

Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

ELEKTROFOREZA

Prowadzący: mgr inż. Marta Grec
Miejsce ćwiczeń: sala 102

1. Wstęp teoretyczny

Przyłożenie pola elektrycznego do wodnego roztworu elektrolitu zawierającego makrocząsteczki obdarzone niezrównoważonym ładunkiem elektrycznym (makrojon) zawsze powoduje ruch jonów, zarówno elektrolitu, jak i makrojonów, w kierunku elektrod o przeciwnym znaku ładunku elektrycznego. Przemieszczeniu jonów i makrojonów towarzyszą zjawiska fizyczne określane mianem elektrolizy oraz elektroforezy. Należy wyraźnie rozróżnić te procesy. Elektroliza jest procesem zachodzącym przy powierzchni elektrod i polega na odkładaniu się substancji, pochodzących z elektrolitu, na elektrodach pod wpływem przepływającego prądu. Procesy te opisywane są ilościowo prawami elektrolizy Faradaya. **Elektroforezą nazywa się procesy elektrokinetyczne zachodzące w objętości elektrolitu i polegające na przemieszczaniu się jonów i makrojonów w polu elektrycznym.** W klasycznym ujęciu elektroforezy, opracowanym dla koloidów, mowa jest o ruchu fazy rozproszonej w stosunku do fazy rozpraszającej pod wpływem pola elektrycznego. Zjawisko to opisane zostało przez Smoluchowskiego i Sterna w początkach XIX w. Do tej pory do zjawiska elektroforezy włączono ruch wszelkich jonów poddanych działaniu pola elektrycznego w tym środowisku.

Zarówno proste jony jak i makrojon w środowisku wodnym występują w postaci uwodnionej, co oznacza, że posiadają otoczkę hydratacyjną, będącą w istocie rzeczy uporządkowanym układem dipoli wodnych związanych z jonem dość słabymi siłami oddziaływania elektrostatycznego. Zasięg tego uporządkowania, choć niewielki, to w całym poważny sposób wpływa na możliwość ruchu jonów i makrojonów w otaczającym środowisku, a właściwości otoczki hydratacyjnej zależą zarówno od rozmiaru jonu i zgromadzonego na nim niezrównoważonego ładunku elektrycznego, jak i od właściwości elektrolitu, tj. jego siły jonowej oraz wartości pH.

Siła jonowa - jest funkcją stężenia jonów komponujących elektrolit (bufor), a jej wartość definiuje się jako połowę sumy iloczynów stężeń molowych i kwadratu wartościowości wszystkich jonów znajdujących się w roztworze. W początkowej fazie wzrostu wartości siły jonowej, gdy odległości pomiędzy jonami, a ściślej pomiędzy otoczkami jonów są duże, obserwuje się wzrost przewodności jonowej elektrolitu związany ze wzrostem liczby nośników ładunku elektrycznego. Jednak dalszy wzrost siły jonowej prowadzi do tak dużego zagęszczenia jonów i ich otoczek hydratacyjnych, że decydującą rolę w ich ruchu w polu elektrycznym zaczyna odgrywać tarcie występujące pomiędzy otoczkami. Przewodnictwo elektryczne elektrolitu w tych warunkach znacznie spada. Z tego powodu niezmiernie wagi nabiera odpowiedni skład elektrolitów przeznaczonych do elektroforezy. Przy zbyt wysokim stężeniu jonów następuje ograniczenie ich ruchliwości, przy zbyt niskim można zaobserwować niedobór nośników ładunku elektrycznego i związany z tym wzrost oporności elektrycznej.

Wartość pH - będąca miarą stężenia jonów wodorowych w elektrolicie ma szczególnie istotne znaczenie w odniesieniu do białek i peptydów. Białka i peptydy posiadają własności amfoteryczne (dwufunkcyjne lub obojętne) co oznacza, że są obdarzone wypadkowym ładunkiem elektrycznym dodatnim lub ujemnym w zależności od warunków środowiskowych. Cecha amfoteryczności wynika z właściwości aminokwasów wchodzących w skład peptydów i białek, a konkretnie z właściwości reszt aminokwasowych, które mogą być zarówno zasadowe, jak i kwaśne. W związku z tym, wypadkowy ładunek elektryczny cząsteczki aminokwasów zależy od wartości pH i można znaleźć taką jej wartość przy której wypadkowy ładunek równy jest zeru. Tę wartość pH nazywa się punktem izoelektrycznym i oznacza symbolem pI . Każdy aminokwas charakteryzuje się jemu właściwym punktem izoelektrycznym. Zawsze w środowisku o $pH < pI$ aminokwas obdarzone jest ładunkiem dodatnim i migruje w kierunku elektrody ujemnej. Aby elektroforetyczna separacja aminokwasów była skuteczną koniecznym jest utrzymywanie stałej wartości pH elektrolitu. Jednak z uwagi na zachodzącą elektrolizę wody ciągle generowane są jony H^+ na katodzie i OH^- na anodzie. W związku z tym elektrolit przeznaczony do elektroforezy musi być buforowany.

Parametry elektryczne - Zjawisko elektroforezy zachodzi dzięki obecności pola elektrycznego. Siła, z jaką pole to oddziałuje na ładunek elektryczny jonu jest proporcjonalna do natężenia tego pola (E [V/m]), a ta wielkość jest z kolei proporcjonalna do napięcia U [V] przyłożonego do elektrod. W zakresie niskich sił jonowych istnieje prosta relacja wynikająca z prawa Ohma regulująca zależność pomiędzy przyłożonym napięciem U , a płynącym w wyniku tego prądem I [A] oraz oporem elektrycznym (rezystancją) R [Ω] elektrolitu: $V = I R$. Podczas przepływu prądu elektrycznego, w wyniku wykonywania pracy przesunięcia ładunku elektrycznego przez pole, na opornościach obwodu tracona jest moc P [W]. Pracy tej towarzyszy wydzielanie się ciepła, zwanego ciepłem Joule'a. Ilość wydzielonego ciepła Q [J] można obliczyć korzystając z równania: $Q = U I t$. Oczywiście ciepło to jest wydzielane na wszystkich oporach obwodu, ale największy udział w tym zjawisku posiada elektrolit. Zasilacze stosowane do elektroforezy zwykle mogą utrzymywać stałą wartość jednego z parametrów: prądu I , napięcia U lub mocy P . Dla pozostałych parametrów ustala się tylko górny limit wartości. W ciągu trwania elektroforezy oporność elektrolitu ulega zmianom, zwykle obniża się ze wzrostem temperatury wynikającym z ciepła Joule'a. W zależności od składu elektrolitu oraz wyboru stabilizowanego parametru obserwuje się wzrost lub spadek ilości wydzielanego ciepła. I tak przy stałym prądzie wzrasta oporność układu i wraz z tym wzrasta ilość wydzielanego ciepła. Układ wymaga aktywnego odprowadzania ciepła. Z drugiej strony, gdy stabilizowane jest napięcie, ze wzrostem oporu następuje ograniczenie prądu, a w ślad za tym spadek ilości oddawanego ciepła. Układ nie wymaga termostatowania, ale znacznie wydłuża się czas trwania elektroforezy. W przypadku elektroforezy w warunkach stałego pH i stabilizacji prądu, wraz ze spadkiem oporności układu maleje ilość oddanego ciepła. W tych samych warunkach elektrolitu przy stabilizacji napięcia rośnie wartość prądu i w związku z tym wzrasta ilość wydzielanego ciepła. Wybór optymalnego składu elektrolitu (buforu) oraz stabilizacji wybranego parametru musi być poprzedzony analizą licznych zmiennych, w tym czasu trwania elektroforezy, ograniczenia dyfuzji molekuł czy strat aktywności biologicznej molekuł.

Temperatura - Utrzymywanie temperatury na zadanym poziomie, odpowiednim dla danego procesu, jest konieczne dla osiągnięcia zadowalających i powtarzalnych rezultatów elektroforetycznej separacji makromolekuł. Nadmiar ciepła uwalnianego podczas samego procesu elektroforezy może również stanowić poważne problemy natury praktycznej. Nadmiar ciepła może również prowadzić do denaturacji i inaktywacji separowanych białek, co w przypadku elektroforezy preparatywnej naraża eksperymentatora na duże straty. Przy zastosowaniu zbyt dużej mocy, można zaobserwować topnienie żeli agarozowych, w innych rodzajach elektroforezy może dojść do pęknięcia szklanych płyt czy nawet uszkodzenia aparatu poprzez termiczne odkształcenia jego plastikowych elementów. Dlatego współcześnie użytkowane dobre aparaty do elektroforezy mają możliwość aktywnego odprowadzania lub rozpraszania nadmiaru ciepła z całej objętości żelu.

RODZAJE NOŚNIKÓW ELEKTROFORETYCZNYCH

Nośniki elektroforetyczne - Rozdziały elektroforetyczne mogą być prowadzone bezpośrednio w objętości elektrolitu, rozwiązanie takie stosowane jest często w elektroforezie kapilarnej, lub w nośniku elektroforetycznym wypełnionym odpowiednim elektrolitem. W tym drugim przypadku nośnik elektroforetyczny (bibuła, azotan celulozy, agarosa, poliakrylamid i inne) nie tylko stabilizuje elektrolit ale często przyczynia się do lepszej separacji makrocząsteczek. Szczególnie zastosowanie porowatych nośników (agarowa, poliakrylamid) potęguje efekt separacji poprzez dodatkowe frakcjonowanie makrocząsteczek na zasadzie sita molekularnego.

Przy poszukiwaniu nowego rodzaju nośnika należy zawsze pamiętać, że powinien on być elektrycznie obojętny. Występowanie związanego z nośnikiem ładunku elektrycznego prowadzi do niekontrolowanych oddziaływań makrojonów z tym ładunkiem i w rezultacie zmianę prędkości ich migracji, aż do całkowitego zatrzymania makrojonu. Jednocześnie istnienie takiego ładunku elektrycznego przyczynia się do migracji cząsteczek wody w kierunku katody. Proces ten nazwano elektroendoosmozą. Generalnie istnienie związanego

z powierzchnią nośnika ładunku elektrycznego prowadzi do znaczącego obniżenia rozdzielczości elektroforezy.

RODZAJE KOMÓR ELEKTROFORETYCZNYCH

Ze względu na sposób umieszczenia nośnika elektroforetycznego można wyróżnić elektroforezę kapilarną (*ang. capillary electrophoresis*), elektroforezę pionową (*ang. vertical electrophoresis*) oraz elektroforezę poziomą (*ang. horizontal electrophoresis*).

Elektroforeza kapilarna. W elektroforezie kapilarnej, określanej często skrótem HPCE (*ang. high performance capillary electrophoresis*) elektrolit wypełnia kapilarę. Oba końce kapilary zanurzone są w zasobnikach z odpowiednimi elektrolitami. Sama kapilara wypełniona jest swobodnym elektrolitem (elektroforeza swobodna) lub porowatym nośnikiem (elektroforeza na nośniku). Do obu końców kapilary przykłada się wysokie napięcie co skutkuje pojawieniem się we wnętrzu kapilary pola elektrycznego. Przeznaczeniem elektroforezy kapilarnej są rozdziały analityczne i mikropreparatywne. Ilość nanoszonego materiału do analizy jest bardzo niewielka - rzędu pojedynczych nanogramów. Detekcja rozdzielonych grup makrocząsteczek realizowana jest u ujścia kapilary przy pomocy detektora o konstrukcji zbliżonej do przepływowego detektora stosowanego w chromatografii cieczowej.

Elektroforeza pionowa - jest najpowszechniej stosowaną techniką. W technice tej nośnik elektroforetyczny wypełnia szklane rurki (elektroforeza rurkowa) lub znajduje się pomiędzy dwoma płytkami rozdzielonymi przekładkami dystansowymi (*ang. spacer*) (elektroforeza płytowa).

Elektroforeza pozioma - jest rodzajem elektroforezy w którym nośnik umieszczony jest w płaszczyźnie poziomej (rys. 2). Zaletą tego rozwiązania jest brak wycieków elektrolitu oraz możliwość łatwego odprowadzenia ciepła generowanego w trakcie przepływu prądu. Elektroforeza półsucha, w której bufor elektrodowy zamknięte są w zestalonej agarozie lub w warstwach bibuły filtracyjnej, pozwala ponadto na znaczne ograniczenie zużycia chemikaliów niezbędnych do przygotowania buforów.

RODZAJE ELEKTROFOREZY

Metody elektroforetyczne stosowane w praktyce są pochodnymi lub kombinacją trzech podstawowych rodzajów separacji. Są to: elektroforeza strefowa (*ang. Zone electrophoresis*), izotachoforeza (*ang. isotachphoresis*) oraz ogniskowanie izoelektryczne (*ang. isoelectric focusing*).

BARWIENIE, DOKUMENTACJA ORAZ ANALIZA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA

Ukończenie rozdziału elektroforetycznego czy transferu nie kończy procedury separacji. Większość białek i kwasów nukleinowych nie jest widoczna w świetle białym. Niezbędne jest ich wybarwienie (wizualizacja) w żelach lub na membranach, tak aby uzyskać informację o dystansie ich migracji i ich ilości w prążku lub spocie (obszarze zawierającym białko w rozdziale 2D). Postępowanie to pozwala na przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej separowanych makrocząsteczek.

2. Opis ćwiczenia

Uwaga!: Wszystkie czynności wykonywać w gumowych rękawiczkach.

Ćwiczenie polega na rozdziale i identyfikacji aminokwasów w mieszaninie, stosując metodę elektroforezy poziomej.

W pierwszej części ćwiczenia zostanie przeprowadzona elektroforeza wybranych aminokwasów, dobranie optymalnych warunków (napięcia, czasu trwania). Zostanie to wykorzystane w drugiej części, która zakłada rozdzielanie i identyfikację aminokwasów w przygotowanej mieszaninie.

CZĘŚĆ 1

Przygotowanie roztworów wzorcowych aminokwasów.

Do trzech pojemniczków odważyć po 0,1g: lizyny, prolina oraz histydyny, a następnie dodać wody destylowanej odpowiednio: 10 ml (histydyna i prolina) oraz 18 ml (lizyna). Mieszać do całkowitego rozpuszczenia.

Przygotowanie bibuły do elektroforezy

Wyciąć pasek bibuły o wymiarach 10x32 cm, na brzegu bibuły oznaczyć jej dokładny środek (16 cm:)) oraz narysować linie startową na wysokości 8,5cm od krótszej krawędzi. Na linii startowej zaznaczyć 4 punkty: po 1 dla każdego aminokwasu oraz na tzw. mix (od krawędzi bocznej co 2cm).

Uwaga: Rysować i opisywać ołówkiem!

Pasek bibuły zwilżyć poprzez zanurzenie w buforze octanowym o pH=3,8 znajdującym się w wanience i ułożyć w aparacie pomiędzy elektrodami.

Włączyć prąd (napięcie 500 V) i odczekać 15 minut, po czym wyłączyć prąd.

Elektroforeza aminokwasów

Na poszczególne punkty zaznaczone na bibule nanieść kolejno cienką kapilarą po 1 **kropelce** następujących przygotowanych roztworów aminokwasów.

Przed nakrapianiem dobrze umyć pipetki wodą destylowaną i osuszyć.

Ponownie włączyć prąd (napięcie 500V) i tym razem odczekać 1 godz. 30 min. Po upływie tego czasu wyłączyć prąd.

Pasek bibuły wyjąć, wysuszyć w suszarce, a następnie spryskać ją roztworem ninhydryny i ponownie wysuszyć.

CZĘŚĆ 2

Na podstawie próby wykonanej w części pierwszej powtórzyć doświadczenie dla nieznanej mieszaniny aminokwasów, zawierającej 3 z spośród 5 wytypowanych przez prowadzącego aminokwasów.

Opracowanie wyników.

Na podstawie przeprowadzonej elektroforezy zidentyfikować aminokwasy, wchodzące w skład mieszaniny, wyjaśnić przyczyny przesunięcia plam od linii startowej w kierunku odpowiednich elektrod. Zakwalifikować poszczególne aminokwasy do odpowiednich grup (kwasowe, zasadowe, obojętne).