

NOTE DE CURS

Electroforeza capilară

Capillary electrophoresis

Ileana Funduc *

Rezumat

Electroforeza capilară este o tehnică mai nouă care combină mecanismele de separare ale electroforezei cu aparatura și automatizarea cromatografiei. Există numeroase variante de electroforeză capilară care soluționează diversele probleme de separare. Acestea includ electroforeza zonală, electroforeza pe gel, focalizare izoelectrică și izotacoforeza. Puterea extraordinară de separare, viteza analizelor și sensibilitatea extremă (o singură moleculă prin detectarea cu fluorescență indusă cu laser) conduc la aplicarea intensivă a electroforezei capilare de către multe dintre cele mai bune laboratoare de cercetare analitică din lume.

Electroforeza capilară, fiind modalitatea cea mai potrivită și eficientă de a separa moleculele încărcate mari și mici, oferă o largă varietate de aplicații privind analiza lichidelor biologice umane.

Cuvinte cheie: electroforeză capilară, proteine serice, proteine monoclonale.

Abstract

Capillary electrophoresis is a newer technique which combines separation mechanisms of electrophoresis with the instrumentation and automation concepts of chromatography. There are many variants of capillary electrophoresis which solve different separation problems. These include free zone electrophoresis, gels for sieving and molecular weight based separations, isoelectric focusing, and isotachopheresis. The extraordinary separation power, speed of analysis and extreme sensitivity (a single molecule using laser induced fluorescence detection) are leading to intensive application of capillary electrophoresis by many of the best analytical research laboratories around the world.

Being the most appropriate and efficient way to resolve both large and small charged molecules, capillary electrophoresis offers a wide variety of applications on the analysis of human body fluids.

Keywords: capillary electrophoresis, serum proteins, monoclonal proteins

* **Adresa pentru corespondență:** Ileana Funduc, Barajul Uzului 2, Bl. Y16, Sc. A, Apt. 18, Sector 3, 032796, București
Tel.: 021 3407668, Mobil: 0724 210670, E-mail: fmzg@xnet.ro

Introducere

Electroforeza capilară s-a născut din combinarea mecanismelor de separare ale electroforezei cu aparatura și automatizarea cromatografiei.

Istoric

În 1967, Hjerten aplică electroforeza în tub deschis cu diametrul intern de mm.

Virtanen utilizează capilare de sticlă cu diametrul intern de 200 μm .

Mikkers folosește capilare de teflon.

În 1980-81 Jorgenson și Lukacs au separat peptide în capilare de sticlă cu diametrul intern de 75 μm . Datorită limitării transmisiei luminii prin sticlă s-a folosit detectarea prin fluorescență. Acest format de capilar, capabil de a suferi efectul Joule, care apare în toate separările electroforetice și degradează rezoluția, conduce la disiparea căldurii. Autorii folosesc volaje mult mai mari (peste 30kV) față de cele an-

terioare, astfel scurtându-se timpul de analiză.

Ulterior, capilarele de sticlă au fost înlocuite cu cele de silice căptușite cu poliimidă, care sunt mult mai robuste și, mai important, transmit lumina UV.

Aparatură

Instalația implică un capilar ce trece prin instalația optică a unui detector, un dispozitiv de introducere a probei și o sursă de voltaj înalt¹ (Figura 1).

Capilarul umplut cu tampon are capetele introduse în rezervoarele de tampon. Electrozii fabricați dintr-un material inert (Pt) sunt introduși în tampon pentru a completa circuitul electric.

La un capăt al capilarului se injectează proba, apoi se aplică voltajul. Ionii probei se deplasează spre electrodul corespunzător, trecând prin detectorul ce răspunde cu o înregistrare a componenților separați în funcție de timp - respectiv cu o electroforegramă.

Noțiuni teoretice

Fluxul electroosmotic sau electroosmotic

Capilarul este fabricat din silice topită, a cărei suprafață interioară conține grupări silanol SiOH , care, în contact cu tamponul, se disociază în grupări SiO^- , imprimând peretelui capilar o sarcină negativă (Figura 2).

Când capilarul este umplut cu tampon, sarcinile sale pozitive sunt atrase de peretele încărcat negativ. Rezultă o diferență de potențial

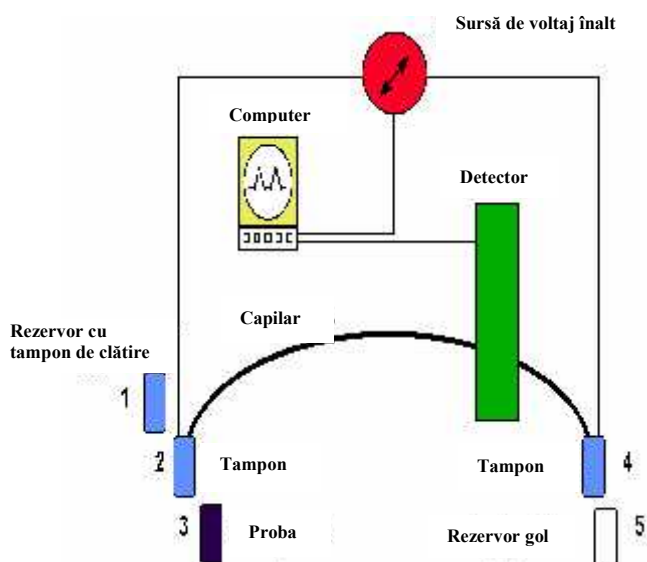


Figura 1. Schema principalelor componente ale unei instalații de electroforeză capilară¹

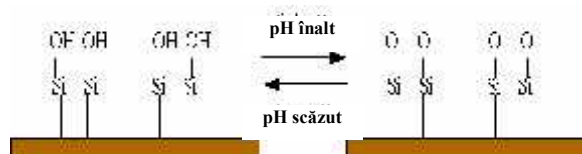


Figura 2. Deprotonarea grupărilor silanol de pe peretele capilarului¹

(potențial zeta) limitată la peretele capilar.

Aplicându-se voltajul de-a lungul capilarului, cationii din stratul difuz sunt liberi să migreze spre catod, transportând și masa de soluție după ei. Acest flux lichid, având încărcătura suprafeței peretelui interior al capilarului, ce se suprapune peste mobilitatea substanțelor de analizat, constituie fluxul electroosmotic sau electroosmotic.

Mobilitatea fluxului endosmotic este strâns legată de potențialul zeta, iar factorii ce îl influențează pe acesta din urmă evoluează în același sens și pentru primul parametru. Astfel, există o directă proporționalitate cu pH-ul (când acesta crește, potențialul zeta crește datorită încărcăturii suprafeței peretelui capilar, iar fluxul electroosmotic crește, de asemenea, datorită deprotonării grupărilor silanol) și o dependență inversă de punctul izoelectric a tamponului (când acesta crește, potențialul zeta scade datorită dublului strat ce se comprimă, fluxul electroosmotic reducându-se).

La moleculele mari (peptide, proteine) se poate ca reziduurile sau solvitul să fie adsorbite în întregime pe peretele capilar. Pentru a evita aceasta:

- se mărește concentrația tamponului;

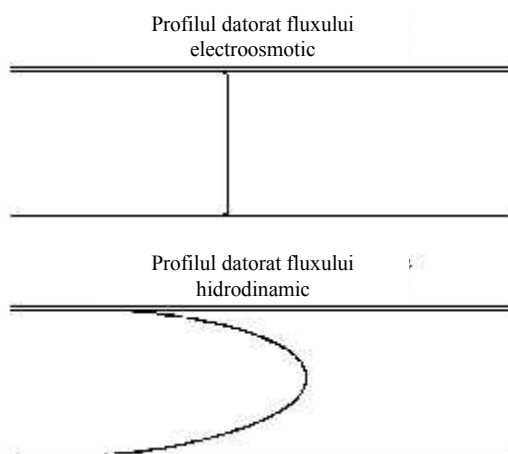


Figura 3. Profilul plat datorat fluxului electroosmotic și profilul parabolic datorat fluxului hidrodinamic¹

- se folosesc extremele de pH;
- se captează pereții capilarelor, eliminând sau inversând încărcătura lor sau se alterează hidrofobicitatea lor.

Fluxul electroosmotic determină o viteză constantă pe toată lungimea capilarului.

Profilul plat obținut în aceste condiții este superior celui obținut în cromatografia lichidă de înaltă performanță, unde proba este împinsă sub presiune în coloană. În cel din urmă caz, viteza soluției de la marginile coloanei este mai scăzută față de cea din mijlocul ei, aceasta conducând la un profil parabolic și la o lărgire a bazei peak-urilor (Figura 3).

Etapele analizei

Injectarea probei

Proba nu este mai mare de 100 nl (10-20 μl în HPLC), introducerea se face hidrodinamic sau electrocinetic.

Condițiile de separare

Capilarul este confecționat din silice topită, inert chimic, transparent pentru spectrul UV și vizibil, flexibil, robust și ieftin. Dimensiunile sale sunt :

- diametrul intern 20-200μm;
- lungime 10 cm, excepțional până la 100 cm.

Voltajul, câmpul electric și amperajul: V 10-30 kV; 100-500 V/cm; A până la 300μA.

Detecția

Absorbția în UV-vizibil este cea mai frecventă, se desfășoară în domeniul sub 200 nm până la vizibil. Timpul de răspuns trebuie să fie scurt (până la 0,5 s, pentru a evita peak-urile largi, distorsionate). Analitul, trecând prin sursa de lumină, absoarbe radiația UV, ce se transformă în semnal și evaluarea cantitativă se face prin calibrare.

Fluorescența clasică și cea indusă cu laser au ca avantaj limita de detectare extrem de joasă. Moleculele se marchează cu fluorofori ce sunt excitați de sursa de lumină. Analizii, trecând prin fereastra detectorului, determină excitația fluoroforilor ce emit radiații de o anumită

lungime de undă. În cazul fluoroforilor excitați de laser, sensibilitatea crește semnificativ. Din nefericire, prin laser se limitează lungimile de undă pentru excitație la un număr mic de valori în domeniul vizibil.

Spectrometria de masă, importantă prin sensibilitatea, selectivitatea și universalitatea sa, furnizează informații asupra greutății moleculare și a structurii solvitului – date utile identificării sale. Pentru a obține acestea, electroforeza capilară se cuplează cu ionizarea prin electropulverizare (ESI) și cu desorbția cu laser a matriței asistate (MALDI). Varianta mai modernă folosită în prezent este CE MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) la care limita de detectare a atins domeniul sub-nanomolar.

Tipurile de electroforeză capilară

Electroforeza capilară zonală este cea mai utilizată, datorită simplității și versatilității sale. Capilarul se umple cu tampon și solviții migrează în zone discrete, cu viteze diferite. Fluxul electroosmotic influențează timpul de migrare și rezoluția.

Electroforeza capilară în gel

Termenul de “gel” nu este foarte potrivit, acesta implicând o structură oarecum solidă. Ori, multe din “gelurile” folosite nu posedă această proprietate; un termen mai potrivit ar fi “rețea de polimer”.

Deși există o identitate a mecanismului de separare capilar cu cel al electroforezei clasice în gel, câmpul electric folosit în primul caz este de 10-100 ori mai intens și aparatura este automată. Posibilitatea în electroforeza clasică de a separa concomitent mai multe probe este compensată în electroforeză capilară în gel cu timpul scurt necesar separării unei singure probe.

Focalizarea capilară izoelectrică

Moleculele au și grupări acide și bazice. La un anumit pH (punct izoelectric), încărcătura lor electrică se echilibrează și ele devin

neutre. Gradientul de pH se formează cu ajutorul unei soluții de amfoliți, ce posedă și grupare acidă și bazică și un punct izoelectric de-a lungul unui domeniu larg. Când se aplică câmpul electric, amfoliții formează un gradient de pH, analiții migrează prin mediu, până ajung într-o zonă când devin neîncărcați atingând propriul lor punct izoelectric. Pentru a detecta substanțele separate, zonele sunt mobilizate (prin aplicarea unei presiuni capilarului sau adăugarea unei sări la unul din rezervoare) și trec prin detector, care îi înregistrează în funcție de timp.

Izotacoforeza capilară

Izotacoforeza capilară analizează fie anioni, fie cationi. Toate zonele separate se deplasează cu aceeași viteză, folosind două sisteme tampon: în frunte un electrolit cu un ion de mobilitate mai mare ca a solviților, în urmă un electrolit cu o mobilitate mai mică față de a lor.

Aplicații clinice³

Proteine serice

Electroforeza capilară a proteinelor serice a devenit o modalitate standard pentru studiul lor. Nu se folosește un colorant care implică afinitatea diferită după tip pentru fracțiunile electroforetice, posibila colorare incompletă, dependența de concentrația și vechimea reactivului, nu se întârzie cu timpii de colorare, de decolorare și de scanare.

Electroforeza normală⁶ în 7 minute separă, într-un traseu mai larg decât în cazul agarozei, mai multe fracțiuni, cu detectarea prealbuminei sau a globulinei transportoare a hormonilor tiroidieni, transferinei, complementului. Pe acest tip de traseu se evită confundarea componentilor mici din regiunea β cu transferina sau cu β lipoproteina ce se află între zonele α_2 și β globulinice (Figura 4). De asemenea, spre deosebire de agaroză, care uneori nu permite migrarea de pe start a moleculelor mari, acestea constituind un artefact, electroforeza capilară include acele “poteine pe start” în zona γ , în felul acesta ele putând fi evaluate.

Separarea componentului monoclonal^{2,4} prin electroforeză capilară este net superioară față de cea pe agaroză (Figura 5).

Evaluarea sa se face făcând să reacționeze serul cu cei 5 anticorpi de lanțuri grele și ușoare și comparând electroforeza înainte și după tratament. Tiparea componentului monoclonal rezultă prin dispariția peak-ului caracteristic lanțului greu și ușor datorită cuplării anticorpului corespunzător cu proteina specifică.

Detectarea componentelor monoclonali este total automatizată și rezultatele se pot stoca. Limitele de detecție sunt de 0,5-0,75 g/l.

Lipoproteine

Electroforeza capilară permite obținerea a 9 fracțiuni.

Hemoglobină

Prin focalizare izoelectrică capilară se

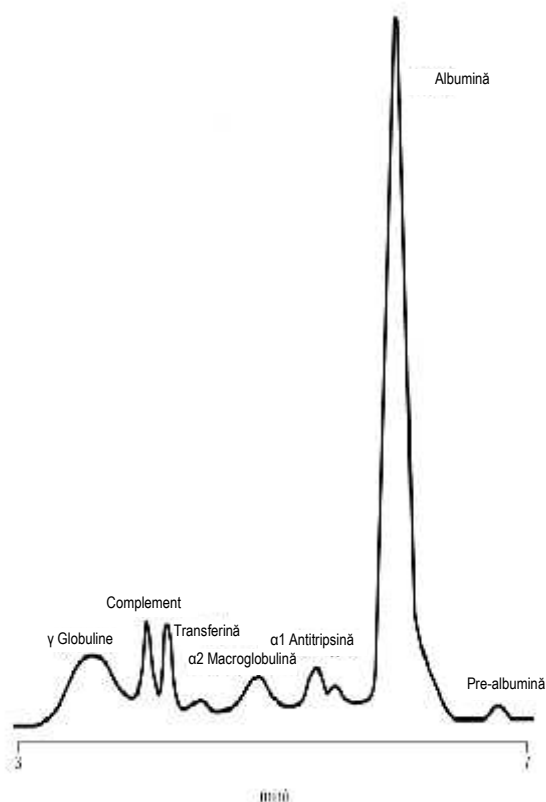


Figura 4. Electroforeza capilară zonală a unui ser normal⁶

pot separa următoarele fracțiuni: A, F, D, S, E, A2.

Proteinele urinare^{4,5} se pot separa prin electroforeză capilară din urină neconcentrată sau concentrată de 200 ori, această determinare fiind de ajutor în diagnosticarea sindromului nefrotic și la detectarea proteinelor Bence Jones (Figura 6).

În lichidul cefalorahidian se pot separa β_2 -microglobulina, mielina bazică, proteinele în urme din zona β (2 peak-uri majore – ce arată alterări ale sistemului nervos central) și din zona γ ; bandarea oligoclonală este marker în scleroza multiplă.

În lichidul sinovial se separă α_1 -glucoproteina acidă (orosomucoid) care arată prezența glicoformelor.

Extrakte celulare din probe celulare foarte mici

Se marchează extractul de celule HT 29

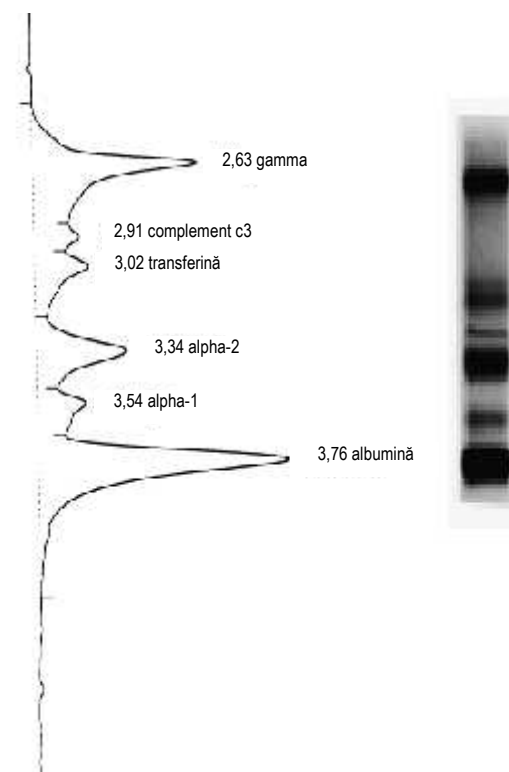


Figura 5. Electroforeza capilară într-o gammapatie monoclonală⁴

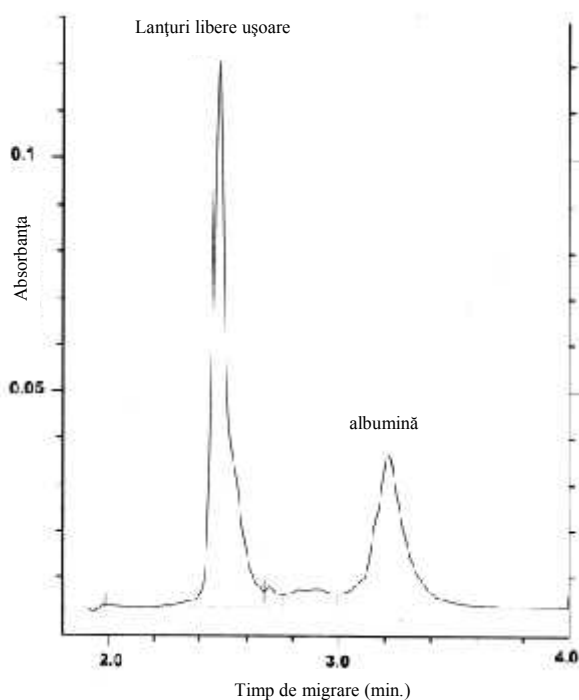


Figura 6. Electroforeza capilară urinară a lanțurilor ușoare libere (proteine Bence – Jones) ⁴

adenocarcinomatoase și volumul a 2,5 celule se analizează în 12 minute. De asemenea, electroforeza capilară se aplică în studii legate de eritropoetină, interleukina 3 și 6 și alte citokine.

Analiza unei celule sau molecule constituie una din cele mai spectaculoase arii în care electroforeza capilară și-a dovedit utilitatea.

Analiza unei celule ridică probleme:

- s-a selectat celula tipică din amestecul de celule ?
- câte celule trebuie măsurate pentru a aprecia variația naturală?

Totuși, există variații mici între celule în ceea ce privește concentrația multor metaboliți (sub 1mmol/l); volumul mic al celulei este suficient însă ca probă pentru electroforeza capilară.

În 1990, Ewing și colaboratorii au separat serotonina și neurotransmițătorii înrudiți dintr-un neutron.

În 1992, Yeung și colaboratorii au se-

parat Hb, anhidraza arbonică și HbA_{1c} dintr-un eritrocit.

Au mai fost separate prin electroforeza capilară lactatul și piruvatul dintr-un eritrocit și catecolaminele din celulele cromafine ale glandei suprarenale.

În 1994 au fost separate izoenzimele LDH dintr-un eritrocit uman, subliniindu-se variabilitatea intracelulară a izoenzimelor.

Biologie moleculară

În 1990 Brownlee și colaboratorii au efectuat analiza fragmentelor de restricție ADN și a produșilor PCR pentru detectarea HIV-1 din sânge. De asemenea, electroforeza capilară a avut un aport în tipizarea virusurilor hepatitic C și poliomielitice.

În 1994, Righetti și colaboratorii au folosit electroforeza capilară asociată cu PCR pentru diagnosticul bolilor genetice (fibroza chistică, boala Kennedy, hiperplazia adrenal congenitală, sindromul Down).

În 1998 s-a realizat un microdispozitiv de analiză ADN pentru integrarea funcțională a electroforezei capilare cu PCR.

Concluzii

Electroforeza capilară utilizează cantități minime de probă, este cantitativă, automată și de aceea are un domeniu larg de aplicare. Cea mai importantă trăsătură a sa este faptul că are posibilitatea de a se cupla cu tehnici complementare de separare pentru a identifica proteine din sisteme biologice complexe și a elucida aspecte legate de structura și funcția fiecărei proteine separate. Faptul că necesită probe extrem de mici este considerată un instrument de explorare al chimiei spațiilor mici, dintre care un exemplu ar fi celula însăși.

Electroforeza capilară constituie un important pilon al evoluției viitoare a biochimiei moderne.

Bibliografie

1. Altria K.D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.*, 1999; 856: 443-463
2. Bossuyt X., Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis, *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41(6): 762-772
3. Dolnik V. Recent developments in capillary zone electrophoresis of proteins, *Electrophoresis* 1999; 20: 3106-3115
4. Henskens Y.M.C., van Diejen-Visser M.P. Capillary zone electrophoresis as a tool to detect proteins in body fluids: reproducibility, comparison with conventional methods and a review of the literature, *Ned Tijdschr. Klin. Chem* 2000; 25: 219-229.
5. Kolios G., Bairaktari E, Tsolas O. et al. Routine Differential Diagnosis of Proteinurias by Capillary Electrophoresis, *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001; 39(9): 784-88
6. Perrett D. Capillary electrophoresis in clinical chemistry, *Ann. Clin. Biochem.* 1999; 36: 133-150