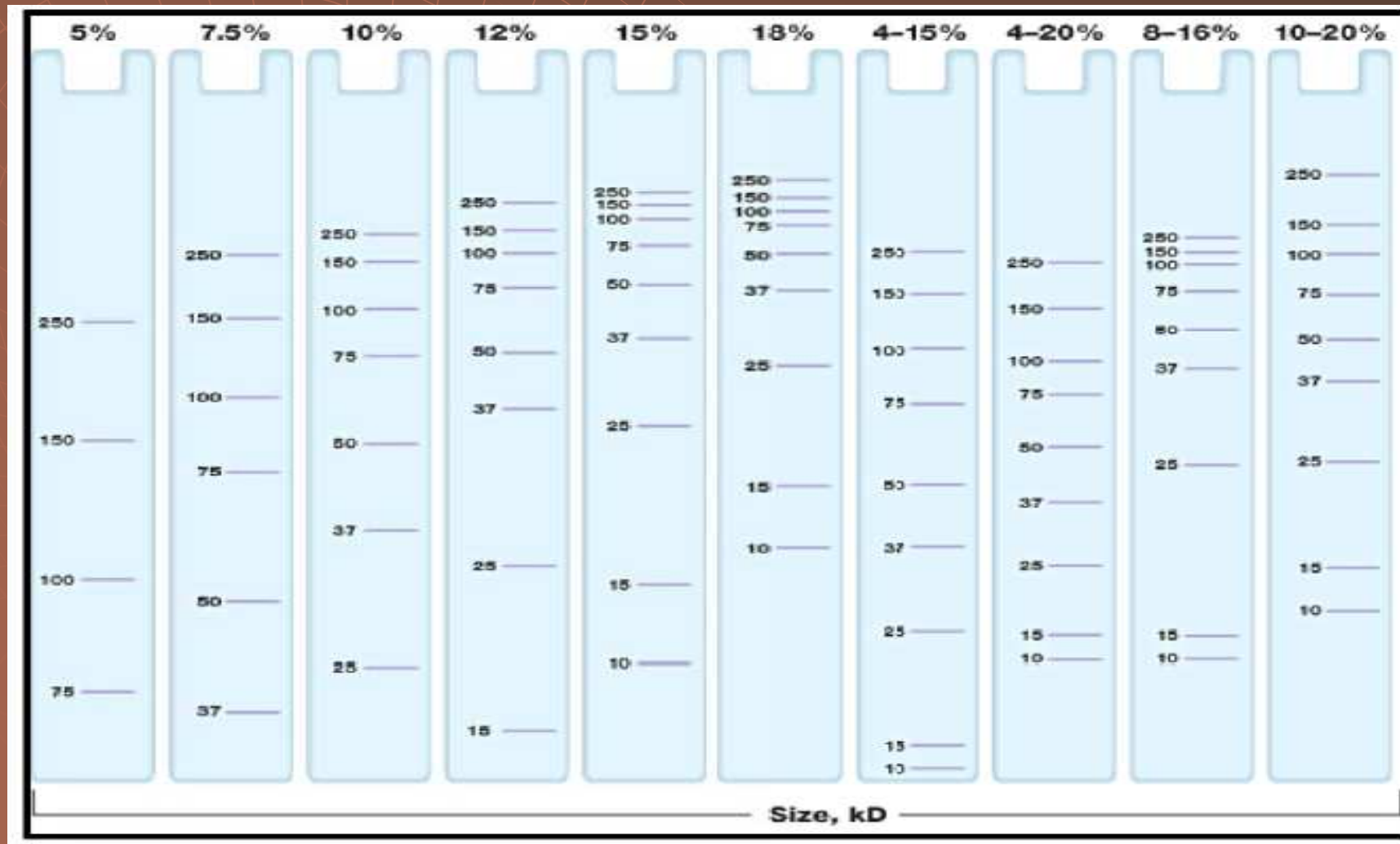
# Provedení PAGE

## homogenní x gradientové



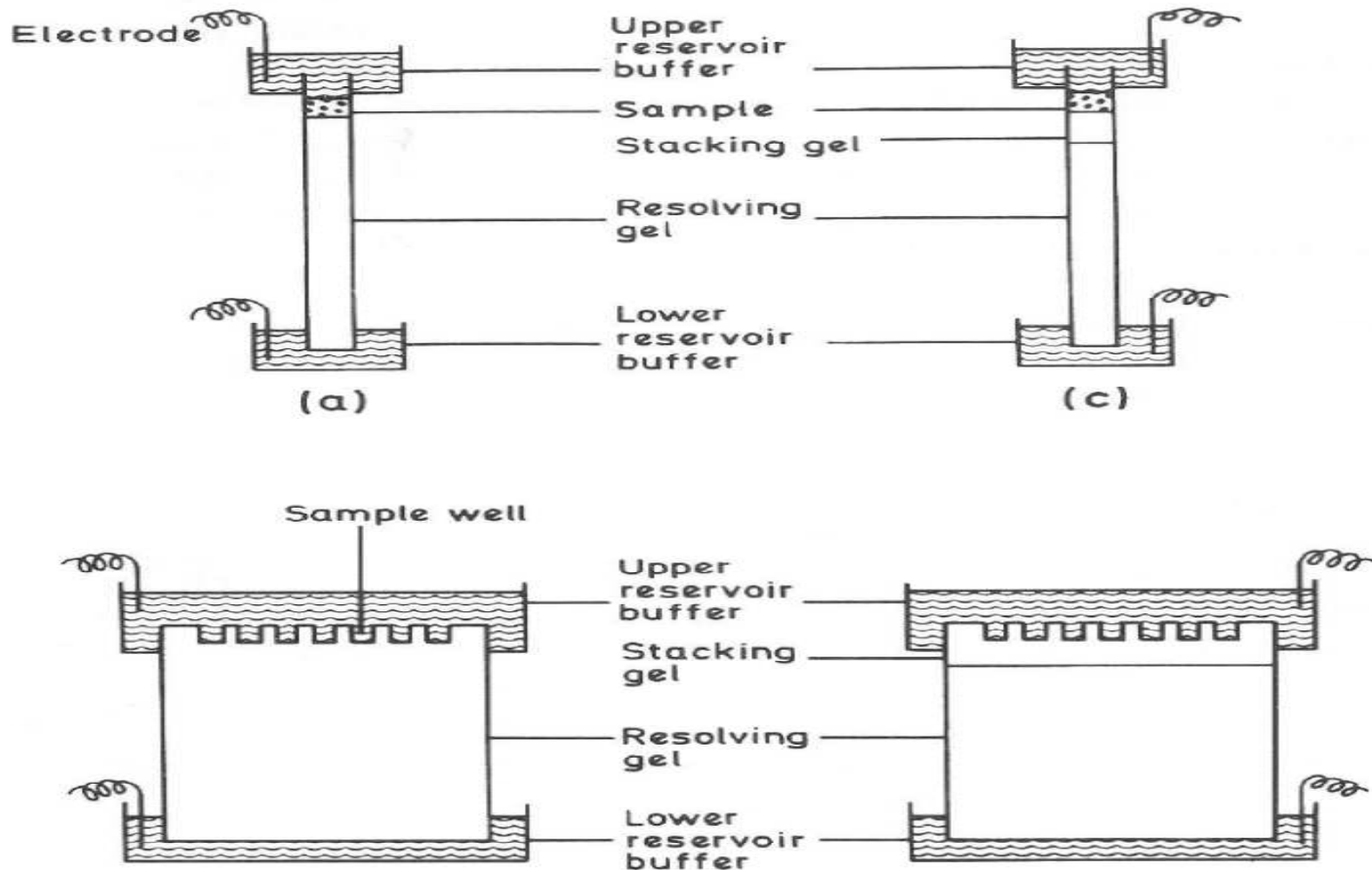
# Provedení PAGE

## homogenní x gradientové



# Provedení PAGE

kontinuální x diskontinuální

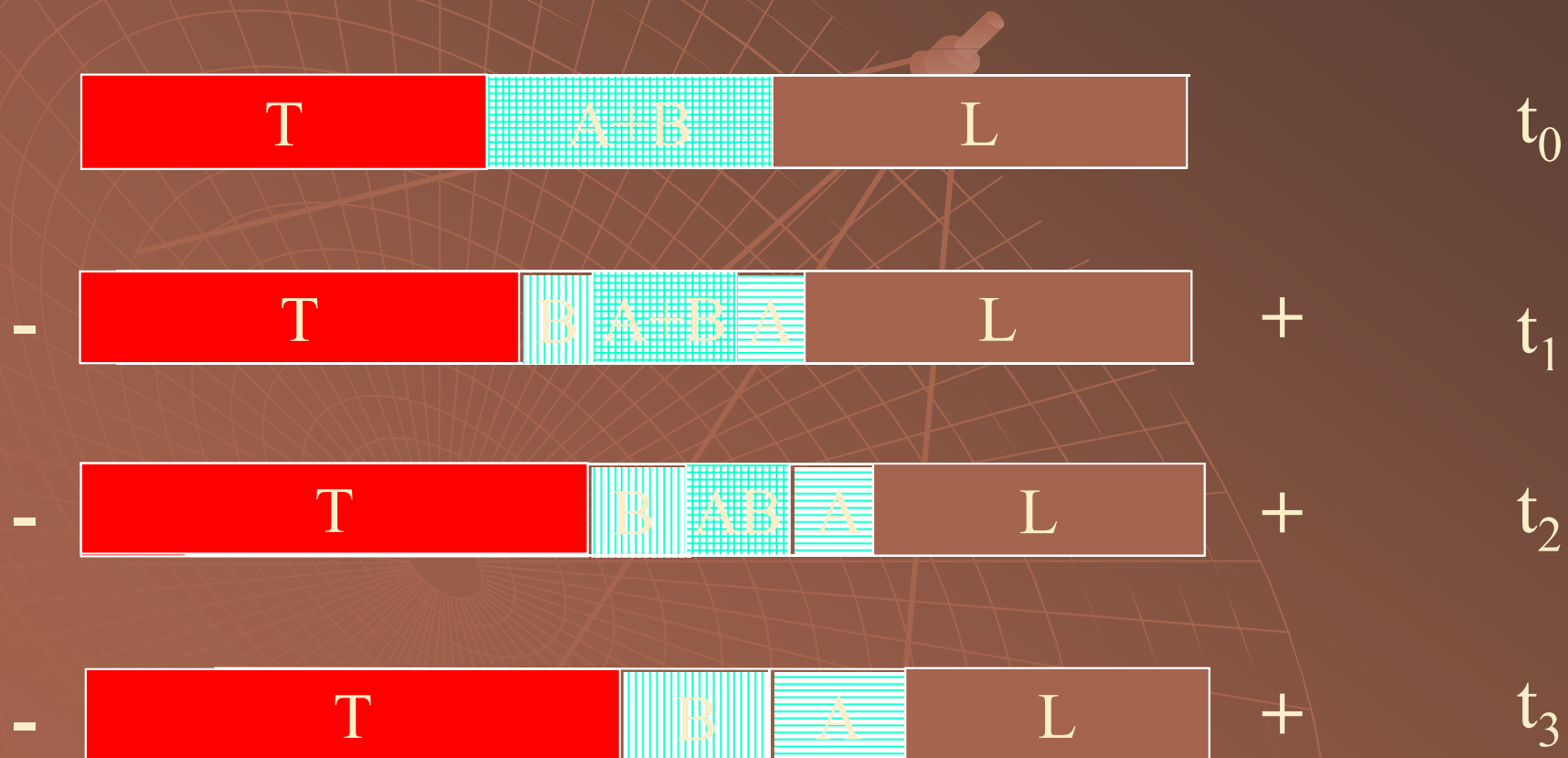


# Izotachoforéza

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

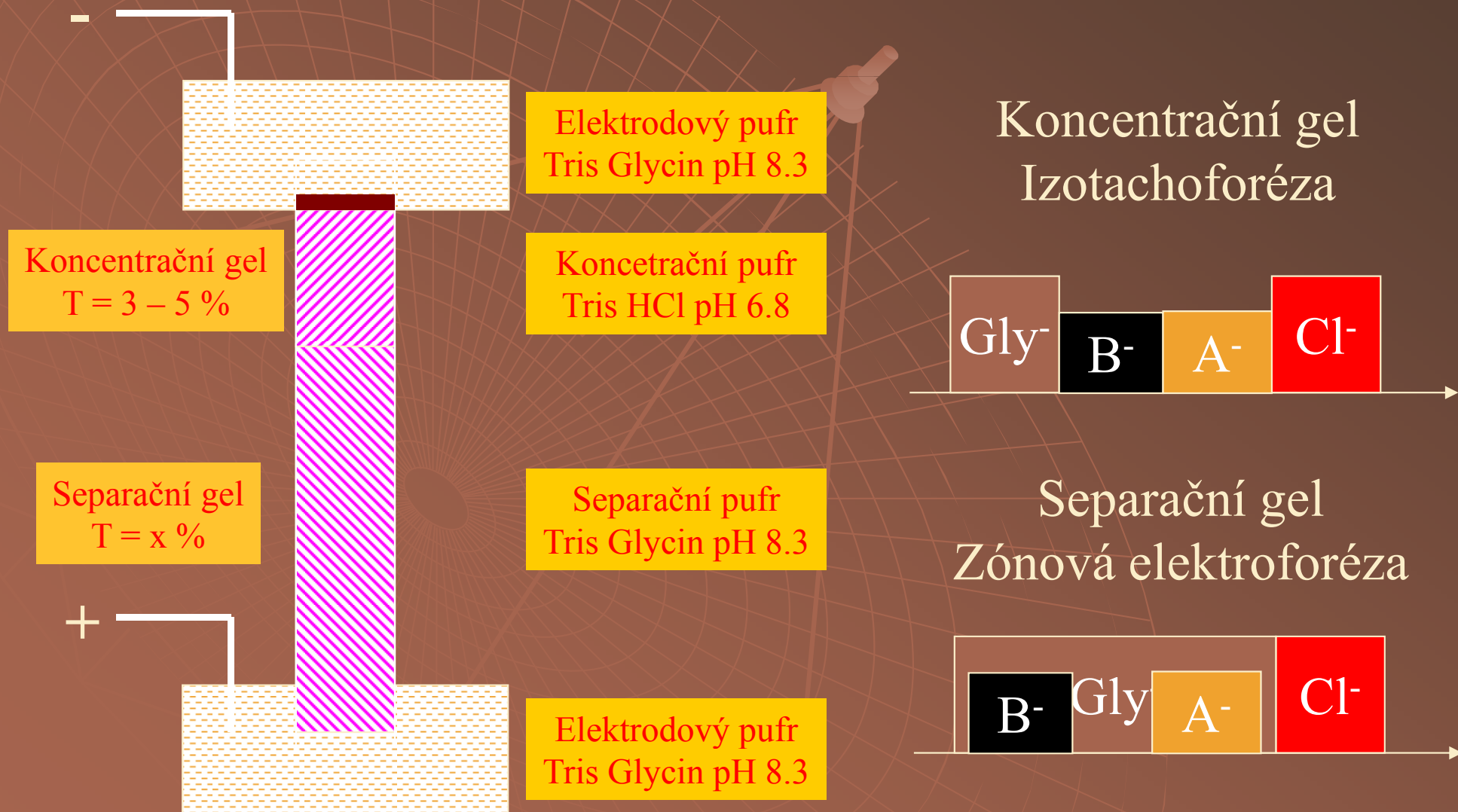


# Izotachoforéza



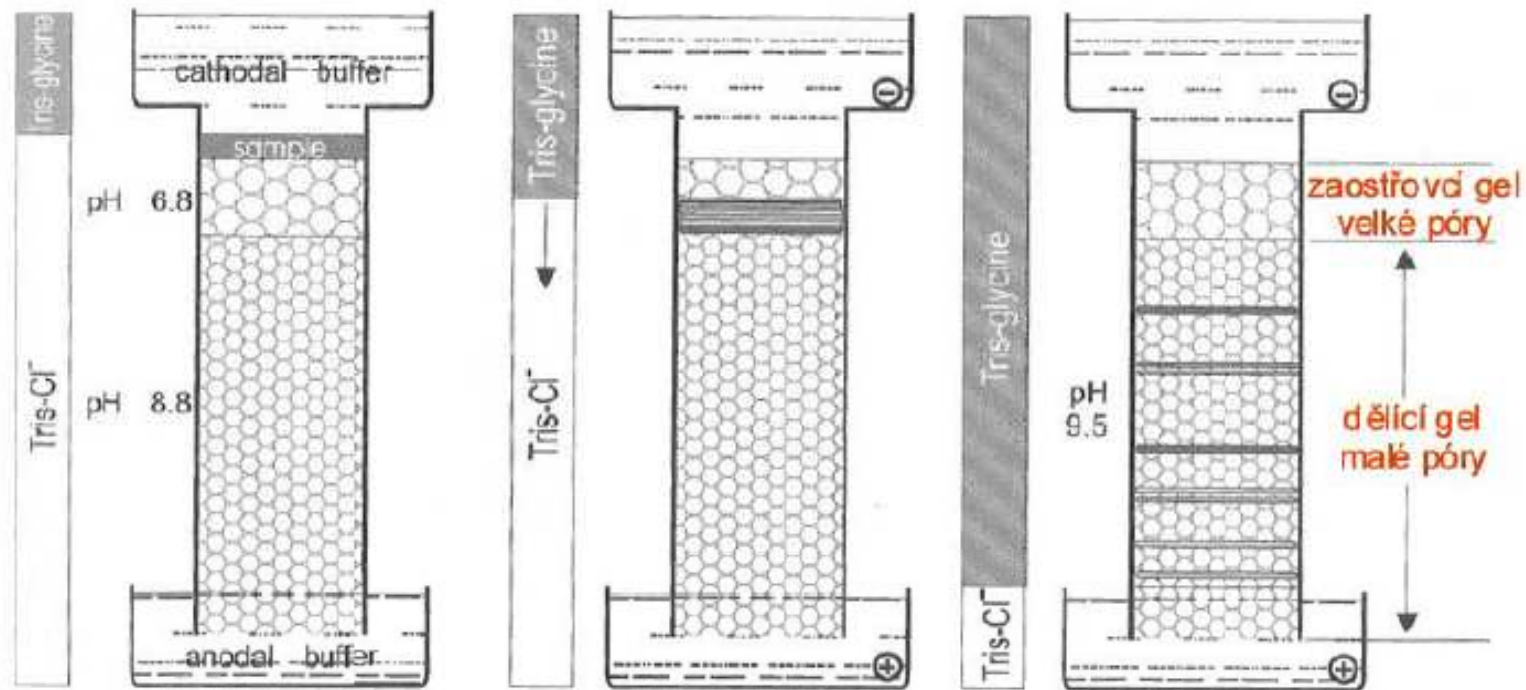
# Diskontinuální PAGE

## Orstein, Davis



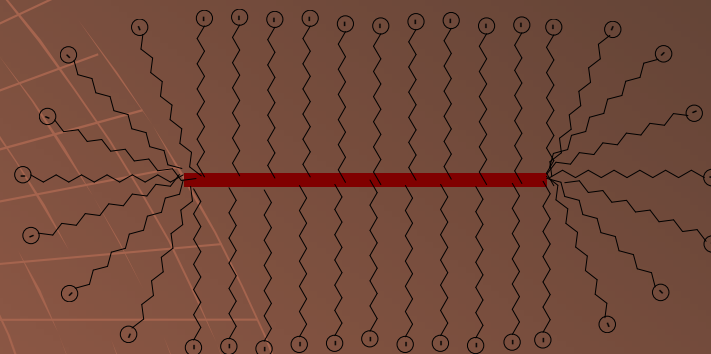
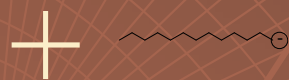
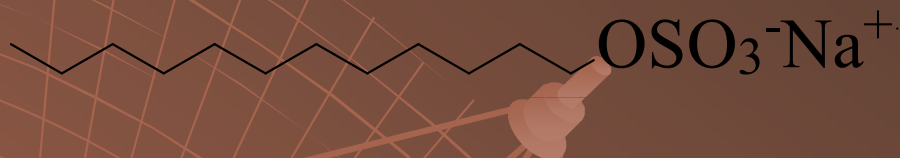
# Diskontinuální PAGE

## Orstein, Davis



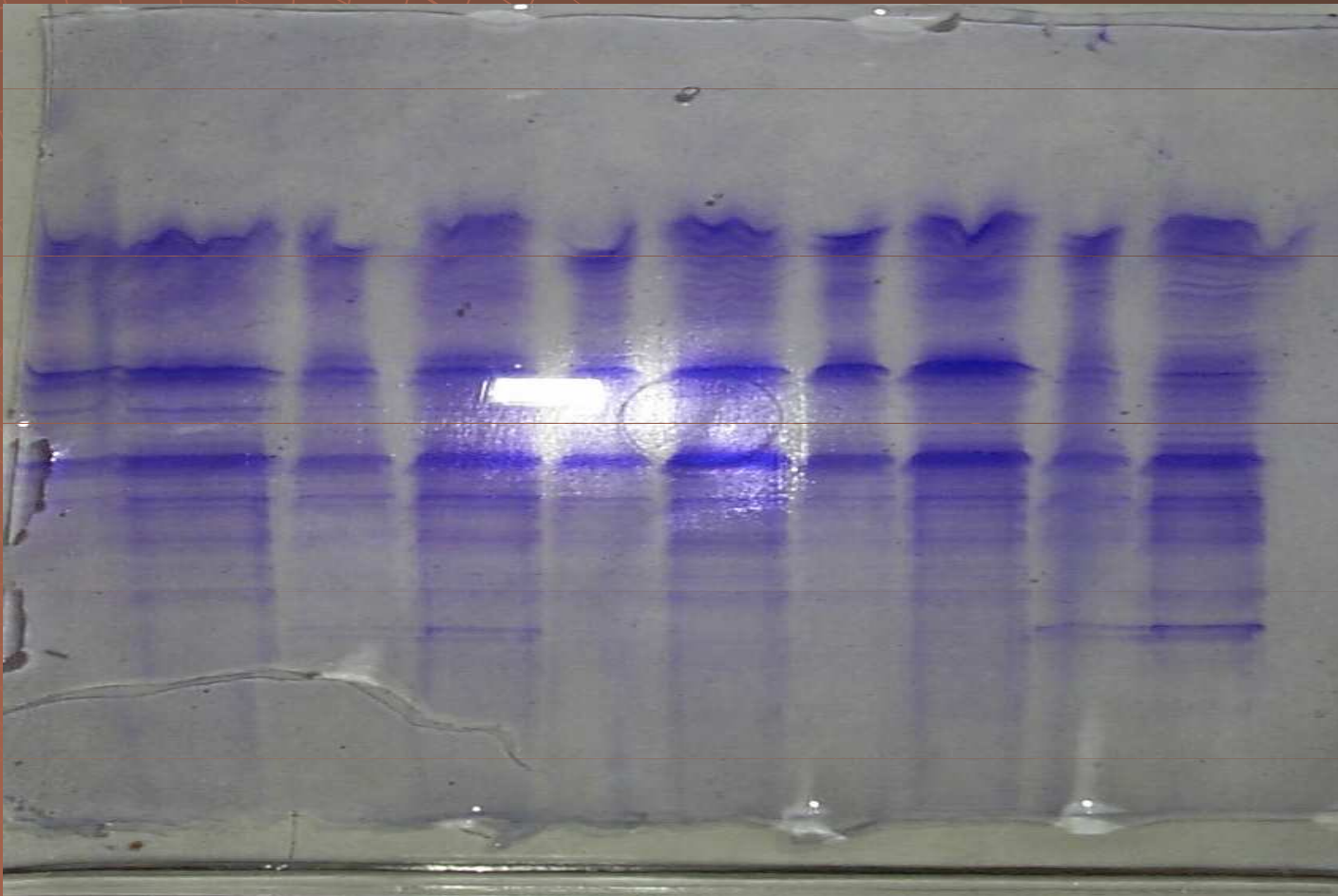
**princip zaostřování**

# SDS PAGE



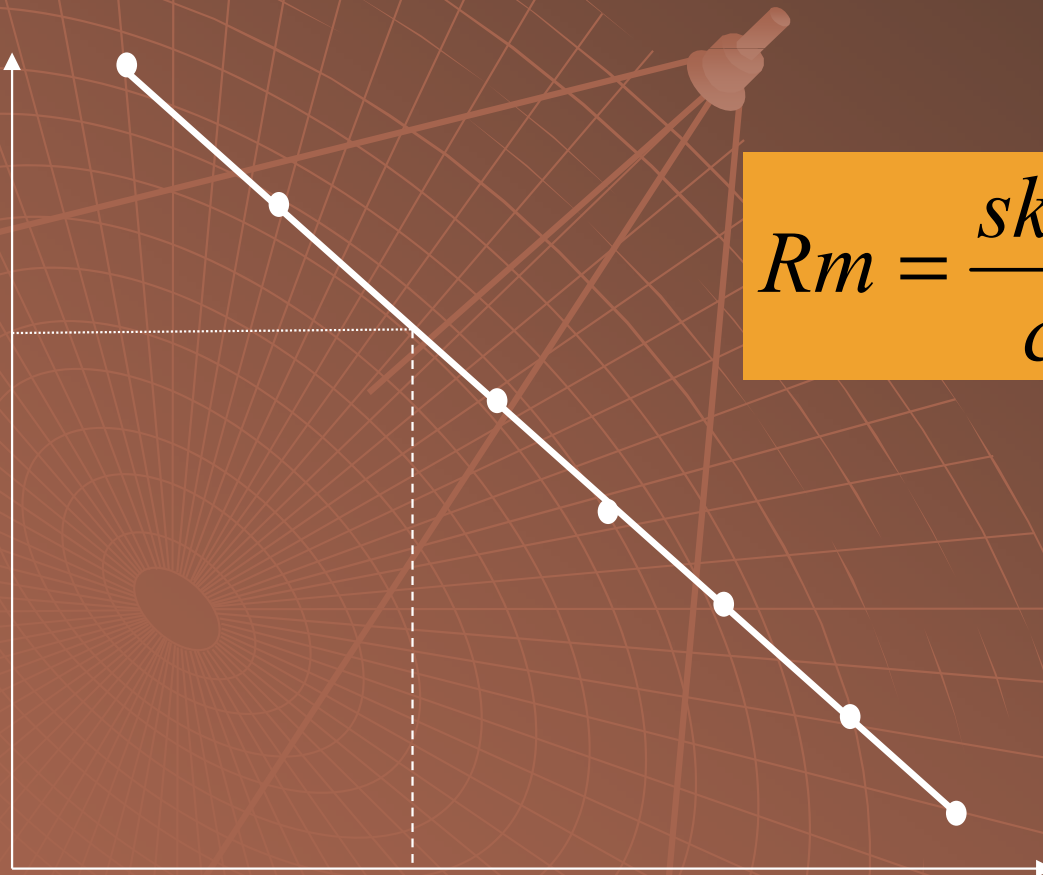
1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS  $\Rightarrow$   
uniformní náboj na jednotku MW

# SDS PAGE



# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE

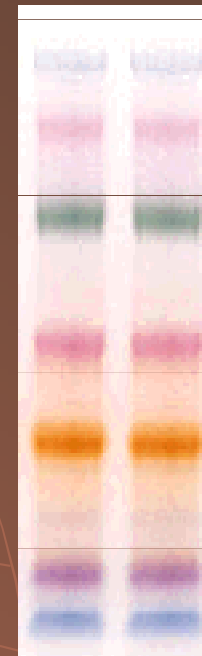
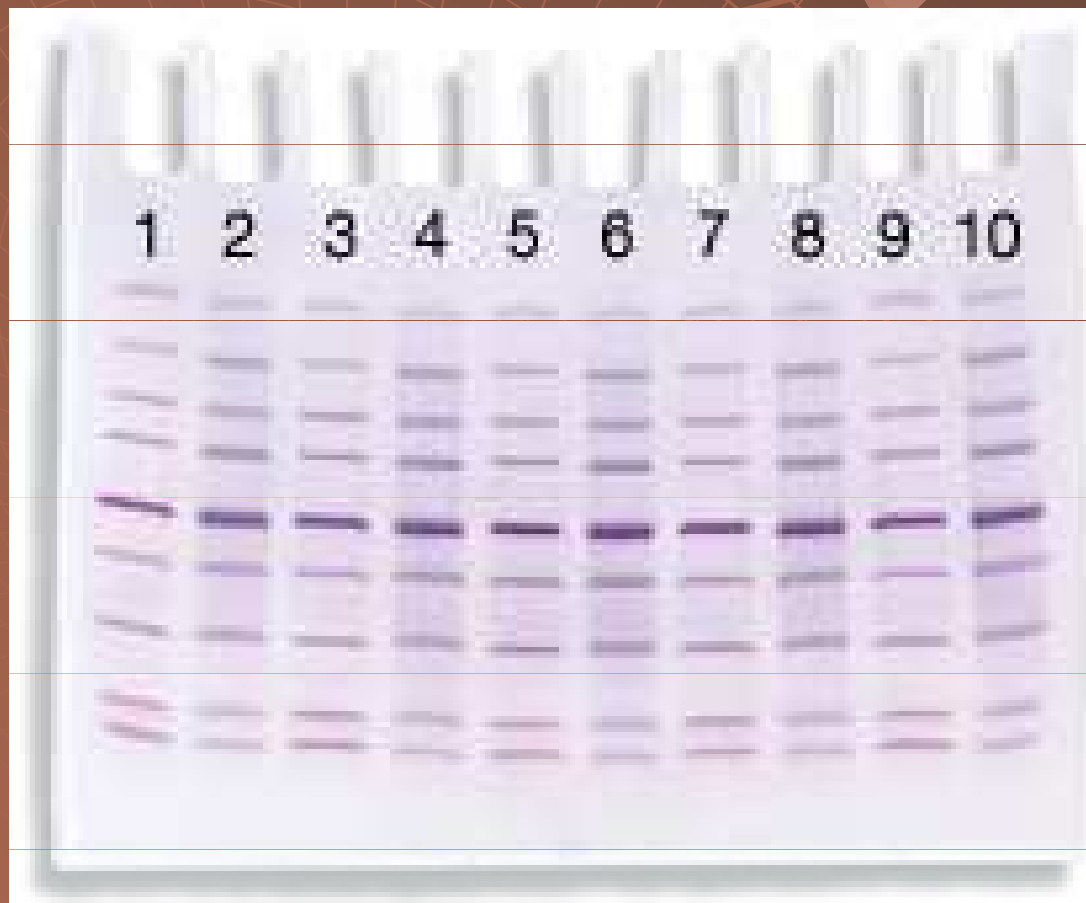
Log Mr



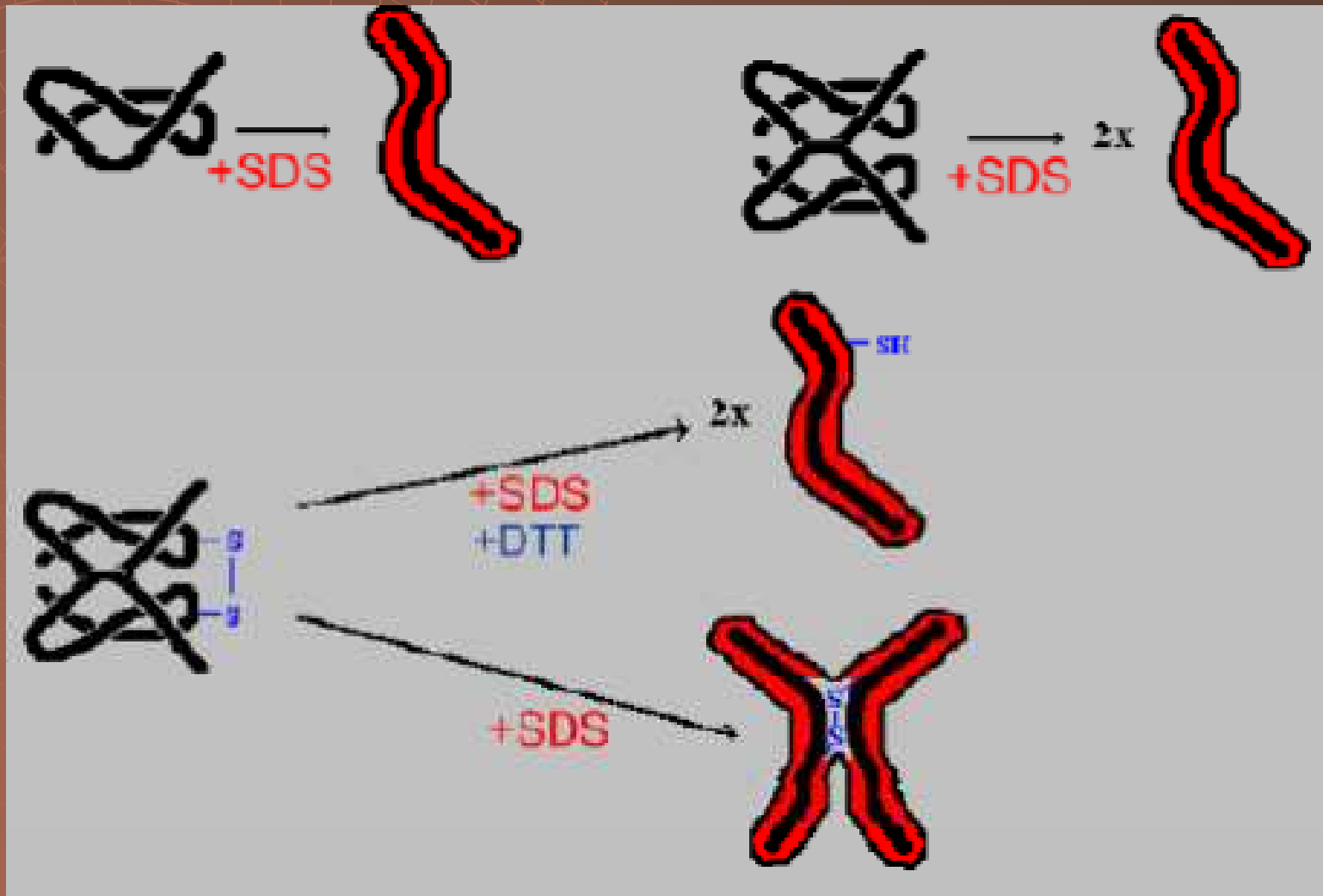
$$Rm = \frac{\text{skvrna}}{\text{čelo}}$$

Rm

# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy



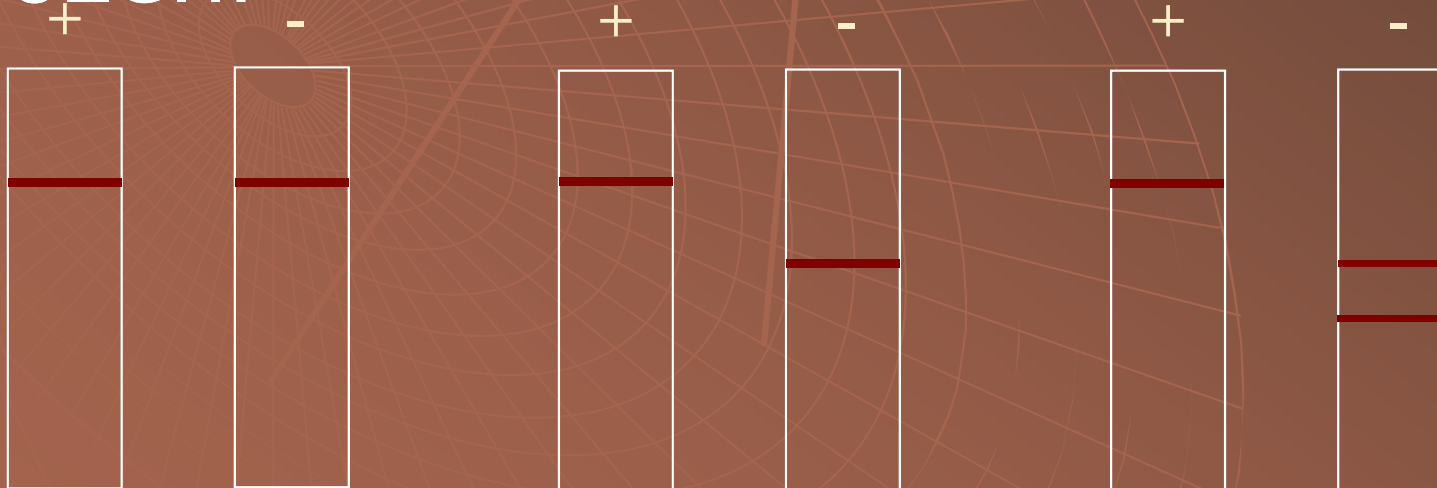
# Stanovení Mr pomocí SDS redukcující x neredukující



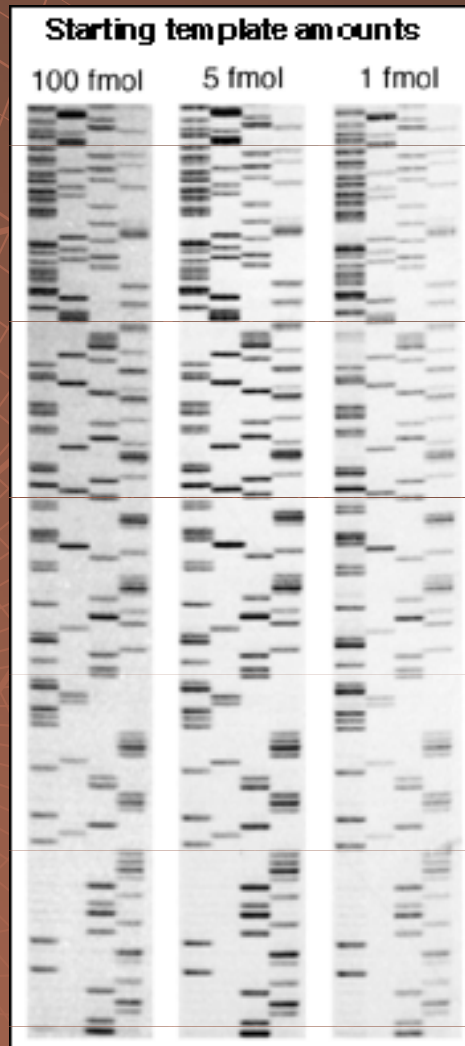


# Použití SDS PAGE

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



# PAGE - sekvenace DNA



# Chemická metoda

## Maxam-Gilbertova metoda

- značení 5' konce  $^{32}\text{P}$
- specifické chemické štěpení
- elektroforéza

# Enzymová metoda

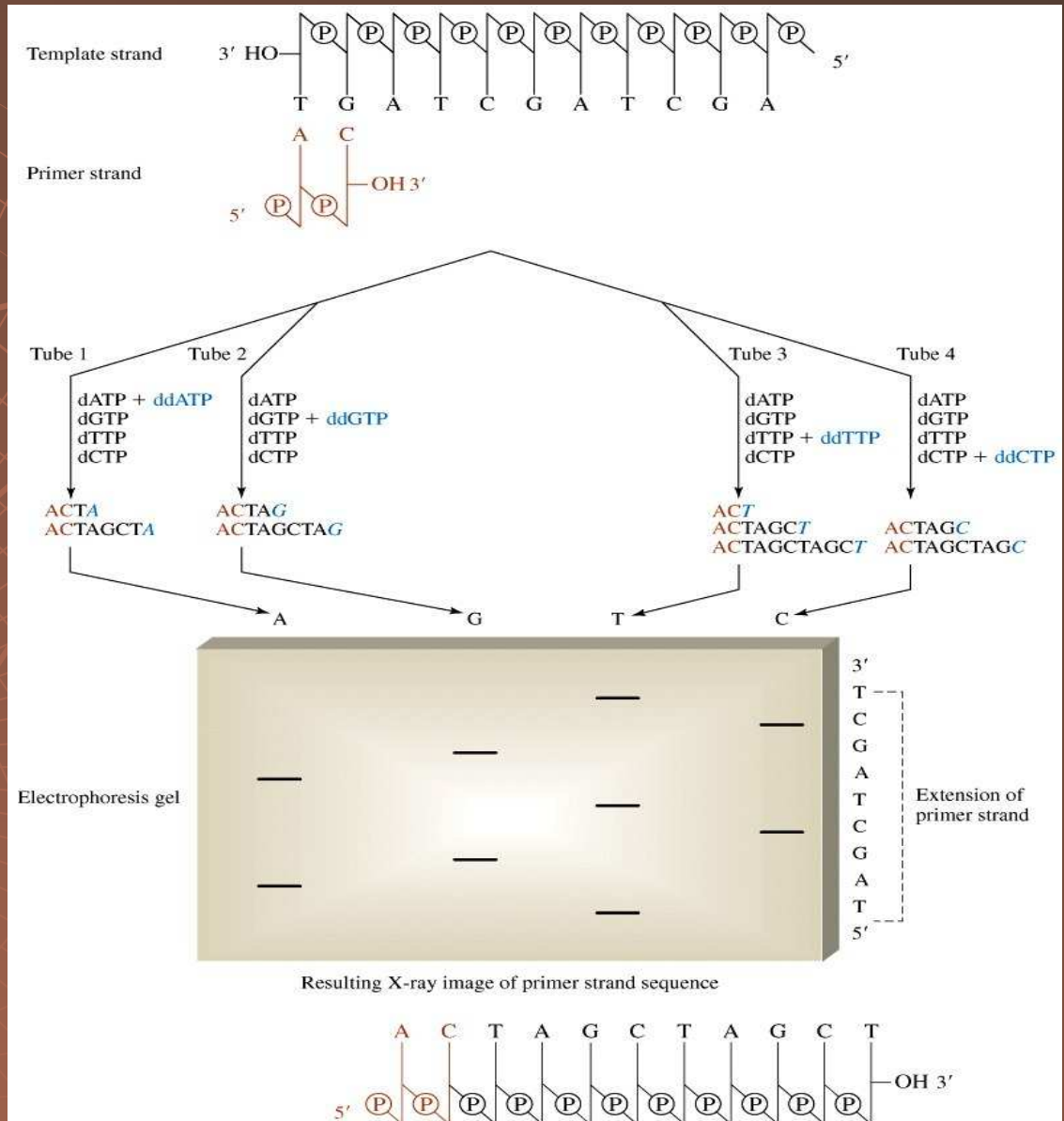
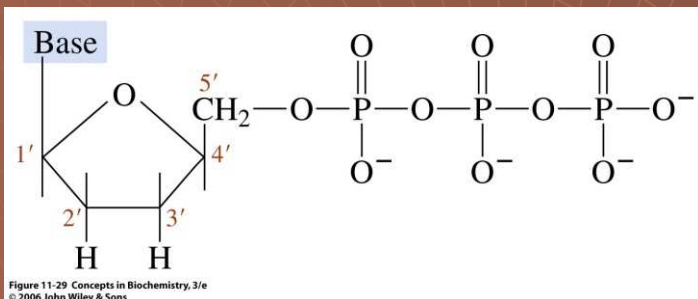


Figure 11-30 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

A G C T

A G C T

140

80

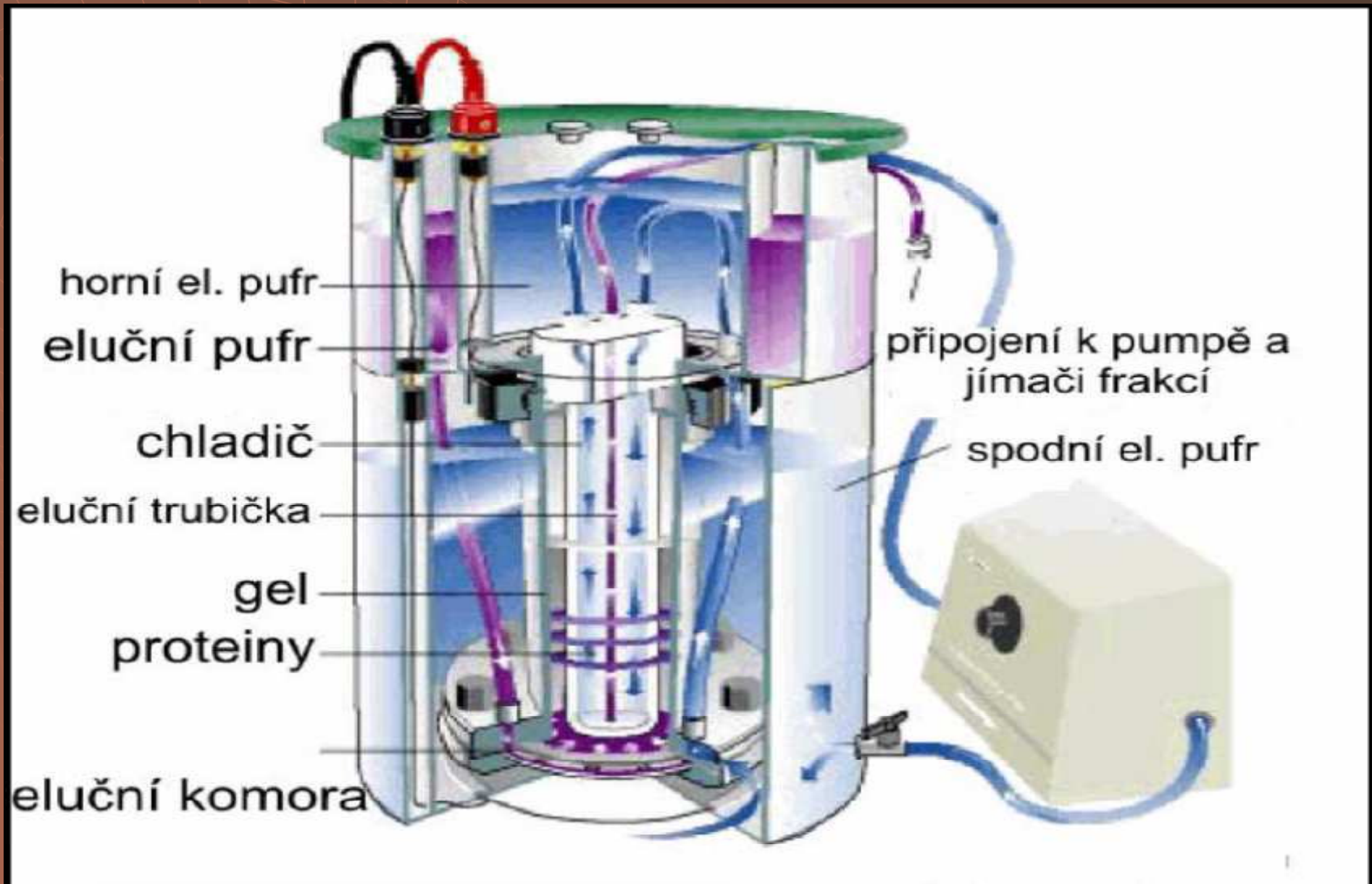
AGGTCTTGG  
CTTATGTTG  
GTAACAGAT  
GCATTTGAG  
90 ATCTGACGC  
TAATACTATA  
TCCAAGTTTA

—  
—  
—  
—  
—  
—  
—

—  
—  
—  
—  
—  
—  
—  
—

ATTTGAACCT  
CAGATAGTAT  
TTCCCTGA  
CCTGGGAGTT  
AACATCCGAA  
TGAACCTTTG  
TACCCATCAT  
TCGTA  
TACTTGT

# Preparativní PAGE

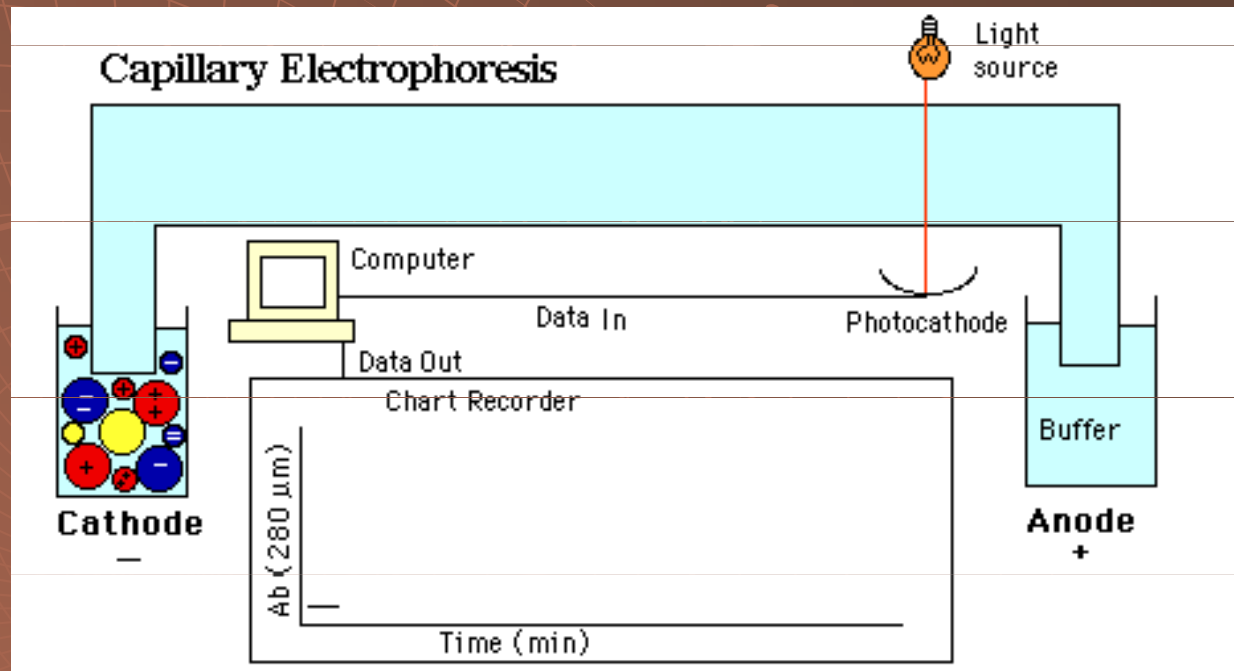


# Automatizace PAGE Fast-system



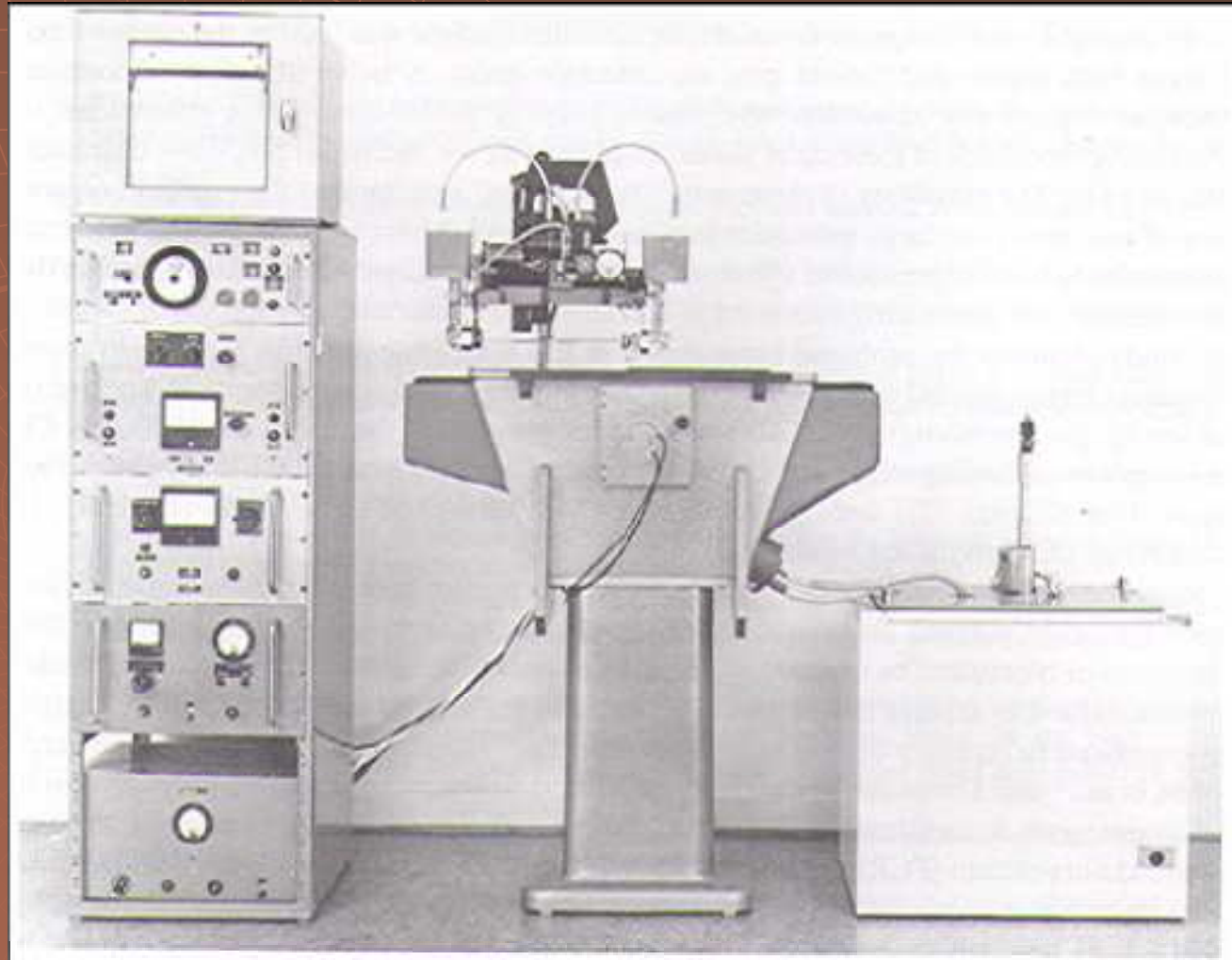
# Kapilární zónová elektroforéza

## CZE

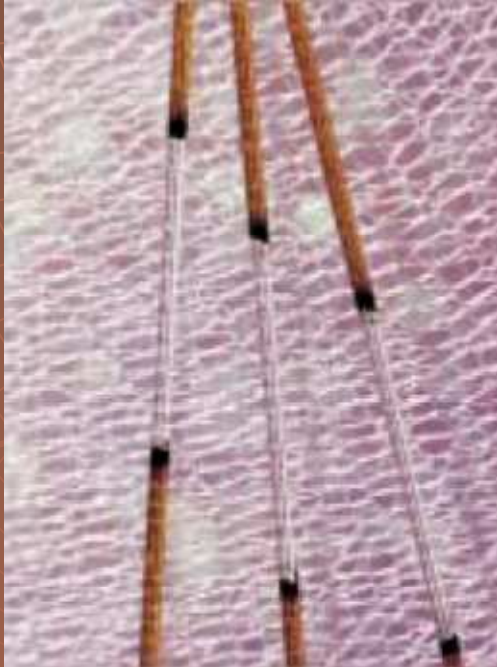




# Hjerten 1967



# 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:

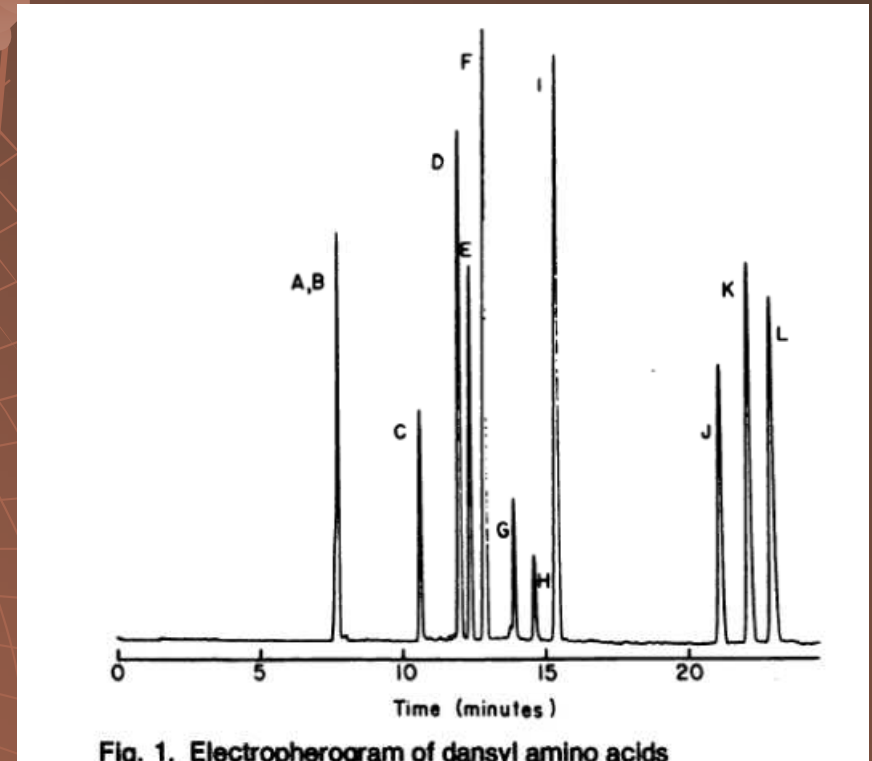
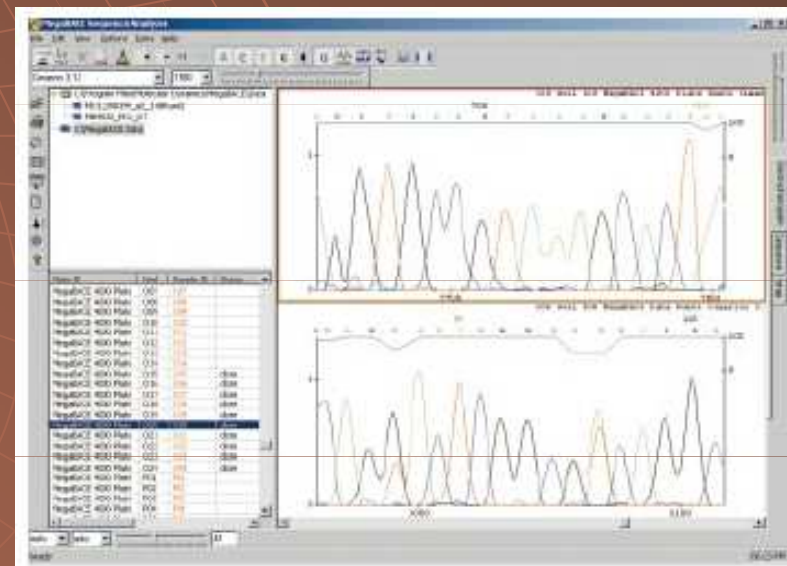
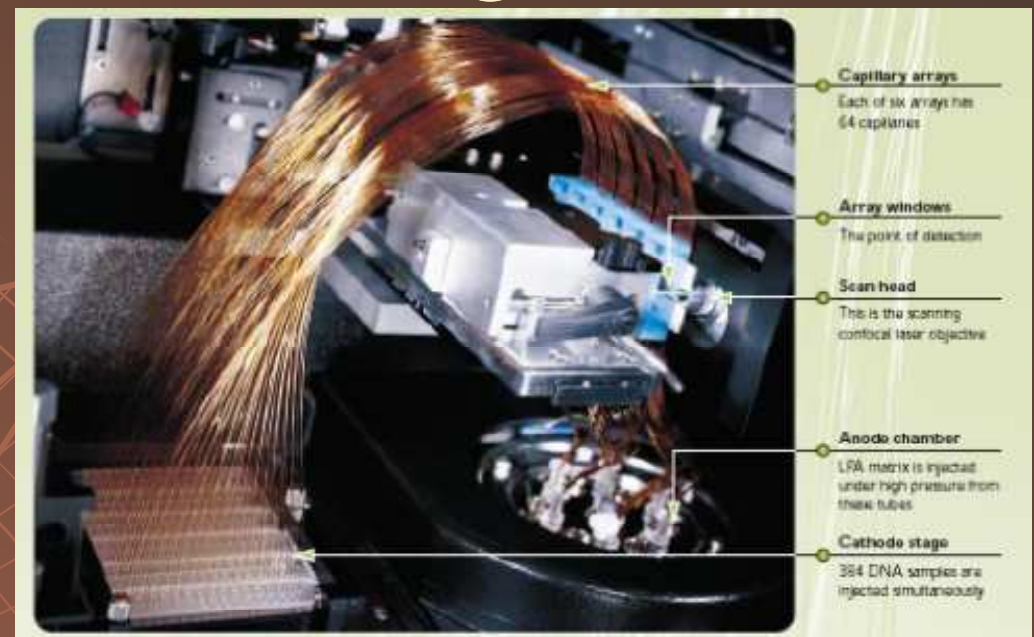


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

# Beckman 1987



# 2003 - Projekt lidského genomu





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

- ◆ Aplikaační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace

# Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace

CZE, MEKC,  
CIEF, CITP  
NACE, MEEKC,  
CGE, ChCE



CEC



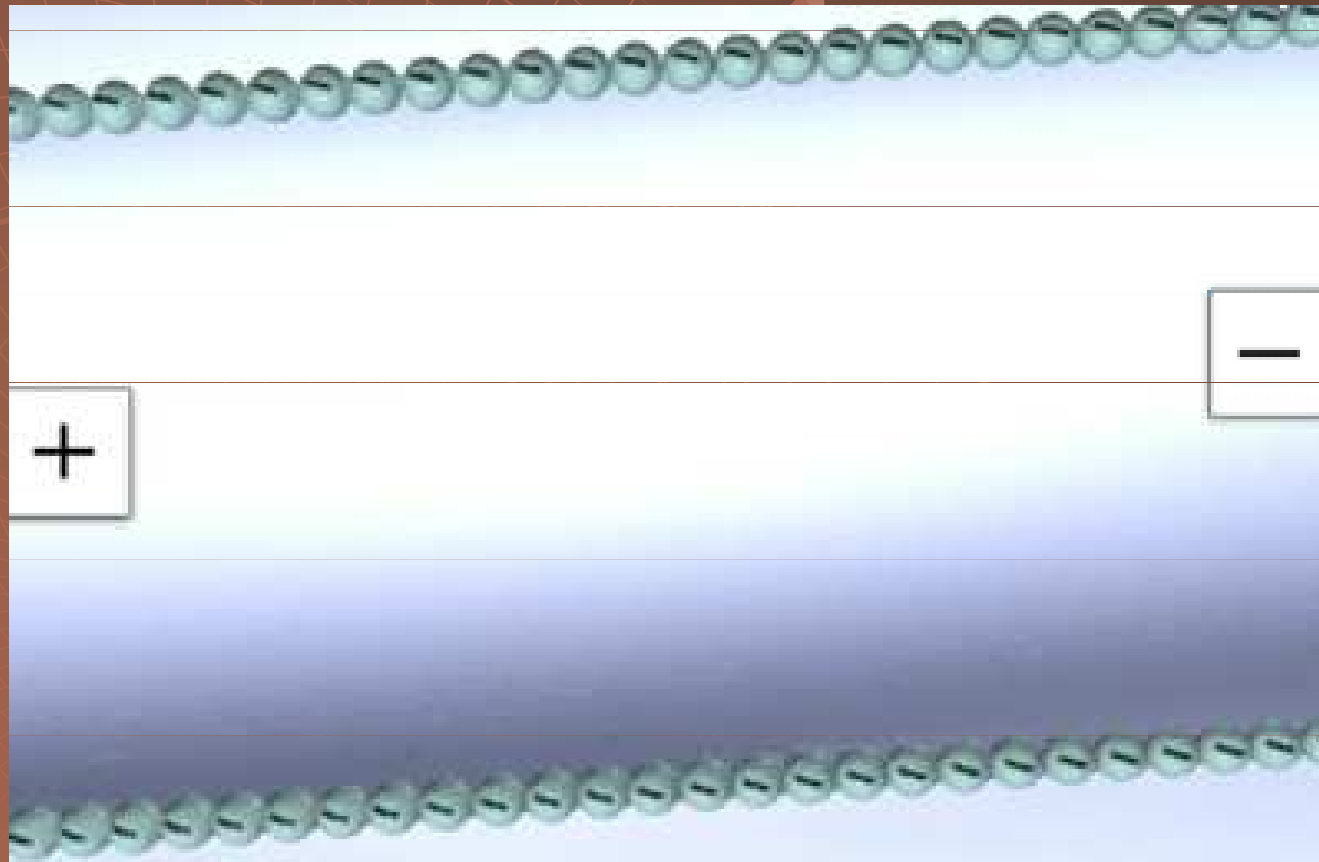
# Výhody CE

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

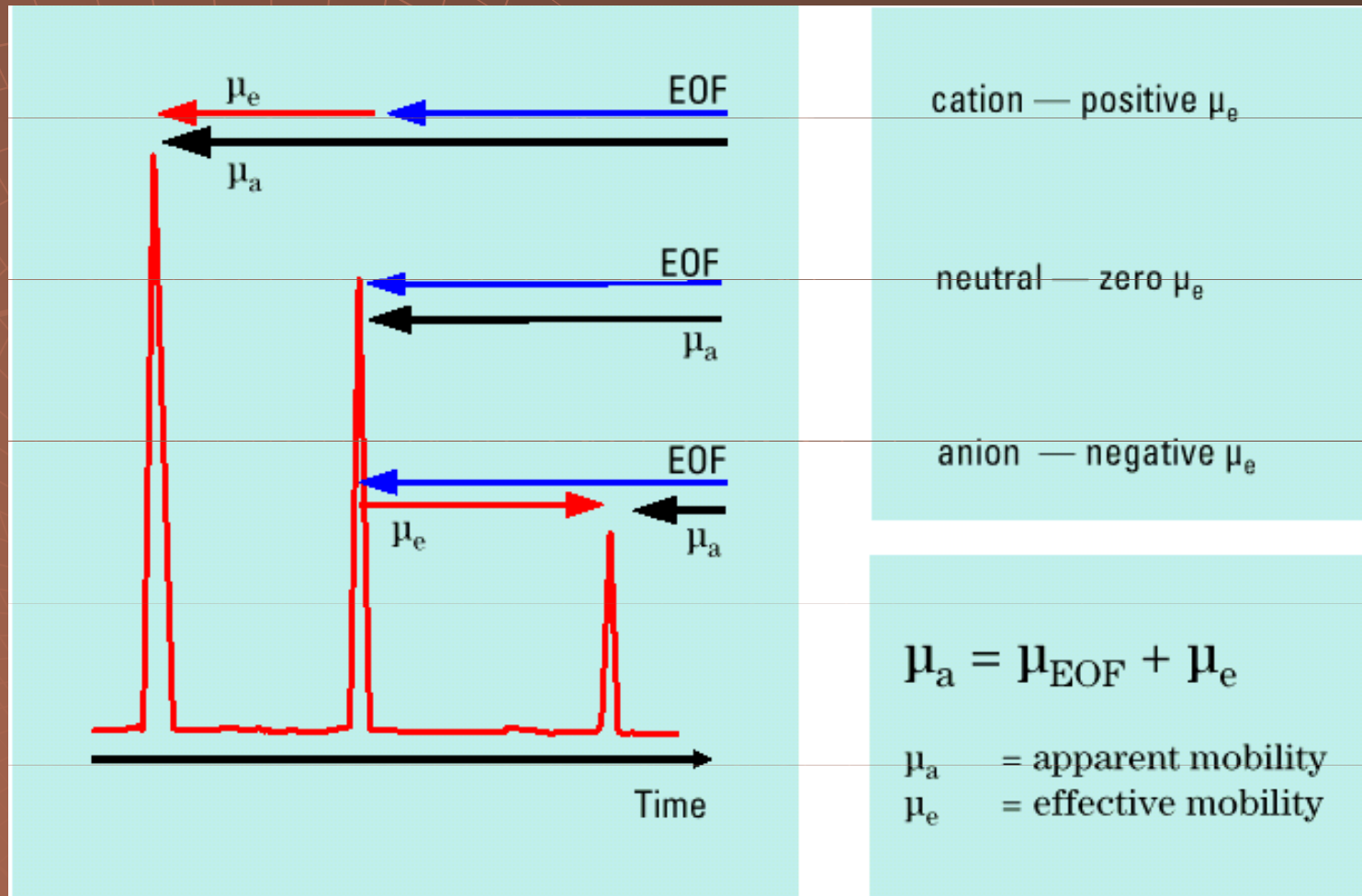
# Módy CE

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

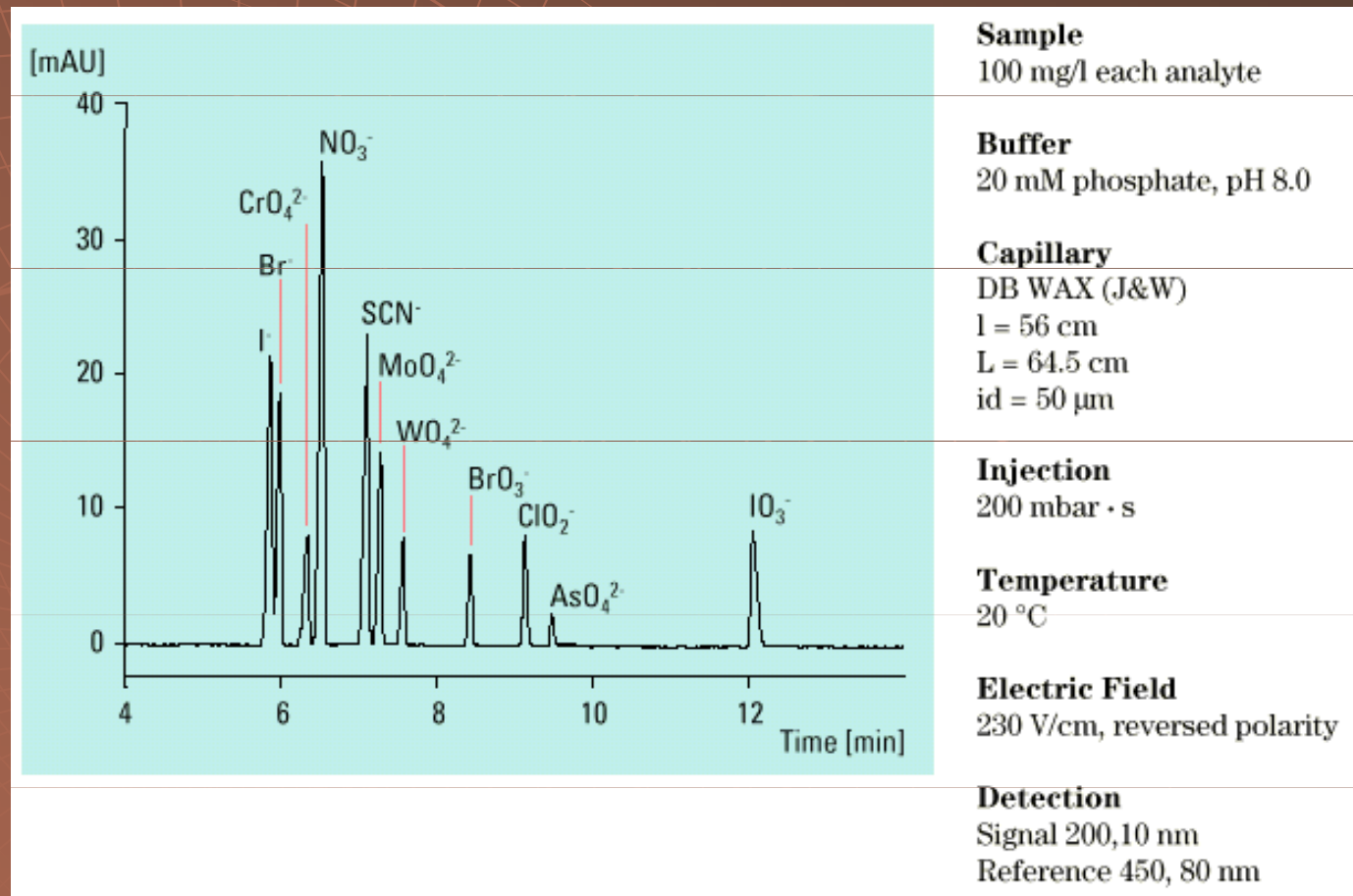
# Kapilární zónová elektroforéza ve volné kapiláře



# Výsledná mobilita částic při CZE



# Separace aniontů pomocí CZE



# Stanovení aktivity HD pomocí CZE

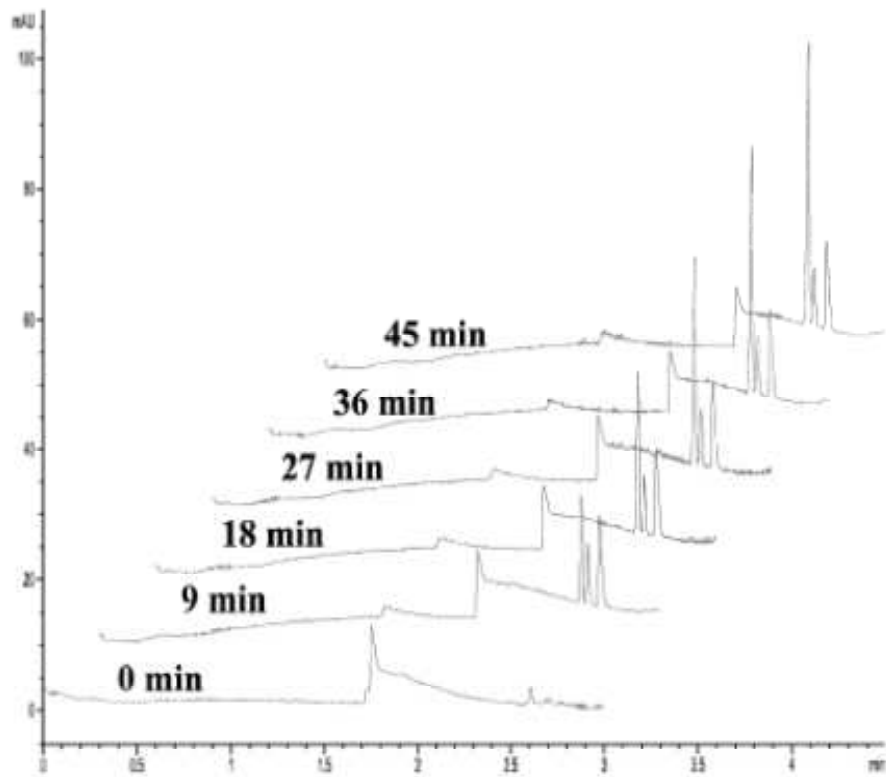


Fig. 1. CZE analysis of haloalkane dehalogenase catalysed reaction using indirect detection. Overlaid electropherograms show the reaction mixture of 10 mM 1,3-dibromopropane in 50 mM glycine buffer (pH 9.0) at 30°C before and 9, 18, 27, 36 and 45 min after addition of 10  $\mu$ l of enzyme solution. The separation conditions are the same as in Table 1.

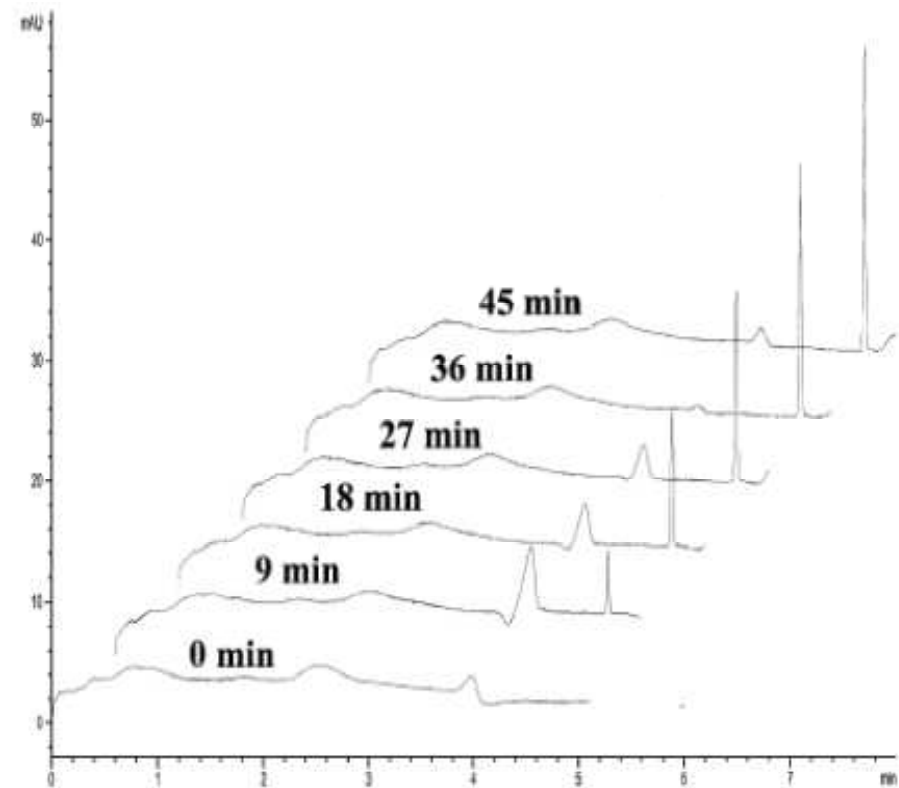
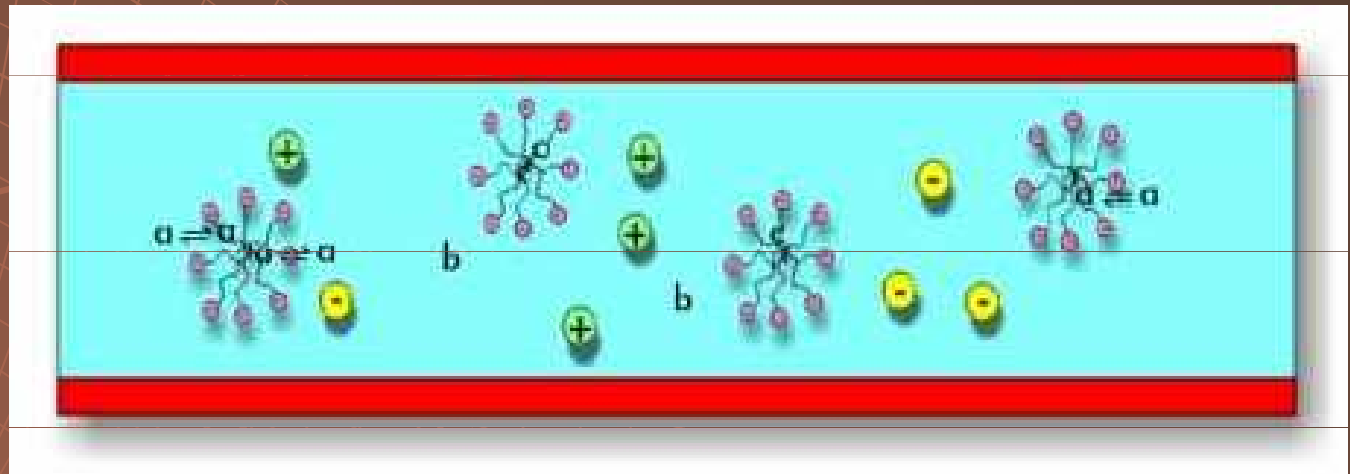
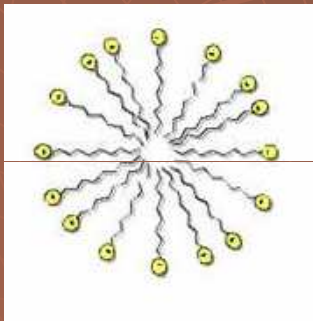


Fig. 2. CZE analysis of haloalkane dehalogenase catalysed reaction using long-end injection in combination with direct detection. The enzyme preparation was 4 times diluted with 50 mM phosphate buffer (pH 7.5). Separation conditions are the same as in Table 2. The other conditions are the same as in Fig. 1.

# Princip MEKC

Micela

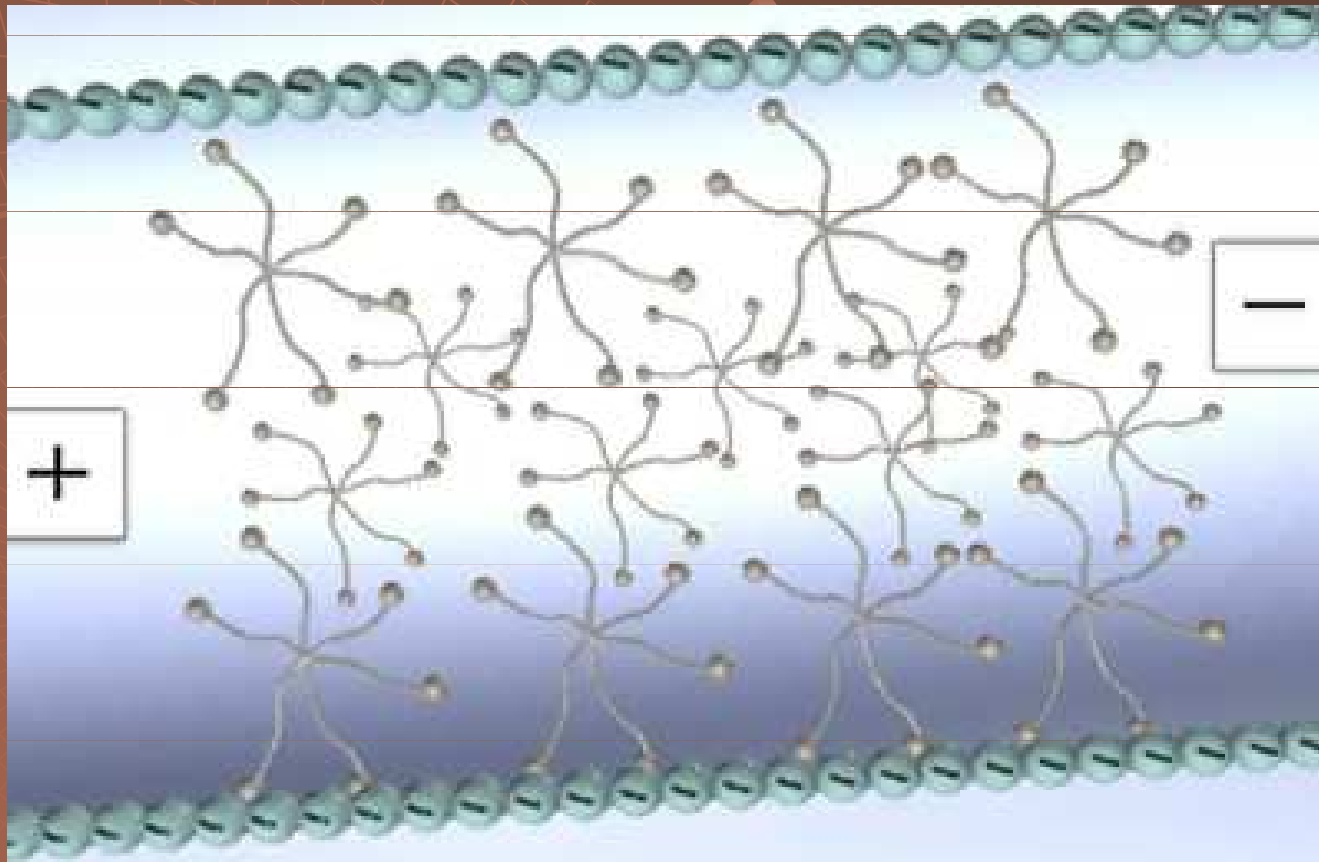


a – střed – rozpustná v obou

b – silně hydrofilní – nerozpustná v  
micelle

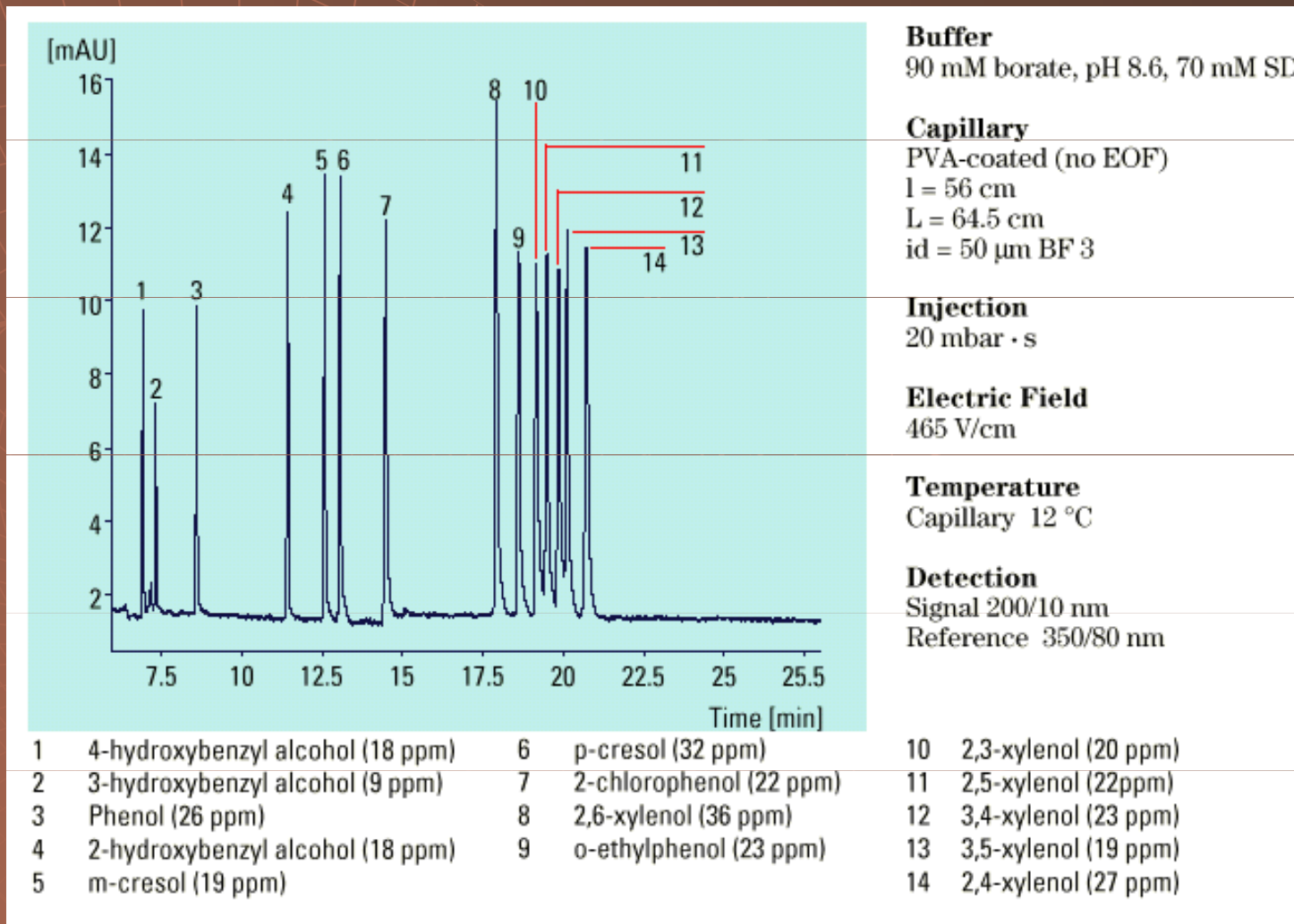
c – silně hydrofóbní – nerozpustná ve  
vodné fázi

# Micelární elektrokinetická chromatografie

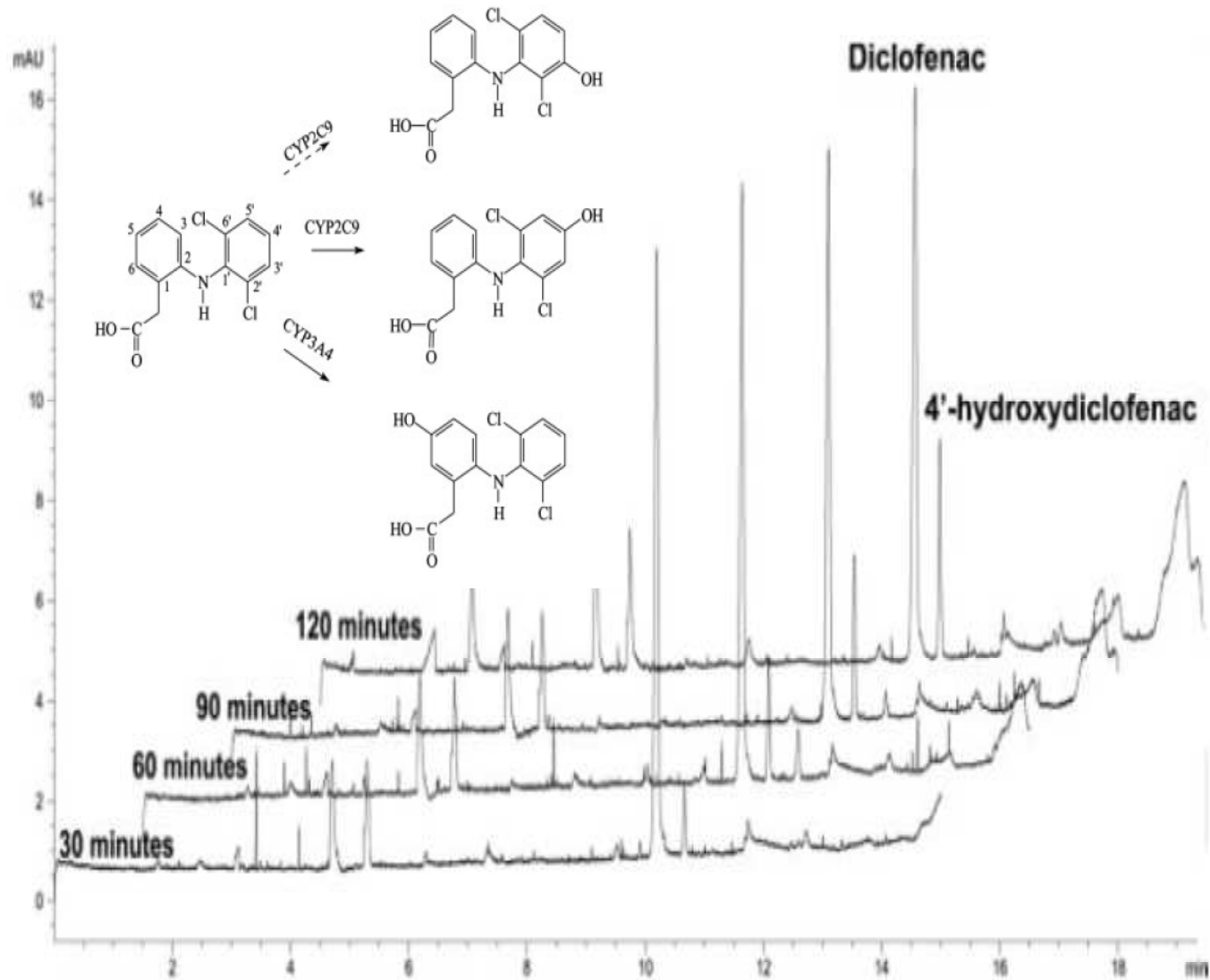




# Separace fenolů a alkoholů pomocí MEKC

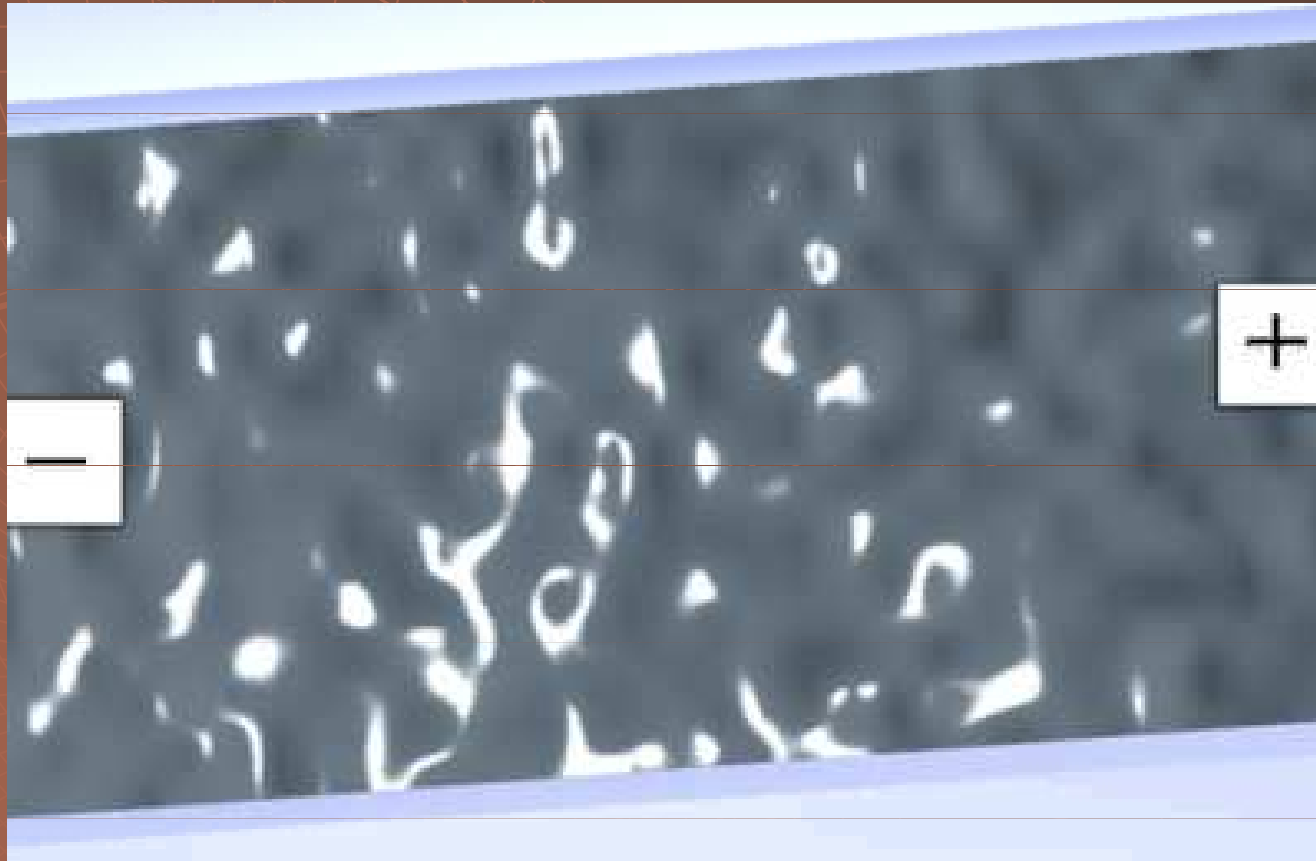


# Stanovení aktivity CYP 2C9 pomocí MEKC

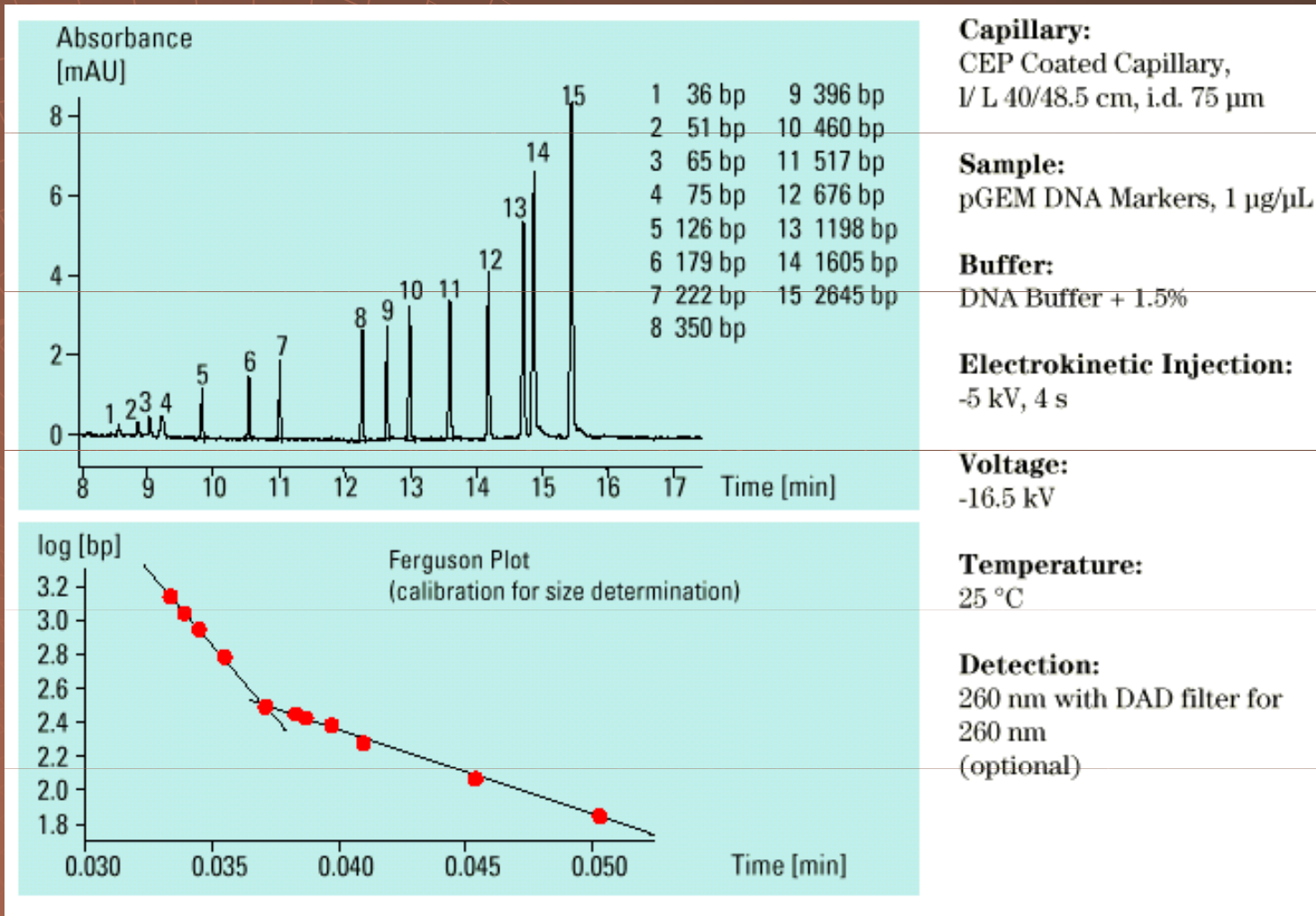


**Figure 3.** MEKC analysis of CYP2C9 reaction. Overlaid electropherograms show the enzymatic reaction under standard conditions as described in Section 2; the final concentrations of CYP2C9 and diclofenac in reaction mixture were 9.7 nM and 100  $\mu$ M, respectively. MEKC conditions as in Fig. 2.

# Kapilární gelová elektroforéza



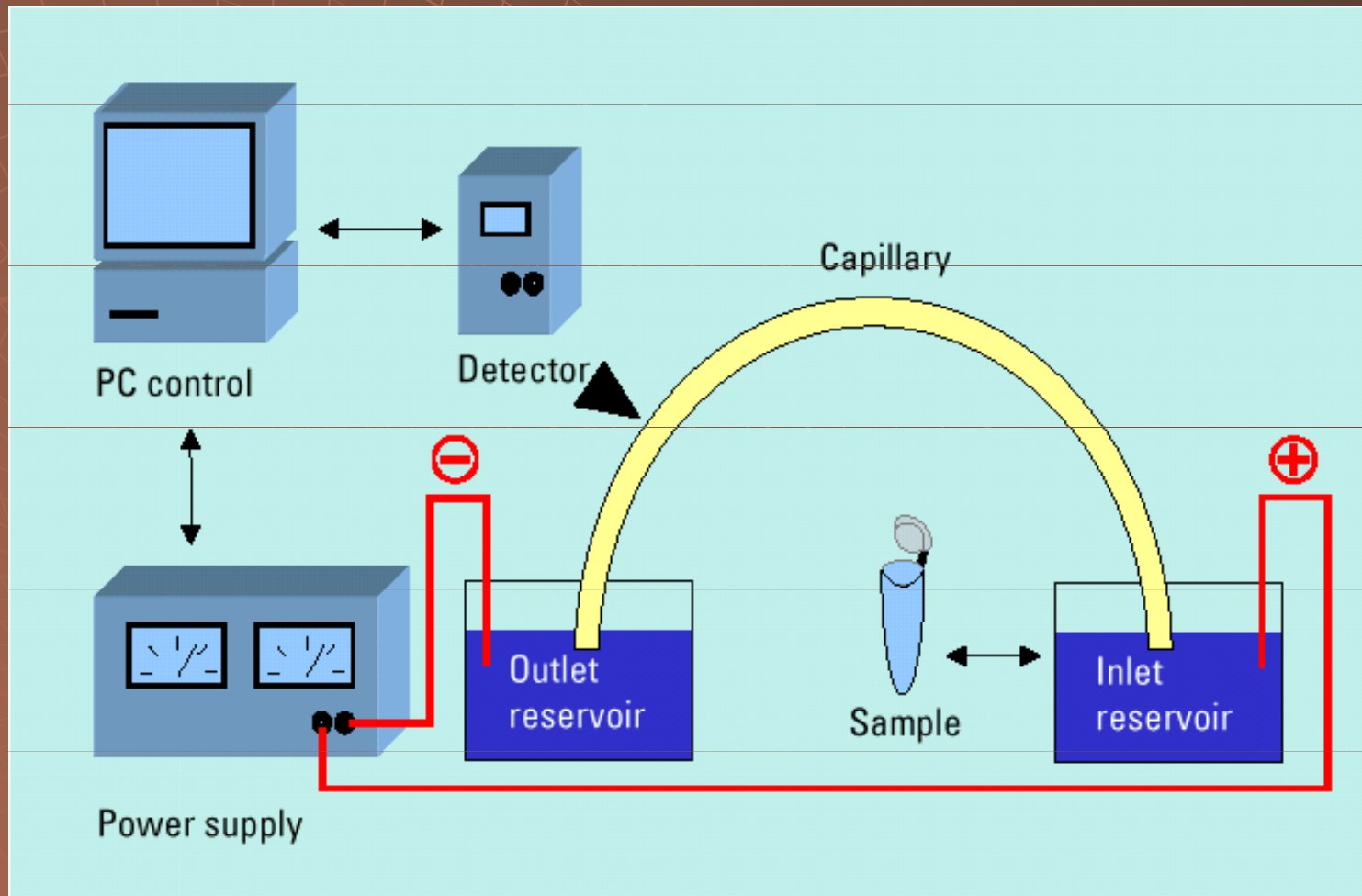
# CGE fragmentů dsDNA





# Instrumentace CE

# Schéma zařízení pro CE

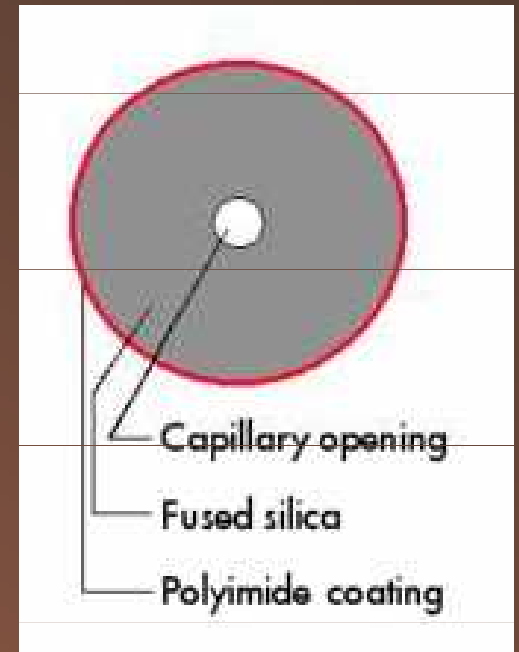


# Napájecí zdroj

- ◆ **stabilizovaný  $\pm 30$  kV  
300  $\mu$ A**
- ◆ **konstantní napětí nebo proud**
- ◆ **obojí polarita**
- ◆ **ochrana obsluhy**

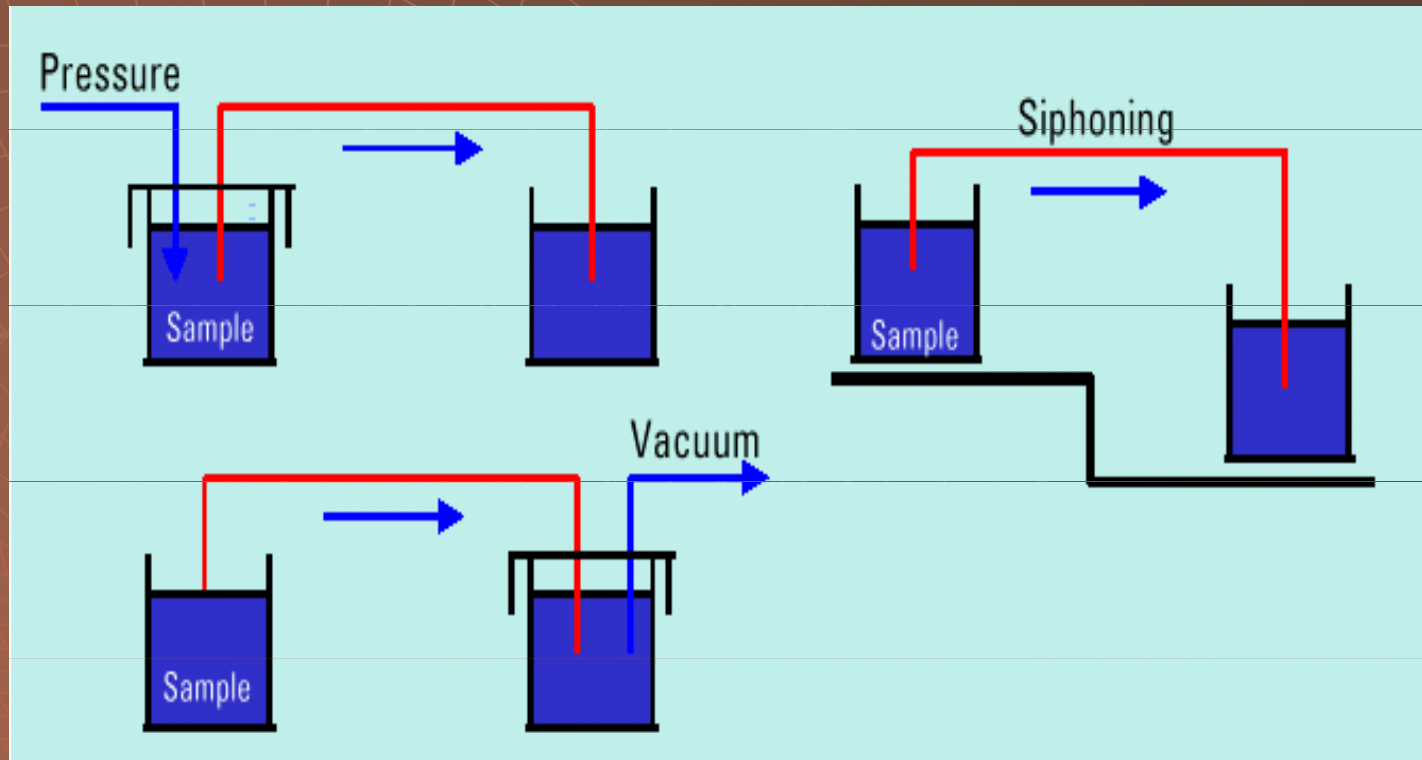
# Kapilára

- ◆ křemenná - 25 -100  $\mu\text{m}$  i.d  
- 350  $\mu\text{m}$  o.d.
- ◆ délka až 100 cm délka
- ◆ polyimidové vnější pokrytí

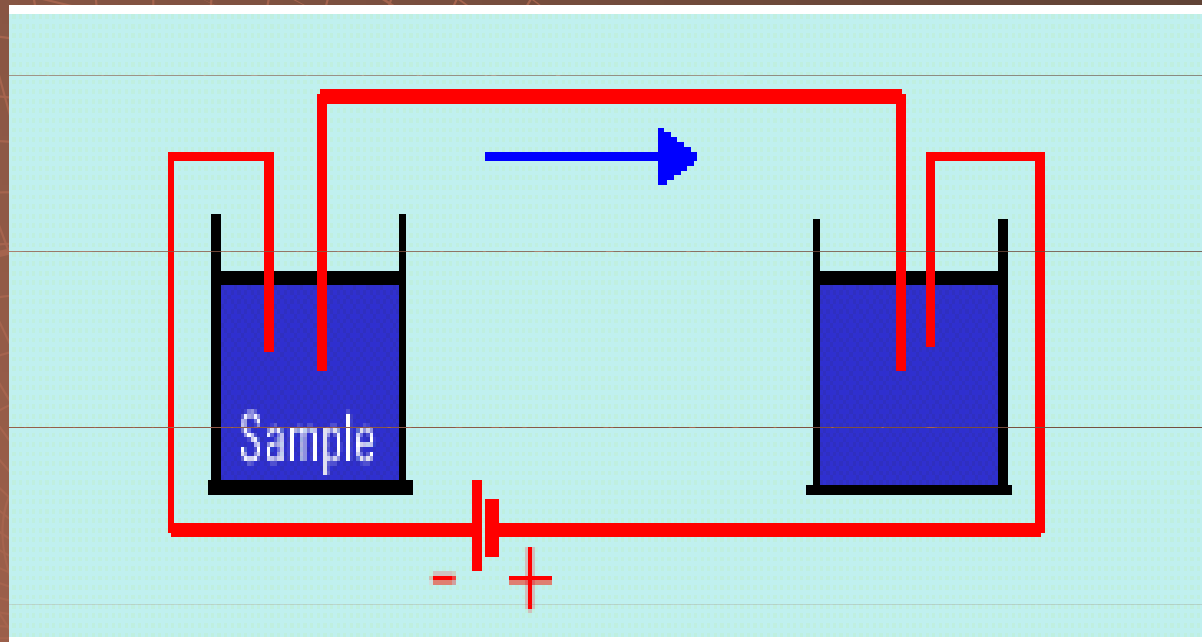




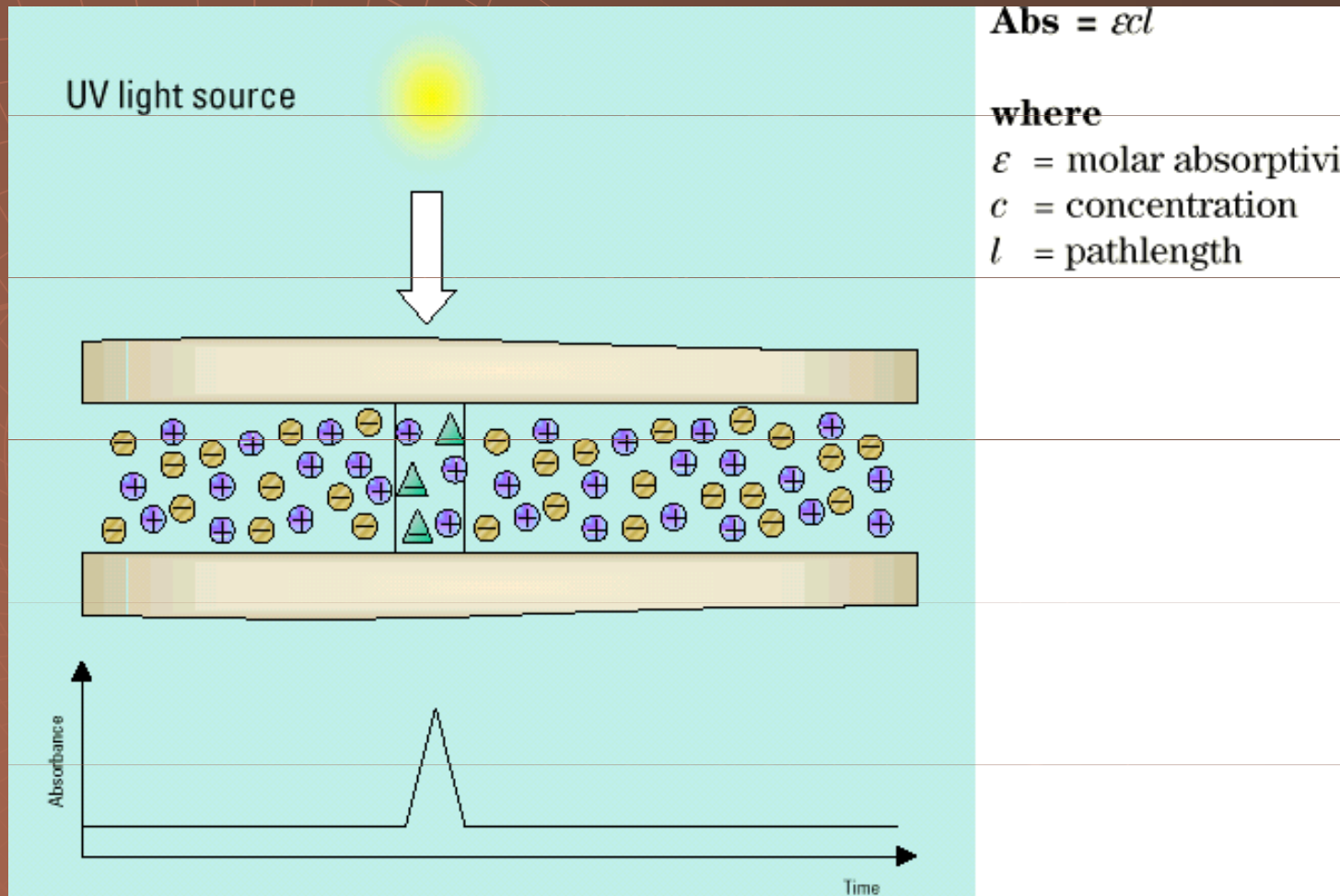
# Dávkování - hydrodynamické



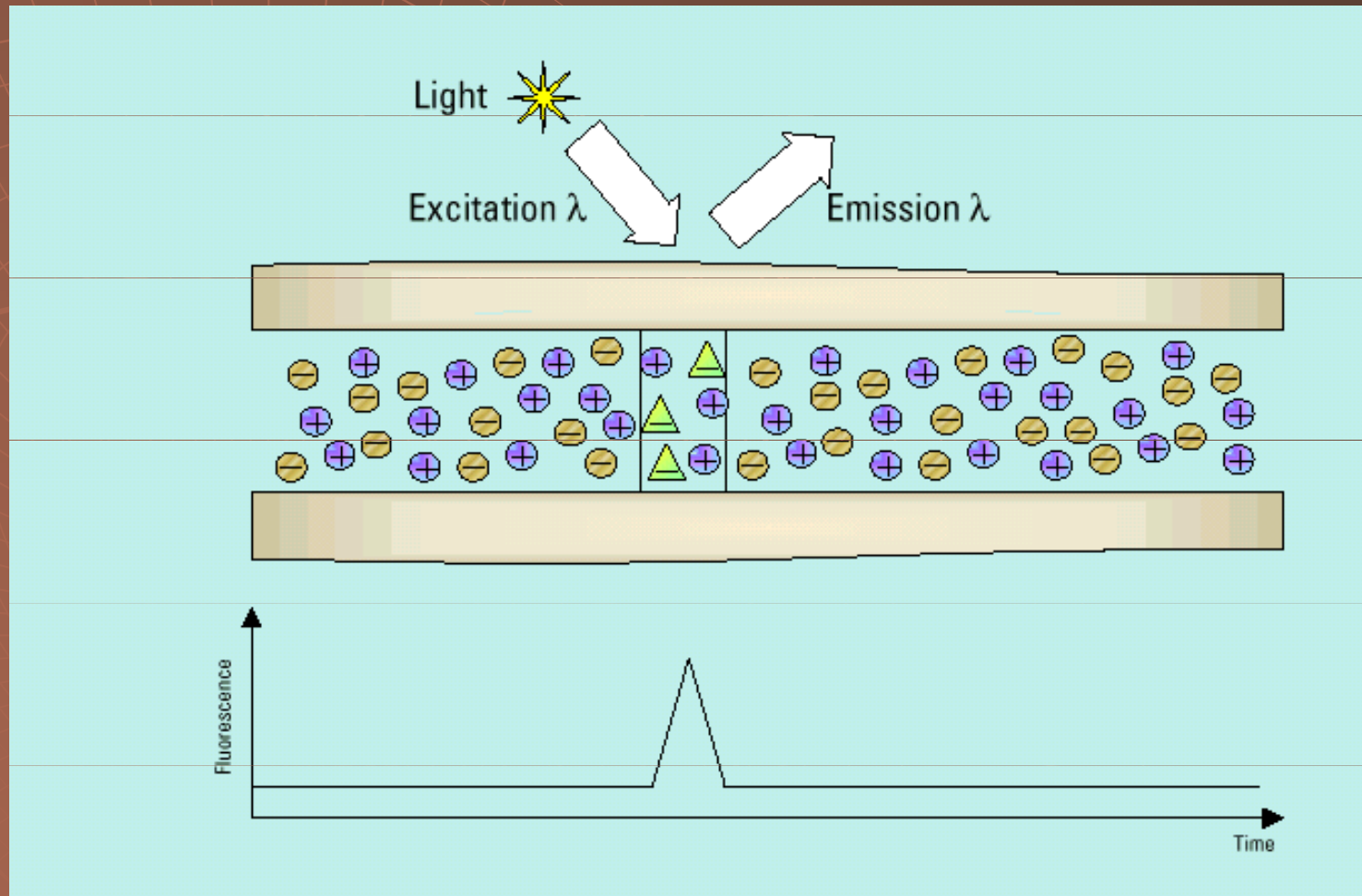
# Dávkování - elektrokinetické



# Detekce spektrofotometrická



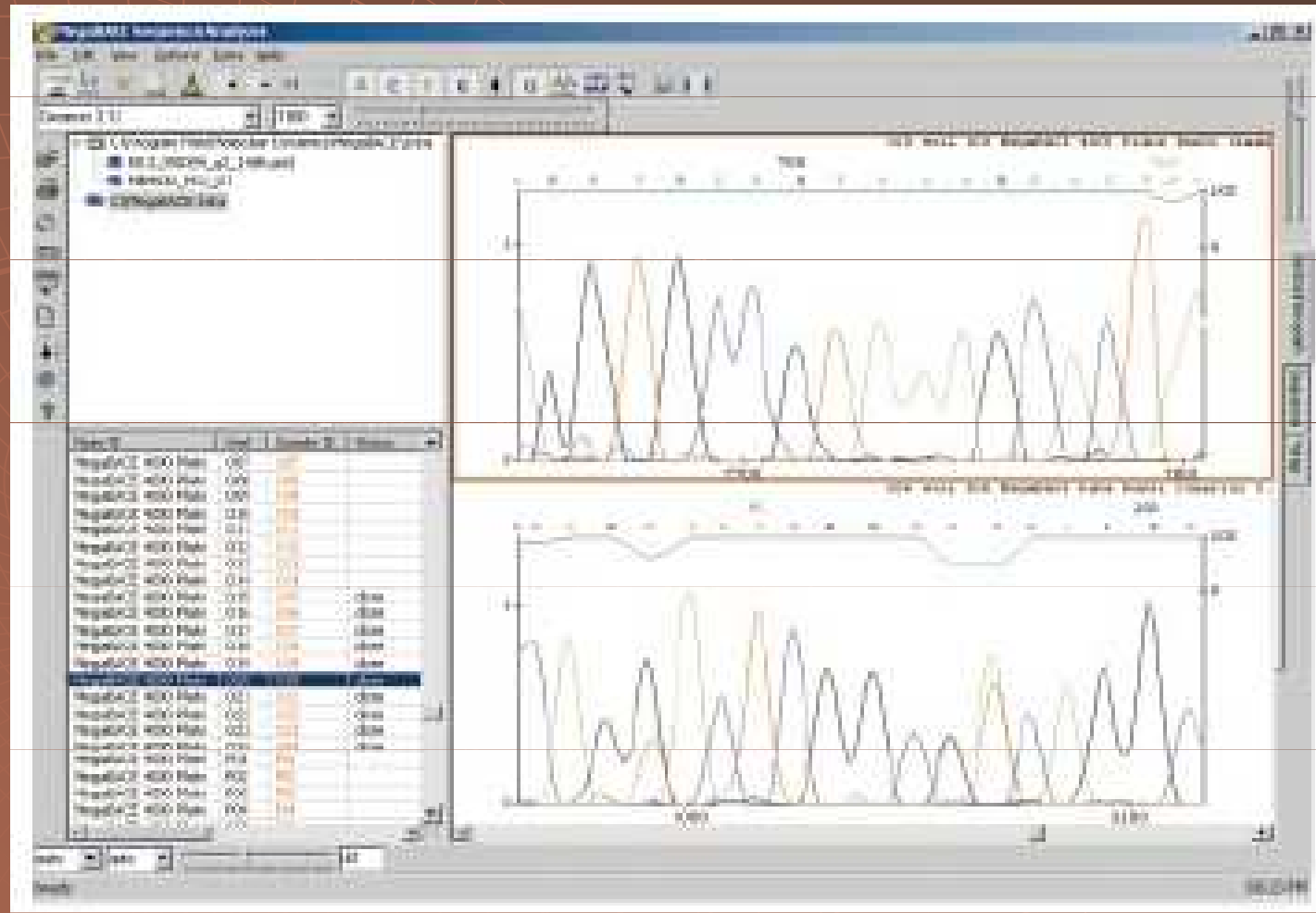
# Detekce fluorescenční



# 2003 - Projekt lidského genomu



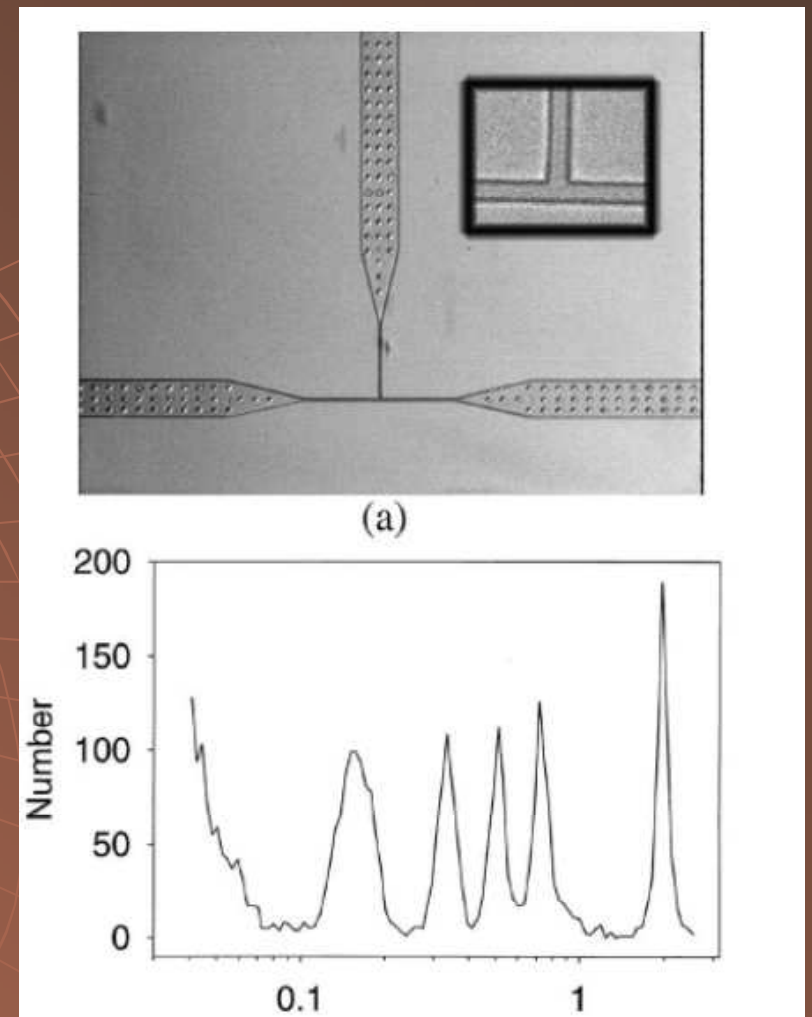
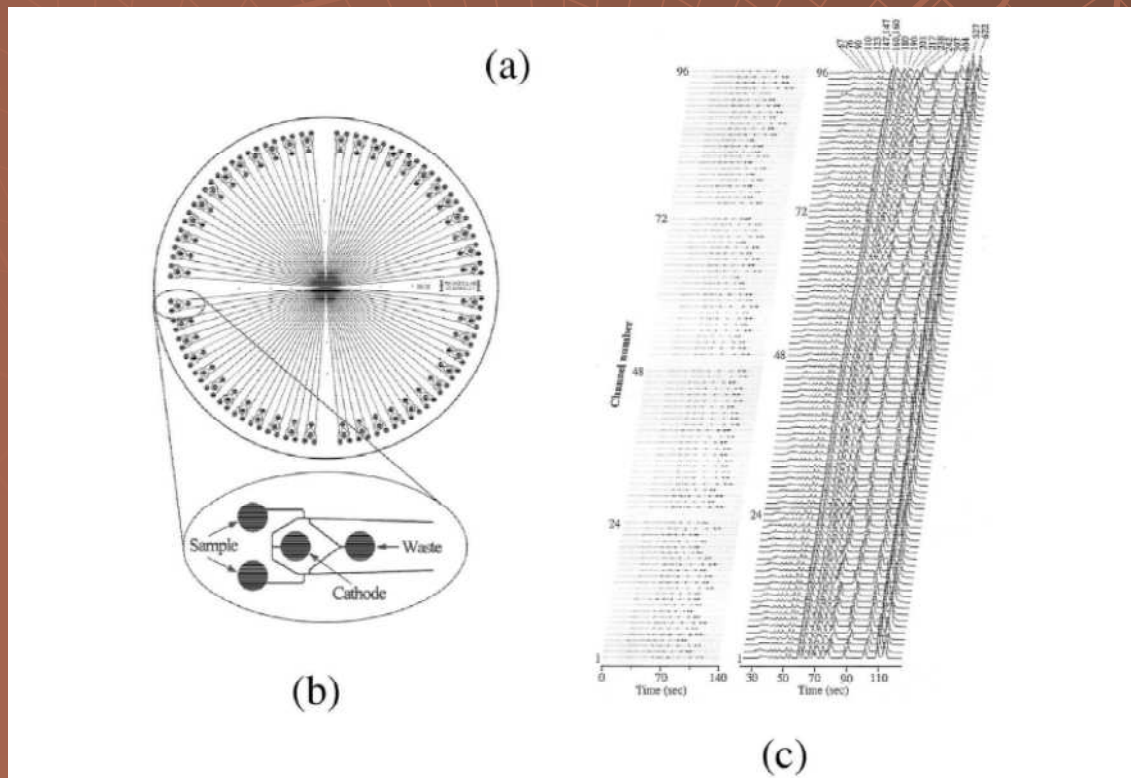
# 2003 - Projekt lidského genomu



# 3730x/ DNA Analyzer Applied Biosystems

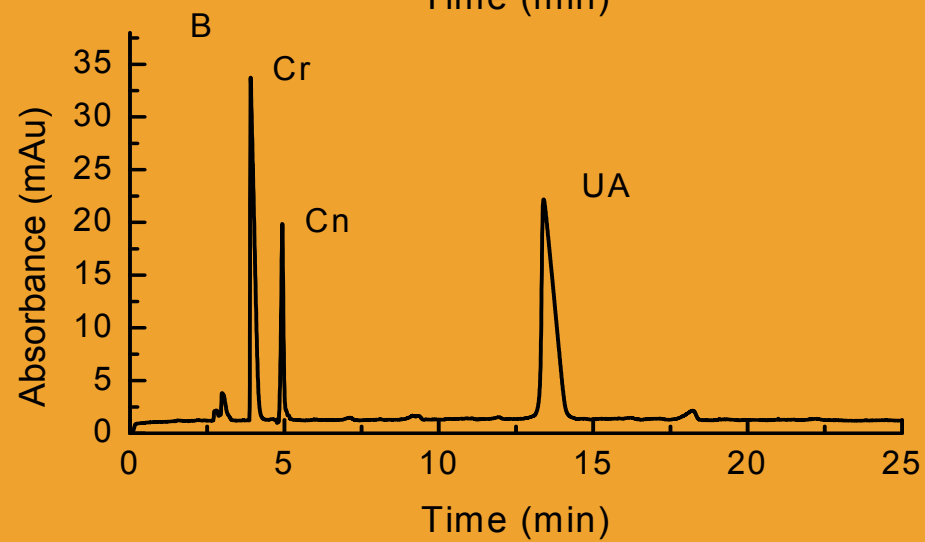
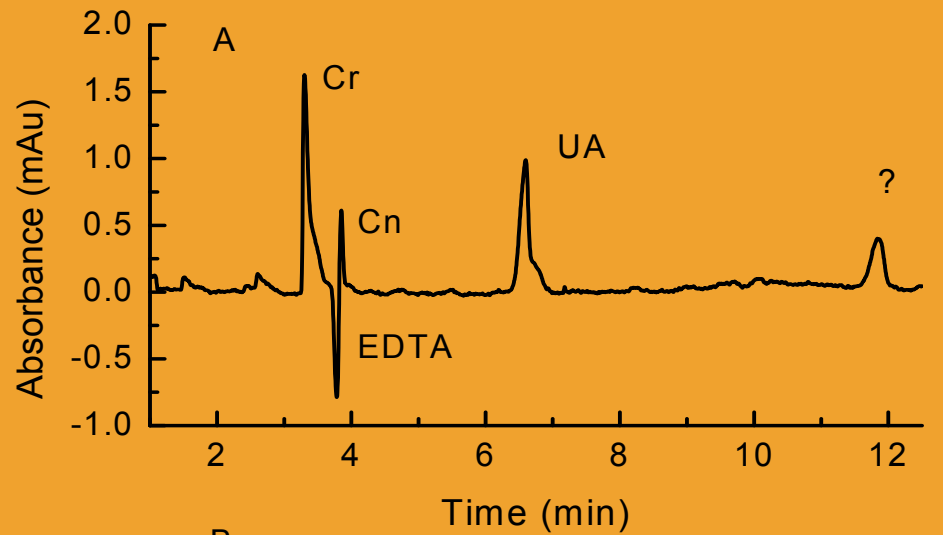


# 1997 $\mu$ CE

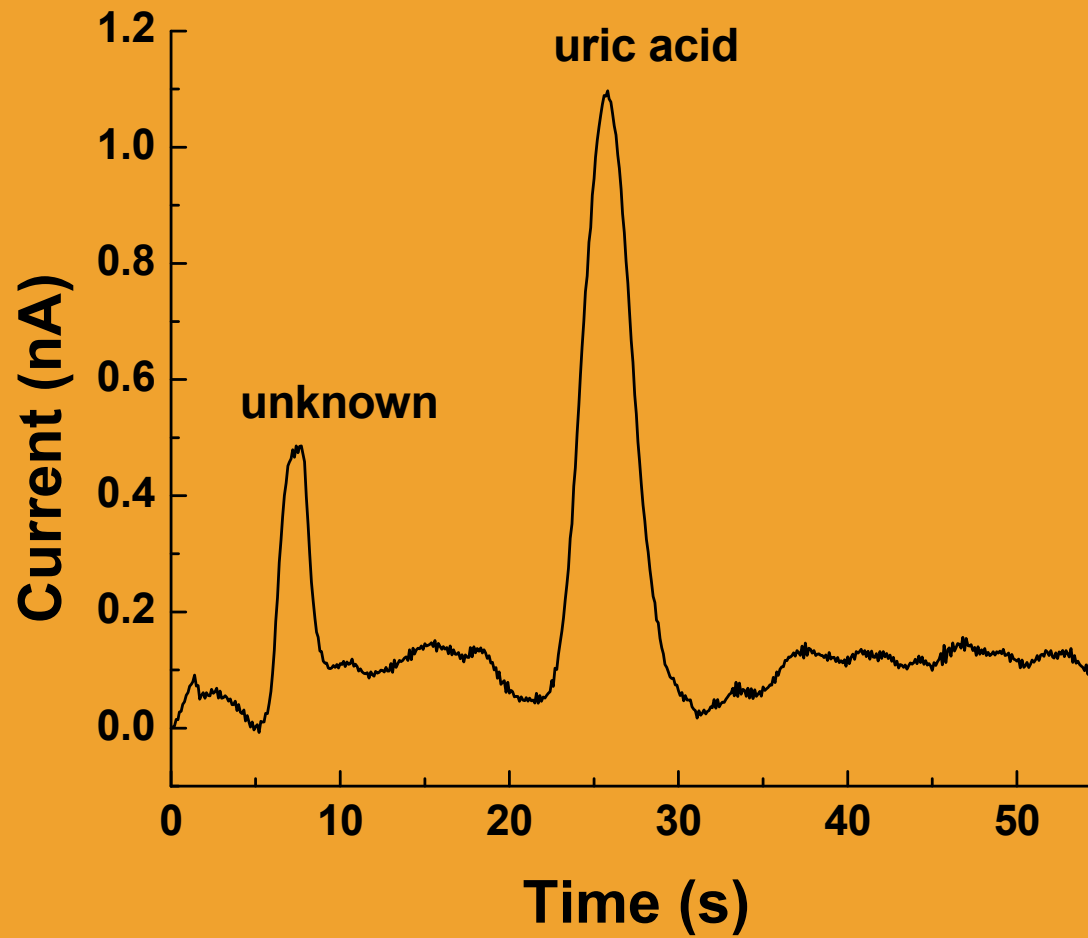




# Klasická CZE



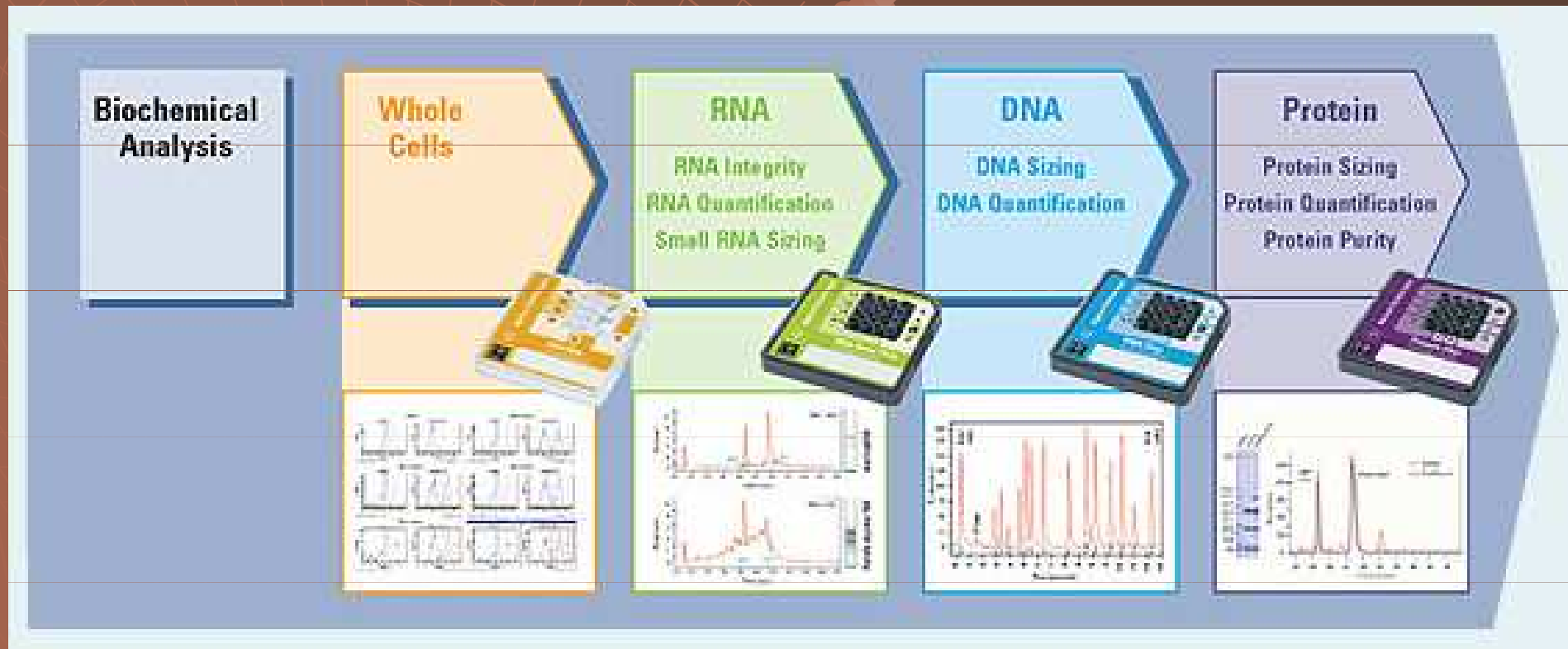
# Microchip CZE



# Bioanalyser Agilent 2100

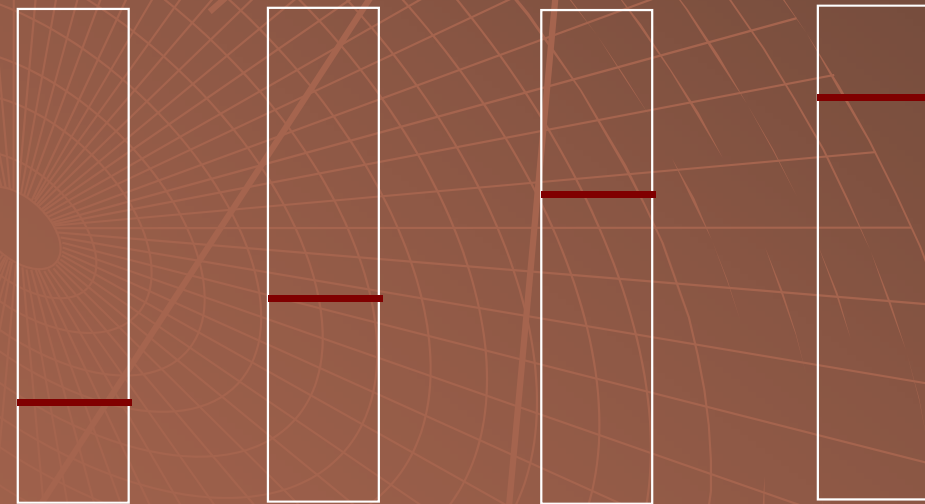


# Bioanalyser Agilent 2100



# 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

<b>Biopolymery</b>	<b>Ligandy</b>
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

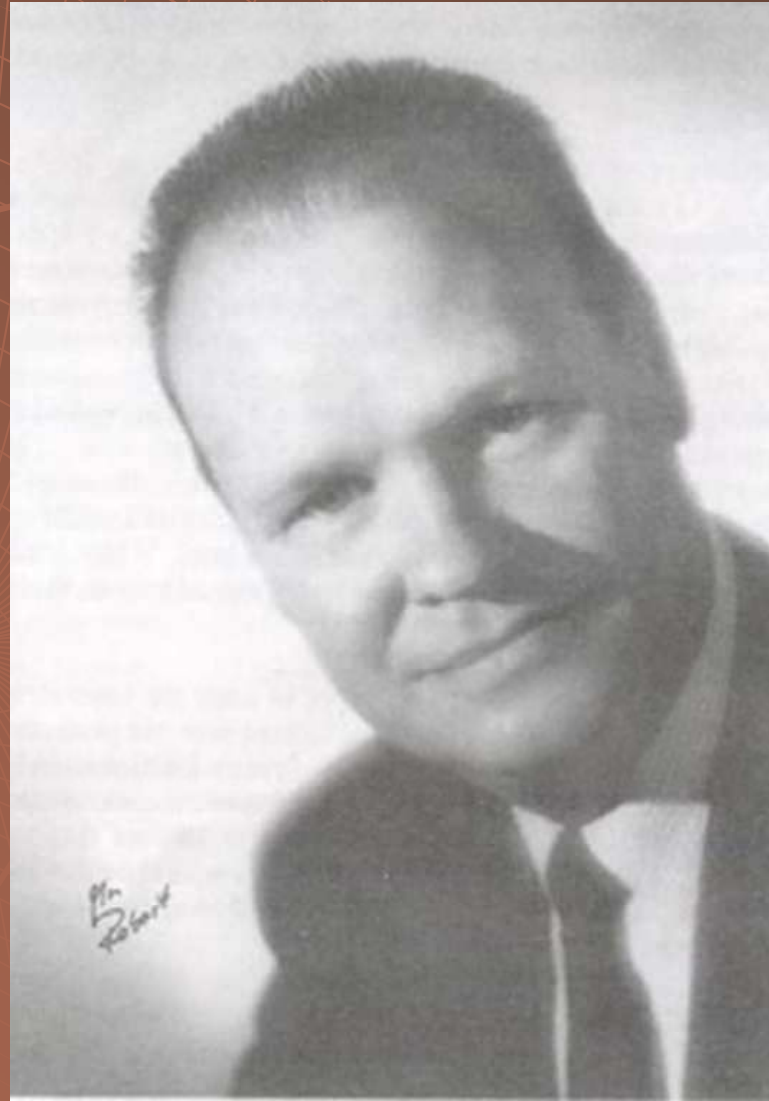
# Izoelektrická fokusace

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



# Izoelektrická fokusace

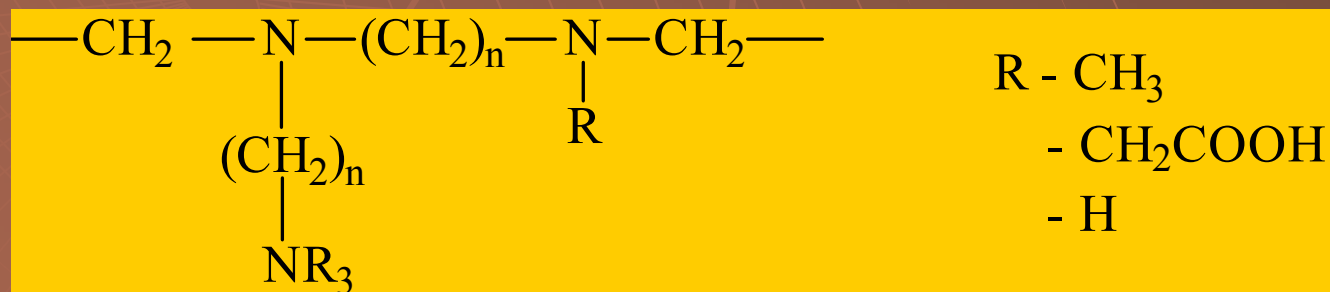
1961 Svensson – Rilbe (1968)



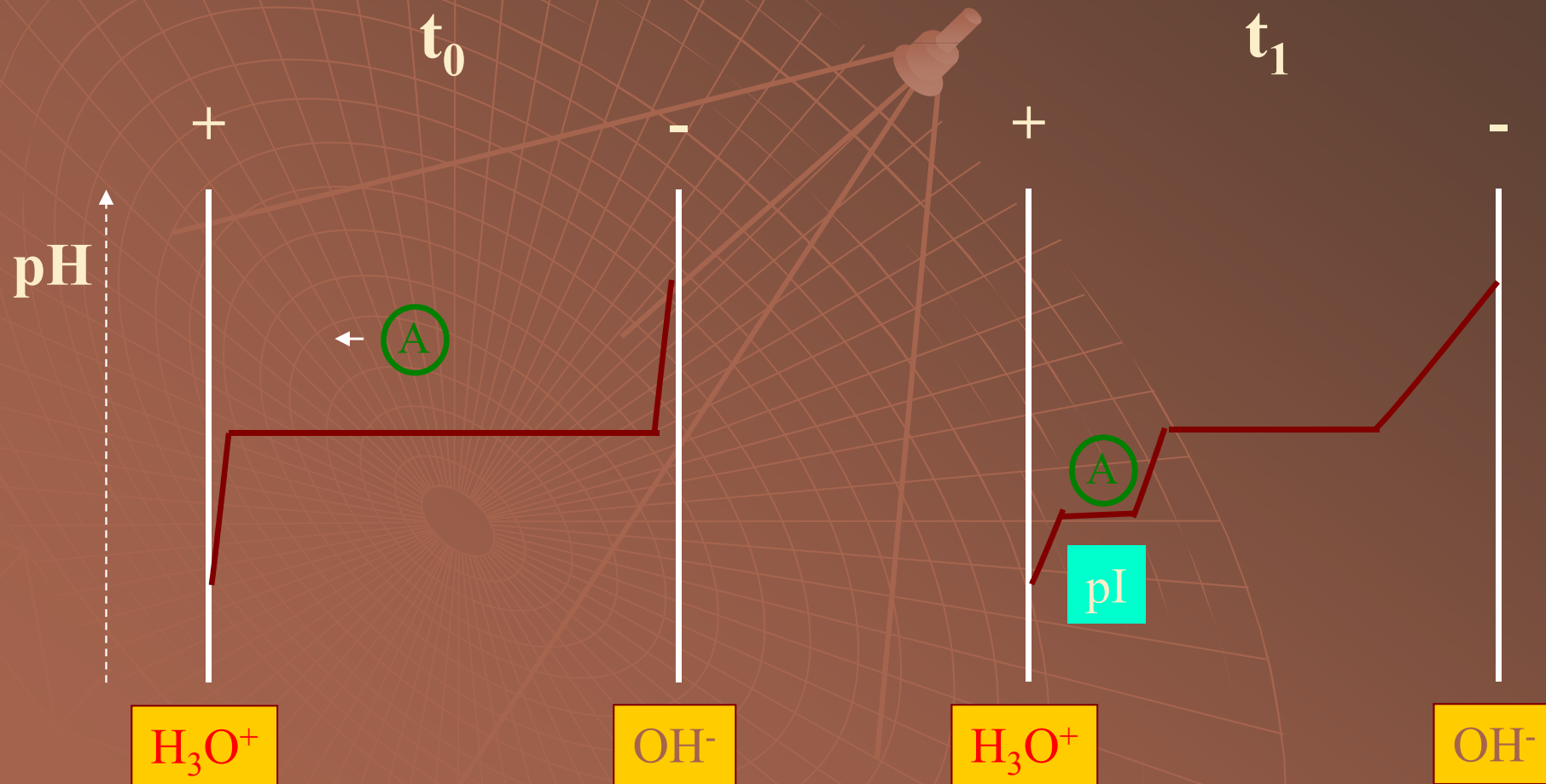
# Tvorba gradientu



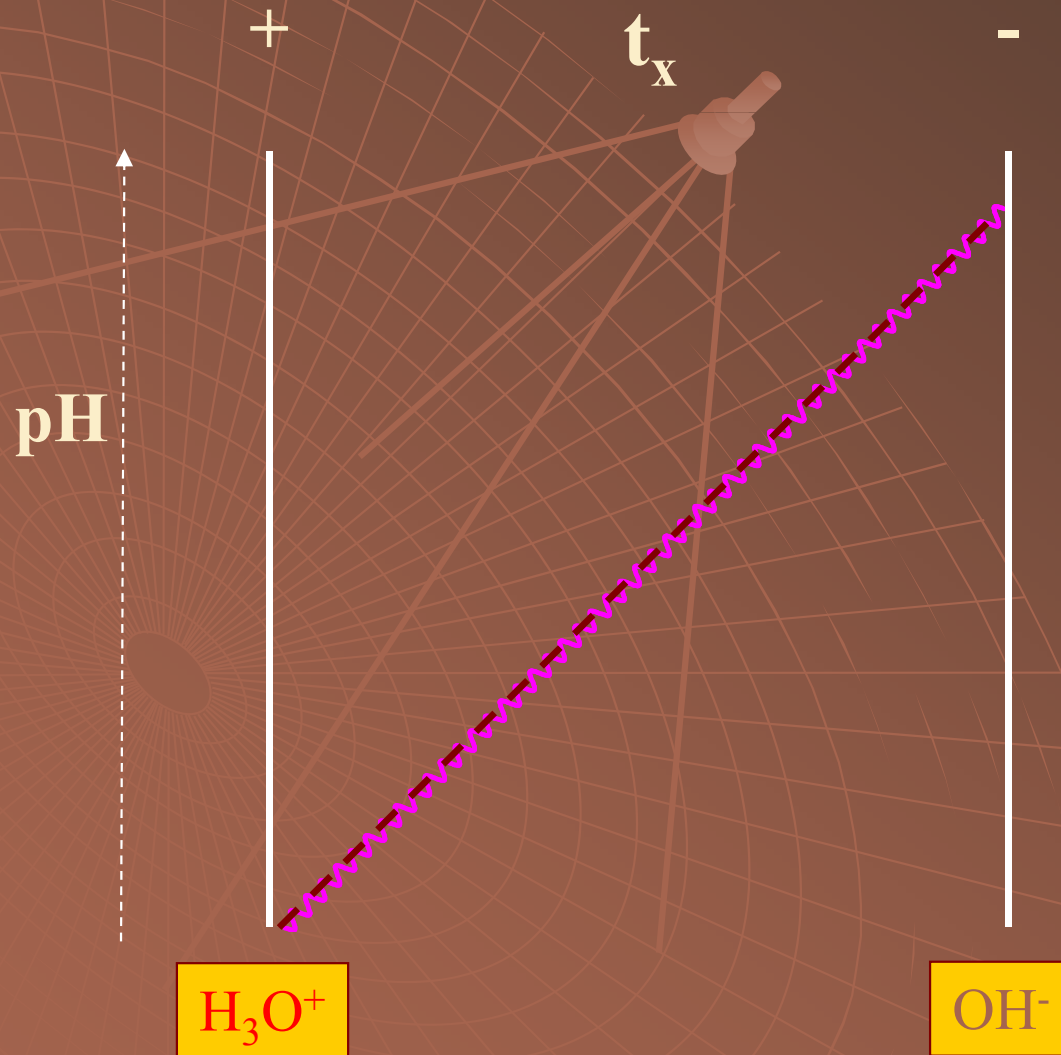
## Ampholyty



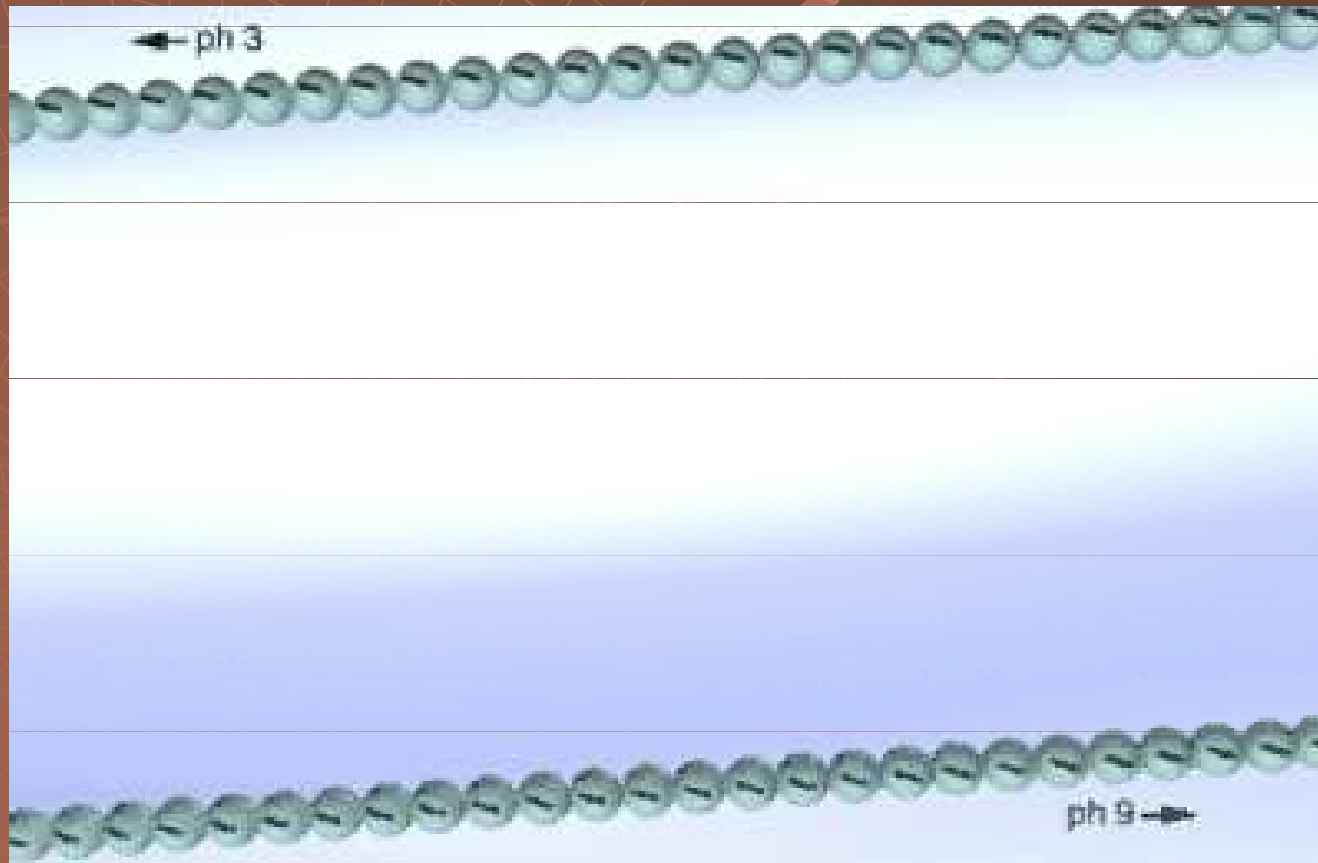
# Izoelektrická fokusace



# Izoelektrická fokusace



# Kapilární izoelektrická fokusace



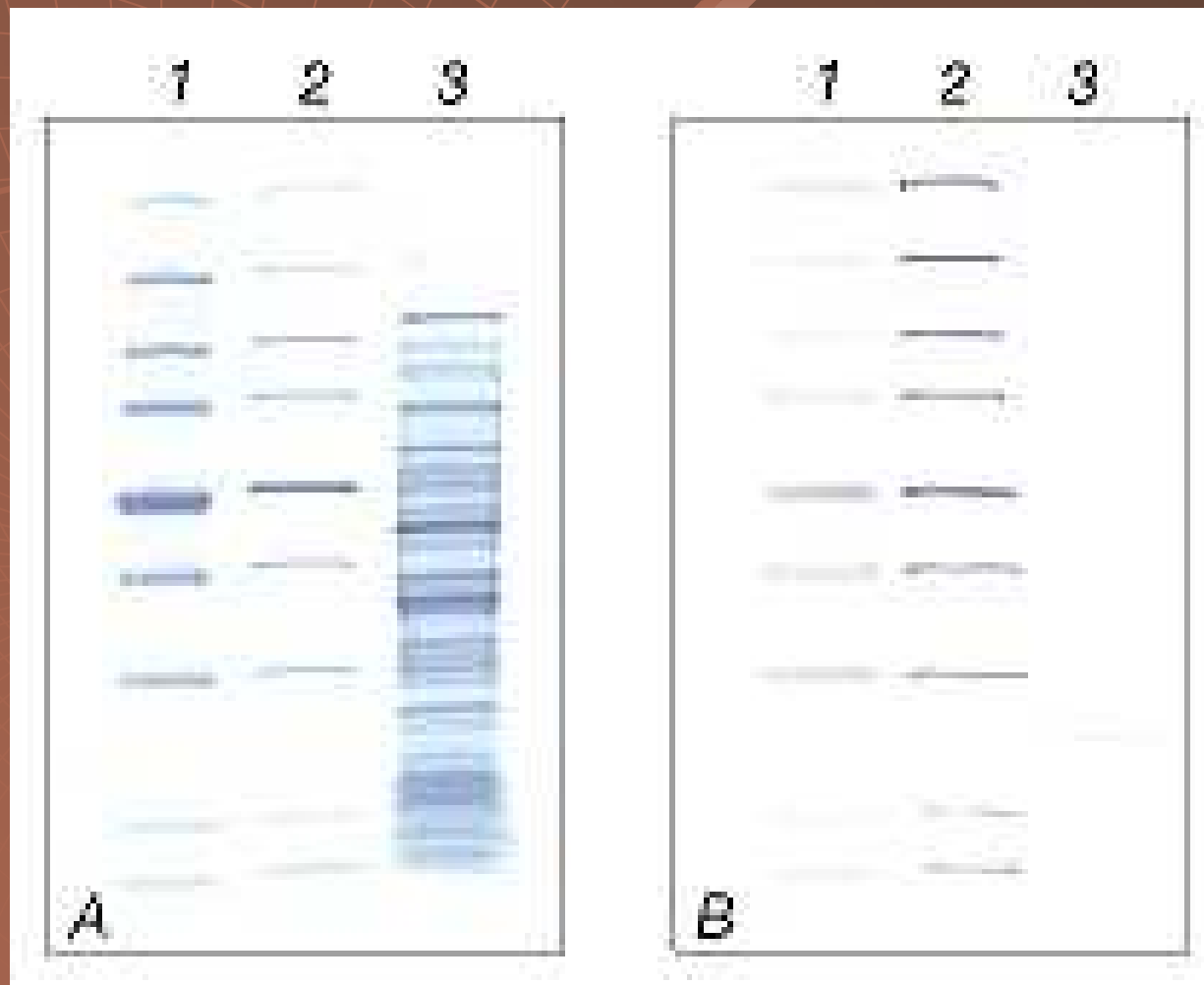
# Izoelektrická fokusace analytická

- ◆ Provedení - v gelech – PAGE, agarosa
- ◆ Použití - sledování komplexních směsí
  - izoenzymové složení
  - stanovení pI – rozřezání a eluce
    - $\mu\text{pH}$  elektrody
    - pI standardy

# Izoelektrická fokusace analytická

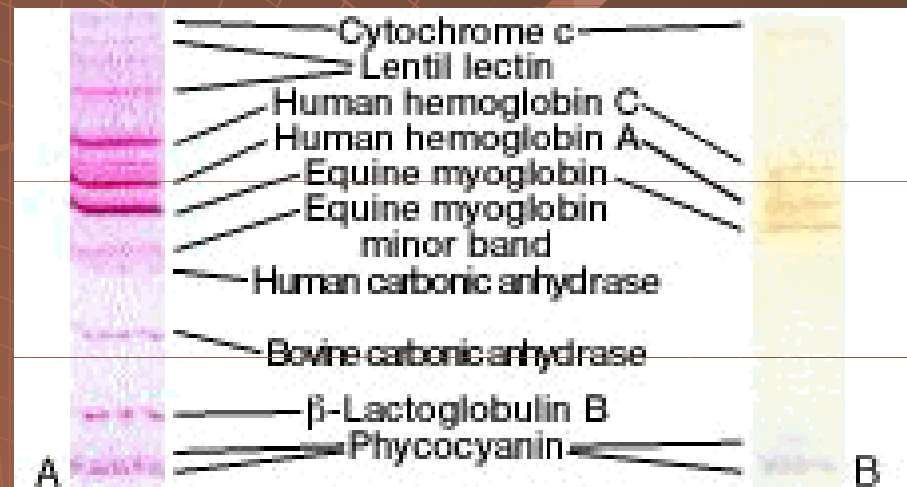


# Izoelektrická fokusace analytická





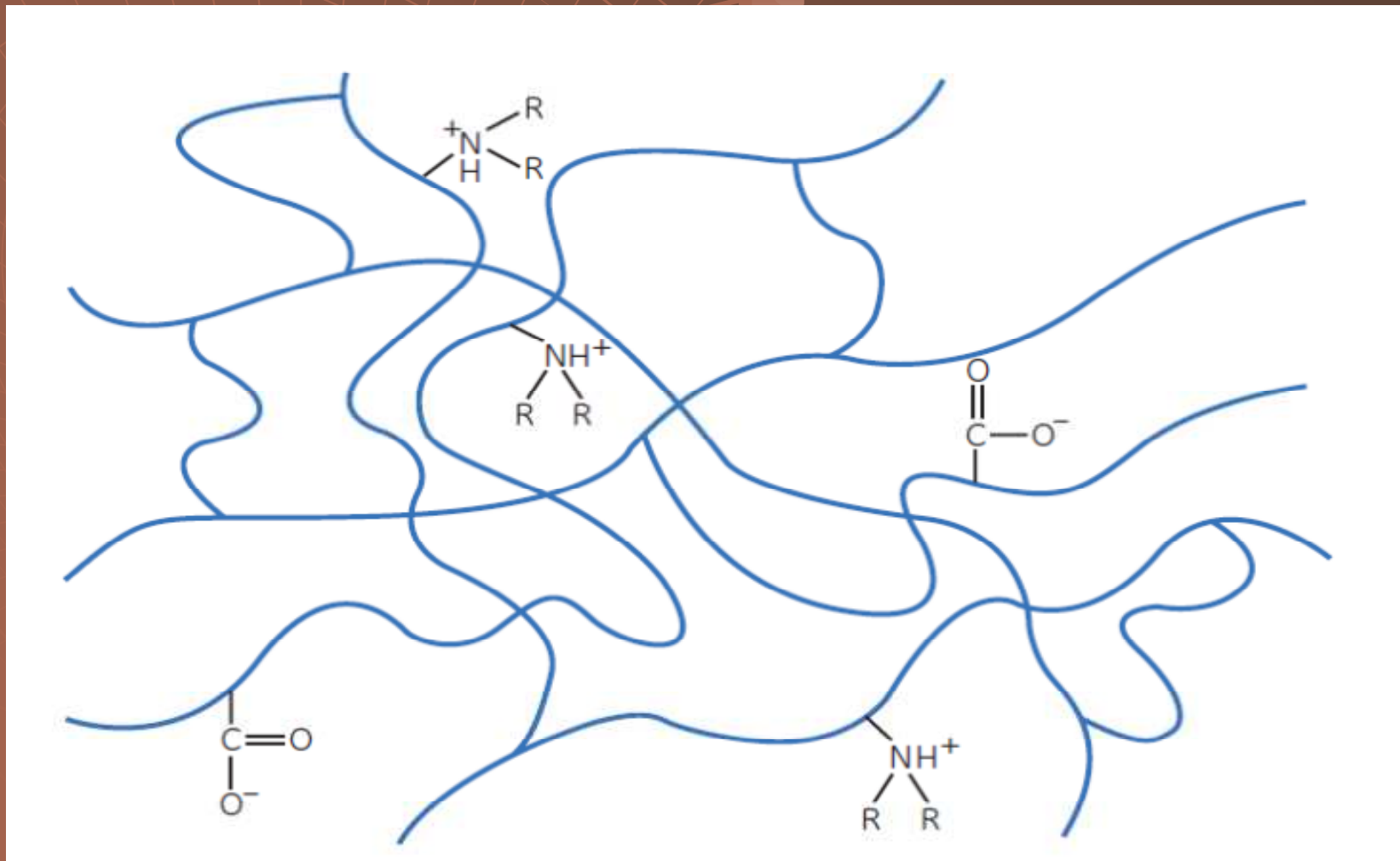
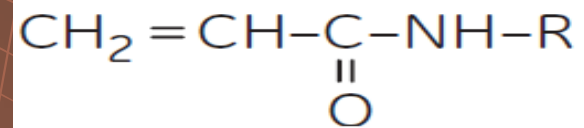
# Izoelektrická fokusace analytická - standardy



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

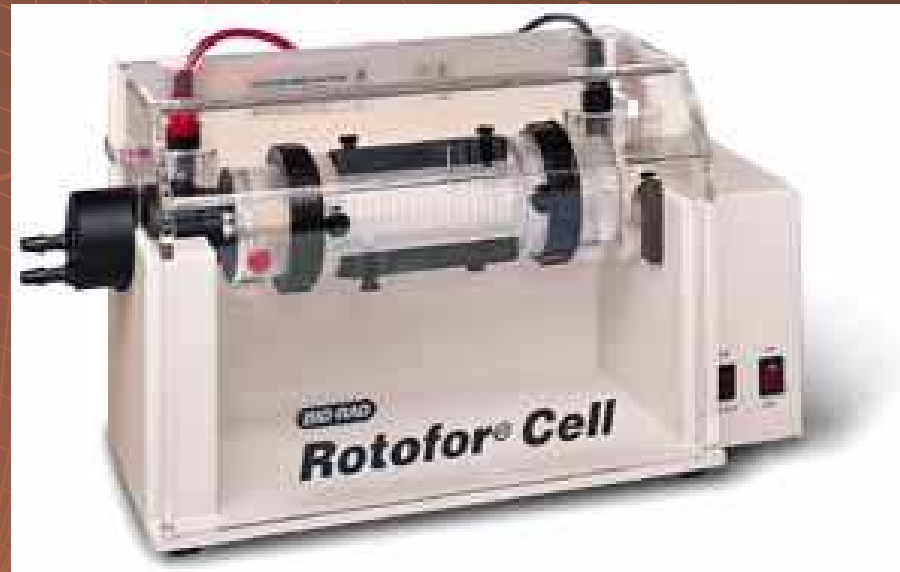
# Izoelektrická fokusace

## Imobiline



# Izoelektrická fokusace preparativní

- ◆ Provedení - rotací – Rotofor (BioRad)



A



B



C



D

# Izoelektrická fokusace preparativní

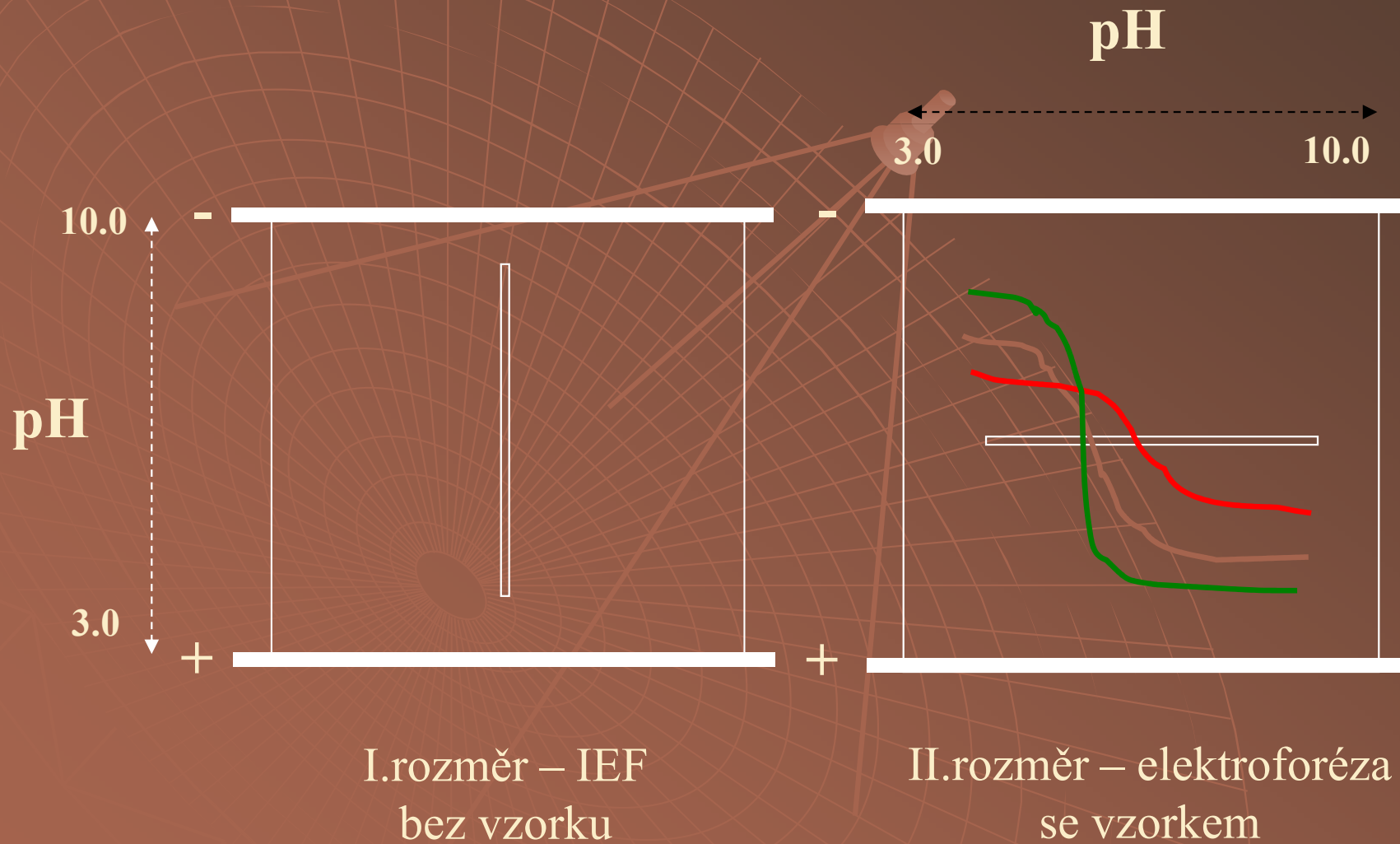
- ◆ Provedení - v sypaných vrstvách (Sephadex)
  - v gradientech hustoty (sacharoza)

Použití – izolace bílkovin

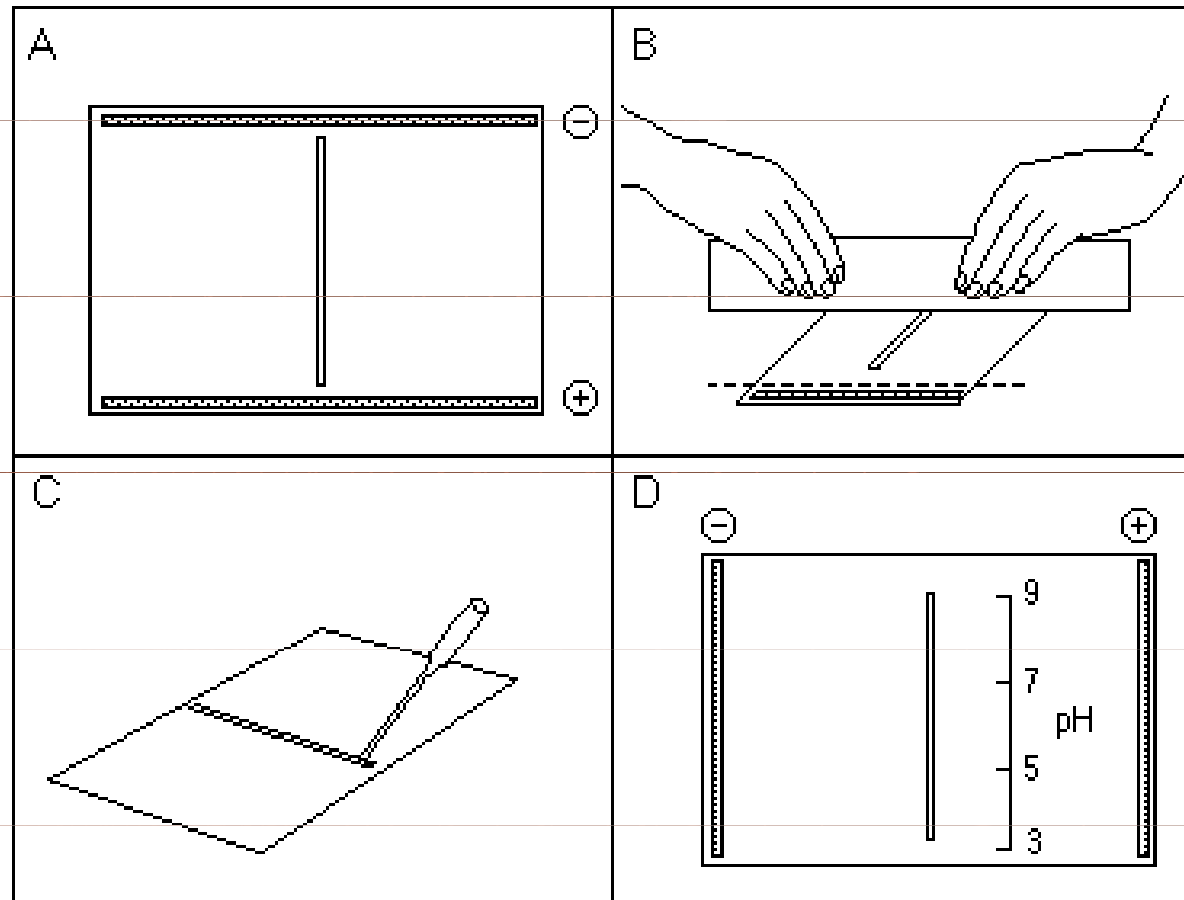
# Dvourozměrné metody

- ◆ Metoda titračních křivek
- ◆ Dvourozměrná elektroforéza

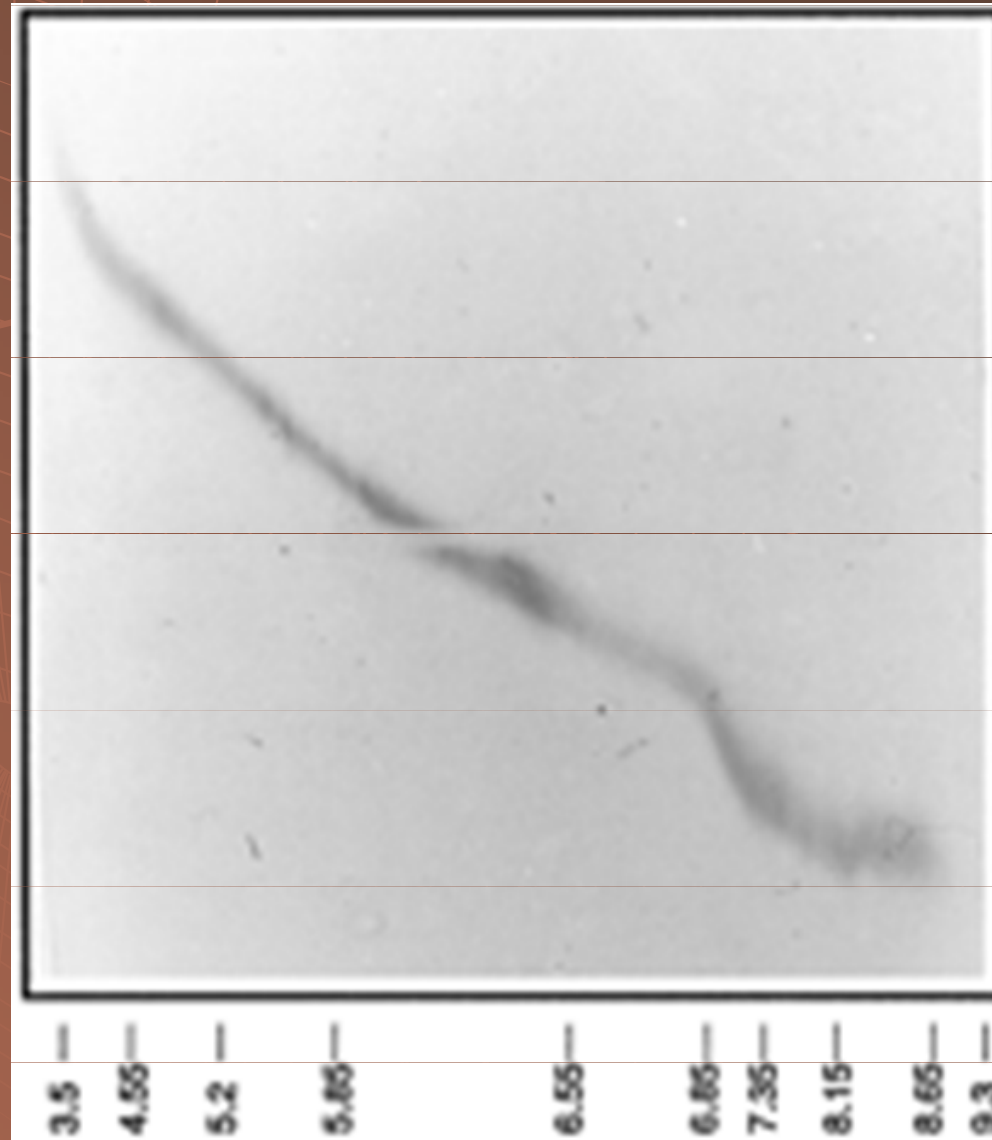
# Metoda titračních křivek



# Metoda titračních křivek

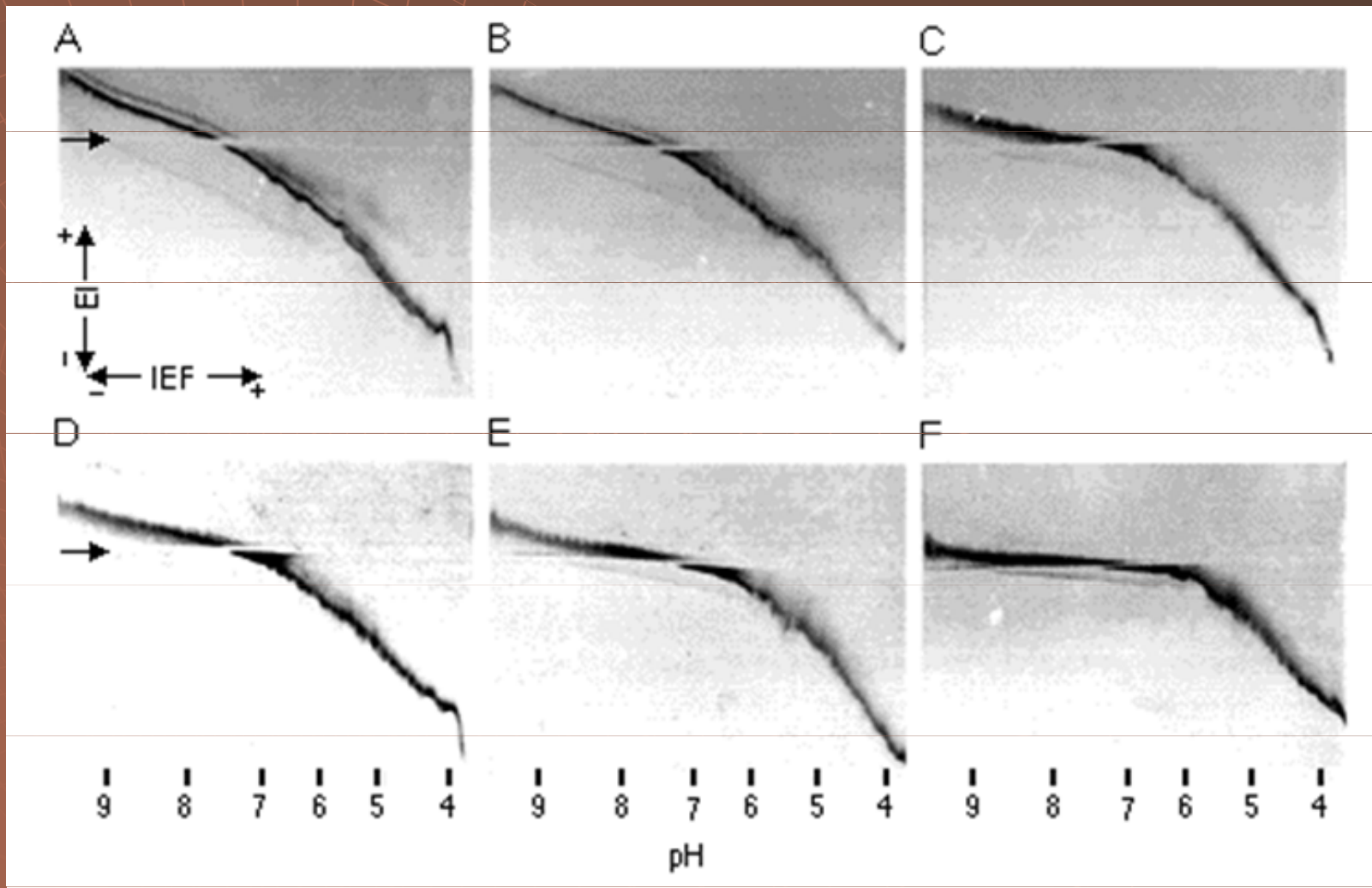


# Metoda titračních křivek

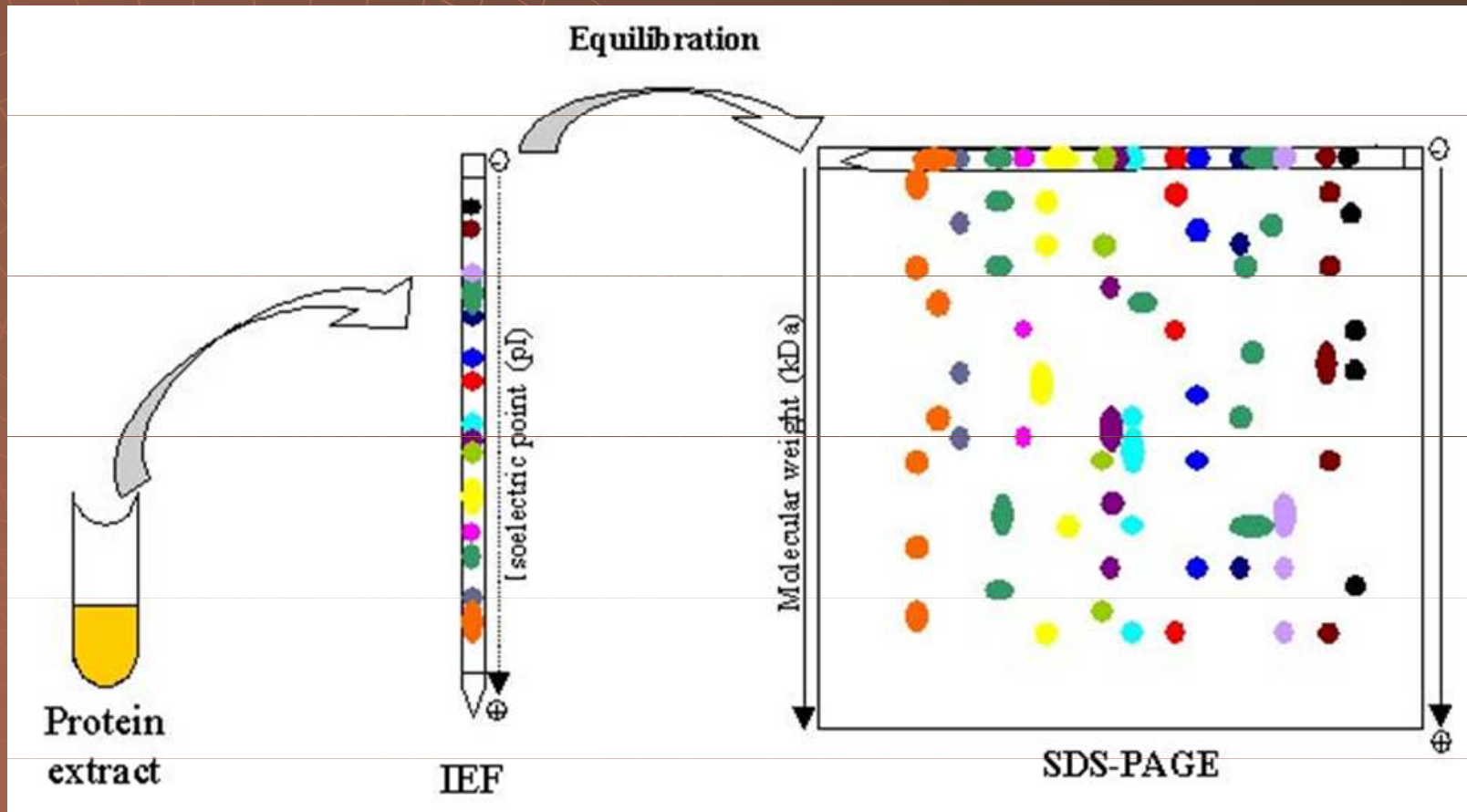




# Metoda titračních křivek

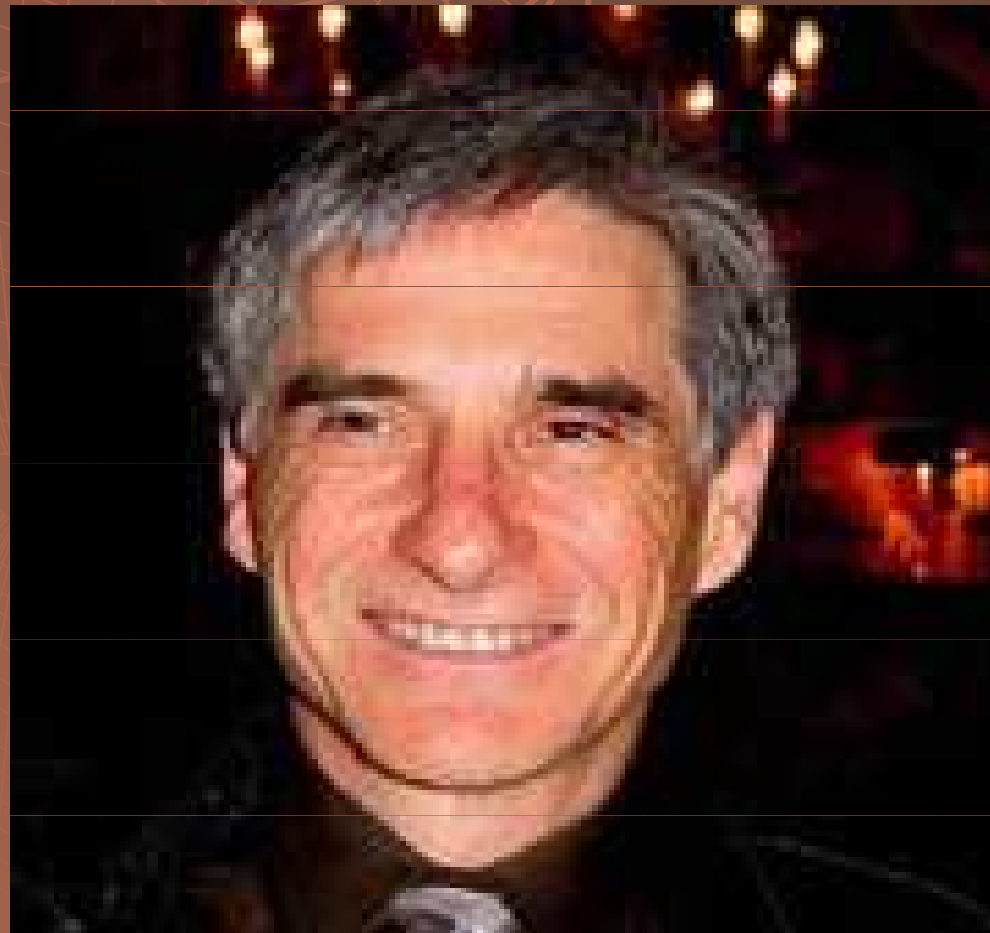


# Dvojměrná elektroforéza

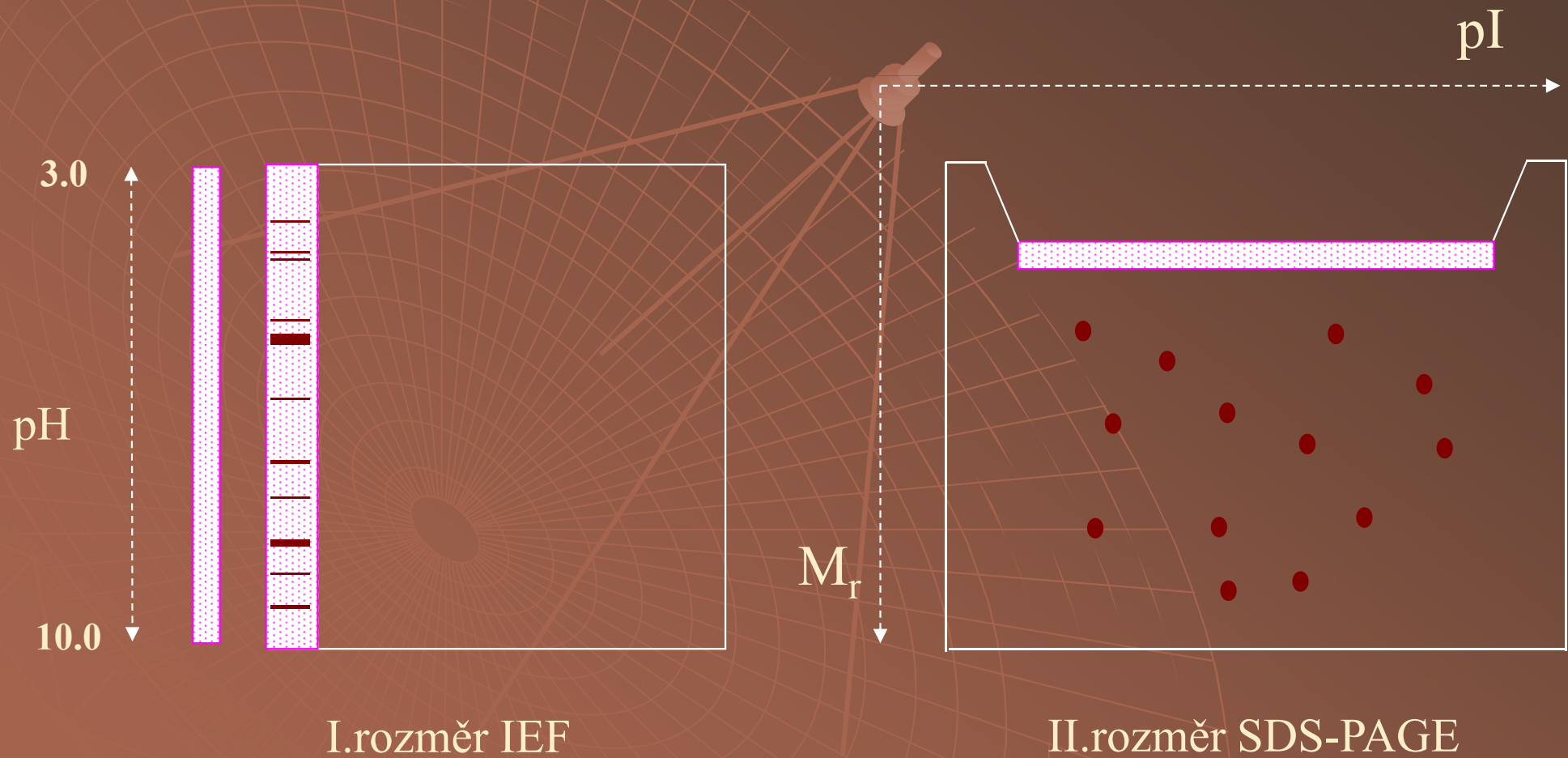


# Dvojměrná elektroforéza

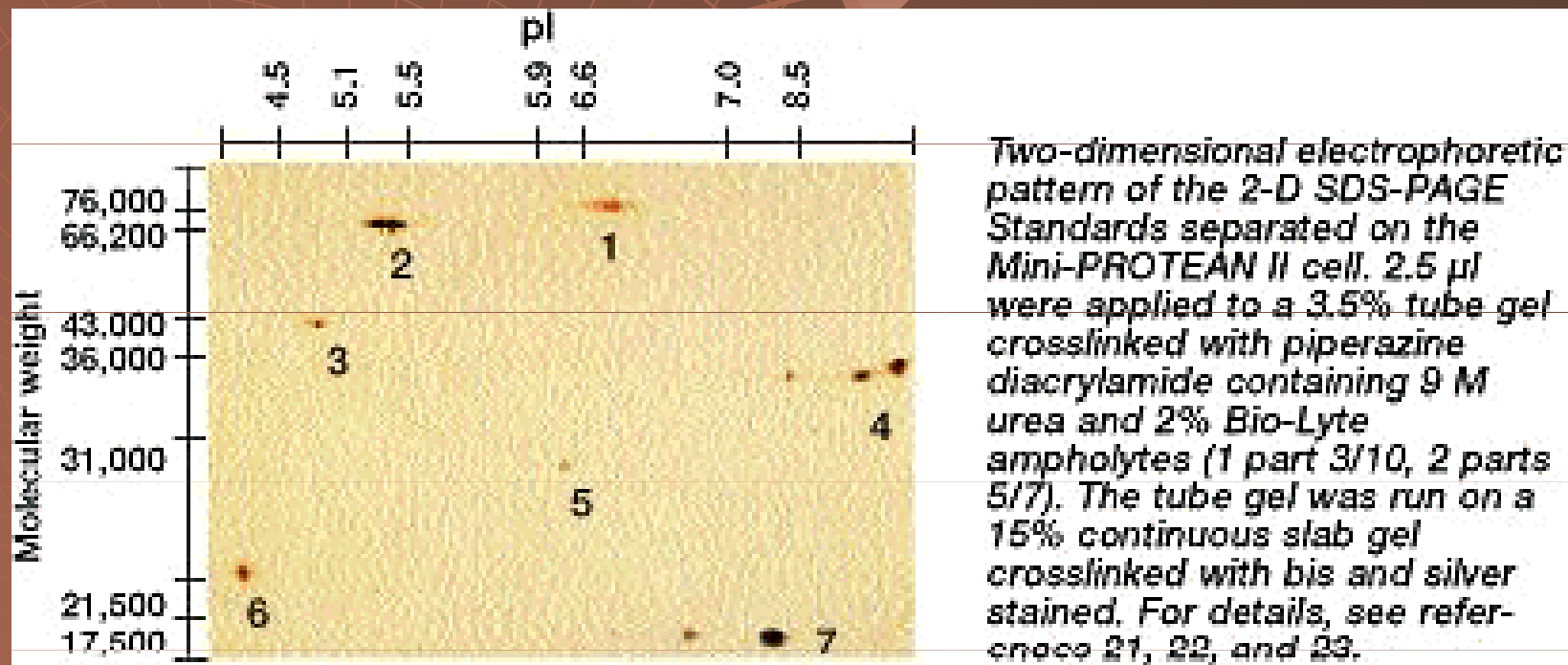
1975 O'Farrell



# Dvojrozměrná elektroforéza



# Dvojměrná elektroforéza



# Dvojměrná elektroforéza



Compugen Z3 DeskTop v.1.11.Beta

File Edit Image Spots Align View Analysis Window Log Help

[1st] 2small [2nd] 1small

Layered View: 2small vs. 1small

Matching Data Table

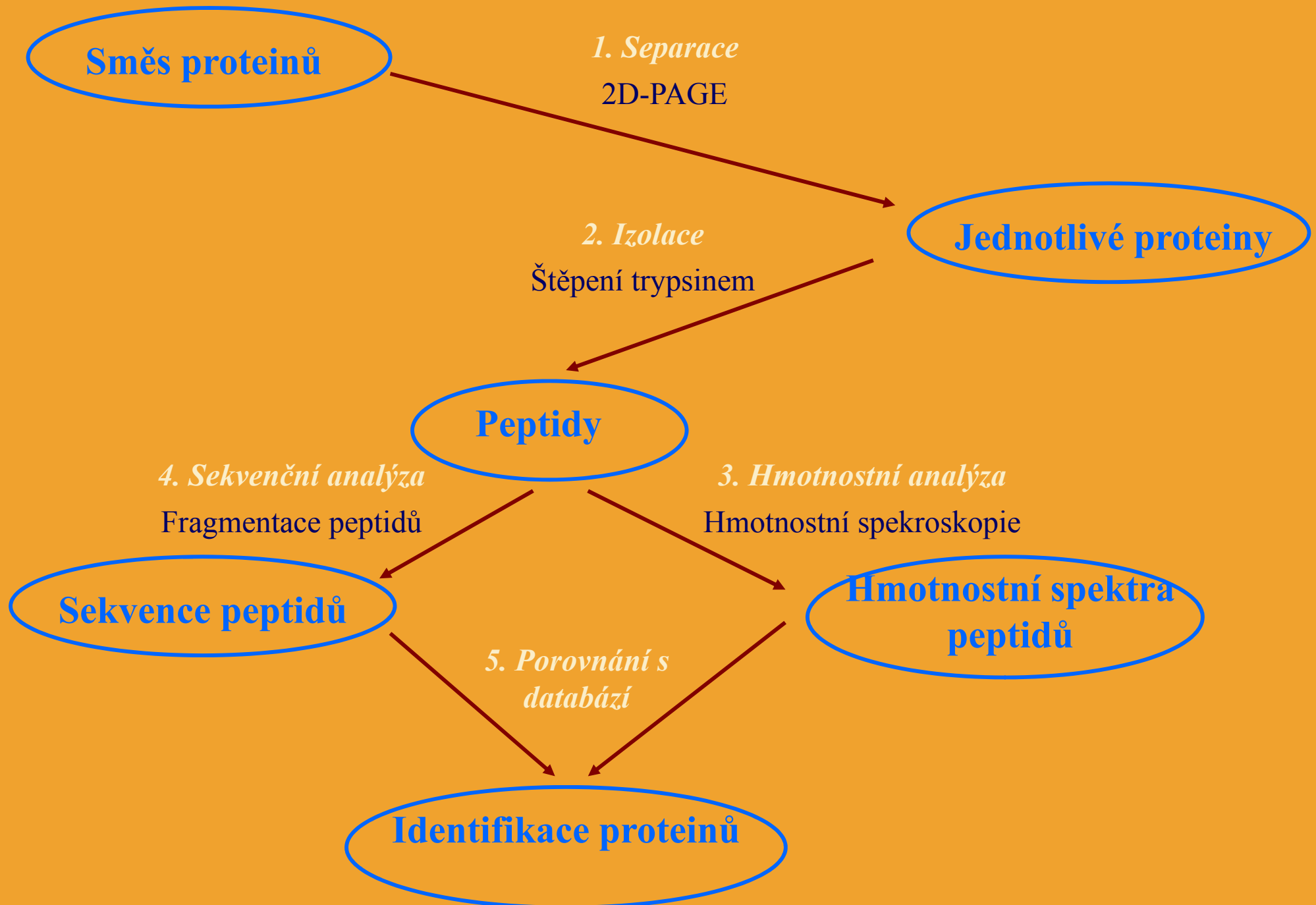
The gels in the table are enumerated as follows:

1. 2small
2. 1small

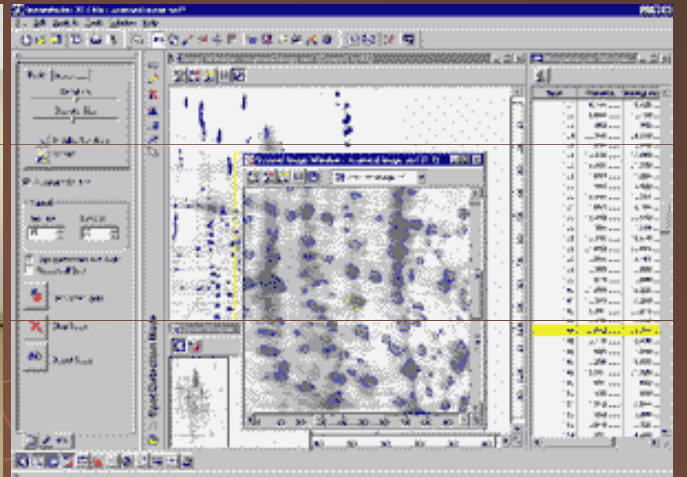
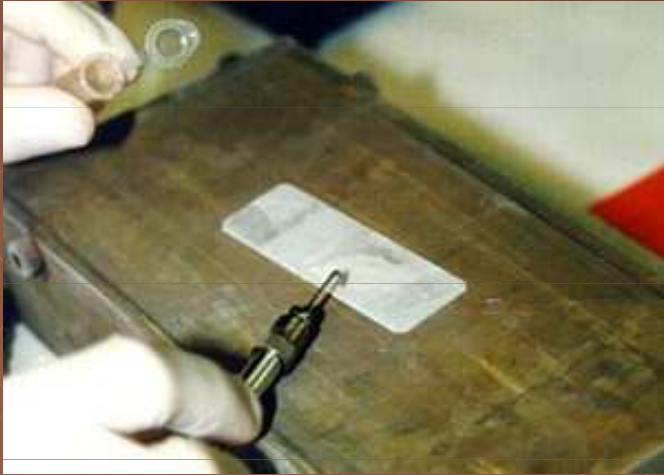
ID	X1	Y1	RE1	X2	Y2	RE2	std	baseline
1016	346	39	6031	337	43	11053	2511.0	0.508
1022	255	45	3712	250	51	3745	16.5	0.009
1023	242	48	2206	237	53	2921	357.5	0.279
1024	119	49	584	125	53	1076	246.0	0.593
1025	100	50	3290	108	54	4738	724.0	0.361
1027	183	50	2104	183	53	3515	705.5	0.502
1029				35	52	1150		
1030	221	52	5409	217	56	4496	456.5	-0.184
1032				264	52	4886		
1033				275	52	1422		
1034	147	53	3078	151	59	1281	898.5	-0.625
1038	290	56	1992					
1040				35	57	1006		

[142, 129] -> [1st: 127 2nd: 184]

# Základní schéma analýzy užívané v proteomice





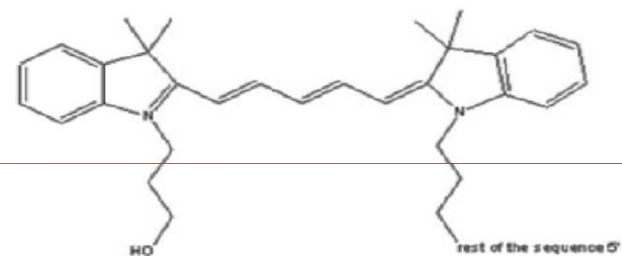
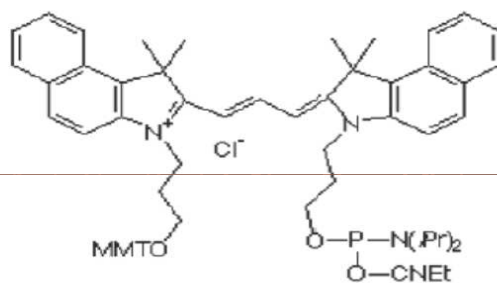


## DIGE – DIFERENČNÍ GELOVÁ ELEKTROFORESA

Cy2

Cy3

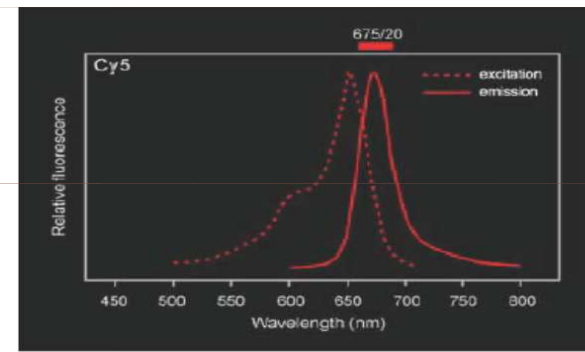
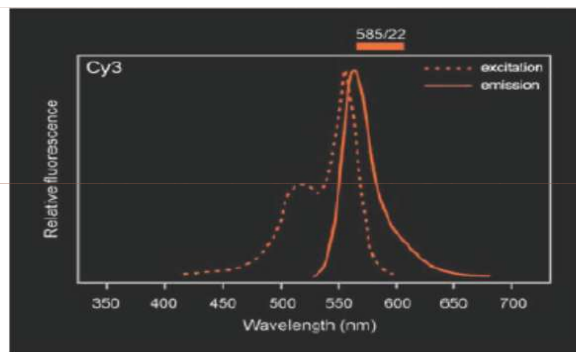
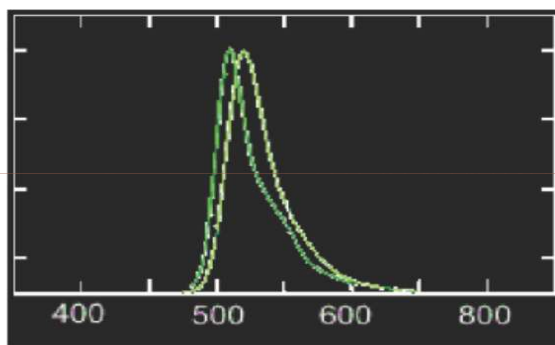
Cy5



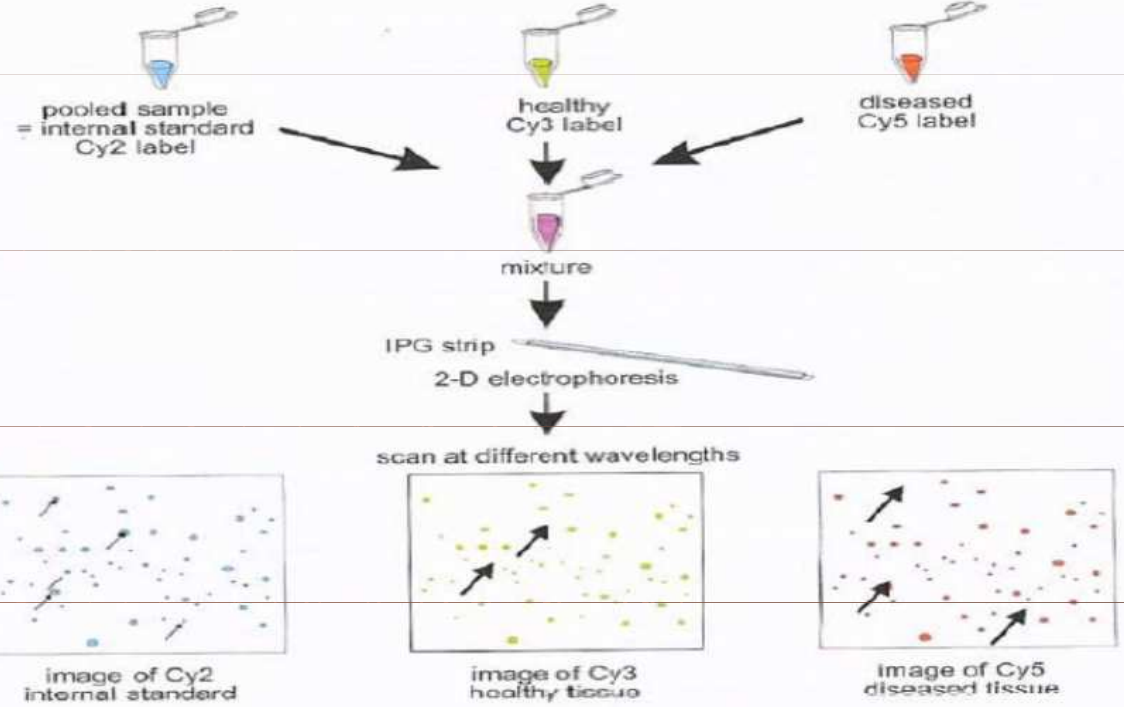
excitace 488 nm  
emise 520 nm

excitace 532 nm  
emise 580 nm

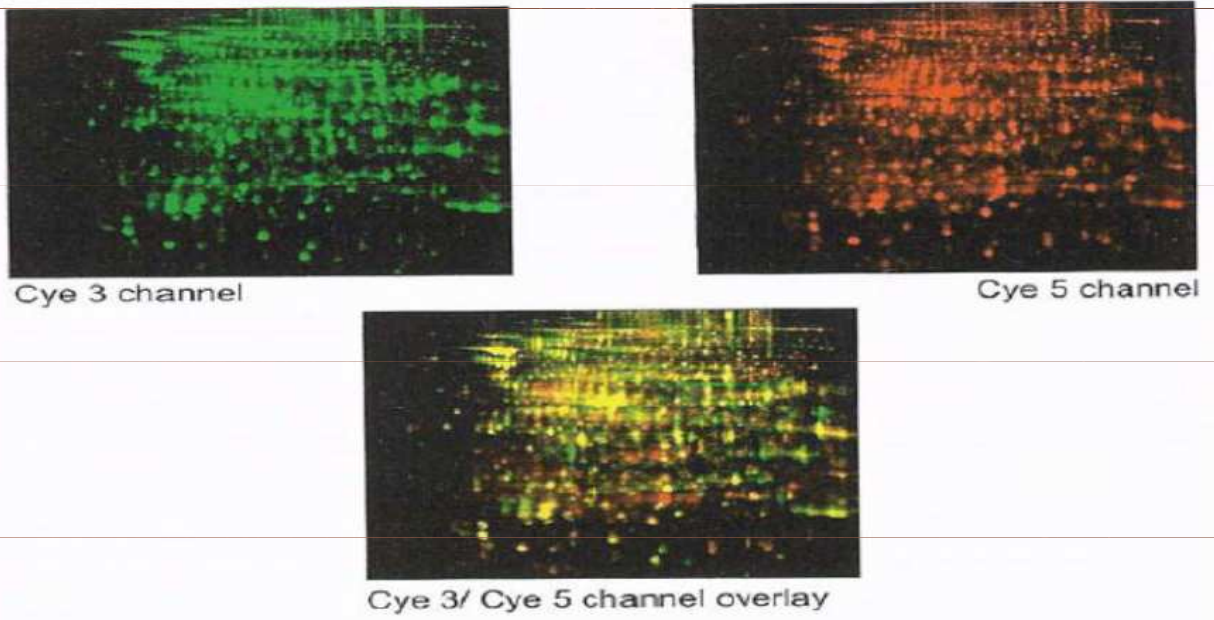
excitace 633 nm  
emise 670 nm



**A**



**B**



# Izotachoforéza

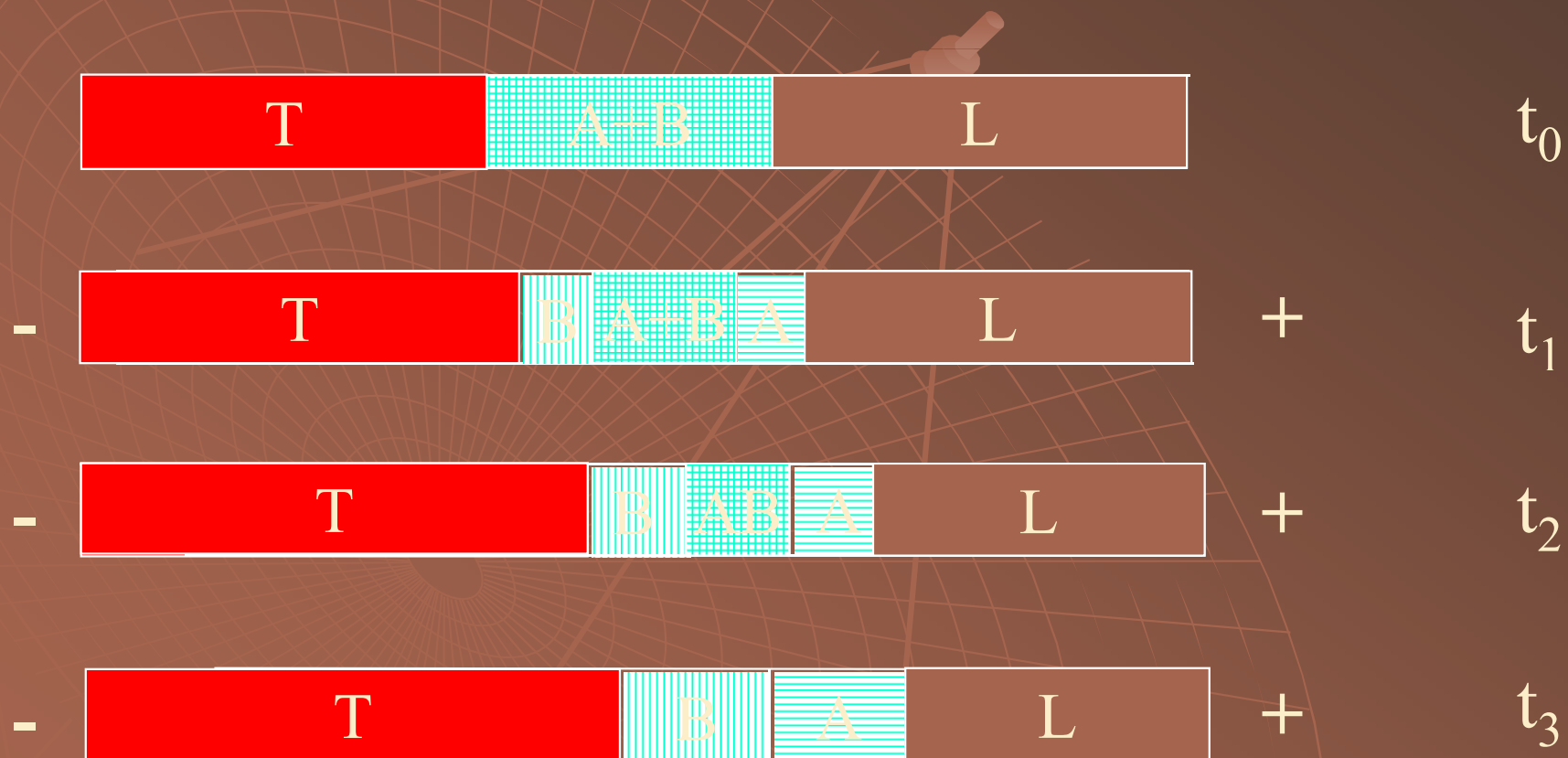
*„Vzorek je umístěn mezi dva elektrolyty : vedoucí L (leading) s nejvyšší mobilitou a - uzavírající T (terminating) s nejmenší mobilitou“*

# Izotachoforéza

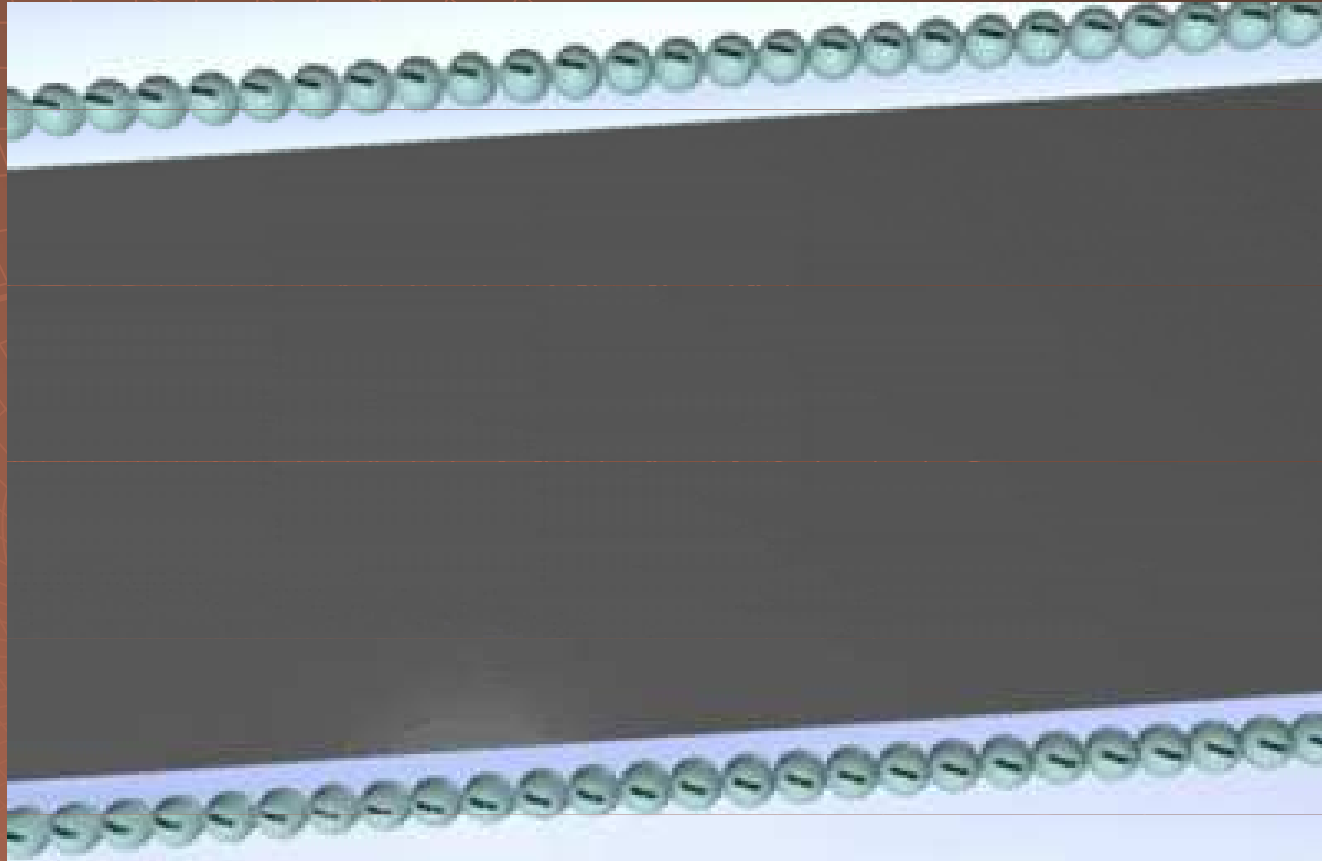
1976 Everaerts



# Izotachoforéza



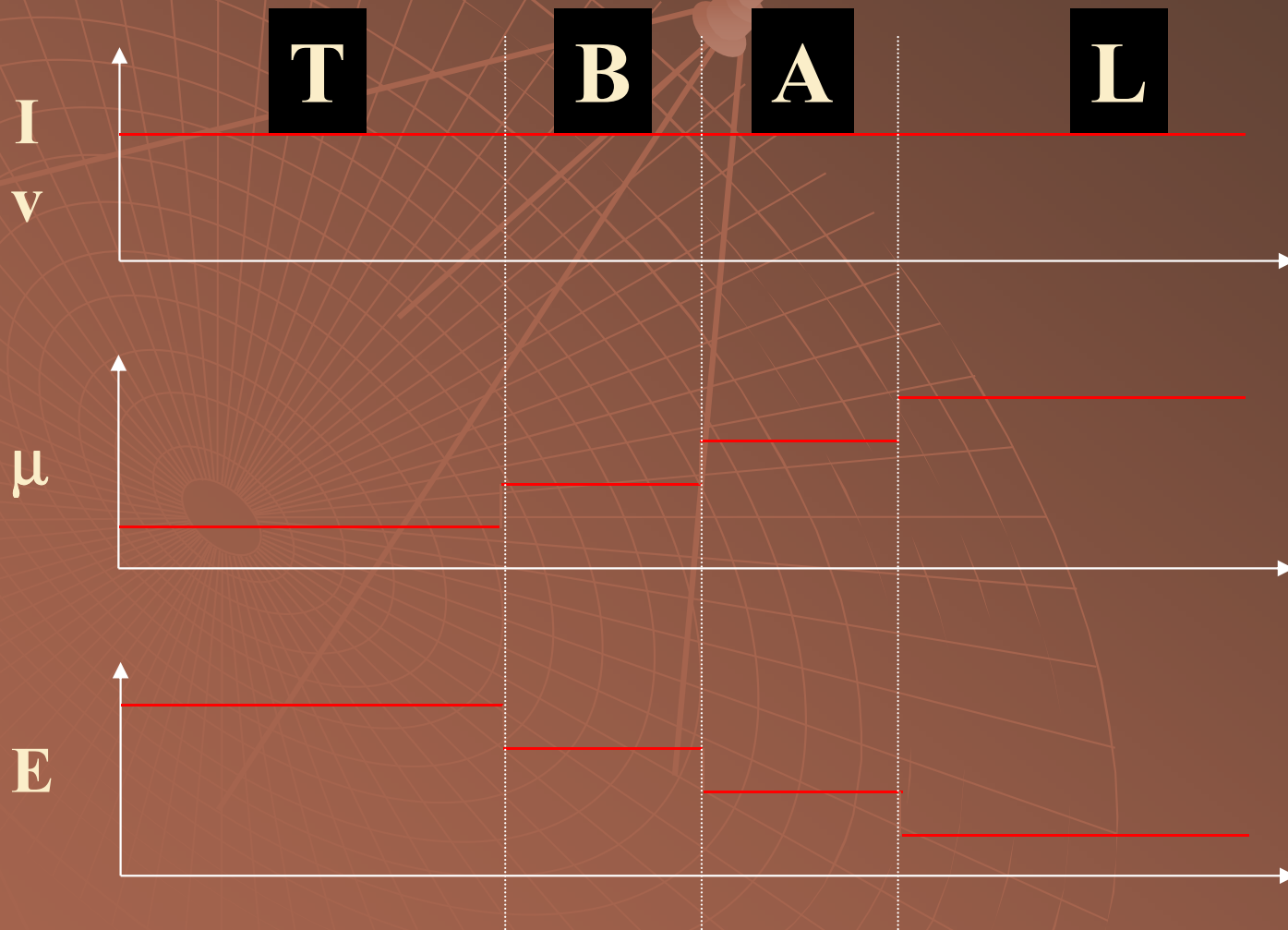
# Izotachoforéza



# Izotachoforéza

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

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



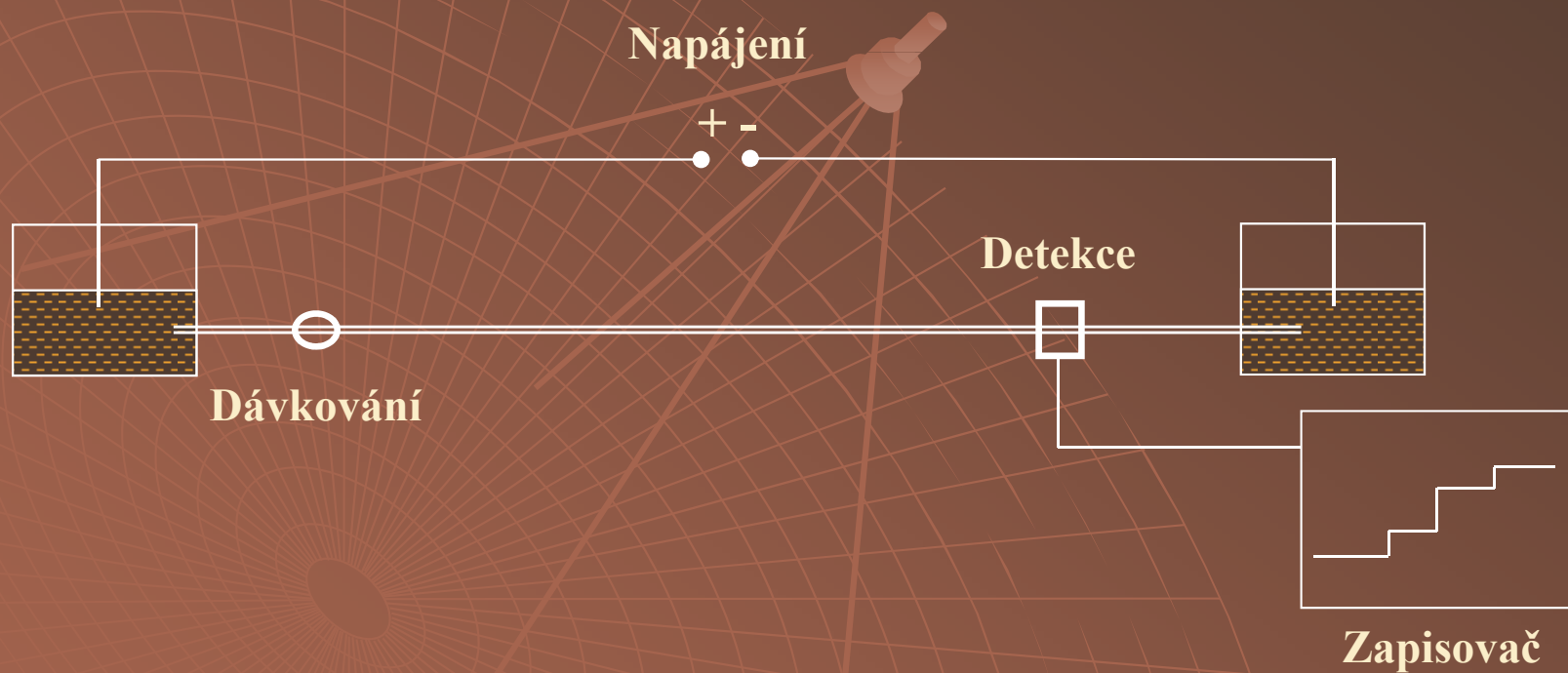


# Kohlrauschova regulační funkce

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

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

# Analytická ITP



# Analytická ITP instrumentace

- ◆ Napájení - stejnosměrné 3 kV 0,2 – 0,5 mA
- ◆ Kapilára 0,1 – 2 mm
- ◆ Dávkování - dávkovací ventil
- ◆ Detekce - universální – konduktometrická  
– potencialně gradientová  
- selektivní – UV-VIS

# Analytická ITP

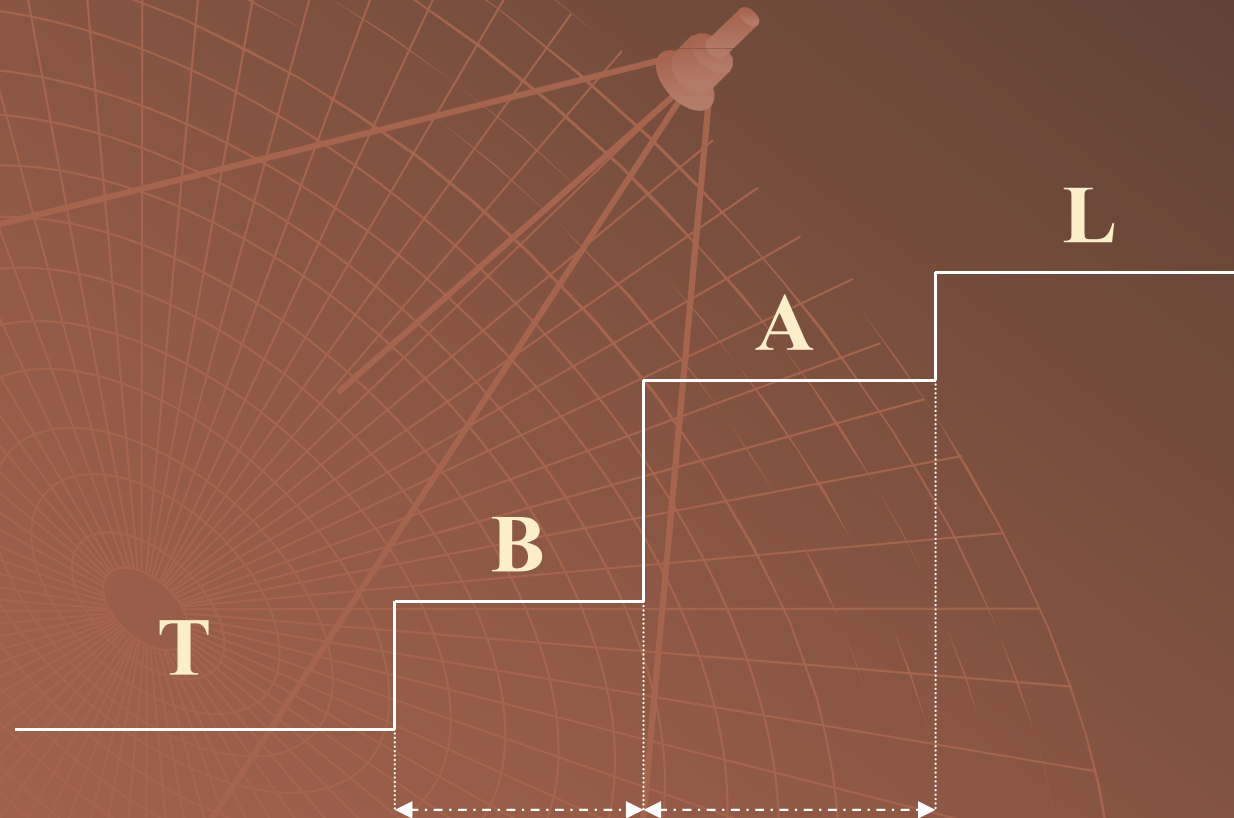
## Metoda spojování kapilár



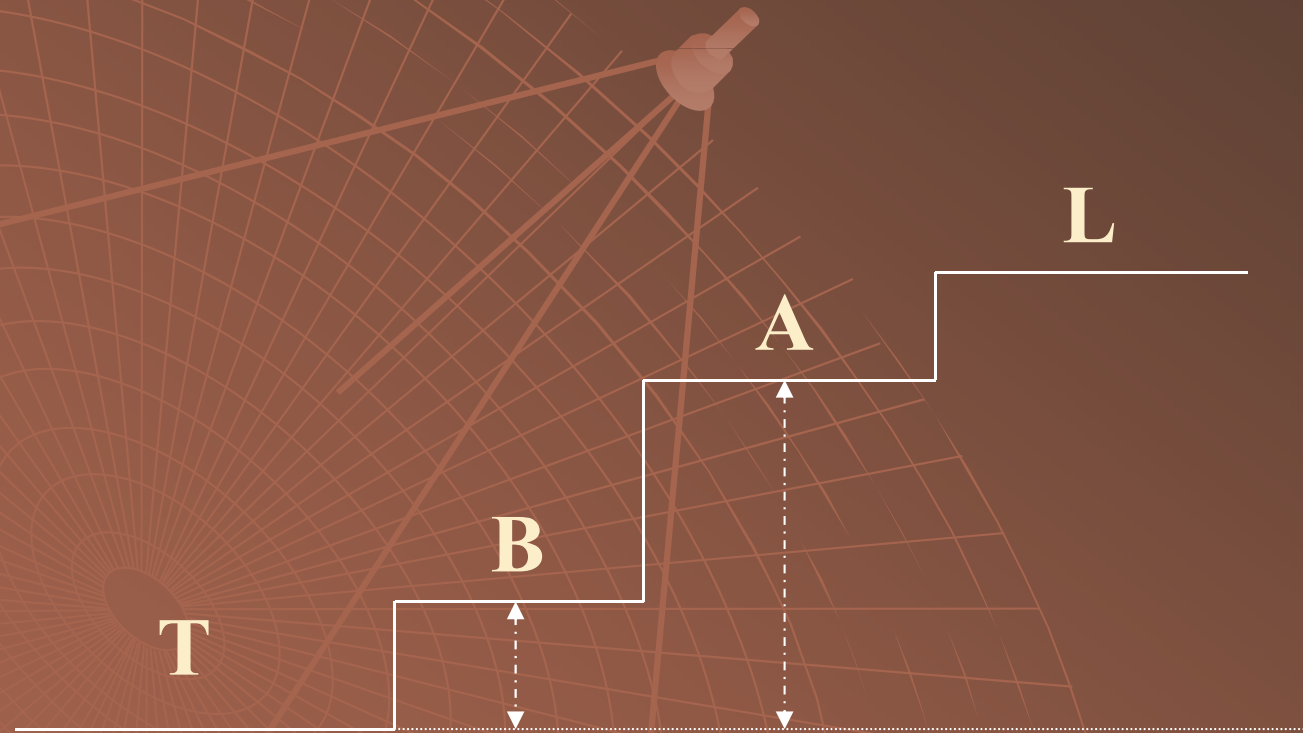
# Analytická ITP Villa Labeco



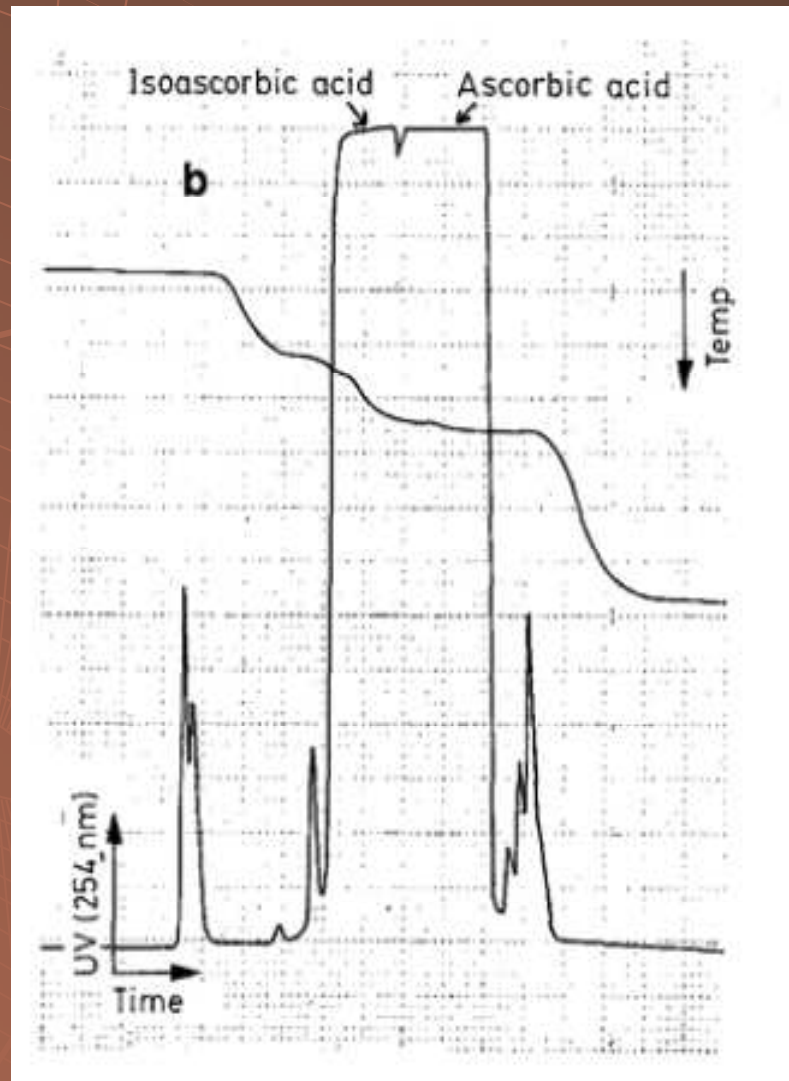
# Izotachoforetický záznam kvantita



# Izotachoforetický záznam kvalita



# Izotachoforetický záznam





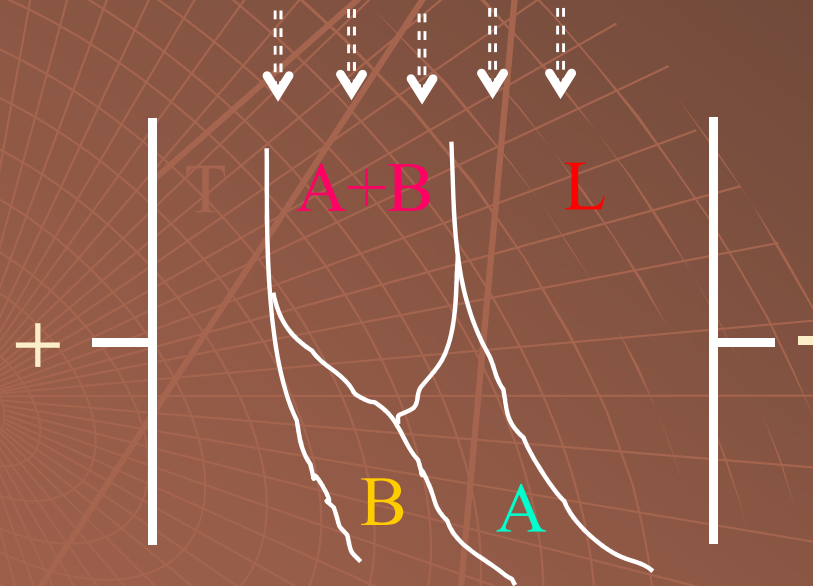
# Preparativní ITP

V gelech - Sephadex

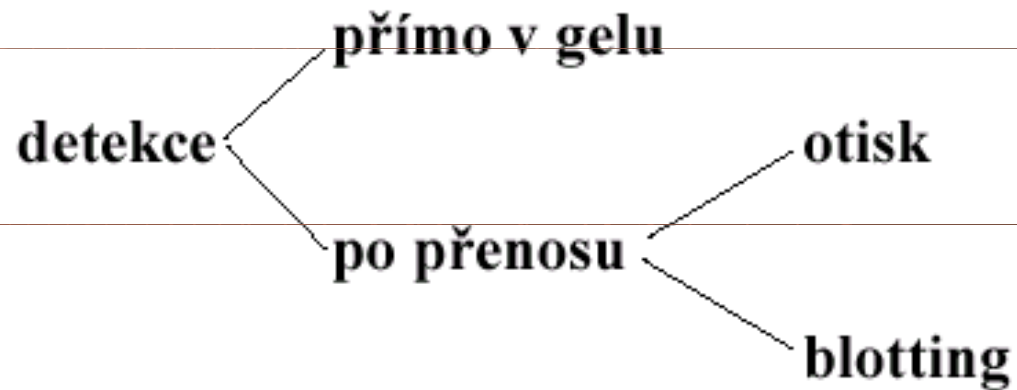


# Preparativní ITP

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**

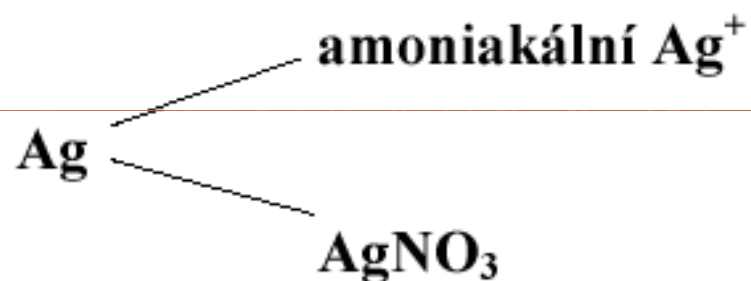
*Coomassie Brilliant Blue G 250*

*Fast Green*

*Panceau S*

# Nespecifická detekce

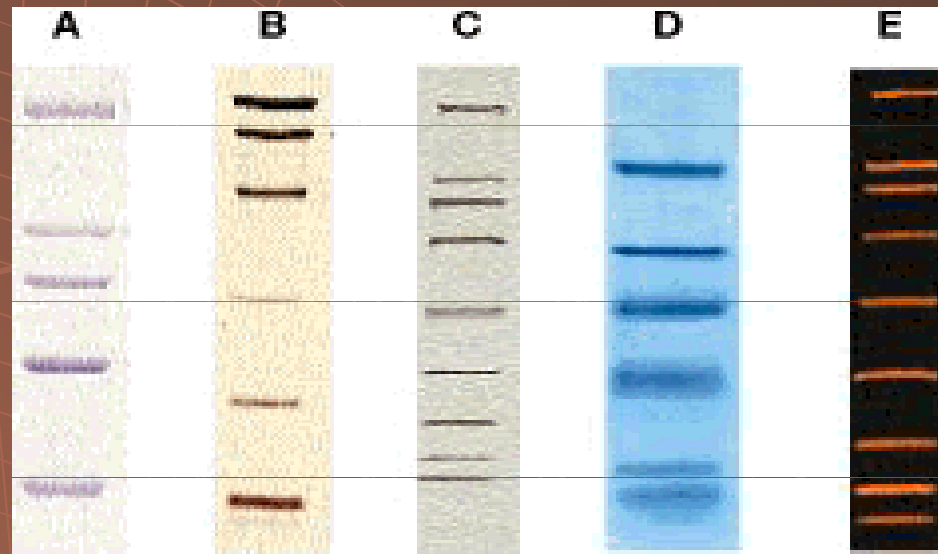
## Barvení Ag



**Postup :**

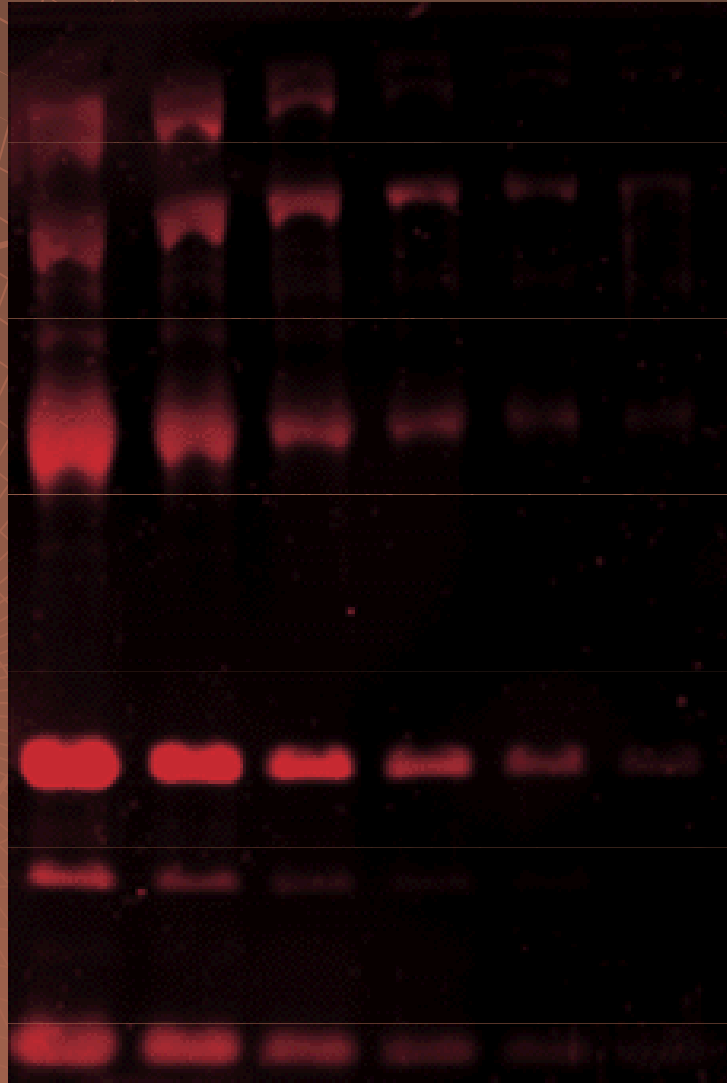
- A. Navázání  $\text{Ag}^+$  na bílkovinu**
- B. Redukce  $\text{Ag}^+$  na  $\text{Ag}^0$**

# Nespecifická detekce



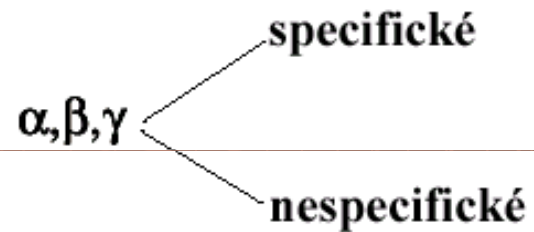
**SDS-PAGE Standards provide accurate molecular weight determinations. A. High range SDS-PAGE Standards run on a 7.5% gel and stained with Coomassie blue R-250 dye, B. Low range Silver Stain SDS-PAGE Standards run on a 12% gel and stained with Bio-Rad's Silver Stain Kit, C. Broad range Biotinylated SDS-PAGE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

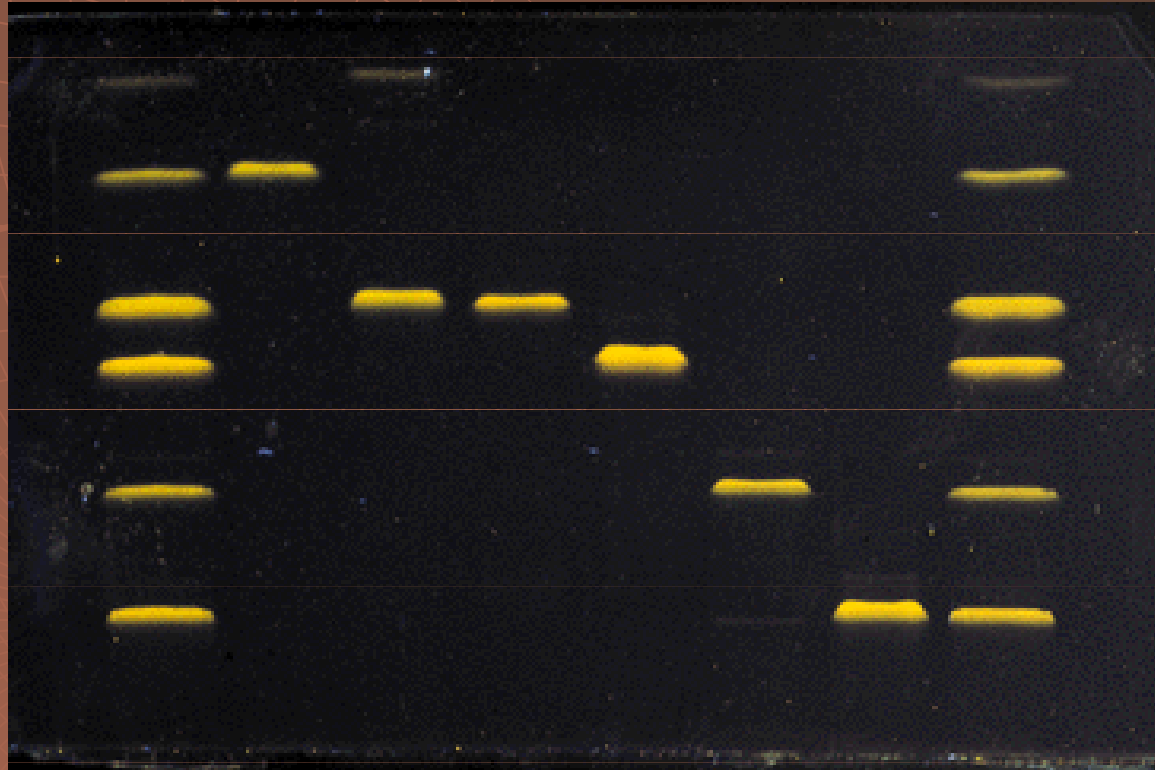
**B. Fluorografie**

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

značený protein  $\longrightarrow$  fluorofor  $\longrightarrow$  rentgenový film



# Autoradiografie

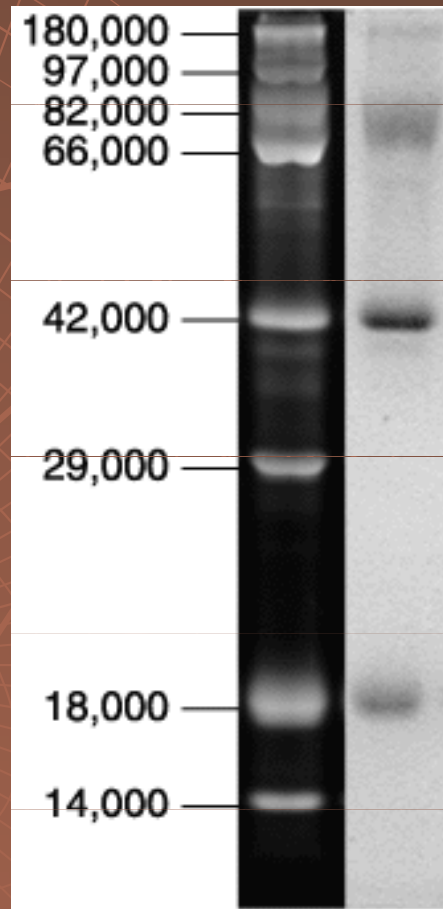


# Specifická detekce

## Detekce různých skupin bílkovin

glykoproteiny	-	Schiffova reakce (oxidace s $\text{HJO}_4$ , reakce s Schiffovým činidlem - bazický fuchsin)
lipoproteiny	-	Sudan B
hemoproteiny	-	peroxidázová aktivita (hem + benzidin + $\text{H}_2\text{O}_2$ )
$\text{Cu}^{2+}$	-	alizarin
$\text{Fe}^{3+}$	-	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

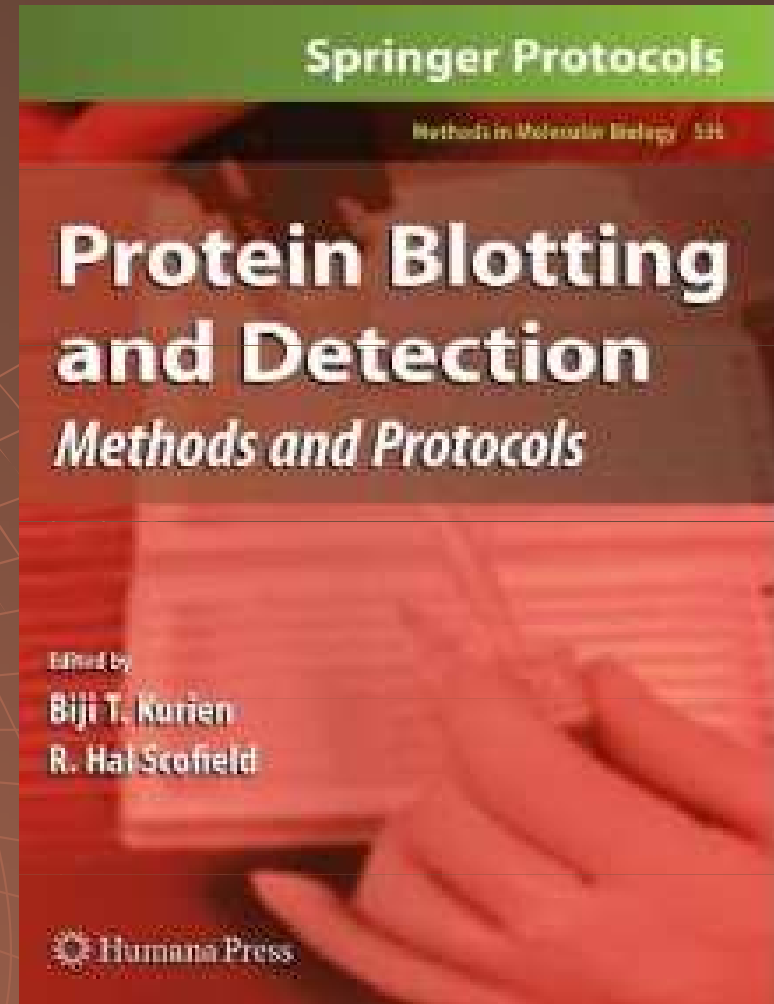
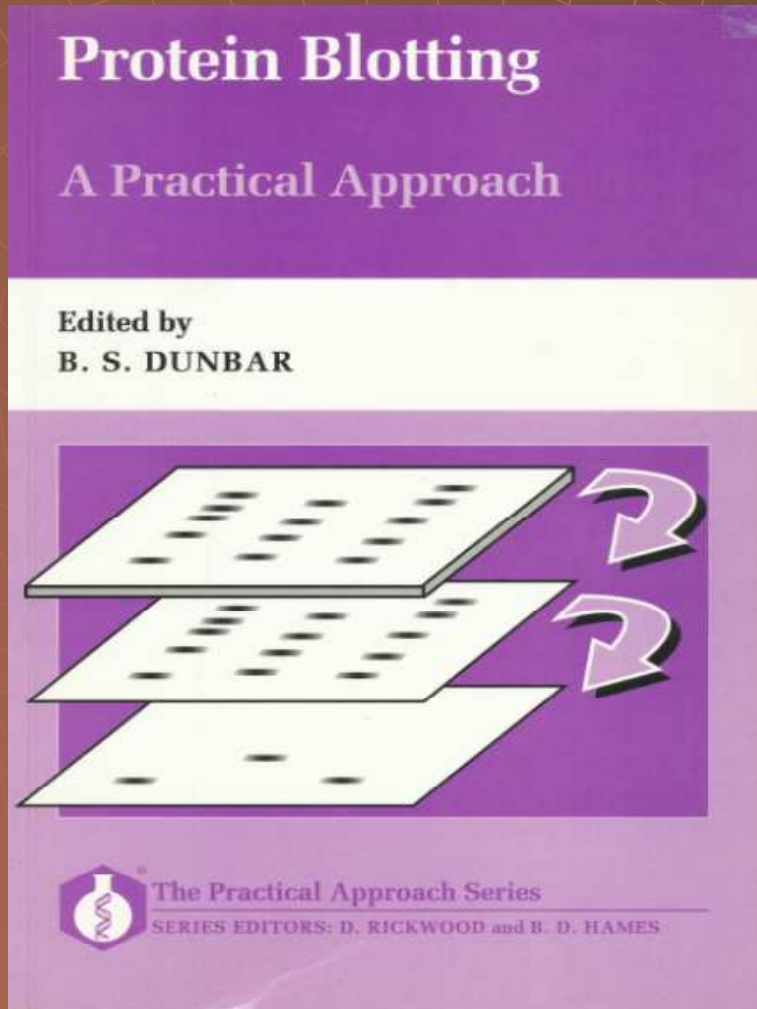
ANTIGEN



PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA

radioaktivní ( $^{125}\text{I}$ ) fluorescenční enzymové avidin-biotin koloidní Au  
značení

# Blotting



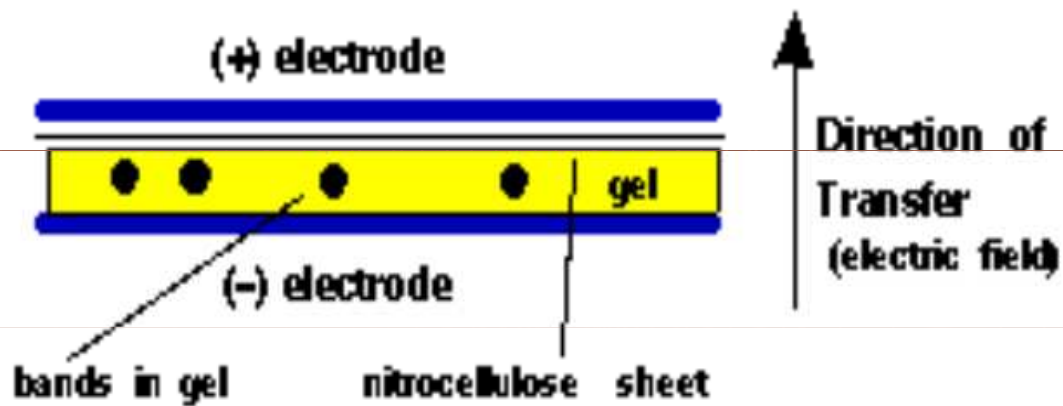
# Blotting

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

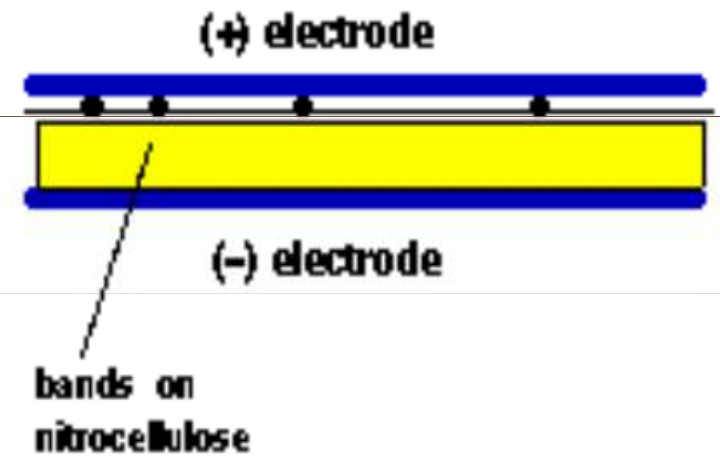
# Blotting

Side View:

Before Transfer:



After Transfer:



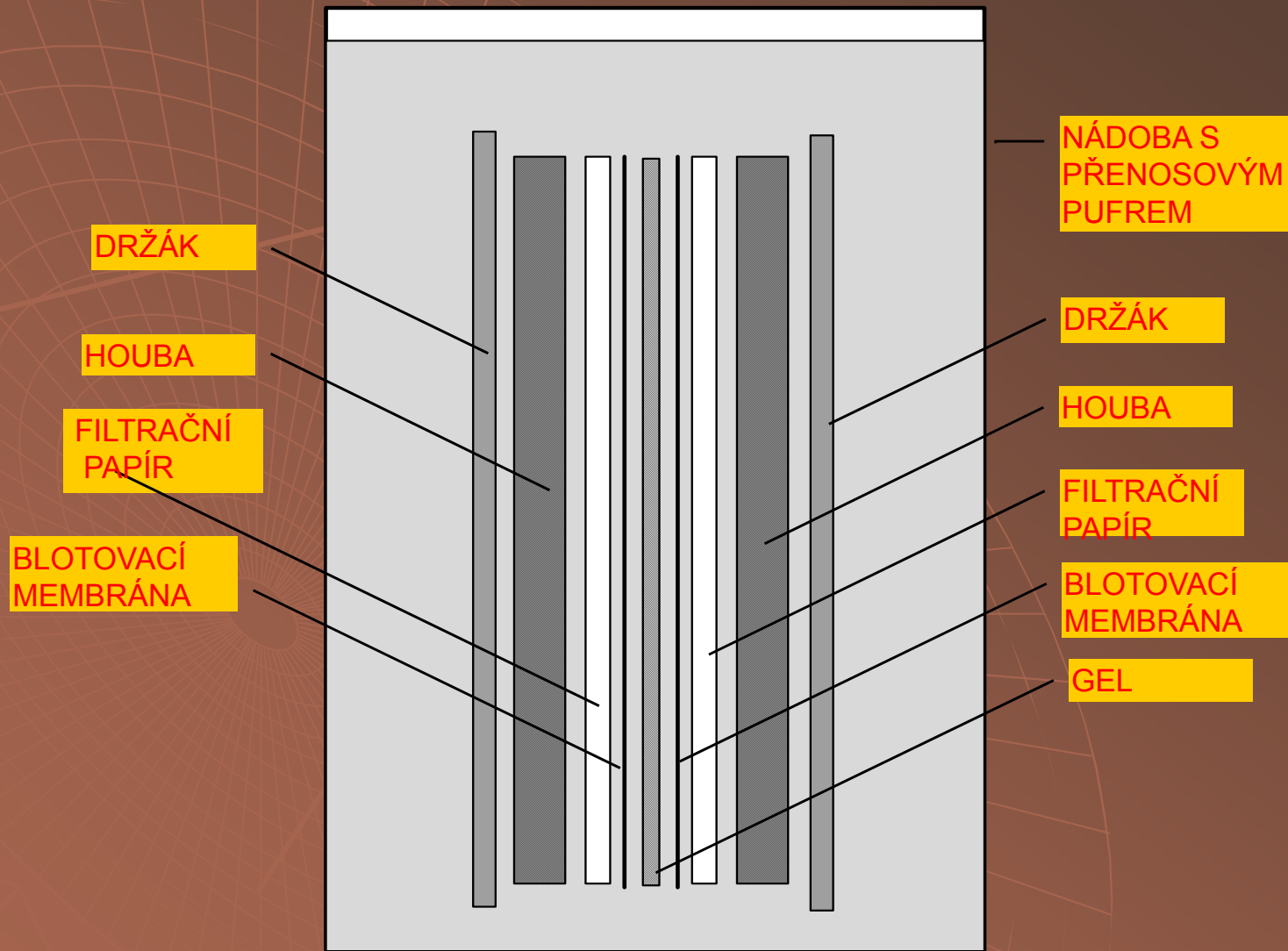
Note: All the layers are pressed tightly together.



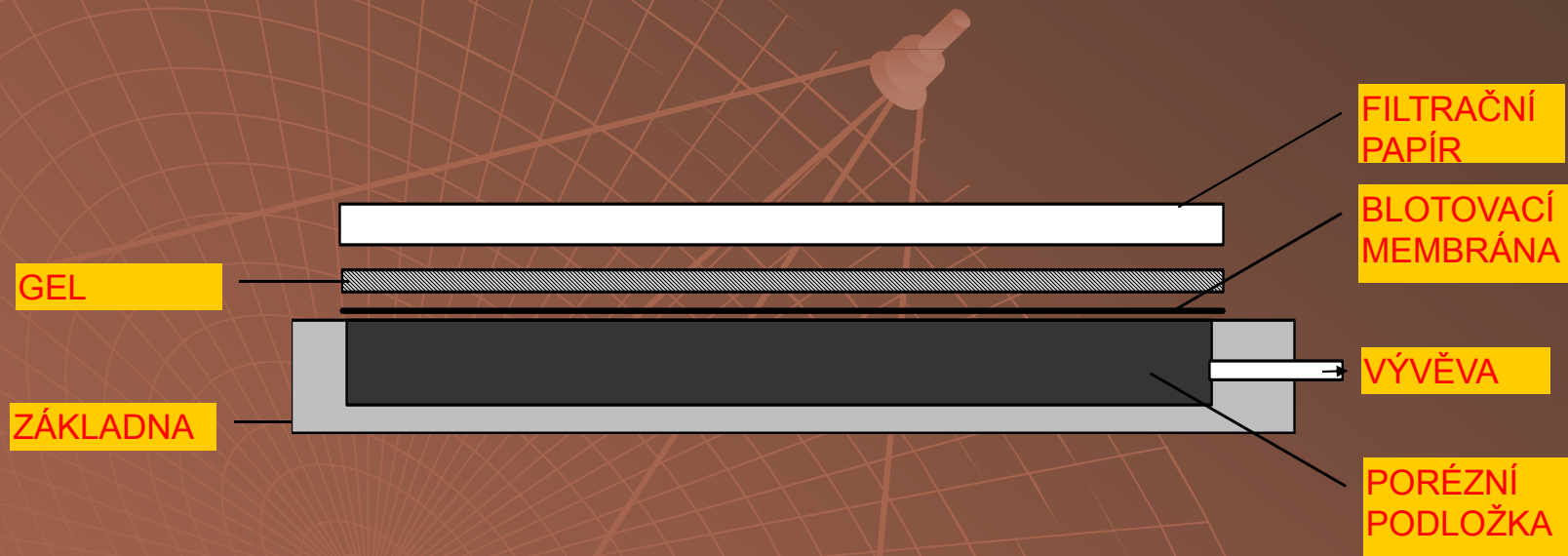
# Výhody blottingu

- ◆ Dostupnost biomakromolekul
- ◆ Zakoncentrování biomakromolekul
- ◆ Redukce doby a množství potřebných chemikálií
- ◆ Imobilizace biomakromolekul – možnost uchovávání
- ◆ Možnost vícenásobné detekce
- ◆ Mechanická stabilita

# Difuzní blotting



# Vakuový blotting



# Kapilární blotting

FILTRAČNÍ  
PAPÍR

GEL

ZÁVAŽÍ

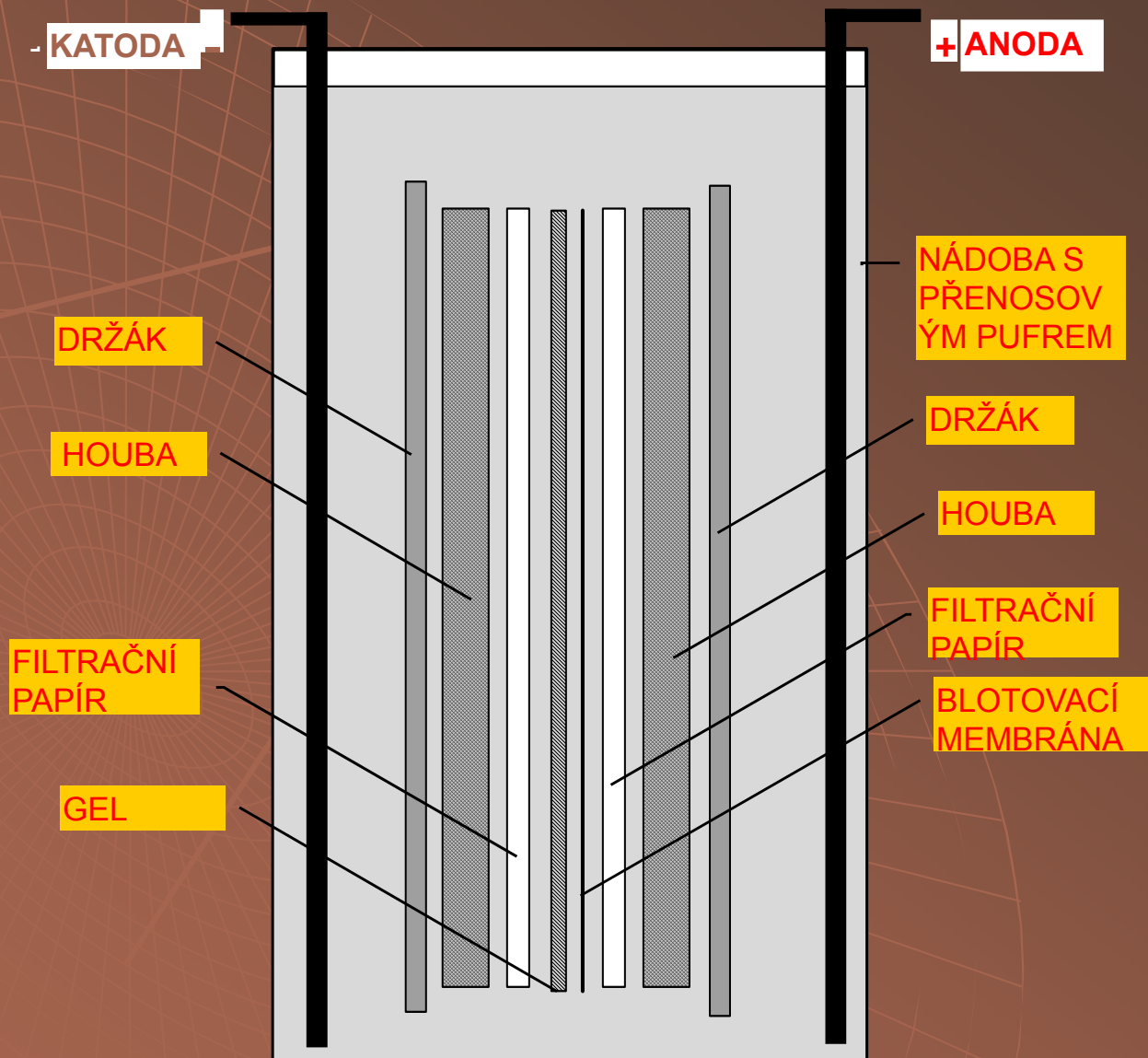
BLOTOVACÍ  
MEMBRÁNA

FILTRAČNÍ  
PAPÍR

NÁDOBA S  
PŘENOSOVÝM  
PUFREM



# Tankový elektroblotting



# Tankový elektroblotting

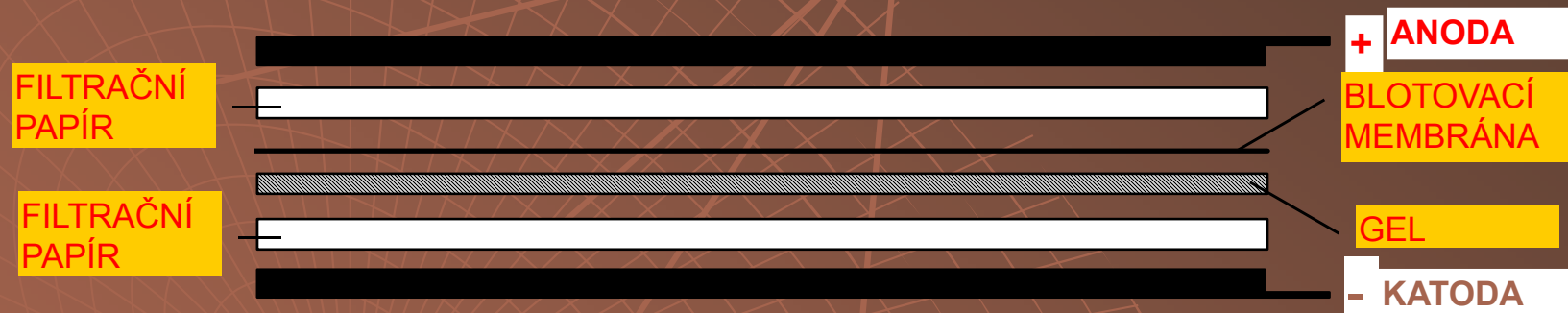


# Tankový elektroblotting

## Mini Protean Trans Blot Cell



# „Semi dry“ blotting

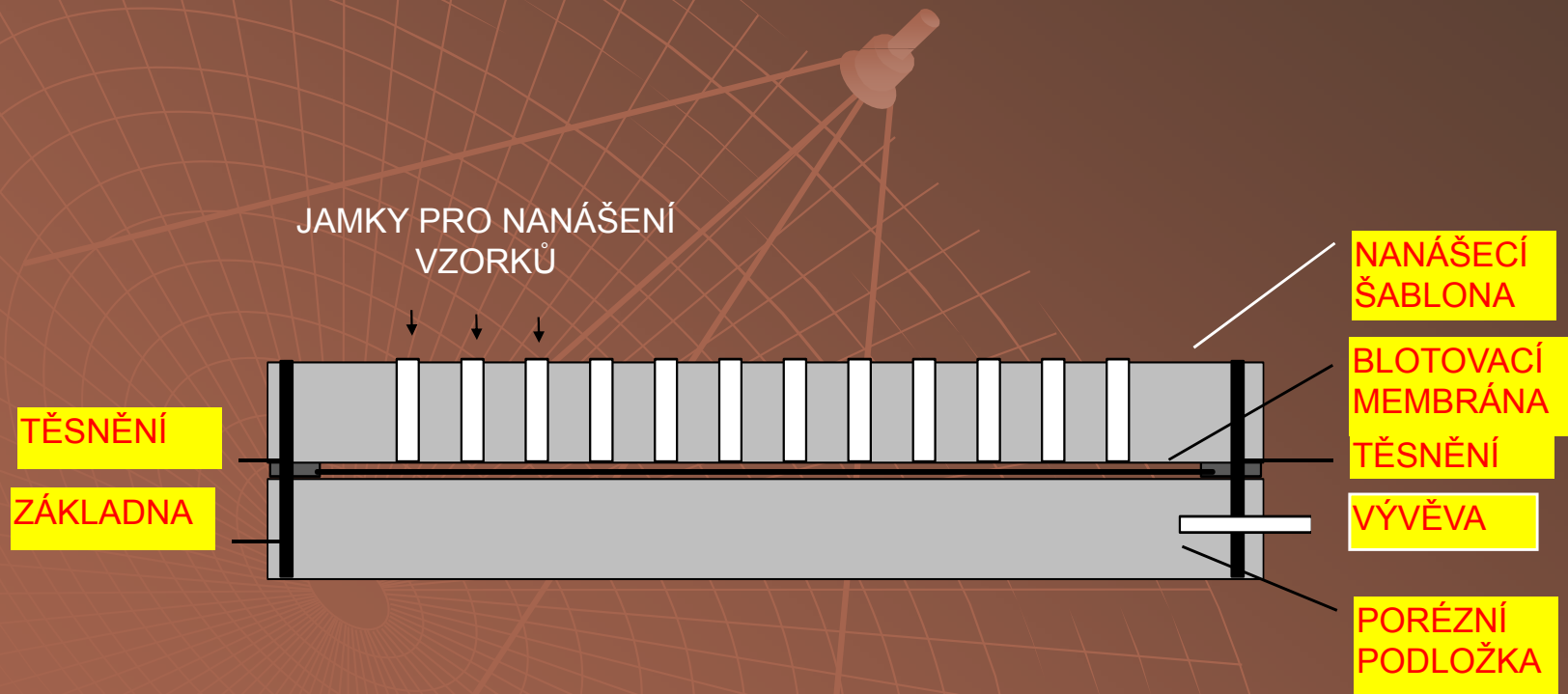




# „Semi dry“ blotting



# Kapkovací dot blotting



# Membrány

- nitrocelulosa - nejběžnější
- polyviniliden difluorid – vysoká vazebná kapacita
- diazobenzoyloxymethyl – chemická aktivace
- ionexové membrány - preparativní
- aktivovaná skleněná vlákna – pro přímou sekvenaci

# Detekce

## HYBRIDIZACE

- radioaktivní proba – vysoká senzitivita, Southern blot
- neradioaktivní proba – biotin – streptavidin, dioxigenin

REAKCE SE SUBSTRÁTEM    nativní enzym, nedifundující substrát

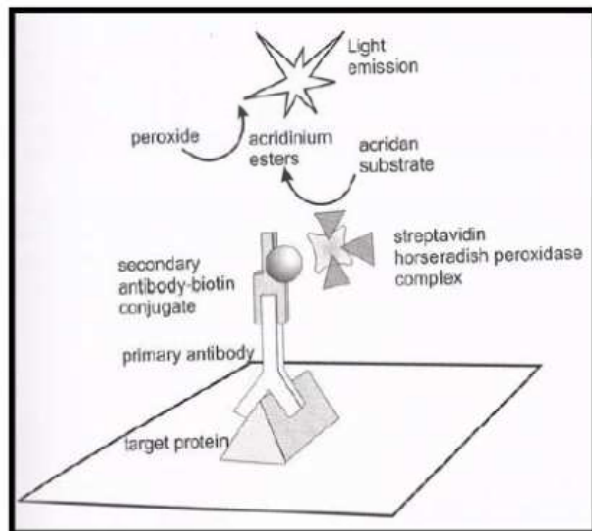
## “IMUNOBLOTTING“

$^{125}\text{I}$ -protein A

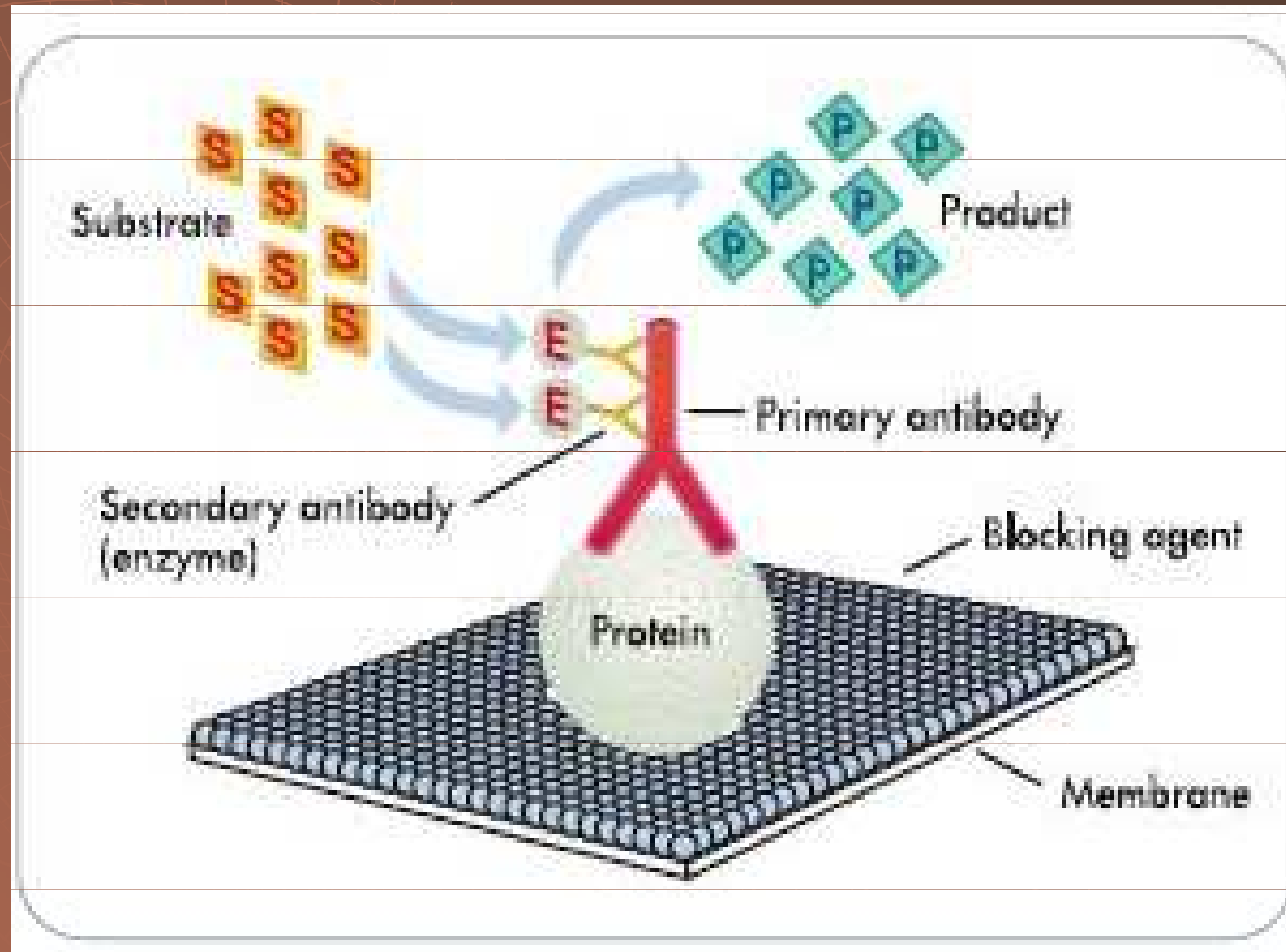
enzymem značená sekundární protilátka – konjugace s peroxidasou (tetrazoliová sůl), alkalickou fosfatasou

zlatem značená sekundární protilátka (100 pg)

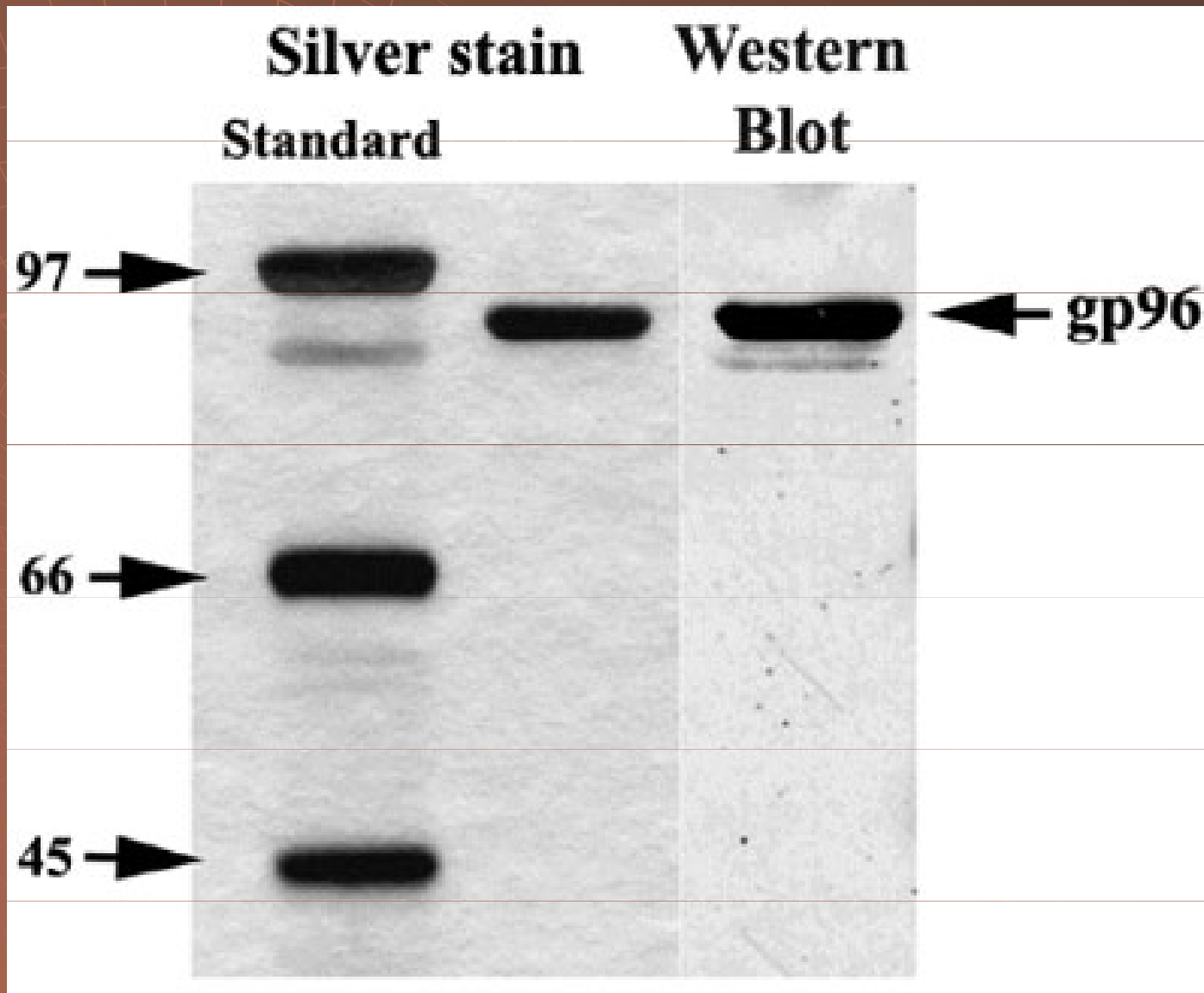
chemiluminescence – nejcitlivější



# Detekce



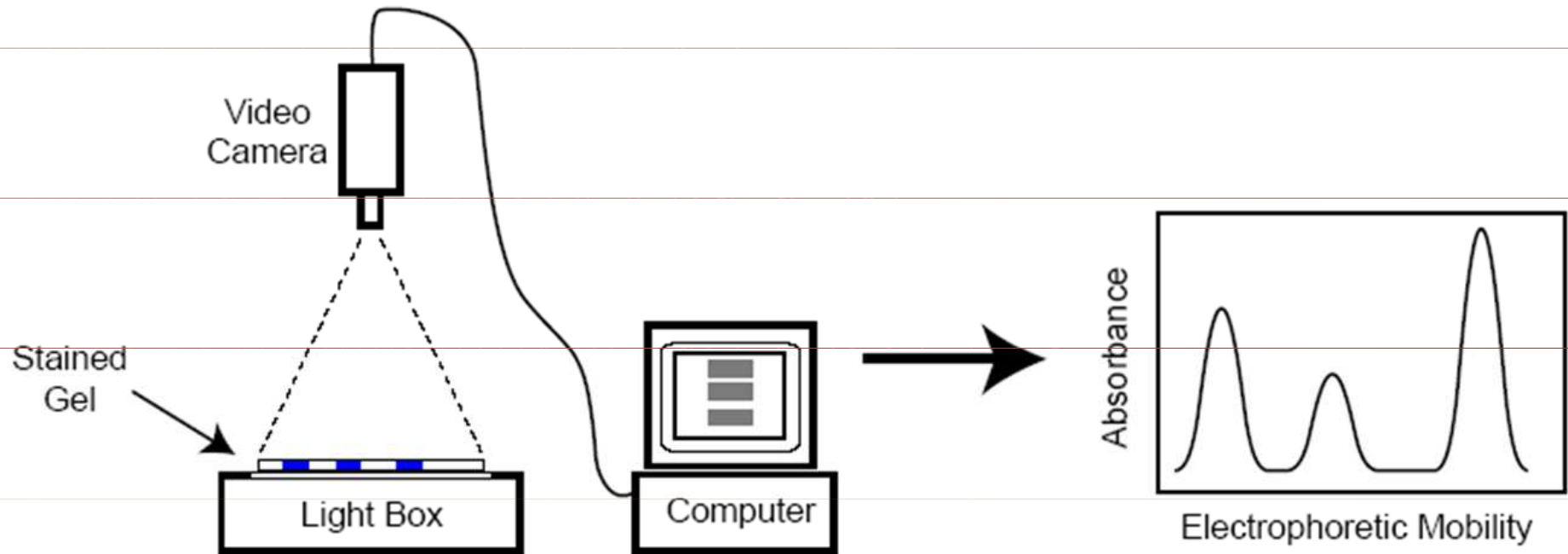
# Detekce



# Speciální aplikace blottingu

- ◆ Získání homogenních preparátů
- ◆ Studium složení a struktury bílkovin
- ◆ MS bílkovin – MALDI, DESI
- ◆ Příprava protilátek
- ◆ Purifikace protilátek

# Detekce





# Detekce

