

Thema Capillaire Elektroforese

Capillaire elektroforese in de klinische chemie

J.P.M. WIELDERS¹, H.A.M. VOORBIJ², Y.M.C. HENSKENS³, M.P. van DIEIJEN-VISSER⁴ en P.N.M. DEMACKER⁵

Capillaire elektroforese-apparatuur voor diagnostisch gebruik werd ontwikkeld door de Zweedse firma LKB. Vanaf 1990 lanceerden verschillende firma's een tweede generatie apparatuur die beter geschikt was voor dit doel. Sindsdien hebben ongeveer twintig klinisch-chemische laboratoria in Nederland dergelijke apparatuur aangeschaft. De hernieuwde belangstelling op het gebied van capillaire elektroforetische scheiding leidde tot een meer intensief collegiaal overleg. Dit mondde in 1997 uit in de oprichting van een officiële gebruikersgroep met organisatorische steun van de firma Beckman. Prof. Dr. Van Dieijen-Visser was de eerste organisator van deze gebruikersbijeenkomsten. Een informeel bestuur werd opgericht bestaande uit Dr. H. Voorbij, Dr. Ir. J. Wielders, Prof. Dr. M. van Dieijen-Visser en Dhr. van Leeuwen (Beckman) met als taak het jaarlijks beleggen van een dergelijke gebruikersbijeenkomst. Velen hebben hier de gelegenheid gekregen mogelijkheden en moeilijkheden die zij bij het gebruik van de apparatuur ontmoeten met vakmensen en collega's door te spreken. Vermeldenswaardig is ook het eerste CE-artikel in het Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie in 1993 door dr. Stob e.a. waarin de serumeiwitanalyse wordt beschreven met behulp van capillaire zone elektroforese (Stob S, Lauer H.H., Zwart A. Capillaire zone elektroforese in de klinische chemie, Tijdschrift NVKC 1993; 18: 299-305).

Naast dit circuit is er nog een tweede forum op het gebied van capillaire elektroforese in Nederland actief. Dit richt zich vooral op analytische research met een breed toepassingsgebied. Allerlei onderzoekdisciplines uit het land komen hier samen voor uitwisseling van de laatste nieuwtjes vernomen op internationale congressen, ook eigen bevindingen m.b.t. zelfbouw, ontwikkeling van nieuwe detectoren en andere technische snuffjes komen hier aan bod.

Zoals in het volgende artikel aangegeven is Eindhoven de bakermat geweest van de capillaire elektroforese-techniek. Verschillende klinisch chemici met

een Eindhovense ingenieursopleiding droegen bij aan de ontwikkeling of uitbouw hiervan.

In hoeverre heeft de capillaire elektroforese nu een plaats verworven in de klinische chemie? We proberen in dit themanummer hierop een antwoord te geven. Er zijn verschillende toepassingsgebieden. Een globaal overzicht volgt hieronder. Vervolgens bespreken we specifieke toepassingen uitmondend in de verschillende bijdragen die de auteurs aanleverden.

Capillaire elektroforese in de Klinische Chemie

In principe zijn voor elektroforese alle oplosmiddelen geschikt, waarin elektrisch geladen deeltjes kunnen voorkomen. Echter het gebruik van waterige oplossingen is verreweg het meest voorkomend, gezien de goede oplosbaarheid in water van vele biochemisch belangrijke stoffen en de historische ontwikkeling van deze analyse techniek.

De laatste jaren is het aantal toepassingen snel gegroeid en hieronder wordt in grote lijnen een overzicht gegeven van de belangrijkste applicatiegebieden binnen de klinische chemie. Grote voordelen ten opzichte van de oudere elektroforesemethoden zijn onder meer de veel hogere resolutie, de kortere analyse-tijd, het minimale reagentia verbruik, de veelheid van detectiemogelijkheden en het geautomatiseerd zijn van het totale proces vanaf het vullen van scheidingscompartiment tot en met de uitwerking van de verkregen analysedata. Reviews met overzichten van klinisch-chemische en farmacologische applicaties zijn te vinden in de referenties 14 t/m 17 van de bijdrage van Beckers en Wielders.

Eiwit elektroforese

CZE van serum is een moderne variant van de aloude elektroforese van serumeiwitten, welke via papier-naar gel- en cellulose-acetaatstrips evolueerde. De moderne versie in een capillair is niet alleen sneller, maar behoeft ook geen uitgebreide behandeling (zoals kleuren/fixeren, ontkleuren, scannen) en kan direct met UV gemeten worden tijdens de elektroforese. In een publicatie van Henskens en Van Dieijen e.a. wordt hier nader op in gegaan. Door eiwitten met antistoffen te laten reageren worden na vergelijken en aftrekken van elektroferogrammen conclusies getrokken over aanwezigheid en aard van gammopathieën. De scheiding van lipoproteïnen met behulp van spacers is beschreven. Ook eiwitten in andere lichaamsvochten dan serum zoals liquor en urine kunnen geanalyseerd worden.

Eemland ziekenhuis Amersfoort¹, Academisch ziekenhuis Utrecht², Academisch Medisch Centrum Amsterdam³, Academisch Ziekenhuis Maastricht⁴ en Academisch ziekenhuis Nijmegen⁵

Correspondentie: Dr. Ir. J. Wielders, Eemland Ziekenhuis, Postbus 4150, 3800 ED Amersfoort.

Hb elektroforese

Hb elektroforese vindt traditioneel plaats in een gel, zodat voor de bepaling in principe gewacht wordt tot er voldoende monsteraanbod is. Omdat CZE altijd standby staat kan meteen op een vraag vanuit de kliniek gereageerd worden. Naast onderzoek van Hb-pathieën met CZE of eventueel CIEF, is CZE ook zeer geschikt als (secundaire) referentie methode voor de bepaling van geglycosyleerd Hb, zoals beschreven door Doelman en Weijkamp.

Farmacologische en toxicologische applicaties

CZE en MECC zijn zeer geschikt om geneesmiddelen en drugs te bepalen in biologische monsters zoals serum, speeksel en urine. In deze vormt capillaire elektroforese, zonodig in combinatie met MS (massaspectrometrie) een welkome aanvulling op het gebruik van HPLC. GC (gaschromatografie) is minder geschikt gezien het gegeven dat vele componenten wateroplosbaar zijn en niet of nauwelijks vluchtig, waardoor een derivatiseringsstap noodzakelijk wordt.

Laag moleculaire stoffen

Voorbeelden van applicaties op dit gebied zijn de bepalingen van oxalaat en citraat in urine bij patiënten met urolithiasis of organische zuren bij erfelijke stofwisselingsziekten, hierbij wordt de indirecte UV-methode gebruikt. Analyse van porfyrienes met fluorescentiedetectie zijn eveneens beschreven. In principe is de bepaling van kationen als K^+ en Li^+ of stofwisselingsproducten als kreatinine goed mogelijk met CE. Echter, hiervoor zijn in de loop der tijd reeds prima geautomatiseerde methoden ter beschikking gekomen.

DNA onderzoek

Met de opkomst van de moleculaire diagnostiek kwam de vraag naar een snelle micro-analyse methode voor DNA-fragmenten. Aangezien de massa/lading ratio voor DNA-fragmenten gelijk is, wordt hier de hulp van het op grootte discriminerend vermogen van gelen ingezet. Door bijvoorbeeld lineaire polymeren als acrylamide en methylcellulosederivaten toe te voegen aan de buffer in de gewenste concentratie, kunnen DNA-fragmenten over een voldoende breed meetbereik worden gescheiden.

Specifieke bijdragen

De redactie stelt het op prijs dat enkele pioniers uit Eindhoven een bijdrage leverden voor dit speciaal themanummer: Prof. Dr. Ir. F.M. Everaerts geeft samen met Dr. Ir. J.P.M. Wielders en Dr. Ir. F.J.L. Everaerts een korte historische terugblik; Dr. Ir. J.L. Beckers samen met Dr. Ir. J.P.M. Wielders behandelen daarna de theoretische concepten en grondslagen van de techniek. Momenteel spreekt vooral de compactheid van de apparatuur aan: naast het basisconcept zijn er opties voor uitbreiding. De P/ACE 2000 en 5000 van de firma Beckman Coulter met UV-detectie of fluorescentiedetectie zijn daar voorbeelden van. De robuustheid van analyses is essentieel voor routinediagnostiek in ziekenhuislaboratoria. Gezien de ervaringen met de eerste generatie apparatuur is de introductie

van de tweede generatie apparatuur zeer voorzichtig van start gegaan. De apparatuur bleek goede resultaten te geven bij de elektroforese van serum eiwitten en bleek handig bij de zogenaamde immunofixatie. In de bijdrage van Dr. Y.M.C. Henskens en Prof. Dr. M.P. van Dieijen-Visser wordt de merites van de capillaire elektroforesetechniek beschreven t.o.v. de conventionele elektroforese. Elektroforetische scheiding van Hb-varianten en -derivaten bleek eveneens een nieuw toepassingsgebied te zijn, zie het artikel van de hand van de auteurs Dr. C.J.A. Doelman en Dr. C.W. Weijkamp. In deze artikelen wordt duidelijk dat de reproduceerbaarheid van de capillaire elektroforesetechniek een grotere zorg is dan een te lage detectiegrens. Bij de analyses blijkt vaak het capillair de zwakste keten in de analyseketting te zijn met grote invloed op de analytische variatie. Dynamische coating van het capillair in combinatie met een dragerion lijkt een oplossing van de meeste problemen rondom het capillair te zijn, waar zelfs patenten aan zijn verbonden. Doelman en Weijkamp schrijven hun goede scores in buitenlandse kwaliteitsbewakingsprogramma's voor de GlyHb-bepaling zelfs hieraan toe. Applicatie van het zogenaamde lipidogram op de capillaire elektroforeseapparatuur leek ook een logische beslissing. Met toepassing van dragers zoals cellulose-acetaat of agarose bleek slechts een kwalitatieve scheiding van lipoproteïnen uit plasma mogelijk. Nu zouden dan eindelijk kwantitatieve resultaten te behalen zijn? Een aantrekkelijk vooruitzicht; kwantitatief meten van plasma lipoproteïnen is immers nu slechts weggelegd voor laboratoria die over een ultracentrifuge beschikken. De ervaringen in de internationale literatuur leken aanvankelijk positief, doch de ervaringen van P. van Heijst e.a. leren dat dit toepassingsgebied nog een brug te ver is. Dit is mede veroorzaakt doordat hiervoor isotachoforese met spacers i.p.v. conventionele elektroforese nodig is. De kwaliteit van het capillair is hier van het allergrootste belang, matrixproblemen spelen sterk mee. Door toedoen van Dr. Ir. Kuypers (proefschrift Nijmegen, 1998) zijn de Nederlandse klinisch-chemische laboratoria reeds vroegtijdig bekend met de mogelijkheden die capillaire elektroforese biedt op het gebied van de analyse van DNA-fragmenten en PCR-producten. Een bijdrage van de hand van Drs. M. Smit e.a. biedt meer inzicht hierin. Een tweede bijdrage met de beschrijving van de specifieke applicatie: apolipoproteïne E genotypering bevestigt de geschiktheid van capillaire elektroforese, maar maakt duidelijk dat er voor elke applicatie toch nog problemen te verwachten zijn die om een specifieke oplossing vragen. De bijdrage van Dr. J. de Vries e.a. beschrijft de toepassing van de capillaire elektroforese voor de bepaling van apolipoproteïne E genotypen. Deze bijdrage bevat een vergelijkende studie met agarose-elektroforese en geeft daarnaast nog nuttige informatie over het toepassingsgebied van deze bepaling.

Het aantal medisch georiënteerde publicaties (Medline) over CE groeit exponentieel. In de laatste 5 jaar zijn er meer dan 3000 publicaties verschenen! De Nederlandse bijdrage is niet gering. Het is te verwachten dat de ontwikkeling van de CE doorgaat. De

bijdrage van Dr. H.A.M. Voorbij geeft aan dat miniaturisering en de koppeling van diverse soorten detectoren de toepassingsmogelijkheden zal vergroten. In dit artikel wordt tevens een methode beschreven voor de scheiding van racemeren, waaruit blijkt welke mogelijkheden er niet allemaal zijn met deze techniek

Gezien de toenemende belangstelling voor de CE in de klinische chemie en de goed bezochte gebruikersbijeenkomsten probeert de redactie de kennis in het veld te bundelen door middel van een themanummer. Voortrekkers waren Dr. P.N.M. Demacker, Dr. ir. J.P.M. Wiolders en Dr. H.A.M. Voorbij.

Na een aantal E-mails kwam de eerste opzet in een mum van tijd al uit de grondverf. Samen met Prof. Dr. M.P. van Dieijen-Visser, en Dr. Y.M.C. Henskens werden vervolgens auteurs benaderd, die reeds een

bijdragen hadden geleverd op de CE-gebruikersbijeenkomsten of die al jaren actief waren met CE. Er volgden nog vele mails alvorens de eerste concepten klaar waren, referees hun zegje hadden gedaan, revisies opnieuw waren beoordeeld, copyright was geregeld en de bijdragen onderling op elkaar waren afgestemd. In een recordtijd van 6 weken werden aldus 8 concepten als E-mail van de ene PC meermalen naar de andere verstuurd. De nieuwe mogelijkheden van dit medium hebben zeker bijgedragen tot een snelle en effectieve totstandkoming van dit themanummer.

Als (gast)-editoren hopen we dat dit nummer aansluit bij de geconstateerde belangstelling voor CE in de klinische chemie en een stimulans is voor degene die overwegen met deze veelbelovende techniek te starten.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 207-210

De geschiedenis van capillaire elektroforese

F.M. EVERAERTS¹, J.P.M. WIELDERS² en F.J.L. EVERAERTS³

Vroegste geschiedenis

In het midden van de negentiende eeuw rapporteerden Wiedeman (1,2) en Buff (3) over een verschijnsel dat geladen deeltjes in een oplossing bewegen als een elektrisch veld werd toegepast. Fysisch chemici hielden zich vervolgens enige tijd bezig met de meting van zogenaamde Hittorf transportgetallen, welke feitelijk een ratio van mobiliteiten zijn. Later werden experimenten uitgevoerd door Lodge (4) en Whetham (5,6), die de basis vormden voor de theorie van Kohlrausch (7) over elektroforetische migratie. Met de door Kohlrausch opgestelde vergelijking, 'die beharrliche Funktion', kunnen alle elektroforetische principes worden beschreven: zone elektroforese, "moving-boundary" elektroforese en isotachoforese. Alleen het laatstgenoemde elektroforetische principe heeft het 'zelf-corrigerende vermogen' van de zonegrenzen in de "steady-state". Voor de liefhebber dient opgemerkt te worden dat vergelijkbare principes ook bestaan in de chromatografie.

Bij de theorie van "isoelectric focusing" moeten nog andere vergelijkingen worden meegenomen in verband met de scheiding op pI waarden. Ook dit elektroforetische principe heeft in de "steady-state" een 'zelf-corrigerend' vermogen van de zonegrenzen.

Emeritus hoogleraar Technische Universiteit, Eindhoven¹; Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort²; Medtronic, Bakken Research Center, Maastricht³

Correspondentie: Prof. Dr. Ir. F.M. Everaerts, Hallenhof 1, 6006 NC Weert.

Rond 1900 ontstaat het besef dat de pH van belang is voor de migratiesnelheid van eiwitten (Hardy (8-9)). Het onderzoek van Michaelis (10), tevens bekend van de Michaelis-Menten-vergelijking, moet speciaal genoemd worden. Bij zijn studie van enzymreacties had hij behoefte aan zuivere enzymen, welke toendertijd niet verkrijgbaar waren. Hij vond dat enzymen te scheiden en te karakteriseren zijn op basis van hun karakteristieke migratiepatroon tijdens elektroforese, waarbij de pH van de gebruikte buffer een belangrijke rol speelt. De term elektroforese zou voor het eerst door hem gebruikt zijn. Vroeger gebruikte men de namen cataforese en elektroforese enkel voor scheiding van geladen colloïdale deeltjes. Ionoforese of iontoforese werd gereserveerd voor het werk met laagmoleculaire stoffen. Men zag op tijd in dat deze spraakverwarring tot niets leidde. De meeste wetenschappers hadden dan ook niet het werk van Kohlrausch (7), een fysicus, gelezen. Dit puur theoretisch betoog was te moeilijk voor de gemiddelde (bio)chemicus, arts en zelfs menig fysicus.

In 1923 lukte het Kendall en Crittenden (11) elementen van de 'zeldzame aarden' (lanthanidengroep) te scheiden, wat een doorbraak betekende. De oxiden van deze metalen worden aarden genoemd. De zeldzame aarden zijn niet zeldzaam, alleen vreemd en relatief laat ontdekt. De Zweedse naam "rare metale", was voor de Engelsen verwarrend en werd vertaald als 'zeldzame metalen'. Kendall en Crittenden noemden de techniek "ion migration method", wat tegenwoordig isotachoforese zou worden genoemd. Zij beweerden dat de ionen niet alleen gescheiden werden, maar hun concentraties ook aanpasten aan die van de eerste zone.