

11. fejezet ELEKTROFORÉZIS TECHNIKÁK

Dr. Pécs Miklós



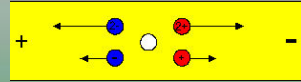
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

(Oktatási célra)

BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ELEKTROFORÉZIS

Olyan elválasztási technikák, amelyben a molekulák elektromos erő hatására különbözőképpen mozdulnak el, és ezáltal szétválaszthatók.



A mozgást két erő eredője okozza:

- Elektrosztatikus erő (függ a térerősségtől és a töltésszámtól)
- Közegellenállás (függ a molekula méretétől, alakjától, a közeg sűrűségétől, viszkozitásától)

Rövid gyorsulás után a sebesség állandóvá válik (ülepedés)

BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforetikus mozgáskonyság:

ahol: q – a molekula töltése

d – molekula átmérője

η – viszkozitás/gélsűrűség

Az állandósult sebesség:

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

$$v = \mu E$$

E – térerősség

A közeg szerint, amiben a mozgás végbemegy, megkülönböztethető:

1. Free flow (szabadon áramló) elektroforézis
2. Gél-elektroforézis
3. Kapilláris elektroforézis

BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

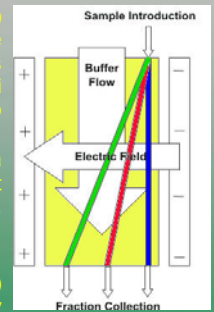
3

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

A folyadék egy lapos (~mm vastag) cellában laminánsan áramlik. Erre merőlegesen elektromos potenciált kapcsolunk rá, ami eltéríti a töltéssel rendelkező molekulákat.

Technikailag nehéz megvalósítani a homogén áramlási képet (egyenletes betáplálás és elvétel, frakciószedés).

A térerősséghez (100-150 V/cm) nagy feszültség kell, ahhoz, hogy ne melegejden, kis áramerősség (mA)



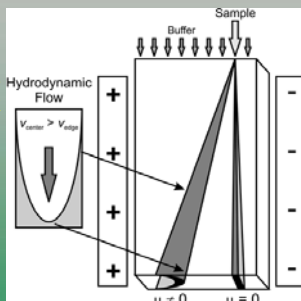
BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

A lamináns áramlás parabolikus áramlási képe miatt a sávok eltorzulnak:

A fal mellett áll a folyadék, a réteg közepén gyorsan áramlik.

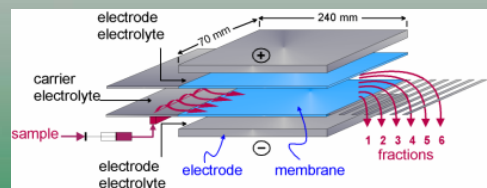


BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Másik elrendezés: az elválasztási úthossz rövid (mm), a cella „vastagsága” nagyobb → a kapacitás nagyobb, a felbontás rosszabb



BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Technológiai paraméterek:

A pufferminta tartózkodási ideje: 2-5 perc. Ez elegendő az elválasztáshoz, de nem hagy időt a diffúziós szétterjedésre.

A minta koncentrációja: nagyobb koncentráció esetén lassul az elválás, ez hosszabb tartózkodási idővel, vagy nagyobb térerősséggel ellensúlyozható.

Térerősség: 100-150 V/cm, növelése egy tartományban javítja a szétválást, de előlött sávkiszéleledést okoz.

A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Áramlások/melegedés: az áthaladó áram hatása melegíti a folyadékot → hűteni kell → sűrűségkülönbségek alakulnak ki → áramlások (natúralkonvekció)

Leírása: Grashof szám:

$$Gr = \frac{g\beta\Delta t d_n^3}{\nu^2}$$

ahol: g – nehézségi gyorsulás

β – a hordozó folyadék hőtágulási együtthatója

Δt – a folyadék és a fal hőmérséklet különbsége

d_n – a kamra hidraulikus átmérője

ν – a folyadék kinetikai viszkozitása

A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Ha a Grashof szám egy határérték fölé emelkedik, rendezetlen áramlások lépnek föl. A Gr csökkenthető

- a kamra hidraulikai átmérőjének csökkentésével
- a viszkozitás növelésével (pl. glicerinnel)

A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Diffúzió: függ a hőmérséklettől, a közeg viszkozitásától, a tartózkodási időtől → hőmérséklet csökkentése, viszkozitás növelése

Elektroozmózis: a cella falára töltésük révén adszorbeálódó ionok a térerősség hatására „elcsúsznak” a felületen és ezáltal áramlást hoznak létre → a fal bevonása, pl. teflonnal

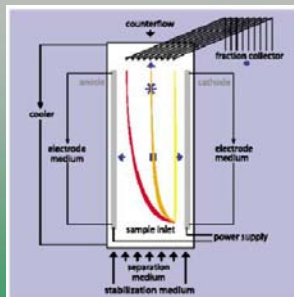
Buborékok: az oldott gázok felszabadulása → a pufferek gázmentesítése (ultrahang, He)

A hordozó puffer és a minta közötti sűrűség/viszkozitás különbségek → azonos puffer

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Az elektródák lehetnek inert fémből, vagy nagy felület esetén membránnal elválasztott áramió pufferben.

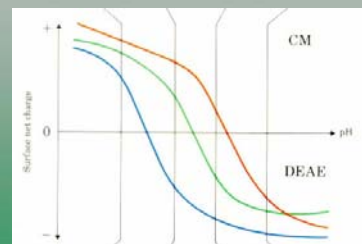
Az elvételt a kamra másik végén bevitt puffer „ellenáramával” teszük pontosabbá.



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Milyen pH-n érdemes elválasztani?

Ott, ahol a legnagyobb a különbség a töltésben.



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Előnyei:

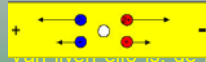
- Folyamatos művelet

Hátrányai:

- Bonyolult és kényes készülék
- Korlátozott kapacitás (40 – 200 mg/óra/cella)

GÉL ELEKTROFORÉZIS

A közeg, amiben a molekulák mozognak, hidrogél, leggyakrabban poliakrilamid, néha aga-roz. A különböző töltésű molekulák kétirányba mennének:



Van ilyen előkészítés, de legtöbbször az egyirányú futtatás a cél →

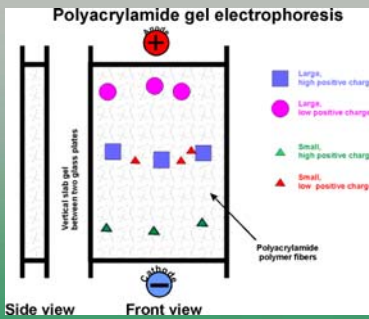
- Ezt elérhetjük: - pH állítással
- minta előkezeléssel (SDS)
- nem törődünk az ellentétes töltésűekkel



AZ ELVÁLASZTÁS ELVE

Méret és töltés szerint.

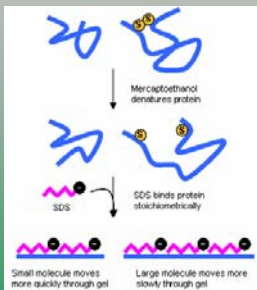
A nagyobb töltésű, illetve a kisebb méretű molekulák gyorsabban vándorolnak a gélben.



A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

- Beállítjuk a minta sűrűségét (cukoroldattal vagy glicerinnel)
- Markert adunk hozzá (olyan festék, ami a futtatásnál „előli” halad, és ezzel vizuálisan követhető a folyamat → a legtöbbször bróm-timolkék)
- Denaturálás („befőzés”): kezelés redukáló szerekkel és detergenssel (legtöbbször merkaptó-etanollal és SDS-sel)

KEZELÉS SDS-SEL



A diszulfid hidak felbomlanak.

- A fehérjére SDS molekulák tapadnak
- a pozitív töltéseket leárymkojják, az apoláris részekre ne-gatív töltéseket ragasztanak
- minden fehérje negatív töltésű lesz
- mindegyik egy irányba (az anód felé) vándorol
- a vándorlási sebességet csak a méret szabja meg!

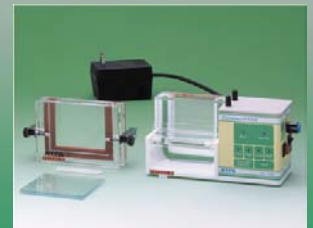
GÉL ELEKTROFORÉZIS

Technikai paraméterek:

A feszültség: 80 – 500 Volt

Az elválasztás mértékét Volt*óra-ban adják meg.

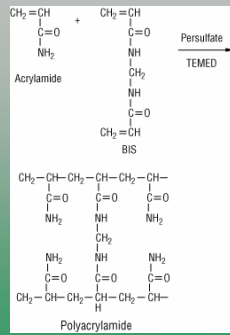
- tápegység
- feszültség szabályozó/programozó egység
- Az elektródok elektrolitkádakon keresztül viszik át a feszültséget a géltre.
- Gyakran hűteni kell.



A POLI-AKRILAMID GÉL

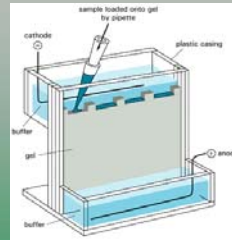
A lineáris poliakrilamid láncokat bis-akrilamiddal térhálósítják. Az akrilamid koncentrációjával jellemezhető a gél „sűrűsége” (3 – 30 %).

A polimerizációhoz szükséges:
TEMED – tetrametil-etilén-diamin katalizátor
Ammónium-persulfát – iniciátor
Oxigénmentes közeg



19

A GÉL ALAKJA



A gél mérete 4x4 cm-től 20x20 cm-ig bármekkora lehet.

Vastagsága 1 - 5 mm.
A gél tetején mintatartó „zsebeket” alakítanak ki, ebbe pipettázzák a mintákat.

Mennyisége: ~ 5 µg/csík
Sűrűsége szerint a gél lehet:

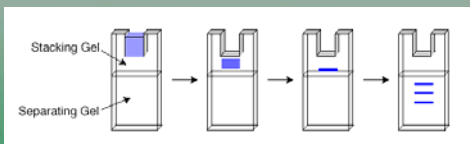
- homogén
- discontinuous
- gradiens

BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

DISC GÉLEK

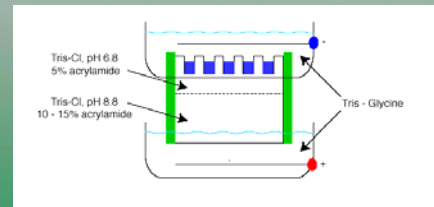
A tényleges futató gél fölött egy tömörítő gél szakasz van. Célja a viszonylag nagy mintatérfogatban lévő fehérjék összetömörítése egy csíkba, hogy azután jól elválasztható csíkokat kaphassunk.



21

DISC GÉLEK

A tömörítő gél szakasz összetétele olyan, hogy ott gyorsabban vándorolnak a fehérjék: vezetőképessége és sűrűsége kisebb.

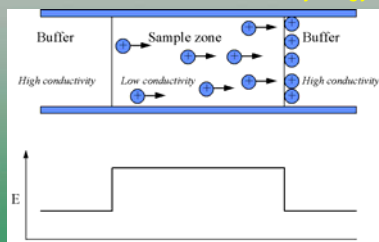


BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

DISC GÉLEK

Amikor a molekulák kiérnek a tömörítő gél szakaszból, akkor hirtelen lefékeződnek, összevárnak egymást.

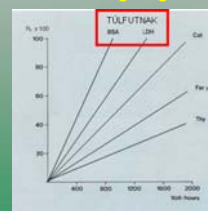


23

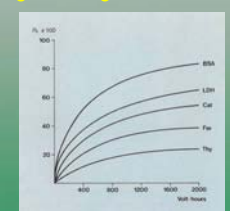
GRADIENS GÉLEK

A gél sűrűsége a futással szakasz mentén folyamatosan változik, növekszik. Célja: egy gélen szélesebb molekulatartomány átfogása.

Futás homogén gélen:



gradiens gélen:



BMGE Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

A KÉSZ GÉLEK KIÉRTÉKELÉSE

A fehérjecsíkok szabad szemmel nem láthatók, ezért festési eljárásokkal „hívják elő”. Fixálás - festés - halványítás.

Fixálás: savas reagensekkel (perklórsav, szulfosalicilsav)

Festés:

Coomassie Blue R250 – a legáltalánosabban használt festék. Többféle receptúra. Kék színt ad, elég érzékeny.

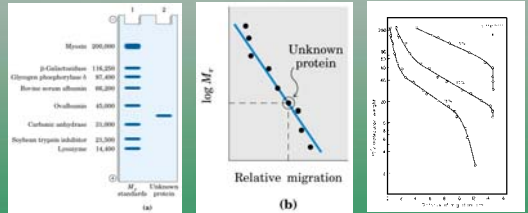
Ezüst festés – ezüst-nitrát oldatból a fehérjékre barna fémézüst kolloid csapódik le. Nagyon érzékeny (+2 nagyságrend), de nagyon tisztán kell dolgozni.

Amido Black, Fast Green – ritkábban használatosak.

Blotting – átvitel membránra (cellulóz-acetát, nylon), kimutatás immun-analitikai reakcióval

A KÉSZ GÉLEK KIÉRTÉKELÉSE

Az SDS-PAGE méret szerint választja el a molekulákat. A molekuly meghatározásához a futtatást kalibrálni kell. Ezért minden gélen futtatnak ismert móltömegű fehérjéket (kalibrációs Jétra™)



KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforézis egy kapillárban elhelyezkedő puffer oldatban történik.

Műszaki adatok:

Feszültség: 10 - 30 kV

Térférség: 100-500 V/cm

Átmérő (belső): 25-75 μm

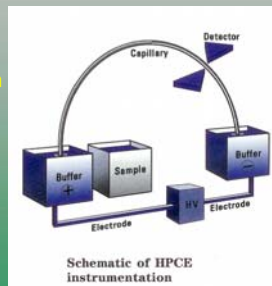
Hossz: 50-100 cm

Anyaga: kvarcüveg

Mintatérfogat: 1-50 nl

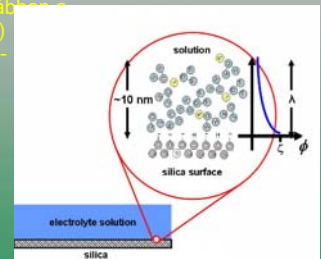
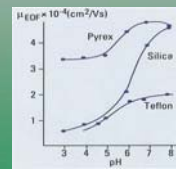
Tartózkodási idő: 1-3 perc

Detektálás: UV



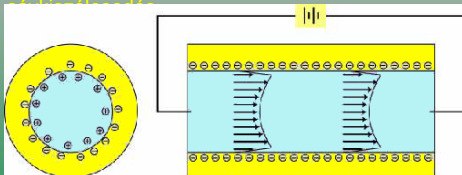
MŰKÖDÉSI ELVE

Az elektrooszmózis alapul: a kvarcszó belső felülete negatív töltésű, erre kationokból egy ellenion-réteg rakódik le. (ld. korábban a felületi potenciáloknál). A felületi potenciál pH-függő:



ELEKTROOZMÓZIS

A kation-réteget a potenciálkülönbség a katód irányába húzza. A mozgó ionok a vizet is magukkal ragadják, ez-zel az egész folyadék mozgásba jön. Az áramlási profil leginkább a dugószerű áramlásra hasonlít, alig van sebesség-különbség \rightarrow emiatt nincs kórártás.



ELEKTROOZMÓZIS

A leírásnál kétféle sebességet kell megkülönböztetni:

A folyadék áramlási sebessége: $v_{\text{EOF}} = (\epsilon \zeta / \eta) E$

ahol: ϵ - dielektromos állandó

ζ - zéta potenciál

η - viszkozitás

E - térerősség

A molekula állandósult mozgási sebessége a folyadékban (ld. korábban):

$$v = q \cdot E / 3d\pi\eta = \mu \cdot E$$

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

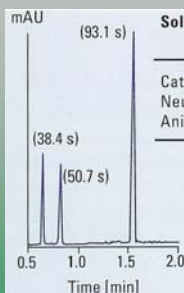
A molekula sebessége a az áramló folyadékéhoz előjel szerint hozzáadódik: $V_{\text{eredő}} = V_{\text{EOF}} + V_{\text{molekula}}$

- a pozitív töltésűek előre szaladnak, a negatívak pedig lemaradnak
- szétválnak (hasonlít a kromatográfiához)



31

SEBESSÉG-KÜLÖNBSÉGEK



Solute	Migration time(s)	μ_a (cm ² /Vs)	μ_n (cm ² /Vs)
Cation	38.4	3.05×10^{-3}	7.40×10^{-4}
Neutral	50.7	2.31×10^{-3}	0
Anion	93.1	1.26×10^{-3}	-1.05×10^{-3}

$$\text{Cation: } \mu_a = \frac{IL}{Vt} = \frac{(50)(58.5)}{(25,000)(38.4)} = 3.05 \times 10^{-3}$$

$$\text{Neutral: } \mu_{\text{EOF}} = \frac{(50)(58.5)}{(25,000)(50.7)} = 2.31 \times 10^{-3}$$

$$\mu_n = \mu_a - \mu_{\text{EOF}} = (3.05 \times 10^{-3}) - (2.31 \times 10^{-3}) = 7.40 \times 10^{-4}$$

(note: μ_n will be negative for the anion)

32

BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

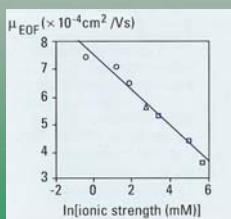
Térférfesség: növeli a sebességet az elválasztás romlása nélkül. Hátrány: fokozza a melegedést

pH: magasabb pH-n jobban működik

Ionerősség: növelése rontja az elválasztást, mert:

- csökkenti a zéta potenciált
- növeli az áramerősséget, és ezzel a melegedést
- torzítja a csúcs alakját

Detergensek: a kationosok lefedik a felületet és ezzel akadályozzák az áramlást



33

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Nagyon hatékony technika, jó szétválasztás töltés alapján igen rövid idő alatt.

De:

- Nem folytonosítható.
- Nem léptéknövelhető, még preparatív szintre sem, csak analitikai módszer.

(az ionsere szintén töltés alapján választ szét, lassabb, rosszabb a felbontása, de léptéknövelhető)

34