

## Parametry prądowe rozdziału elektroforetycznego

Elektroforezę cząsteczek DNA/RNA lub białek zachodzącą w porowatym nośniku, jakim może być żel np. poliakrylamidowy lub agarozowy, można traktować jako rozdział polijonów pod wpływem pola elektrycznego.

Na cząsteczkę posiadającą wypadkowy ładunek elektryczny, znajdującą się w polu elektrycznym, działa siła proporcjonalna do jej ładunku oraz natężenia pola elektrycznego.

$$F_e = q \cdot E, \quad (1)$$

gdzie:  $q$ -ładunek cząsteczki [C],  $E$ - natężenie pola elektrycznego [V/cm].

Im większy jest wypadkowy ładunek elektryczny cząsteczki i natężenie pola elektrycznego – tym większa jest siła działająca na cząsteczkę. Szybkość migracji cząsteczki w żelu jest wypadkową siły  $F_e$  oraz sił oporów ruchu  $F_t$ . Zależy ona od właściwości cząsteczki oraz otoczenia w którym się ona znajduje, nazywana jest ruchliwością elektroforetyczną cząsteczki i oznaczana jako  $m$ .

Natężenie pola elektrycznego  $E$ , definiowane jest jako iloraz napięcia elektrycznego  $U$  (różnicy potencjałów) oraz odległości pomiędzy potencjałami  $l$ .

$$E = U/l, \quad (2)$$

Skąd

$$F = Q \cdot U/l, \quad (3)$$

Im większe napięcie  $U$  - tym większa siła działa na cząsteczkę i szybsza jej migracja, i odwrotnie im większa odległość  $l$  pomiędzy potencjałami (elektrodami), tym mniejsze natężenie pola  $E$  i wolniejsza migracja cząsteczek.

Dlatego aby zapewnić optymalne natężenie pola elektrycznego  $E$  w aparatach większych, o większej odległości pomiędzy elektrodami zwykle prowadzi się elektroforezę przy wyższym napięciu niż w aparatach małych – o małej odległości pomiędzy elektrodami.

### Ciepło Joul'a

Podczas elektroforezy prąd wykonuje w żelu pracę, która powoduje wzrost temperatury żelu. Efekt ten zwiększa dyfuzję polijonów podczas elektroforezy i dlatego limituje użycie bardzo wysokich napięć podczas elektroforezy.

**Ciepło Joul'a w** – definiujemy jako moc wydzielaną w objętości podczas elektroforezy [P/m<sup>3</sup>]

$$w = P/V, \quad (4)$$

gdzie  $w$  - ciepło Joule'a [ $P/m^3$ ],  $P$  - moc prądu [ $W$ ],  
 $V$  - objętość w której wydzielana jest moc [ $m^3$ ]

Ponieważ moc to iloczyn napięcia i natężenia prądu

$$P = U * I, \quad (5)$$

gdzie:  $U$  - napięcie [ $V$ ],  $I$  natężenie prądu [ $A$ ],

a z prawa Ohma

$$I = U/R, \quad (6)$$

gdzie:  $I$  natężenie prądu [ $A$ ],  $U$  napięcie prądu [ $V$ ],  $R$  – opór żelu [ $\Omega$ ],

Z równań (4), (5) i (6) otrzymujemy:

$$w = U^2 / (R * V), \quad (7)$$

Ciepło Joule'a jest więc proporcjonalne do kwadratu napięcia prądu.

Aby nie przegrzać żelu i nie doprowadzić do denaturacji lub nadmiernej dyfuzji biomolekuł (wzrastającej wraz z temperaturą) – rozmyte prążki - stosuje się podczas elektroforezy ograniczone napięcia.

Dla elektroforezy agarozowej DNA/RNA napięcie nie powinno przekraczać 5V/cm co dla aparatu **SUBDNA** daje  $V_{max} = 140$  V, a dla aparatu **SUBMINI**  $V_{max} = 90$  V.

Dla elektroforezy w żelach poliakrylamidowych moc  $P$  wydzielana podczas elektroforezy nie powinna przekraczać 5 [W]. Prowadzenie elektroforezy przy wyższej mocy w aparatach nie posiadających efektywnego systemu odbierania ciepła może powodować dużą dyfuzję bierną cząsteczek (nieostre prążki), nierównomierną migrację związaną z przegrzewaniem się środka żelu (efekt uśmiechu), utratę różnic konformacyjnych (SSCP) lub w przypadku natywnej elektroforezy białek – denaturację białek.

Prowadzenie elektroforezy przy niskim napięciu redukuje moc wydzielaną w żelu – a więc obniża ciepło Joule'a i wpływa pozytywnie na jakość rozdziału elektroforetycznego. W niższej temperaturze dyfuzja bierna biomolekuł podczas elektroforezy jest mniejsza – prążki są bardziej ostre. Prowadzenie elektroforezy przy niskim napięciu (małej mocy) wydłuża jednak proporcjonalnie czas elektroforezy, dlatego dużą zaletą jest możliwość schłodzenia żelu podczas elektroforezy, którą dają aparaty z chłodzeniem (**Submini z chłodzeniem**, **Subdna z chłodzeniem**, **IEF Vertical 2D**, **Horizontal Cer**, oraz **DNA Pointer**).

## Rozdział elektroforetyczny ze stałą mocą.

Rozwiązaniem problemu niekontrolowanego przegrzewania się żeli jest prowadzenie rozdziału elektroforetycznego ze stałą mocą ( $W=const.$ ).

Zasilacze umożliwiające utrzymywanie stałej mocy podczas rozdziału elektroforetycznego np. **Apelex 1006P**, automatycznie dobierają napięcie  $U$  w czasie trwania elektroforezy, aby utrzymać moc  $W$  na stałym zaprogramowanym poziomie.

Z równań (2) i (5) wynika

$$P=U^2/R, \quad (8)$$

gdzie:  $P$ - moc [W],  $U$ - napięcie [V],  $R$ - opór [ $\Omega$ ]

Ponieważ opór żelu  $R$  zazwyczaj rośnie w trakcie elektroforezy, prowadzenie elektroforezy przy stałym napięciu prowadzi do niekontrolowanych zmian mocy wydzielanej w postaci ciepła Joule'a, zaś prowadzenie elektroforezy przy stałej mocy wymaga korekt napięcia.

## Czas elektroforezy:

Podczas prowadzenia rozdziału elektroforetycznego ze stałą mocą długość elektroforezy mierzona w czasie (np. w minutach) nie jest miarodajną wielkością określającą przebieg elektroforezy ze względu na zmiany napięcia  $U$ . Parametrem pozwalającym na w sposób powtarzalny określić długość elektroforezy są **woltogodziny**. Jest to iloczyn napięcia  $U$  oraz czasu mierzony przez zasilacze posiadające integrator  $Vh$  np. **Apelex 1006 P**.

$$Vh=U*T, \quad (9)$$

gdzie:  $Vh$ - woltogodziny [ $V*min$ ],  $U$ - napięcie [V],  $T$ - czas [min.]

Prowadzenie elektroforezy przy stałej mocy, oraz pomiar długości jej trwania przy pomocy woltogodzin, umożliwia prowadzenie rozdziałów elektroforetycznych charakteryzujących się wysoką jakością i dużą powtarzalnością.