

Ηλεκτροφορητική ανάλυση

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σκοπός της άσκησης : η κατανόηση της αρχής λειτουργίας της ηλεκτροφόρησης και η χρήση της ως τεχνική ανάλυσης μακρομορίων.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Ο όρος ηλεκτροφόρηση (electrophoresis) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1931 από τον Arne Tiselius για να χαρακτηρίσει τη μεταφορά φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε ένα διάλυμα, κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ένα σωματίδιο με φορτίο q που βρίσκεται σε ένα μέσο με συντελεστή ιξώδους f , θα κινηθεί με σταθερή ταχύτητα u όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο ένταση $E=V/l$. Στο φορτίο q θα ασκηθεί δύναμη

$$F = Eq = fu \Leftrightarrow Vq/l = fu \Leftrightarrow u = Vq/fl \Leftrightarrow u = \alpha V$$

Γίνεται έτσι φανερό ότι η ταχύτητα u του σωματιδίου είναι ανάλογη της διαφοράς δυναμικού V που εφαρμόζουμε για να δημιουργηθεί το πεδίο.

Η ταχύτητα μεταφοράς σε ένα μέσο με συντελεστή τριβής, ενός φορτισμένου μορίου, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου έντασης εξαρτάται από :

1. Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (V/cm)
2. Το καθαρό φορτίο του μορίου
3. Το μέγεθος και το σχήμα του μορίου
4. Το ιξώδες, την ιοντική ισχύ και τη θερμοκρασία του μέσου ηλεκτροφόρησης

Είδη πηκτωμάτων

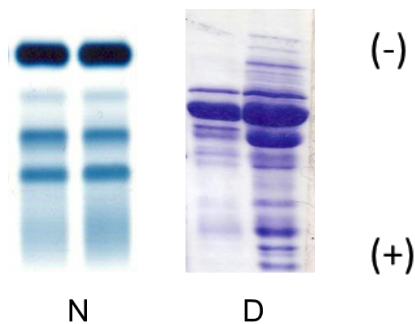
Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης είναι κυρίως η αγαρόζη και το πολυακρυλαμίδιο.

1. Τα πηκτώματα αγαρόζης (agarose gels) χρησιμοποιούνται τόσο ερευνητικά όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς για τη μελέτη πρωτεϊνών, ενζύμων και νουκλεϊκών οξέων
2. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου (πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο) χρησιμοποιούνται ερευνητικά για τη μελέτη κυρίως πρωτεϊνών και δευτερευόντως νουκλεϊκών οξέων.

Είδη ηλεκτροφόρησης

Οι πιο διαδεδομένοι τύποι ηλεκτροφόρησης ανάλογα με τον τρόπο διαχωρισμού των πρωτεϊνών, είναι η ουδέτερη και η αποδιατακτική. Η ισοεστίαση είναι πολύ εξειδικευμένη.

1. Η **ουδέτερη** (neutral) ηλεκτροφόρηση, όπου ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με το **φορτίο** των μορίων.
2. Η **αποδιατακτική** (denaturing) ηλεκτροφόρηση κατά την οποία ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με το μοριακό βάρος. Στην περίπτωση αυτή γίνεται πρώτα αποδιάταξη των πρωτεϊνών με ανιοντικό απορρυπαντικό (SDS), ώστε να χάσουν τις ανώτερες δομές τους και να αποκτήσουν όλες **αρνητικό φορτίο**. Έτσι, τα πρωτεϊνικά μόρια αποκτούν διαφορετική κινητικότητα που οφείλεται μόνο στο διαφορετικό μέγεθος και τα μόρια με μικρό μοριακό βάρος μετακινούνται πιο γρήγορα προς την άνοδο (θετικός πόλος).



Εικόνα 1. Συγκριτική ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών του ορού. **N:** ουδέτερη ηλεκτροφόρηση, δείγμα εις διπλούν, σε ποσότητα 10 μl και **D:** αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, το ίδιο δείγμα σε ποσότητες 5 και 10 μl

3. Η **ισοεστίαση** (isoelectric focusing), όπου ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με το **ισοηλεκτρικό σημείο** των πρωτεϊνών. Εδώ χρησιμοποιείται ένα πήκτωμα στο οποίο έχει δημιουργηθεί μια κλίση pH με τη χρήση αμφολυτών. Όταν μια πρωτεΐνη φτάσει σε εκείνο το pH όπου είναι το ισοηλεκτρικό της σημείο (συνολικό φορτίο $q=0$), ακινητοποιείται.

Η ουδέτερη και η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται τόσο ερευνητικά όσο και διαγνωστικά. Η ισοεστίαση χρησιμοποιείται μόνο σε ερευνητικά εργαστήρια και κυρίως σε αυτά που ασχολούνται με πρωτεϊνωμική ανάλυση (proteomics). Εδώ χρησιμοποιείται ηλεκτροφορητική ανάλυση δύο διαστάσεων (2D electrophoresis) όπου η πρώτη ανάλυση (διάσταση) γίνεται με ισοεστίαση και η δεύτερη με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

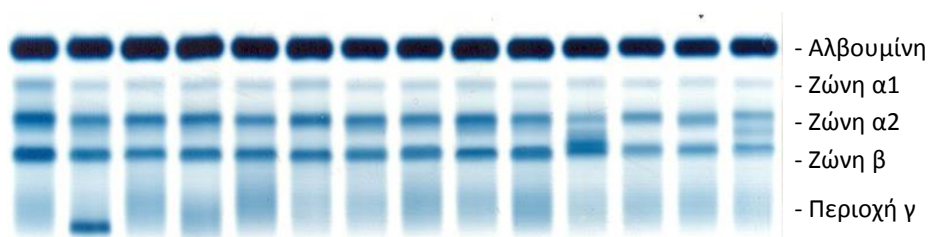
Για την ηλεκτροφορητική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο πηκτώματα αγαρόζης, σε διάφορες περιεκτικότητες, ανάλογα με το μέγεθος των προς ανάλυση μορίων. Σε περιπτώσεις όπου η ανάλυση απαιτεί ευαισθησία ακόμα κι ενός ζεύγους βάσεων χρησιμοποιούνται πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Στις ηλεκτροφορήσεις για διαγνωστικούς σκοπούς, χρησιμοποιούνται πηκτώματα αгарόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις ανάλογα με το είδος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ηλεκτροφορητικές αναλύσεις πρωτεϊνών αφορούν τις πρωτεΐνες του ορού και των αιμοσφαιρινών.

Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών του ορού

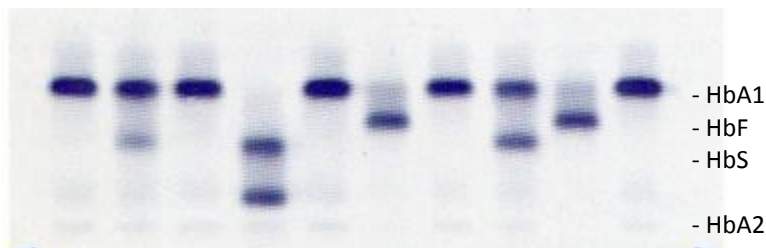
Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών του ορού διενεργείται για τη διερεύνηση λοιμώξεων και δυσλειτουργία οργάνων.



Εικόνα 2. Ουδέτερη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού.

Ηλεκτροφορητική ανάλυση αιμοσφαιρινών

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των αιμοσφαιρινών χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των διαφόρων κατηγοριών αιμοσφαιρινών για να διαγνωστούν διάφοροι τύποι αιμοσφαιρινοπαθειών.

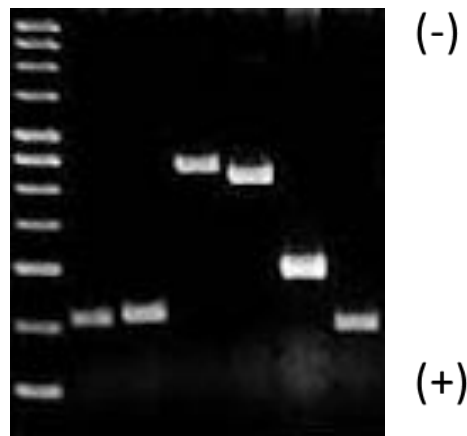


Εικόνα 3. Ουδέτερη ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρινών.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα **νουκλεϊκά οξέα** όταν βρίσκονται σε ένα διάλυμα έχουν **αρνητικό φορτίο**, γιατί οι φωσφορικές ομάδες τους είναι ιοντισμένες. Έτσι όταν βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων που αποτελούνται από μεγάλες αλυσίδες (κλώνους) έχουν σχεδόν ίδιο λόγο **φορτίο/μάζα**, ανεξάρτητα από το μήκος τους,

γιατί κάθε νουκλεοτίδιο συμβάλλει με το ίδιο περίπου φορτίο και μάζα. Η ανάλυση των νουκλεϊκών μορίων γίνεται κατά κύριο λόγο σε πήκτώματα αγαρόζης και ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το μήκος της αλυσίδας τους. Το μέγεθος των πόρων ενός πήκτωματος εξαρτάται από την περιεκτικότητα της αγαρόζης σε αυτά και είναι ο μόνος περιοριστικός παράγοντας για τη σχετική μετακίνηση των μορίων κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση. Τα μικρότερα μόρια περνούν πιο εύκολα μέσα από τους πόρους του πήκτωματος άρα μετακινούνται γρηγορότερα, ενώ τα μεγαλύτερα μετακινούνται πιο αργά.



Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα μόρια με μικρότερο μήκος έχουν μετακινηθεί προς την άνοδο (θετικός πόλος) ενώ αυτά με μεγαλύτερο μήκος έχουν μετακινηθεί λιγότερο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Τροφοδοτικό συνεχούς ρεύματος

Φούρνος μικροκυμάτων

Κωνική φιάλη

Ζυγός

Αντιδραστήρια

Αγαρόζη

Διάλυμα TAE (40 mM Tris-οξικό, pH 7,8 - 2 mM EDTA)

Δείγματα χρωστικών

Ηλεκτροφόρηση – Πορεία

- Ζυγίστε 0,5 gr αγαρόζη
- Προσθέστε σε μια κωνική φιάλη με 50 ml διάλυμα TAE την αγαρόζη
- Τοποθετείστε τη φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 περίπου λεπτό
- Όταν το διάλυμα αρχίζει να βράζει και γίνει διαυγές ψύξτε την κωνική σε τρεχούμενο νερό βρύσης μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία ανεκτή στο δέρμα (37°C)
- Χύστε την υγρή αγαρόζη στην πλάκα ηλεκτροφόρησης, σε ένα πάχος 4-5 mm.
- Τοποθετείστε το χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις εναπόθεσης (πηγαδάκια) των δειγμάτων.
- Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα (~ 30 min) αφαιρέστε το χτενάκι.
- Τοποθετείστε το πήκτωμα με τη βάση του στο δοχείο ηλεκτροφόρησης και προσθέστε διάλυμα TAE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα.
- Τοποθετείστε τα δείγματα μέσα στα πηγαδάκια, με τη βοήθεια πιπέτας.
- Συνδέστε το τροφοδοτικό και ηλεκτροφορήστε στα 30 V.
- Παρατηρήστε τη μετακίνηση των δειγμάτων και το διαχωρισμό τους σε επιμέρους χρωστικές.