

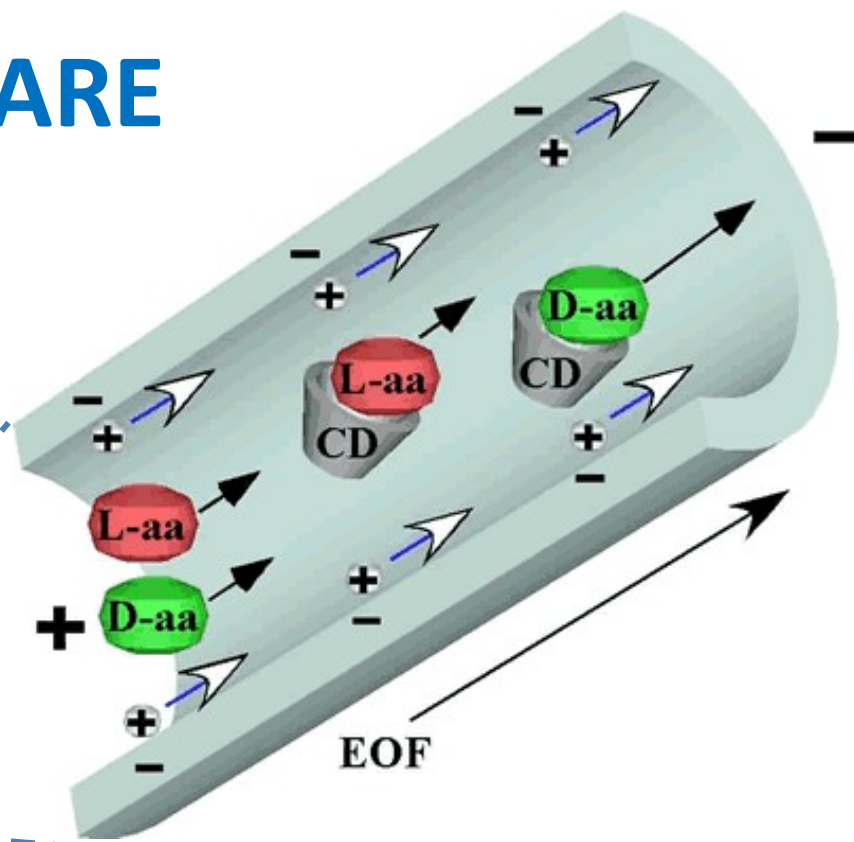
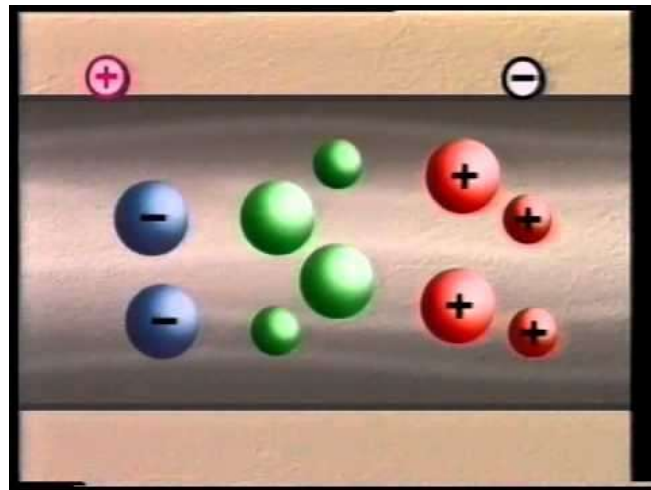
# Elettroforesi capillare



e applicazioni



# ELETTROFORESI CAPILLARE



# ELETTROFORESI CAPILLARE

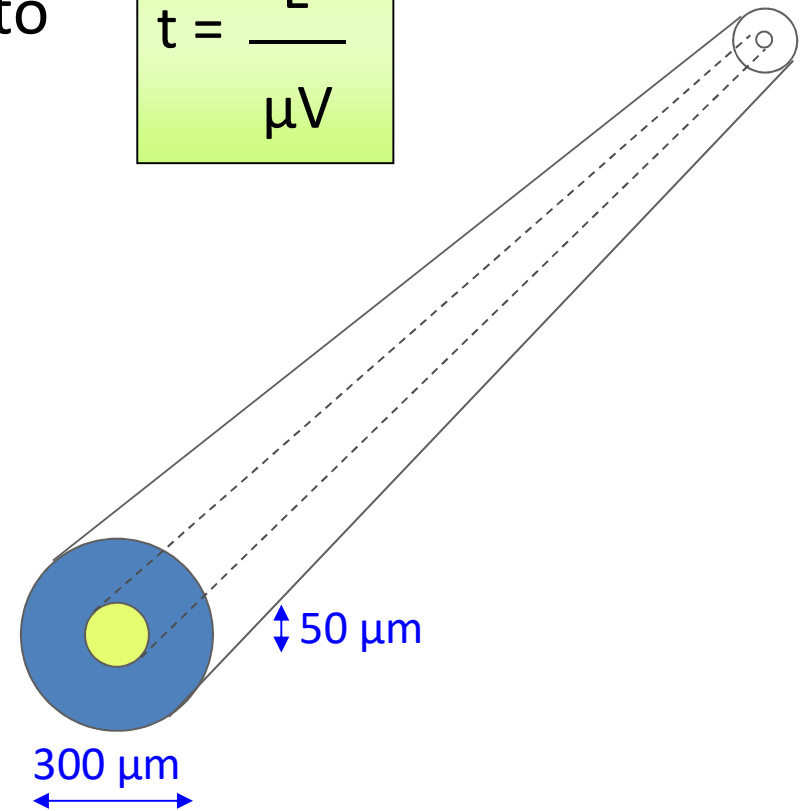
## VANTAGGI

- Uso di **quantità molto ridotte** di campioni (**fmoli** e **nL!**).
- **Applicabilità** a molte tipologie di molecole.
- Analisi di campioni senza trattamento
- **Velocità** di analisi, rilevazione in tempo reale.
- **Alto** rapporto superficie/volume.
- Migrazione in fase libera.
- Elevata **sensibilità**.
- Automazione.

## ELETTROFORESI CAPILLARE

- $t$  = Tempo di permanenza del soluto nel capillare
- $L$  = lunghezza del capillare
- $\mu$  = mobilità elettroforetica del soluto
- $V$  = differenza di potenziale (ddp)

$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$



Elettroforesi condotta in tubi di  $\varnothing$  interno di pochi  $\mu\text{m}$ .

# ELETTROFORESI CAPILLARE

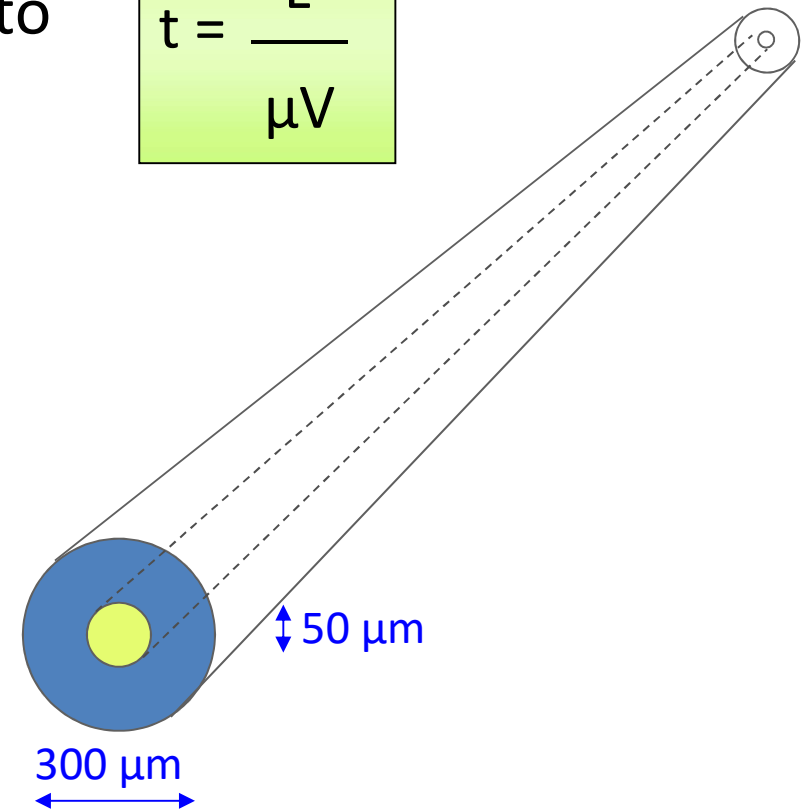
- $t$  = Tempo di permanenza del soluto nel capillare
- $L$  = lunghezza del capillare
- $\mu$  = mobilità elettroforetica del soluto
- $V$  = differenza di potenziale (ddp)

$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$

Caratteristiche del capillare:

- chimicamente ed elettricamente inerte
- trasparente alle  $\lambda$  UV e visibile
- flessibile e robusto

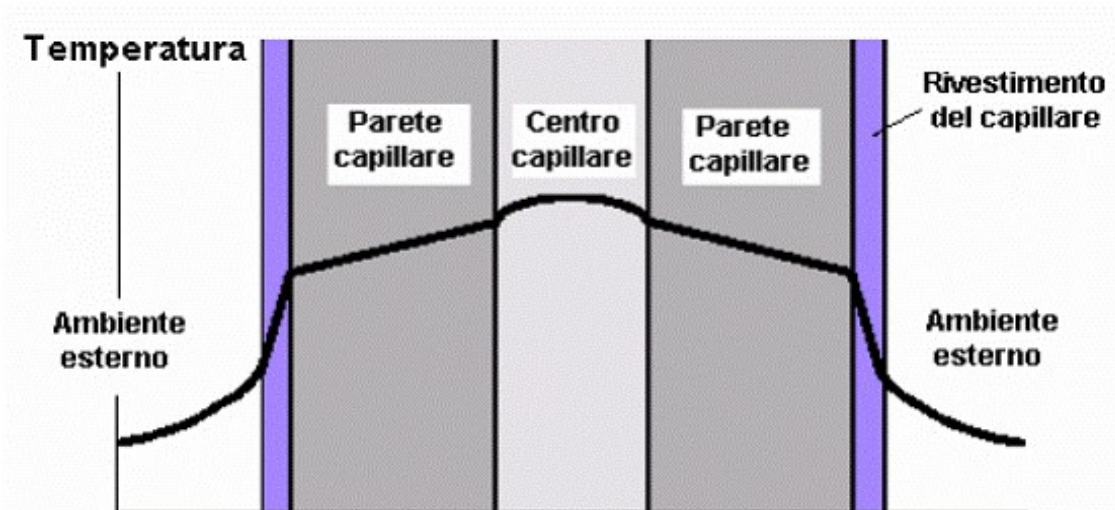
All'interno: **SILICE FUSA**



Elettroforesi condotta in tubi di  $\varnothing$  interno di pochi  $\mu\text{m}$ .

# GRADIENTE DI TEMPERATURA IN UN CAPILLARE

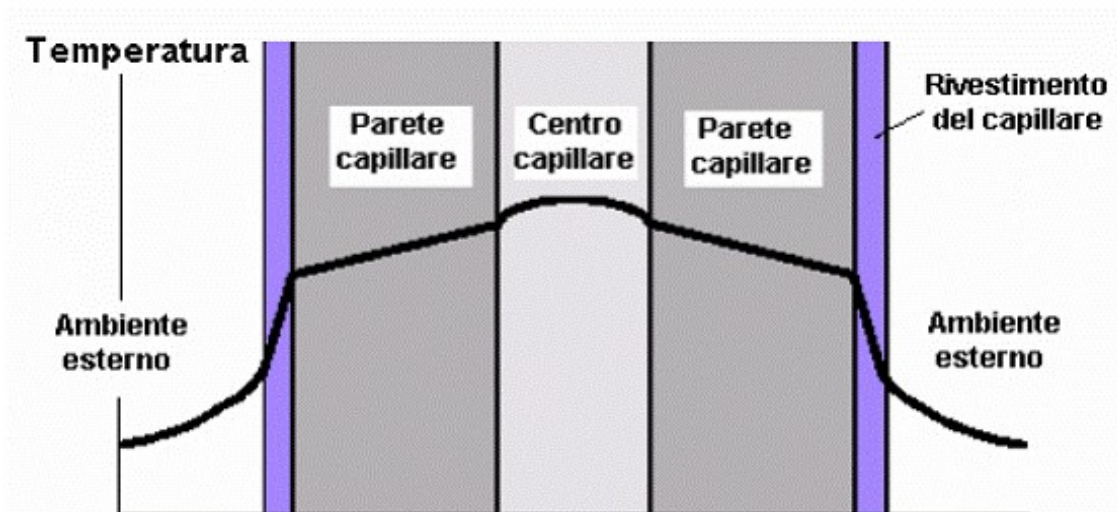
- **Elevate ddp** applicate (10.000-50.000 Volt).
- Per **dissipare il calore** prodotto si usano capillari di 50-100 cm.



Tali gradienti di T originano locali differenze di **viscosità** nel tampone e dunque una migrazione **non** uniforme.

# GRADIENTE DI TEMPERATURA IN UN CAPILLARE

- **Elevate ddp** applicate (10.000-50.000 Volt) – capillari di 50-100 cm

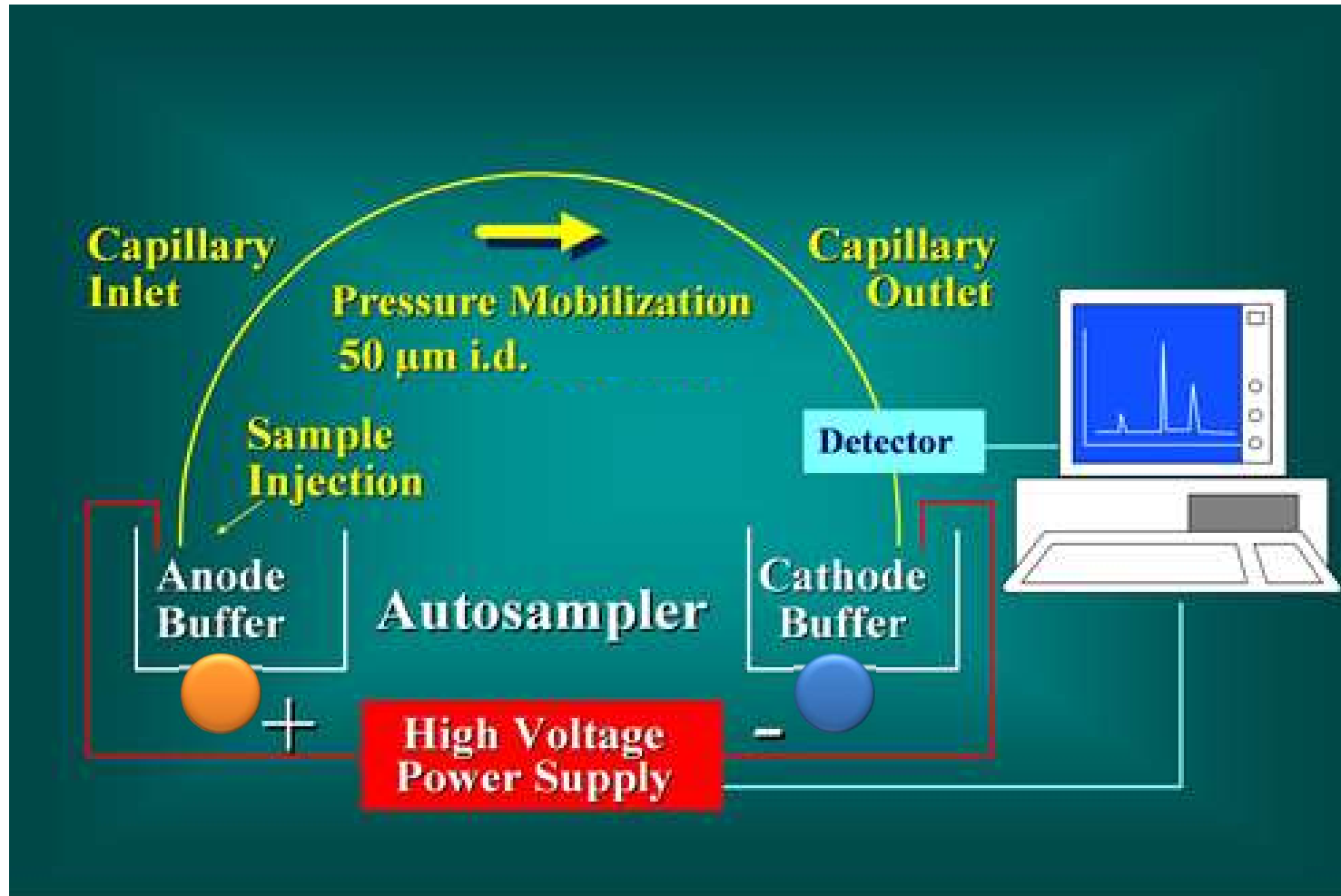


Tali gradienti di T originano locali differenze di **viscosità** nel tampone e dunque una migrazione **non** uniforme.

Soluzione:

Capillari con **raggio interno piccolo** e **grande raggio esterno** per **limitare la quantità di calore** generato e per **facilitare la dissipazione** del calore (trasferimento verso la periferia del capillare)

## DIREZIONE DEL FLUSSO

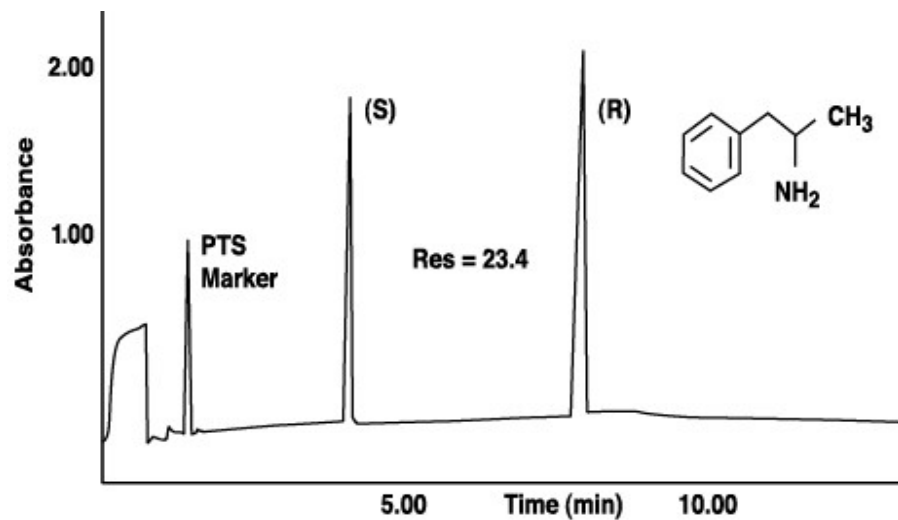


Le sostanze si spostano  
tutte da **anodo (+)** verso **catodo (-)**.

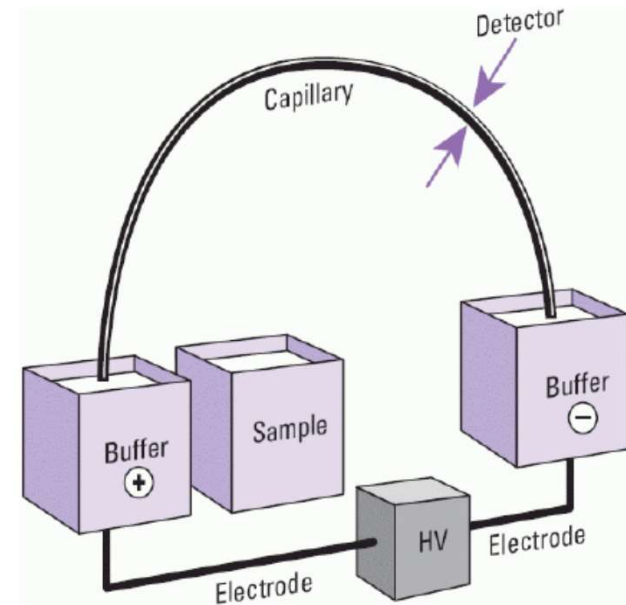


# STRUMENTAZIONE

- Serbatoi del tampone e del campione.
- Generatore di ddp.
- Tubo **capillare**.
- Un rivelatore solo, al catodo  
(spesso **UV** o **fluorescenza**).

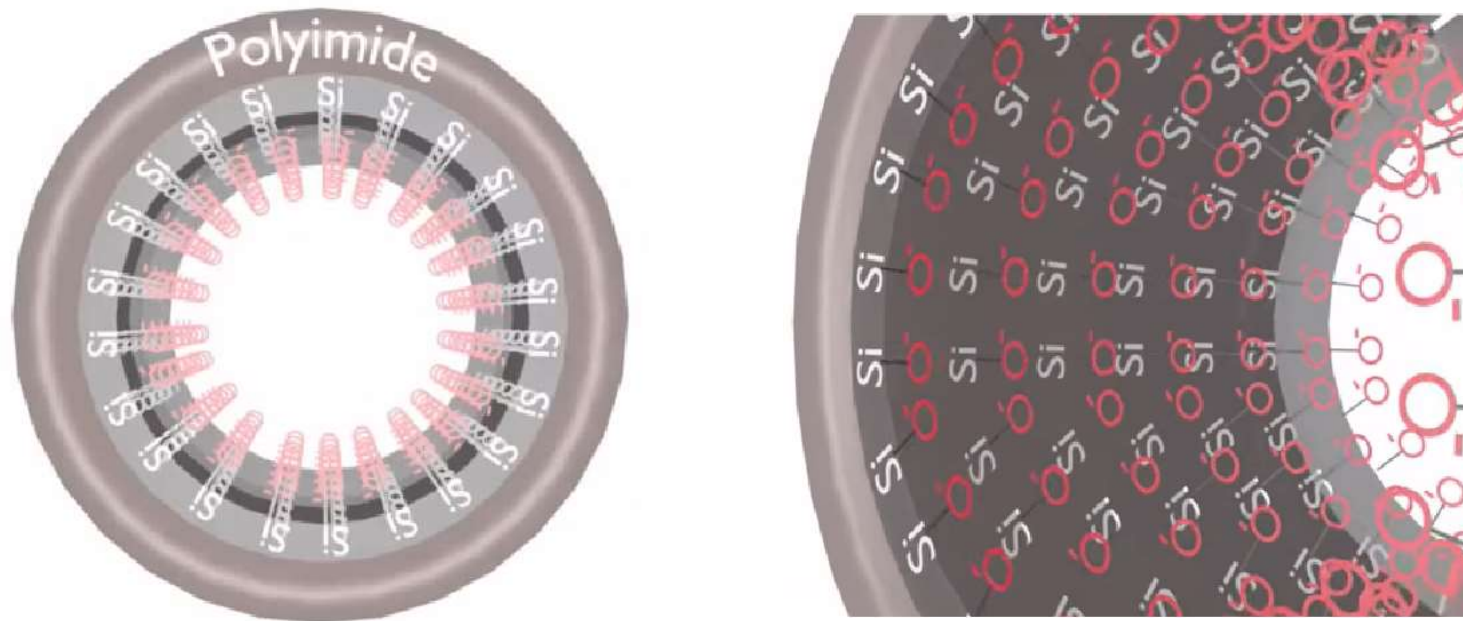


Campione introdotto **sempre**  
all'estremità anodica (+).



# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

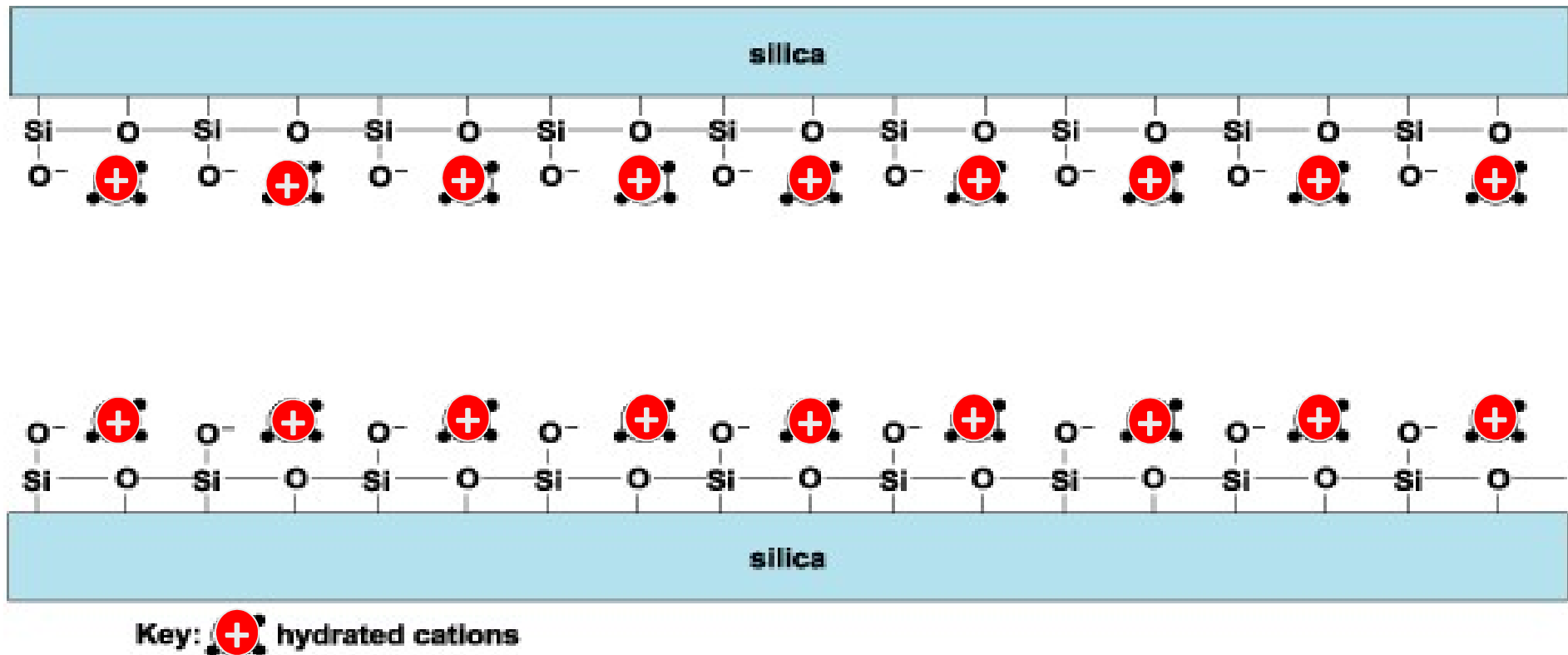
Movimento di fluido in un capillare immerso in un campo elettrico agevolato dall'applicazione di alto voltaggio.



I gruppi silanolic ( $-$ ) della parete del capillare attirano uno strato di **controioni ( $+$ )** del tampone creando un **doppio strato** diffuso.

# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

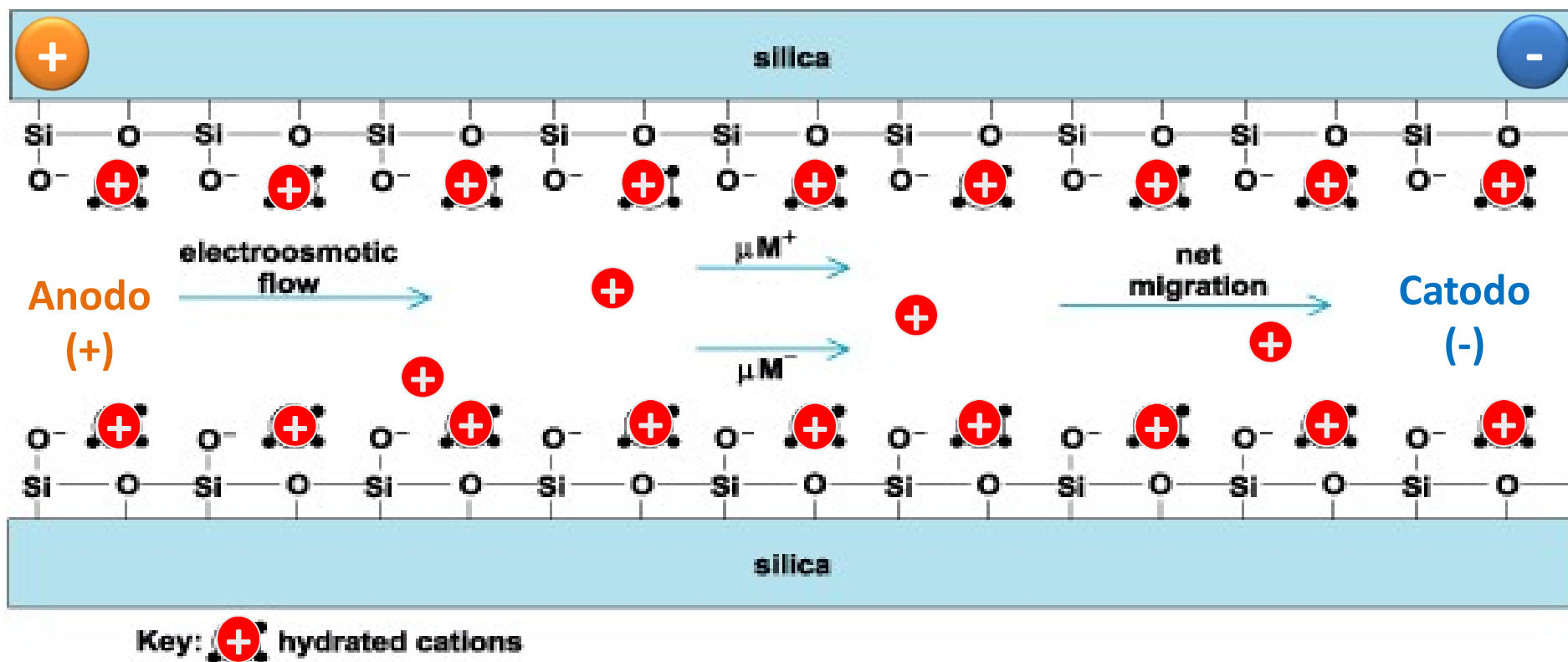
Movimento di fluido in un capillare immerso in un campo elettrico agevolato dall'applicazione di alto voltaggio.



I gruppi silanolic (-) della parete del capillare attirano uno strato di **controioni (+)** del tampone creando un **doppio strato** diffuso.

# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

All'applicazione della tensione, le cariche positive del doppio strato migrano in direzione del **catodo** trasportando molecole d'acqua.



L'uso di un tampone neutro o basico rende il **EOF** più forte del campo elettrico così da **trascinare tutte le molecole (e gli ioni) verso il catodo (-)**.

# MODIFICAZIONI DEL FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO

Tensioattivi

pH

Temperatura

EOF

Forza Ionica

Campo elettrico

# MODIFICAZIONI DEL FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO

Tensioattivi

pH

Temperatura

EOF

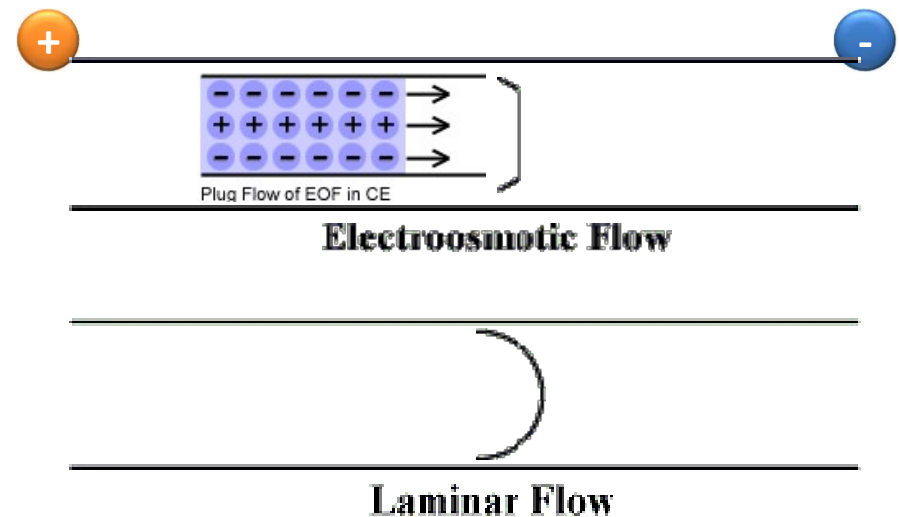
Forza Ionica

Campo elettrico

EOF

Vs

Flusso laminare



# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

EOF ha direzione verso il polo avente carica corrispondente al segno delle cariche che ricoprono la superficie interna del capillare

- L'uso di un tampone neutro o basico, rende il **EOF più forte del campo elettrico** così da trascinare **tutte le sostanze verso il catodo (-)**
- L'applicazione del campo elettrico rende la **forza** di spinta del **EOF uniforme** su tutto il diametro del capillare evitando il profilo del flusso laminare

# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

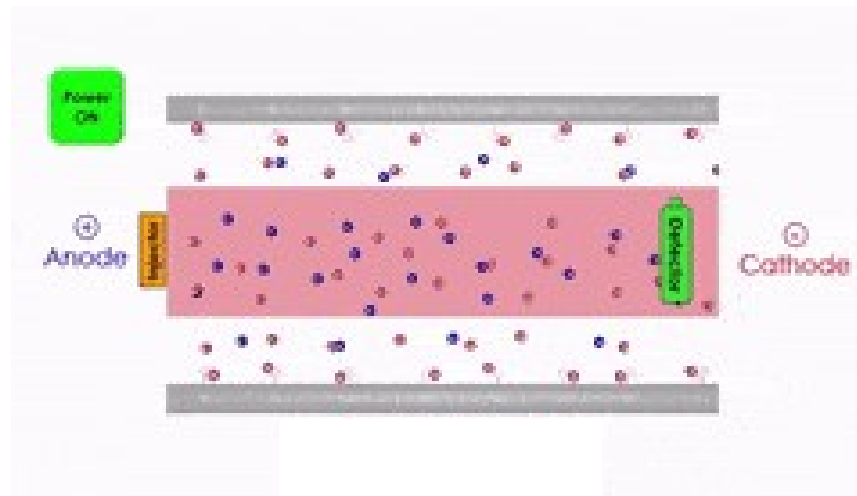
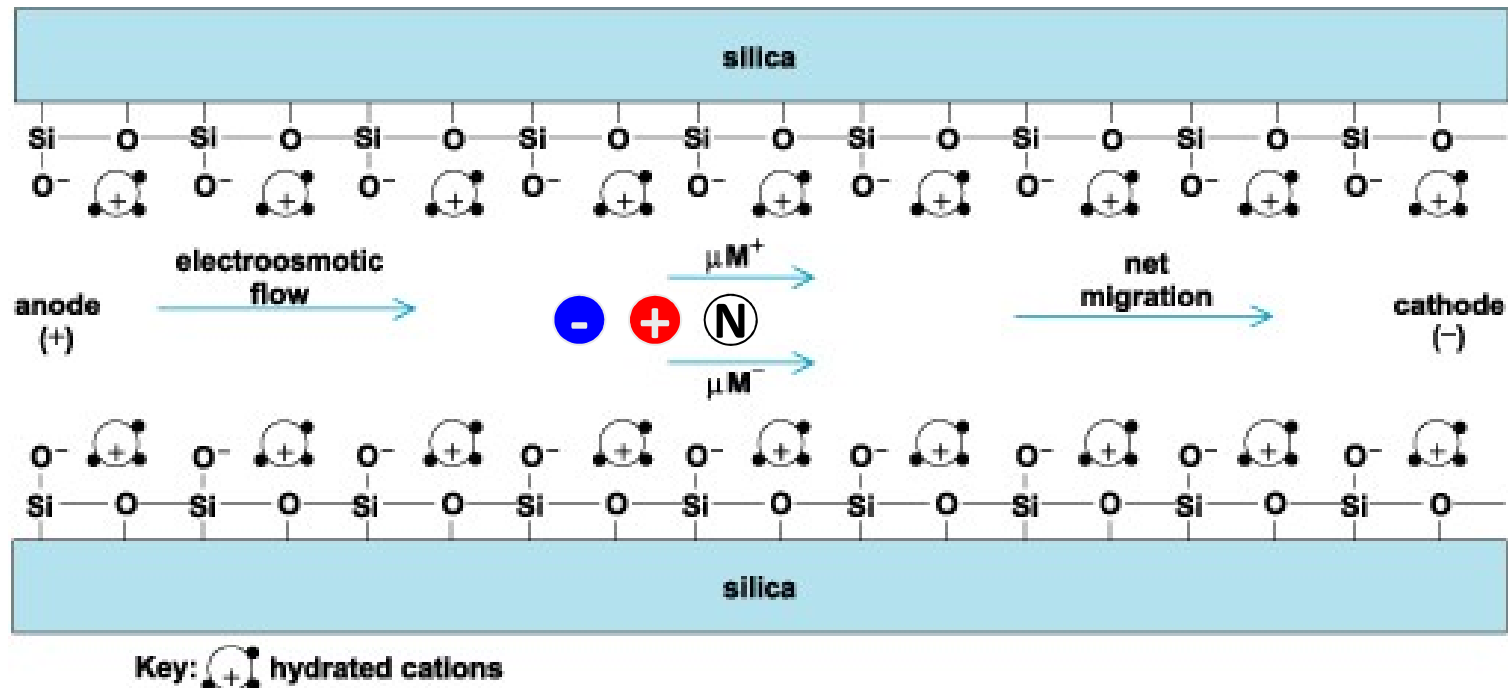
Movimento di fluido in un capillare immerso in un campo elettrico agevolato dall'applicazione di alto voltaggio

- I **gruppi silanolici (-)** della parete interna del capillare **attirano** uno strato di **contro-ioni positivi** del tampone creando un **doppio strato diffuso**
- All'applicazione di tensione, le **cariche positive** del doppio strato migrano in direzione del **catodo (EOF) trasportando** molecole d'**acqua**
- L'uso di un tampone neutro o basico, rende il **EOF più forte del campo elettrico** così da trascinare **tutte le sostanze verso il catodo (-)**
- L'applicazione del campo elettrico rende la **forza** di spinta del **EOF uniforme** su tutto il diametro del capillare evitando il profilo del flusso laminare

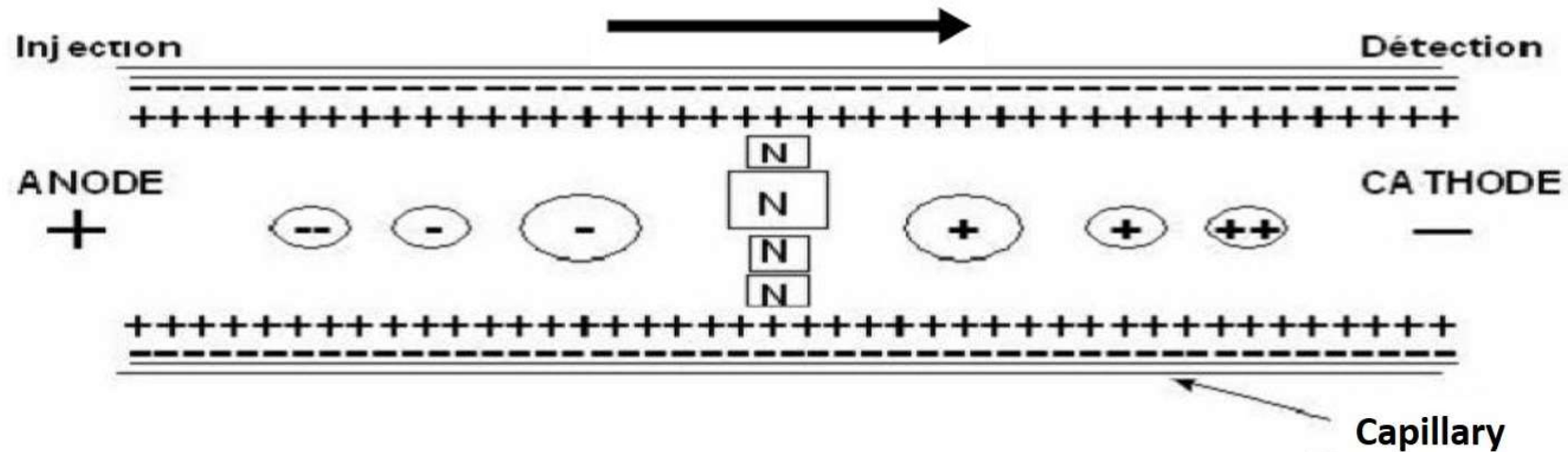
EOF ha direzione verso il polo avente carica corrispondente al segno delle cariche che ricoprono la superficie interna del capillare



# Quindi, come migrano gli analiti?



# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE



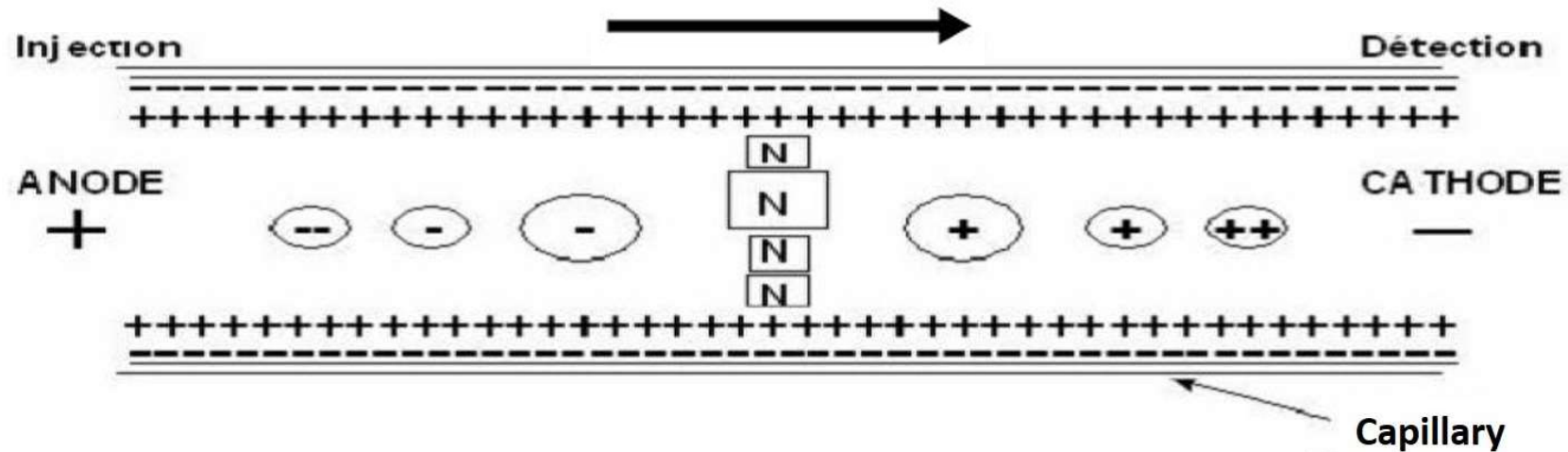
Migrazione

Cations	+	=
Neutral		=
Anions	+	=

EOF = Flusso elettroosmotico

EF = Elettroforesi

# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

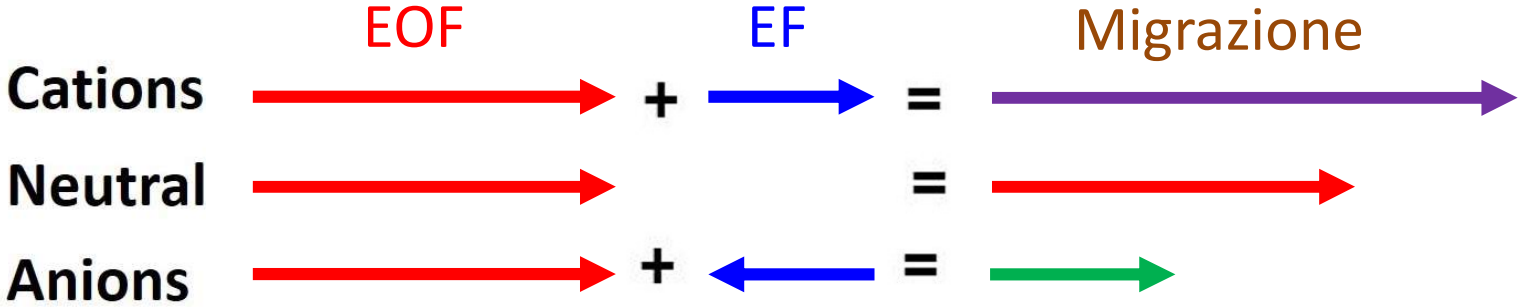
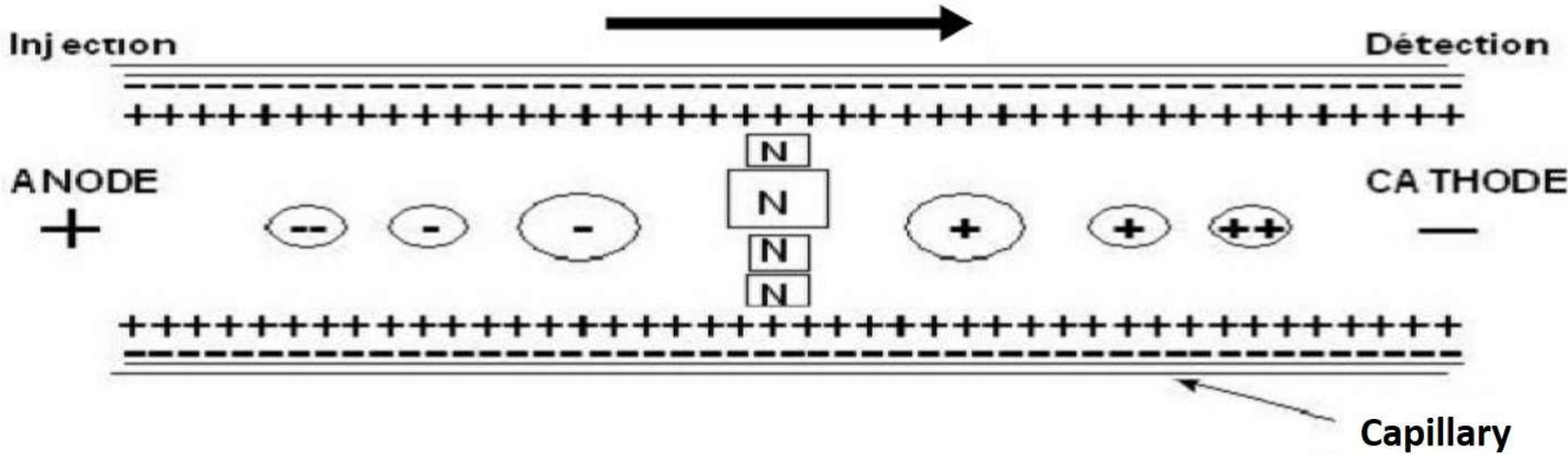


	EOF		EF		Migrazione
Cations		+	=		
Neutral			=		
Anions		+	=		

EOF = Flusso elettroosmotico

EF = Elettroforesi

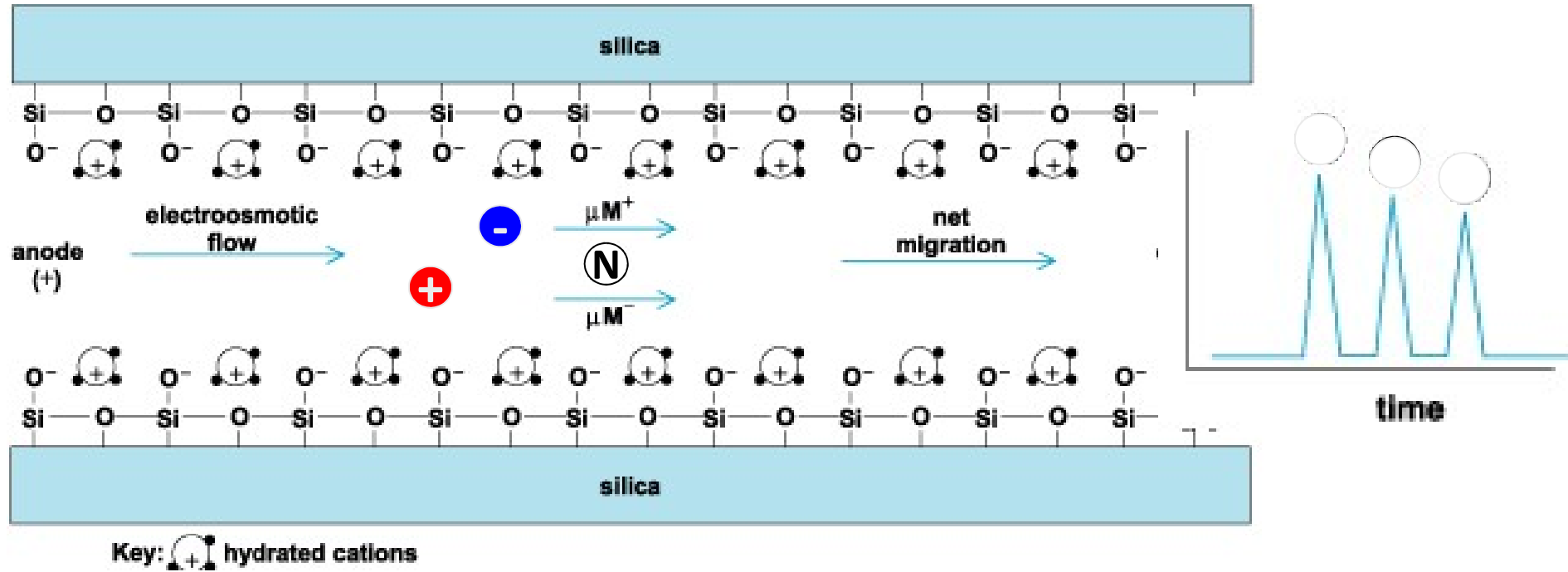
# FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE



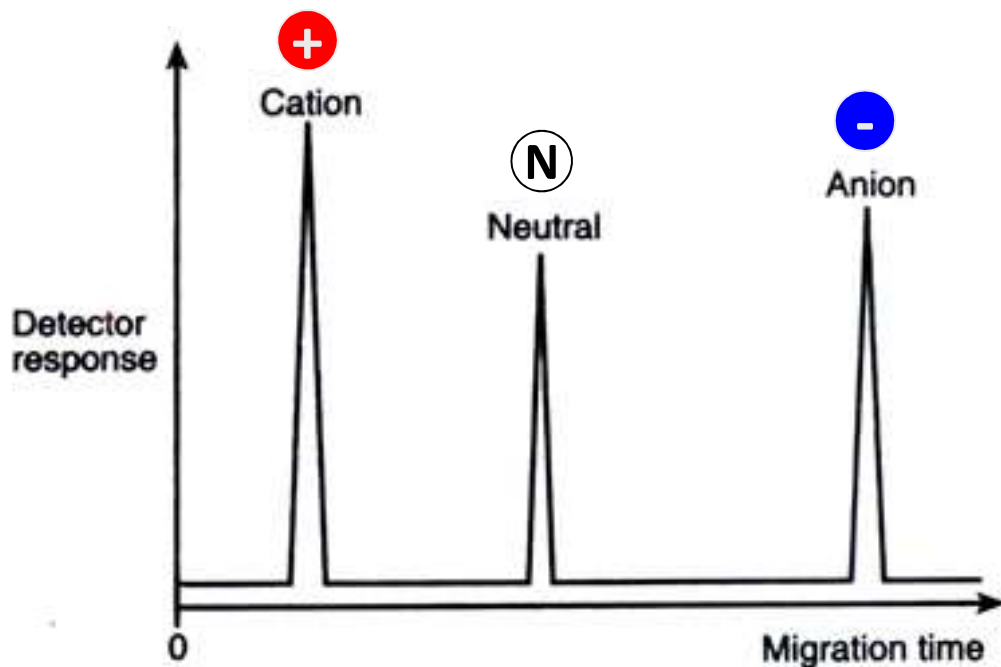
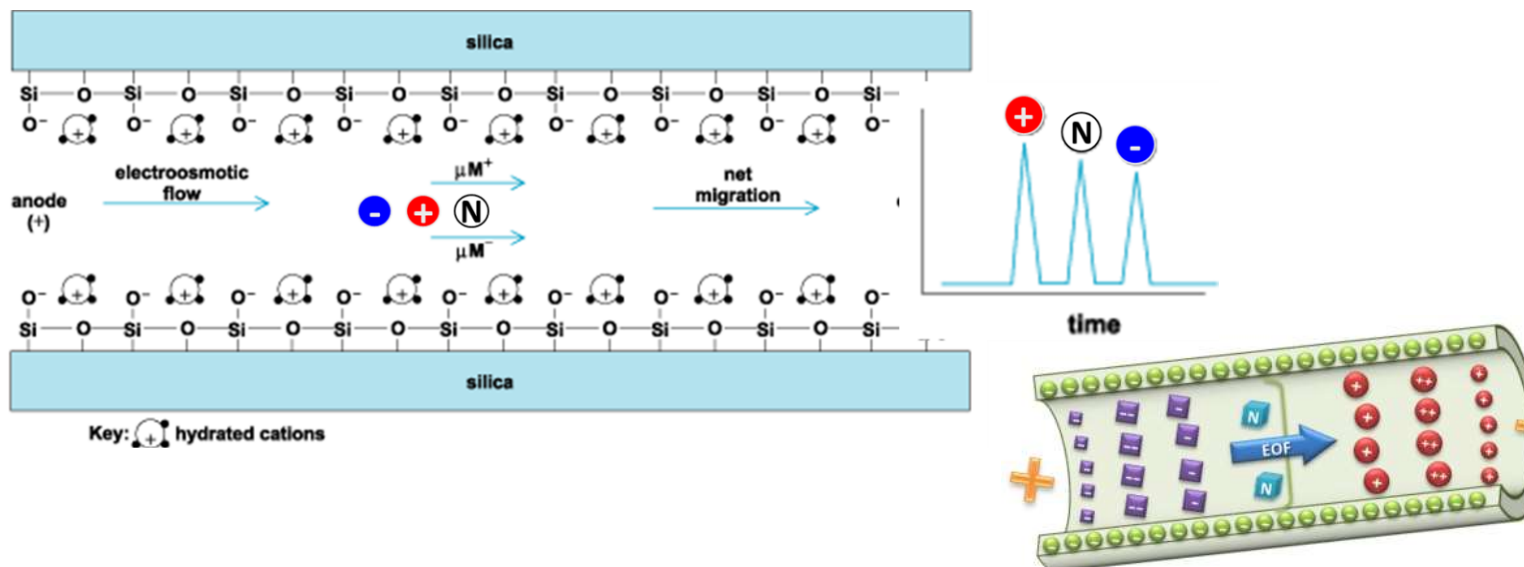
EOF = Flusso elettroosmotico

EF = Elettroforesi

# Quindi, come migrano gli analiti?



# Quindi, come migrano gli analiti?



## Elettroferogramma

- Risposta del rivelatore in funzione del tempo di migrazione, a sua volta dipendente dalla carica della sostanza/molecola/ione
- Picco proporzionale alla concentrazione delle molecole rivelate

# APPLICAZIONI ELETTROFORESI CAPILLARE

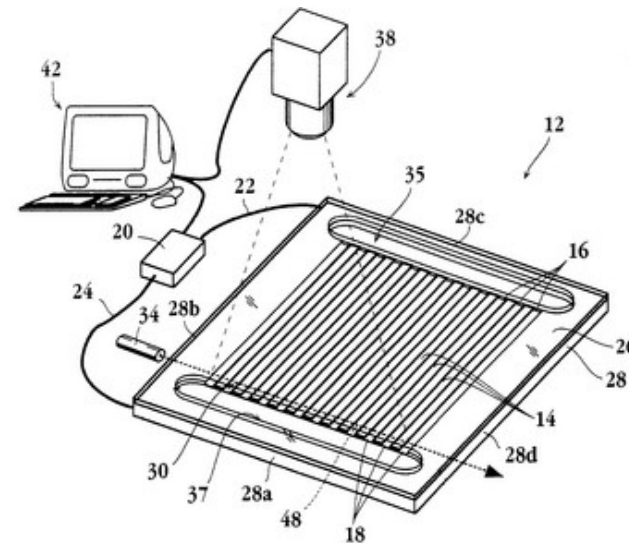
## ELETTROFORESI SU MICROCHIP

Miniaturizzazione dei sistemi elettroforetici capillari.

- Velocità di analisi elevate
- Basse ddp
- Riduzione dei volumi di campione da utilizzare
- Elevata sensibilità

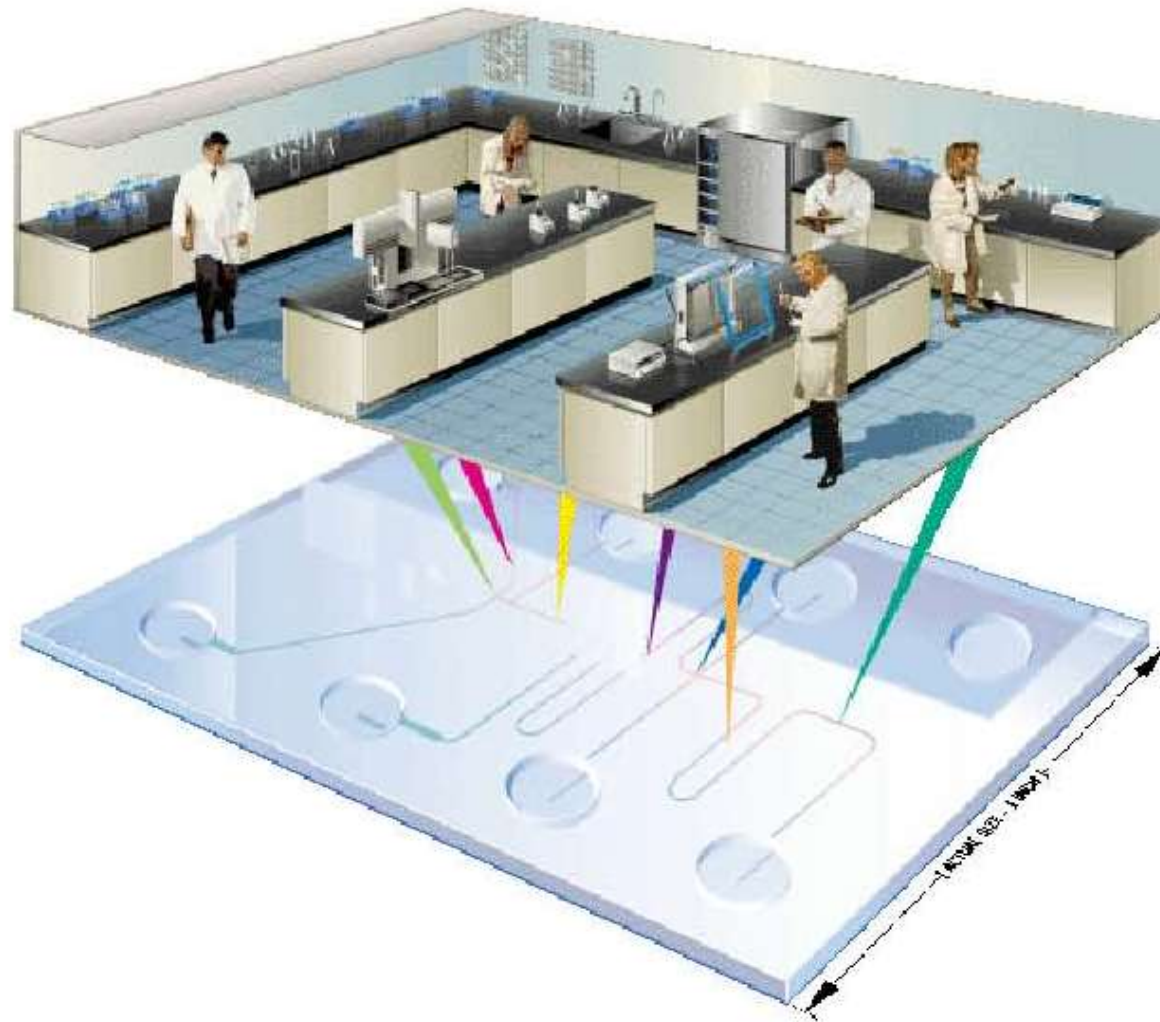


$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$



# LAB ON A CHIP

## ELETTROFORESI SU MICROCHIP





# LAB ON A CHIP



## Experion Automated Electrophoresis System



# Experion Automated Electrophoresis System

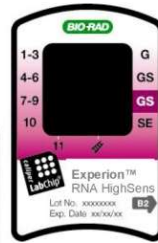
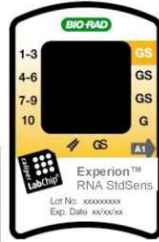
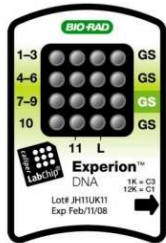
Per analisi di DNA, RNA e proteine denaturate

RNA HighSens Chip

RNA StdSens Chip

Pro260 Chip

DNA Chip



Analysis Reagents



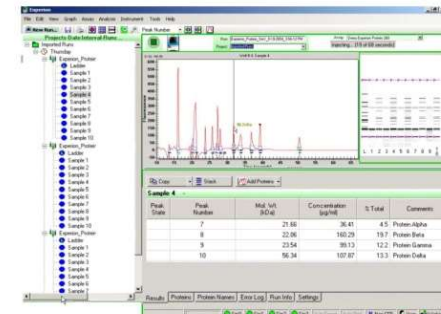
Automated Electrophoresis Station



Priming Station



Vortex Station



Data Analysis Software

# Experion Automated Electrophoresis System



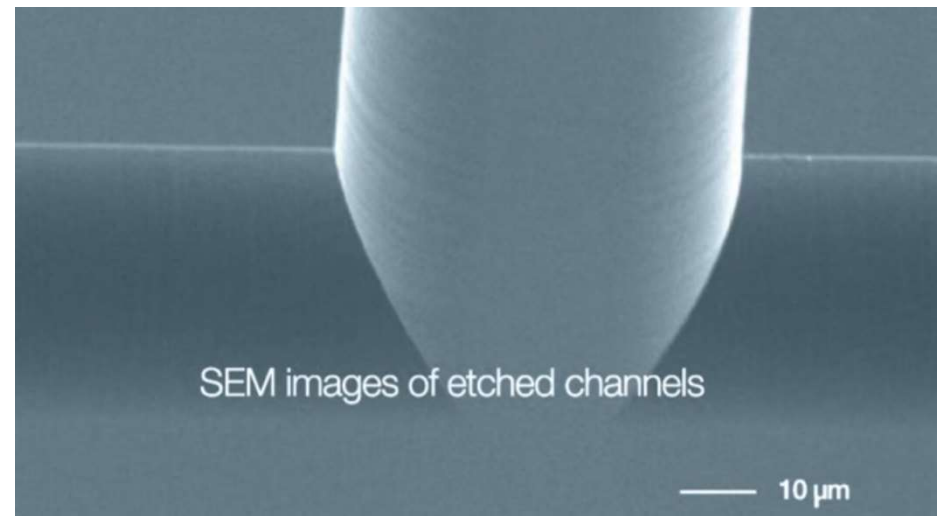
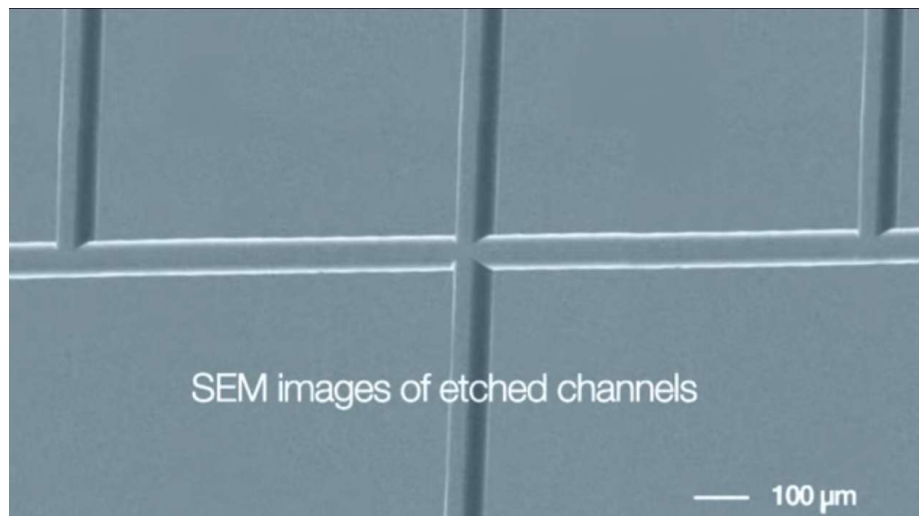
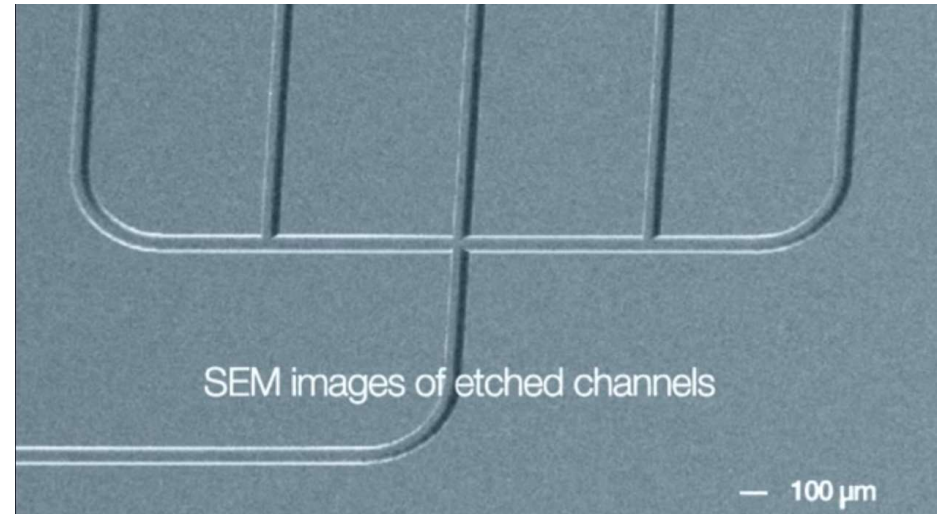
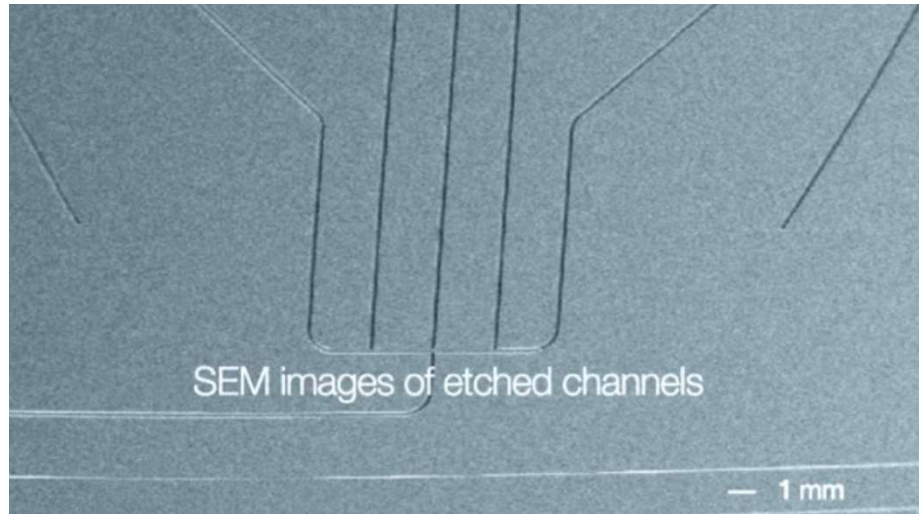
# Chip Experion

Chip di **vetro** all'interno di un supporto di plastica

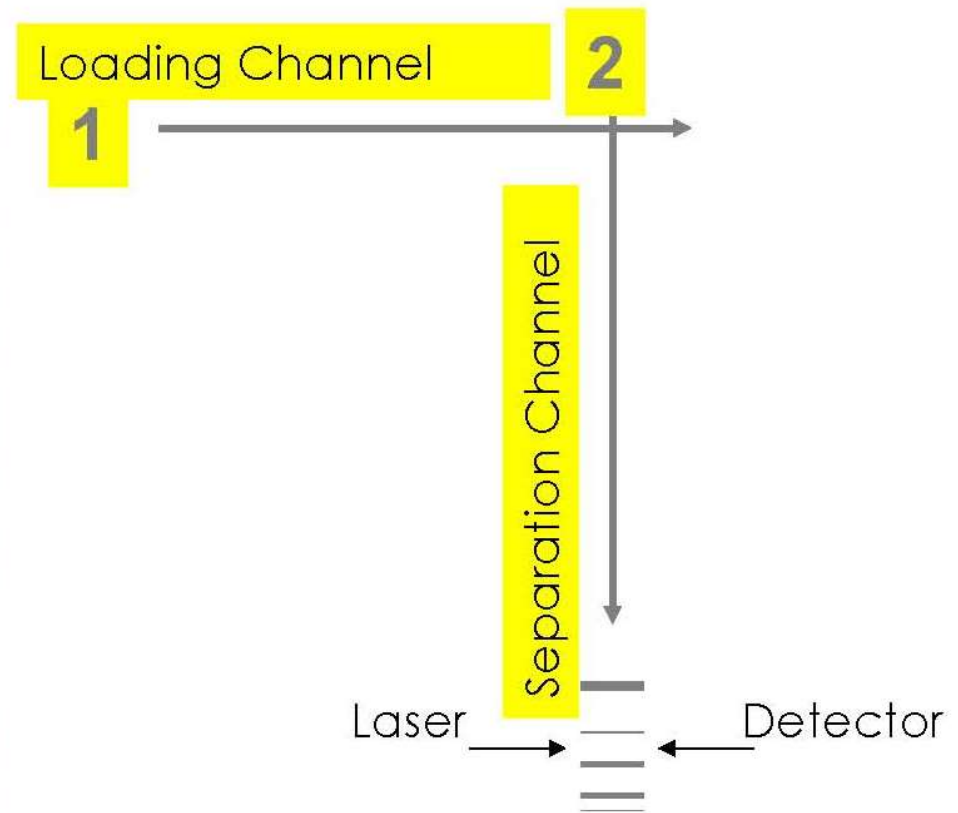
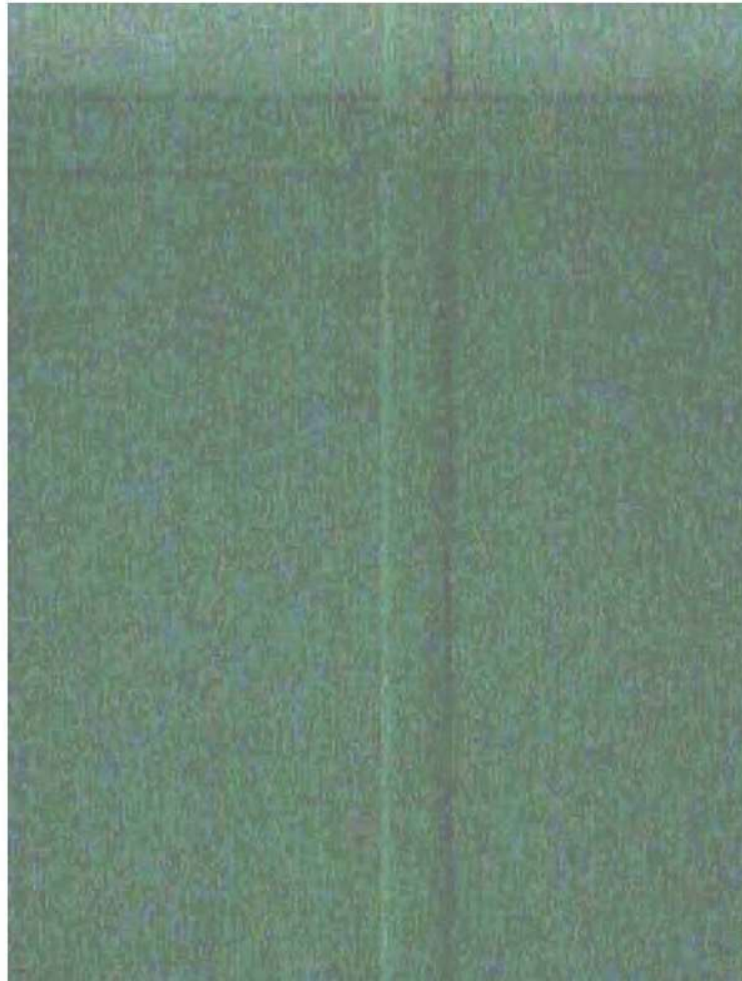
La plastica crea i **pozzetti** in cui caricare i campioni/reagenti



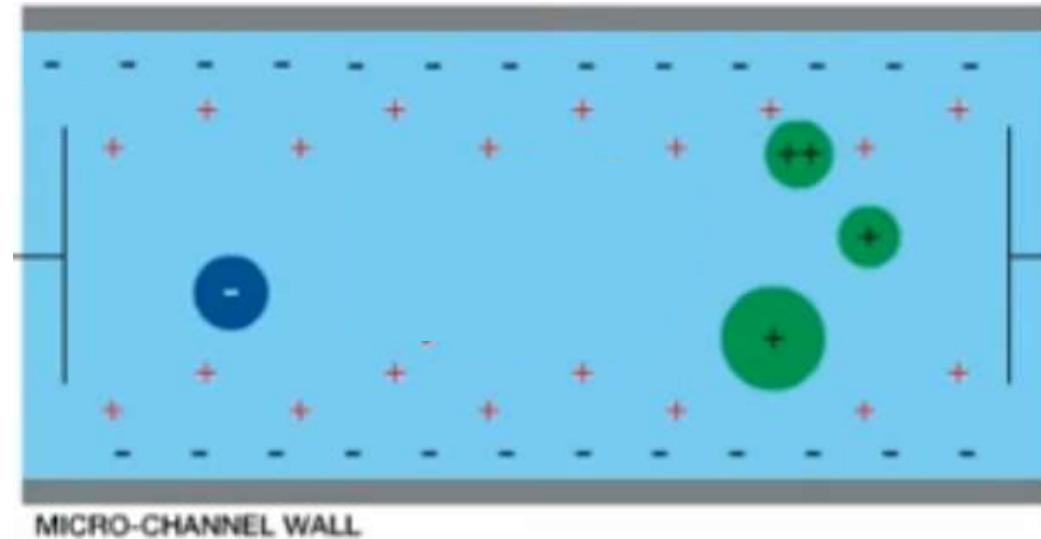
# Zoom su un Chip Experion



# Chip Experion - il sistema microfluidico

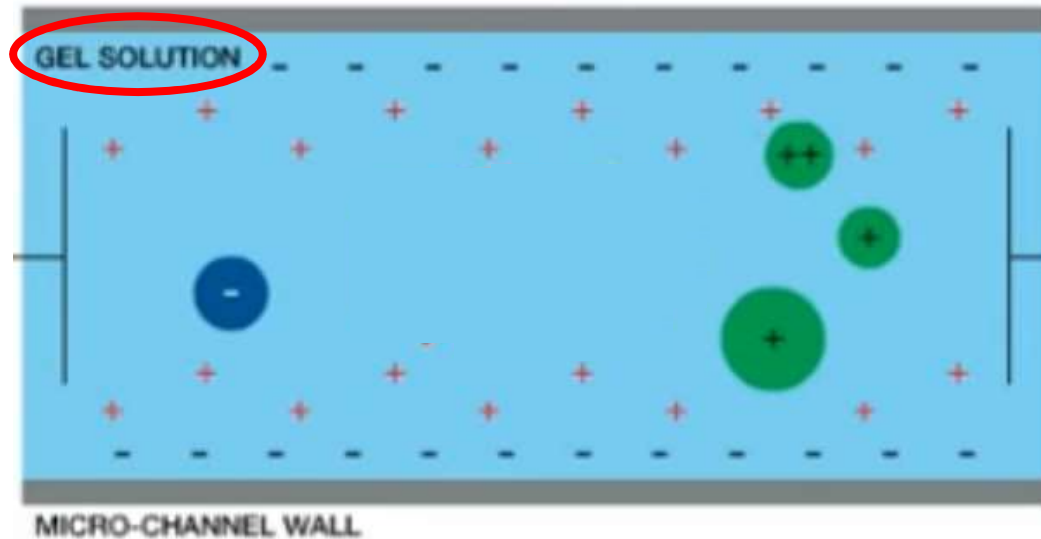


# Come avviene la migrazione



Come separare molecole che hanno  
lo stesso rapporto carica/massa??

# Come avviene la migrazione



Il gel ha un effetto "coating" della superficie interna.

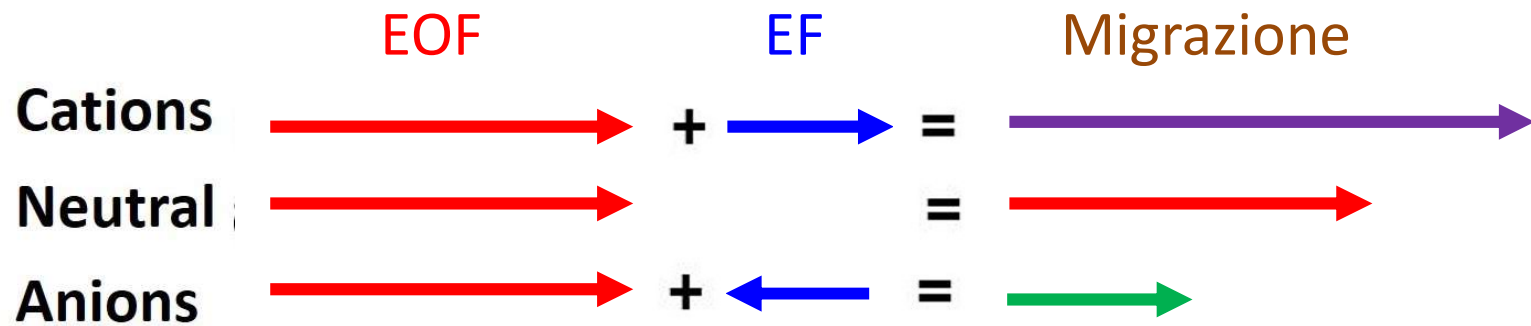
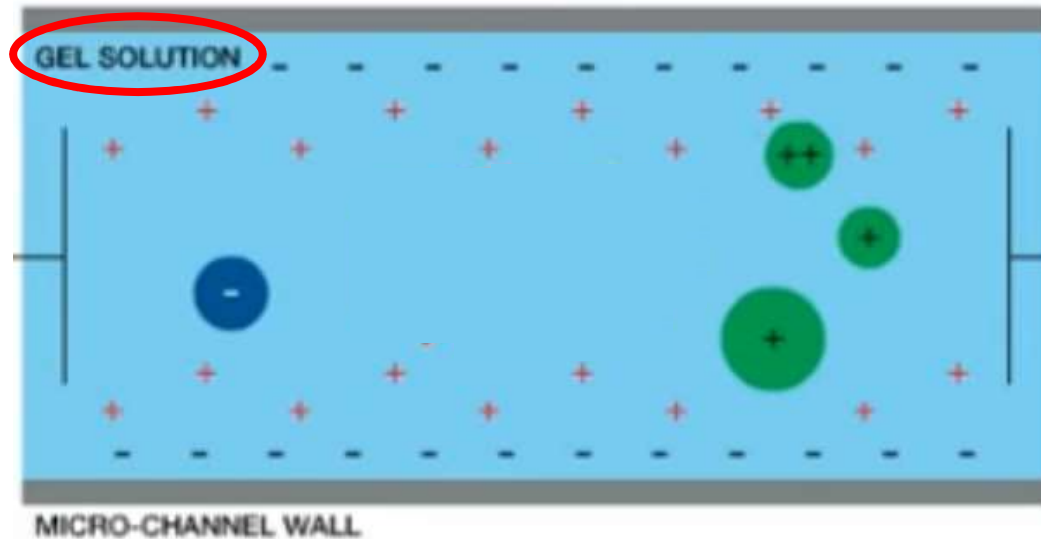


Cosa succede?

Flusso elettroosmotico ,  
elettroforesi  
o entrambi??



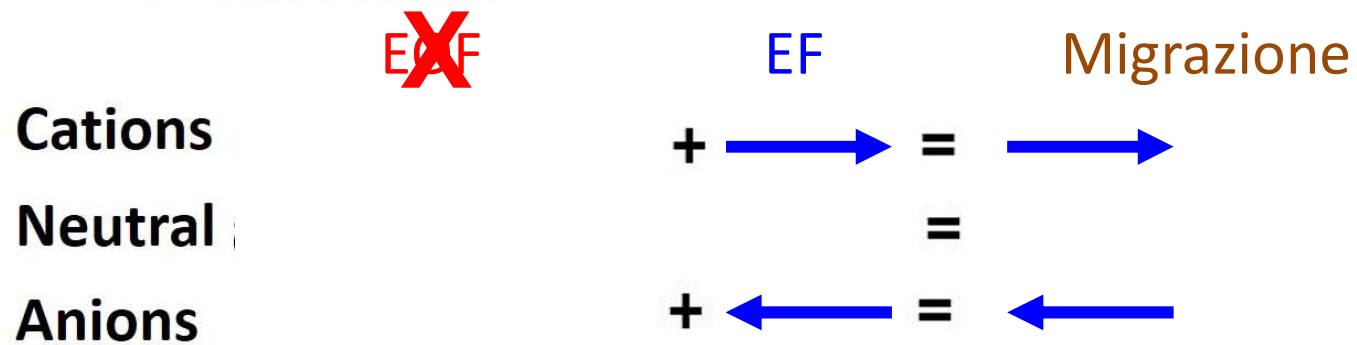
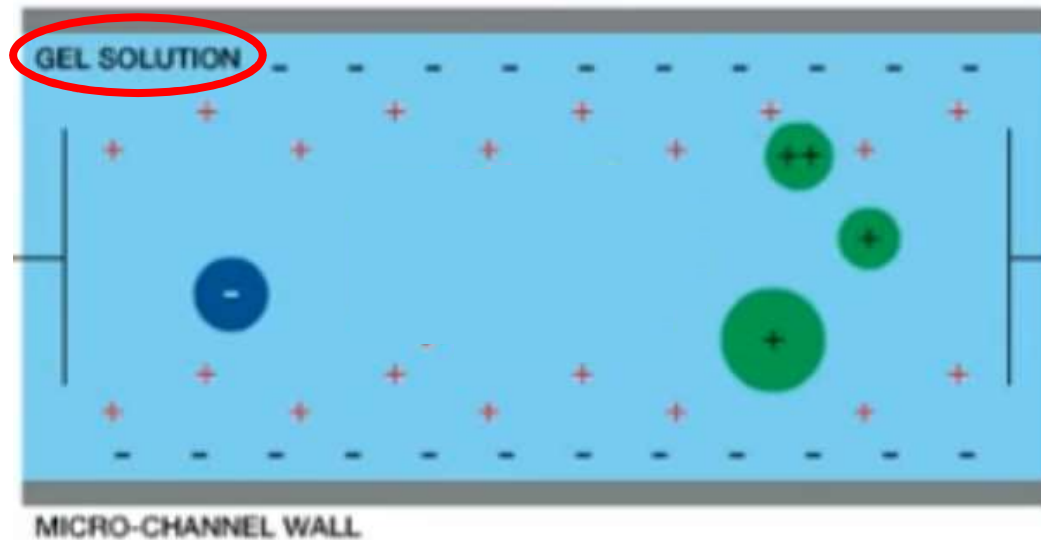
# Come avviene la migrazione



EOF = Flusso elettroosmotico

EF = Elettroforesi

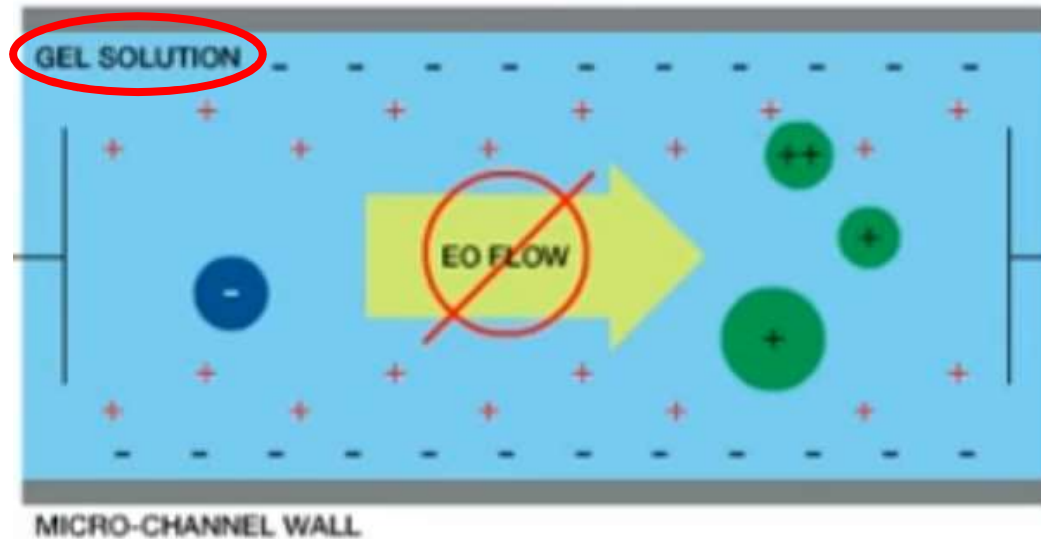
# Come avviene la migrazione



EOF = Flusso elettroosmotico

EF = Elettroforesi

# Come avviene la migrazione



$$V_{\text{migrazione}} = V_{\text{EOF}} + V_{\text{EF}} \longrightarrow V_{\text{EOF}} = 0$$

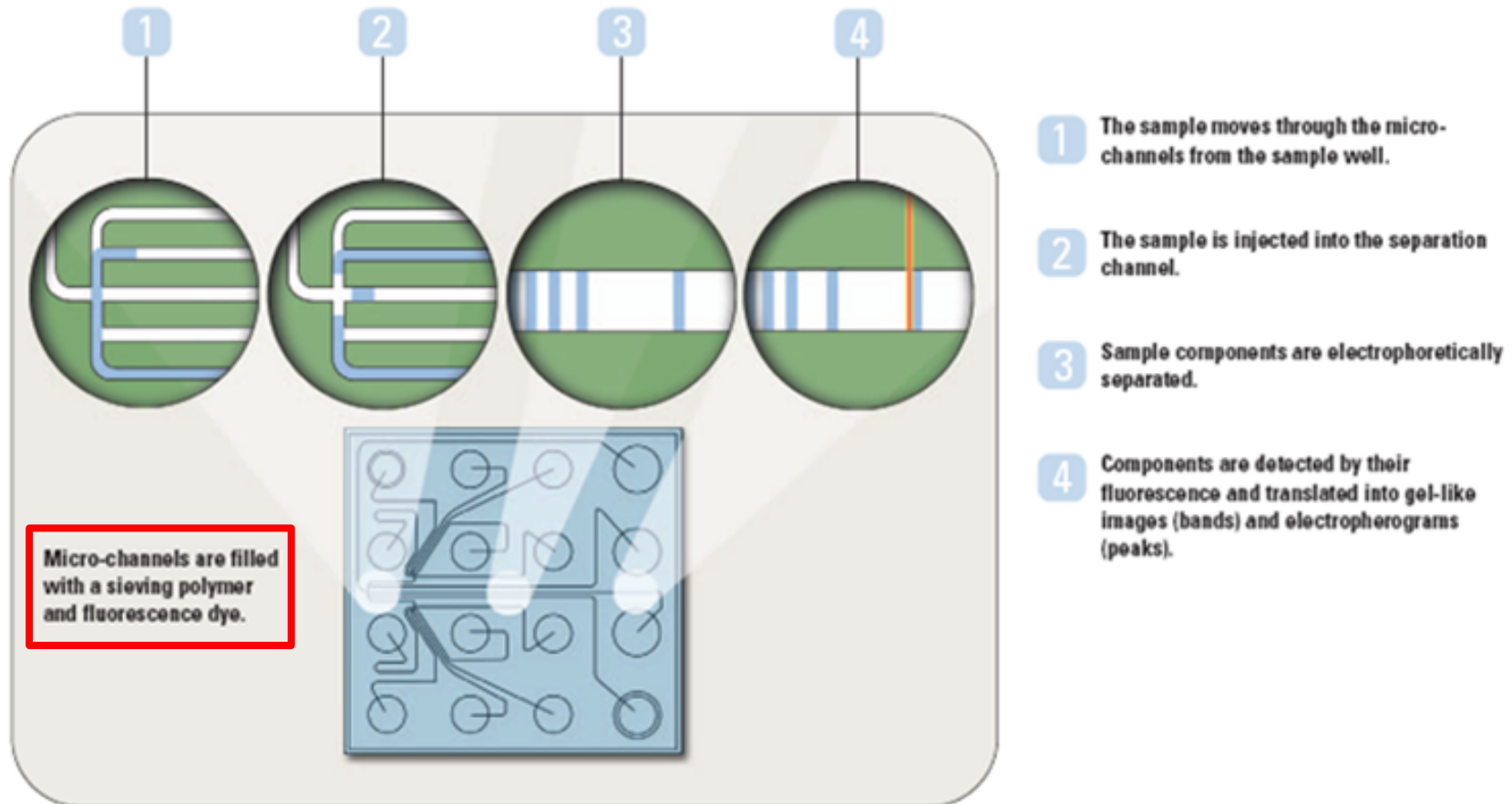
$$V_{\text{migrazione}} = V_{\text{EF}}$$

EOF = Flusso elettroosmotico

EF = Elettroforesi

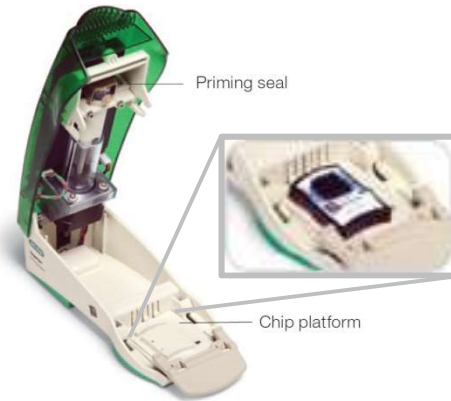
# Come avviene la migrazione

## Il sistema microfluidico



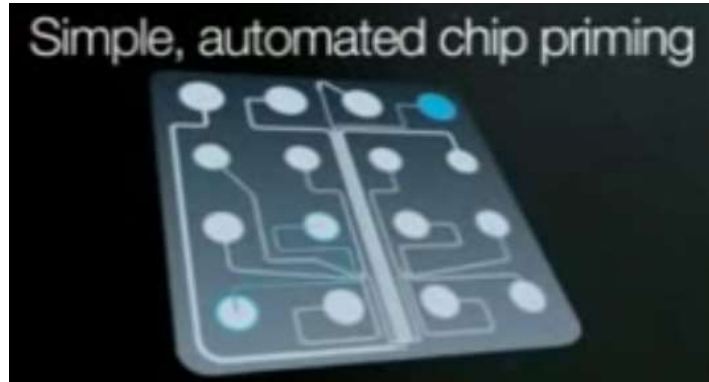
$$V_{\text{migrazione}} = V_{\text{EF}}$$

# Come si procede



## "Priming" del chip

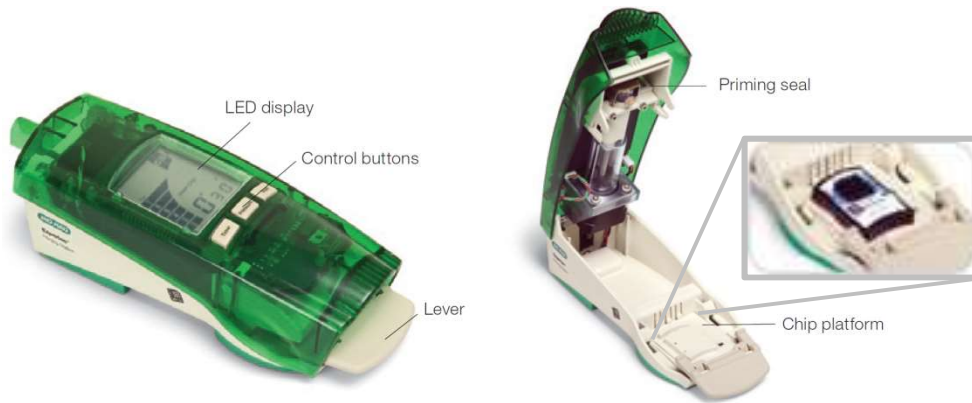
Un sistema a pressione spinge la "gel-stain solution" (componente di gel e di staining), all'interno dei microcanali del chip



"Priming"



# Come si procede



## "Priming" del chip

Un sistema a pressione spinge la "gel-stain solution" (componente di gel e di staining), all'interno dei microcanali del chip



## Caricamento dei campioni






All'interno dei pozzetti numerati

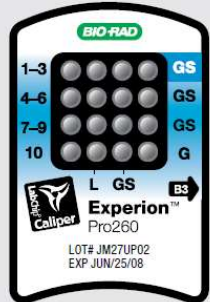


# Chip Experion

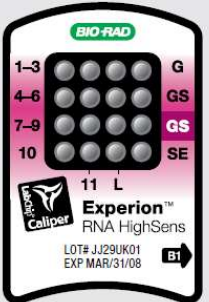
Diversi tipi di chip a seconda del tipo di molecola da analizzare

## Specifications


	 <b>Pro260 Chip</b>	 <b>RNA HighSens Chip</b>	 <b>RNA StdSens Chip</b>	 <b>DNA 1K Assay</b>	 <b>DNA 12K Assay</b>
Number of samples	1–10	1–11	1–12	1–11	1–11
Sample volume	4 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Linear dynamic range	5–2,000 ng/µl BSA	—	—	—	—
Concentration range	5–2,000 ng/µl	100–5,000 pg/µl	5–500 ng/µl	0.1–50 ng/µl	0.1–50 ng/µl
Separation range	10–260 kD	—	—	Between 15 and 1,500 bp	Between 50 and 17,000 bp
Sensitivity	2.5 ng/µl of carbonic anhydrase in 1x PBS	100 pg	5 ng	0.1 ng	0.1 ng




**Experion Pro260 Chip**  
The Pro260 chip enables analysis of up to 10 protein samples (10–260 kD).



**Experion RNA HighSens Chip**  
The RNA HighSens chip enables analysis of up to 11 RNA samples in the 100–5,000 pg/µl range.



**Experion RNA StdSens Chip**  
The RNA StdSens chip enables analysis of up to 12 RNA samples in the 5–500 ng/µl range.



**Experion DNA 1K and 12K Chip**  
DNA chip enables analysis of up to 11 DNA samples (2 assays covering DNA between 15 and 17,000 bp) in the 0.1–50 ng/µl range.

L, ladder; SE, sensitivity enhancer

# Come si procede



## "Priming" del chip

Un sistema a pressione spinge la "gel-stain solution" (componente di gel e di staining), all'interno dei microcanali del chip



## Caricamento dei campioni

All'interno dei pozzetti numerati

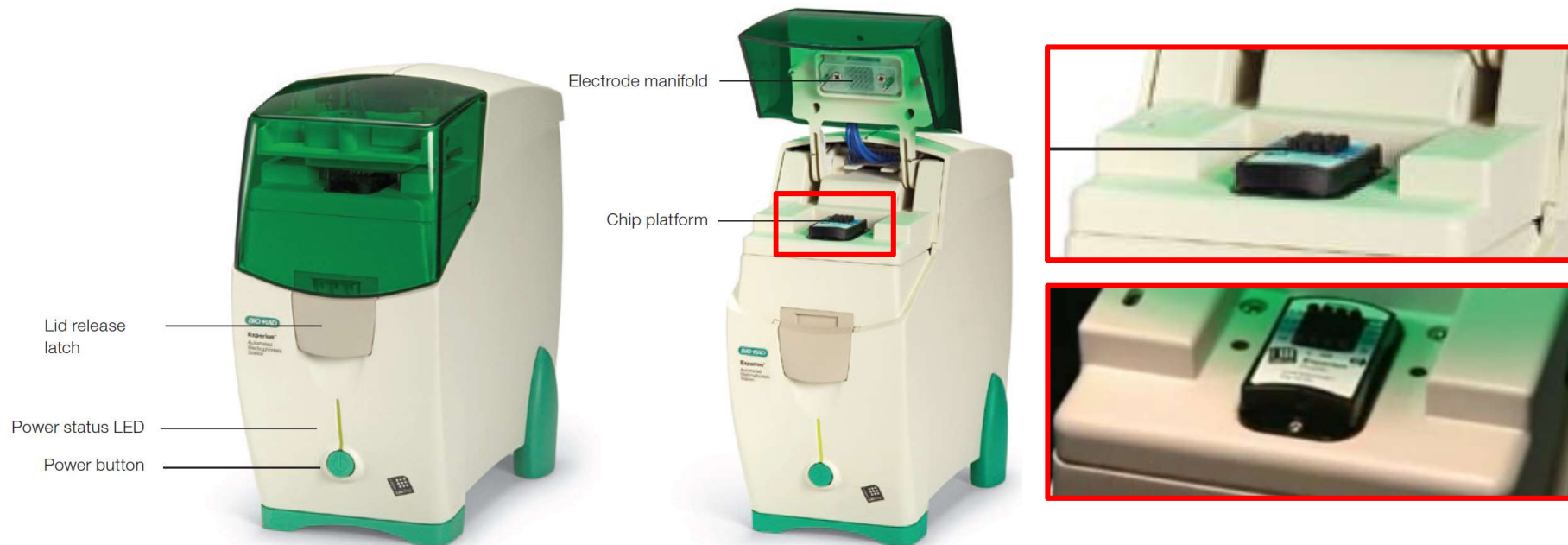


## Vortex

Completa miscelazione ed omogenizzazione dei campioni

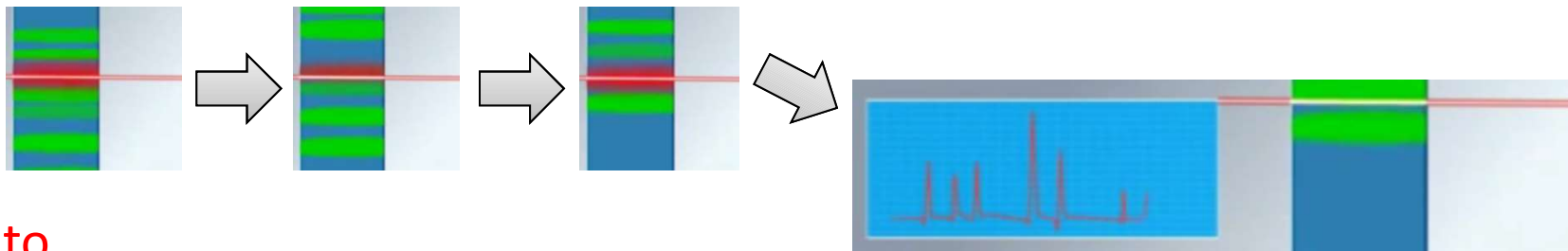


# Come si procede



## Rivelazione del campioni

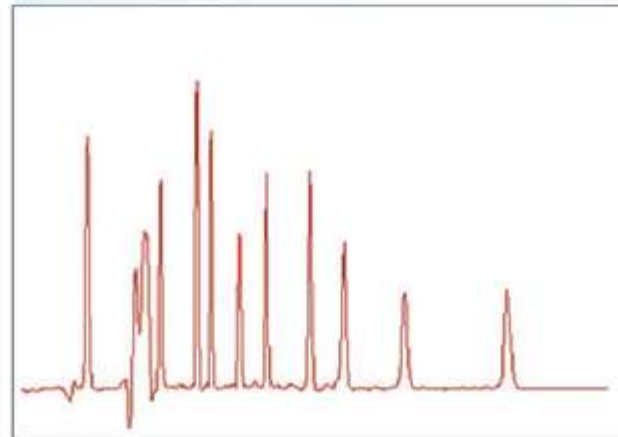
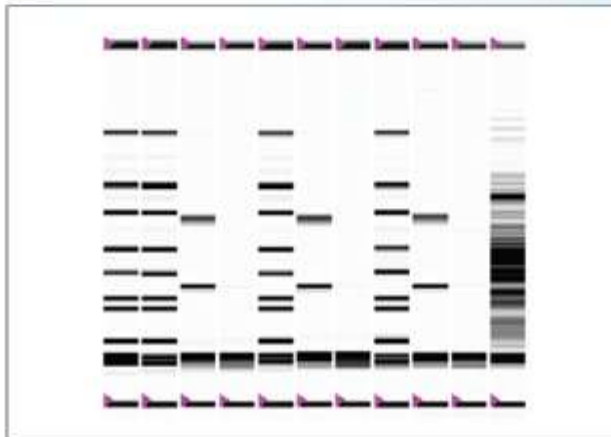
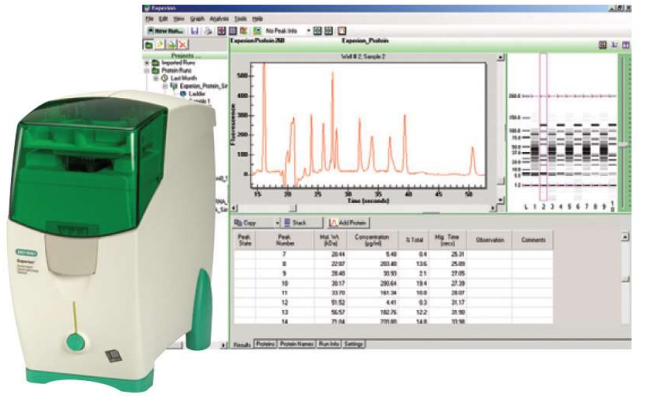
Alla fine della migrazione, un laser eccita la molecola di "staining" legata alle proteine o ai frammenti di molecole di DNA/RNA



## Risultato

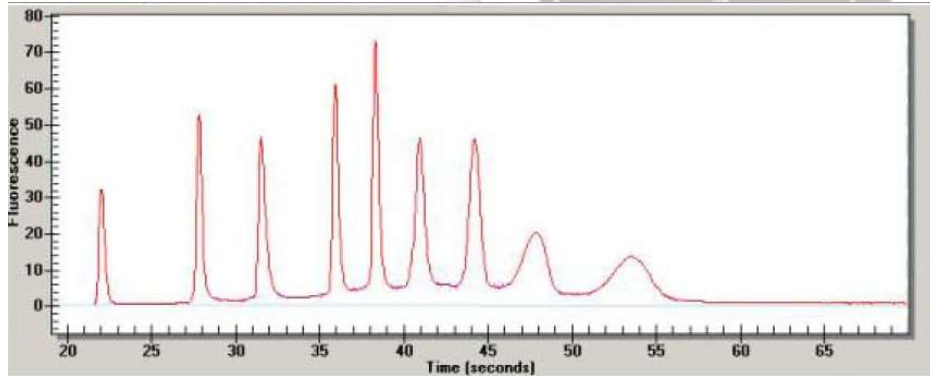
Elettroferogramma con emissione di **fluorescenza** in funzione del tempo

# Risultato di un'analisi



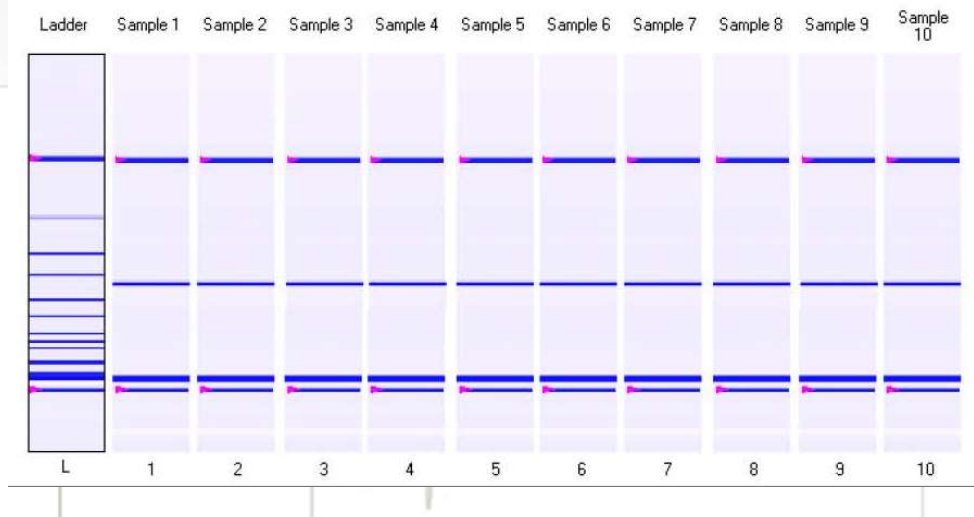
# Risultato di un'analisi

FLUORESCENZA

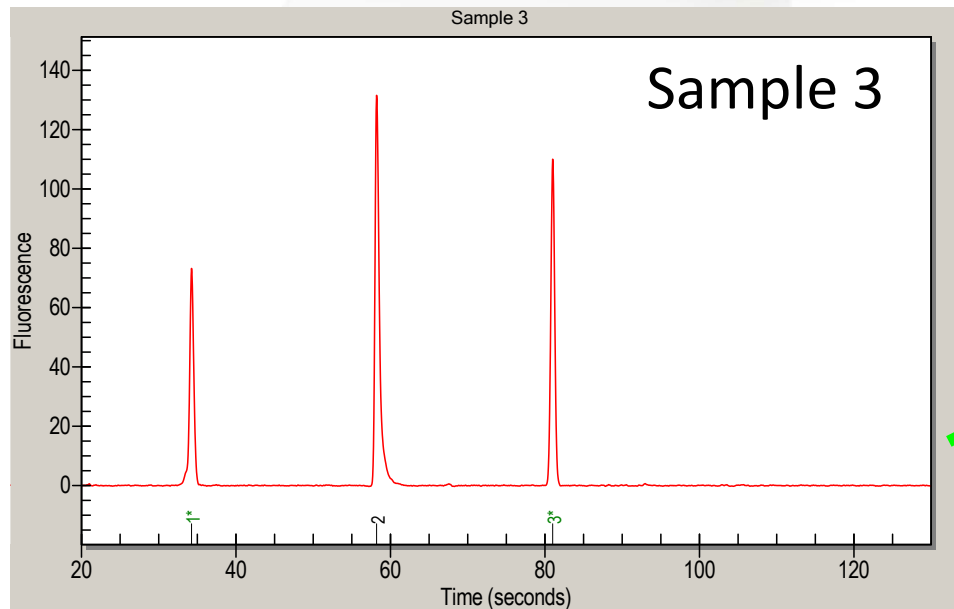
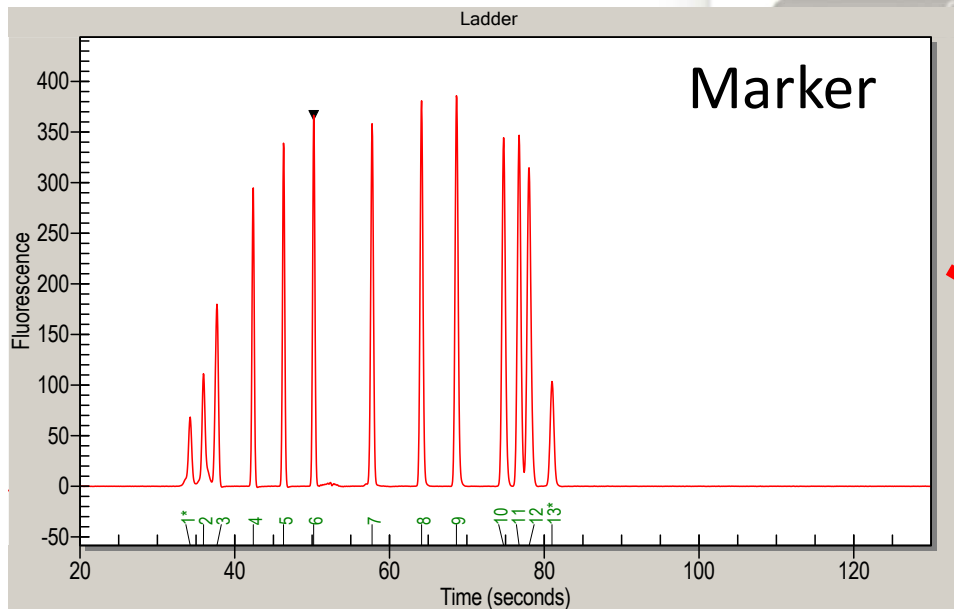


Visualizzazione dei  
campioni rilevati in  
forma di  
**elettroferogramma**

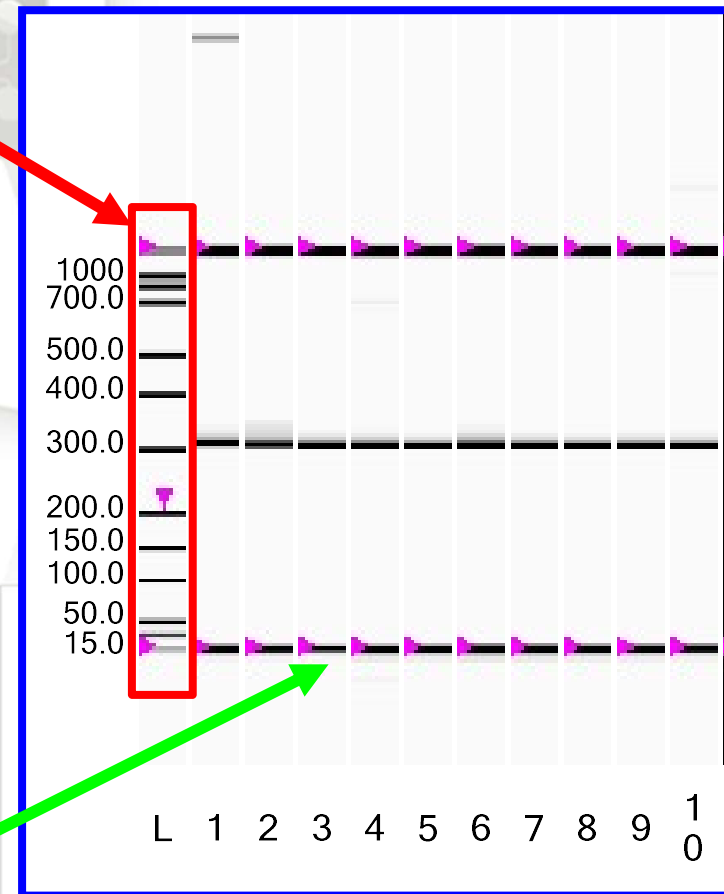
Visualizzazione dei  
campioni rilevati in  
forma di  
**gel (virtuale)**



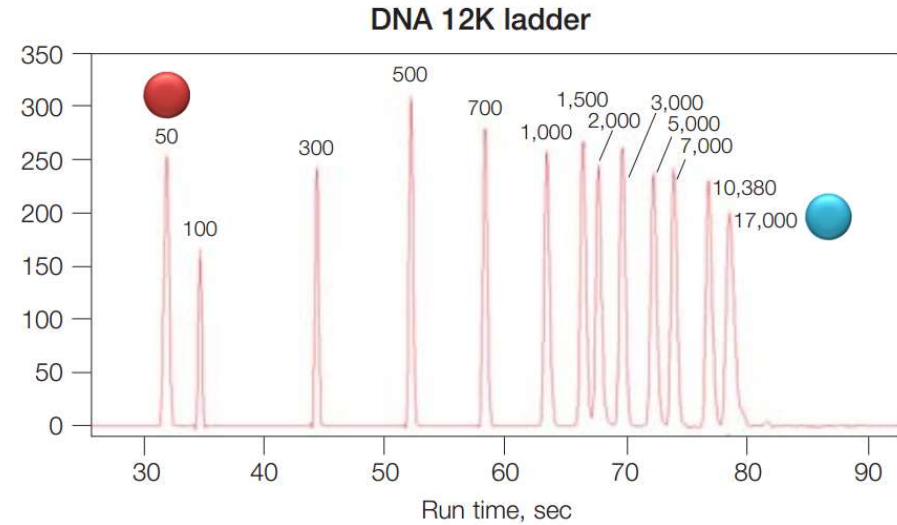
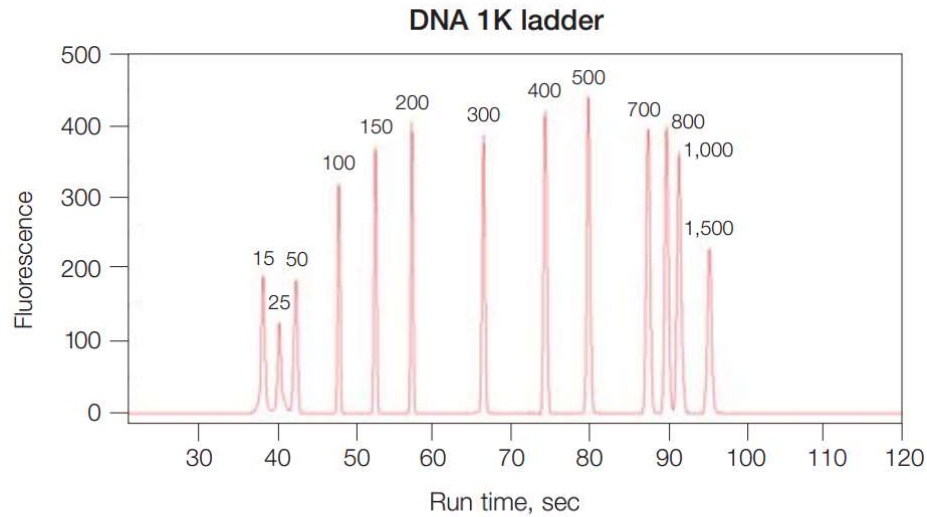
# Risultato di un'analisi



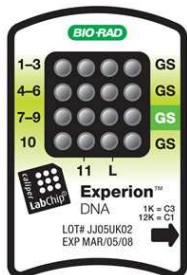
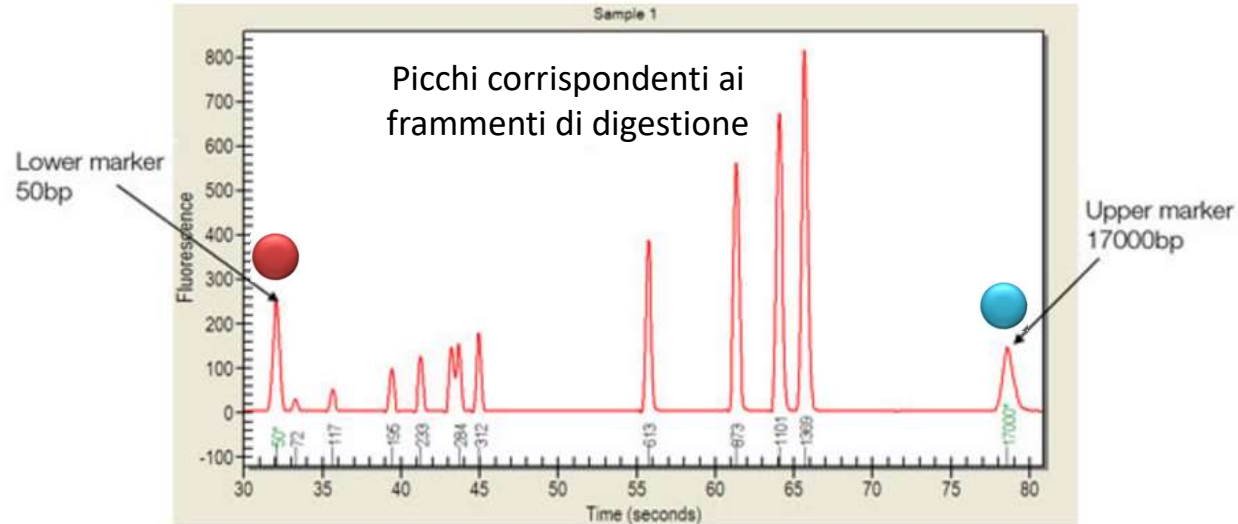
## Corsa virtuale



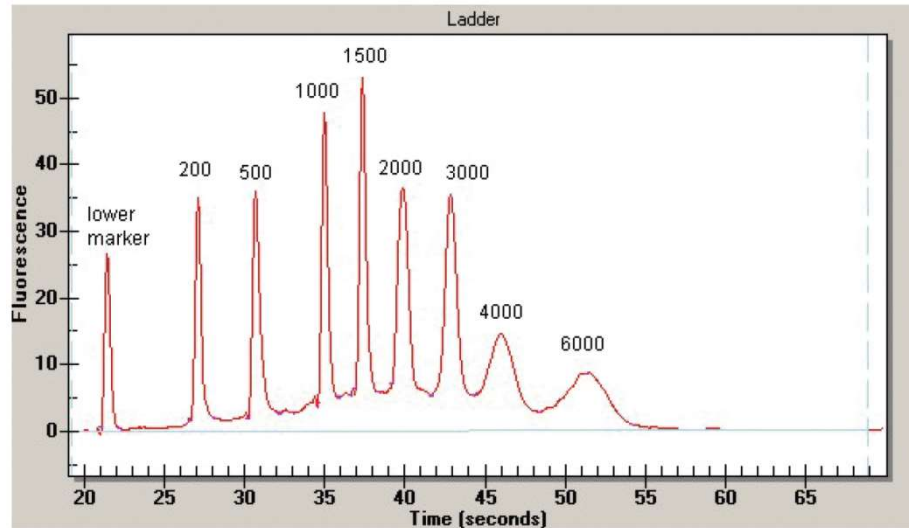
# Esempio di analisi sul DNA



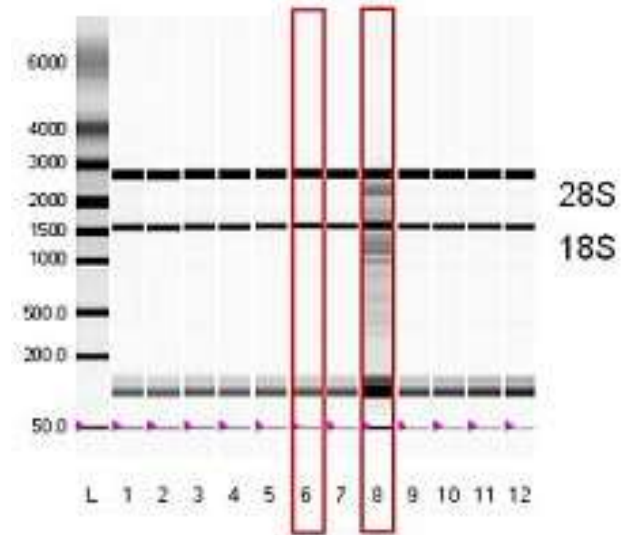
es. Restrizione enzimatica di un plasmide



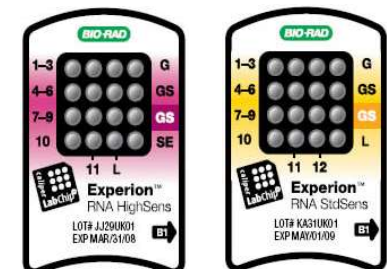
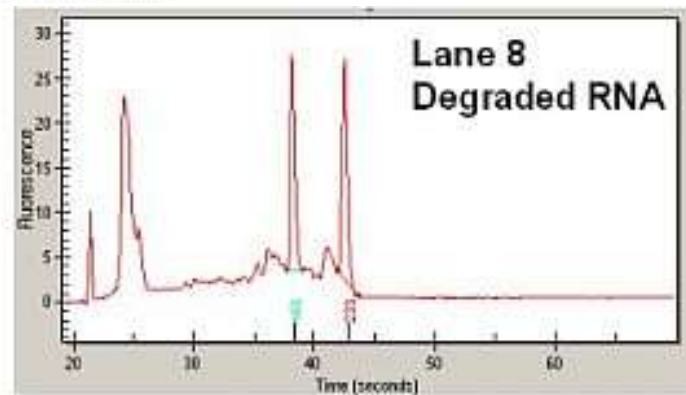
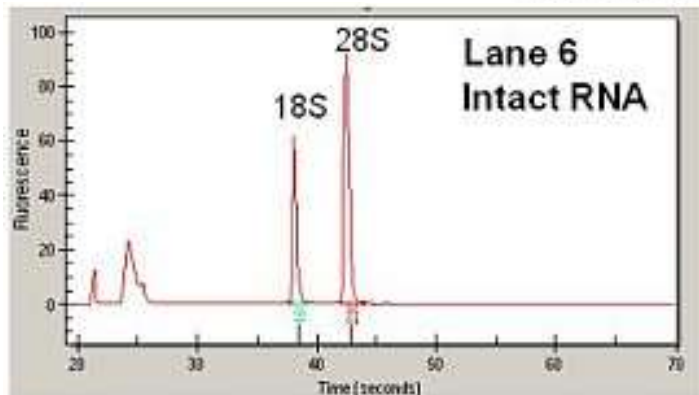
# Esempio di analisi su RNA totale



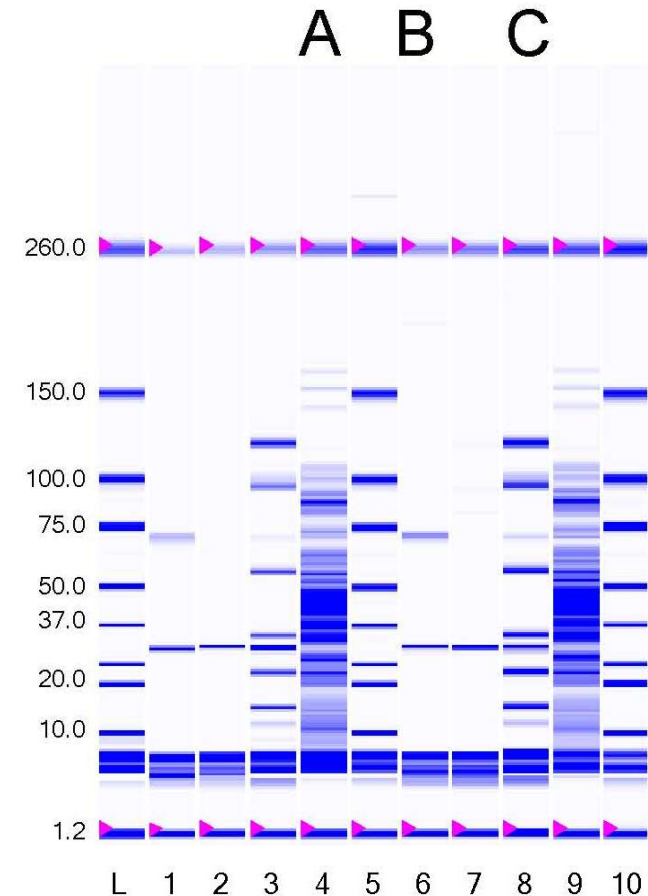
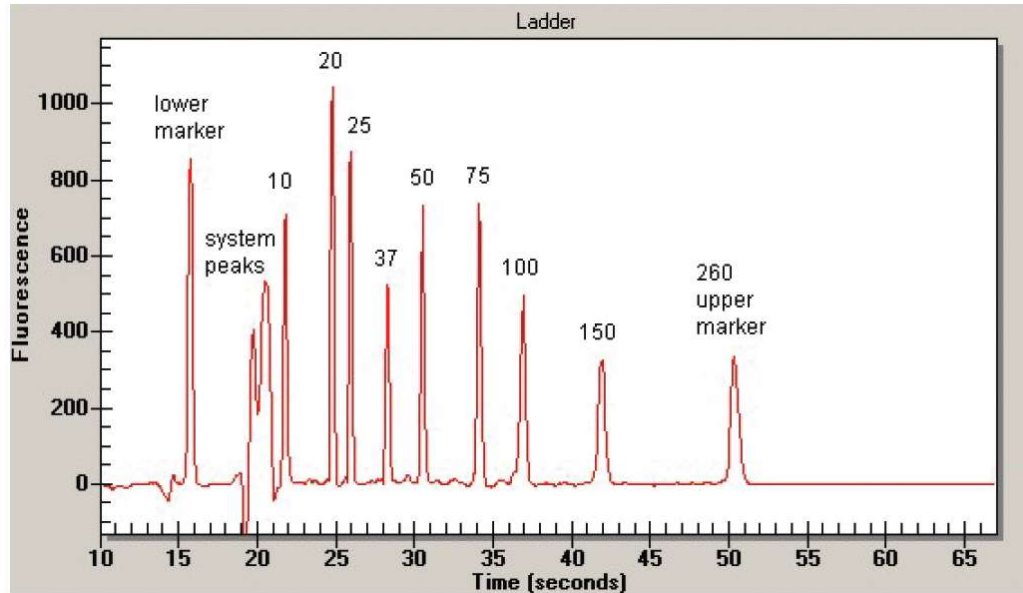
Virtual Gel Image is generated from the electropherograms



Electropherogram Traces From Human RNA 50 ng/ $\mu$ l



# Esempio di analisi delle proteine



Assay: Pro260

Sample: "A" = E. coli lysate



"B" = Carbonic Anhydrase  
+ BSA

"C" = Protein mix 14 – 117 kD