

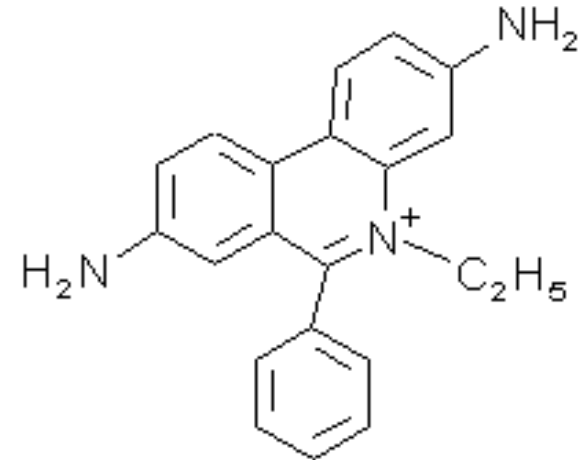
Elektromigrační metody

Vizualizace DNA

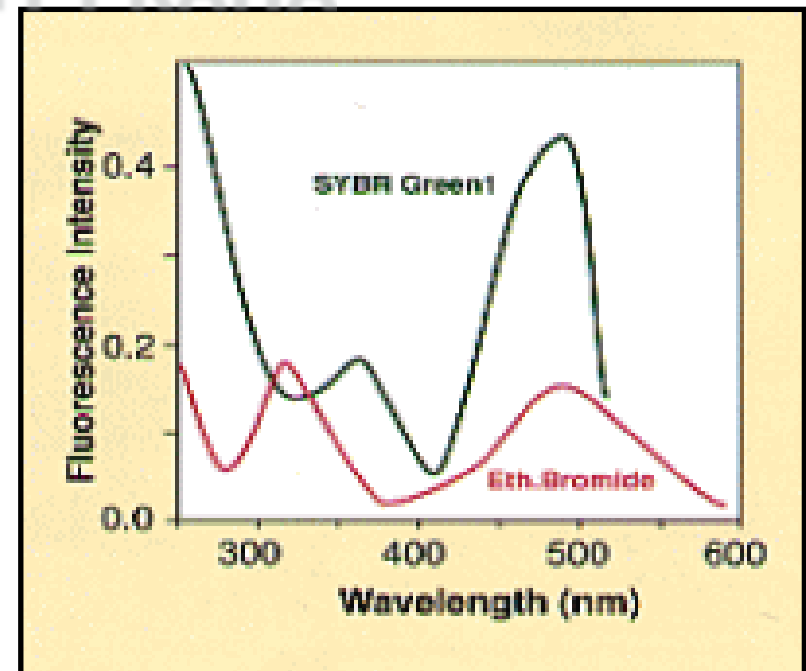
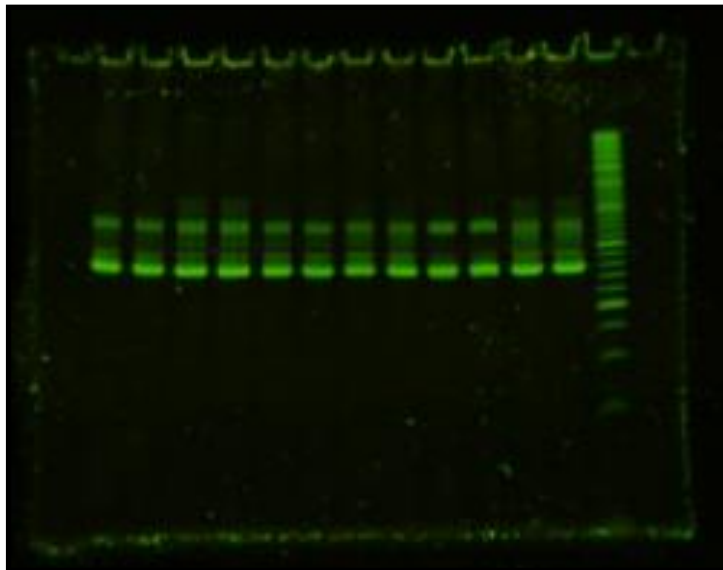
ETHIDIUM BROMID

fluorescenční barva – interkalační činidlo

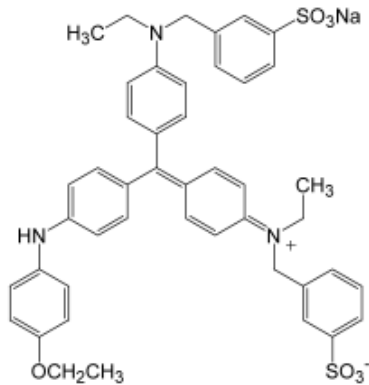
- do gelu
- do pufru
- barvení po elfu



SYBR GREEN



Barvení proteinů

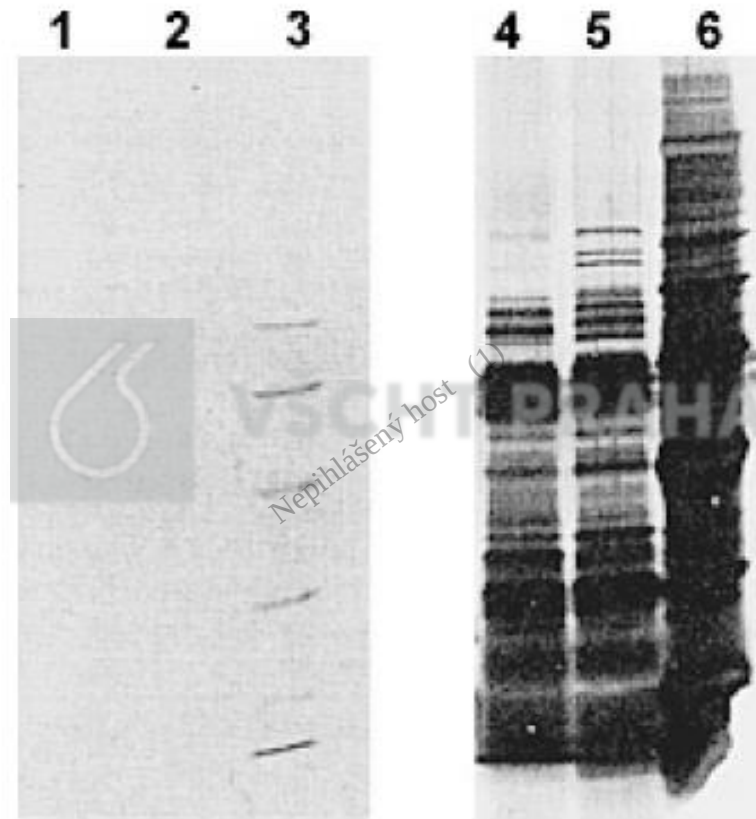


Coomassie Brilliant Blue

Method	Detection limit
Coomassie Brilliant Blue R 250 Staining – Standard Method	500 – 1,000 ng per band
Coomassie Brilliant Blue R 250 Staining – Maximal Sensitivity	50 – 100 ng per band
Silver Staining – Neutral Silver Staining	1 – 10 ng per band
Silver Staining – Ammoniacal Silver Staining	1 – 10 ng per band
Copper Staining	10 – 100 ng per band for 0.5 mm gels 1,000 ng per band for 1 mm gels
Staining with colloidal gold	3 ng per band
Staining with SYPRO fluorescent dyes	1 – 2 ng per band

Barva	$A_{\max}$ (nm)	Použití
Amidočern 10B	620	barvení proteinů
Coomassie Brilliant Blue R-250	590	barvení proteinů, 10 x citlivější než amidočern
Coomassie Brilliant Blue G-250	595	barvení proteinů
Alcian Blue	630	Glykoproteiny
Methylene Blue	665	RNA, RNase
Methyl Green	635	Nativní DNA, neutrální nebo kyselá dělicí barva
Fast Green FCF	610	barvení proteinů
Basic Fuchsin	550	Glykoproteiny, nukleové kys., glykoproteiny bohaté na sialovou kys.
Pyronin Y	510	RNA, kyselá dělicí barva
Bromocresol Green		dělicí barva pro DNA agarosovou elú
Bromophenol Blue	595	neutrální nebo alkalická dělicí barva
Crocein Scarlet	505	Immunoelektroforesa
Ethidium Bromide		Fluorometrická detekce DNA
Toluidine Blue O	620	RNA, RNase, mukopolysacharidy

Coomassie Blue x barvení stříbrem



Porovnání identických gelů po barvení Coomassie Blue (dráhy 1–3) a po barvení stříbrem (dráhy 4–6).

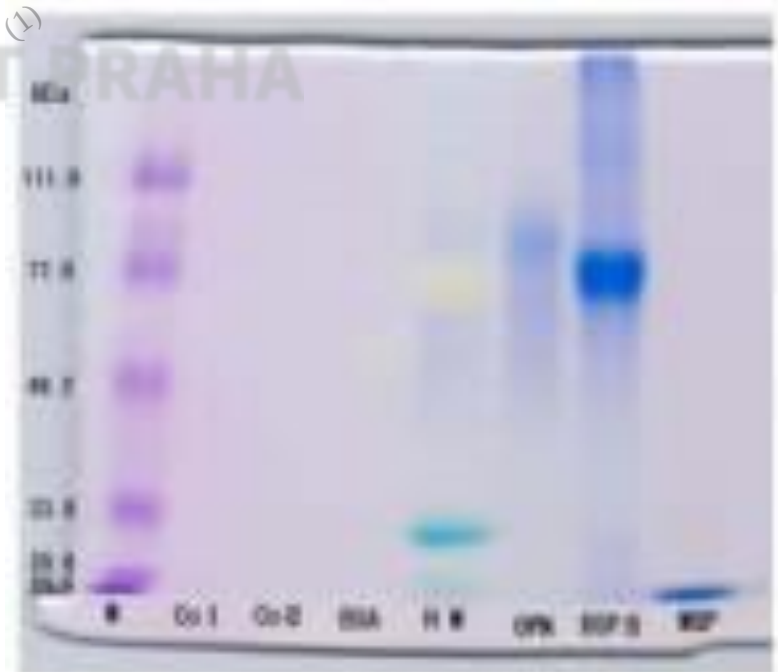
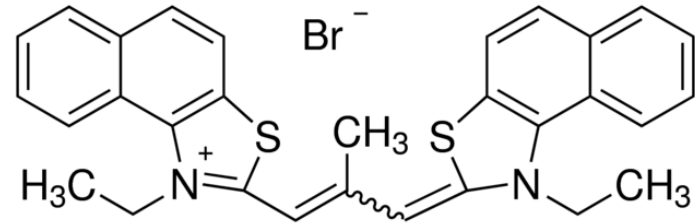
[B. S. Dunbar, “Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques”, Plenum Press, New York, 1987.]

Stain all

Biochem/physiol Actions

Stains-All is a cationic carbocyanine dye and is a multipurpose dye. It stains sialoglycoproteins **blue**, Ca^{2+} binding proteins **deep blue to violet**, proteins **red** and lipids **yellow-orange**. It also stains RNA (**bluish purple**) and DNA (**blue**).

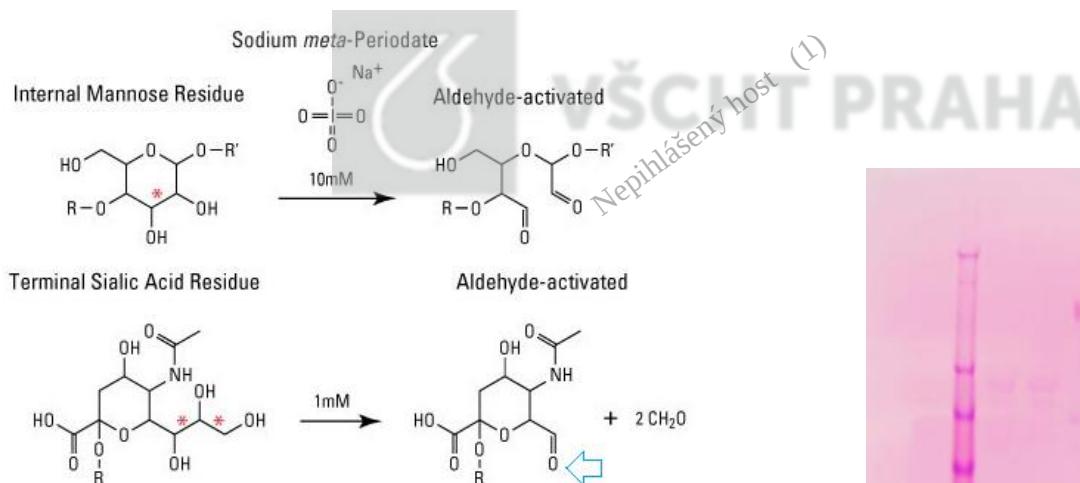
As little as 3 ng (123 BP fragment) of pBR322/Hae III digest DNA and 90 ng tRNA can be detected on a polyacrylamide gel. PAGE gels are stained in the dark and then destaining by removing the gel from the staining solution and exposing it to the light from a light box until sufficient destaining has occurred. A staining solution is typically made by dissolving the dye in formamide and buffer.



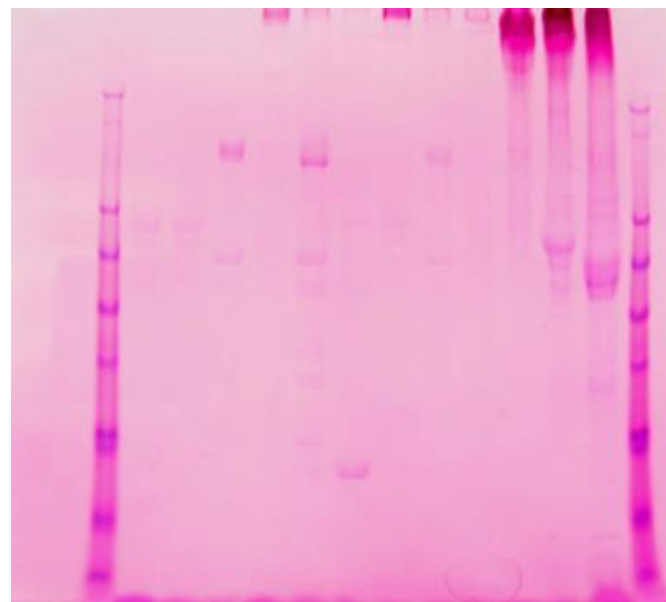
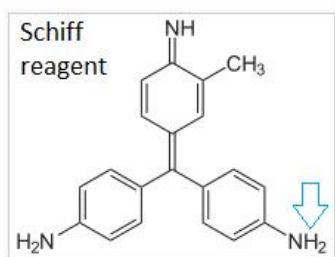
Stains All

Detekce glykoproteinů

The Glycoprotein Detection Kit is designed for the selective staining of glycoproteins on polyacrylamide gels and membranes using a modification of the **Periodic Acid-Schiff (PAS) method**. Staining of sugar moieties of glycoproteins yields magenta bands with a colorless background. The periodic acid/Schiff reagent stains vicinal diol groups found mainly on peripheral sugars and sialic acids and is used as a general glycoprotein stain.



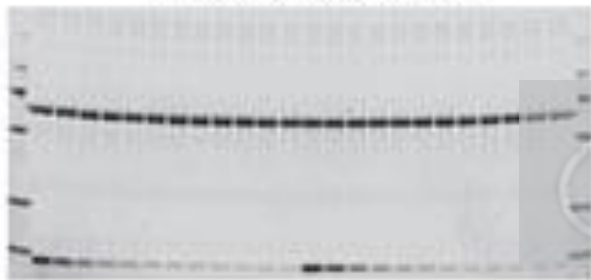
Fuchsin



Stain-Free Technology

přídavek trihalogenové sloučeniny - zvýšení fluorescence Trp

Gel before transfer



Membrane after transfer



Gel after transfer



Bio-Rad



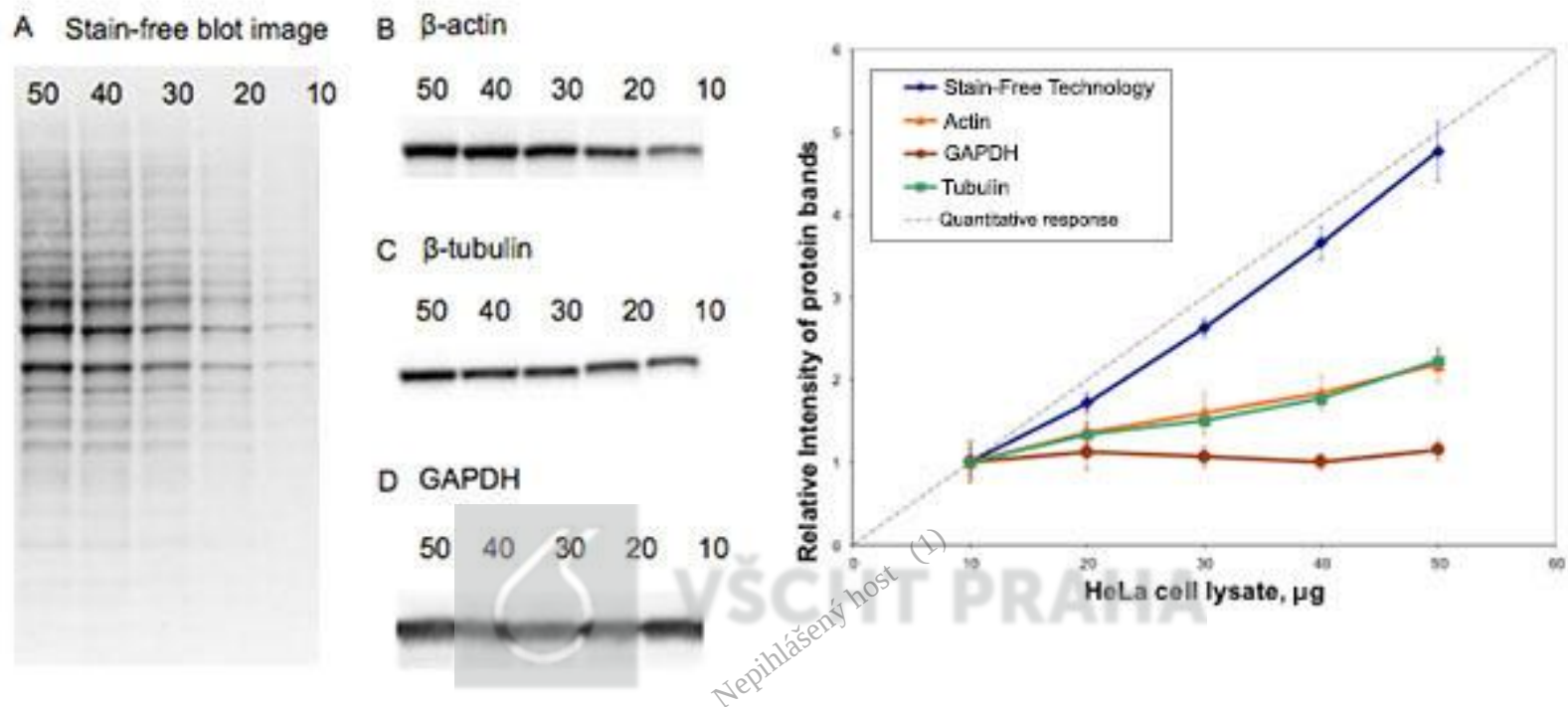
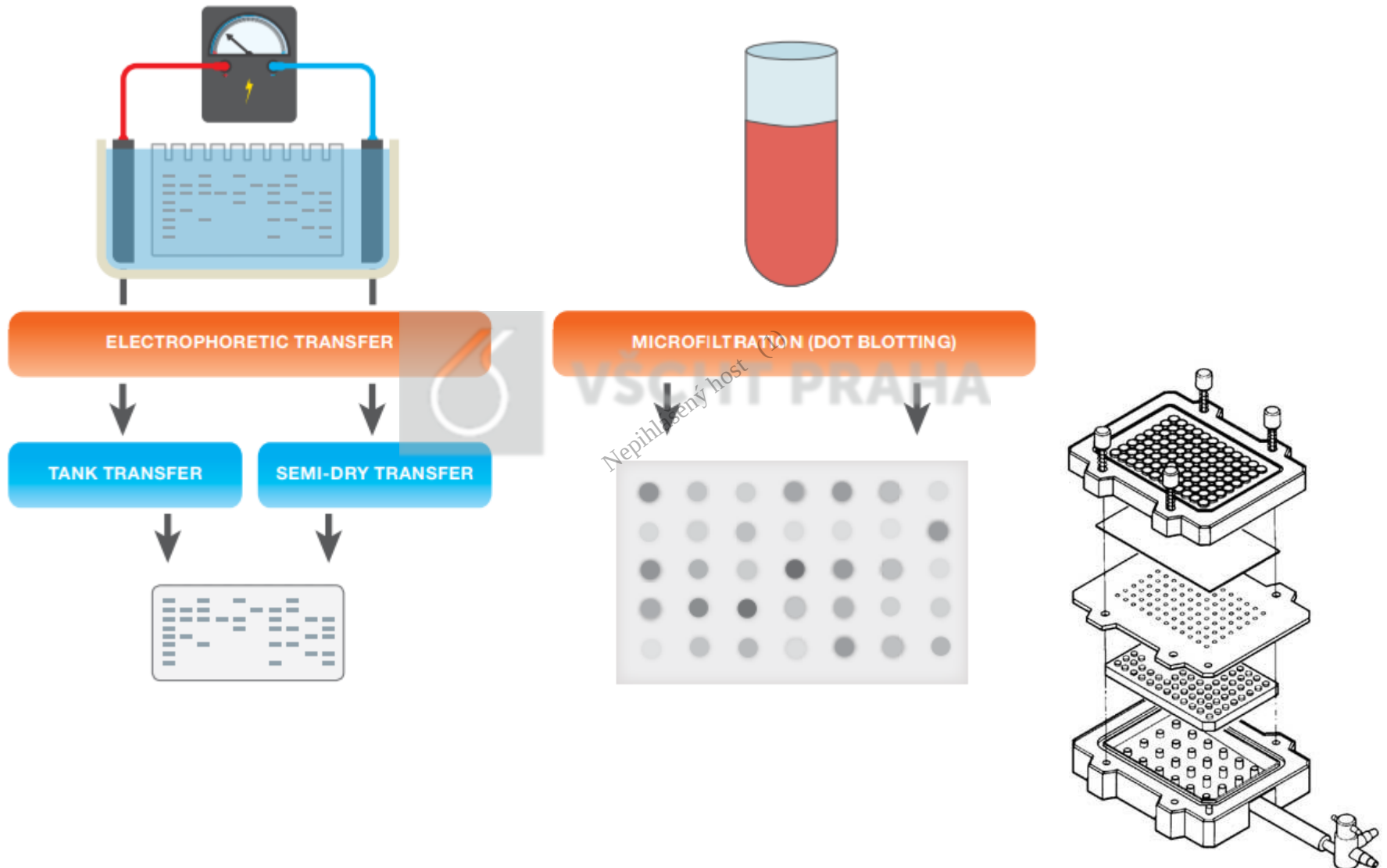


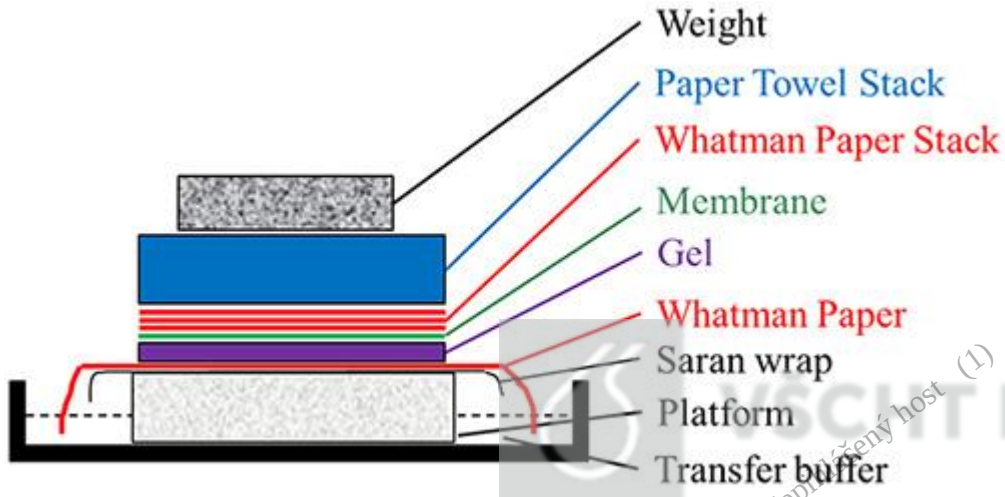
Figure 5. Comparison of protein normalization using stain-free technology and commonly used housekeeping proteins. Tenfold dilutions of HeLa cell lysates ranging from 50 to 10 μ g were loaded for samples detected with stain-free technology (A) and the housekeeping genes β -actin (B), β -tubulin (C), and GAPDH (D). The protein quantification signal is higher with stain-free technology than with housekeeping genes (E).

Přenos na membránu



Blotování - přenos

- přenos difuzí



- „tank“ přenos



- „semi-dry“ přenos

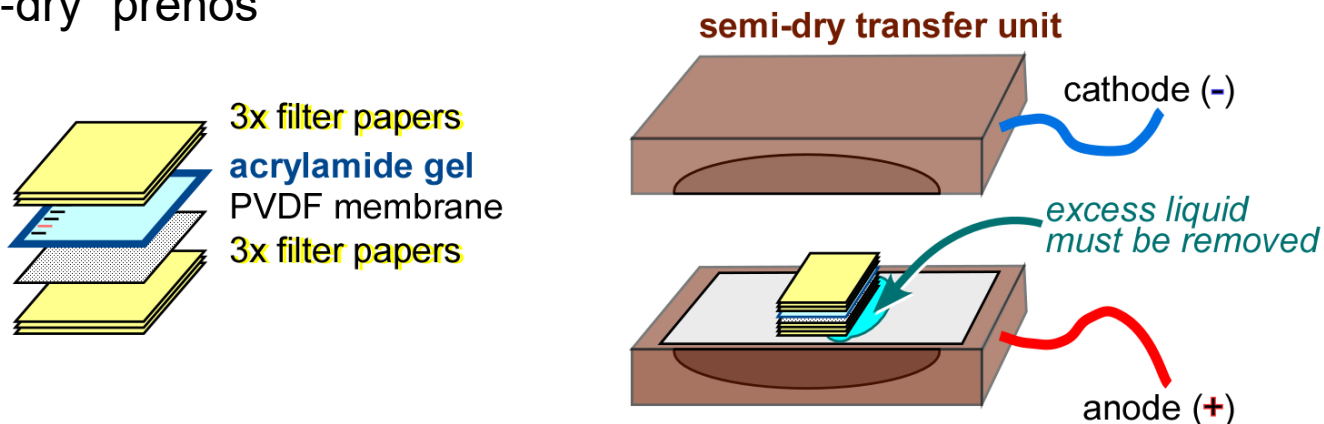


Table 2.1. Comparison of electrophoretic protein transfer systems.

	Tank Blotting	Semi-Dry Blotting	
		Traditional	Rapid
Transfer time	30 min–overnight	15–60 min	3–10 min
Handling convenience	Manual assembly of transfer components	Manual assembly of transfer components	Prepackaged, presaturated components
Transfer parameters	Widest range of power settings and transfer times	Power and transfer time limited due to lack of cooling options	Preinstalled, customizable programs for transfers of most proteins, user-programmable settings for traditional semi-dry techniques
Molecular weight range	Broad range	Best for 30–120 kD	Broad range
Temperature control	Cooling with ice pack or refrigerated water recirculator	None	None
Buffer requirement	1–12 L, system-dependent	250 ml per blot	No additional buffer required

Bio-Rad

Membrány

- nitrocelulosa - nejběžnější
- polyviniliden difluorid PVDF – vysoká vazebná kapacita
- nylon – nukleové kyseliny
- diazobenzyloxymethyl – chemická aktivace
- ionexové membrány - preparativní
- aktivovaná skleněná vlákna – pro přímou sekvenaci

Detekce

HYBRIDIZACE

- radioaktivní proba – vysoká senzitivita, Southern blot
- neradioaktivní proba – biotin – streptavidin, dioxigenin

REAKCE SE SUBSTRÁTEM

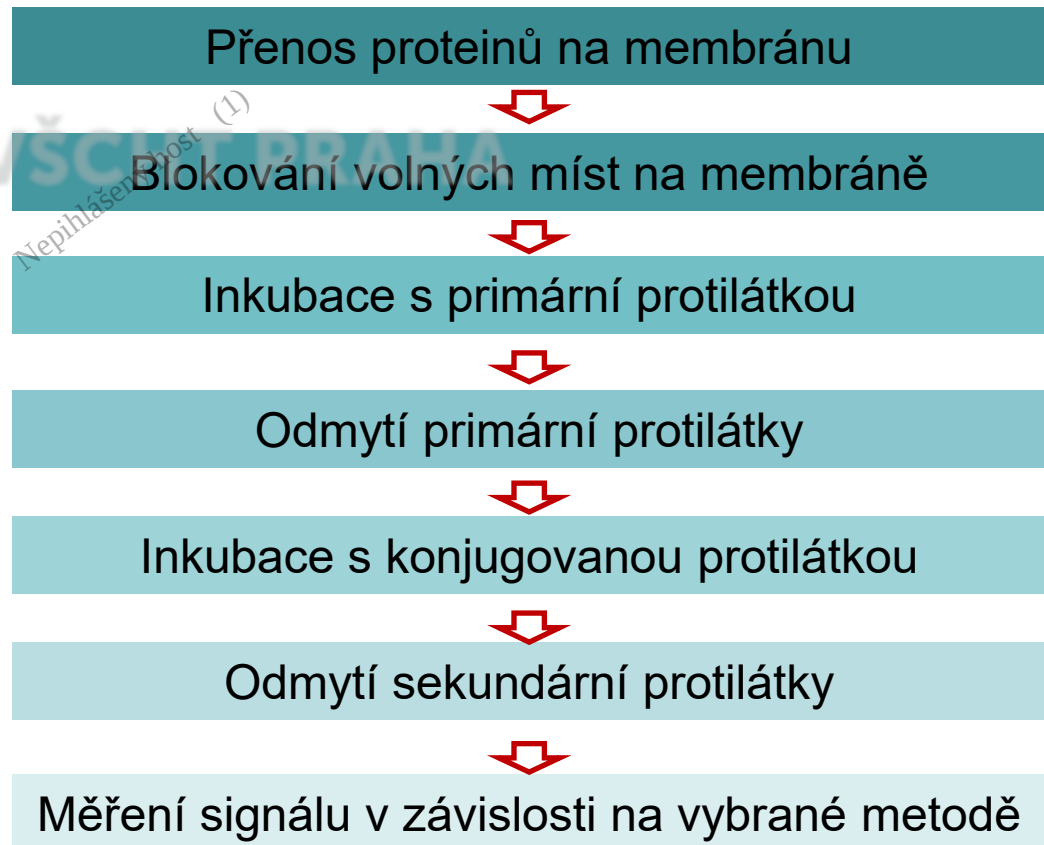
- nativní enzym, nedifundující substrát

IMUNOBLOT

^{125}I -protein A

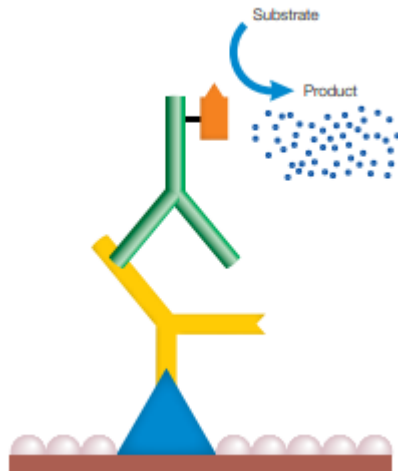
zlatem značená sekundární
protilátka (100 pg)

enzymem značená sekundární
protilátka – konjugace s
peroxidasou (tetrazoliová sůl),
alkalickou fosfatasou

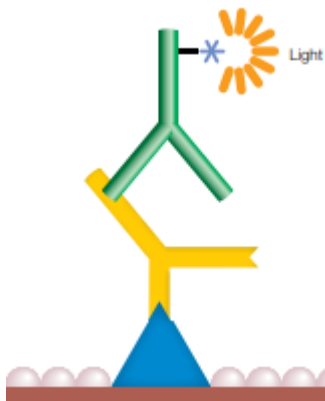


Substráty pro enzymem značenou sekundární protilátku

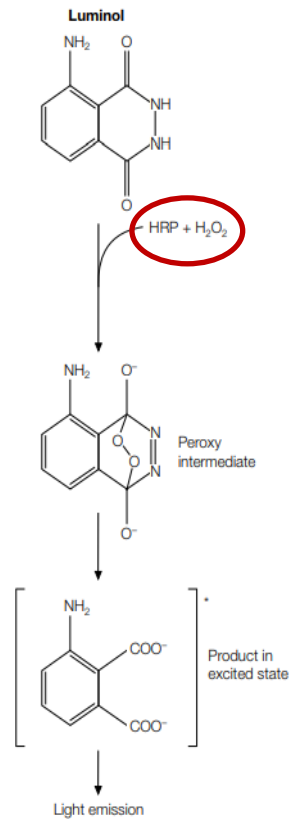
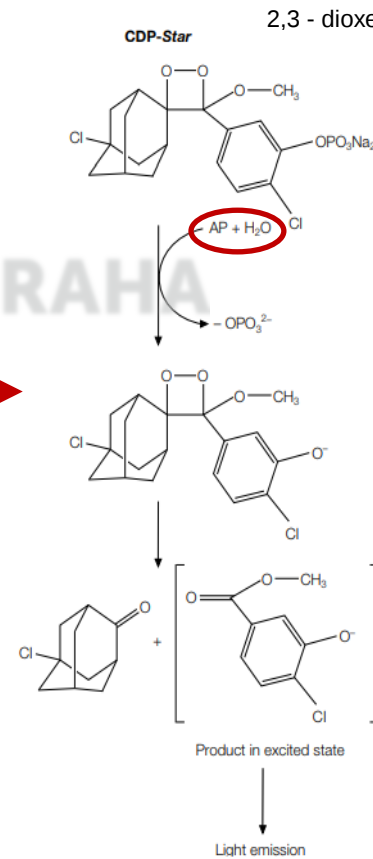
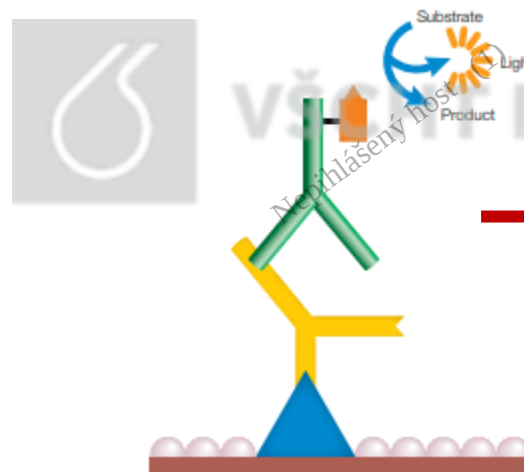
Kolorimetrické stanovení



Fluorescence



Chemiluminescence

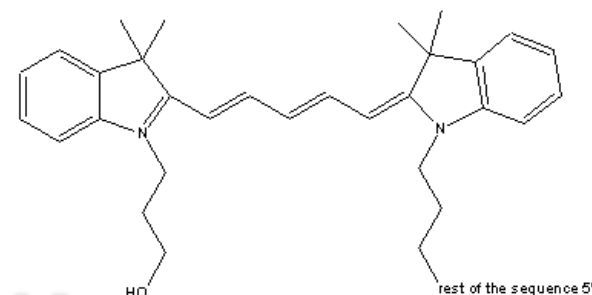
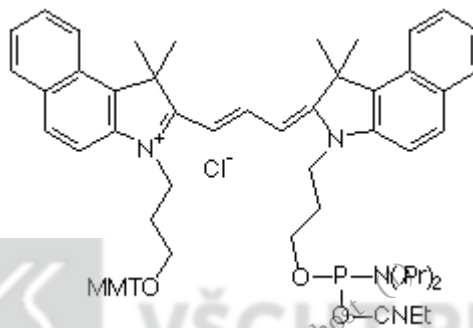


DIGE – DIFERENČNÍ GELOVÁ ELEKTROFORESA

Cy2

Cy3

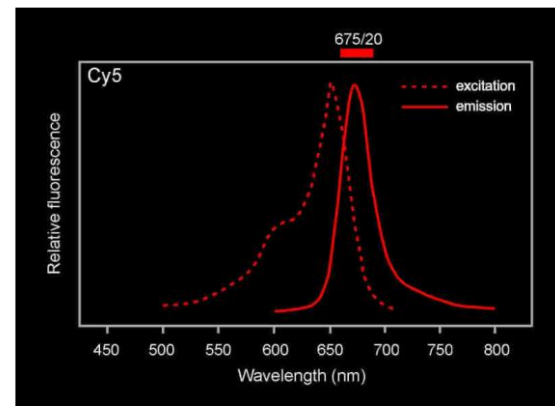
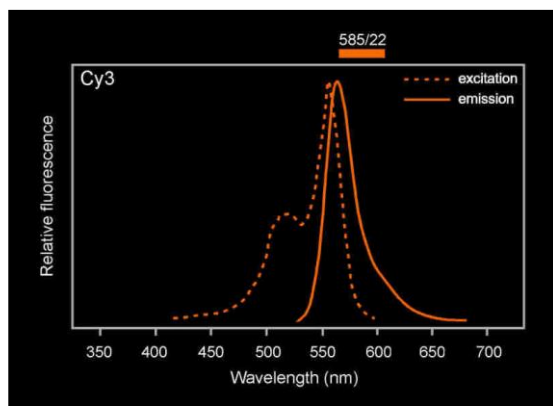
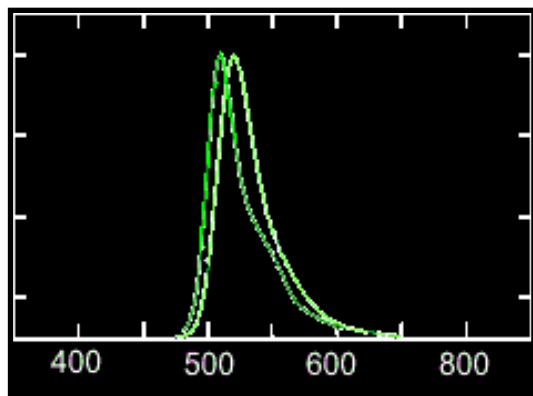
Cy5



excitace 488 nm
emise 520 nm

excitace 532 nm
emise 580 nm

excitace 633 nm
emise 670 nm



Isotachoforesa

- migrace všech iontů stejnou rychlostí
- separace složek jako „iontového vlaku“
- zonový zaostřovací efekt

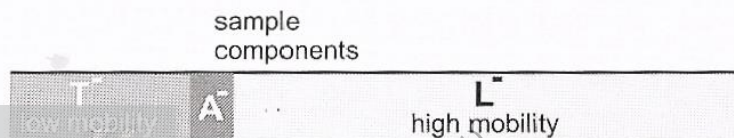
diskontinuální systém – vedoucí a terminační elektrolyt



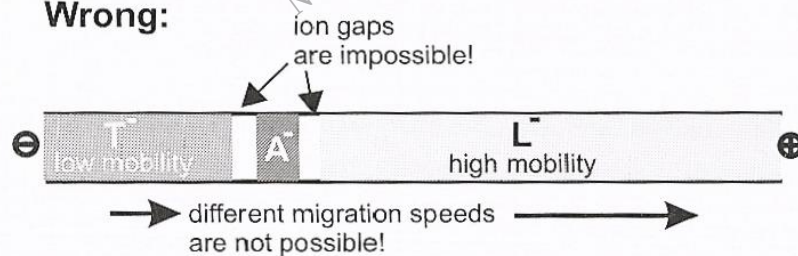
migrace všech iontů stejnou rychlostí

A: Same migration speed

Before start

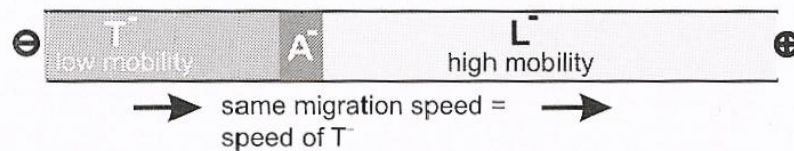


Wrong:



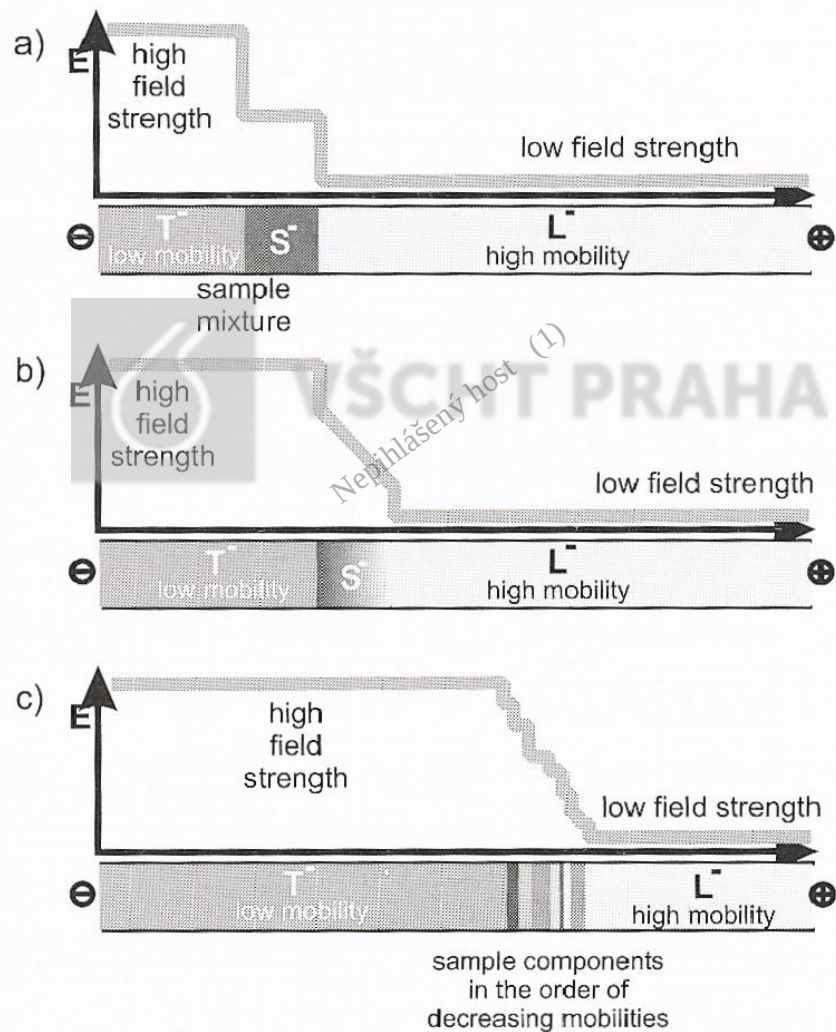
Right:

Also sample components conduct the current

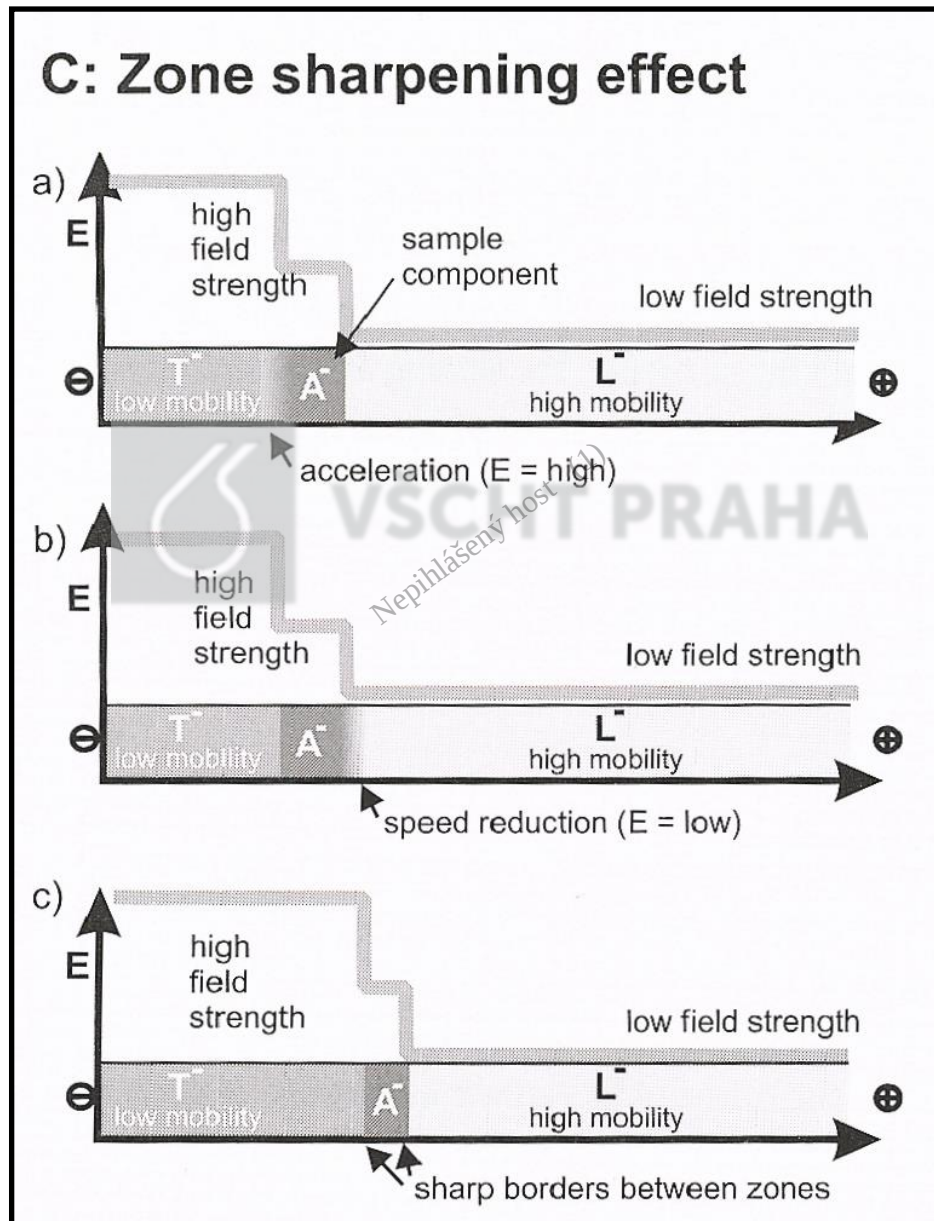


separace složek jako „iontového vlaku“

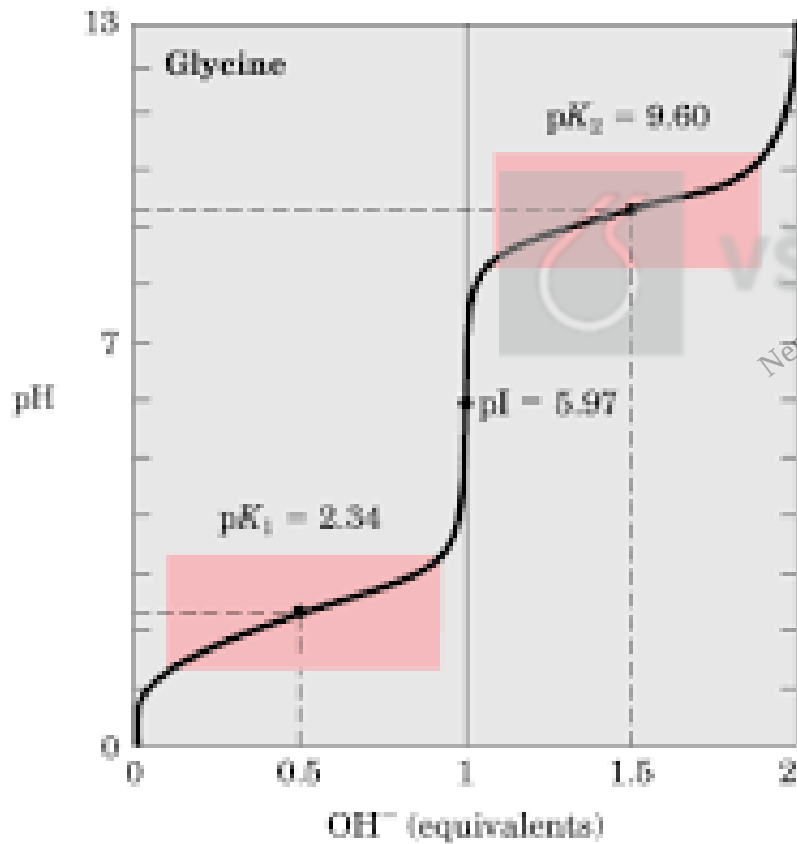
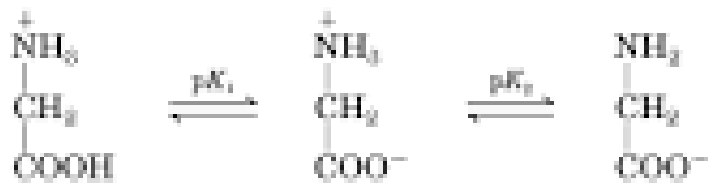
B: “Ion train” separation



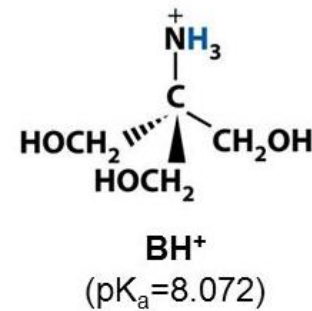
zonový zaostřovací efekt



TRIS/Gly elektrodový pufr



Tris buffer



Tris (hydroxymethyl)aminomethane

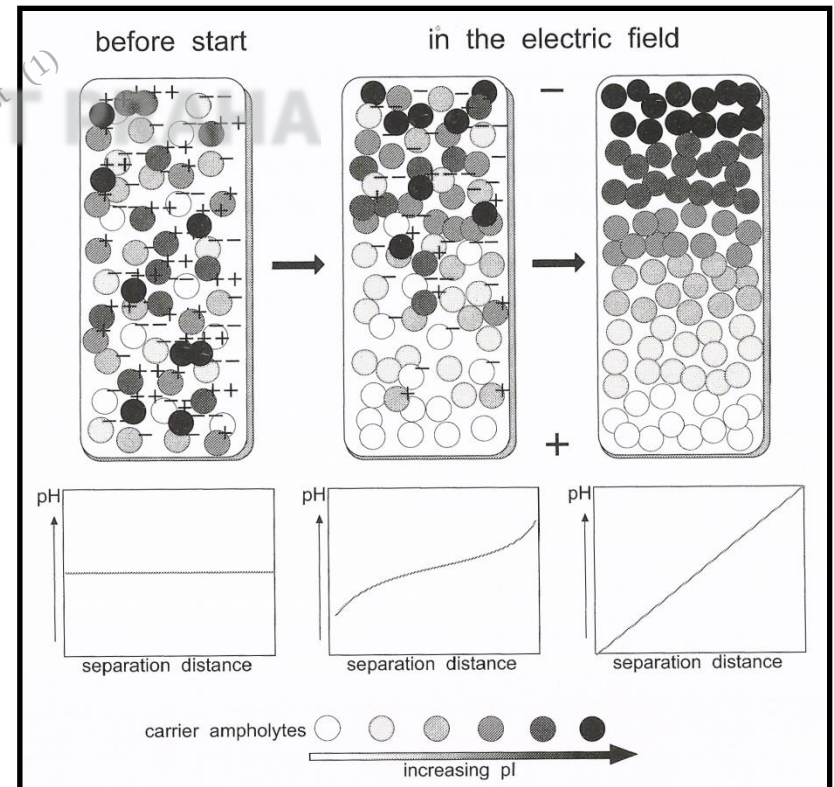
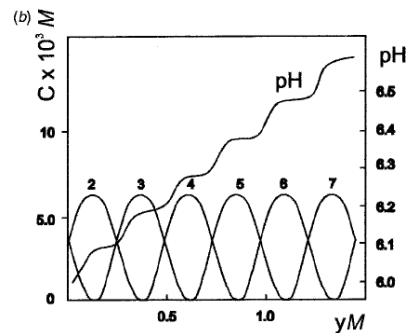
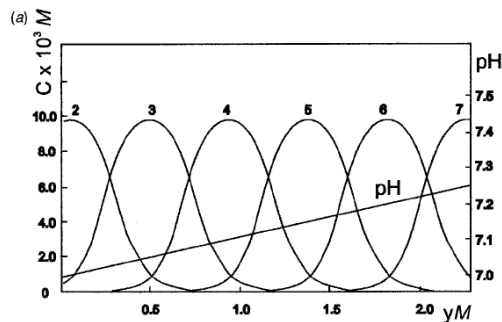
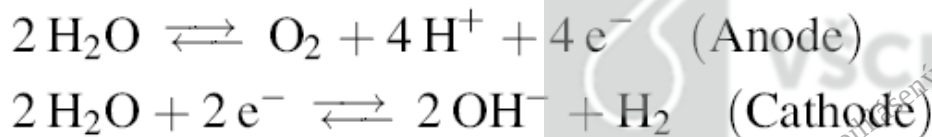
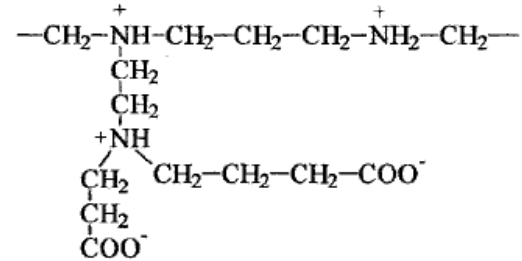
Nepřehlášený host (1)

VŠCHT PRAHA

Isoelektrická fokusace

- agarosa nebo polyakrylamid
- konstantní teplota - pK_a je závislé na teplotě – 10°C

- volné nosiče gradientu pH – pomocí ampholytů
- imobilisovaný gradient pH – lineární gradient dvou různých polymerizačních směsí – deriváty akrylamidu





Kapilární elektroforesa

Probrané elektromigrační metody mají tři hlavní nedostatky:

- značná produkce Jouleova tepla během elektroforesy, hodnota vloženého napětí je tím limitována, použití nižšího napětí - odtud časová náročnost
- detekce - nutné barvení po elektroforese
- je obtížné automatizovat



kapilární elektroforesa (CE)

metoda byla vyvíjena od počátku 80. let (Jorgensen a Lukacs), první komerční přístroj se objevil v roce 1988

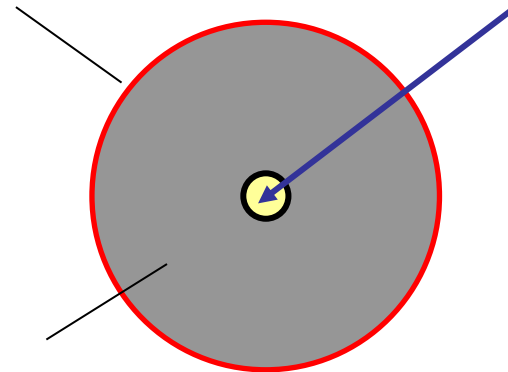
Způsoby provedení kapilární elektroforesy

- kapilární zonální elektroforesa
- kapilární gelová elektroforesa
- kapilární izoelektrická fokusace
- kapilární izotachoforesa
- micelární elektrokinetická chromatografie

Kapilára

- tavený křemen
- ochranný polyimidový povlak
- délka 25 – 100 cm
- vnitřní průměr 25 – 100 μm
- vnitřní povrch lze modifikovat

polyimidový povlak



tavený křemen



Nepřihlášený host (1)
VŠCHT PRAHA

Detekce

- UV/Vis absorpce
- fluorescence
- radiometrie
- MS

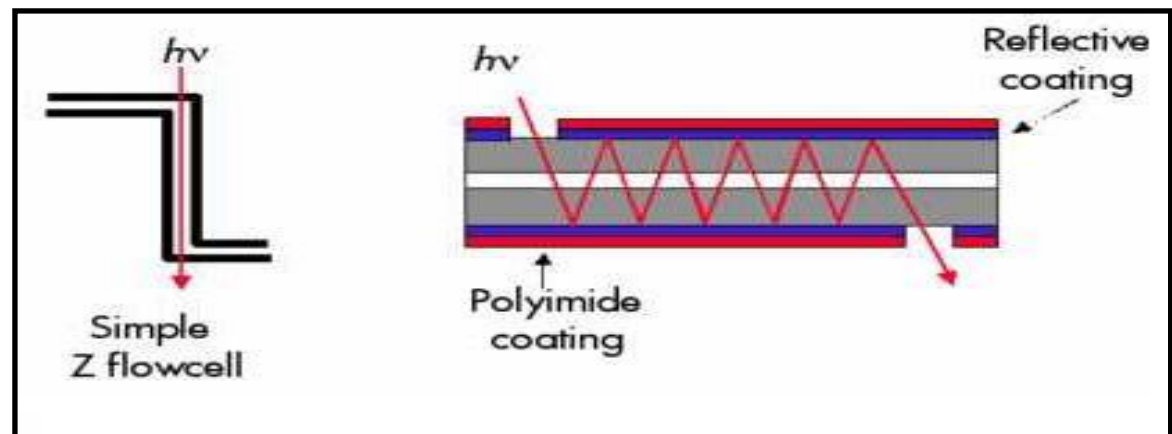
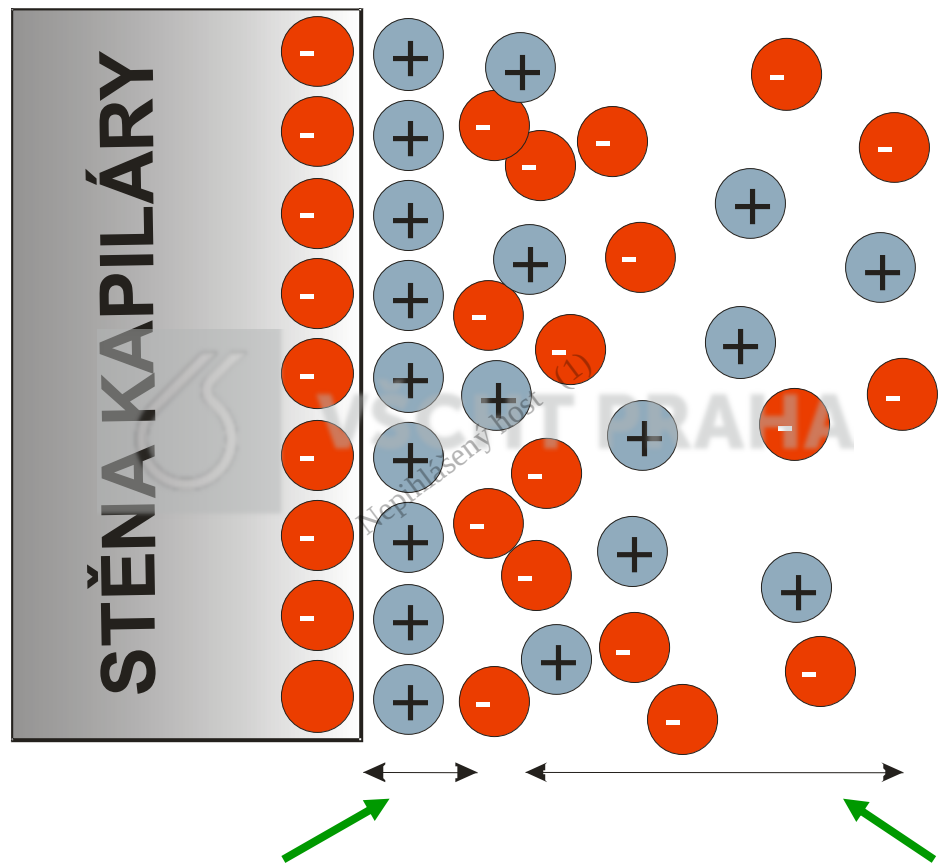


TABLE 12.1. Detectors Used in Capillary Zone Electrophoresis Instruments^a

Classification	Property Measured	Detection Limit (mol)
Optical	Absorbance	10^{-15} – 10^{-13}
	Fluorescence	
	(a) Precolumn derivatization	10^{-21} – 10^{-17}
	(b) On-column derivatization	8×10^{-16}
	(c) Postcolumn derivatization	2×10^{-17}
	Indirect fluorescence	5×10^{-17}
	Thermal lensing	4×10^{-17}
Electrochemical	Raman	2×10^{-15}
	Conductivity	1×10^{-16}
	Current (amperometry)	7×10^{-19}
Radiochemical	³² P Emission	1×10^{-19}
Mass	Electrospray ionization MS	1×10^{-17}

^a See Ref. 1. Reprinted, with permission, from A. G. Ewing, R. A. Wallingford, and T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.* **61**, 1989, 292A–301A. Copyright © 1989 American Chemical Society.

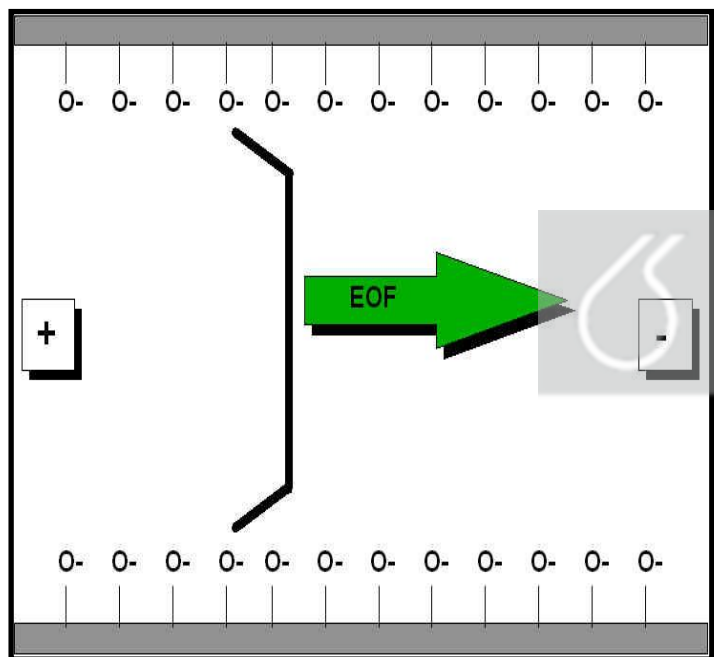


stacionární vrstva (Sternova)

mobilní vrstva (Guy-Chapmanova)

princip: pohyb podle velikosti náboje + elektroosmotický tok

Lineární elektroforetická rychlost



$$v_e = \mu_e \cdot E = \mu_e \cdot \frac{U}{L} \quad t = L / v_e = \frac{L^2}{\mu_e \cdot U}$$

- v_e ... rychlost toku
 μ_e ... elektroforetická pohyblivost
 E ... intenzita elektrického pole
 U ... napětí
 L ... délka kapiláry

Elektroosmotický tok

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \cdot \varepsilon}{4 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

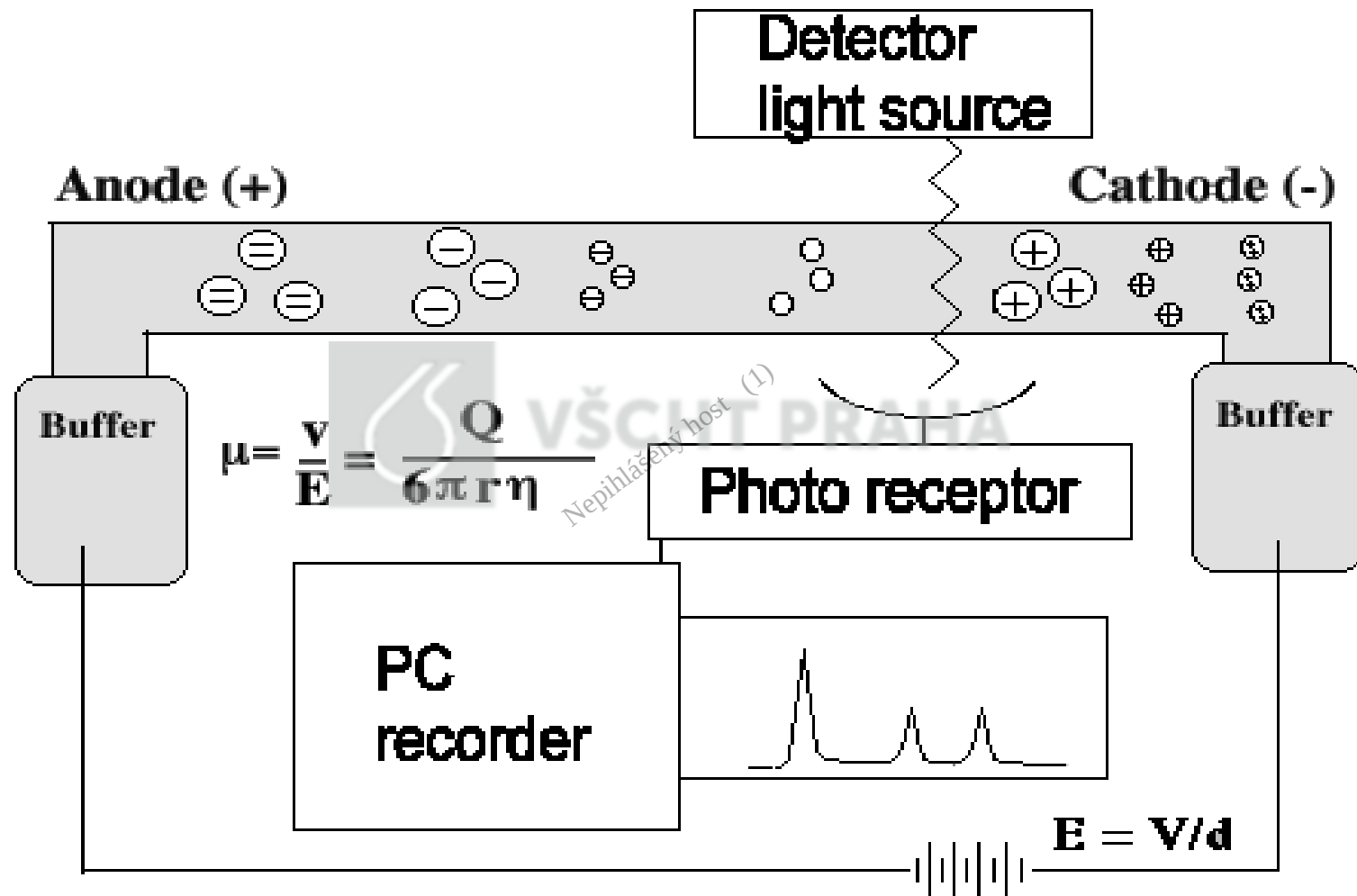
$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

μ_{EOF}	... elektroosmotická pohyblivost
ζ	... zeta potenciál
ε	... dielektrická konstanta
η	... viskozita elektrolytu
r	... poloměr kapiláry

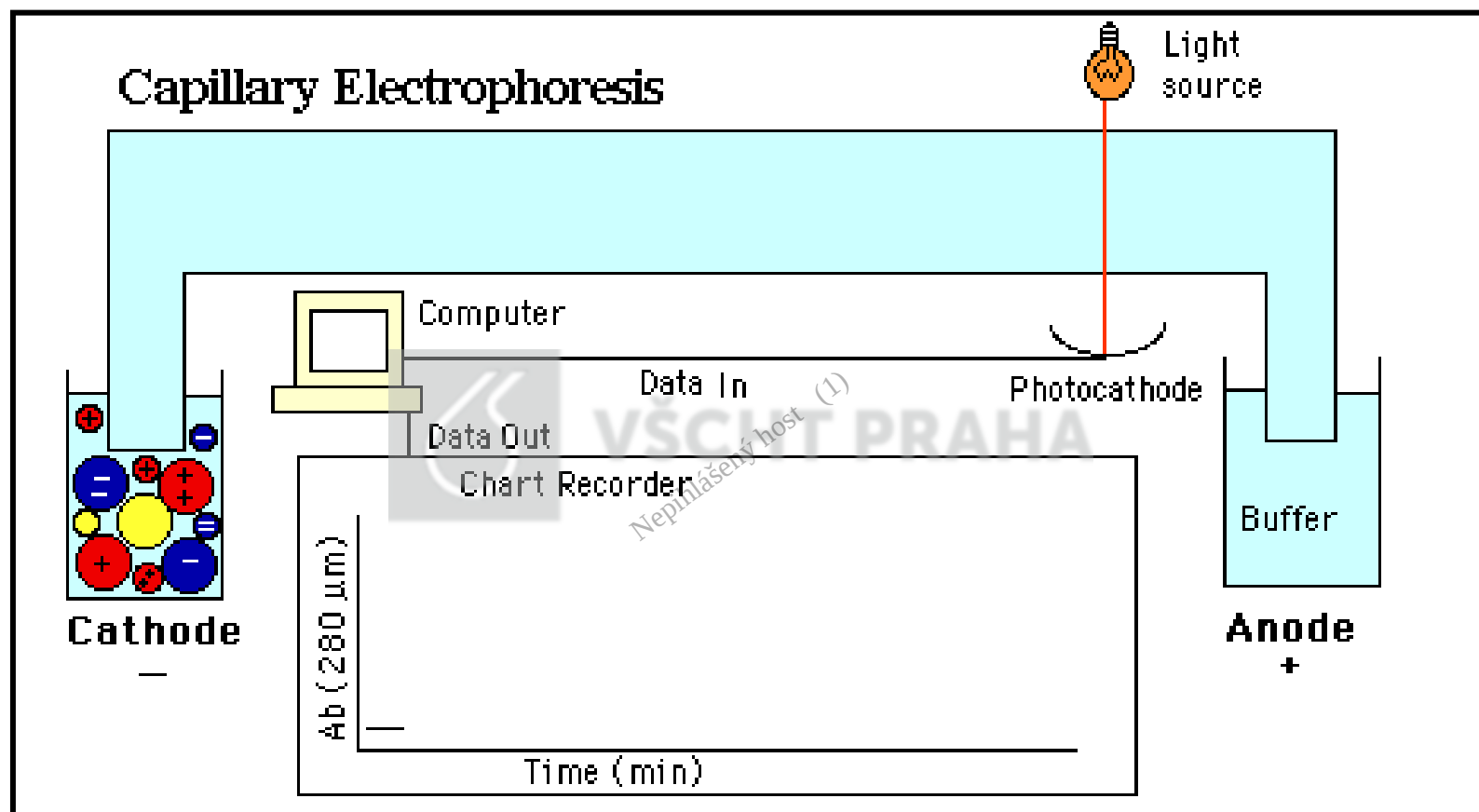
Celková rychlost pohybu analytu

$$\mu = \mu_e + \mu_{EOF}$$

$$v = (\mu_e + \mu_{EOF}) \cdot E = (\mu_e + \mu_{EOF}) \cdot \frac{U}{L} \quad t = L / v = \frac{L^2}{(\mu_e + \mu_{EOF}) \cdot U}$$



Kapilární zonální elektroforesa





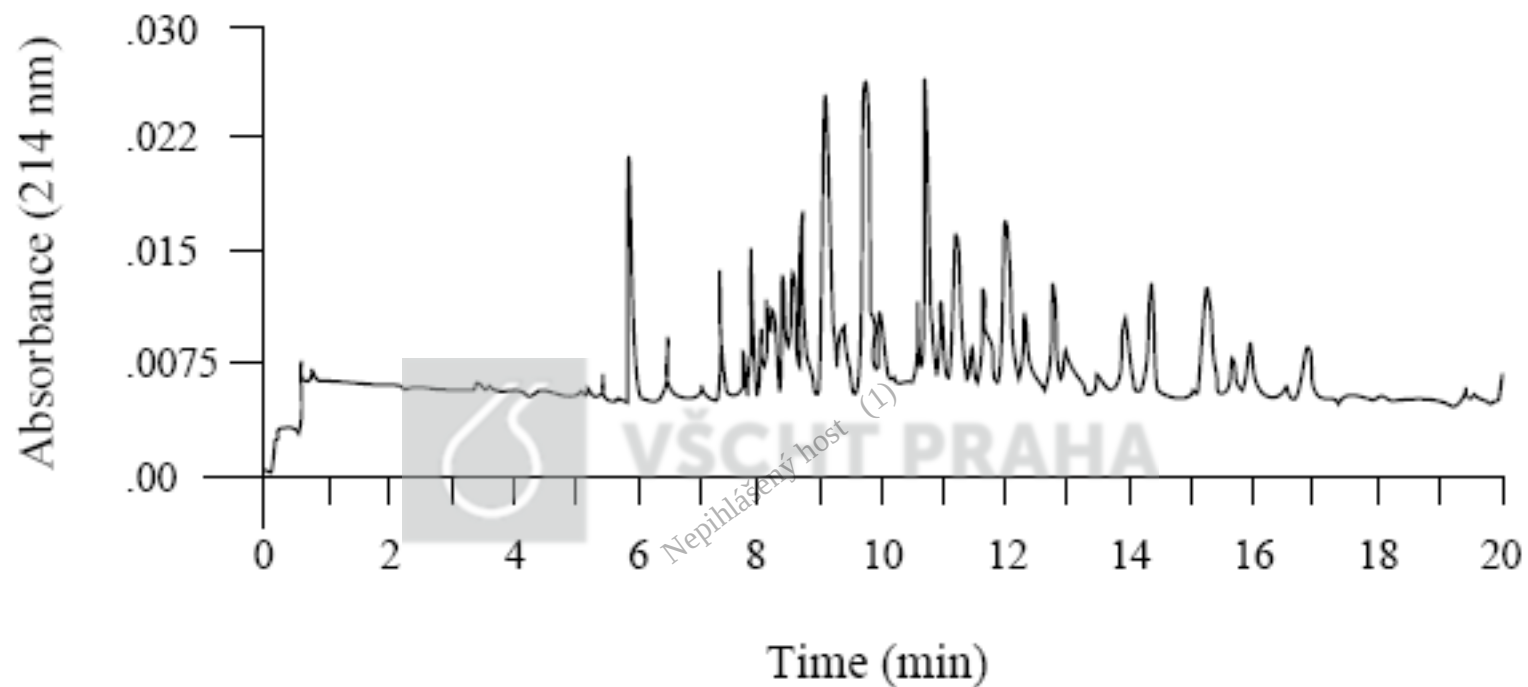


Figure 6. CZE Separation of a Tryptic Digest of Reduced, Denatured and Alkylated Bovine Serum Albumin. Buffer, 21 mM sodium phosphate (monobasic), 1.5 M urea, pH 2.5; capillary, 59 cm. Courtesy of R. Rush, A. Cohen, and B. Karger, Northeastern University.

Analyte	Buffer	Reference
Dipeptides/proteins	150 mM H ₃ PO ₄ , pH 1.5	<i>Anal. Chem.</i> 60, 2322 (1988)
Angiotensin II octapeptides	150 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3.0	<i>Anal. Chem.</i> 60, 2322 (1988)
Tryptic digest	12.5 mM phosphate, pH 6.86	<i>J. Chromatogr.</i> 352, 337 (1986)
β-Lactoglobulin	50 mM borate, 50 mM KCl	<i>J. Chromatogr.</i> 447, 117 (1988)
Carbonic anhydrase		
Whale skeletal myoglobin		
Myoglobins	10 mM tricine, 40 mM KCl, pH 8.24	<i>Anal. Chem.</i> 58, 743a (1986)
Carbonic anhydrases		
β-Lactoglobulins		
Horse heart myoglobin	10 mM borate, 40 mM KCl, pH 9.5	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 157 (1989)
Endorphins	20 mM citrate, pH 2.5	<i>Anal. Chem.</i> 61, 1186 (1989)
Ribonucleases	20 mM CAPS, pH 11.0	<i>Anal. Chem.</i> 61, 1186 (1989)
Immune complexes	0.1 M tricine, pH 8.0	<i>Anal. Chem.</i> 61, 1186 (1989)
Tobacco mosaic virus	2 mM potassium borate	<i>Anal. Chem.</i> 62, 1592 (1990)
Adenosine-5' [α - ³² P]triphosphate	200 mM borate, pH 8.1	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 259 (1989)
Lysozyme, α-chymotrypsin	0.1 M CHES, 0.25 M K ₂ SO ₄ , pH 9	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 301 (1989)
Nucleoside phosphates	40 mM glutamic acid/GABA	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 321 (1989)
Collagens	2.5 mM sodium tetraborate	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 371 (1989)
Membrane proteins	0.2 M borate, 7 M urea, pH 9.2	<i>J. Chromatogr.</i> 516, 89 (1990)
Human growth hormone	100 mM phosphate, pH 2.6, pH 8	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 379 (1989)
Anions	25 mM salicylate, pH 4	<i>J. Chromatogr.</i> 480, 169 (1989)

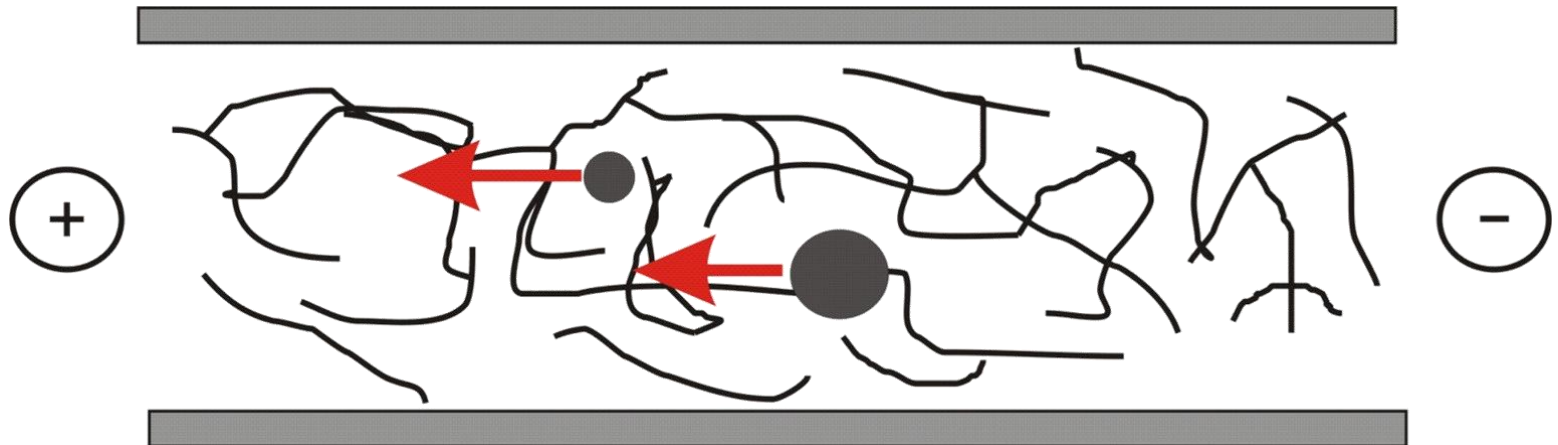


CE Czech.swf

C:\Users\karasovp\AppData\Local\Temp\C
ECZEC~1.SWF

Kapilární gelová elektroforesa

- na základě velikosti – polymerní síta (agarosa, bis-polyakrylamid, methylcelulosa)
- kapilára je naplněna gelem - zvyšuje rozdíly mezi elektroforetickými rychlostmi velkých iontů různých tvarů, které jsou nuceny migrovat póry gelu
- nevzniká elektroosmotický tok - lze dělit pouze jeden druh iontů
- používá se pro velké ionty jako peptidy, bílkoviny, sacharidy, štěpy DNA a RNA



Dodnes však nenahradila klasickou gelovou vertikální a horizontální elfo.

Výhody:

- vysoká rychlost průchodu vzorku
- přímá kvantifikace
- možnost automatizace

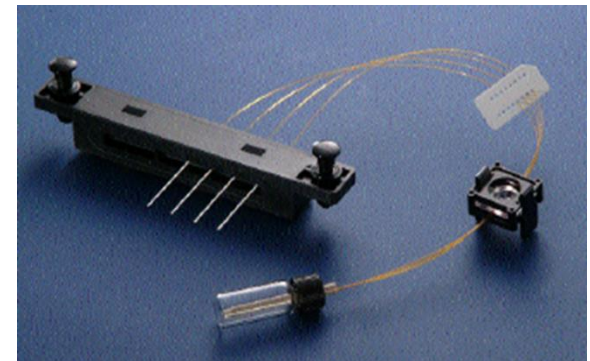
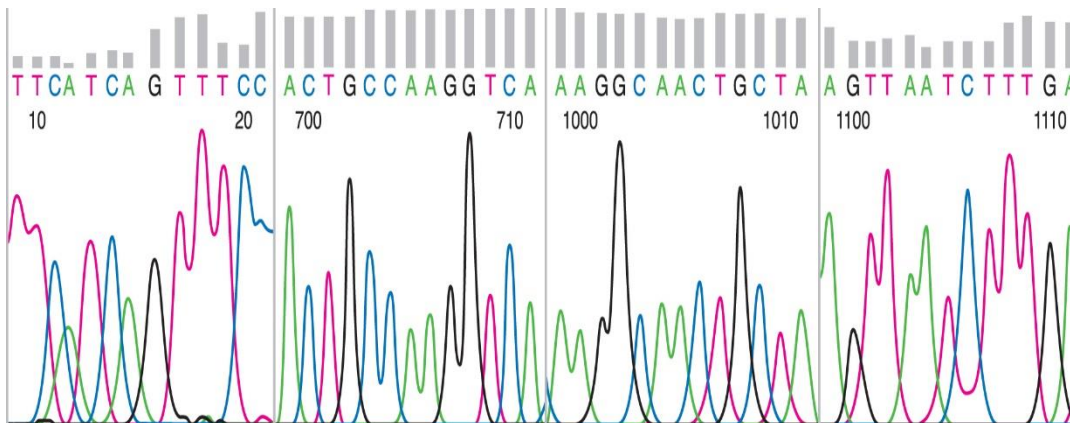
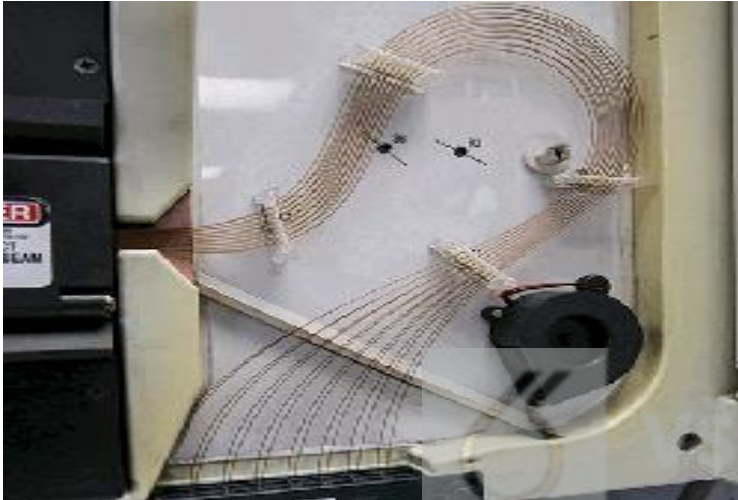
Nevýhody:

- drahé přístrojové vybavení

Pro sekvenování DNA se na přístroji Applied Biosystems 3730 DNA analyzer paralelně používá 96 kapilár, to umožňuje až 1000 analýz za 24 hodin.

PAA gely pro proteiny, PAA a agarosové gely pro nukleové kyseliny. Modifikace při přípravě gelů (lineárně polymerovaný PAA), možnost použití řidších gelů oproti konvenčním.

- kapilární elektroforesa



Kapilární isoelektrická fokusace

- dělí molekuly mající amfolytickou povahu na základě jejich rozdílných isoelektrických bodů pI
- dělicí kapilára se naplní roztokem dělených amfolytických látek a pomocného amfolytu, který je schopen pufovat celý rozsah pH
- z opačných konců migrují do kapiláry OH^- a H^+ ionty, které v ní vytvářejí spojitý lineární pH gradient
- dělené molekuly (ionty) putují roztokem dokud nedosáhnou pH , které se rovná jejich pI vytvoří úzkou zónu (fokusují)
- po fokusaci se zóny mobilizují (uvedou do pohybu), aby prošly detektorem a byly detekovány
- kapilární izoelektrické fokusování je použitelné pouze pro amfolytické molekuly

Kapilární izotachoforesa

- dělí ionty na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit
- roztok dělených iontů je dávkován jako rozhraní dvou rozdílných pufrů – vedoucí, terminační iont
- každý separovaný iont vytváří během analýzy svoji vlastní zónu
- zóny všech dělených iontů jsou uzavřeny mezi vedoucí a terminační pufr a jsou seřazeny bezprostředně za sebou podle klesající elektroforetické pohyblivosti dělených iontů
- kapilární izotachoforéza je použitelná pouze pro molekuly s nábojem
- během jednoho experimentu lze dělit a detekovat pouze jeden druh iontů

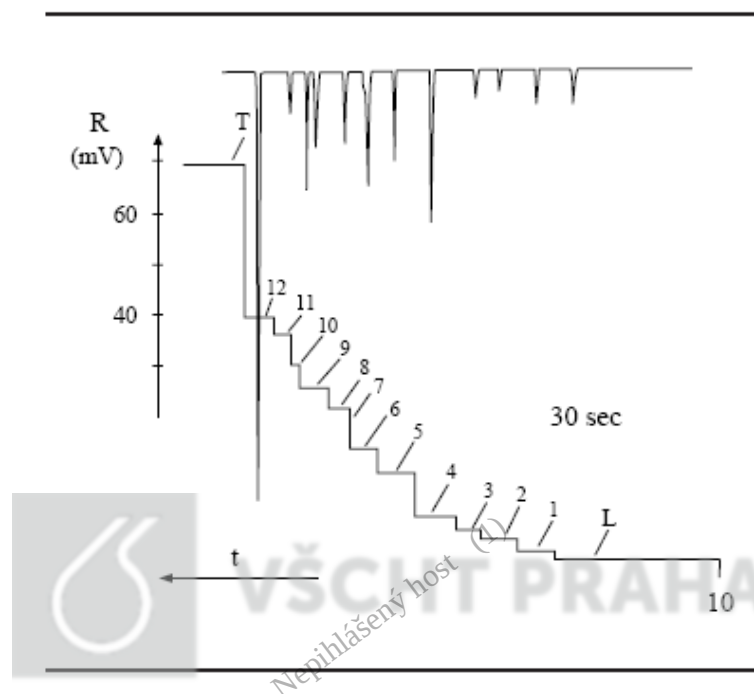
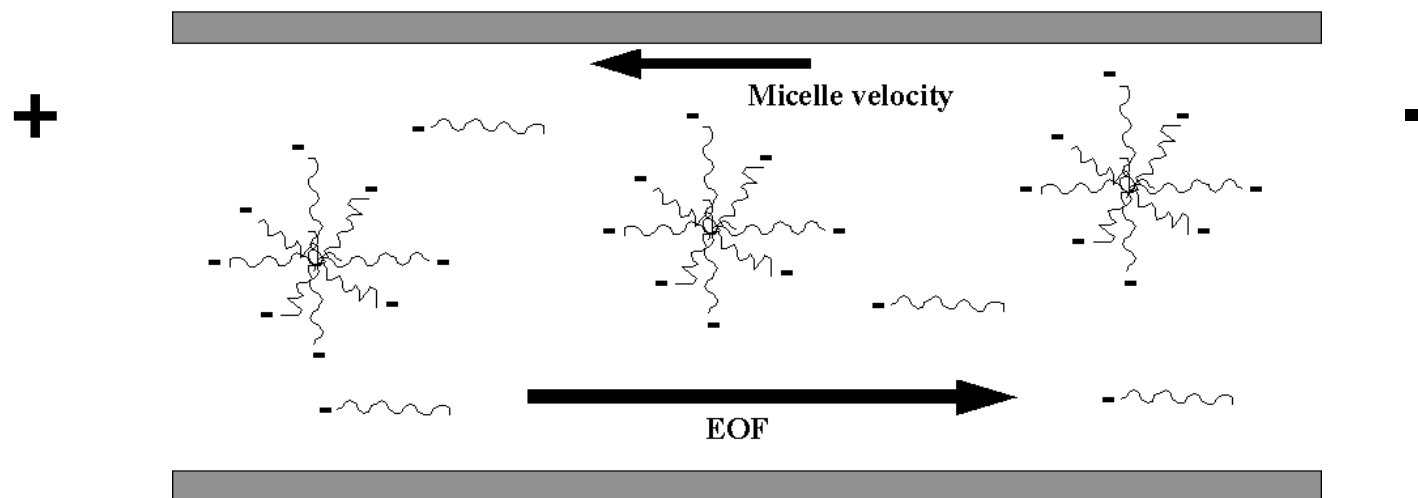


Figure 14. ITP of a Mixture of Anions with Conductivity Detection. Capillary, 105 μm i.d. fluorinated ethylene-propylene copolymer; leader, 10 mM hydrochloric acid titrated to pH 6.0 with histidine, 2 mM hydroxyethylcellulose; terminator, 5 mM MES; driving current, 10 μA . Key: R, signal on conductivity meter (increasing resistance); L, chloride; 1, sulfate; 2, chlorate; 3, chromate; 4, malonate; 5, adipate; 6, benzoate; 7, impurity; 8, acetate; 9, β -bromopropionate; 10, naphthalene-2-sulfonate; 11, glutamate; 12, enantate; T, MES. Reproduced in part from J. Chromatogr., 267, 67 (1983) (Fig. 3).

Micelární elektrokinetická chromatografie

- dělení elektroneutrálních látek (hydrofobní a hydrofilní) na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodní a micelární fází
- povrchově aktivní látka přidána do pufru (detergent, např. SDS, deoxycholát sodný, CTAB)
- koncentrace detergentu musí být větší než je **kritická micelární koncentrace** (CMC).
- povrchově nabitě micely migrují uvnitř pufru vlastní elektroforetickou rychlostí a unášejí molekuly a ionty separovaných sloučenin, které jsou více či méně přítomny uvnitř hydrofobních dutin micel
- stupeň solvatace molekul micelami udává rychlost unášení těchto molekul micelami



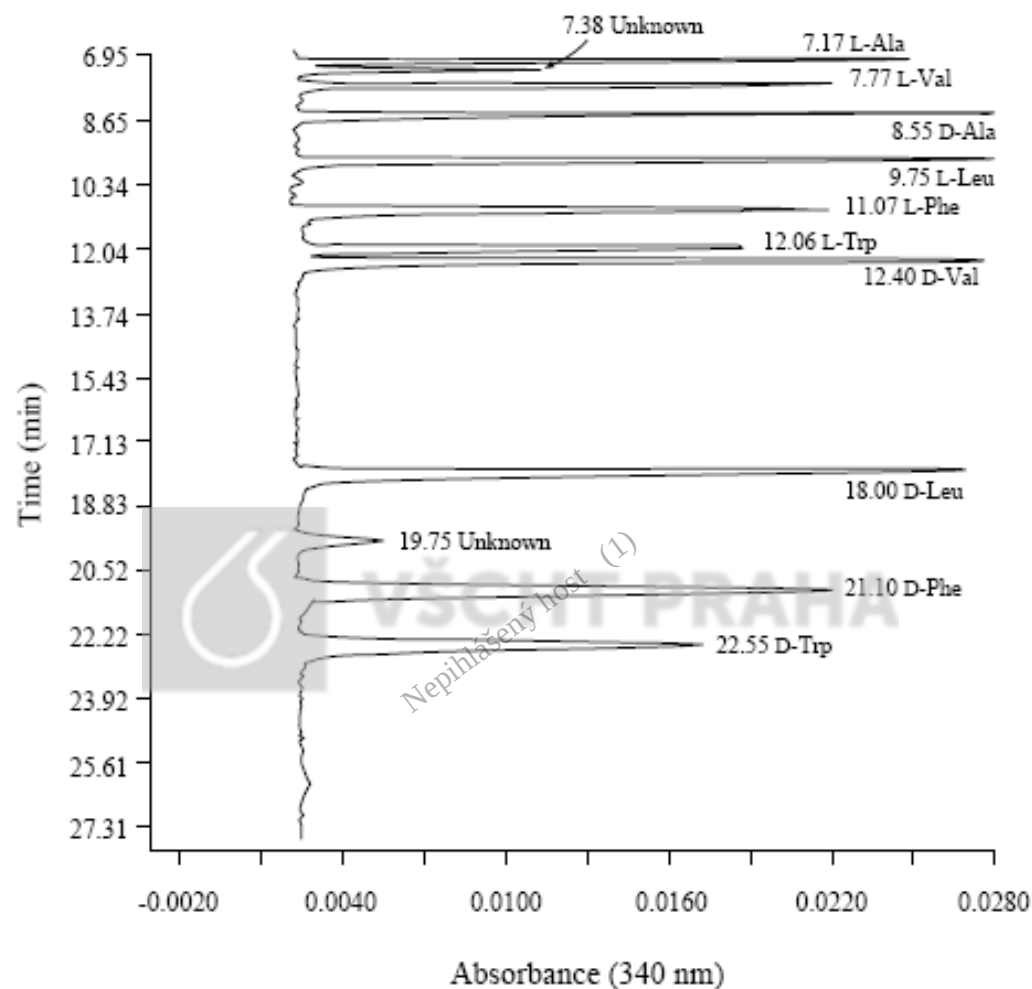


Figure 17. Separation of Chiral Amino Acids Derivatized with Marfey's Reagent. Buffer, 100 mM sodium borate, 200 mM SDS, 5% acetonitrile, pH 8.5.

Small Ions	Small Molecules	Peptides	Proteins	Oligonucleotides	DNA
CZE ITP	MECC CZE ITP	CZE MECC IEF CGE ITP	CZE CGE IEF ITP	CGE MECC	CGE

Možné změny parametrů

Zmenšení průměru kapiláry umožňuje použití vyššího napětí (lepší odvod tepla). Zvýší se rozlišení a sníží doba analýzy. Snížením průměru se ale sníží tloušťka optické dráhy detektoru, tím poklesne citlivost detekce.

Prodloužení kapiláry umožňuje opět použití vyššího napětí, avšak prodlouží se doba analýzy, vyšší difuze.

Důležitá je volba vhodného pufru. S rostoucí iontovou silou roste vodivost, ale i produkce tepla.