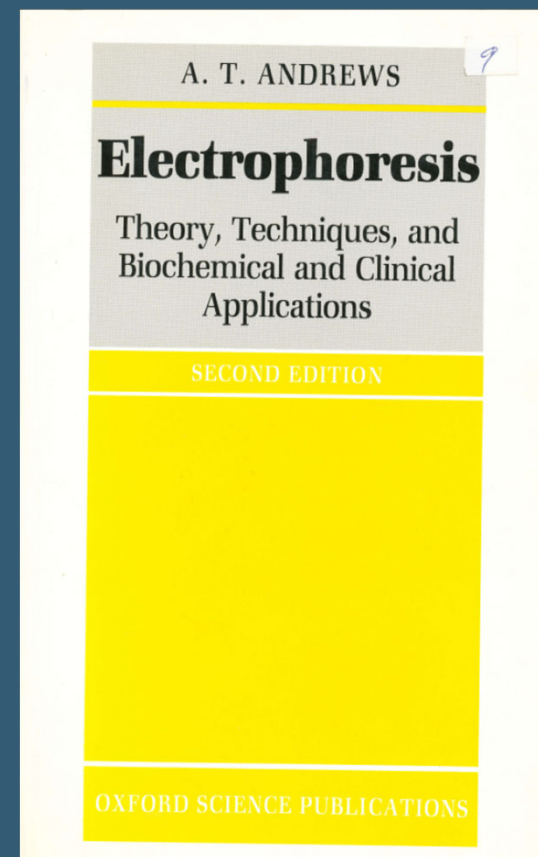
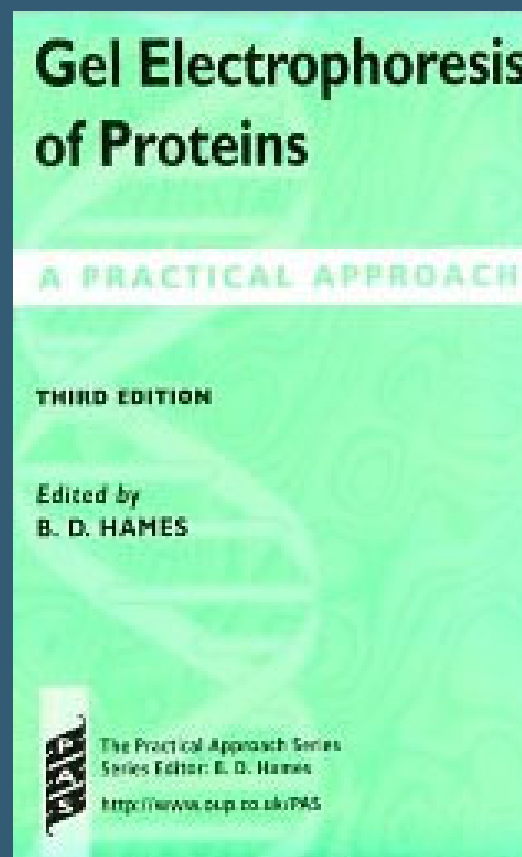
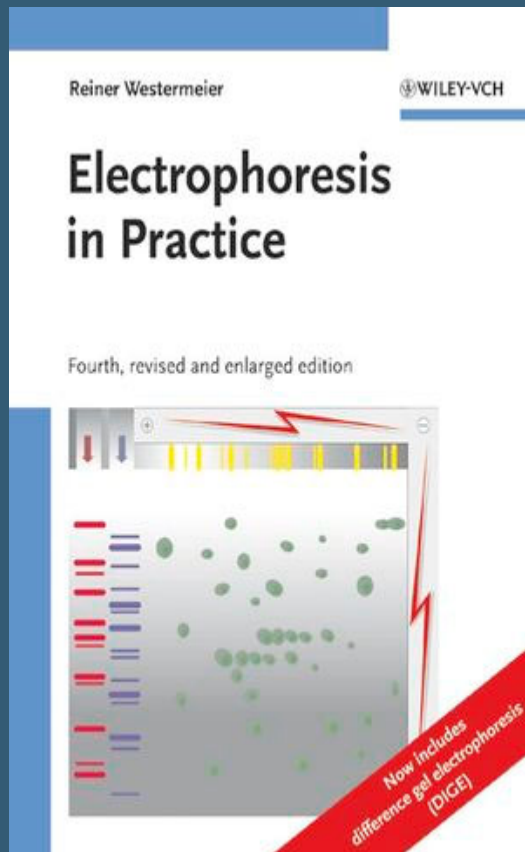


ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

LITERATURA



HISTORIE ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD

- 1806 Reuss
Elektroforéza – pohyb koloidní částic v elektrickém poli
- 1897 Kohlrausch
regulační funkce
- 1930 Arne Tiselius
Volná a zónová elektroforéza (1948 Nobelova cena)
- 1962 Vesterberg, (Svensson) Rilbe
izoelektrická fokusace
- 1967 Hjerten
kapilární elektroforéza v rotující 1 - 3 mm křemenné kapiláře

HISTORIE ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD

• 1970 Laemmli

SDS PAGE

• 1975 O'Farrell

2D-elektroforéza

• 1976 Everaerts, Mikkers

isotachoforéza

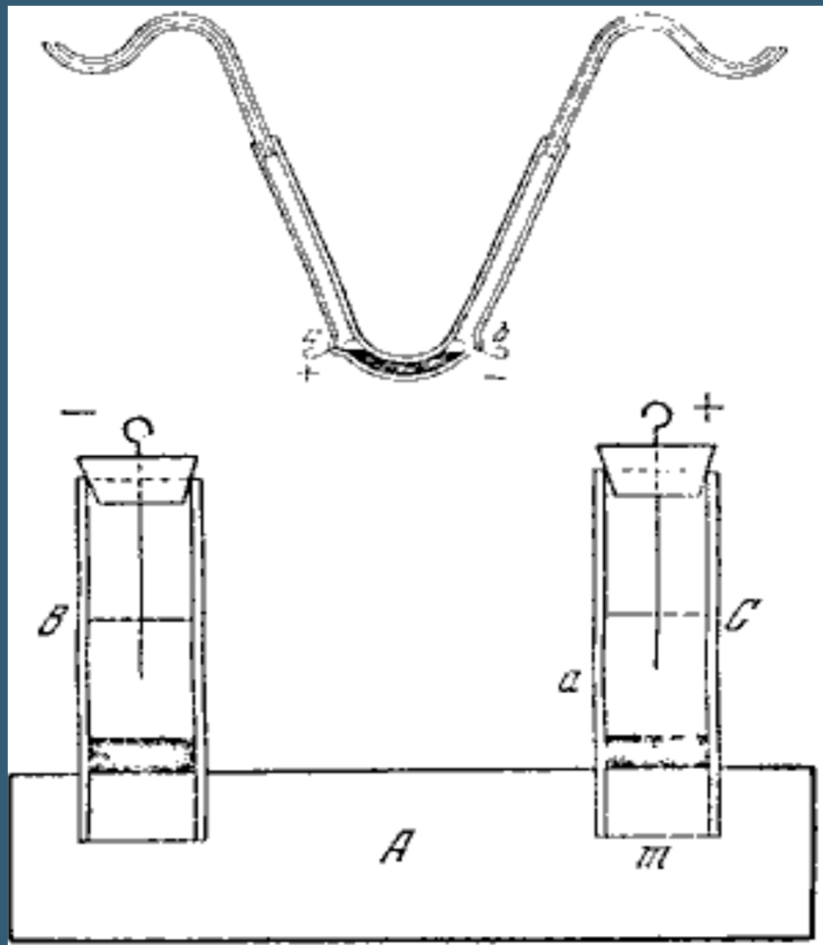
• 2003 Karger

Multikapilární CE – lidský genom

FREDERIC REUSS

(1807)

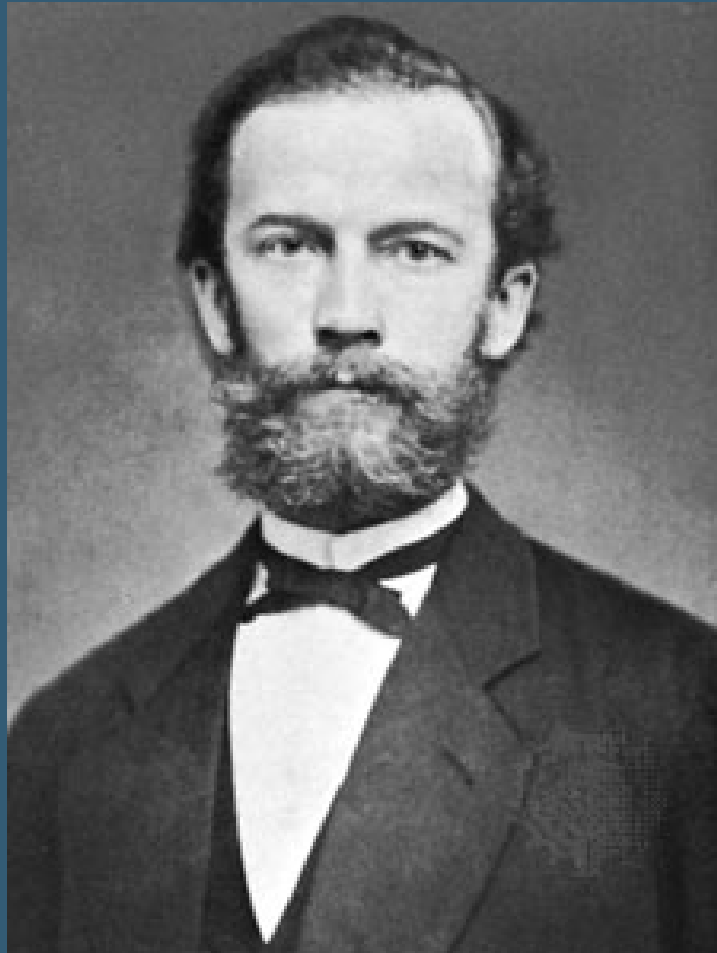
KATOFORÉZA



FRIEDRICH KOHLRAUSCH

(1874)

REGULAČNÍ FUNKCE

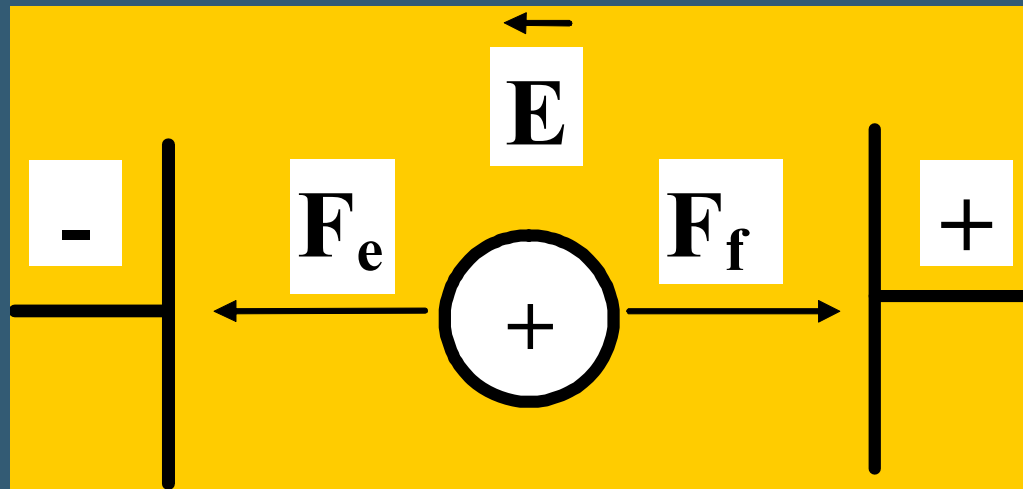


$$\sum_i \sum_z \frac{|z| c_i}{\mu_i} = K_x$$

PODSTATA

*„Pohyb elektricky nabitých částic
v elektrickém poli“*

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



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

[m² V⁻¹ s⁻¹]

IONTOVÁ MOBILITA

(LIMITNÍ ZŘEDĚNÍ, TEPLOTA 298 K)

<i>KATIONTY</i>	<i>$/\mu_0 \cdot 10^9$</i>	<i>ANIONTY</i>	<i>$/\mu_0 \cdot 10^9$</i>
H ₃ O ⁺	362.5	OH ⁻	205.5
Li ⁺	40.1	F ⁻	57.4
Na ⁺	51.9	Cl ⁻	79.1
K ⁺	76.2	NO ₃ ⁻	74.1
Tris ⁺	29.5	SO ₄ ⁻	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

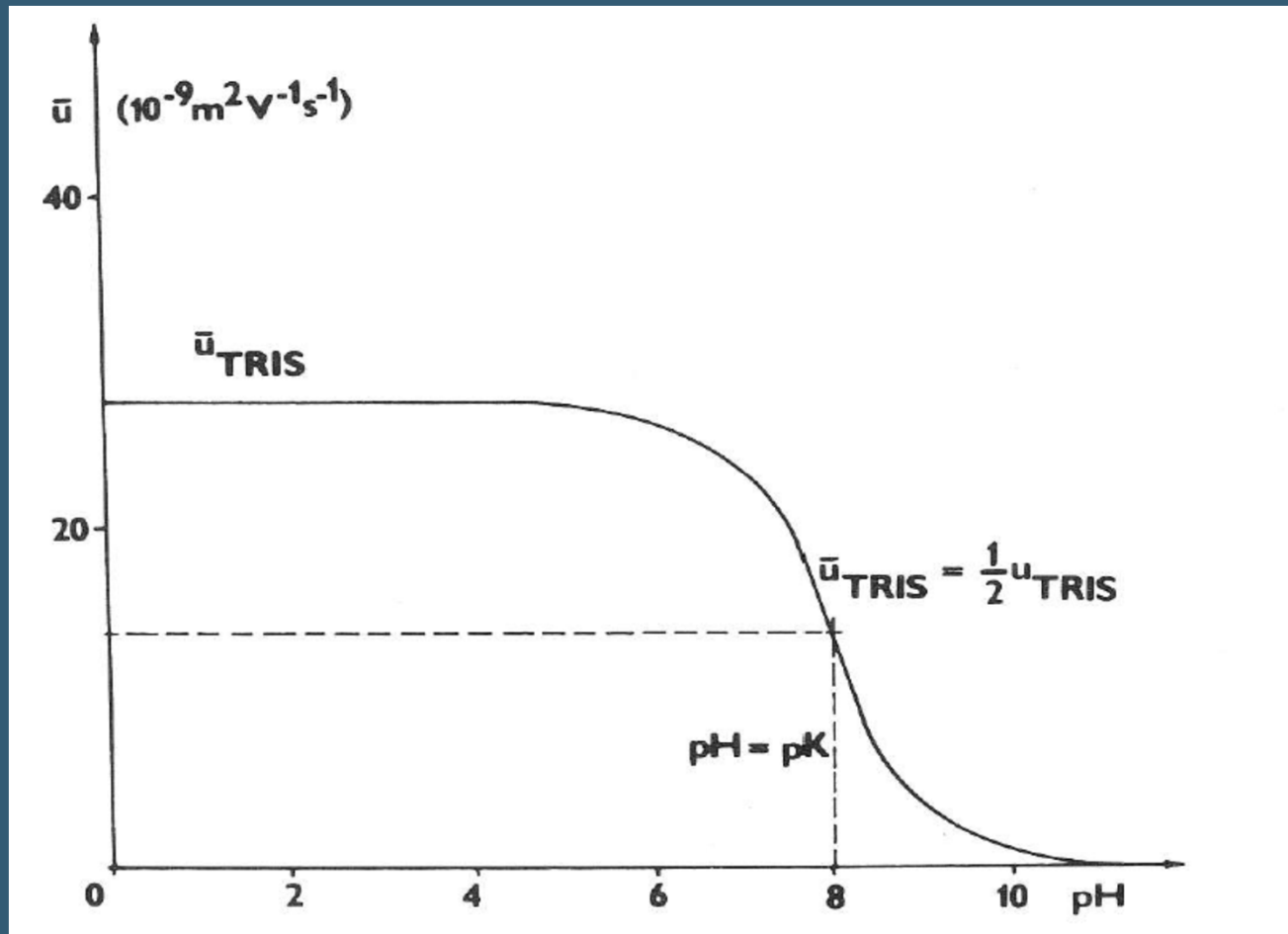
$$\bar{\mu}_A = \frac{[H^+]}{K_{HA} + [H^+]} \times \mu_A$$

- pro slabou monovalentní zásadu

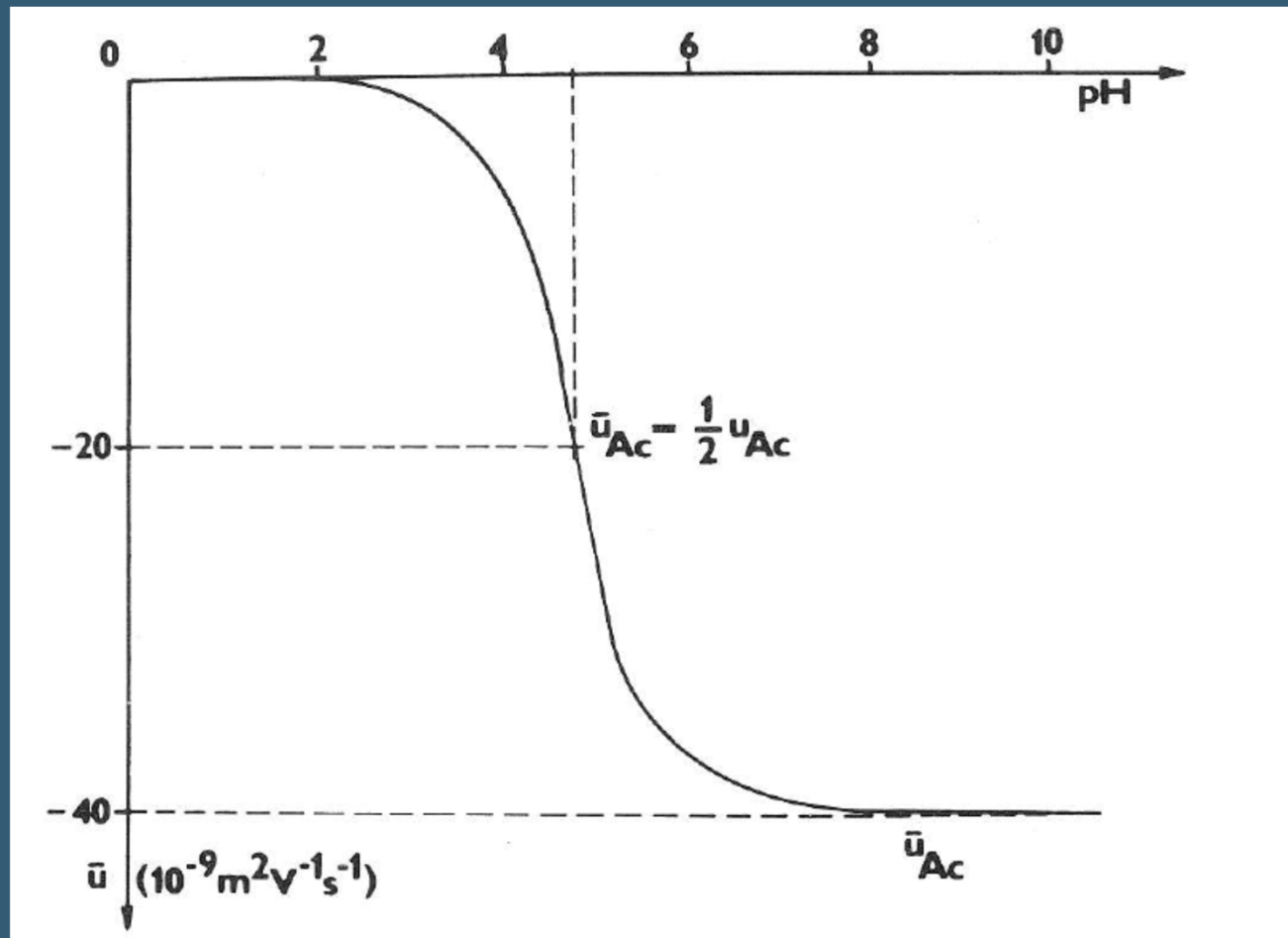
$$\bar{\mu}_B = \frac{[H^+]}{K_{BH} + [H^+]} \times \mu_{BH}$$

ZÁVISLOST EFEKTIVNÍ MOBILITY NA pH

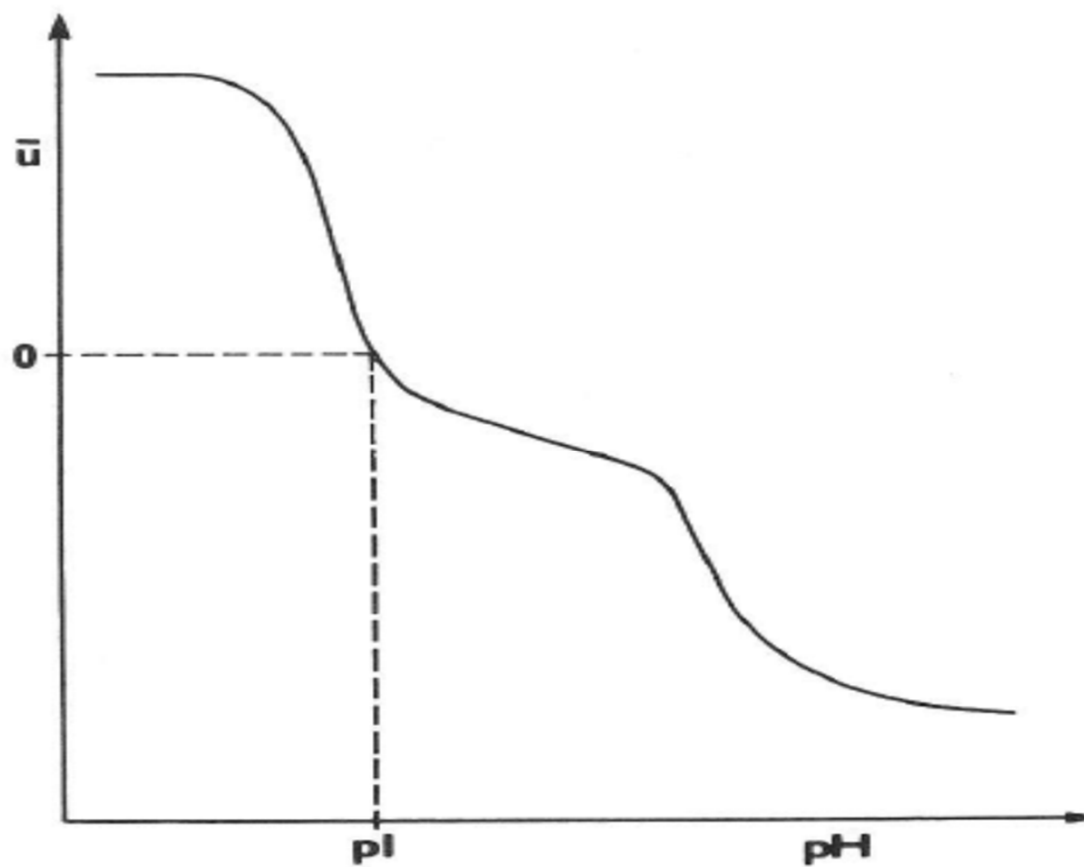
pro slabou monovalentní zásadu



ZÁVISLOST EFEKTIVNÍ MOBILITY NA pH pro slabou monovalentní kyselinu



ZÁVISLOST EFEKTIVNÍ MOBILITY NA pH pro bílkovinu



VLIV VELIKOSTI MOLEKULY NA MOBILITU

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

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

$$\frac{1}{r} \approx M_r^{\frac{1.2}{3.3}}$$

η - 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 TEPLLO

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

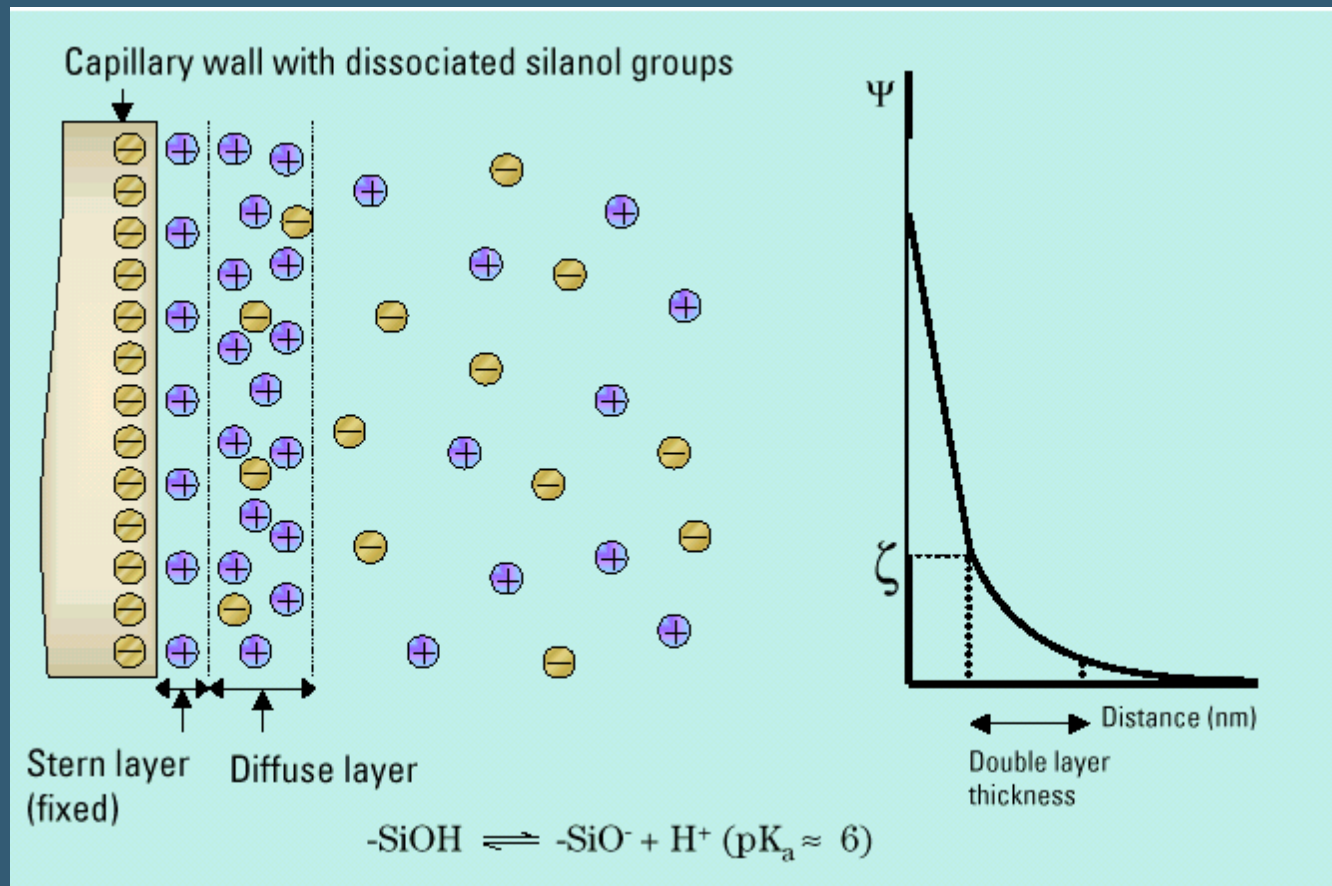
$P =$ výkon [W.m⁻³]

$S =$ průřez [m²]

$\kappa =$ 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

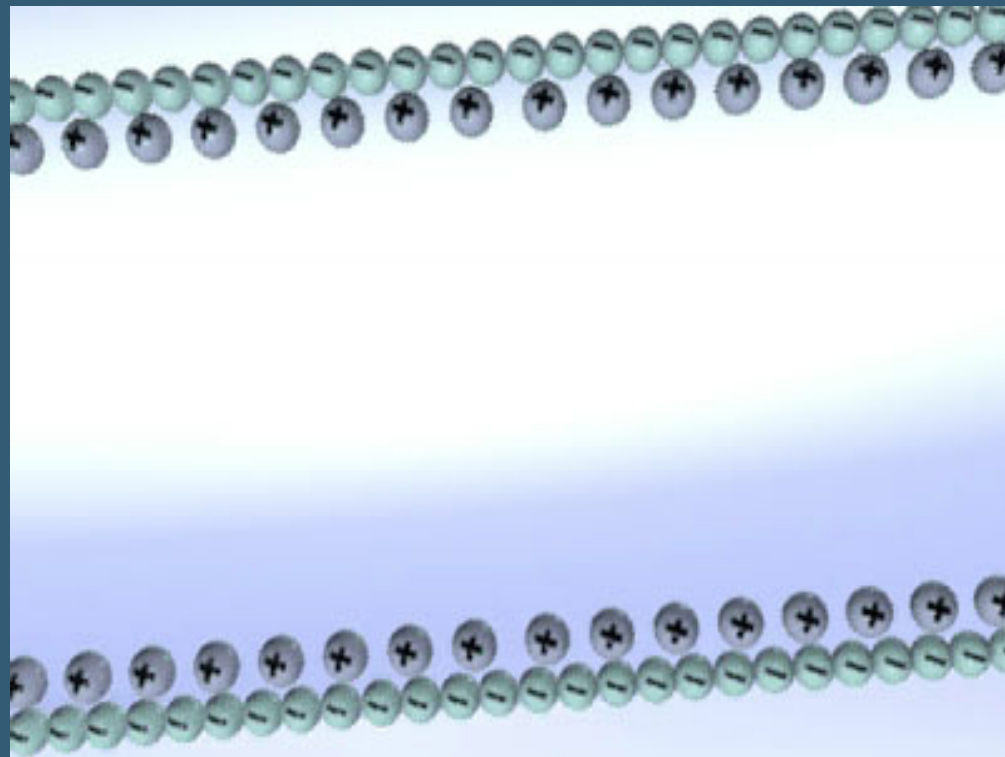
η = viskozita

ε = dielektrická konstanta

μ_{eo} = elektroosmotická mobilita

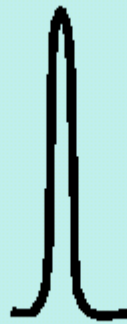
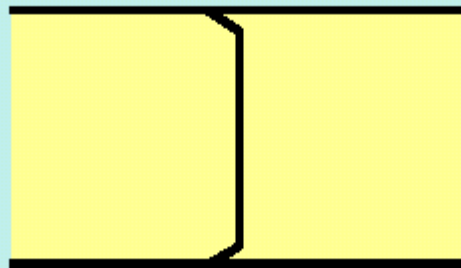
$$v_{eo} = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \times E\xi$$

PŮVOD ELEKTROOSMOTICKÉHO TOKU

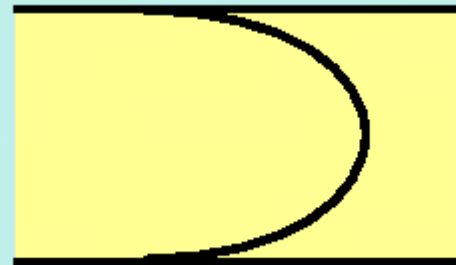


ELEKTROOSMOTICKÝ TOK

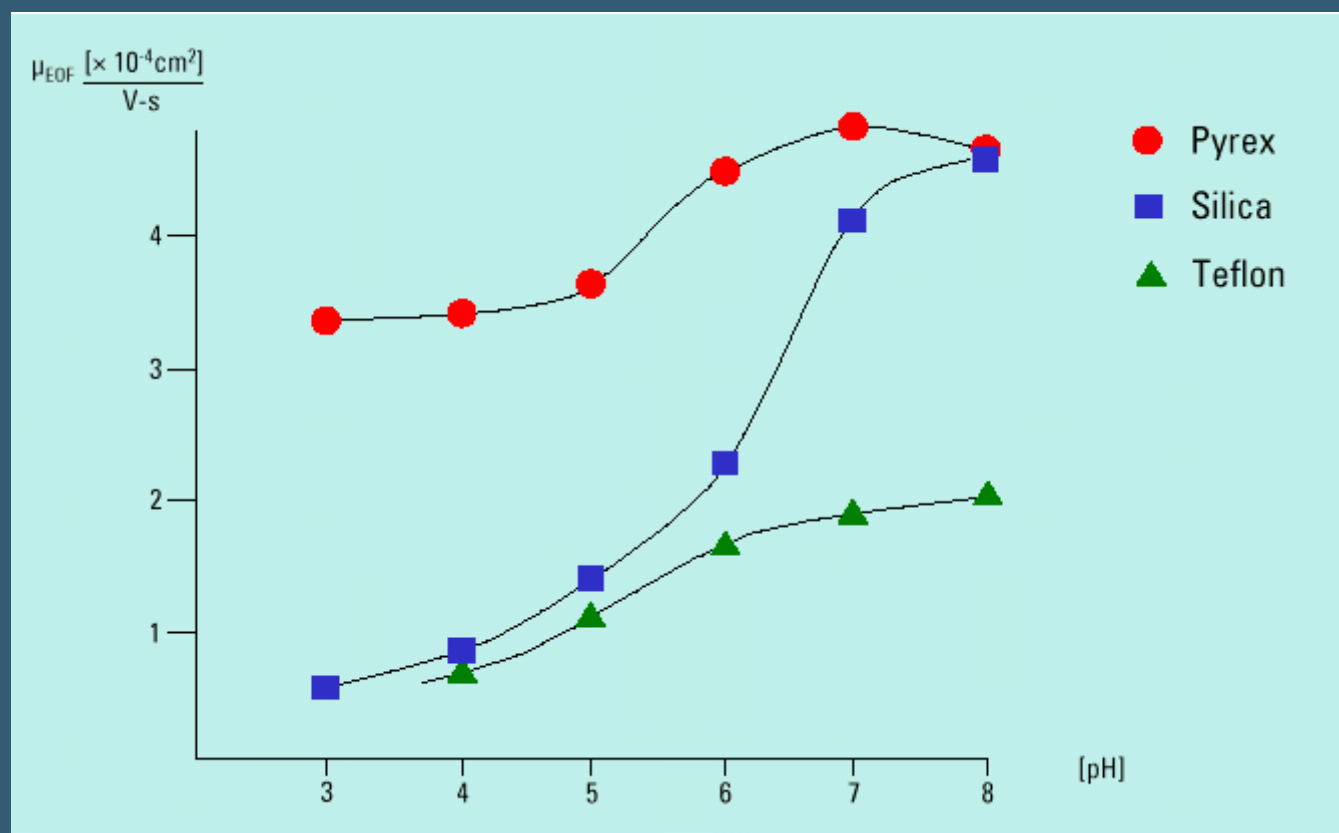
EOF



Laminární tok



ELEKTROOSMOTICKÝ TOK V RŮZNÝCH KAPILÁRÁCH



DIFUZE

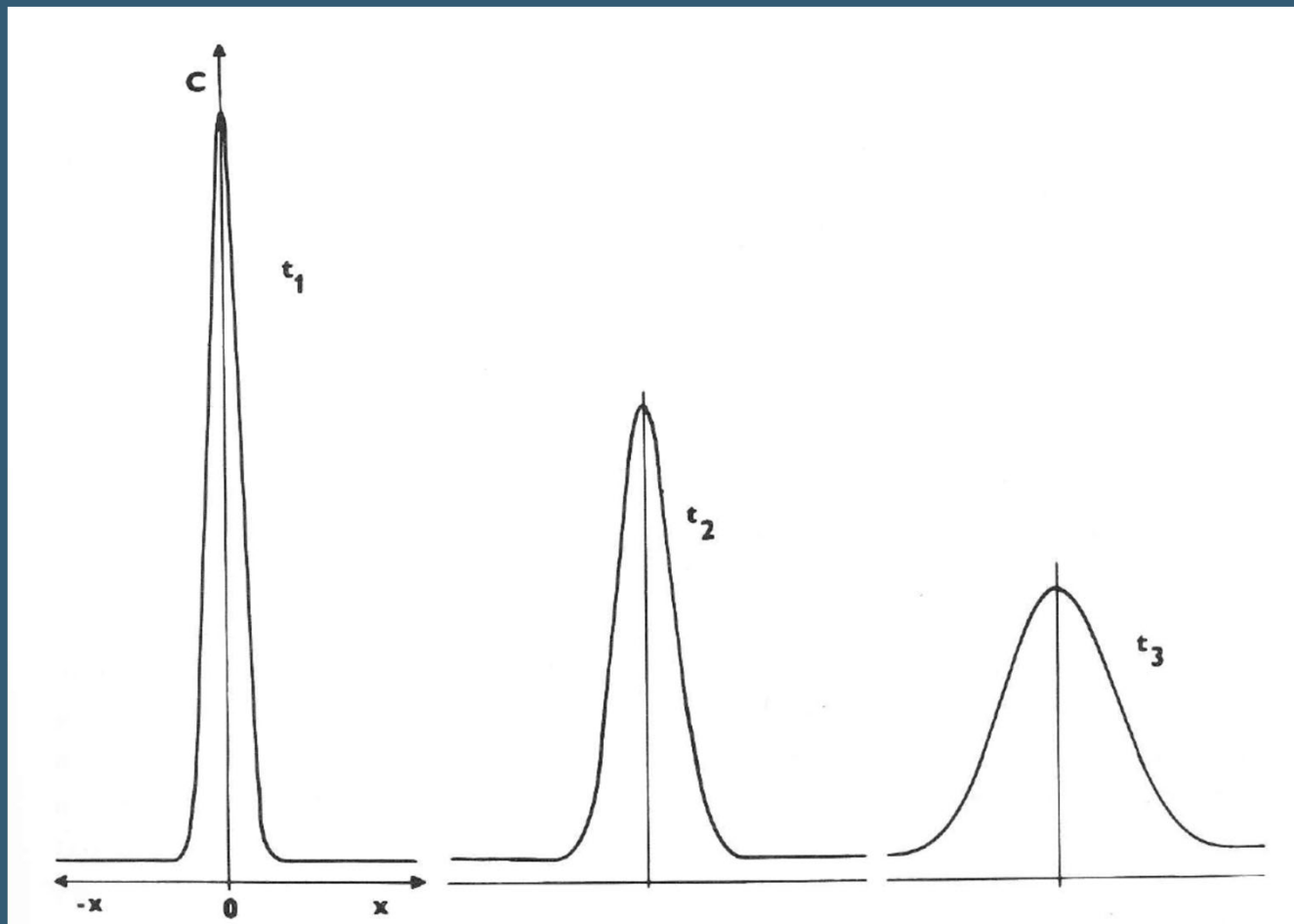
$$c = c_0 e^{-\left(\frac{x^2}{\sigma^2}\right)}$$

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

$\sigma^2 = \text{rozptyl}$

$D = \text{difuzní koeficient}$

DIFUZE

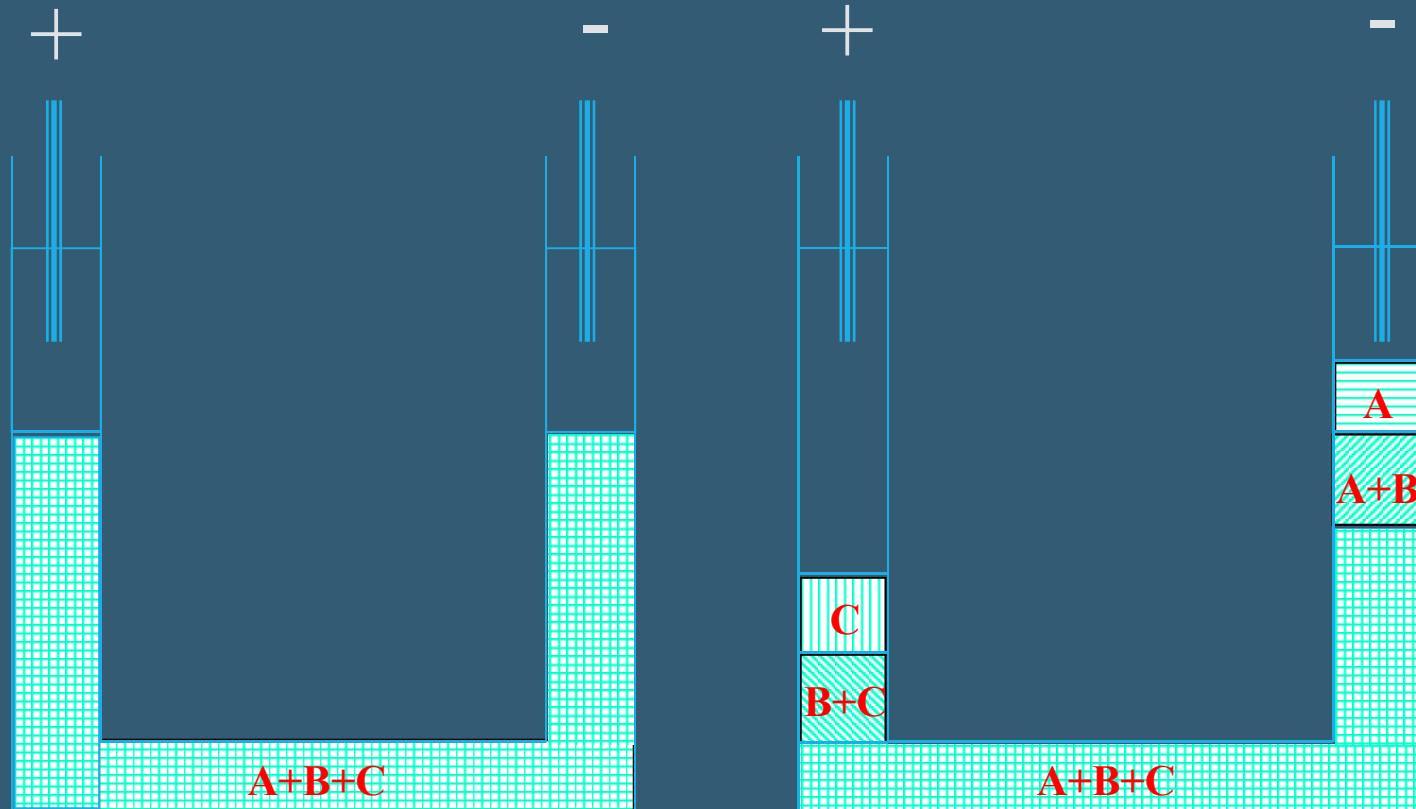


ELEKTROFORÉZA

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

ELEKTROFORÉZA

• Volná

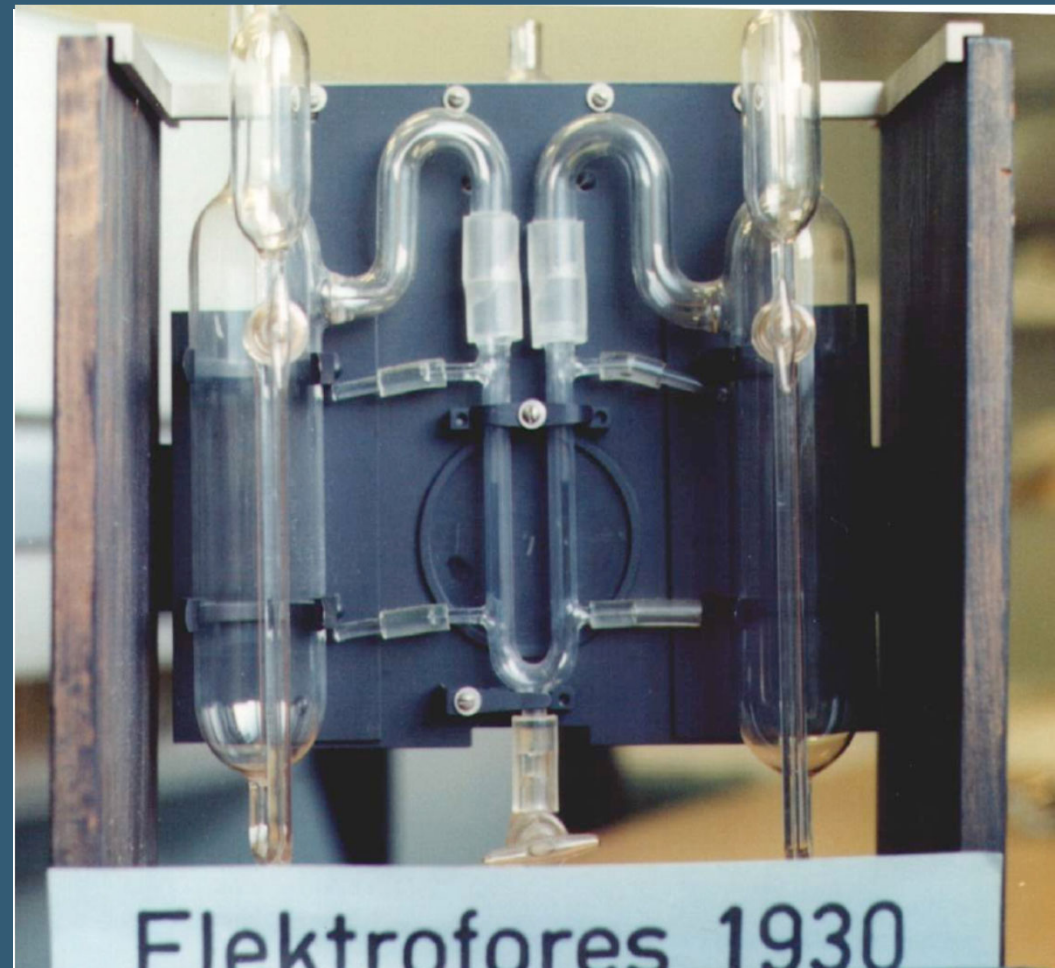


M U Z I
S C I
• Zóhová

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

VOLNÁ ELEKTROFORÉZA

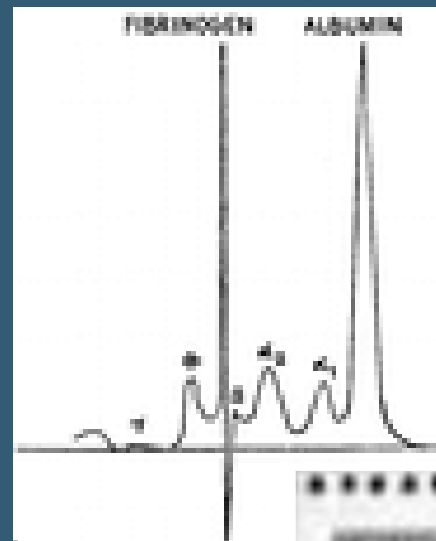
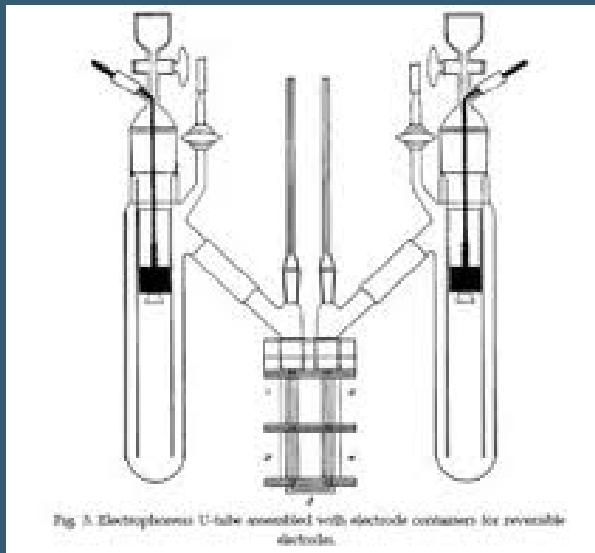
ARNE TISELIUS (1902 –1971)



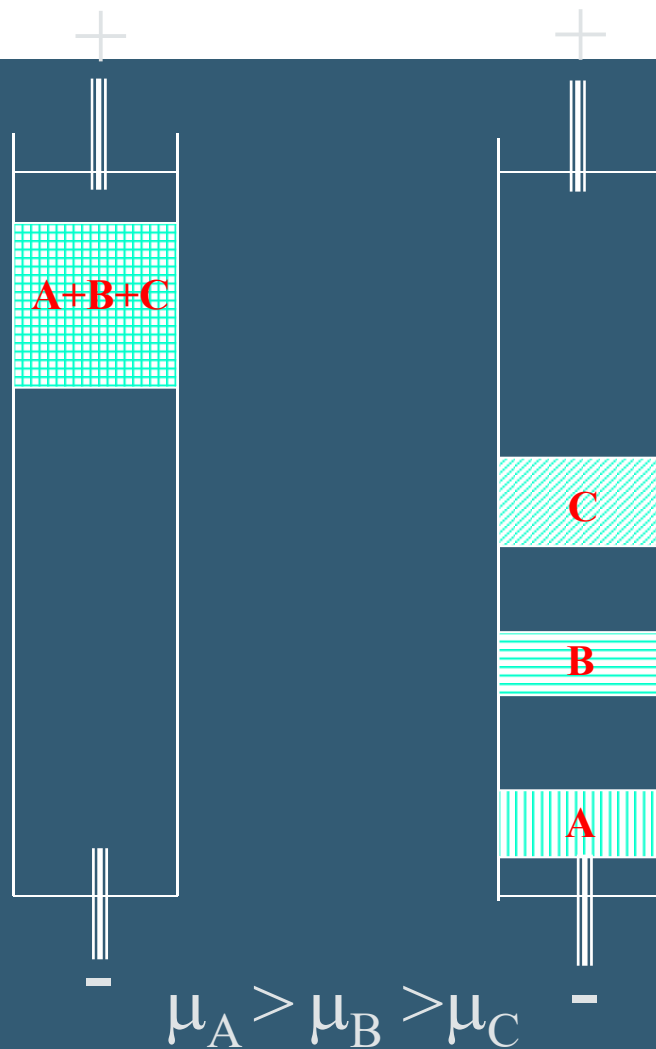
VOLNÁ ELEKTROFORÉZA

ARNE TISELIUS

Nobelova cena 1948

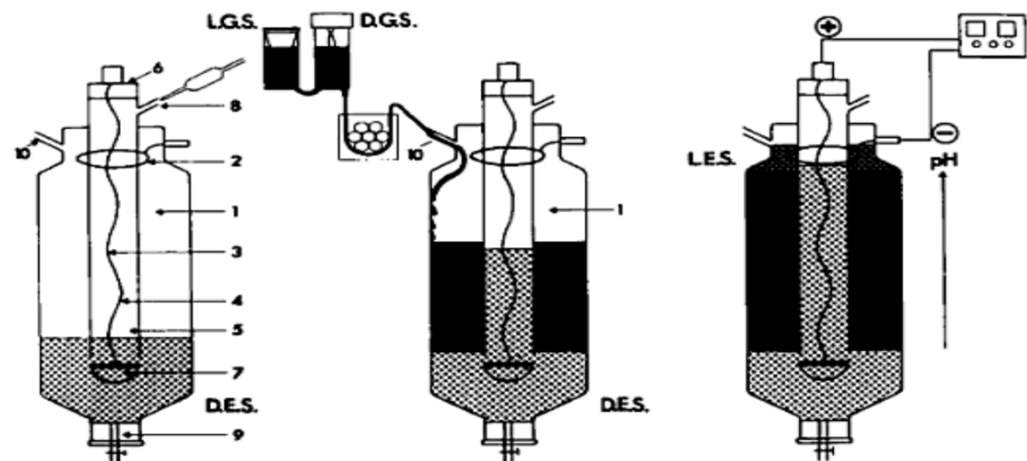
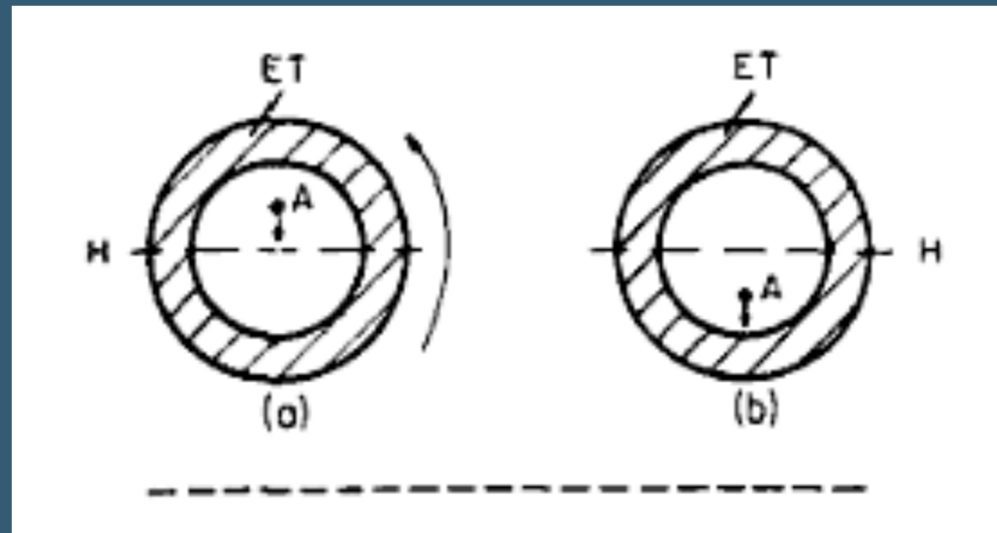


ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

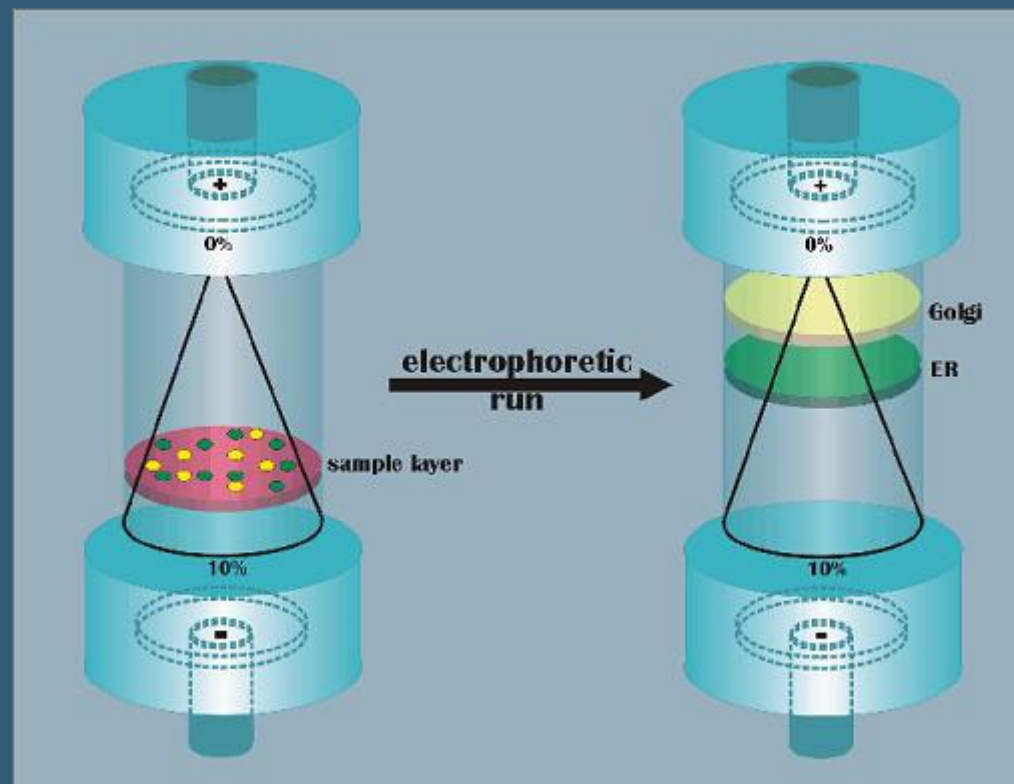


STABILIZACE

- Rotací
- Gradienty hustoty
- Porézními medii
- Kapilárou



STABILIZACE



POŽADAVKY NA PORÉZNÍ MEDIA

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

PORÉZNÍ MEDIA

- 1939 *Papír*
- 1950 *Agarový gel*
- 1955 *Škrobový gel*
- 1957 *Acetát celulosy*
- 1959 *Polyacrylamidový gel*
- 1979 *Agarosový gel*

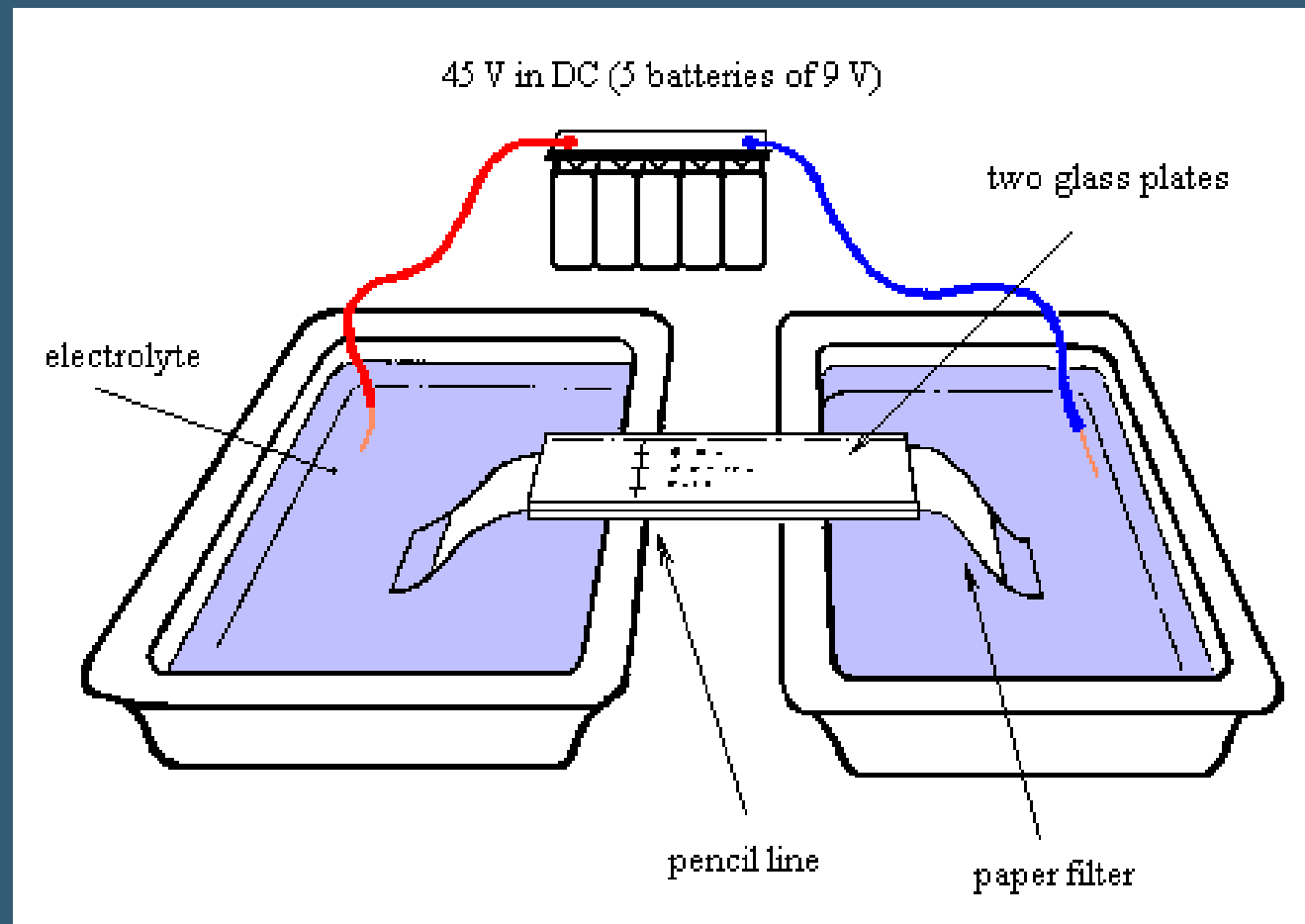
CHROMATOGRAFICKÝ PAPÍR

Složení – celuloza

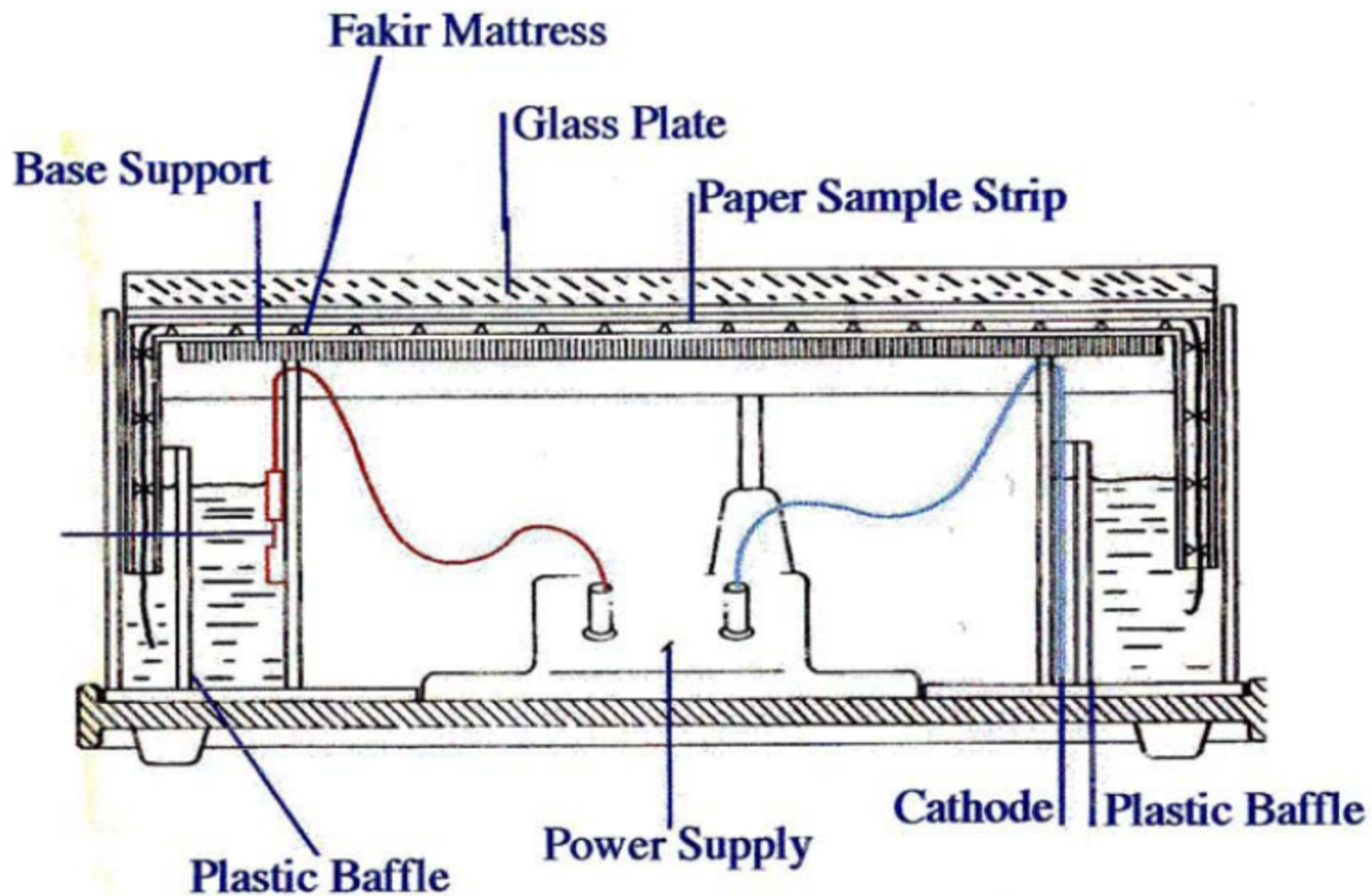
- Nehomogenní
- Přítomnost ionogenních skupin
- Špatně se chladí – pálí se

Použití : téměř už se nepoužívá

CHROMATOGRAFICKÝ PAPIR



CHROMATOGRÁFICKÝ PAPIR



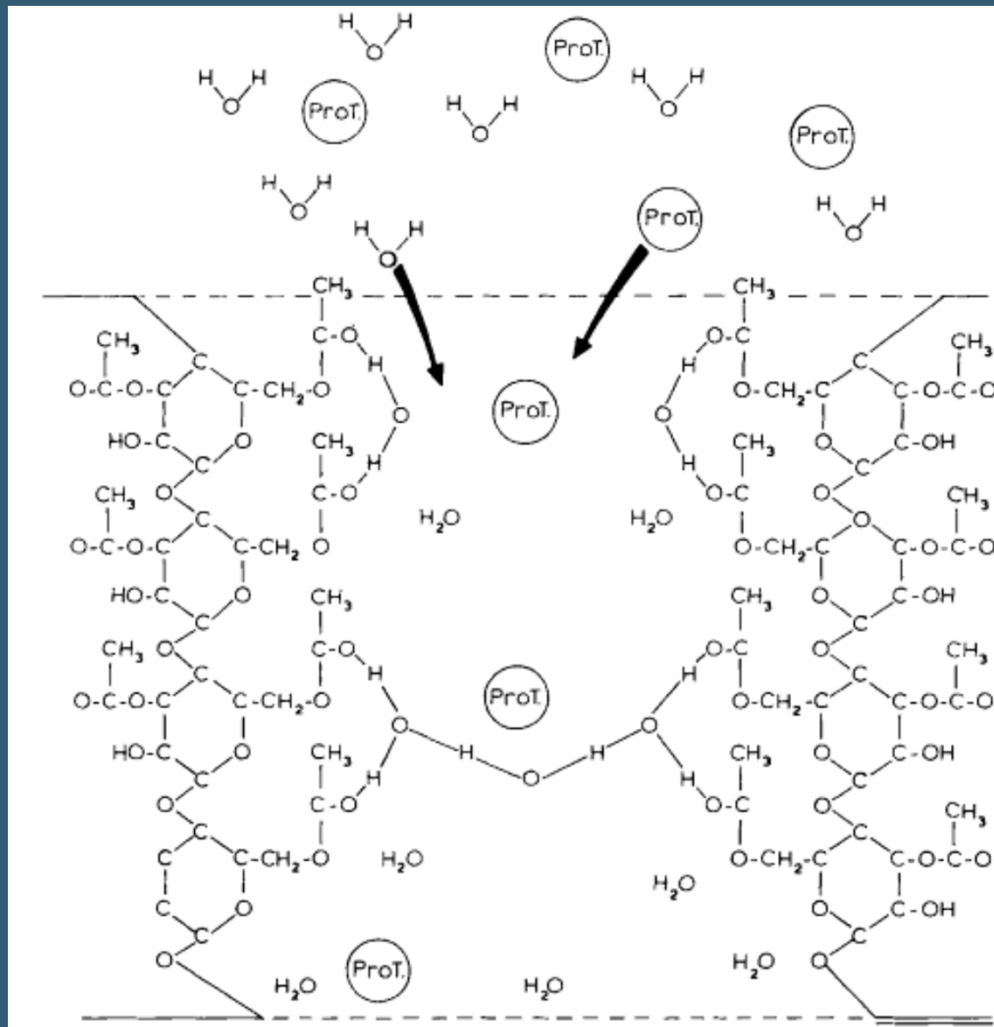
ACETÁT CELULOSY

Složení – acetát celulosy

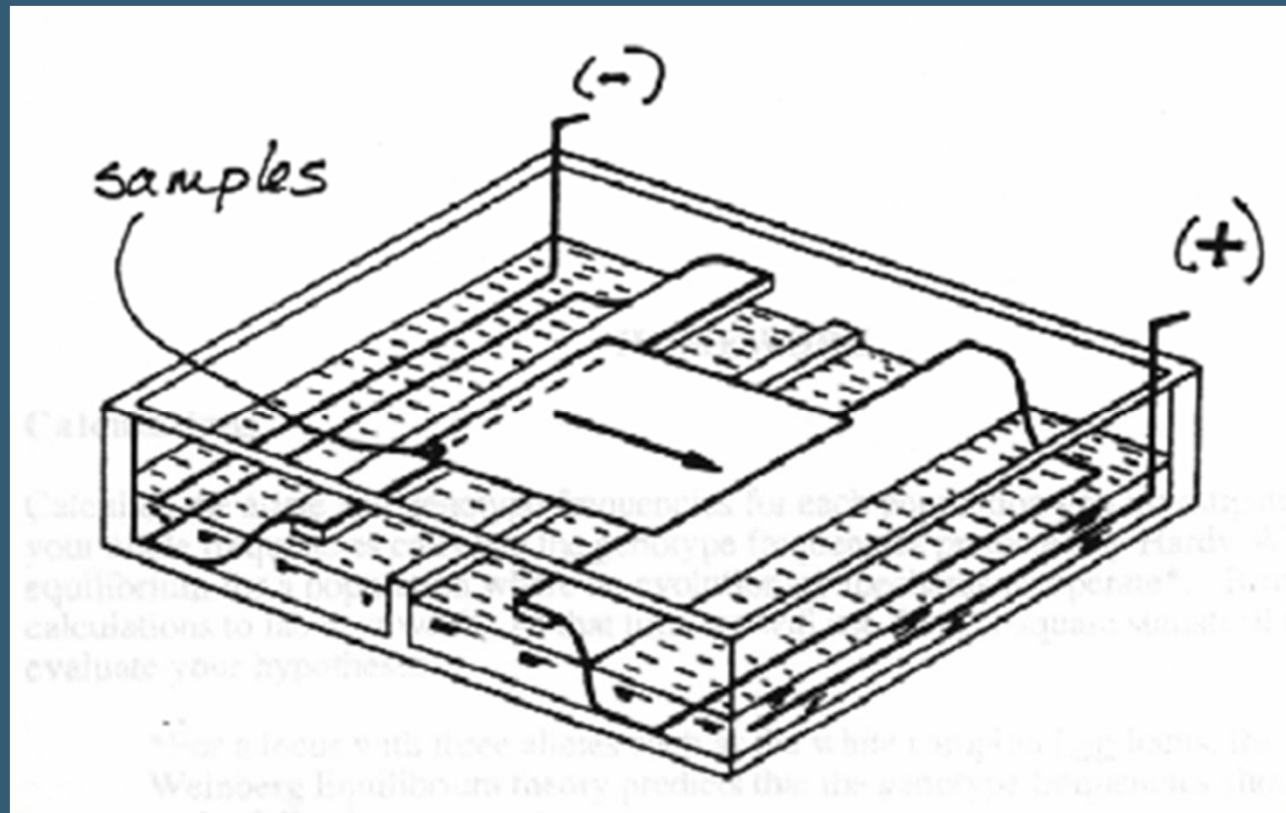
- + Komerčně dostupný
- + Dobré mechanické vlastnosti

Použití : imunoelektroforetické metody,
klinické aplikace

ACETÁT CELULOZY

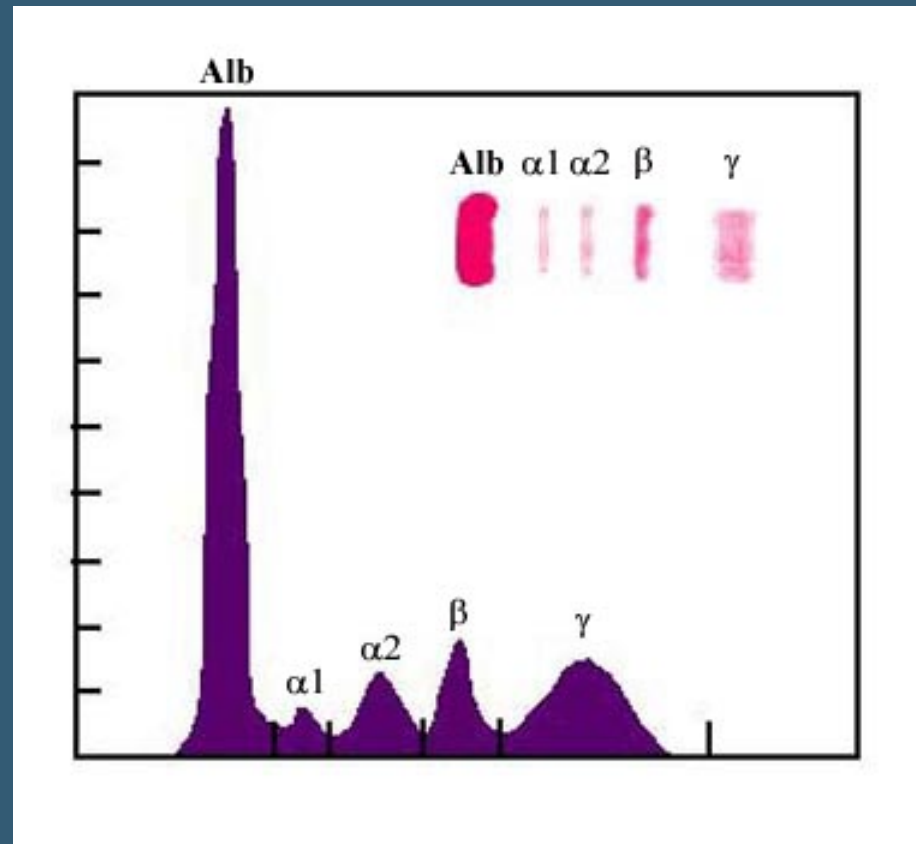
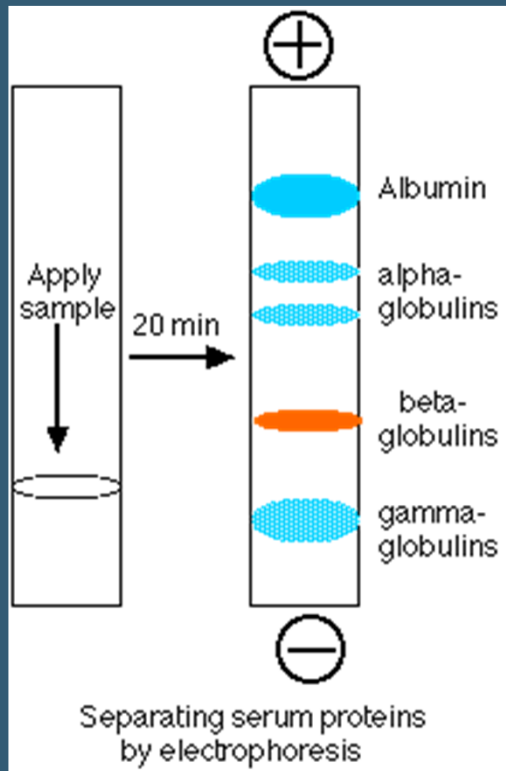


ACETÁT CELULOSY



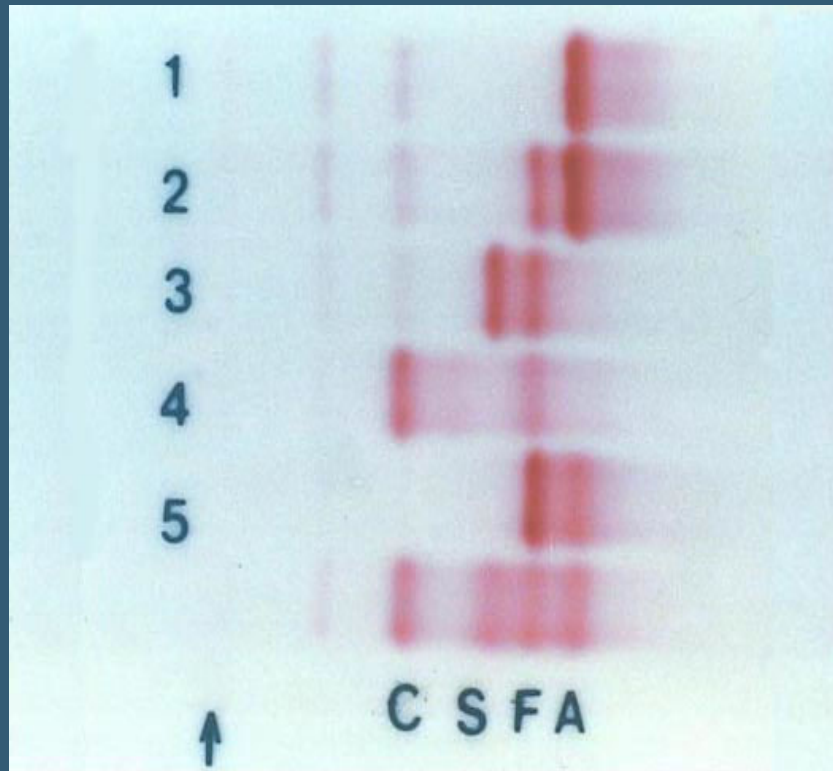
ACETÁT CELULOZY

ANALÝZA SÉROVÝCH BÍLKOVIN



ACETÁT CELULOSY

HEMOGLOBINU



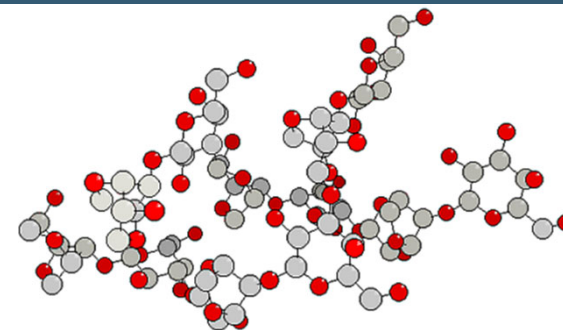
**HPFH –
dědičné přetrvávání
hemoglobinu F (“hereditary
persistence”)**

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

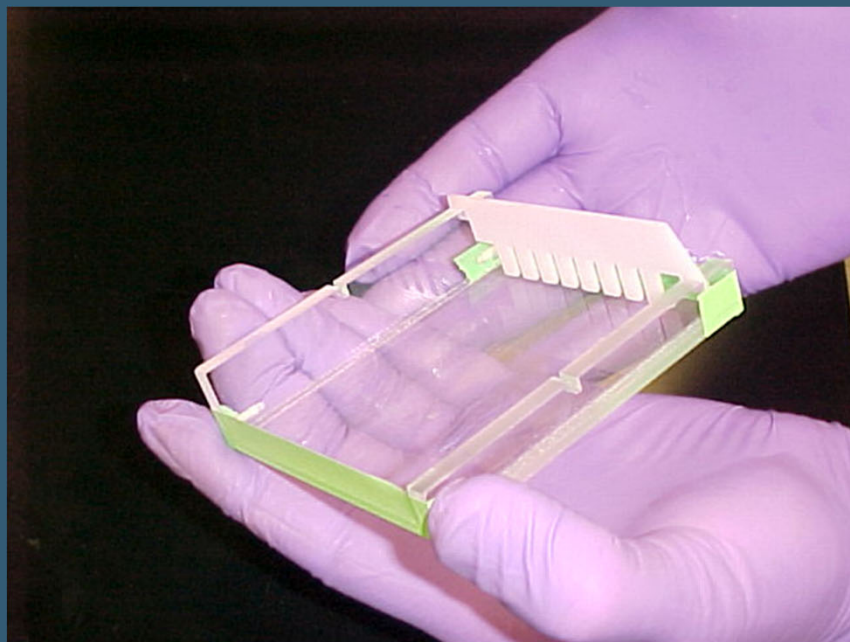


Složení – kopolymer galaktosy a anhydrogalaktosy

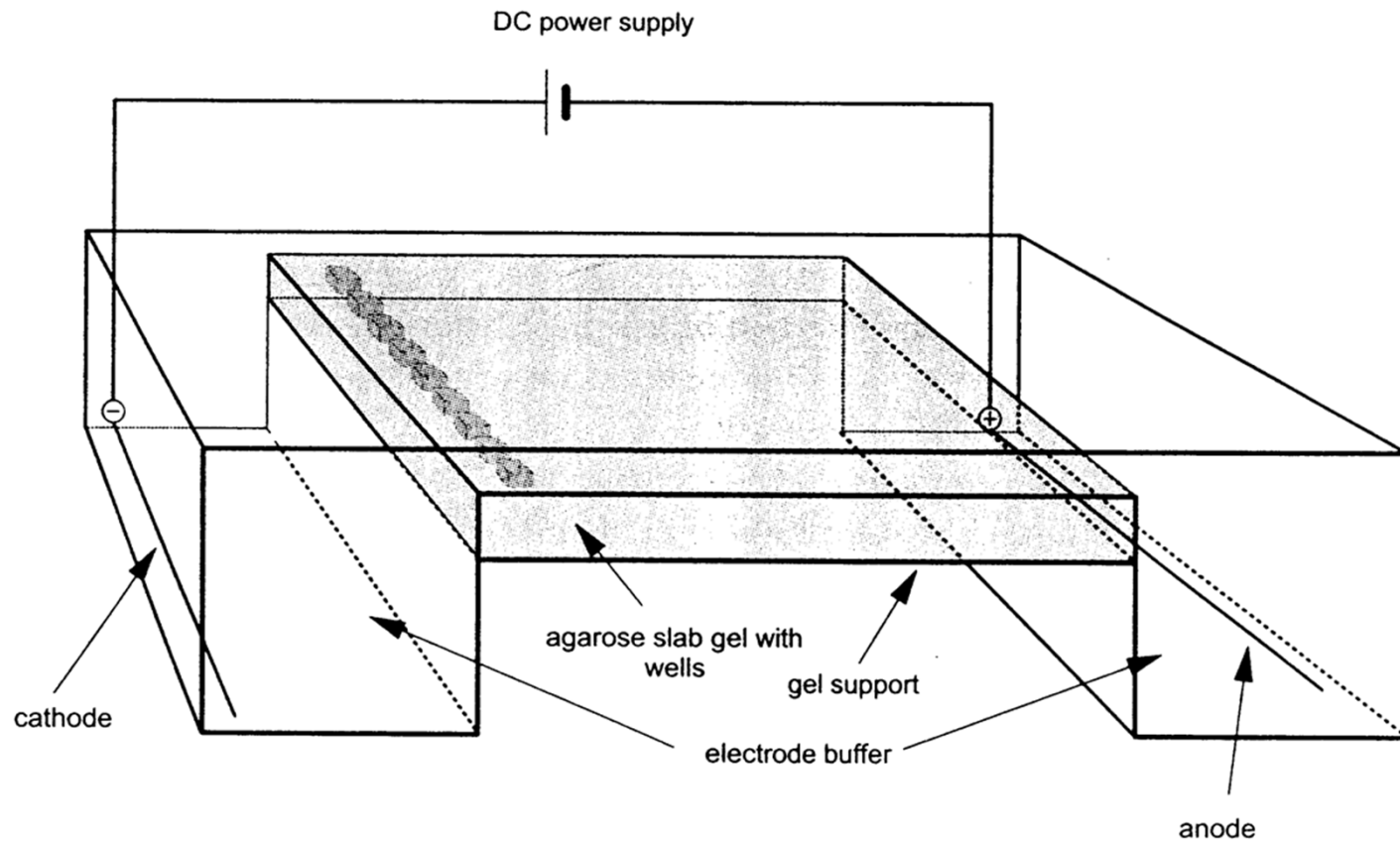
- Přítomnost ionogenních skupin – silný EOF
- + Velké pory
- + Snadná příprava

Použití : imunoelektroforetické metody
elektroforéza NK

AGAR A AGAROSA



AGAR A AGAROSA



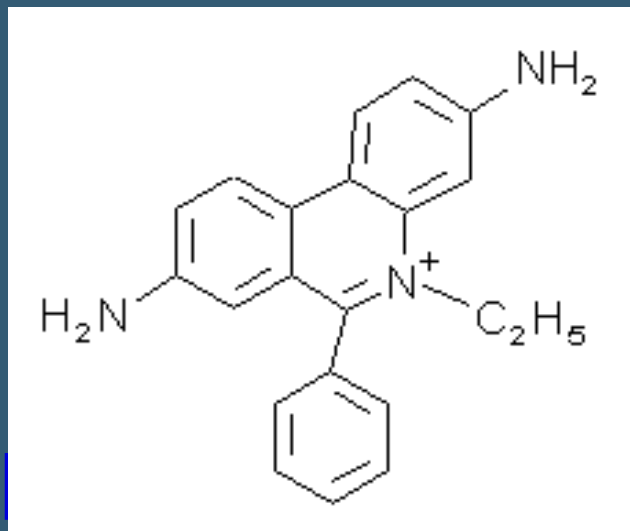
AGAR A AGAROSA



MUNI
SCI

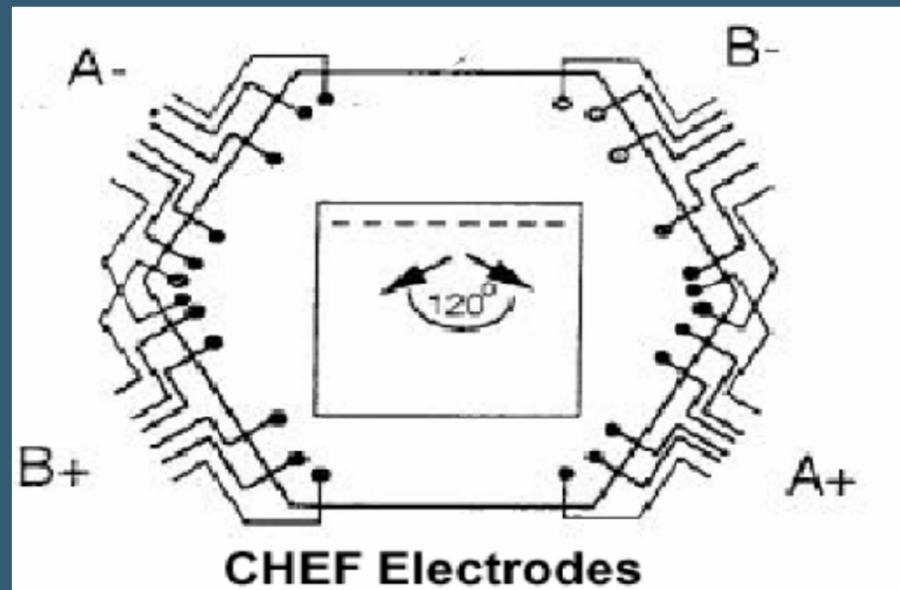
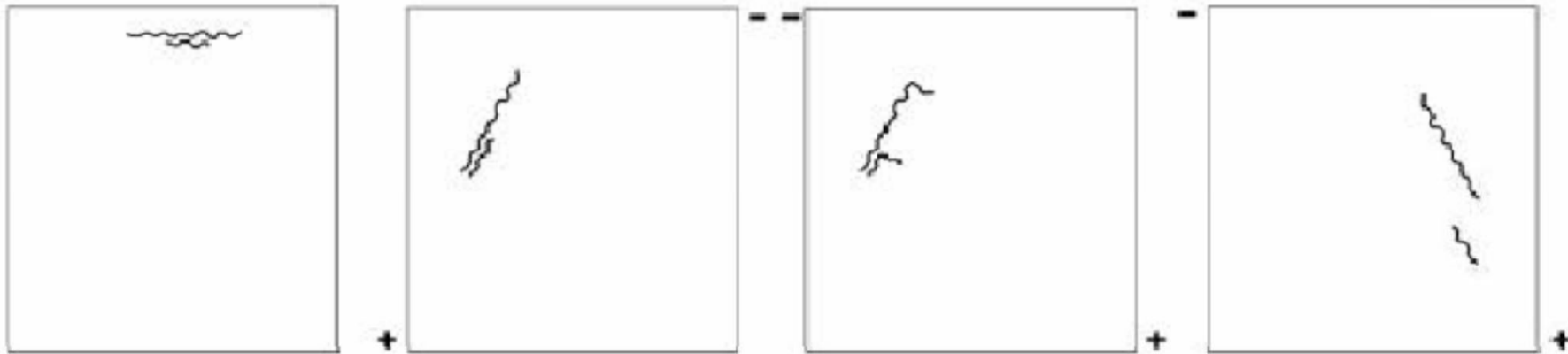
DNA AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

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!



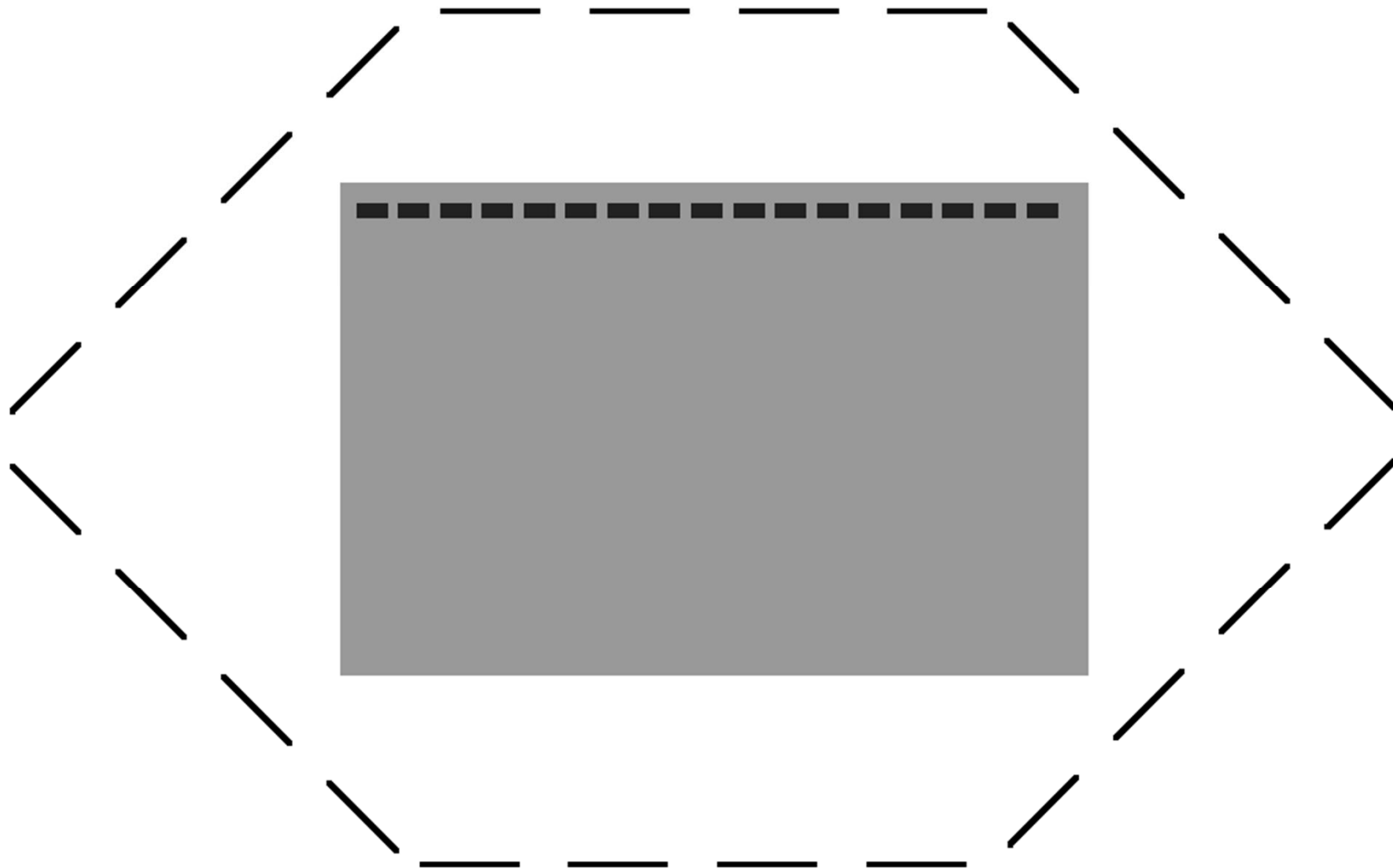
PULSNÍ DNA ELEKTROFORÉZA

20 000 – 12 000 000 PB

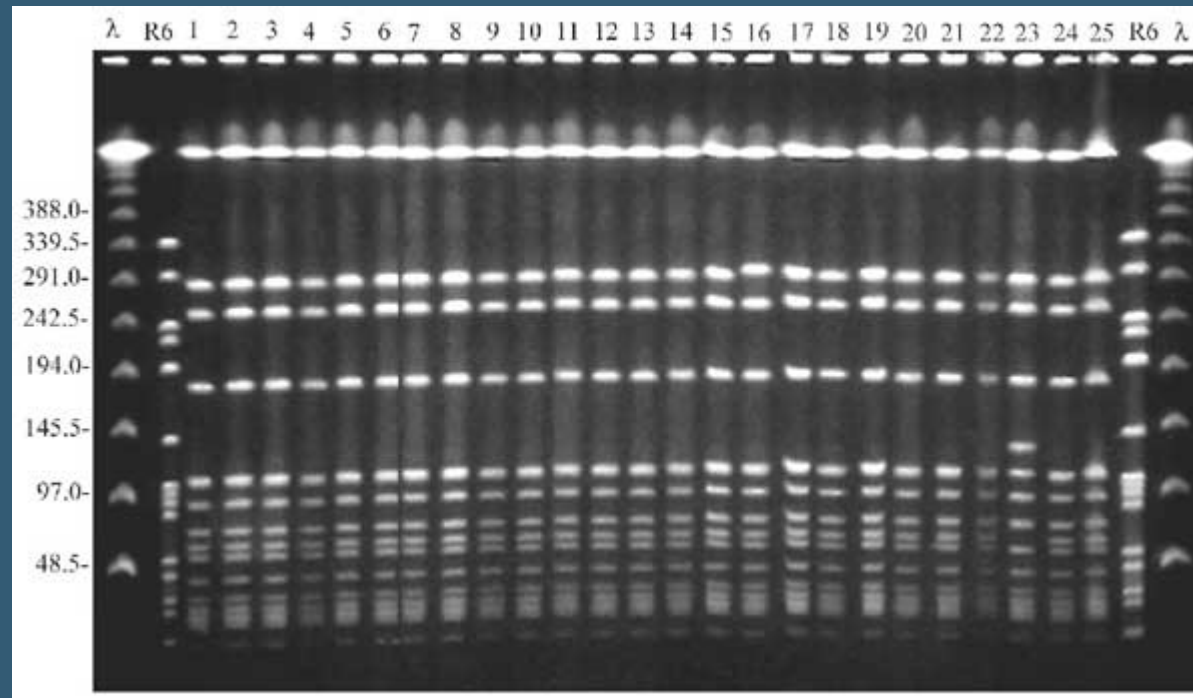


PULSNÍ DNA ELEKTROFORÉZA

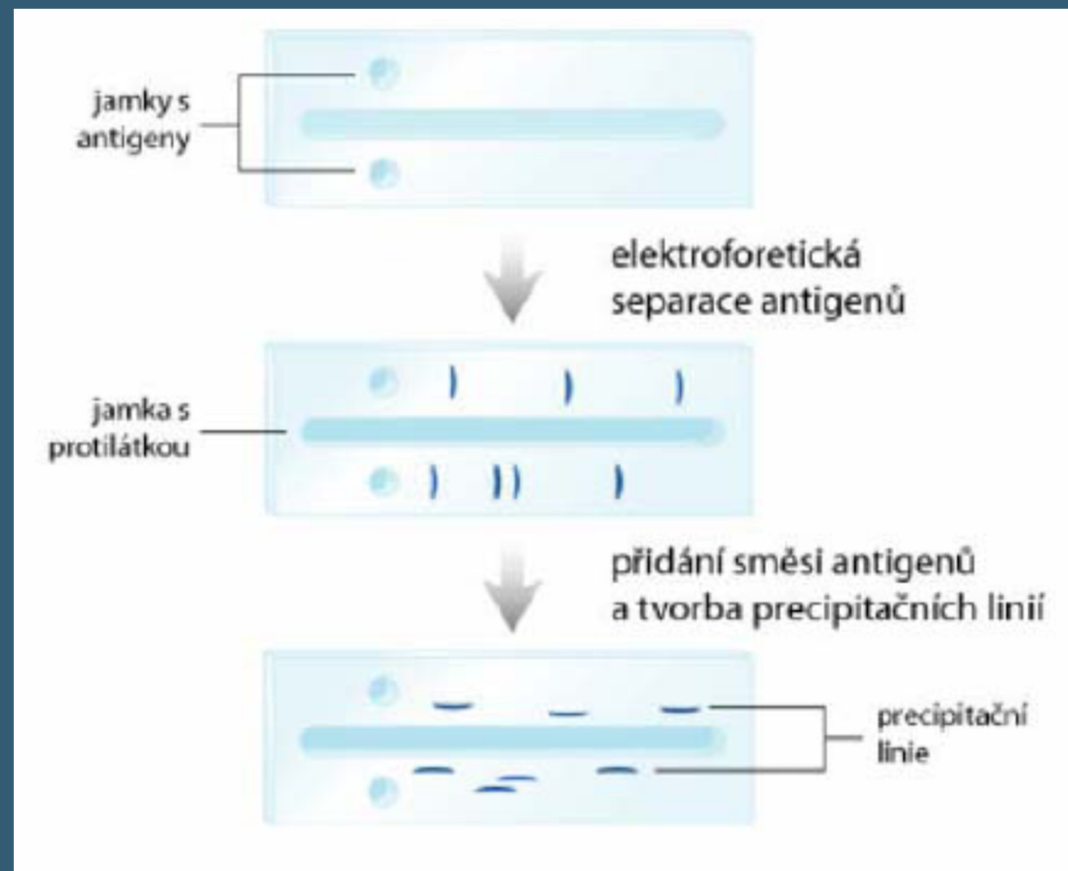
20 000 – 12 000 000 PB



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

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 a NK

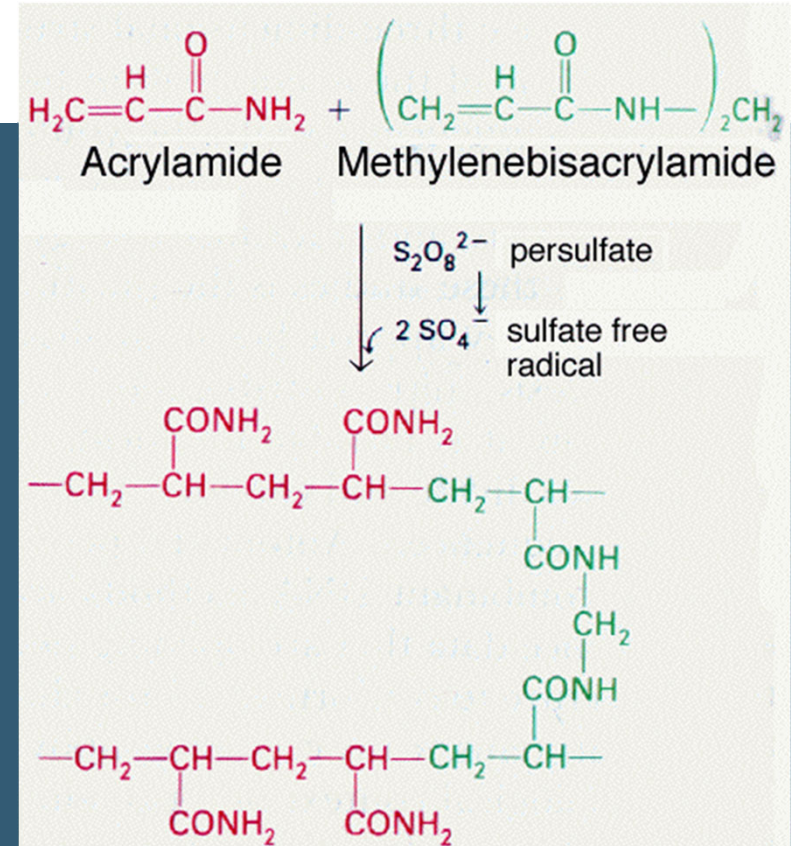
POLYAKRYLAMID - PŘÍPRAVA

Radikálová polymerace

- Katalyzátor – tetramethylethyldiamin (TEMED)

- Iniciátor - chemicky – $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

MUNI - fotochemicky – ribloflavin + UV
SCI



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)

FERGUSONOVA ROVNICE

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

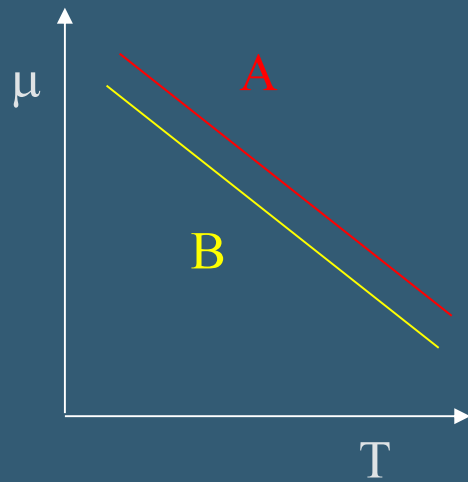
$$\log \mu = \log \mu_0 + K_r [T]$$

μ - mobilita

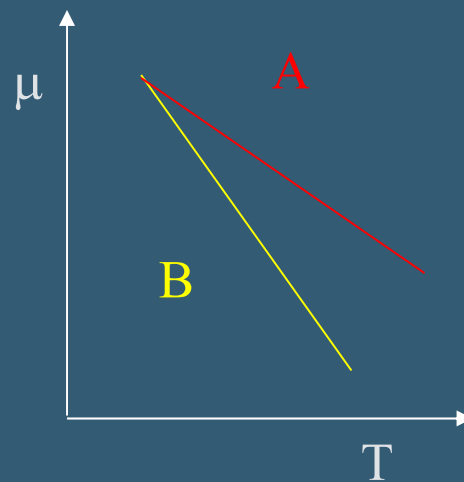
μ_0 - mobilita při limitním zředění

K_r - retardační koeficient

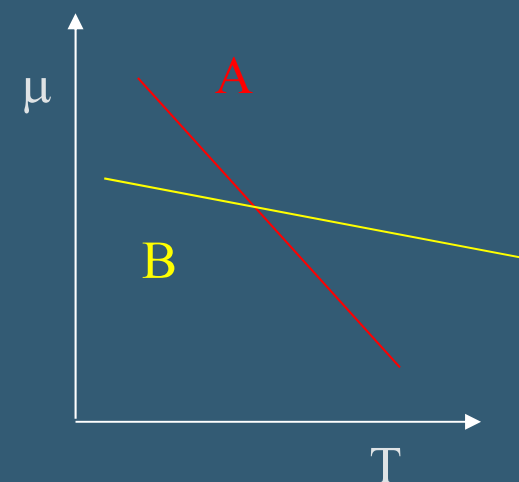
UPLATNĚNÍ FERGUSONOVY ROVNICE



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



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



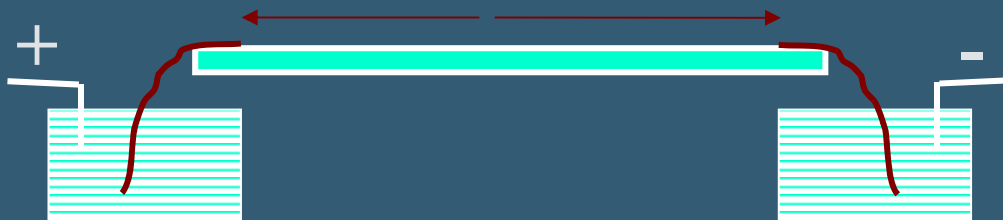
$$\begin{aligned} Mr_A &\neq Mr_B \\ pI_A &\neq pI_B \end{aligned}$$

PROVEDENÍ PAGE

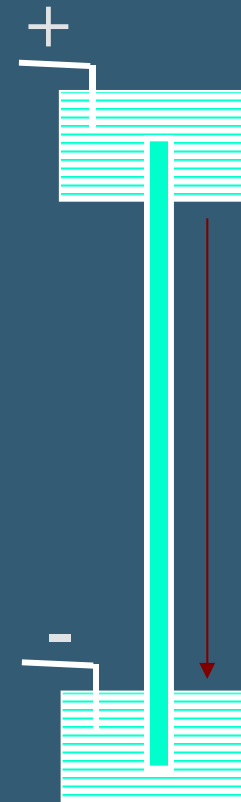
vertikální x horizontální
deskové x trubičkové
homogenní x gradientové
kontinuální x diskontinuální
nativní x SDS PAGE

USPOŘÁDÁNÍ

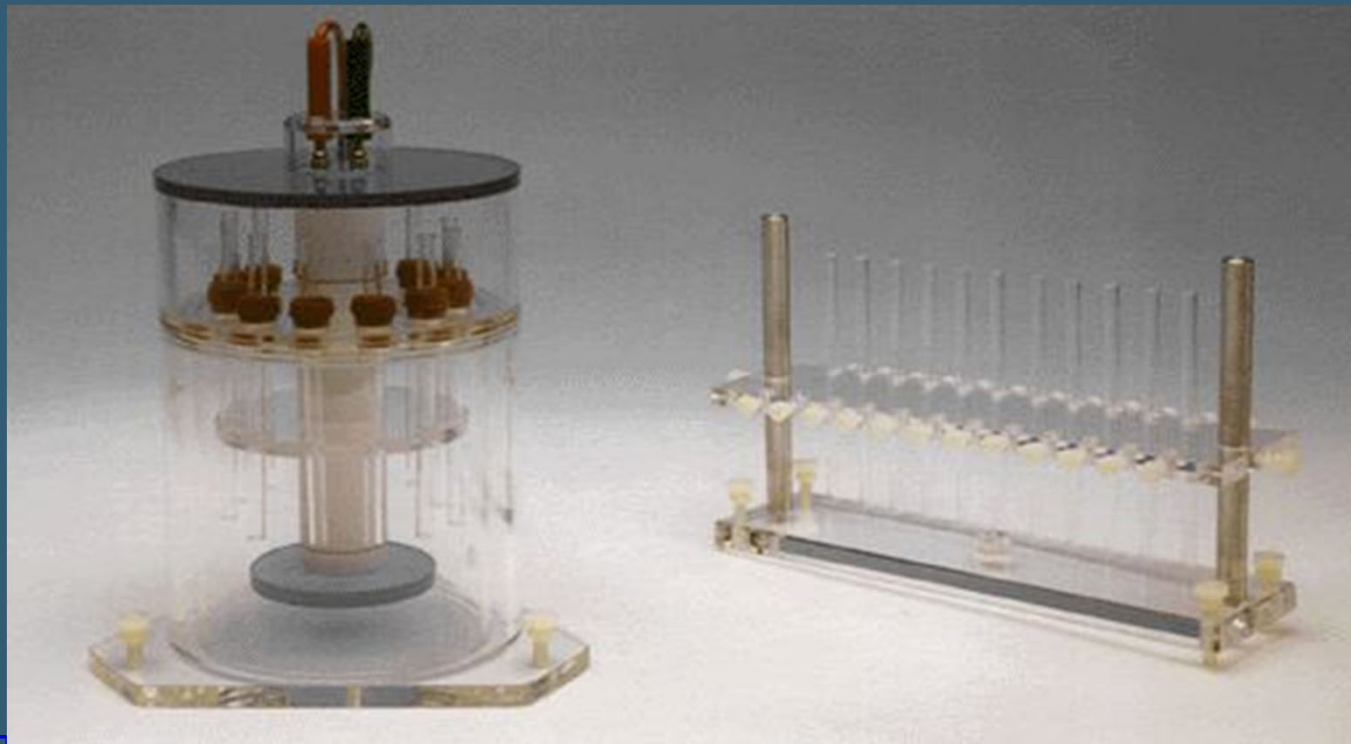
Horizontální



Vertikální



PROVEDENÍ PAGE

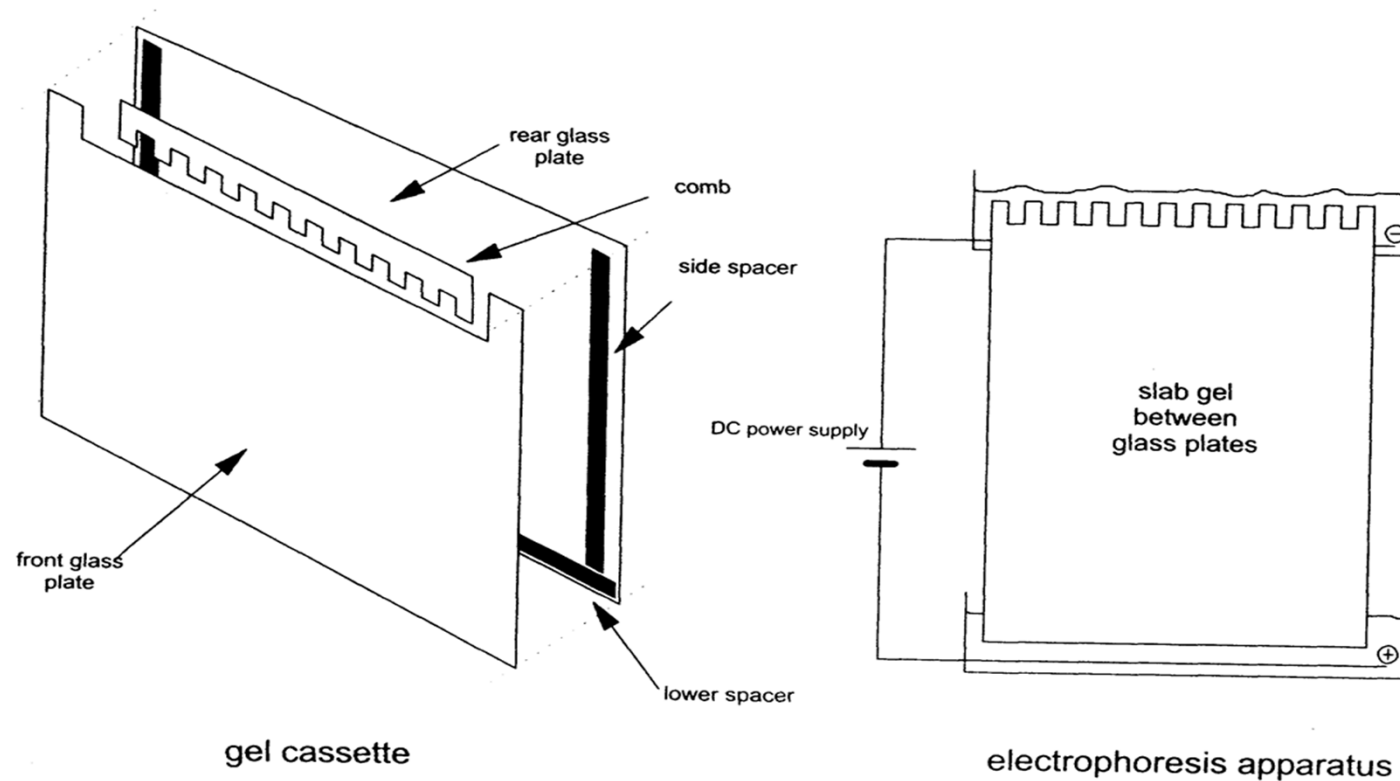


PROVEDENÍ PAGE

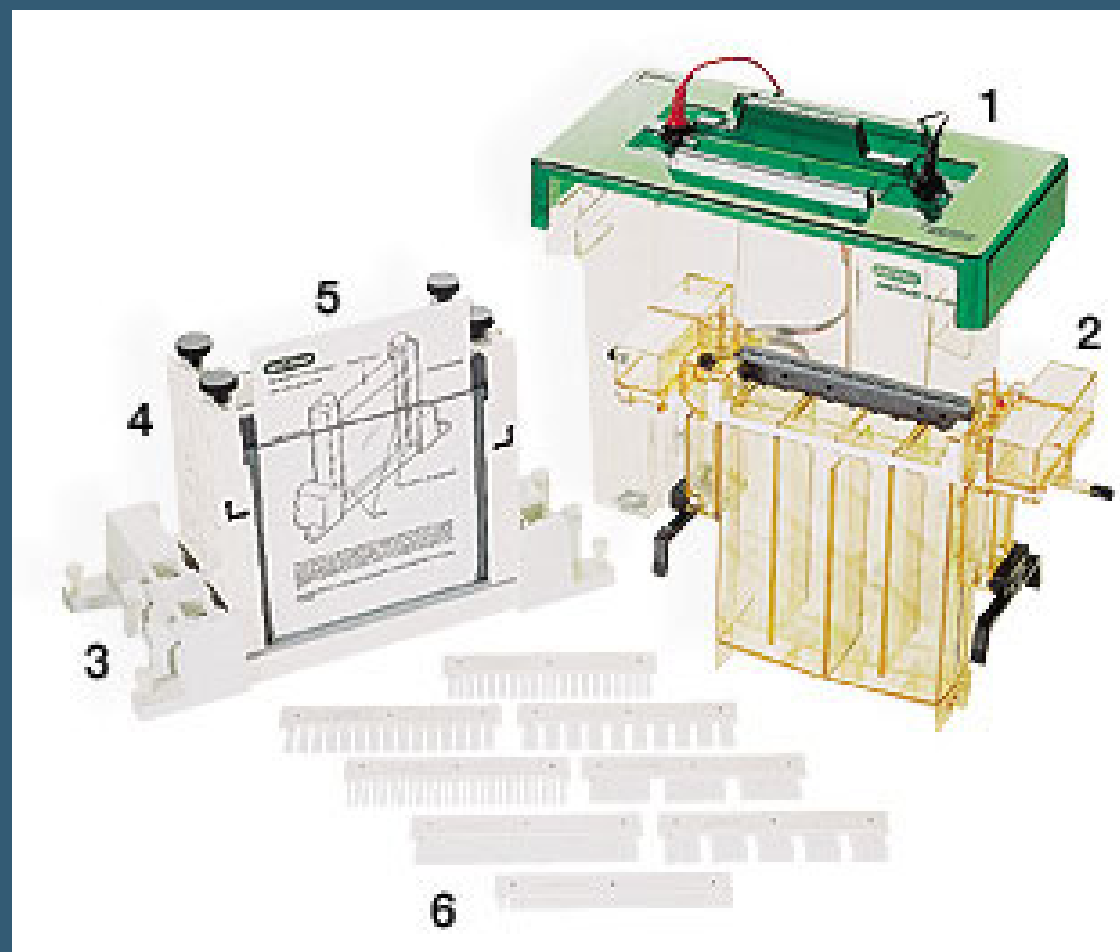


PROVEDENÍ PAGE

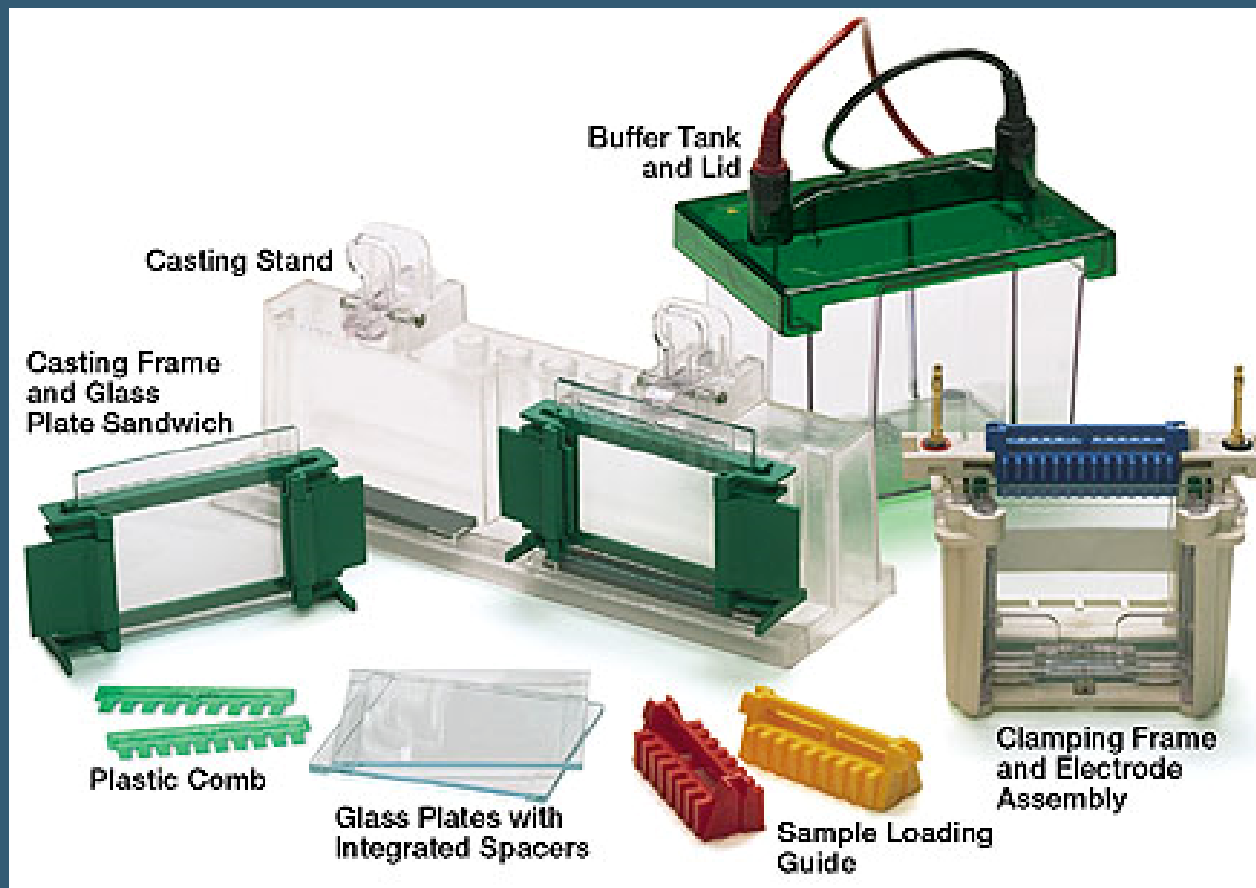
deskové x trubičkové



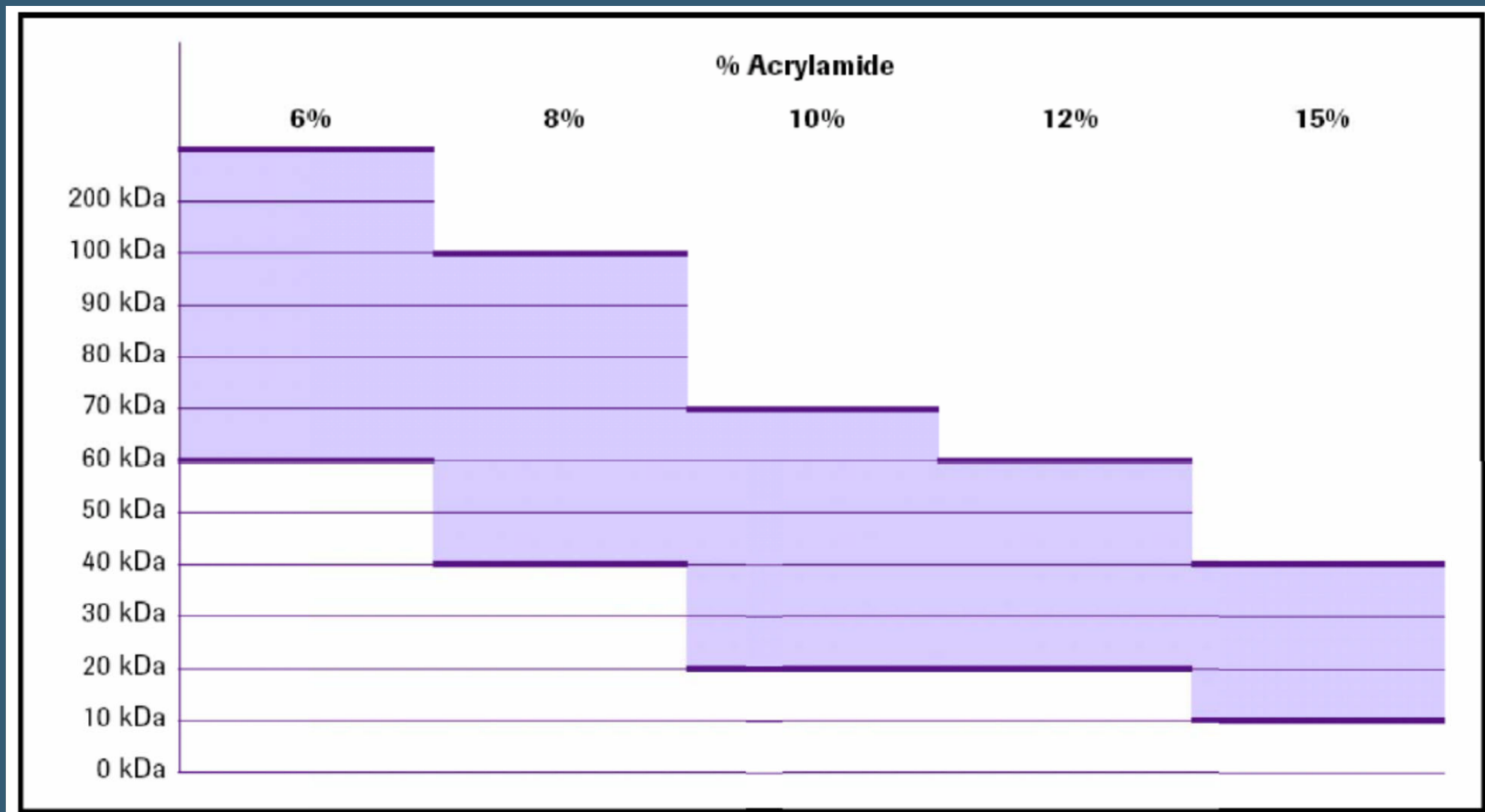
PROVEDENÍ PAGE



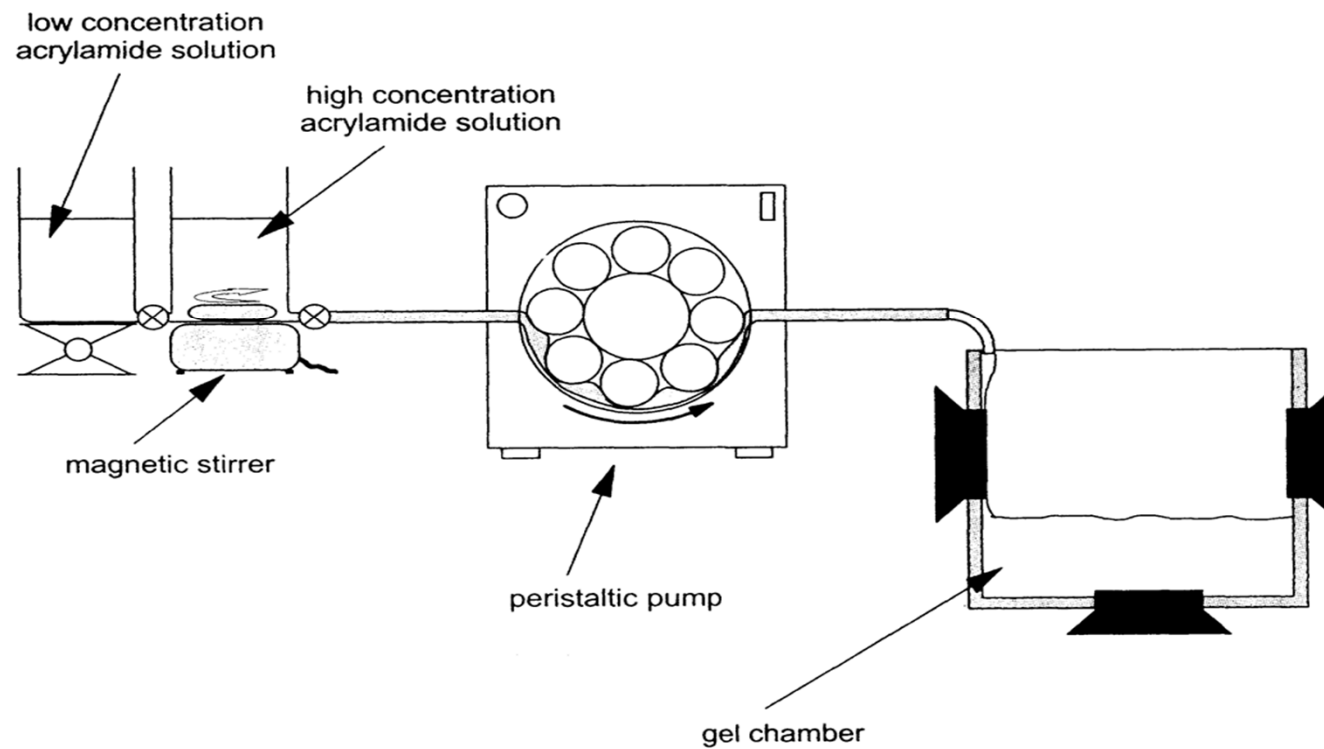
PROVEDENÍ PAGE



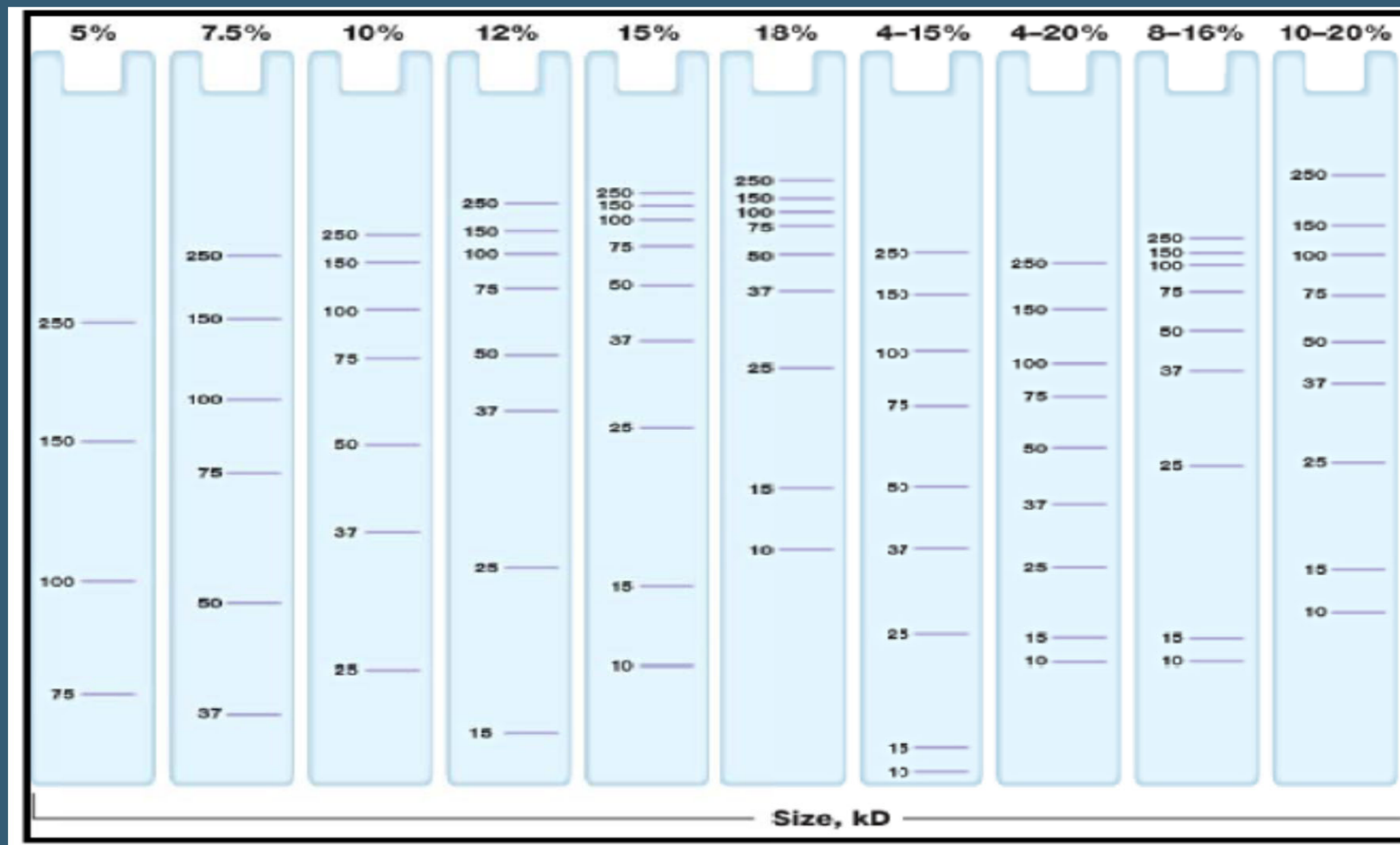
PROVEDENÍ PAGE



PROVEDENÍ PAGE

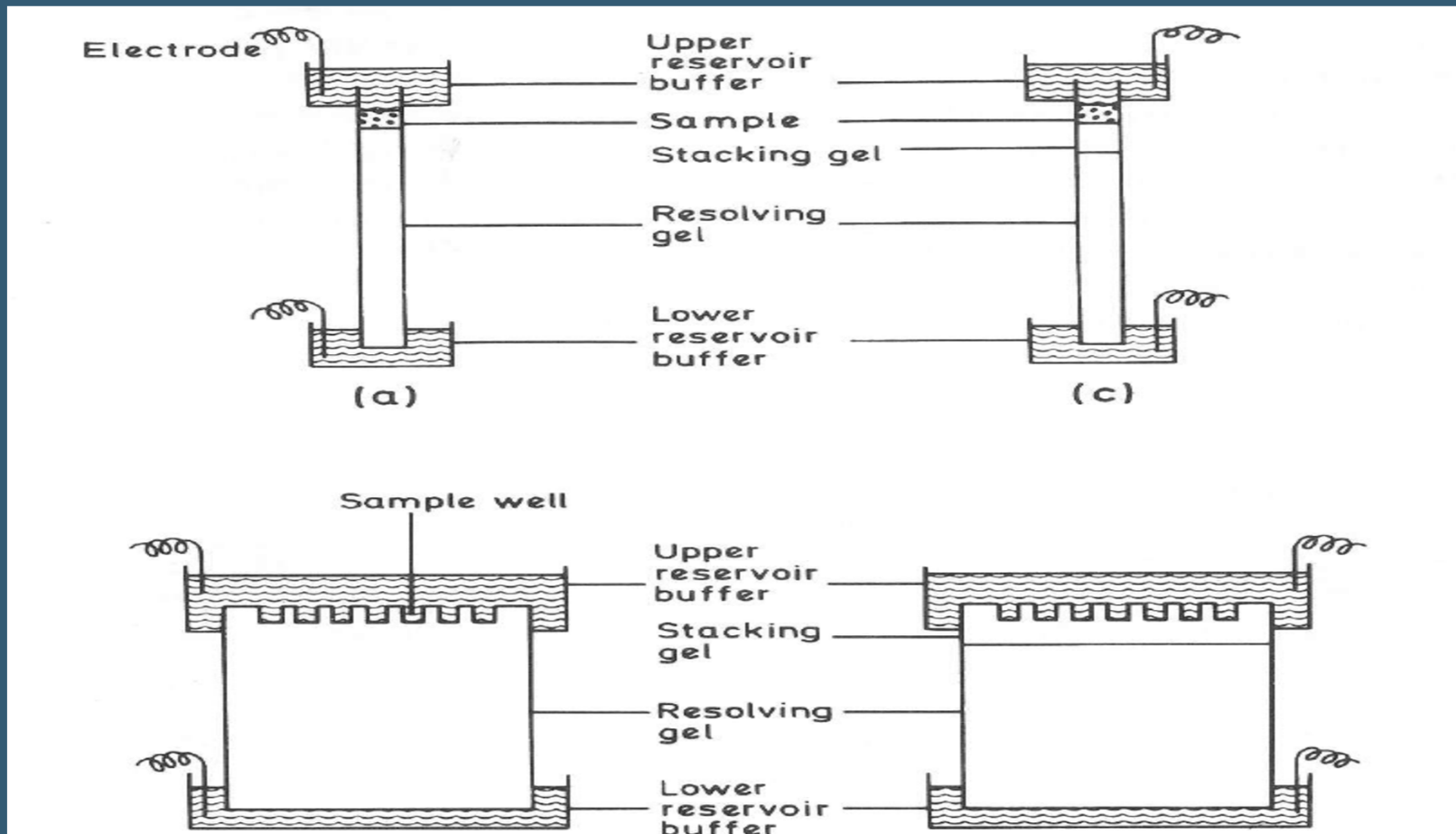


PROVEDENÍ PAGE

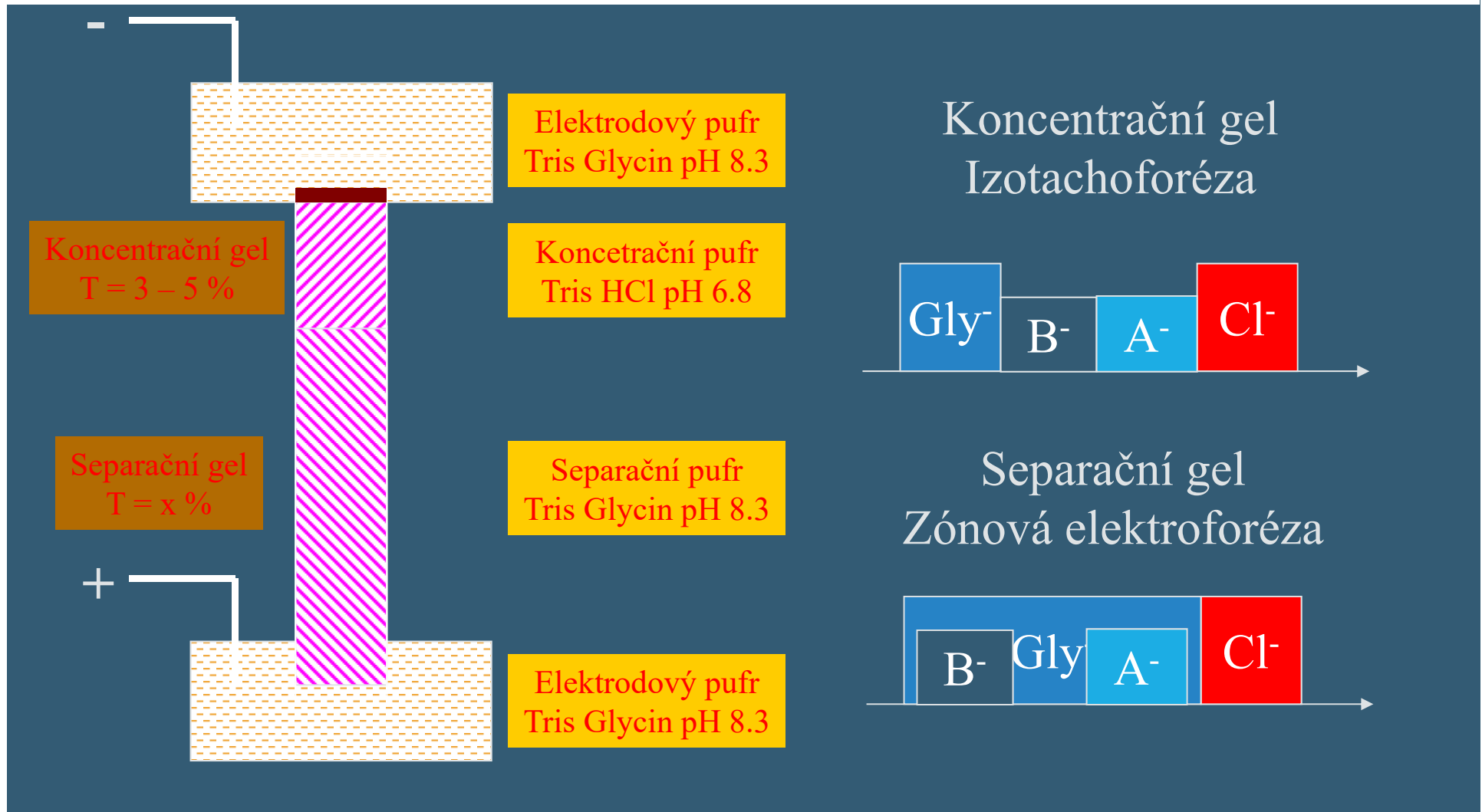


PROVEDENÍ PAGE

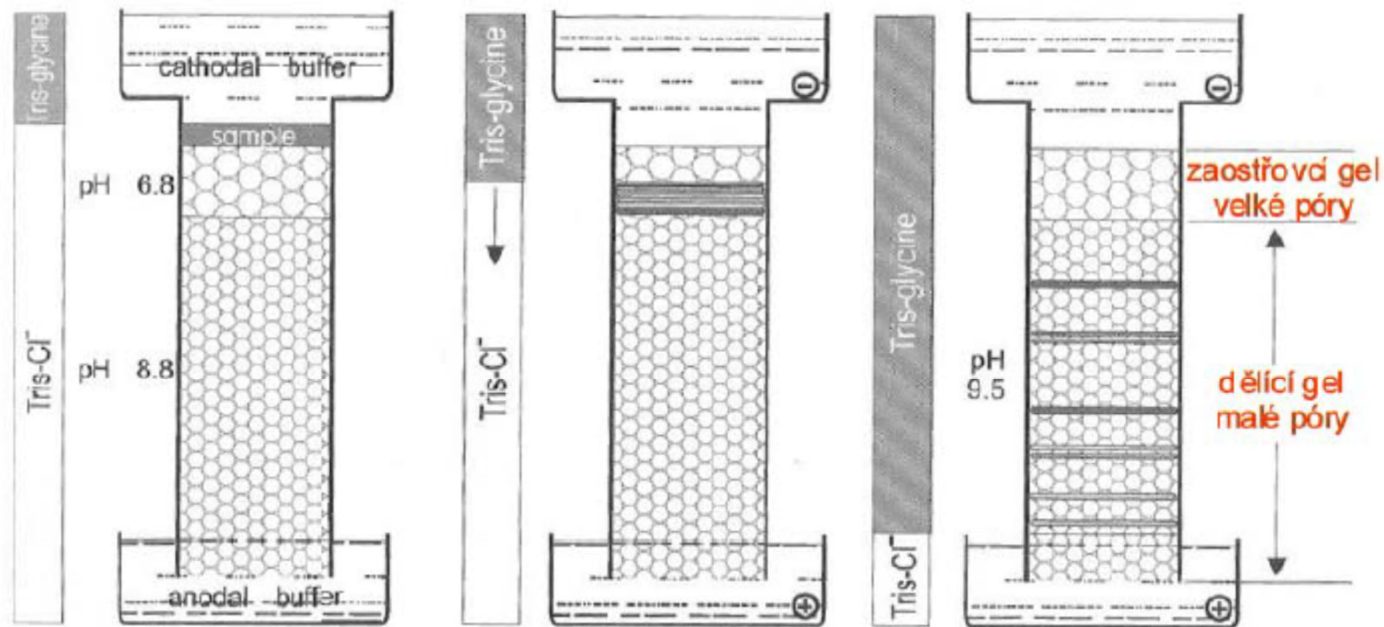
kontinuální x diskontinuální



DISKONTINUÁLNÍ PAGE ORSTEIN, DAVIS

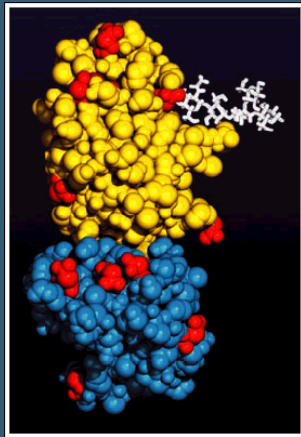
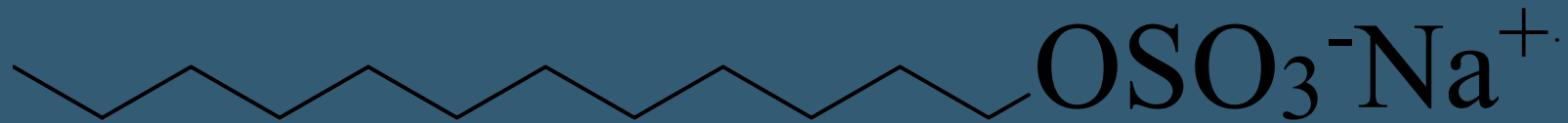


DISKONTINUÁLNÍ PAGE ORSTEIN, DAVIS

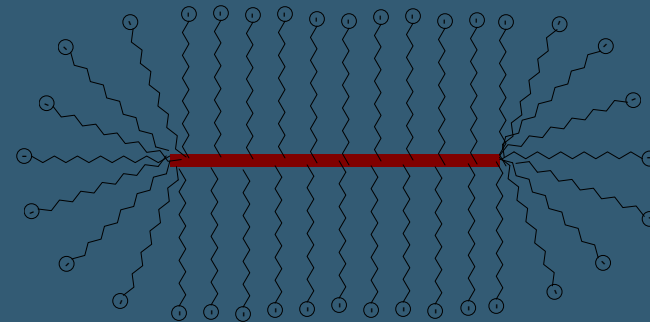


princip zaostřování

SDS PAGE

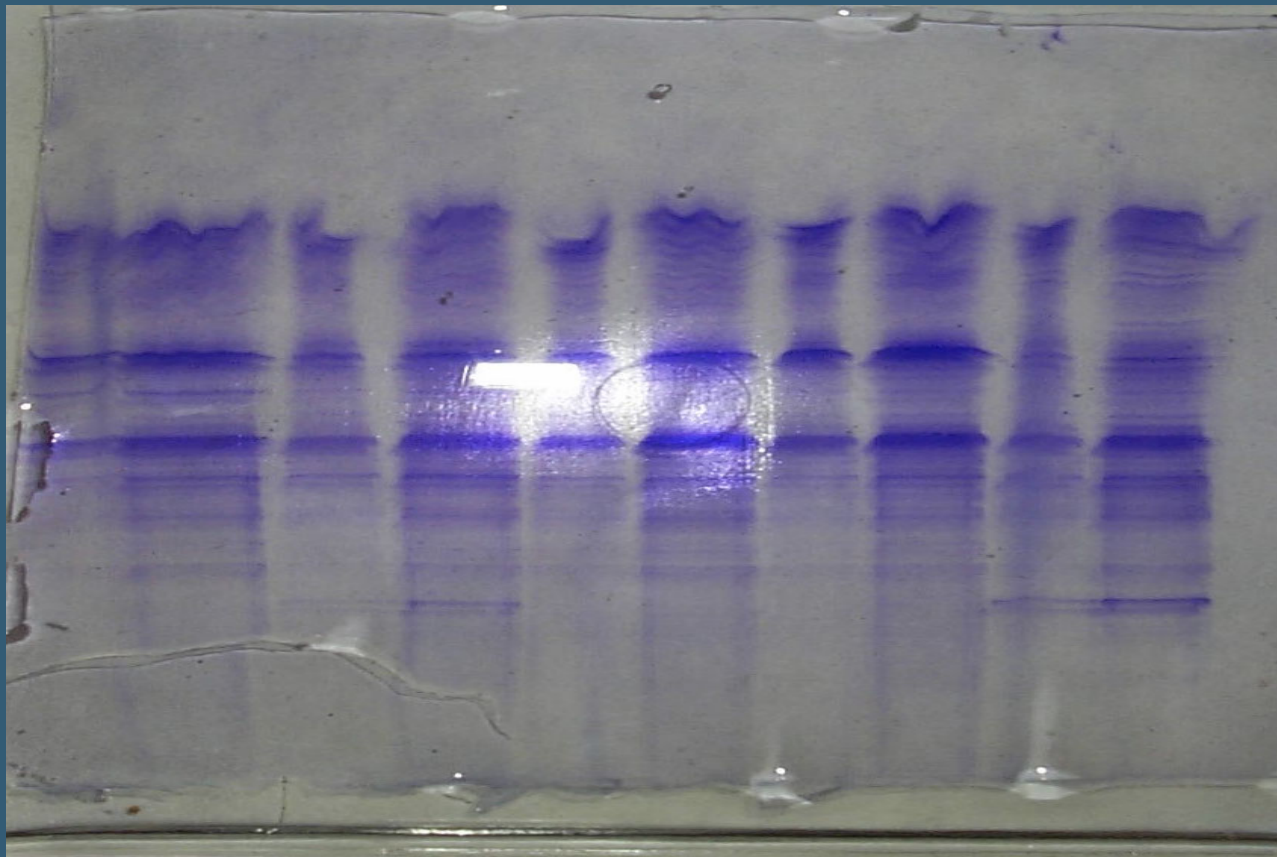


+

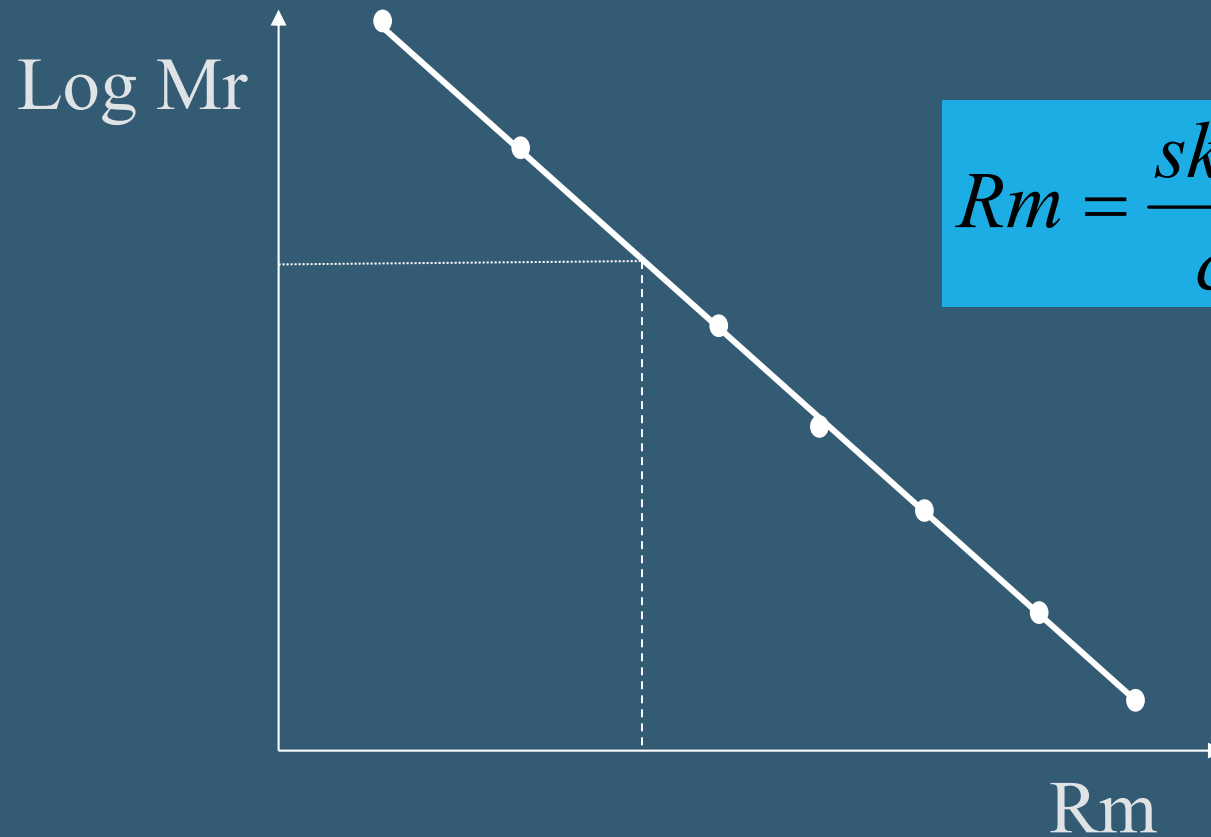


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

SDS PAGE

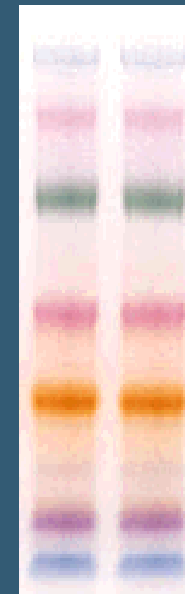
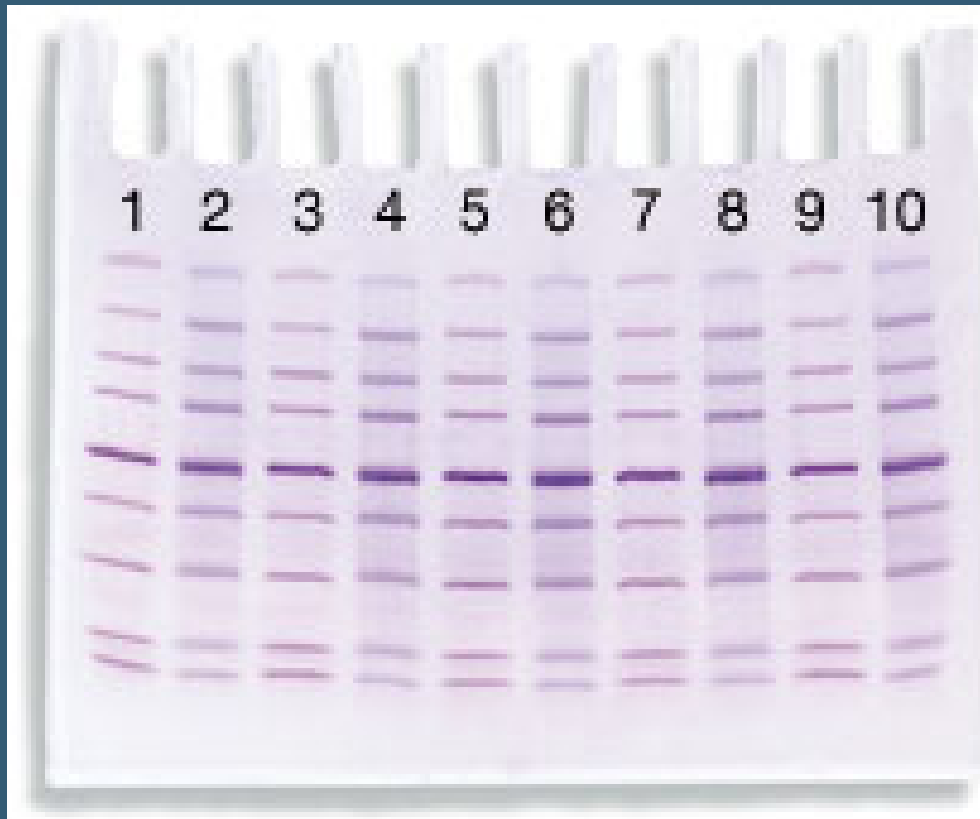


STANOVENÍ M_r POMOCÍ SDS PAGE



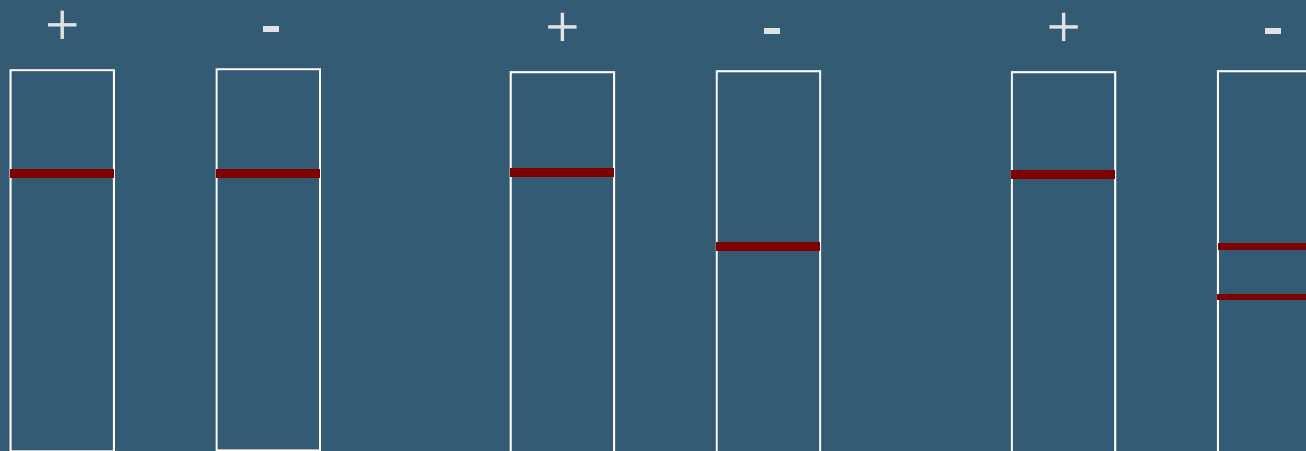
$$R_m = \frac{\text{skvrna}}{\text{čelo}}$$

STANOVENÍ MR POMOCÍ SDS PAGE - STANDARDY

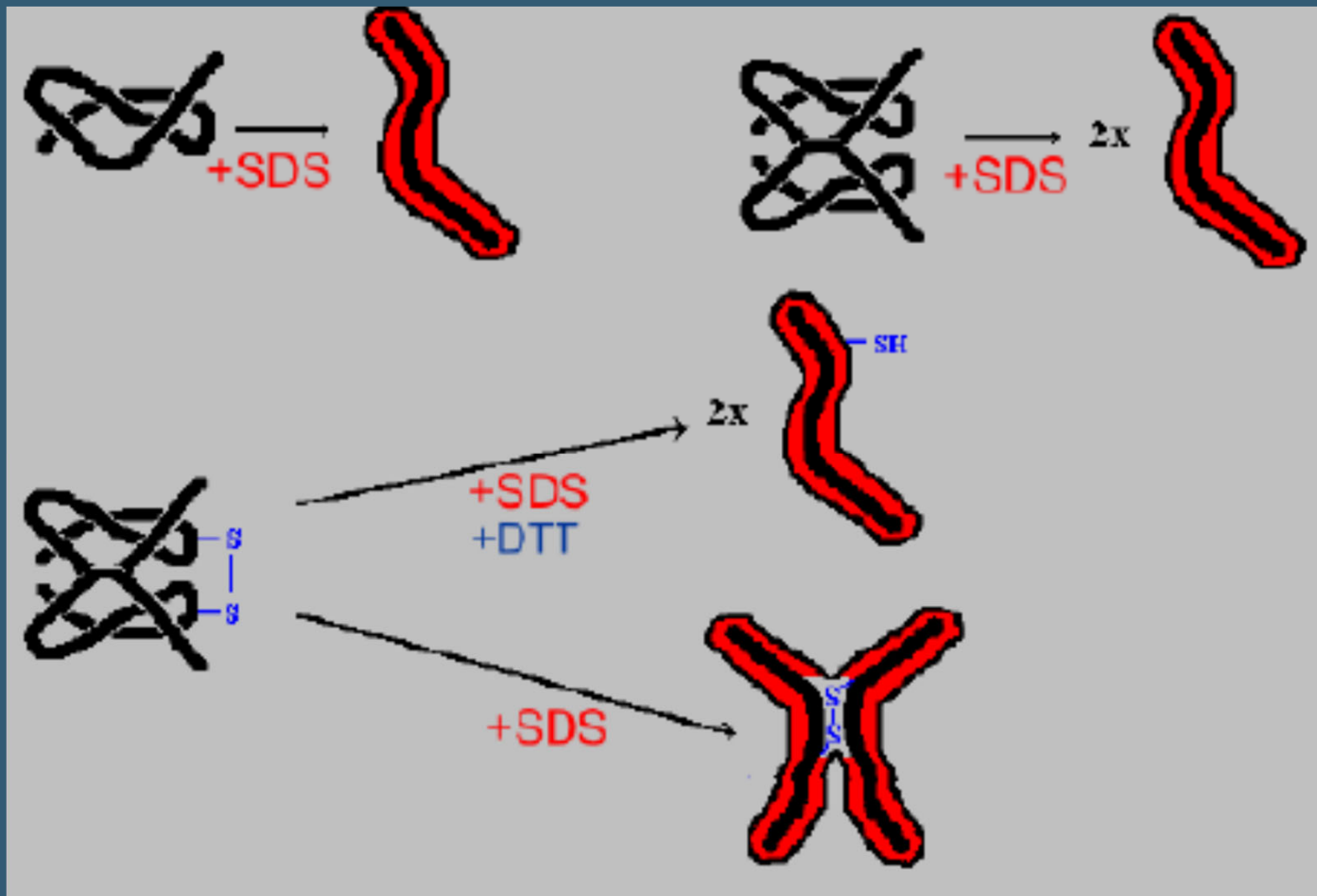


POUŽITÍ SDS PAGE

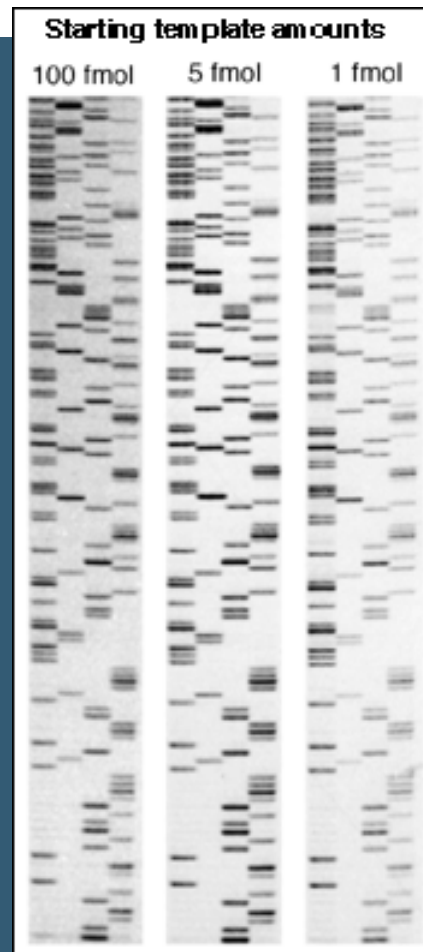
- Stanovení M_r
- Analýza komplexních směsí
- Sledování purifikace bílkovin
- Stanovení podjednotkového složení



STANOVENÍ Mr POMOCÍ SDS REDUKUJICÍ X NEREDUKUJÍCÍ



PAGE - SEKVENACE DNA



CHEMICKÁ METODA

Maxam-Gilbertova metoda

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

BÁZE

G

G + A

C

C + T

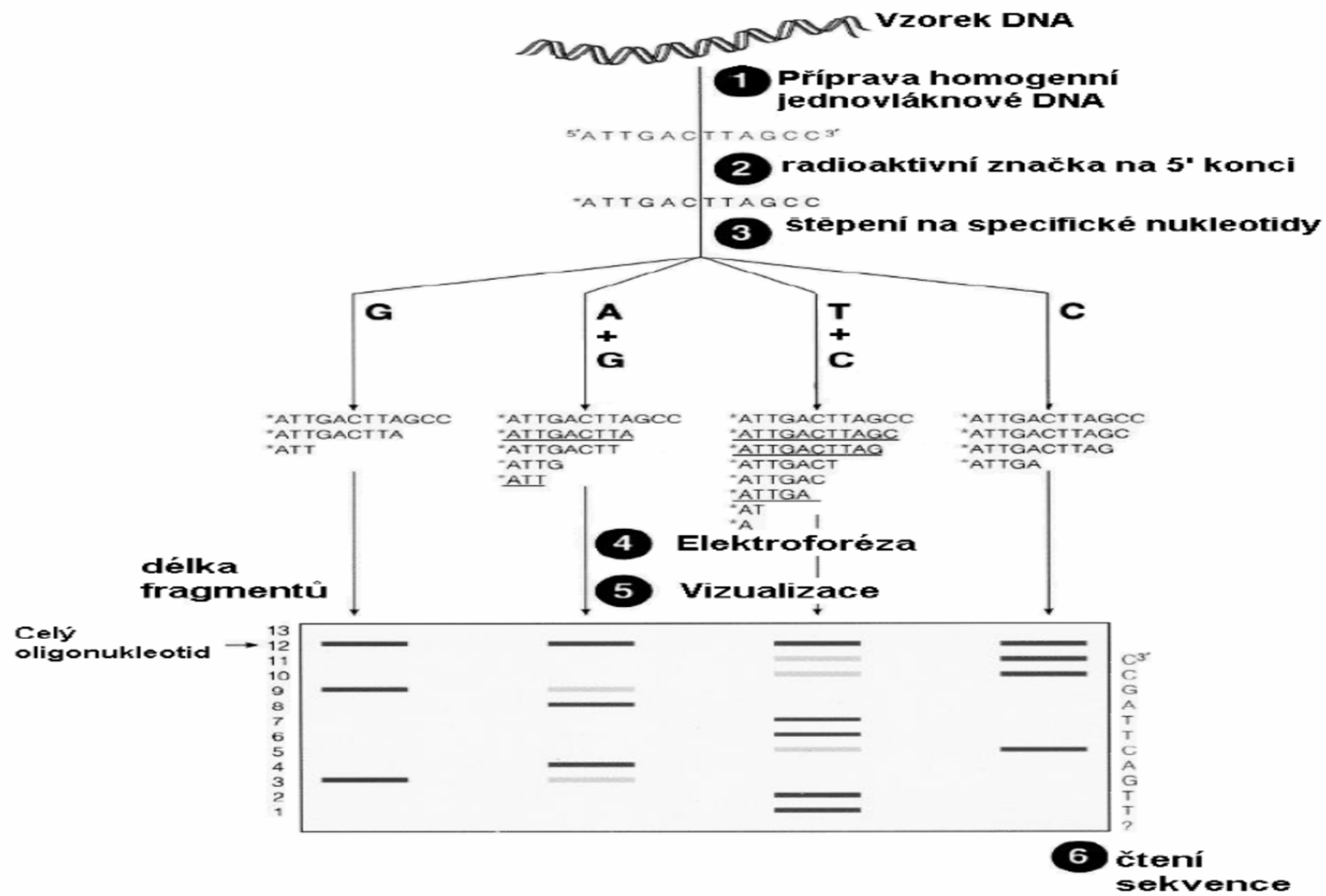
CHEMIKÁLIE

dimethylsufoxid+ piperidin

dimethylsufoxid+ piperidin + k.mravenčí

hydrazin/chlorid sodný+ piperidin

hydrazin + piperidin



ENZYMOVÁ METODA

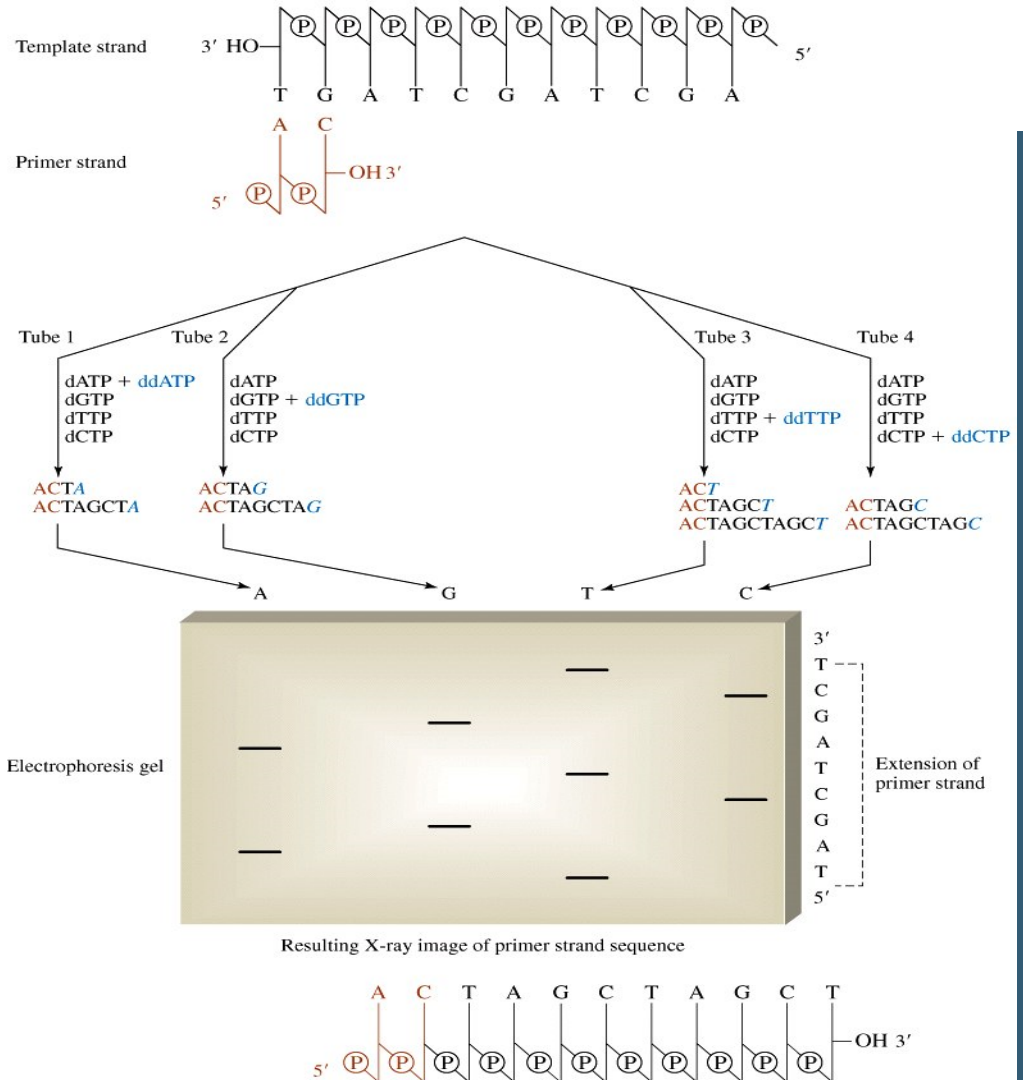
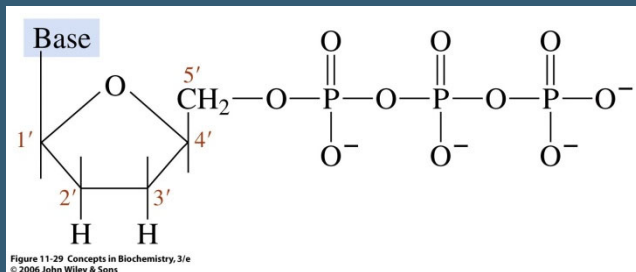
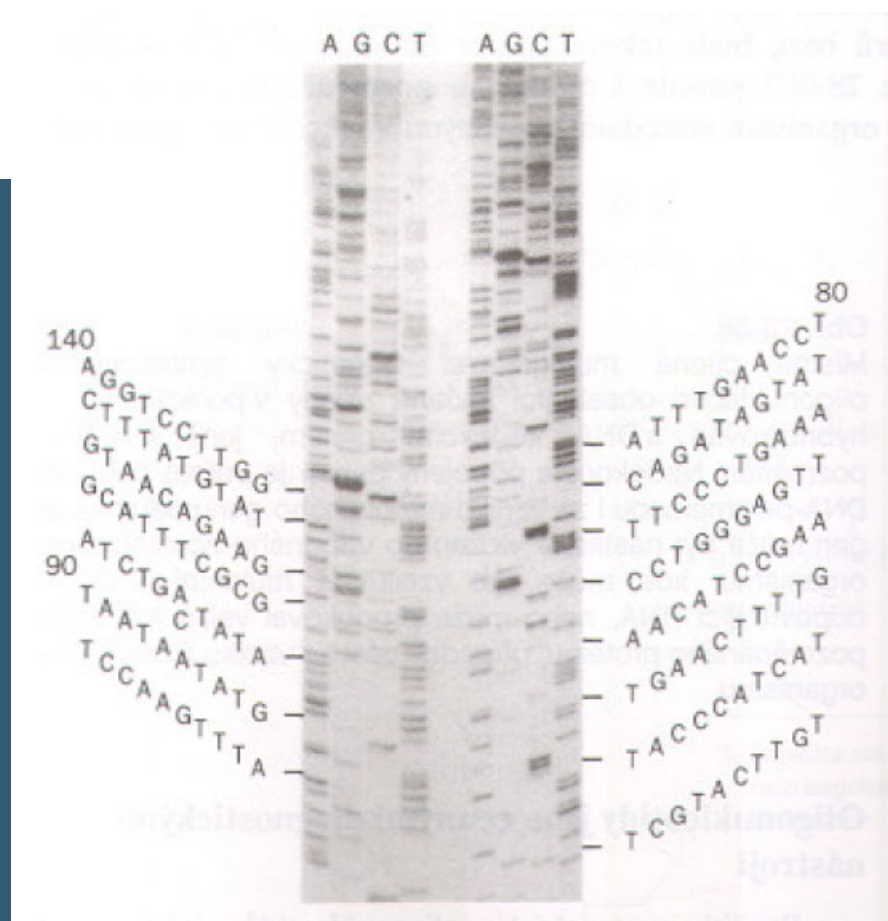
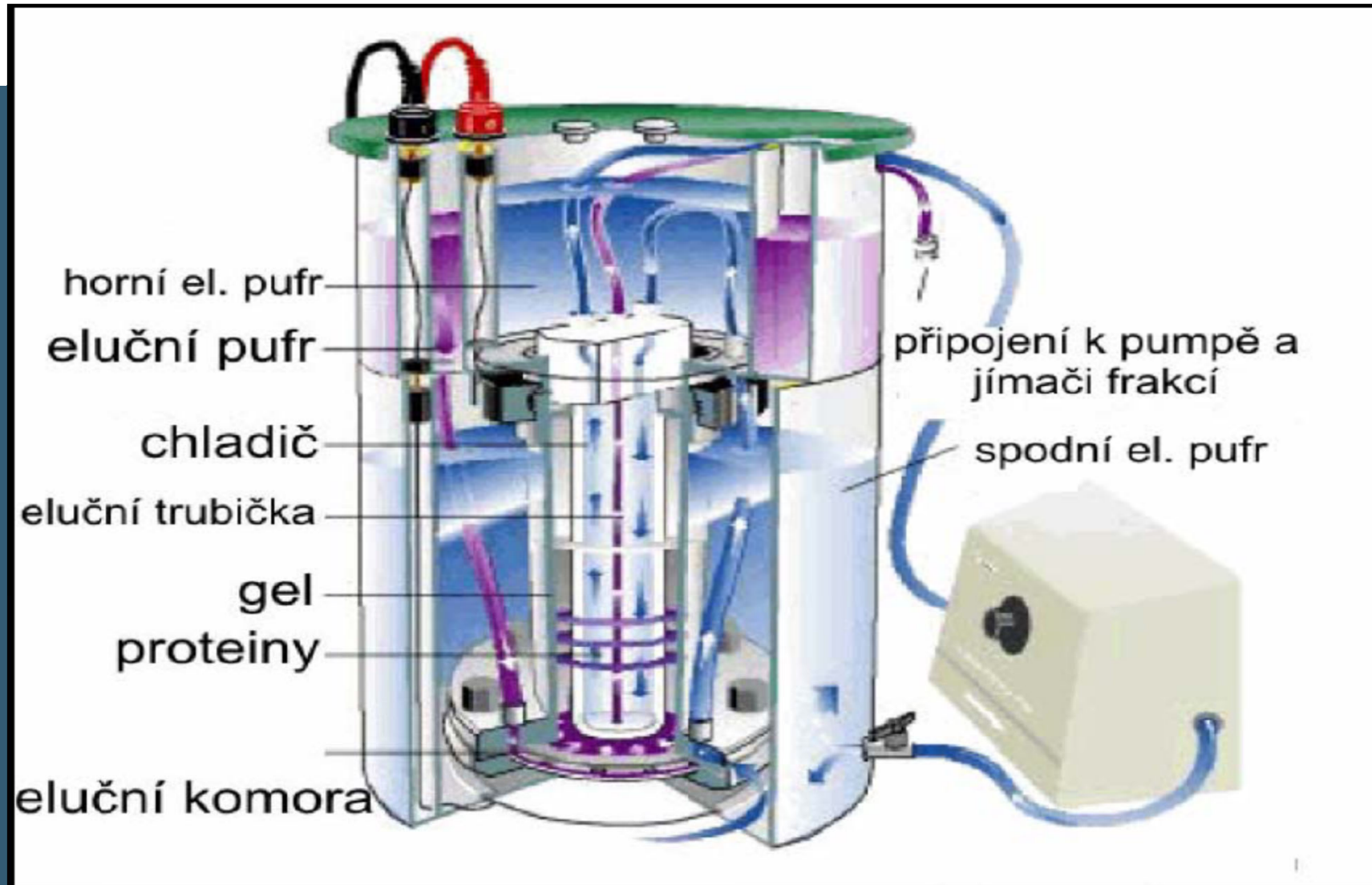


Figure 11-30 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons



PREPARATIVNÍ PAGE



AUTOMATIZACE PAGE FAST-SYSTEM

