

# Elektroforetické techniky

David Zeman

2022

## 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)

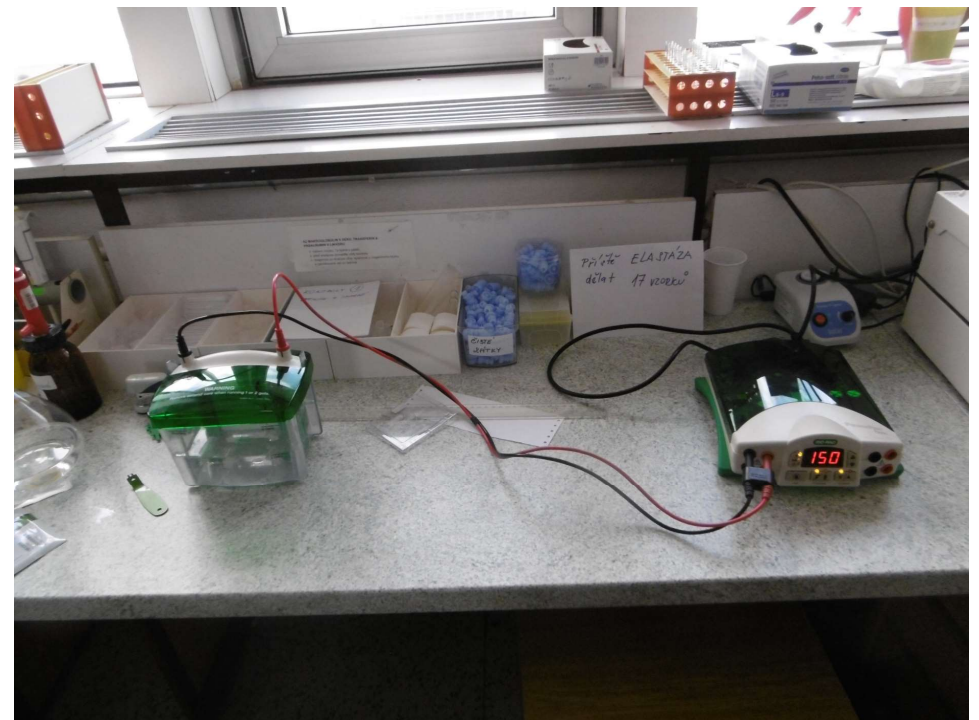
U slabých kyselin a zásad je pro rychlost migrace rozhodující efektivní mobilita  $u_{ef}$  daná vztahem

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

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
- 
- Uspořádání
    - horizontální
    - vertikální



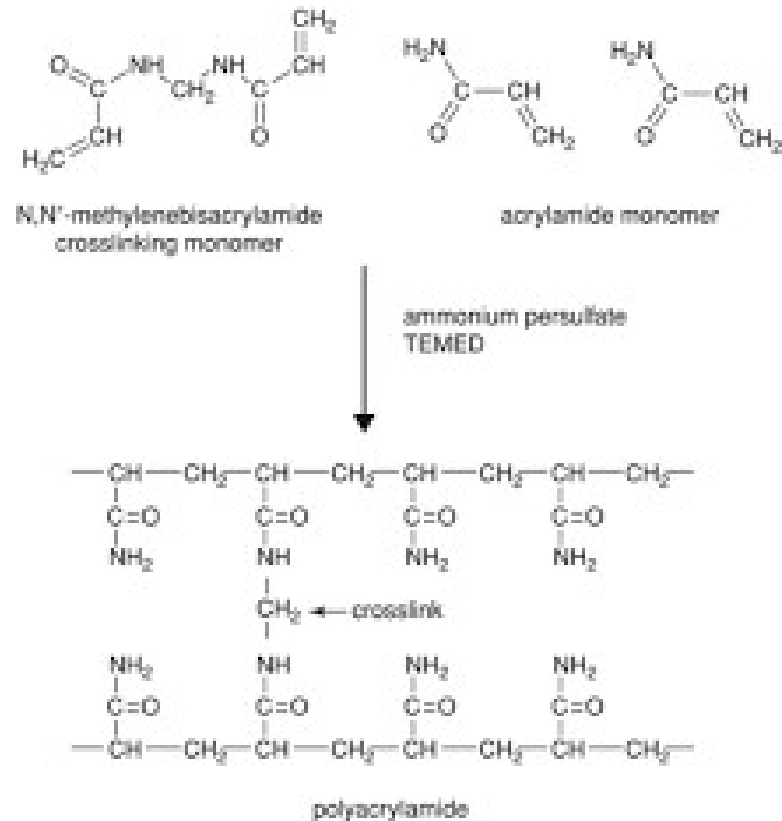
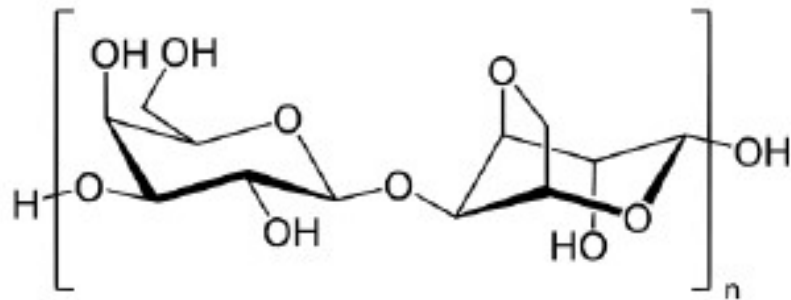
## Zónová elektroforéza

- **Nativní** – dělení bílkovin podle náboje, v gelech se síťovým efektem přistupuje faktor velikosti a tvaru molekuly
- **SDS-elektroforéza** – dělení bílkovin podle velikosti molekuly (SDS = dodecylsírán sodný – váže se na bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, uděluje jim negativní náboj – všechny bílkoviny migrují k anodě, malé molekuly rychleji, velké molekuly pomaleji); v redukujícím prostředí (beta2-merkaptoethanol, dithiothreitol) se bílkoviny rozpadají na podjednotky a z SDS elfo lze dobře odhadnout M.h.
- **Kontinuální uspořádání** – 1 gel, 1 pufr
- **Diskontinuální uspořádání** – koncentrace vzorku na startu pomocí koncentrujícího gelu na izotachoforetickém principu – zlepšení rozlišení

## Média pro zónovou elektroforézu

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

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





## Výhody a nevýhody agarózových a polyakrylamidových gelů

	Agarózový gel	Polyakrylamidový gel
Výhody	<p>Netoxické</p> <p>Jednoduchá příprava</p> <p>Ideální pro dělení vysokomolekulárních bílkovin (&gt;500 kDa)</p> <p>Velké póry (150 nm u 1% agarózy) – do nich mohou difundovat imunoglobuliny, proto je možný specifický průkaz bílkovin přímo v gelu pomocí imunofixace</p>	<p>Velmi stabilní a průhledné</p> <p>Téměř žádná elektroendoosmóza</p> <p>Dobry sítový efekt (malé póry – 5,3 nm v gelu s 5% T a 3% C; 3,3 nm v gelu s 20% T a 3% C))</p> <p>Jednoduchá manipulace s gelem po separaci</p> <p>Vhodné pro řadu barvicích metod</p>
Nevýhody	<p>Vždy přítomna určitá elektroendoosmóza</p> <p>Malý sítový efekt pro bílkoviny o M.h. &lt;100 kDa</p> <p>Nejsou zcela průhledné</p> <p>Některá barvení (např. stříbření) jsou obtížně proveditelná (dochází k silnému zbarvení pozadí)</p>	<p>Monomery jsou toxické</p> <p>Velikost pórů limituje velikost molekul, které lze dělit (proteiny o M.h. &gt;800 kDa nevstoupí do gelu)</p> <p>Zásadité gely mohou být skladovány jen krátkou dobu (časem dochází k jejich hydrolýze)</p>

# Izotachoforéza

řecky *isos* = stejný, *tachos* = rychlost

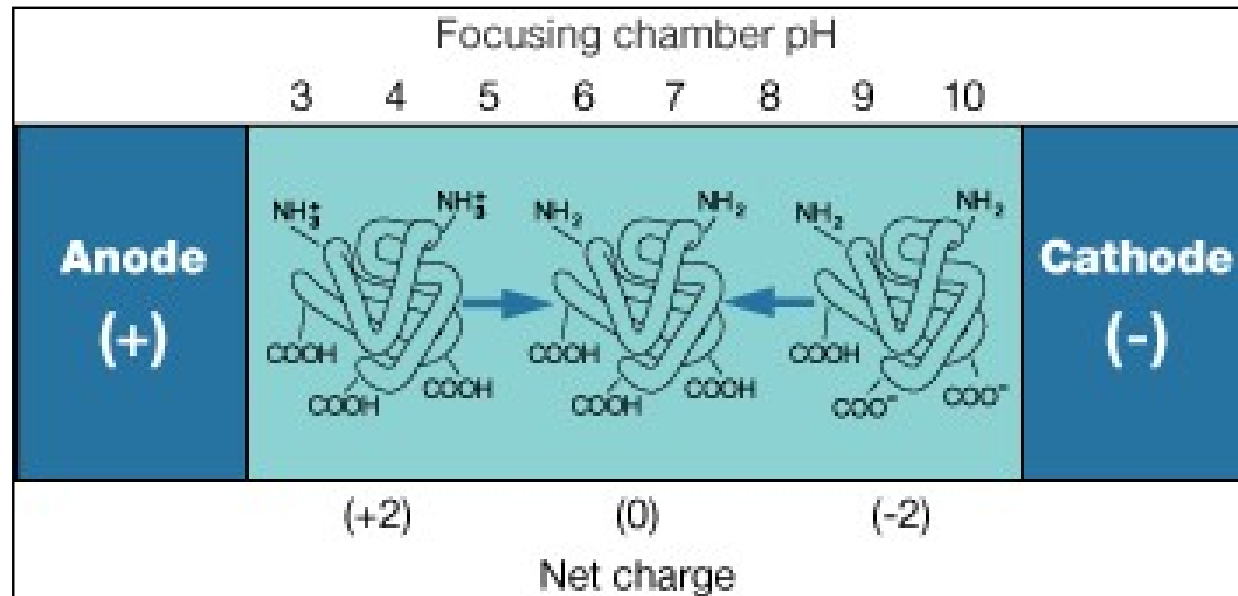
- Všechny ionty migrují stejnou rychlostí
- Složky směsi jsou rozděleny v „iontovém vlaku“
- Samozaostřovací efekt
- Efekt regulující koncentraci (Kohlrauschova regulační funkce):

$$c_A = c_L \cdot \frac{\mu_A(\mu_L + \mu_Q)}{\mu_L(\mu_A + \mu_Q)}$$

kde  $c_A$  = koncentrace analytu;  $c_L$  = koncentrace vedoucího elektrolytu;  $\mu$  = pohyblivost (mobilita) analytu (A), vedoucího elektrolytu (L) resp. protiiontu (Q)

- Předpokladem ITP separace je **diskontinuální pufovací 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 pufující 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:

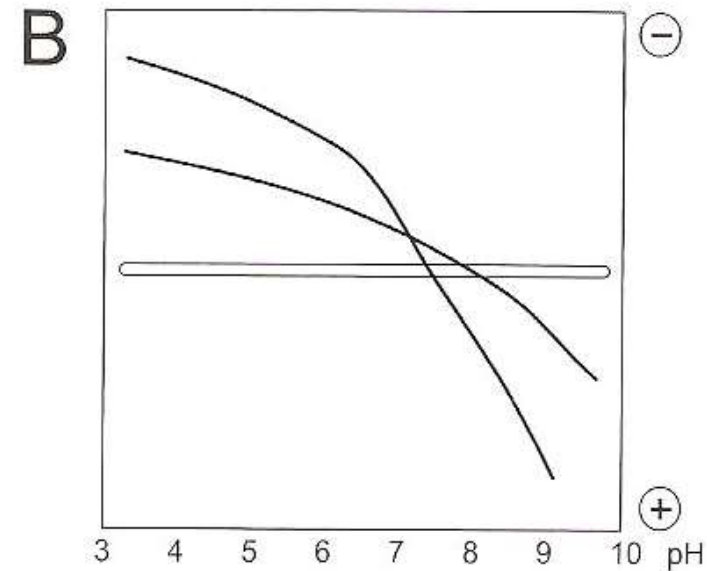
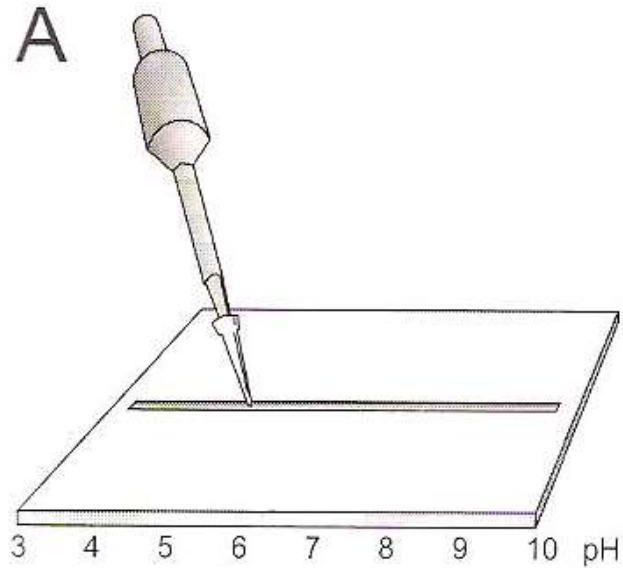
$$pH = pK_A + \log \frac{c_B}{c_A - c_B}$$

# 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 amfolyty - 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

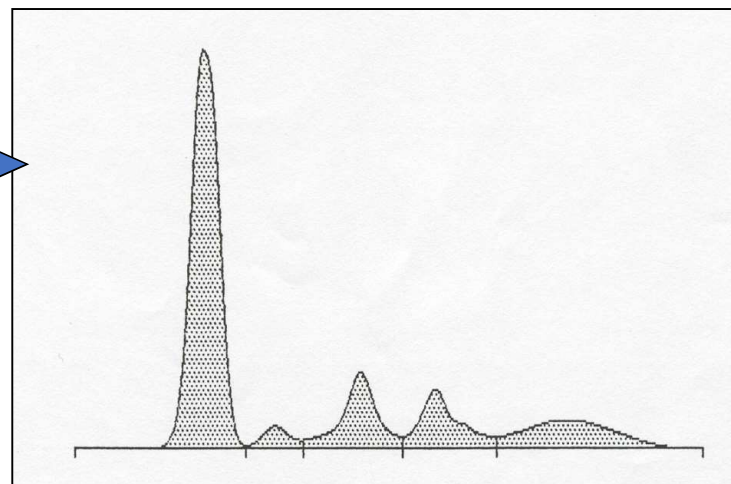
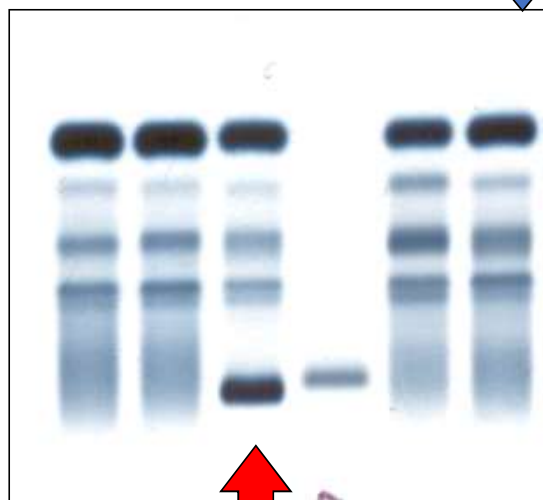
- Kvantitativní hodnocení intenzity zbarvení
- Měření absorpce světla jednotlivými zónami (pásy)
- Pohyblivý světelný zdroj (laser nebo lampa s bílým světlem s filtry) je veden nad gelem a na každém místě gelu je měřena a počítačově zpracována absorpce
- U jednorozměrných gelů získáváme křivku extinkce  $\ln I_0/I$  ( $I_0$  = 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

# Denzitometrie

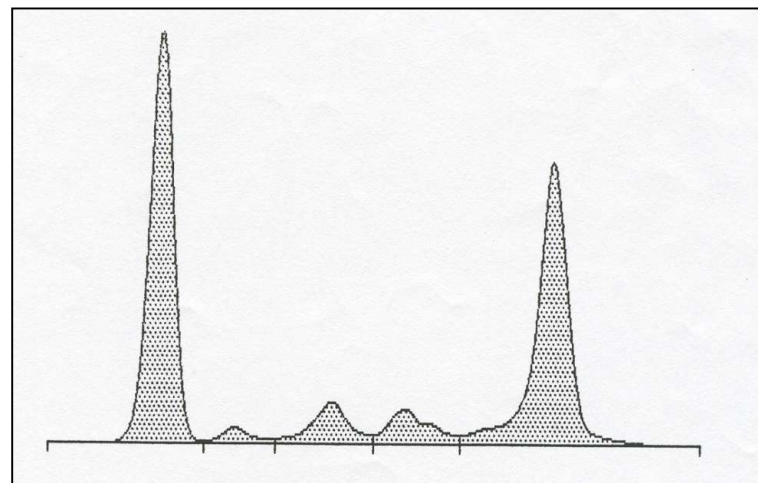


# Denzitometrické vyhodnocení

Normální nález



„M“ gradient



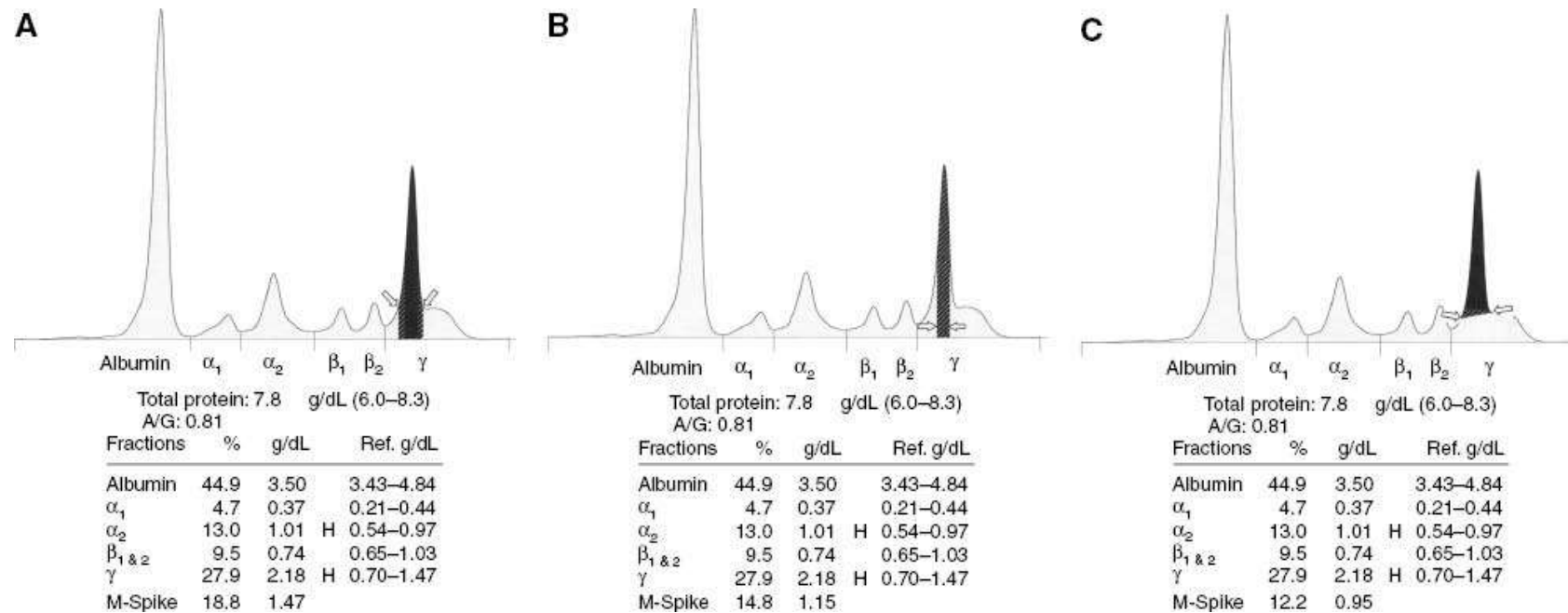
# Metody pro kvantifikaci M-komponenty

- Odečet z elektroforézy
  - „Perpendicular drop“: ohraničení kolmicemi k ose x v místech, kde M-komponenta „nasedá“ na polyklonální pozadí
  - „Corrected perpendicular drop“: ohraničení kolmicemi k ose x, v případě polyklonálního pozadí se pokoušíme toto pozadí kompenzovat zúžením měřené oblasti (velmi subjektivní)
  - „Tangent skimming“: ohraničení M-komponenty zdola úsečkou spojující body, kde M-komponenta „nasedá“ na polyklonální pozadí

*Další možností je odečet z kapilární elektroforézy po imunsubtrakci – zatím nelze používat v rutinní praxi*

# Kvantifikace M-komponenty: 3 používané metody elektroforeogramy z kapilární elektroforézy

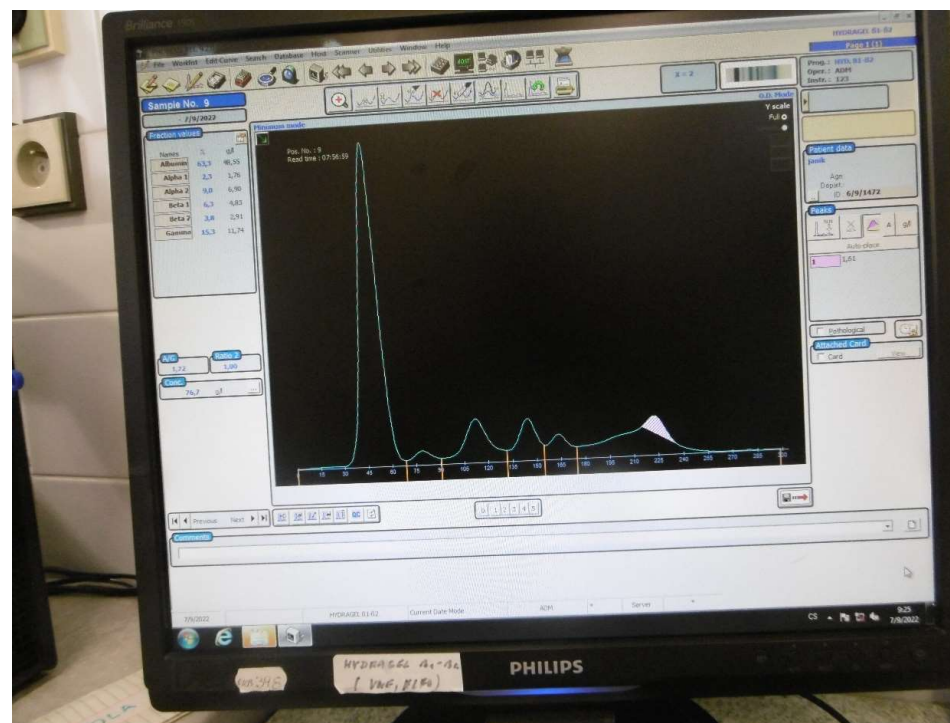
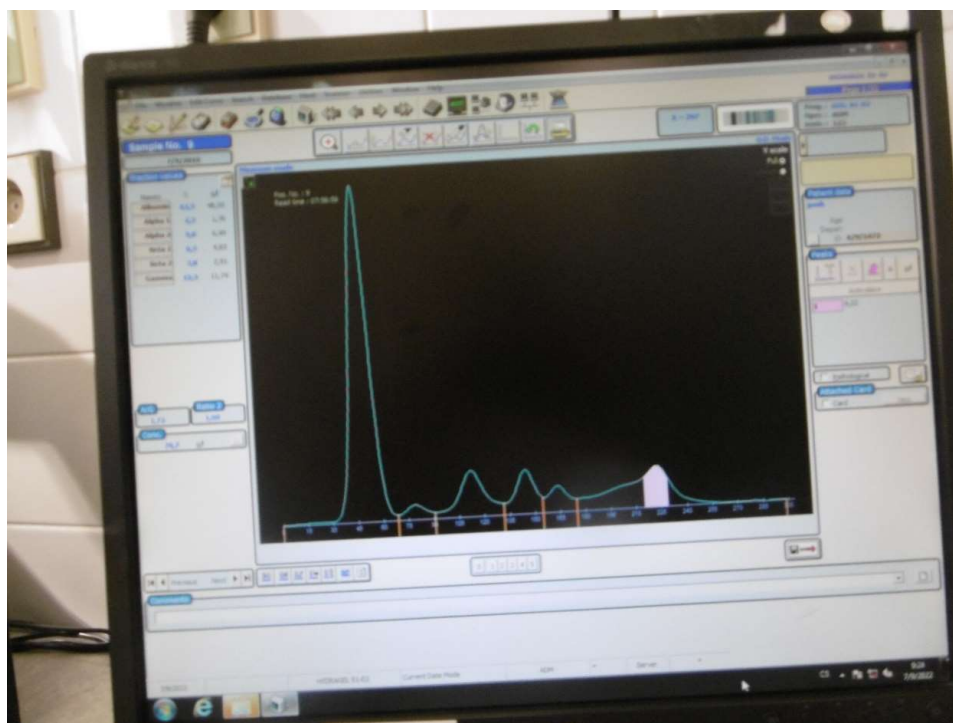
Keren DF, Schröder L. *Clin Chem Lab Med* 2016



## Kvantifikace monoklonální komponenty

*vlevo*: ohraničení kolmicemi k ose x („perpendicular drop“): 4,2 g/L

*vpravo*: ohraničení zdola úsečkou mezi body, kde M-pík nasedá na polyklonální pozadí („tangent skimming“): 1,6 g/L

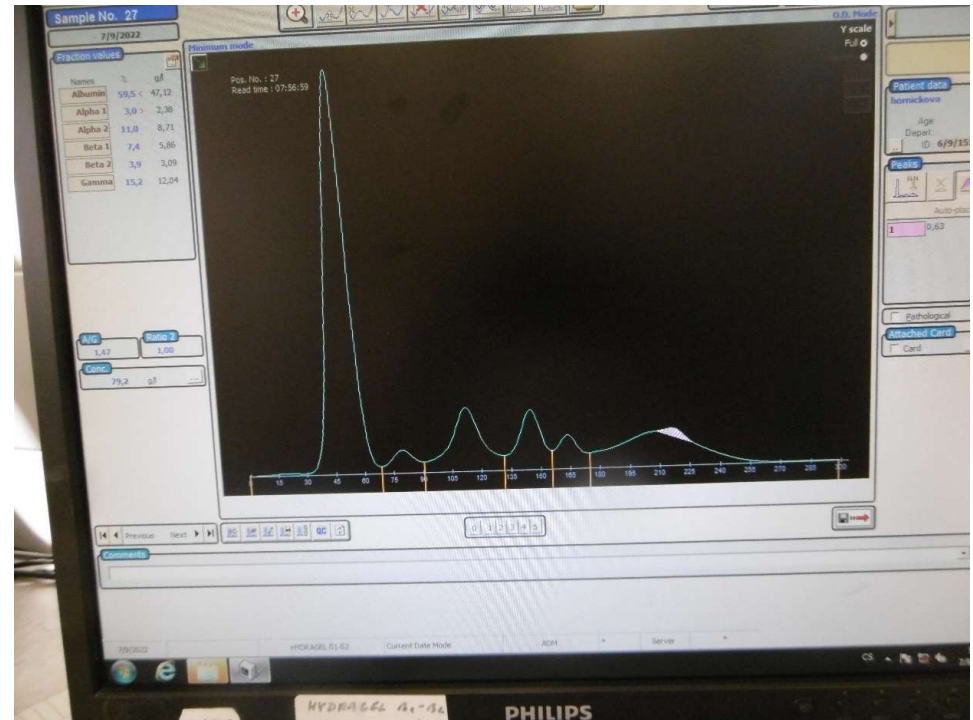
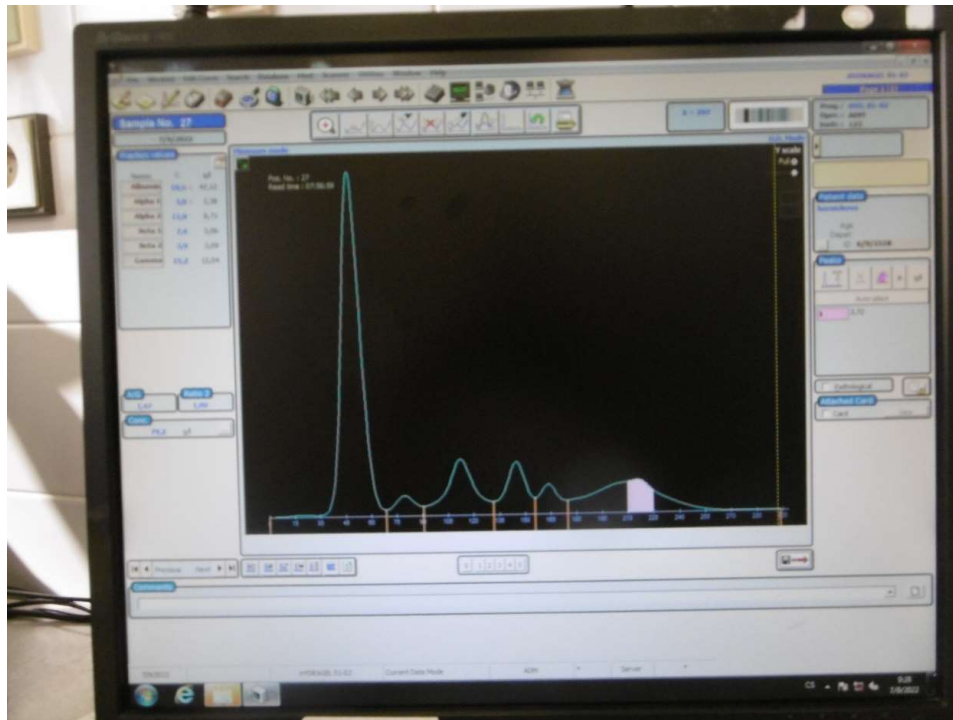




# Ohraničení monoklonální komponenty – problém polyklonálního pozadí

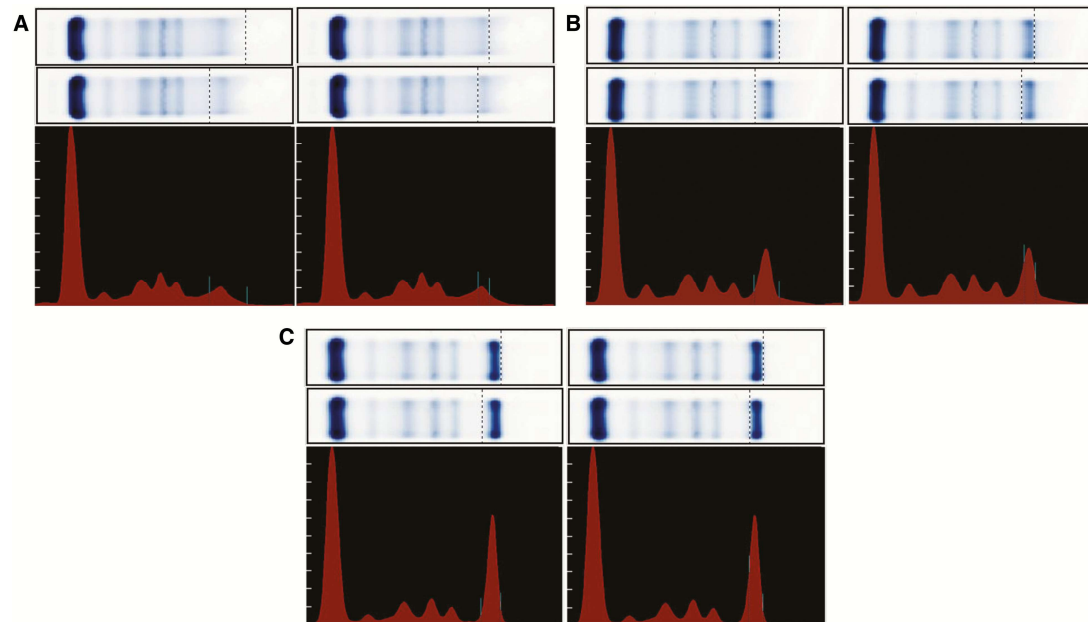
*vlevo*: ohraničení kolmicemi k ose x („perpendicular drop“): 3,7 g/L

*vpravo*: ohraničení zdola úsečkou mezi body, kde M-pík nasedá na polyklonální pozadí („tangent skimming“): 0,6 g/L





**Figure 1** Serum protein electrophoresis and densitometric scanning: A, Low-level, broad-based monoclonal immunoglobulin ...



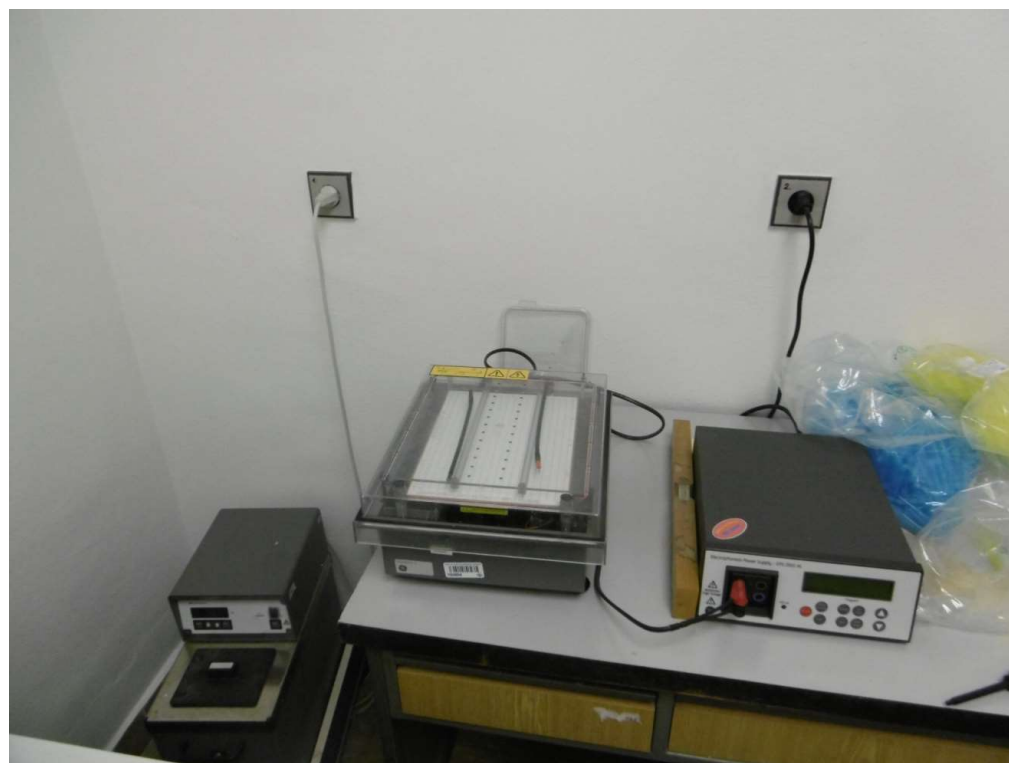
## Komerčně dostupné elektroforetické systémy pro použití v klinické laboratorní diagnostice

- 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 imunsubtrakční elektroforéza (CE) – typizace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)
- SDS elektroforéza bílkovin moče – diferenciální diagnostika proteinurií (glomerulární, tubulární, postrenální)
- Elektroforéza hemoglobinů – detekce abnormních 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)

## Elektroforéza bílkovin

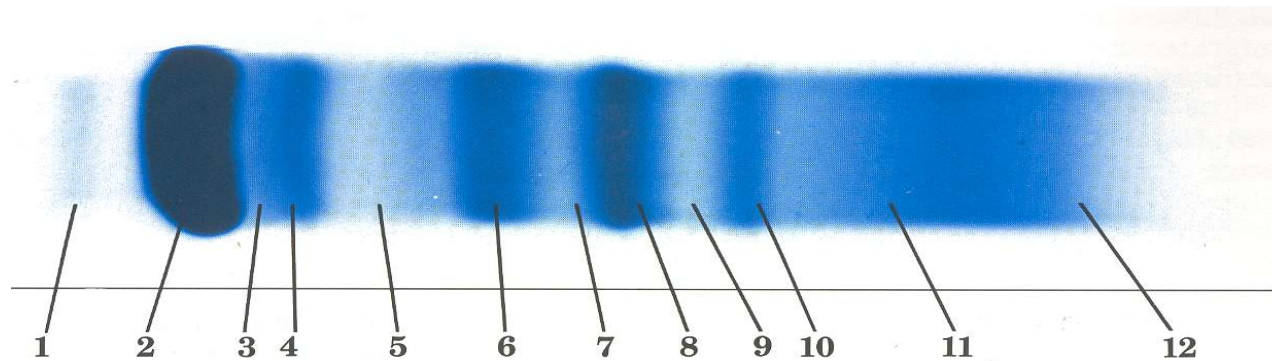
se provádí s cílem **zjistit abnormality bílkovin krevního séra.**

☞ 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 %



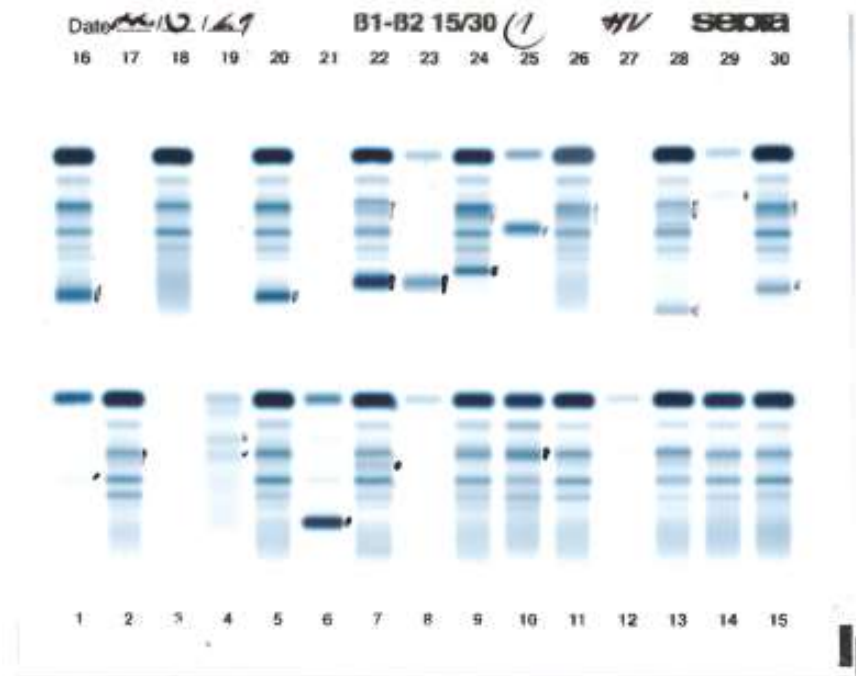
1.	prealbumin
2.	albumin
3.	$\alpha$ -lipoprotein, $\alpha$ -fetoprotein
4.	A1AT, orosomukoid
5.	$\alpha_1$ antichymotrypsin, Gc globulin
6.	A2M, Hp
7.	hemoglobin

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



**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)**

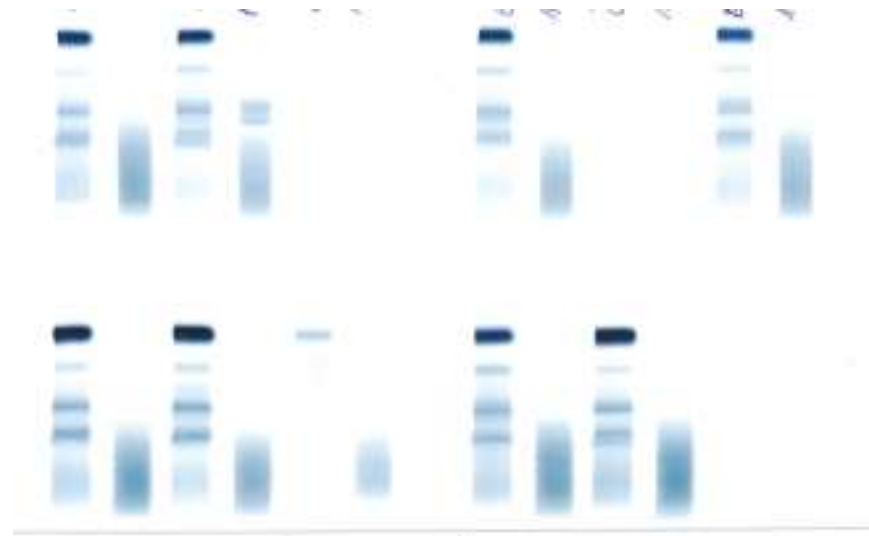
Paraprotein v pozicích 6 (moč), 16 (sérum), 20 (sérum), 22 (sérum), 23 (moč), 24 (sérum), 25 (moč – v beta frakci), 28 (sérum) a 30 (sérum); v sérech na pozicích 20, 22, 28 a 30 je patrná výrazná redukce polyklonálních gamaglobulinů; zvýšená frakce alfa2-globulinů v pozicích 2, 10, 24, 30 (séra)



## 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



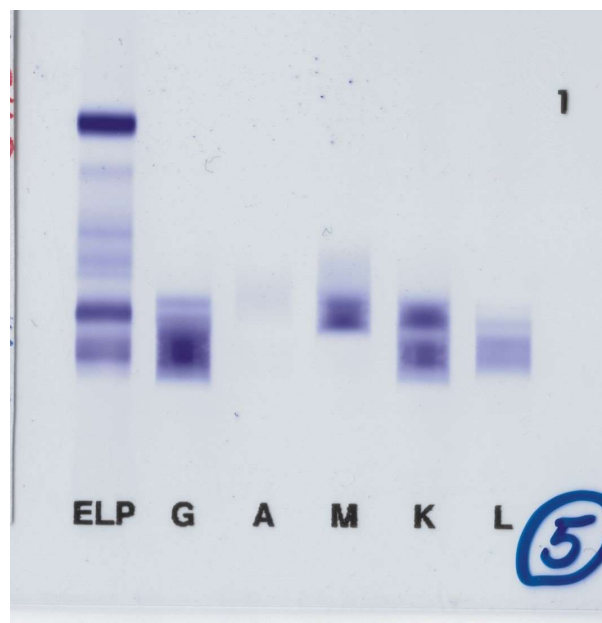
## Imunofixace – problematické nálezy

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

IF s Fluidilem



IF s beta-merkapttoethanolem



# Posouzení typu proteinurie – separace močových bílkovin SDS-PAGE nebo SDS-elfo v agarose je (starší) alternativou ke kvantitativní analýze markerových proteinů (Regeniter A et al., *Clin Chem* 2004)

Zopakujte si: Podle jaké vlastnosti se bílkoviny při této elektroforetické metodě dělí?

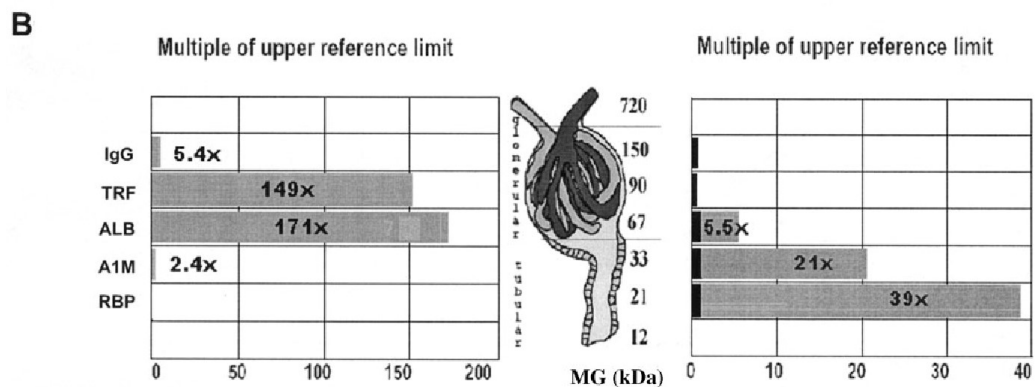
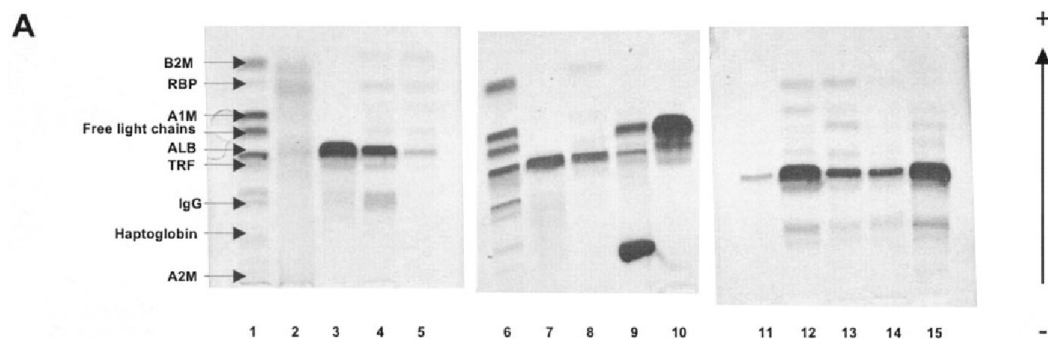
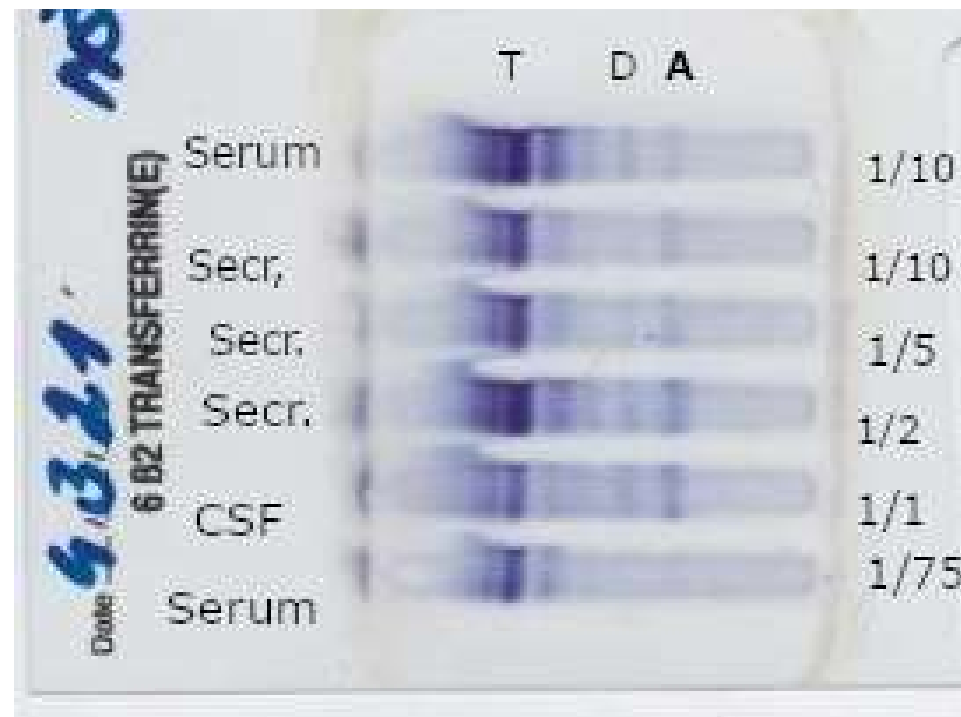


Fig. 1. Selected electrophoretic patterns obtained with Hydrasis SDS gels (A) and reproductions of marker proteins profiles (B).

## 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

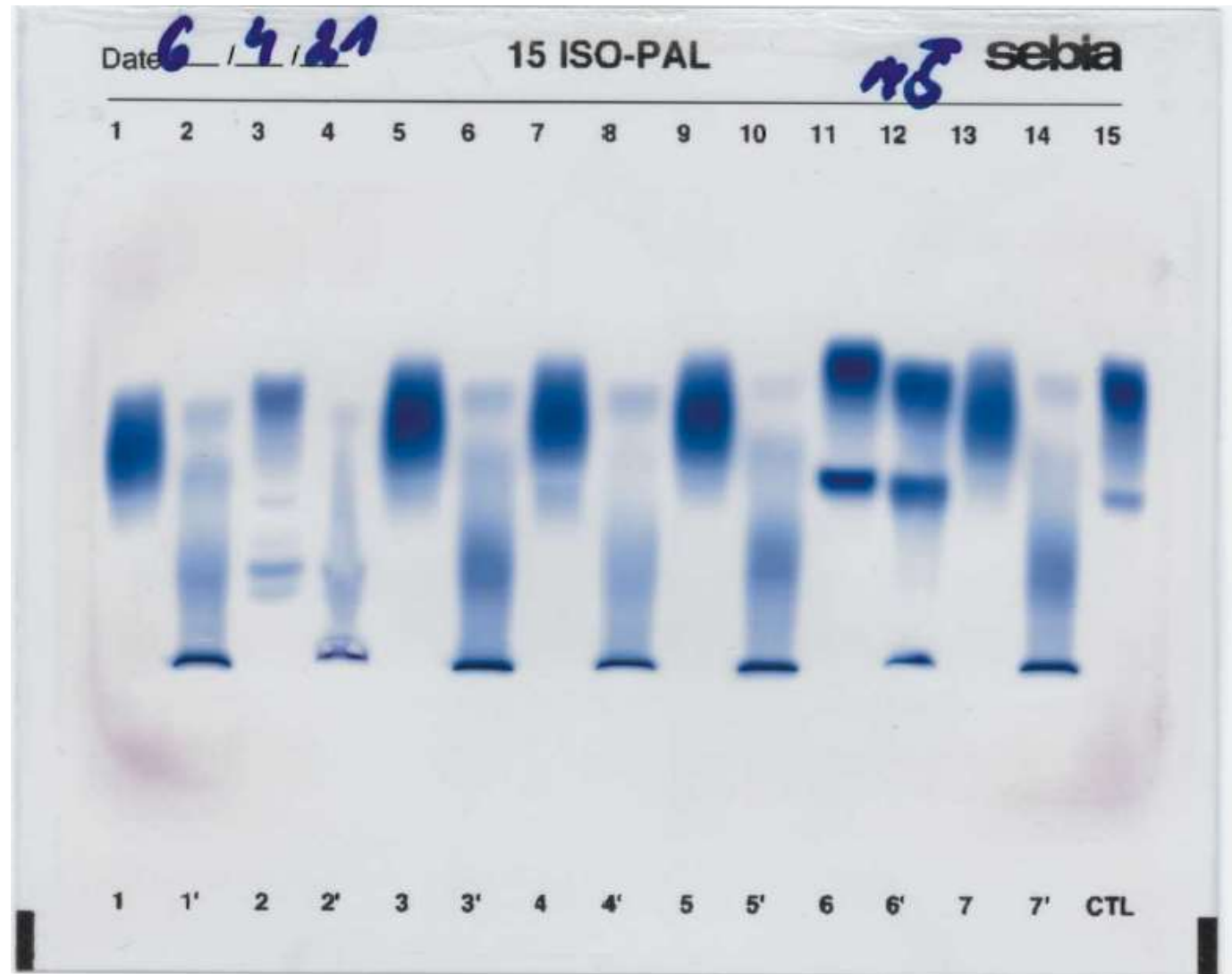


**Elektroforéza izoenzymů  
alkalické fosfatasy  
(Hydragel 15 ISO-PAL, Sebia)**

v pozicích 2, 4, 6, ... je kostní  
izoenzym vyvázan přítomným  
lektinem blízko startu

v pozicích 3, 4 je patrná  
střevní frakce (I)

v pozicích 11, 12 je výrazná  
druhá jaterní frakce (L2)

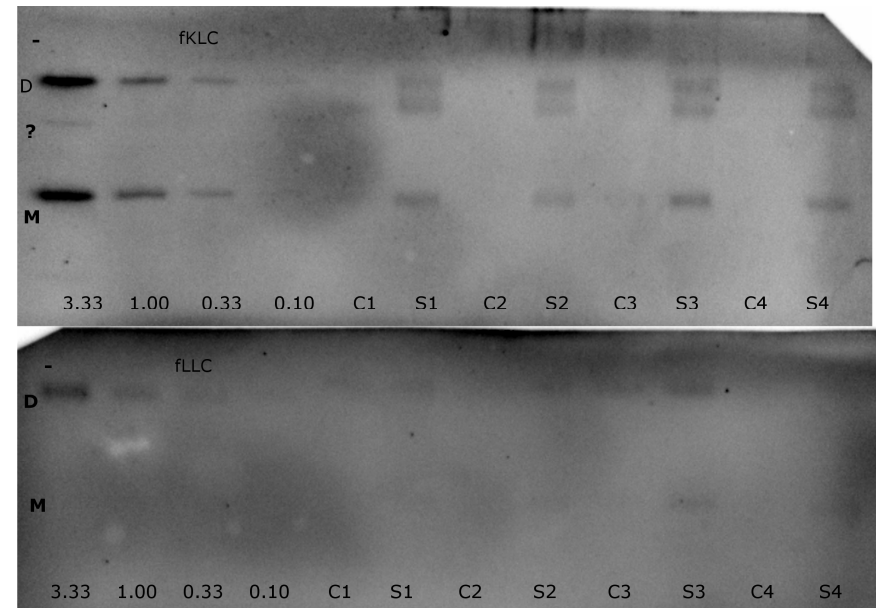
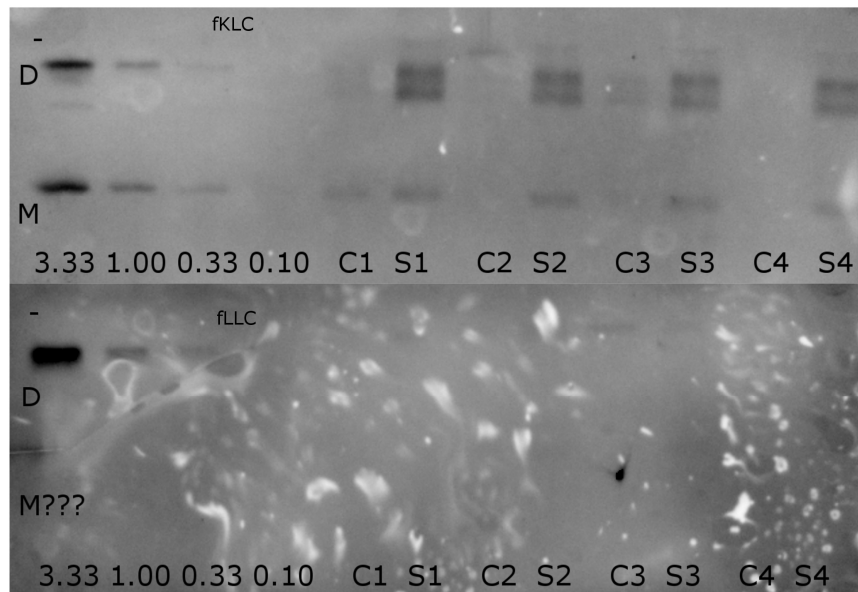




## SDS-elfo

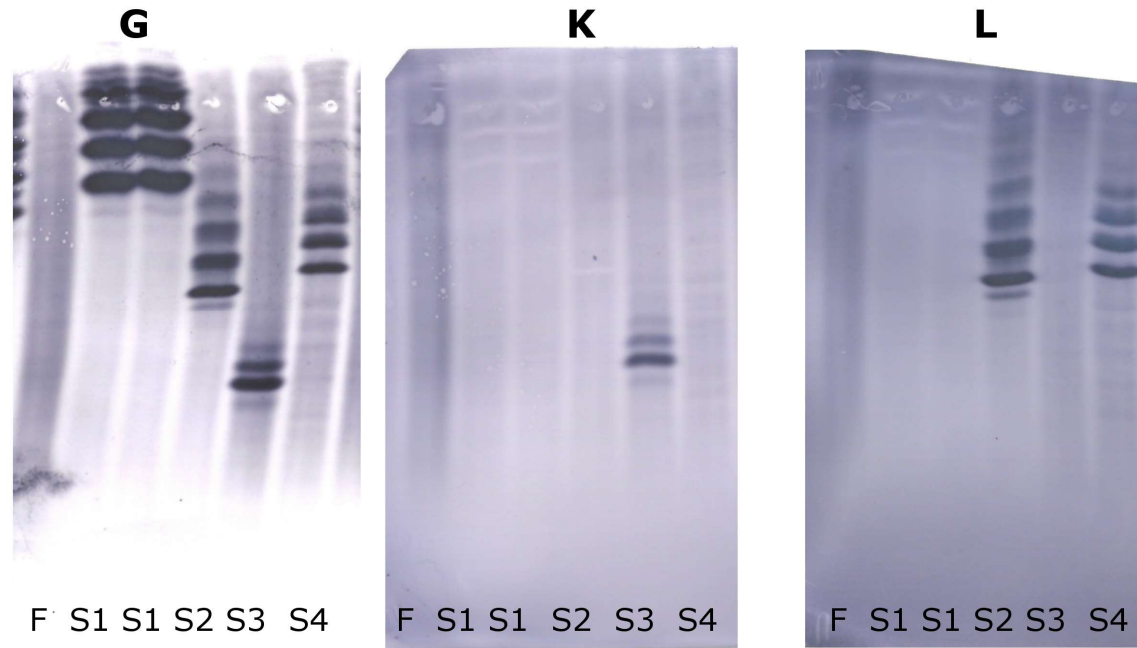
vzorky smíchaný s SDS (sodium dodecyl sulfate – laurylsíran sodný), který se váže na bílkoviny za tvorby negativně nabitých micel (v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny). Často se používají denaturační podmínky (inkubace vzorků s  $\beta$ -ME nebo DTT, zahřátí – redukce disulfidových vazeb). SDS (0,1%) je i v gelu (zprav. polyakrylamidovém). Mezi log M a relativní pohyblivostí bílkoviny je pak v určitém rozsahu M přibližně lineární vztah.

Obr.: Monomery a dimery fLC, SDS-PAGE v neredukujících podmínkách/AIB, chemiluminiscenční detekce (2018)



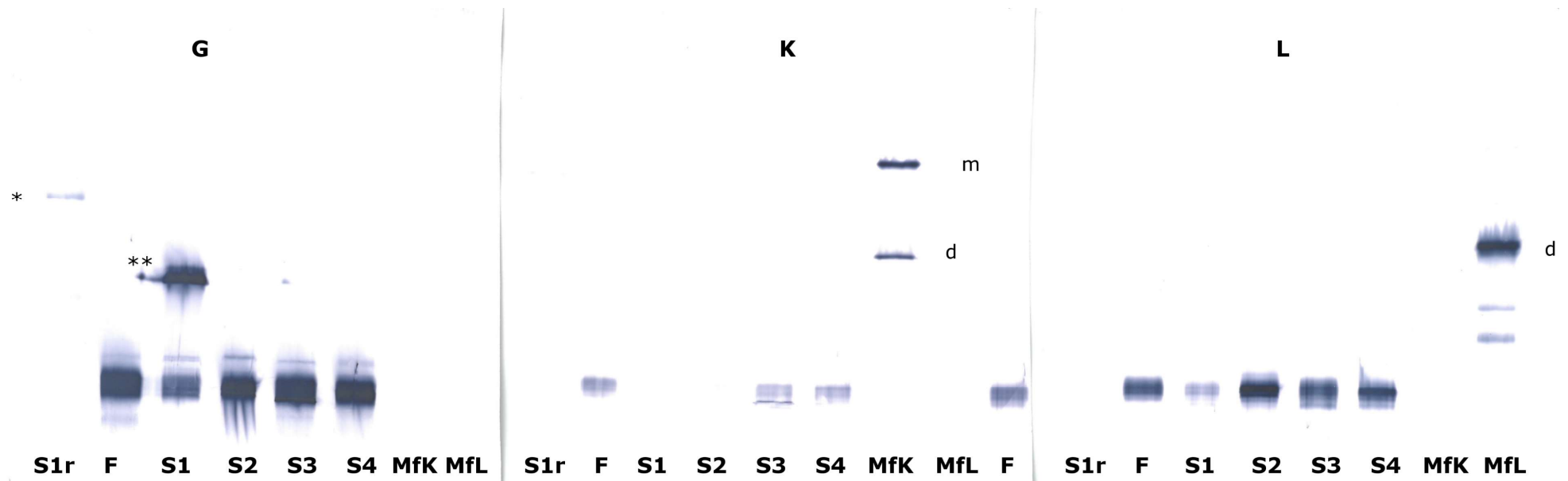
# IEF/AIB: typizace LŘ v Ig jako pomoc v diagnostice nemoci těžkých řetězců

Kušnierová et al. *Klin Onkol* 2020; 33(4): 280-5

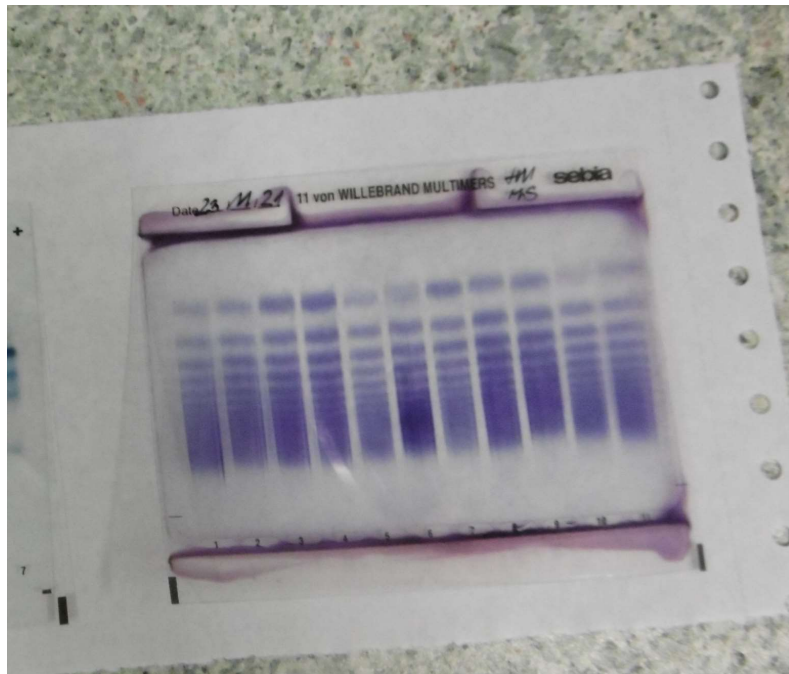


# SDS elfo jako pomoc v diagnostice nemoci těžkých řetězců

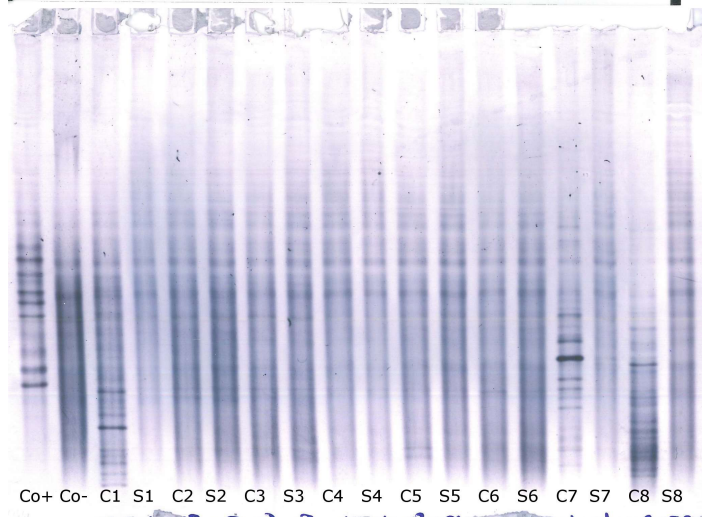
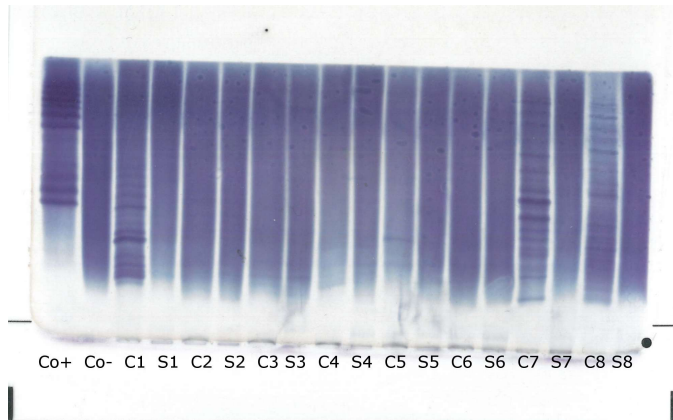
Kušnierová et al. *Klin Onkol* 2020; 33(4): 280-5



## Detekce multimerů vWF (SDS elfo v agarose, Sebia)



- Multimery vWF jsou sníženy nebo chybí u některých případů von Willebrandovy nemoci (typ II)
- Na obr. vlevo nálezy bez hrubé patologie; vysokomolekulární formy v gelu dole (migrují nejpomaleji)



## IEF a detekce o-IgG: Metody

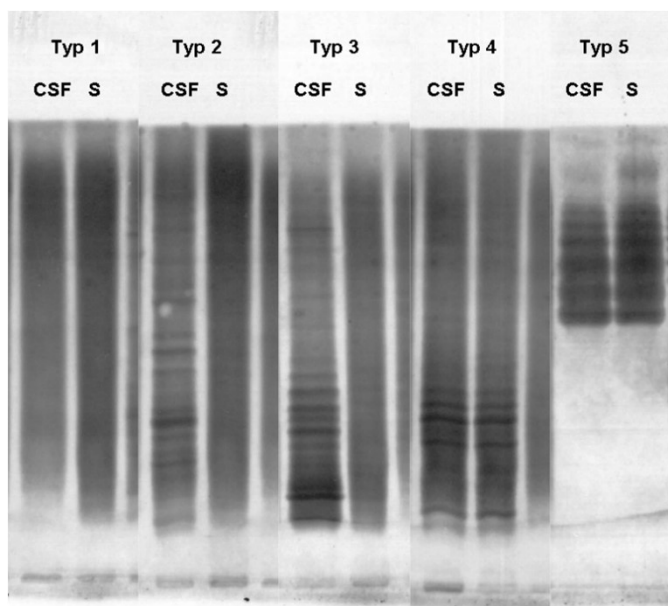
Zeman D et al. *Ces Slov Neurol N* 2019;82/115(1):68-75

- 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

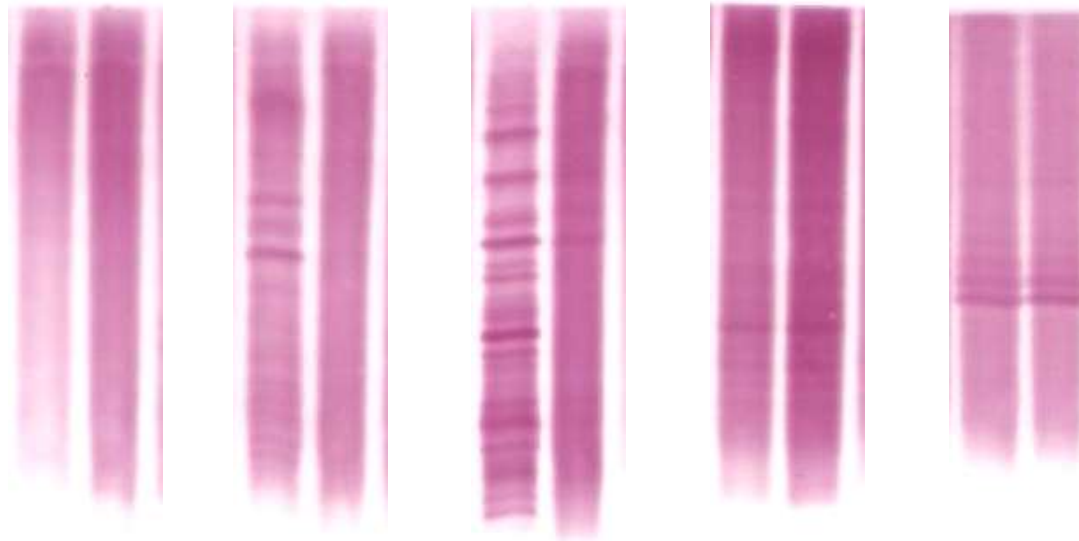


- **Typ 1:** jen „polyklonální“ IgG v likvoru i séru
- **Typ 2:**  $\geq 2$  IgG pásy v likvoru, jen „polyklonální“ IgG v séru
- **Typ 3:** IgG pásy shodné v likvoru i séru + IgG pásy přítomné pouze v likvoru
- **Typ 4:** IgG pásy shodné v likvoru i séru
- **Typ 5:** monoklonální IgG v likvoru i séru

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

typ 1 – typ 2 – typ 3 – typ 4 – typ 5

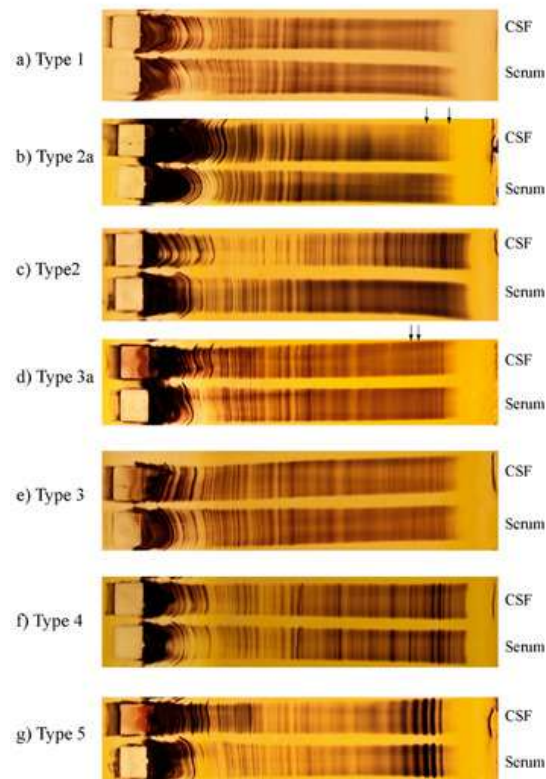
*dvojice likvor (vlevo), sérum (vpravo)*



# IEF v polyakrylamidovém gelu

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

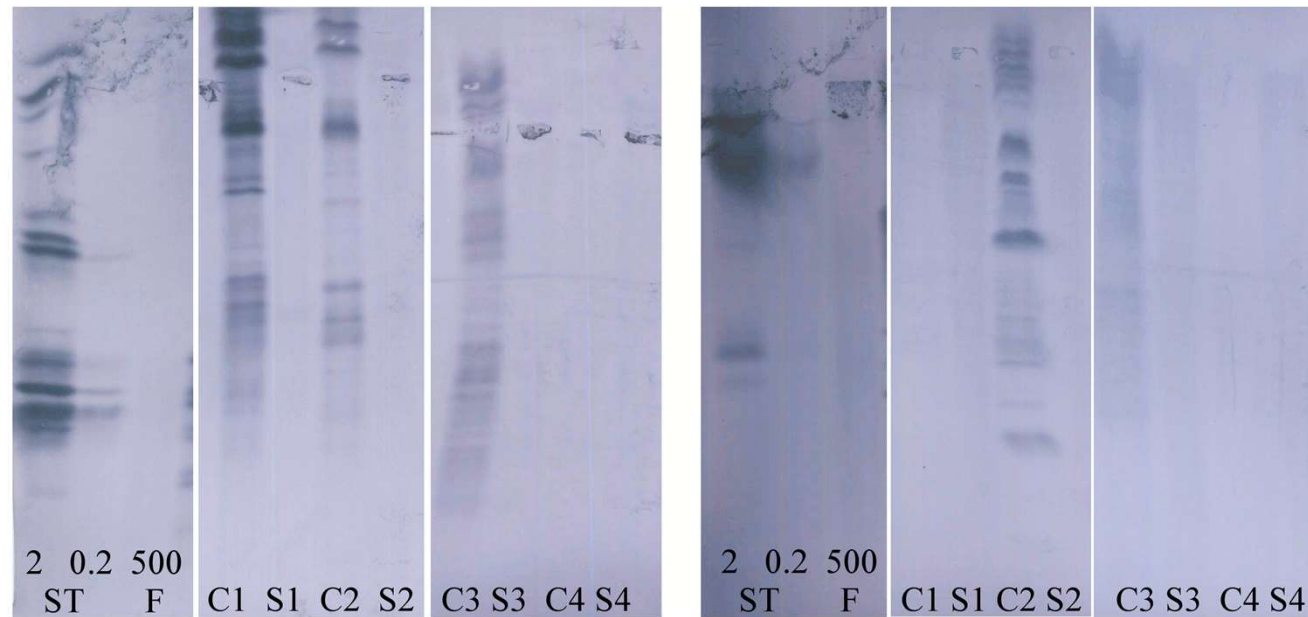
OCB patterns





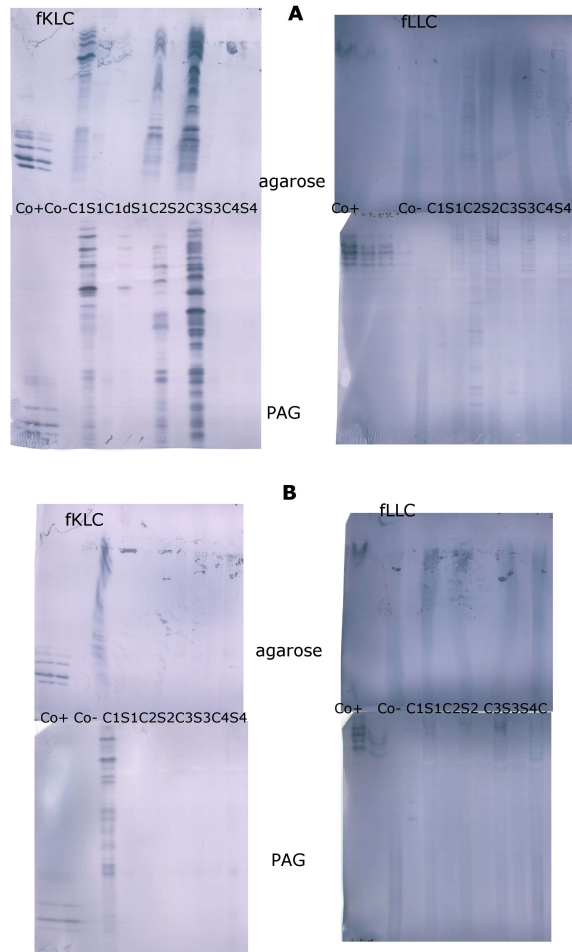
# Oligoklonální volné lehké řetězce (o-fLC)

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



## Oligoklonální volné lehké řetězce (fLC): agarózový vs. polyakrylamidový gel

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

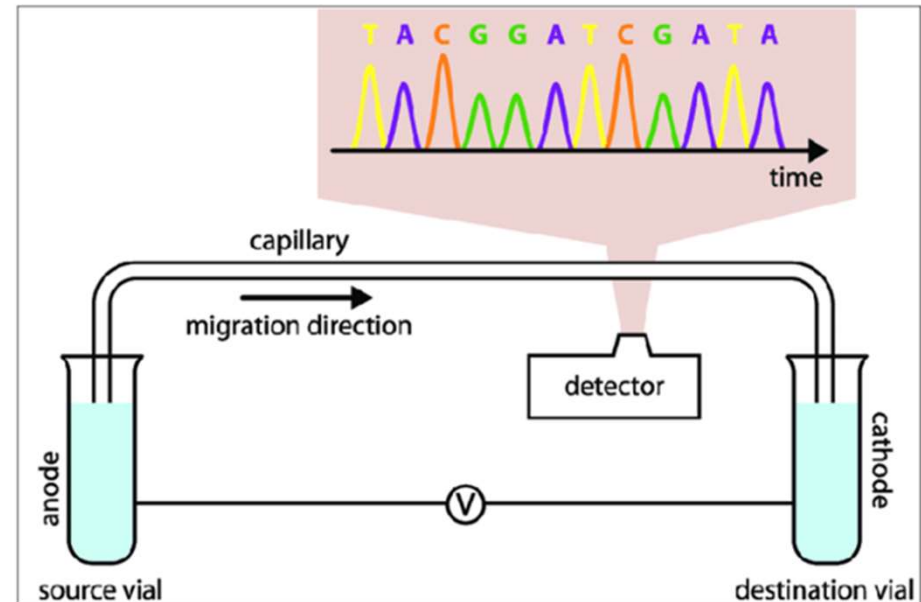


- 48 vzorků
- Výtečná shoda mezi separací v agarózovém a polyakrylamidovém (PAG) gelu (kappa > 0,8 pro všechna srovnání)
- Počet pásů poněkud vyšší v PAG
- Klinické korelace lepší v PAG (cut-off 6 o-fKLC pásů)
- Výtečná shoda mezi hodnotícími (kappa > 0,9 pro všechna 4 srovnání)

# Kapilární elektroforéza (CE) – princip

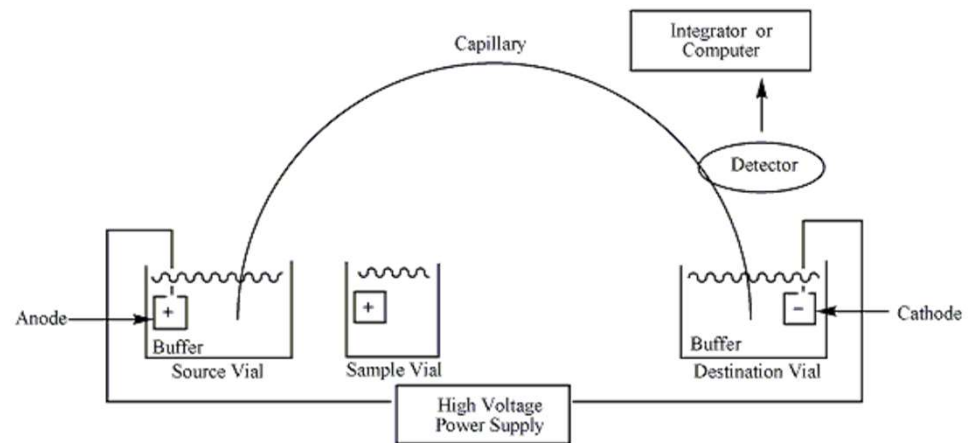
(obrázek převzatý z <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/capillary-electrophoresis-technology.html>)

- Dělení v křemenných kapilárách
- Dvě elektrody
- Dva rezervoáry pro pufrů
- 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

- Tenké křemenné kapiláry (vnitřní průměr 25 – 75  $\mu\text{m}$ , délka 20 – 100 cm), na jejich povrchu jsou záporně nabitě silanolové skupiny – způsobí elektroosmotický tok kladně nabitých iontů pufru ke katodě – všechny složky vzorku nakonec dorazí ke katodě, kde jsou detekovány
- Detekce nejčastěji UV/VIS (200 nm – peptidová vazba; 280 nm – aromatické zbytky)



OKB FN Brno: Příklad Capillarys 2 Flex-piercing  
využití: 1) stanovení HbA1c, 2) stanovení CDT (%)



## Přístroje pro kapilární elektroforézu firmy Sebia

Volume of tests	Low	Medium	High		
Configuration	Standalone	Standalone	Standalone	Workcell	On Track
Instrument	MINICAP FLEX-PIERCING	CAPILLARYS 3 OCTA	CAPILLARYS 3 TERA	CAPILLARYS 3 TERA MC 1, 2 or 3	CAPILLARYS 3 TERA TLA
Number of capillaries	2	8	12	12 to 36	12
Available menu	HbA1c, Hemoglobin, CDT, Serum Protein, Urine Protein, Serum Immunotyping, Urine Immunotyping				HbA1c, Serum Protein, Serum Immunotyping

## Odkazy na internetové stránky dvou hlavních výrobců

- Sebia: <https://www.sebia.com/solutions/instruments/>
- Helena: <https://www.helena-biosciences.com/en/clinical-electrophoresis/>

# 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

## Literatura

- R. Westermeier: *Electrophoresis in Practice*. 4. přepracované a rozšířené vydání. Wiley-WCH, Weinheim, 2005. ISBN 3-527-31181-5
- R. Westermeier, A. Görg: Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.) *Bioanalytik*. 3. vydání. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2012. Str. 269-302.
- P. Schmitt-Koplin, C. Schwer: Kapillarelektrophorese. In: Lottspeich F, Engels JW (Eds.) *Bioanalytik*. 3. vydání. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2012. Str. 303-333. ISBN 978-3-8274-2942-1.
- Keren DF, Schröder L. Challenges in measuring M proteins in serum. *Clin Chem Lab Med* 2016, 54: 947-961

# Reflexní fotometrie

- měří záření odražené od homogenně zbarvené podložky
- Matrice: impregnovaná vlákna nebo vícevrstvý (želatinový) film
- Vzorek: plná krev, sérum, plazma, moč
- Suchá činidla aktivovaná vodou obsaženou ve vzorku
- Použití zejména v glukometrech – suchá chemie
- močová analýza
- denzitometrické hodnocení tenkovrstevných chromatogramů

## Vertikální fotometrie

- uspořádání absorpční fotometrie, při které paprsek prochází kyvetou vertikálně

- Použití pro měření v mikrotitračních destičkách
- Světlovody (skleněná vlákna) vedou světlo do více (zprav. osmi) jamek současně a další světlovody odvádějí prošlé světlo k detektoru
- Při konstantní ploše kruhové základny je pro stejnou koncentraci konstantní součin absorbance a délky optické dráhy roztokem:

$$A_1 \cdot l_1 = A_2 \cdot l_2$$

- Při krátké optické dráze (cca 3 mm) tak lze docílit solidních výsledků i navzdory malým nepřesnostem v pipetování multikanálovou pipetou