

Elektroforetické techniky

Mgr. Jana Gottwaldová

Elektroforéza

- elektromigrační separační metoda

- Princip:

využití rozdílné pohyblivosti (migrace) nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Při elektroforéze se jedná o mechanický přenos hmoty vlivem působení elektrického pole.

Elektrostatická síla F_1

$$F_1 = QE$$

Kde:

- E = intenzita elektrického pole: $E = U / l$
[Volt/cm]
- U = napětí mezi elektrodami [Volt]
- l = vzdálenost elektrod [cm]
- Q = náboj iontu

Odpor viskózního prostředí - F2

$$F_2 = kv$$

Kde:

- v - je rychlost pohybu iontu [cm/s]
- koeficient k - závisí na velikosti a tvaru částice (iontovém poloměru rozpuštěné látky) a na viskozitě prostředí (η):

- $k = 6\pi r\eta$

Kde:

- r = poloměr iontu [cm], η = vizkozita, π = Ludolfovo číslo

Princip elektroforézy

Hnací silou pohybu částice je rozdíl mezi elektrostatickou silou F_1 a odporem prostředí F_2 . V počátečním okamžiku je rychlost v nulová, částice je uvedena do pohybu elektrostatickou silou F_1 .

S rostoucí rychlostí v roste síla F_2 (odpor prostředí) tak dlouho, až se obě síly působící na částici vyrovnají a nastane stacionární stav: **$F_1 = F_2$; $QE = kv$**

Elektroforetická pohyblivost - μ

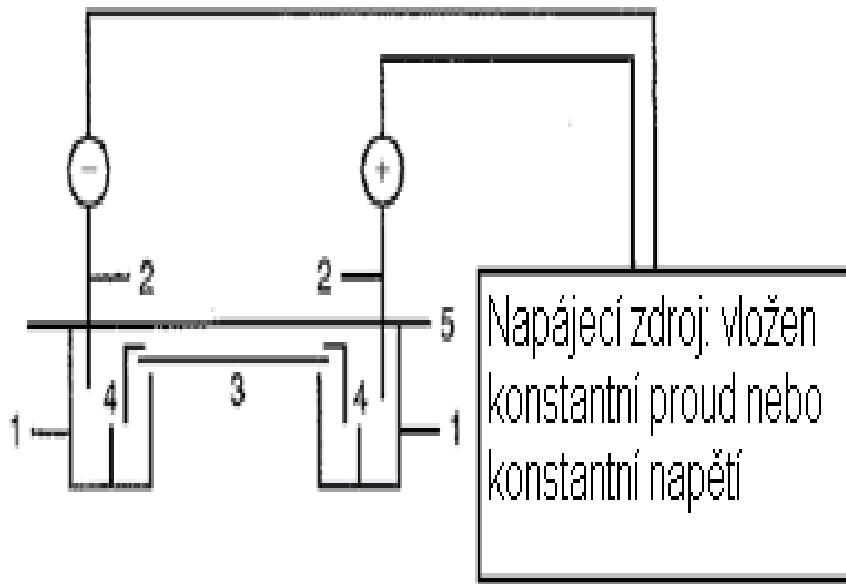
Rychlost pohybu určité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě je definována jako **elektroforetická pohyblivost μ**

- ve stacionárním stavu $F_1 = F_2$; $QE = kv$
kde: $k=6\pi r\eta$ a $E=1$ [Volt/cm] 

elektroforetická pohyblivost: μ

$$\mu = Q / 6\pi r\eta \quad [\text{cm}^2 \text{s}^{-1}\text{V}^{-1}]$$

Technického uspořádání elektroforetické aparatury



1. prostory pro pufry (anodický a katodický)
2. elektrody – vyrobeny z platiny nebo karbonu, polarita každé z nich je dána připojením k napájecímu zdroji
3. elektroforetický nosič, kde probíhá vlastní separace – může být přímo v kontaktu s pufrem, nebo je s pufry spojen prostřednictvím knotů (pufrovaných houbiček)
4. knoty – pufrované houbičky
5. kryt – zabraňuje vypařování, chrání systém během elektroforézy

Napájecí zdroj

- Funkcí: dodání elektrické energie
- napájecí zdroje umožňují provoz v podmínkách konstantního proudu, napětí nebo výkonu, které jsou nastavitelné.

Pufry při elektroforéze

Funkce pufry:

- nese vložený proud
- stanoví pH, při kterém probíhá elektroforetické dělení
- určuje výsledný elektrický náboj rozpuštěné látky

.

Rozdělení elektroforetických technik

- **Volná elektroforéza**

provádí se ve vodných roztocích, kde částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou.

- **Zónová (zonální) elektroforéza na nosičích**

Pro zónovou elektroforézu se využívají nosiče

Zónová elektroforéza

- nosiče pro zónovou elektroforézu jsou hydrofilní (nerozpustné ve vodě) porézní, s co nejmenší absorpční schopnostmi.
- Prvními použitými nosiči byly neklížený (chromatografický) papír, acetát celulózy, škrob a celulóza.
- V současné době se jako nosiče používají hlavně gely – agarózový (AGE) a polyakrylamidový gel (PAGE). Při přípravě gelu je možné ovlivňovat stupeň polymerace (zesíťování) - tedy velikost pórů.

Zónová elektroforéza

Rychlost migrace proteinů závisí na těchto faktorech:

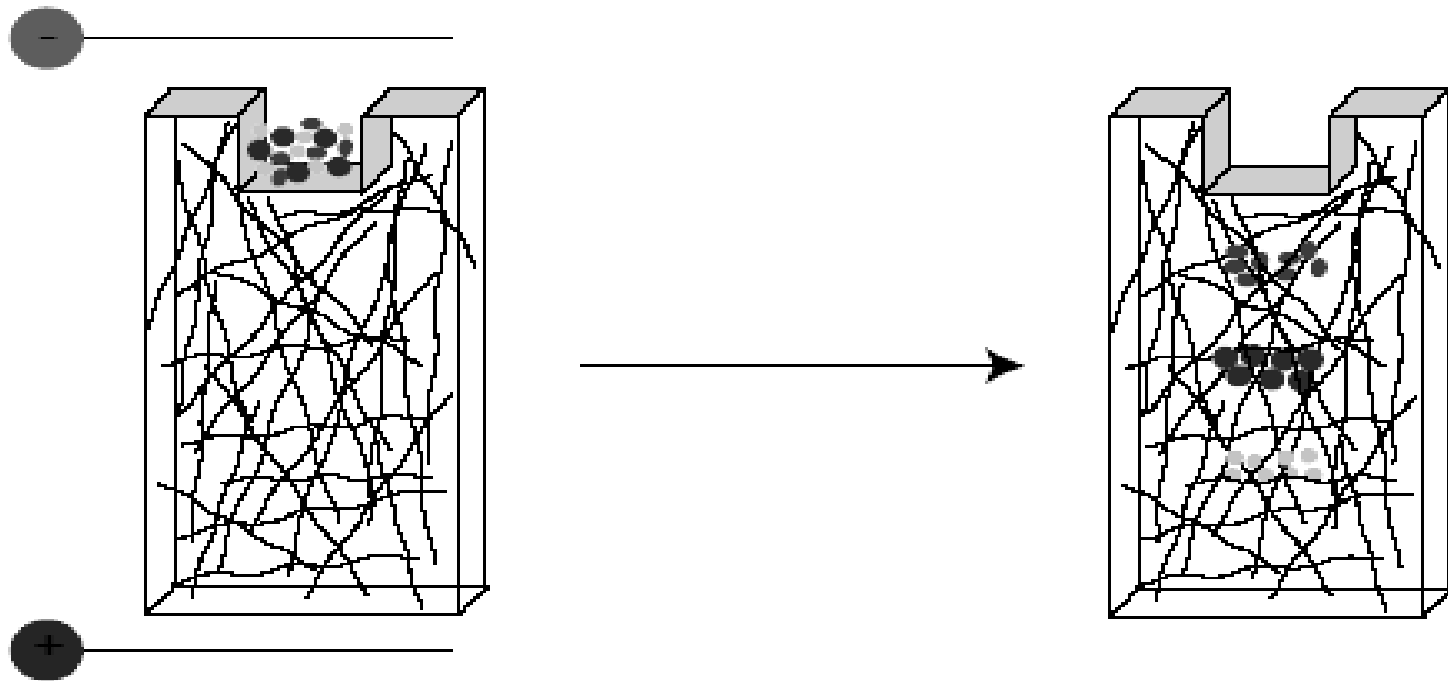
- Elektrický náboj molekuly
- Velikost a tvar molekuly
- Síla elektrického pole
- Vlastnosti nosného média
- Teplota

Proteiny s rozdílnou pohyblivostí migrují v gelu jako pásy (bandy).

Zónová elektroforéza

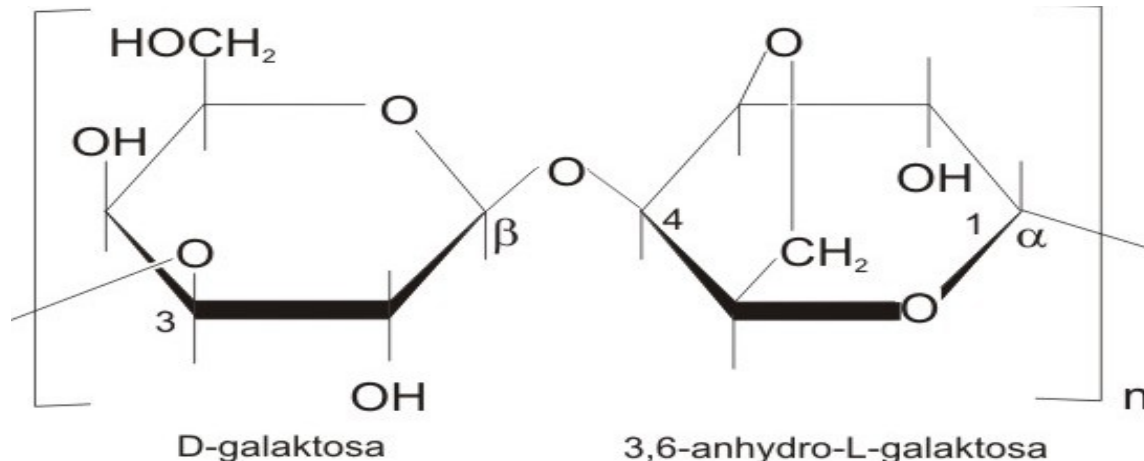
[A+B+C]

[A] + [B] + [C]



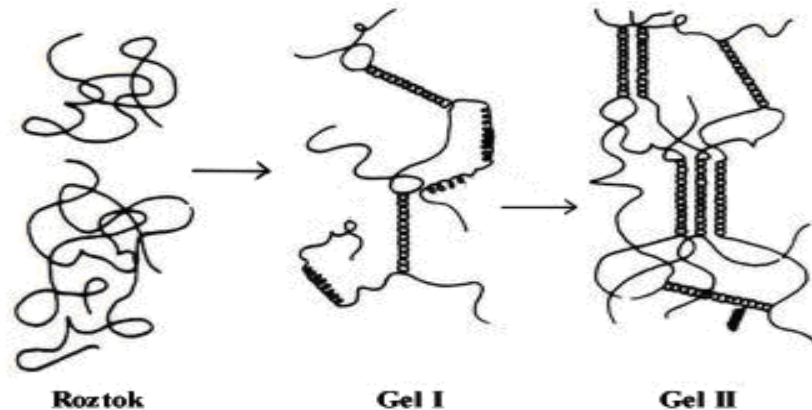
Elektroforéza v agarózovém gelu

- Agaróza je získávána z mořských řas. Je to lineární polysacharid, jehož základní strukturní jednotka je složena z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy
Průměrná velikost molekuly agarozy činí 300-400 základních jednotek.



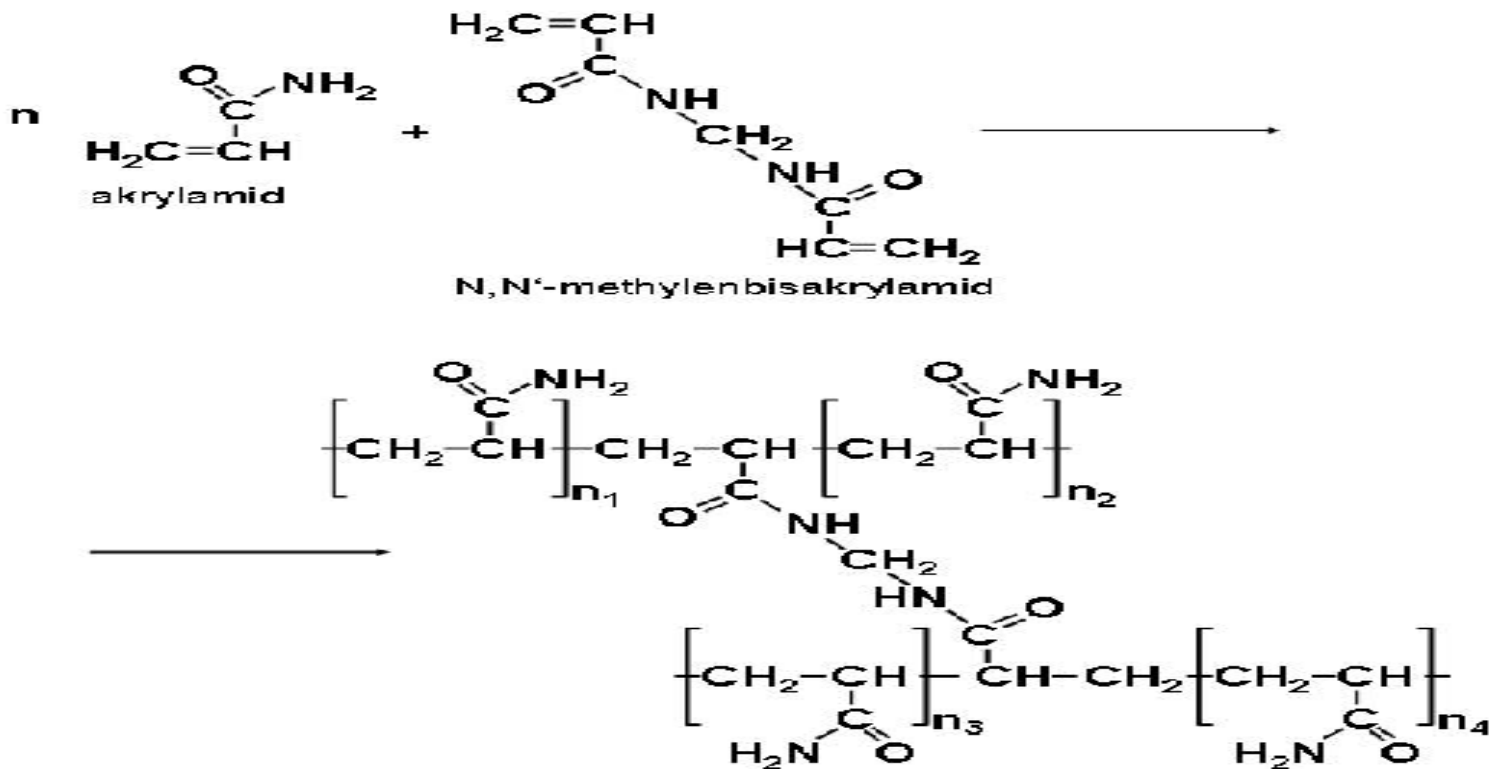
Elektroforéza v agarózovém gelu

- příprava tzv. gelifikací agarózy. Agaróza má za nižších teplot podobu gelu, gelifikuje působením vyšší teploty.
- **Bod tání** závisí na koncentraci a typu agarózy – asi 85-100 ° C
- **gelifikace** při poklesu teploty pod 45-50 ° C.
- nejčastěji se používá 1-2 % gel agarózy.
- **Velikost pórů** v gelu závisí na koncentraci agarózy, typicky se pohybuje mezi 100 - 300 nm.



Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- Polymerací akrylamidu vznikají lineární molekuly polyakrylamidu.
- spojují příčnými můstky, které vznikají kopolymerací s N,N'-methylenbisakrylamidem



Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány **podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm jeho zesíťování**.
- Nejčastěji používané **koncentrace polyakrylamidu jsou 5-15%**, přičemž koncentrace N, N'-methylebisakrylamidu je obvykle 5% celkového množství akrylamidu.
- Nevýhodou je **vysoká toxicita** akrylamida N,N'-metylenbisakrylamidu.

Hlavní typy gelové elektroforézy

Gelová nedenačnická elektroforéza

- *Nativní gelová elektroforéza*

Gelová denačnická elektroforéza

- *SDS gelová elektroforéza*

Gelová nedenačovací elektroforéza

Nativní gelová elektroforéza

- probíhá bez denaturačních činidel
- někdy jsou používány relativně vysoké, nebo nízké hodnoty pH
- Migrace proteinů gelem závisí na jejich náboji, velikosti a tvaru.
- Citlivost elektroforézy je dána charakterem póru gelu

Nativní gelová elektroforéza

Faktory ovlivňují mobilitu proteinů v nativním gelu:

Náboj proteinu:

- sekvence aminokyselin – počet kyselých a bazických zbytků
- pH roztoku
- třírozměrná struktura proteinu

Velikost a tvar proteinu

Koncentrace a stupeň zesíťování gelu

- gel obecně snižuje mobilitu proteinů, v závislosti na jejich volné pohyblivosti (bez přítomnosti gelu)
- větší molekuly jsou gelem ovlivněny více než menší molekuly
- složení gelu může být ovlivněno tak, že dělení probíhá na základě rozdílné velikosti molekul

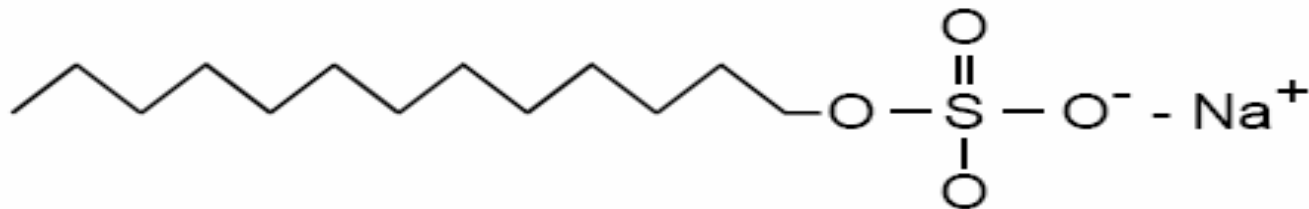
Gelová denaturační elektroforéza

SDS gelová elektroforéza :

- proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (SDS) a β -merkaptoetánolem
- Proteiny jsou separovány podle své molekulové hmotnosti

SDS gelová elektroforéza

- **SDS** je **anionaktivní detergent**, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, které se potom pohybují v gelu jen podle velikosti.
- Vzorek proteinu se zpracuje s **tzv. vzorkovým pufrem** - obsahuje SDS a redukční činidlo b-merkapt ethanol.
- Působením těchto látek dojde k rozrušení kvarterní, terciární a do značné míry i sekundární struktury.

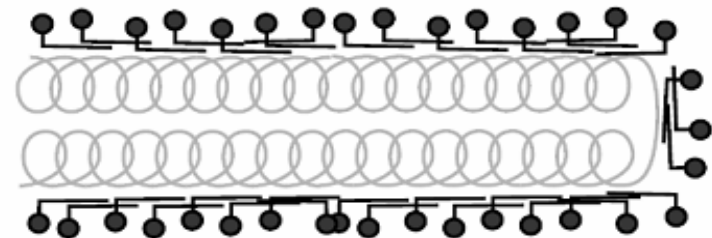
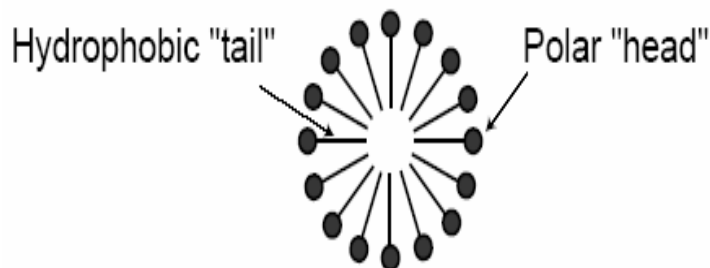


SDS gelová elektroforéza

Všechny bílkoviny váží SDS v konstantním poměru, asi **1,4g SDS na 1g bílkoviny**, a tím charakteristicky mění svou konformaci.

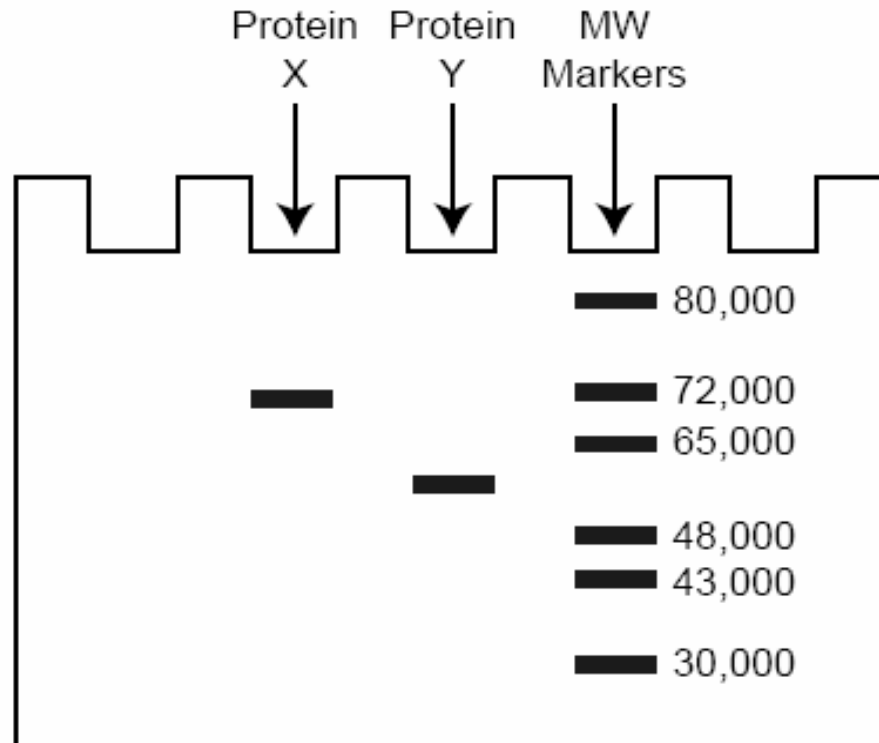
Výsledné komplexy SDS-bílkovina:

- mají stejnou hodnotu povrchového náboje
- konformace bílkovin se do jisté míry unifikuje
- relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS.



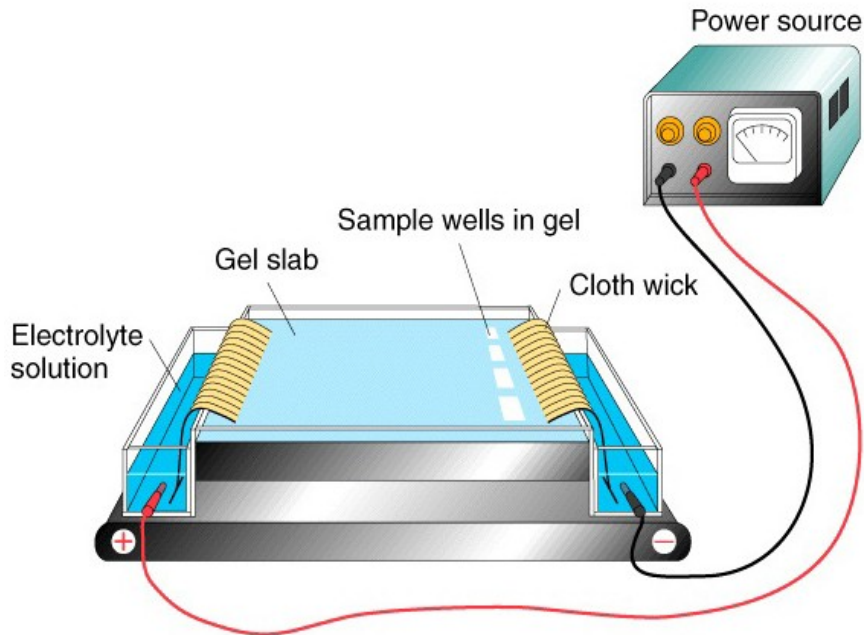
SDS gelová elektroforéza

Pro vlastní odhad molekulové hmotnosti neznámého proteinového vzorku se používají komerční směsi proteinů-standards.



Rozdělení dle uspořádání (orientace nosného média)

- *Vertikální gelová elektroforéza*
- *Horizontální gelová elektroforéza*



Zpracování gelu po separaci - barvení gelů

- Po proběhnuté elektroforéze je nutné gel rychle sušit nebo fixovat fixačním roztokem (obsahuje kyselinu, např. kys. octová)- dojde k denaturaci proteinů a jejich imobilizaci v nosném médiu aby se zabránilo difúzi jednotlivých zón.
- Dále je nutné gel obarvit, aby došlo k vizualizaci jednotlivých proteinových frakcí. Po promytí přebytku barviva, se gel suší.
- Množství barviva, které se během barvení váže na proteiny závisí na mnoha faktorech. Je ovlivněno typem proteinu nebo stupněm denaturace při fixaci.

Zpracování gelu po separaci - barvení gelů

Barva	použití	λ_{max} [nm]
Amidočern 10B	barvení proteinů	620
Coomassie Brilliant Blue R-250		590
Coomassie Brilliant Blue G-250		595
Fast Green		610
Acid violet	Imunoelektroforéza	
Alcian Blue	glykoproteiny	630
Basic Fuchsin	Glykoproteiny, glykoproteiny bohaté na sialovou kys., nukleové kys.	550
Methyl Green	DNA	635
Ethidium Bromide (Fluorimetrická detekce)		
Bromocresol Green		
Methylene Blue	RNA	665
Pyrimin Y		510
Toluidine Blue O		620

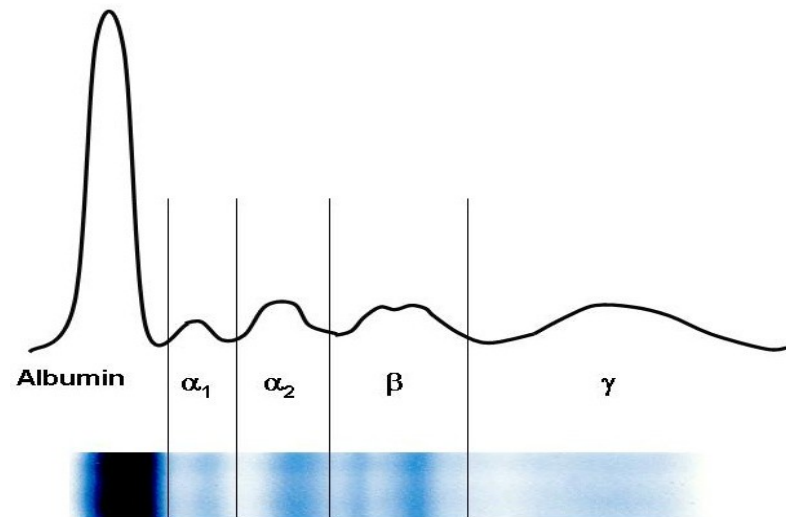
Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

Po elektroforetické separaci a barvení, je možné kvantifikovat jednotlivé zóny jako procentuální podíl přímou ***denzitometrii***.

Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení (liší se v uspořádání), zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení.

Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

- Při denzitometrii se měří intenzita záření procházejícího průhlednou plochou, získává se grafický záznam fotometrovaného úseku.
- Jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru.
- Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi.



Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

- Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky (400 – 700 nm), v místě frakcí dochází k částečné absorpci záření – to se projeví při dopadu na detektor.
- Po zpracování signálu integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí.

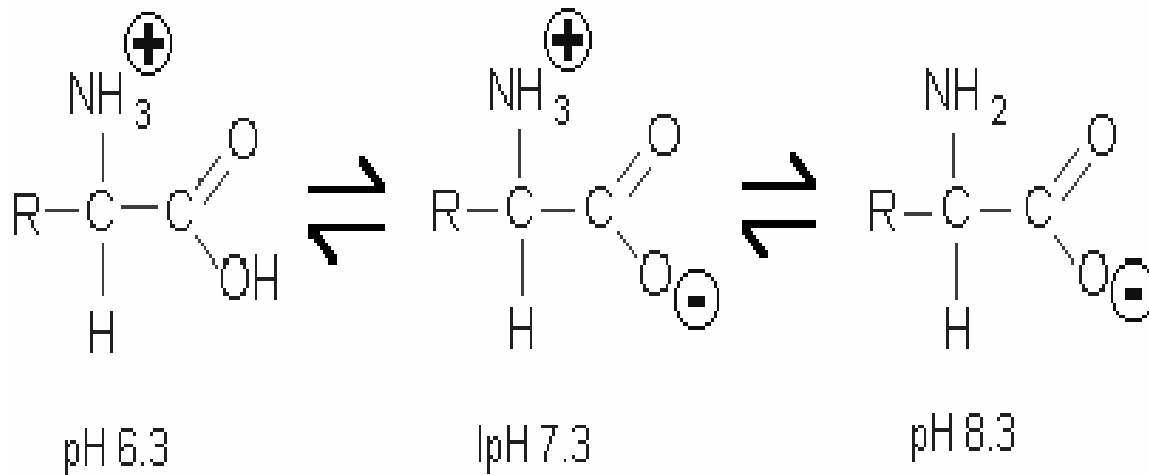
Barva	A_{\max} [nm]
Amidočern 10B	620
Coomassie Brilliant Blue R-250	590
Coomassie Brilliant Blue G-250	595
Fast Green	610
Acid violet	
Alcian Blue	630
Basic Fuchsin	550
Methyl Green	635
Ethidium Bromide (Fluorimetrická detekce)	
Bromocresol Green	
Methylene Blue	665
Pyrimin Y	510
Toluidine Blue O	620

Základní elektroforetické techniky

- **Izoelektrická fokusace (IEF)**
- **Izotachoforéza**
- **Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)**
- **Kapilární elektroforéza (CE = capillary electrophoresis)**

Izoelektrická fokusace (IEF)

- Metoda IEF se používá k separaci amfoterních látek - aminokyseliny, peptidy a proteiny.
- V závislosti na pH mají amfoterní molekuly kladný nebo záporný celkový náboj („net charge“).
- Pro posouzení tohoto náboje při různých hodnotách pH je důležitá hodnota isoelektrického bodu (pI).



Izoelektrická fokusace (IEF)

- využívá gely s velkými póry, které obsahují směs syntetických alifatických polyamino-polykarboxylových skupin, které se označují jako **nosné amfolyty**.
- jsou voleny tak, že pokrývají široký rozsah izoelektrických bodů. Jakmile gel připojíme ke zdroji elektrického napětí, amfolyty vytvoří stabilní **lineární gradient pH**, s nejnižší hodnotou pH při anodě a nejvyšší při katodě.
- Stabilita amfolytů v gelu je zajišťována silnou kyselinou (anoda) a silnou zásadou (katoda).
- Anodový roztok je kyselý (k. fosforečná, k. octová, kyselý pufr), katodový roztok je bazický. (NaOH, triethylamin, bazický pufr)

Izoelektrická fokusace (IEF)

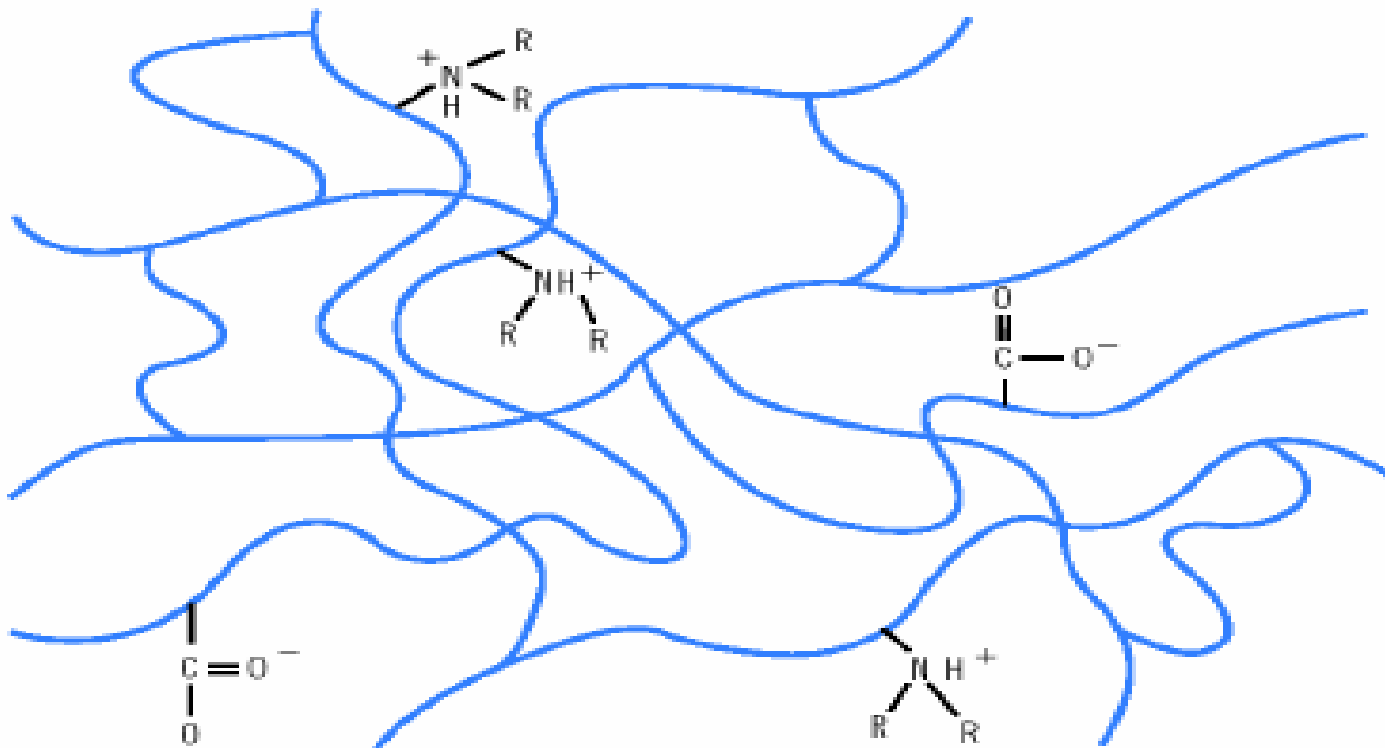
- Proteiny se po nanesení na gel budou pohybovat pH gradientem až do míst, kde se pH gelu vyrovná s jejich izoelektrickým bodem (pI).
- V tomto bodě je protein elektricky neutrální – jakmile by se z této polohy vychýlil na jakoukoli stranu, získal by kladný, nebo záporný náboj a vrátil by se zpět.
- Výsledkem jsou velmi úzké zóny na gelu (odtud název „fokusace“ - „zaostřování“).
- rozlišovací schopnost této metody vysoká a lze jí oddělit i proteiny, lišící se o 0,01 jednotky svých pI.
- Proteiny, které se liší nábojem, ale mají prakticky stejnou molekulovou hmotnost (např. izoenzymy), lze separovat pouze IEF.

Izoelektrická fokusace (IEF)

- IEF se obvykle provádí v 3-4% polyakrylamidových gelech, nebo v agarose.
- Do roztoku pro přípravu gelu se přidávají 2-2.5% amfolyty. Jedná se o směs nízkomolekulárních oligoamino-oligokarboxylových látek, které mají rozdílné pI hodnoty.
- Gradienty se tvoří nejčastěji v rozmezí pH 3-10, nebo v užším.
- Jinou možností tvorby gradientu je použití immobilinů. Gradient je v tomto případě immobilizován v gelu, toho se dosahuje použitím akrylamidových derivátů obsahujících ionizovatelné skupiny s pufrujícími vlastnostmi.

Izoelektrická fokusace (IEF)

Imobilizovaný pH gradient v polyakrylamidovém gelu s disociovatelnými karboxy- a aminoskupinami, R= kyselá nebo bazická pufrující skupina



Izoelektrická fokusace (IEF)

- Isoelektická fokusace se provádí ve vertikálním uspořádání.
- Hotové IEF gely s amfolyty nebo immobiliny se dodávají komerčně spolu s přístroji pro automatizovanou IEF.
- Vzorky se obvykle nanášejí na katodové straně.

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

- Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE) je analytická a preparativní technika
- metoda je schopná účinně separovat komplexní směsi bílkovin.
- 2-DE je klíčovou technikou ***proteomiky***

Proteomika je obor, který se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem), rovněž však zkoumá strukturu a interakce proteinů.

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Cíle proteomiky formulovala v roce 2001 Human Proteome Organization – HUPO :

- ***expresní proteomika*** - identifikace všech proteinů kódovaných lidským genomem s následným stanovením jejich exprese v různých buňkách daného organismu
- ***strukturní proteomika*** zahrnuje subcelulární lokalizaci proteinů v různých organelách, jejich posttranslační modifikaci a jejich vzájemnou interakci
- ***funkční proteomika*** - vztah mezi strukturou a funkcí proteinů

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Podstatou 2-DE je využití dvou odlišných fyzikálně chemických vlastností proteinů:

- **v prvním rozměru** jsou proteiny rozděleny **podle jejich izoelektrického bodu (pI)** - pomocí izoelektrické fokuzace (IFE)
- **v druhém rozměru** se proteiny dělí v závislosti na jejich **molekulové hmotnosti** použitím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a SDS (SDS -PAGE).

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

První rozměr: izoelektrická fokuzace (IFE)

- Provádí se na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu s malými póry s imobilizovanými gradienty pH nejčastěji v rozsahu 3-10.
- Proteiny migrují ke katodě či anodě dle svého celkového náboje až do chvíle, kdy pH místa v gelu odpovídá pI proteinu.
- Podle zvoleného rozsahu pH můžeme měnit škálu proteinů, které rozdělíme.

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Druhý rozměr: elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS PAGE)

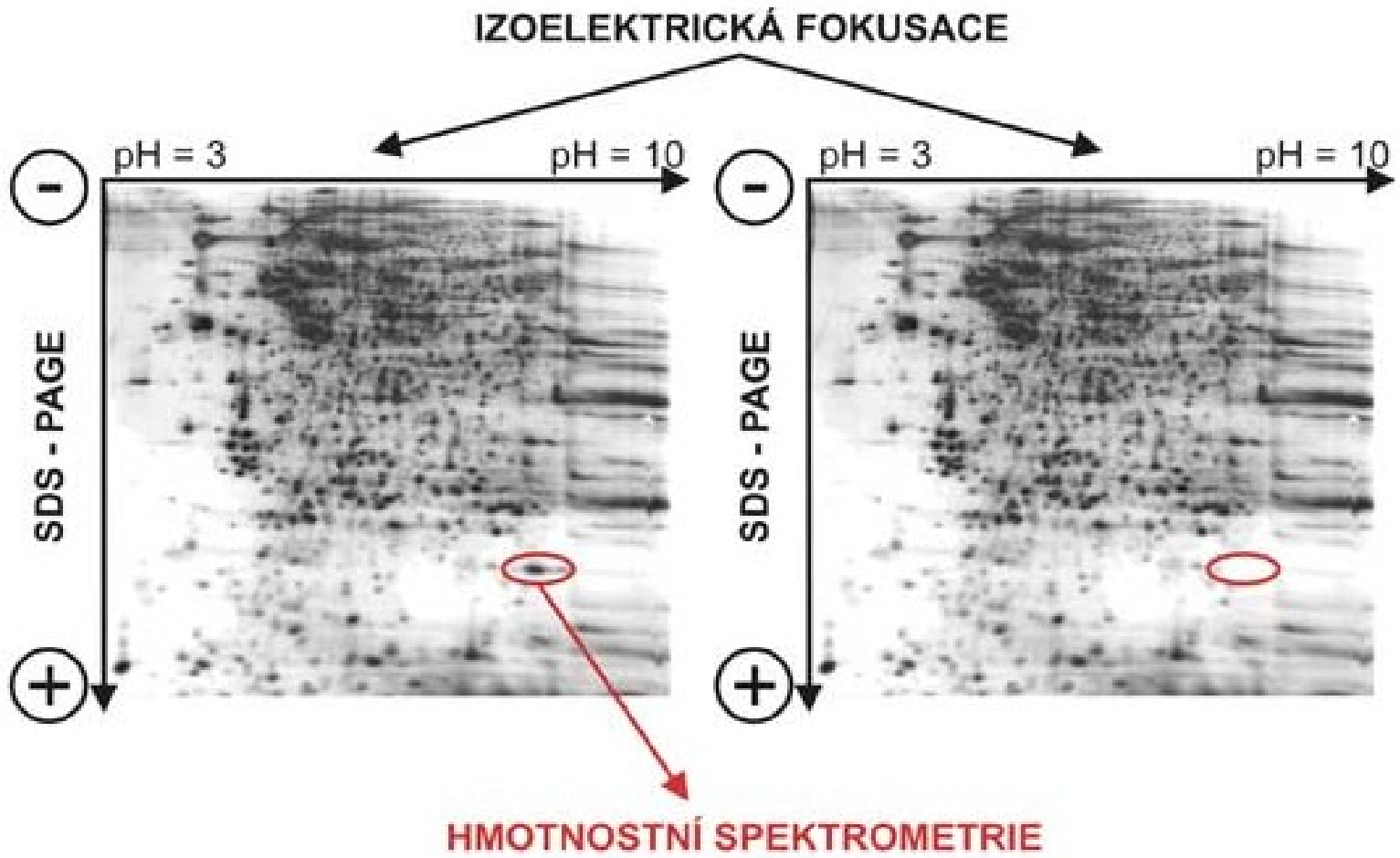
- proužek gelu obsahující proteiny po prvním dělení izoelektrickou fokuzací je umístěn na vrch deskového gelu, který obsahuje SDS dávající proteinům uniformní náboj
- napětí se aplikujeme kolmo vzhledem k původní orientaci elektrod
- proteiny poté migrují v druhém rozměru gelem čistě v závislosti na jejich velikosti.

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)

Vizualizace: barvení 2-DE gelů

- *proteiny jsou vizualizovány některou z barvicích metod*
- *Výsledné "mapy" proteinů lze porovnávat např. mezi experimentálním a kontrolním vzorkem nebo mezi vzorky odebranými od pacientů s konkrétním onemocněním oproti zdravým kontrolám a identifikovat tak odlišně exprimované proteiny, které mohou mít souvislost s patogenezí daného onemocnění.*
- *Proto je třeba ověřit identitu těchto odlišně exprimovaných proteinů, nejčastěji pomocí "vyříznutí" oblasti gelu vykazující odlišnost a její následnou analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.*

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)



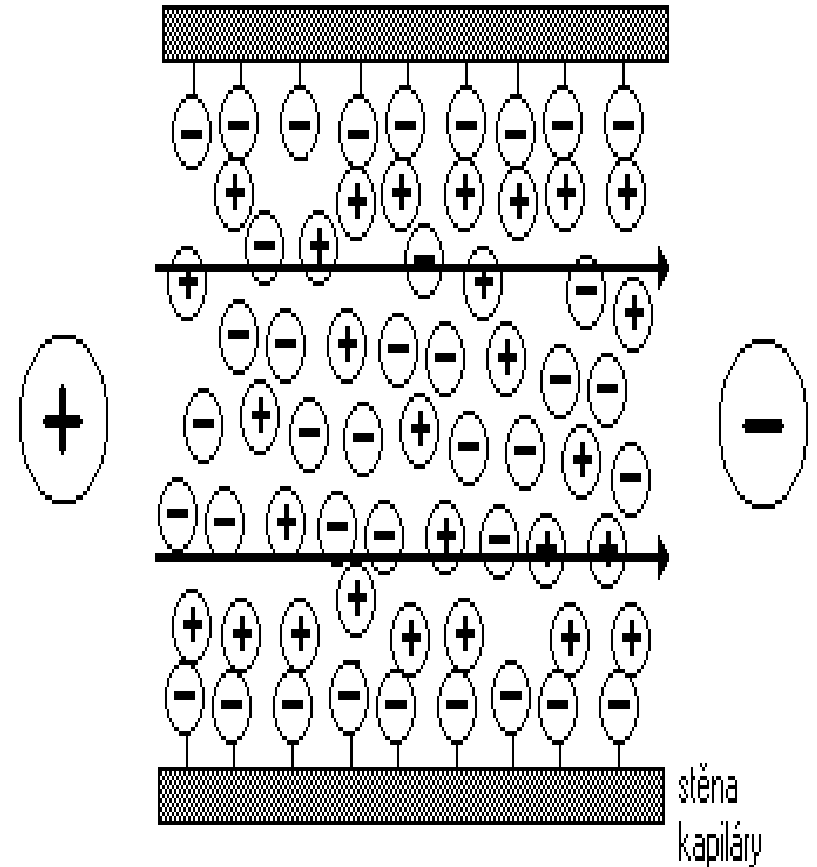
Kapilární elektroforéza (CE = capillary electrophoresis)

- Zvláštním způsobem elektroforézy je tzv. kapilární elektroforéza, která využívá elektrokinetických principů elektroforézy a *elektroosmózy* k separaci látek uvnitř kapiláry.

Kapilární elektroforéza - Elektroosmotický tok (EOF)

- Povrch křemenné kapiláry obsahuje negativně nabitě funkční skupiny, které přitahují pozitivně nabitě ionty.
- Pozitivně nabitě ionty migrují k negativní elektrodě a unášejí molekuly rozpouštědla stejným směrem.
- Tento celkový pohyb kapaliny je nazýván **elektroosmotický tok**.

Pozitivně nabitě ionty jsou elektroosmotickým tokem urychlovány, negativně nabitě naopak zpomalovány.



Kapilární elektroforéza - Elektroosmotický tok (EOF)

Velikost elektroosmotického toku je závislá:

- na náboji kapiláry
- viskozitě elektrolytu
- elektrické permitivitě elektrolytu

Kapilární elektroforéza - Elektroosmotický tok (EOF)

Velikost EOF je značně závislá:

- na pH elektrolytu
- ionizaci skupin na povrchu kapiláry

Do pH=4 je ionizace malá, a nad pH=9 jsou prakticky všechny skupiny ionizované.

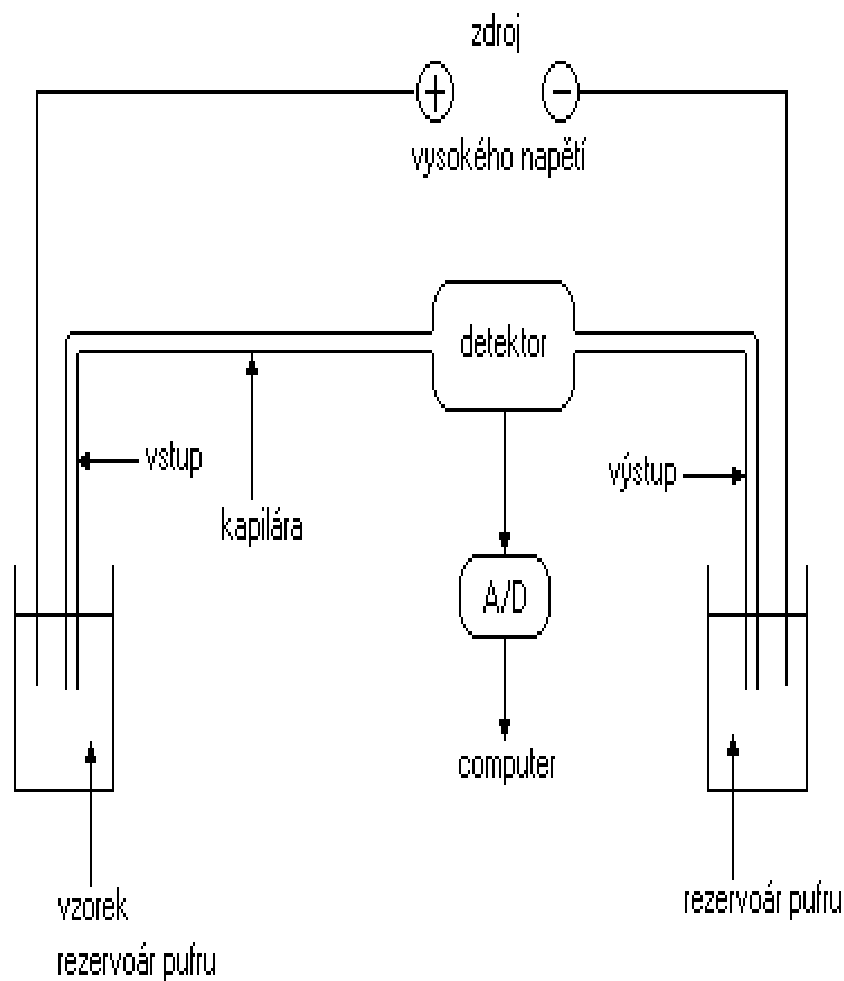
Kapilární elektroforéza - Elektroosmotický tok (EOF)

Nejdůležitější praktické důsledky EOF:

- **různě nabitě molekuly** v separovaném vzorku se pohybují různými směry podle náboje, ale všechny jsou **neseny ve směru katody** díky elektroosmóze.
- **kladně nabitě molekuly** dosáhnou katody jako první, protože elektroforetická migrace i elektroosmotický tok mají stejný směr.

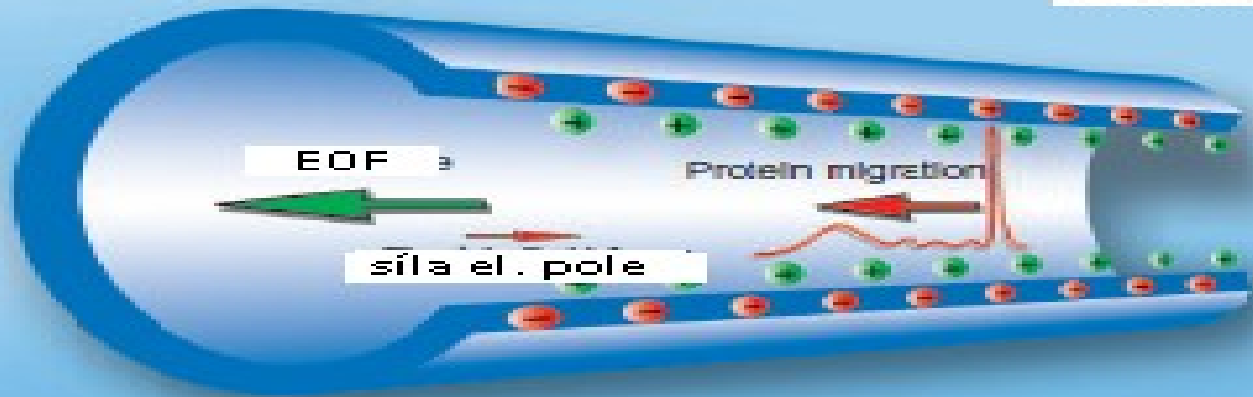
Kapilární elektroforéza – technické uspořádání

- křemenné kapiláry (čistý oxid křemičitý) s malým průměrem, které jsou vně potažené tenkou vrstvou polyimidu
- hydroxylové skupiny křemene mohou disociovat a nabíjet tak vnitřní stěnu kapiláry
- vnější průměr je obvykle 180 – 375 μm
- vnitřní průměr se pohybuje mezi 20 -180 μm .
- Celková délka kapiláry je 20 cm až několik metrů.
- Kapiláry slouží jako elektroforetická komora, která je terminálním koncem připojena na detektor
- přes rezervoár s pufrem je napojena na vysokonapěťový zdroj.



KATODA -

ANODA +



- pozitivní náboj pufru
- negativní náboj stěny kapiláry



EOF je silnější než síla elektrického pole - výsledkem je migrace proteinů ke katodickému konci kapiláry

Aparatura pro CE



Kapilární elektroforéza – technické uspořádání

Největší výhodou CE oproti tradičním elektroforetickým technikám je **možnost účinného odvodu tepla** během separace. To umožňuje použití vysokého napětí v rozmezí 25 – 30 kV, což vede k **zvýšení separační účinnosti a redukci doby separace**, v některých případech až pod 1 min..

Praktické využití elektroforetických technik v klinické zdravotnické laboratoři

- Elektroforéza **bílkovin krevního séra**
- Elektroforéza **bílkovin moče**
- Elektroforéza **bílkovin mozkomíšního moku**

Elektroforéza bílkovin krevního séra

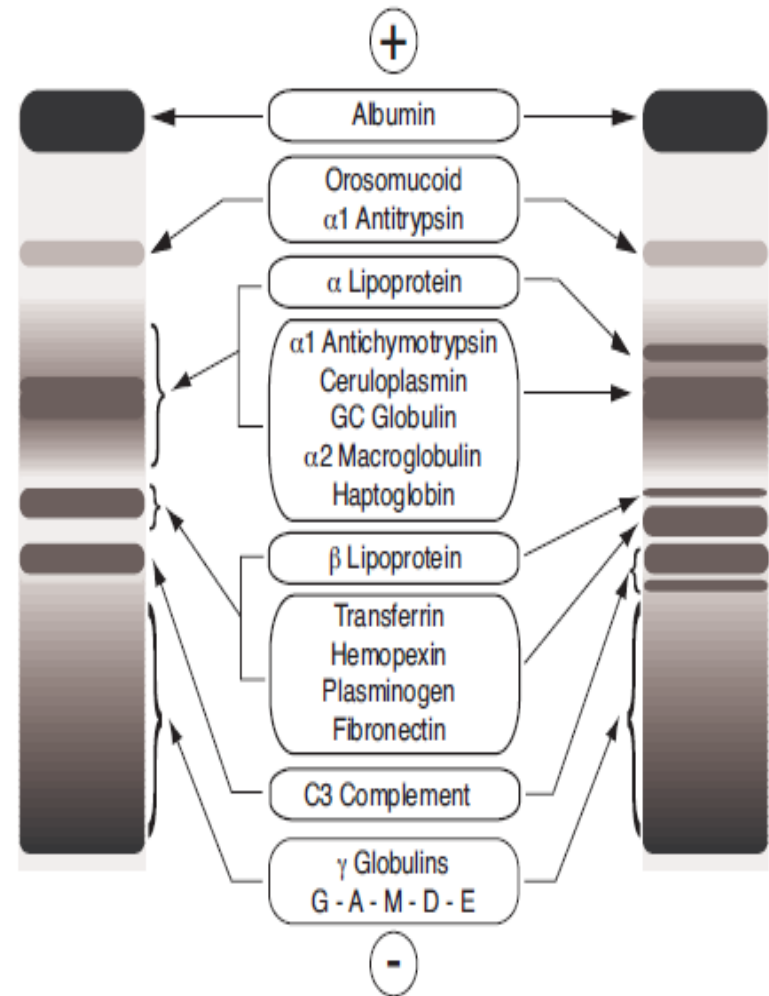
- Gelová elektroforéza
- Vysokorozlišovací gelová elektroforéza (HR elektroforéza)
- Gelová elektroforéza s následnou imunofixací
- Kapilární elektroforéza

Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

- vzorky nanášeny v blízkosti katodického konce nosného média, které je saturováno **alkalickým pufrem (pH 8,6)** s nízkou iontovou silou (asi 0,05)
- Jako nosné médium se nejčastěji používá **agarózový gel**
- Nosné médium je spojeno s dvěma elektrodami a proud prochází nosným médiem k separovaným proteinům.
- Typické parametry při elektroforetické migraci jsou **proud 10 mA na 1 cm šířky gelu s časem migrace asi 10 min.**(napětí 240 V, teploty 20 °)
- **Všechny hlavní sérové proteiny nesou při pH 8,6 negativní náboj a migrují k anodě.**
- Při standartně používané SPE se **sérové proteiny dělí na 5-6 proteinových frakcí.**

Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

- Každá zóna obsahuje jeden a více sérových proteinů.
- Nejvíce anodicky putuje albumin, následují α 1-globuliny α 2-globuliny, β 1-globuliny, β 2-globuliny a gamaglobuliny.
- Šířka proteinového bandu frakce závisí na počtu proteinů, které jsou ve frakci přítomny.

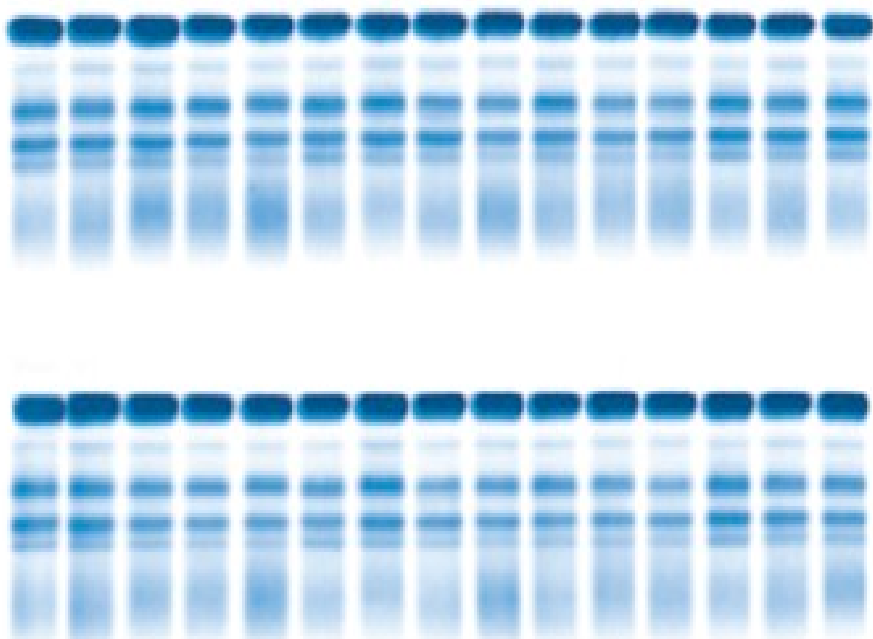


Elektroforéza bílkovin krevního séra - Gelová elektroforéza - SPE

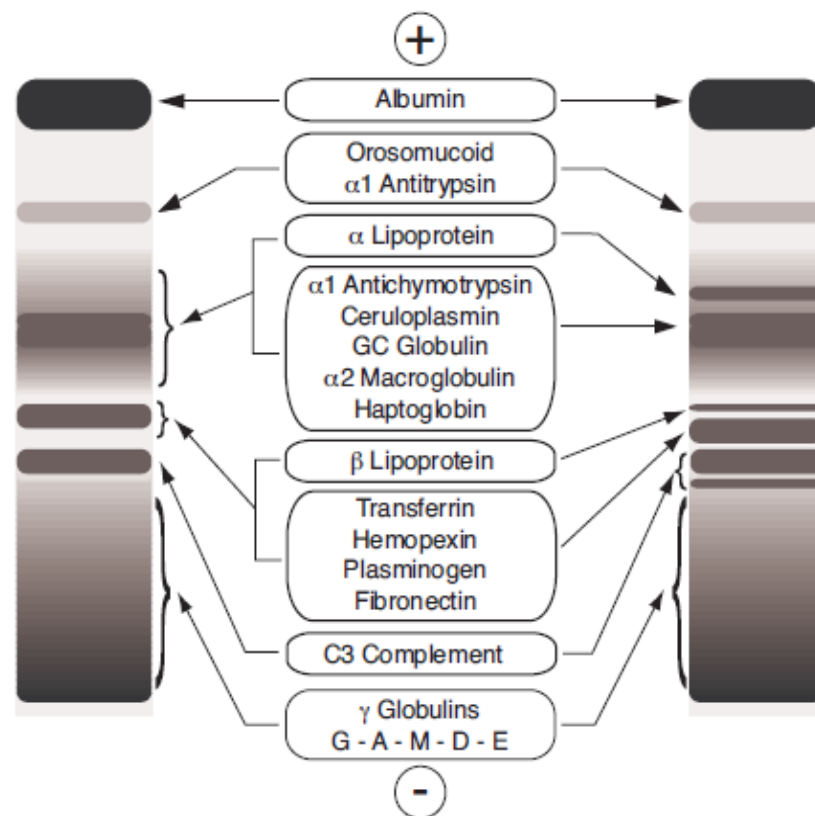
HYDRAGEL 01-02 15/30

sebia

10 17 10 19 20 21 22 23 24 25 26 27 20 29 30



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

Po elektroforetické separaci jsou proteinové frakce:

- 1. zafixovány** v nosném médiu ponořením do kyselého fixačního média (např. kys. octová):
 - dojde k denaturaci proteinů a
 - jejich imobilizaci v nosném médiu.
- 2. v dalším kroku jsou proteiny vizualizovány** barvením. Nejčastěji se jako barvivo používá Amidočern 10B nebo Coomassie blue.

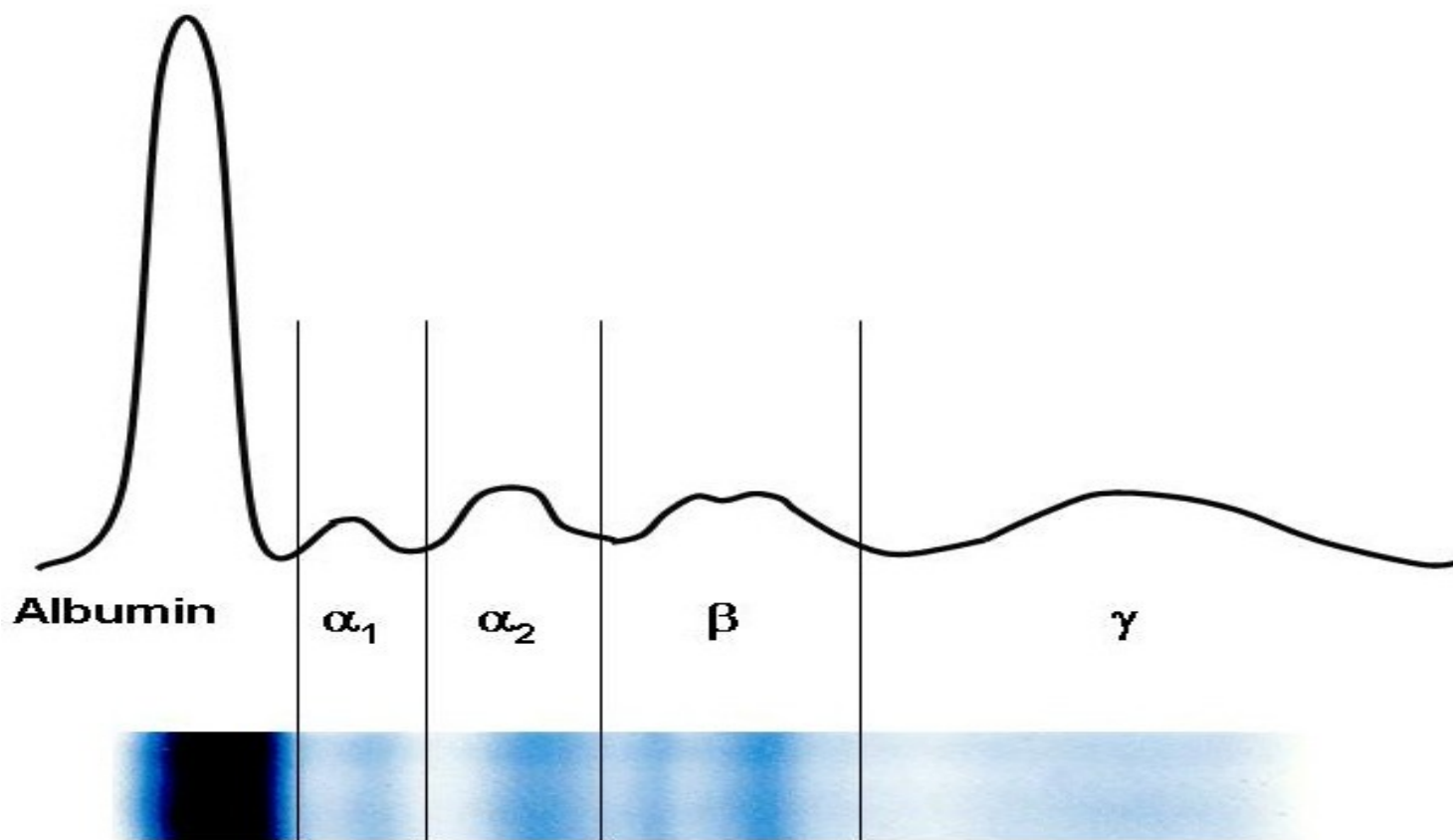
Elektroforéza bílkovin krevního séra - **Gelová elektroforéza - SPE**

Vyhodnocení elektroforeogramu:

- vizuální
- denzitometrické : jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi.

Po zpracování signálu integrátorem PC získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí v %. Koncentrace je vypočítána jako % z hodnoty celkové bílkoviny, která byla stanovena kvantitativně.

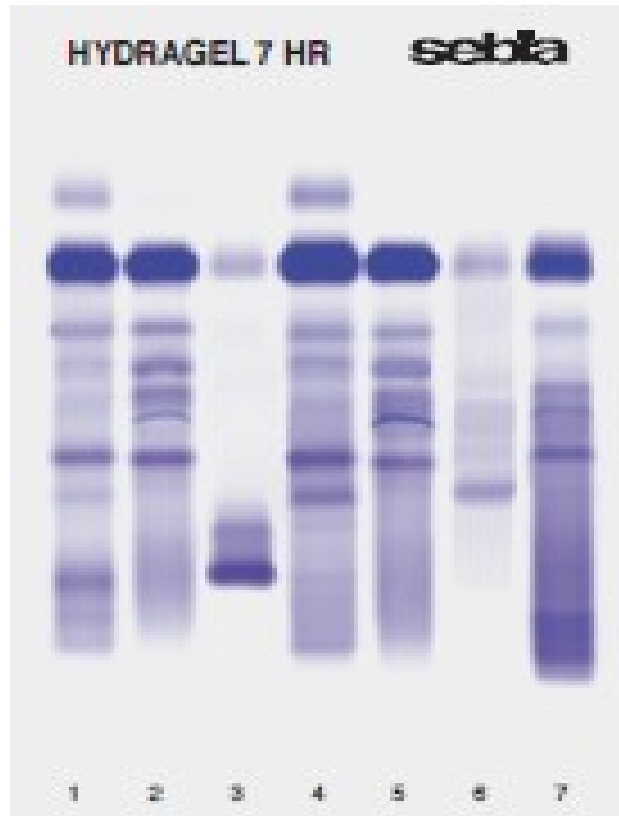
Elektroforéza bílkovin krevního séra - Gelová elektroforéza - SPE



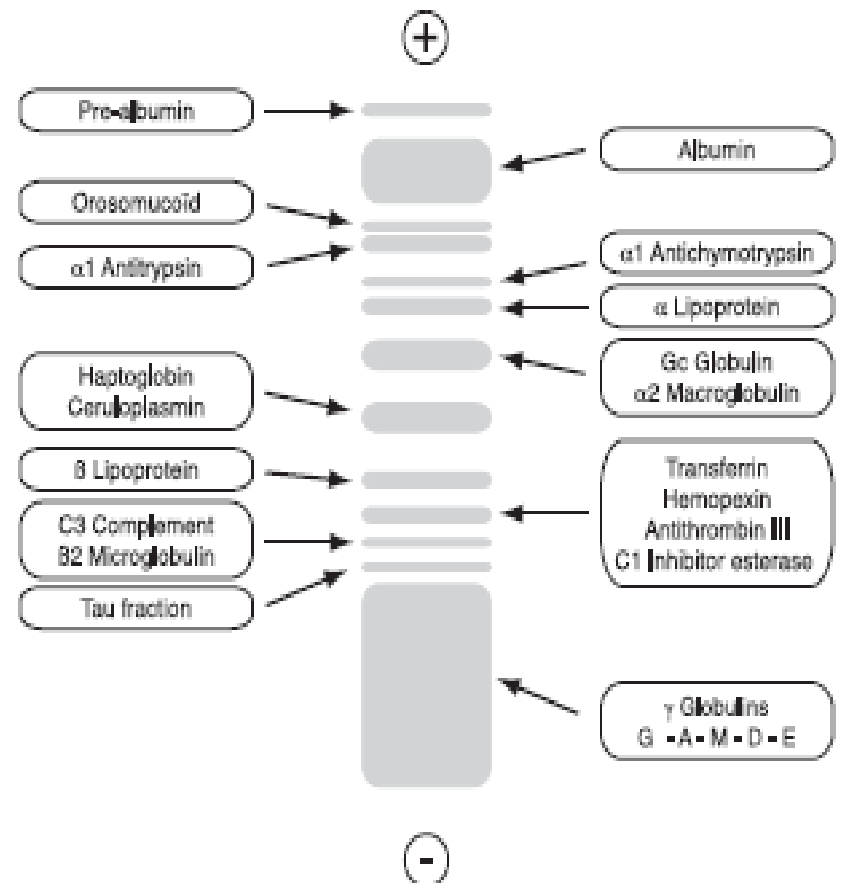
Elektroforéza bílkovin krevního séra: ***Vysokorozlišovací elektroforéza (HR elektroforéza)***

- Bílkoviny séra dělí na přibližně 10 frakcí.
- Každá frakce obsahuje jeden a více sérových proteinů.
- Složení gelu, podmínky elektroforézy a volba barvičky dovoluje vynikající rozlišení a vysokou senzitivitu zvláště v gama zóně.
- Gely je možné obarvit amidočerní nebo kyselou violetí.
- Obarvené elektroforogramy lze vyhodnotit vizuálně a denzitometrií.

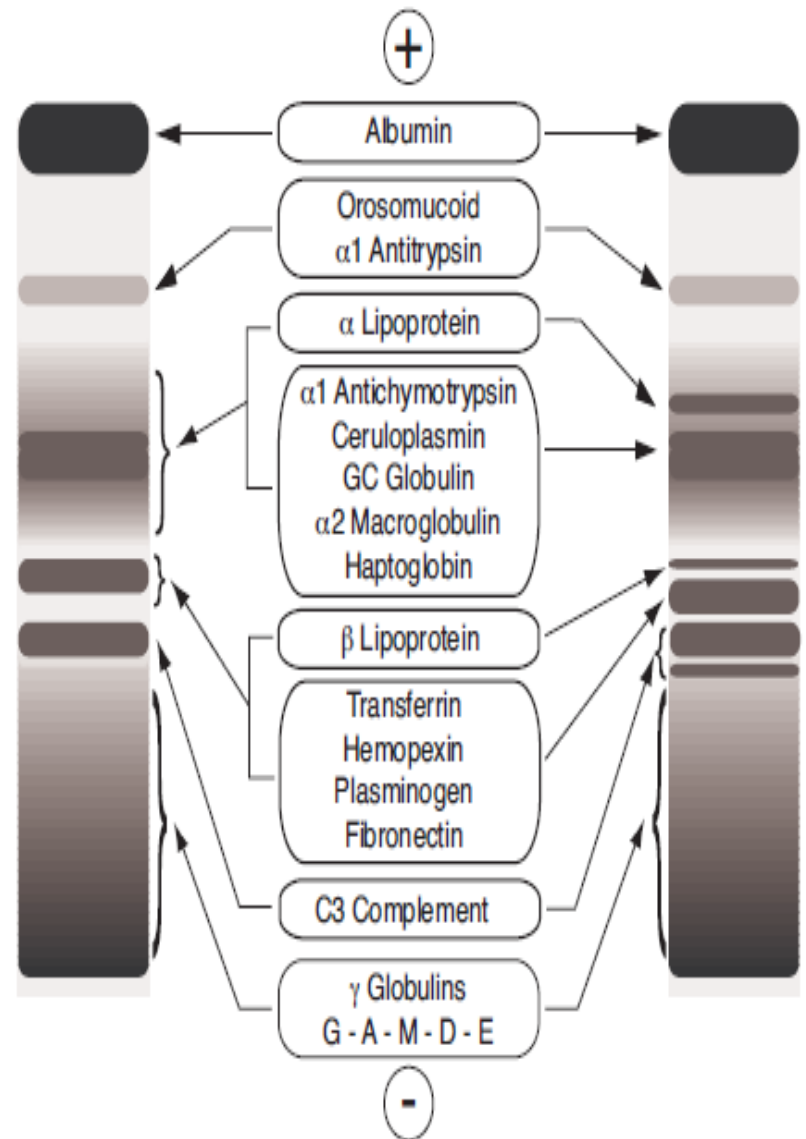
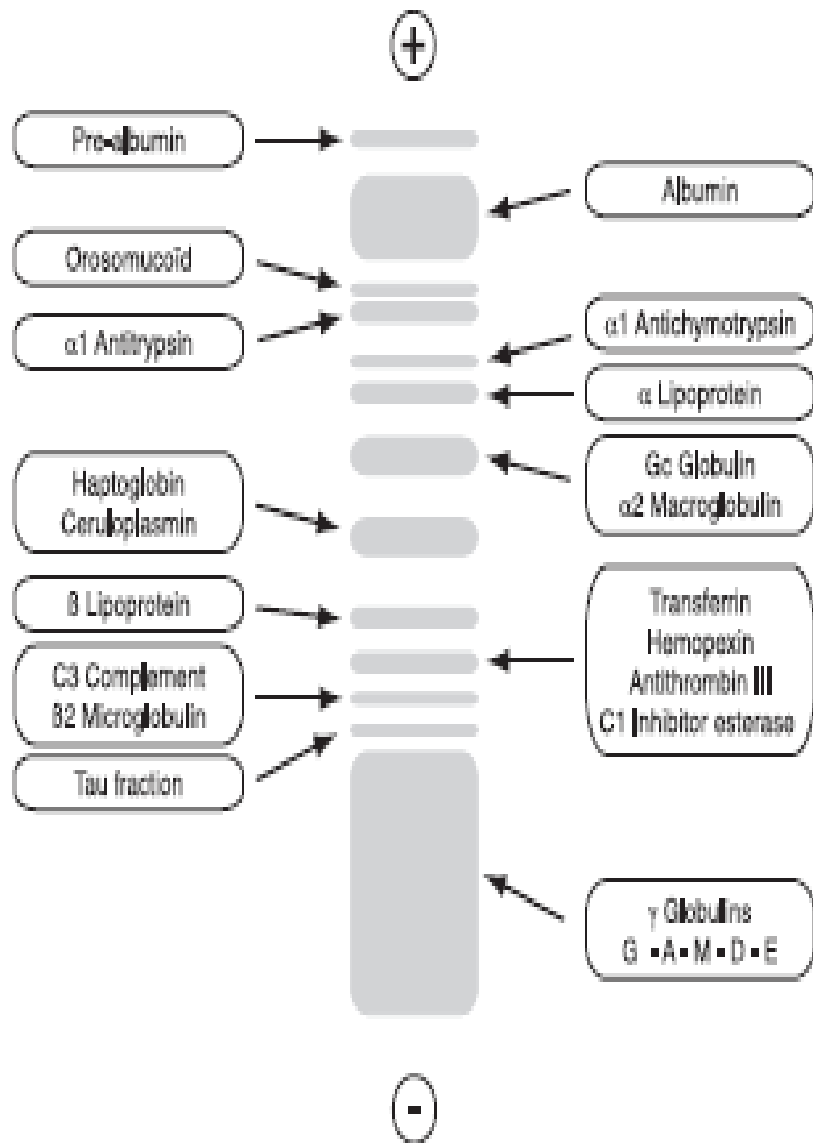
Vysokorozlišovací elektroforéza (HR elektroforéza)

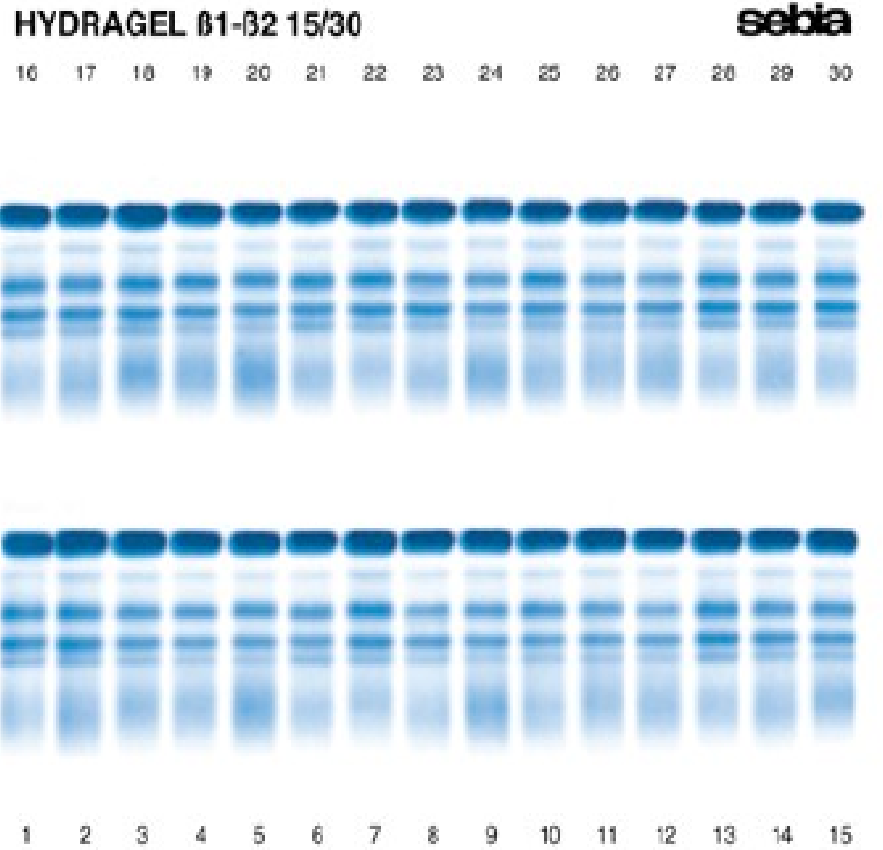


Elektroforeogram - HR elektroforéza



Elektroforeogram - HR elektroforéza





Elektroforéza bílkovin krevního séra:

Kapilární elektroforéza

- Elektroforetické dělení proteinů probíhá **v silikonových kapilárách o délce 30 -50 cm s vnitřním průměrem 25-100 μm .**
- **Detekce** se provádí v oblasti vlnových délek 200-600 nm.

Elektroforéza bílkovin krevního séra: **Elektroforéza s následnou imunofixací**

- Proteiny separované elektroforézou na alkalicky pufovaných agarózových gelech jsou inkubovány se specifickými antiséry proti těžkým řetězcům Ig G, Ig A, Ig M a lehkým volným i vázaným kappa a lambda řetězcům.
- Po odstranění nezreagovaných bílkovin jsou precipitáty obarveny kyselou violetí nebo amidočerní.
- Elektroforeogramy se hodnotí vizuálně a pátrá se po přítomnosti monoklonálních bílkovin.

Elektroforéza s následnou imunofixací

Provádí se ve čtyřech krocích:

- 1. Separace proteinů elektroforézou na agarózovém gelu.
- 2. Imunofixace (imunoprecipitace) proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty jednotlivými antiséry. Antiséra difundují do gelu a precipitují přítomné antigeny. Proteiny v referenční stopě jsou fixovány fixačním roztokem.
- 3. Neprecipitované, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny odsátím a promytím. Komplex antigen-protilátka zůstává v gelové matrix.
- 4. Precipitované proteiny jsou vizualizovány obarvením.

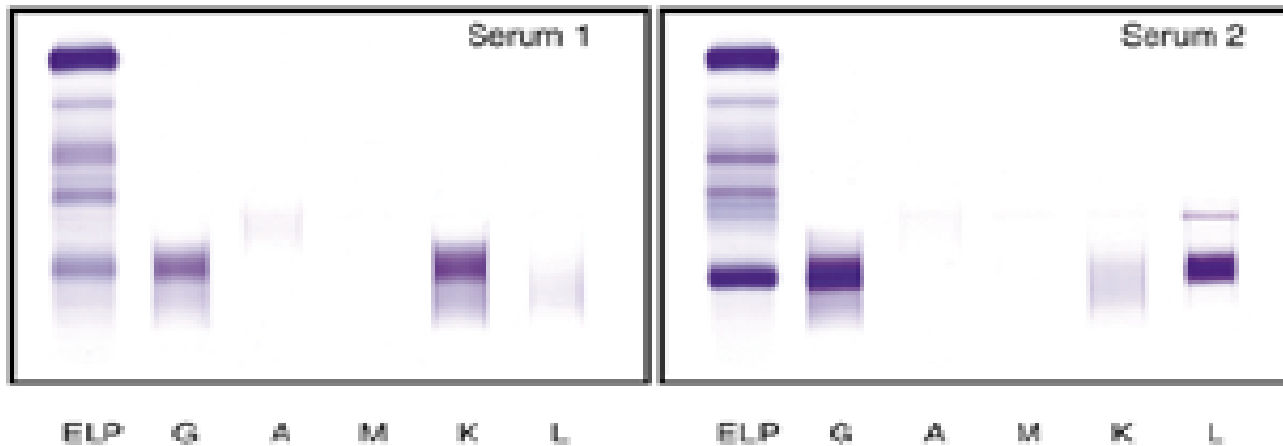
Elektroforéza s následnou imunofixací

- Elektroforetické dělení vzorku probíhá simultánně v šesti stopách. Po elektroforéze – první stopa (ELP) slouží jako referenční. Zbývajících 5 stop je použito k nanesení specifických antisér – trivalentní proti těžkým řetězcům (G, A, M) a anti-kappa a anti-lambda volným a vázaným lehkým řetězcům.
- Imunofixační proužky jsou porovnány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku – odpovídající proužek by měl mít stejnou migrační pozici.

Elektroforéza s následnou imunofixací

HYDRAGEL 2 IF

sebia



Elektroforéza bílkovin krevního séra:

Klinický význam stanovení

- k diagnostice a monitorování **mnohočetného myelomu** a dalších patologických stavů spojených s absorpcí, nadměrnou produkcí bílkovin, popř. stavů spojených se zvýšenými ztrátami bílkovin následkem orgánového poškození nebo změnou nutričních návyků.
- provádí se zejména, zjistíme-li patologický výsledek celkové bílkoviny, nebo potřebujeme-li podrobnější informaci o sérových bílkovinách.
- Zvlášť cenná je pro průkaz **dysproteinemie** – změna koncentrace a kvalitativního složení jednotlivých bílkovin v séru, **paraproteinemie** – charakterizována přítomností monoklonálních imunoglobulinů.

Elektroforéza bílkovin krevního séra:

Klinický význam stanovení

- Velkou předností elektroforézy ve srovnání s kvantifikací specifických proteinů je přehled, který poskytuje.
- Elektroforeogram nám dává informace o o relativním zvýšení, snížení nebo homogenitě jednotlivých proteinových frakcí.
- Proteiny tvoří velkou skupinu látek přítomných v plazmě (séru), jejich celková koncentrace se pohybuje v rozmezí 60 - 80 g/L.
- Tyto proteiny plní řadu funkcí, nacházíme zde transportní proteiny, protilátky, inhibitory enzymů, srážecí faktory, aj.

Elektroforéza bílkovin krevního séra:

Klinický význam stanovení

- Pro vyšetření spektra krevních proteinů je nejvhodnějším sérum: na rozdíl od plazmy neobsahuje fibrinogen (faktor I koagulační kaskády), jehož fyziologická koncentrace je kolem 3 g/L.
- V případě vyšetření plazmy se fibrinogen nachází v místech, kde se za patologických situací mohou vyskytovat tzv. monoklonální imunoglobuliny (viz dále).
- Během různých onemocnění se mění relativní zastoupení jednotlivých proteinů v séru a tím i elektroferogram (výsledek elektroforézy), který tak může sloužit k orientačnímu zhodnocení zastoupení výše uvedených frakcí proteinů.

Elektroforéza bílkovin moče (UPE = urine protein electrophoresis)

- Poskytuje kvalitativní pohled na proteinurii.
- užitečnou informací při diagnostikování selhání ledvin.
- Identifikace hlavních bílkovin v moči pomáhá přesně určit typ poškození ledvin (tubulární, glomerulární nebo smíšený)
- dále pomáhá při identifikaci monoklonálních gamapatií (Bence Jonesovy bílkoviny).

Elektroforéza bílkovin moče (UPE = urine protein electrophoresis)

- **Elektroforeogram bílkovin moče je podobný rozdělení bílkovin v séru** - intenzita frakcí závisí na filtrační schopnosti ledvin.
- K analýze používáme **zahuštěné nebo nezahuštěné vzorky moče**.

Zahuštění se provádí na koncentraci bílkoviny asi 15 - 20 g/L pomocí koncentračních zkumavek (Vivaspine 2, Santorius):

- Tyto zkumavky obsahují speciální hydrofilní membránu což znesnadňuje vazbu proteinů.
- Membrána je vyrobena z polyethylensulfonátu (PES), triacetátu celulózy (CTA) nebo ze stabilizované celulózy (Hydrostat), má cutoff hodnotu podle molekulové hmotnosti pro kterou je nepropustná.(5, 10 a 30 kDa).
- Stabilita moče pro vyšetření elektroforézy je minimálně 1 týden při teplotě 2 – 8 °C, není doporučeno vzorky mrazit.

Elektroforéza bílkovin moče (UPE = urine protein electrophoresis)

Přehled nejvíce používaných elektroforetických technik:

- *Gelová elektroforéza UPE (urine protein electrophoresis)*
- *Gelová elektroforéza s následnou imunofixací (uIFE=urine immunofixation electrophoresis)*
- ***Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům***
- ***SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)***

Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům

Postup:

Vzorek **zahuštěné moče** je současně podroben elektroforéze v devíti stopách na alkalicky pufovaném agarózovém gelu (pH 9.1) .

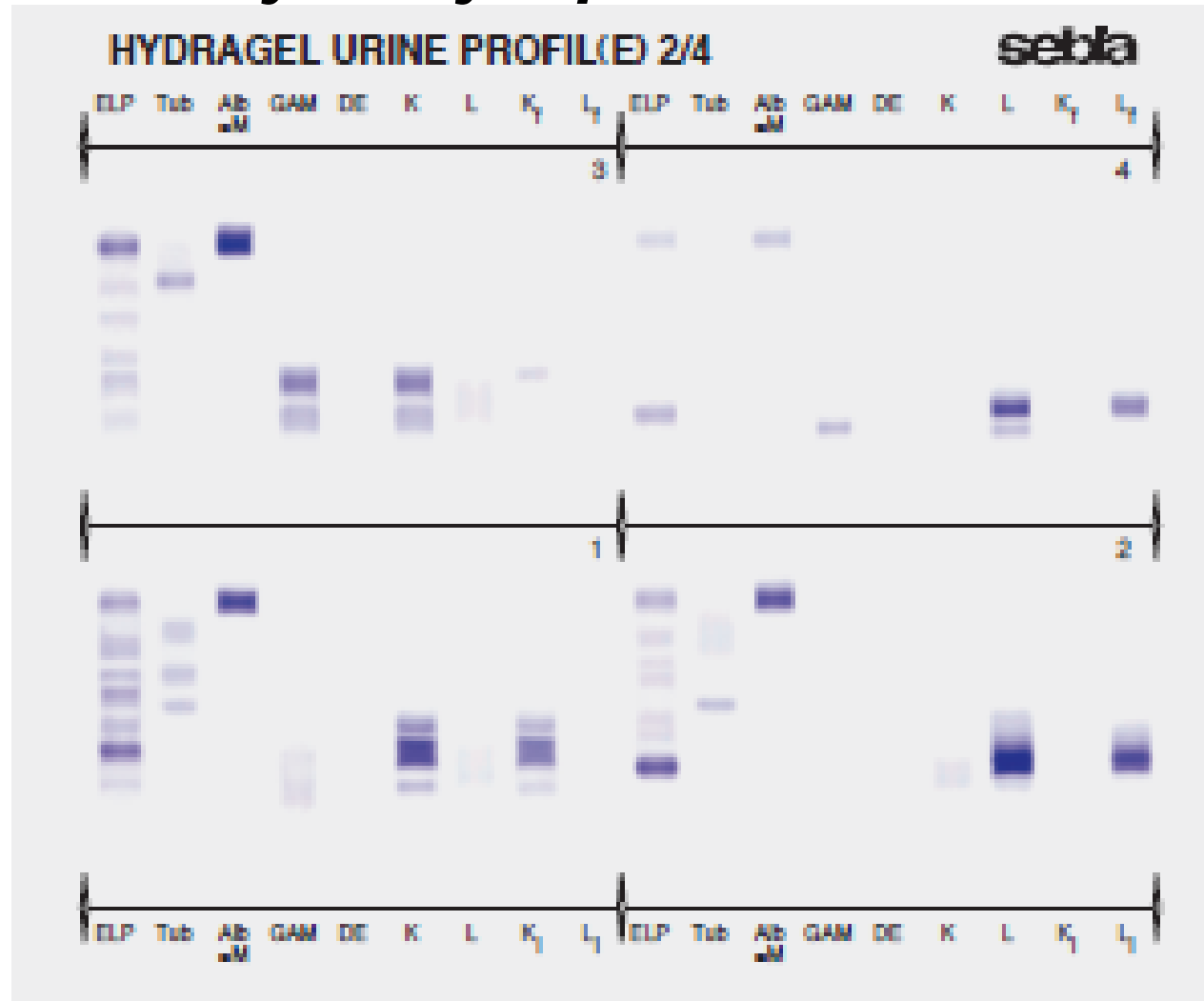
- Po elektroforéze slouží jedna stopa (ELP) jako referenční pro znázornění elektroforetického uspořádání bílkovin ve vzorku.
- Zbývajících osm stop je imunofixováno příslušným antisérem.
- Nevysrážené, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny pomocí odsávání a promývání.
- Precipitovaný komplex antigen-protilátka je zachycen v matici gelu.
- Vysrážené bílkoviny jsou vizualizovány barvením kyselou violetí. Přebytečné barvivo se odstraňuje kyselým roztokem.

Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům

Bílkoviny jsou imunofixovány specifickými antiséry proti :

- - tubulární proteiny: β 2 mikroglobulin, Protein Vázající Retinol (RBP) a α 1 mikroglobulin,
- - glomerulární proteiny: (Albumin a α 2 makroglobulin),
- - těžké řetězce gama, alfa a mu (s trivalentním antisérem),
- - lehké řetězce Kappa, volné i vázané,
- - lehké řetězce Lambda, volné i vázané,
- - lehké volné řetězce Kappa ,
- - lehké volné řetězce Lambda.

Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům



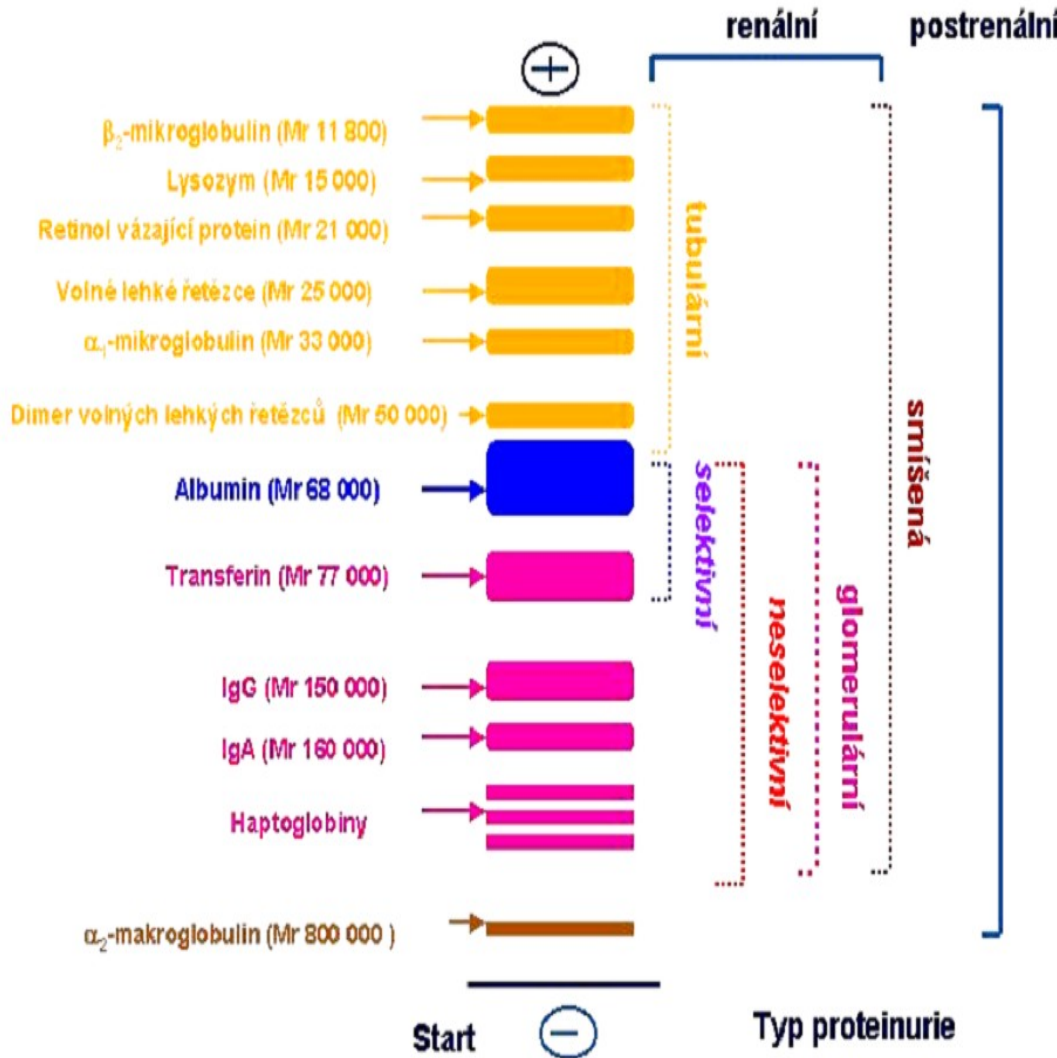
SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)

- Používají se neutrálně pufované SDS gely - separují močové bílkoviny podle jejich molekulové hmotnosti a zcela jasně odlišuje bílkoviny tubulární od bílkovin glomerulárního původu.
- Výsledek elektroforetického dělení proteinů obarvených kyselou violetí je vizuálně porovnáván s proteinovými markery v referenční stopě.
- provádí se v nezahuštěné moči,
- minimální detekční hladina je 15 mg/L na frakci.

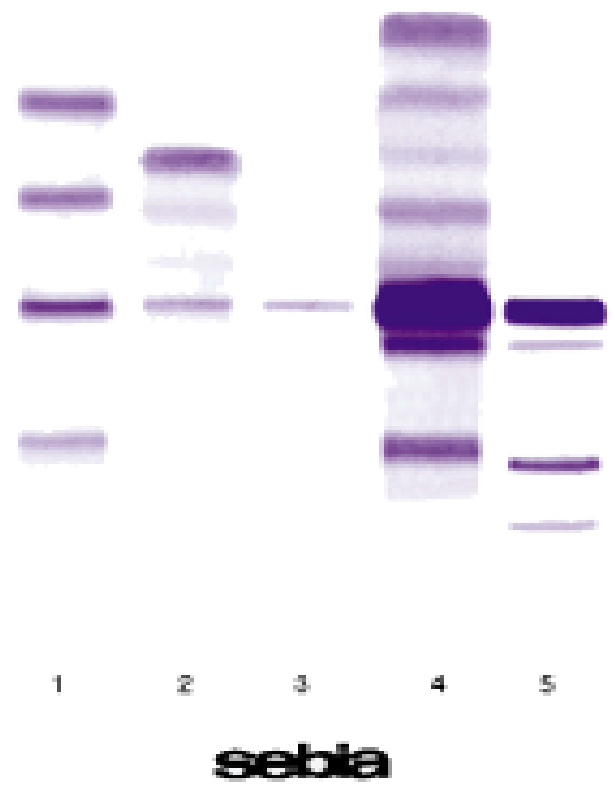
SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)

- V přebytku detergentu SDS jsou bílkoviny změněny v komplexy kde dochází k rozrušení nativní struktury bílkovin a zaujetí uniformní struktury o stejném negativním elektrickém náboji na jednotku hmotnosti.
- Používají se gely s vysokou koncentrací – 10%, kde dochází k rozdělení močových bílkovin dle jejich molekulární hmotnosti.
- Jednotlivé bílkoviny tubulárního původu (M.V. < 65 - 70 kDa) jsou jasně odlišeny od glomerulárních (M.V. > 65 - 70 kDa).

SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)



HYDRAGEL 5 PROTEINURIE



Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

- Vyšetření mozkomíšního moku (CSF) je důležitou součástí diagnostiky onemocnění centrálního nervového systému (CNS).
- Mozkomíšní mok je čirá bezbarvá tekutina. Vzniká hlavně v chorioideálním plexu mozkových komor.
- Mozkomíšní mok obtéká mozek a míchu, chrání je proti nárazům a otřesům.
- Je neustále produkován, cirkuluje a poté je absorbován do krevního řečiště.

Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

- Celá řada onemocnění CNS se vyznačuje zvýšením proteinů v mozkomíšním moku v důsledku zvýšené permeability hematoencefalické bariéry nebo zvýšené syntézy imunoglobulinů - v první řadě imunoglobulinu (Ig) ve třídě IgG v CNS. Přítomnost intratékálního Ig G je významnou informací vedoucí k dg. zánětlivého onemocnění CNS jehož příčinou je např. **skleróza multiplex.**

Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

- Izoelektrická fokuzace :

metoda zahrnuje izoelektrofokusaci na agarózovém gelu, následovanou immunofixací s anti-Ig G antisérem.

Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.

Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování.

Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

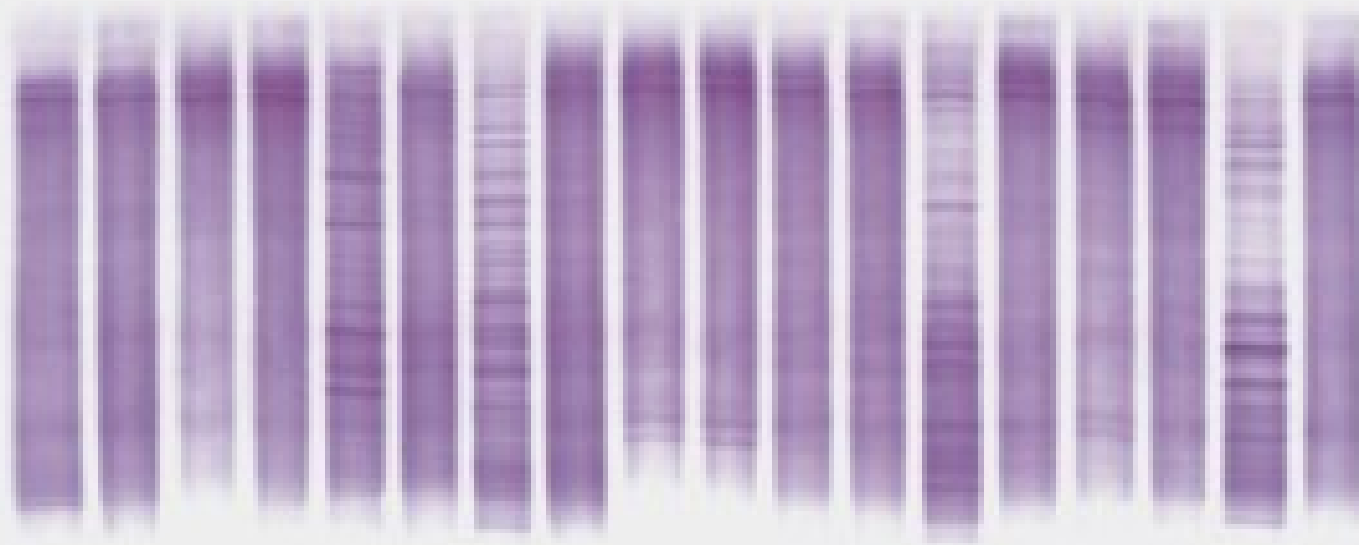
Test se provádí ve dvou stupních :

1. Izoelektrofokusace na agarózovém gelu k rozdělení proteinů ve vzorcích CSF a séra.
 2. Immunofixace anti Ig G antisérem značeným enzymem (peroxidáza) určeným k detekci Ig G oligoklonálních proužků a demonstrace rozdílů nebo nepřítomnosti Ig G v CSF a v séru.
- K potvrzení intratékální syntézy Ig je nutno analyzovat sérum a mozkomíšní mok paralelně ve stejných koncentracích, aby byl demonstrován rozdíl v distribuci Ig G.

HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

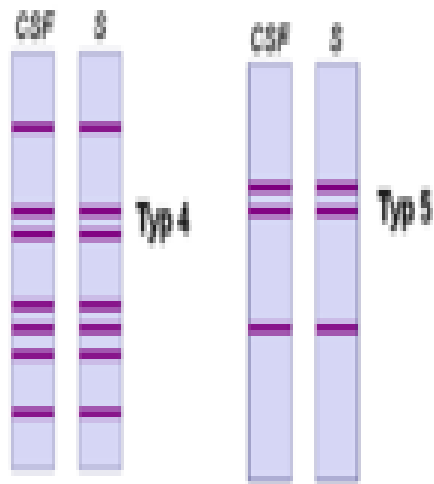
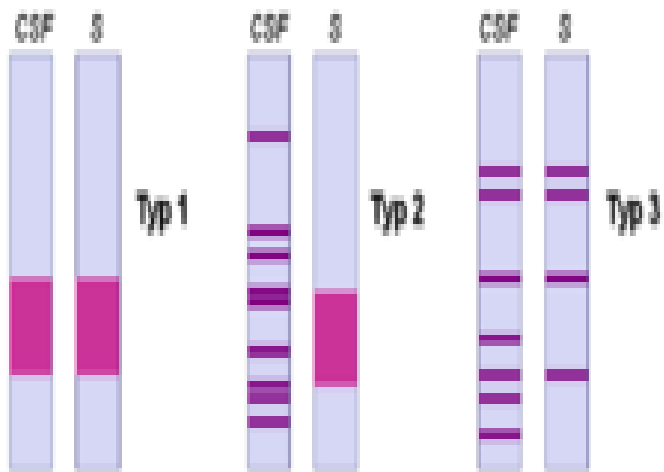
sebia

1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 7 7' 8 8' 9 9'



Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

- Fyziologicky mají imunoglobuliny v séru i mozkomíšním moku polyklonální charakter a vyjadřují heterogenitu individuálních protilátek produkovaných jako odpověď na nejrůznější antigeny, s nimiž se jedinec setkal.
- Intratékálně produkované protilátky se vyznačují pouze omezenou (oligoklonální) heterogenitou, což se při izoelektrické fokusaci projeví jako izolované proužky, které nejsou patrné při analýze séra.
- Z toho vyplývá nutnost provádět současně analýzu imunoglobulinů likvoru i séra.
- Srovnává se přítomnost či nepřítomnost identických pruhů IgG v séru a moku; počet a lokalizace proužků nemá diferenciálně diagnostický význam.



Základní typy :

- **Typ 1** – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;
- **Typ 2** – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u [roztroušené sklerózy](#));
- **Typ 3** – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (např. chronická infekce CNS, roztroušená skleróza);
- **Typ 4** – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;
- **Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu ([myelom](#), [monoklonální gamapatie](#))

Výrobci elektroforetických zařízení

- Automatizované systémy pro **gelovou elektroforézu bílkovin**
- Automatizované systémy pro **kapilární zónovou elektroforézu**

Automatizované systémy pro gelovou elektroforézu bílkovin

- ***Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor HYDRASYS***
- *Výrobce Helena Biosciences Europe (Anglie) – analyzátor SAS1-4, SPIFE 4000*
- *Výrobce Interlab (Itálie)-Analyzátor Microge, I analyzátor G26*

Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor HYDRASYS

- Poloautomatické systémy HYDRASYS jsou nejrozšířenější elektroforetické systémy v klinických laboratořích. Tyto systémy jsou určeny pro elektroforézu bílkovin na agaróze (AGE).
- Lze provést až 145 elektroforéz bílkovin krevního séra za hodinu.
- Na jednom gelu je možné separovat až 54 vzorků séra v jednotlivých elektroforetických stopách.

Výrobce *Sebia (Francie)* – analyzátor *HYDRASYS*

Analyzátor Hydrasys:

- migrační modul - aplikaci vzorku, elektroforetickou migraci atd. Migrační model je vybaven systémem pro kontrolu teploty (Peltierův efekt), který během migrace zajistí konstantní teplotu.
- barvicího modulu - fixace, barvení a sušení gelu

Provádí všechny fáze elektroforézy.

Druhá generace přístrojů má zabudovaný scanovací modul pro následné denzitometrické vyhodnocení elektroforeogramů. Scanovací modul umožňuje snímání s vysokým rozlišením obrazu a kvantifikaci gelu za méně než za jednu minutu.

Tento přístroj má také modul pro izoelektrickou fokuzaci

*Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor
HYDRASYS*



Výrobce Sebia (Francie)

- separace proteinů krevního séra, moče mozkomíšního moku nebo jiných biologických tekutin.
- provedení SPE, UPE, imunofixace séra a moče, izoelektrickou fokuzací, separací kvantifikaci izoenzymů (ALP, LDH, CK), lipoproteinů, frakcí hemoglobinu nebo transferinu.

Výrobce Helena Biosciences Europe (Anglie)

Analyzátor SAS 1-4

- Tento výrobce nabízí poloautomatické systémy SAS 1 – 4 (dle kapacity přístroje) pro gelovou elektroforézu na agaróze.
- Lze provést až 100 elektroforéz bílkovin krevního séra za hodinu. Přístroj má obdobné uspořádání a poskytuje stejnou nabídku vyšetřovaných parametrů jako výrobce SEBIA.
- *SPIFE 4000 analyzátor pro elektroforézu (SPE) a imunofixaci (IFE) bílkovin krevního séra*

Výrobce Helena Biosciences Europe

SPIFE 4000 analyzátor pro elektroforézu (SPE) a imunofixaci (IFE) bílkovin krevního séra

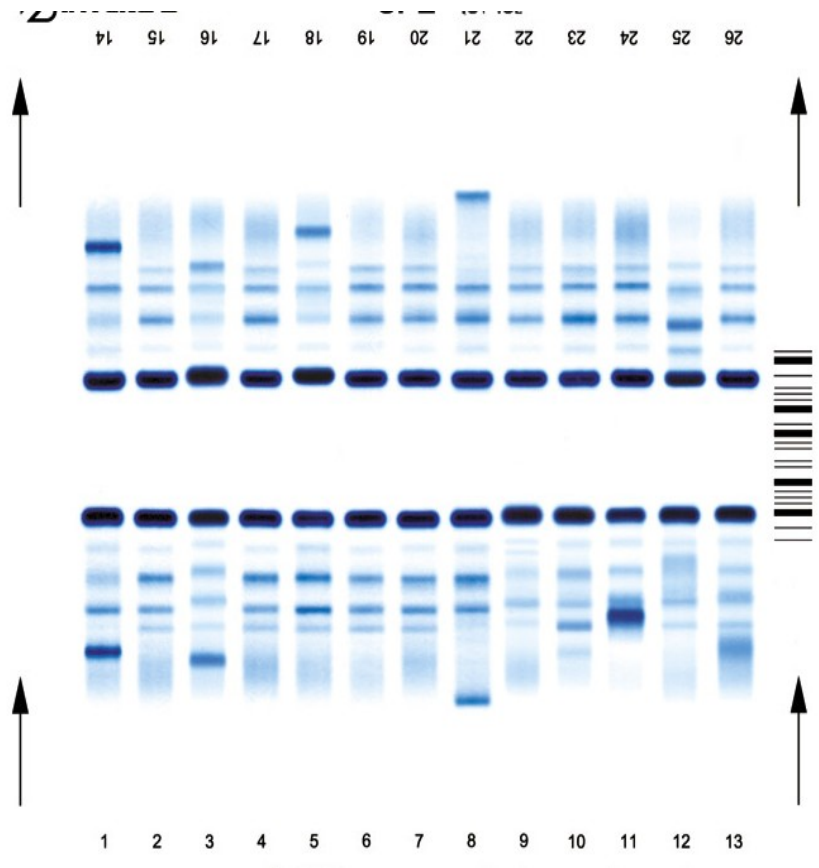
- plně automatizovaný systém pro elektroforézu a imunofixaci séra.*
- Tento automat má kapacitu 560 SPE a 80 IFE během 8 hodin.*
- Analyzátor provádí vše automaticky včetně aplikace antiséra (pro IFE), které jsou umístěny na palubě.*
- Po usušení je gel automaticky přenesen do scanovacího modulu.*

Výrobce Interlab (Itálie)-Analyzátor

Microgel analyzátor G26

- plně automatizovaný elektroforetický systém pro elektroforézu na agaróze.
- Jeho kapacita je 150 vzorků za hodinu.
- Systém má 4 držáky na gel, do každého lze umístit 1-2 gely. Na jednom gelu je možné současně analyzovat 26 vzorků.
- Obsahuje také modul pro izoelektrickou fokuzaci.
- Unikátní dvojitý aplikátor umožňuje simuntálně aplikovat vzorky v 1 nebo 2 řadách na každý gel.
- Migrační modul má 3 elektrody, což umožní zrcadlové dělení vzorků, při 2 - řadové aplikaci vzorků na gel

Výrobce Interlab (Itálie)-Analyzátor Microgel analyzátor G26



Migrační modul má 3 elektrody, což umožní zrcadlové dělení vzorků, při 2 - řadové aplikaci vzorků na gel

*Výrobce Interlab (Itálie)-Analyzátor
Microgel analyzátor G26*



Automatizované systémy pro kapilární zónovou elektroforézu

- Multikapilární elektroforetické systémy se v současné době stávají významným nástrojem rychlého, rutinního, vysokokapacitního a zcela automatizovaného měření základních proteinových frakcí krevního séra.
- Vysoká pracovní kapacita multikapilárních zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE) komunikujících s laboratorním informačním systémem představuje možnost zvýšení efektivity měření v režimu průběžného zpracování vzorků z primárních zkumavek identifikovaných čárovými kódy.

Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor CAPILLARYS

- Plně automatizovaný systém pro kapilární elektroforézu provádí elektroforetickou separaci současně na osmi kapilárách
- je schopen analyzovat 80 vzorků za hodinu.
- Životnost kapiláry je 3000 vzorků/1 kapilára, tzn. 24 000 vzorků pro celý systém.
- Pro detekci se používá optický UV – VIS detektor s detekcí vlnové délky v závislosti na stanovovaných parametrech.(při elektroforéze sérových proteinů je měřena absorbance při 200 nm.)

Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor CAPILLARYS

- Systém Capillarys 2 umožňuje rozdělení bílkovin krevního séra na 6 frakcí - frakce betaglobulinů se dělí na beta-1 a beta-2 frakci .
- Přístroj je vybaven čtečkou čárového kódu, což umožňuje identifikaci vzorků.
- Na tomto systému je možné provádět elektroforézu séra a moče, imunofixaci, dělení frakcí hemoglobinu a transferinu.

Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor CAPILLARYS

