Электрофорез есть движение заряженных электрических частиц в электрическом поле.

1791 г. М. Фарадей сформулировал основные законы электролиза. Он ввел такие понятия, как анод и катод

1897 г. Ф. Кольрауш дал первое теоретическое обоснование поведению движущихся в электрическом поле частиц

1926 г. Т. Сведберг “благословил” **А. Тизелиуса** на работы по электрофорезу.

1930 г. А. Тизелиус представил докторскую диссертацию по белковому электрофорезу. Так началась биологическая эра электрофореза.

Свободный электрофорез

Электрофорез в поддерживающей среде

↓

Двумерный форез в полиакриламидном геле

↓

Капиллярный электрофорез

↓

Капиллярная электрохроматография

Три способа получения структурной информации о частице, помещенной в электрическое поле

Первый способ основан на измерении ее транспортных свойств в постоянном электрическом поле.

Измеряемая величина -электрофоретическая подвижность.

Процесс аналогичен методу скоростной седиментации.

Второй способ основан на движении частицы через матрицу.

Последняя действует как молекулярное сито разделяя их по размеру или заряду.

Процесс аналогичен методу зонального ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы.

Третий способ основан на измерении ориентации частицы, имеющей асимметричный заряд, в переменном электрическом поле (эффект Керра).

Измеряемая величина – степень ориентации в таком поле.

Процесс аналогичен ориентации макромолекул в гидродинамическом поле (эффект Максвелла).

Экспериментальный метод	Экспериментальные условия	Вычисляемый параметр	Аналог в гидродинамике
Метод движущейся границы	Свободный электрофорез	Электрофоретическая подвижность	Скоростная седиментация
Одномерный электрофорез в капилляре	Свободный электрофорез	Электрофоретическая подвижность	Скоростная седиментация
Изоэлектрическое фокусирование	Градиент pH	Разделение по заряду (изоэлектрическая точка)	Равновесная седиментация в градиенте плотности
Зональный одномерный электрофорез	SDS	Разделение согласно фрикционым свойствам (массе)	Равновесная седиментация в градиенте плотности
Зональный двумерный электрофорез	Градиент pH в одном направлении и SDS в другом направлении.	Разделение по заряду в первом направлении и по фрикционым свойствам (массе) во втором направлении	Равновесная седиментация в градиенте плотности

Заряд и электрофоретическая подвижность

Заряд – фундаментальное свойство молекулы, определяющее ее структуру, растворимость и взаимодействие с другими молекулами.

Если частица, имеющая заряд Q, находится в электрическом поле E, то на нее будет действовать сила

$$F = Q\,E$$

Под действием этой силы частица будет ускоряться до тех пор пока ее действие не будет уравновешено силами вязкого сопротивления среды. При этом частица станет двигаться со скоростью u равной

$$u = Q\,E\,/\,f$$

где f коэффициент поступательного трения частицы

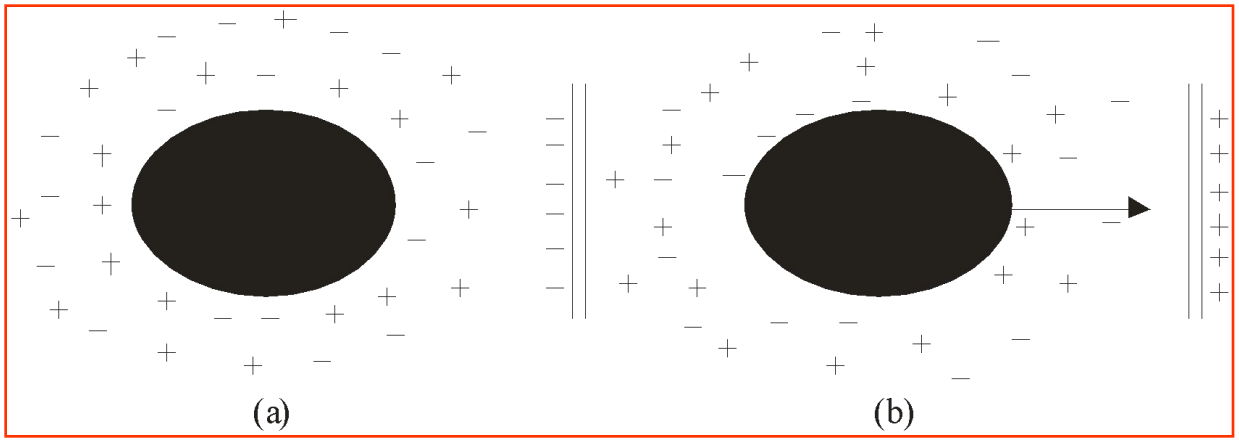
Транспортные свойства заряженной частицы под действием электрического поля называются электрофоретической подвижностью, μ, которая есть отношение скорости ее движения к величине приложенного электрического поля

$$\mu = u\,/E$$

и поэтому

$$Q = \mu f$$

Такое простое описание электрофореза не соответствует реальным условиям, поскольку возникает проблема эффективного заряда молекулы



(a) В отсутствии электрического поля . Малые ионы образуют ионную атмосферу вокруг молекулы.

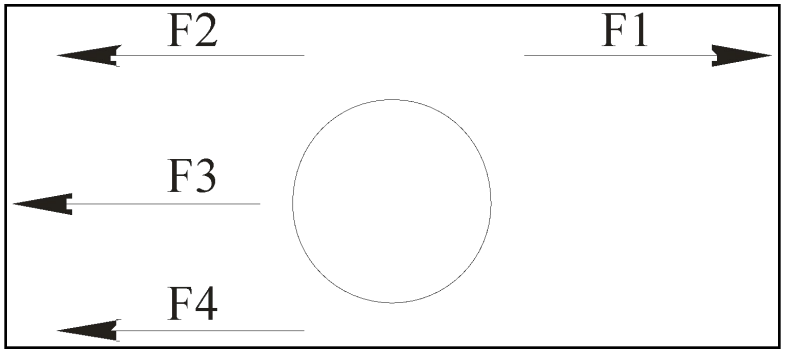
(b) В присутствии электрического поля ионная атмосфера нарушается из-за движения молекулы в электрическом поле. Поэтому заряд макромолекулы и ее ионная атмосфера в отсутствии поля сильно отличны от таковых в присутствии поля

$$u = Q\,E\,/\,f \rightarrow u = Q_{эфф}\,E\,/\,f$$

где под эффективным зарядом молекулы понимается заряд «одетой» молекулы (макроины + противоионы).

<u>Сравнить с Гидратацией</u>

Электрофорез в отсутствии поддерживающей среды (свободный электрофорез)



$$F1 = Q\,E\,, \quad F2 = f\,u$$

$F3$ - сила, связанная с существованием атмосферы противоинов, которая тормозит движение частицы.

$F4$- сила, связанная с возникающей асимметрией этой оболочки и тоже тормозящая движение частицы.

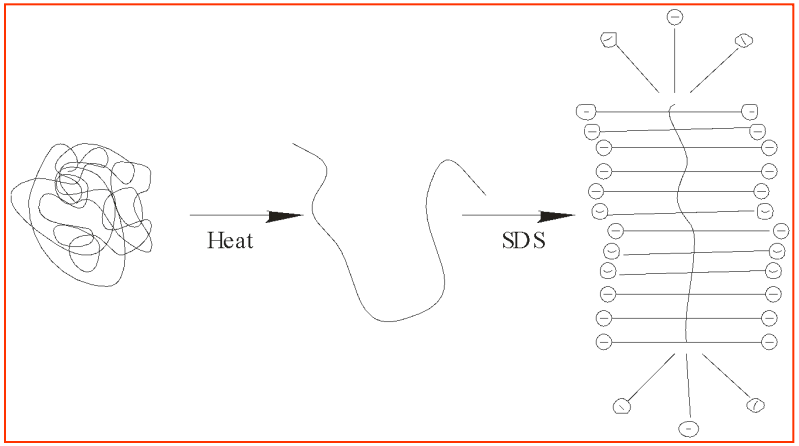
Проблема выделения тепла и проблема конвекции

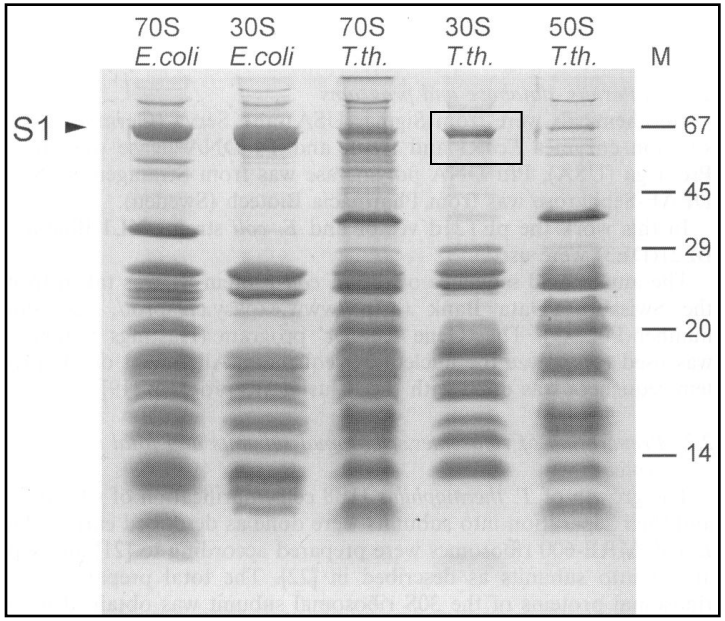
Электрофорез в присутствии поддерживающей среды

Первая работа Тизелиуса была посвящена свободному электрофорезу. Однако вскоре было обнаружено, что многие проблемы (конвекция, большая диффузия) могут быть решены введением стабилизирующей среды.

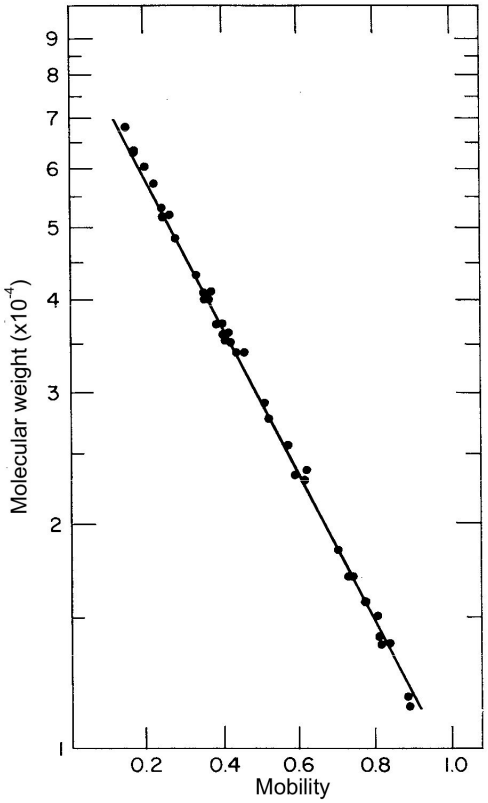
В качестве таких сред использовались, бумага, целлюлоза. Позже они были вытеснены агарозой и полиакриламидным гелем. Важным свойством последнего была возможность его приготовления с разным размером пор

Разделение белков согласно фрикционным свойствам: SDS электрофорез





15% SDS-PAGE анализ рибосомных белков из *E. coli* и *T. thermophilus*. M, молекулярная масса маркеров, кДа.
Белок S1

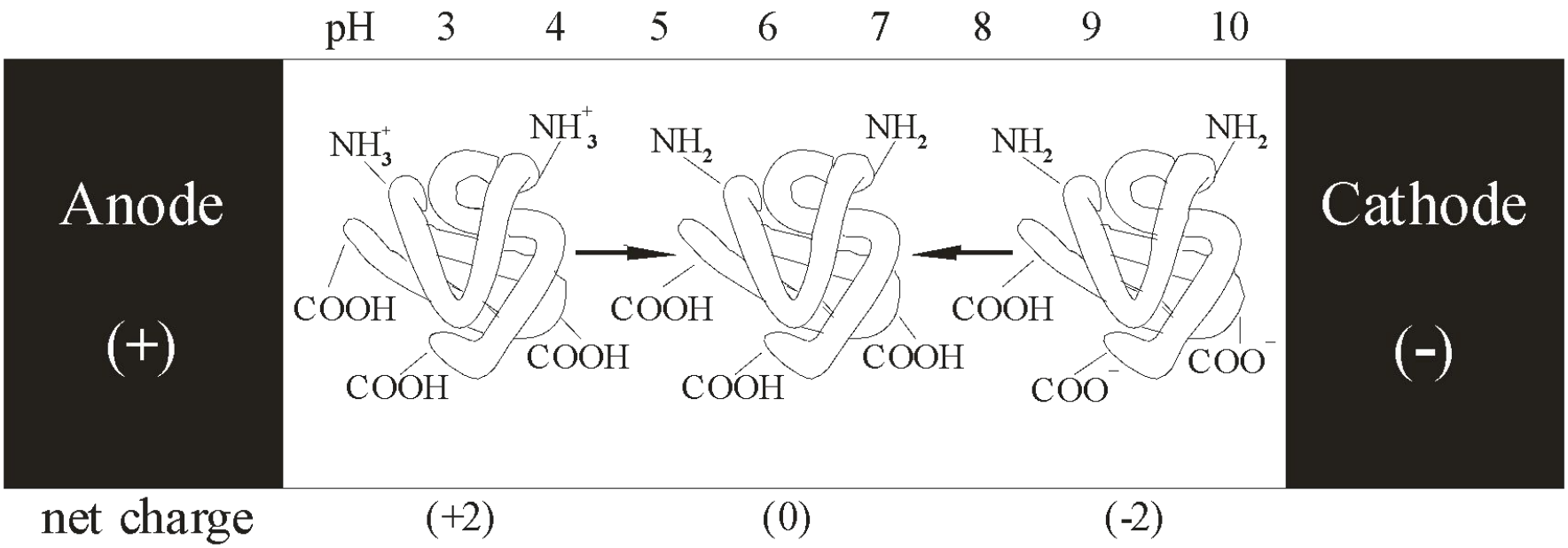


Относительная подвижность 37 белков в 10% SDS-PAGE геле.

В первом приближении скорость миграции белка обратно пропорциональна логарифму ее молекулярной массы.

Необходимость калибровки

Разделение белков согласно заряду: изоэлектрическое фокусирование



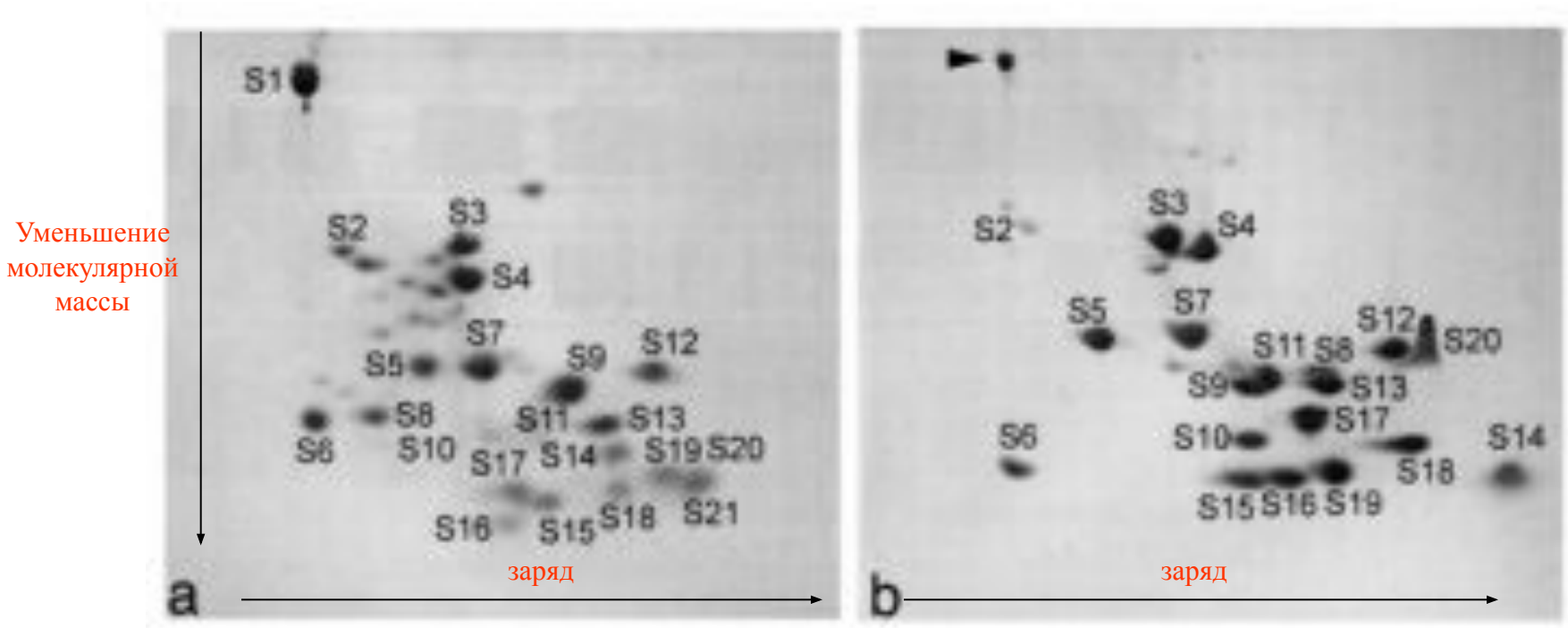
Изоэлектрическое фокусирование основано на разделении заряженных молекул в градиенте pH.

Высокая разрешающая способность изоэлектрическоего фокусирования основана на возможности установления градиента pH с точностью 0.01.

Аналог в гидродинамике - равновесная седиментация в градиенте плотности

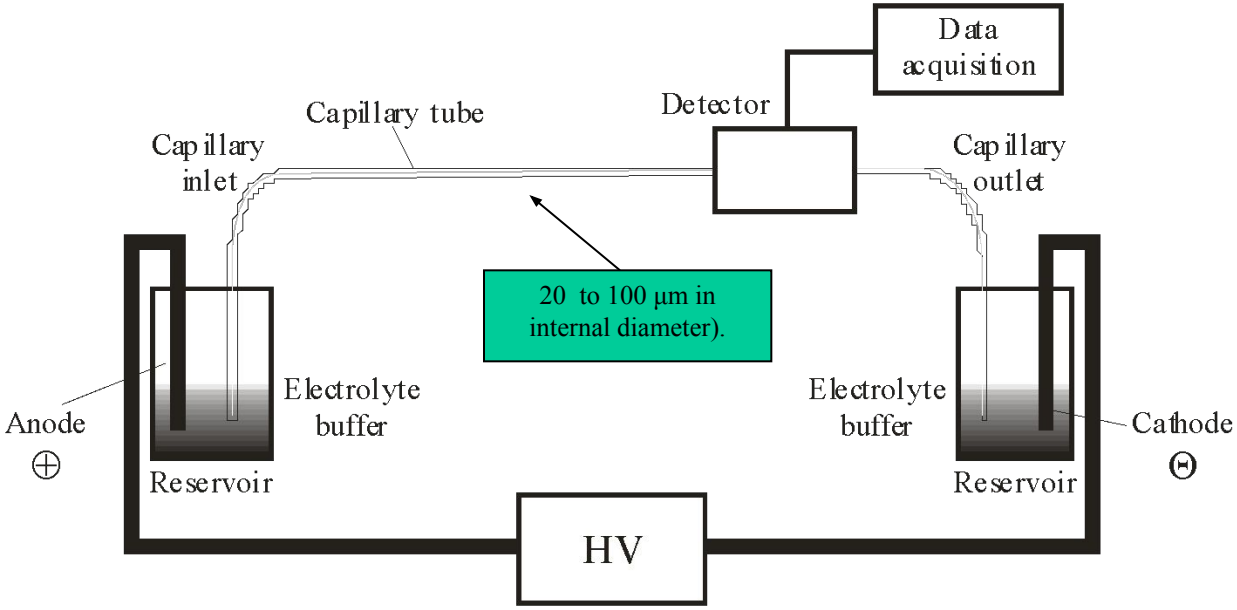
Двумерный электрофорез: разделение белков по заряду и массе одновременно

E. coli *T. thermophilus*



Электрофоретическое разделение белков 30S рибосомной субъединицы из *E. coli* и *T. thermophilus* в 15% SDS-PAGE, pH (5.5) (Shiryaev et al., 2002.

Капиллярный электрофорез



Два уравнения капиллярного электрофореза

Первое уравнение:

$$\mu = L^2/Vt,$$

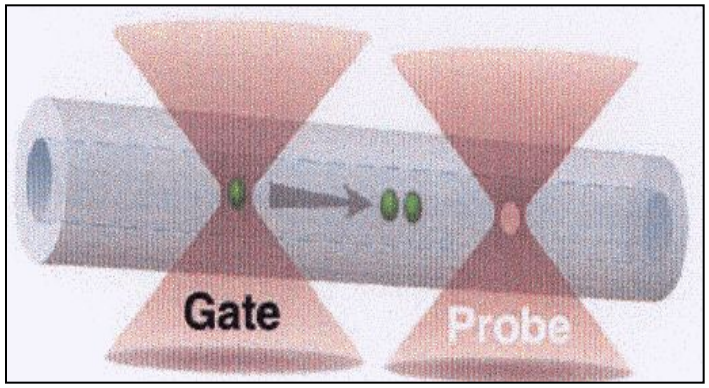
где *μ- электрофоретическая подвижность, L – длина капилляра в см, t- время прохождения в сек., V – прикладываемое напряжение*

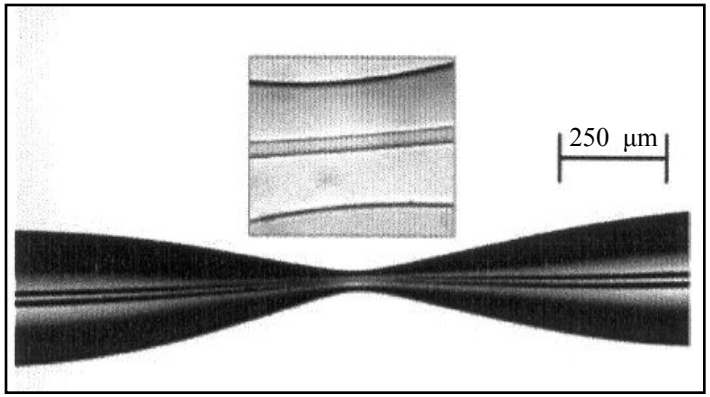
Второе уравнение:

$$N = \mu V/2D$$

Разрешающая способность капиллярного электрфореза прямо пропорциональна прикладываемому напряжению и обратно пропорциональна коэффициенту диффузии.

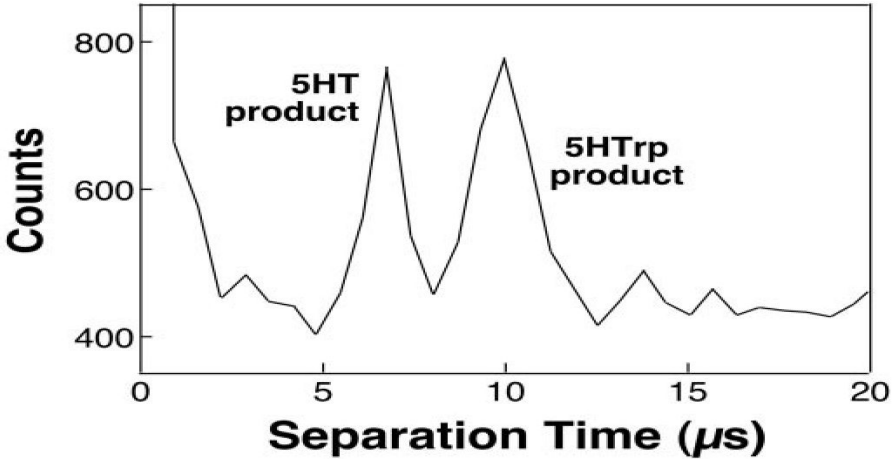
Ультрабыстрый капиллярный электрофорез: геометрия песочных часов





Прикладываемое поле 20 кV

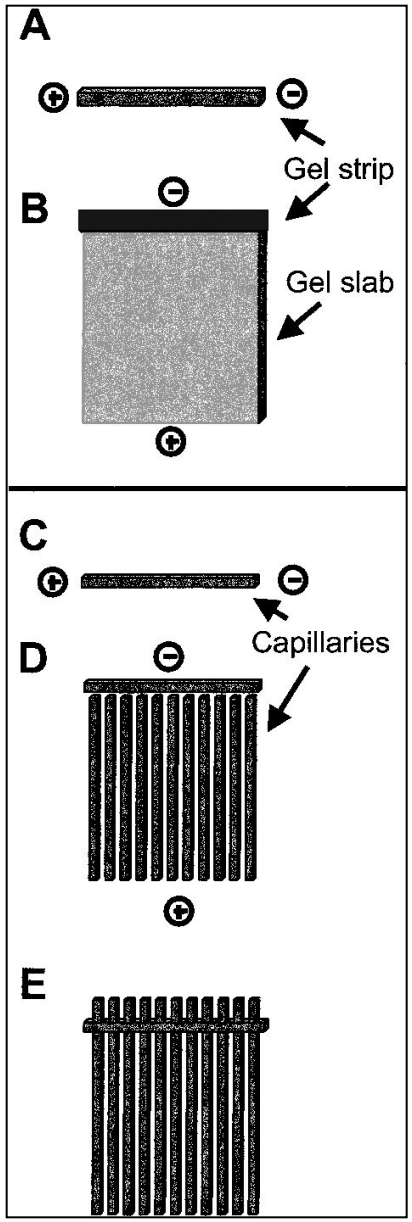
Локальное поле 0.2 MV/см на длине ~ 60 μm.



Демонстрация возможностей метода.

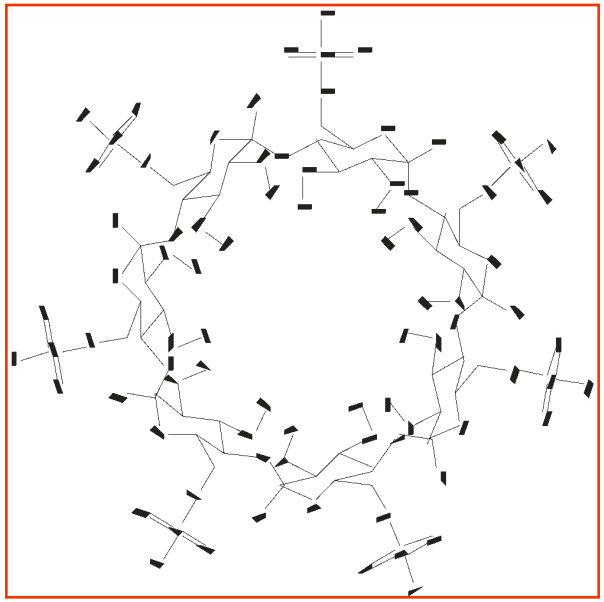
Поле 0.15 MVcm-1 используется для разделения 5-Hydroxytryptamine (5HT) от Hydroxytryptophan (5HTrp) на микросекундной шкале времени.

Двумерный капиллярный электрофорез



Разделение хиральных молекул

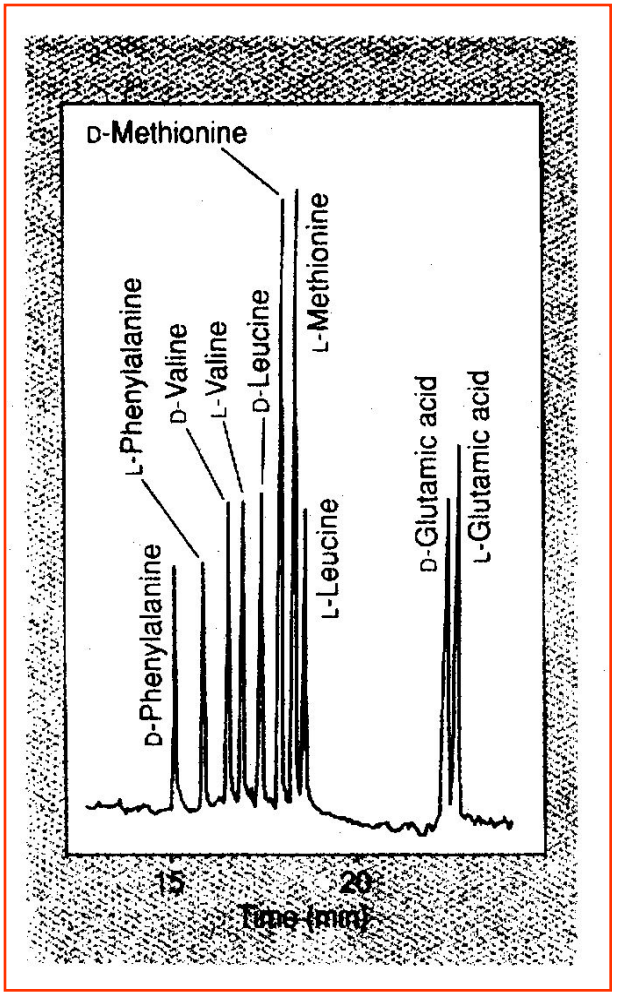
L- и D- изомеры, лекарства, рацематы, D- и L- пропанол

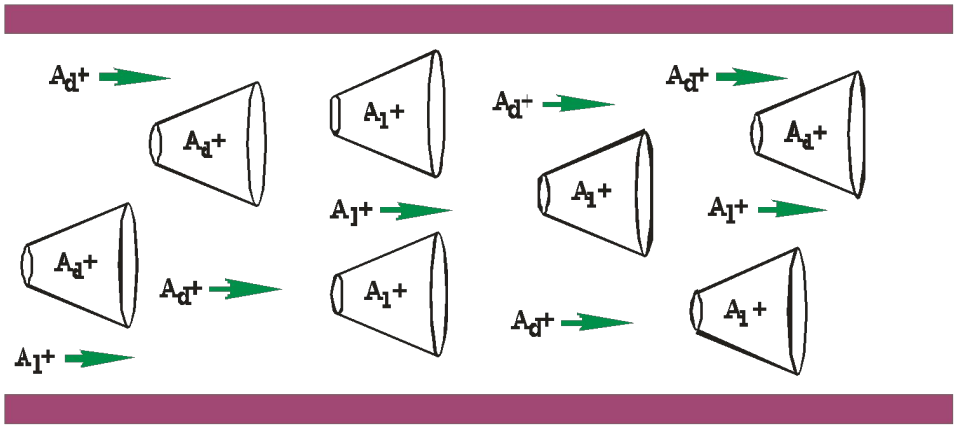


Разделение хиральных молекул в электрофорезе производится путем добавления специальных веществ, называемых циклодекстринами, в электролит.

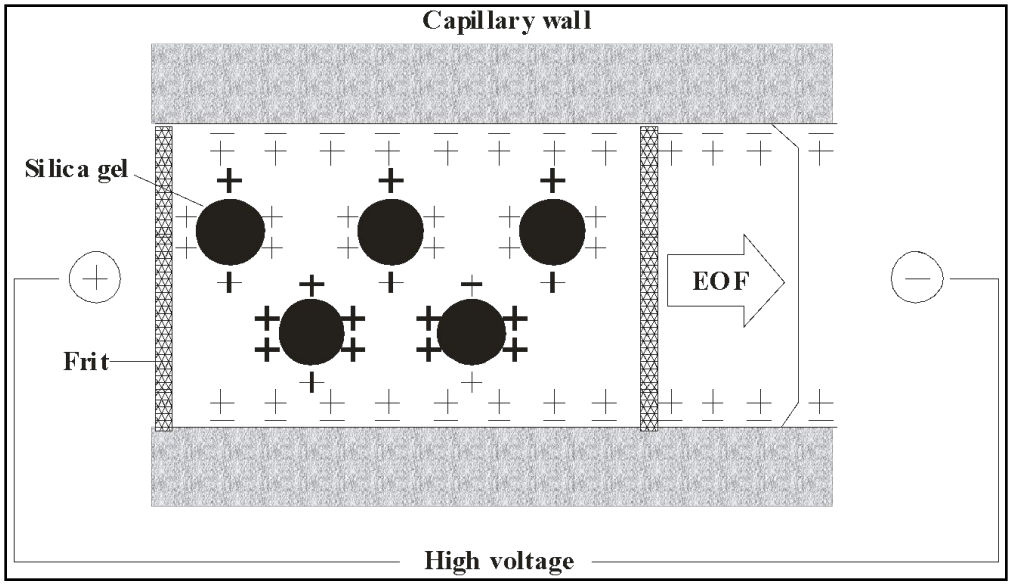
Циклодекстрины- циклические, хиральные карбогидраты сложены из глюкопиранозных единиц.

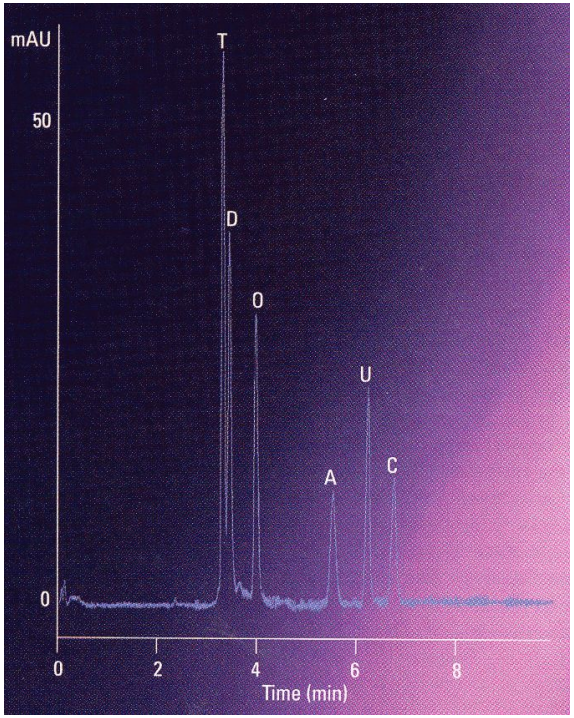
Структурно они представляют собой усеченые конусы, внутренняя поверхность которых в основном гидрофобна, тогда как внешняя поверхность гидрофильна.





Капиллярная хроматография: гибрид HPLC и CE (CEC)





В обычной хроматографии высокого давления проток жидкости обеспечивается механическим насосом.

В некоторых случаях движение мобильной фазы может быть осуществлено приложением электрического поля, за счет сил, называемых электроосмотическими.

Жидкостная хроматография основанная на этом принципе носит название капиллярной хроматографии.

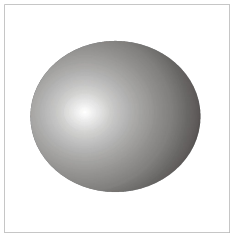
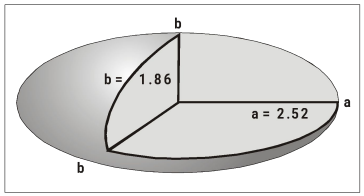
Пример разделения пяти небольших пептидов Колонка: внутренний. диаметр 100-µм, длина 25-см; напряжение 25 кВ; несущий электролит, 40 мМ/Л NH_4Ac-Ac OH (pH 4.5); ацетонитрил (1:1 v/v); детектирование при 214 нм.

Пептиды

T, triptorelin; D, desmopressin; O, oxylocin; A, peptide A; U, uracil (EOF marker), (Unger et al. 2002)

Явление	Движущая сила
$D = kT / f$	Тепловая
$s = M(1 - \bar{\upsilon}\rho_0) / N_A f$	Гравитационная
$\mu = Q / f$	Электрическая

$$u = F / f$$

$$f = 6\pi \eta_0 R_0$$

$$f(p) = 6\pi\eta_0 R_0 F(p)$$