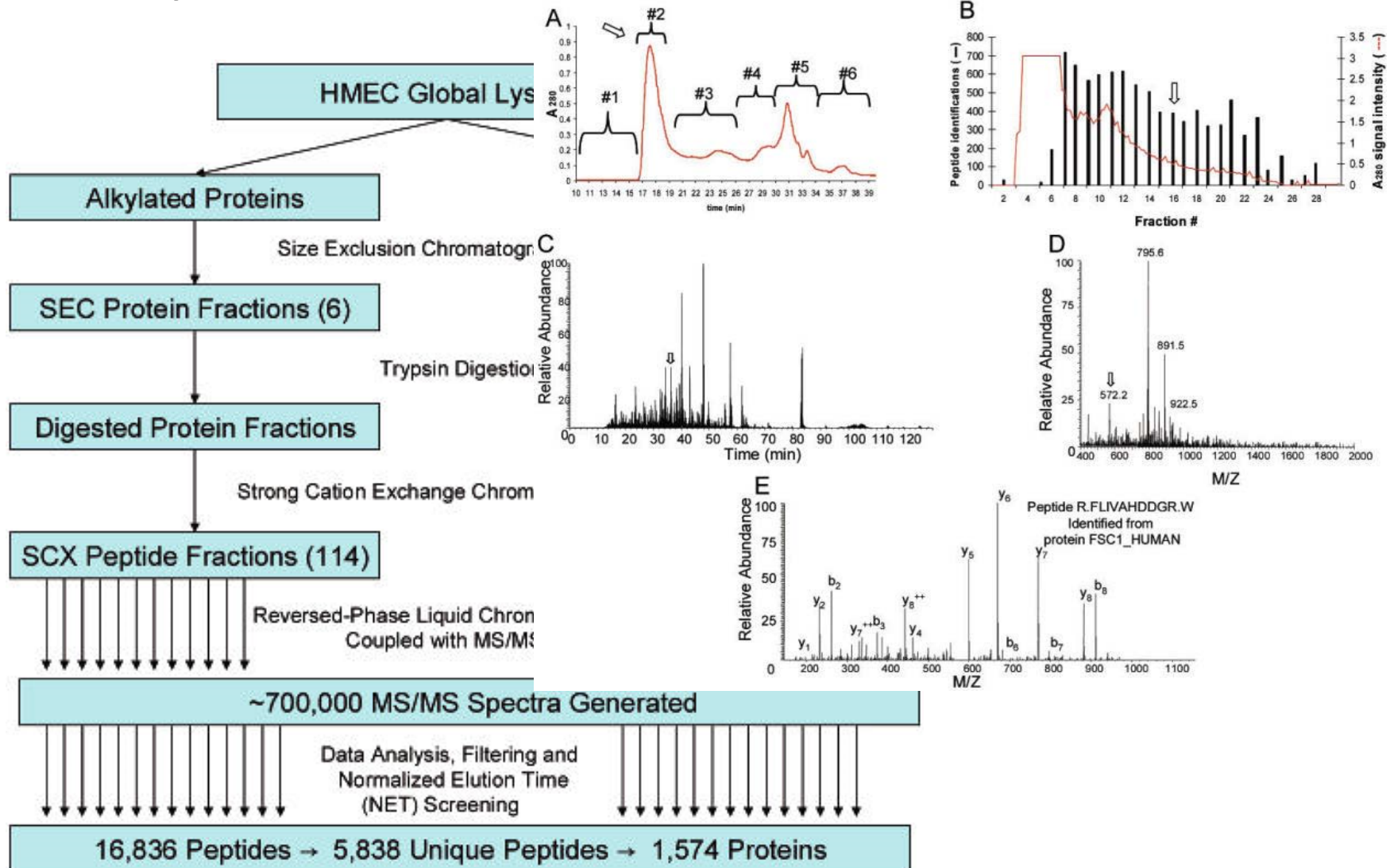


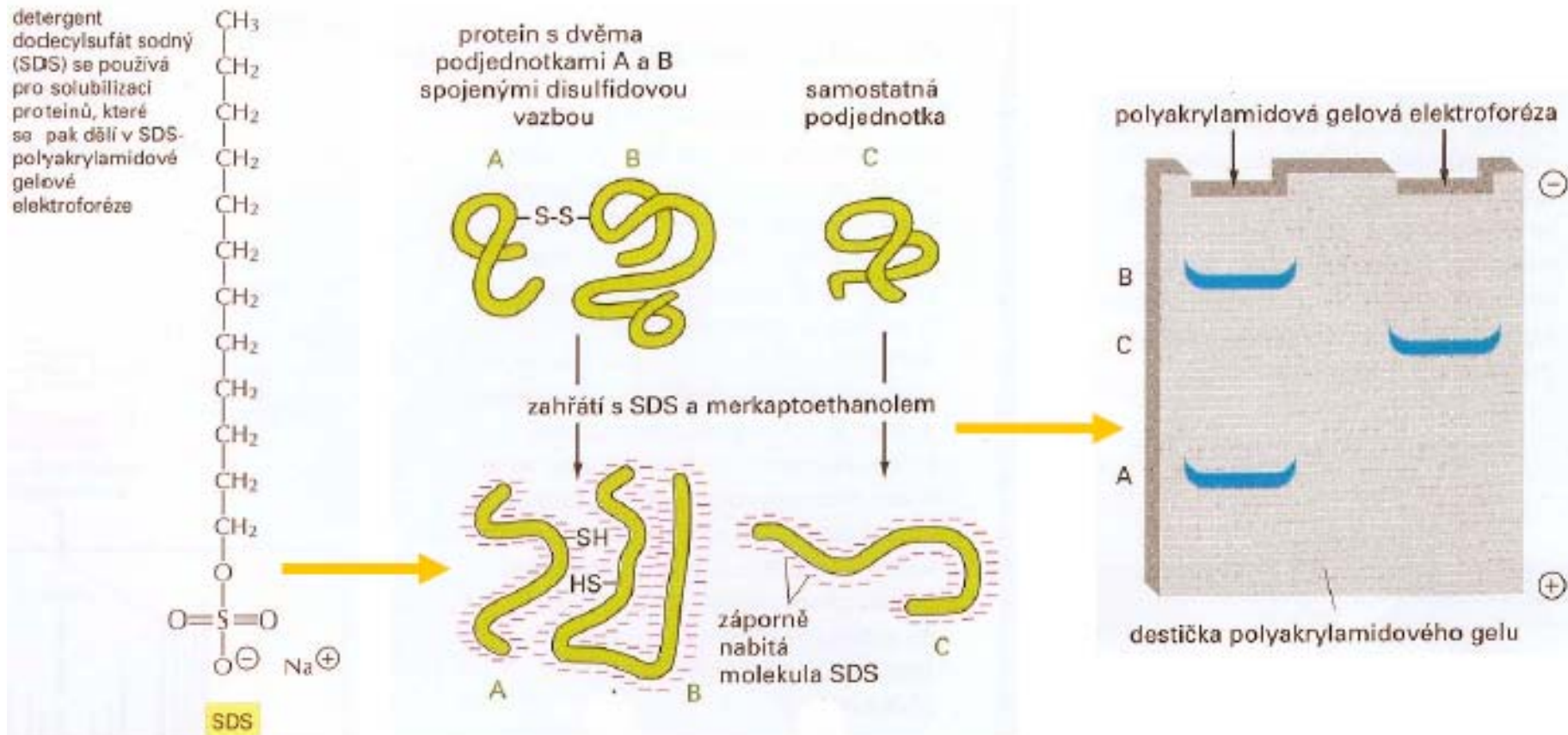
Chromatographic methods

Analysis of Human mammary epithelial cells



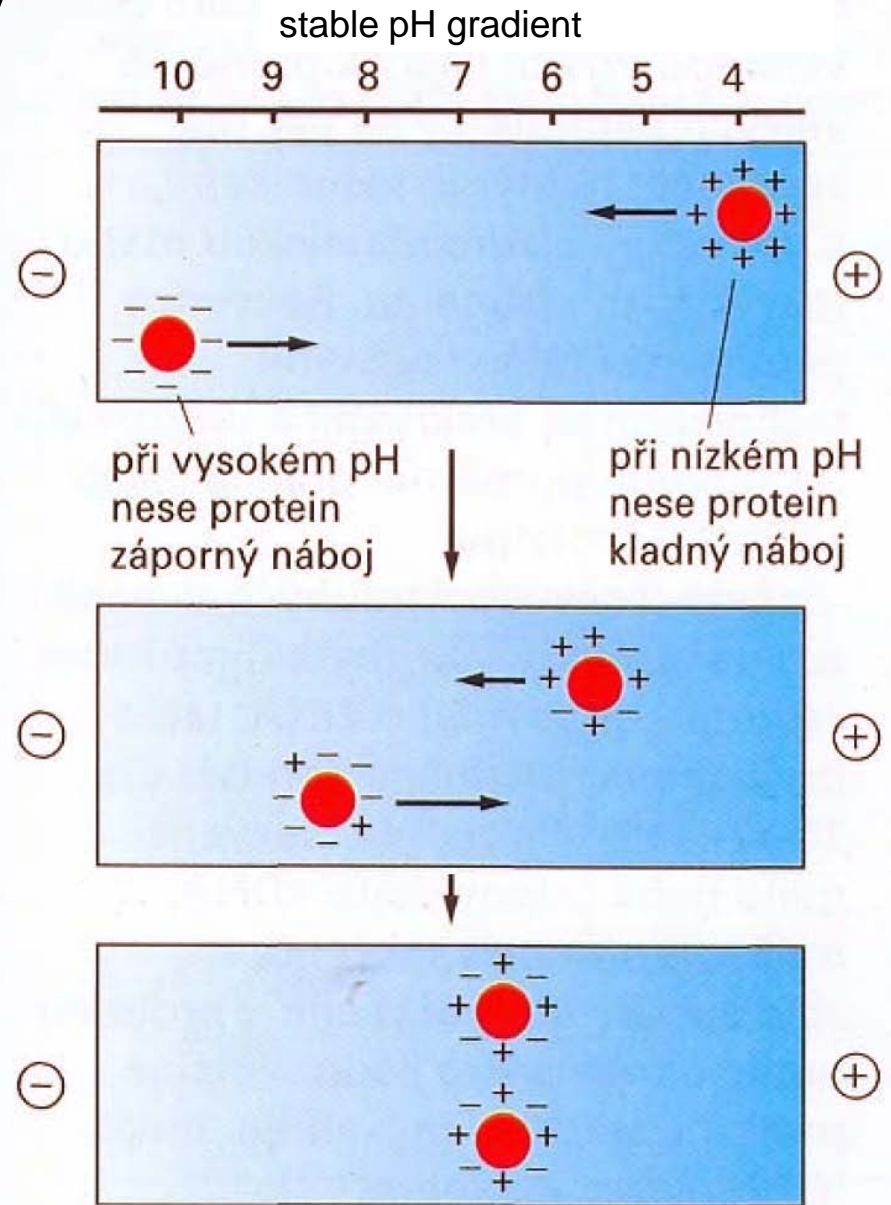
Elektromigrační metody

- SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)
 - Dělení dle molekulové hmotnosti



Elektromigrační metody

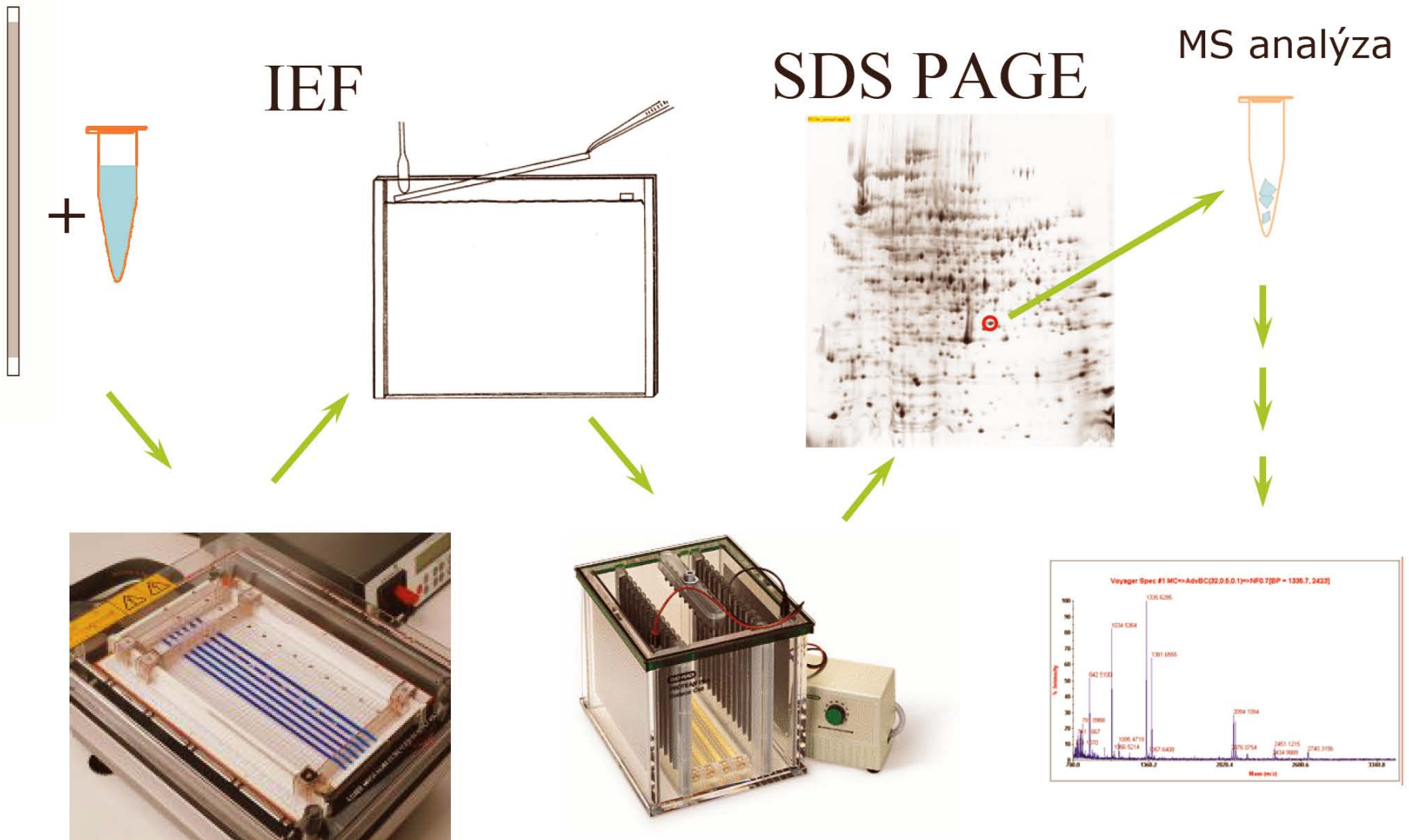
- isoelektrická fokusace
 - separace proteinů podle jejich isoelektrického bodu (pI)
- IPG stripy –imobilizovaný pH gradient
 - různé pH gradienty
 - 3-10, 4-7, 6-11, 4,5-5,5

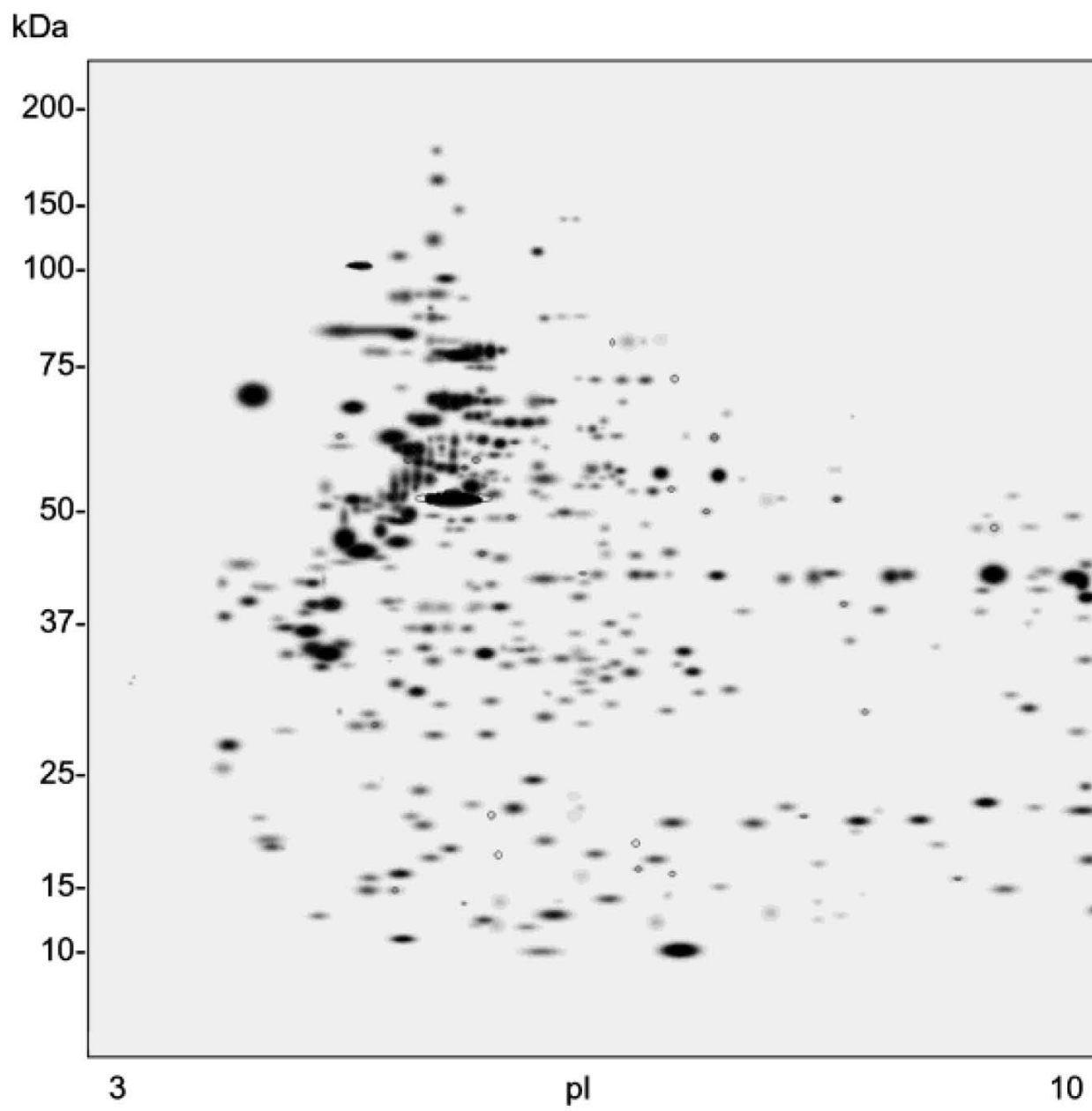


Protein v naší ukázce má izoelektrický bod při pH 6,5

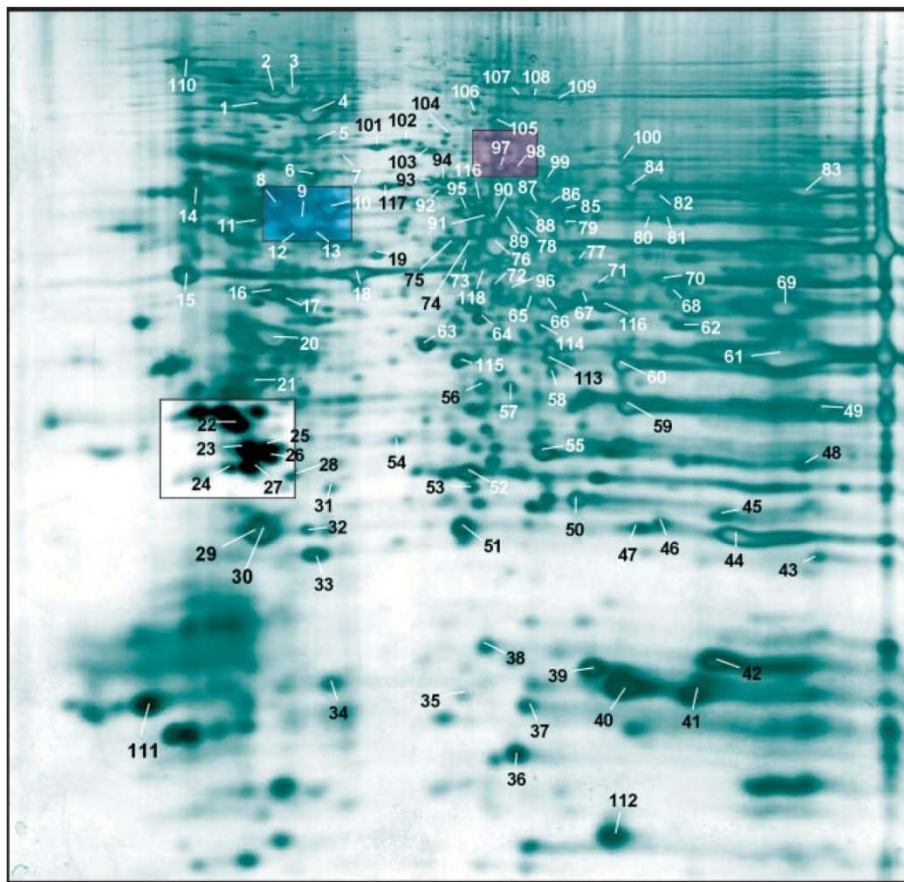
Elektromigrační metody

- 2-dimenzionální elektroforéza (2-DE)

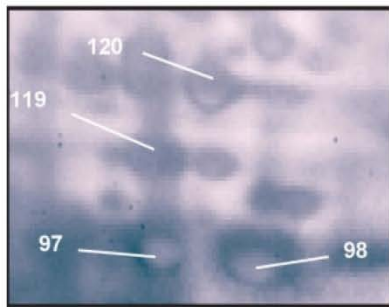




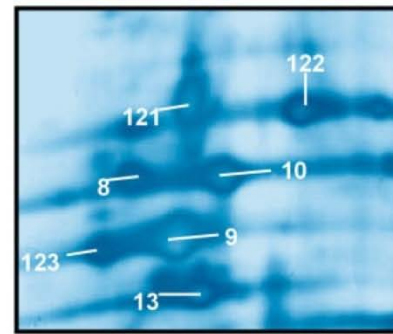
2-D elektroforéza buněk pankreatu



A



B



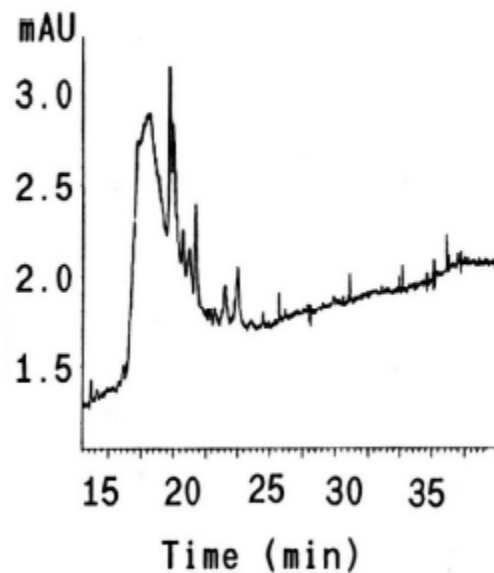
C

2-D elektroforéza bílkovin z lidských ES buněk
 (A) barvení stříbrem, pH 3-10, 12.5% akrylamidový gel, označeno 123 určených skvrn
 (B) a (C) zvětšené označené oblasti; (C) rozlišení v 8% polyakrylamidovém gelu

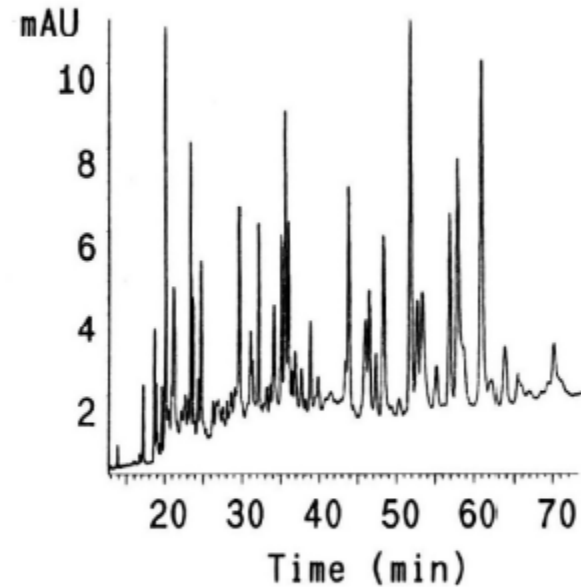
Kapilární elektroforéza

- Podrobnosti viz přednáška o kapilární elektroforéze

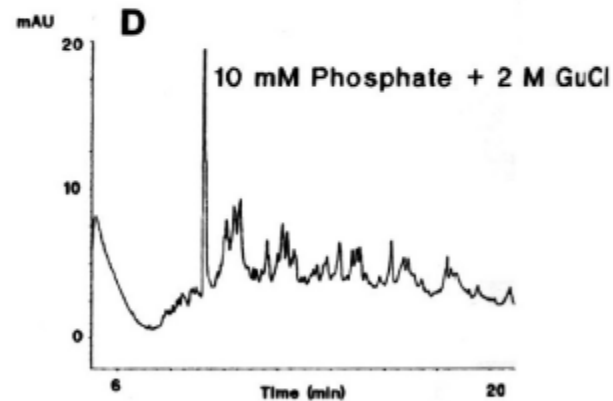
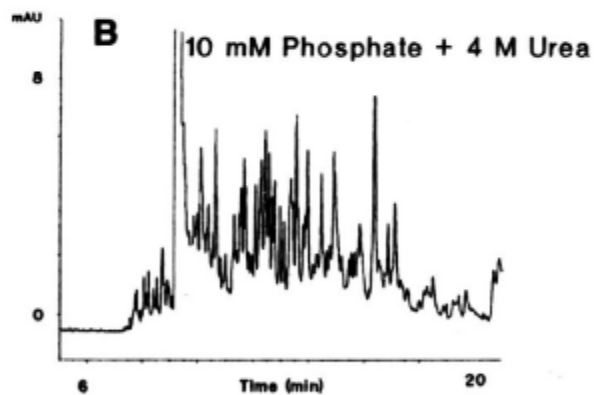
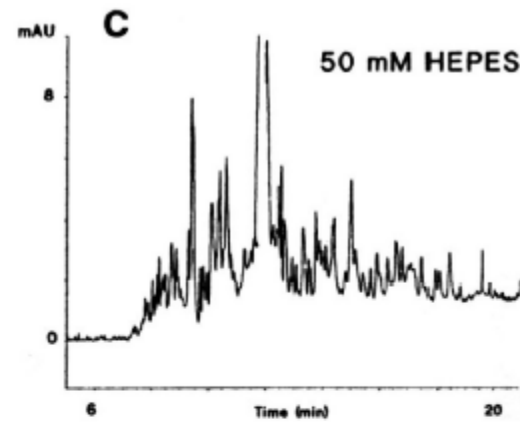
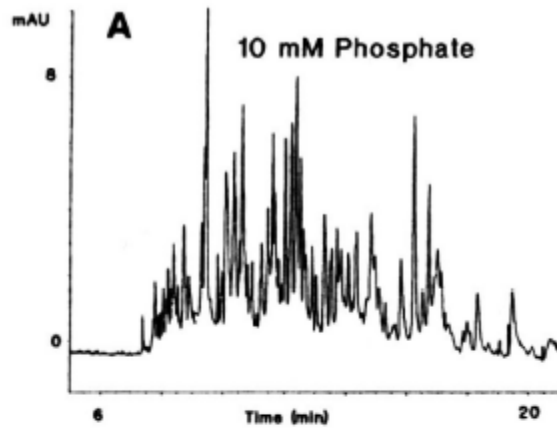
In 50 mM HEPES
and 100 mM GuCl



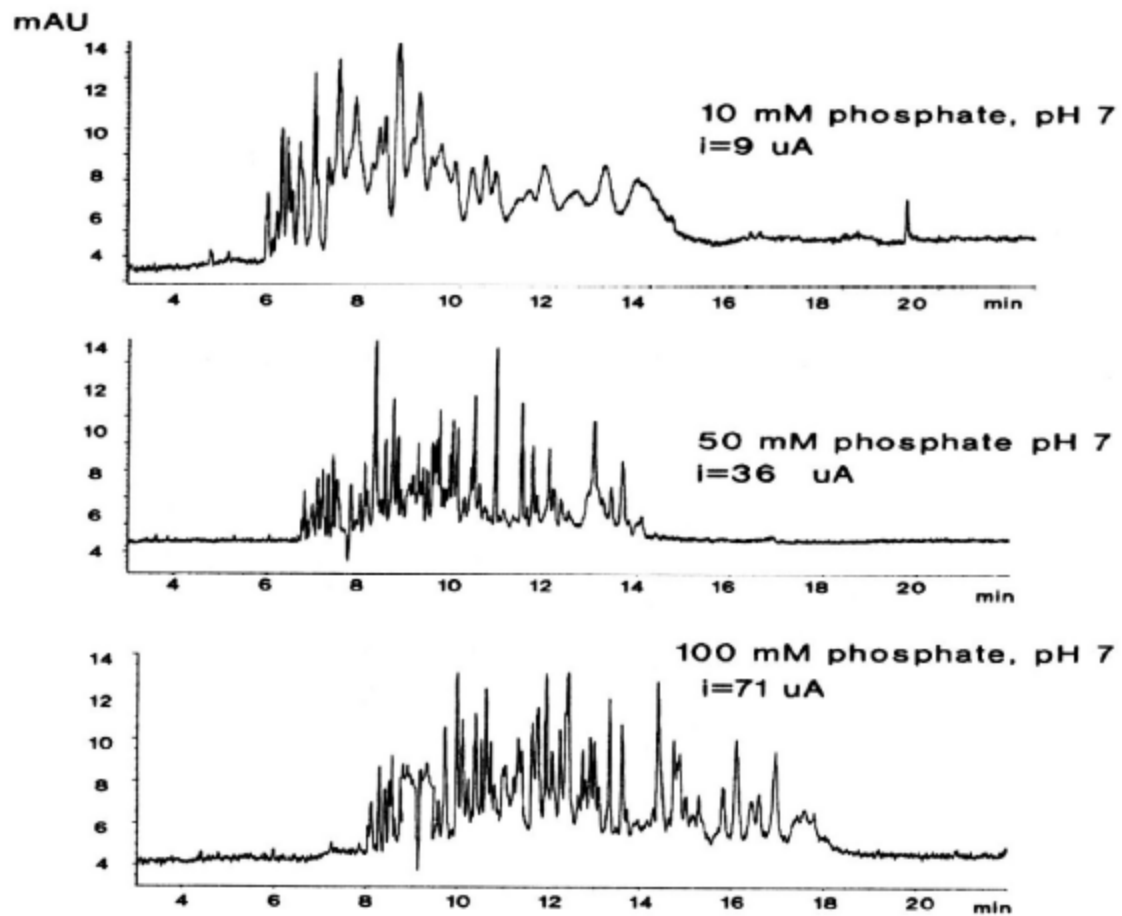
After Desalting
on reversed phase C18



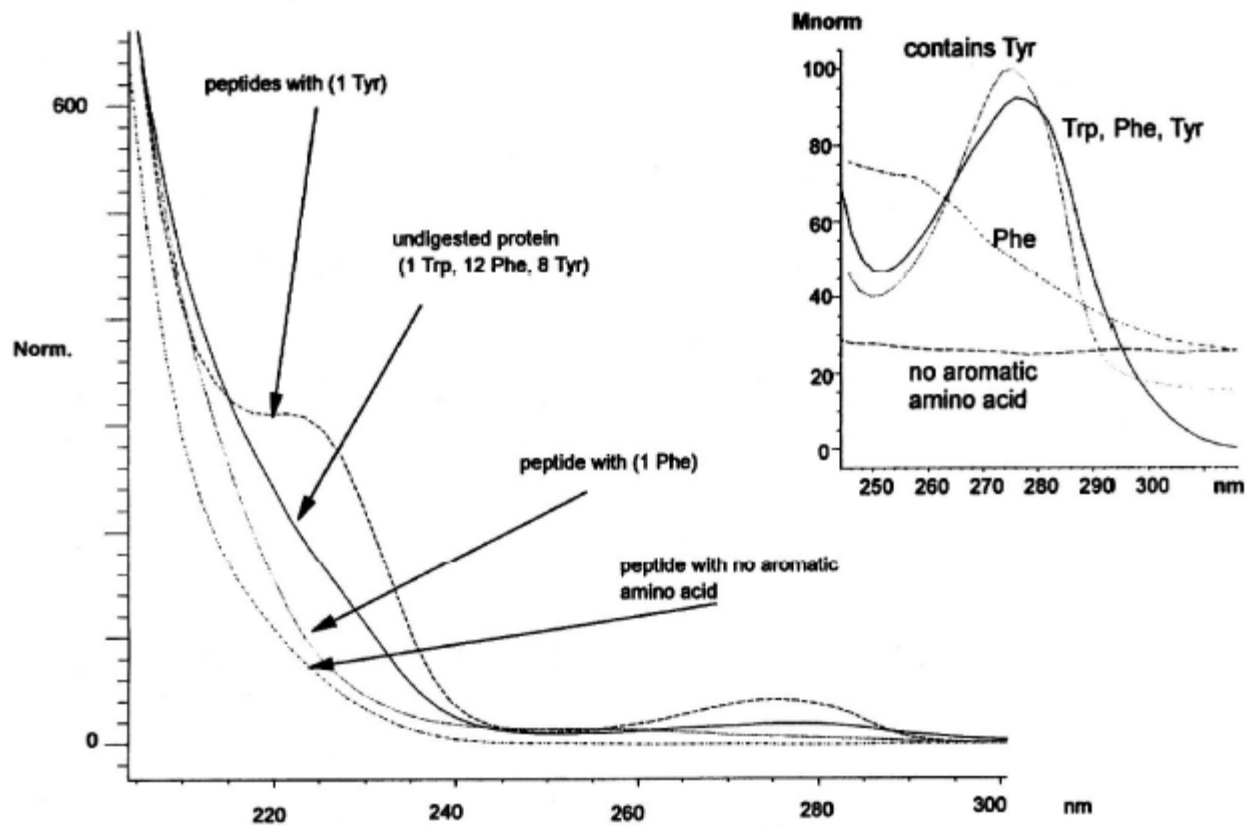
Vliv solí ve vzorku na dělení. Trypťické štěpy aspartát aminotransferázy.
Kapilára 100 (92) cm × 50 μm, teplota 30°C, pufr 50 mM fosfát, pH 2.5, napětí
200 V/cm, nástřik 200 mbar.s



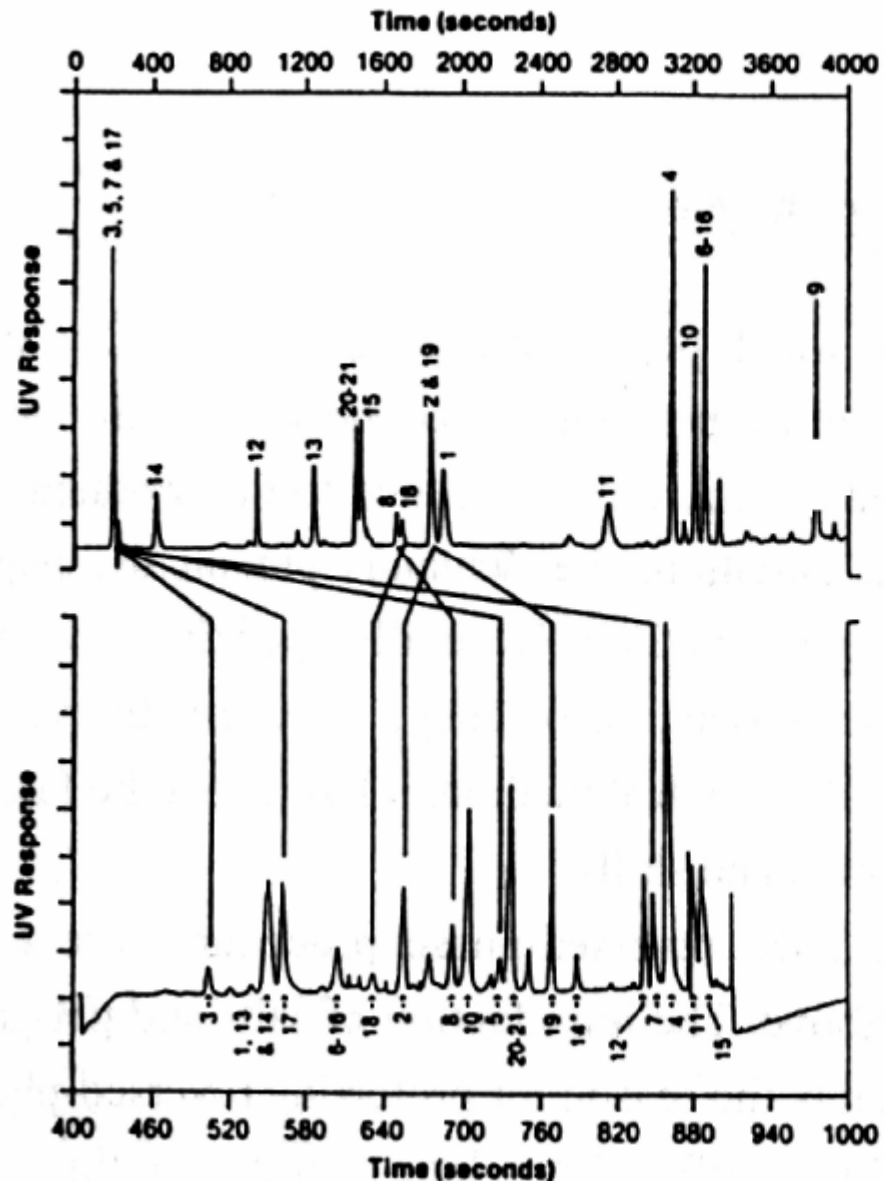
Vliv pufru ve vzorku na separaci tryptických štěpů hovězího sérového albuminu. Kapilára 80 (72) cm × 50 μm, teplota 25°C, pufr 30 mM fosfát, pH 7.0, napětí 310 V/cm, nástřik 200 mbar.s



Vliv koncentrace fosfátového pufru na dělení tryptických štěpů β -laktalbuminu A. Kapilára 80 (72) \times 50 μ m, teplota 30°C, napětí 310 V/cm, nástřik 200 mbar.s

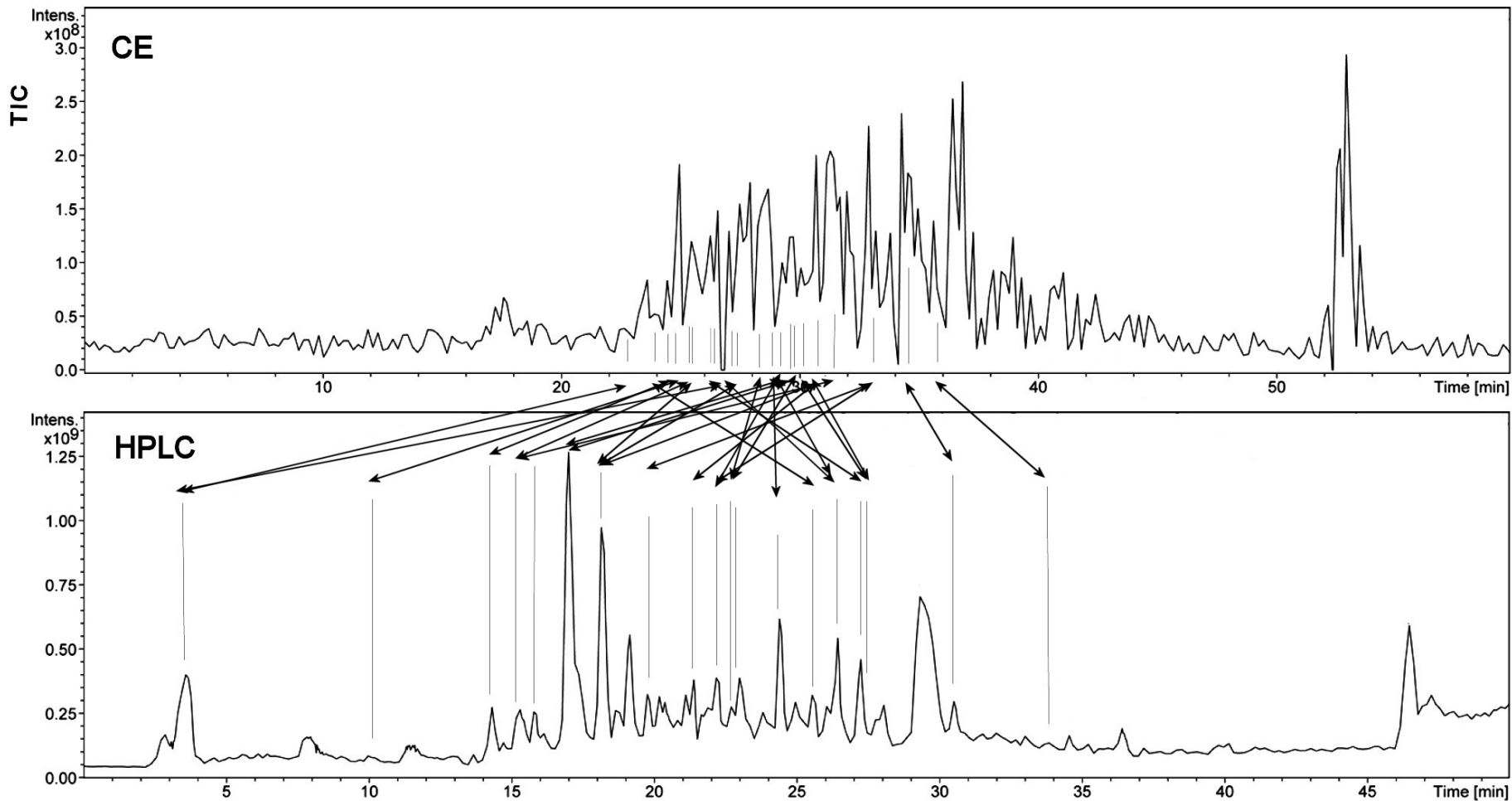


Vliv pufru ve vzorku na separaci tryptických štěpů hovězího sérového albuminu.
 Kapilára 80 (72) cm × 50 μm, teplota 25°C, pufr 30 mM fosfát, pH 7.0, napětí 310 V/cm, nástřik 200 mbar.s



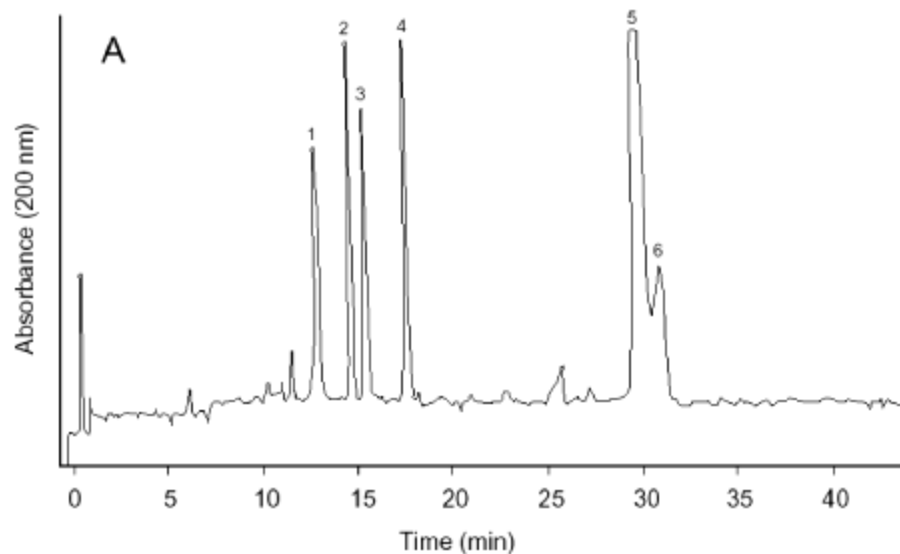
**Porovnání CZE a
RP-HPLC separace
(tryptické štěpy hGH)**

nahoře: HPLC
dole: CZE



Porovnání CZE a RP-HPLC separace (tryptic digest proteinů skořápky vajec)
Metody nejsou kompetitivní, ale komplementární

nahoře: CZE, dole: HPLC

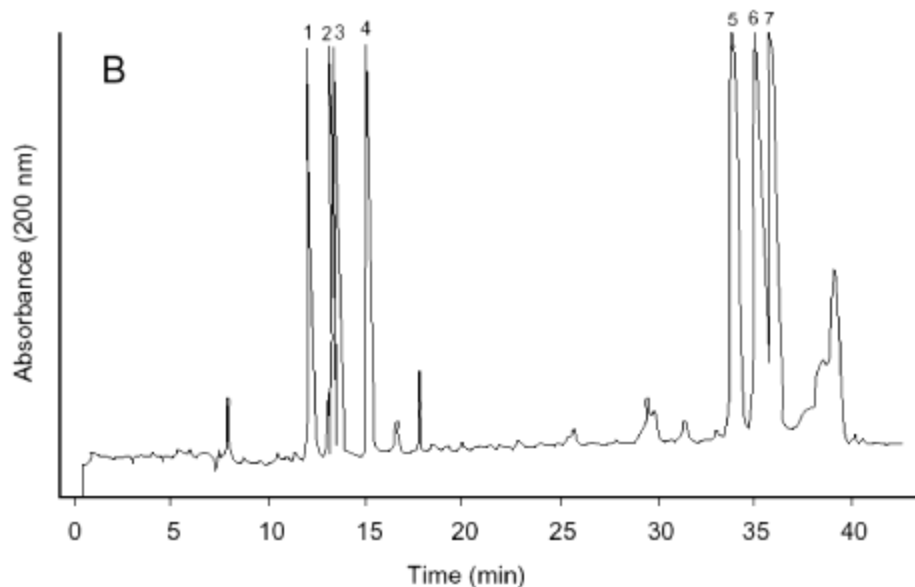


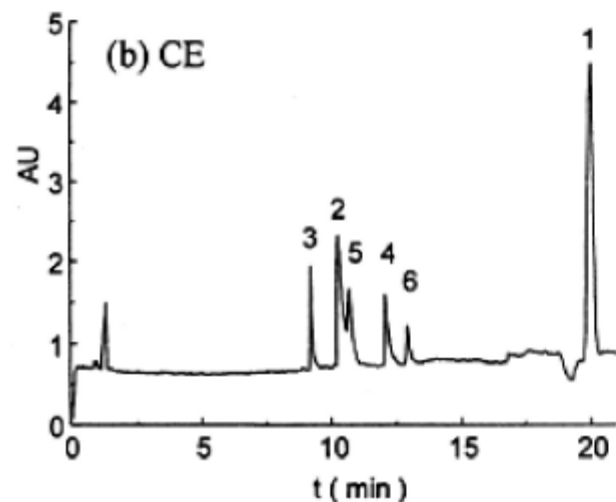
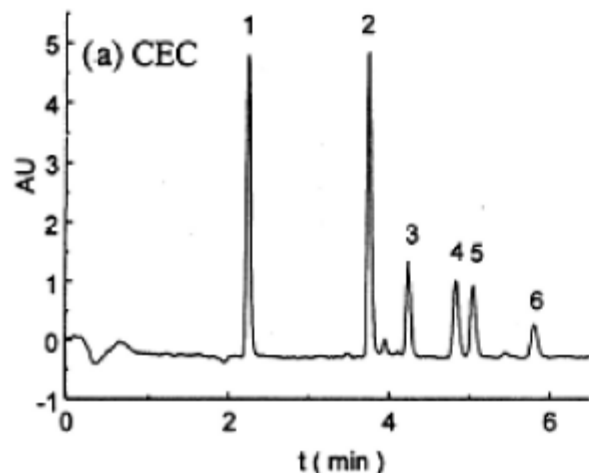
MEKC enkefalinových analogů
(A) bez a (B) s přidavkem 5%
acetonitrilu v pufru.

Kapilára, 65 cm × 75 μm, 100 mM borát
sodný, 100 mM SDS, pH 8.5, 15 kV,
25 °C, 200 nm.

Identifikace:

(1) metsulfoxidový enkefalin;
(2) methioninový enkefalin; (3) [ala2]
methioninový enkefalin; (4) leucinový
enkefalin; (5) amid leucinového
enkefalinu; (6) leucinový enkefalin-arg;
(7) proenkefalin.





Separace malých peptidů pomocí IE-CEC a CZE

Experimentální podmínky:

- (a) IE-*CEC* kolona, 75 μm ID, 375 μm OD, naplněná 5 μm Spherisorb-SCX, plněná/celková délka 10/31 cm; napětí, 15 kV, UV-detekce při 200 nm.
- (b) *CZE* kolona, 50 μm ID, 375 μm OD, účinná/celková délka 40/50.2 cm; napětí, 25 kV; UV detekce při 200 nm.

Identifikace: 1, benzylalkohol; 2, Gly-Thr; 3, Gly-Ala-Gly; 4, Glu-Glu; 5, Gly-Gly-Asn-Ala; 6, Glu-Glu-Glu.

SDS kapilární gelová elektroforéza (SDS-CGE)

27 cm Total Length Capillary

1 = Orange G

2 = α -lactalbumin (14.2 KDa)

3 = carbonic anhydrase (29 KDa)

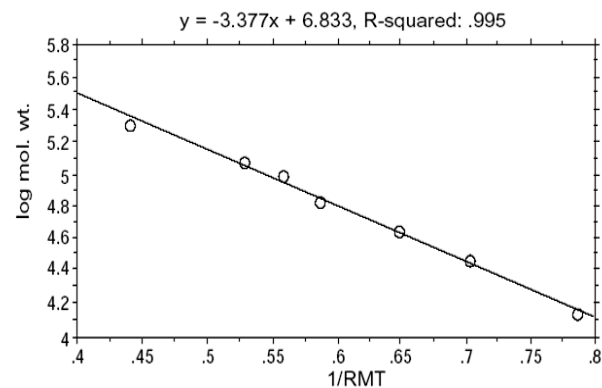
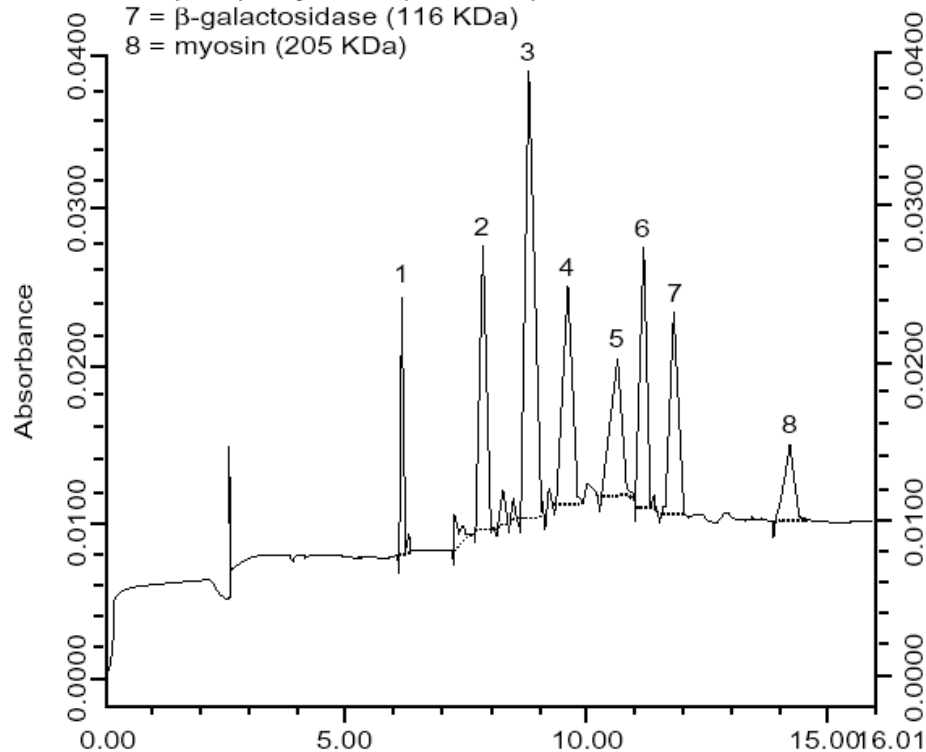
4 = ovalbumin (45 KDa)

5 = bovine serum albumin (66 KDa)

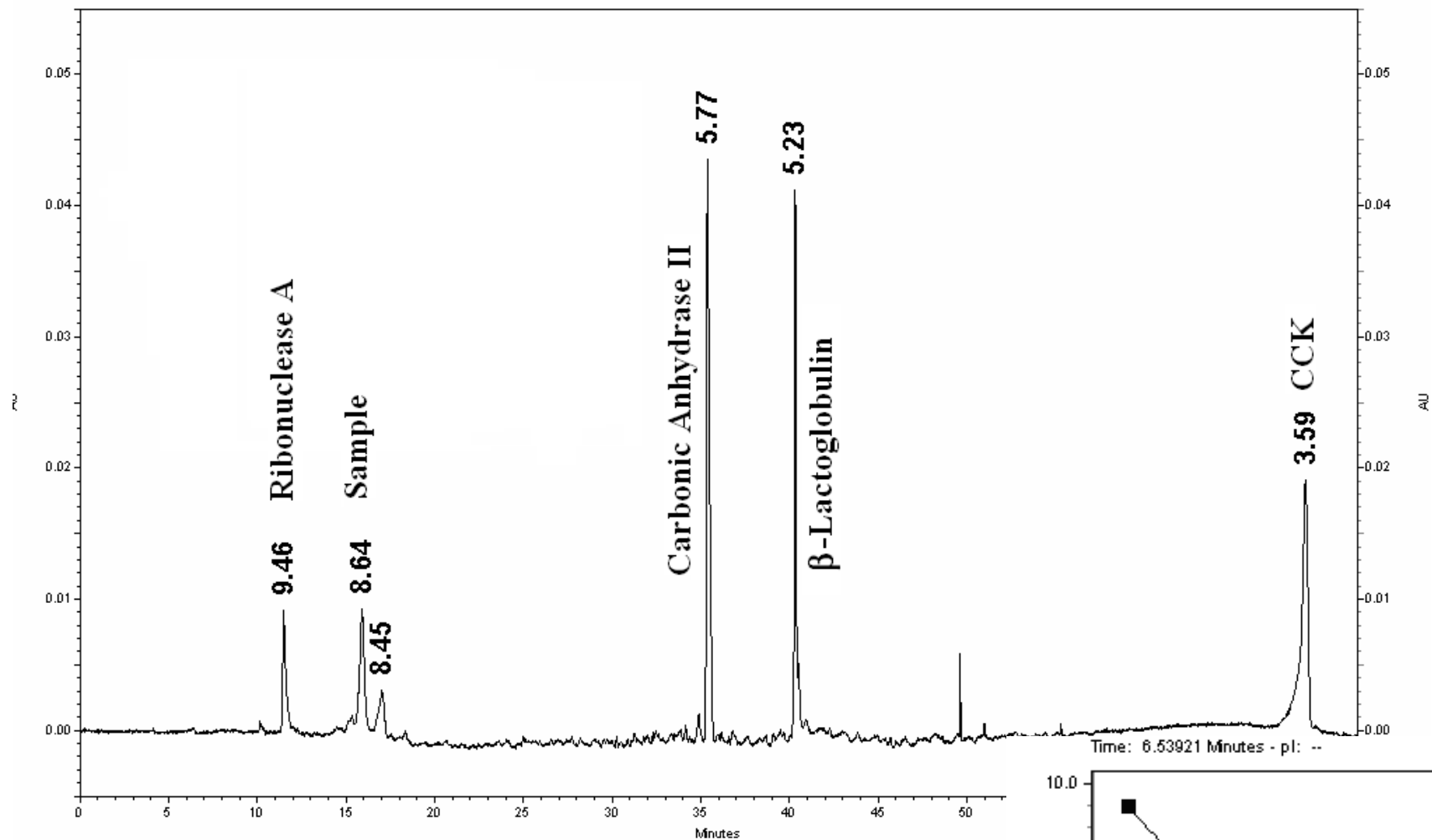
6 = phosphorylase B (97.4 KDa)

7 = β -galactosidase (116 KDa)

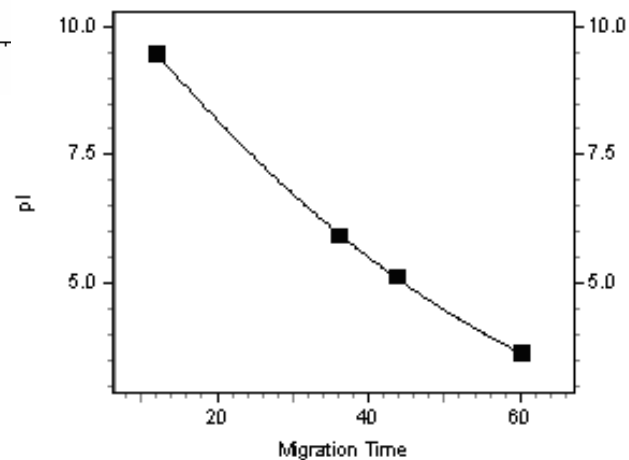
8 = myosin (205 KDa)



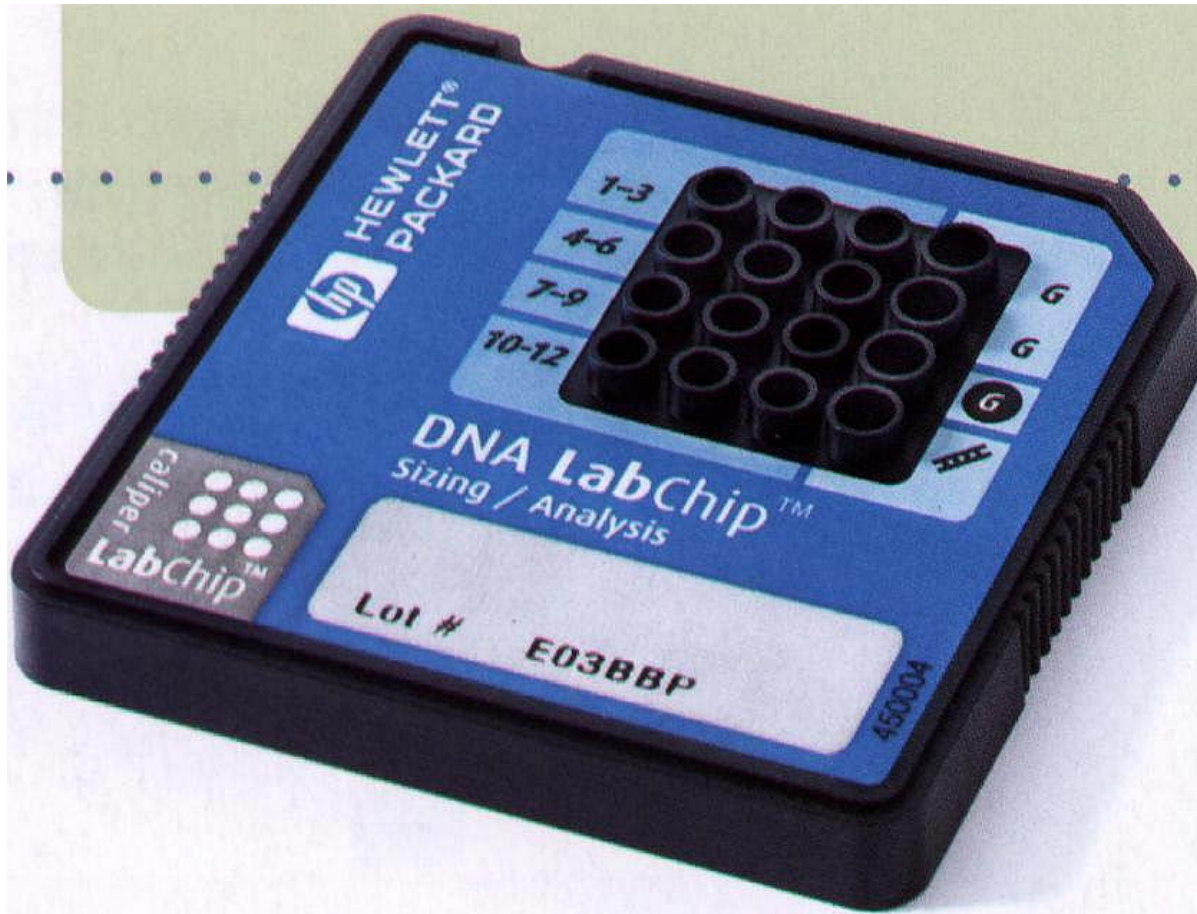
Molecular weight standard curve

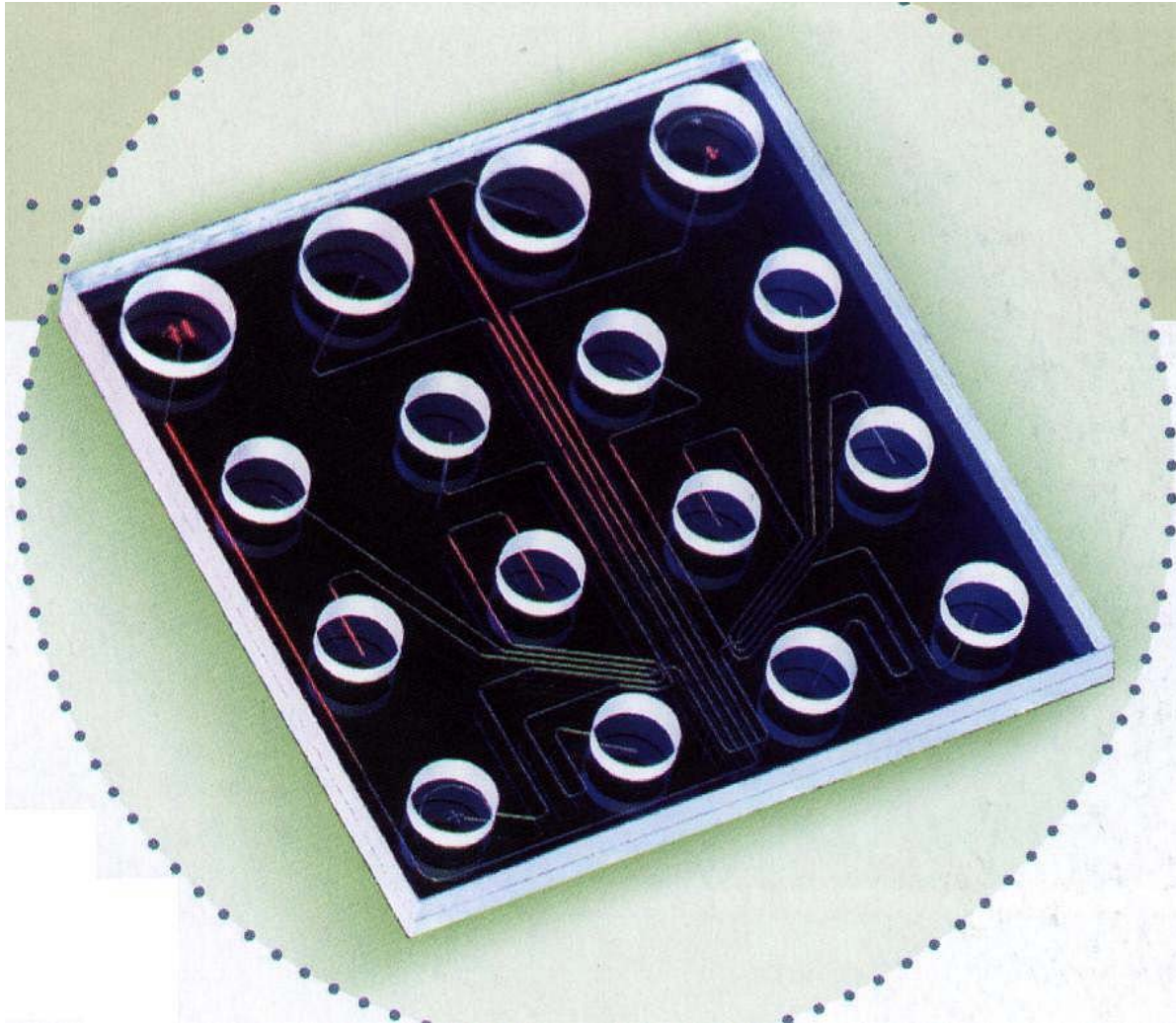


Kapilární izoelektrická fokusace



Chip



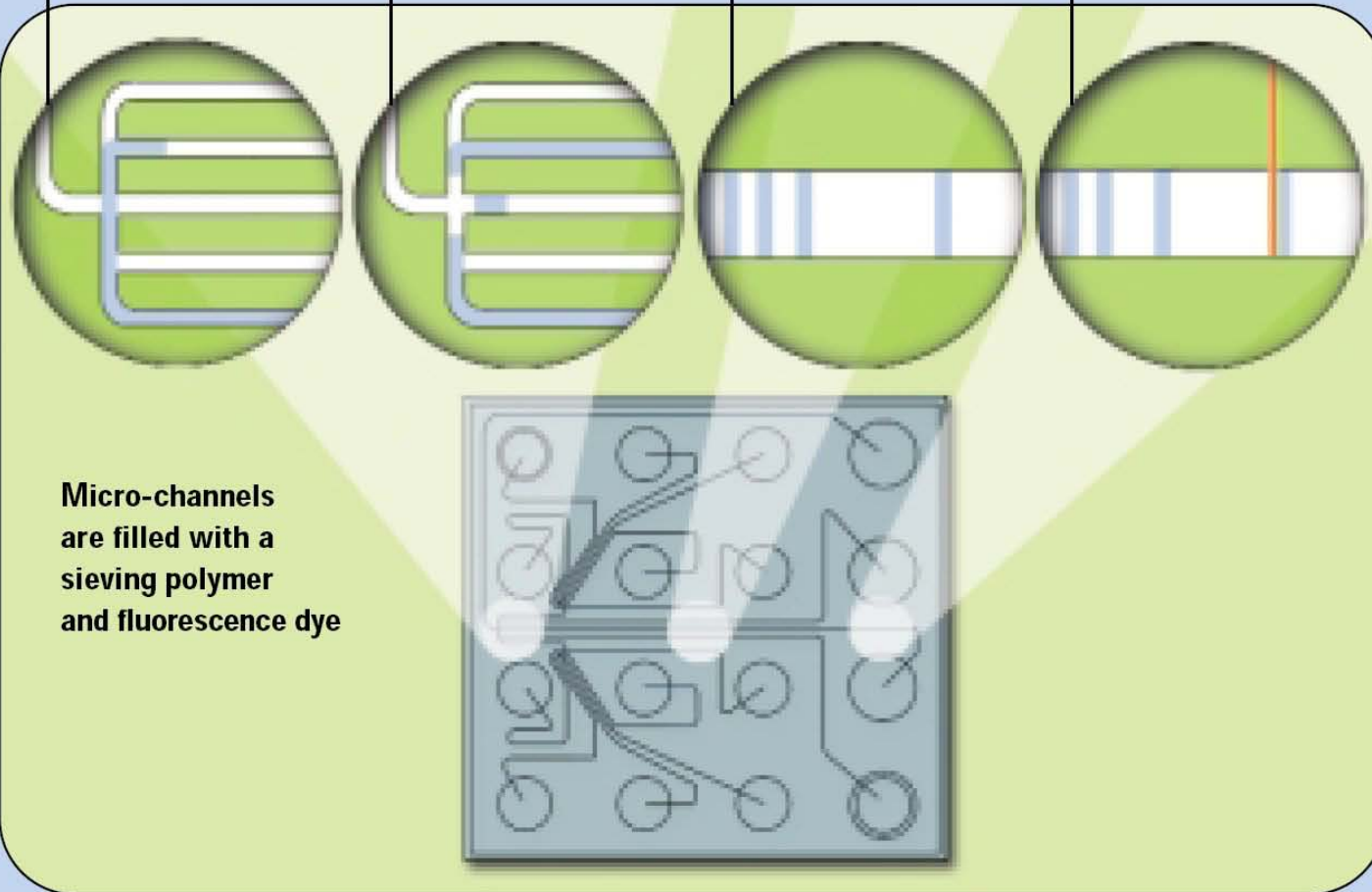


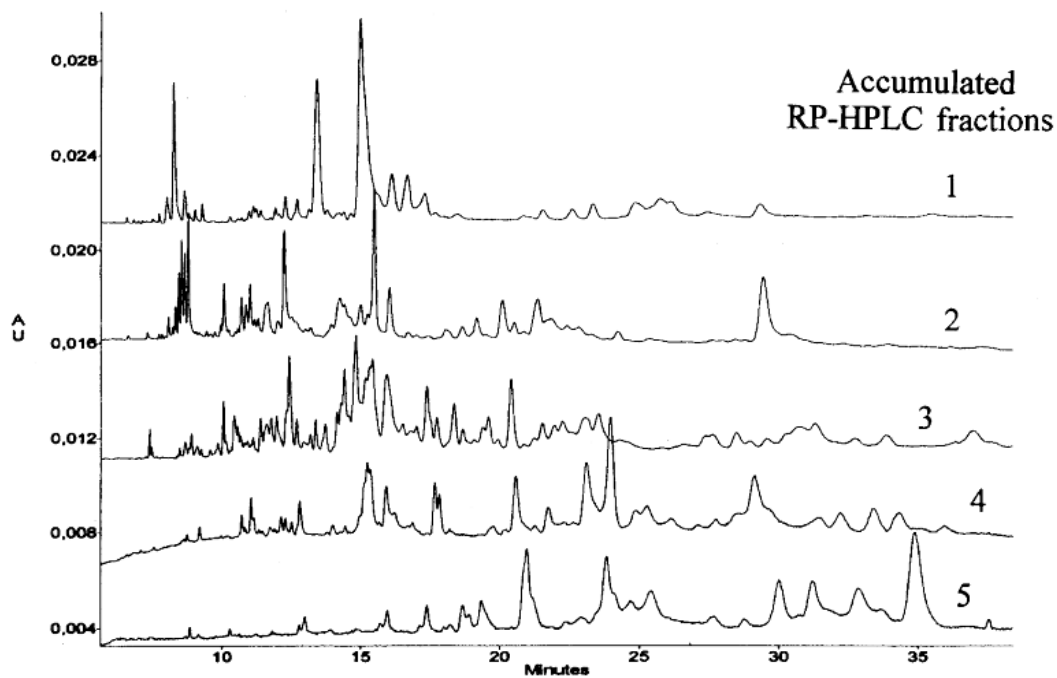
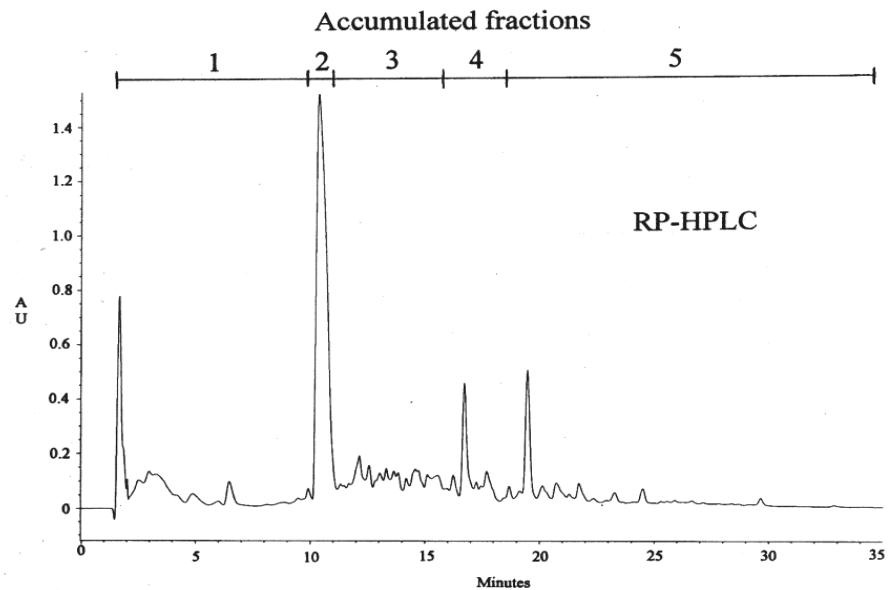
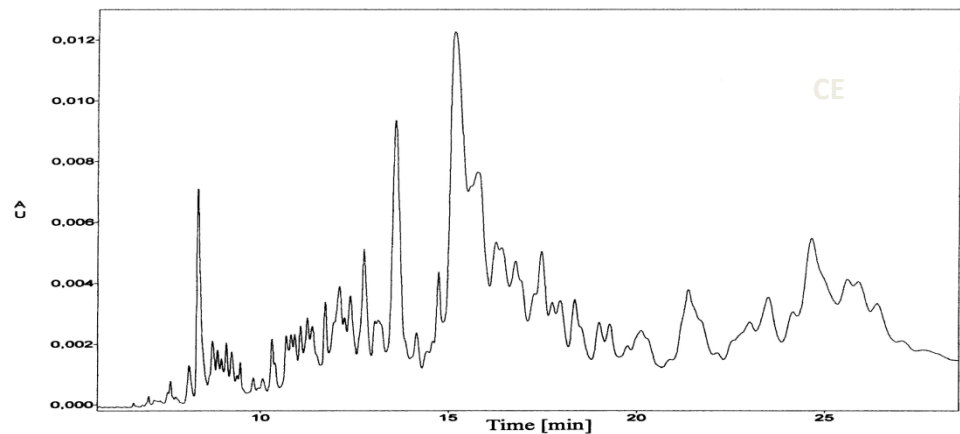
The sample moves through the micro channels from the sample well

The sample is injected into the separation channel

Sample components are electrophoretically separated

Components are detected by their fluorescence and translated into gel-like images (bands) and electropherograms (peaks)





Kolagen typu I a III – 172 fragmentů

CE analýza	–	65 píků
HPLC analýza	–	40 píků
HPLC + CE	–	150 píků