

Daniela Laura Pălărie

Ion Pălărie

**STUDIUL ELECTROFORETIC
AL HEMOGLOBINEI ȘI PROTEINELOR SERICE
APLICAȚII CLINICE**



**EDITURA UNIVERSITARIA
Craiova, 2013**

Referenți științifici:
Prof.univ.dr. Mircea Preda
Conf.univ.dr. Cristian Tigae

Copyright © 2013 Universitaria
Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

PĂLĂRIE, DANIELA LAURA

**Studiul electroforetic al hemoglobinei și proteinelor serice :
aplicații clinice / Daniela Laura Pălărie, Ion Pălărie. - Craiova :**
Universitaria, 2013

Bibliogr.

ISBN 978-606-14-0585-5

I. Pălărie, Ion

616.155.16-073:543.545.2

612.124:543.545.2

Apărut: 2013

TIPOGRAFIA UNIVERSITĂȚII DIN CRAIOVA

Str. Brestei, nr. 156A, Craiova, Dolj, România

Tel.: +40 251 598054

Tipărit în România

Introducere

Electroforeza este un fenomen fizico-chimic cunoscut de la începutul secolului al XIX-lea când F. Reiss a observat că particulele de argilă în apă, sub acțiunea unui câmp electric, se deplasează spre electrodul pozitiv. Denumirea de electroforeză a luat naștere prin asocierea a două cuvinte din limba greacă veche: elektron = chihlimbar și phoresis = deplasare. Electroforeza, ca metodă de separare a început să fie folosită la sfârșitul secolului al XIX-lea, dar pentru analiza unor amestecuri de proteine a fost utilizată cu succes prima dată în 1937 de Tiselius.

Treptat, de la electroforeza în mediu liber a lui Tiselius s-a trecut la electroforeza pe medii suport (hârtia de filtru, acetatul de celuloză, gelul de agaroză, gelul de poliacrilamidă, etc.).

Diversitatea proteinelor ce au putut fi analizate electroforetic s-a extins pe măsură ce tehnicile s-au perfecționat. În prezent, electroforeza permite separarea unui număr foarte mare de proteine sanguine: proteine serice, lipoproteine, enzime, glicoproteine, hemoglobine, acizi nucleici precum și diverse proteine din lichide și țesuturi biologice, contribuind astfel la diagnosticarea multor afecțiuni.

În această lucrare prezentăm studiile pe care le-am efectuat utilizând electroforeza unor proteine de mare interes în chimia clinică: hemoglobina și proteinele serice.

Influența mediului de migrare asupra separării și determinării electroforetice a proteinelor serice s-a studiat utilizând două metode electroforetice: electroforeza pe hârtie și electroforeza în gel de agaroză.

Cea mai mare parte a studiilor s-a realizat folosind electroforeza în gel de agaroză datorită faptului că această metodă oferă o rezoluție de separare foarte bună atât pentru proteinele serice cât și pentru hemoglobină.

Determinarea spectrofotometrică a derivaților hemoglobinici a permis obținerea unor corelații între concentrațiile acestora și concentrațiile unor proteine determinate utilizând electroforeza în gel de agaroză.

CONSIDERAȚII TEORETICE

Capitolul 1

Medii de migrare și mecanisme de separare în electroforeză

1.1 Mărimi caracteristice electroforezei

Electroforeza este o metodă analitică și preparativă de separare a particulelor sau ansamblurilor de particule încărcate electric, sub acțiunea unui câmp electric uniform aplicat din exterior.

Metoda are la bază fenomenul fizico-chimic de deplasare sau migrare diferită a speciilor de particule într-un câmp electric. Deplasarea se face spre unul din electrozi, fără ca între aceștia și componentele separate să aibă loc reacții. Particulele pot fi: ioni simpli, macromolecule, celule vii sau materiale inerte (emulsii de ulei).

O particulă încărcată electric, aflată într-un mediu lichid tamponat, se va deplasa sub acțiunea unui câmp electric uniform cu o viteză constantă determinată de acțiunea a patru forțe [1].

Forța de atracție electroforetică, \vec{F}_1 , egală cu produsul dintre sarcina Q a particulei și intensitatea \vec{E} a câmpului electric aplicat,

$$\vec{F}_1 = Q\vec{E}. \quad (1.1)$$

Forța de frecare Stokes, \vec{F}_2 , proporțională cu coeficientul de vâscozitate dinamică a mediului η , raza particulei r și viteza electroforetică \vec{v} ,

$$\vec{F}_2 = 6\pi\eta r \vec{v}. \quad (1.2)$$

Produsul $6\pi\eta r = f$ se numește coeficient de frecare.

Forța de frânare electroforetică, \vec{F}_3 , rezultată ca urmare a atracției exercitate de câmpul electric asupra ionilor electrolitului (soluția tampon în care se deplasează particula),

$$\vec{F}_3 = (Q - \varepsilon \cdot \zeta \cdot r) \vec{E}, \quad (1.3)$$

unde ε este permitivitatea dielectrică a mediului iar ζ este potențialul electrocinetic al particulei.

Forța datorată efectului de relaxare, \vec{F}_4 ; efectul de relaxare apare din cauza redistribuirii ionilor electrolitului în apropierea particulei, sub acțiunea câmpului electric uniform.

Imediat după aplicarea câmpului electric, suma vectorială a celor patru forțe devine egală cu zero,

$$\vec{F}_1 + \vec{F}_2 + \vec{F}_3 + \vec{F}_4 = 0, \quad (1.4)$$

iar viteza electroforetică \vec{v} devine constantă.

În cazul electroforezei în medii stabilizante de tipul gelului de amidon sau al gelului de poliacrilamidă, forța de frânare electroforetică \vec{F}_3 și forța datorată efectului de relaxare \vec{F}_4 sunt neglijabile. Astfel relația (1.4) devine

$$\vec{F}_1 + \vec{F}_2 = 0. \quad (1.5)$$

Folosind relațiile (1.1) și (1.2), relația (1.5) capătă forma

$$Q \vec{E} + 6\pi\eta r \vec{v} = 0, \quad (1.6)$$

de unde obținem expresia vitezei electroforetice

$$\vec{v} = -\frac{Q \vec{E}}{6\pi\eta r}. \quad (1.7)$$

Modulul vitezei electroforetice va fi deci

$$v = \frac{Q \cdot E}{6\pi\eta r}.$$

Masa unei particule de rază r și densitate ρ este

$$M = \rho \frac{4}{3} \pi r^3. \quad (1.8)$$

Din ultima relație deducem că raza r a particulei este proporțională cu $M^{1/3}$, deci $r \sim M^{1/3}$. Deoarece coeficientul de frecare $f = 6\pi\eta r$ și $r \sim M^{1/3}$ rezultă că f este proporțional cu $M^{1/3}$, adică $f \sim M^{1/3}$.

Viteza electroforetică v este direct proporțională cu Q și cu E dar invers proporțională cu r . Folosind faptul că $r \sim M^{1/3}$ obținem $v \sim \frac{Q \cdot E}{M^{1/3}}$.

Astfel, viteza electroforetică este direct proporțională cu intensitatea câmpului electric E și cu raportul $\frac{Q}{M^{1/3}}$.

Mobilitatea electroforetică, μ , se definește ca raportul dintre viteza electroforetică și intensitatea câmpului electric

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi\eta r}. \quad (1.9)$$

Din relația (1.9) se observă că mobilitatea electroforetică depinde de raportul Q/r , adică particulele pentru care acest raport este identic au mobilități electroforetice identice.

Deoarece viteza electroforetică poate fi exprimată ca raportul dintre distanța de migrare d și intervalul de timp t ,

$$v = \frac{d}{t}, \quad (1.10)$$

mobilitatea electroforetică se poate exprima și prin relația

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{d}{tE}. \quad (1.11)$$

Mobilitatea relativă, μ_{rel} , se definește ca raportul dintre distanța d , de migrare a unei benzi și distanța de migrare d_{col} , a frontului de colorant [2]

$$\mu_{rel} = \frac{d}{d_{col}}. \quad (1.12)$$

Mobilitatea relativă se utilizează pentru a compara migrarea unei proteine de la un mediu suport la altul, fără a ține seama de lungimea mediului suport sau durata electroforezei.

Mobilitatea relativă a unei benzi polipeptidice depinde de dimensiunea polipeptidului. Folosind un set de proteine standard cu greutatea moleculară cunoscută, se poate obține o curbă standard a dependenței mobilității relative de greutatea moleculară, care permite estimarea greutăților moleculare pentru proteine necunoscute.

În electroforeza într-un mediu stabilizant, particulele cu mobilități electroforetice diferite se vor deplasa ca zone distincte. Teoretic, separarea diferitelor fracțiuni sub formă de zone distincte este realizabilă dacă mobilitățile relative sunt suficient de diferite și dacă distanța de migrare este suficient de mare. Astfel, eficiența unei separări electroforetice este exprimată printr-o mărime numită *rezoluție de separare* notată R_s . Rezoluția de separare pentru două tipuri de particule, care formează două zone (1 și 2), se exprimă astfel

$$R_s = \frac{2 \cdot \Delta d}{l_1 + l_2}, \quad (1.13)$$

unde Δd reprezintă distanța dintre centrele zonelor 1 și 2, iar l_1 și l_2 lățimile zonelor formate de cele două tipuri de particule. Drumul parcurs de o particulă în procesul de separare electroforetică este dat de produsul dintre viteza electroforetică și timpul de migrare

$$d = v \cdot t. \quad (1.14)$$

Pe baza relației (1.11) se poate scrie

$$d = \mu \cdot t \cdot E, \quad (1.15)$$

de unde obținem

$$\Delta d = d_1 - d_2 = (\mu_1 - \mu_2) \cdot t \cdot E. \quad (1.16)$$

Folosind relațiile (1.13) și (1.16), rezoluția de separare poate fi rescrisă în forma

$$R_s = \frac{2 \cdot (\mu_1 - \mu_2) \cdot t \cdot E}{l_1 + l_2}. \quad (1.17)$$

Se consideră că pentru o separare electroforetică eficientă este necesar să fie îndeplinită condiția $1 < R_s < 1,5$.

Se observă că un rol hotărâtor în separarea a două particule diferite îl are lățimea zonelor (l_1 și l_2), care este asociată cu o dispersie de tip Gauss, datorită caracterului aleator al procesului de deplasare. *Dispersia totală*, în cazul electroforezei, este suma a cinci termeni care acționează independent: difuzia termică, microeterogenitatea, difuzia turbulentă, electrodifuzia și electrosorbția. Pentru electroforeza în mediu liber prezintă importanță numai contribuțiile difuziei termice și a microeterogenității, iar pentru electroforeza în mediu stabilizant contribuțiile difuziei termice și ale difuziei turbulente. Astfel rezultă că pentru creșterea rezoluției este preferabil să crească intensitatea câmpului electric E și nu timpul de migrare [3].

Yarmola și colaboratorii au arătat că difuzia nu este cauza predominantă a lărgirii benzilor separate în gelurile de agaroză și că lărgimea benzilor depinde liniar de distanța și timpul de migrare [4]. Prin intermediul unui alt studiu, Yarmola și Chrambach au analizat influența unor factori (gradientul de temperatură, încălzirea prin efect Joule, diferența de conductivitate dintre analit și tampon, electroosmoza, microeterogenitatea datorată diferențelor de densități de sarcină, etc.) asupra lărgirii benzii asociate proteinei R-phycoerythrin analizată prin electroforeza în gel de agaroză și electroforeza în gel de poliacrilamidă [5]. Aceștia au arătat că nici unul dintre factorii analizați nu este cauza majoră a lărgirii benzii, au confirmat dependența liniară a

lărgimii benzii de distanța de migrare și au descris panta acestei dependențe în funcție de condițiile electroforetice.

De asemenea, în calculul rezoluției trebuie luat în considerare și pH-ul soluției tampon care afectează mobilitatea electroforetică, deoarece sarcina electrică netă depinde de pH. Rezoluția mai depinde și de difuzia post electroforeză, care este strâns legată de metoda electroforetică utilizată.

Mobilitatea electroforetică depinde atât de factori care sunt proprii particulei (mărimea, forma, sarcina electrică, concentrația și gradul de hidratare și disociere) cât și de cei caracteristici mediului de separare (vâscozitatea, pH-ul, intensitatea câmpului electric, timpul de migrare). Se știe că pH-ul soluției tampon afectează sarcina electrică netă a particulelor. De exemplu, proteinele conțin lanțuri polipeptidice care au cel puțin două grupări terminale ionizabile: grupa amino și grupa carboxil. Aceste sarcini sunt responsabile de migrarea proteinelor în câmp electric. La pH mare, grupările carboxil (-COOH) sunt încărcate negativ iar grupările amino (-NH₂) sunt neutre. La pH mic, grupările carboxil sunt neutre iar grupările (-NH₂) sunt încărcate pozitiv. Astfel, trebuie să existe un pH intermediar la care proteina nu are sarcină electrică netă și nu migrează în câmp electric. Această valoare a pH-ului se numește punct izoelectric. La un pH mai mare decât punctul izoelectric, o proteină este încărcată negativ și când proba este aplicată pe gel, la capătul dinspre electrodul negativ, aceasta va migra către electrodul pozitiv. Viteza de migrare a unei proteine în câmp electric depinde de densitatea sa de sarcină (raportul dintre sarcină și masă); cu cât densitatea de sarcină este mai mare cu atât proteina se va deplasa mai repede. De exemplu, albumina serică, ce are punctul izoelectric 4,7, va avea o sarcină negativă mare într-o soluție tampon de pH=8,6 comparativ cu γ -globulinele care au punctul izoelectric 7,2. De aceea, la pH=8,6 albumina va migra către electrodul pozitiv cu viteză mai mare decât γ -globulinele.

Mobilitatea electroforetică este influențată semnificativ și de tăria ionică a soluției tampon și de temperatura mediului de migrare.

Tăria ionică, j , este definită ca semisuma termenilor obținuți prin înmulțirea concentrației molare, c , a fiecărui ion din soluție, cu pătratul valenței sale, z :

$$j = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i \cdot z_i^2. \quad (1.18)$$

Mobilitatea electroforetică este aproximativ invers proporțională cu rădăcina pătrată a tăriei ionice:

$$\mu \sim \frac{1}{\sqrt{j}}. \quad (1.19)$$

Utilizarea soluțiilor tampon cu țării ionice mici conduce la mobilități electroforetice mari, deci viteze de migrare mari. În schimb, țăriile ionice mari dau viteze de migrare mai lente, timpii de migrare necesari sunt mai mari iar rezoluția de separare a zonelor este mai bună.

Din păcate, cu cât este mai mare țaria ionică a soluției tampon, cu atât crește conductivitatea și, prin urmare, cantitatea de căldură degajată prin efectul termic Joule. Temperatura ridicată produce creșterea vitezelor de difuzie a ionilor și, totodată, o creștere a mobilității. În același timp, vâscozitatea mediului scade odată cu creșterea temperaturii. În felul acesta, scade rezistența electrică și, la tensiune constantă, curentul va crește, sporind și mai mult producerea de căldură. Din această cauză, alegerea țării ionice a soluției tampon este foarte importantă, ea determinând efectiv puterea electrică ce poate fi aplicată sistemului [6].

Factorii de influență luați în discuție până acum sunt prezenți la toate formele de electroforeză, fie în soluție liberă (electroforeza frontală) fie în medii stabilizante (gelurile de amidon și poliacrilamidă, acetatul de celuloză, hârtia). Cu toate acestea, la utilizarea unui mediu suport, pot intervenii factori suplimentari ce influențează mobilitatea electroforetică și rezoluția separării. Aceștia se referă la efectele de adsorbție pe suport, neomogenitățile matricei suport, schimburile ionice cu grupările încărcate electric ale moleculelor suport și electroosmoza (care apare datorită grupărilor încărcate electric din mediul suport).

Electroosmoza este un fenomen electrocinetic, reciproc electroforezei, care apare în urma deplasării fazei lichide de dispersie într-un capilar, sistem de capilare sau mediu poros la aplicarea unui câmp electric exterior [7]. În unele medii suport stabilizante, de exemplu hârtia de filtru și mai ales gelul de agaroză, electroosmoza este corelată cu proporția de sarcini negative ale acestora. Particulele încărcate pozitiv și moleculele fazei lichide asociate lor, într-un sistem electroforetic cu polaritate negativă, vor migra împreună spre catod sub forma unui flux de lichid. Cum deplasarea particulelor încărcate negativ (proteine, acizi nucleici, etc.), care urmează a fi separate, se face spre anod, electroosmoza poate să influențeze negativ separarea propriu-zisă, prin convecție internă. Așa se explică includerea sa în categoria factorilor care influențează mobilitatea electroforetică și rezoluția de separare.

1.2 Electroforeza în mediu liber

Electroforeza în mediu liber este cea mai veche metodă și a fost introdusă de Tiselius în 1937 pentru separarea proteinelor serice [8]. Ulterior, s-au adus îmbunătățiri atât metodei cât și aparatului folosite. În plus s-au pus