

FYZIKÁLNÍ GELY V KAPILÁRNÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZE A JEJICH UPLATNĚNÍ V ANALÝZE BÍLKOVIN

TOMÁŠ KRÍŽEK^a, PAVEL COUFAL^a,
ZUZANA BOSÁKOVÁ^a, EVA TESAŘOVÁ^b
a JANA SOBOTNÍKOVÁ-SUCHÁNKOVÁ^a

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha,

^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha
krizek@natur.cuni.cz

Došlo 12.11.07, přijato 15.8.08.

Klíčová slova: kapilární gelová elektroforéza, fyzikální gely, proteiny

Obsah

1. Úvod
2. Fyzikální gely a jejich vlastnosti
3. Separační mechanismy v kapilární gelové elektroforéze
4. Problematika adsorpce bílkovin
5. Syntetické polymery
6. Gely na bázi polysacharidů
7. Závěr

1. Úvod

Výsledky výzkumů v oblasti proteomiky nacházejí uplatnění v nejrůznějších oborech lidské činnosti od potravinářského průmyslu přes medicínu až po ekologii. K proteomice neodmyslitelně patří také analýza předmětu jejího zájmu – bílkovin. Vlastnosti bílkovin, jako jsou polarita, hodnota izoelektrického bodu nebo molekulová hmotnost, mohou být velmi různé, a proto není jejich analýza jednoduchá. Navíc se pracuje s biologickými vzorky, jejichž matrice jsou nejen složité, ale také velmi rozmanité. V důsledku toho neexistuje, navzdory intenzivnímu rozvoji proteomiky, metoda, která by byla pro analýzu bílkovin obecně použitelná. Vždy je nutno zvolit vhodný přístup a optimalizovat jej pro daný problém. Přehled nejnovějších trendů ve vývoji metod pro analýzu bílkovin podává Oliva ve svém nedávném článku¹. Mezi často používané techniky patří HPLC, kde se využívají separace jak na náplňových, tak na monolitických kolonách. Problematiku těchto separačních médií shrnul Jungbauer². Poměrně intenzivně se rovněž vyvíjejí metody využívající kapilární

elektrochromatografii. S aplikacemi této techniky při separaci bílkovin a peptidů se čtenář může seznámit prostřednictvím článku Mikšíka a Sedlákové³. Dalším možným přístupem k analýze bílkovin je aplikace kapilární gelové elektroforézy (CGE), někdy rovněž označované jako gelová kapilární elektrochromatografie⁴. Tato technika je na poli proteomiky perspektivní mimo jiné právě proto, že poskytuje dostatečný prostor pro úpravu podmínek analýzy tak, aby co nejlépe vyhovovaly určité aplikaci^{5,6}. Již při výběru separačního gelu se nabízí množství alternativ. V zásadě však lze volit mezi dvěma hlavními skupinami separačních médií, a to mezi gely fyzikálními a chemickými⁷. V obou případech je gel tvořen dlouhými polymerními řetězci, rozdíl však spočívá ve způsobu, jakým jsou tyto řetězce navzájem propojeny. Chemické gely jsou zesíťovány kovalentními vazbami. Při aplikaci v CGE mohou být tyto gely také kovalentně vázány k vnitřnímu povrchu kapiláry. Do této skupiny patří např. polyakrylamidový gel používaný při gelové elektroforéze v plošném uspořádání. Struktura gelů fyzikálních je naproti tomu dána fyzikálními interakcemi mezi řetězci, jako jsou vodíkové můstky a hydrofobní interakce, a také vzájemným zauzlením řetězců polymeru. Právě fyzikálními gely používanými pro separaci bílkovin metodou CGE se zabývá předkládaný přehledný článek.

2. Fyzikální gely a jejich vlastnosti

Jak již bylo řečeno, polymerní řetězce fyzikálního gelu nejsou zesíťovány kovalentními vazbami, v důsledku čehož vykazují nižší viskozitu než gely chemické. To spolu s faktem, že gel není vázán k vnitřní stěně kapiláry, umožňuje snadnou výměnu separačního média po každé analýze jeho prostým vytlačněním. Výměnou gelu se eliminují problémy spojené s jeho degradací a kontaminací během analýzy, což v konečném důsledku prodlužuje životnost kapiláry. Důležitou vlastností gelu je jeho propustnost či nepropustnost pro UV záření. Gely absorbující UV záření výrazně snižují citlivost nejčastěji používaného UV spektrofotometrického detektoru, a proto se snažíme, pokud je to možné, dávat přednost gelům UV transparentním. V rámci optimalizace metody CGE je kromě druhu, koncentrace a pH separačního pufru významným a snadno nastavitelným parametrem rovněž koncentrace gelující složky, která určuje viskozitu a hustotu polymerní sítě. Podobný vliv na kvalitu separačního gelu má i střední molekulová hmotnost použitého polymeru. Obecně platí, že polymery o vyšší molekulové hmotnosti a koncentraci mají vyšší separační účinnost, avšak s rostoucí délkou řetězců a zvyšující se koncentrací polymeru roste i viskozita gelu, což může působit potíže při jeho přípravě a manipulaci s ním. Proto je nutné najít mezi těmito dvěma

tendencemi přijatelný kompromis. Vhodnou volbou koncentrace a průměrné molekulové hmotnosti polymeru je možné také modifikovat metodu pro analýzu bílkovin různých molekulových hmotností a v případě, že je rozlišení analytů pro daný účel zbytečně velké, lze snížením množství gelu zkrátit i dobu analýzy.

3. Separační mechanismy v kapilární gelové elektroforéze

Separace proteinů metodou CGE se často provádějí v pufru s malým přídavkem natrium-dodecylsulfátu (SDS). Tato látka interaguje svými alifatickými řetězci s bílkovinami a vytváří s nimi záporně nabitě komplex. Přitom větší molekuly bílkovin interagují současně s více molekulami SDS a získávají tak větší náboj než proteiny menší. Díky tomu mají pak komplexy s různě velkými molekulami bílkovin podobné elektroforetické mobility a jejich separace probíhá pouze na základě síťového efektu. Rychlost jejich migrace je v tomto případě určována jejich velikostí, resp. molekulovou hmotností. Probíhá-li separace výlučně tímto mechanismem, jsou migrační časy proteinů lineární funkcí logaritmu jejich molekulové hmotnosti.

Při provedení analýzy bez přítomnosti SDS se proteiny separují na základě kombinace již zmíněného síťového efektu a rozdílů v jejich mobilitách, které jsou dány poměrem jejich hmotnosti k jejich celkovému náboji. Celkový náboj bílkovin je přitom silně závislý na pH separačního pufru. Dále mohou k separaci přispívat i více či méně specifické interakce proteinů se separačním gelem (např. hydrofobní interakce), které výrazně zpomalují migraci určitého analytu nebo celé skupiny analytů.

4. Problematika adsorpce bílkovin

Při CGE na fyzikálních gelech, a nejen na nich, je nutno řešit i problém adsorpce proteinů na vnitřní stěnu kapiláry. Z tohoto důvodu se mnohdy používají kapiláry s pokrytými vnitřními stěnami. To nejen snižuje míru adsorpce bílkovin, ale také potlačuje elektroosmotický tok, který může během separace vymývat gel z kapiláry. Pokrytí je možné realizovat chemickým navázáním tenké vrstvy vhodného polymeru, což nazýváme statické neboli permanentní pokrytí^{8,9}. Druhým způsobem je pokrytí dynamické, kdy je polymerní film k povrchu kapiláry poután pouze fyzikální adsorpcí či elektrostatickou interakcí¹⁰⁻¹². Při použití dynamické metody pokrývání se kapilára před separací promývá roztokem aktivní látky modifikující vnitřní povrch kapiláry, a během separace je tato látka v malé koncentraci přítomna i v separačním pufru. Dynamická a statická pokrytí vnitřního povrchu separační kapiláry nabízejí širokou paletu možností a jsou předmětem neustálého vývoje^{5,13,14}. Další možnosti, jak potlačit elektroosmotický tok a adsorpci bílkovin, je provádět separace v prostředí o nízkém pH, v němž nedisociují silanolové

skupiny na povrchu separační kapiláry. Výhoda tohoto způsobu spočívá v tom, že není nutná předchozí úprava kapiláry, a že odpadají problémy s životností pokrytí. V mnohých případech však nemusí být snížení pH dostatečným prostředkem k potlačení adsorpce analytů. Tento přístup rovněž znemožňuje separaci proteinů v nativním stavu, což je podmínkou při studiu jejich interakcí a biologických funkcí. Posledně jmenovanou nevýhodu je možné kompenzovat využitím hystereze pH (cit.¹⁵), kdy se kapilára před analýzou promývá silně kyselým roztokem (pH 1). Pufr používaný při následné separaci má pH vyšší, avšak díky pomalému ustavování rovnováhy mezi vnitřním povrchem kapiláry a separačním pufrům zůstávají silanolové skupiny na vnitřní stěně kapiláry nedisociovány po dobu dostatečně dlouhou k provedení analýzy, takže lze separovat bílkoviny v nativním stavu i v nemodifikované kapiláře¹⁵.

5. Syntetické polymery

Jako fyzikální gely pro separační média v CGE se nabízejí dvě základní skupiny polymerů. Jednou z nich jsou syntetické polymery, druhou pak polymery přírodní, zpravidla na bázi polysacharidů. Přehled vybraných aplikací zmiňovaných v tomto článku je uveden v tab. I.

Ze syntetických polymerů se často používají lineární polyakrylamid¹⁶⁻¹⁹, polyvinylalkohol^{20,21} a polyethylenglykol²²⁻²⁶. Lineární polymer akrylamidu použili Werner a spol.¹⁶ pro separaci sedmi proteinů o molekulových hmotnostech v rozmezí 14–205 kDa v přítomnosti SDS. Vzhledem k tomu, že lineární polyakrylamid slouží jednak jako separační médium a jednak pokrývá vnitřní stěny kapiláry, mohla být separace s úspěchem provedena v nepokryté křemenné kapiláře. Nevýhodou polyakrylamidu je však jeho vysoká absorpce při 214 nm, která omezuje citlivost a zvyšuje detekční limity metody. Naproti tomu polyethylenglykol (PEG) vykazuje v UV oblasti spektra absorpční výrazně nižší. Ganzler a spol.²² jej použili v 3% koncentraci pro separaci šesti proteinů (14 až 97 kDa) v přítomnosti SDS v kapiláře dynamicky pokryté dextranem, jenž bude podrobněji zmíněn v další části. PEG o stejné koncentraci a rovněž v pufru s přídavkem SDS použili také Benedek a spol.²³ k separaci pěti bílkovin v rozmezí molekulových hmotností 14–97 kDa. V jejich provedení však byla použita nepokrytá separační kapilára. Podle studie provedené autory citovaného článku není vliv pokrytí kapiláry na separaci příliš velký, avšak prodlužuje její životnost. Podobně jako lineární polyakrylamid i PEG tedy zřejmě pokrývá vnitřní povrch kapiláry a zároveň funguje jako separační médium. Autoři dále v souladu s obecným předpokladem uvádějí, že s rostoucí koncentrací PEG se rozšiřuje separační oblast, tj. rozmezí na ose retenčního času, v němž se nacházejí piky bílkovin. Tím roste i rozlišení analytů, přičemž účinnost separace zůstává bez výrazných změn. Třetí z výše jmenovaných polymerů, polyvinylalkohol (PVA), použili Simo-Alfonso a spol.²⁰ v 5–6% koncentraci v kapiláře staticky pokryté 2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-olem k separaci šesti bílkovin

Tabulka I

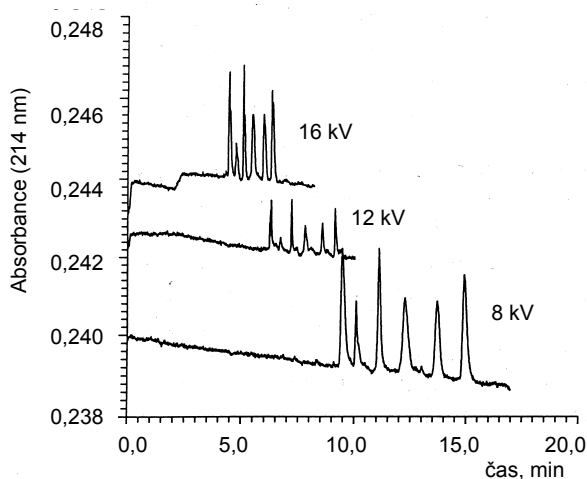
Přehled aplikací fyzikálních gelů v kapilární gelové elektroforéze pro separaci bílkovin

Gel	Předúprava kapiláry	Princip separace	pH	Teplota [°C]	Separované analyty	Poznámka	Lit.
lineární polyakrylamid	ne	sítový efekt	8,0	30	α -laktalbumin, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, fosforylasa b, β -galaktosidasa, myosin	vysoká absorpce gelu při 214 nm	13
10% dextran, SDS	ne	sítový efekt	8,8	20	myoglobin, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, β -galaktosidasa a myosin	dlouhá životnost kolony	17
3% polyethylen-glykol, SDS	pokrytí dextranem						
3% polyethylen-glykol 100 kDa	ne	sítový efekt	8,5	20	α -laktalbumin, sojový inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, fosforylasa b	pokrytí kapiláry prodlužuje životnost kolony	19
10% dextran 2 MDa	2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-ol	sítový efekt	10,5	20	α -laktalbumin, inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, BSA, fosforylasa b		20
4% polyvinylalkohol	2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-ol						
7,5% Pluronic F127	ne	dle poměru z/m +	2,5	20 (50)	CNBr fragmenty kolagenu	při 5 °C kapalina,	24
10% Pluronic F127	ne	sítový ef. + hydrofobní interakce	2,5	20	peptidové štěpy nerozpustných proteinů slepičí skořápky	při 20 °C gel	25
5% Pluronic F127, SDS	ne		2,5	20	proteiny do 50 kDa		26
7,5% Pluronic F127	hydrofilní pokrytí		2,5	20	cytochrom C, aldolasa, katalasa, chymotrypsinogen, albumin, polylysin		27
15% Pluronic F127 (gelová zátka)	ne		2,5	40	peptidy kolagenu, peptidy získané natrávením BSA trypsinem		28
dextran 2 MDa, SDS	[3-(glycidylxy)propyl]trimethoxysilan	sítový efekt	8,6	20	karbonátdehydratasa, BSA, ovalbumin, fosforylasa b	separace do 2 min, složitě vzorky do 12 min	29
7% pullulan, SDS	lineární polyakrylamid	sítový efekt	8,7	20	α -laktalbumin, inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, fosforylasa b, BSA, β -galaktosidasa	separace do 13 min	31
0,1–0,2% roztok kationtového derivátu škrobu, použit i k pokrytí vnitřních stěn kapiláry	nebyl diskutován		7,5	20	insulin β , ribonukleasa A, karbonátdehydratasa II, α -chymotrypsinogen A	separace do 13 min	32

s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 14–94 kDa. PVA je podobně jako PEG propustný pro UV záření od 200 nm výše, takže ani tento polymer nepůsobí potíže při UV spektrofotometrické detekci. Autoři článku navíc studovali zajímavý stěnový efekt, kdy použití kapiláry o vnitřním průměru 25 μ m namísto 75 μ m umožňuje účinnou separaci proteinů již při 1% koncentraci PVA, což je hodnota

ležící hluboko pod mezí zauzlení. Ta se u PVA pohybuje okolo 3%. Důsledkem použití kapiláry takto malého průměru je ovšem rovněž snížení citlivosti detekce. Autoři proto volí kompromis a doporučují 4% PVA v separační kapiláře o vnitřním průměru 50 μ m. Separaci bílkovin za těchto podmínek ilustruje obr. 1.

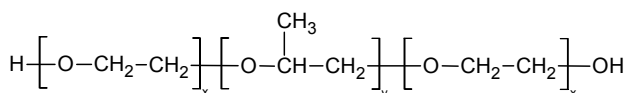
Zvláštním typem syntetických polymerů jsou gely



Obr. 1. Separace bílkovin v pufru o pH 8,8 s přidavkem 4 % polyvinylalkoholu a 0,1 % SDS. Píky zleva doprava: α -laktalbumin, inhibitor trypsinu, karbonátdehydratasa, ovalbumin, hovězí sérový albumin, fosforylasa b. Simo-Alfonso a spol.²⁰, převzato se svolením autora

citlivé na teplotu, tzv. termoresponzivní gely. Mezi ně patří např. Pluronic F127, jehož struktura je znázorněna na obr. 2.

Možnosti aplikace tohoto gelu studovala skupina Mikšíka^{27–30}. Jde o zástupce široké skupiny trojblokových kopolymerů (Pluronic), jejichž koncové bloky jsou tvořeny poly(ethylenoxidem), zatímco prostřední blok je tvořen poly(propylenoxidem). Kopolymer asociují do velkých micel tím způsobem, že méně polární polypropylenoxidové bloky tvoří jádro micely, které je obklopeno více hydratovanými bloky polyethylenoxidovými. Viskozita roztoku tohoto polymeru je silně závislá na jeho koncentraci a také na teplotě. Roztok obsahující 20 % polymeru Pluronic F127 je kapalný při 5 °C a zahřátím na teplotu 20 °C nabývá gelové konzistence. To je výhodné, protože za laboratorní teploty během analýzy nehrozí vymývání gelu z kapiláry elektroosmotickým tokem, zatímco snížení teploty umožňuje jeho snadnou výměnu. Nevýhodou je naopak časová náročnost přípravy, která vyžaduje plnění kapiláry za snížené teploty a kontrolu teploty pro správnou tvorbu gelu. Proto byl Pluronic F127 používán v nižších koncentracích, což proces výrazně zjednodušilo. Pluronic



Obr. 2. Strukturální vzorec polymeru Pluronic F127; $x = 106$, $y = 70$

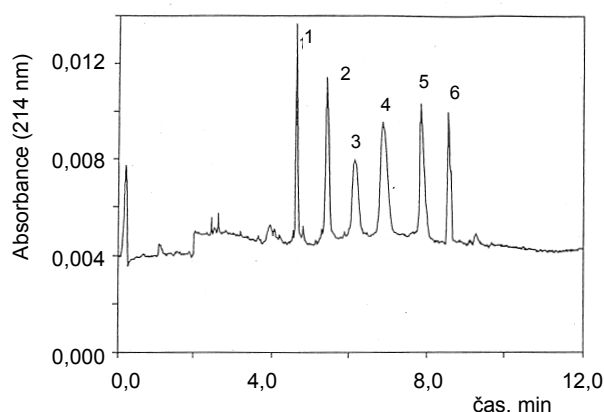
F127 byl použit v koncentraci 7,5–10 % pro separace peptidových štěpů bílkovin v nepokryté kapiláře v pufru o nízkém pH, aby byla potlačena adsorpce analytů na stěnu kapiláry^{27,28}. Některé studie naznačují, že přidavek organických modifikátorů do separačního pufru nemá podstatný vliv na výsledek separace. Při studiu vlivu zvýšené teploty se ukázalo, že při 50 °C probíhá analýza sice rychleji než při 20 °C, současně se však zhoršuje rozlišení²⁷. V koncentraci 5 % byl Pluronic F127 použit také k separaci proteinů o molekulové hmotnosti do 50 kDa v přítomnosti SDS a v nepokryté kapiláře²⁹. V další popsané aplikaci byl tento gel použit k separaci směsi šesti bílkovin se širokým rozsahem molekulových hmotností v hydrofilně pokryté kapiláře³⁰. Výsledky naznačují, že separace na tomto gelu probíhá v kyselém pufru bez přítomnosti SDS podle poměru hmotnosti k náboji a na základě síťového efektu s určitým příspěvkem hydrofobních interakcí. Sedláková a spol.³¹ plnili týmž kopolymerem kapiláru pouze částečně. Separace peptidů pak probíhala zčásti v gelu a zčásti ve volné kapiláře. Některé analyty byly zřejmě v naplněné části kapiláry specificky zadrženy, což výrazně zpomalilo jejich migraci. Patrně se zde uplatnily již zmiňované hydrofobní interakce. Interakce analytů se separačním gelem může být v jistých aplikacích výhodou, jindy je však naopak na obtíž a je tedy nutné použitelnost gelu v daném případě experimentálně ověřit.

6. Přírodní polymery

Z přírodních polymerů se v CGE nejvíce používají polysacharidy, případně jejich deriváty. Často používaným polysacharidem je dextran^{20,22,32,33}. Simo-Alfonso a spol.²⁰ takto separovali šest bílkovin (14–94 kDa) v kapiláře pokryté 2-(2-akrylamidoethoxy)ethan-1-olem v alkalickém prostředí. Autoři uvádějí, že pro proteiny s nižší molekulovou hmotností (do 20 kDa) je lepšího rozlišení dosaženo s dextranem s kratšími řetězci, zatímco u proteinů s vyšší molekulovou hmotností se lépe osvědčily řetězce delší. Ganzler a spol.²² použili dextran v nepokryté kapiláře v přítomnosti SDS k separaci šesti bílkovin v rozmezí molekulových hmotností 14–97 kDa. Výsledek této separace je ukázán na obr. 3.

Laush a spol.³² publikovali metodu pro rychlou separaci proteinů s dextranem v krátké kapiláře pokryté [3-(glycidyloxy)propyl]trimethoxysilanem v přítomnosti SDS. Separace čtyř bílkovin s molekulovou hmotností v rozmezí 29–97 kDa bylo za výše uvedených experimentálních podmínek dosaženo během dvou minut. Ačkoliv byly všechny proteiny separovány na základní linii, u komplikovanějších směsí by dosažené rozlišení nemuselo být dostatečné. Pro komplexní směsi proto autoři doporučují provést analýzu v delší kapiláře při nižší intenzitě elektrického pole; separace pak proběhne během 12 minut.

Mezi méně běžné polysacharidy patří pullulan, s jehož použitím Nakatani a spol.³⁴ provedli třináctiminutovou separaci sedmi bílkovin (14–116 kDa) v kapiláře pokryté lineárním polyakrylamidem v pufru s přidavkem



Obr. 3. Separace bílkovin v pufru o pH 8,8 s přidavkem 10 % dextranu a 0,1 % SDS. Píky: (1) myoglobin, (2) karbonátdehydratasa, (3) ovalbumin, (4) hovězí sérový albumin, (5) β -galaktosidasa, (6) myosin. Ganzler a spol.²², převzato se svolením autora

SDS. Kationtové deriváty škrobu, ne však jako separační gel, nýbrž jako dynamické pokrytí vnitřních stěn kapiláry, použili Sakai-Kato a spol.³⁵ při separaci směsi čtyř bazických bílkovin. Zde je však vhodné poznamenat, že kladný náboj použitého pokrytí, který je velmi výhodný pro separaci bazických proteinů (elektrostaticky je odpuzuje), může být naopak problematický při separaci kyselých bílkovin.

7. Závěr

Tento přehled si klade za cíl podat stručný, zdaleka ne však úplný přehled často používaných gelů a způsobů běžně sloužících k optimalizaci separace bílkovin při CGE. Aplikace fyzikálních gelů při CGE přináší oproti chemickým gelům především možnost výměny separačního média po každé analýze, čímž se prodlužuje životnost kapilár a dosahuje dobré reprodukovatelnosti výsledků. Existuje mnoho faktorů, jejichž variací je možné optimalizovat metodu CGE pro potřeby určité proteomické aplikace. Významným faktorem je přitom především druh gelu, jeho střední molekulová hmotnost, jeho koncentrace a dále způsob potlačení adsorpce bílkovin na vnitřní stěně kapiláry. Při volbě gelu je dobré věnovat pozornost jeho propustnosti pro UV záření, neboť jeho omezená propustnost resp. nepropustnost omezuje použitelnost UV spektrofotometrické detekce. Z tohoto hlediska se například polyakrylamid jeví jako nevýhodný. Pro potlačení adsorpce bílkovin na stěnách kapiláry se nabízí možnost statického či dynamického pokrytí kapiláry, a také práce v separačním pufru o nízkém pH, případně využití hystereze pH. Některé gely jako lineární polyakrylamid nebo polyethylenglykol navíc fungují samy o sobě jako pokrývací médium, takže je možná jejich aplikace i v nepokryté kapiláře. CGE na fyzikálních gelech má mezi nástroji proteomiky své místo

a není pochyb o tom, že vývoj v této oblasti bude pokračovat i v budoucnu. V této oblasti lze také předpokládat rostoucí počet aplikací postupně převáděných nebo přímo vyvíjených v nanoměřítku pro separace bílkovin a peptidů s využitím fyzikálních gelů na mikrofluidních čípech.

TK a PC děkují za finanční podporu Grantové agentury ČR (projekt 203/07/0392), ZB a JS děkují MŠMT ČR (výzkumný záměr MSM0021620857) a ET děkuje MŠMT ČR (projekt Kontakt ME895).

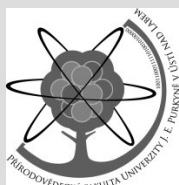
LITERATURA

- Oliva A., Farina J. B., Llabres M.: *Curr. Pharm. Anal.* 3, 230 (2007).
- Jungbauer A.: *J. Chromatogr., A* 1065, 3 (2005).
- Mikšík I., Sedláková P.: *J. Sep. Sci.* 30, 1686 (2007).
- Deyl Z., Švec F. (ed.): *Capillary Electrochromatography*. Elsevier, Amsterdam 2001.
- Schomburk G. v knize: *Capillary Electrophoresis Technology* (Guzman N. A., ed.), kap. 9. Marcel Dekker, New York 1993.
- Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*, kap. 4.3. Elsevier, Amsterdam 1992.
- Weinberger R.: *Practical Capillary Electrophoresis*, kap. 5. Academic Press, San Diego 1993.
- Štřelec I., Pacáková V., Bosáková Z., Coufal P., Guryča V., Štulík K.: *Electrophoresis* 23, 528 (2001).
- Liu Y., Fu R., Gu J.: *J. Chromatogr., A* 723, 157 (1996).
- Chang W. W. P., Hobson C., Bomberger D. C., Schneider L. V.: *Electrophoresis* 26, 2179 (2005).
- Mohabbati S., Westerlund D.: *J. Chromatogr., A* 1121, 32 (2006).
- Quang C., Malek A., Khaledi M. G.: *Electrophoresis* 24, 824 (2003).
- Horvath J., Dolník V.: *Electrophoresis* 22, 644 (2001).
- Kunh R., Hoffstetter-Kunh S.: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, kap. 5. Springer-Verlag, Berlin 1993.
- Bohlin M. E., Blomberg L. G., Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* 26, 4043 (2005).
- Werner W. E., Demorest D. M., Stevens J., Wiktorowicz J. E.: *Anal. Biochem.* 212, 253 (1993).
- Blanco D., Junco S., Exposito Y., Gutierrez D.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27, 1523 (2004).
- Gomis D. B. L., Junco S., Exposito Y., Gutierrez D.: *Electrophoresis* 24, 1391 (2003).
- Manabe T., Oota H., Mukai J.: *Electrophoresis* 19, 2308 (1998).
- Simo-Alfonso E., Conti M., Gelfi C., Righetti P. G.: *J. Chromatogr., A* 689, 85 (1995).
- Boulis Y., Richet C., Haupt K., Hennebicq S., Soudan B., Tetaert D., Degand P., Vijayalakshmi M. A.: *J. Chromatogr., A* 805, 285 (1998).
- Ganzler K., Greve K. S., Cohen A. S., Karger B. L., Cooke N. C.: *Anal. Chem.* 64, 2665 (1992).

23. Benedek K., Thiede S.: *J. Chromatogr., A* 676, 209 (1994).
24. Bean S. R., Lookhart G. L.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 4246 (1999).
25. Mori A., Leita L.: *J. Plant Nutr.* 21, 2335 (1998).
26. Guttman A., Shien P., Hoang D., Horvath J., Cooke N.: *Electrophoresis* 15, 221 (1994).
27. Mikšík I., Deyl Z.: *J. Chromatogr., B* 739, 109 (2000).
28. Mikšík I., Charvátová J., Eckhardt A., Deyl Z.: *J. Chromatogr., B* 800, 155 (2004).
29. Mikšík I., Eckhardt A., Forgács E., Cserháti T., Deyl Z.: *Electrophoresis* 23, 1882 (2002).
30. Mikšík I., Deyl Z., Kašička V.: *J. Chromatogr., B* 741, 37 (2000).
31. Sedláková P., Svobodová J., Mikšík I.: *J. Chromatogr., B* 839, 112 (2006).
32. Laush R., Scheper T., Reif O. W., Schlösser J., Fleischer J., Freitag R.: *J. Chromatogr., A* 654, 190 (1993).
33. Ostergaard J., Schou C., Larsen C., Heegaard N. H. H.: *Anal. Chem.* 75, 207 (2003).
34. Nakatani M., Shibukawa A., Nakagawa T.: *J. Chromatogr., A* 672, 213 (1994).
35. Sakai-Kato K., Kato M., Nakajima T., Toyo'oka T., Imai K., Utsunomiya-Tate J.: *J. Chromatogr., A* 1111, 127 (2006).

T. Křížek^a, P. Coufal^a, Z. Bosáková^a, E. Tesařová^b, and J. Sobotníková-Suchánková^a (^a *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,* ^b *Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Physical Gels in Capillary Gel Electrophoresis and Their Application in Protein Analysis**

Capillary gel electrophoresis (CGE) is a promising proteomic technique. It involves many parameters which can be manipulated to optimize the CGE method for particular application, first of all the type of separation gel. Physical gels possess certain advantages over the chemical ones. Not being covalently crosslinked, physical gels exhibit lower viscosity; they are not chemically bonded to the inner capillary wall. Physical gels can readily be replaced after each analysis, which eliminates the problem of gel contamination and degradation during analysis. This fact leads to higher reproducibility of measurements and prolongs the capillary lifetime. In this review, applications of some common physical gels, both synthetic and natural, are described and their advantages and drawbacks are critically evaluated. Attention is paid especially to absorption of physical gels in the UV region, which may limit spectrophotometric detection of analytes to a great extent. The methods for suppression of protein adsorption on the inner capillary wall like static and dynamic coatings as well as separations under acid conditions are also discussed.



Katedra chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně
v Ústí nad Labem

hledá:

Doc. nebo OA pro obor Anorganická chemie (plný nebo částečný úvazek)

Požadavky: VŠ vzdělání příslušného oboru, PhD studium v oboru, odborné práce v oboru, schopnost tvůrčí práce

Předpokládaný nástup: rok 2009 (přesněji dle dohody)

Kontakt: Z. Kolská, e-mail: zdenka.kolska@ujep.cz, tel: 475 283 382