



Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

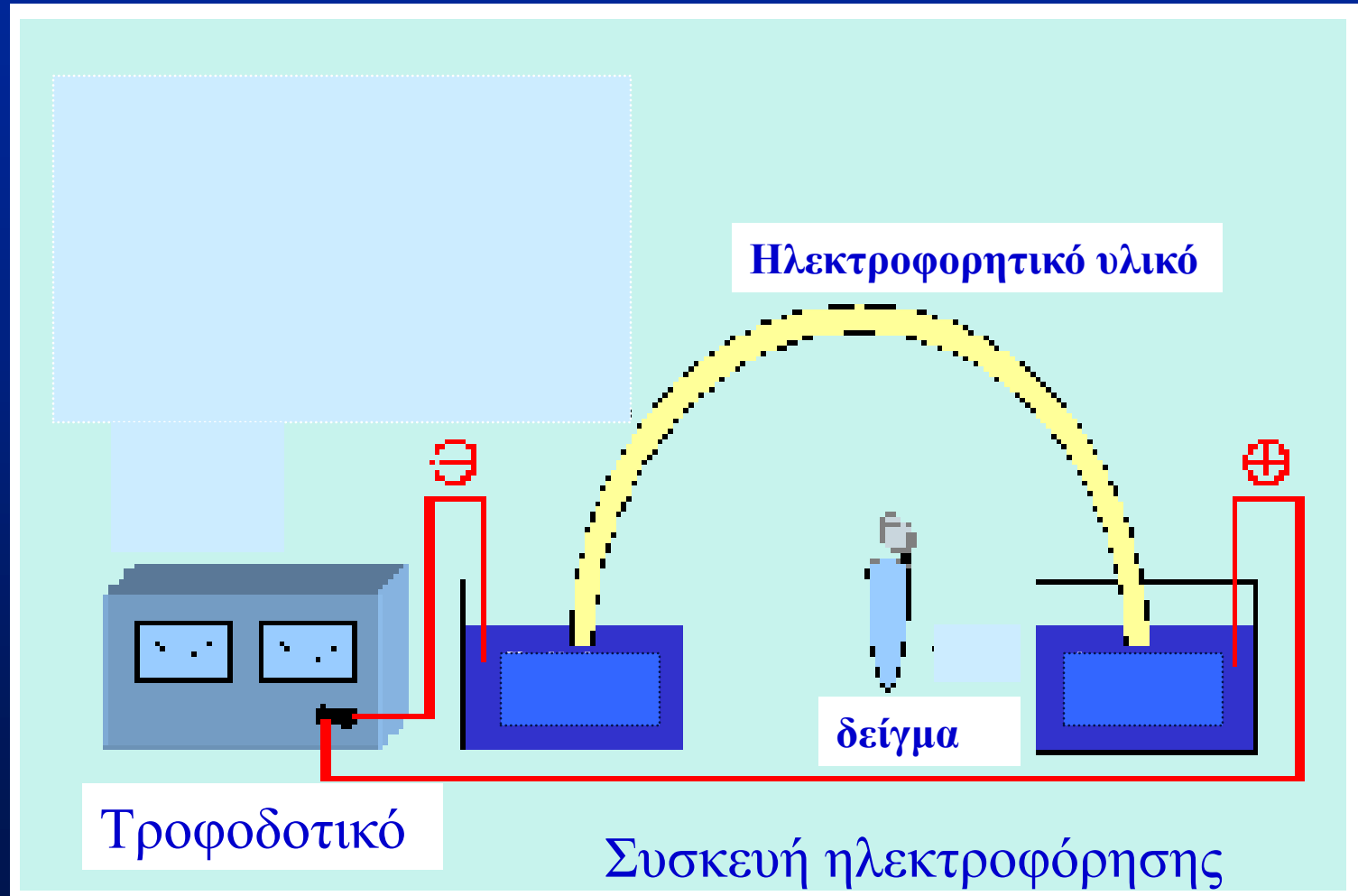
Ε. Λιανίδου,

Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας
lianidou@chem.uoa.gr

Ηλεκτροφόρηση

- αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο για το διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και το DNA
- χρησιμοποιείται ευρύτατα για διαχωρισμό πεπτιδίων, πρωτεϊνών του πλάσματος, των αιμοσφαιρινών, των ισοενζύμων, των λιποπρωτεϊνών, αλλά και στην έρευνα για διαχωρισμό και ταυτοποίηση πρωτεϊνών, DNA, RNA
- αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και θεμελιώδη εργαλεία στην εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική και στη μοριακή βιολογία.
- βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων μέσα σ'ένα υγρό μέσον υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.
- Πρώτος ο Tiselius χρησιμοποίησε τη μέθοδο το 1937, για το διαχωρισμό πρωτεϊνών.

Ηλεκτροφόρηση-βασική συνδεσμολογία



Θεωρητική βάση της τεχνικής

- Μόρια που φέρουν ηλεκτρικό φορτίο κινούνται προς την άνοδο (+) ή την κάθοδο (-) όταν τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, ανάλογα με το φορτίο που διαθέτουν.
- Οι πρωτεΐνες και τα νουκλειικά οξέα είναι βιομόρια με φυσικοχημικές ιδιότητες αμφολυτών, μπορούν δηλαδή να συμπεριφέρονται τόσο ως οξέα όσο και ως βάσεις.
- Οι ομάδες που ιονίζονται και συμβάλλουν στην αμφολυτική τους συμπεριφορά ανήκουν κυρίως στα πολικά αμινοξέα (πρωτεΐνες) ή φωσφορικές ομάδες (νουκλειικά οξέα).
- Κάθε αμινοξύ μπορεί να φορτισθεί θετικά ή αρνητικά ανάλογα με το pH του διαλύματος σ βρίσκεται,

Θεωρητική βάση της τεχνικής

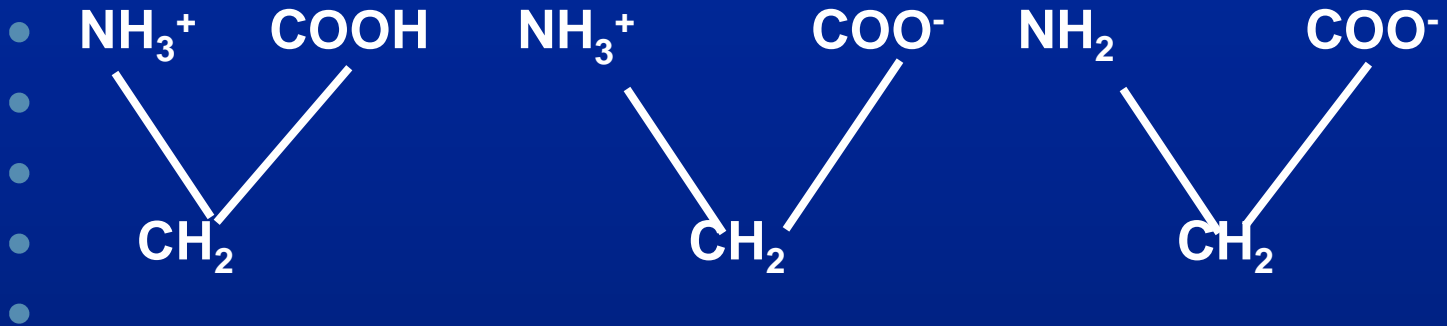
- Κάθε πρωτεΐνη έχει ένα χαρακτηριστικό σημείο της κλίμακας του pH όπου δεν έχει καθαρό φορτίο.
- Το σημείο αυτό καλείται ισοηλεκτρικό σημείο (isoelectric point, P.I.) και η τιμή του εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κάθε πρωτεΐνης σε αριθμό και είδος αμινοξέων.
- Στο ισοηλεκτρικό σημείο, οι πρωτεΐνες δεν κινούνται ούτε προς την άνοδο ούτε προς την κάθοδο κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό δεν οφείλεται σε έλλειψη φορτίου αλλά στο ότι το συνολικό φορτίο του πρωτεϊνικού μορίου είναι μηδέν.
- η μεγάλη πλειοψηφία των πρωτεϊνών έχει ισοηλεκτρικά σημεία μικρότερα του 8, άρα σε αλκαλικό περιβάλλον ($\text{pH} > 8$) τα περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια είναι αρνητικά φορτισμένα και κατά την ηλεκτροφόρηση οδεύουν προς την άνοδο (+).

Παράγοντες που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό

- pH
- θερμοκρασία
- ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού
- μέγεθος και σχήμα του βιομορίου
- φύση του ρυθμιστικού διαλύματος



pH



- α) χαμηλό pH
- β) pH=pI
- γ) υψηλό pH
- περίσσεια H⁺
- ισοηλεκτρικό
- περίσσεια OH⁻
-

Σχήμα 1. Αμφολυτική συμπεριφορά της γλυκίνης

- Τα βιομακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA είναι αμφολύτες, μικρή μεταβολή του pH μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στο συνολικό ηλεκτρικό φορτίο και να επιδράσει στο διαχωρισμό.

Θερμοκρασία

- Η ροή ρεύματος i κατά την ηλεκτροφόρηση προκαλεί απελευθέρωση θερμότητας Joule, $Q = E \cdot i \cdot t$, όπου E η διαφορά δυναμικού και t ο χρόνος ηλεκτροφόρησης.
- Η απελευθέρωση θερμότητας προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας.
- Εάν η τάση διατηρείται σταθερή, η αύξηση της εντάσεως που προκαλείται έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας κινήσεως των βιομορίων και αύξηση της εξάτμισης του νερού από το ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία επιτείνει την ελάττωση της αντίστασης και την παραπέρα αύξηση του i και του Q .
- Η αύξηση της θερμοκρασίας αποτελεί σοβαρό κίνδυνο διότι μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση και καταστροφή των βιομορίων. Γι' αυτό το λόγο σε συστήματα ηλεκτροφόρησης όπου αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται και συστήματα ψύξης.

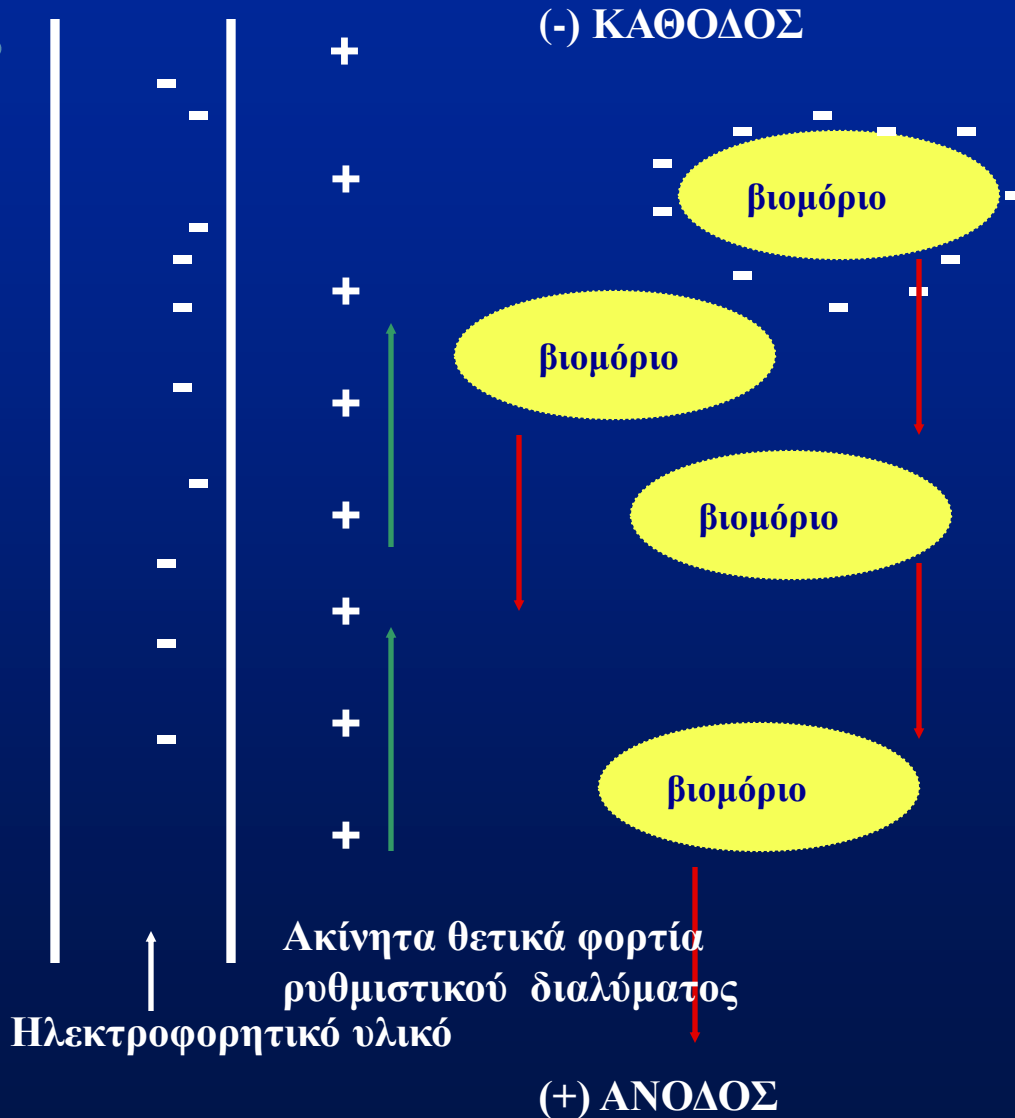
Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

- επηρεάζει άμεσα την πραγματική απόσταση που διανύουν τα βιομόρια σ' ένα δεδομένο χρόνο.
-
- Υπό την επίδραση ισχυρού πεδίου επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός.
- όσο αυξάνεται το δυναμικό και η ένταση του ρεύματος, τόσο περισσότερη ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα Joule.
- για κάθε ηλεκτροφορητική συσκευή και μέθοδο, το μέγιστο δυναμικό που μπορεί να εφαρμοσθεί καθορίζεται μέσα σε αυστηρά όρια και η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει με σταθερή τάση ή ένταση ρεύματος.

Το είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού - Ηλεκτροενδόσμωση (Electroendosmosis).

- Μερικά ηλεκτροφορητικά υλικά όταν έρθουν σ' επαφή με το νερό φορτίζονται αρνητικά, οπότε έλκουν θετικώς φορτισμένα σωματίδια από το διάλυμα και σχηματίζουν μια διπλοστιβάδα όπου τα θετικά σωματίδια είναι, επίσης ακινητοποιημένα πάνω στο ηλεκτροφορητικό υλικό.
- Όταν αρχίσει η ηλεκτροφόρηση τα θετικά αυτά σωματίδια κινούνται προς την κάθοδο (-). Αυτό το φαινόμενο καλείται ηλεκτροενδόσμωση και επηρεάζει την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων, τα οποία κινούνται προς την άνοδο.

Το είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού - Ηλεκτροενδόσμωση (Electroendosmosis).



Το είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού - Ηλεκτροενδόσμωση (Electroendosmosis).

- Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν μόρια αρνητικώς φορτισμένα να παραμένουν ακίνητα ή ακόμα να κινούνται και προς την κάθοδο προσπαθώντας ν' ακολουθήσουν τα θετικά φορτισμένα σωματίδια που έχουν αυτήν την κατεύθυνση λόγω ενδόσμωσης.
- σε ορισμένα ηλεκτροφορητικά υλικά που παρουσιάζουν υψηλή ενδόσμωση, οι γ-σφαιρίνες κινούνται προς την κάθοδο, παρ' όλο που είναι ανιόντα σε pH 8.6.
- Υλικά με υψηλή ηλεκτροενδόσμωση είναι το χαρτί, η οξική κυτταρίνη, το άγαρ ενώ με χαμηλή είναι η πηκτή αγαρόζης και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος

- η ιοντική ισχύς και οι χημικές ιδιότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων ασκούν διαφορετική επίδραση στις διάφορες πρωτεΐνες.
- Η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος επηρεάζει την ταχύτητα κίνησης, διότι το μόριο που κινείται περιβάλλεται από το "ιοντικό νέφος" των μορίων του ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο εμποδίζει την κίνησή του.
- ρυθμιστικά διαλύματα πολύ υψηλής ιοντικής ισχύος προκαλούν την απελευθέρωση μεγάλου ποσού θερμότητας (Joule) με πιθανό κίνδυνο τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.
- αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος δίνει καλύτερα διαχωριζόμενα κλάσματα.
- Πρωτεΐνες: ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτουρικών, pH 8,6
- νουκλειικά οξέα: διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) ή TBE (Tris-Borate-EDTA)



Ανίχνευση πρωτεϊνών σε ηλεκτροφόρημα

- Πρωτείνες ορού
- Amido Black (640 nm),
- Bromophenol Blue (600 nm),
- Coomassie Brilliant Blue (595 nm),
- Nigrosin (540 nm)
- PONCEAU-S (520 nm).

- διαχωρισμός ισοενζύμων
- ενζυματικές ενδεικτικές αντιδράσεις με NADH, ή NADPH, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φορμαζάνης (570 nm).

- Λιποπρωτεΐνες
- Sudan Red 7B (540 nm)
- Oil Red O (520 nm)
- Sudan Black (600 nm)

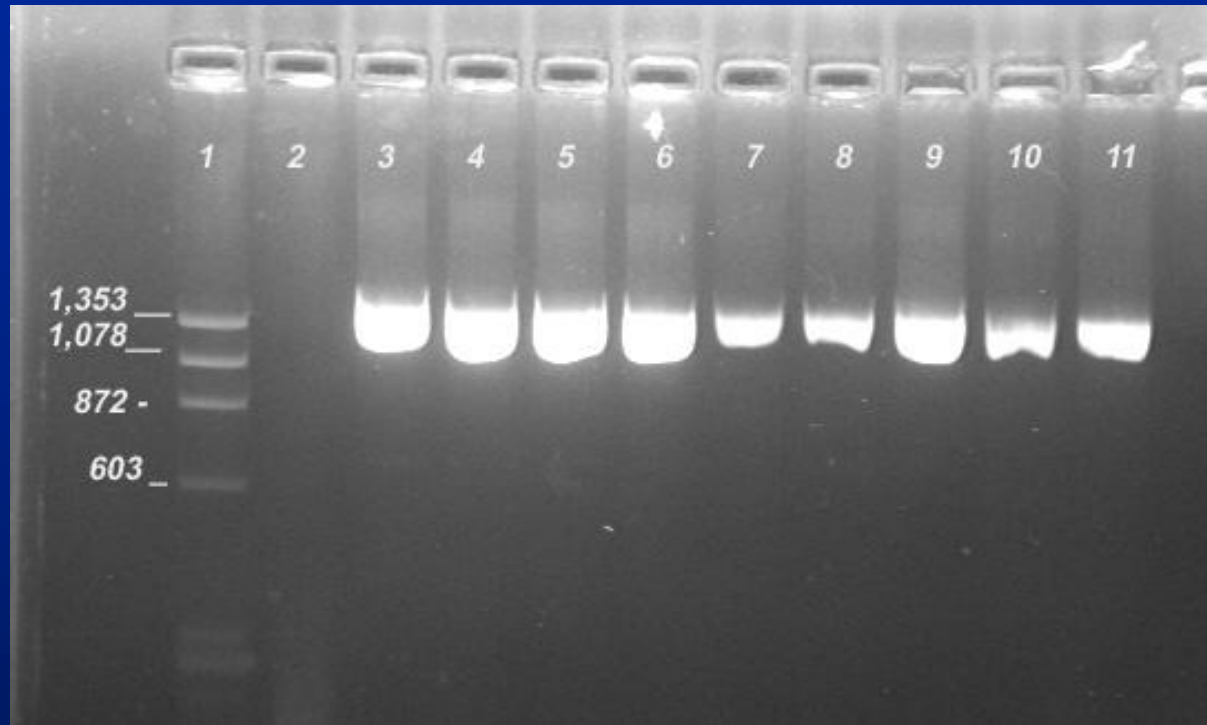
- AgNO₃ (silver stain), με κύριο πλεονέκτημα την αύξηση της ευαισθησίας, διότι ενώ με τη χρωστική Coomassie Blue το όριο ανίχνευσης είναι 1 μg, πρωτεΐνης με τη χρώση αργύρου μειώνεται στα 10 ng.
- αυτοραδιογραφία

Ανίχνευση DNA σε ηλεκτροφόρημα

- βρωμιούχο αιθίδιο
- SYBR GREEN, SYBR GOLD (Molecular Probes): πολύ υψηλή ευαισθησία
- χρώση αργύρου : πολύ υψηλή ευαισθησία
- αυτοραδιογραφία (autoradiography)
- αποτύπωση (blotting) (Southern Blot για DNA και Northern Blot για RNA)



ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (ανίχνευση με βρωμιούχο αιθίδιο)



Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε αγαρόζη: θέση 1, δείκτης μοριακών βαρών φχ174/HaeIII με αναγραφόμενα τα MB των πιο έντονων ζωνών, θέση 2, τυφλό και θέσεις 3-11, προϊόν Α από διαφορετικά δείγματα (1548 bp).

Κυριότερες ηλεκτροφορητικές τεχνικές

- ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης
- πηκτής πολυακρυλαμιδίου
- ισοηλεκτρική εστίαση
- δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση
- τριχοειδής ηλεκτροφόρηση



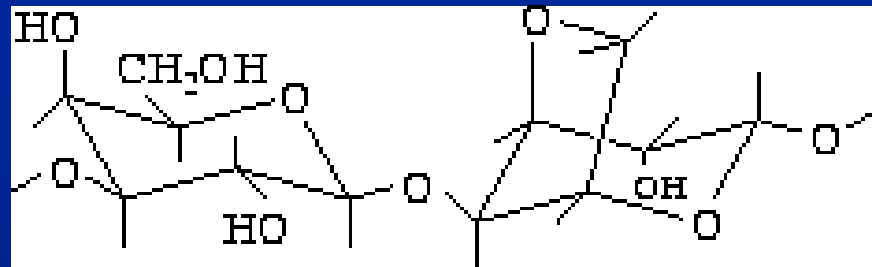
Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (agarose gel electrophoresis)

χρησιμοποιείται ευρύτατα:

- στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού
- των ισοενζύμων (LDH, CK, ALP, αιμοσφαιρινών κ.α.)
- των κλασμάτων λιποπρωτεϊνών
- των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA).



Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης



- Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό υλικό αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής,
- Διάλυμα αγαρόζης σε θερμοκρασία $\sim 100^{\circ}\text{C}$ πολυμερίζεται δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45°C .
- Η πηκτή αγαρόζης, λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, αποτελεί ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων.

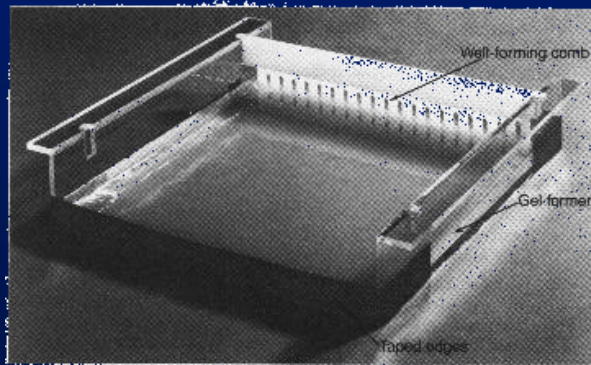
Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης



α) τροφοδοτικό

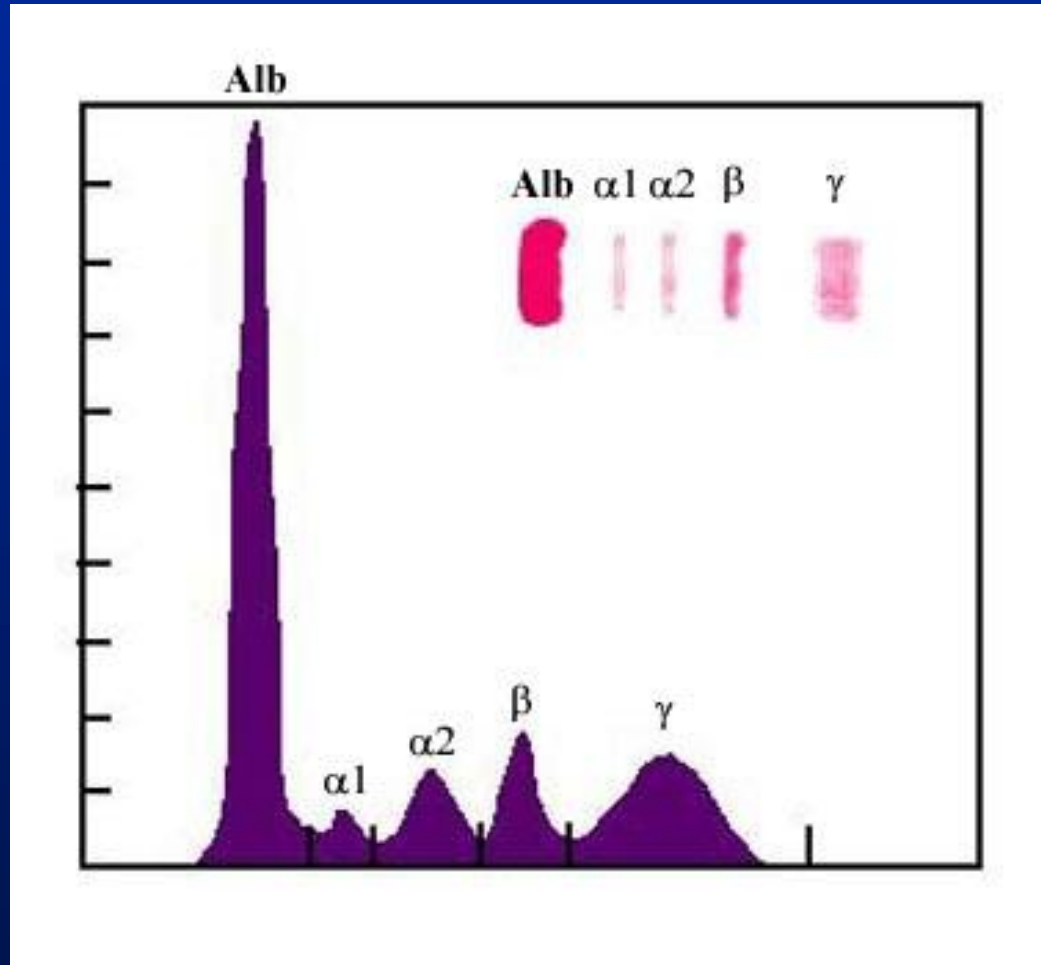


β) συσκευή

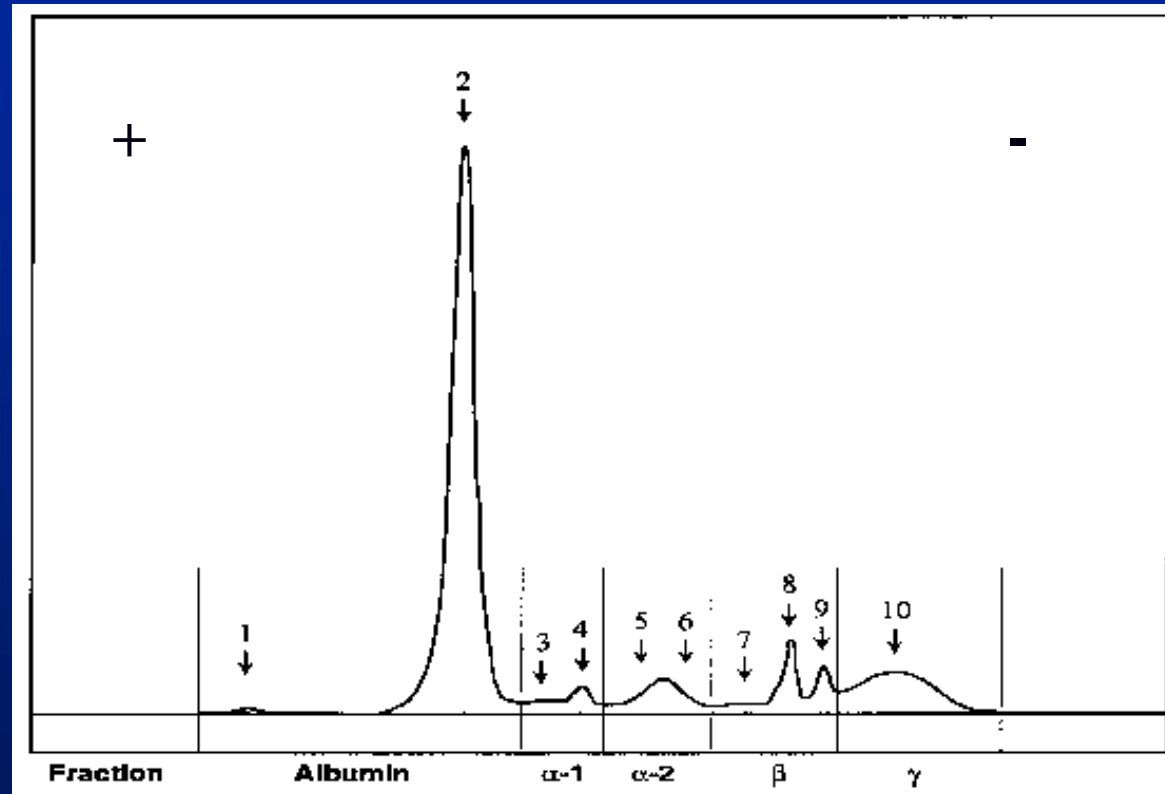


γ) παρασκευή πηκτής

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού σε πηκτή αγαρόζης



Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού σε πηκτή αγαρόζης

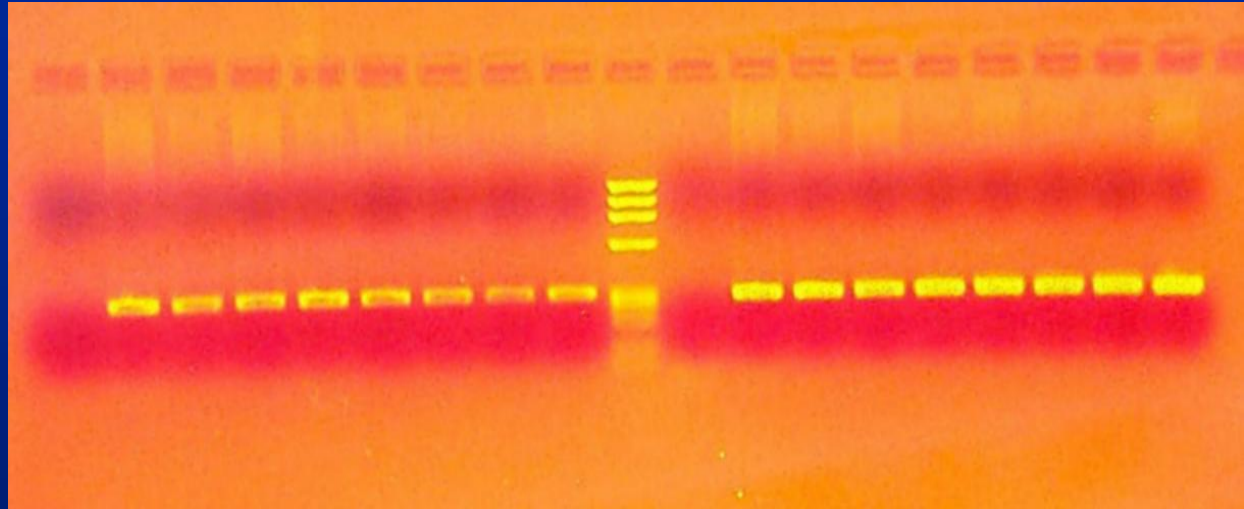


- | | | | |
|----|---------------------------|-----|----------------------|
| 1. | pre-albumin | 6. | alpha2 macroglobulin |
| 2. | Albumin | 7. | Hemopexin |
| 3. | alpha 1-Acid-Glycoprotein | 8. | Transferrin |
| 4. | alpha 1-Antitrypsin | 9. | Complement |
| 5. | Haptoglobin | 10. | Gamma |

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζη

- απλή, γρήγορη τεχνική
- το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του
- τα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς την άνοδο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του αριθμού των βάσεων τους.
- Τα μικρότερα μόρια DNA, μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους.
- Επειδή το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε “ζώνες” και γίνονται ορατά με βρωμιούχο αιθίδιο.
- Έτσι, μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1 ng DNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης από U.V. ακτινοβολία.

ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση αгарόζης (ανίχνευση με βρωμιούχο αιθίδιο)



- **#1: PCR blank**
- **#2-#9: BRCA1, exon 14**
- **#10: DNA marker**
- **#11 PCR blank**
- **#12-19: BRCA1, exon 22**

Ethidium bromide



- This dye is a planar molecule and intercalates between the stacked base pairs of DNA.
- When the dye becomes fixed in its position and enters the hydrophobic interior of the DNA, it becomes more fluorescent than free dye in solution.
- The dye absorbs UV light at 300 to 360 nm and emits light at 590 nm in the red-orange region of the visible spectrum.
- It is also possible for the DNA to absorb light at 260 nm and transmit the light to the dye so that it will then fluoresce.

Πίνακας 1. Εύρος διαχωρισμού του DNA σε πηκτές αγαρόζης

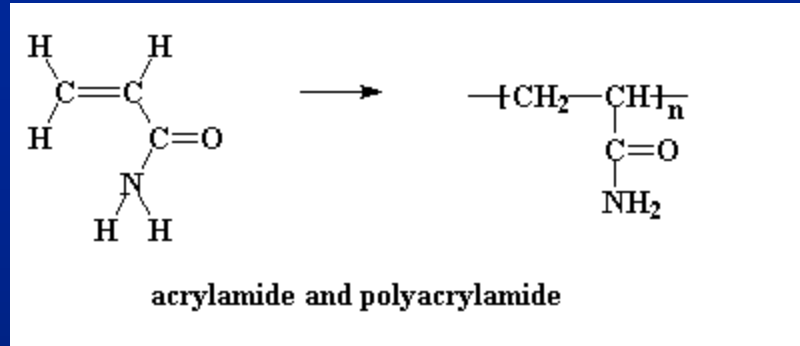
<u>αγαρόζη, %</u>	<u>DNA (Kb)</u>
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
<u>2.0</u>	<u>0.1-2</u>

Τα πηκτώματα αγαρόζης έχουν μικρότερη διαχωριστική ικανότητα από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, έχουν, όμως, μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού. Πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό τμημάτων DNA μήκους 200bp-50Kb.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

- χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο, διότι χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική ικανότητα.
- Σε επίπεδο πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών και διαχωρισμό ισοενζύμων.
- Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του ορού διαχωρίζονται με την τεχνική αυτή είκοσι και πλέον κλάσματα, ενώ οι απλές τεχνικές (οξική κυτταρίνη, αγαρόζη) δίνουν συνήθως 5 πρωτεϊνικά κλάσματα.
- Άλλο σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η πολύ χαμηλή ηλεκτροενδόσμωση και η μεγάλη περιοχή pH που μπορεί να χρησιμοποιηθεί.
- Σε συνδυασμό με την επιφανειοδραστική ουσία, δωδεκυλικό θειϊκό νάτριο, SDS (Sodium-dodecyl sulfate), η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό πρωτεϊνών όχι με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο αλλά με βάση τη διαφορά του μοριακού βάρους (SDS-PAGE electrophoresis).

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου κυριότεροι παράγοντες



- Συγκέντρωση ακρυλαμιδίου
- Αναλογία ακρυλαμιδίου προς δισακρυλαμίδιο στην πηκτή (cross linking)
- Παρουσία προσθέτου
- Θερμοκρασία
- ένταση ηλεκτρικού πεδίου

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

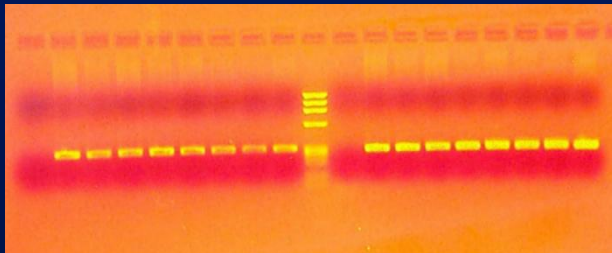
α) τροφοδοτικό



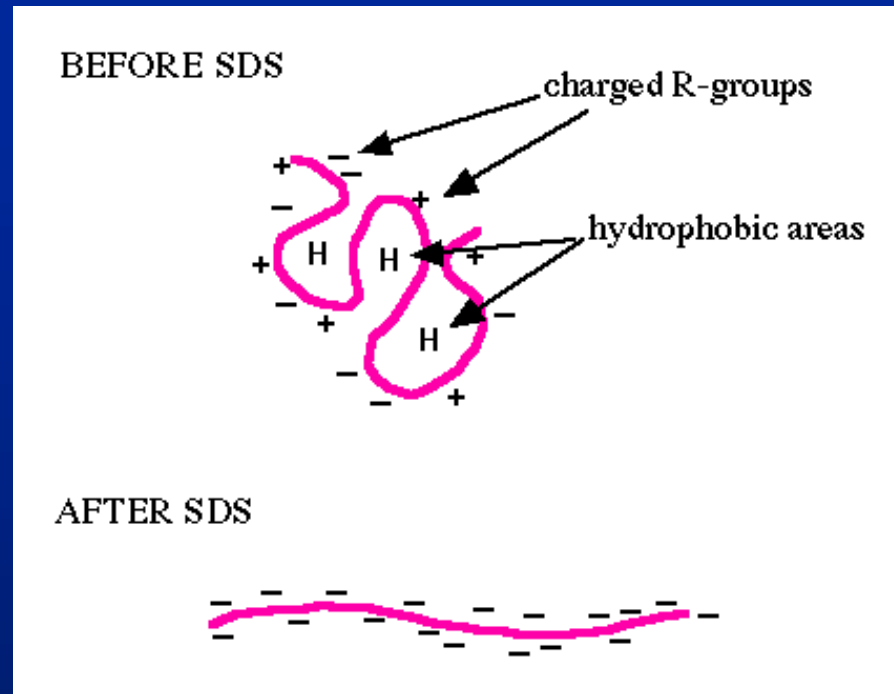
β) συσκευή



γ) ηλεκτροφόρημα

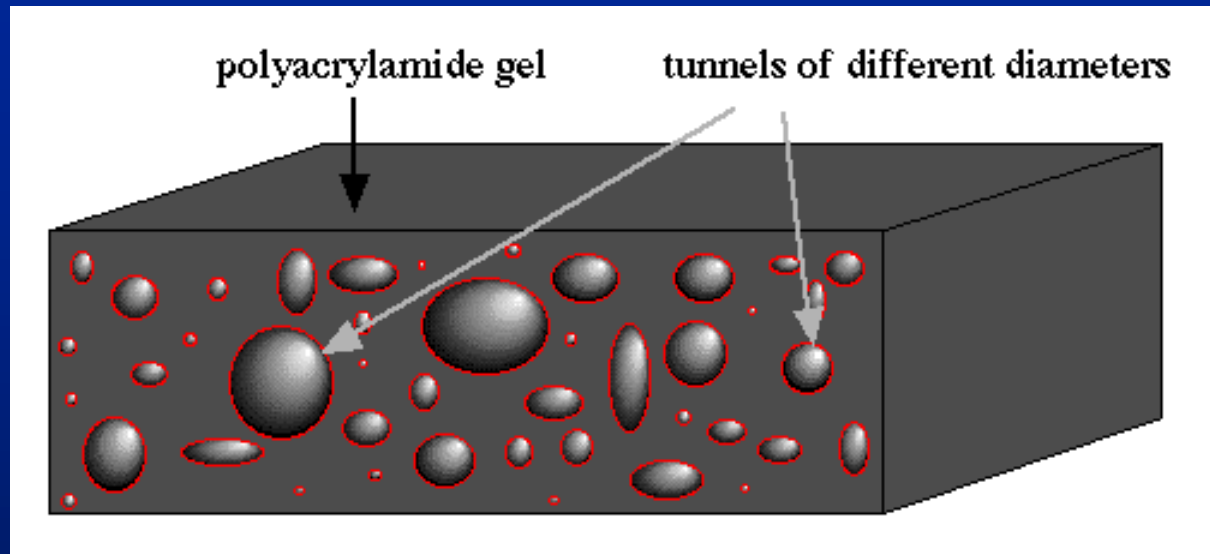


Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



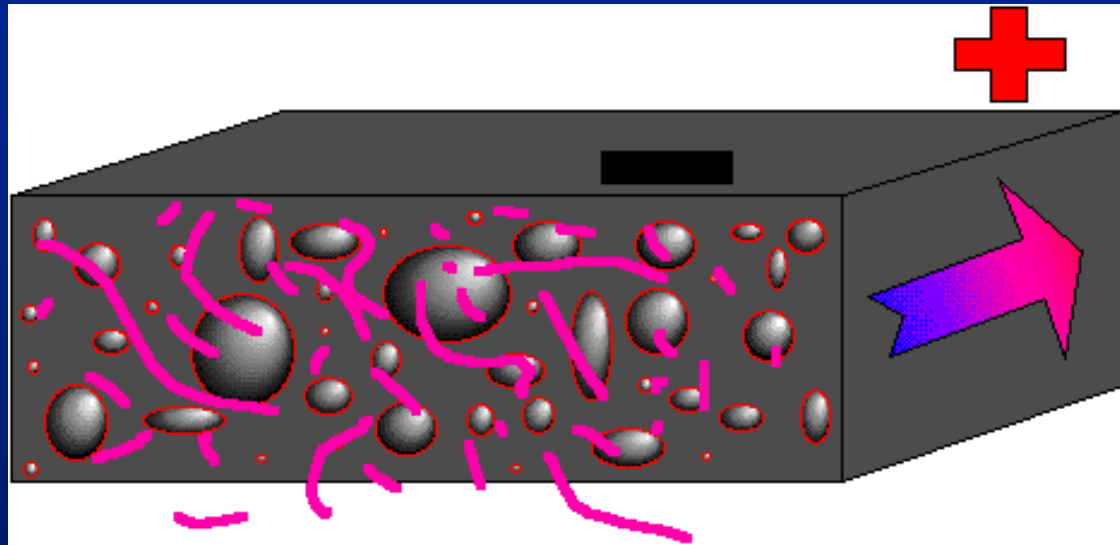
- Κάθε πρωτεΐνη φέρει θετικά και αρνητικά φορτία R λόγω των αμινοξέων της
- Οι μη πολικές υδρόφοβες περιοχές H βρίσκονται σε απόσταση από το πολικό υδατικό περιβάλλον
- Όταν μία πρωτεΐνη επωάζεται με το επιφανειοδραστικό SDS, τότε οι πρωτεΐνες περιβάλλονται από ένα αρνητικό νέφος, το οποίο καταστρέφει τις υδρόφοβες περιοχές, οι πρωτεΐνες αλλάζουν δομή.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



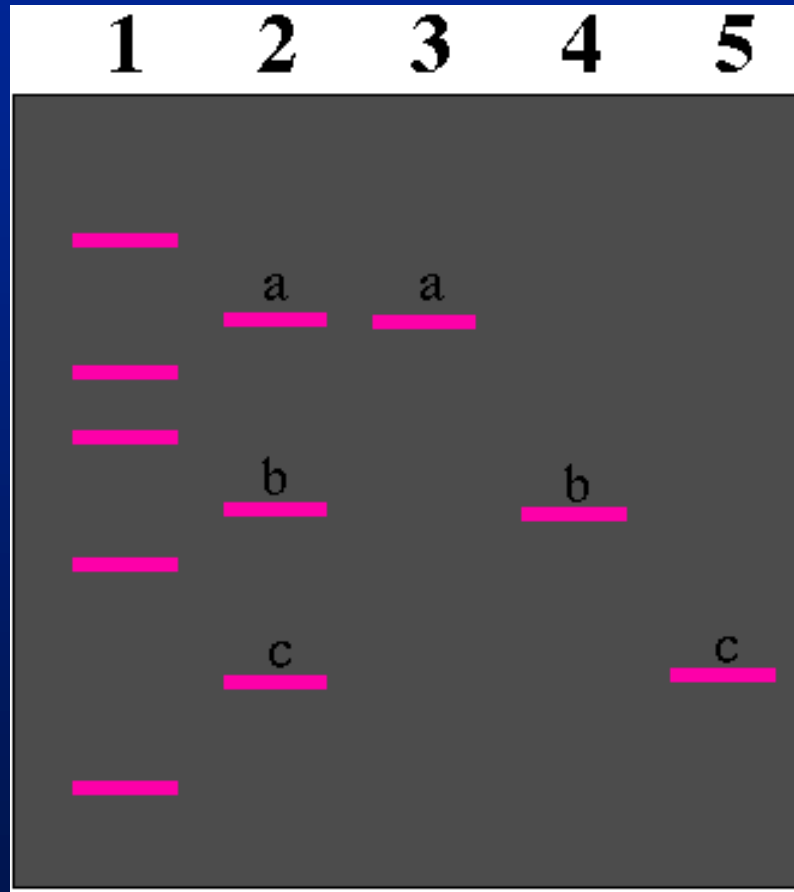
- Η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου σχηματίζει τούνελ με διαφορετικό μήκος και μέγεθος, διασκορπισμένα σε όλες τις περιοχές της πηκτής.
- Το μέγεθος της διαμέτρου των οπών του τούνελ καθορίζεται κυρίως από τη σύσταση του πολυακρυλαμιδίου.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



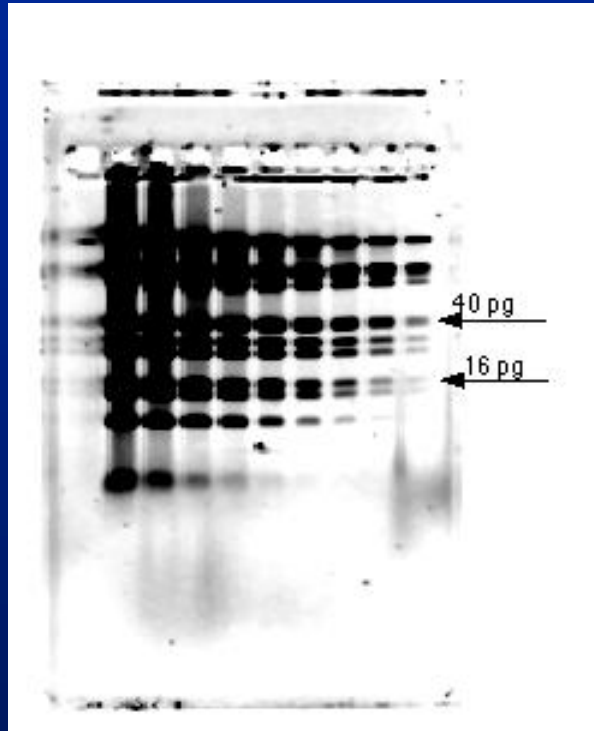
- Οι αποδιατεταγμένες με SDS πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της πηκτής του πολυακρυλαμιδίου μέσω των τούνελ προς την άνοδο.
- Καθώς όλες οι πρωτεΐνες είναι ισχυρά φορτισμένες αρνητικά κατευθύνονται με βάση το μοριακό τους βάρος.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



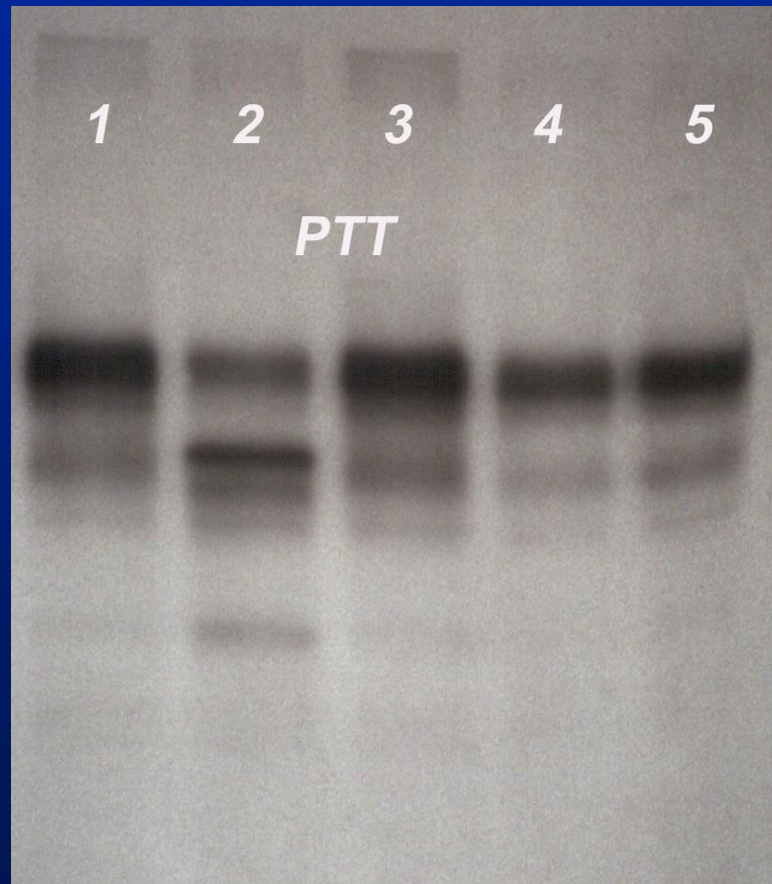
- 1. Δείκτης μοριακών βαρών
- 2. Μίγμα τριών πρωτεϊνών, α η μεγαλύτερη και c η μικρότερη
- 3. Πρωτεΐνη α
- 4. Πρωτεΐνη β
- 5. Πρωτεΐνη c

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



- Διαδοχικές αραιώσεις του ίδιου δείγματος.
- Όριο ανίχνευσης: 16 picograms = $16 \cdot 10^{-12}$ grams


Παράδειγμα ανίχνευσης πρωτεϊνών με
αυτοραδιογραφία έπειτα από ηλεκτροφόρηση **SDS-
PAGE**



Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- Σε επίπεδο DNA, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα.
- Διακρίνονται δύο τύποι πηκτών, έτσι ώστε το DNA να διαχωρίζεται:
 - Α) υπό μη-αποδιατακτικές (nondenaturing) συνθήκες. Οι μη-αποδιατακτικές συνθήκες εννοούν κυρίως τον διαχωρισμό και καθαρισμό δίκλωνου DNA.
 - Β) ή υπό αποδιατακτικές συνθήκες (denaturing). Οι αποδιατακτικές συνθήκες εννοούν κυρίως τον διαχωρισμό και καθαρισμό μονόκλωνου DNA, απομόνωση DNA probes, και DNA Sequencing. Στην περίπτωση αυτή οι πηκτές περιέχουν ουρία ή φορμαμίδιο ως αποδιατακτικούς παράγοντες και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα είναι τελείως ανεξάρτητη από την αλληλουχία και τη σύσταση των βάσεων του DNA, ενώ εξαρτάται απόλυτα από το MB.

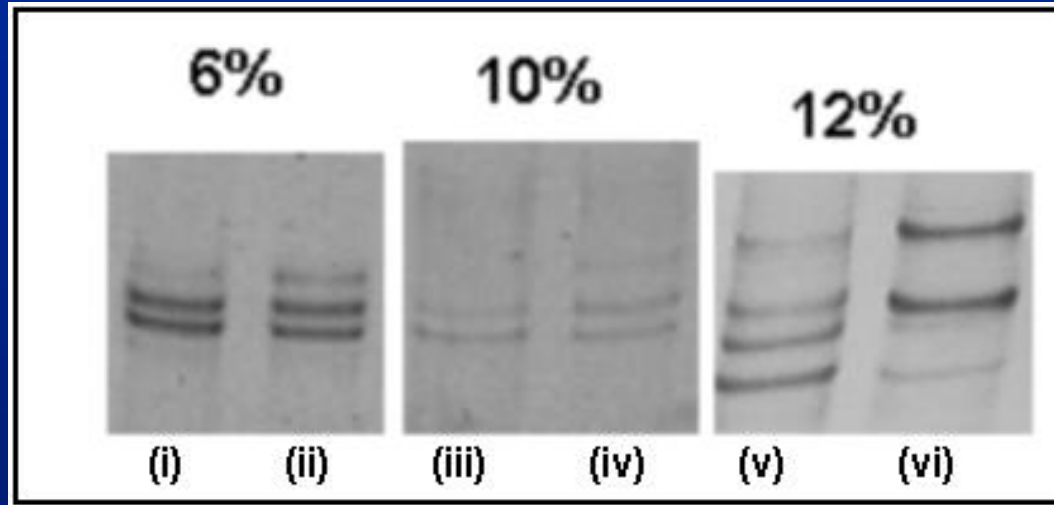
Εύρος διαχωρισμού του DNA σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου



<u>Ακρυλαμίδιο, %</u>	<u>DNA (bp)</u>
3.5	1000-2000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
<u>20.0</u>	<u>6-100</u>

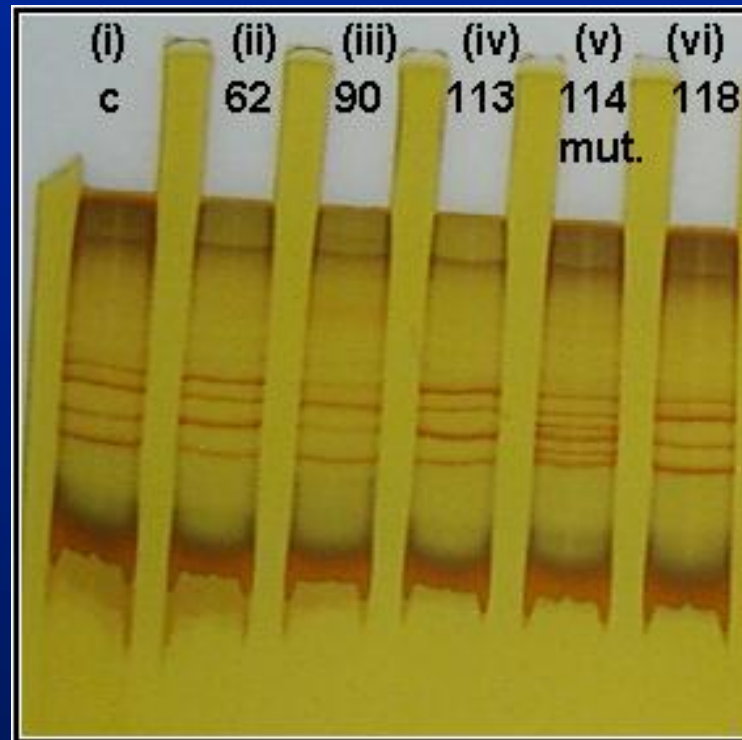
Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου

Επίδραση συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου στον διαχωρισμό



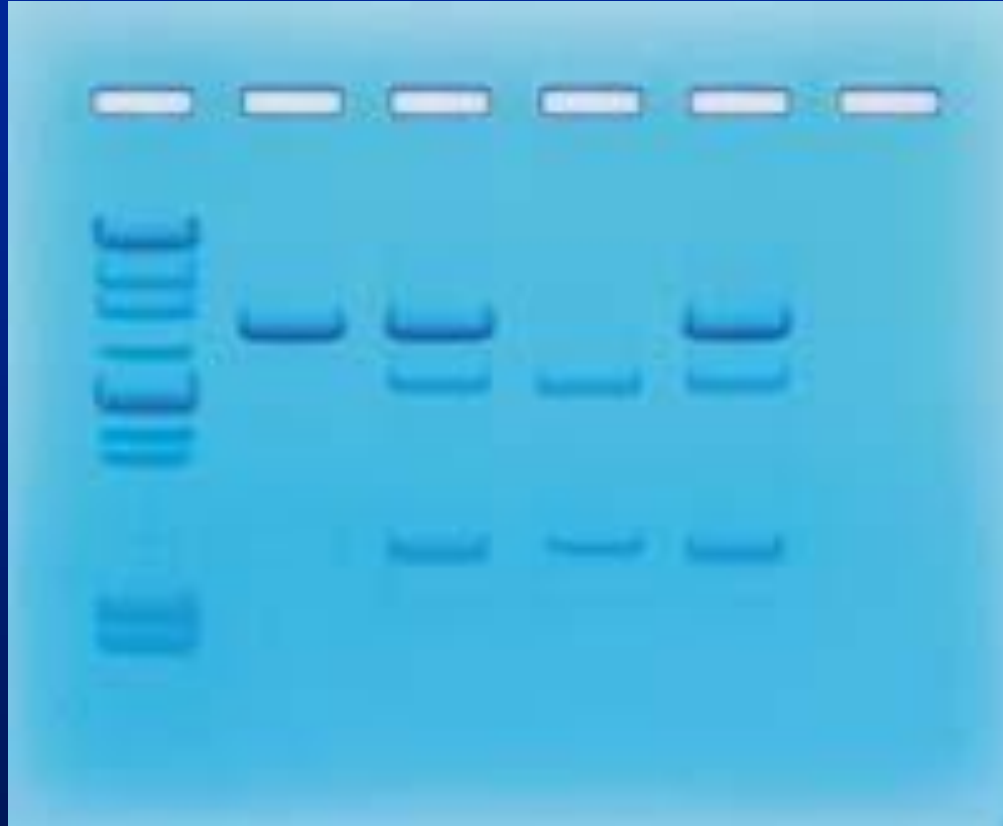
Ηλεκτροφορήσεις βελτιστοποίησης για το δείγμα #64 (3741 insA) : (i) αρνητικός μάρτυρας σε πολυακρυλαμίδιο 6%, (ii) θετικός μάρτυρας σε πολυακρυλαμίδιο 6%, (iii) αρνητικός μάρτυρας σε πολυακρυλαμίδιο 10%, (iv) θετικός μάρτυρας σε πολυακρυλαμίδιο 10%, (v) αρνητικός μάρτυρας σε πολυακρυλαμίδιο 10%, (vi) θετικός μάρτυρας σε πολυακρυλαμίδιο 12%.

**ανίχνευση προϊόντων PCR με χρώση αργύρου
έπειτα από ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου)**

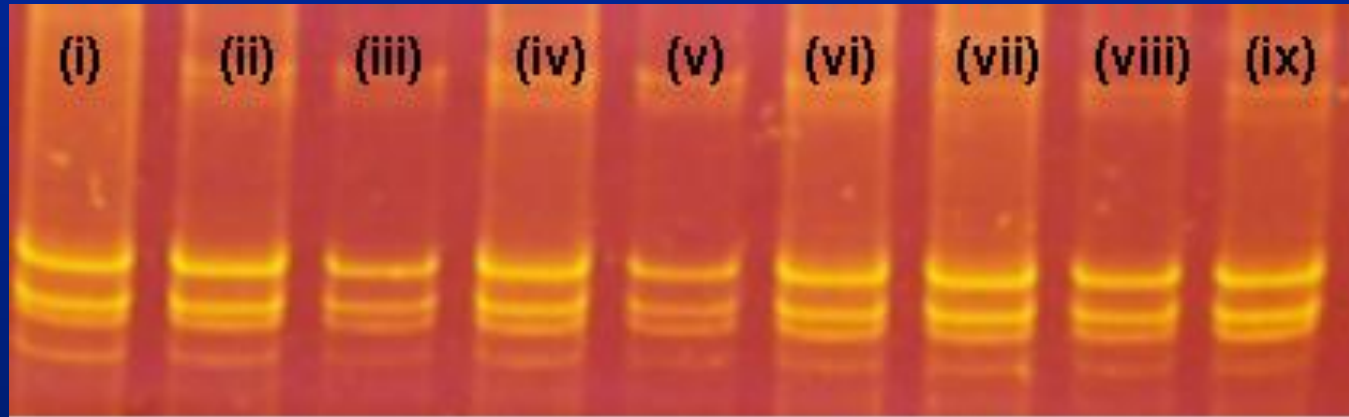


Ηλεκτροφόρηση SSCP με 5 δείγματα του εξονίου 16: (i) αρνητικός μάρτυρας, (ii) δείγμα #62, (iii) δείγμα #90, (iv) δείγμα #113, (v) δείγμα #114, (vi) δείγμα #118.

**ανίχνευση προϊόντων PCR με χρώση
Coomassie Brilliant Blue
έπειτα από ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου)**



**ανίχνευση προϊόντων PCR με SYBR GREEN
έπειτα από ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου)**



Ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing)

οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σ' ένα μέσον με μεταβλητή σύσταση pH, διαβαθμιζόμενη ως προς την κατεύθυνση μετακίνησης.

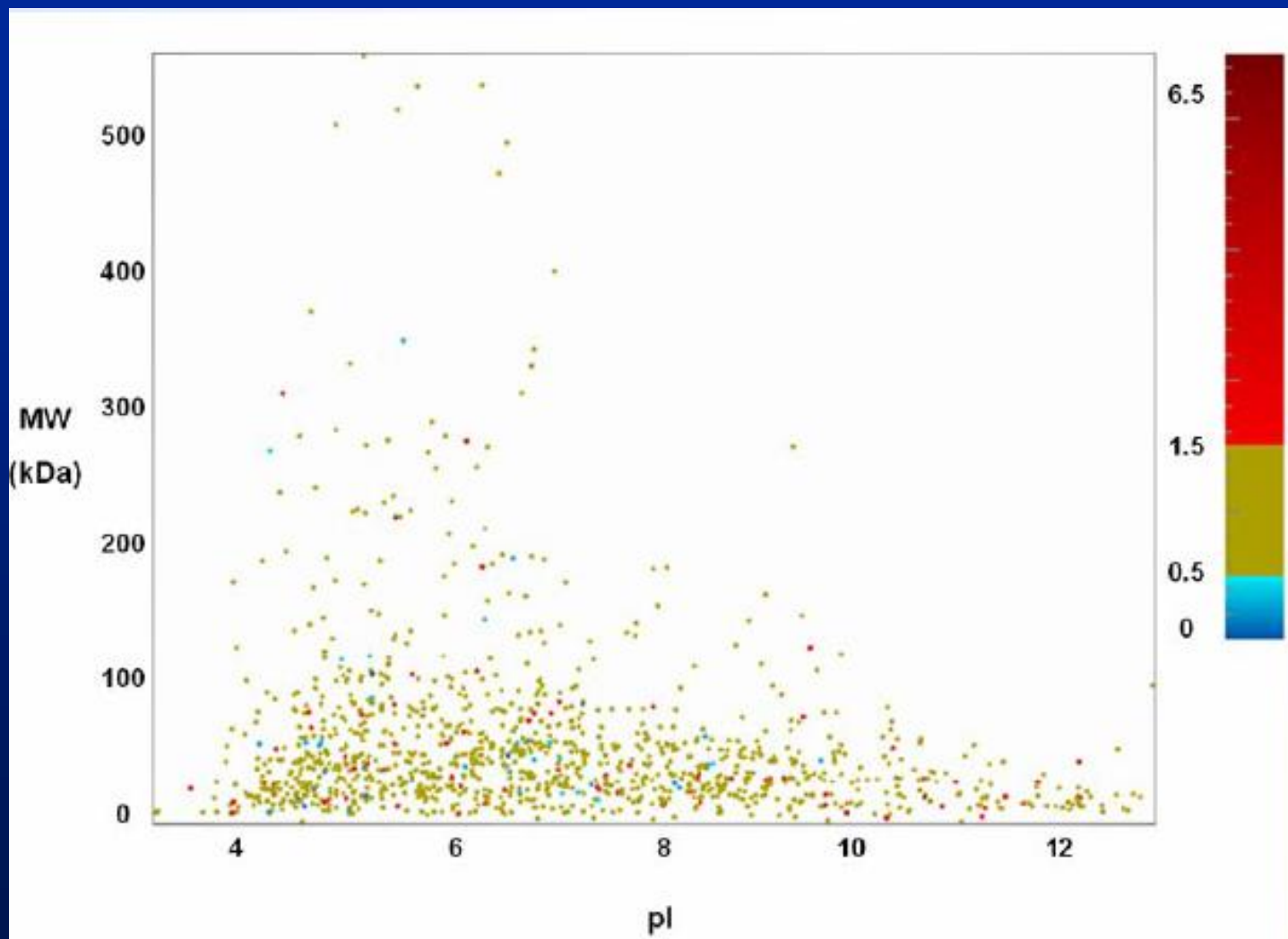
Η πρωτεΐνη μετακινείται προς τη ζώνη εκείνη, όπου το pH είναι ίσο με το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Σ αυτό το pH το συνολικό φορτίο των πρωτεΐνης εξουδετερώνεται και η μετακίνηση σταματά.

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πολύ υψηλή τάση, περίπου 2000 V και απαιτείται σύστημα ψύξης για αποφυγή υπερθέρμανσης.

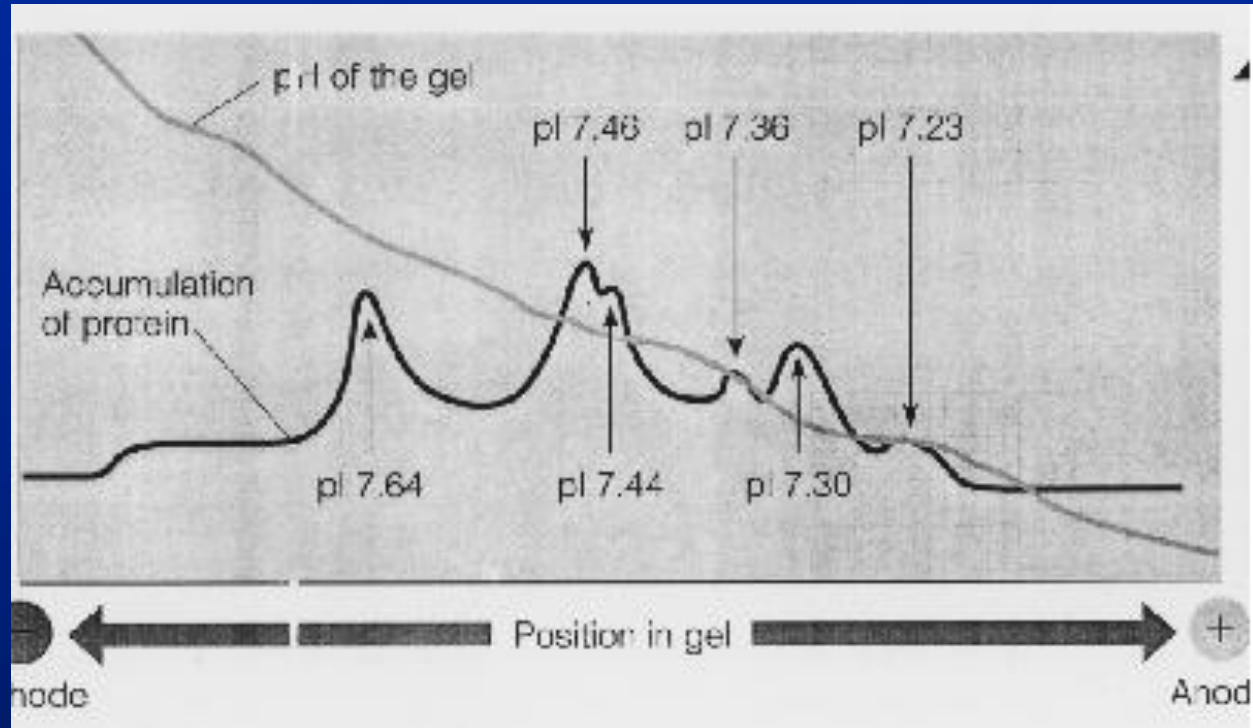
Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο, αλλά έχει και πολλές πρακτικές διαγνωστικές εφαρμογές.



Χάρτης κατανομής πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος και το ισοηλεκτρικό τους σημείο



Ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing)



Επειδή το ισοηλεκτρικό σημείο κάθε πρωτεΐνης περιορίζεται σε πολύ στενή και συγκεκριμένη περιοχή pH οι ζώνες διαχωρισμού στην ισοηλεκτρική εστίαση είναι πολύ οξείες.

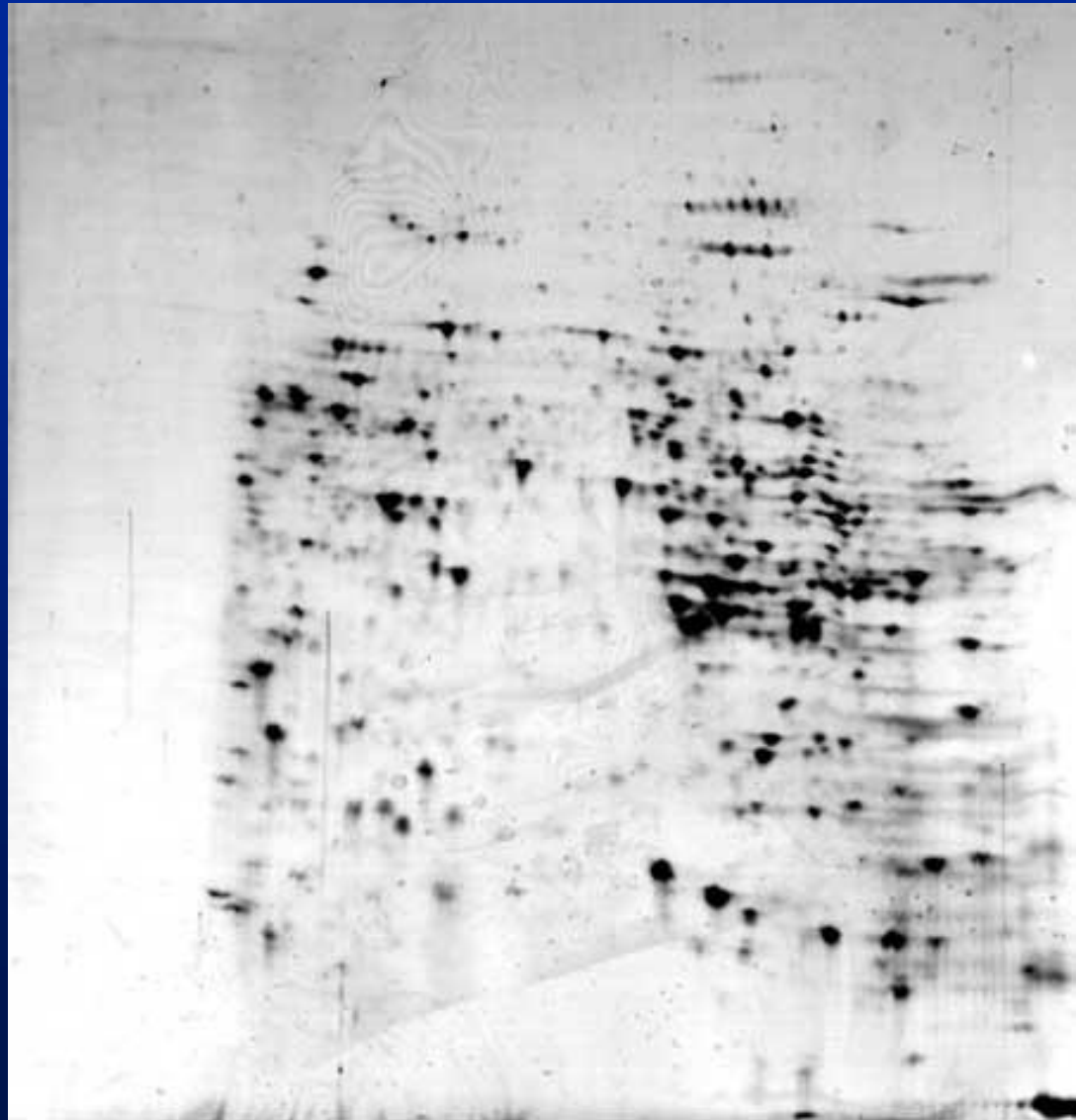
Με την τεχνική αυτή έχουν διαχωρισθεί πρωτεΐνες, των οποίων τα ισοηλεκτρικά σημεία διαφέρουν μόλις κατά 0.02 μονάδες pH.

δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two Dimensional Electrophoresis, 2DE).

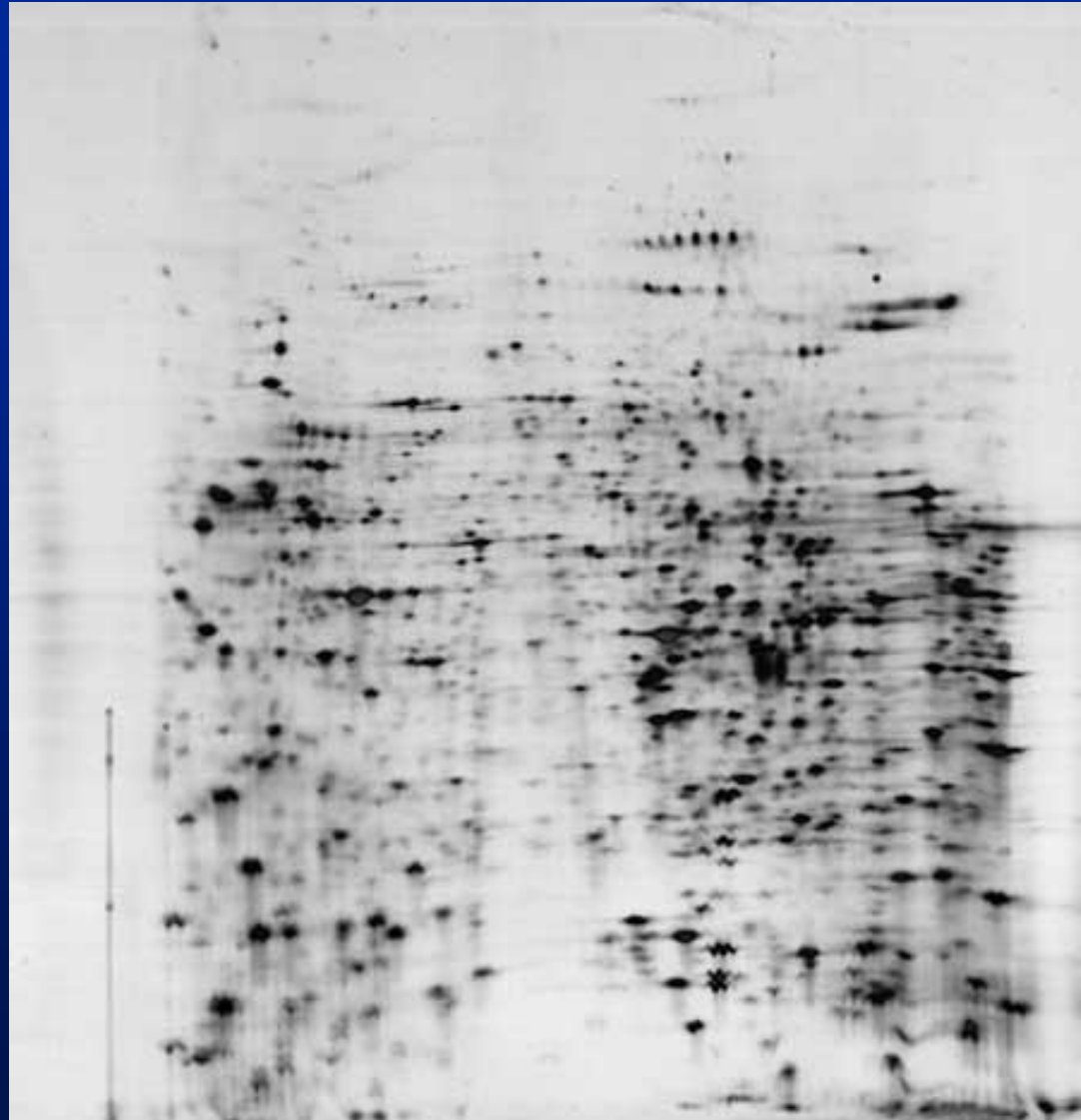
- Συνδυασμός των τεχνικών SDS-PAGE και IEF επιτρέπει τον καλύτερο διαχωρισμό ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο pI (ως προς μια κατεύθυνση) και το MB (ως προς άλλη κατεύθυνση).



δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two Dimensional Electrophoresis, 2DE)



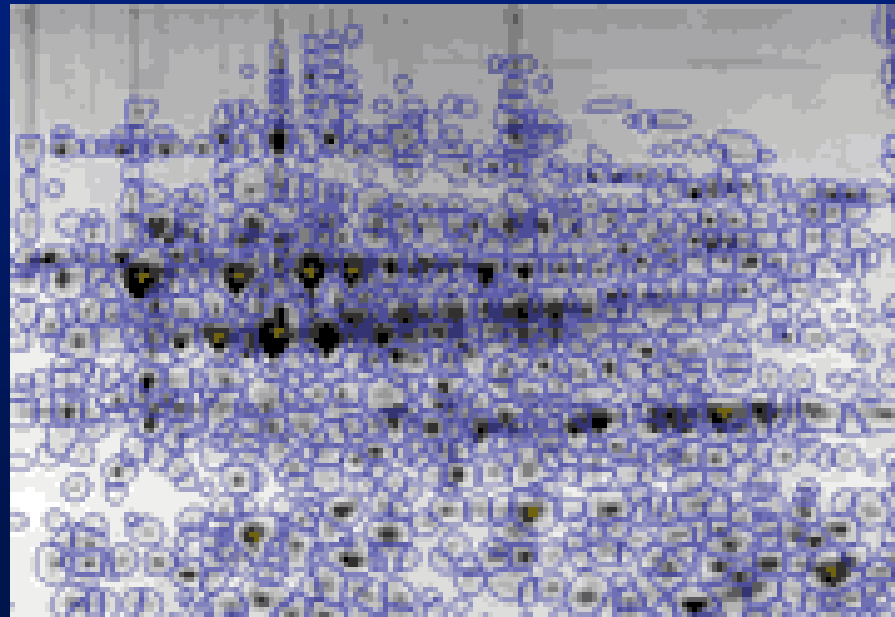
δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two Dimensional Electrophoresis, 2DE)



buffer: 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 66mM DTT and 0.5% ampholytes

δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE σε συνδυασμό με Mass spectrometry

- Ο συνδυασμός 2DE MS αποτελεί τον βασικό πυρήνα της μεθοδολογίας ανάλυσης πρωτεϊνών στην πρωτεομική.
- Η μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των 2D-PAGE gels σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας οδηγεί στην ταυτοποίηση πρωτεϊνικών συστατικών σε πολύπλοκα δείγματα.



Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis)

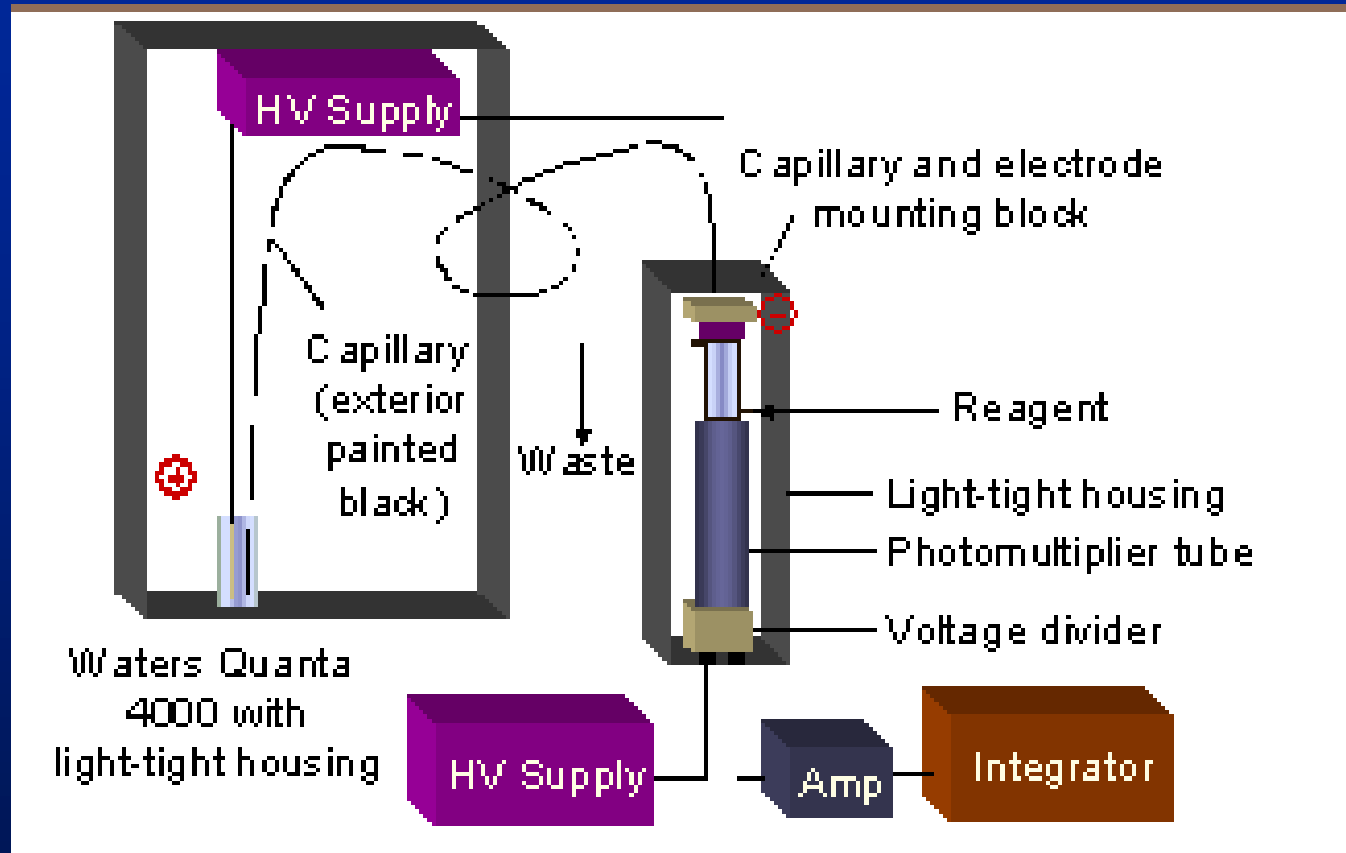
- Η Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αποτελεί την πλέον αυτοματοποιημένη και εξελιγμένη ηλεκτροφορητική τεχνική για διαχωρισμό σακχάρων, πεπτιδίων, φαρμακευτικών ουσιών, ανόργανων ιόντων, πρωτεϊνών και νουκλειικών οξέων.
- χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλες δυνατότητες αναλυτικών διαχωρισμών, οι οποίες υπερτερούν ακόμη και έναντι καθιερωμένων χρωματογραφικών μεθόδων, όπως η HPLC.
- Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο αλλά πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται και στην κλινική διάγνωση, ακόμη και για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA (DNA Sequencing).
- Κύρια πλεονεκτήματα της είναι: α) γρήγοροι, ποσοτικοί και επαναλήψιμοι διαχωρισμοί, β) πολλές δυνατότητες αναλυτικών εφαρμογών με ασυναγώνιστη ποικιλία και γ) καταλληλότητα για αυτοματοποιημένη χρήση για πολλαπλά δείγματα, δ) μεγάλη ευαισθησία.
-



Βασική αρχή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

- Η βασική αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι η χρησιμοποίηση ενός τριχοειδούς σωλήνα από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου (fused silica capillary tube) ως μέσο μεταφοράς.
- Ο σωλήνας έχει συνήθως μήκος μικρότερο των 100 cm και εσωτερική διάμετρο περίπου 50 μm . Ο σωλήνας αυτός μπορεί να είναι κενός ή να περιέχει κατάλληλο ηλεκτροφορητικό υλικό, πχ πολυακρυλαμίδιο.
- Τα άκρα του τοποθετούνται σε δοχεία ηλεκτρολυτών που περιέχουν ηλεκτρόδια.
- Ένα τροφοδοτικό μηχάνημα παρέχει διαφορά δυναμικού στην περιοχή 20.000 - 30.000 Volts για να προκαλέσει μετακίνηση των μορίων.
- Μετά το διαχωρισμό, ο οποίος λαμβάνει χώρα μέσα στον τριχοειδή σωλήνα, τα κλάσματα ανιχνεύονται με οπτικό ανιχνευτή και οι πληροφορίες συλλέγονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή υπό μορφή κορυφών σε ηλεκτροφόρημα.

Βασική οργανολογία τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης



Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση οργανολογία



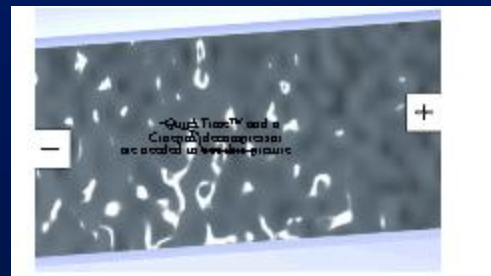


Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης Capillary zone electrophoresis (CZE)

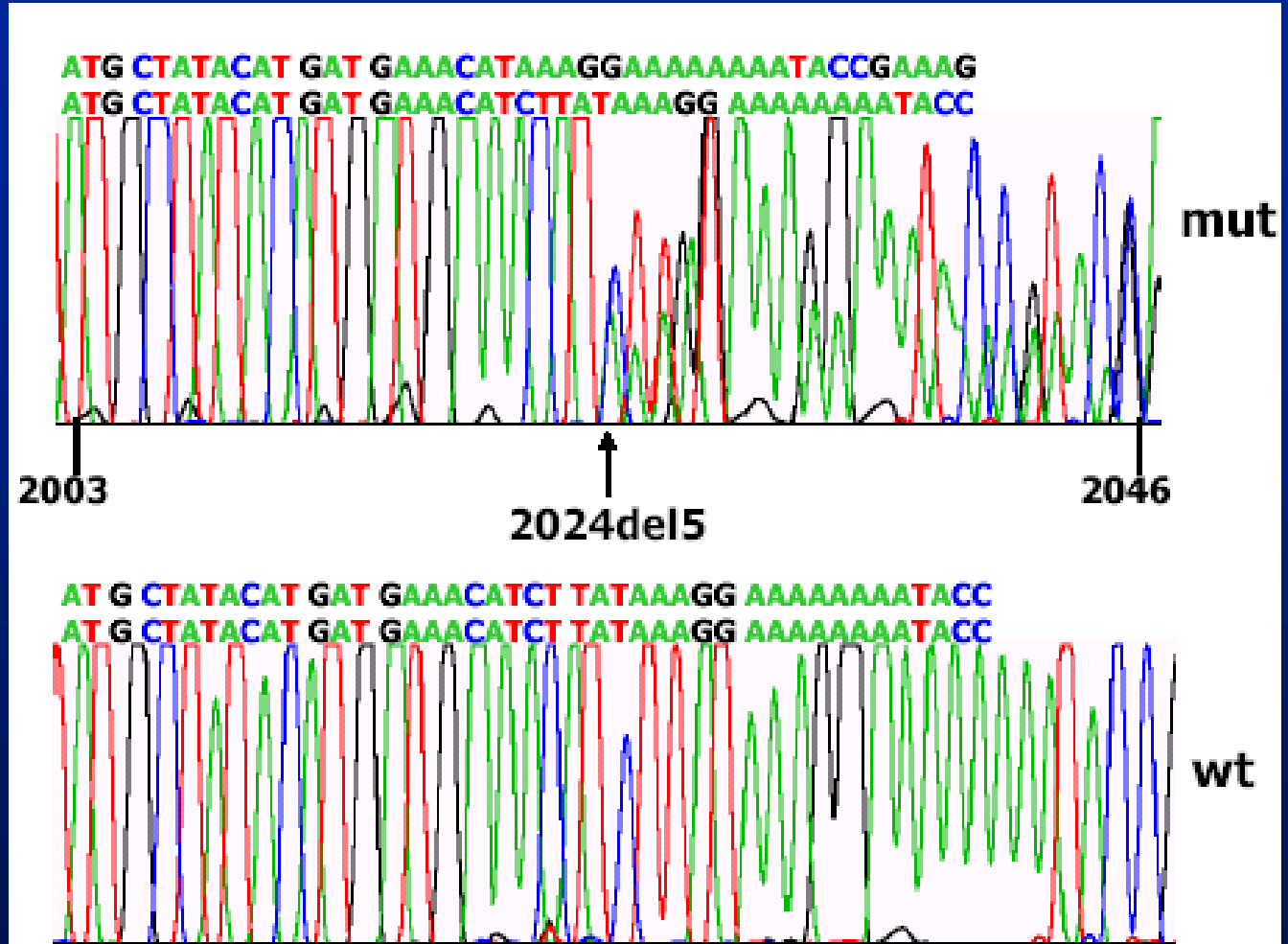
- Αποτελεί την πλέον διαδεδομένη παραλλαγή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης
- Εφαρμογή για ταυτόχρονο διαχωρισμό ανιοντικών και κατιοντικών ουσιών σε μία ανάλυση
- Στην CZE τα ανιόντα και τα κατιόντα κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις, αλλά παρασύρονται προς την κάθοδο λόγω ισχυρότατης ηλεκτροενδόσμωσης, η οποία υπερσχύει της ταχύτητας του διαλύτη.
- Σε μία τυπική ανάλυση, τα κατιόντα εκκλούνται πρώτα, διότι η κατεύθυνση μετακίνησης ταυτίζεται με εκείνη της ηλεκτροενδόσμωσης (EOF).
- τα ουδέτερα μόρια ακολουθούν, αλλά δεν διαχωρίζονται, καθώς η μετακίνηση τους ταυτίζεται με εκείνη της EOF.
- τα ανιόντα εκκλούνται τελευταία, διότι η μετακίνησης αντίθετη από εκείνη της EOF.

Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής Capillary gel electrophoresis (CGE)

- Η CGE αποτελεί ο ανάλογο της ηλεκτροφόρησης πηκτής στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.
- Χρησιμοποιείται για διαχωρισμό βιομακρομορίων, όπως τα ολιγονουκλεοτίδια, DNA και πρωτεΐνες.
- Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με πλήρωση του τριχοειδούς σωλήνα με το ηλεκτροφορητικό υλικό, αγαρόζη, πολυακρυλαμίδιο.
- Τα βασικά πλεονεκτήματα έναντι της κλασικής ηλεκτροφόρησης είναι η αποφυγή παρασκευής των πηκτών, η μεγάλη ποικιλία των gel matrix, η αυτόματη ανίχνευση, και βέλτιστη ποσοτικοποίηση και αυτοματοποίηση.



παράδειγμα: προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση πηκτής



Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση Capillary isoelectric focusing (CIEF)

- Χρησιμοποιείται για διαχωρισμό πρωτεϊνών
- Βασίζεται στη διαφορά των ισοηλεκτρικών σημείων (pI).
- Η CIEF πραγματοποιείται με πλήρωση του τριχοειδούς με ένα μίγμα αμφολυτών, που σχηματίζουν διαβάθμιση στις τιμές του pH
- Βασική αρχή διαχωρισμού, ίδια με την ισοηλεκτρική εστίαση (pH=pI).

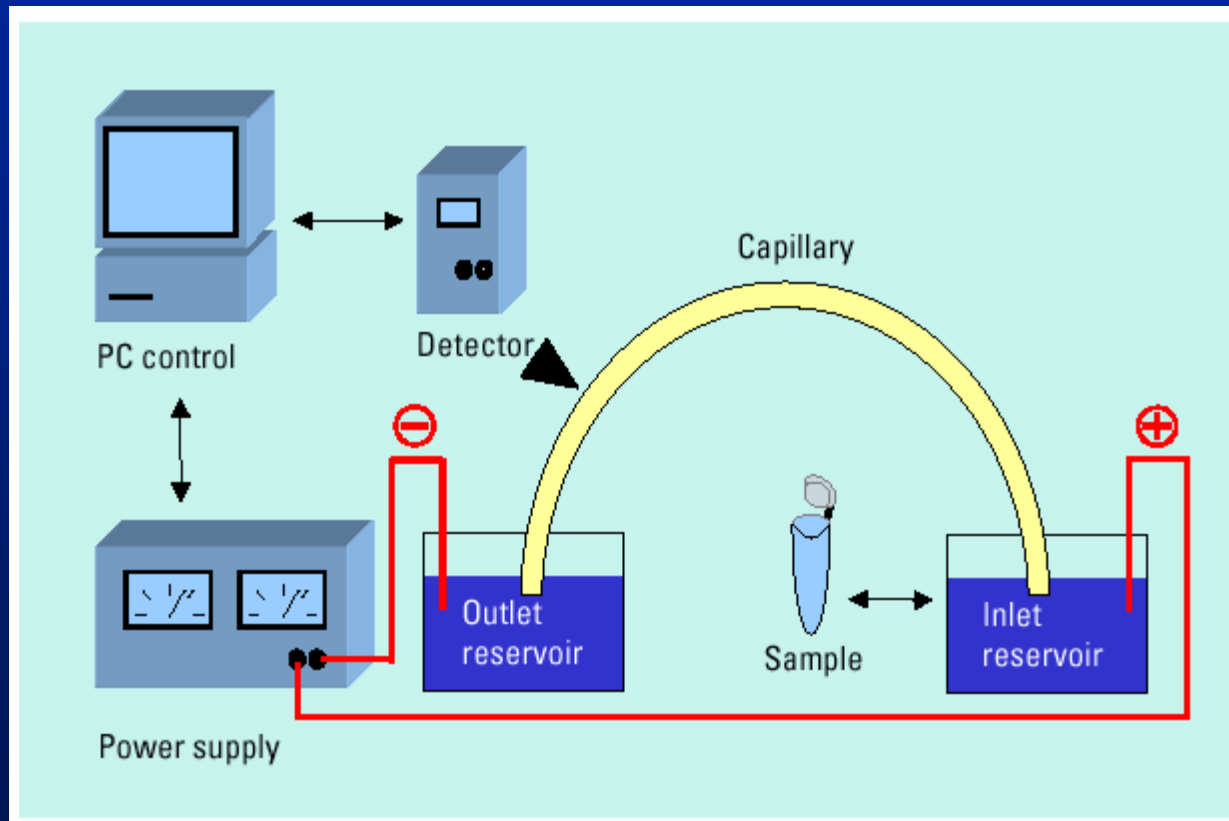




Separations in Capillaries

- **Application of higher potentials**
 - more rapid separations
 - reduced separation efficiency due to Joule heating
- **Use of capillaries**
 - enhanced heat dissipation
 - permits the use of high potentials
 - extremely efficient separations

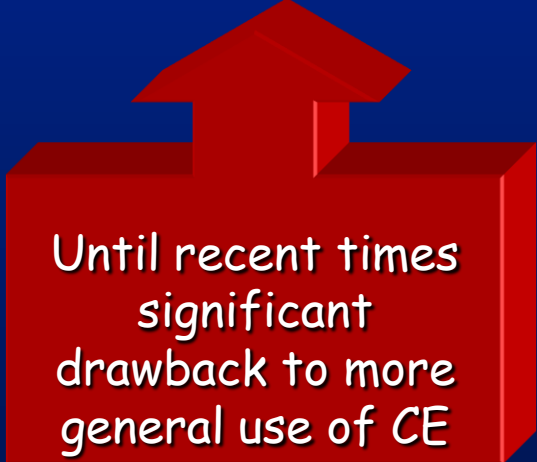
Basic Instrument Layout



©1999 Hewlett Packard, used by permission

Instrument Components

- **Electrodes**
 - Pt electrodes
- **Buffer reservoirs**
- **Power supply**
 - 20-30 kV
- **Capillary**
 - Fused silica capillary
 - **Dimensions ;**
 - » length; 50-100 cm
 - » internal diameter; 25-100 μm
 - May be open or packed
- **Detection**
 - On-column
 - **Most common**
 - » UV absorbance
 - » fluorescence



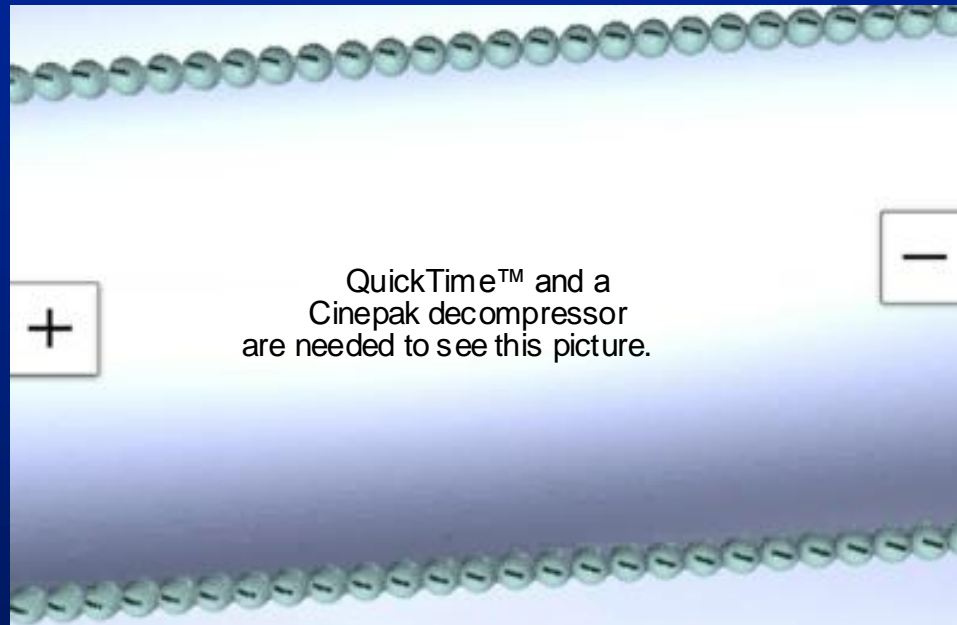
Until recent times
significant
drawback to more
general use of CE



CE Separations

- **CE exploits three physicochemical phenomena to achieve separations**
 - **electrophoresis**
 - » process whereby charged particles or ions move through a fixed liquid
 - **electroosmosis**
 - » process whereby a charged liquid moves against a fixed solid
 - **partition**
 - » c.f. chromatography

Capillary Zone Electrophoresis



©1999 Hewlett Packard, used by permission

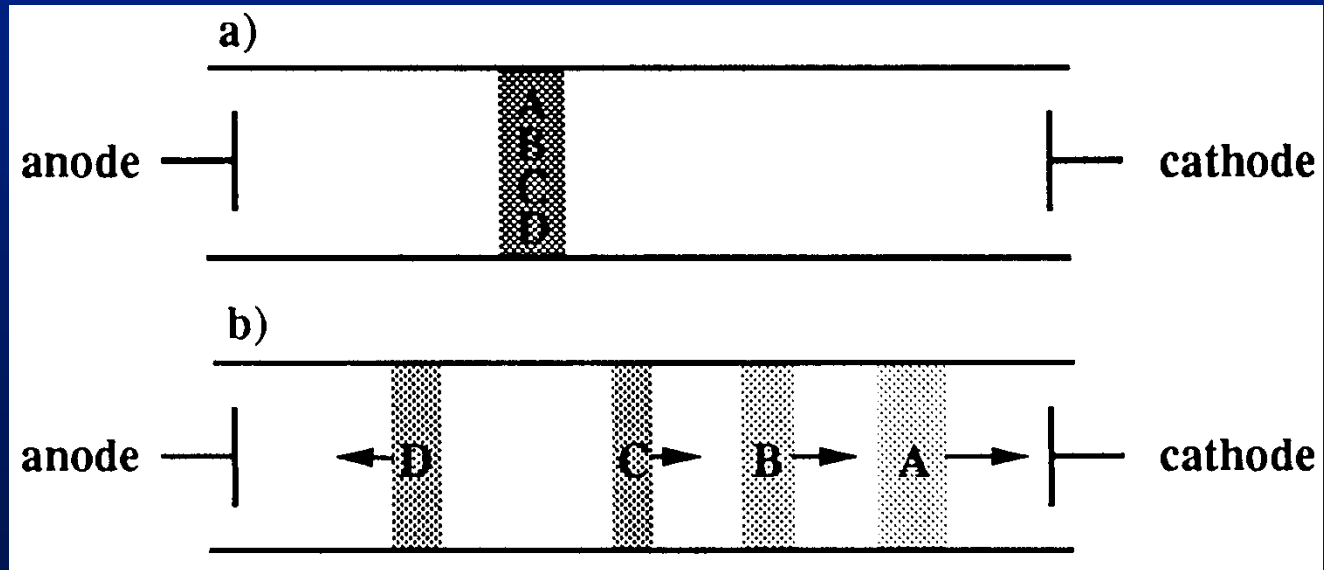


Factors Affecting Mobility

- **Electrophoretic mobility depends on;**
 - **solute properties**
 - » **charge, radius, shape, charge of ions, degree of dissociation**
 - **solvent properties**
 - » **ionic strength, pH, dielectric constant, viscosity, temperature**

Electrophoretic Migration

- Under the influence of an electric field;
 - » ionic species
 - » migrate towards corresponding electrodes
 - » velocities depend on charge densities





Electroosmosis

- **The relative motion of a liquid to a fixed charged surface caused by an electric field**
- **Electroosmotic flow (EOF)**
 - **magnitude and direction depends on capillary and solution within it**
 - **movement of all species, regardless of charge, in the same direction**
 - **under normal conditions the flow is towards the cathode**



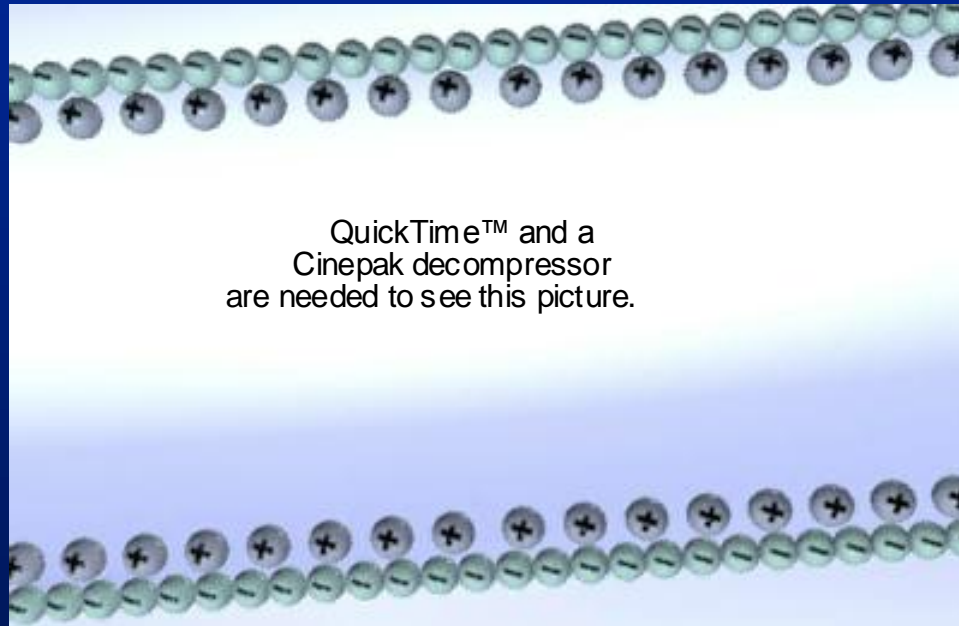
Charge on the Silica Surface

Silica can exist with a net positive, neutral or negative surface charge.

In a solution at pH=2 the net surface charge on silica is zero. And is referred to as Silica's pH_{zpc} (zero point charge).

A solution with a pH above pH 2 and in contact with Silica will give a surface charge on the Silica that is predominantly negative. As result of deprotonated Silanol groups Si-O^-

Electroosmotic Flow



©1999 Hewlett Packard, used by permission

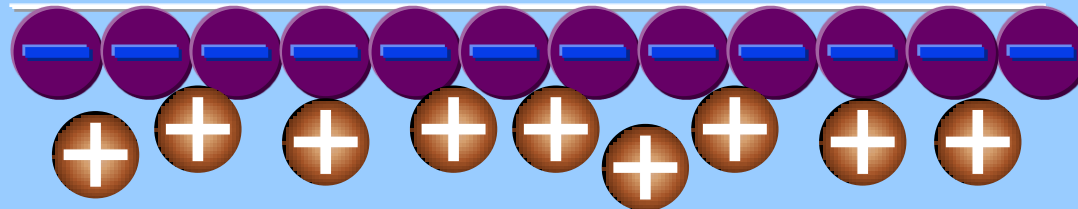
Capillary/solution interface

- Fixed negative charges on Silica capillary surface arising from
 - partially ionised acidic silanol groups (SiO⁻)



Capillary/solution interface

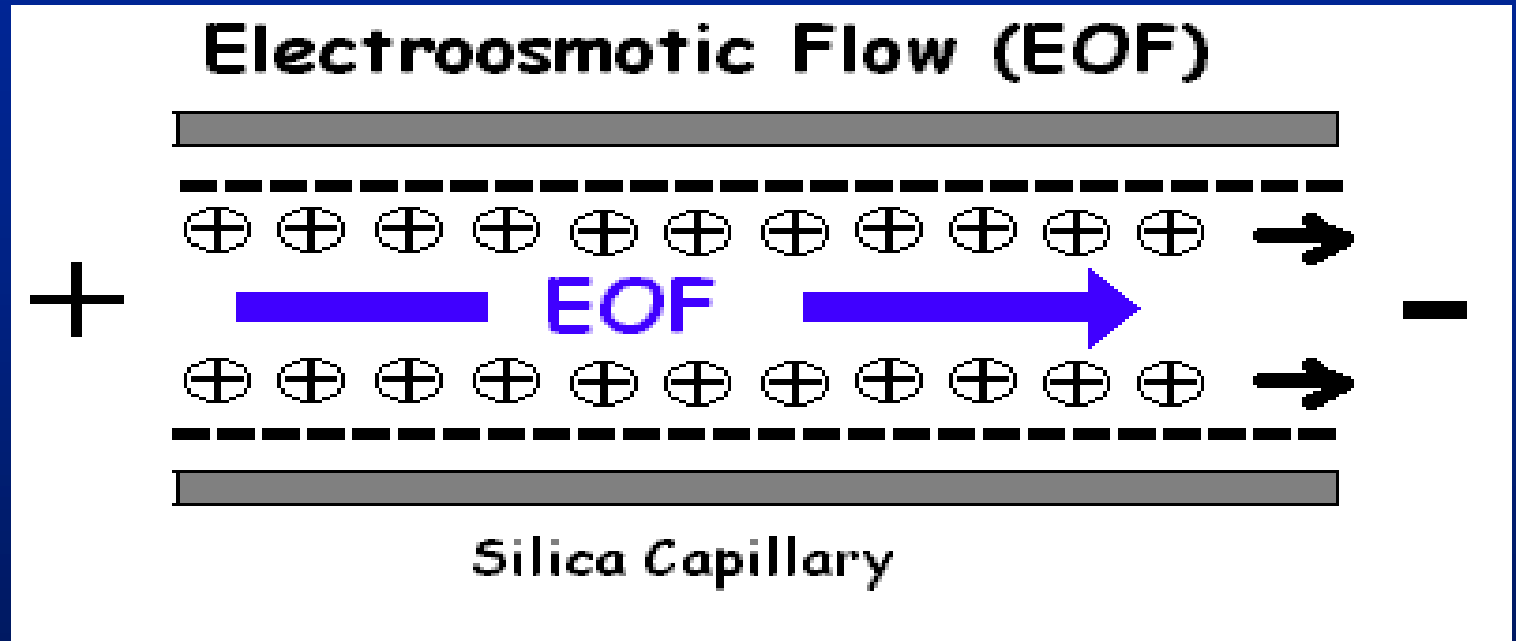
- Negative charge attracts positive hydrated ions from the buffer solution forming an “electrical double layer”



Electroosmotic Flow

Positive Electrode

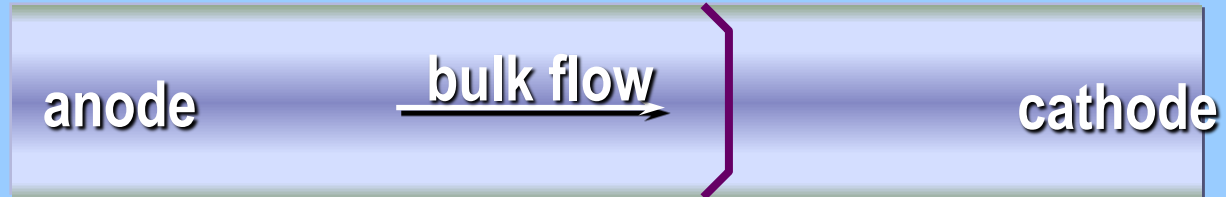
Negative Electrode



Silica in a solution above pH 2 is predominantly negative. Hydrated cations (Buffer) in solution are attracted to the surface and under a high potential move towards the negative electrodes dragging the solvent in the same direction.(EOF)

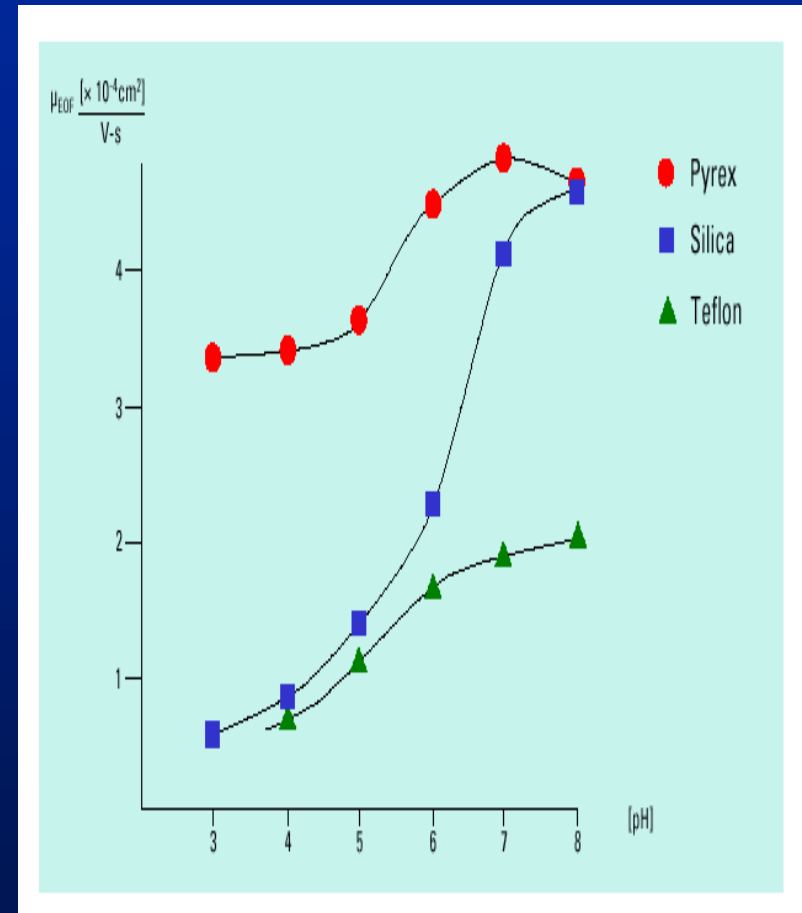
Capillary/solution interface

- Electric field is applied parallel to surface



Effect of pH on EOF

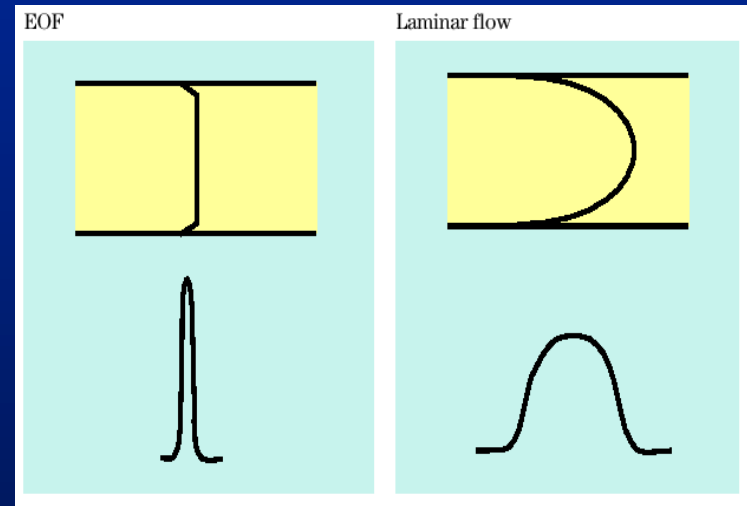
- **Double layer**
 - potential difference very close to the capillary wall -
 - Zeta Potential
 - Magnitude determined by surface charge therefore EOF depends on pH
- **Silica capillaries**
 - EOF significantly greater at high pH (silanols deprotonated) than at low pH (silanols protonated)



©1999 Hewlett Packard,
used by permission

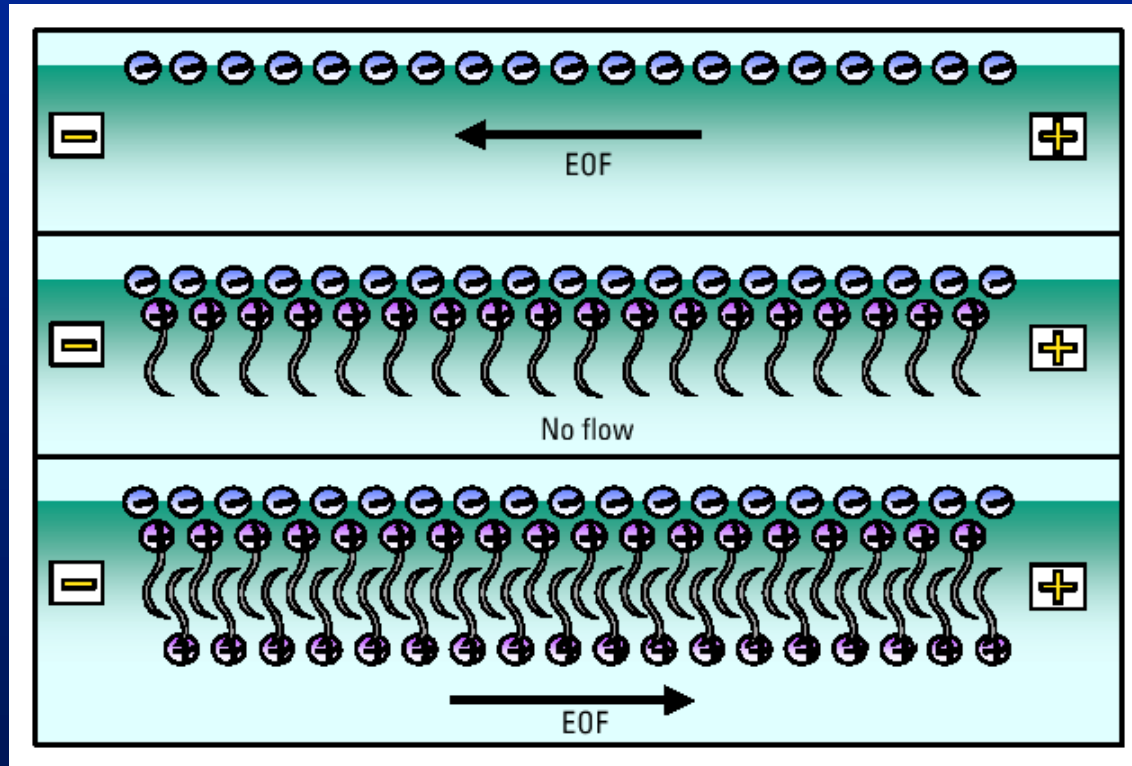
Flow Profile

- **Pressure driven flow systems (LC)**
 - frictional forces at the liquid-solid boundaries
 - strong pressure drop across the capillary
 - laminar or parabolic flow
- **EOF**
 - uniformly distributed along the capillary
 - plug flow
 - EOF does not contribute significantly to band broadening



©1999 Hewlett Packard,
used by permission

Reversal of EOF

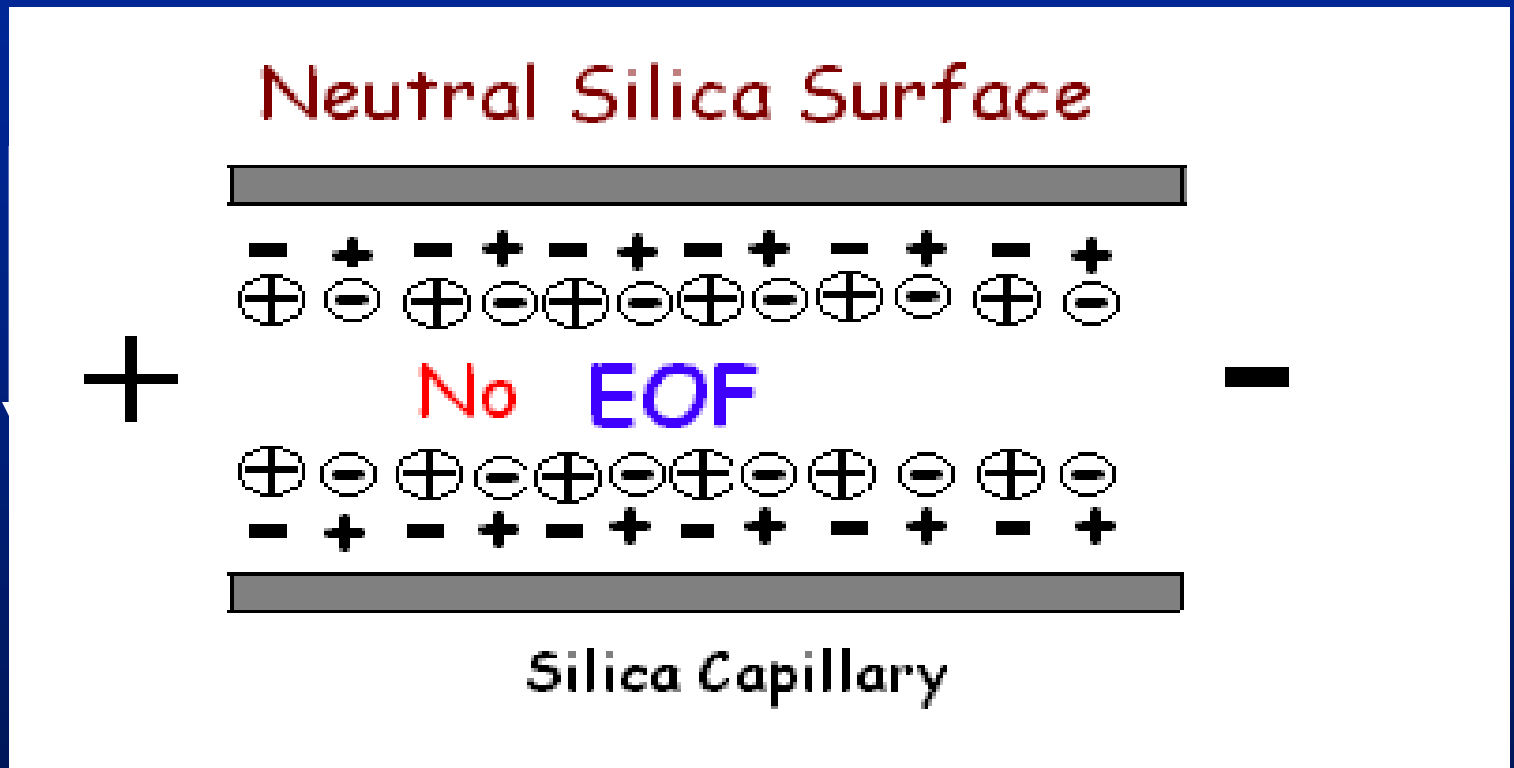


©1999 Hewlett Packard, used by permission

Electroosmotic Flow(EOF)

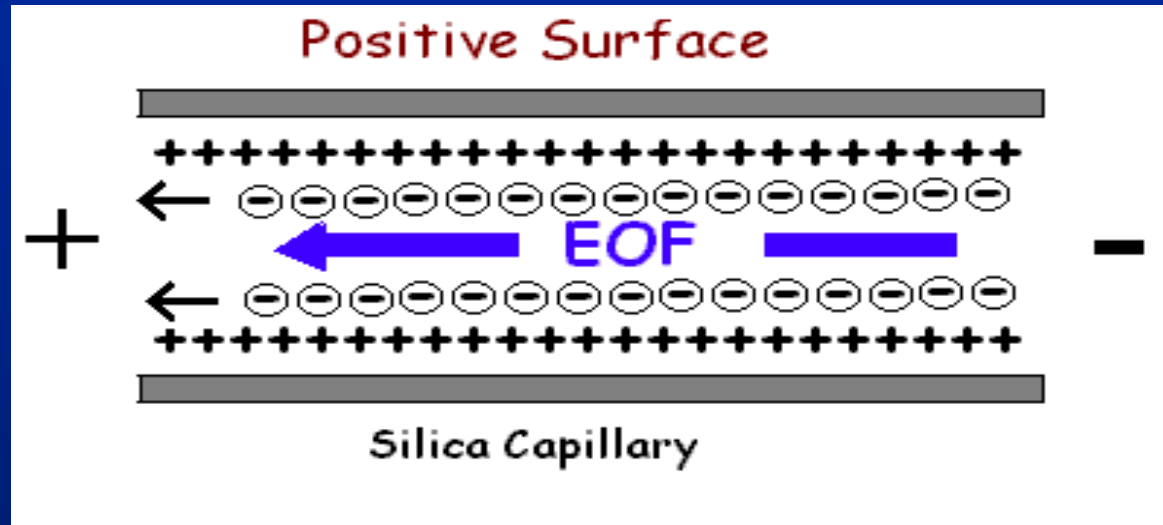
Positive Electrode

Negative Electrode



In this case there is no net movement of ions towards an electrode in the layer in contact with the surface.

Electroosmotic Flow



In the case of a positive surface the layer of ions in contact with the surface is negative and will move towards the positive electrode dragging the solvent in the same direction



Detection in CE

- **Conventional on-column detection**
 - UV-visible detection, Fluorescence
- **Mass spectrometry**
 - Electrospray MS
- **Chemiluminescence detection**
 - Lower limits of detection
 - Selectivity




Electropherogram

- Sample injected at the anodic end of the silica capillary
 - Sample consists;
 - » cationic component
 - » anionic component
 - » neutral substance (EOF marker)

The resulting output consists of a series of peaks similar to a chromatogram.
In CE neutral compounds also migrate as a result of the Electroosmotic Flow (EOF)

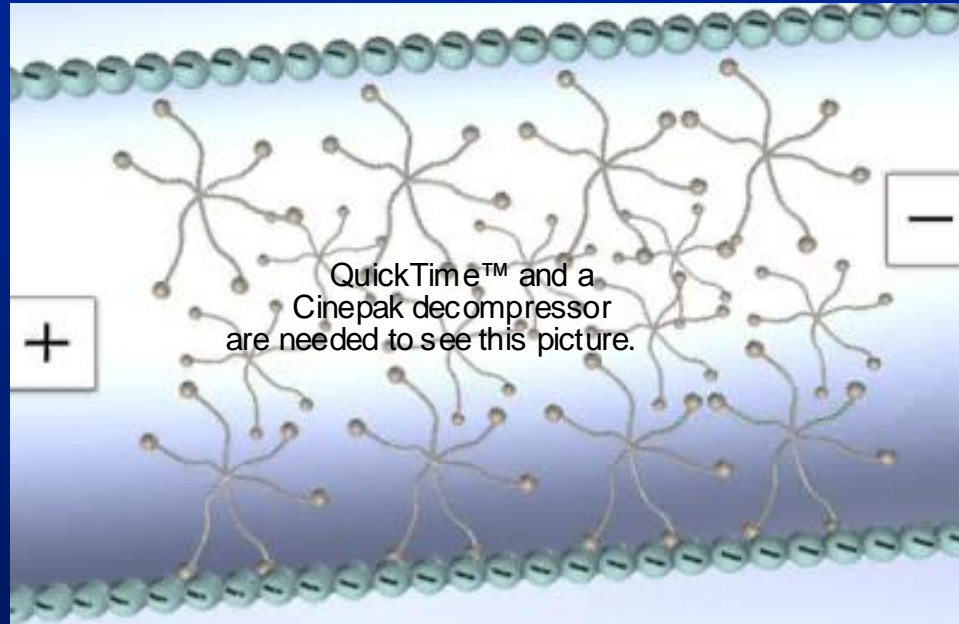
CE Techniques



Use CE Mode...	For Analysis of...
Capillary zone electrophoresis (CZE)	Ions, etc.
Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)	Neutral and ionic analytes
Chiral capillary electrophoresis (CCE)	Chiral molecules
Capillary electrochromatography (CEC)	Small molecules
Capillary gel electrophoresis (CGE/SDS-PAGE)	DNA/RNA size/protein MW
Capillary isoelectric focussing (CIEF)	Protein/peptide isoelectric point
Capillary isotachopheresis (CITP)	Ions

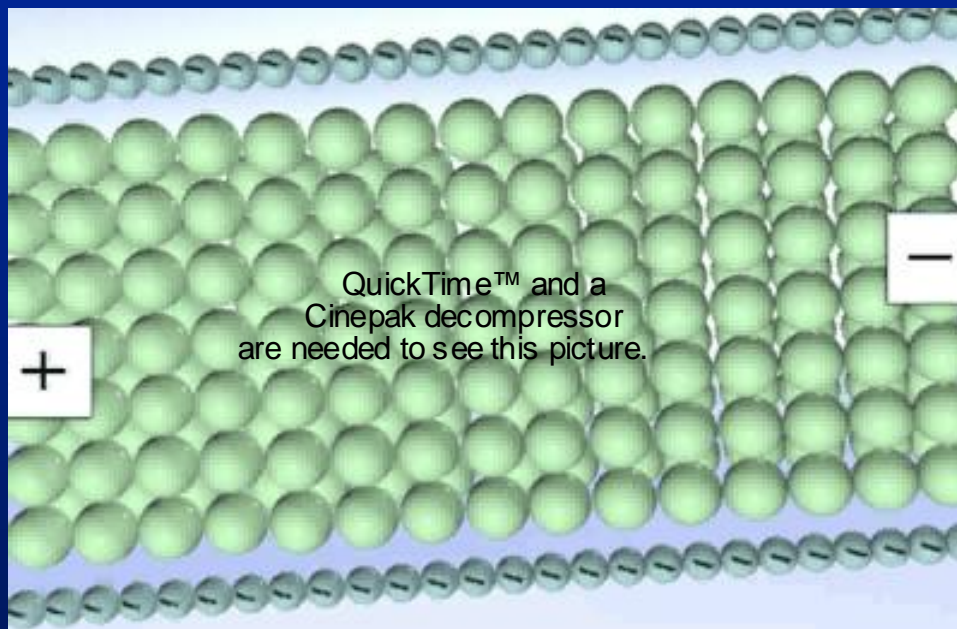
©1999 Hewlett Packard, used by permission

MEKC (micellar electrokinetic chromatography)



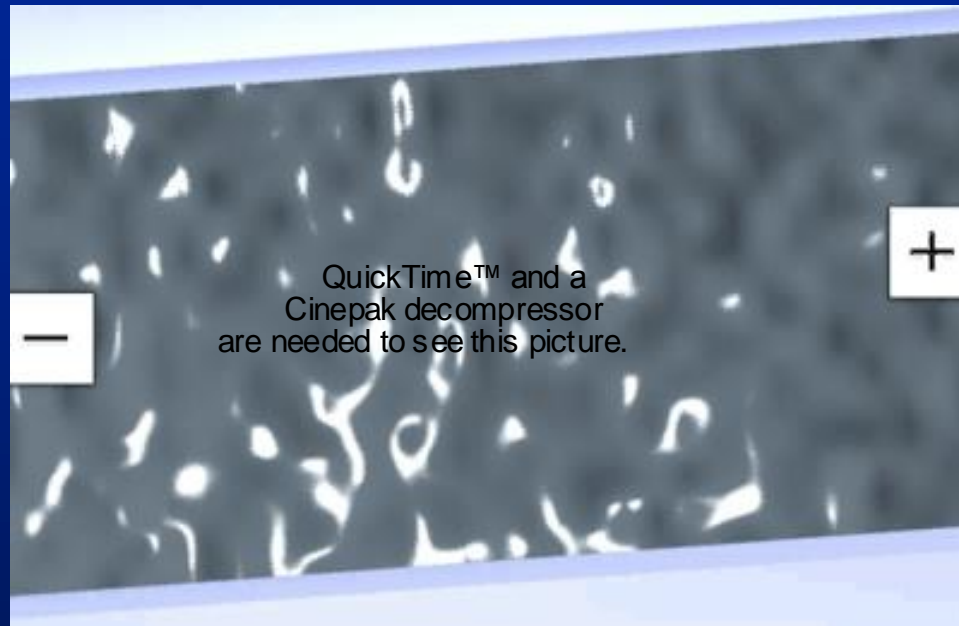
©1999 Hewlett Packard, used by permission

Capillary Electrochromatography



©1999 Hewlett Packard, used by permission

Capillary Gel Electrophoresis



©1999 Hewlett Packard, used by permission

Pros & Cons of CE

• Advantages

- Highly efficient separations
- Rapid analysis
- Low sample volumes
- Different CE techniques may be carried out on the same instrument
- Applicable to ionic and neutral species

• Disadvantages

- Detection
 - » Small Samples give low sensitivity
- Identification of eluted solutes
 - » one detection system may not get all
- System ruggedness
 - » Fragile Capillary
- High voltages
 - » solvent stability, heat



Application of CE

- **First commercial instruments mid 1980's**
- **Papers listed in Analytical Abstracts;**
 - **1984 ~ 1**
 - **1990 ~ 111**
 - **1992 ~ 230**
- **amino acids, peptides, proteins, carbohydrates**
- **Nucleic acids, DNA sequencing**
- **Pharmaceuticals**
- **Natural products**
- **Inorganic cations and anions**



Selectivity

- **Chromatography (MEKC/Chiral CE)**
 - stationary phases
 - mobile phases
- **CZE**
 - electrolyte system



CE Detection

- **Capillary electrophoresis is limited by detection systems**
 - UV absorbance most common
 - Detection limits usually $> 1 \times 10^{-6}$ M
 - CL orders of magnitude $>$ UV
 - CE-CL systems in early stages of development

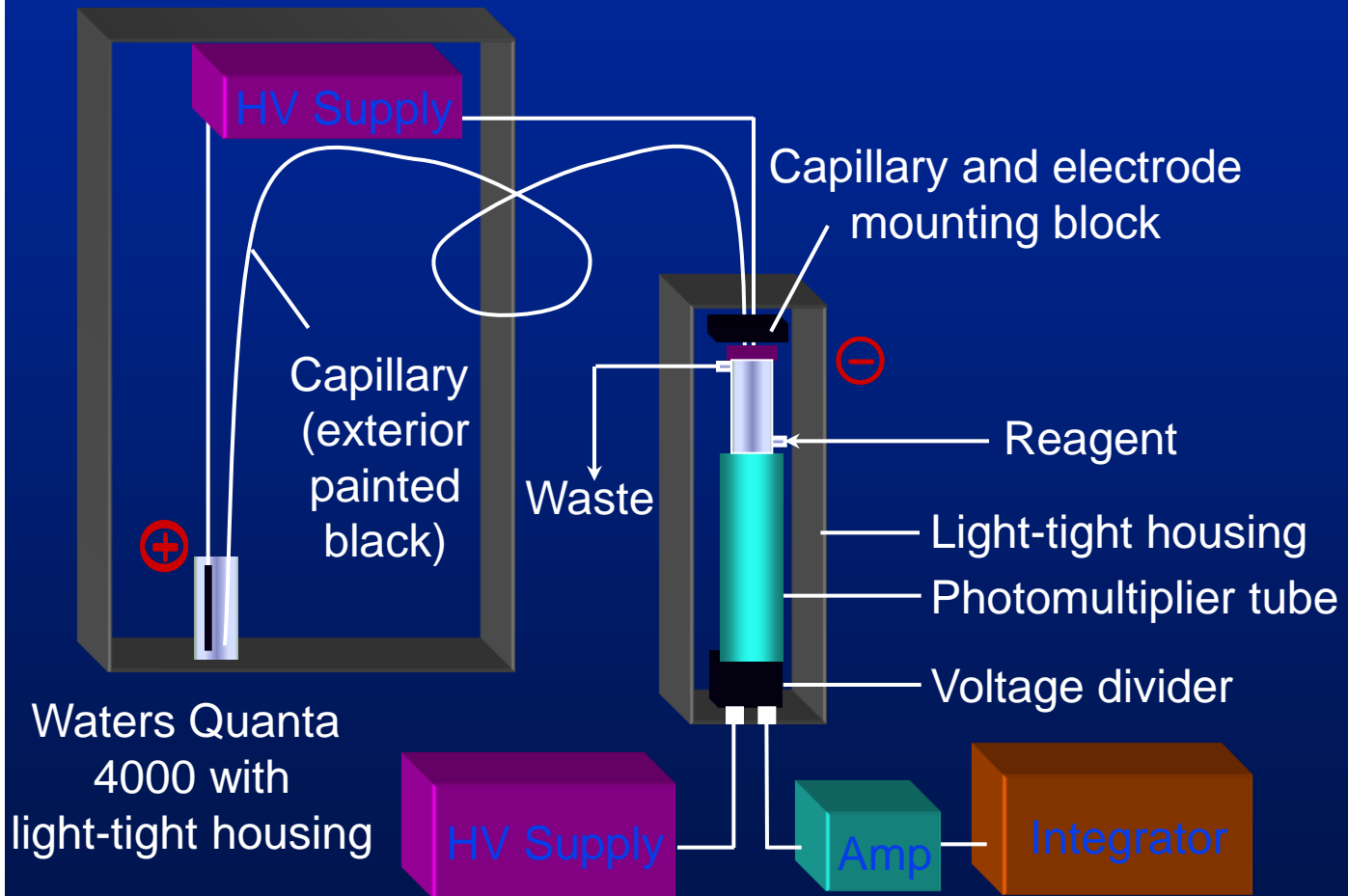
Detection is possibly the greatest drawback to CE.



Chemiluminescence Detection

- **Post-column reaction and occasionally pre-column reaction (labeling)**
- **Emission intensities are sensitive to environmental factors (solvent, pH)**
- **Emission intensity varies with time**
 - **profile is different for different analytes/reactions**
 - **important to detect signal at point of maximum emission**

CE-CL Instrument





CE vs HPLC

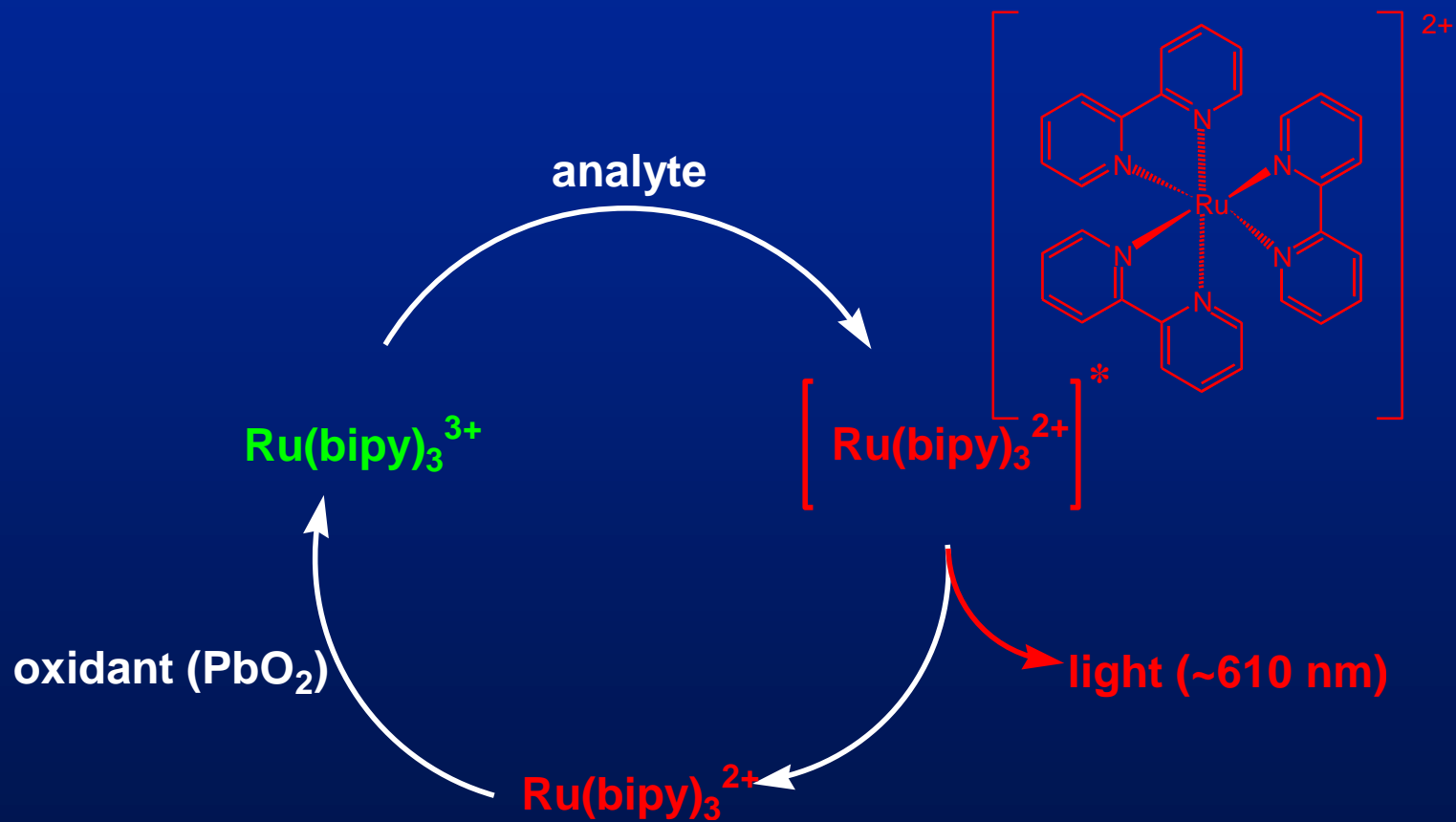
- **Both CE & HPLC involve Separations in Liquids
Good Selectivity**
- **Deliver Selectivity by differing Analyte Migration**
- **CE sharper peaks good for compounds with small differing selectivities.**
- **In CE Capillary prone to clogging an lower sensitivity due to sample size.**



CE vs HPLC

- **CE has shown promise with the separation of Large molecules(DNA 1000 bases)**
- **Good Selective in CE for Chiral separations**
- **Due to small sample sizes CE separated analytes may be difficult to detect.**
- **Specific HPLC Columns are required depending on the analyte.**
- **In HPLC the mobile phase can be readily changed to alter selectivity**

Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)





Capillary Electrophoresis of Opiates

- **Codeine produced by methylation of morphine**
 - » codeine
 - » 6-methoxycodeine
 - » thebaine
- **Determination of codeine and related opiates in urine, Taylor et al. (1996)**