

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie

Studijní obor: Chemie



Bc. Kateřina Lorinčíková

Stanovení a porovnání elektromigračních vlastností markerů pro
izoelektrickou fokusaci

The Determination and Comparison of the Electromigration Properties
of Markers for Isoelectric Focusing

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Praha, 2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Stanovení a porovnání elektromigračních vlastností markerů pro izoelektrickou fokusaci vypracovala pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne

.....
podpis

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za vstřícné a trpělivé vedení. Dále bych chtěla vzdát díky Mgr. Martinu Ansorgemu za zcela neocenitelnou pomoc při plánování a vyhodnocování práce. Nakonec bych poděkovala všem členům laboratoře ECHMET za poskytnutí příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Byly proměřeny závislosti elektroforetické mobility na pH pro 14 pI markerů využívaných pro izoelektrickou fokusaci připravených skupinou Šlais, které jsou založené na substitucích na nitrofenolovém jádře, a pro 5 pI markerů připravených Shimurou, které mají strukturu oligopeptidů. Pomocí programu AnglerFish byly z těchto závislostí získány termodynamické disociační konstanty a limitní elektroforetické pohyblivosti daných látek. Ze získaných hodnot byly následně vypočítány hodnoty pI příslušných markerů. Provedlo se srovnání získaných hodnot pI s těmi, jež jsou uváděny v literatuře, avšak byly stanoveny jinými analytickými metodami.

Klíčová slova

kapilární zónová elektroforéza, izoelektrická fokusace, pI markery, izoelektrický bod, termodynamická disociační konstanta, limitní iontová pohyblivost

Abstract

The dependencies of electrophoretic mobility on pH were measured for a set of 14 markers used for isoelectric focusing that were developed by the group of Šlais and that are based on substitutions on the nitrophenol core, and for a kit consisting of 5 pI markers developed by Shimura, which have an oligopeptide structure. The dissociation constants and limiting electrophoretic mobilities of these compounds were obtained from the dependencies with the use of the program AnglerFish. The isoelectric point values of the compounds were consequently calculated using the obtained data. A comparison of the obtained pI values with the values that have been declared in literature, albeit gained by different analytical methods, has been made.

Key Words

capillary zone electrophoresis, isoelectric focusing, pI markers, isoelectric point, thermodynamic dissociation constant, limiting ionic mobility

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Seznam použitých symbolů	9
1 Úvod	10
2 Přehled dosavadního stavu poznání	11
2.1 Kapilární zónová elektroforéza	11
2.2 Doprovodné jevy	11
2.2.1 Elektroosmotický tok	11
2.2.2 Systémové zóny	12
2.2.3 Disperze zón	12
2.3. Korekce na iontovou sílu	13
2.3.1 PeakMaster	13
2.3.2 AnglerFish	14
2.4 Izelektrická fokusace	15
2.4.1 Historie	15
2.4.2 Princip	15
2.4.3 Typy IEF	16
2.4.5 Gradient pH při IEF	16
2.4.6 Nosné amfolyty	16
2.4.7 Příprava gradientu	17
2.4.8 Úskalí	18
2.5 Významné parametry	19
2.5.1 Izelektrický bod	19
2.5.2 Izomobilitní bod	19
2.5.3 Výpočet chyby měření	20
2.5.4 Parametr $-dz/dpH$	21
2.6 pI markery	22
2.6.1 Typy markerů	23
2.6.2 Šlaisovy markery	23
2.6.3 Shimurovy markery	28
3 Cíle práce	29
4 Experimentální část	30

4.1 Využité chemikálie a přístroje	30
4.2 Měření Šlaisových markerů	32
4.2.1 Experimentální podmínky a postupy	32
4.2.2 Výsledky měření	35
4.2.3 Vyhodnocení v programu AnglerFish	38
4.3 Měření Shimurových markerů	44
4.3.1 Experimentální podmínky a postupy	44
4.3.2 Výsledky měření	45
4.3.3 Vyhodnocení v AnglerFish	46
4.4 Diskuze a srovnání	50
5 Závěr	53
6 Použitá literatura	54

Seznam použitých zkratk

CZE	kapilární zónová elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
EOF	elektroosmotický tok
UV-Vis	ultrafialová a viditelná část spektra
PB	hexadimethrin bromid (polybren)
DMSO	dimethylsulfoxid
MES	kyselina 2-morfolinethansulfonová
MOPS	kyselina 4-morfolinpropansulfonová
CHES	kyselina 2-(cyklohexaamino)ethansulfonová
HVL	Haarhoff-Van der Lindeho funkce
FC	fluorocarbon
IEF	izoelektrická fokusace
cIEF	kapilární izoelektrická fokusace

Seznam použitých symbolů

pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
$\text{p}K_{\text{A}}$	disociační konstanta
$\text{p}I$	izoelektrický bod
$\text{p}I_{\text{mob}}$	izomobilitní bod
z	náboj
I	iontová síla
γ	aktivitní koeficient
μ_{eff}	efektivní elektroforetická pohyblivost (mobilita)
μ_{lim}	limitní elektroforetická pohyblivost (mobilita)
σ	směrodatná odchylka
c	koncentrace
β	pufrální kapacita
t	čas

1 Úvod

Pro separaci bílkovin a zjištění jejich acidobazických vlastností se běžně využívá izoelektrické fokusace. Tato metoda se zakládá na srovnání fokusovaných zón analytů se zónami tzv. *pI* markerů, amfolytických látek s jasně daným a ostrým přechodem závislosti náboje na pH přes izoelektrický bod. Za tímto účelem byla vyvinuta celá řada strukturně odlišných látek, z nichž mnohé se komerčně prodávají.

Izoelektrické body těchto látek se mnohdy určovaly pomocí metod s nižší citlivostí oproti kapilární zónové elektroforéze anebo srovnáním s jinými dříve stanovenými *pI* markery. Proto je pro ověření jejich správnosti vhodné tyto hodnoty potvrdit měřením na kapilární zónové elektroforéze, která při dostatečně precizní práci umožňuje s vysokou přesností stanovit izoelektrický a izomobilitní bod.

Přesnost stanovení dále zvyšuje využití programu AnglerFish, vyvinutého Michalem Malým [1], který efektivní mobility analytu naměřené při jednotlivých pH koriguje na nulovou iontovou sílu základního elektrolytu, a až poté provádí proložení dle Henderson-Hasselbachovy rovnice, které umožňuje stanovení jednotlivých limitních mobilit a termodynamických disociačních konstant elektrolytu.

Analyty zde představovalo 14 *pI* markerů vyvinutých Šlaisem [2]. Jelikož Šlais pro stanovení *pI* použil kapilární izoelektrickou fokusaci (cIEF) a kombinaci potenciometrické titrace s gelovou izoelektrickou fokusací (IEF), přičemž se jako markerů pro srovnání využilo sady *pI* markerů vyvinutých Shimurou [3], přistoupili jsme rovněž k ověření hodnot *pI*, jež se udávají pro tyto markery.

2 Přehled dosavadního stavu poznání

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je elektromigrační separační metoda, která umožňuje rozdělit ionty na základě jejich odlišné elektroforetické pohyblivosti v elektrickém poli. Zpravidla se jako separační prostředí využívá křemenná kapilára naplněná základním elektrolytem (BGE), který má za úkol udržet stabilní pH. Mezi oběma konci kapiláry je pak udržované elektrické pole o intenzitě zpravidla 5-30 kV/m [4]–[6].

Tuto metodu lze využít pro separaci celé řady ionogenních látek, zejména nachází uplatnění při analýze léčiv [7] a peptidů [5]. Její předností je nízká spotřeba vzorku, vysoká rychlost analýzy a vysoká separační účinnost. Za nevýhodu se běžně považuje nízká opakovatelnost pro naměření migračních časů, ovšem přidáním markeru elektroosmotického toku do roztoku analytu zajistíme, že údaje o látce získáváme z efektivních elektroforetických pohyblivostí, které jsou rozumně opakovatelné. Často se pro zlepšení informační hodnoty využívá v kombinaci s dalšími metodami, jako je hmotnostní spektroskopie [5], [8].

CZE se rovněž využívá pro stanovení fyzikálně-chemických konstant látek, jakými jsou disociační konstanty, elektroforetické pohyblivosti, komplexační konstanty, aj. [9], [10]. Jelikož je teorie chování iontů v elektrickém poli velice dobře popsána, byla vyvinuta řada programů, které umožňují předvídat chování systému při analýze a nalézt vhodné podmínky pro měření [11]–[13].

2.2 Doprovodné jevy

2.2.1 Elektroosmotický tok

Mimo elektromigrace iontu v elektrickém poli dochází při kapilární elektroforéze k celé řadě dalších jevů. Z nich nejdůležitější je elektroosmotický tok (EOF).

Při CZE se měření zpravidla provádí v křemenné kapiláře, tedy v kapiláře, jež má na stěnách siloxanové skupiny. Ty ovšem ve vodném prostředí přecházejí na silanolové skupiny, které mají vlastnosti slabé kyseliny, což znamená, že budou v zásaditém pH odštěpovat vodíkové kationty a ponесou záporný náboj. Kationty z roztoku, který

naplňuje kapiláru, se v důsledku budou ve větší míře sdružovat v blízkosti záporně nabitých stěn. Při zapojení elektrického proudu poputují ke katodě, a celý roztok uvnitř strhávají s sebou.

Celý roztok se pak pohybuje kapilárou s určitou rychlostí. Problém ovšem představuje, že nejde o stabilní a opakovatelný jev. I malá změna pH nebo přítomnost malé koncentrace povrchově aktivních látek, vzniklá například nadávkováním vzorku, může vést ke značným výkyvům v EOF. Nejnáchylnější je oblast pH 3 až 8, kde silanolové skupiny disociují [14]. Pro stabilizaci, zpomalení, nebo obrácení EOF existuje celá řada metod. Lze použít kapiláry z jiných materiálů, nebo kapiláry potažené povrchově aktivními látkami, které pozmění stěnu kapiláry a zabrání vzniku záporného náboje silanolových skupin [15]–[17].

Elektroosmotický jev ovšem nemusí být pouze překážkou. V případě, že se analyzovaná látka pohybuje stejným směrem, přispívá EOF k urychlení analýzy. Pokud se analyzovaná látka pohybuje v opačném směru, ale s nižší rychlostí, než má EOF, pak přítomnost EOF umožní analýzu i opačně nabitých částic, protože je dopraví k detektoru. Ve srovnání s urychlením analýzy využitím vnějšího tlaku navíc EOF způsobuje výrazně menší rozmytí zón analytu, jelikož má plochý radiální profil.

2.2.2 Systémové zóny

Systémové zóny vznikají důsledkem narušení koncentrace základního elektrolytu nadávkováním vzorku. V elektroferogramu se vyskytují jako píky, které nenáleží analytu a v případě překryvu s píkem analytu mohou znemožnit jeho vyhodnocení. Jejich počet odpovídá počtu složek základního elektrolytu. Zpravidla je snaha zvolit si takové podmínky měření, aby se překryvu vyhnulo, což je možné díky programům, které jsou schopny výskyt systémových píků předvídat [18].

2.2.3 Disperze zón

V ideálním případě by pík měl mít Gaussovský tvar. Existují ovšem čtyři významné jevy, v jejichž důsledku dochází k narušení tohoto tvaru.

Nejběžněji pozorovatelná je elektromigrační disperze, která může za trojúhelníkový tvar píků, běžně pozorovatelný v elektroferogramech. Jev se projevuje, pokud mají

analyzovaný ion a koion přítomný v BGE rozdílnou elektroforetickou pohyblivost. Tento jev je možné omezit vhodnou volbou separačního prostředí. Deformovaný pík je možné i přesto poměrně přesně analyzovat proložením Haarhoff-Van der Lindeho (HVL) funkcí, která umožňuje určit migrační čas a další parametry píku [19].

Nejproblematictější jev představuje adsorpce analytu na stěnu kapiláry. Mnohdy v jejím důsledku dojde k deformaci píku, jež znemožňuje vyhodnocení, a někdy až k naprosté ztrátě analytu. V případě, že k tomuto jevu dochází, je nutné upravit povrch kapiláry vhodně zvolenou látkou, která zabrání adsorpci analytu [4].

Dalším významným jevem, který přispívá k disperzi píků, je Joulovo teplo, k jehož vzniku dochází proto, že elektrický proud při svém průchodu ohřívá vnitřek kapiláry. Jev lze omezit využitím nižšího proudu a termostatováním kapiláry [20].

Nakonec je třeba zmínit podélnou difúzi. Koncentrační gradient zapříčiňuje rozmývání analytu oběma směry, čímž dojde k symetrickému rozšíření píku. Vliv lze snížit zkrácením doby analýzy.

2.3. Korekce na iontovou sílu

Iontová síla je dána sumou koncentrací nabitých částic v roztoku a její velikost má značný vliv na průběh měření při CZE. Vyšší iontová síla má za následek zpomalení elektroosmotického toku, a tedy rychlosti celé analýzy. Snižuje efektivní mobilitu analytů a může způsobit prohození zón, jelikož k tomuto snížení dochází mnohem rychleji pro nabitější molekuly. Zároveň ovšem zmírňuje distorzi píku, omezuje adsorpci na stěnu a zlepšuje selektivitu měření [12], [21].

Jelikož jsou limitní elektroforetické mobility i rovnovážné disociační konstanty silně závislé na iontové síle, je potřeba provádět korekce na nulovou iontovou sílu. Pro usnadnění tohoto kroku byly v naší laboratoři vyvinuty programy PeakMaster a AnglerFish.

2.3.1 PeakMaster

PeakMaster je program umožňující předvídat chování elektroforetických systémů [11]. Ve své databázi využívá hodnoty pK_A konstant a limitních elektroforetických

mobilit, které jsou uvedené v Hirokawových tabulkách [22]. Program lze využít k předpovězení systémových zón, iontové síly, pufrací kapacity, nebo i pH soustavy při pufru o daném složení. Při znalosti limitních hodnot analytu lze rovněž odhadnout migrační čas.

Algoritmus tohoto programu provádí korekci na iontovou sílu. pK_A konstanty koriguje pomocí rozšířené Debyeho-Hückelovy teorie:

$$\log \gamma_i = -\frac{Az_i^2\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} + CI \quad (1)$$

kde γ_i je aktivní koeficient, I je iontová síla roztoku v mol/dm³, a je velikost iontu, z_i je náboj i -té složky, A , B , C jsou konstanty pro danou teplotu a rozpouštědlo [12].

Korekce limitních elektroforetických mobilit se provádí pomocí rozšířeného Onsagerova-Fuossova limitního zákona ve tvaru:

$$\mu_i = \mu_i^0 - \left(\mu_i^0 B_1 z_i \sum_{n=0}^5 C_n R_i^{(n)} + |z_i| B_2 \right) \frac{\sqrt{\Gamma}}{1 + Ba\sqrt{\Gamma}} \quad (2)$$

přičemž μ_i^0 je limitní mobilita i -té složky, a udává velikost iontu, B , B_1 a B_2 jsou konstanty pro danou teplotu a prostředí, z_i jsou nábojová čísla i -tého iontu, Γ v sobě zahrnuje vliv iontové síly a člen v sumaci představuje maticové vyjádření složení elektroforetického systému [23], [24].

2.3.2 AnglerFish

AnglerFish využívá stejného principu jako PeakMaster, ale iteračně v opačném směru. Ze známých efektivních mobilit při určitém složení pufru a iontové síle je schopný získat hodnoty korigované na nulovou iontovou sílu. Tyto korigované hodnoty pak fituje příslušnou regresní Henderson-Hasselbalchovou funkcí, kde představují fitované parametry termodynamické disociační konstanty a limitní elektroforetické pohyblivosti látky.

Při práci s programem je nutno znát přesnou koncentraci silné kyseliny nebo zásady a pH pufru. Koncentraci pufrující složky na základě těchto údajů dokáže AnglerFish

dopočítat. Dále je třeba znát nebo být schopen odhadnout počet disociačních konstant dané látky a také se musí provést počáteční odhad pK_A hodnot a limitních mobilit.

Při vyhodnocení tímto způsobem není třeba použít při měření pufrů s jednotnou iontovou silou, proto lze měřit i v o něco silněji kyselých a bazických oblastech, ovšem jen do iontové síly zhruba 30mM, protože aproximace, kterých AnglerFish využívá k výpočtu, nejsou spolehlivé při vysokých iontových silách [1], [25].

2.4 Izoelektrická fokusace

2.4.1 Historie

Počátky izoelektrické fokusace se datují k roku 1897, kdy Picton a Linder [26] pozorovali soustředování různě nabitých barviv u opačných elektrod, čímž nevědomky provedli elektrolyzu. Princip IEF byl popsán až o 15 let později Williamem a Watermanem [27].

V 50. letech došlo k dalšímu rozvoji, když Kolin [28], [29] navrhl umělý gradient pH, který umožňoval mnohem rychlejší zaostření, ačkoliv byl rovněž méně stabilní. Podle Svenssona [30] je k rozdělení dvou amfolytů stacionární elektrolyzou nutné mít třetí amfolyt, který leží mezi nimi. Tím zavedl koncept nosného elektrolytu a vyjádřil nutnost nalezení mnoha elektrolytů, které pokryjí co nejširší rozsah pH [31]. Další rozvoj metody byl umožněn díky preciznějšímu kapilárnímu provedení [2].

2.4.2 Princip

Izoelektrická fokusace je elektroforetická technika s vysokým rozlišením používaná pro separaci směsi amfolytických molekul na základě jejich pI ve spojitém pH gradientu. Zatímco v kapilární elektroforéze zajišťuje přítomnost BGE konstantní hustotu náboje na povrchu analyzované molekuly, a tedy migraci s konstantní mobilitou, v IEF dochází ke změně povrchu molekuly a snížení náboje na základě titrační křivky, dokud molekula nedoputuje do rovnovážné pozice, kde se zastaví při nulové mobilitě [32].

Izoelektrická fokusace nachází využití ve biofarmacii, v medicíně, k charakterizaci produktů biochemických procesů nebo protilátek [33][34]. Lze ji použít pro určování nukleotidů v genové sekvenci [35]. Zejména se však používá pro charakterizaci a analýzu proteinů [3].

2.4.3 Typy IEF

Izoelektrickou fokusaci lze provést na gelu nebo v kapiláře [36]. Kapilární IEF má proti gelovému provedení řadu výhod. Využívá se při ní silnějšího pole a není potřeba gel, který zdržuje migraci, což obojí vede k urychlení průběhu měření. Rovněž dosahuje vyšších rozlišení a má nižší detekční limit než gelová IEF, což umožňuje detekci mnohem zředěnějších vzorků [3].

Gelová IEF má tu výhodu, že je k určení pI látky možné vyříznout část gelu a změřit jeho pH. Oproti tomu kapilární provedení je zcela závislé na použití pI markerů, které se používají nejen pro určení pI ale i pro monitorování procesu fokusace [3], [36].

2.4.5 Gradient pH při IEF

Pro správné provedení izoelektrické fokusace je nezbytný opakovatelný a stabilní gradient pH, nejlépe umožněný pomocí směsi tzv. nosných amfolytů. Ty se samy uspořádají v elektrickém poli a hrají klíčovou roli pro úspěšnost a kvalitu separace.

Gradient pH by měl být ideálně lineární, ale snadno může být ovlivněn přítomností solí a jiných složek vzorku [2]. Jeho tvar závisí na pI amfolytů, na jejich koncentracích a dalších elektromigračních vlastnostech. Vodivost amfolytů určuje sílu pole a výrazné rozdíly v jejich vodivosti tedy povedou k nehomogennímu poli.

Zejména mezi pH 4-10 je obtížnější zajistit nezbytnou vodivost, jelikož v extrémnějších pH zajišťují vodivost hydroxidové a oxoniové ionty [37].

2.4.6 Nosné amfolyty

Ve směsi pro izoelektrickou fokusaci bývá přítomno velké množství nosných amfolytů, běžně v řádu stovek i tisíců, které mají svými pI pokrývat co nejširší rozsah pH a vytvářejí pokud možno lineární gradient uvnitř separačního prostředí [38].

Nosné amfolyty musí mít při $pH = pI$ dobrou pufrací kapacitu a vodivost, což není zcela samozřejmá podmínka, jelikož celá řada amfolytů má v oblasti pI zploštělou titrační křivku. Dobré vodivosti se dosáhne, pokud se izoelektrický bod amfolytu nachází mezi kationickou a anionickou pK_A , které leží co nejbliž, a tedy když je jejich rozdíl, ΔpK_A , co nejmenší [32].

Ideálně by nosné amfolyty neměly mít příliš vysokou molární hmotnost, poněvadž se pak od analyzovaných proteinů lépe oddělují pomocí dialýzy, chromatografie a jiných metod [37]. V komerčně dostupných směsích se pohybují v rozsahu zhruba $M_r = 150 - 1200$. Množství nosných amfolytů je dále navýšeno přítomností velkého počtu izomerů [38].

Existuje více nosných amfolytů pro kyselou oblast a mívají lepší vlastnosti, co se pufrční kapacity týče. Oproti tomu v zásadité oblasti je amfolytů méně a zpravidla se mnohem hůře fokusují. Určité množství špatných nosných amfolytů údajně může zlepšit rozpustnost proteinů, ovšem ve větší míře je jejich výskyt nežádoucí [38].

Zatímco analyt a pI markery by měly být ideálně detekovatelné v UV-Vis, případně fluorescenčně, správný nosný amfolyt by se v detektoru objevit neměl a nesmí tedy v těchto oblastech spektra absorbovat. Dále musí být dobře rozpustný v separačním prostředí [37].

2.4.7 Příprava gradientu

Existuje více způsobů, jak vytvořit gradient pH při IEF.

Možnost, která se pro kapiláry nehodí a spíše se používá v gelovém uspořádání, využívá polyakrylamidovou matici, která se zpolymerizuje před samotným měřením. Tomuto uspořádání se říká imobilizovaný gradient pH (IPG) a výrazně zlepšuje rozlišení a záběr měření. Umožňuje vytvářet 1D a 2D mapy a provádět přesné úpravy gradientu. Řeší tím problémy s nestálou vodivostí, nevyrovnanou pufrční kapacitou a nestabilním a celkově špatným gradientem pH, které vznikaly v minulosti.

Přístupy vhodné pro cIEF zahrnují gradient vytvořený a udržovaný průchodem elektrického proudu roztokem amfoterních složek s blízkými pI . Elektroforetický transport pak vede k uspořádáním nosných amfolytů podle pI , čímž vznikne gradient pH, který směřuje od anody ke katodě.

Při tomto uspořádání má médium na začátku jednotné pH, které je průměrem pI všech nosných amfolytů. Po zapojení proudu se kyselé složky uspořádají u anody a zásadité u katody, zkoncentrují se v bodě, kde $pH = pI$. Po ustálení zón může vlivem difúze dojít k jejich prolnutí, ovšem jakmile se molekula dostane do zóny s jiným pH, opět získá náboj,

a bude migrovat zpátky. Tento efekt je zdrojem residuálního proudu, který je pozorovatelný při IEF. Nakonec se zaostří zóny analyzovaných proteinů v místě, kde jejich pI je stejné jako pH [32].

Při dvoukrokovém postupu se nejdřív za nepřítomnosti elektroosmotického toku provede fokusace jak nosných amfolytů, tak vzorku. Po zaostření zón se celý objem kapiláry mobilizuje tlakem nebo chemicky (výměnou anolytu, například hydroxidu sodného, za kyselinu octovou) a tím projde přes detektor [35]. Pro tyto účely se běžně používá kapilára, v níž je potlačen elektroosmotický tok pokrytím (koutováním) [32].

Při jednokrokovém provedení probíhá fokusace při pomalém elektroosmotickém toku a tedy při simultánním pohybu celého gradientu a jednotlivých pásů k detektoru [35]. Za tímto účelem bývá vhodné využít dynamické pokrytí, což znamená přidat do analyzovaného roztoku rozpustné neutrální polymery, například hydroxyethyl celulózu (HEC), hydroxypropylmethyl celulózu (HPMC), které potlačí EOF.

Dvoukrokový přístup má lepší opakovatelnost a sníženou šanci adsorpce proteinu na stěnu kapiláry, proto se preferuje [32].

2.4.8 Úskalí

Při cIEF je nutné dát si pozor na skutečnost, že zvýšený obsah solí v separačním prostředí povede ke zvýšení vodivosti, a tedy i proudu, rovněž hrozí strhnutí pokrytí kapiláry nebo poškození proteinu. Tento problém bude v elektroferogramu pozorovatelný jako distorze píků nebo narušení gradientu. Existují metody, jak se experimentálně nadbytečných solí zbavit, anebo jak provést korekci získaných hodnot na přítomnost soli [39], [40]. Silné kyseliny a zásady bez protiiontů narušují pokrytí kapiláry, a proto je vhodné omezit jejich použití.

Další problém představuje skutečnost, že proteiny mají v blízkosti svých izoelektrických bodů nejnižší rozpustnost a může tak dojít k jejich precipitaci. Aby se tomu zabránilo, lze přidávat aditiva, jako jsou cukry (mannitol, sorbitol), sulfobetainy [41][38] a nejčastěji močovina, která zajistí rozbalení proteinu [42].

Je vhodné si uvědomit, že gradient pH přes široký rozsah nebude lineární, což plyne i ze skutečnosti, že existuje více nosných amfolytů pro kyselou oblast, zatímco nosných

amfolytů pro bazickou oblast je méně a bývají horší. Proto je správné předpokládat lineární vztah jen mezi dvěma sousedními markery, které obklopují studovaný protein. Navíc může vysoká koncentrace proteinu ovlivnit a zploštit směrnici gradientu v pH blízkém pI [32][31][38].

2.5 Významné parametry

2.5.1 Izoelektrický bod

Izoelektrický bod (pI) je bod na titrační křivce, který odpovídá pH v roztoku, kdy je celkový náboj molekuly nulový. Běžně se udává jako aritmetický průměr dvou sousedících disociačních konstant.

$$pI = \frac{pK_a + pK_c}{2} \quad (3)$$

kde pK_a a pK_c jsou disociační konstanty jednonásobně nabitě anionické a kationické formy [25].

V případě složitějších molekul s vysokým počtem disociačních konstant, jako jsou proteiny, je výpočet složitější záležitostí. Pokud má protein uspořádání náhodného klubka, je možné pI spočítat, ale v nativním stavu bývá ovlivněno interakcemi. Z tohoto důvodu rozdíly naměřeného pI oproti výpočtu umožňují vytušit určité strukturní záležitosti.

Přesné naměření pI proteinu je ztíženo tím, že na něj má vliv několik faktorů. Vyšší hydrofobicita prostředí přispívá k disociaci ve prospěch nenabitě formy. Hodnoty pK_A jsou závislé na teplotě, a i pI lze tedy ovlivnit teplotou. Přítomnost močoviny nebo jakýchkoliv organických rozpouštědel vyžaduje korekce [42].

2.5.2 Izomobilitní bod

Bylo pozorováno, že pokud se od sebe mobility kladné a záporné formy látky výrazně liší, pak pH, při kterém má látka nulovou pohyblivost, není totožné s izoelektrickým bodem, tak jak byl definován výše. Bodu, kdy je efektivní pohyblivost nulová, se říká izomobilitní bod a lze ho vypočítat podle vztahu:

$$pI_{mob} = \frac{\log(\mu_A) - \log(\mu_c) + pK_a + pK_c}{2} \quad (4)$$

kde pK_a a pK_c jsou disociační konstanty jednonásobně nabitě anionické a kationické formy a μ_a a μ_c jsou limitní elektroforetické pohyblivosti těchto forem.

Ve většině případů je ovšem rozdíl oproti izoelektrickému bodu v rámci experimentální chyby zanedbatelný [25], [43][44][45].

2.5.3 Výpočet chyby měření

Při výpočtu izoelektrického a izomobilitního bodu z experimentálních dat je nutné rovněž vypočítat jeho směrodatnou odchylku ze směrodatných odchylek stanovených pK_A jeho kationické a anionické formy.

Standardní rovnice pro výpočet směrodatné odchylky má tvar:

$$\sigma_f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)^2 \sigma_x^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)^2 \sigma_y^2} \quad (5)$$

kde σ_f je směrodatná odchylka veličiny f , která je závislá na veličinách x a y . σ_x a σ_y jsou směrodatné odchylky veličin x a y .

Pro směrodatnou odchylku izoelektrického bodu nabývá vztah podoby:

$$\sigma_{pI} = \frac{1}{2} \sqrt{pK_{1,err}^2 + pK_{2,err}^2} \quad (6)$$

kde pK_{err} jsou směrodatné odchylky disociačních konstant jednonásobně nabitých anionických a kationických forem. σ_{pI} je směrodatná odchylka izoelektrického bodu.

Pro směrodatnou odchylku izomobilitního bodu bude mít tvar:

$$\sigma_{pI_{mob}} = \frac{1}{2} \sqrt{pK_{1,err}^2 + pK_{2,err}^2 + \left(\frac{1}{\mu_1 \ln 10}\right)^2 \mu_{1,err}^2 + \left(\frac{1}{\mu_2 \ln 10}\right)^2 \mu_{2,err}^2} \quad (7)$$

kde pK_{err} jsou směrodatné odchylky disociačních konstant jednonásobně nabitých anionických a kationických forem a μ_{err} jsou směrodatné odchylky limitních elektroforetických pohyblivostí těchto forem. $\sigma_{pI_{mob}}$ je směrodatná odchylka izomobilitního bodu.

2.5.4 Parametr $-dz/dpH$

Ke stanovení vhodnosti markeru se používá hodnota $-dz/dpH$, což je parametr vyjadřující, jak závisí náboj z molekuly markeru na pH v blízkosti pI . Vyšší $-dz/dpH$ odráží lepší fokusaci markeru při pH rovném jeho pI a bude vysoká, pokud jsou si pK_A kationtové a aniontové formy blízka [3], [32].

Udává se například takto [43]:

$$\frac{-dz}{dpH} = \frac{\ln 10}{\left(1 + \frac{K_1}{4K_2}\right)^{0,5}} \quad (8)$$

kde K_1 a K_2 jsou disociační konstanty látky. Aby se marker byl schopný zfokusovat, uvažuje se, že by hodnota měla být vyšší než 0,045, což odpovídá rozdílu mezi pK_A do 4.

$$\frac{-dz}{dpH} > 0,045 \quad (9)$$

Kritérium pro dobrý marker je ovšem přísnější. Například Vesterberg a Šlais uvažovali, že rozdíl pK_A nesmí být větší než 3 [43][37] a Ansorge položil ještě přísnější kritérium, 1,5 [25].

Při výpočtu z experimentálních dat je možné postupovat tak, že se vyjádří, jak se mění náboj z vzhledem k pH , což je možné vypočítat ze znalosti disociačních konstant. Odvodili jsme, že například pro látku s dvojnásobným kladným a jednonásobným záporným nábojem bude mít funkce tvar:

$$z = \frac{2 \cdot 10^{pK_{KK}+pK_K-2pH} + 1 \cdot 10^{pK_K-pH} - 1 \cdot 10^{pH-pK_A}}{1 + 10^{pK_{KK}+pK_K-2pH} + 10^{pK_K-pH} + 10^{pH-pK_A}} \quad (10)$$

kde jsou pK_{KK} , pK_K a pK_A rovnovážné disociační konstanty jednotlivých forem.

Následně lze pro celou funkci vypočítat průběh $-dz/dpH$ a stanovit jeho hodnotu při pH odpovídajícím izoelektrickému bodu.

2.6 pI markery

Pro spolehlivé určení pI analytu je nezbytné používat pI markery, amfolytické látky se známým pI. Na rozdíl od nosných amfolytů bývají přítomny v malých koncentracích a musejí být detekovatelné detektorem. Pro účely vyhodnocení se často předpokládá linearita gradientu pH, správnější je ovšem předpokládat, že je gradient lineární pouze mezi dvěma markery, které pokud možno těsně ohraničují studovanou látku [30], [31], [37][35].

Markerům se také říká pI markery, markery izoelektrického bodu, IEF standardy, IEF markery, pH markery, vnitřní markery, testovací sloučeniny pro IEF [43].

Jako každý amfolyt je i marker charakterizovaný počtem protolytických skupin a jejich pK_A . K jejich určení se měří titrační nebo také mobilitní křivka, která vyjadřuje rovněž změnu náboje [37].

Podmínky, které musí pI marker splňovat lze zjednodušit takto: [46]

a) musí se dobře fokusovat, udáno vysokou hodnotou $-dz/dpH$, což je parametr vyjadřující, jak závisí náboj z molekuly markeru na pH v blízkosti pI a bude vysoký, pokud jsou si pK_A kationtové a aniontové formy blízké, tedy ΔpK_A musí být 3 a méně [30], [31], [37],

b) musí být dobře detekovatelný (většina bílkovin silně absorbuje při 280 nm, proto se zpravidla provádí detekce při této vlnové délce [47]),

c) nesmí interagovat se stěnou kapiláry (nízká hydrofobicita),

d) musí být stabilní,

f) musí mít vysokou čistotu.

2.6.1 Typy markerů

Řada autorů se zabývala přípravou co nejlepších markerů a navrhovali přístupy, kterých lze využít pro jejich syntézu. Možnosti zahrnují například substituované aminomethylfenoly, amfoterní barviva, syntetické oligopeptidy [3][37][31].

Využití vysokomolekulárních látek jako jsou proteiny jako markerů pI se pojí s problémy [48]. Bývají nestabilní, snadno denaturují a hydrolyzují, což má za následek vedlejší píky v elektroferogramu. Dále mají nevýhodu v tom, že v blízkosti pI precipitují a vlivem vysoké molární hmotnosti se obtížně separují [43].

Nízkomolekulární markery jsou oproti hmotnější markerům stabilnější, lépe se připravují, charakterizují a získávají v čistém stavu. Problém může představovat, že různí dodavatelé udávají různé hodnoty pI [35].

2.6.2 Šlaisovy markery

Šlais navrhl jako alternativu k peptidovým a proteinovým markerům skupinu nízkomolekulárních sloučenin založených na substitucích na nitrofenolovém jádru, které pokrývaly rozsah pH 3,2-10,4 [2][43].

Markery Šlaise mají tu výhodu, že jsou stabilnější oproti proteinovým markerům, jsou detekovatelné v UV a některé i fluorometricky [49]. Zároveň pokrývají značný rozsah pH . Nevýhodu však představuje, že mají sklon adsorbovat se na stěnu křemenné kapiláry, což vede k dodatečnému EOF a nestabilnímu gradientu [32], [50].

Hodnoty jejich pI byly nejprve stanoveny metodami gelové IEF anebo potenciometrickou titrací [43], [51]. Později byly přeměřeny kapilární IEF, která je považována za přesnější.

Syntéza Šlaisových markerů, jejichž struktury byly nejprve navrženy v softwaru MarvinSketch.[2], se provádí Mannichovou reakcí. Pro stanovení pI těchto markerů pomocí cIEF se použil tzv. Farmalyt - marker kit obsahující Shimurovy markery o udaných pI . Jednotlivé markery mají různé extinkční koeficienty, proto se musí používat při různých koncentracích pro dosažení stejně vysokého píku v elektroferogramu. Šlais uvádí průměr ze tří měření.

Hodnoty vyšly jinak při potenciometrické titraci a gelové IEF, Šlais to připisuje rozdílnému chemickému pozadí (při titraci jde o deionizovanou vodu, při cIEF o gel), a také skutečnosti, že je při cIEF lepší chlazení kapiláry [2].

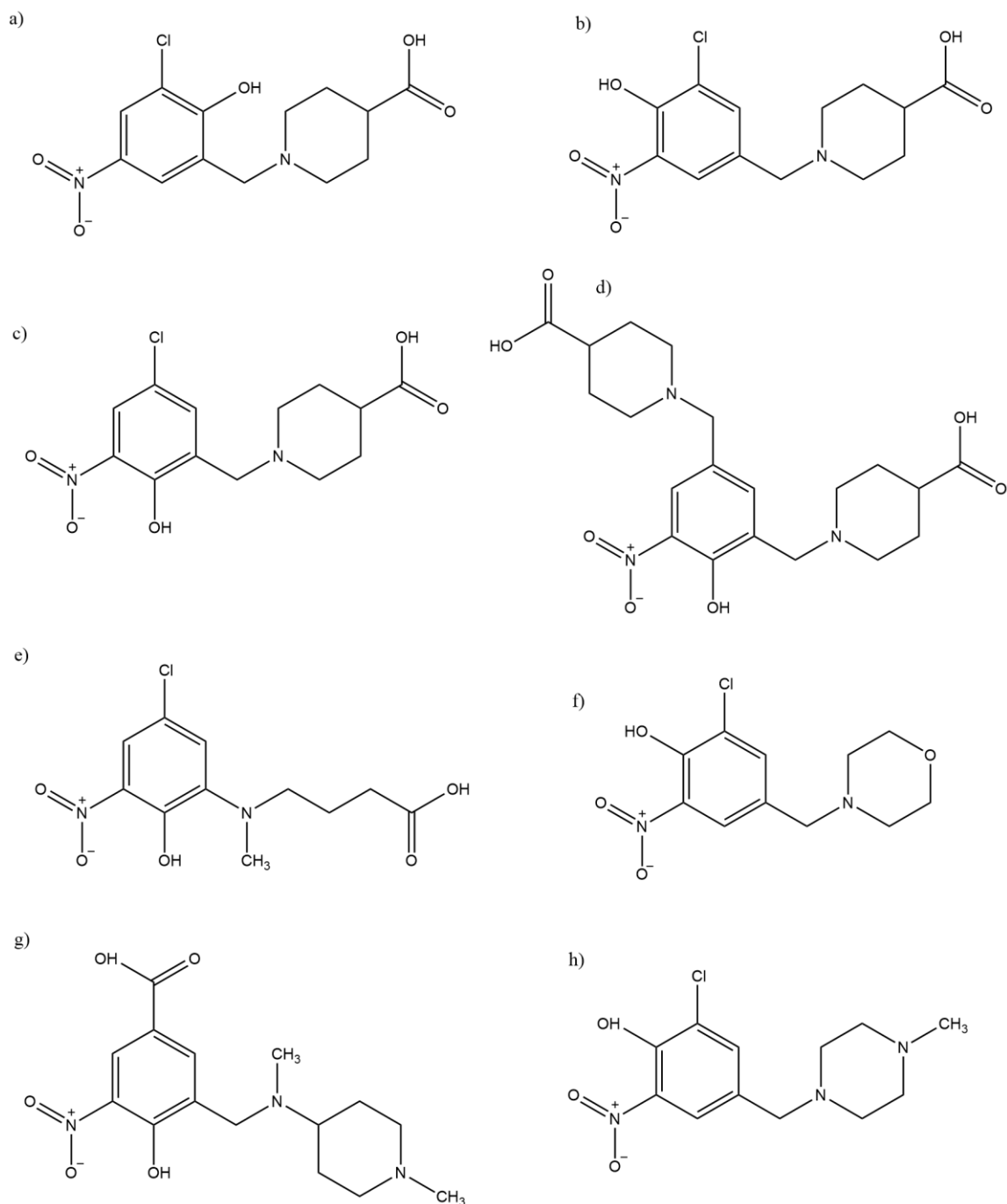
Nitrofenoly mají oproti proteinům tu výhodu, že absorbují ve VIS spektru, kdežto proteiny až v UV. Proto je možná snazší detekce a identifikace obou složek i při překryvu spekter markeru a analytu. Tato skutečnost rovněž znamená, že jsou nitrofenoly barevné, a tedy vhodné i pro vizuální detekci při gelové IEF.

Další výhodou je nízká molární hmotnost, která přispívá k rychlejší migraci a fokusaci. Jelikož nemají žádné hydrolyzovatelné peptidové vazby, jsou rovněž stabilnější a také jsou levnější na přípravu [2].

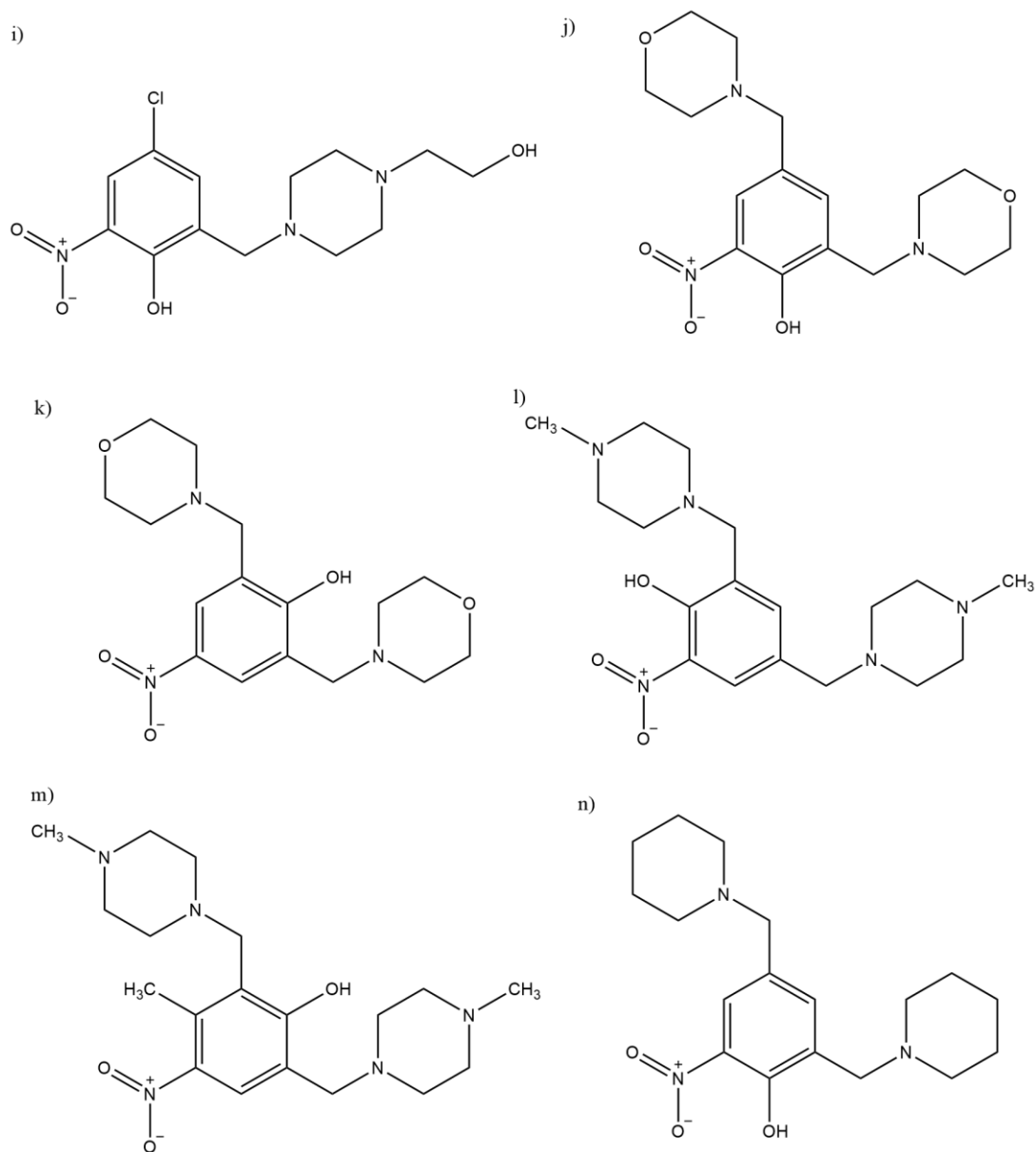
Struktury 14 konkrétních markerů jsou ukázány na obrázcích 1 a 2. Jejich strukturální názvy jsou vypsány v tabulce 1. Pro označení markerů se vždy využívá kód npim spojený s *pI* daného markeru, tak jak ho Šlais stanovil pomocí cIEF.

Tabulka 1 Označení a strukturní názvy vybraných Šlaisových markerů. Označení npim obsahuje p/ stanovené v Ref. [2] na základě cIEF

	zkratka	strukturní název
a)	npim 3,16	1-(3-chloro-2-hydroxy-5-nitrobenzyl)piperidin-4-karboxylová kyselina
b)	npim 3,93	1-(3-chloro-4-hydroxy-5-nitrobenzyl)piperidin-4-karboxylová kyselina
c)	npim 4,55	1-(5-chloro-2-hydroxy-3-nitrobenzyl)piperidin-4-karboxylová kyselina
d)	npim 4,56	1,1'-((4-hydroxy-5-nitro-1,3-fenyl)bis(methylen))bis(piperidin-4-karboxylová kyselina)
e)	npim 4,75	4-((5-chloro-2-hydroxy-3-nitrofenyl)(methyl)amino)butanová kyselina
f)	npim 5,30	2-chloro-4-(morfolinomethyl)-6-nitrofenol
g)	npim 5,95	4-hydroxy-3-((methyl(1-methylpiperidin-4-yl)amino)methyl)-5-nitrobenzoová kyselina
h)	npim 6,21	2-chloro-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-6-nitrofenol
i)	npim 6,74	4-chloro-2-((4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)methyl)-6-nitrofenol
j)	npim 7,24	2,4-bis(morfolinomethyl)-6-nitrofenol
k)	npim 7,54	2,6-bis(morfolinomethyl)-4-nitrofenol
l)	npim 8,24	2,4-bis((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-6-nitrofenol
m)	npim 8,83	3-methyl-2,6-bis((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-4-nitrofenol
n)	npim 10,08	2-nitro-4,6-bis(piperidin-1-ylmethyl)fenol



Obrázek 1 Šlaisovy markery, seřazeny od nejkyselějších po nejzásaditější. Označení zahrnuje kód npim a *pI* stanovené dle cIEF. a) npim 3,16 b) npim 3,93 c) npim 4,55 d) npim 4,56 e) npim 4,75 f) npim 5,299 g) npim 5,95 h) npim 6,21



Obrázek 2 Šlaisovy markery, seřazeny od nejkyslejších po nejzásaditější. Označení zahrnuje kód npim a *pI* stanovené dle cIEF. i) npim 6,737 j) npim 7,24 k) npim 7,54 l) npim 8,24 m) npim 8,83 n) npim 10,08

2.6.3 Shimurovy markery

Shimura připravil peptidy detekovatelné fluorescencí, ty však měly tu nevýhodu, že vyžadovaly, aby se peptid derivatizoval tak, aby fluoreskoval, což nebylo vždy jednoduché [32], [36].

Dále Shimura připravil 16 oligopeptidů, které absorbují v oblasti UV. Toho se dosáhlo tak, že každý peptid má jeden tryptofan, který zajišťuje absorpci při 280 nm. Vhodných acidobazických vlastností bylo dosaženo modifikacemi bočních řetězců. Pro přípravu markerů s pI v kyselé oblasti je nezbytné, aby měly peptidy terminální karboxylovou skupinu nebo obsahovaly kyselinu asparagovou, glutamovou. Pro pI v neutrální oblasti je třeba terminální aminoskupina nebo histidin. Pro alkalickou oblast se začleňuje tyrosin nebo zbytky lysinu.

Shimura stanovil pI svých markerů gelovou IEF pomocí komerčně dostupných amfolytů eCAP cIEF 3-10 kit (Beckman). Detekci prováděl při 280 nm, gradient pH určoval pomocí membránové metal-oxidové elektrody.

Výhody těchto markerů spočívají v jejich stabilitě, čistotě a vysoké rozpustnosti. Shimura uvádí, že mají vysoké $-dz/dpH$ [3], [32].

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo:

- Proměřit závislost elektroforetické pohyblivosti na pH pro 14 *pI* markerů vytvořených skupinou Šlaise a stanovit jejich *pI*
- Proměřit závislost elektroforetické pohyblivosti na pH pro 5 komerčně prodávaných *pI* markerů vytvořených Shimurou a stanovit jejich *pI*
- Porovnat námi naměřené hodnoty *pI* s komerčně udávanými hodnotami a ověřit jejich správnost

4 Experimentální část

4.1 Využité chemikálie a přístroje

Analyty představovala sada 14 markerů připravených a poskytnutých Šlaisem a 5 markerů Shimury, z cIEF pI Peptide Marker Kit PA 800 Plus pořízených od firmy Sciex (MA, USA). Jako marker elektroosmotického toku bylo využito dimethylsulfoxidu (Sigma Aldrich, Německo, > 99,9 %). K úpravě povrchu kapiláry byl využit hexadimethrin bromid (Sigma Aldrich, Německo, > 94 %) a dextransulfát (Sigma Aldrich, Německo).

Pro přípravu základního elektrolytu byly využity následující chemikálie: monohydrát hydroxidu lithného (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), kyselina fosforečná (Lachema, Česká republika, 85 %), kyselina mravenčí (Honeywell, Německo, > 95 %), kyselina octová (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), MES (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %), MOPS (Sigma Aldrich, Německo, > 99,5 %), tricín (Sigma Aldrich, Německo, > 99,0 %), CHES (Sigma Aldrich, Německo, > 99,0 %), β -alanin (Sigma Aldrich, Německo, > 99 %).

K proplachování kapiláry byly použity 1M a 0,1M roztoky hydroxidu sodného (Agilent Technologies, Německo).

Měření pH základního elektrolytu probíhalo na pH/Ion meteru PHM240 (MeterLab, Jižní Korea).

Samotné měření se provádělo v přístroji pro kapilární elektroforézu CE 7100 (Agilent Technologies, Německo), který má zabudovaný UV-Vis detektor. Přístroj byl řízen programem ChemStation (Agilent Technologies, Německo). Data byla dále vyhodnocována v programu CEval 0.6h5 (vytvořen v naší skupině) a následně zpracována v programech Origin 10.5.31 (Origin Lab, Spojené království), AnglerFish (vytvořen v naší skupině) a Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA). K naplánování podmínek měření byl použit program PeakMaster 6 (vytvořen v naší skupině).

K měření byly využívány křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm . Délky kapilár byly zhruba 65 cm (blíže upřesněno v experimentálních

podmínkách a postupech). Vzdálenost k UV-Vis detektoru byla vždy o 8,5 cm menší než délka kapiláry.

Měření probíhalo při teplotě 25 °C.

4.2 Měření Šlaisových markerů

4.2.1 Experimentální podmínky a postupy

Před prvním měřením byly elektrody přístroje očištěny v ultrazvukové lázni, nejprve 10 minut v deionizované vodě a následně po 10 minut v methanolu.

Byly připraveny zásobní roztoky následujících látek o koncentraci 0,5 M: kyselina fosforečná, kyselina mravenčí, kyselina octová, MES, MOPS, Tricin, CHES, β -alanin. Z těchto zásobních roztoků byla připravena sada pufrů odpovídající složení v tabulce 2. Hydroxid lithný se pro každý pufr odvažoval zvlášť. Tabulka rovněž uvádí pufrací kapacity a iontové síly pufru, vypočítané pomocí programu PeakMaster. V průběhu měření se pravidelně kontrolovalo, zda mají pufrы stále žádoucí pH, a v případě, že nikoliv, byl připraven nový pufr o stejném složení.

Vzorek byl připraven tak, že se nejprve připravil vodný roztok markeru o koncentraci zhruba 1 mg/ml. V případě snížené rozpustnosti analytu se roztok přefiltroval, aby došlo k odstranění nerozpuštěných částic, což mělo za následek sníženou celkovou koncentraci analytu. Následně se do 100 μ l vialky vpravilo 30 μ l takto naředěného vzorku, 10 μ l 2% DMSO, jakožto markeru elektroosmotického toku, a 60 μ l deionizované vody.

Dávkování vzorku se provádělo hydrodynamicky tlakovým rozdílem 15 mbar po 10 s. Měření probíhalo při napětí 15 kV a v případě kyselé oblasti (od acetátových po fosfátové pufrы) pro měření v křemenné kapiláře a po celou dobu při měření v kapiláře uvnitř pokryté fluorocarbonem (FC kapilára) nebo polybrenem (PB kapilára) se působilo tlakem 75 mbar. V každém pufru se měření provádělo tři až pětkrát.

V případě použití nepokryté křemenné kapiláry byla před prvním měřením propláchnuta po 10 minut 0,1M NaOH, po 10 minut deionizovanou vodou a po 5 minut používaným pufrem. V případě markerů, které vykazovaly známky adsorpce na stěnu, se v problematických oblastech pH využívala kapilára s pokrytím fluorocarbonem anebo kapilára pokrytá polybrenem. Ty se před měřením proplachovaly pouze deionizovanou vodou a pufrem.

Mezi jednotlivými měřeními se vždy prováděl pětiminutový proplach základním elektrolytem.

Kapilár bylo připraveno celkem 10. Pro první marker (npim 3,16) byla použita křemenná kapilára o délce 64,6 cm, stejná kapilára byla použita pro npim 3,93 a npim 5,299. Při měření npim 4,56 a 5,95 se použila kapilára délky 65,7 cm.

Pro npim 6,21 a 6,74 se v oblasti pH 1,5-2,5 a 9-12 využilo křemenné kapiláry o délce 63,8 cm, ale pro měření pH 3-9 se přešlo do fluorocarbon pokrývané kapiláry délky 64,45 cm. V případě npim 7,24 a 7,54 se podobně v oblasti pH 1,5-2,5 a 10-12 měřilo v křemenné kapiláře (65,1 cm) a v pH 3-10 ve FC kapiláře (64,6 cm). Marker 8,24 se nejprve měřil za stejných podmínek, ale v pH 5-10 se sorboval na stěny obou kapilár, proto se využila PB kapilára o délce 64,7 cm. Podobně tomu bylo s npim 8,83, kde se v PB kapiláře (63,8 cm) měřilo rozmezí pH 3,5-10. Marker npim 10,08 byl celý proměřen v PB kapiláře (64,7 cm). Markery npim 4,55 a npim 4,75 byly na samý závěr proměřeny v polybrenem pokryté kapiláře o délce 64,1 cm.

K detekci analytu byl využíván zabudovaný UV-Vis detektor. Detekce se prováděla zpravidla při vlnové délce 215 nm. Jako kontrola, že skutečně pozorujeme náš analyt, se sledovala vlnová délka 280 nm, při níž by markery pro určování *pI* bílkovin měly být viditelné.

Vyhodnocení migračních časů získaných elektroferogramů se provádělo v programu CEval. Následně se data zadala do programu AnglerFish, který umožňuje korekci na iontovou sílu. Pomocí něj byly stanoveny termodynamické disociační konstanty a limitní elektroforetické pohyblivosti.

V případě polybrenem pokrytých kapilár se postupovalo tak, že se připravilo 5 ml 3% dextranulfátu a 5% hexadimethrin bromidu. Připravená křemenná kapilára byla propláchnuta 1M roztokem hydroxidu sodného. Poté se 20 minut proplachovala roztokem hexadimethrin bromidu, následně 20 minut roztokem dextranulfátu. Nakonec opět 20 minut roztokem hexadimethrin bromidu. Před použitím se kapilára propláchla deionizovanou vodou. Před každým měřením pak byla proplachována základním elektrolytem.

Tabulka 2 Složení, naměřené pH, pomocí PeakMasteru vypočítaná pufrací kapacita β a iontová síla I základního elektrolytu

pufr	c_{Li}	$c_{kyselina}$	pH	β	I
-	mM	mM	-	mM	mM
Kyselina fosforečná	-	125	1,549	121,3	29,92
Kyselina fosforečná	-	60	1,765	74,10	19,15
Kyselina fosforečná	-	22	2,015	35,71	10,05
Fosfát/Li	6,5	14,3	2,468	15,07	10,06
Formiát/Li	9	60	2,962	21,77	10,07
Formiát/Li	9,7	26	3,477	14,98	10,04
Acetát/Li	9,9	61,5	4,004	19,55	10,01
Acetát/Li	10	26	4,480	14,27	10,03
Acetát/Li	10	14,7	5,009	7,38	10,01
MES/Li	10	53	5,541	18,70	10,00
MES/Li	10	23,5	6,067	13,23	10,00
MOPS/Li	10	55	6,502	18,84	10,00
MOPS/Li	10	24,3	7,005	13,55	10,00
Tricin/Li	10	50	7,511	18,42	10,00
Tricin/Li	10	22,5	8,042	12,79	10,00
Tricin/Li	10	14	8,495	6,59	10,00
CHES/Li	10	40	8,944	17,28	10,00
CHES/Li	10	20	9,431	11,59	10,00
β -alanin/Li	10	25	10,076	14,03	10,00
β -alanin/Li	10	14,4	10,635	8,16	10,00
β -alanin/Li	10	10,3	11,088	5,36	9,99
β -alanin/Li	10	6,8	11,519	8,83	9,96
Li	10,1	-	11,996	23,25	9,97
Li	20	-	12,216	46,03	19,53
Li	30	-	12,307	69,00	29,02

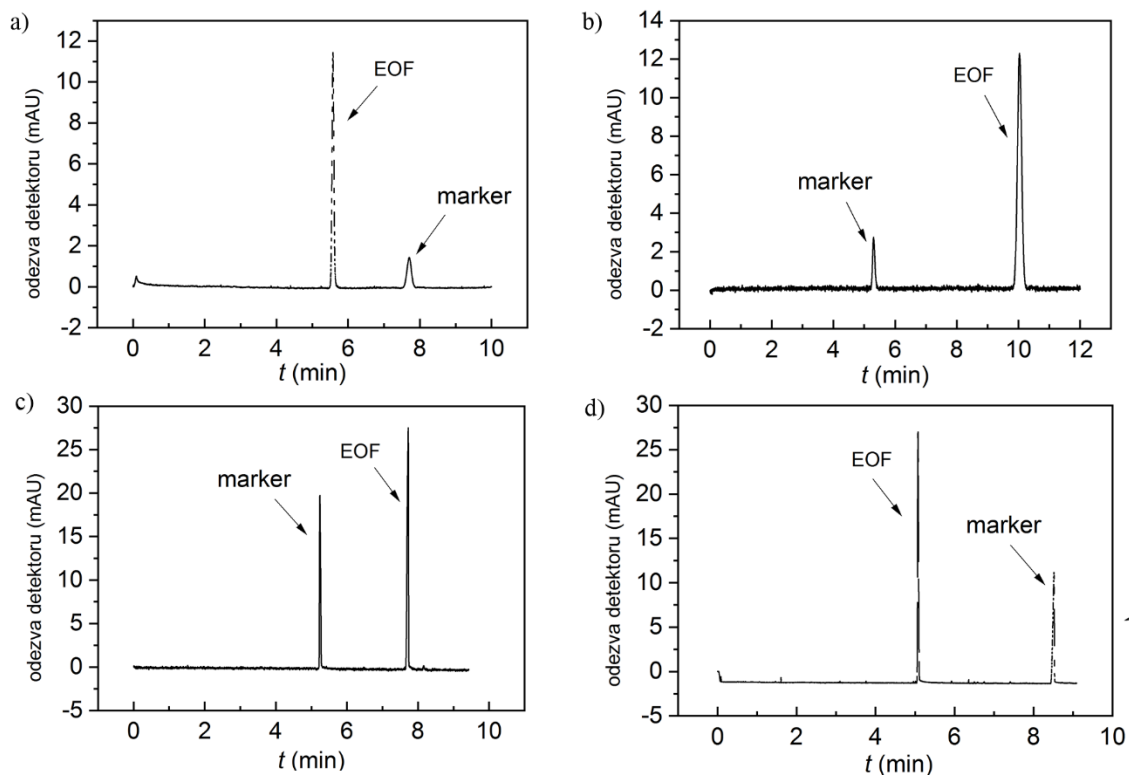
4.2.2 Výsledky měření

Příklady elektroferogramů získaných tímto měřením markerů v jednotlivých pufrech jsou na obrázku 3.

V případě nepokryté křemenné kapiláry anebo kapiláry pokryté fluorocarbonem, se bude pík analytu v oblasti nízkých pH, nižších, než je pI , objevovat na elektroferogramu dříve než pík elektroosmotického toku (obrázek 3b). Analyt bude v této oblasti kladně nabitý a bude se pohybovat s kladnou mobilitou. Pík markeru elektroosmotického toku, DMSO, má Gaussovský tvar, pík analytu má v důsledku elektromigrační disperze často trojúhelníkovitý tvar. V oblasti pH vyšších, než je pI , se pak analyt bude pohybovat se zápornou mobilitou a bude pomalejší než elektroosmotický tok (obrázek 3d).

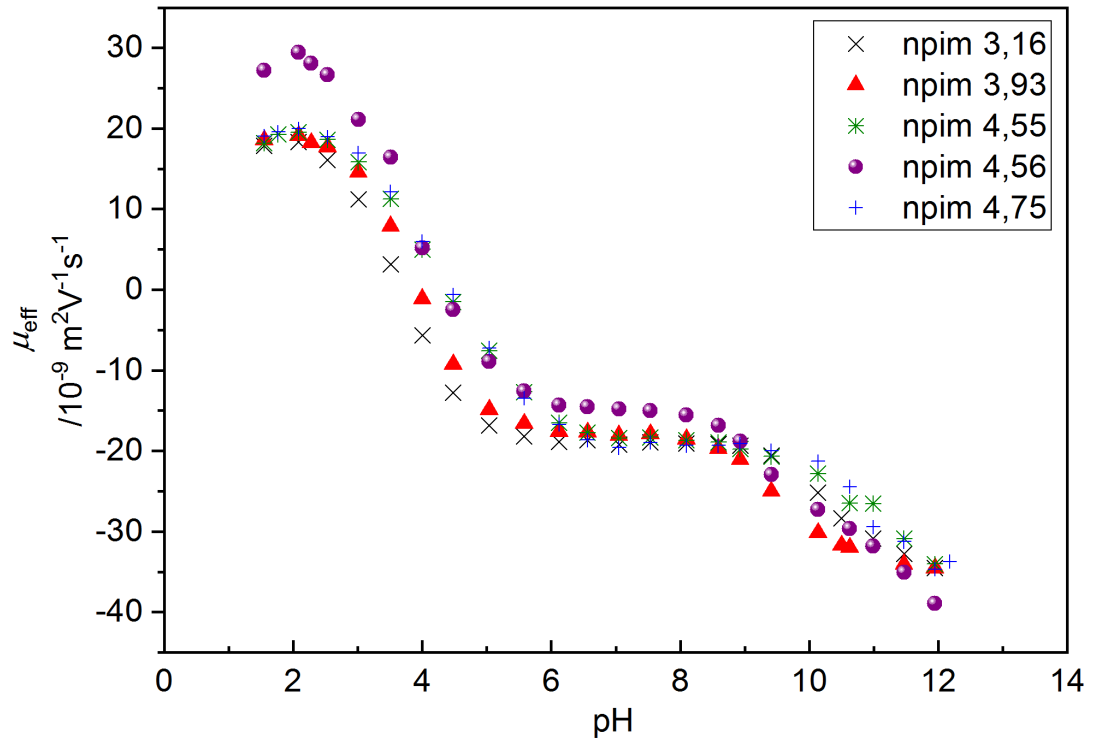
Zejména v křemenné kapiláře je ovšem elektroosmotický tok výrazně rychlejší v zásaditých pH a celkový čas měření bývá zkrácený. V kyselých pH bývá naopak nutno využít externího tlaku pro zkrácení doby měření. V pokrytých kapilárách je rozdíl mezi rychlostmi EOF výrazně snížen a zpravidla bývá nutno využívat externího tlaku po celou dobu měření.

V kapiláře pokryté polybrenem je trend obrácený. V pH nižší než pI , je analyt pomalejší než EOF (obrázek 3a), v pH vyšších než pI , bude naopak rychlejší (obrázek 3c).

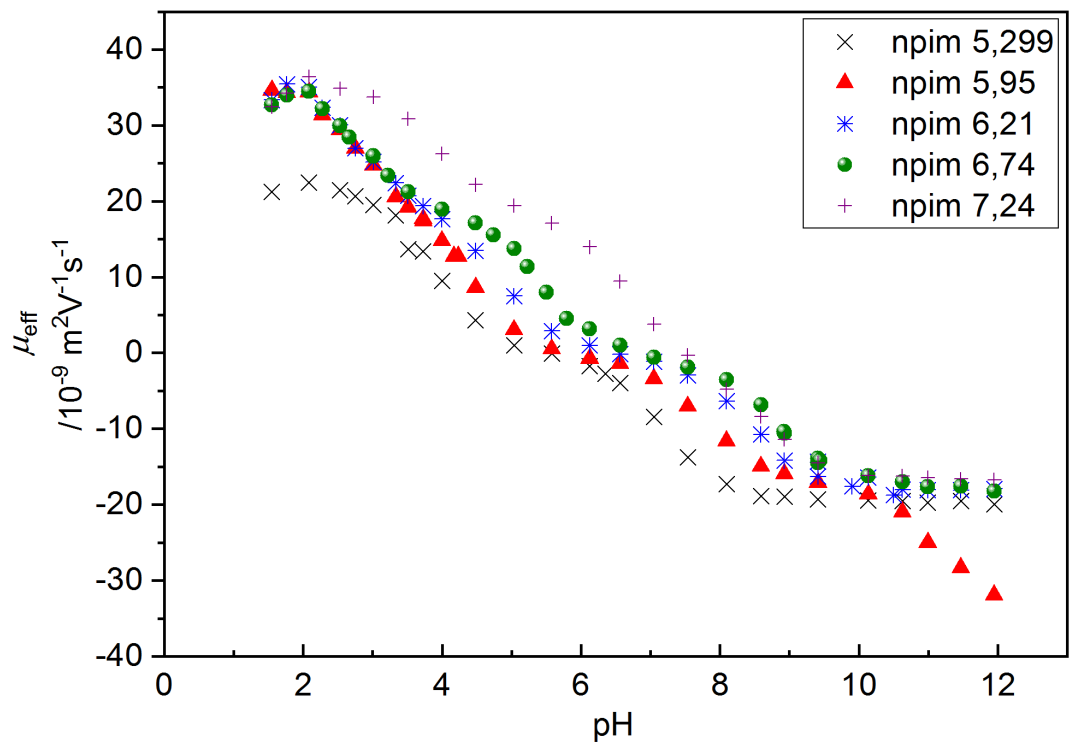


Obrázek 3 Příklady elektroferogramů z měření Šlaisových markerů. Označení zahrnuje kód npim a *pI* stanovené dle cIEF[2] a) npim 4,55 v pufru o pH 2,084 při 214 nm, -15 kV, 75 mbar, PB kouting b) npim 6,74 v pufru o pH 2,084 při 214 nm, 15 kV, 75 mbar, FC kouting c) npim 3,16 v pufru o pH 10,134 při 214 nm, -15 kV, 75 mbar, PB kouting d) npim 3,93 v pufru o pH 10,520 při 214 nm, 15 kV, křemenná kapilára

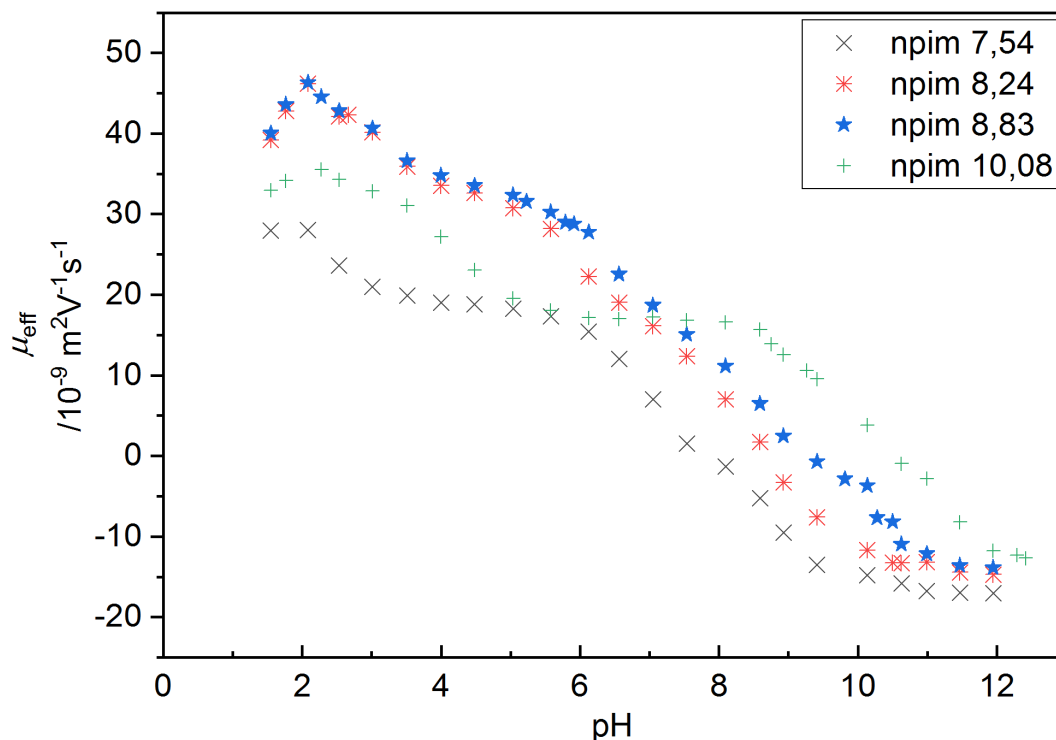
Elektroferogramy byly vyhodnoceny v programu CEval a získané efektivní elektroforetické pohyblivosti byly spolu se složením používaného pufru vyneseny do programu AnglerFish. Obrázky 4, 5 a 6 znázorňují získané závislosti naměřené efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH pro jednotlivé markery. Můžeme pozorovat, že se křivky v extrémních pH stácejí nazpátek, jde o důsledek rozdílné iontové síly hraničních pufrů.



Obrázek 4 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH pro pět Šlaisových markerů s izoelektrickými body v rozsahu 3-5. Každý bod je průměrem ze 3-5 naměřených hodnot. Označení zahrnuje kód npim a pI stanovené dle cIEF [2]



Obrázek 5 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH pro pět Šlaisových markerů s izoelektrickými body v rozsahu 5-7,5. Každý bod je průměrem ze 3-5 naměřených hodnot. Označení zahrnuje kód npim a pI stanovené dle cIEF [2]



Obrázek 6 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH pro čtyři Šlaisovy markery s izoelektrickými body v rozsahu 7,5-10. Každý bod je průměrem ze 3-5 naměřených hodnot. Označení zahrnuje kód npim a pI stanovené dle cIEF [2]

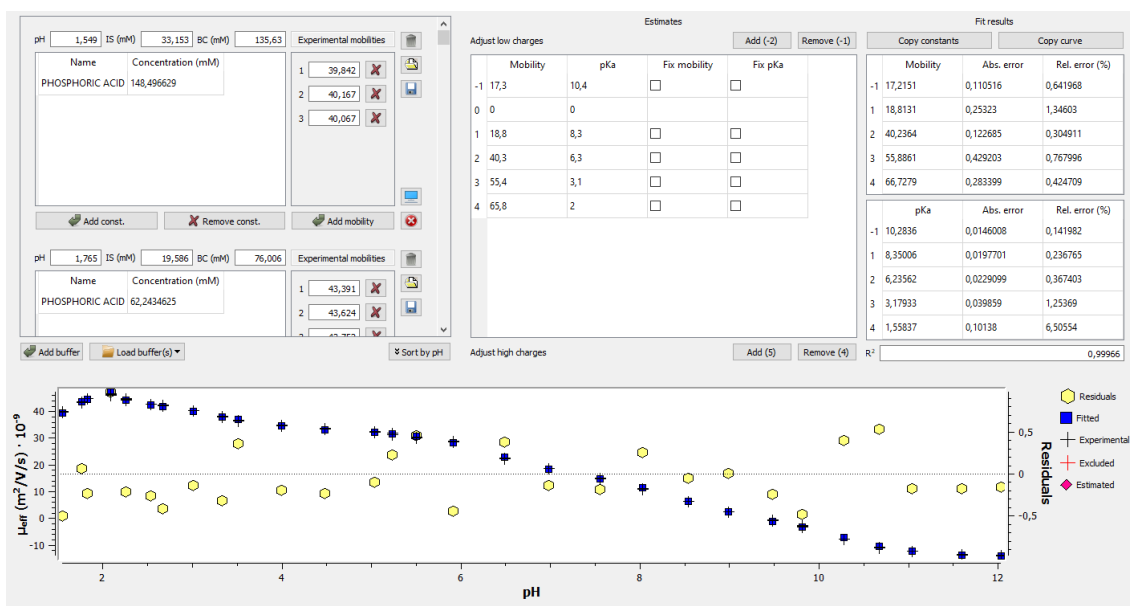
4.2.3 Vyhodnocení v programu AnglerFish

Z chemických vzorců jednotlivých markerů (viz obrázky 1 a 2 v sekci 2.6.2) bylo známo, kolik bude mít látka pK_A . Z tvaru mobilitních křivek byly odhadnuty hodnoty limitních elektroforetických pohyblivostí a termodynamických disociačních konstant. Tyto odhady byly zadány do programu AnglerFish, který iteračně vypočítal správné hodnoty pK_A . Pro příklad rozhraní AnglerFish viz obrázek 7, 8, 9.

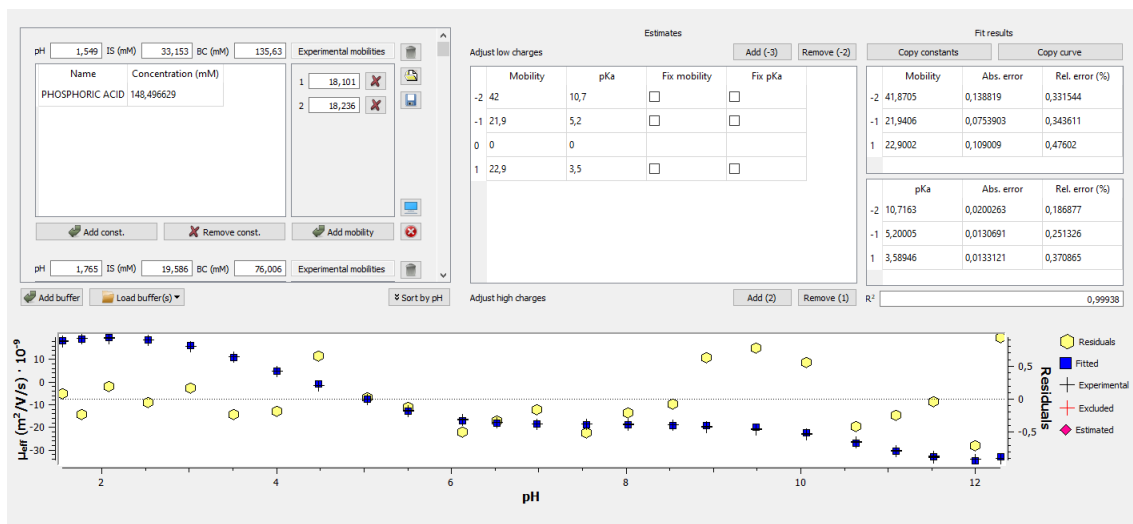
Hodnota pI byla vypočtena z pK_A pro náboj +1 a -1, ve všech případech se v této oblasti dosáhlo směrodatné odchylky v řádu setin nebo lepší. V případě krajních pK_A , (menších než 2 a větších než 12), je v některých případech přesnost nízká, protože nebylo možné připravit pufr, které by tyto oblasti umožňovaly spolehlivě proměřit. Jednalo se však o pK_A vícenabitých forem, která nebyla nutná pro stanovení pI .

V případě npim 4,56 a 4,75 se v elektroferogramu vyskytovaly vedlejší píky, které ukazují, že marker nebyl docela čistý. V případě npim 4,75 se povedlo zvlášť vyhodnotit

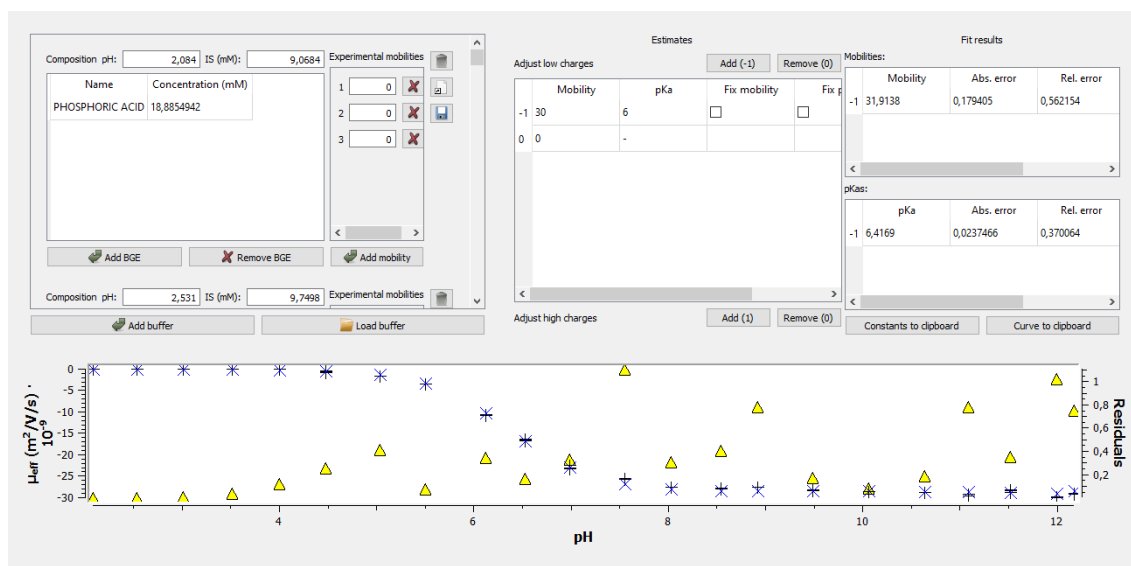
marker (obrázek 8) a boční pík (obrázek 9), který je zřejmě kyselinou s jednonásobným záporným nábojem a pK_A $6,41 \pm 0,02$.



Obrázek 7 Příklad rozhraní programu AnglerFish, vyhodnocení pro marker npim 8,83. Vlevo nahoře je uvedeno složení a pH pufru spolu s efektivními elektroforetickými pohyblivostmi, které byly naměřeny. Uprostřed nahoře se vkládají odhady mobilit a pK_A , rovněž jejich počet. Vpravo nahoře jsou iteračně získané hodnoty pK_A a limitních pohyblivostí. Ve spodní části obrázku jsou experimentální data jako černé křížky, modře jsou pak body fitované křivky. Žluté body představují residua, odchylky fitu od experimentálních hodnot. V rozumných mezích jsou v případě, kdy je jejich rozsah menší než ± 1 .



Obrázek 8 Příklad rozhraní programu AnglerFish, vyhodnocení pro marker npim 4,75. Vlevo nahoře je uvedeno složení a pH pufru spolu s efektivními elektroforetickými pohyblivostmi, které byly naměřeny. Uprostřed nahoře se vkládají odhady mobilit a pK_A , rovněž jejich počet. Vpravo nahoře jsou iteračně získané hodnoty pK_A a limitních pohyblivostí. Ve spodní části obrázku jsou experimentální data jako černé křížky, modře jsou pak body fitované křivky. Žluté body představují residua, odchylky fitu od experimentálních hodnot. V rozumných mezích jsou v případě, kdy je jejich rozsah menší než ± 1 .



Obrázek 9 Vyhodnocení vedlejšího píku, který se vyskytoval spolu s markerem npim 4,75, v programu AnglerFish. Vlevo nahoře je uvedeno složení a pH pufru spolu s efektivními elektroforetickými pohyblivostmi, které byly naměřeny. Uprostřed nahoře se vkládají odhady mobilit a pK_A , rovněž jejich počet. Vpravo nahoře jsou iteračně získané hodnoty pK_A a limitních pohyblivostí. Ve spodní části obrázku jsou experimentální data jako černé křížky, modře jsou pak body fitované křivky. Žluté body představují residua, odchylky fitu od experimentálních hodnot. V rozumných mezích jsou v případě, kdy je jejich rozsah menší než ± 1 . Vidíme zde, že látka zůstává v kyselé oblasti nenabitá a v zásadité se jednonásobně nabíjí. Půjde tedy o kyselinu.

Veškeré takto získané termodynamické hodnoty pK_A a limitní elektroforetické pohyblivosti jsou i se směrodatnými odchylkami uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 Limitní iontové mobility μ_{lim} a termodynamické hodnoty pK_A pro náboj z jednotlivých markerů zkorigované na nulovou iontovou sílu pomocí AnglerFish se směrodatnými odchylkami σ . Označení zahrnuje kód npim a pI stanovené dle cIEF [2]

z	pK_A	σ	μ_{lim}	σ
-	-	-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
npim 3,16				
+1	3,18	0,00	22,50	0,03
-1	4,17	0,00	22,01	0,016
-2	10,39	0,00	40,87	0,04
npim 3,93				
+1	3,46	0,00	22,77	0,03
-1	4,38	0,00	20,95	0,02
-2	9,59	0,01	40,99	0,03

z	pK_A	σ	μ_{lim}	σ
-	-	-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
npim 4,55				
+1	3,59	0,02	22,90	0,11
-1	5,20	0,01	21,94	0,08
-2	10,72	0,01	41,87	0,14
npim 4,56				
+2	2,67	0,05	37,08	0,06
+1	3,70	0,02	23,9	0,8
-1	4,79	0,01	17,80	0,03
-2	9,39	0,01	34,33	0,18
-3	11,04	0,02	49,31	0,08
npim 4,75				
+1	3,67	0,01	23,33	0,03
-1	5,21	0,01	22,39	0,06
-2	11,01	0,02	42,19	0,09
npim 5,299				
+1	3,84	0,00	25,51	0,03
-1	7,19	0,00	22,55	0,02
npim 5,95				
+2	2,48	0,02	45,05	0,2
+1	4,43	0,02	22,5	0,3
-1	7,70	0,01	19,86	0,13
-2	11,26	0,03	40,29	0,4
npim 6,21				
+2	2,52	0,01	45,07	0,12
+1	4,78	0,01	22,38	0,14
-1	8,33	0,01	20,96	0,05

z	pK_A	σ	μ_{lim}	σ
-	-	-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
npim 6,74				
+2	2,66	0,02	43,43	0,15
+1	5,32	0,01	22,10	0,16
-1	8,71	0,01	19,97	0,13
-2	13	4	31	59
npim 7,24				
+2	3,80	0,02	42,64	0,09
+1	6,46	0,01	22,01	0,17
-1	8,47	0,01	19,29	0,07
npim 7,54				
+2	2,13	0,02	39,65	0,20
+1	6,70	0,01	21,86	0,06
-1	8,83	0,01	19,37	0,07
npim 8,24				
+4	0,60	0,70	69	2
+3	3,00	0,06	57,8	0,7
+2	5,80	0,05	39,0	0,3
+1	7,89	0,03	19,9	0,5
-1	9,40	0,03	17,0	0,1
npim 8,83				
+4	0,85	0,14	68,5	0,59
+3	3,08	0,02	57,3	0,2
+2	6,23	0,02	40,32	0,08
+1	8,35	0,01	18,84	0,17
-1	10,28	0,01	17,16	0,08
npim 10,08				
+2	4,01	0,02	42,05	0,11
+1	9,48	0,01	20,13	0,08
-1	11,58	0,03	18,5	0,2

Podle rovnic uvedených v oddíle 2.5. se pro každý marker vypočítal izoelektrický bod (rovnice 3) a izomobilitní bod (rovnice 4) se směrodatnými odchylkami (rovnice 6 a 7), a dále hodnota ΔpK_A z rozdílu mezi přilehlými pK_A . Všechny tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Limitní iontové mobility, izoelektrické a izomobilitní body jednotlivých markerů s příslušnými směrodatnými odchylkami σ a hodnotami ΔpK_A , vypočítané z dat v tabulce 3. Označení zahrnuje kód npim a pI stanovené dle cIEF [2]

	npim 3,16	npim 3,93	npim 4,55	npim 4,56	npim 4,75
pI	3,675	3,920	4,395	4,245	4,438
σ_{pI}	0,000	0,000	0,012	0,011	0,008
ΔpK_A	0,99	0,92	1,61	1,09	1,54
pI_{mob}	3,670	3,902	4,385	4,181	4,429
$\sigma_{pI_{mob}}$	0,000	0,000	0,012	0,013	0,008
	npim 5,299	npim 5,95	npim 6,21	npim 6,74	npim 7,24
pI	5,515	6,065	6,555	7,015	7,465
σ_{pI}	0,000	0,011	0,007	0,007	0,007
ΔpK_A	3,35	3,27	3,55	3,39	2,01
pI_{mob}	5,488	6,038	6,541	6,993	7,436
$\sigma_{pI_{mob}}$	0,000	0,012	0,007	0,007	0,007
	npim 7,54	npim 8,24	npim 8,83	npim 10,08	
pI	7,765	8,645	9,315	10,530	
σ_{pI}	0,007	0,021	0,007	0,016	
ΔpK_A	2,13	1,51	1,93	2,10	
pI_{mob}	7,739	8,611	9,295	10,512	
$\sigma_{pI_{mob}}$	0,007	0,022	0,007	0,016	

Vidíme zde, že se hodnota pI a pI_{mob} ve většině případů neliší, anebo liší zcela minimálně, v rámci experimentální chyby. Směrodatné odchylky jsou zpravidla nízké, což značí, že byla pI určena s vysokou přesností. Především u markerů kolem neutrální oblasti jsou hodnoty ΔpK_A poměrně vysoké, například npim 6,21 se blíží ke 4 a v přísnějších definicích pro dobrý marker pI by obstál obtížněji. Zejména silně kyselé markery tuto podmínku splňují lépe.

4.3 Měření Shimurových markerů

4.3.1 Experimentální podmínky a postupy

Před prvním měřením byly elektrody přístroje očištěny v ultrazvukové lázni. Nejprve byly po 10 minut ponořeny do deionizované vody a následně po 10 minut do methanolu.

K měření byla použita stejná sada pufrů jako v předchozím oddílu. Jejich složení je uvedeno v tabulce 2.

Vzorek byl připraven tak, že se do 100 μ l vialky vpravilo 10 μ l komerčně prodáváného markeru, 10 μ l 2% DMSO, jako markeru elektroosmotického toku, a 80 μ l deionizované vody.

Dávkování se provádělo hydrodynamicky tlakovým rozdílem 15 mbar po 10 s. Měření probíhalo při napětí 10 kV a za tlaku 75 mbar. V každém pufru se měření provádělo tři až pětkrát. Mezi jednotlivými měřeními se vždy prováděl pětiminutový proplach puftrem, ve kterém mělo probíhat následující měření.

K detekci analytu byl využíván zabudovaný UV-Vis detektor. Detekce se prováděla zpravidla při vlnové délce 215 nm. Jako kontrola, že skutečně pozorujeme náš analyt, se sledovala vlnová délka 280 nm, při níž by markery pro určování pI bílkovin měly být detekovatelné.

Kapilár bylo opět využito několik typů. Pro marker 4,1, 5,5 a 7,0 se využila křemenná kapilára (0,65 cm) a FC kapilára (0,6445). V případě markerů 9,1 a 10 se navíc použily PB pokryté kapiláry dlouhé 65,1, 50,0 a 64,9 cm pro oblast pH 5-11, kde se markery lepily.

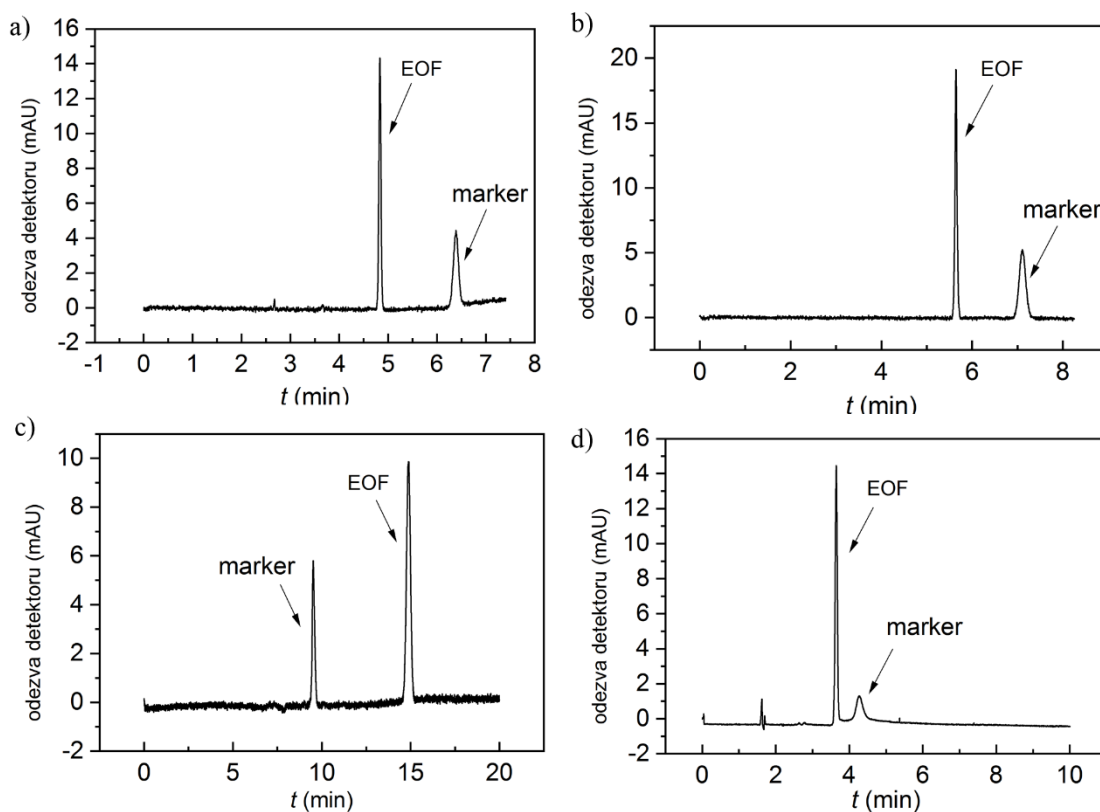
Vyhodnocení migračních časů analytů se provádělo v programu CEval. Následně se data zadala do programu AnglerFish, který umožňuje korekci na iontovou sílu a umožňuje tak stanovení termodynamických disociačních konstant a limitních elektroforetických pohyblivostí.

4.3.2 Výsledky měření

Příklady elektroferogramů získaných měřeními markerů v jednotlivých pufrách jsou na obrázku 10.

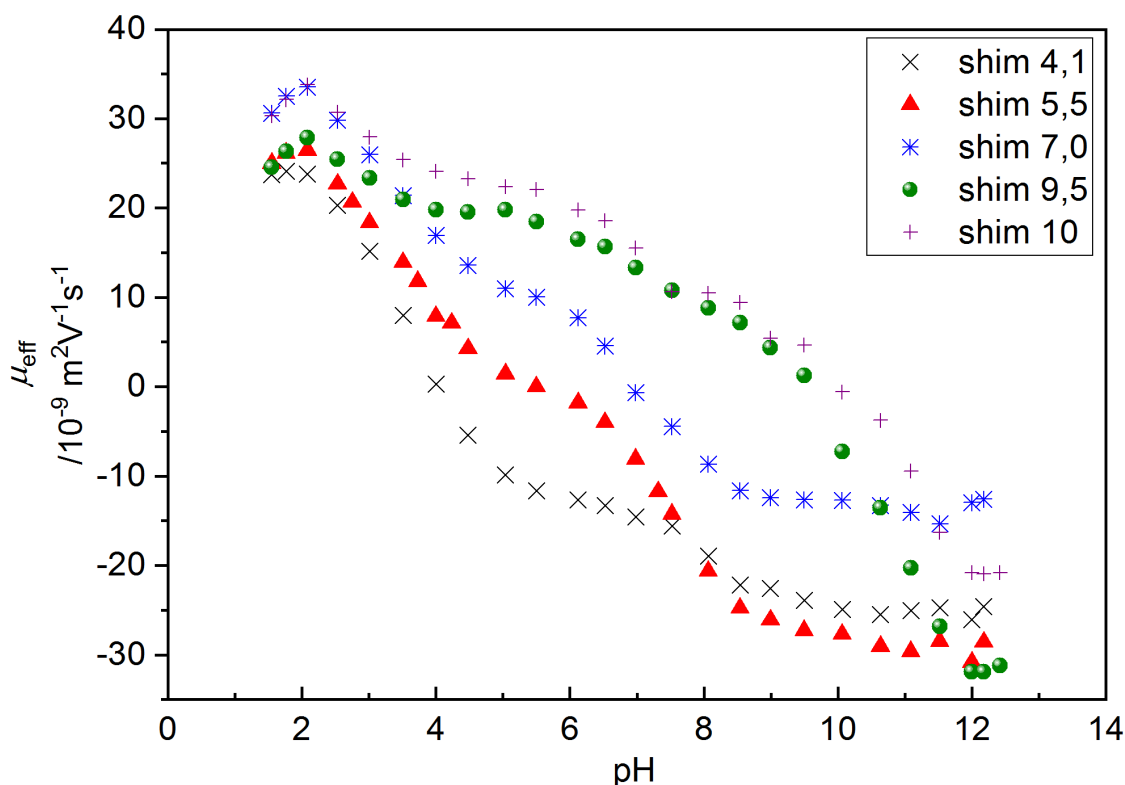
V případě nepokryté křemenné kapiláry anebo kapiláry pokryté fluorocarbonem se analyt při nízkých pH pohybuje rychleji než EOF. Naopak při vysokých pH bude pomalejší (obrázek 10b).

V kapiláře pokryté polybrenem je trend obrácený. V pH nižší než pI , je analyt pomalejší než EOF (obrázek 10a,d), v pH vyšších než pI , bude naopak rychlejší (obrázek 10c).



Obrázek 10 Příklady elektroferogramů z měření Shimurových markerů. a) shim 4,1 v pufru o pH 2,084 při 214 nm, -15 kV, 75 mbar, PB kouting b) shim 4,1 v pufru o pH 8,534 při 214 nm, 15 kV, 75 mbar, FC kouting c) shim 4,1 v pufru o pH 8,991 při 214 nm, -15 kV, 75 mbar, PB kouting d) shim 9,5 v pufru o pH 8,944 při 214 nm, -15 kV, 75 mbar, PB kouting

Elektroferogramy byly vyhodnoceny v programu CEval a získané efektivní elektroforetické pohyblivosti byly spolu se složením používaného pufru vyneseny do programu AnglerFish. Obrázek 11 znázorňuje získané závislosti nekorigované efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH pro jednotlivé markery. Můžeme pozorovat, že se křivky v extrémních pH stáčí nazpátek, jde o důsledek rozdílné iontové síly hraničních pufrů.



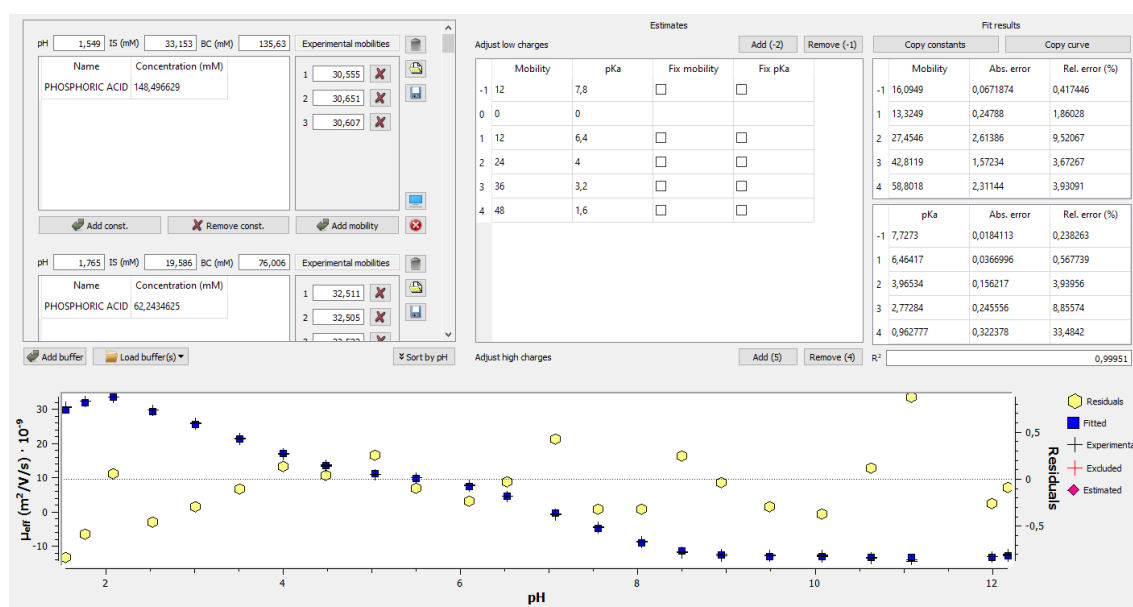
Obrázek 11 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH pro pět Shimurových markerů o různých izoelektrických bodech. Každý bod je průměrem ze 3-5 naměřených hodnot. Označení zahrnuje kód shim a *pI* udávané výrobcí.

4.3.3 Vyhodnocení v AnglerFish

Pro vyhodnocení dat v programu AnglerFish je nutné znát složení a pH pufrů, v kterých měříme, ale rovněž znát počet pK_A analytu. V případě Shimurových markerů bylo toto ztíženo, protože se zakoupil kit pro IEF od Beckman, kde se uvádí pouze *pI* a struktura markerů je udržována v tajnosti. V článkách od Shimury[35] se dohledalo, které markery mají zhruba *pI* měřených markerů, což poskytlo výchozí odhad s kolika pK_A počítat.

Lepší odhad byl pak učiněn na základě proměřených mobilitních křivek, v kterých bývá patrný počet „skoků“ naznačujících pK_A . V případě nejistoty se za správnější považovalo takové složení, které poskytlo vyšší přesnost stanovení pK_A . Situace je komplikována skutečností, že pK_A v extrémních pH nejsou vždy měřitelná, a tedy pozorovatelná na mobilitní křivce, takže skutečný počet disociačních konstant může být vyšší než ten, který jsme určili.

Pro příklad vyhodnocení viz obrázek 12. Na příkladu markeru s udávaným pI 7,0 vidíme, že elektroforetická pohyblivost, již se dosahuje na kyselé straně škály pH, je trojnásobná oproti zásadité straně. To naznačuje, že daný oligopeptid má více funkčních skupin disociujících v kyselé oblasti pH, a náš odhad tomu odpovídá. Odhad krajního pK_A se nachází v oblasti mimo naměřená data, proto je jeho stanovení zatíženo významnou chybou. Podobně se postupovalo i u ostatních markerů a vyhodnocené disociační konstanty a limitní elektroforetické pohyblivosti jsou i se směřodatnými odchylkami zaznamenány v tabulce 5.



Obrázek 12 Příklad rozhraní programu AnglerFish, vyhodnocení pro marker shim 7,0. Vlevo nahoře je uvedeno složení a pH pufru spolu s efektivními elektroforetickými pohyblivostmi, které byly naměřeny. Uprostřed nahoře se vkládají odhady mobilit a pK_A , rovněž jejich počet. Vpravo nahoře jsou iteračně získané hodnoty pK_A a limitních pohyblivostí. Ve spodní části obrázku jsou experimentální data jako černé křížky, modře jsou pak body fitované křivky. Žluté body představují residua, odchylky fitu od experimentálních hodnot. V rozumných mezích jsou v případě, kdy je jejich rozsah menší než ± 1 .

Tabulka 5 Limitní iontové mobility μ_{lim} a termodynamické hodnoty pK_A jednotlivých markerů zkorigované na nulovou iontovou sílu pomocí AnglerFish se směrodatnými odchylkami σ . Označení zahrnuje kód shim a pI udávané výrobcí.

Náboj	pK_A	σ	μ_{lim}	σ
-	-	-	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
shim 4,1				
+2	1,96	0,07	34,78	0,25
+1	3,39	0,02	22,43	0,61
-1	4,52	0,02	15,86	0,08
-2	8,11	0,02	31,88	0,05
shim 5,5				
+2	2,46	0,07	35,52	0,26
+1	3,99	0,04	19,10	0,81
-1	6,97	0,07	16,51	1,43
-2	8,19	0,07	36,22	0,11
shim 7,0				
+4	0,96	0,32	58,80	2,30
+3	2,77	0,25	42,81	1,57
+2	3,97	0,16	27,45	2,62
+1	6,46	0,04	13,32	0,25
-1	7,73	0,02	16,09	0,07
shim 9,5				
+3	2,32	0,04	39,60	0,19
+2	6,62	0,04	25,28	0,11
+1	8,93	0,04	12,51	0,24
-1	10,36	0,06	20,67	1,70
-2	11,58	0,08	42,47	0,32
shim 10				
+3	2,51	0,04	46,41	0,27
+2	6,96	0,04	30,36	0,11
+1	9,65	0,04	14,55	0,24
-1	10,89	0,07	19,70	1,56
-2	12,39	0,22	35,28	1,88

Hodnoty disociačních konstant pro náboj +1 a -1 však byly ve všech případech stanoveny s vyhovující přesností, která umožnila vypočítat izoelektrický bod (rovnice 3) a izomobilitní bod (rovnice 4) podle rovnic v oddílu 2.5. i se směrodatnými odchylkami (rovnice 6 a 7). Dále se počítala hodnota ΔpK_A z rozdílu mezi přílehlými pK_A . Tyto jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Izoelektrické a izomobilitní body jednotlivých markerů s příslušnými směrodatnými odchylkami σ a hodnotami ΔpK_A , vypočítané z dat v tabulce 5. Označení zahrnuje kód shim a pI udávané výrobcí.

	shim 4,1	shim 5,5	shim 7,0	shim 9,5	shim 10
pI	3,953	5,481	7,096	9,644	10,272
σ_{pI}	0,014	0,042	0,021	0,037	0,038
ΔpK_A	1,14	2,98	1,26	1,44	1,24
pI_{mob}	3,878	5,449	7,137	9,503	10,337
$\sigma_{pI_{mob}}$	0,015	0,047	0,021	0,041	0,042

Opět pozorujeme, že se izoelektrický a izomobilitní bod ve většině případů liší zcela minimálně, v rámci experimentální chyby. Pozorovatelný rozdíl je důsledkem odlišných pohyblivostí záporně a kladně nabitě formy látky. Některé elektroforetické pohyblivosti ovšem byly zejména v případě blízkých pK_A stanoveny se značnou chybou a nelze je tedy s jistotou prohlásit za správné. Hodnoty ΔpK_A se zdají být stabilně dobré, s výjimkou poněkud zvýšené hodnoty pro shim 5,5.

4.4 Diskuze a srovnání

Šlais a jeho tým stanovovali hodnoty pI markerů, které připravili, nejprve pomocí potenciometrické titrace nebo gelové IEF a později výsledky zpřesnili pomocí kapilární izoelektrické fokusace. Proto se nabízí porovnat hodnoty, které jsme naměřili pomocí kapilární zónové elektroforézy a vyhodnotili programem AnglerFish, s hodnotami, které naměřil Šlaisův tým. Porovnání je obsaženo v tabulce 7.

Tabulka 7 Hodnoty pI uváděné výrobcí pro Šlaisovy markery, stanovené podle cIEF (pI cIEF), hodnoty pI získané Šlaisem z potenciometrické titrace a gelové IEF [2] (pI titrace/gel IEF), $-dz/dpH$ uváděné Šlaisem ($-dz/dpH$ článek), námi naměřené hodnoty pI pomocí kapilární zónové elektroforézy (pI CZE) a $-dz/dpH$ vypočítané z našich experimentálních dat ($-dz/dpH$ exp. data)

pI cIEF	pI titrace/gel IEF	$-dz/dpH$ článek	pI CZE	$-dz/dpH$ exp. data
3,16	4,00	-0,82	3,68	-0,90
3,93	3,90	-0,53	3,92	-0,94
4,55	4,20	-0,54	4,40	-0,55
4,56	5,30	-0,70	4,25	-0,89
4,75	4,00	-0,70	4,44	-0,59
5,30	5,30	-0,93	5,52	-0,09
5,95	5,90	-0,59	6,07	-0,10
6,21	6,40	-0,31	6,56	-0,08
6,74	7,00	-0,39	7,02	-0,09
7,24	7,50	-0,63	7,47	-0,38
7,54	7,90	-0,86	7,77	-0,34
8,24	8,50	-0,98	8,65	-0,60
8,83	8,90	-0,94	9,32	-0,41
10,08	10,10	-0,64	10,53	-0,35

Překvapivě jsou hodnoty z potenciometrické titrace/gelové IEF ve většině případů bližší námi stanoveným hodnotám než hodnoty z cIEF. U markerů s pI v méně

extrémních pH je shoda poměrně vysoká. V extrémních pH se naopak zvyšuje rozdíl mezi hodnotami získanými všemi způsoby.

Rozdíl je značně vysoký u npim 4,56, což bude patrně dáno skutečností, že látka obsahovala při měření vedlejší píky, a tedy zřejmě nebyla zcela čistá. Významně odlišné hodnoty u ní vycházely už Šlaisovi u jeho dvou přístupů k měření.

Dále je vhodné upozornit na npim 4,75, kde Šlaisovi vyšly zvolenými přístupy výrazně odlišné hodnoty. Zde byla rovněž při elektroforéze výrazně pozorovatelná příměs, která získávala náboj v zásaditém pH, pravděpodobně jednosytná slabá kyselina s pK_A zhruba 6,4. Její přítomnost mohla výrazně ovlivnit Šlaisova měření. Při CZE ale její přítomnost nehraje roli a stanovení by mělo být přesné.

Dále pozorujeme, že pro látky s pI pod 5 byly námi stanovené hodnoty izoelektrického bodu lehce nižší než hodnoty z cIEF. Pro ostatní pH jsou ovšem hodnoty z CZE systematicky vyšší. Ve srovnání s titrací a gelovou IEF jsou naše hodnoty ve většině případů vyšší.

Jedno z kritérií pro dobrý marker je co nejvyšší hodnota $-dz/dpH$, tedy co nejstrmější směrnice přechodu přes nulu. Markery s pI v oblasti 3-5 mají velice dobré hodnoty $-dz/dpH$, v některých případech z našich měření vyšly i vyšší hodnoty než autorům původního článku. Rovněž jejich ΔpK_A uvedená v tabulce 4 z kapitoly 4.2.3. nepřesahují 2, čímž s přehledem splňují definici dobrého markeru uvedenou v kapitole 2.6. (tedy $\Delta pK_A < 3$).

Naopak markery v oblasti $pI = 5-7$ mají extrémně nízké hodnoty $-dz/dpH$. Nejvýraznější rozdíl mezi hodnotou naší, a hodnotou ze Šlaisova článku, lze vidět u npim 5,30, kde je skoro řádový rozdíl. I na obrázku 5 z kapitoly 4.2.2. je patrné, že je směrnice závislosti mobility na pH pro tuto skupinu markerů v blízkosti nuly velmi nízká, křivka je zploštělá. V tabulce 4 z kapitoly 4.2.3. je vidět, že všechny 4 markery v této oblasti mají ΔpK_A vyšší než 3, což je v rozporu s definicí dobrého markeru uvedenou v kapitole 2.6.

Co se týče markerů s $pI = 7-10$, hodnoty $-dz/dpH$ vyšly z našich dat nižší než Šlaisovi, ovšem stále jde o slušné hodnoty, které naznačují, že se marker dokáže dobře zfokusovat. Jejich ΔpK_A se pohybují v okolí 2 a splňují tedy definici dobrého markeru.

Jelikož Šlais stanovoval při cIEF pI pomocí kitu Shimurových markerů, byly měřeny i ty. Získané hodnoty pI jsou uvedeny v tabulce 8 spolu s hodnotami udávanými v Shimurově článku u látek, které předpokládáme, že jsou týmiž markery.

Tabulka 8 Hodnoty pI uváděné výrobcí pro Shimurovy markery (pI uváděné), hodnoty pI uváděné v článku Shimura, Electrophoresis 2000 [3] (pI det článek), hodnoty $-dz/dpH$ uváděné v témže článku ($-dz/dpH$ článek), hodnoty pI stanovené námi (pI CZE), hodnoty $-dz/dpH$ vypočítané z našich experimentálních dat ($-dz/dpH$ exp. data)

pI uváděné	pI det článek	$-dz/dpH$ článek	pI CZE	$-dz/dpH$ exp. data
4,1	4,05	-1,48	3,95	-0,83
5,5	5,52	-0,43	5,48	-0,14
7,0	7,00	-0,77	7,10	-0,73
9,5	9,50	-1,90	9,64	-0,65
10,0	9,99	-1,49	10,27	-0,75

Námi naměřená pI jsou blízká hodnotám uváděným výrobcí. Trochu odchýlenější jsou hodnoty pro marker s pI 9,5 a 10,0. Oba tyto markery se však silně adsorbovaly na stěnu kapiláry, a navíc mají pK_A blízko hraně měřeného rozsahu pH, což může mít za příčinu zkreslení dat. Vesměs můžeme potvrdit, že jsou uváděné hodnoty správné.

Hodnoty $-dz/dpH$ z našich měření opět vyšly menší, než byly uváděné, rozdíl je patrný u všech markerů, ovšem většina přesto dosahuje rozumně vysokých hodnot. Problematický je marker s pI 5,5, jehož hodnota je značně nižší než u ostatních markerů. Při nahlédnutí do tabulky 6 v kapitole 4.3.3. vidíme, že tento marker má hodnotu ΔpK_A těsně na hraně, aby ještě splňoval definici dobrého markeru uvedenou v kapitole 2.6.

Je zajímavé, že jak v případě Šlaisových, tak Shimurových markerů, jsou problematické markery s pI v oblasti 5-7. Zřejmě je obtížnější připravit pro tuto oblast sloučeninu, která by se dobře fokusovala.

5 Závěr

Provedla se rešerše prací autorů zabývajících se problematikou kapilární zónové elektroforézy, izoelektrické fokusace a pI markerů a na jejich základě byl popsán princip kapilární zónové elektroforézy spolu s jevy, které ztěžují její využití a s uvedením programu, který se využívá pro vyhodnocení elektroforézou získaných dat a pro naplánování samotného experimentu. Dále byly vysvětleny principy izoelektrické fokusace, její podoby, vývoj, a zejména význam, který při ní mají izoelektrické markery.

Pomocí kapilární zónové elektroforézy byly v rozsahu pH 2-12 proměřeny závislosti elektroforetické pohyblivosti na pH pro 14 markerů pro izoelektrickou fokusaci vyvinutých Šlaisem a pro 5 markerů vyvinutých Shimurou, jichž Šlais použil pro stanovení pI svých markerů.

Závislosti byly vyhodnoceny v programu AnglerFish a následně byly vypočítány izoelektrické body všech markerů. Jejich hodnoty pak byly porovnány s hodnotami v člancích a hodnotami udávanými výrobcí. U některých markerů se díky elektroforéze zjistila přítomnost nežádoucích příměsí, které přesnost zkreslují. Vesměs se však ukázalo, že udávané hodnoty pI byly stanoveny s poměrně vysokou přesností.

U markerů s pI v oblasti 5-7 se u obou sad ukázalo, že markery nemají příliš dobré fokusační vlastnosti. S jejich výjimkou jsou ostatní studované markery dobrými markery pro izoelektrickou fokusaci.

Lze tedy prohlásit, že bylo dosaženo všech předsevzatých cílů.

6 Použitá literatura

- [1] M. Malý, M. Boublík, M. Pocrnić, M. Ansorge, K. Lorinčíková, J. Svobodová, V. Hruška, P. Dubský, and B. Gaš, “Determination of thermodynamic acidity constants and limiting ionic mobilities of weak electrolytes by capillary electrophoresis using a new free software AnglerFish,” *Electrophoresis*, vol. 41, pp. 493–501, 2020.
- [2] F. Duša, D. Moravcová, and K. Šlais, “Low-molecular-mass nitrophenol-based compounds suitable for the effective tracking of pH gradient in isoelectric focusing,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1076, pp. 144–153, 2019.
- [3] K. Shimura, Z. Wang, H. Matsumoto, and K. I. Kasai, “Synthetic oligopeptides as isoelectric point markers for capillary isoelectric focusing with ultraviolet absorption detection,” *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 603–610, 2000.
- [4] K. Štulík and Univerzita Karlova., *Analytické separační metody*. Karolinum, 2004.
- [5] V. Kašička, “Capillary electrophoresis of peptides,” *Electrophoresis*, vol. 20, pp. 3084–3105, 1999.
- [6] V. Kašička, “Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod.,” *Chem. List.*, vol. 91, pp. 321–325, 1997.
- [7] J. Caldwell, “Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development,” in *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 719, pp. 3–13.
- [8] S. Štěpánová and V. Kašička, “Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomics and peptidomics (2015-mid 2018),” *J. Sep. Sci.*, vol. 42, pp. 398–414, 2019.
- [9] K. Včeláková, I. Zusková, E. Kenndler, and B. Gaš, “Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 25, pp. 309–317, 2004.
- [10] D. Li, S. Fu, and C. A. Lucy, “Prediction of Electrophoretic Mobilities. 3. Effect of Ionic Strength in Capillary Zone Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 687–699, 1999.
- [11] B. Gaš, M. Jaroš, V. Hruška, I. Zusková, and M. Štědrý, “PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis,” *Lc Gc Eur.*, vol. 18, pp. 282-+, 2005.
- [12] S. S. Bahga, M. Bercovici, and J. G. Santiago, “Ionic strength effects on electrophoretic focusing and separations,” *Electrophoresis*, vol. 31, pp. 910–919,

2010.

- [13] V. Hruška, M. Jaroš, and B. Gaš, “Simul 5 – Free dynamic simulator of electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 27, pp. 984–991, 2006.
- [14] D. Corradini and L. Spreccacenero, “Dependence of the Electroosmotic Flow in Bare Fused-Silica Capillaries from pH, Ionic Strength and Composition of Electrolyte Solutions Tailored for Protein Capillary Zone Electrophoresis,” *Chromatographia*, vol. 58, pp. 587–596.
- [15] J. Horvath and V. Dolník, “Polymer wall coatings for capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 644–655, 2001.
- [16] L. Leclercq, M. Morvan, J. Koch, C. Neusüß, and H. Cottet, “Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis,” *Anal. Chim. Acta*, 2019.
- [17] L. Sola and M. Chiari, “Tuning capillary surface properties by charged polymeric coatings,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1414, pp. 173–181, 2015.
- [18] B. Gaš, V. Hruška, M. Dittmann, F. Bek, and K. Witt, “Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis,” *J. Sep. Sci.*, vol. 30, pp. 1435–1445, 2007.
- [19] G. L. Erny, E. T. Bergström, and D. M. Goodall, “Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 959, pp. 229–239, 2002.
- [20] A. Rogacs and J. G. Santiago, “Temperature Effects on Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 5103–5113, 2013.
- [21] C. J. Evenhuis, V. Hruška, R. Guijt, M. Macka, B. Gaš, P. Marriot, and P. Haddad, “Reliable electrophoretic mobilities free from Joule heating effects using CE,” *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 3759–3766, 2007.
- [22] T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi, and J. Akiyama, “Table of isotachophoretic indices,” *J. Chromatogr. A*, vol. 271, pp. D1–D106, 1983.
- [23] R. M. Fuoss, “Ionic Association. I. Derivation of Constants from Conductance Data,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 79, pp. 3301–3303, 1957.
- [24] R. M. Fuoss and L. Onsager, “Conductance of Unassociated Electrolytes,” *J. Phys. Chem.*, vol. 61, pp. 668–682, 1957.
- [25] M. Ansorge, B. Gaš, M. Boublík, M. Malý, J. Šteflová, V. Hruška, and G. Vigh,

“CE determination of the thermodynamic pK_a values and limiting ionic mobilities of 14 low molecular mass UV absorbing ampholytes for accurate characterization of the pH gradient in carrier ampholytes-based IEF and its numeric simulation,” *Electrophoresis*, vol. 41, 2019.

- [26] H. Picton and S. E. Linder, *J. Chem. Soc.*, vol. 71, p. 568, 1897.
- [27] R. R. Williams and R. E. Waterman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 27, p. 56.
- [28] A. Kolin, “Separation and concentration of proteins in a pH field combined with an electric field,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 22. pp. 1628–1629, 1954.
- [29] A. Kolin, “Isoelectric Spectra and Mobility Spectra: A New Approach to Electrophoretic Separation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 41, pp. 101–110, 1955.
- [30] H. Svensson, M. Yhland, W. Evans, G. A. Sim, O. Theander, and H. Flood, “Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes,” *Acta Chem. Scand.*, vol. 16, pp. 456–466, 1962.
- [31] H. Rilbe, “Historical and Theoretical Aspects of Isoelectric Focusing,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 209, pp. 11–22, 1973.
- [32] P. G. Righetti, “Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1037. pp. 491–499, May 28, 2004.
- [33] R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, and Y. N. François, “Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1032, pp. 61–78, 2016.
- [34] T. L. Huang and M. Richards, “Development of a high-performance capillary isoelectric focusing technique with application to studies of microheterogeneity in chicken conalbumin,” *J. Chromatogr. A*, vol. 757, pp. 247–253, 1997.
- [35] K. Shimura, W. Zhi, H. Matsumoto, and K. I. Kasai, “Accuracy in the determination of isoelectric points of some proteins and a peptide by capillary isoelectric focusing: Utility of synthetic peptides as isoelectric point markers,” *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 4747–4757, 2000.
- [36] K. Shimura and K. Kasai, “Fluorescence-labeled peptides as isoelectric point (pI) markers in capillary isoelectric focusing with fluorescence detection,”

Electrophoresis, vol. 16, pp. 1479–1484, 1995.

- [37] O. Vesterberg, C. Larsen, and P. H. Nielsen, “Synthesis and Isoelectric Fractionation of Carrier Ampholytes,” *Acta Chem. Scand.*, vol. 23, pp. 2653–2666, 1969.
- [38] P. G. Righetti, C. Simó, R. Sebastiano, and A. Citterio, “Carrier ampholytes for IEF, on their fortieth anniversary (1967-2007), brought to trial in court: The verdict,” *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 3799–3810, Nov. 2007.
- [39] Q. Mao and J. Pawliszyn, “Effect of salt concentration on separation patterns in static capillary isoelectric focusing with imaging detection,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 729, pp. 355–359, 1999.
- [40] N. J. Clarke, A. J. Tomlinson, G. Schomburg, and S. Naylor, “Capillary Isoelectric Focusing of Physiologically Derived Proteins with On-Line Desalting of Isotonic Salt Concentrations,” American Chemical Society, 1997.
- [41] M. Conti, M. Galassi, A. Bossi, and P. G. Righetti, “Capillary isoelectric focusing: The problem of protein solubility,” *J. Chromatogr. A*, vol. 757, pp. 237–245, 1997.
- [42] N. Ul, “Isoelectric points and conformation of proteins. I. Effect of urea on the behavior of some proteins in isoelectric focusing,” *BBA - Protein Struct.*, vol. 229, pp. 567–581, 1971.
- [43] K. Šlais and Z. Friedl, “Low-molecular-mass pI markers for isoelectric focusing,” *J. Chromatogr. A*, vol. 661, pp. 249–256, 1994.
- [44] A. V. Stoyanov and P. G. Righetti, “Ampholyte dissociation theory and properties of ampholyte aqueous solutions,” *Electrophoresis*, vol. 18. Wiley-VCH Verlag, pp. 1944–1950, 1997.
- [45] A. V. Stoyanov and P. G. Righetti, “Steady-state electrolysis of an ampholyte solution and possibility of violation of the ‘law of pH monotony,’” in *Electrophoresis*, 1998, vol. 19, pp. 2269–2272.
- [46] M. Štastná, M. Trávníček, and K. Šlais, “New azo dyes as colored isoelectric point markers for isoelectric focusing in acidic pH region,” *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 53–59, 2005.
- [47] R. Rodriguez-Diaz, T. Wehr, and M. Zhu, “Capillary isoelectric focusing,” *Electrophoresis*, vol. 18, pp. 2134–2144, Nov. 1997.
- [48] D. Mohan and C. S. Lee, “Extension of separation range in capillary isoelectric

focusing for resolving highly basic biomolecules,” in *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 979, pp. 271–276.

- [49] K. Šlais, M. Horká, J. Nováčková, and Z. Friedl, “Fluorescein-based pI markers for capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection,” *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 1682–1688, 2002.
- [50] S. Molteni, H. Frischknecht, and W. Thormann, “Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants,” *Electrophoresis*, vol. 15, pp. 22–30, 1994.
- [51] K. Šlais and Z. Friedl, “Ampholytic dyes for spectroscopic determination of pH in electrofocusing,” *J. Chromatogr. A*, vol. 695, pp. 113–122, 1995.