

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra analytické chemie

Bioanalytické aplikace elektroforézy

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Hradec Králové, 2009

Andrea Martincová

Děkuji především své školitelce doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za trpělivost, odbornou pomoc a užitečné rady během vypracování této práce. Dále děkuji Mgr. Janovi Honegrovi a prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové za další odborné rady.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Všechna literatura a další zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, 23.4. 2009

Podpis:

Obsah

1	Úvod.....	5
2	Cíl práce.....	5
3	Biopolymery	6
3.1	Bílkoviny	6
3.1.1	Primární struktura	6
3.1.2	Sekundární struktura	8
3.1.3	Terciární struktura.....	8
3.1.4	Kvartérní struktura.....	8
3.1.5	Posttranslační modifikace	9
3.2	Plazmatické bílkoviny.....	9
3.2.1	Elektroforetické frakce	10
3.2.2	Typy elektroforeogramů	10
3.2.3	Bílkoviny krevní plazmy	10
4	Separční metody.....	15
5	Elektromigrační (elektroforetické) metody	17
5.1	Objev elektromigračních metod.....	17
5.2	Princip elektroforézy.....	18
5.2.1	Elektroforetická pohyblivost (mobilita).....	18
5.2.2	Elektroforetická pohyblivost u makromolekul	19
5.3	Uspořádání elektroforetické aparatury.....	20
5.4	Dělení elektroforetických metod	20
5.4.1	Volná elektroforéza.....	21
5.4.2	Izoelektrická fokusace (IEF).....	21
5.4.3	Elektroforéza na nosičích.....	21
5.4.4	Kapilární elektroforéza	22
6	Metody vyhledávání použitých zdrojů	23
7	Výsledky řešerše	24
8	Kapilární elektroforéza sérových proteinů	32
9	Závěr	35
10	Seznam použitých zkratk	36
11	Použitá literatura	38

1 Úvod

Elektromigrační (též elektroforetické) metody jsou významnou skupinou separačních instrumentálních metod a v bioanalytické praxi nacházejí široké uplatnění. Analyty se v biomatrici nacházejí spolu se širokým spektrem látek, často velmi podobných fyzikálních a chemických vlastností. Proto je mnohdy nutné před vlastní analýzou tuto směs rozdělit.

V běžné klinické praxi nachází elektroforéza největší uplatnění v laboratořích klinické biochemie při analýze bílkovin. Nejčastěji se stanovují v séru, moči a mozkomíšním moku. Tato práce je zaměřena na analýzu bílkovin v séru.

Nejvíce používaná je elektroforéza v gelu, nejčastěji agaroforéza. Tato technika je stále nejvýhodnější pro analýzu v menších laboratořích. Kapilární elektroforéza umožňuje oproti agaroforéze rychlejší analýzu a je vhodná pro laboratoře které zpracovávají více vzorků. V rámci centralizace a konsolidace laboratoří dochází ke spojování laboratoří ve větší celky. Tím nabývá na významu metoda kapilární elektroforézy, proto jsem se rozhodla zaměřit tuto práci na stanovení sérových proteinů metodou kapilární elektroforézy.

2 Cíl práce

Cílem této práce je vyhledat v odborné literatuře práce týkající se analýzy sérových proteinů s využitím metod kapilární elektroforézy. Na základě zpracování zveřejněných elektroforetických dat pak vytvořit přehled těchto metod za období 2008-2009 a kriticky zhodnotit publikované základní parametry elektroforetických systémů a postupů.

3 Biopolymery

Biopolymery jsou nejvýznamnější sloučeniny v živém organismu. Patří k nim bílkoviny, nukleové kyseliny a polysacharidy. Jsou složeny z jednotek, tzv. monomerů. U bílkovin existuje asi dvacet základních monomerů, aminokyselin. Z tohoto nevelkého počtu mohou tvořit ohromné množství různých polymerních molekul, řádově 10^{100} až 10^{1000} . Tento princip výstavby dal proteinům možnost zdokonalování a v průběhu evoluce umožnil vznik „živé hmoty“. [1]

3.1 Bílkoviny

Po chemické stránce jsou proteiny nejsložitější a funkčně nejdůmyslnější známé molekuly. [2] Tvoří asi jednu polovinu suché hmotnosti buňky. Účastní se všech základních životních procesů a mají v buňce nezastupitelné funkce:

- strukturální funkce (jsou to stavební součásti buňky)
- metabolická funkce (realizují chemický metabolismus)
- informační funkce (jako signály nebo receptory signálů regulují buněčné procesy). [1]

Metody analýzy jsou založeny na vlastnostech analyzované látky. Funkce a vlastnosti proteinů jsou dány jejich strukturou, proto je důležité se seznámit i se stavbou proteinů. [2]

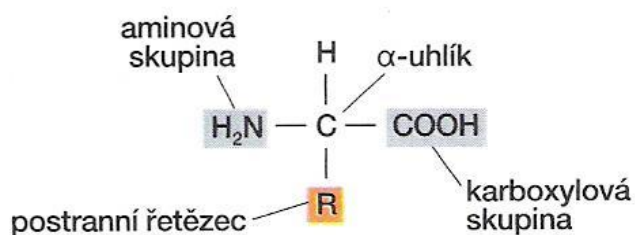
Strukturu bílkoviny můžeme rozdělit na několik úrovní:

3.1.1 Primární struktura

Jak již bylo zmíněno, monomerem bílkovin jsou aminokyseliny. Primární struktura je určena pořadím aminokyselin v polypeptidovém řetězci a jejich zastoupením v molekule.

Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou odvozeny od organických kyselin. Na α -uhlík v jejich molekule je navázaná aminoskupina. [1]



Obr. 1 Obecný vzorec aminokyseliny [1]

Bílkoviny jsou tvořeny aminokyselinami, které patří převážně k α -aminokyselinám. V bílkovinném řetězci jsou vždy L-izomery aminokyselin, D-izomery byly nalezeny jen v peptidech buněčné stěny některých bakterií. [1]

Struktura peptidového řetězce

V bílkovinném řetězci jsou aminokyseliny pospojovány peptidovou vazbou. Ta vzniká spojením aminoskupiny na α -uhlíku (2. uhlíku) jedné aminokyseliny s karboxylovou skupinou další aminokyseliny. Při tvorbě peptidové vazby se vylučuje molekula vody, takže jde vlastně o kondenzaci.

Peptidový řetězec vzniká spojením více aminokyselin. Od jeho osy odstupují postranní řetězce. Každý peptidový řetězec má dva konce; jeden je ukončen $-NH_2$ skupinou (označuje se N-konec) a druhý $-COOH$ skupinou (označuje se C-konec). Pro zápis aminokyselin v řetězci platí standardní pravidla, vždy je zapisujeme od jejich N-konce. [1]

Aminokyselinové složení bílkovin

Pro zjištění aminokyselinového složení proteinů je třeba provést nejprve úplnou hydrolýzu bílkovin. Výsledek se pak vyjadřuje v %. Procentuální složení je charakteristickým znakem každé bílkoviny.

O vlastnostech bílkovin rozhodují postranní řetězce jejich aminokyselin. Z fyzikálně-chemického hlediska je můžeme dělit na kyselé (např. kys. arparagová, kys. glutamová), bazické (např. arginin, lysin, histidin) a neutrální. [1] Dále je můžeme rozdělit podle hydrofobicity. Nepolární (hydrofobní) postranní řetězce v proteinu (obsahující např. $-CH_3$), které mají např. fenyلالanin, leucin, valin a tryptofan, se snaží shlukovat uvnitř molekuly. Tím omezují svůj kontakt s vodným prostředím buňky. Naopak polární postranní řetězce, např. u argininu, glutaminu a histidinu (obsahující $-COOH$ nebo $-OH$ skupiny), se snaží zadržovat se na povrchu molekuly, kde tvoří vodíkové můstky s molekulami vody a jiných polárních látek. [2]

Sekvence aminokyselin

Vlastnosti bílkoviny jsou určeny jak aminokyselinovým složením, tak i jejich pořadím v řetězci. V současnosti se primární struktura odvozuje podle sekvencí nukleotidů v DNA, které bílkovinu kódují. Primární struktura určuje vlastnosti celé molekuly, tedy i její biologickou funkci. [1]

3.1.2 Sekundární struktura

Sekundární strukturou označujeme uspořádání bílkovinného řetězce. Tvoří struktury jako je α -helix, β -skládaný list a náhodné smyčky. V molekulách proteinů se obvykle vyskytují obě hlavní struktury (α -helix i β -skládaný list) a přechody mezi nimi jsou z náhodných smyček. Struktura je udržována hlavně vodíkovými vazbami. [3]

3.1.3 Terciární struktura

Je to struktura bílkoviny v prostoru, která je stabilizována vodíkovými vazbami, iontovými vazbami, disulfidickými vazbami, Van der Waalsovými silami a hydrofobními interakcemi. Nejvíce se na jejím udržení podílí hydrofobní interakce. [3]

Proteiny můžeme podle tvaru jejich molekuly jednoduše rozdělit na:

- globulární - osa molekuly je sbalena do klubíčka, jsou částečně rozpustné ve vodě (např. imunoglobuliny, albumin)
- fibrilární - bílkovinné řetězce jsou nataženy a spojeny příčnými vazbami, tvoří základ mechanicky pevných struktur (např. kolagen, elastin). [4]

3.1.4 Kvartérní struktura

Některé bílkoviny jsou složeny z podjednotek, jejichž uspořádání označujeme jako kvartérní strukturu. Podle počtu podjednotek proteiny můžeme označovat jako dimerní, tetramerní, atd. Podle jejich druhu je dělíme na homodimery a heterodimery. [1] Příkladem bílkoviny složeny z podjednotek může být molekula IgG. Skládá se ze dvou identických lehkých řetězců a dvou identických těžkých řetězců. [3] Kvartérní struktura je vždy udržována nekovalentními vazbami. Polymerní bílkoviny proto mohou snadno disociovat na své podjednotky a následně znovu resociovat. Kvartérní struktura určuje biologickou aktivitu proteinů, proto změna této struktury může být důležitou cestou jejich regulace. [1]

Podle podjednotek dělíme proteiny na:

- jednoduché - složeny jen z bílkovinných řetězců (albumin, kolagen)
- konjugované - obsahující bílkovinnou část (apoprotein) a nebílkovinnou část (prostetická skupina); podle druhu nebílkovinné části rozeznáváme lipoproteiny (lipid), fosfoproteiny (fosfát), metaloproteiny (iont kovu), nukleoproteiny (DNA, RNA), glykoproteiny a mukoproteiny (cukerná složka) [4]

3.1.5 Posttranslační modifikace

Sekvence aminokyselin v řetězci proteinu je sice dána sekvencí nukleotidů v DNA, ale po přepsání do struktury řetězce je protein ještě upravován posttranslační modifikací. Touto modifikací může být fosforylace, N-terminální acetylace, acetylace postranních řetězců, C-terminální amidace glycinu, sulfatace tyrosinových skupin nebo γ -karboxylace glutamové kyseliny. Tyto úpravy mohou ovlivnit nejen funkci proteinu, ale i jeho pohyblivost při elektroforéze. [3]

3.2 Plazmatické bílkoviny

V krevní plazmě můžeme prokázat mnoho různých bílkovin, které se liší funkcí, koncentrací i velikostí molekuly. Většina bílkovin je tvořena v játrech, část v plazmatických buňkách. V organismu zastávají různé funkce:

- udržují onkotický tlak (nejvíce albumin)
- udržují pH krve (fungují jako pufry)
- účastní se imunitních reakcí organismu (nejvíce se uplatňují imunoglobuliny - specifická imunita a komplement - nespecifická imunita)
- funkce hemokoagulace a fibrinolýzy (plazmatický koagulační a fibrinolytický systém)
- transportují řadu látek (hlavně látky nerozpustné ve vodě - řadu minerálů, lipidů, hormonů, např. albumin a prealbumin, transferin, ceruloplazmin, apoproteiny,...)
- funkce enzymů a jejich inhibitorů (např. cholinesteráza a ceruloplazmin, inhibiční funkce se uplatňuje zejména při zánětu, kdy štěpí proteolytické enzymy, které by poškodily tkáň - např. α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, α_2 -makroglobulin)
- další specializované funkce (poznatky se v této oblasti teprve rozvíjejí, tuto funkci má např. haptoglobin, hemopexin, ceruloplazmin)

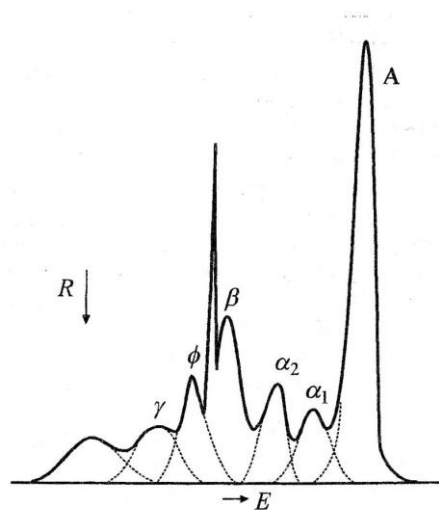
Při stanovování množství jednotlivých druhů bílkovin vycházíme z celkové koncentrace bílkovin v krevní plazmě, resp. v krevním séru, která se fyziologicky pohybuje v rozmezí 62-82 g/l. Většina patologických stavů neovlivňuje hladinu všech typů bílkovin, většinou dochází ke změně jedné nebo několika málo bílkovin. Je proto mnohem výhodnější stanovovat při diagnostice změny jednotlivých elektroforetických frakcí. To umožňuje odhalit poruchu specifičtěji a dříve. [5]

Pro vyšetření se používá spíše sérum než plazma. Odběr séra je ekonomicky výhodnější a pro interpretaci je přehlednější, když v elektroforeogramu frakce fibrinogenu chybí. Fibrinogen se častěji stanovuje jinými metodami.

3.2.1 Elektroforetické frakce

Pomocí elektroforézy se sérové proteiny separují do 5-6 frakcí: frakce albuminu, globulinů α_1 , α_2 , β (často β_1 a β_2) a γ . Frakce albuminu je tvořena pouze jednou bílkovinou, ostatní frakce jsou tvořeny směsí proteinů, které se liší podílem, funkcí i barvitelností a některé přesahují i z jedné frakce do druhé.

Za patologických stavů může dojít ke zmnožení, posunu, vymizení i k vytvoření nových frakcí. Dlouholetou zkušeností byly vytvořeny tzv. elektroforetické typy. Ty ukazují typický elektroforetický obraz při určité chorobě.



Obr. 2 Elektroforeogram lidského séra [6]

3.2.2 Typy elektroforeogramů

Rozlišuje se typ akutního zánětu, chronického zánětu, chronické hepatopatie, nefrotického syndromu, malnutriční typ a typ monoklonální hyperimmunoglobulinémie. U chronické hepatopatie se objevuje tzv. β - γ můstek, který je tvořen zvýšením IgA.

Fyziologické změny

U kojenců a malých dětí nacházíme relativně větší podíl albuminu a fyziologicky snížené γ -globuliny (imunoglobuliny se tvoří postupně). Typické je také zvýšení α_1 - a hlavně α_2 -globulinů (dáno α_2 -makroglobulinem). U těhotných žen bývá přítomný nižší podíl albuminu (následkem hemodiluce) a zvýšené frakce α_1 , α_2 a β_1 -globulinů (zvýšením α_1 -antitrypsinu, ceruloplazminu a transferinu). [5]

3.2.3 Bílkoviny krevní plazmy

Zóna albuminu

prealbumin (transthyretin)

Tvoří se v játrech. Je to transportní protein pro hormony štítné žlázy, hlavně pro T4. Dále zabraňuje ztrátám vitamínu A močí tím, že tvoří komplex s bílkovinu

transportující vitamin A (retinol binding protein - RBP), ten už není schopen projít glomerulární membránou. Snížená koncentrace albuminu je důsledkem poruchy proteosyntézy v játrech u proteinové malnutrice a těžkých hepatopatií.

albumin

Má dlouhý biologický poločas (20 dní), u akutních stavů se projeví poměrně pozdě. Jeho molekulová hmotnost je asi 68 000. V plazmě je ho z plazmatických bílkovin nejvíce (35-53g/l). Na onkotickém tlaku se podílí až z 75%, proto může být pokles jeho koncentrace doprovázen otoky a vede k aktivaci osy renin-angiotenzin-aldosteron. V těle má transportní funkci. Přenáší nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, hormony štítné žlázy (T4 a T3), vápník, hořčík, zinek, další minerály a značnou část některých léků, (penicilin, salicyláty, digoxin,...). U pacientů s hypoalbuminemií tím může být zvýšena účinná volná frakce léku. Látky se mohou z vazby na albumin vzájemně vytěšňovat, např. volné mastné kyseliny vytěšňují bilirubin a ohrozit CNS u novorozenců. Albumin pomáhá udržet acidobazickou rovnováhu a uplatňuje se i v ochraně proti volným radikálům.

Analbuninémie je vzácná dědičná choroba při které je sérová koncentrace albuminu pod 2,0 g/l. Jako kompenzace onkotického tlaku se zvyšují koncentrace ostatních plazmatických bílkovin.

Hypoalbuminémie je častý nález a může být způsobena fyziologicky v těhotenství, sníženou syntézou (těžká hepatopatie a proteinová malnutrice), zvýšeným katabolismem (akutní záněty a stavy, nádory), zvýšenými ztrátami (nemoci ledvin, GITu, kůže) a hyperhydratací pacienta (způsobené naředěním vnitřního prostředí).

Alfa₁-globuliny

alfa₁-inhibitor proteáz (API), též α_1 -antitrypsin (AAT)

Je to glykoprotein jehož funkcí je inhibovat proteolytické enzymy, hlavně elastázu a kolagenázu, uvolňujících se z makrofágů při zánětlivé reakci.

Zvýšená hladina je fyziologicky v těhotenství, patologicky u akutních stavů a zánětů. Snížená hladina je u těžkých hepatopatií a dědičné poruchy tvorby AAT. Zdraví jedinci mají alely typu MM, postižení typu ZZ. Nefunkční AAT se hromadí v hepatocytech. Tím může dojít k rozvoji cirhózy. Pokud je hladina AAT snížena pod 15% normálních hodnot, projeví se to hlavně v plicích. Kolagenáza a elastáza porušuje vazivo mezi sklípky a rozvíjí se emfyzém (juvenilní typ). Vyvolávacím faktorem je kouření. Působí na makrofágy a stimuluje je k uvolňování elastázy.

alfa₁-kyselý glykoprotein (orozomukoid)

Obsahuje ve své molekule 41,4% cukrů. Jeho funkce v organismu dosud není známa, ale jeho koncentrace stoupá u akutních stavů a klesá při poruchách proteosyntézy v játrech.

alfa₁-fetoprotein

Používá se jako tumorový marker a v prenatální diagnostice.

alfa₁-lipoprotein

Odpovídá lipoproteinu HDL.

alfa₁-mikroglobulin

Tlumí migraci leukocytů a jejich proliferační odpověď na antigen. V séru stoupá při poruše glomerulární filtrace, při nálezů v moči vypovídá o poruše tubulů.

Alfa₂- globuliny

alfa₂-makroglobulin

Má velkou molekulu, jeho mol. hmotnost je 820 000. Slouží jako inhibitor proteáz. Kvůli své velké molekule špatně proniká glomerulem. Fyziologicky je zvýšen u dětí. Je zvýšen u pacientů s nefrotickým syndromem a chronických hepatopatií. Snížená koncentrace se objevuje u akutní pankreatitidy.

haptoglobin

Je to tetramerní glykoprotein, je tvořen dvěma řetězci α a dvěma β . Řetězce α jsou třech typů, tím vznikají různé typy haptoglobinů, které můžeme rozlišit např. elektroforézou ve škrobovém gelu. Dříve se za jeho hlavní funkci považovalo vychytávání uvolněného hemoglobinu, dnes je to zábrana vzniku hydroxylového radikálu, na kterém se podílí volný hemoglobin. Zvýšená koncentrace haptoglobinu je u akutních stavů, snížená koncentrace u poruch jater, velmi nízká koncentrace je při intravaskulární hemolýze.

ceruloplazmin

Slouží k transportu mědi a brání vzniku hydroxylového radikálu. Fyziologicky je koncentrace ceruloplazminu vyšší v těhotenství, jeho snížená tvorba je u Wilsonovy choroby.

feritin

Je to zásobní bílkovina pro železo, jeho koncentrace odráží zásoby železa.

K α_2 -globulinům dále patří proteiny pro transport hormonů, např. transkortin, přenášející kortizol a globulin vázající thyroxin (thyroxin binding protein - TBP).

Beta globuliny

transferin

Váže v plazmě železo a umožňuje jeho transport. Fyziologicky je železem nasycena 1/3 celkového množství transferinu. Jeho koncentrace stoupá při nedostatku železa v organismu, pokles koncentrace se objevuje u nemocí s přebytkem železa a při poruchách jater, mírně klesá při akutní zátěži.

U alkoholiků se objevuje bezsacharidový transferin (carbohydrate-deficient transferin, CDT). Je to transferin, který je na konci každé podjednotky zakončen jedním nebo dvěma sacharidovými řetězci zakončenými molekulou kyseliny sialové, místo původních čtyř. Vzniká vlivem ethanolu, který snižuje syntézu sacharidů v Golgiho aparátu.

hemopexin

Má podobnou funkci jako haptoglobin, váže hemoglobin. Jeho koncentrace klesá u hemolytické anémie a stoupá u akutních stavů.

složky komplementu C3 a C4

V séru se nejčastěji stanovují tyto složky komplementu. Jejich koncentrace stoupá u akutních stavů a klesá u některých nemocí, např. autoimunitních.

beta-lipoprotein

Odpovídá lipoproteinu LDL.

beta₂-mikroglobulin

Je součástí HLA systému a je homologní s Fc-fragmentem IgG. Je tvořen hlavně myeloidními a lymfoidními buňkami a dá se použít jako tumorový marker. Volně prochází glomerulem. Jeho koncentrace v séru stoupá s poklesem glomerulární filtrace a v moči roste při poruchách tubulů. Dlouhodobě zvýšená koncentrace beta₂-mikroglobulinu a alfa₁-mikroglobulinu může vést k amyloidóze (např. u dialyzovaných pacientů).

C-reaktivní protein (CRP)

Fyziologicky je jeho hladina velmi nízká. Uplatňuje se při imunitní obraně organismu. U zánětů stoupá nejrychleji a nejvýrazněji, u bakteriálních infekcí je koncentrace vyšší než u virových.

fibrinogen

Je to dimerní bílkovina s lineární molekulou. Během elektroforézy se pohybuje mezi β- a γ-globuliny. Uplatňuje se při krevním srážení. Zvýšená koncentrace je součástí reakce akutní fáze a je to rizikový faktor aterosklerózy. Snížená koncentrace se

objevuje při snížené syntéze (poruchy jater) nebo při zvýšené spotřebě (diseminovaná intravaskulární koagulopatie).

Gama globuliny

Ve frakci γ jsou nejvíce zastoupeny imunoglobuliny, ale zasahují i do β - a zčásti i do α_2 - frakce. Slouží jako protilátky a jsou tvořeny buňkami lymforetikulárního charakteru. Jsou složeny z lehkých a těžkých řetězců. Podle typu těžkých řetězců rozlišujeme:

IgG protilátky - mají ve frakci největší podíl a procházejí placentární bariérou

IgA protilátky - v plazmě se vyskytují jako monomery, na sliznicích jako dimery

IgM protilátky - v plazmě jsou jako pentamery, při imunitní reakci vznikají jako první a jejich syntéza probíhá již v játrech plodu

IgD protilátky - jsou přítomny v nízké koncentraci a jejich význam je nejasný

IgE protilátky - vznikají při alergických reakcích

Snížená koncentrace je fyziologicky u novorozenců. Patologicky bývá způsobena sníženou syntézou (dědičnou nebo získanou, např. u mnohočetného myelomu) nebo ztrátou, např. u nefrotického syndromu. Hyperimmunoglobulinémie je buď polyklonální, vznikají protilátky různých typů a na elektroforeogramu je široký γ -pruh (chronické záněty, chronická hepatopatie a autoimunitní choroby), nebo monoklonální, kdy se tvoří jen jeden druh imunoglobulinů a na elektroforeogramu je úzký pruh.

Reakce akutní fáze se projeví změnou zastoupení bílkovin v plazmě. Rozlišují se reaktanty :

- pozitivní - při reakci stoupá jejich syntéza a tedy i koncentrace, např. inhibitory proteáz (α_1 -inhibitor proteáz), alfa₁-kyselý glykoprotein, haptoglobin, hemopexin, koagulační faktory, sérový amyloid A (SAA) a CRP, dále mírněji stoupají složky komplementu
- negativní - jejich koncentrace klesá důsledkem zvýšeného katabolismu a snížené syntézy, např. albumin, prealbumin a transferin [5]

4 Separační metody

Analyzované vzorky jsou většinou směsí látek. Jen některé metody a typy vzorků nám dovolují stanovit analyt přímo, ve většině případů je před vlastní analýzou potřeba složky směsi oddělit, odseparovat. Separace je zvláště potřebná u složitých směsí ve kterých mají látky podobné analytické vlastnosti. [7] Pro separaci hledáme takovou vlastnost analytu, kterou se odlišuje od ostatních látek v matici.

Separace je proces, při kterém je vzorek rozdělen minimálně na dva podíly, které se liší svým složením. Na úspěšnosti separace závisí přesnost a správnost celé analýzy. [8]

K dělicím metodám patří i běžně používané postupy, jako je selektivní srážení, sublimace, destilace apod. V užším slova smyslu se jako separační metody označují extrakce, chromatografické a elektroforetické postupy. Mají vysokou separační účinnost a mnohdy nevyžadují použití další analytické metody, tzn. spojují v sobě oddělení i analýzu látky. Separační metody se používají nejen pro analýzu, ale i pro preparativní postupy. [7]

Separační postupy charakterizujeme několika parametry:

Selektivita metody

Vyjadřuje schopnost metody odseparovat analyt. Selektivnější metoda umožňuje oddělit látky s velmi podobnými vlastnostmi. Využívají se vlastnosti chemické (např. rozdíl polarity) nebo fyzikální (např. rozdílná teplota varu).

Rozsah použitelnosti

Určuje na jaké typy vzorků lze metodu použít, např. jen pro ionty, makromolekuly, plyny, atd.

Frakcionační kapacita

Udává nejvyšší počet složek, které mohou být odděleny během jedné operace. Např. sublimace má frakcionační kapacitu dvě, plynová chromatografie až několik set.

Separační metody dělíme na metody založené na rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze, membránové separace a separace polem, ke kterým řadíme elektroforézu.

Největší význam pro analytickou chemii mají chromatografické metody, různé typy extrakcí a elektromigrační metody. [8]

Velkou výhodou elektromigračních metod ve srovnání s chromatografickými je jednoduchá příprava vzorku. To je zvláště důležité pro rutinní analýzy velkých souborů vzorků. Doba analýzy bývá obvykle kratší při stejné separační účinnosti. [9]

Při analýze je požadována rychlost a účinnost. Tím se vytváří tlak na vývoj separačních metod. Ten směřuje k miniaturizaci klíčových prvků nebo celého separačního systému, od zmenšování částic sorbentů, přes využití nanočástic až po technologii separací na čipu. [10]

5 Elektromigrační (elektroforetické) metody

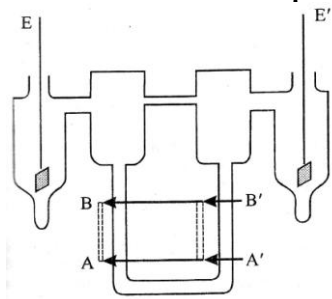
Elektroforetickými metodami nazýváme soubor technik, které využívají pohyb ionizovaných částic ve stejnosměrném elektrickém poli. [11]

5.1 Objev elektromigračních metod

Elektroforézu jako separační techniku poprvé použil Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902 - 1971), profesor univerzity v Uppsale. [12] V r. 1937 rozdělil pomocí elektroforézy směs bílkovin. [11] Roku 1948 za tento objev získal Nobelovu cenu. Zabýval se i výzkumem aminokyselin, sacharidů a složkami virů. [12]

Tiseliův přístroj pracuje na principu volné elektroforézy; rychlost částice se určuje z rychlosti pohybu koncentračního rozhraní. Pohyb rozhraní se sleduje opticky, nejčastěji metodou zkřížených štěrbin. Vzorek proteinu obsahuje obvykle několik složek s různou elektroforetickou pohyblivostí. Každá z nich vytvoří samostatné koncentrační rozhraní. Metoda zobrazuje gradient koncentrace, v záznamu tedy odpovídá každému rozhraní pík, jehož vzdálenost od počátku je úměrná elektroforetické pohyblivosti dané složky. Elektrody jsou umístěny v postranních nádobách, aby se předešlo znečištění měřeného systému produkty elektrolyzy. [6]

Obr. 3 Schéma Tiseliova přístroje na sledování elektroforézy metodou pohyblivého rozhraní. [6]



Čáry AA', BB' vymezují

vodorovně posuvné části

U-trubice, jejichž polohy při plnění

jsou vyznačeny čárkovaně.

Elektromigrační metody využívají dvou elektrokinetických dějů - elektroforézy a elektroosmózy. V roztoku s nabitými částicemi stýkající se s pevným podkladem, který může nést elektrický náboj (stěny kapiláry, povrchy přítomných částic), se tvoří elektrické dvojvrstvy. Časem vzniká rovnovážné rozložení nábojů. Na tento systém se připojuje stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb.

- elektroforéza - vlivem napětí se nabitě částice pohybují směrem k opačně nabitě elektrodě.
- elektroosmóza - vlivem napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda směrem k záporné elektrodě. [8]

5.2 Princip elektroforézy

Hybnou silou pro částice je intenzita elektrického pole E , vyjádřená gradientem napětí v jednotkách $V \cdot m^{-1}$. Sílu působící pohyb částic vyjadřuje součin intenzity pole a velikosti náboje částice.

Proti pohybu částic působí brzdivá síla tření. Třecí síla pohybu kulovité částice je přímo úměrná jejímu poloměru a viskozitě kapaliny (Stokesův zákon). V praxi má jen charakter korelace.

Hybná i brzdivá síla působí na jednotlivé druhy iontů rozdílně, podle jejich náboje a velikosti. Skutečná migrační rychlost je výsledek interakce těchto vlivů. Pro separaci musí být u složek směsi rozdílná.

5.2.1 Elektroforetická pohyblivost (mobilita)

Rychlost elektroforetického pohybu v ($m \cdot s^{-1}$) je závislá mj. na intenzitě použitého elektrického pole. Pro srovnání hodnot měřených v různých podmínkách se zavádí pojem elektroforetická pohyblivost μ . Je to rychlost při jednotkové intenzitě pole: $\mu = \frac{v}{E}$ ($m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$), kde v je rychlost pohybu iontu.

Je nutné uvádět teplotu; změna o 1 stupeň mění pohyblivost o 2 %. Konstantou každého iontu je jeho absolutní pohyblivost. Je to idealizovaná hodnota platná jen pro nekonečně ředěné roztoky a je přímo úměrná limitní vodivosti iontů.

V reálných podmínkách jsou efektivní pohyblivosti většinou nižší než absolutní. Je to způsobeno interakcemi iontů v konečně zředěných roztocích i dalšími okolnostmi.

Efektivní pohyblivost můžeme cíleně ovlivnit volbou vnějších podmínek - složením elektrolytů migračního prostředí. Efektivní pohyblivost iontů silných elektrolytů je poměrně stálá. Ionty slabých elektrolytů mohou svoji efektivní pohyblivost výrazně měnit během reakcí, měnících jejich náboj. Rozhodujícím činitelem je zde pH prostředí. [7]

Jak již bylo uvedeno, můžeme rychlost pohybu iontu vyjádřit vztahem

$$v = \mu E, \text{ kde: } v \text{ je rychlost pohybu iontu}$$

μ elektroforetická pohyblivost a

E intenzita elektrického pole.

Elektroforetická pohyblivost je výsledek rovnováhy mezi silou působící na ionty v elektrickém poli a silou vnitřního tření prostředí.

Tedy: $\mu = \text{síla elektrického pole } F_E / \text{síla vnitřního tření } F_F$

$$F_E = qE$$

$$F_F = -6\pi\eta rv \quad \text{kde: } q \text{ je náboj iontu}$$

η je viskozita roztoku

r poloměr iontu

v rychlost pohybu iontu

Ze vztahu vyplývá, že síla vnitřního tření se mění s viskozitou prostředí. Proto se změnou teploty dojde ke změně této síly a tudíž ke změně rychlosti pohybu částice.

V průběhu elektroforézy dojde k ustavení rovnováhy mezi silou elektrického pole a silou vnitřního tření. V rovnováze mají obě síly stejnou hodnotu, ale opačného směru.

Malé částice s velkým nábojem mají velkou pohyblivost, zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Efektivní mobilita, tj. pohyblivost, kterou skutečně při elektroforéze naměříme, je závislá na pH a použitém pufru. Úspěch separace látek ze směsi lze předpokládat jen tehdy, mají-li separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti. [11]

V kapilární elektroforéze je hybnou silou elektroosmotický tok. Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalně fáze a je důsledkem disociace ionogenních skupin na kapiláře nebo jako selektivní adsorbce jednoho iontu na povrch kapiláry. Unáší všechny ionty stejnou rychlostí a má téměř pravoúhlý profil. Platí: $v_{eo} = m_{eo} \cdot E$, kde m_{eo} je elektroosmotická mobilita. [13]

5.2.2 Elektroforetická pohyblivost u makromolekul

Proteiny můžeme považovat za makroionty. Elektroforetická pohyblivost kulového makroiontu roste s jeho nábojem, klesá s iontovou silou přítomných solí a s poloměrem makroiontu tím rychleji, čím větší je iontová síla. [6] Pohyblivost je také ovlivněna tvarem částic, tzn. u bílkovin jejich terciární a kvartérní strukturou. [14]

Proteiny ve své molekule obsahují jak kyselé, tak i bazické skupiny, proto pro ně existuje izoelektrický bod, to je pH při kterém se navenek jeví jako neutrální.

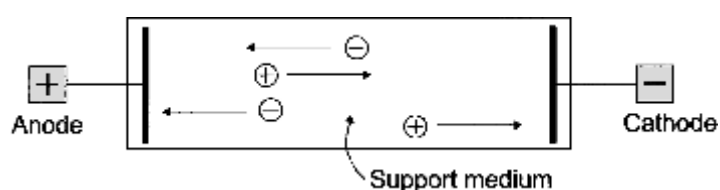
Složení aminokyselin a uhlovodíků v molekule je pro každý protein jedinečné, proto má každý svůj specifický náboj podle kterého (mimo jiné) migruje. Náboj je

možné ovlivnit pomocí pH prostředí. Při pH odpovídajícímu pI protein nemigruje. Izoelektrický bod pI je konstanta charakteristická pro každou bílkovinu.

Jestliže se protein nachází v roztoku s kyselým pH, je ve formě kationtu, který migruje ke katodě. V roztoku, kde je pH relativně bazické vůči pI , proteiny budou odevzdávat protony a migrovat k anodě. [3]

5.3 Uspořádání elektroforetické aparatury

Elektroforetická separace probíhá v médiu mezi dvěma elektrodami. Na jednom konci média je pozitivně nabitá anoda a na opačném konci je negativně nabitá katoda.



Obr. 4 Elektroforetická aparatura [14]

Vzdálenost katody od anody může být od 10 cm až po 1 m. V médiu mezi elektrodami putují kladně nabitě částice ke katodě a záporně nabitě částice k anodě. Vložené médium se skládá z kapaliny, obvykle pufru, která je nesená inertním pevným materiálem, tím bývá papír nebo polotuhý gel. Kapalina umožňuje pohyb iontům, zatímco pevný materiál zajišťuje třecí odpor. Když je na elektrody aplikováno napětí, ionty se vlivem elektrického pole začnou pohybovat. Síla elektrického pole určuje rychlost pohybu částic a může být volena experimentálně. [14]

5.4 Dělení elektroforetických metod

Elektroforéza zahrnuje množství technik, které lze rozdělit na 4 základní skupiny: [11]

- volná elektroforéza
 - s přímým sledováním částic
 - metoda pohyblivého rozhraní [6]
- rovnovážná elektroforéza zastoupená izoelektrickou fokusací
- zónová elektroforéza neboli elektroforéza na nosičích
- kapilární elektroforéza [11]

5.4.1 Volná elektroforéza

Přímé sledování částic

Toto zařízení lze použít jen pro sledování částic lyofobního solu, ne makromolekul.

Metoda pohyblivého rozhraní

viz. Objev elektroforézy, str. 17. [6]

Ve „volné“ technice elektroforéza probíhá ve vodných roztocích pufrů a částice putují k elektrodě s opačnou polaritou rychlostmi, které jsou úměrné velikosti jejich náboje. Velikost náboje a použitý gradient napětí tedy určují rychlost migrace.

Účinnost separace je omezena konvenčními proudy v kapalině, které vznikají vlivem tepla při průchodu elektrického proudu a tepelnou difúzí. Vlivem difúze se snižuje ostrost zón a tím klesá i účinnost separace. Proto se elektroforéza často provádí v antikonvekčních médiích, např. v polyakrylamidovém nebo agarosovém gelu. Tuto variantu označujeme jako elektroforézu na nosičích. [11]

5.4.2 Izoelektrická fokusace (IEF)

Mezi elektrodami se vytvoří gradient pH, které pozvolna stoupá od anody ke katodě, při aplikaci proteinů každý doputuje do bodu kde pH odpovídá jeho pI a tam se zastaví. Při difundování proteinu do jiné zóny se změní jeho náboj a je vrácen do původní úzké zóny (fokusován). Je možné dělit proteiny jejichž pI se liší o minimálně 0,01 jednotky pH. Tato metoda je velmi výhodná pro analytické i preparativní účely.

5.4.3 Elektroforéza na nosičích

Při této metodě se vzorek pohybuje na pevném podkladu, tím bývá filtrační papír, celulóza nebo gel.

Elektroforéza na papíře

Vzorek se nanáší na filtrační papír nebo acetát celulózy navlhčený roztokem pufru a jeho konce se ponoří spolu s elektrodami do roztoku pufru. Papírová elektroforéza rozděluje ionty převážně podle jejich náboje. Pro omezení difúze se používá se vysokovoltové papírové elektroforézy.

Gelová elektroforéza

Nejběžnější jsou polyakrylamidové nebo agarosové gely, u kterých je možné ovlivnit velikost pórů. U polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) se používá gel vzniklý polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Může probíhat jak plošně, tak v trubičkách. Po separaci se proužky vhodnou metodou zviditelní. Ostrost zón, a tím i rozlišovací schopnost dělení může být zvýšena použitím diskontinuální

elektroforézy. Při ní se používají dva různé gely a několik pufrů o různém pH. Pro dělení vysokomolekulárních látek (nad 200 kDa) se používají gely s velkými póry, proto se používají směsi agarosy a polyakrylamidu nebo samotná agarosa. SDS-PAGE je variantou PAGE, při které se do gelu přidá dodecylsulfát sodný (SDS). SDS se váže k proteinům a tvoří s nimi komplexy. Následkem toho se proteiny dělí jen podle molekulové hmotnosti.

5.4.4 Kapilární elektroforéza

Oproti ostatním metodám je kapilární elektroforéza (CE) rychlejší, dá se snadno automatizovat a výsledky lze relativně snadno kvantifikovat. Používají se úzké kapiláry o průměru 1 až 100 μm zhotovené ze skla, křemene nebo plastu. Tenké kapiláry umožňují účinně odvádět teplo, proto je možné použít elektrická pole s vysokým napětím (většinou 10-30 kV), to je asi stokrát více než u ostatních typů elektroforézy. Tím se sníží doba separace až na několik minut. Rychlé dělení také omezuje difúzní rozostření proužků. Kapilára se plní pufrům nebo SDS-polyakrylamidovým gelem, pak se látka dělí podle molekulové hmotnosti. Metoda CE má velmi vysoký stupeň rozlišení a umožňuje automatizaci včetně automatického nanášení vzorku a vyhodnocování frakcí. Používají se velmi malé objemy vzorku, proto se používá převážně pro analytické účely. [15]

Afinitní elektroforéza (A CE)

Je založena na specifických interakcích molekul, např. interakce typu enzym-inhibitor, antigen-protilátka nebo hormon-receptor. Podstatou je tvorba komplexu mezi dvěma molekulami s různými elektroforetickými mobilitami, kdy se elektroforetická mobilita vznikajícího komplexu liší od mobilit obou reaktantů. Umožňuje specifickou identifikaci analytů v komplexních směsích peptidů a bílkovin. [13]

Kapilární elektroforéza–frontal analysis (CE-FA)

FA spojená s CE je nová technika CE, která byla vyvinuta pro studie nekovalentních interakcí. Tato technika je využívána pro studium interakcí albuminu s léčivými. [22]

Kapilární zónová elektroforéza

Je nejjednodušší elektromigrační technika. Separace probíhá v základním elektrolytu. Složky vzorku se liší svými pohyblivostmi a díky tomu dochází k jejich separaci. [13]

Detekce u CE:

Nejčastěji se používá UV detekce, fluorescence, refraktometrická detekce, hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich varianty. [16]

6 Metody vyhledávání použitých zdrojů

Zdrojem pro teoretickou část práce byla odborná literatura v českém, resp. anglickém jazyce (Literatura 1 - 16). Články, ze kterých byly čerpány informace o provedených studiích zadané problematiky byly získány z internetu prostřednictvím databázového systému ISI Web of Knowledge (Literatura 17 – 33). Byla zadána hesla: „capillary electrophoresis“, „serum protein(s)“ a výběr byl limitován články v angličtině a češtině týkajícími se člověka (Human) a publikované za roky 2008-2009. Pouze jeden zajímavý článek je z roku 2002. Z nalezených článků byly vybrány ty, které jsou použitelné pro zadanou problematiku bioanalytického využití elektroforézy a obsahovaly full text. Články, u kterých byl zveřejněn pouze abstrakt, neobsahovaly potřebné informace.

7 Výsledky rešerše

Tab. č. 1: Afinitní CE

Analyt	Metoda CE	Cíl práce	Instrumentace (kapilára a analyzátor)	Podmínky měření (pufr, pH, napětí, teplota)	Detekce a limity	Literatura
Gc-globulin (vitamin D-binding protein) a jeho izoformy interagující s G-aktinem	A CE (Affinity capillary electrophoresis)	Stanovení Gc globulinu a jeho izoform interagujících s G-aktinem při onemocněních (trauma, akutní jaterní selhání, sepse,...)	Nepotažené křemenné kapiláry, 50 μm i.d., 375 μm o.d., celková délka 57 cm, efektivní délka 50 cm. Beckman P/ACE 5010 instrument (Fullerton, CA, USA)	10 mM fosfátový pufr, pH 7,4, 25 kV, 25 °C	UV 200 nm. LOD 1 mM pro proteiny LIF 3 mW argonový laser chlazený vzduchem, s λ 488 a 520 nm pro excitaci a emisi, 75 nM až 1,0 mM	[17]

<p>β-laktoglobulin (β-LG)</p>	<p>IA-CE (imunoafinitní CE)</p>	<p>Separace β-laktoglobulinu z mléka po prekoncentraci ITP</p>	<p>Křemenná kapilára, 50 μm i.d. a 375 μm o.d., celková délka 40 cm, efektivní délka 30 cm. P/ACE MDQ system (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland)</p>	<p>Separační pufr (10% v/v octová kyselina, pH 2,0), 30 kV, 25 °C</p>	<p>UV 200 nm, DAD. RSD = 2,6–6,9%, Lineární rozmezí od 1 do 17,5 mg/ml ($r^2 = 0,98$), LOQ 1 mg/ml, tj. přibližně 55 nM</p>	<p>[18]</p>
<p>Volné sérové proteiny reprezentované BSA</p>	<p>VACE (Vacancy affinity capillary electrophoresis)</p>	<p>Charakterizace interakcí biomolekul - BSA s warfarinem</p>	<p>Křemenná kapilára, 50 μm i.d. and 375 μm o.d., celková délka 50 cm, efektivní délka 40,2 cm Beckman Coulter P/ACE MDQ automated CE system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)</p>	<p>Fosfátový pufr (0,05 M dihydrogenfos fát draselný a hydrogenfosfá t didraselný) upravený 1 M NaOH na pH 7,4 10 kV, 25 °C</p>	<p>UV-VIS 214 nm. Koncentrace BSA 40 μM, (warfarinu 50-350 μM).</p>	<p>[19]</p>

Trombin	APCE/LIFP (affinity probe capillary electrophoresis/ laser-induced fluorescence polarization)	Vysoce senzitivní detekce trombinu v séru u pacientů s koagulopatiemi	Křemenná kapilára, 25 µm i.d., celková délka 30 cm, efektivní délka 23,5 cm. Laboratoří sestavený CE/LIFP systém z vysokonapětového zdroje (Model DW-S303- 1ACE5/DW-HVSC-1, Tianjin Dongwen High-voltage Power Supply Plant, Tianjin, China), LIF detektor	Pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, pH 8,3), 20 kV, 25 °C	LIFP. LOD $4,38 \times 10^{-19}$ a $2,94 \times 10^{-19}$ mol, tj. 83 a 55,6 pM (pro standard a sérum)	[20]
---------	---	--	--	---	--	------

Tabulka č. 2: CE-frontal analysis

Analyt	Metoda CE	Cíl práce	Instrumentace (kapilára a analyzátor)	Podmínky měření (pufr, pH, napětí, teplota)	Detekce a limity	Literatura
Albumin, α_2 -kyselý glykoprotein	CE-FA (capillary electrophoresis-frontal analysis)	Charakterizace interakcí sérových proteinů s léčivými obsahujícími polyfenolické sloučeniny	Křemenná kapilára, 50 μm i.d., 363 μm o.d., celková délka 65 cm, efektivní délka 58,5 cm. Hewlett-Packard HP 3DCE capillary electrophoresis system (Agilent Phoenix, AZ, USA)	67 mM fosfát sodný, pH 7,4, 15 kV, 36,5 °C	UV 254–300 nm. Koncentrace HSA 475 μM , α_2 -kyselého glykoproteinu 20 μM	[21]
Volný bilirubin a albumin	Microchip capillary electrophoresis spojená s CE/FA (frontal analysis)	Monitorování volného bilirubinu a jeho interakcí s albuminem při bed-side monitorování u novorozenců	Křemenná kapilára, 50 μm i.d., celková délka 13 cm (s detekčním oknem 4 cm od konce kapiláry), efektivní délka 9,8 cm (zahrnující i část na čipu). PMMA microfluidic Chip.	10 mmol/l fosfát sodný a 1 mmol/l EDTA, pH 7,4, 3,5 kV (0-13500 V), 25 °C	LIF 440 nm. Lineární rozmezí pro volný bilirubin od 10 do 200 mmol, (RSD od 2,1 do 5,0% pro $n = 3$), a LOD 9 mmol	[22]

Albumin	FI-CE-FA flow injection- capillary electrophoresis frontal analysis	Studie interakce enantiomerů léčiva amlodipinu (AL) se sérovým albuminem	Nepotažené křemenné kapiláry, 75 μm i.d., 375 μm o.d., celková délka 38,5 cm , efektivní délka 35 cm. HPE-100 CE system s maximálním napětím 12 kV (BioRad, Hercules, CA, USA).	Fosfátový pufr, pH 3,7 s hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD) (10 mM) jako chirální selektor, 12 kV, 23,5 +/- 0,5 °C.	UV 214 nm. RSD 1,5% R-AL: LOD (S/N = 3) 4,46 mM, LOQ (S/N = 10) 14,87 mM, r = 0,99911, lineární rozmezí 15–400 mg/ml. S-AL: LOD (S/N = 3) 5,43 mM, LOQ (S/N = 10) 18,09 mM, r = 0,99983, lineární rozmezí 15-400 mg/ml.	[23]
Albumin	CE-FA (capillary electrophoresis– frontal analysis)	Studie vazebné konstanty dexamethasonu s lidským sérovým albuminem	Křemenná kapilára, 50 μm i.d. a 375 μm o.d., celková délka 27 cm, efektivní délka 20 cm P/ACE System 5010 s UV	67 mM fosfátový pufr, pH 7,4, 8 kV, 25 °C	UV 214 nm. Lineární rozmezí dexamethasonu 50-800 $\mu\text{mol/l}$,	[24]

			detektorem (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)		r = 0,9998	
--	--	--	--	--	------------	--

Tab. č. 3: CE a ostatní modifikace metod

Analyt	Metoda CE	Cíl práce	Instrumentace (kapilára a analyzátor)	Podmínky měření (pufr, pH, napětí, teplota)	Detekce a limity	Literatura
Transferin a bezsacharidový transferin (CDT)	CZE	Monitorování CDT a omezení interferencí v beta oblasti u pacientů s jaterní cirhózou	Křemenná kapilára, 50 µm i.d., celková délka 60,2 cm, efektivní délka 50 cm. P/ACE MDQ capillary electrophoresis systems (Beckman Coulter)	CE ofix kit - pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl), 20 kV, 30,0 °C.	UV 200 nm. Oblast linearity 0,10 až 5,00 mg/ml	[25]
Albumin	CZE	Studie interakcí proteinů a micelárních částic vázájících vysoce	Nepotažená křemenná kapilára, 50 µm i.d. a 375 µm o.d., celková délka 60 cm, efektivní délka	TG pufr (25 mM Tris/192 mM glycin, pH 8,3),	UV-VIS (DAD) 190–400 nm. Lineární rozmezí HSA 0-120 mM	[26]

		hydrofobní molekuly (polycyklické aromatické uhlovodíky)	51,5 cm. Agilent 3DCE Electrophoresis System (Hewlett-Packard, Willington, DE, USA)	30 kV, 37 °C		
Sérové proteiny (frakce albuminu, α_1 , α_2 , β_1 a β_2 a γ globulinů)	CZE	Analýza abnormálních proteinových frakcí, srovnání CZE a agaroforézy při diagnóze mnohočetného myelomu, gamapatií, atd.	Křemenná kapilára, 50 μm i.d., celková délka 56 cm, efektivní délka 40 cm. HP3D CE (Hewlett Packard), BioFocus 3000 (BioRad) and PrinCE (Lauerlabs) capillary electrophoresis systems	50 mM borátový pufr, pH 9,3, 10-20 kV, 20 °C	UV 200 nm. Sérum ředěno 50 krát.	[27]
Albumin, transferin	CE-ICP-MS (capillary electrophoresis - inductively coupled plasma mass spectrometry)	Studie reaktivity cytostatik na bázi (Ru III) se sérovými proteiny	Křemenná kapilára, 75 μm i.d. \times 60 cm. Agilent Technology HP3D CE system (Waldbronn, Germany)	10 mM fosfátový pufr, pH 7,4, 15 kV, 37 °C	MS. Albumin 50 μmol ; RSD 2,5 %	[28]

Imunitní komplexy (imunoglobuliny v komplexu s antigenem)	CE	Stanovení cirkulujících imunitních komplexů v séru při diagnostice (nefropatie, rheumatitis, sclerodermis, lupus erythematosus)	Křemenná kapliára 50 µm i.d., délka 36 cm. Quanta 4000 (Waters, Milford, MA)	PEG pufr připravený z PEG 8000 (2,2%) v 10 mmol/l fosfátovém pufru, pH 7,1, obsahující 0,5% NaCl, 15 kV, 20 °C.	UV 214 nm. 45-510 mg/l; sérum ředěno 50 krát	[29]
Cholinesteráza (substrát benzoylcholin-hydrolyza)	CE, srovnání s FIA (cholin-biosenzor)	Stanovení aktivity sérové cholinesterázy při poruchách funkce jater	Křemenná kapilára, 75 µm i.d. × celková délka 34 cm, efektivní délka 26,0 cm. CE system (G1600A, Agilent, MA, USA)	30,0 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 16 kV, 25 °C	UV-VIS 233 nm a 228 nm. Lineární rozmezí pro benzoylcholin a benzoát 0,01-50,0 mM, r = 0,998-0,993, RSD 4 % až 6 %; LOD 1,0 µM	[30]

8 Kapilární elektroforéza sérových proteinů

Analýzy proteinů v lidské plazmě patří pravděpodobně k nejdůležitějším klinickým aplikacím kapilární elektroforézy.

V práci jsou stručně shrnuty poznatky z problematiky kapilární elektroforézy sérových proteinů. Byly zpracovány vybrané publikace za období 2008-2009. Pozornost byla zaměřena na druh analyzovaného vzorku a použité elektroforetické metody, cíl práce, přístrojové vybavení včetně technické specifikace kapiláry, způsob detekce, zhodnocení citlivosti metody a další experimentální podmínky měření. Další konkrétní podmínky analýz, jako je způsob zpracování vzorků, včetně prekoncentrace a derivatizace, redukce adsorpce analytů na stěnu kapiláry a použití pokrytých kapilár nebo konkrétní zásahy pro zlepšení účinnosti separace, je možné nalézt v původních pracích.

Potenciál CE v klinické diagnostice sérových proteinů byl popsán na začátku roku 1990 [31], [32]. Později v roce 1990 a začátkem roku 2000 byly pro klinické použití představeny dva komerční CE přístroje, Paragon 2000 (Beckman, Coulter, Brea, CA, USA) a Capillarys (Sebia, Paris, France). Jednalo se o multikapilární systémy, které používají kity pro separaci sérových proteinů. Jsou výhodné pro práci v klinických laboratořích, zabývajících se analýzou velkého počtu vzorků. [33]

U všech studií bylo jako analyzovaný materiál použito lidské sérum. Při analýze sérových proteinů byla často použita metoda CZE, A-CE, CE-FA.

Metoda afinitní elektroforézy (A-CE)

U všech studií stanovující analyty metodou afinitní kapilární elektroforézy [17-19] byl použit analyzátor Beckman P/ACE 5010 instrument (Fullerton, CA, USA), jen studie [20] používala vlastní analyzátor sestavený přímo v laboratoři. V analyzátoru Beckman P/ACE 5010 instrument (Fullerton, CA, USA) byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 375 μm , délka kapiláry se u studií lišila. U studie [20] byla použita kapilára s vnitřním průměrem 25 μm a efektivní délkou 23,5 cm. Efektivní délka kapiláry se u studií lišila, pohybovala se v rozmezí od 50 cm do 30 cm.

Pufř použitý pro separaci se u studií lišil, byl použit pufř připravený z kyseliny octové, TG pufř a ve dvou případech fosfátový pufř o pH 7,4. Napětí použité pro

separaci se také lišilo, pohybovalo se v rozmezí 20 - 30 kV. Všechny studie používající metodu A-CE byly provedeny při teplotě 25 °C.

Většinou byla použita UV detekce [17-19] při 200 nm [17, 18], případně při 214 nm [19]. U studie [17] byla použita LIF detekce, čímž bylo dosaženo snížení detekčního limitu. U studie používající analyzátor sestavený v laboratoři byla použita detekce LIFP, díky této citlivé detekci bylo dosaženo velmi nízkých detekčních limitů, řádově pM.

Metoda byla použita pro stanovení Gc-globulinu [17], β -laktoglobulinu [18], trombinu [20] a pro charakterizaci interakcí BSA s warfarinem [19]. Byla použita A CE [17], IA-CE [18], VACE [19] a APCE [20].

Metoda frontal analýzy (CE-FA)

Ve studiích byly použity různé analyzátory, Hewlett-Packard HP 3D CE capillary electrophoresis system (Agilent Phoenix, AZ, USA) [21], HPE-100 CE system (BioRad, Hercules, CA, USA) [23], P/ACE System 5010 s UV detektorem (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) [24] a v jednom případě analýza na čipu PMMA microfluidic Chip [22].

Většinou byla použita kapilára s vnitřním průměrem 50 μ m [21], [22], [24] a lišící se vnějším průměrem (okolo 370 μ m). U studie [23] byla použita kapilára o vnitřním průměru 75 μ m. Celková délka kapiláry byla od 65 cm [21] do 27 cm [24], u mikročipu 13 cm [22]. Efektivní délka kapiláry byla od 58,5 cm [21] do 20 cm [24], u mikročipu 9,8 cm [22].

U všech studií [21], [22], [24], byl použit fosfátový pufr, většinou o pH 7,4, jen u studie [23] byl použit pufr o pH 3,7. Vložené napětí bylo od 8 do 15 kV, u mikročipu 3,5 kV. Byly použity teploty okolo 25 °C, u studie [21] byla použita teplota 36,5 °C.

Ve většině případů byla použita UV detekce, často při 214 nm [24] a [23], v jednom případě při 254–300 nm [21]. U mikročipu [22] byla použita detekce LIF při 440 nm.

Metoda byla použita pro charakterizaci interakcí proteinů s látkami, které se na ně váží, hlavně pro interakci s albuminem. Většinou bylo interagující látkou některé léčivo: léky s polyfenolyckými sloučeninami [21], amlodipinu [23], dexamethasonu [24]; u studie [22] byl interagující látkou volný bilirubin.

Metoda kapilární zónové elektroforézy (CZE) a ostatní metody

Ve studiích byly použity různé analyzátoři: P/ACE MDQ capillary electrophoresis systems (Beckman Coulter) [25], Agilent 3DCE Electrophoresis System (Hewlett-Packard, Willington, DE, USA) [26] a od (Waldbronn, Germany) [28], HP3D CE (Hewlett Packard), BioFocus 3000 (BioRad) and PrinCE (Lauerlabs) capillary electrophoresis systems [27], Quanta 4000 (Waters, Milford, MA) [29] a CE system (G1600A, Agilent, MA, USA) [30].

U většiny stanovení byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm [25-27], [29]. U ostatních byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem 75 μm [30] a [29]. Celkové délky kapilár byly od 60,2 cm [25] do 34 cm [30]. Efektivní délky se pohybovaly v rozmezí od 60 cm [28] do 26,0 cm [30].

Ve třech případech byl použit fosfátový pufr [28-30], u ostatních stanovení byly použity různé druhy pufrů, které jsou uvedeny v tabulce. Rovněž pH bylo různé, ale opět se často pohybovalo okolo 7-7,5 [25], [28-30]. Bylo použito různé napětí v rozmezí 10-30 kV, často kolem 15 kV [28-30]. Byla použita teplota od 20 °C [27, 29] do 37 °C [26, 28].

Nejčastěji byla použita UV detekce [25] - [30], kromě [28], kde byla použita MS detekce. Používaly se různé vlnové délky, 200 nm [25] a [27], 214 nm u studie [29], 233 nm a 228 nm u studie [30]. U studie [26] byl použit DAD detektor s rozmezím vlnových délek 190–400 nm. Lineární rozmezí bylo řádově většinou v mM. Limit detekce byl uveden jen u studie [30] a byl 1,0 μM .

Byly stanovovány různé sérové proteiny a jejich interakce s léčivou [26] a [28], imunitní komplexy [29] a enzym cholinesteráza [30].

Jak vyplývá z publikovaných studií, k analýze sérových proteinů byly použity různé elektroforetické metody i detekce. Nejčastěji používanou metodou v běžných klinických laboratořích je kapilární zónová elektroforéza s UV detekcí. Velmi používanou detekční technikou je LIF a také se stále častěji využívá separační síly MS v hyphenální technice CE - MS.

9 Závěr

V předloženém spise byly zpracovány vybrané experimentální práce z problematiky kapilární elektroforézy sérových proteinů za období 2008-2009. Ve studiích byly použity různé analyzátory, nejvíce byl využíván Beckman P/ACE 5010 instrument (Fullerton, CA, USA). K analýze byla často použita metoda CZE, ostatní metody byly využity v různých modifikacích (např. IA-CE, APCE). Byly používány křemenné kapiláry s různým průměrem o různé délce, nejčastěji s vnitřním průměrem 50 μm . Migrační medium nejčastěji představoval fosfátový pufr. Detekce byla velmi často UV, pro analyty o velmi nízké koncentraci je výhodnější použití LIF, resp. CE-MS. Základní hodnocené charakteristiky analýz jsou uspořádány do tabulek. Analýza proteinů v lidské plazmě patří k základním aplikacím CE v klinické praxi v oblasti diagnostiky monoklonálních gamapatií a dalších patologických stavů, jako jsou nemoci jater, ledvin, arteriosclerosis nebo zhoubných urogenitálních onemocnění.

10 Seznam použitých zkratek

A CE	affinity capillary electrophoresis
AAT	α_1 -antitrypsin
AL	amlodipin
APCE/LIFP	affinity probe capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence polarization
API	alfa ₁ -inhibitor proteáz
BSA	bovine serum albumin
CDT	carbohydrate-deficient transferin (bez sacharidový transferin)
CE	kapilární elektroforéza
CE-FA	capillary electrophoresis–frontal analysis
CE-ICP-MS	capillary electrophoresis interfaced online with inductively coupled plasma mass spectrometry
CNS	centrální nervový systém
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	diode array detektor
GIT	gastrointestinální trakt
HDL	high density lipoprotein
HLA	human leukocyte antigen
HSA	lidský sérový albumin
IA-CE	imunoafinitní kapilární elektroforéza
IEF	izoelektrická fokusace
Ig	imunoglobulin
ITP	izotachoforéza
LDL	low density lipoprotein
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MS	hmotnostní spektrometrie
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PEG	polyethylenglykol
<i>pI</i>	izoelektrický bod
r	korelační koeficient

r^2	koeficient determinace
RBP	retinol binding protein
RSD	přesnost
SDS	dodecylsulfát sodný
TBP	thyroxin binding protein
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové spektrum
VACE	vacancy affinity capillary electrophoresis
VIS	viditelné spektrum
β -LG	β -laktoglobulin

11 Použitá literatura

- [1] NEČAS, O., SVOBODA, A., HEJTMÁNEK, M., JANISH, R., ČERVINKA, M., LENHART, K., KOLÁŘ, Z.: *Obecná biologie: Pro lékařské fakulty*. 3. přepracované vydání, v nakladatelství H&H 1. vydání. Jinočany: H&H, 2000, s. 51-54, 57-60. ISBN 80-86022-46-3.
- [2] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHONSON, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 1. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, s. 133, 137. ISBN 80-902906-0-4
- [3] KEREN, D., F.: *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. 1. vydání. London: Arnold, 2003, s. 3-5. ISBN 0340 812133.
- [4] HOLME, D. J., PECK, H.: *Analytical biochemistry*. 3. vydání. Harlow: Prentice Hall, 1998, s. 383-386. ISBN 0 582 29438-X.
- [5] RACEK, J., EISELT, J., FRIDECKÝ, B., HOLEČEK, V., NEKULOVÁ, M., PITTROVÁ, H., RUŠAVÝ, Z., SENFT, V., ŠAVLOVÁ, M., TĚŠÍNSKÝ, P., VERNER, M.: *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. Praha: Galén, 2006, s. 65-73. ISBN 80-7262-324-9.
- [6] POUCHLÝ, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 1. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1998. s. 132, 133. ISBN 80-7080-331-2.
- [7] MAJER, J., JOKL, V., SCHILLER, P., SVOBODOVÁ, D., KARLÍČEK R., KETTMAN V., PAVELČÍK, F., KOTRLÝ, S.: *Analytická chémie: Učebnica pre farmaceutické fakulty*. 1. vydání. Martin: Osveta, 1989, s. 229, 263, 264.
- [8] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 9, 33. ISBN 80-86369-07-2.

- [9] DUŠEK, M., KVASNIČKA, F., MORAVCOVÁ, J.: Stanovení organických kyselin v silážích kapilární isotachoforézou a kapilární zónovou elektroforézou. *Chem. Listy*. 2004, 98 (7), 418.
- [10] ŘEZANKA, P., ZÁRUBA, K., KRÁL, V.: Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii. *Chem. Listy*. 2007, 101 (11), 884.
- [11] BÍLKOVÁ, K., KRÁLOVÁ, B.: *Izolace biomakromolekul*. 1. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1997, s. 142, 143. ISBN 80-7080-288-X.
- [12] FERLES, M.: Střípky a klípky o světových chemících. In *Bulletin Asociace českých chemických společností*. Kratochvíl Bohumil. Praha: Česká společnost chemická, 2002. Svazek 33. Část 1. s. 65.
- [13] KAŠIČKA, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*. 1997, 91 (5), 321-325.
- [14] MIKKELSEN, S. R., CORTÓN, R.: *Bioanalytical chemistry*. 1. vydání. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. s. 167, ISBN 0-471-54447-7.
- [15] VOET, D., VOETOVÁ, J., G.: *Biochemie*. 1. vydání. Praha: Victoria Publishing, 1995, s. 101-106. ISBN 80-85605-44-9.
- [16] KRÁLY, J., FAZAL, A., SCHOENHERR, R., M., BONN, R., HARWOOD M., M., TURNER, E., JONES, M., DOVICHI, N., J.: Bioanalytical applications of capillary electrophoresis. Review. *Anal. Chem.*, 2006, 78 (12), 4102.
- [17] PEDERSEN, J., T., OSTERGAARD, J., HOUEN, G., HEEGAARD, N., H., H.: Affinity capillary electrophoresis for identification and investigation of human Gc-globulin (vitamin D-binding protein) and its isoforms interacting with G-actin. *Electrophoresis*. 2008, 29 (8), 1723-1733.
- [18] CHEN, H.-X., BUSNEL, J.-M., GASSNER A.-L., PELTRE, G., ZHANG, X.-X., GIRAULT, H., H.: Capillary electrophoresis immunoassay using magnetic beads.

Electrophoresis. 2008, 29 (16), 3414-3421.

- [19] SUN, Y., FANG, N., CHEN, D., D., Y.: Behavior of interacting species in vacancy affinity capillary electrophoresis described by mass balance equation. *Electrophoresis*. 2008, 29 (16), 3333-3341.
- [20] SONG, M., ZHANG, Y., LI, T., WANG, Z., YIN, J., WANG, H.: Highly sensitive detection of human thrombin in serum by affinity capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence polarization using aptamers as probes. *J. Chromatogr., A*. 2009, 1216 (5), 873–878.
- [21] DINIZ, A., ESCUDER-GILABERT, L., LOPES, N., P., VILLANUEVA-CAMAÑAS, R., M., SAGRADO, S., MEDINA-HERNÁNDEZ, M., J.: Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391(2), 625-632.
- [22] NIE, Z., FUNG, Y., S.: Microchip capillary electrophoresis for frontal analysis of free bilirubin and study of its interaction with human serum albumin. *Electrophoresis*. 2008, 29 (9), 1924-1931.
- [23] LIU, X., CHEN X., YUE, Y., ZHANG, J., SONG, Y.: Study of interaction between drug enantiomers and human serum albumin by flow injection-capillary electrophoresis frontal analysis. *Electrophoresis*. 2008, 29 (13), 2876-2883.
- [24] ZHAO, P., ZHU, G., ZHANG, W., ZHANG, L., LIANG, Z., ZHANG, Y.: Study of multiple binding constants of dexamethasone with human serum albumin by capillary electrophoresis–frontal analysis and multivariate regression. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393 (1), 257-261.
- [25] LANZ, CH., FALMAGNE, J., B., DE L'ESCAILLE F., MARTI, U., THORMANN, W.: Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum with capillary zone electrophoresis. Sample preparation strategies for the removal of interferences caused by increased levels of immunoglobulins. *J. Chromatogr., A*. 2008, 1206 (1), 33-40.

- [26] LIU, S., WANG, H., SONG, M., YIN, J., JIANG, G.: Study of protein binding and micellar partition of highly hydrophobic molecules in a single system using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008, 29 (14), 3038-3046.
- [27] IVANOVA, M., TZVETANOVA, E., JETCHEVA, V., KILÁR, F.: Abnormal protein patterns in blood serum and cerebrospinal fluid detected by capillary electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2002, 53, 141–150.
- [28] POLEC-PAWLAK, K., ABRAMSKI, J., K., FERENC, J., FOTEEVAB, L., S., TIMERBAEV, A. R., KEPPLER, B., K., JAROSZ, M.: Application of capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry to comparative studying of the reactivity of antitumor ruthenium (III) complexes differing in the nature of counter-ion toward human serum proteins. *J. Chromatogr., A*. 2008, 1192 (2), 323-326.
- [29] SHIHABI, Z., K.: Analysis of immune complexes by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008, 29 (12), 2565-2569.
- [30] HSIEH, B.-C., HSIAO H.-Y., CHENG, T.-J., CHEN, R., L., C.: Assays for serum cholinesterase activity by capillary electrophoresis and an amperometric flow injection choline biosensor. *Anal. Chim. Acta*. 2008, 623 (2), 157-162.
- [31] CHEN, F. T., LIU, C. M., HSIEH, Y. Z., STERNBERG, J. C.: Capillary electrophoresis-a new clinical tool. *Clin. Chem*. 1991, 37, 14–19.
- [32] EVENSON, M. A., WIKTOROWICZ, J. E.: Automated capillary electrophoresis applied to therapeutic drug monitoring. *Clin. Chem*. 1992, 38, 1847-1852.
- [33] JABEEN, R., PAYNE, D., WIKTOROWICZ, J., MOHAMMAD, A., PETERSEN, J.: Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. Review. *Electrophoresis*, 2006, 27, 2413–2438.