

# Elektroforetické techniky

David Zeman

2021

## Pojmy a definice

- Elektroforéza = pohyb nabitých částic v elektrickém poli; 3 základní techniky:
- **Zónová elektroforéza:** homogenní pufovací systém – konstantní pH; migrační vzdálenosti během definované doby dělení odpovídají elektroforetickým mobilitám dělených látek; lze aplikovat na neamfoterní i amfoterní molekuly; difúze snižuje senzitivitu detekce i rozlišení
- **Izotachoforéza (ITP):** dělení v diskontinuálním systému pufrů, ionizovaný vzorek migruje mezi vedoucím elektrolytem s vysokou mobilitou a terminálním elektrolytem s nízkou mobilitou; lze dělit buď pouze kationty, nebo pouze anionty (ne obojí současně); všechny složky směsi se pohybují stejnou rychlostí; složky směsi jsou rozdělené podle svých elektroforetických mobilit
- **Izoelektrická fokusace (IEF):** dělení v gradientu pH, lze použít pouze pro amfoterní látky (peptidy a bílkoviny); molekuly migrují do svých izoelektrických bodů; samozaostřující (fokusační) efekt brání difúzi
- Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis, CE)

## Teoretické základy elektroforetických metod

- $F_E = q \cdot E$  ( $q = z \cdot e$ )
- $F_{fr} = f_c \cdot v$
- V rovnováze:

$$F_E = F_{fr}$$

$$q \cdot E = f_c \cdot v$$

$$v = \frac{q \cdot E}{f_c} = u \cdot E$$

$u$  je **mobilita** neboli **elektroforetická pohyblivost** částice. Je to veličina charakteristická pro danou látku.

## Elektroforetická pohyblivost částice $u$

- Pro kulovitou částici platí:

$$u = \frac{q}{f_c} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

- Peptidy a proteiny však nejsou kulovité. Mobilita  $u$  je u nich nepřímo úměrná molekulové hmotnosti podle vztahu

$$u = \frac{q}{M^{2/3}}$$

(exponent ve jmenovateli je udáván různě mezi 1/3 a 2/3)

U slabých kyselin a zásad je pro rychlost migrace rozhodující efektivní mobilita  $u_{ef}$  daná vztahem

$$u_{ef} = \sum_i \alpha_i \cdot u_i$$

Kde  $\alpha_i$  je stupeň disociace. Ten lze ovlivnit vhodnou volbou pH elektrolytu.

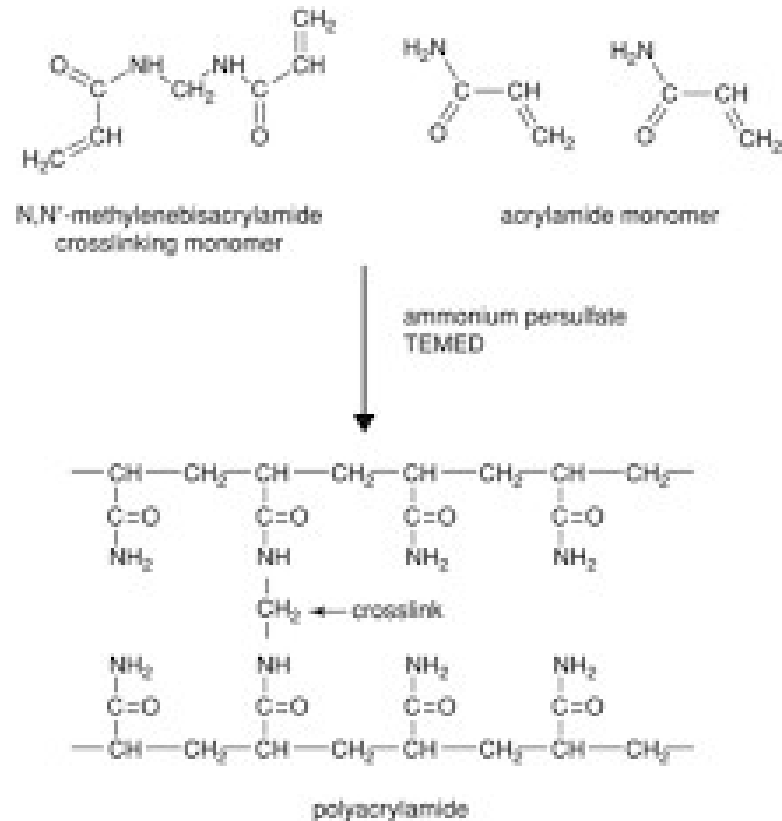
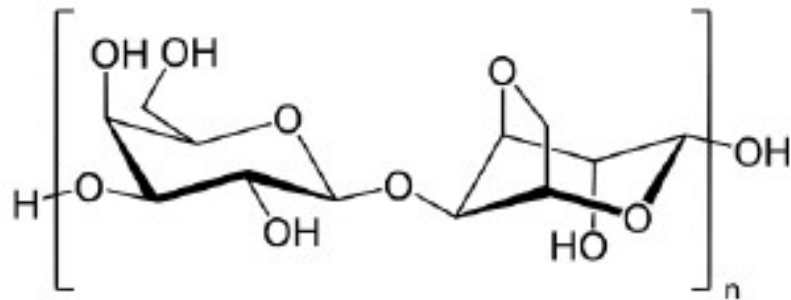
# Instrumentace – 3 základní komponenty:

- Zdroj stejnosměrného napětí
- Chlazení (termostat)
- Elektroforetická vana/deska

## Média pro zónovou elektroforézu

- Papír
- Škrob
- Acetylcelulóza
- Agar
- Agaróza
- Polyakrylamid

# Agaróza (vlevo) a polyakrylamid (vpravo – znázorněn princip přípravy z akrylamidu a N, N'-methylenbisakrylamidu)



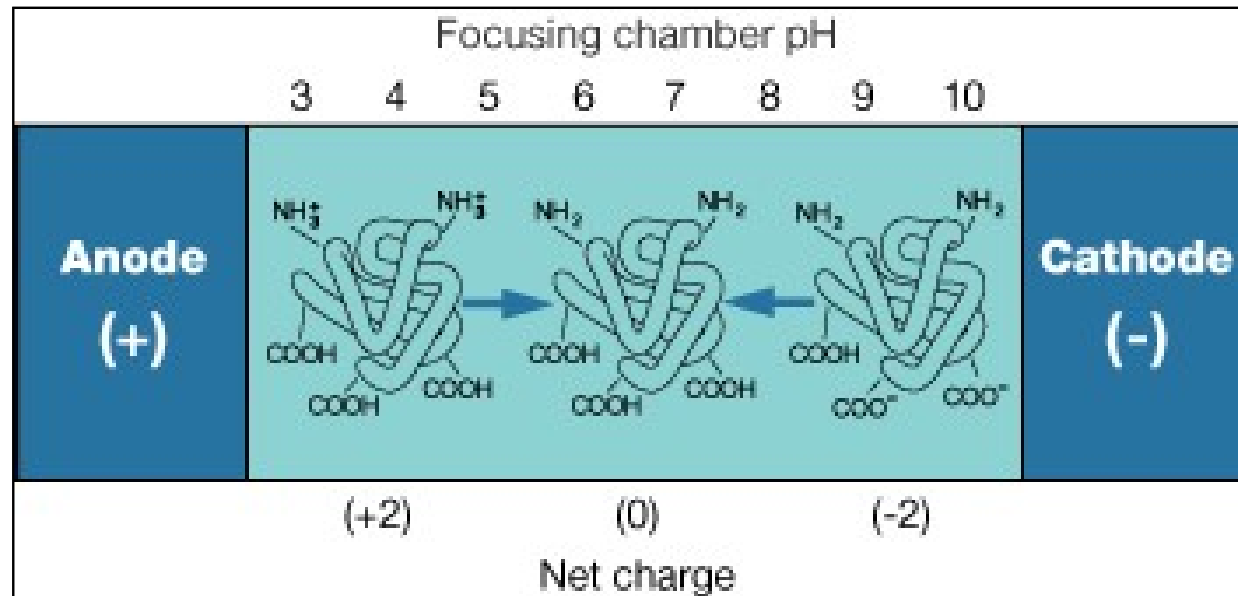
# Izotachoforéza

řecky isos = stejný, tachos = rychlost

- Všechny ionty migrují stejnou rychlostí
- Složky směsy jsou rozděleny v „iontovém vlaku“
- Samozaostřovací efekt
- Efekt regulující koncentraci
  
- Předpokladem ITP separace je **diskontinuální pufrovací systém** s vedoucím (leading, L) a terminačním (terminating, T) elektrolytem
- U běžnější separace aniontů je L (*příklad: Cl<sup>-</sup>*) na anodické a T (*příklad: Gly<sup>-</sup>*) na katodické straně. Protiion je společný (*příklad: Tris<sup>+</sup>*)



## Izoelektrická fokusace (IEF)



## Izoelektrická fokusace

- Dělení amfoterních látek (peptidů, proteinů) podle jejich izoelektrického bodu

- Vysoké rozlišení:  $\Delta pI = \sqrt{\frac{D[d(pH)/dx]}{E[-du/d(pH)]}}$

$\Delta pI$  = rozlišovací schopnost

D = difúzní koeficient bílkoviny

E = síla elektrického pole (V/cm)

$d(pH)/dx$  = pH gradient

$du/d(pH)$  = směrnice mobility bílkoviny v izoelektrickém bodu

## Způsoby provedení IEF podle účelu

- **ANALYTICKÁ IEF** (pro analýzu peptidů a proteinů)
  - agarózový gel
  - polyakrylamidový gel
    - s nosičovými amfolyty (oligoamino-oligokarboxylové kyseliny)
    - s imobilizovaným pH gradientem (bifunkční /nikoliv amfoterní!/ akrylamidové deriváty s pufrující skupinou /karboxyskupina nebo terc. amin/ navázanou na dusík aminoskupiny)
- **PREPARATIVNÍ IEF** (cílem je získat relevantní množství daného peptidu/proteinu po jeho separaci ze směsi)
  - Dextranový gel s nosičovými amfolyty
  - Izoelektrické membrány (polyakrylamid s Imobiliny – každá membrána má příslušnou hodnotu pH)
  - Off-gel IEF: na IPG – proužcích (frakcionační rámeček s 24 komůrkami se přiloží na povrch IPG proužku)

**IPG-gely získáme při nalévání gelu kontinuální změnou míšícího poměru Imobilinů (podobně jako při nalévání gelu s gradientem velikosti pórů) – principem je acidobazická titrace, aktuální hodnota pH je definována Henderson-Hasselbachovou rovnicí:**

- Je-li pufrujícím Imobilinem zásada:

$$pH = pK_B + \log \frac{c_B - c_A}{c_A}$$

- Je-li pufrujícím Imobilinem kyselina:

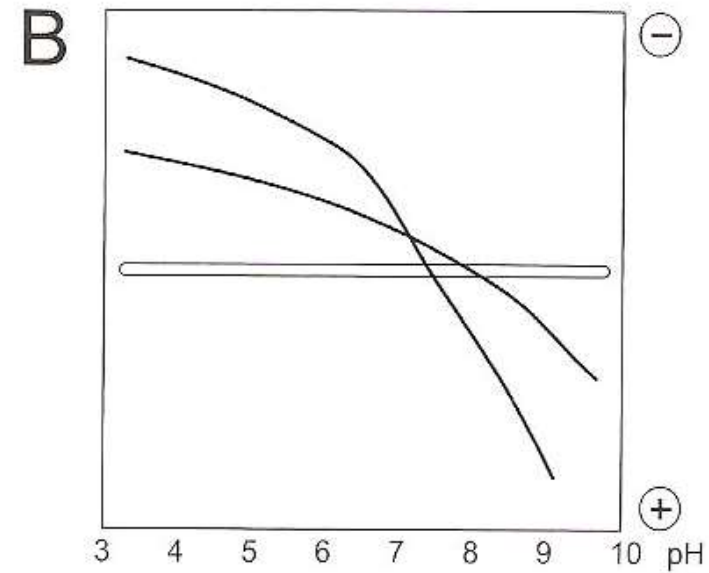
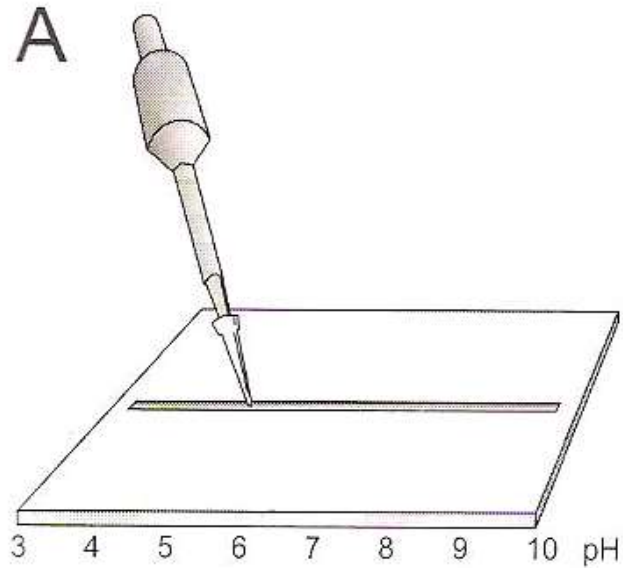
$$pH = pK_A + \log \frac{c_B}{c_A - c_B}$$

# Nábojové vlastnosti AK a bílkovin

- Při  $\text{pH} < \text{pI}$  jsou kationty
- Při  $\text{pH} = \text{pI}$  jsou amfolyty navenek elektroneutrální
- Při  $\text{pH} > \text{pI}$  jsou anionty
- Disociační konstanty  $K_1$  a  $K_2$  jsou vyjadřovány logaritmicky jako  $\text{pK} = \text{pH}$ , při kterém se v roztoku nacházejí stejná množství protonovaných (asociovaných) a neprotonovaných (disociovaných) forem
- $\text{pI}$  = izoelektrický bod =  $\text{pH}$ , při které molekula existuje jako amfolyt s nulovým výsledným nábojem
- **$\text{pI} = \frac{1}{2} [\text{pK}_1 + \text{pK}_2]$** ; u AK s ionizovatelnou skupinou v postranním řetězci uvažujeme hodnoty  $\text{pK}$  „na obě strany“ od elektroneutrálního zwitteriontu ( $\text{pI}$  leží mezi hodnotami  $\text{pK}$  zwitteriontu a jeho konjugované kyseliny)
- Při fyziologickém  $\text{pH}$  je většina bílkovin záporně nabitá

**Analýza titračních křivek:** gel s amfolity - po IEF (vytvoření pH gradientu) otočíme gel o 90° a do žlábků nanese analyzované bílkoviny, necháme probíhat elektroforézu. Kde je pI hledané bílkoviny?

obr. z: Westermeier R. Electrophoresis in practice. Wiley-VCH, Weinheim 2005



# Vysokorozlišovací dvourozměrná elektroforéza

- 1. krok: IEF na IPG-proužcích
- 2. krok: SDS-PAGE

# Denzitometrie

- Kvantitativní hodnocení intenzity zbarvení
- Měření absorpce světla jednotlivými zónami (pásy)
- Pohyblivý světelný zdroj (laser nebo lampa s bílým světlem s filtry) je veden nad gelem a na každém místě gelu je měřena a počítačově zpracována absorpce
- U jednorozměrných gelů získáváme křivku extinkce  $\ln I_0/I$  ( $I_0$  = intenzita světla ze zdroje,  $I$  = intenzita měřená detektorem) podél elektroforetické stopy; u dvourozměrných gelů je extinkce zobrazena jako funkce povrchu gelu
- Neplatí zde Lambertův-Beerův zákon! (proč?)
- Závislost absorpce na koncentraci bílkoviny při extinkci  $>2,5$  (lampa s bílým světlem) nebo  $>4$  (laser) se stává hyperbolická nebo sigmoidní
- Slabé pásy/stopy jsou často nadhodnocené, proteiny ve vysoké koncentraci podhodnocené



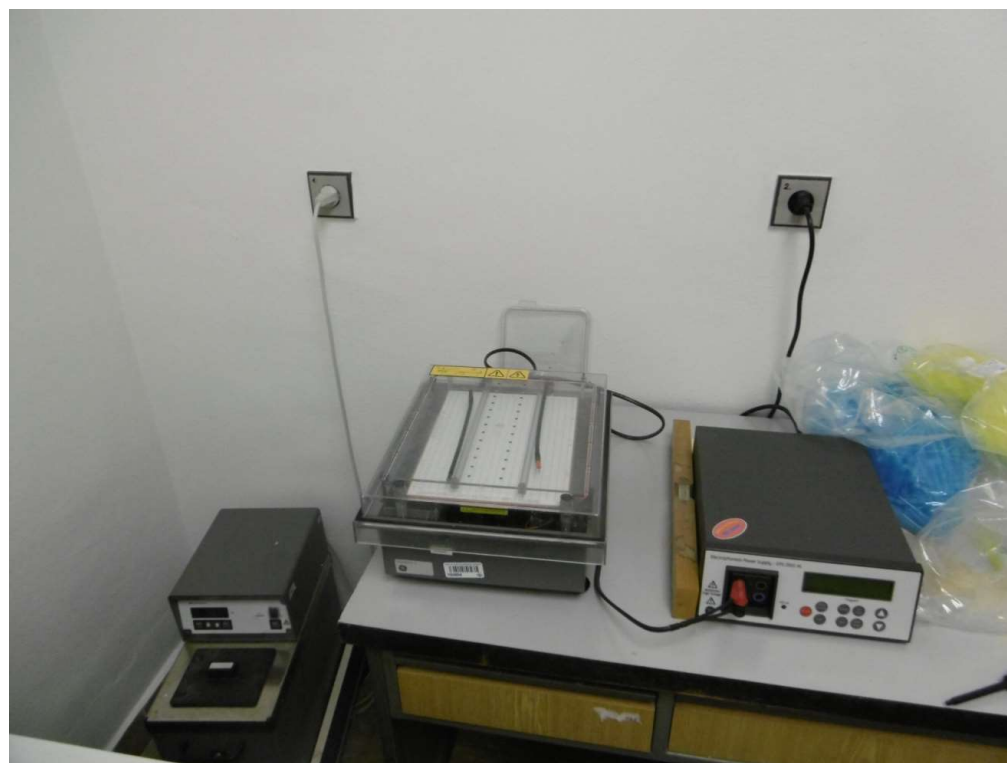
## Komerčně dostupné elektroforetické systémy pro použití v klinické laboratorní diagnostice

- Firma Sebia (založena 1967, nadřízená organizace: Montagu Private Equity)
- [www.sebia.com](http://www.sebia.com)
- Firma Helena Laboratories (založena 1966)
- [www.helena.com](http://www.helena.com)

# Elektroforetický přístroj Hydrasys2 (Sebia) – pro elektroforézu a izoelektrickou fokusaci



Elektroforetický přístroj Multiphor II (uprostřed) se zdrojem (vpravo) a termostatickým cirkulátorem MultiTemp III (vlevo)



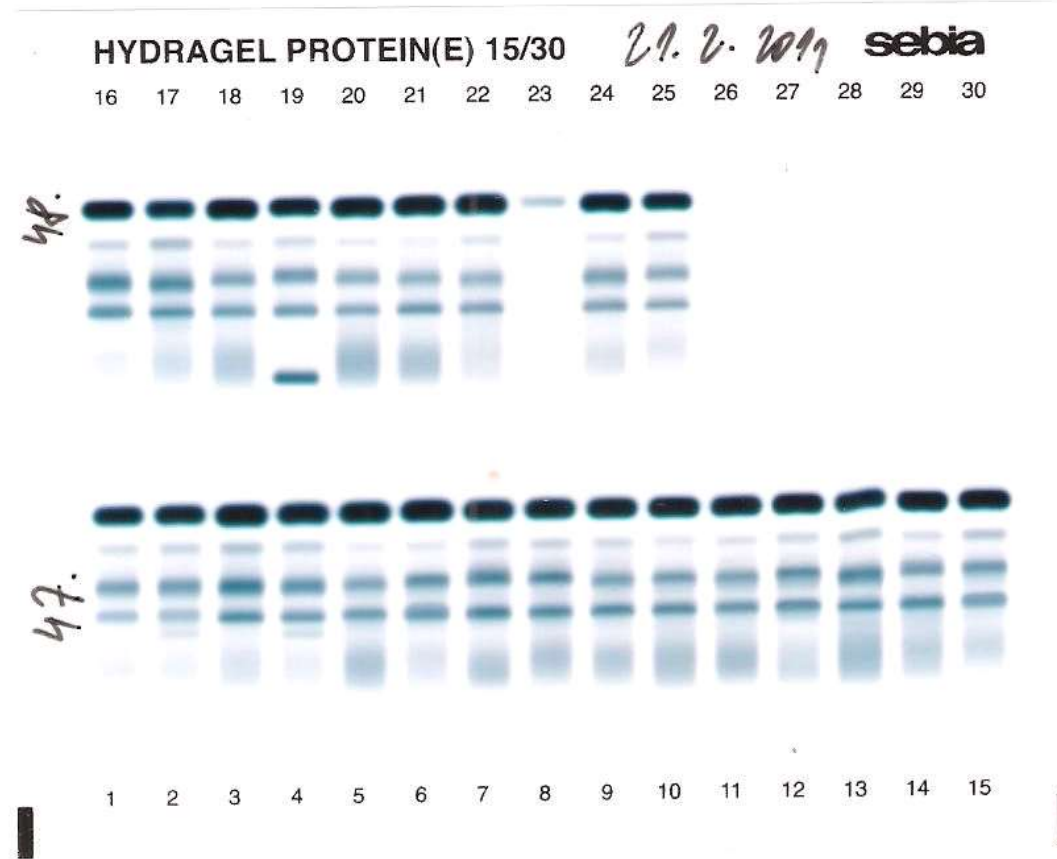
Elektroforetický přístroj Flatbed Professional (EDC, uprostřed) se zdrojem (Consort, vlevo) a termostatickým cirkulátorem (Huber, vpravo)



# Elektroforetické metody v klinické laboratoři

- Elektroforéza bílkovin séra a moče (agaróza, CE) – zejména screening monoklonálních gamapatií
- Imunofixační elektroforéza bílkovin séra a moče (agaróza) NEBO imunosubtrakční elektroforéza (CE) – typizace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)
- SDS elektroforéza bílkovin moče – diferenciální diagnostika proteinurií (glomerulární, tubulární, postrenální)
- Elektroforéza hemoglobinů – detekce abnormálních hemoglobinů
- Elektroforéza izoform některých enzymů – ALP, LDH, CK
- Elektroforéza lipoproteinů
- Izoelektrická fokusace – detekce oligoklonálních pásů (zejm. IgG) v likvoru u chronických zánětlivých onemocnění CNS (zejm. roztroušené sklerózy); fenotypizace alfa1-antitrypsinu
- Elektroforéza nebo izoelektrická fokusace s detekcí izoform transferinu (průkaz likvoru v sekretech – v likvoru je přítomna kompletně desialovaná frakce, tzv.  $\beta$ 2-transferin neboli asialotransferin; CE pro relativní kvantifikaci CDT – disialofrakce, popř. s mono- a asialofrací)

# Elektroforeogramy



## Elektroforéza bílkovin

se provádí s cílem **zjistit abnormality bílkovin krevního séra.**

☞ Bílkoviny jsou rozděleny podle svých elektroforetických pohyblivostí do skupin (frakcí), které vytvářejí charakteristický obrazec.

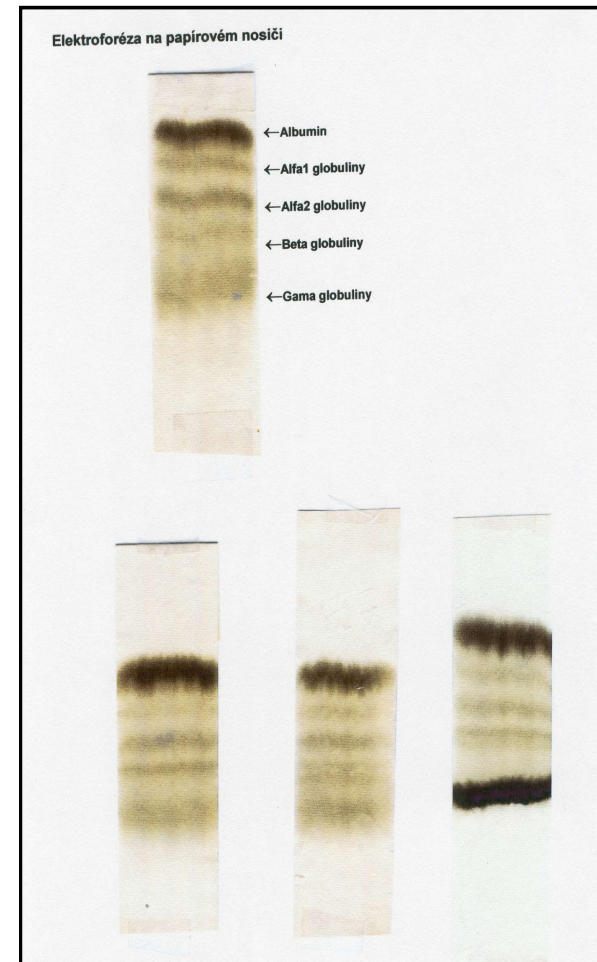
☞ Změny v tomto obrazci souvisí s různými druhy onemocnění nebo s různými patologickými stavy.

Bílkoviny se dělí na 5 – 6 hlavních frakcí:

✦	Albumin	56 – 66 %
✦	$\alpha$ 1 globuliny	2 – 3 %
✦	$\alpha$ 2 globuliny	8 – 12 %
✦	$\beta$ globuliny ( $\beta$ 1, $\beta$ 2)	7 – 10 %
✦	$\gamma$ globuliny	10 – 18 %

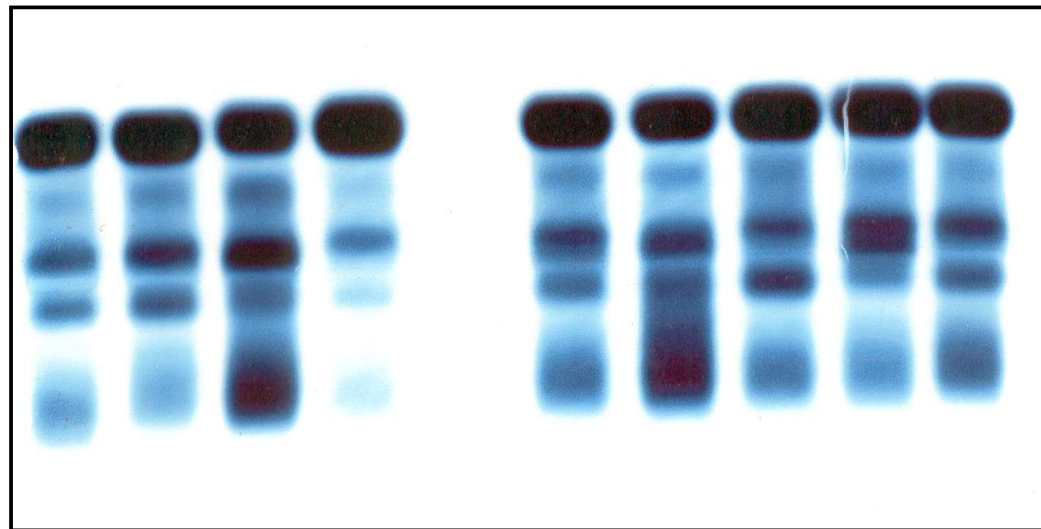
Typ: **ELFO na papíře**  
Nosič: chromatografický papír  
Nanášení: mikroskop. podložní sklo  
Denaturace: tepelná  
Barvení: amidočerň 10B  
Odbarvení: zředěná kyselina octová  
Hodnocení: fotometricky  
Poznámka: dlouhá doba dělení

První typ elektroforézy  
používaný v klinické praxi

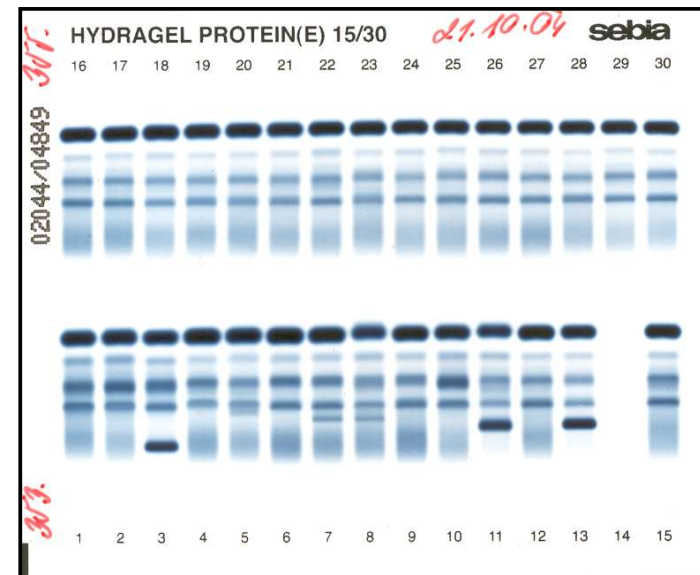
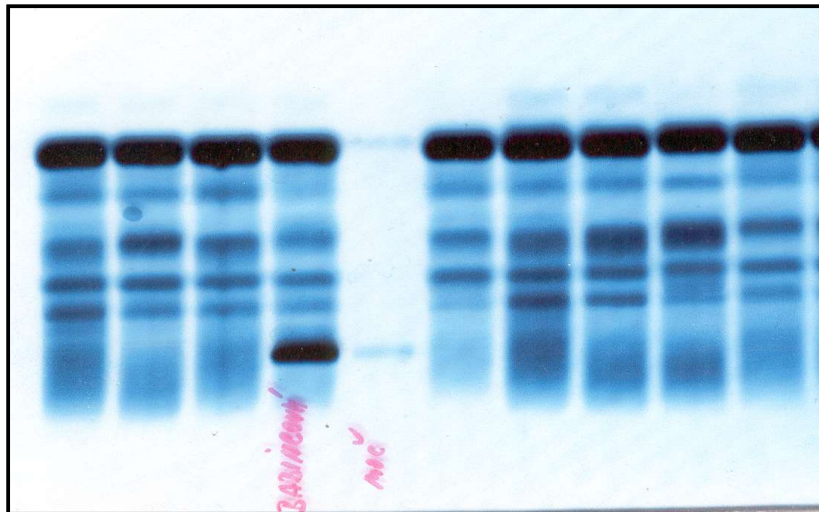




Typ: **ELFO na agaru**  
Nosič: agaróza + agaropektin  
Nanášení: papír, hřeben, fólie  
Denaturace: kyselina octová  
Barvení: anionická barviva  
Odbarvení: kyselina octová  
Hodnocení: vizuálně  
Poznámka: elektroendoosmóza



Typ: **ELFO na agaróze**  
Nosič: agaróza  
Nanášení: hřeben, fólie  
Denaturace: kyselina pikrová  
Barvení: anionická barviva  
Odbarvení: kyselina octová  
Hodnocení: vizuálně nebo denzitometricky  
Poznámka: automatizace



## Agaróza

Agaróza je polysacharid z mořských řas.

- ★ Jde o lineární polymer galaktózy a 3,6 – anhydrogalaktózy.
- ★ Rozpouští se v horké vodě a po ochlazení tuhne.
- ★ Tvoří dvoušroubovice ve svazcích, které se spojují do trojrozměrné struktury. Vodíkové vazby.
- ★ Vysoké koncentrace agarózy generují gel s malými póry a naopak. 1% gel má póry 150 nm.

Agarózový gel má větší póry než PAG – větší molekuly snadněji putují v agaróze.

Přítomnost reziduálních nábojů generuje elektroendoosmózu (použít extrémně čistou)

Typ: **ELFO na acetylcelulóze**

Nosič: acetylcelulóza (celulóza + anhydrid.oct.)

Nanášení: speciální tiskátko

Denaturace: kyselina trichloroctová

Barvení: anionická barviva

Odbarvení: směs – metanol + kyselina octová

Hodnocení: denzitometricky (po zprůhlednění)

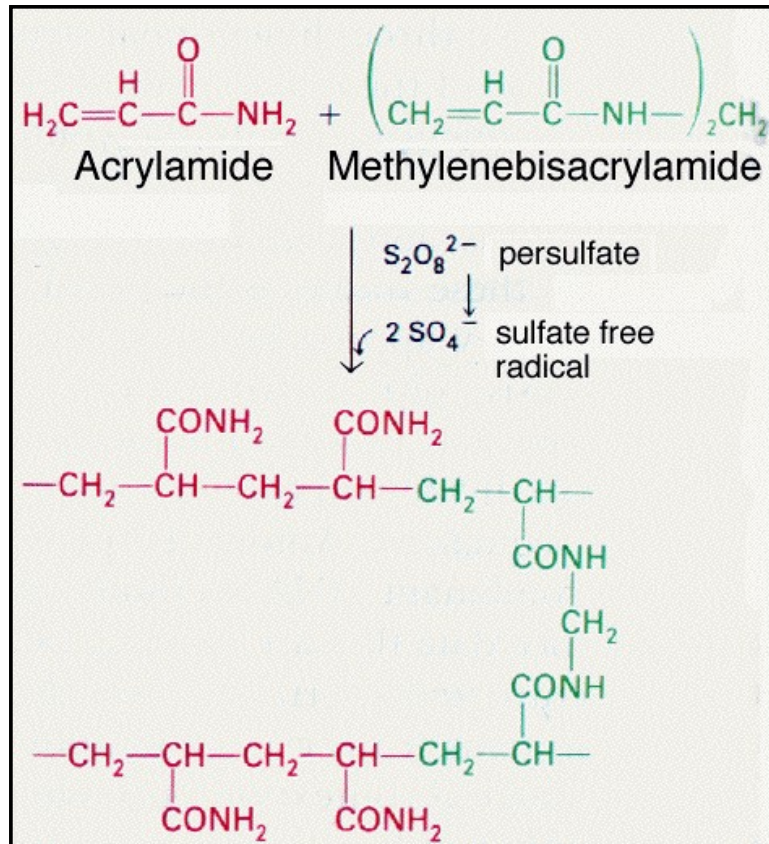
Poznámka: dovozové fólie

Zprůhledňovací směs:

Metanol s ledovou kyselinou octovou

Cyklohexanol

## Typ: ELFO na polyakrylamidu



## Polyakrylamidový gel

Tvořen polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu v pufru, zahájenou volnými radikály.

Ty vzniknou při rozkladu persíranu amonného nebo při rozložení riboflavinu v přítomnosti  $\text{O}_2$ .

Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm zesíťování.

- ☐ Nejčastěji používané koncentrace polyakrylamidu jsou 5-10%.
- ☐ Koncentrace N,N'-metylenbisakrylamidu je obvykle 5% celkového množství akrylamidu.
- ☐ Podpurná matrice je prakticky nenabita.

**barvičky:**

Amidočerň 10 B,

Coomassie Brilliant Blue,

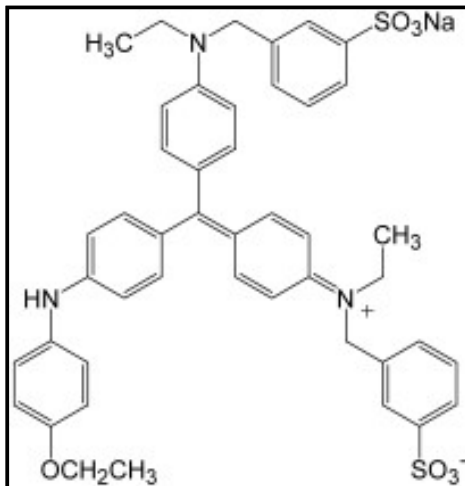
Ponceau S,

Bromfenolová modř,

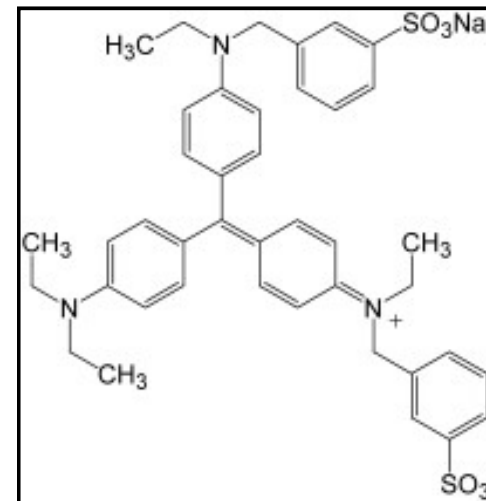
Kyselá violeť,

barvení stříbrem (není kvantitativní ale je 50x citlivější než  
coomassie: Ag<sup>+</sup> ionty se v proteinech vážou na -SH a -COOH  
skupiny)

Coomassie Brilliant Blue R-250

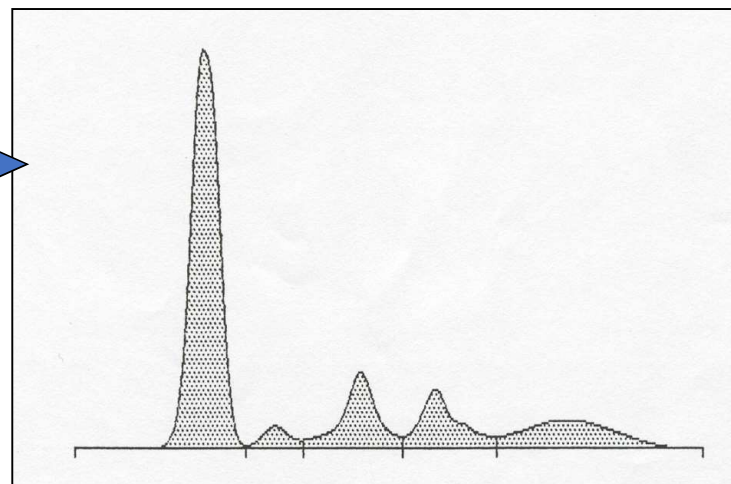
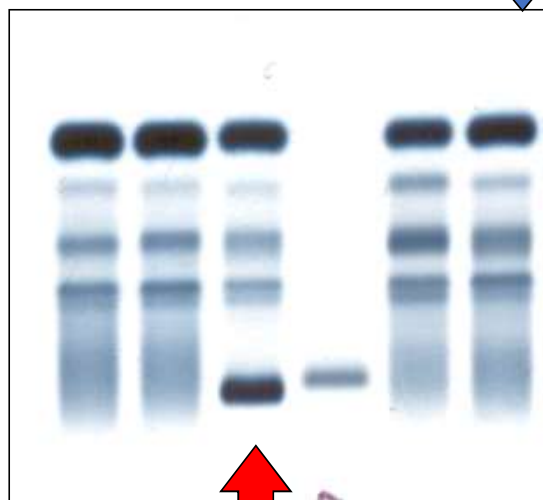


Coomassie Violet R - 150

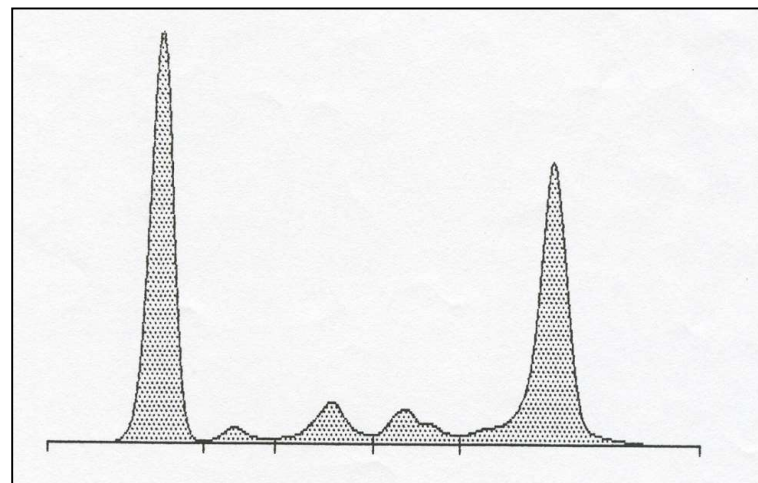


# Denzitometrické vyhodnocení

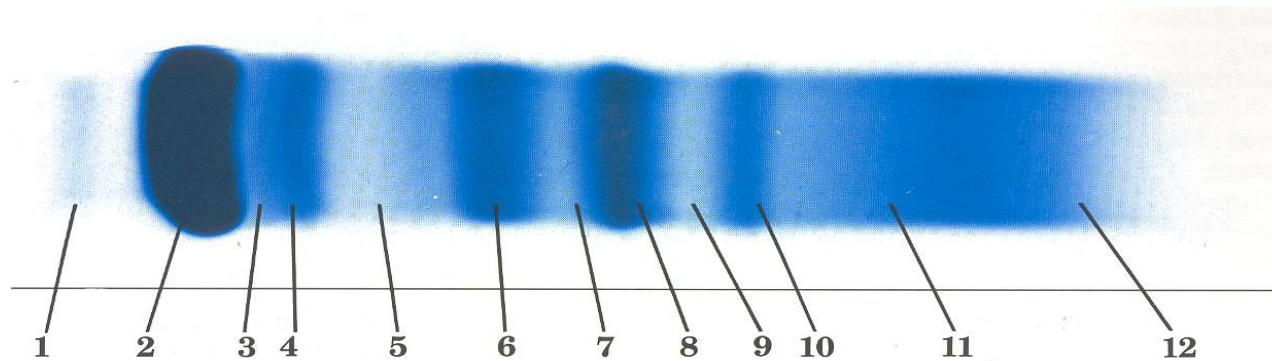
Normální nález



„M“ gradient







1.	prealbumin
2.	albumin
3.	$\alpha$ -lipoprotein, $\alpha$ -fetoprotein
4.	A1AT, orosomukoid
5.	$\alpha_1$ antichymotrypsin, Gc globulin
6.	A2M, Hp
7.	hemoglobin

8.	Transferin
9.	Beta-lipoprotein
10.	C3
11.	IgA, IgM, fibrinogen, „M“, VLŘ
12.	IgG, CRP, „M“, VLŘ



## Klinické vztahy

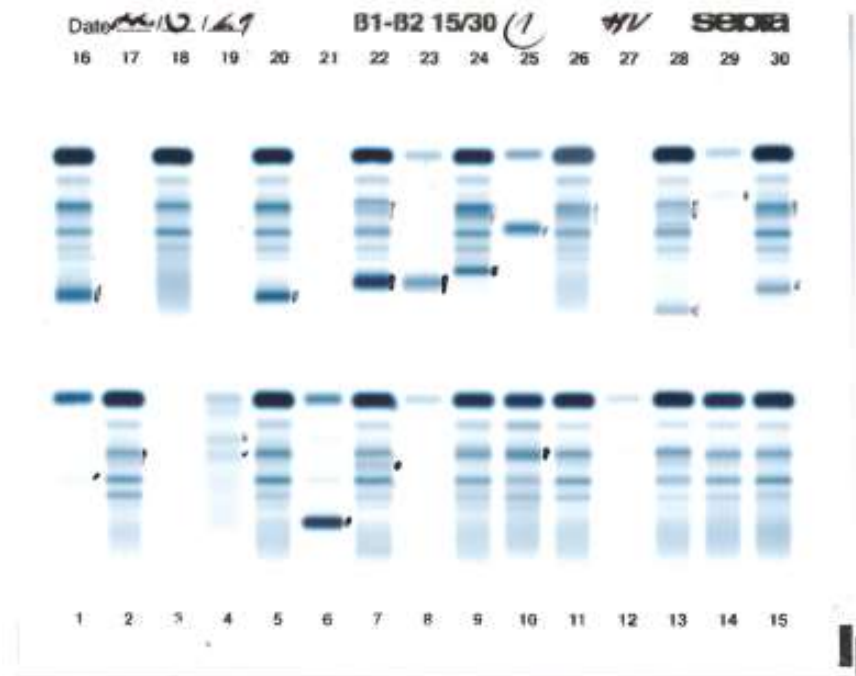
frakce	Snížení	zvýšení
<b>Albumin</b>	Malnutrice a malabsorpce Těhotenství Onemocnění ledvin (zejména NS) Onemocnění jater Zánětlivé stavy	dehydratace
<b><math>\alpha_1</math></b>	Kongenitální emfyzém (nedostatek AAT) Těžká jaterní onemocnění	akutní nebo chronická zánětlivá onemocnění
<b><math>\alpha_2</math></b>	Hypertyreóza Vážná jaterní onemocnění Hemolýza	Onemocnění ledvin (NS) Akutní nebo chron. onem.
<b><math>\beta</math></b>	Malnutrice Cirhóza	Hypercholesterolémie Anémie z nedostatku Fe Některé případy MM nebo MGUS

## Klinické vztahy

frakce	Snížení	Zvýšení
$\gamma$	<p>různé druhy geneticky podmíněných poruch imunity</p> <p>sekundární imunodeficience</p>	<p><b>Polyklonální:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- chronická zánětlivá onemocnění</li><li>- revmatoidní artritida</li><li>- systémový lupus erythematosus</li><li>- cirhóza</li><li>- chronická jaterní onemocnění</li><li>- akutní nebo chronická infekce</li><li>- nedávná imunizace</li></ul> <p><b>Monoklonální:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Waldenströмова makroglobulinemie</li><li>- Mnohočetný myelom</li><li>- Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)</li></ul>

**Elektroforéza bílkovin séra (pozice 2, 5, 7, 9-11, 13-16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30) a moče (pozice 1, 3, 4, 6, 8, 12, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29) – Hydragel  $\beta$ 1- $\beta$ 2 15/30 (Sebia)**

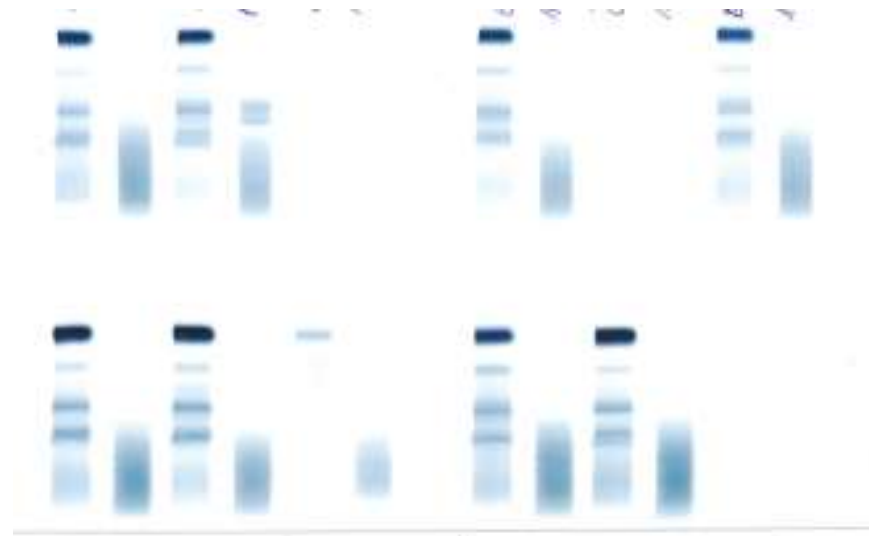
Paraprotein v pozicích 6 (moč), 16 (sérum), 20 (sérum), 22 (sérum), 23 (moč), 24 (sérum), 25 (moč – v beta frakci), 28 (sérum) a 30 (sérum); v sérech na pozicích 20, 22, 28 a 30 je patrná výrazná redukce polyklonálních gamaglobulinů; zvýšená frakce alfa2-globulinů v pozicích 2, 10, 24, 30 (séra)



## Screeningová imunofixace (Hydragel Penta 6/12 IF, Sebia)

Elektroforetická stopa a vpravo od ní stopa stejného vzorku fixovaného s pentavalentním  
antisérem (G, A, M, kappa, lambda)

*pozitivní výsledek imunofixace M-Ig atypicky migrujícího v zóně alfa2-globulinů (horní  
řada, 4. stopa zleva – sérum), ve všech ostatních vzorcích je výsledek screeningové  
imunofixace negativní*



# Typizace paraproteinů – elektroforéza s následnou imunofixací

ELP – elektroforéza s fixací všech bílkovin; G, A, M, K, L – stopy se selektivní fixací antiséry proti řetězcům  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$

*vlevo dole*: volné kappa v moči; *vpravo dole*: fyziologický nález (polyklonální Ig); *vlevo nahoře*: paraprotein IgM $\kappa$  v séru; *vpravo nahoře*: volné  $\kappa$  v moči u téhož pacienta



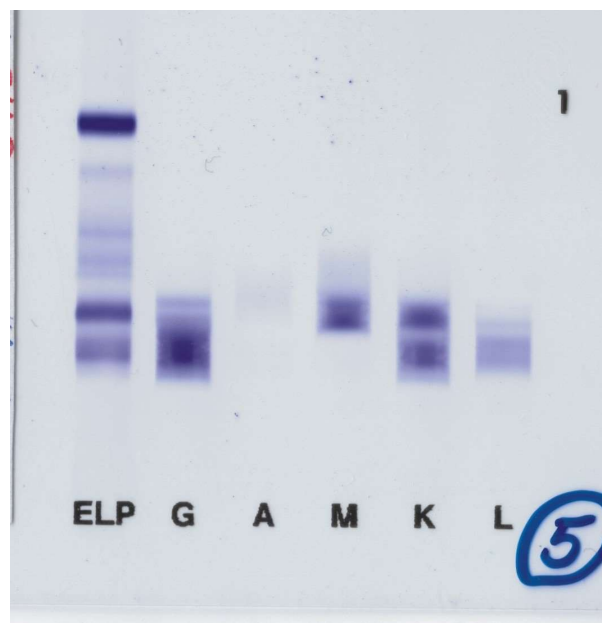
## Imunofixace – problematické nálezy

*monoklonální IgM kappa s aktivitou revmatoidního faktoru (RF 129 IU/mL)*

IF s Fluidilem

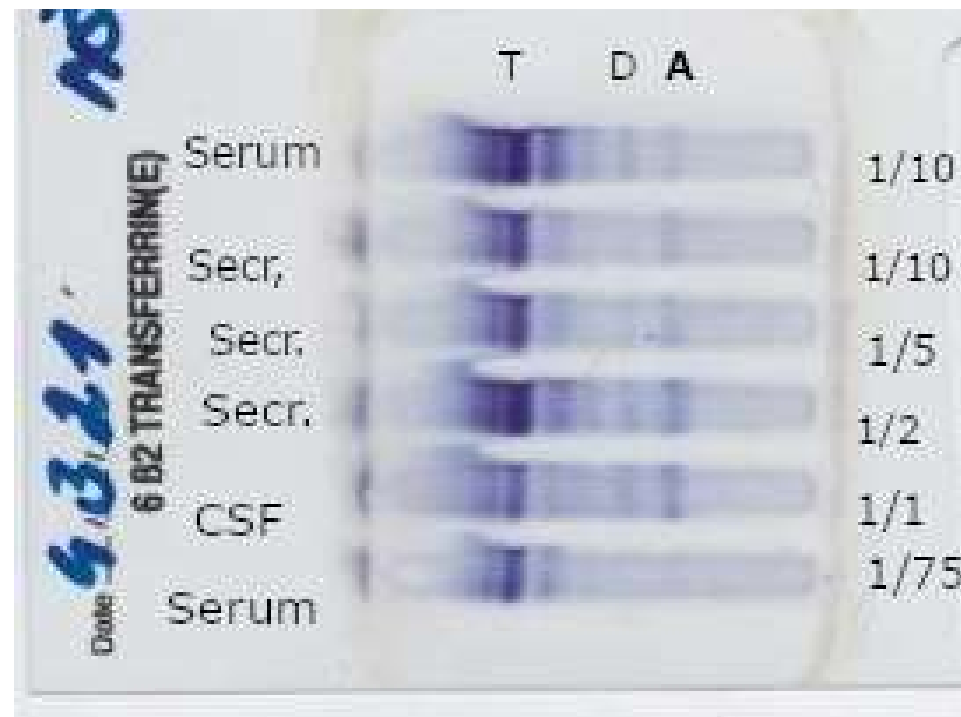


IF s beta-merkapttoethanolem



## Průkaz asialotransferinu (elfo s imunofixací – Sebia)

Metoda používaná k průkazu přítomnosti likvoru v sekretech. V likvoru je poměr A/D > 1, v séru <1; poměr A/D v sekretu s příměsí likvoru je vyšší než v séru.



## Elektroforéza hemoglobinu

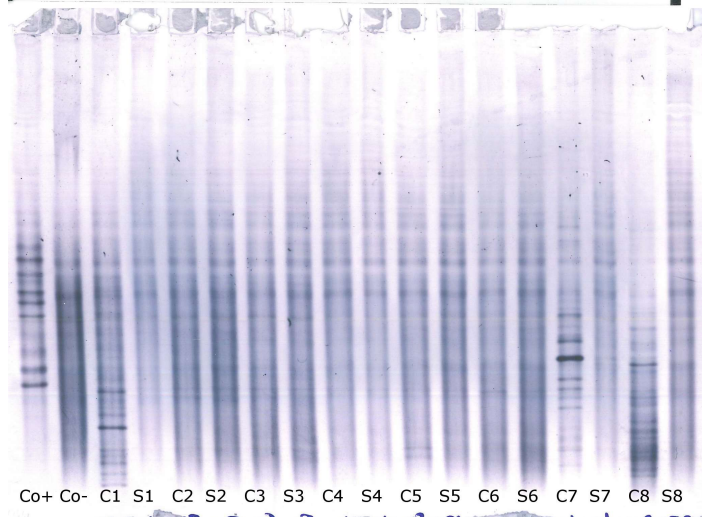
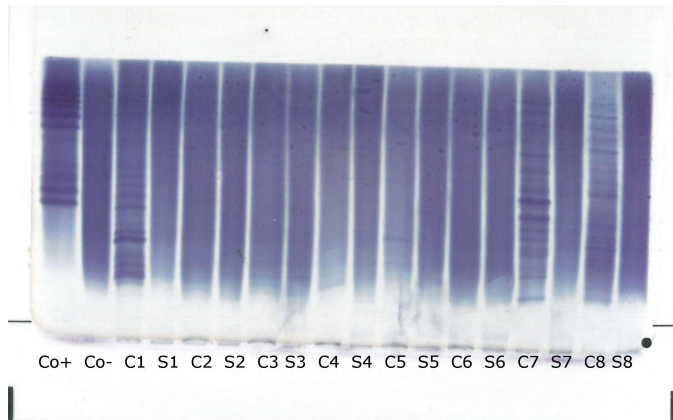
Hydragel 7 Hemoglobin(e),  
Sebia

vzorky 1 a 2: frakce HbA<sub>2</sub> >  
15%, což značí  
pravděpodobnou přítomnost  
HbC nebo HbE  
vzorky 3-6: normální nález  
vzorek 7: kontrola









## IEF a detekce o-IgG: Metody

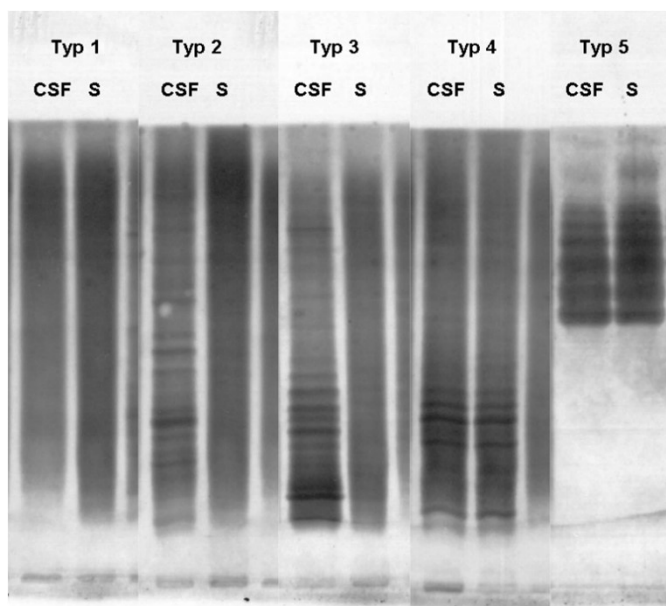
Zeman D et al. *Ces Slov Neurol N* 2019;82/115(1):68-75

- Agarosový gel, imunofixace v gelu (Hydrasys, Sebia) – AGA IEF/IF
- Polyakrylamidový gel (Flatbed Professional, EDC), imunoblotting – PAG IEF/IB
- Obě metody poskytly prakticky shodné kvalitativní výsledky

# Klasifikace nálezů o-IgG – 5 typů podle mezinárodních doporučení

Andersson M et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902

Freedman MS et al. *Arch Neurol* 2005;62:865-70

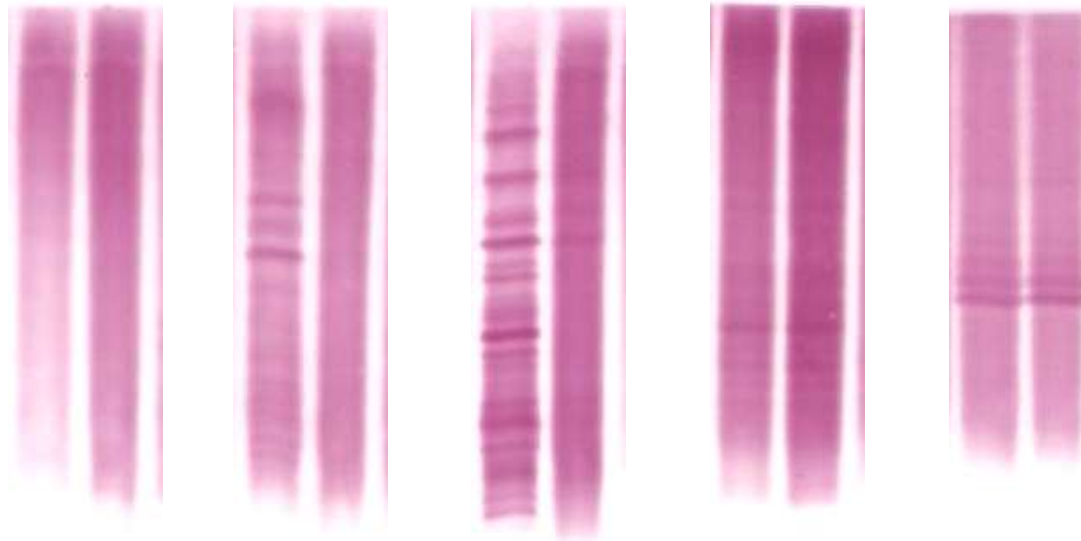


- **Typ 1:** jen „polyklonální“ IgG v likvoru i séru
- **Typ 2:**  $\geq 2$  IgG pásy v likvoru, jen „polyklonální“ IgG v séru
- **Typ 3:** IgG pásy shodné v likvoru i séru + IgG pásy přítomné pouze v likvoru
- **Typ 4:** IgG pásy shodné v likvoru i séru
- **Typ 5:** monoklonální IgG v likvoru i séru

## Oligoklonální IgG - typy IEF nálezu: IEF/IF (Sebia)

typ 1 – typ 2 – typ 3 – typ 4 – typ 5

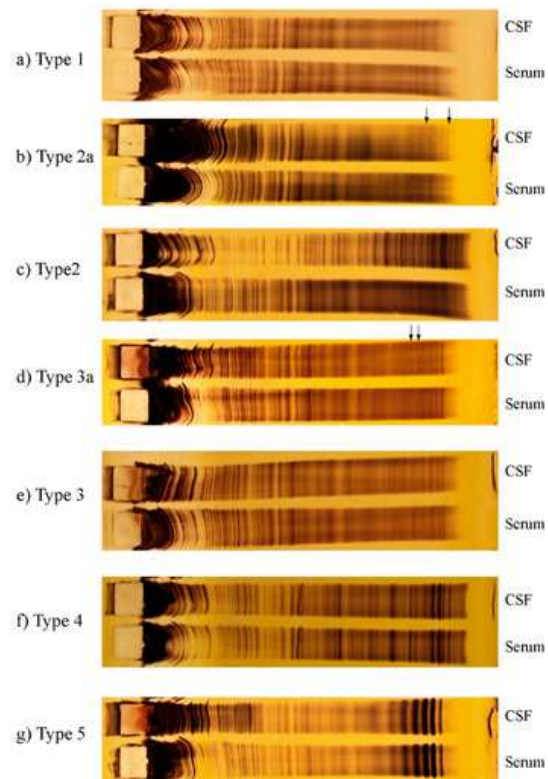
*dvojice likvor (vlevo), sérum (vpravo)*



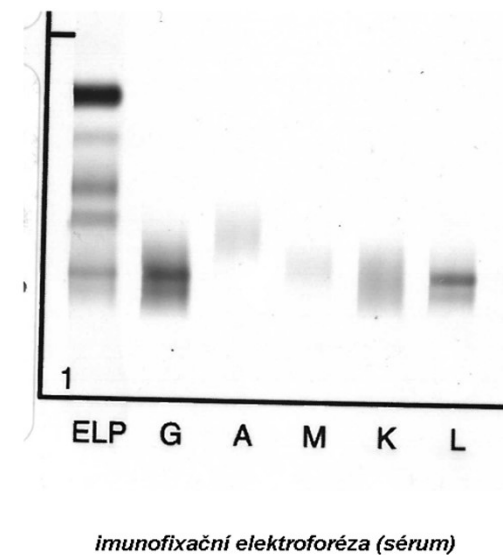
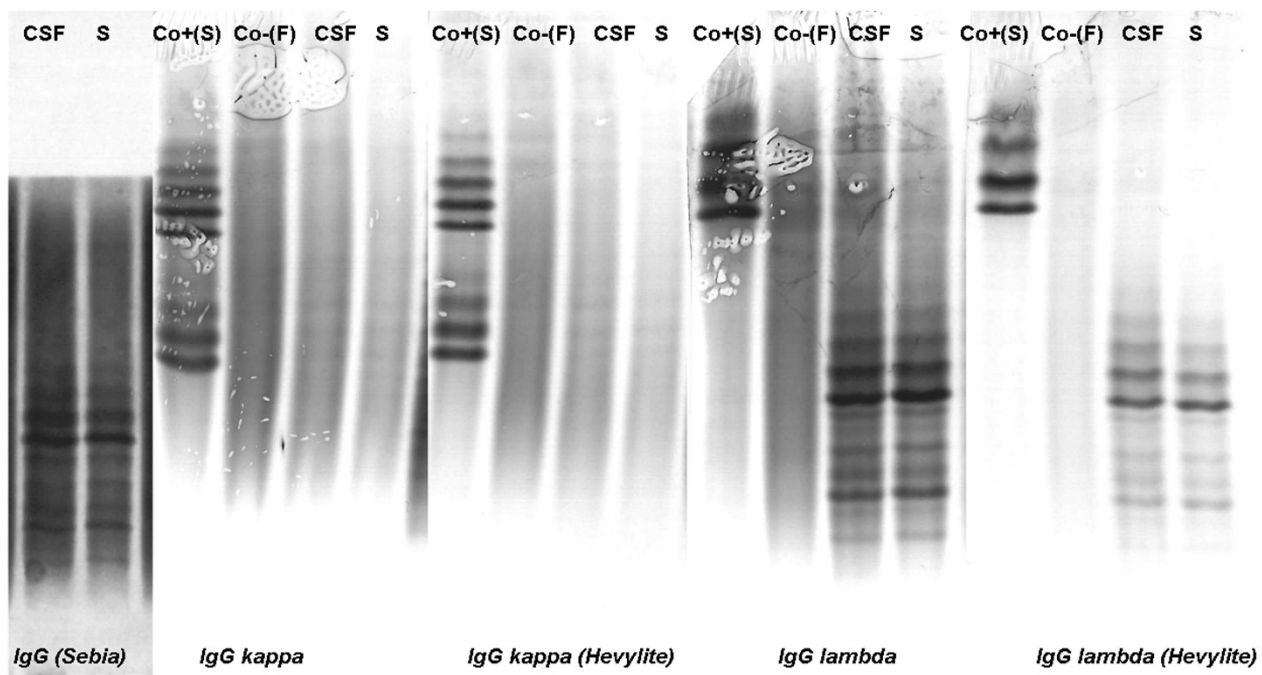
# IEF v polyakrylamidovém gelu

(Pannewitz-Makaj K et al, *Diagnostics* 2021, 11(1): 37)

OCB patterns

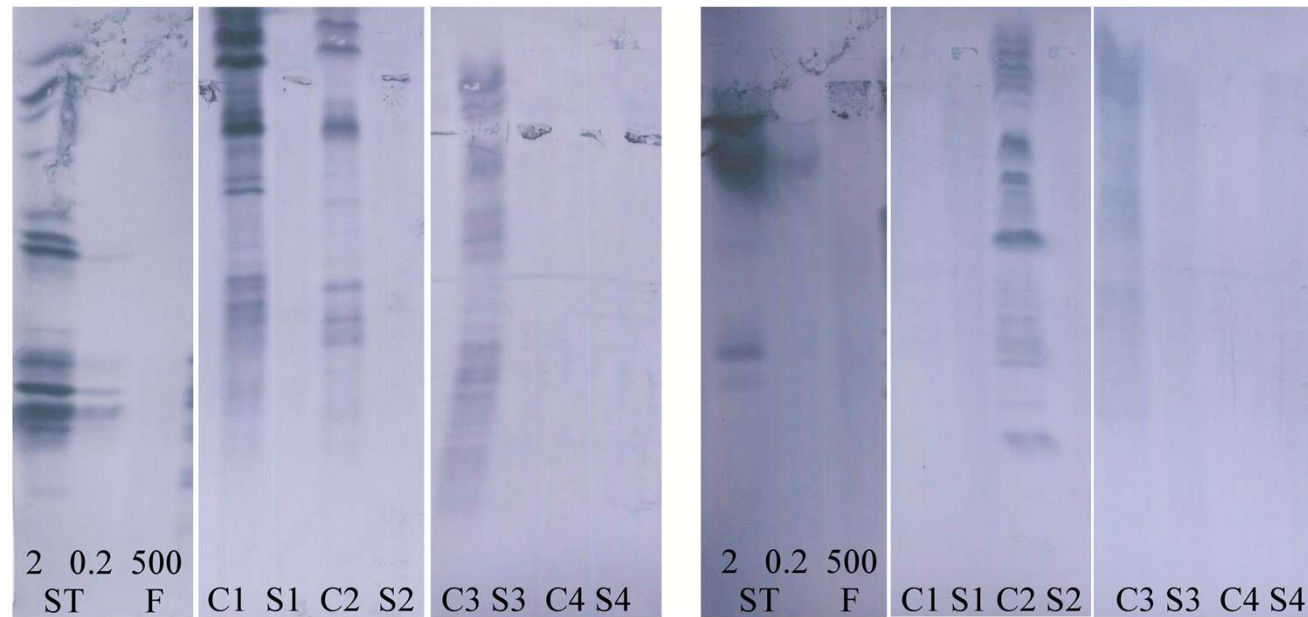


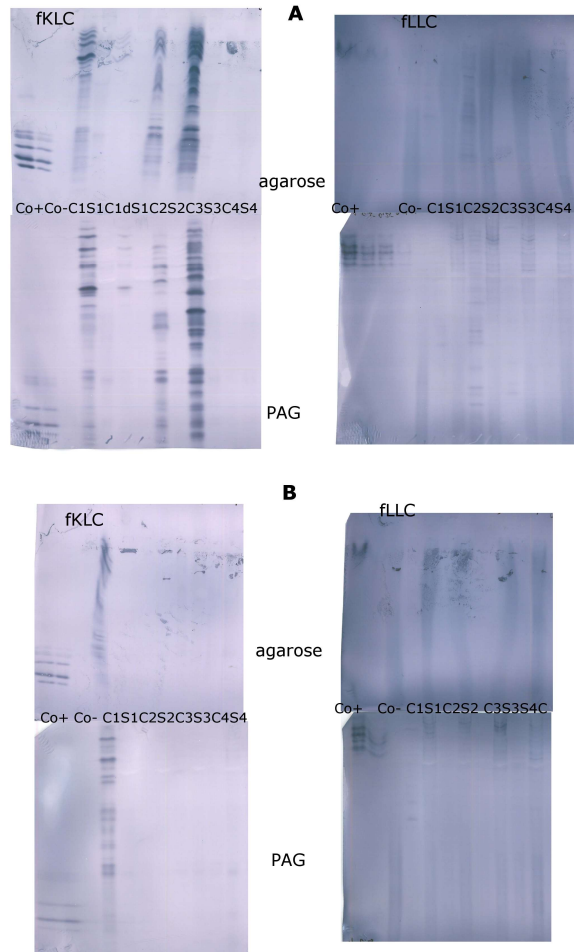
## Vzorek EHK (SEKK 2/2016): Typ 4 nebo Typ 5?



# Oligoklonální volné lehké řetězce (o-fLC)

Zeman D et al., *PLoS ONE* 2016;11(11):e0166556





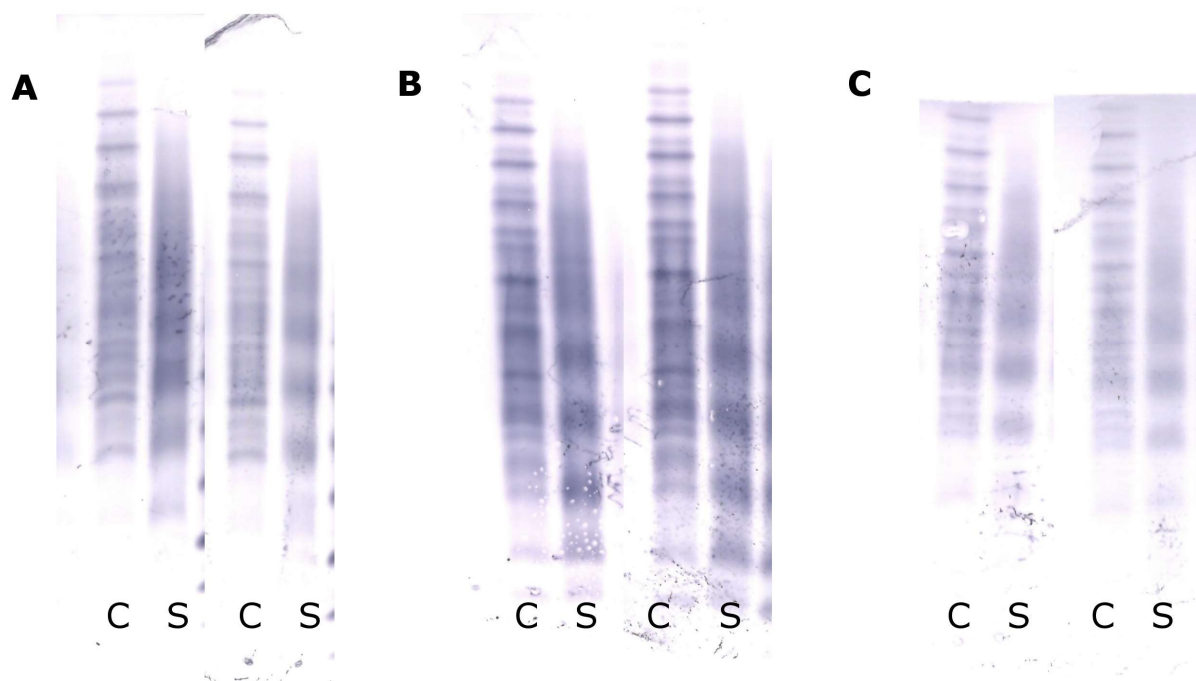
## Oligoklonální fLC: agarózový vs. polyakrylamidový gel

Zeman et al. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 81/115(1):68-75

- 48 vzorků
- Výtečná shoda mezi separací v agarosovém a polyakrylamidovém (PAG) gelu ( $\kappa > 0,8$  pro všechna srovnání)
- Počet pásů poněkud vyšší v PAG
- Klinické korelace lepší v PAG (cut-off 6 o-fKLC pásů)
- Výtečná shoda mezi hodnotícími ( $\kappa > 0,9$  pro všechna 4 srovnání)

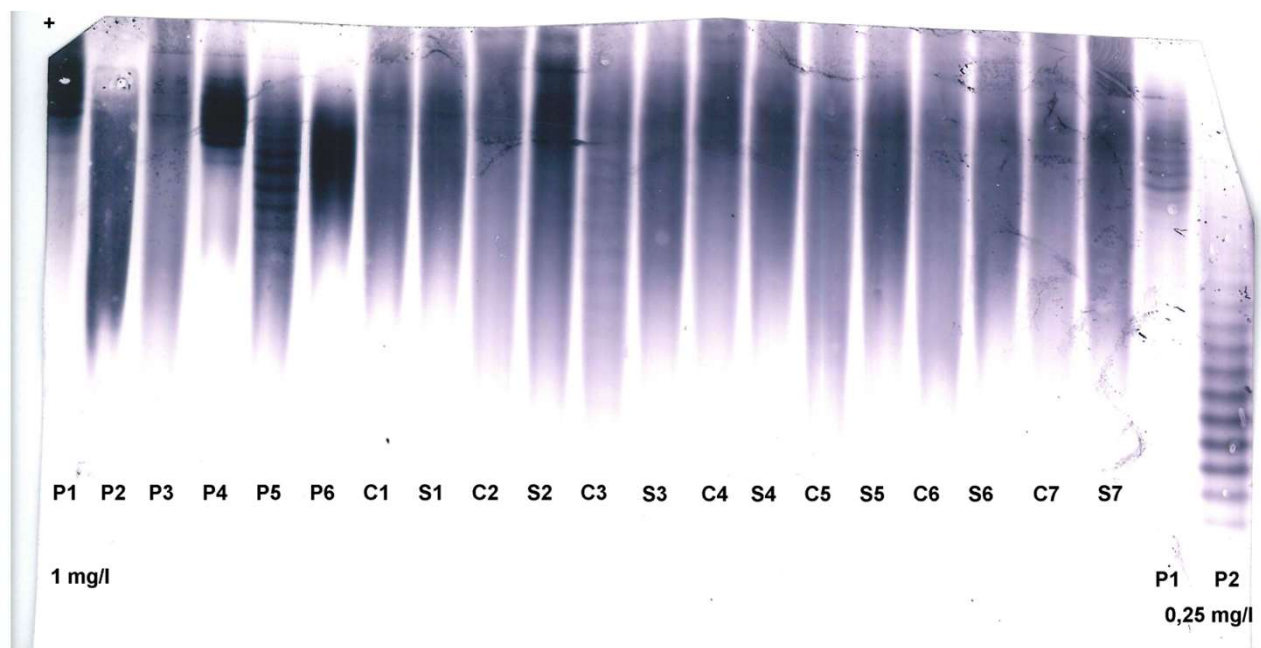


**o-IgM** u pacientky s RS při diagnostické LP (A), po 18 měsících bezprostředně před AHSCT (B) a po dalších 12 měsících (C)



# Oligoklonální IgA

pH gradient 4-8, anodická aplikace, bez prefokusace  
pozitivní nález ve vzorku 3 (pacientka s CIS)



## Kapilární elektroforéza (CE) - princip

- Dělení v křemenných kapilárách
- Dvě elektrody
- Dva rezervoáry pro pufry
- Zdroj vysokého napětí (+/- 30 kV)
- *On-column* detektor
  
- V obvyklém uspořádání: Aplikace k anodě, detekce u katody; vlivem elektroosmózy migrují nakonec ke katodě i kladně nabitě částice

## Kapilární elektroforéza (CE) – nástřik (injekce) vzorku

$$\bullet \sigma_{Inj}^2 = \frac{l^2}{12}$$

- $\sigma_{Inj}^2$  ... rozptyl přídatného rozšíření píku
- $l$  ... délka pravoúhlého injekčního profilu
  
- Reprokovatelná injekce velmi malých objemů (nL až  $\mu$ L) se děje formou
  - hydrodynamického nástřiku
  - elektrokinetického nástřiku

# Kapilární elektroforéza (CE) - detektory

- Absorpční
  - *UV-detektor*
  - *detektor diodového pole*
- Fluorescenční
  - *excitace lampou*
  - *excitace indukovaná laserem*
- Hmotnostní spektrometr
- Elektrochemický
- Radioizotopový
- Vodivostní
- Indexu lomu
- Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie

## Kapilární elektroforéza (CE) - metody

metoda	zkratka	Dělení podle	Aplikace
Kapilární zónová elektroforéza	CZE	Velikosti/náboje (mobility)	Malé ionty, peptidy, proteiny
izotachoforéza	ITP	Velikosti/náboje (mobility)	Malé ionty, proteiny
Kapilární afinitní elektroforéza	ACE	Velikosti/náboje (mobility)	Interakce ligandů
Bezvodá kapilární elektroforéza	NACE	Velikosti/náboje (mobility)	Malé ionty s malou rozpustností ve vodě
Micelární elektrokinetická chromatografie	MEKC/MECC	Hydrofobicity/náboje	Neutrální částice
Kapilární gelová elektroforéza	CGWE	velikosti	Proteiny, DNA
Kapilární elektrochromatografie	CEC	Chromatografická retardace	Malé ionty a neutrální částice
Izoelektrická fokusace	CIEF	Náboj (izoelektrický bod)	Proteiny