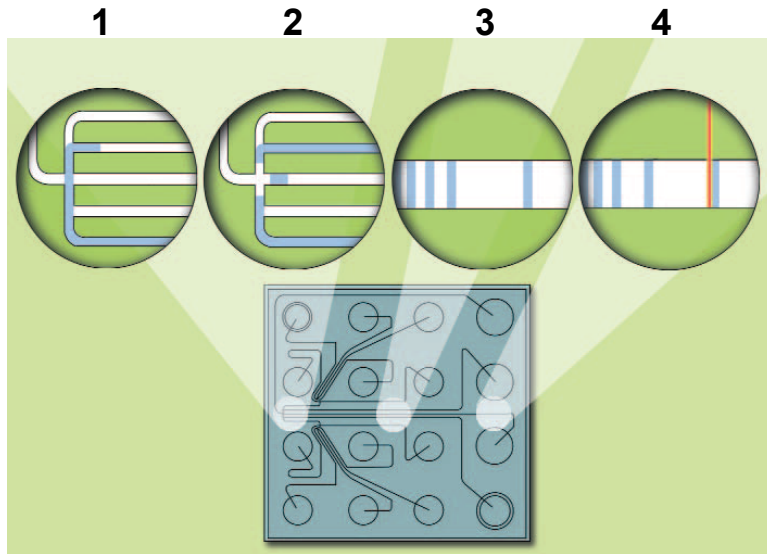


Elettroforesi su Chip

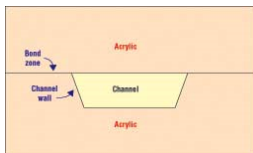
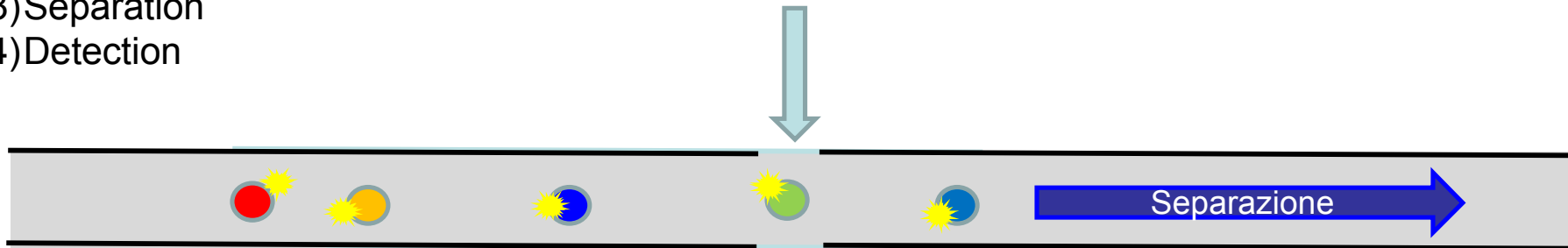


Elettroforesi condotta su **Chip**, dove sia le linee di trasferimento del campione (fluidica) che i gel per la separazione del campione sono costituiti/collocati in **microcanali** incisi su di un supporto di vetro.

- Principio separativo: simile ad una **SDS PAGE**: (detergente che conferisce m/z uguale a tutte le proteine e separazione che avviene per effetto setaccio in una matrice costituita da un gel di poliacrilamide)
- Rilevamento: **Spettrofluorimetrico** in linea: Molecole legate (o derivatizzate con) da dei fluorofori. Il rilevamento della fluorescenza avviene in linea durante il processo separativo.

- 1) Sample delivery
- 2) Sample injection
- 3) Separation
- 4) Detection

ECCITAZIONE



Sezione di un microcanale
Larghezza: ca 50-200 μm
Profondità: ca 0-100 μm

EMISSIONE

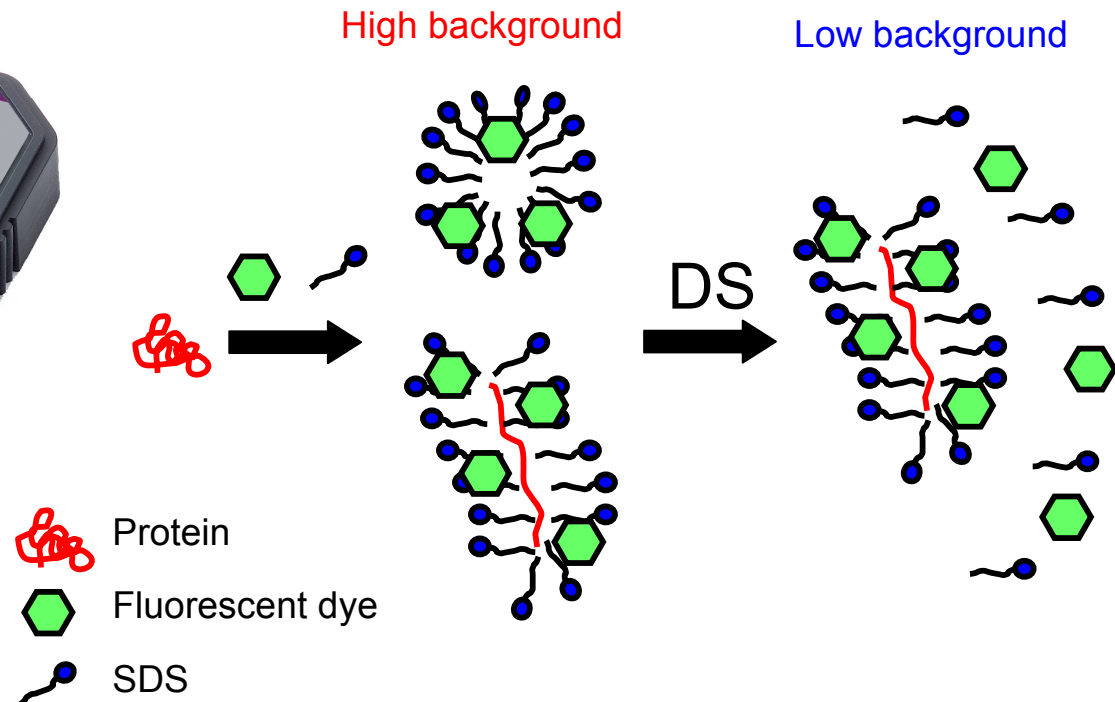
Bioanalyzer: protein chip

1-10: samples

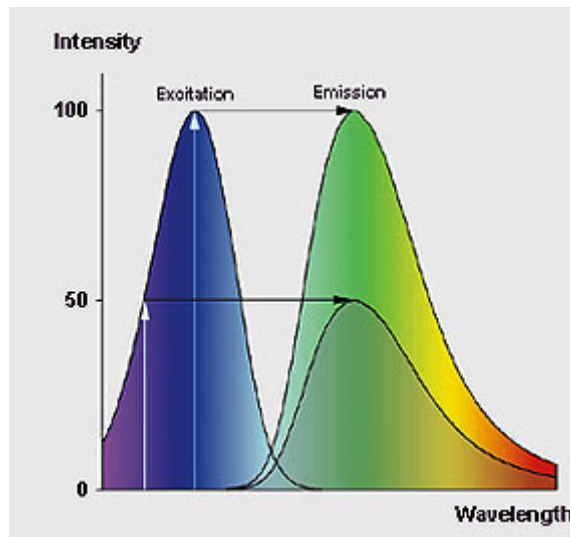
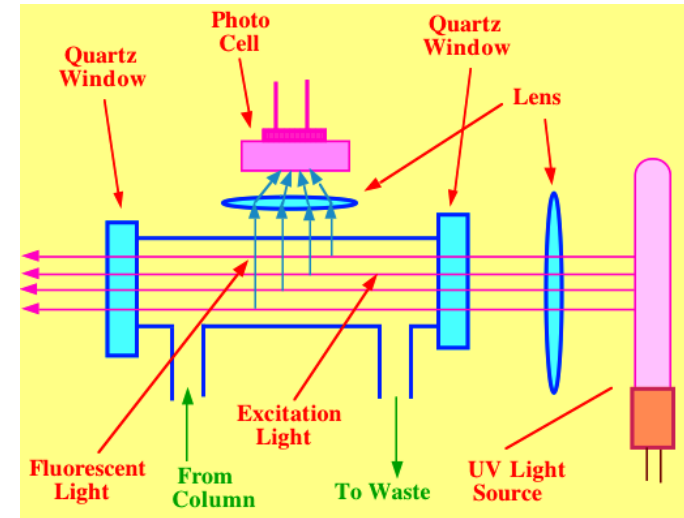
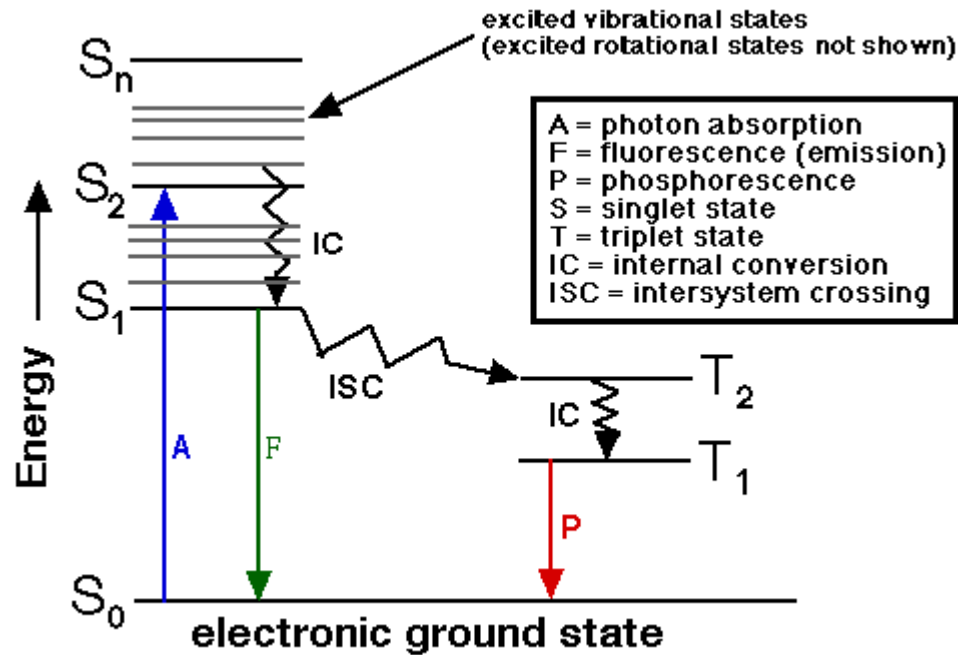
Ladder: molecular weight marker

G: polymer + dye solution (Dye intercalates in SDS micelles (with or without proteins)). The polymer is not an acrylamide/bis-acrylamide solution.

DS: Destaining solution - disrupt SDS micelles not containing proteins (higher Signal/Noise) - Samples is diluted under the critical SDS micellar concentration.



Elettroforesi su Chip – Rilevamento mediante spettrofluorimetria



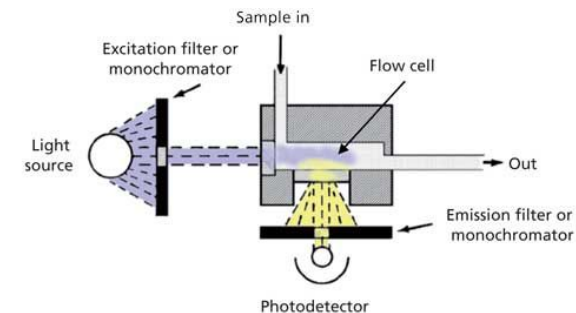
Geometria del **detector a fluorescenza**:

La radiazione emessa viene rilevata perpendicolarmente rispetto alla radiazione incidente. Minimizza fondo.

Nel detector MWF, è possibile scegliere la lunghezza d'onda della radiazione eccitante e quella della radiazione emessa (fluorescenza) tramite utilizzo di monocromatori o filtri.

Caratteristiche di un detector a fluorescenza:

Sensibile
Specifico



NB: la cella di rilevamento per sistemi on-line deve essere commisurata ai flussi utilizzati per non portare a fenomeni di perdita di risoluzione per rimescolamento delle molecole.

Le proteine possono anche essere derivatizzate con fluorofori - Compatibilità

Table 5 Compatibility List for the Labeling Reaction

Low Impact: 50% - 150% signal compared to 1xSLB*

- 30 mM Tris-HCl, pH 8.5 (Standard Labeling Buffer, 1xSLB[†]).
- 100 mM Sodiumbicarbonate[†] pH 9.0
- 1xSLB, 7 M Urea, 2 M Thiourea (Urea/Thiourea Buffer[†])

- 1xSLB with 0.1 mM DTT
- 1xSLB with 1.0 mM DTT
- 1xSLB with 20 mM EDTA
- 1xSLB, 0.04% Sodiumazide
- 1xSLB, 1% CHAPS
- 1xSLB, 1% Triton
- 1xSLB, 1% Tween
- 100 mM Tris-HCl, pH 8.5
- 1xSLB + PBS (30 mM Tris-HCl, 26 mM NaH₂PO₄, 41 mM Na₂HPO₄, 79 mM NaCl) pH 8.5
- 50 mM HEPES, pH 8.0
- 30 mM Tris-HCl, 1.25 M NaCl, pH 9.0
- 30 mM Tris-HCl, 30% Glycerol, pH 8.3
- 30 mM Tris-HCl, 0.9 M KCl, pH 9
- 30 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, pH 8.3

Medium Impact: 10% - 50% signal compared to 1xSLB[†]

- 1xSLB with 10 mM DTT
- 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Glutathion, pH 8.5
- 1xSLB, 1% SDS, pH 8.7
- 30 mM Tris-HCl, pH 7.3

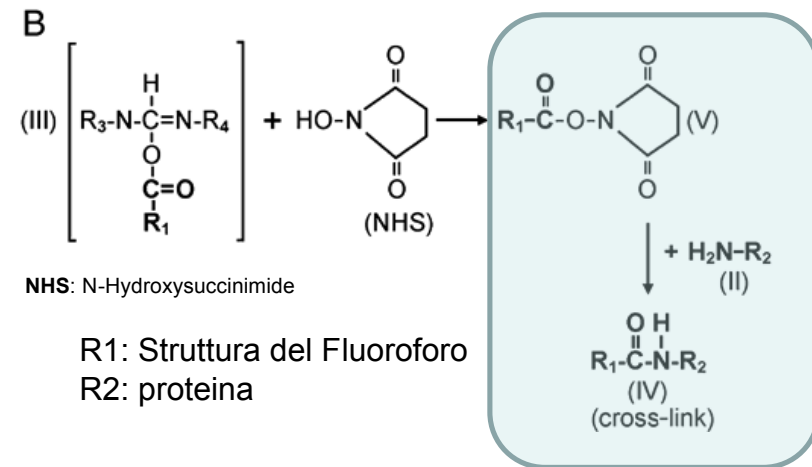
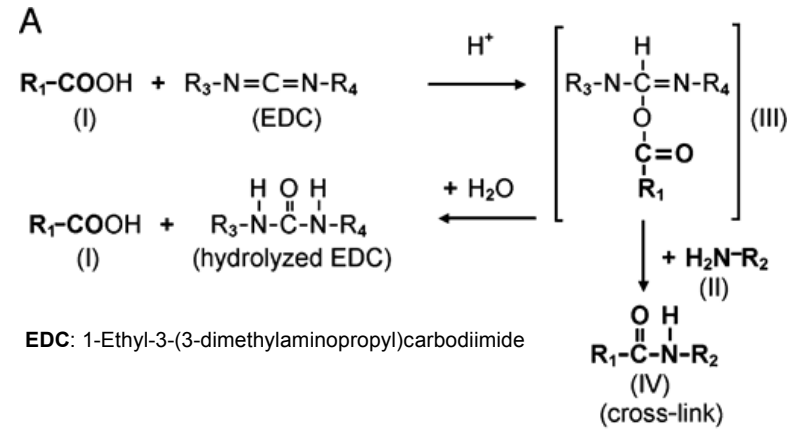
Strong Impact: < 10% signal compared to 1xSLB[†]

- 100 mM Glycine/NaOH, pH 9
- 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 9

* These are recommended buffers for the labeling reaction.

Per poter essere rilevate le molecole proteiche devono essere derivatizzate con opportuni fluorofori:

Processo di derivatizzazione (analogo a quello visto per la DIGE)




 Fluoroforo "reattivo"

Elettroforesi Capillare (CE)

5 principali metodiche:

- a) Capillary zone electrophoresis*
- b) Micellar electrokinetic capillary chromatography
- c) Capillary gel electrophoresis*
- d) Isotachopheresis
- e) Isoelectric focusing

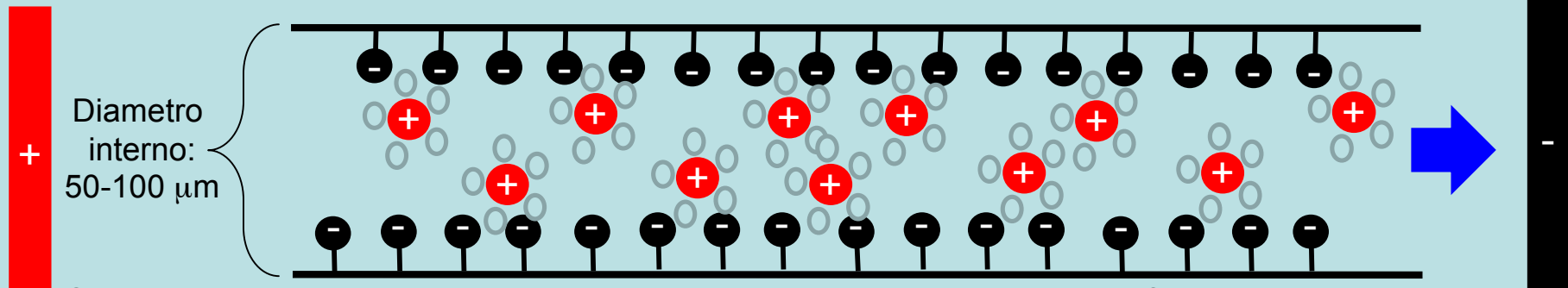
Prima caratteristica:

Dissipamento del calore molto efficiente grazie all'elevato rapporto superficie/volume

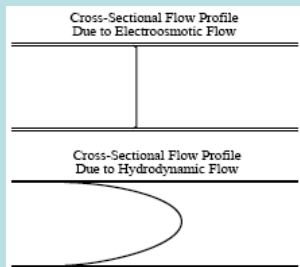
=>

Moti convettivi ridotti al minimo

Seconda caratteristica: Flusso elettroosmotico



Capillare di silice: a pH basici, gruppi silanologici dissociati => carica negativa fissa immobilizzata sulla superficie del capillare. Controioni con sfera d'idratazione si muovono verso l'elettrodo di segno opposto al loro => sviluppo di un flusso.



Elettrosmotico

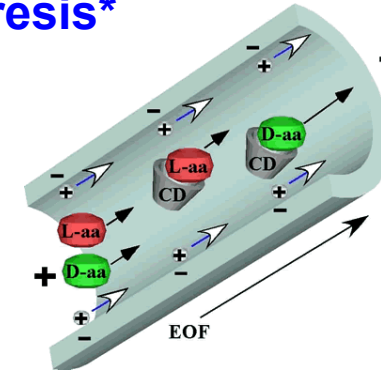
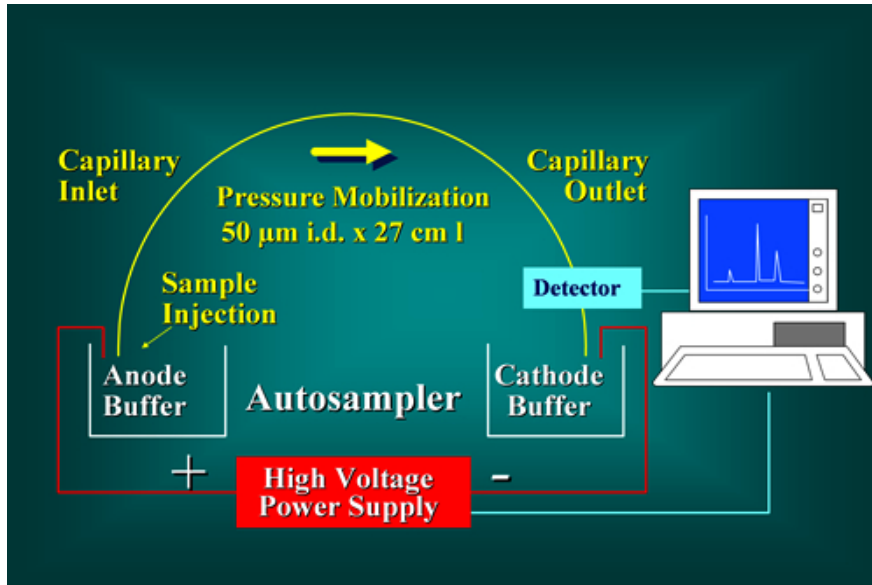
Idrodinamico

La caratteristica di un flusso elettroosmotico è quella di avere un **profilo sostanzialmente piatto** rispetto a quello di un flusso idrodinamico, in cui le molecole vicino alle pareti si muovono più lentamente rispetto a quelle centrali per effetto dell'attrito

=>

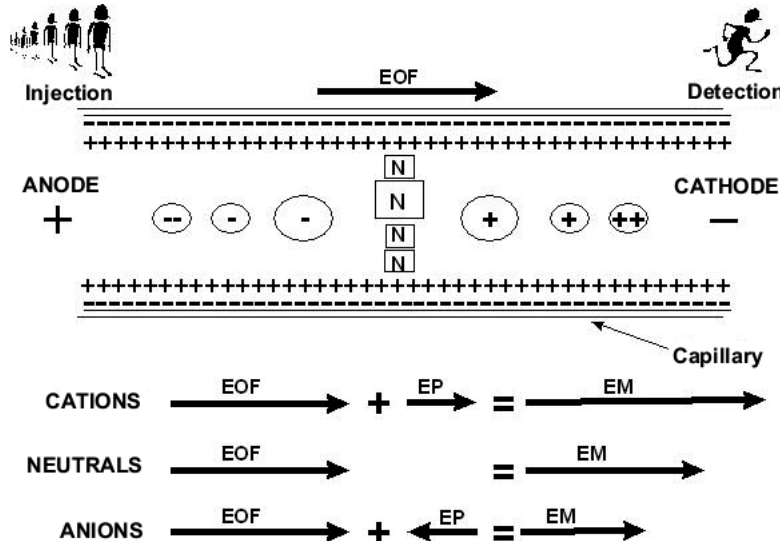
Dispersione molto minore, ovvero poco impatto sulla risoluzione

Capillary zone electrophoresis*



Rilevamento: in linea mediante detector ad assorbanza (UV-VIS) o a fluorescenza. (Silice è trasparente nello spettro UV-VIS). Sistema simile a quello considerato per le Chip-elettroforesi o per la cromatografia

Comportamento di molecole cariche positivamente (+), negativamente (-) o neutre (N) in presenza di EOF



Tre condizioni di pH in cui puo esser condotta una elettroforesi

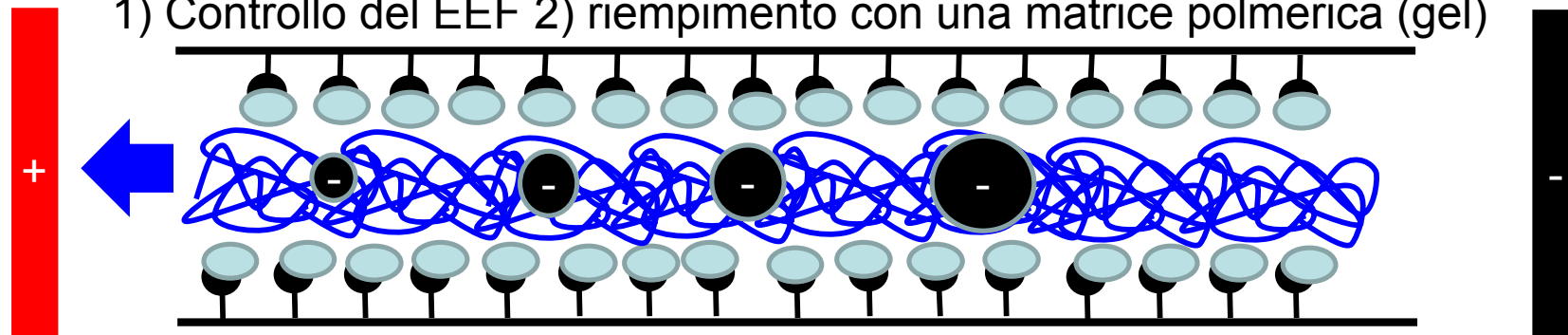
a) **pH basico** => **Flusso elettroosmotico elevato**. Trasportate verso il catodo sia le molecole cariche positivamente che quelle negativamente e neutre.

b) **pH acido** => **riduzione/annullamento del flusso elettroosmotico**. Solo molecole con carica positiva verso il catodo. Se le molecole d'interesse sono negative allora necessario invertire la polarità per far passare le molecole davanti al detector.

c) **coating** (rivestimento della parete) => **eliminazione della carica**. Molecole che si muovono solo esclusivamente grazie alla loro carica.

Capillary gel electrophoresis*

1) Controllo del EOF 2) riempimento con una matrice polimerica (gel)



Stessi principi separativi di normali analisi elettroforetiche con il vantaggio del fatto che la rilevazione avviene in linea e che le tempistiche sono solitamente molto più ridotte. Spesso vengono condotte in modalità SDS-PAGE.

Caricamento del campione in CE

Mediante variazione di pressione

Il campione viene introdotto nel capillare attraverso una variazione di pressione per un prestabilito periodo di tempo. Si applica una depressione all'estremità opposta rispetto a dove si trova l'estremità immersa nel campione e il campione in questo modo viene "risucchiato" all'interno del capillare. Non può essere applicata se il capillare è riempito con una matrice.

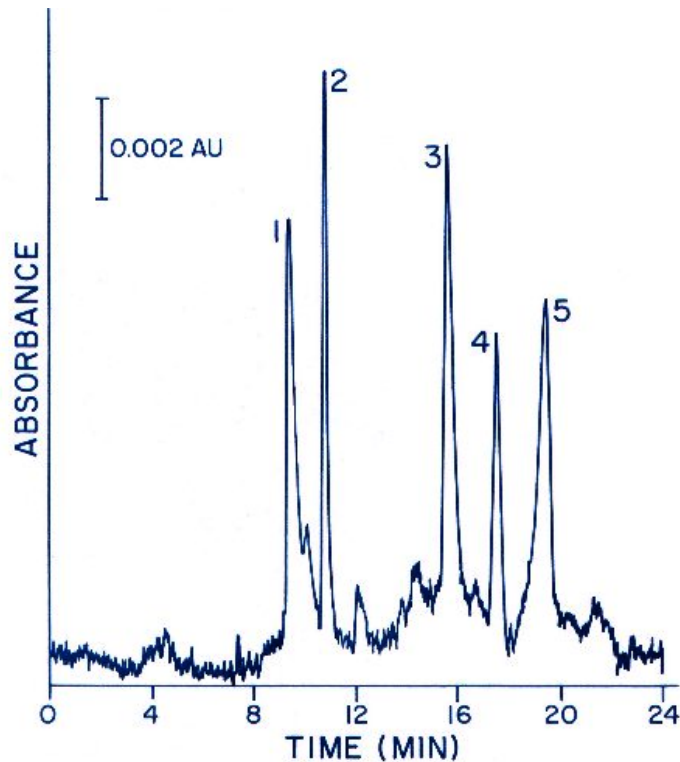
Elettrocinetico

Il campione viene introdotto nel capillare mediante l'applicazione di una differenza di potenziale per un prestabilito periodo di tempo. Attenzione al fatto che (i) molecole con una mobilità elettroforetica maggiore verranno "caricate" in modo preferenziale rispetto a quelle con una mobilità elettroforetica minore e che (ii) la scelta del tampone in cui è sciolto il campione è fondamentale per avere un efficiente caricamento (deve fornire un'elevata resistenza (bassa conducibilità) in modo da avere una forte caduta di potenziale rispetto al liquido contenuto nel capillare.

Capillary electrophoresis - alcuni esempi -

CZE su capillare rivestito

Il grafico ottenuto è chiamato **elettroferogramma** e riporta in ascissa il tempo e in ordinata l'assorbanza o la fluorescenza

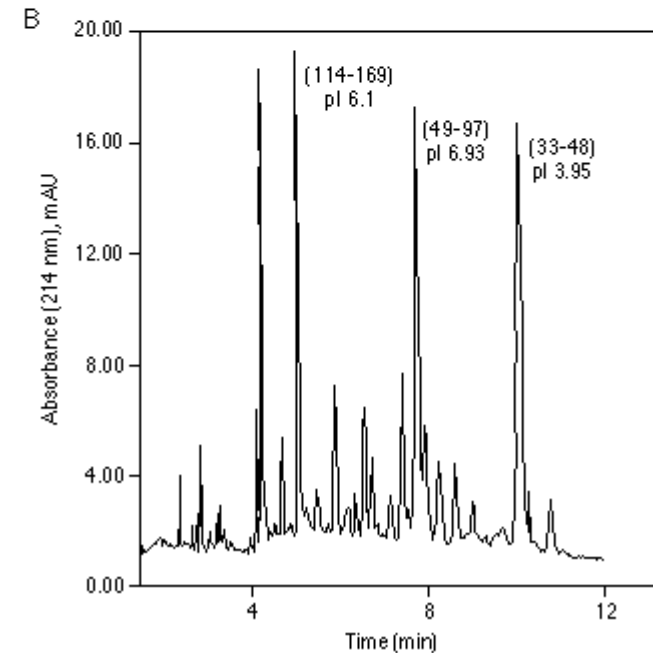


Separation of five middle pI proteins at neutral pH
Conditions: 60 cm x 50 mm ID Baulo Neutral-01, capillary (42 cm separation length), 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, 300 V/cm, 17 mA. Peaks: 1. trypsinogen, 2. myoglobin, 3. conalbumin, 4. carbonic anhydrase, 5. amylase.

NB: 60 cm x 300 V/cm => 18000 V (ddp)

Notare il tempo in cui è avvenuta la separazione!!!!

Ottimo per effettuare delle valutazioni quantitative in brevi tempi.



Separation of tryptic peptides