

Elektroforézis technikák

Az elektroforézis olyan elválasztási technika, amelynek alapja az ionok elektromos térbeli mozgékonyasága. A pozitív töltésű ionok a negatív elektród irányába vándorolnak, még a negatív töltésűek pedig a pozitív elektród felé. Gyakran biztonsági okokból az egyik elektród a földre van kötve, és a másik potenciálját ehhez képest állítják pozitívvá, vagy negatívvá. Az ionok vándorlási sebessége különböző, ezért lehetséges az elválasztásuk. A vándorlási sebességet az ion teljes töltése, a mérete és formája befolyásolja.

Az elektroforézishez szükséges: erősáramú tápegység, elektródák, puffer és egy közeg, ami a puffert tartalmazza. Ez a közeg lehet szűrőpapír, cellulóz-acetát csík, többféle gél vagy kapilláris cső.

Maga az elválasztás művelete hasonlít a centrifugálásra, illetve az ülepedésre leírás szempontjából, mert itt is két erő hat egy adott molekulára. Az elektromos erő gyorsítja, a közegellenállás fékezi. Lesz egy adott vándorlási sebesség, mely függ: a töltéstől, a molekula méretétől és a rendszer viszkozitásától.

Az elektroforetikus mozgékonyaság:

$$\mu = \frac{q}{3d\pi\eta}$$

ahol μ az elektroforetikus mozgékonyaság

q a töltés nagysága

η a viszkozitás

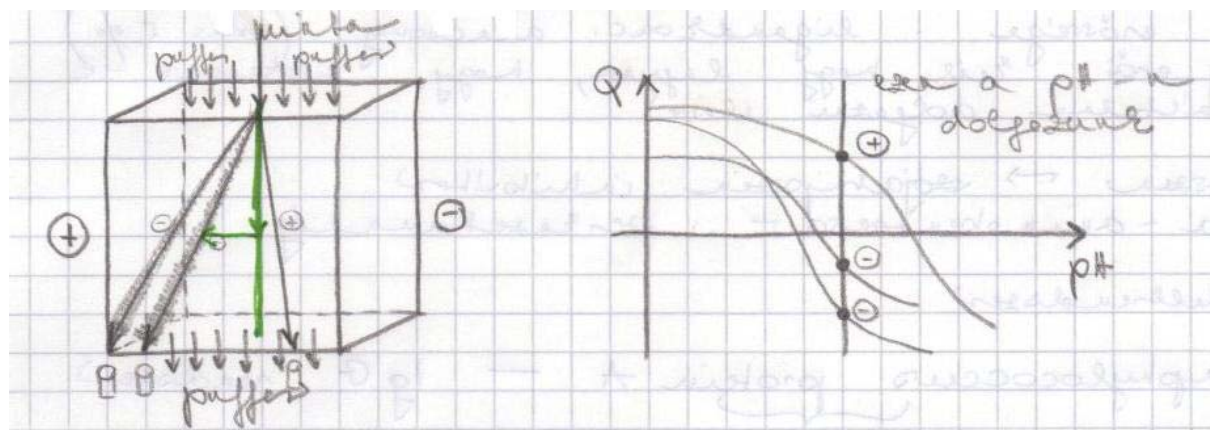
A képletből adódóan a különböző tulajdonságú molekulák különböző sebességgel mozognak, mely ennek az elválasztási technikának az alapja.

Típusok:

- gélelektroforézis
- free flow elektroforézis
- kapilláris elektroforézis

Free flow (szabad folyású) elektroforézis

Ebben az esetben nincs gél, hanem folyadék van, így a berendezést, mellyel dolgozunk, folyadékcellának nevezik. A közeg, melyben dolgozunk teljesen inert, nem vándorolhat az elektromos tér hatására. Az elválasztást nem egyszerű megvalósítani, biztosítani kell a szinte teljes homogenitást, az elválasztandó anyag csak kvázi-laminárisan (nagyon lassan) mozoghat. Követelmény, hogy a cella vastagsága nagyon kicsi (kb. 2-3 mm) legyen, valamint, hogy a betáplálás és az elvétel is igen egyenes legyen.



Előnyök:

- folytonos üzemben működtethető
- lehet a léptékét növelni (csak a felületet, a vastagságot nem! → kialakítható hengerpalást formájában is)

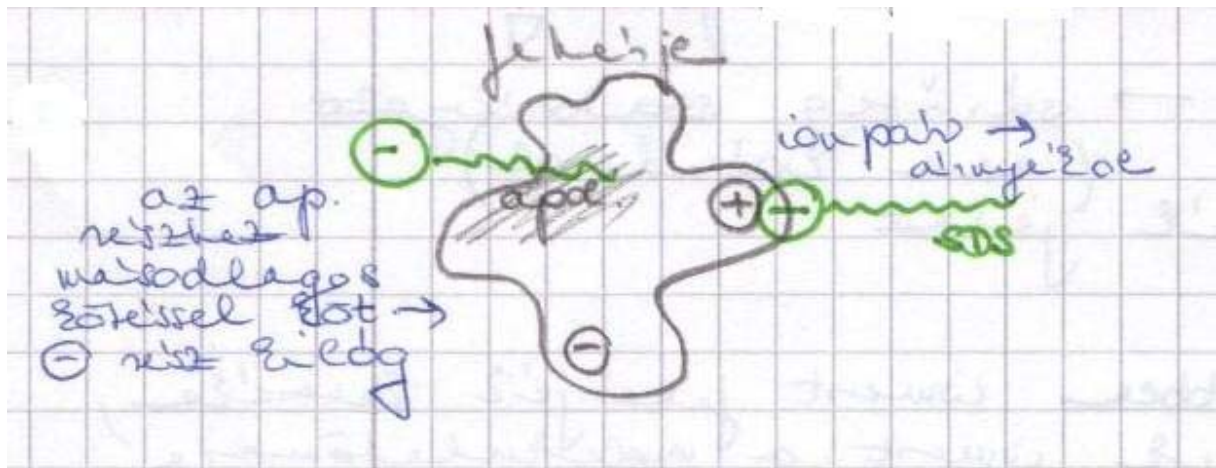
Hátrányok:

- a hatékony elválasztáshoz nagy feszültséget kell alkalmazni, melynek hatására azonban melegedés lép fel, ami a hővezetés egyenetlensége miatt sávszélesedést okoz az elválasztásban ⇒ ha azonban az adott pH-n kis elektromos vezetőképességű pufferral dolgozunk, ez a probléma kiküszöbölhető
- a hőmozgás diffúziót okoz ⇒ vagy hűteni kell a rendszert, vagy növelni kell az áramló közeg viszkozitását (pl. glicerin alkalmazása)
- elektrooszmózis jelenségének fellépése: a 2 lap mentén elektromos megoszlás jön létre (nem a mintából, a pufferből!) és ezek az ionok az elektromos tér hatására vándorolnak és viszik magukkal a rendszerben jelenlevő vizet is, mely keresztirányú káros áramlást okoz ⇒ a cella falát (a fegyverzeteket nem!) be kell vonni valamely inert anyaggal, pl. teflonnal, mely megakadályozza ezt a jelenséget, és jó a káros adszorpciós jelenségek ellen is
- buborékok megjelenése a pufferban: ez is sávszélesedést okoz, ennek elkerülése érdekében vagy vákuumozzuk az oldatokat, vagy pedig inert gázzal átöblítjük (He v. N₂)

Gélelektroforézis

Az elválasztandó komponensek itt gélben vándorolnak, melynek anyaga az esetek döntő többségében poliakrilamid, illetve agaróz.

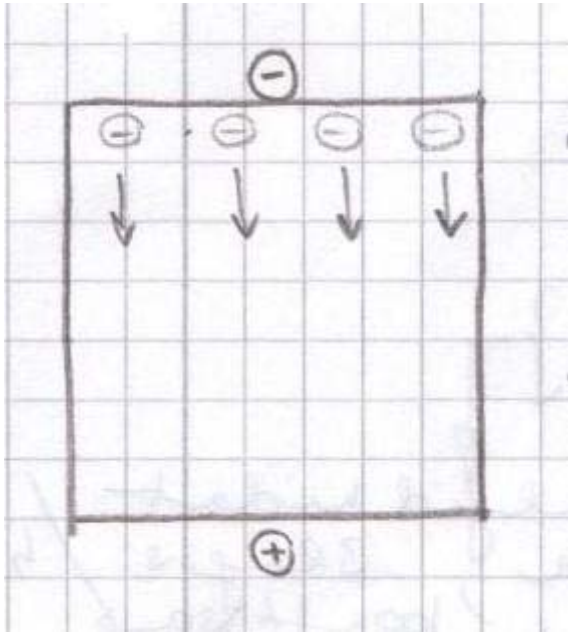
Biztosítani kell, hogy a komponensek egy irányba mozogjanak, mert a mintákat csak a gél egyik oldalára visszük fel. Ehhez meg kell változtatni a töltést, ekkor az elválasztás méret illetve alak alapján történik.



Egyirányú mozgás biztosítása:

- pH állítás
- megtehetjük, hogy az egyik féle töltést nem vesszük figyelembe (pl. ha azt szeretnénk, hogy a fehérje a negatív fegyverzet irányából a pozitív felé haladjon, akkor a negatív oldalon felvisszük a mintát, ekkor a pozitív töltésűek nem vándorolnak, a negatív töltésűek pedig elindulnak a másik pólus felé – ez azonban nem tökéletes megoldás)
- maszkírozás SDS-sel (nátrium – dodecilsulfáttal): az SDS egy anionos detergens, mely azt jelenti, hogy van egy anionos poláros vége, illetve egy hosszú szénláncú apoláros vége. A fehérje felszínén vannak apoláros, pozitív illetve negatív régiók. Az apoláros részhez oda tud kapcsolódni az SDS másodlagos kötése segítségével, a pozitívan töltött régiókkal ionpárt alakít ki, a negatív régiókat pedig szabadon hagyja, melynek eredményeképp a fehérje anionos jellegűvé válik és

adott pH-n egy irányba fog vándorolni. Mivel azonban SDS-es maszkírozás hatására minden fehérje negatív töltésű lesz, a töltés szerinti elválasztás nem szignifikáns, helyette előtérbe kerül a méret, illetve molekulatömeg szerinti szeparálás. (A nagy lassú, a kicsi gyorsabb ☺)

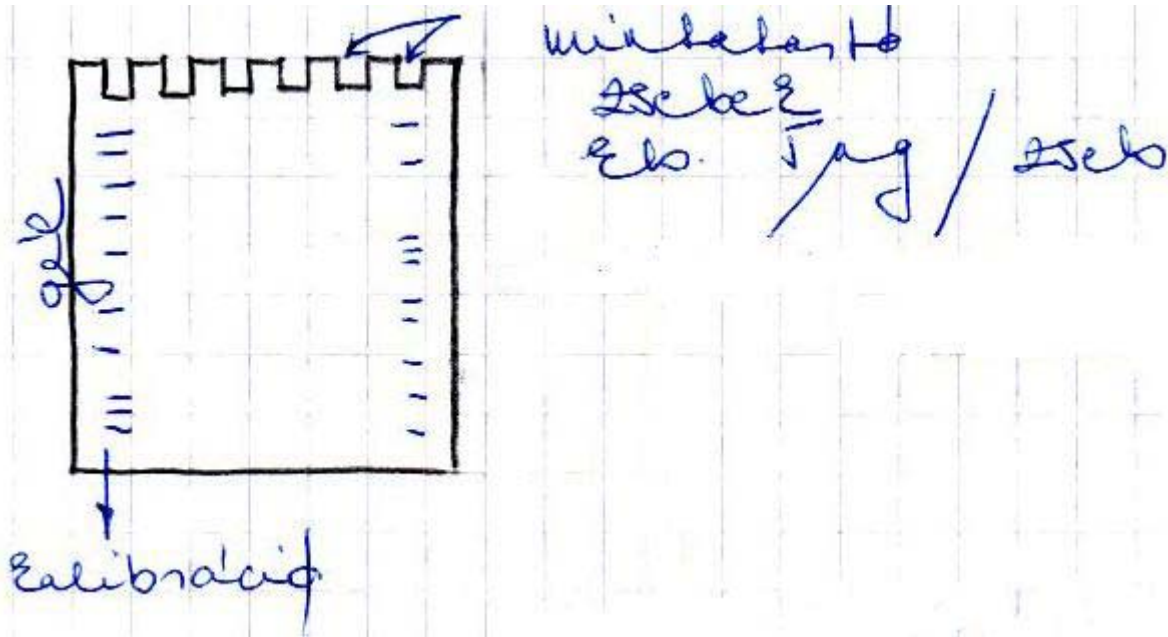


A folyamat nyomonkövetése színes markerral történik (brómtimolkék), mely a fehérjékhez képes kis móltömegű, így elől fut a reakció során. Ha ez kiért a gél végére, akkor vége a folyamatnak, már csak elő kell hívni a gélben önmagukban nem látszó fehérjéket.

Jellemzők és problémák:

- alkalmazott feszültség: 50 – 500V, a feladat igénye szerint
- teljesítmény: tömény puffer → nagyobb áram → nagyobb teljesítmény
ez probléma, mert a nagy teljesítmény hatására a gél melegszik és ekkor
→ nagyobb a diffúzió, ami miatt romlik a felbontás
→ melegen gázbuborékok jelennek meg (ezért szokták a puffert gázmentesíteni)
→ a melegedés sosem egyenletes össze – vissza diffúziót v. áramlást okoz
ezért általában kis teljesítménnyel dolgoznak, és hűtik a rendszert
jellemző mennyiség: volt x óra (kül. rendszerek összehasonlítására)

Mintaelőkészítés



A gél általában úgy van kialakítva (vagy a gyártó által, vagy a felhasználónak célszerű így megcsinálnia), hogy a felső részén mintatartó zsebek vannak. Ebbe kerül a mérés során kb. 5 μ g minta zsebenként.

A fehérjemintát általában úgy készítik el, hogy először SDS-sel és merkaptotetanollal vagy ditiotreitollal főzik 100°C-on 5 percig. Ezután szacharózt adnak hozzá, mely a sűrűséget szabályozza, de nem vándorol. Végül pedig hozzáadják a brómtimolkék festéket.

A gél két legszélső zsebébe általában kalibráló oldatot tesznek. Ez ismert fehérjék keveréke, mely nagyság (molekulatömeg) szerint elválik, támpontot adva az ismeretlen minták analizéséhez. Ha ez meg van, megfuttatják a mintát; a folyamat végét a brómtimolkék festék megjelenése jelzi a gél alján; ekkor már csak elő kell hívni a különböző fehérjéket.

Előhívás: festési eljárásokkal: az adott festék köt a fehérjéhez (adott töménységű festékoldat, adott pH-n), majd a mennyisége spektrofotometriás eljárással meghatározható.

Típusok:

- Coomassie Blue → kék
- Amido Black → fekete
- Fast Green → zöld

Ha a mintákat megfestettük a felesleget ki kell mosni, a színt halványítani, majd fixálni kell.

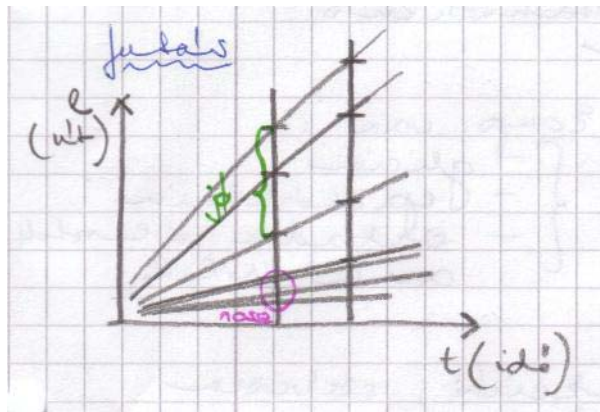
Egy különleges festési eljárás az „Ezüst festés”, ennek során ezüst-nitrátból koloid ezüstöt választanak le, melyet a fehérjék adszorbeálnak. Ez két nagyságrenddel érzékenyebb detektálást tesz lehetővé, azonban nagyon tiszta körülményeket igényel.

Gélek anyaga:

- poliakrilamid
- agaróz
- egyéb (elenyésző)

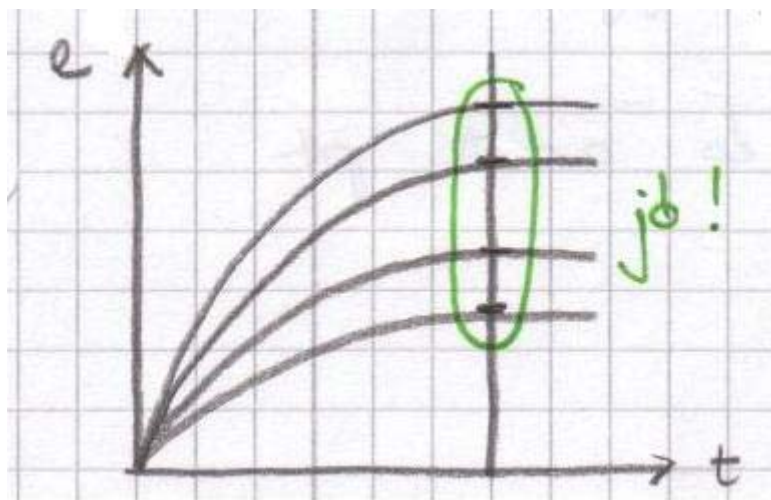
Általában poliakrilamidot alkalmaznak a gyakorlatban, mert ez könnyen előállítható „háziilag”, azaz laboratóriumi körülmények között is. Ennek előállításához az akrilamidot polimerizálják oxigén kizárása mellett (az iniciátor ammónium-perszulfát, a katalizátor tetraetilén-diamin), majd keresztkötéseket hoznak benne létre bisz-akrilamiddal. A keresztkötések száma megszabja a sűrűséget, mely minimum 3% és maximum 30%. (Általában 10-15%-ossal dolgoznak).

A futtatás eredménye



Amint az ábrán is látható, lineáris gélek esetén az elválasztás nem tökéletes. A jobb elválasztás érdekében szoktak gradiens géleket alkalmazni.

Gradiens gél: a futási úthossz mentén változik a sűrűsége, mely azt eredményezi, hogy amelyik fehérje nagyon előreszaladna a gélben, azt lefékezi a sűrűség okozta nagyobb ellenállás. Ennek előállítása hasonló a kromatográfiás eljárásokból ismert gradiens elúció kivitelezéséhez; a különböző sűrűségű géleket az adagolópumpa megfelelő módon egymáshoz keveri.



Ugyanehhez az eredményhez homogén gélen 4 mérést kellene elvégezni. (A futási úthossz arányos az \ln móltömeggel.)

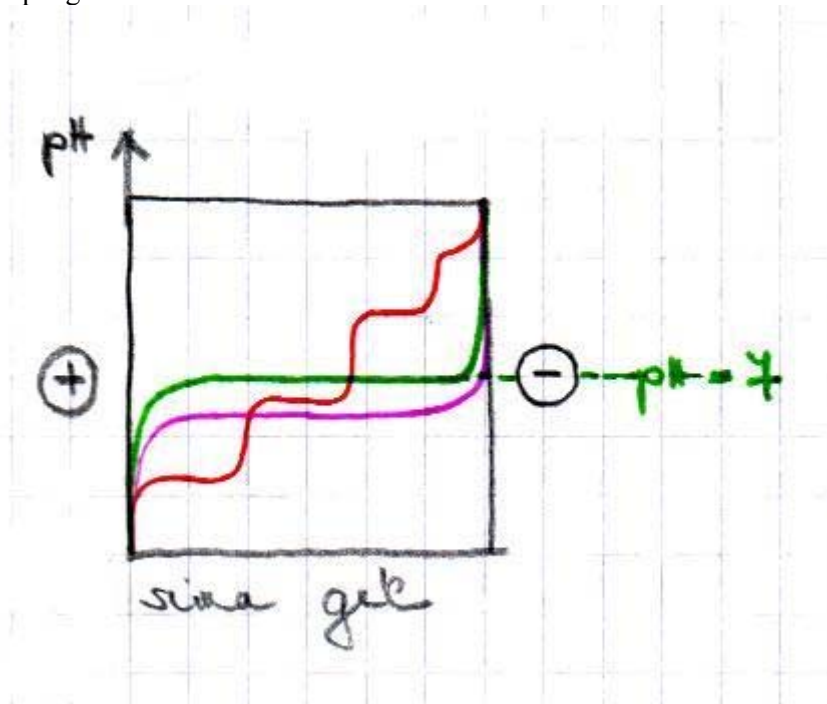
Izoelektromos fókuszálás (IEF)

Az IEF egy speciális elektroforézises technika, mely során, a gélen belül pH gradienst hozunk létre. Ekkor a gél a fehérje izoelektromos pontja alapján választ el, mégpedig úgy, hogyha a fehérje abba az adott pH tartományba ér a gélben, ahol az izoelektromos pontja van, ott elveszti a töltését és megáll (fókuszálódik).

Előnyök:

- jó felbontású (IEP szerint, 0.001 pH)
- koncentráció művelet
- egyszerű, egy oldat elég hozzá
- automatikus és preparatív elválasztásra egyaránt jó

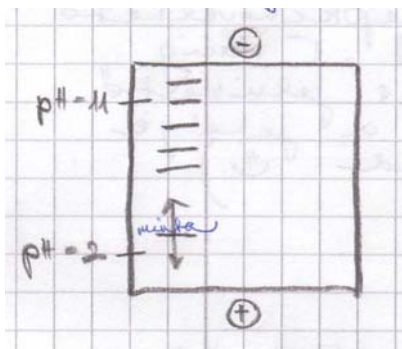
A pH gradiens kialakítása



A zöld vonal egy semleges anyag pH gradiensét mutatja. Ha ikerionos anyagot alkalmazunk (pl. glicint), a pH gradiensben (lila vonal) egy kis plató jelenik meg, mert a glicin ikerionos jellegű és van némi pufferkapacitása. Ha olyan anyagot alkalmazunk, mely sok ionizálható, mobilizálható csoportot tartalmaz, azaz nagy a pufferkapacitása (piros vonal), a pH gradiens olyan sok lépcsőből áll, hogy egy vonalnak tekinthető. Ilyen anyagok pl. az „Ampholyte” és a „Pharmalite”, melyek adott molekularendszerből nem teljesen randomszerű polimerizációval hozzák létre a gradiens gélt. (Komponenseik: glicin, epiklórhidrin és valamely amin.) Egy adott típus, egy adott pH zónára alkalmazható.

Alkalmazás

Feszültség hatására a gélben kialakul a pH profil, mely a feszültség elvételekor visszakeveredik. Ha meg van a pH gradiens, felvihető a fehérje minta.



Az ábra magyarázata, példa az alkalmazásra:

A gél pH=2-11 tartományban alkalmas fehérjék meghatározására. A mintát a rajzon látható helyen felvisszük a géltre (gyakorlatilag mindegy, hogy hová, a hely csak a vándorlási időt növelheti meg). A pozitív töltéssel rendelkező fehérje az ábrán felfelé halad az izoelektromos pontjáig, majd ott megáll. Ott elkezd diffundálni magasabb pH irányba, de ekkor a töltése negatív lesz, ami ellenkező irányba húzza vissza, mert a negatív töltésű fegyverzet taszítani kezdi. Hasonlóan, a negatív töltésű fehérje az ábrán lefelé indul el, majd az izoelektromos pontján megáll. Ott szintén megindul a diffúzió, de az

alacsonyabb pH tartományok felé, ám ez szintén töltésváltással jár, ami taszítást vált ki. Ez a jelenség maga a fókuszálás, a töltését vesztett fehérje egy helyben marad a térerő hatására.

A fehérje miért nem csinál gradienst, ha az „Ampholyte” igen?

Az „Ampholyte”-nak nagyobb a pufferkapacitása, valamint a fehérjének nagyobb a mólsúlya, mely összességében azt eredményezi, hogy az Ampholyte komponensek gyorsabban diffundálnak, mint a fehérjék.

Mitől függ a rendszer jósága?

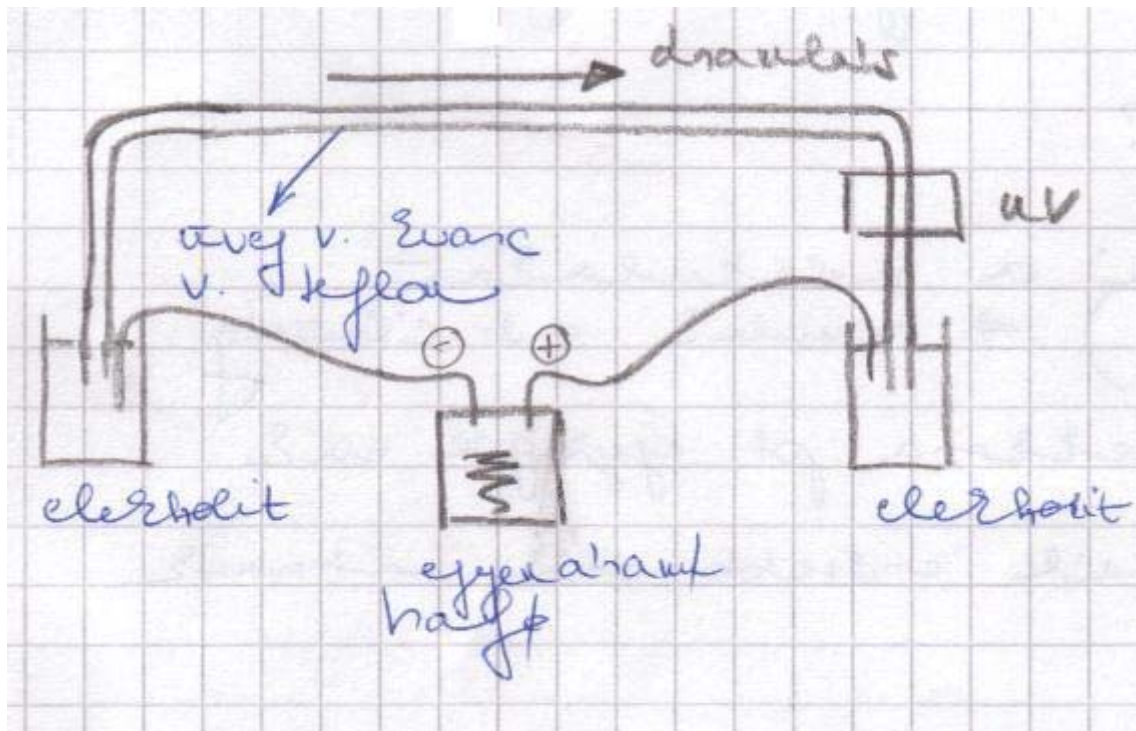
- diffúzió: ha ez a hatás erős, szétkergeti a molekulákat (főleg keresztirányban), mely hatására romlik az érzékenység
- feszültséggradiens: minél meredekebb, annál erősebb erők hatnak a rendszerre (mekkora pH egységre esik)

Kapilláris elektroforézis

Az elektroforetikus elválasztás kapillárisban játszódik el. A kapillárisban lehet gél, az alap eljárás az, hogyha puffer van benne.

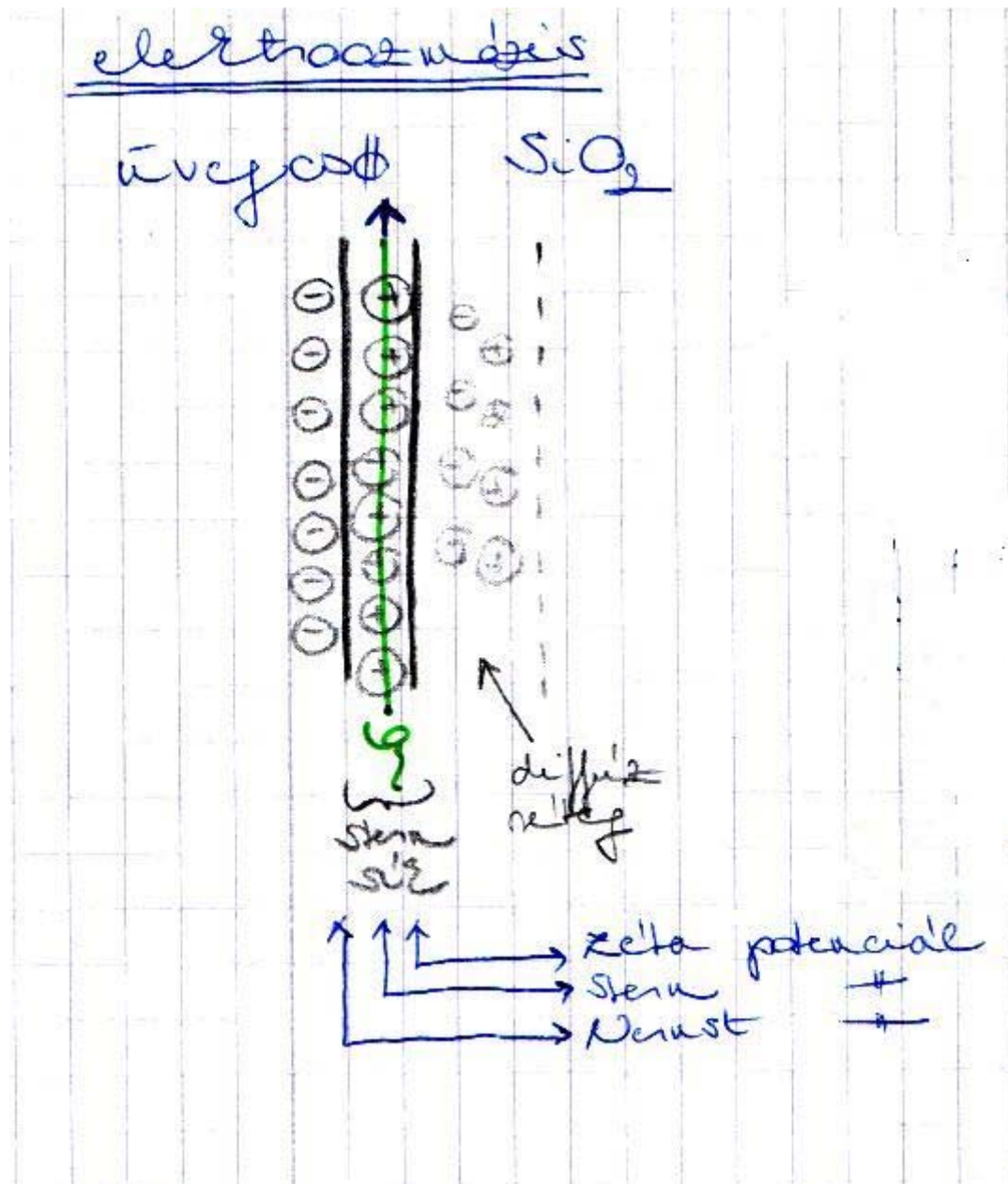
Előnyei:

- nincs keresztirányú kitérés (1 dimenziós)
- vékony, nagy fajlagos felületű rendszer (a hő jól elvezethető, jobban terhelhető)
- több 10000V feszültség
- 100-500 V/cm térerősség (egy kapilláris hossza 50-100 cm)
- kicsi áramerősség, mert a kapilláris vékony (25-75 μm)
- gyors, jó felbontású mérés (1-3 perc alatt elvégezhető)
- egyféle puffer van

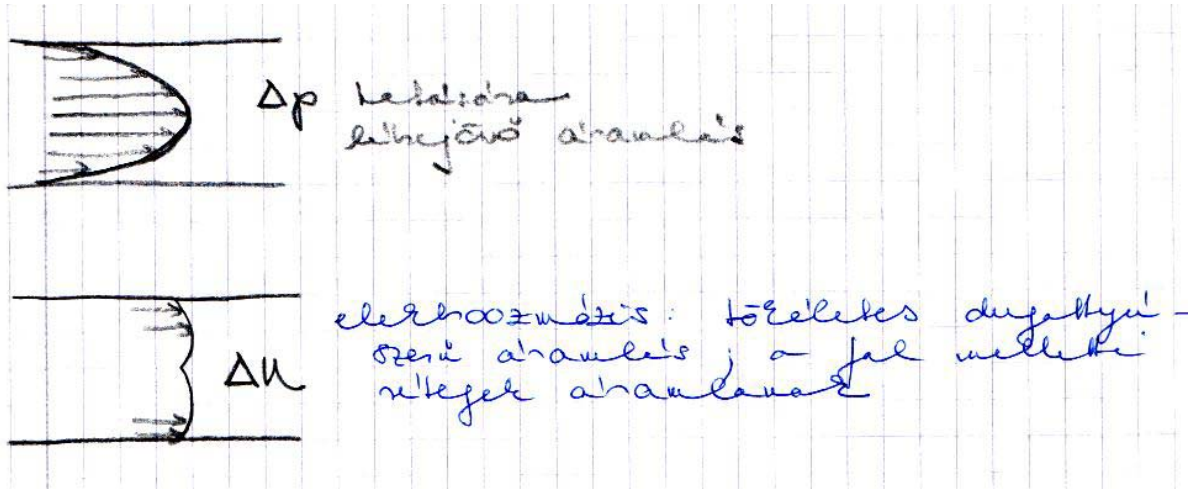


A mintaadagolás úgy történik, hogy a kapilláriscső mindkét vége elektrolit oldatba ér. Az elektroosmotikus áramlás miatt minden mintakomponens a negatív elektród felé vándorol, ezért a kis mennyiségű mintát (1-5nl) a kapilláris pozitív végénél injektálják, és az elválasztott komponenseket a kapilláris negatív végénél detektálják. Szerencsés, ha a kapilláris üvegből vagy kvarcból készül, mert az átengedi a fényt, így a spektrofotometriás detektorok könnyen a rendszerbe építhetőek. Szóba jöhetnek még elektrokémián és tömegspektrometrián alapuló detektálási módszerek is, hasonlóan a HPLC-ben alkalmazottakhoz.

Elektroosmózis jelensége



A kapilláris belső felülete negatív töltésű, anyagából adódóan (üveg, kvarc), így a folyadékban a fal mellett pozitív töltésű határréteg alakul ki. Ez a térerő hatására függőlegesen elmozdul. Ha azonban ezek az ionok csúsznak, magukkal viszik a vizet is, mely áramlást okoz. Ez maga az elektroosmózis, azaz hogy feszültség hatására ionáramlás okozta áramlás jön létre. Az áramlás tökéletesen dugattyúszerű, nem parabolászerű, mint a nyomáskülönbség létrehozta áramlás esetén, így nincs sávkiszéledés sem.



Leírás:

- a fehérjére

$$F_{\text{elektromos}} = F_{\text{közegellenállás}}$$

$$E \cdot q = 6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

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

ebből az elektroforetikus mozgékonyág

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

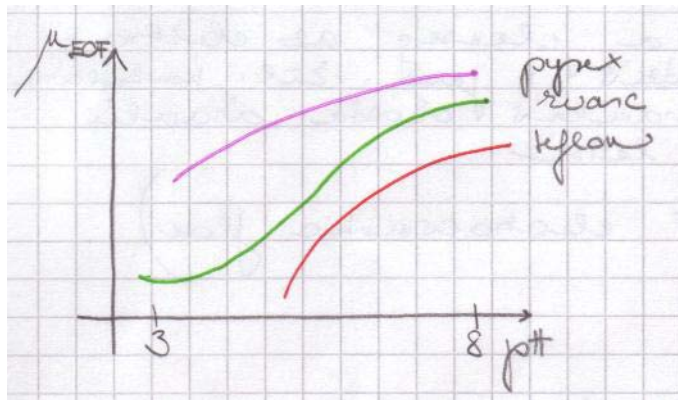
- a folyadékra:

$$v_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E$$

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

ez nem függ E-től, ahol E az elektromos térerősség
 ε a dielektromos állandó
 ζ a zéta potenciál nagysága
 η a viszkozitás

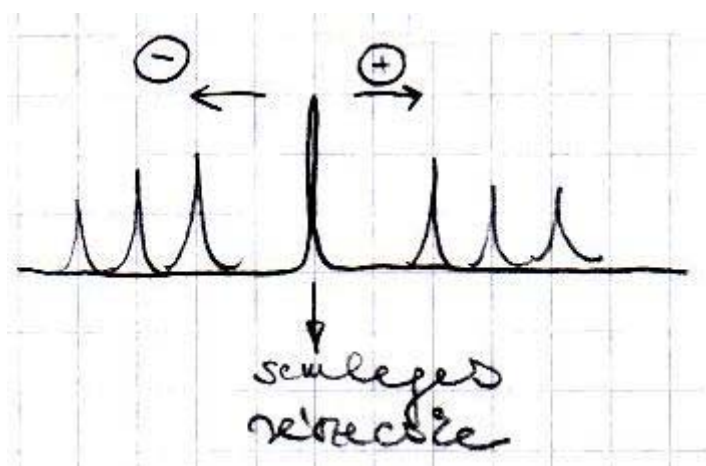
A töltött rétegek viselkedése függ a pH-tól, emiatt v_{EOF} és μ_{EOF} is.



Az elválasztás alapja az, hogy minden oldott molekula vándorol egy adott sebességgel a katód felé, a pozitívak egy picit gyorsabban, mert őket segíti az elektrooszmózis hatásán kívül a vonzás; a negatívak pedig kevésbé lemaradva a taszítás miatt.

Az elektrooszmózis szabályozása, befolyásoló tényezők:

- E csökkentése:
 - nő a migrációs idő
 - kiszélesednek a sávok
- E növelése: melegedés
- pH csökkentése:
 - lassítja az áramlást
 - megváltoztatja az egyes fehérjék töltését, szerkezetét
- ionerősség növelése
 - lassul az elektroosmotikus áramlás
 - megnő az áramerősség, és emiatt melegszik a rendszer
 - ha nem egyezik a minta ionerősségével, deformálódik a csúcs
- viszkozitás növelése
 - lassul az elektroosmotikus áramlás
 - változik a komponensek mozgékonyága



Nincs retenciós idő, ellentétben van migrációs idő. Ez a töltött molekula vándorlási idejét mondja meg egy adott semleges molekulához viszonyítva.

$$\mu_a = \mu_{EOF} \pm \mu_e = \frac{l \cdot E}{t} = \frac{l \cdot L}{t \cdot U}$$

melyből a migrációs idő

$$t = \frac{l \cdot L}{\mu_a \cdot U}$$

ahol μ_a a látszólagos mozgékonyosság
l a hossz a detektorig
L a teljes úthossz, melyen a feszültség esik
U a feszültség