

# Elektromigrační metody

# Podstata

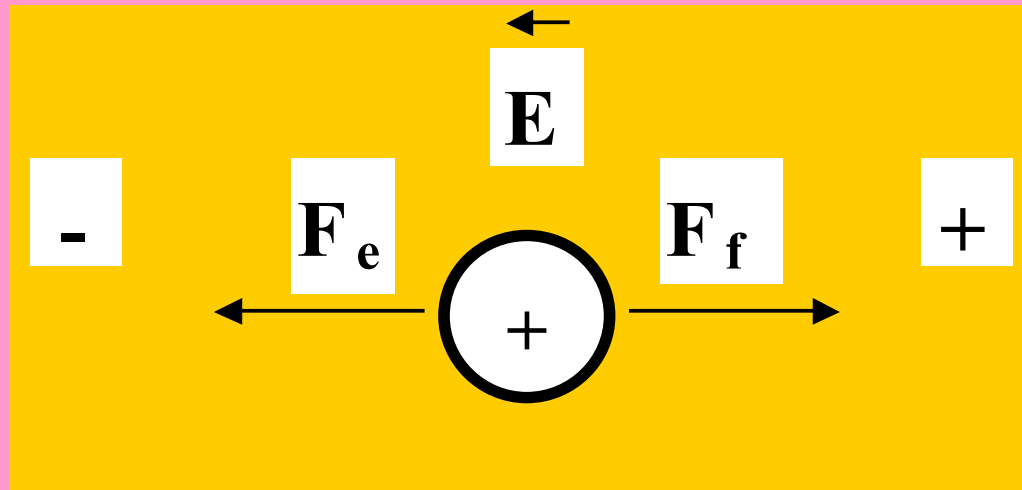
*„Pohyb elektricky nabitých částic  
v elektrickém poli“*

# Historický přehled

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

# Teoretické aspekty elektromigračních metod

# Mobilita



## *Elektrická síla $F_e$*

$$F_e = E \times Q$$

$E$  = intenzita elektrického pole [V/m]

$Q$  = náboj částice =  $z_i \times e$  []

## *Frikční síla $F_f$*

$$F_f = \gamma \times f$$

$\nu$  = rychlost částice

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

## *Ustálený stav*

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



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

mobilita  $\implies$

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

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

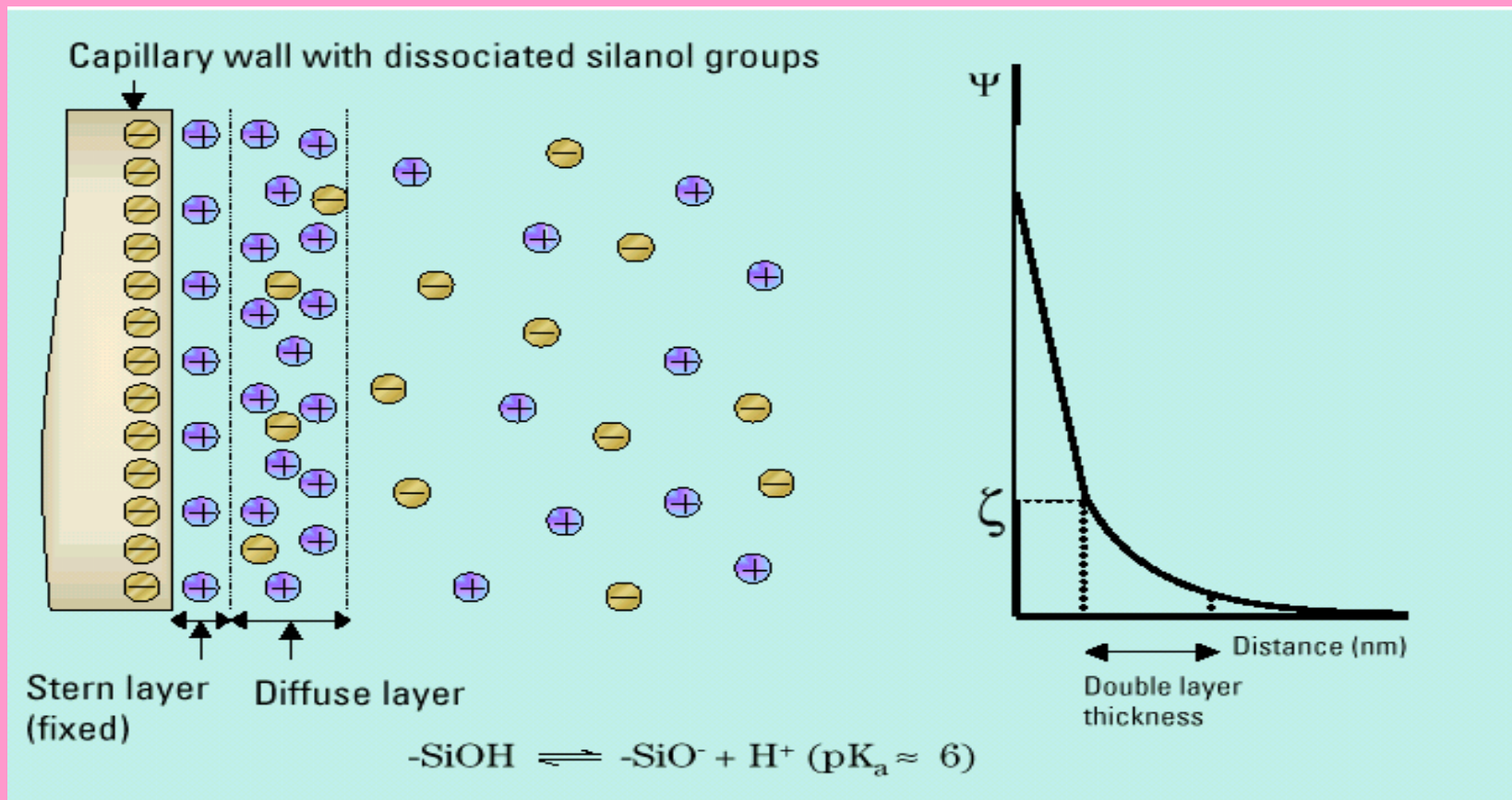
# Sekundární jevy

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





# Elektroosmotický tok



# Elektroosmotický tok

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

$\xi$  = potenciál Helmholtzovy dvojvrstvy

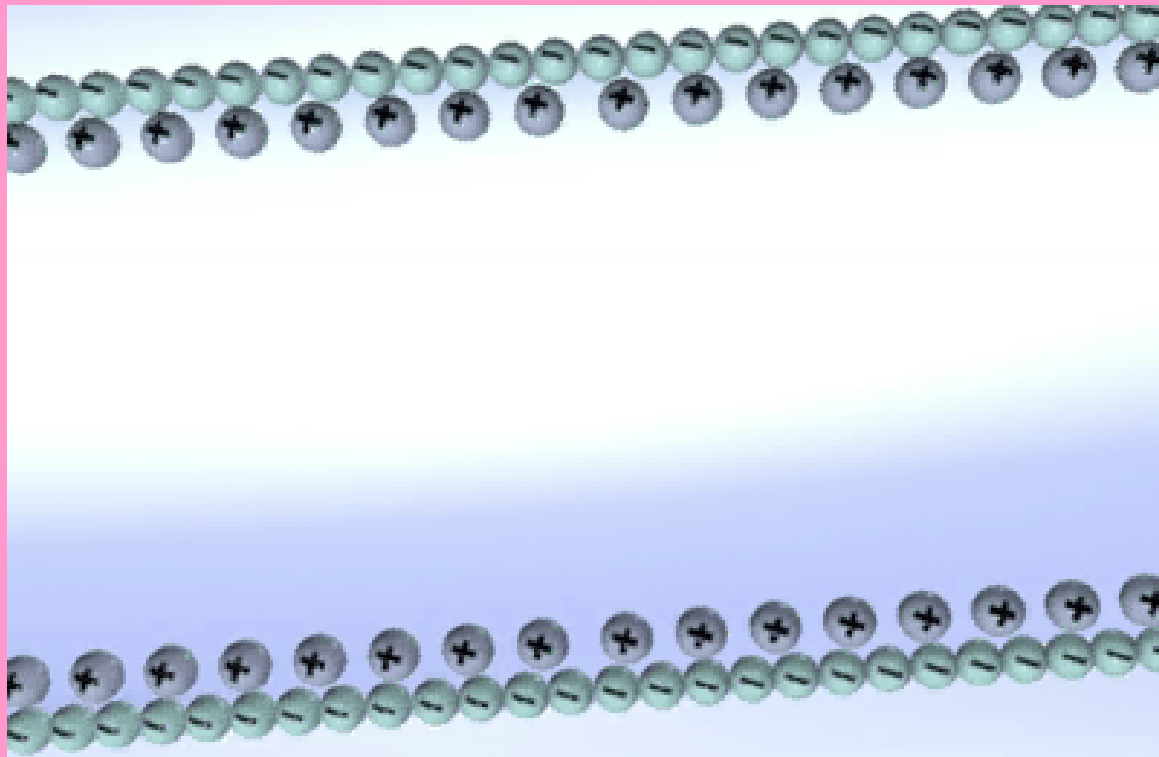
$\eta$  = viskozita

$\varepsilon$  = dielektrická konstanta

$\mu_{eo}$  = elektroosmotická mobilita

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

# Původ elektroosmotického toku



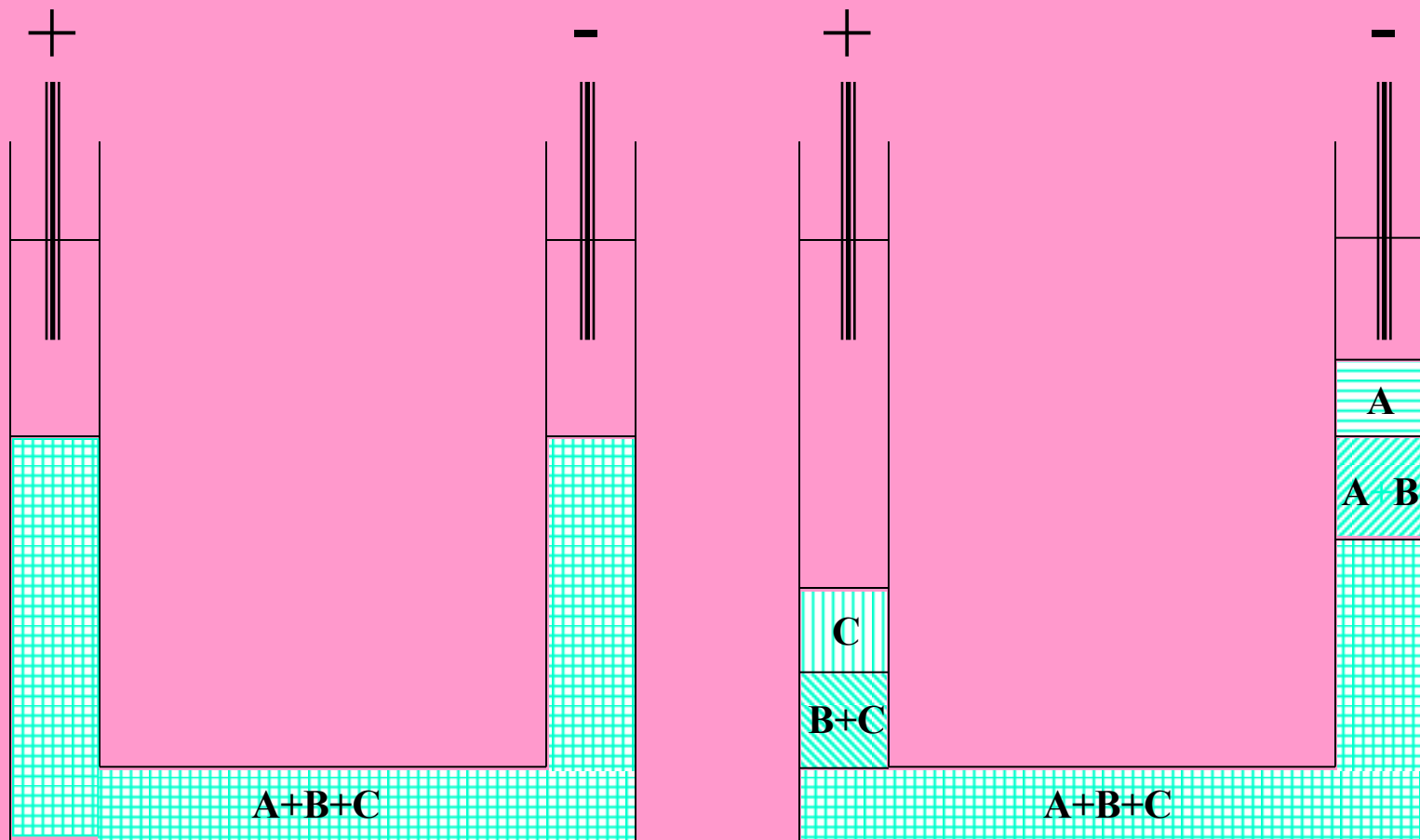
# Elektroforéza

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

# Elektroforéza

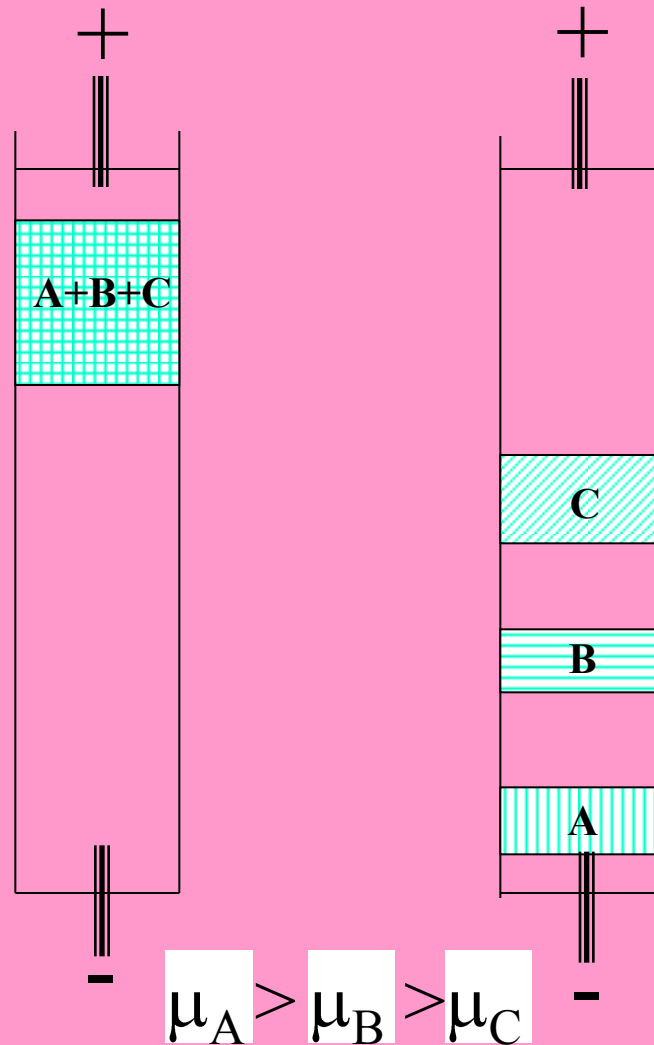
- Volná
- Zónová

# Volná elektroforéza



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

# Zónová elektroforéza





# Stabilizace

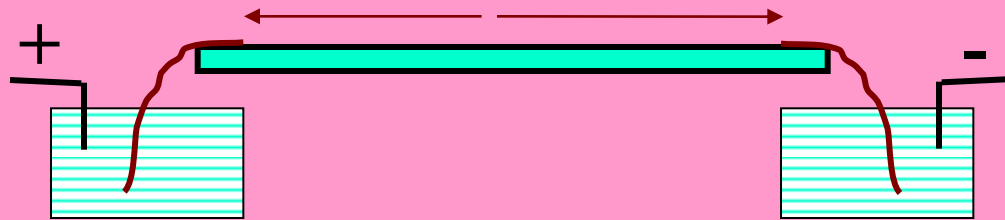
- Rotací
- Gradienty hustoty
- Porézními medii
- Kapilárou

# Požadavky na porézní media

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

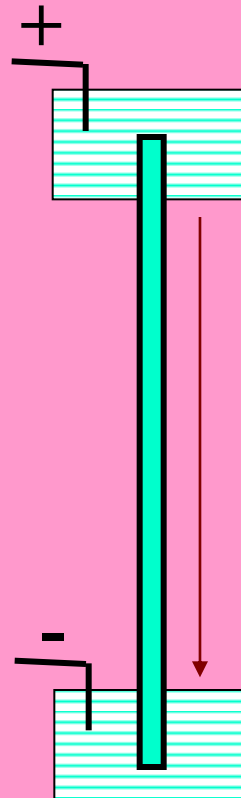
# Upořádání

Horizontální



# Upořádání

Vertikální



# Chromatografický papír

Složení – celulosa

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

Použití : téměř už se nepoužívá

# Agar a agarosa

Složení – kopolymer galaktosy a anhydrogalaktosy

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

Použití : imunoelektroforetické metody  
elektroforéza NK

# Acetát celulosy

Složení – acetát celulosy

- + Komerčně dostupný
- + Dobré mechanické vlastnosti

Použití : imunoelektroforetické metody  
klinické aplikace

# Škrob

Složení – hydrolyzovaný škrob

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

Použití : izoenzymová analýza



# Sypané vrstvy

Složení – Sephadex – zesíťovaný dextran

+ uplatňuje efekt molekulového síta

Použití : preparativní

# Polyakrylamid

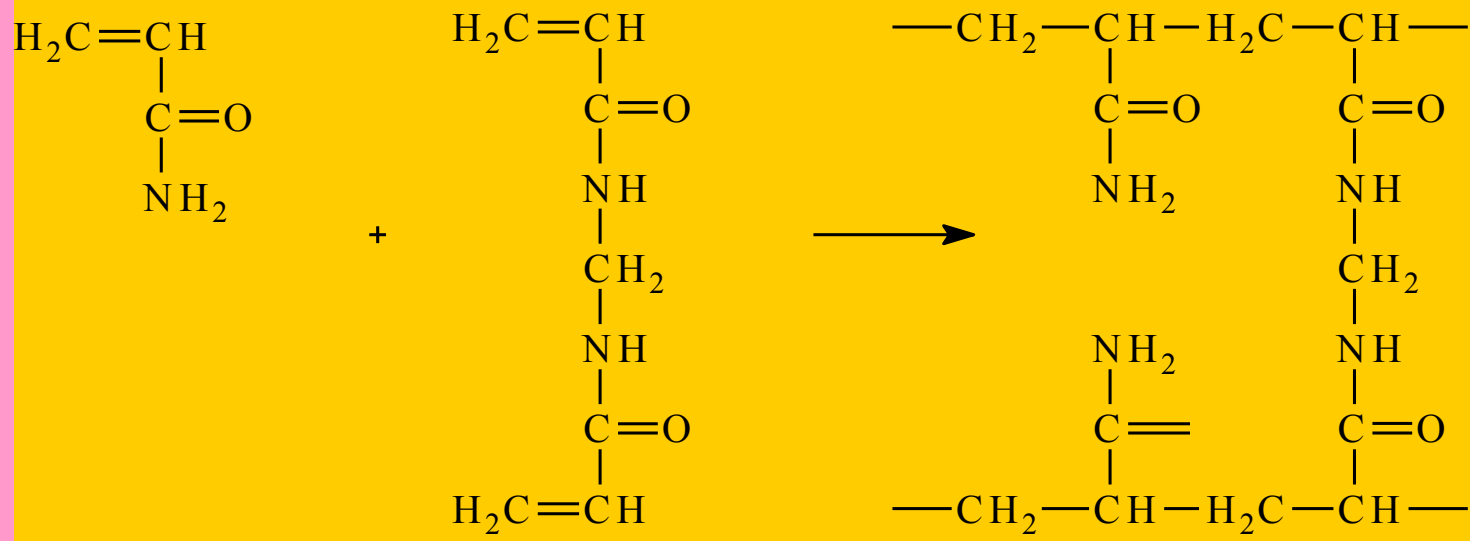
Složení – kopolymer akrylamidu a  
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

- Monomery jsou neurotoxiny !!!!!

Použití : analýza bílkovin

# Polyakrylamid



# Polyakrylamid - příprava

## Radikálová polymerace

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

# Polyakrylamid - složení

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

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

a – akrylamid (g)

b – methylenbisakrylamid (g)

m – objem (ml)

# Provedení PAGE

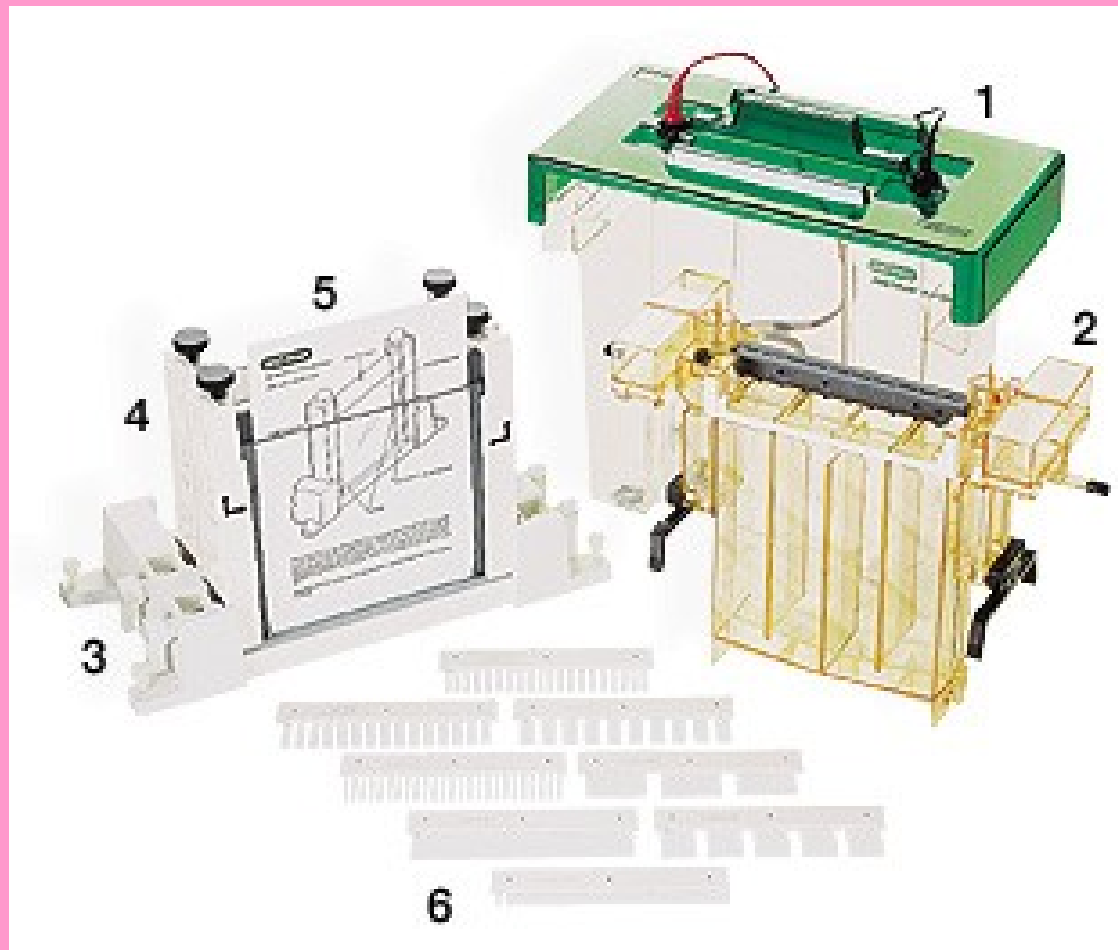
vertikální x horizontální

deskové x trubičkové

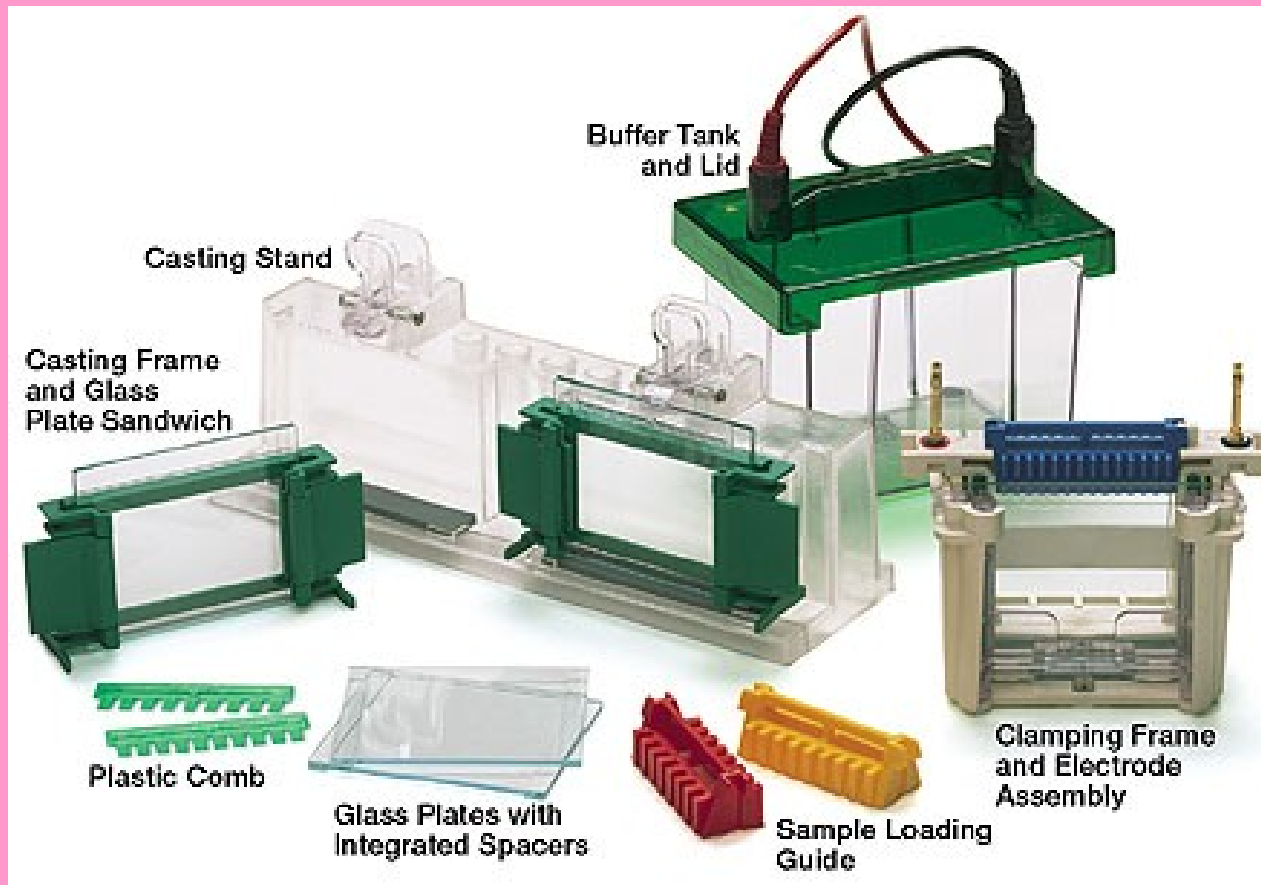
homogenní x gradientové

kontinuální x diskontinuální

# Provedení PAGE



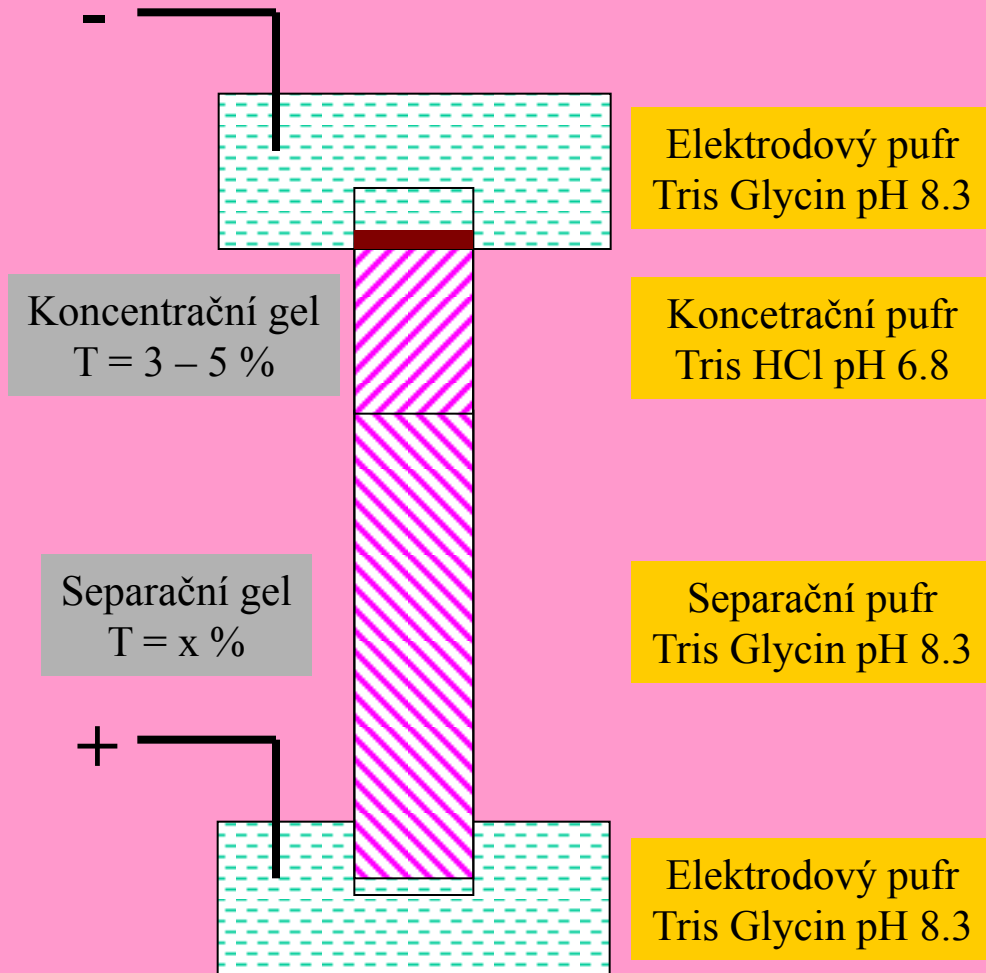
# Provedení PAGE



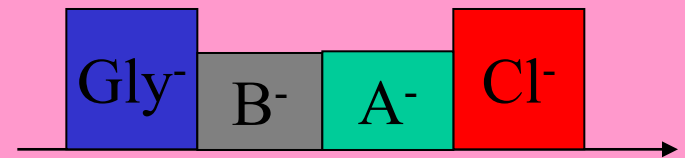


# Diskontinuální PAGE

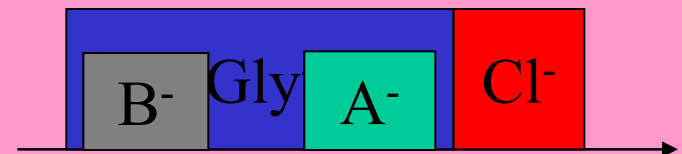
## Orstein, Davis



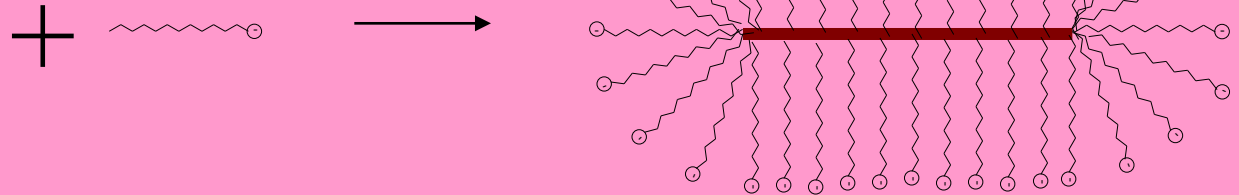
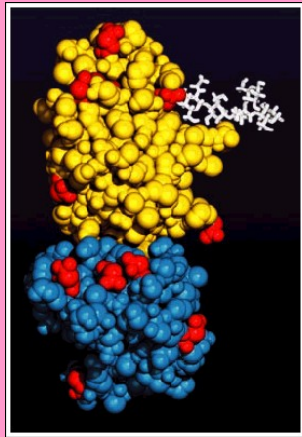
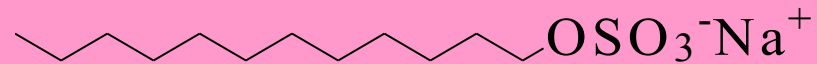
Koncentrační gel  
Izotachoforéza



Separační gel  
Zónová elektroforéza

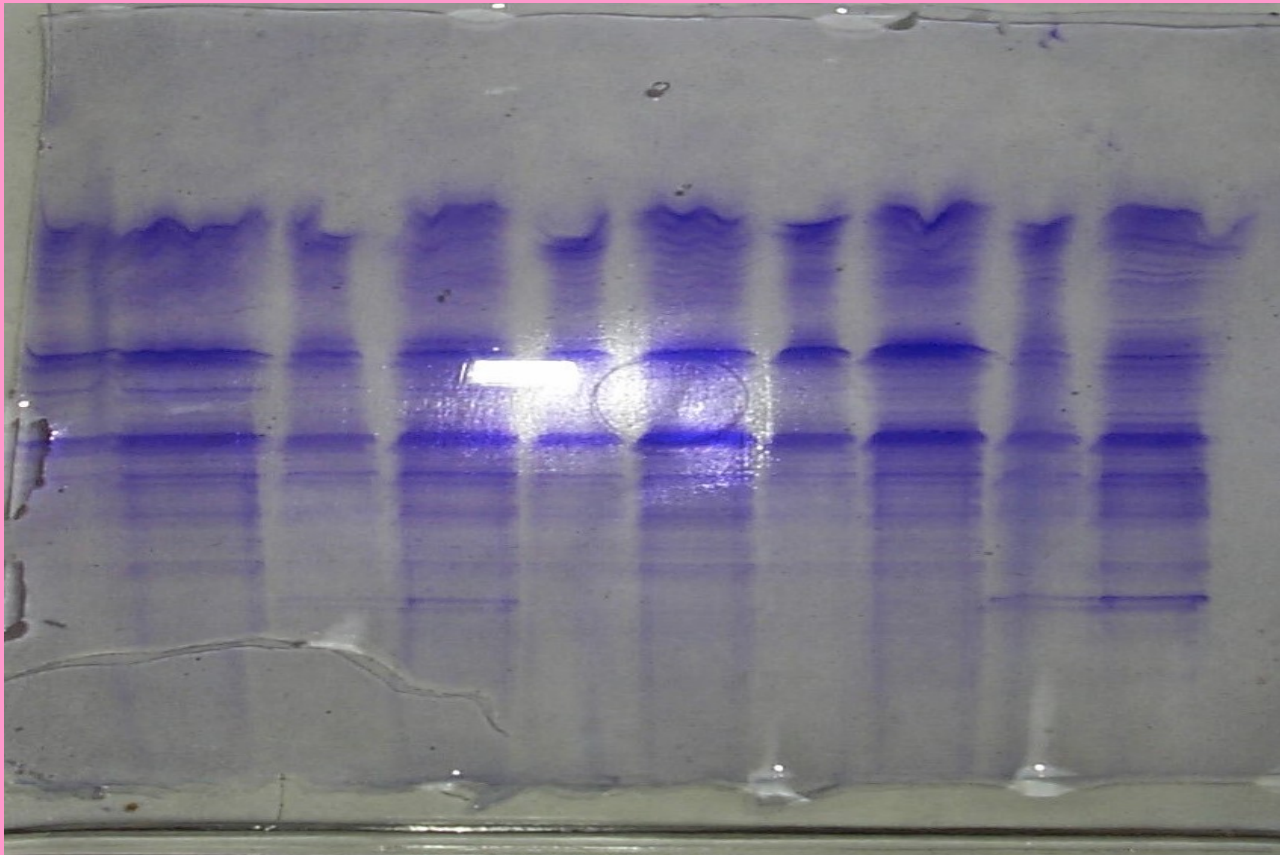


# SDS PAGE

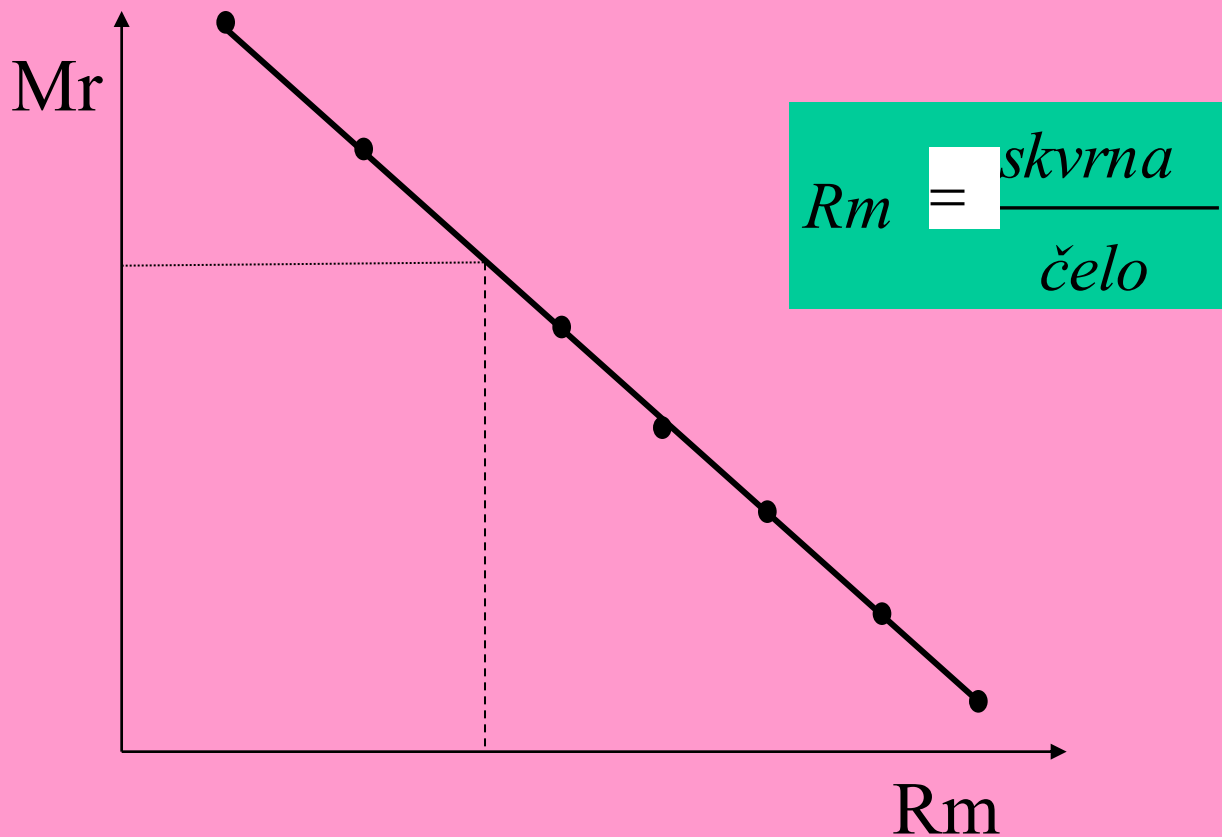


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS ⇒  
uniformní náboj na jednotku MW

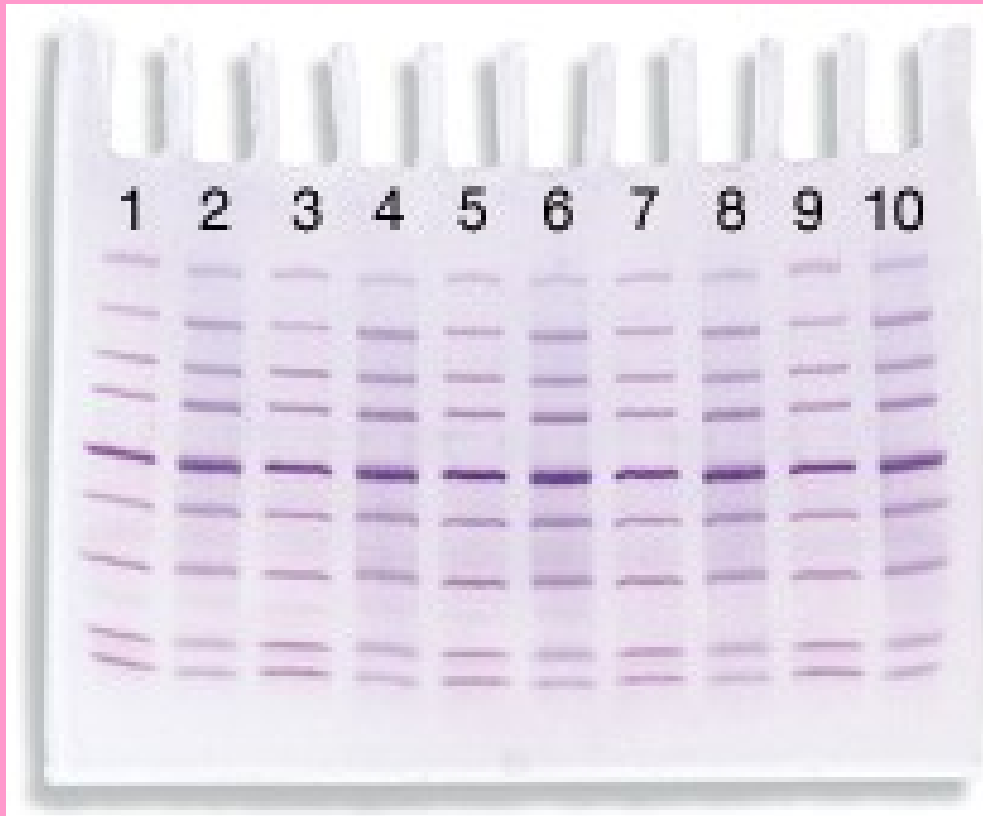
# SDS PAGE



# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE

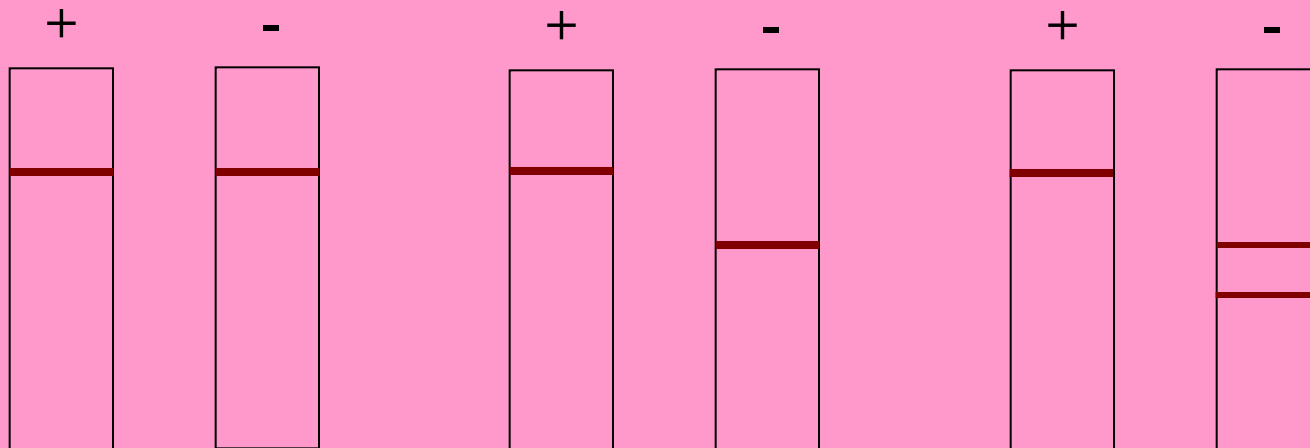


# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy

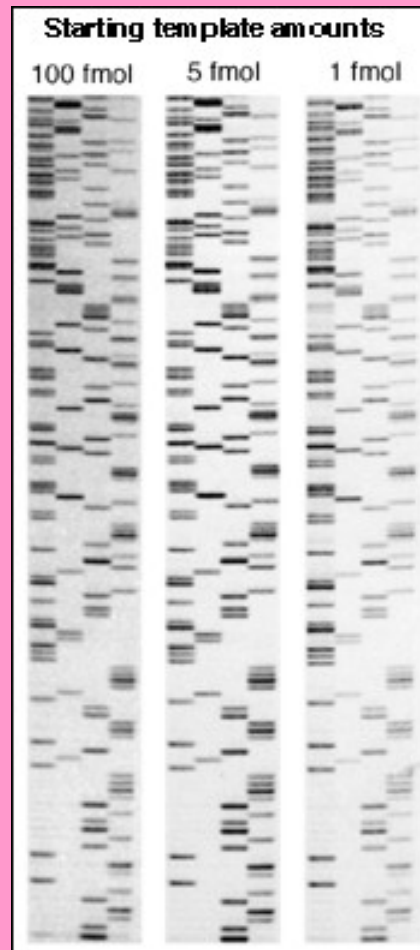


# Použití SDS PAGE

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



# PAGE - sekvenace DNA

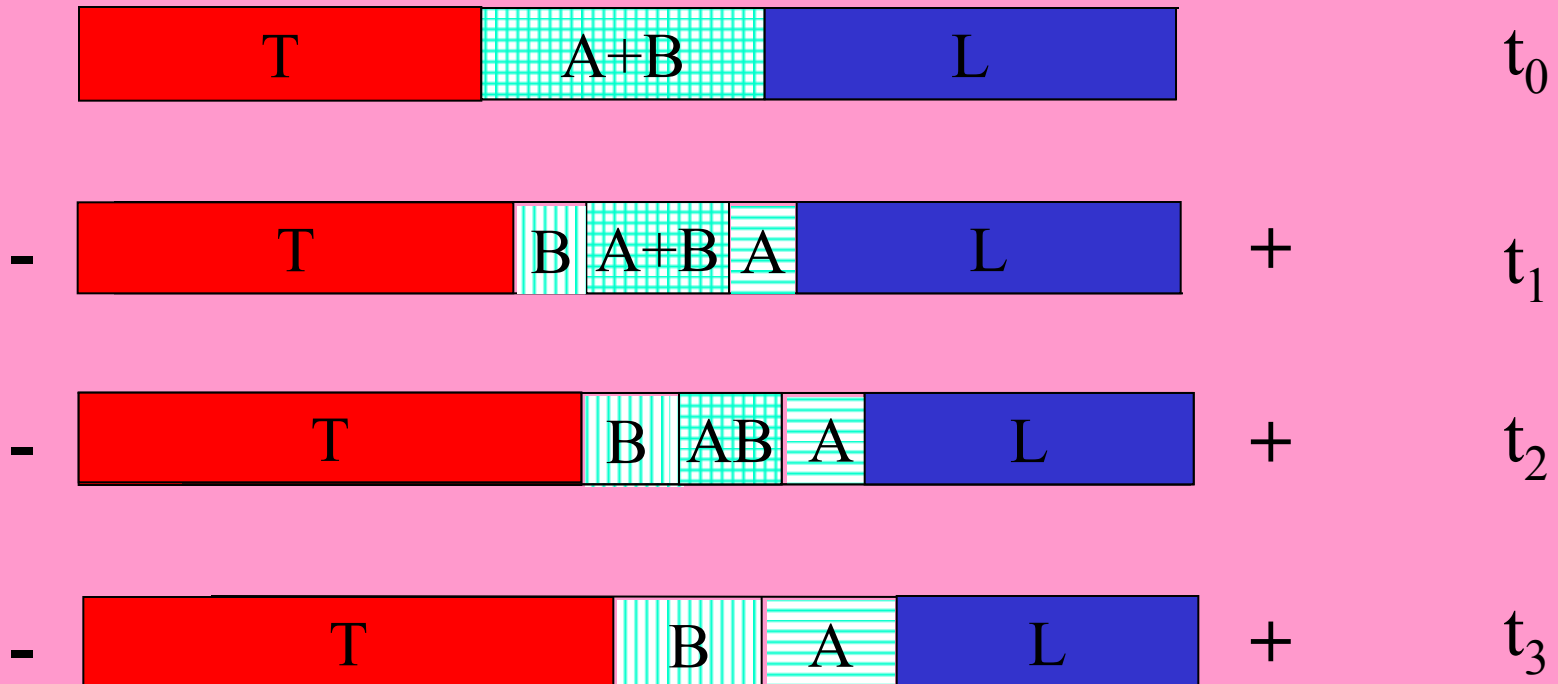


# Izotachoforéza

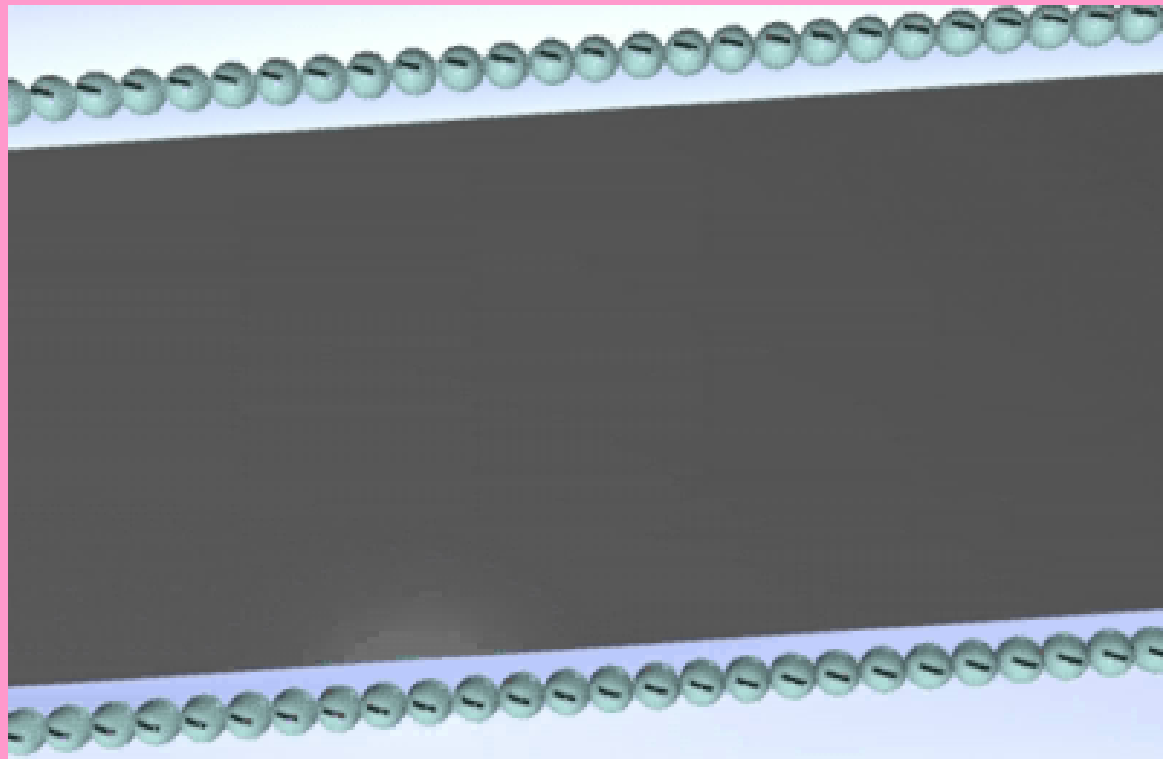
*„Vzorek je umístěn mezi dva elektrolyty : vedoucí L (leading) s nejvyšší mobilitou a - uzavírající T (terminating) s nejmenší mobilitou“*



# Izotachoforéza



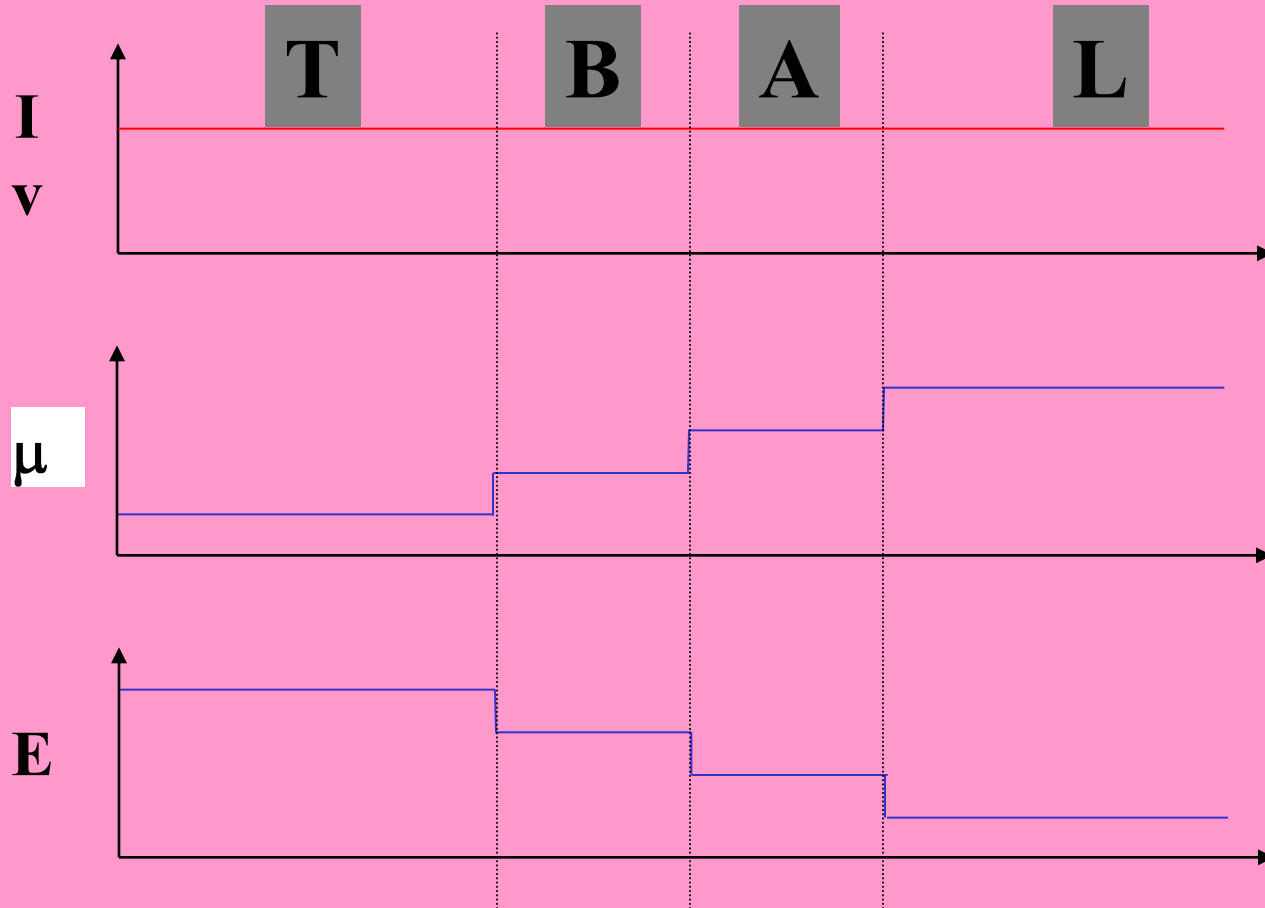
# Izotachoforéza



# Izotachoforéza

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

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

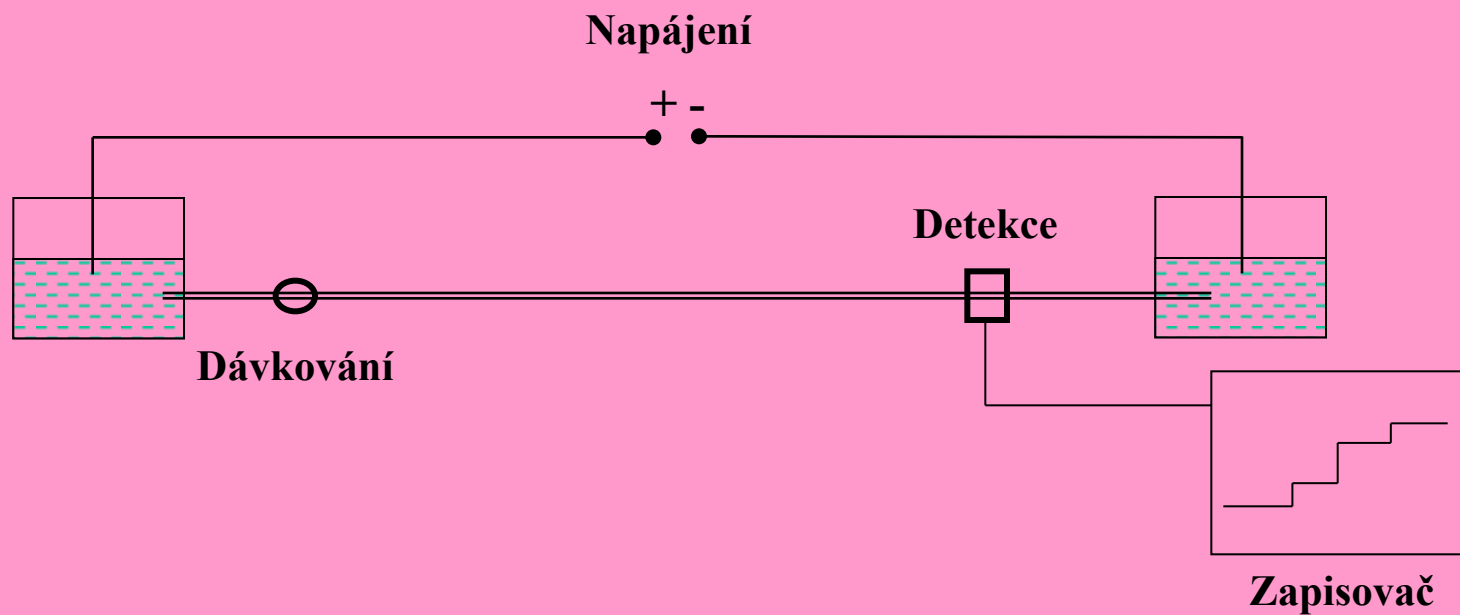


# Kohlrauschova regulační funkce

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

$$c_i = c_L \cdot \frac{\mu + \mu}{\mu} \cdot \frac{\mu}{\mu + \mu} \cdot \frac{z_L}{z_i}$$

# Analytická ITP

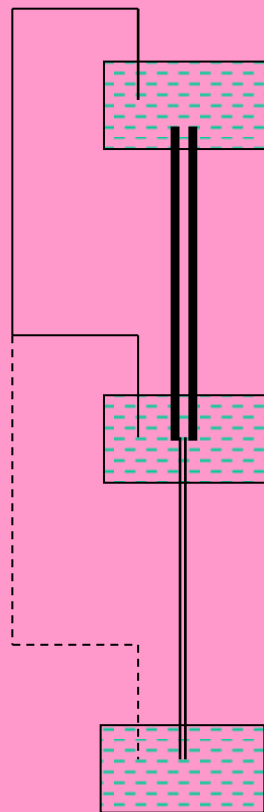


# Analytická ITP instrumentace

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

# Analytická ITP

## Metoda spojování kapilár



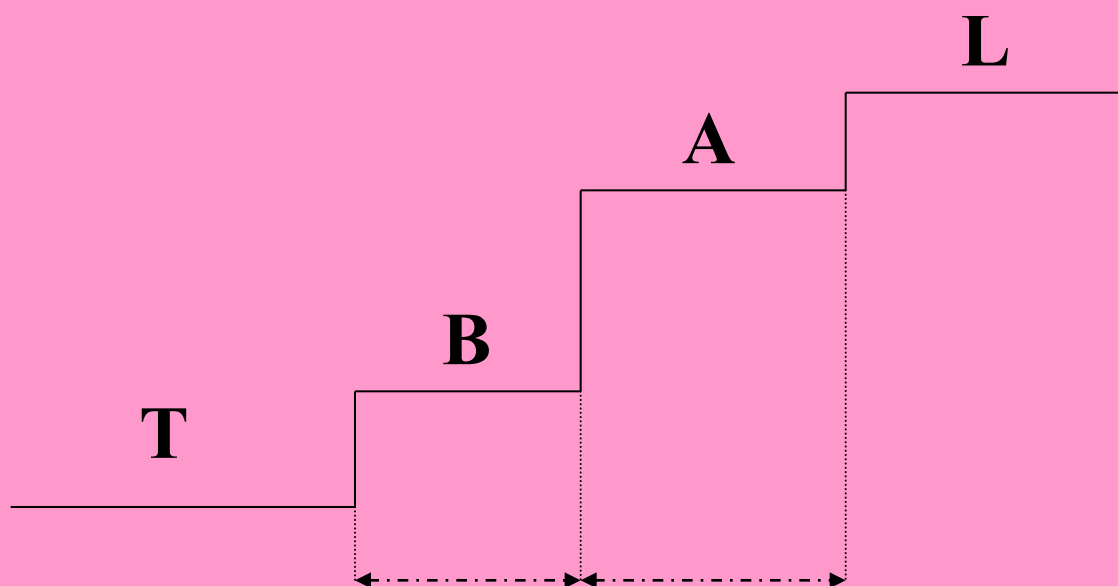
Předseparační kapilára – 2 mm



Analytická kapilára – 0.1 mm

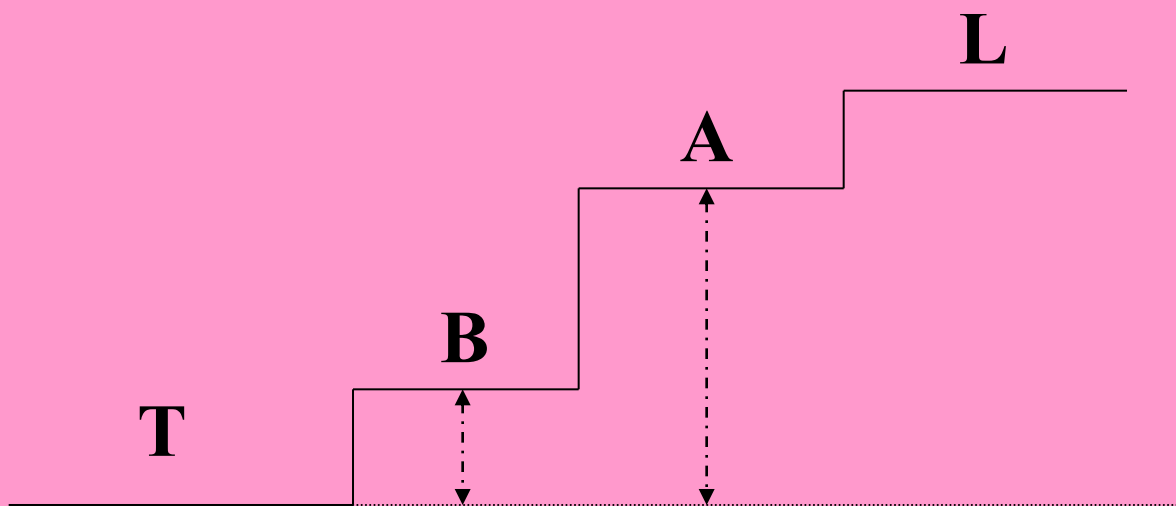


# Izotachoforetický záznam kvantita



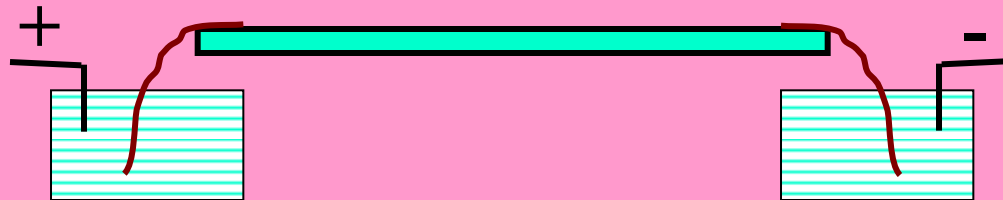


# Izotachoforetický záznam kvalita



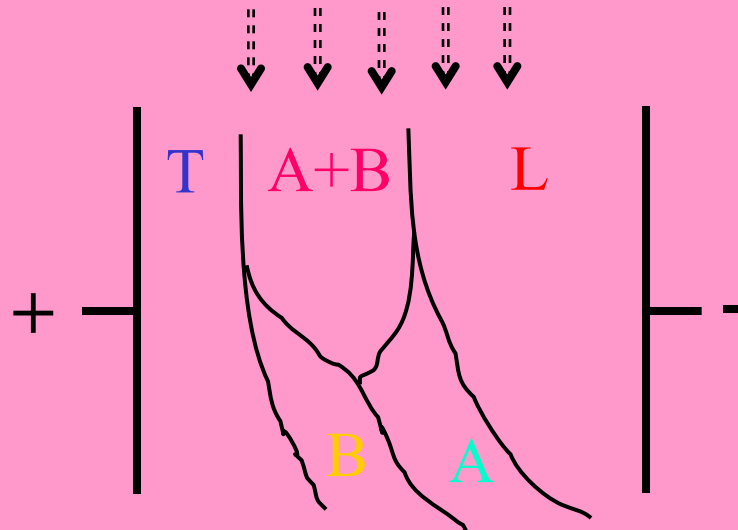
# Preparativní ITP

V gelech - Sephadex

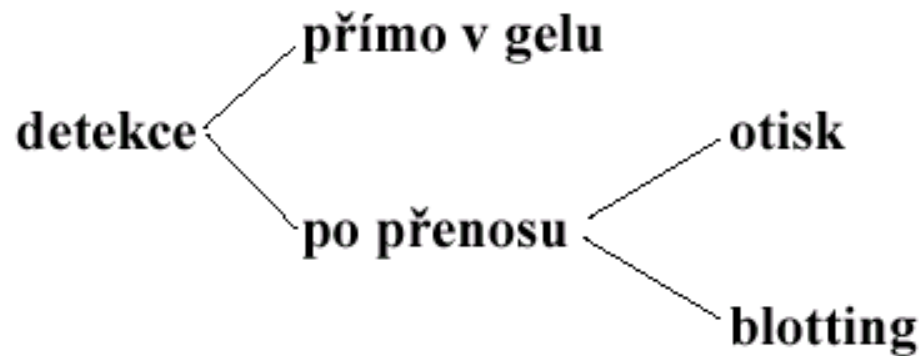


# Preparativní ITP

Kontinuální plošná



# Detekce po elektroforéze a izoelektrické fokusaci



# Nespecifická detekce

## Reakce s barvičkou

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

Používané barvičky

*Amido Black 10 B*

**Coomassie Brilliant Blue R 250**

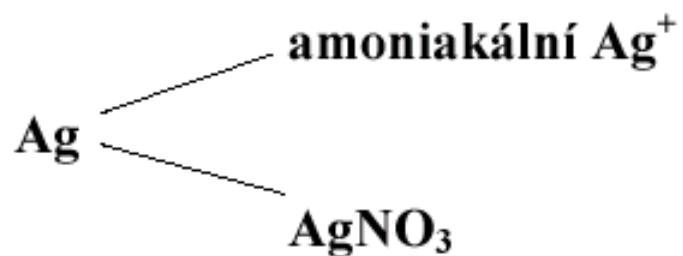
*Coomassie Brilliant Blue G 250*

*Fast Green*

*Ponceau S*

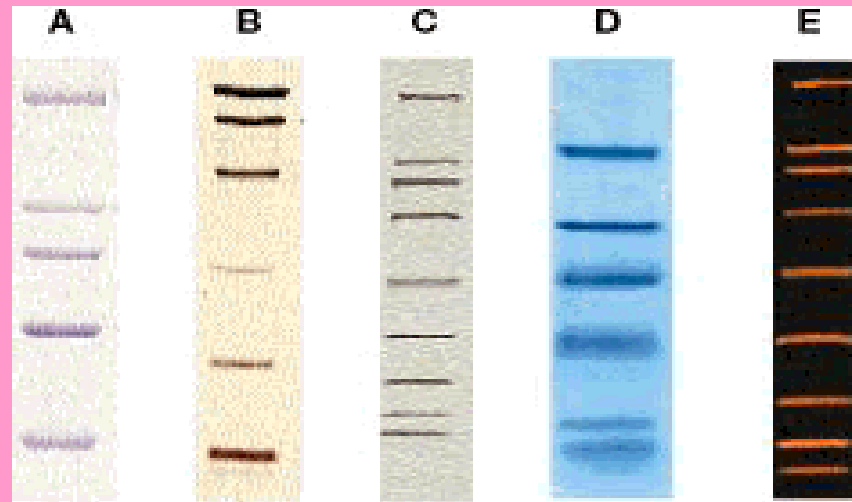
# Nespecifická detekce

## Barvení Ag



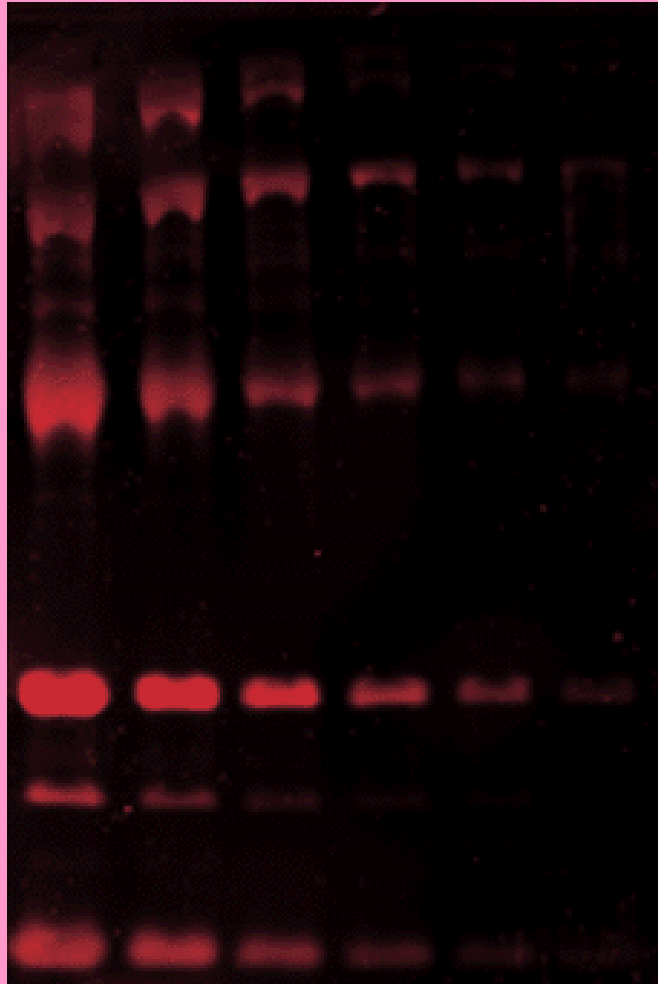
Postup :    **A. Navázání  $\text{Ag}^+$  na bílkovinu**  
              **B. Redukce  $\text{Ag}^+$  na  $\text{Ag}^0$**

# 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.

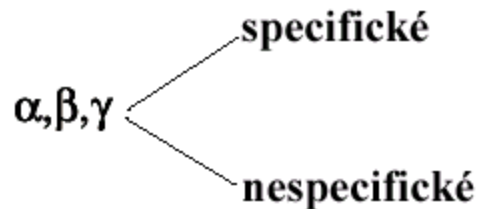
# Fluorescenční detekce





# Specifická detekce

## Radioaktivní značení



A. Autoradiografie

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

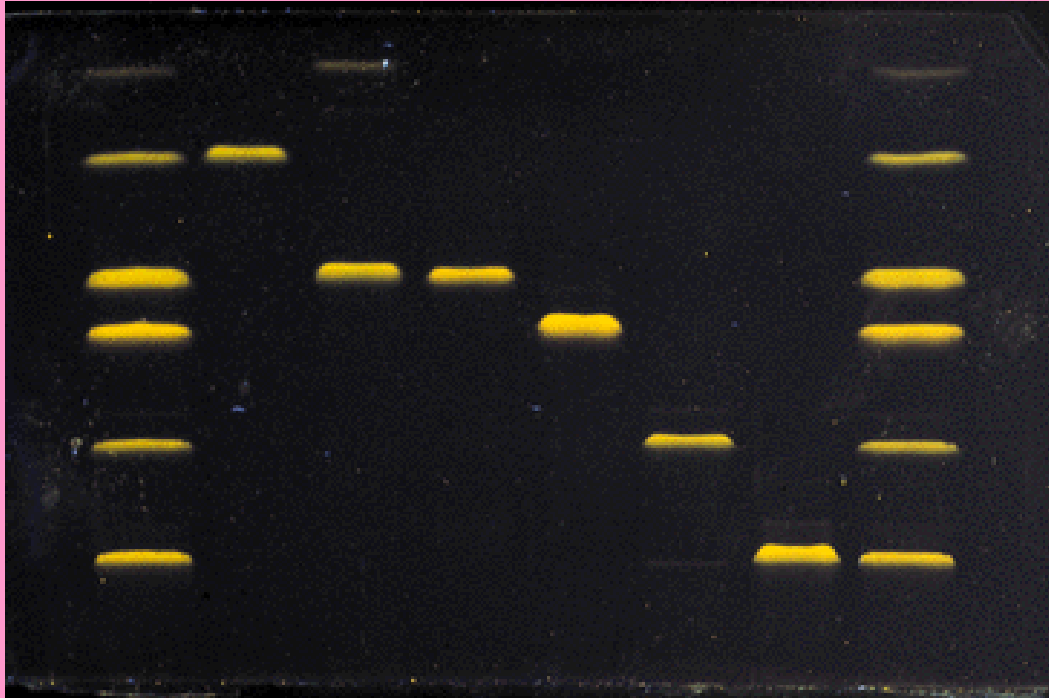
značený protein → rentgenový film

B. Fluorografie

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

značený protein → fluorofor → rentgenový film

# Autoradiografie

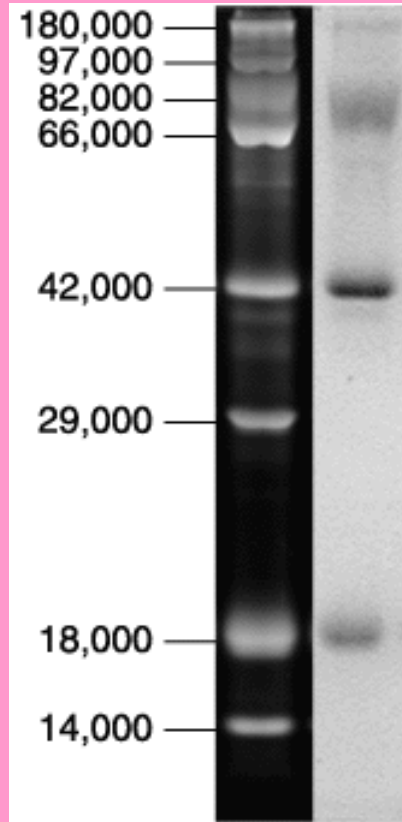


# Specifická detekce

## Detekce různých skupin bílkovin

glykoproteiny	-	Schiffova reakce (oxidace s $\text{HJO}_4$ , 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

