

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2



ELVÁLASZTÁSTECHNIKA (BMEVEMBM203) AZ ELVÁLASZTÁSTECHNIKA KORSZERŰ MÓDSZEREI (BMEVESAM203)

TÖRÖK KITTI

KTOROK@MAIL.BME.HU

Oktatók

Tóth Blanka

Ch fsz. 35

tblanka@mail.bme.hu

Török Kitti

Ch 160

ktorok@mail.bme.hu

Menetrend, laborprogram

Előadások:

- Első két alkalom külön
- Harmadik héttől együtt – Ch A 10
- ZH-k 7. és 14. héten

Laborok:

BIÓSOK	VEGYÉSZEK
Gyors LC	Gyors LC
Elektroforézis	Elektroforézis
SE-HPLC	LC-MS

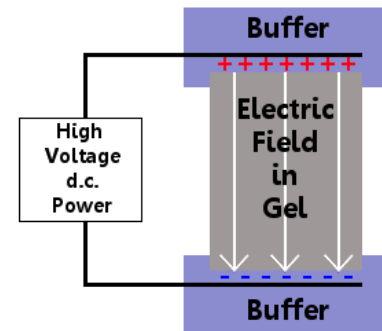
Laborbeosztás, jegyzetek az oktatás.ch.bme.hu-n

Számonkérések

BIÓSOK	VEGYÉSZEK
Félévközi jegyes tárgy	Vizsgás tárgy
2 zárthelyi (10.17 és 12.04)	2 zárthelyiből megajánlott jegy vagy vizsga
Pótzh és pótpótzh a pótlási héten	Pótvizsga tehető
Az aláírás feltétele a laborgyakorlatok 100 %-án történő részvétel és laborjegyzőkönyvek leadása és elfogadása!	
40 % - 1. zh 40 % - 2. zh 20 % - laborjegy Mindháromnak külön meg kell lennie 2-esnek	80 % - vizsgajegy 20 % - laborjegy Mindháromnak külön meg kell lennie 2-esnek vagy biósok követelménye

Elektroforetikus technikák

Elektroforézis – definíció



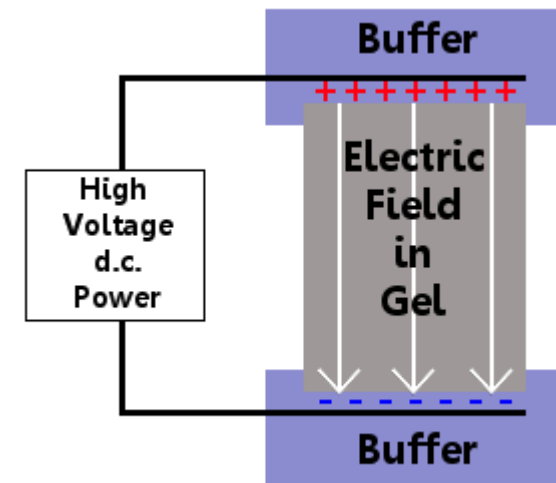
A töltéssel rendelkező részecskék elektromos erőter hatására eltérő sebességgel vándorolnak.

$$v = \mu_e * E \quad \rightarrow \quad \begin{aligned} F_e &= q * E \\ F_s &= -6\pi\eta r v \end{aligned} \quad \rightarrow \quad \mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

v – az ion sebessége
 μ_e – elektroforetikus mozgékonyság
 E – elektromotoros térerő
 F_e – elektromos erő
 F_s – súrlódási erő
 q – az ion töltése
 η – az oldat viszkozitása
 r – az ion sugara

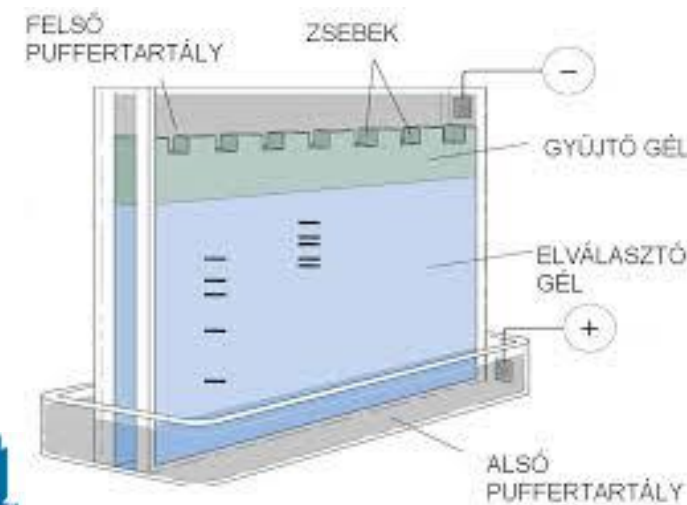
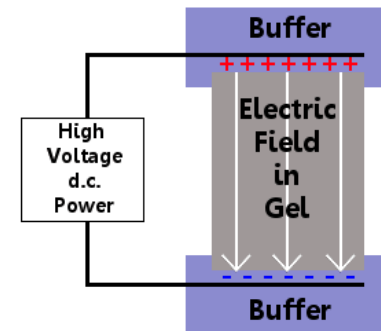
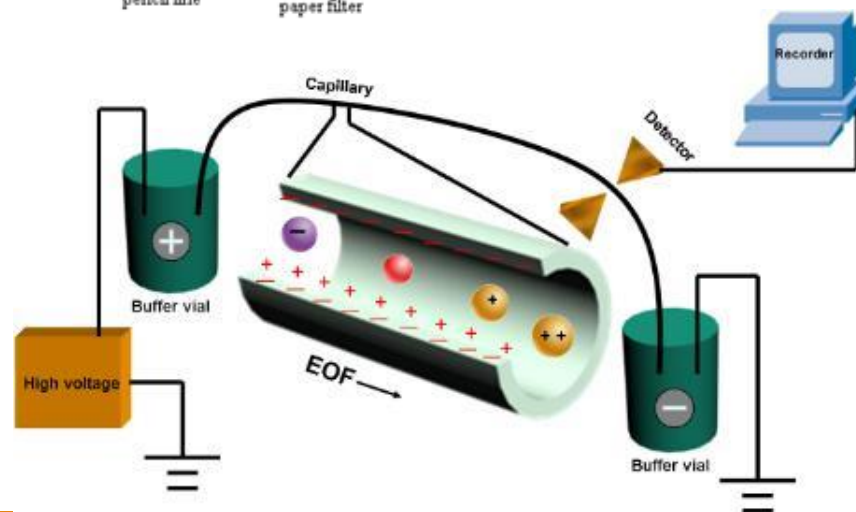
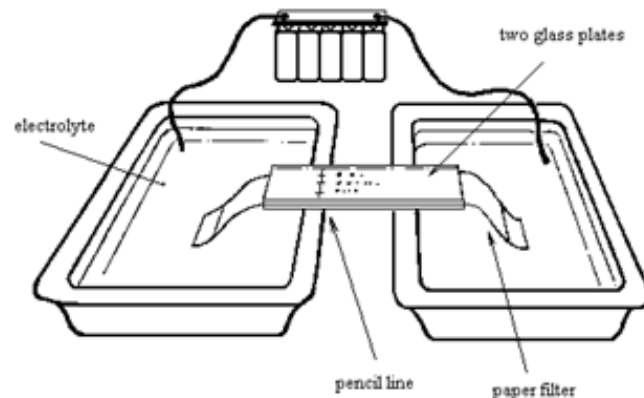
- Egy-egy elektród egy-egy puffer tartályba merül
- Két tartály között a részecskék számára átjárást biztosítunk
- Két elektród között potenciálkülönbséget hozunk létre
- Kationok a katód felé, anionok az anód felé vándorolnak
- Ionok eltérő töltésük és méretük miatt eltérő sebességgel vándorolnak

↓
Elválaszthatók egymástól

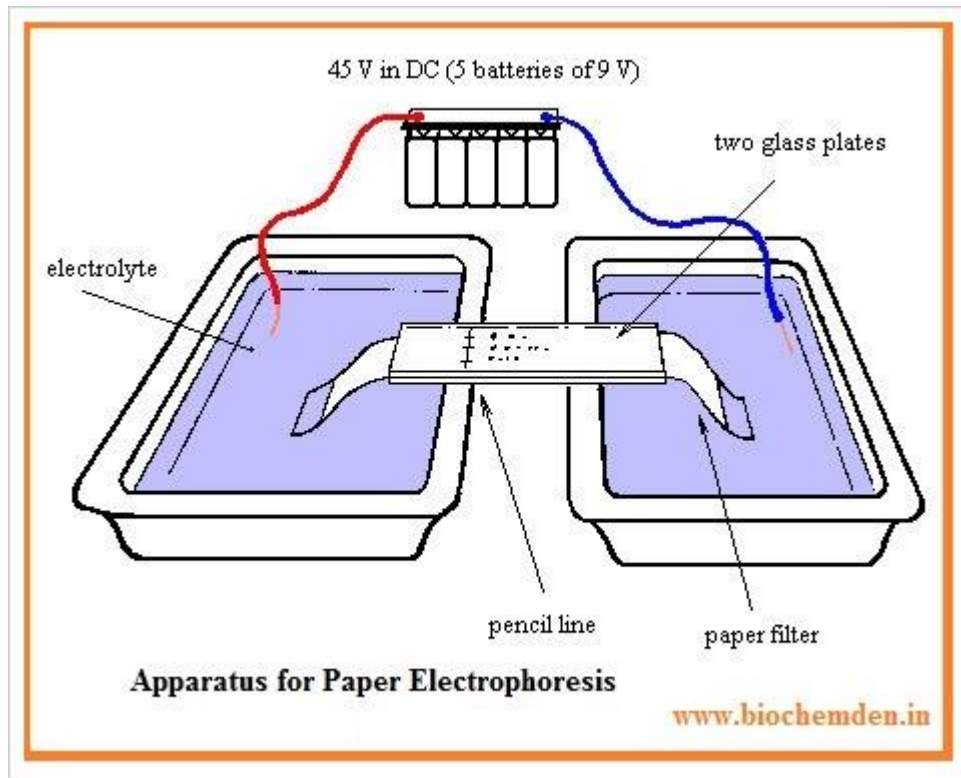
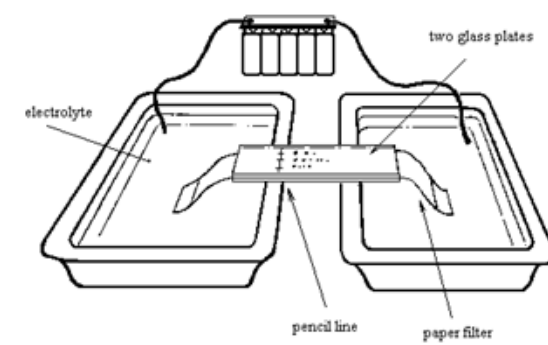


Elektroforézis – csoportosítás

- Papír elektroforézis
- Gélelektroforézis
 - Natív
 - Savas
 - SDS
 - IEF
- Kapilláris elektroforézis
 - CZE
 - CGE
 - CIEF
 - MEKC



Papír elektroforézis



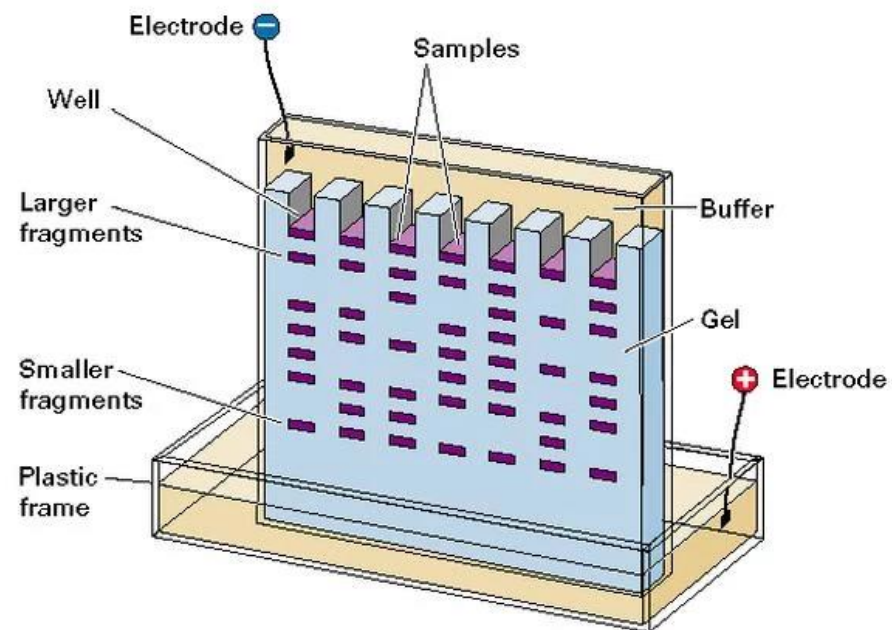
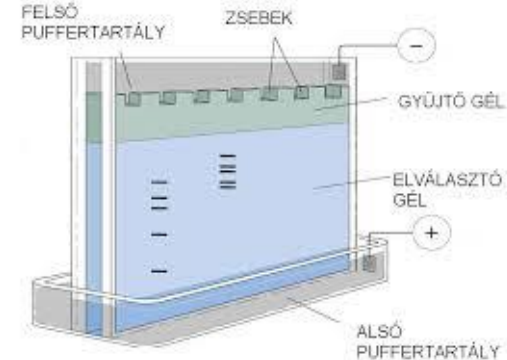
- Elválasztás pufferrel felitatott papíron
- Jó minőségű papír (min. 95% α -cellulóz) nagyon kis adszorpciós kapacitással
- A papír két vége puffertartályba ér
- Papír zárt kamrában a párolgás megakadályozása érdekében
- Festés (pl. brómfenolkék, etídium-bromid)
- Denzitometria (mennyiségi analízis)
- Egyszerű és olcsó, de hosszadalmas
- Fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok vizsgálatára

Gélelektroforézis – alapok

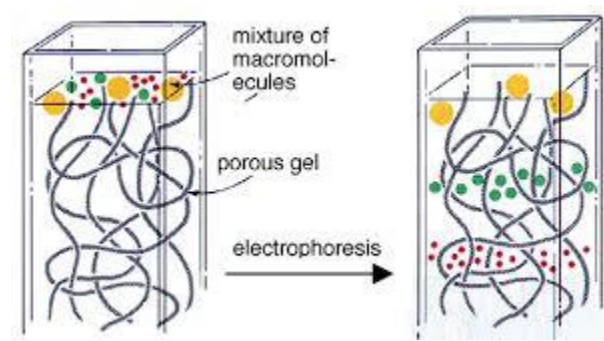
- Térhálós gélközeg alkalmazása
- Gél méretfüggő módon lassítja a részecskék mozgását, ezzel gátolja a diffúzió mértékét

Géllel szemben támasztott követelmények:

- Vízrel nedvesedő
- Kémiaailag stabil (nem lép reakcióba az elektroforézis során)
- Ne hordozzon töltéseket (ne viselkedjen ioncserélőként)
- Legyen fizikailag ellenálló
- Legyen átlátszó
- Ne festődjön a kimutatásra használt festékkel
- Legyen szabályozható a pórusmérete

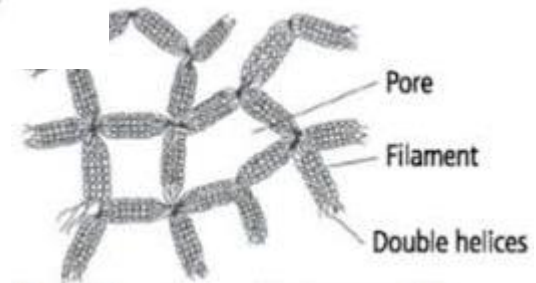
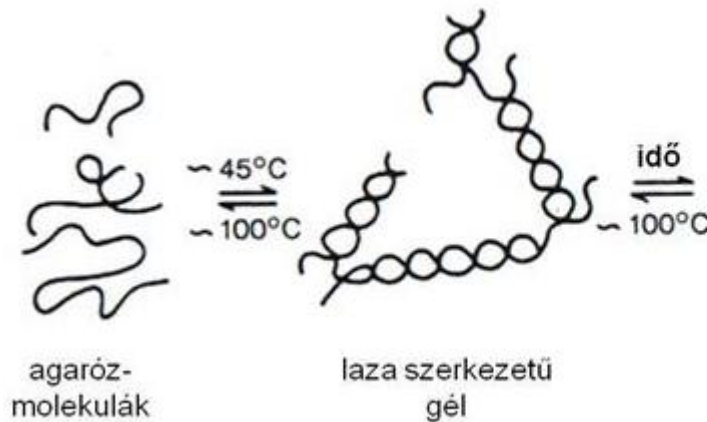
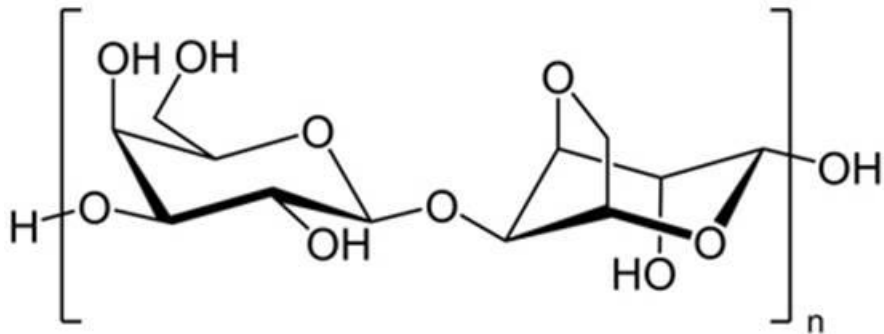


Gélelektroforézis – agaróz gél

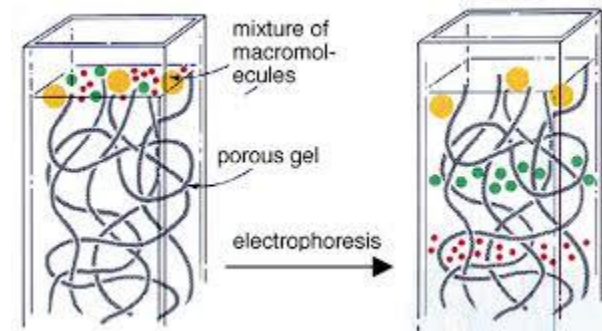


Alapvetően kétféle poliszacharid építi fel, a kémiai heterogén molekulákból álló agaropektin és a homogén **agaróz**. Az agaróz poliszacharid agarobióz építőkövekből áll, mely egy diszacharid: D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-galaktopiranoz kapcsolódik egymáshoz 1-4 kötéssel

Agarobióz

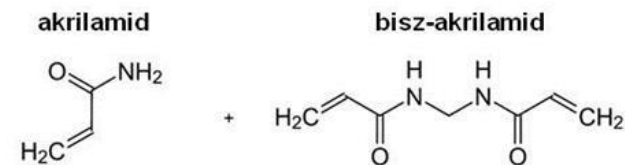


Gélelektroforézis – PA

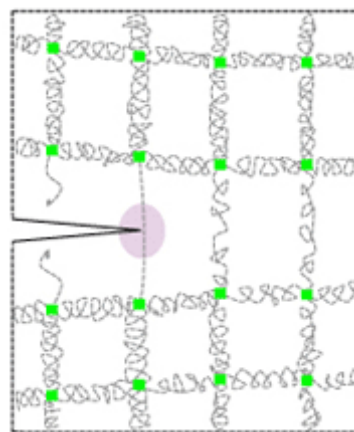
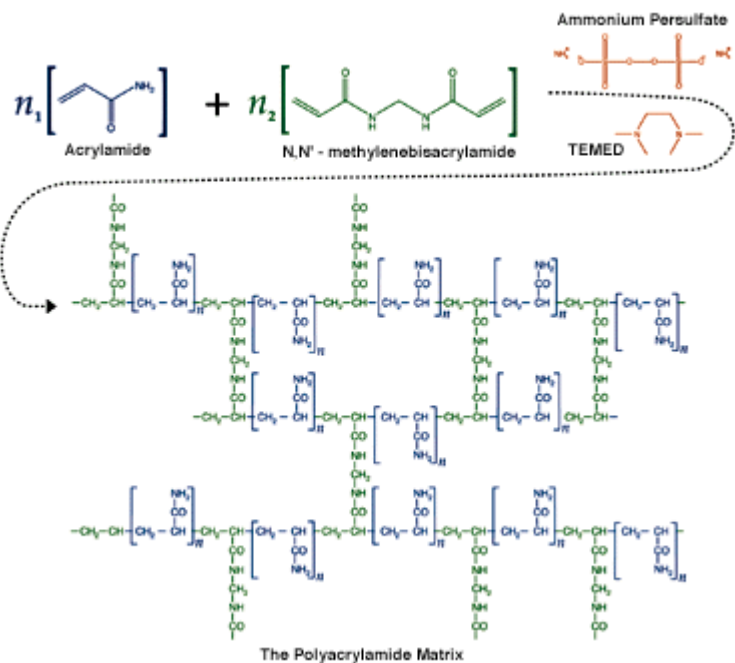
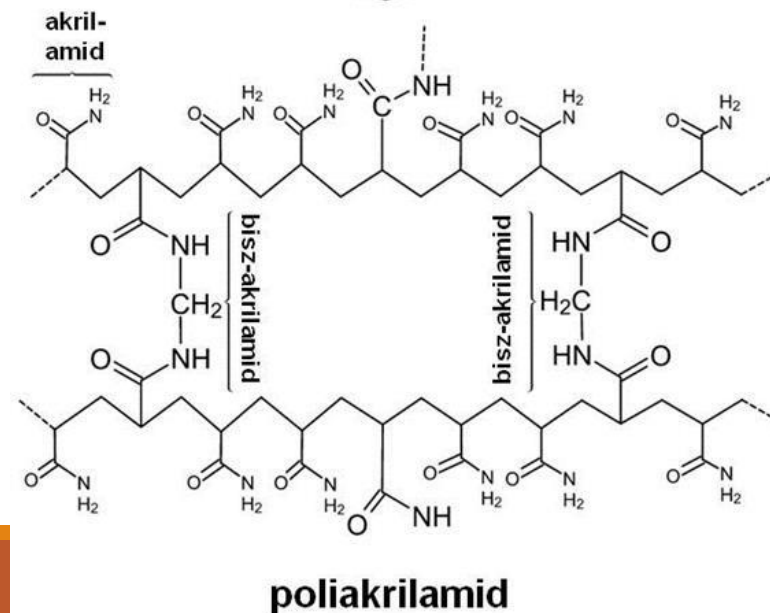


Az akrilamid kettős kötésének köszönhetően képes polimerizálódni, hosszú láncok képződhetnek. Ha N,N'-metilén-bisakrilamiddal együtt polimerizálódik, a két szomszédos láncba is beépülhet, összekötve azokat. Így egy térhálós szerkezet alakulhat ki, mely hidrofil tulajdonsága miatt gélképző anyag. Ez a térháló kovalensen kötött, melegítésre sem olvad meg. A térháló sűrűségét megszabja az oldott akrilamid koncentrációja és az akrilamid/bisakrilamid aránya

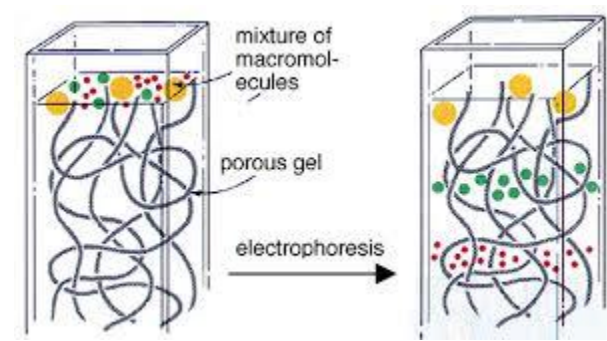
Poliakrilamid gél polimerizációja



polimerizáció



Gélelektroforézis – gélek



Gel Types

Agarose

- Polysaccharide extracted from sea weed.
- Gel casted horizontally
- Non-toxic.
- Separate large molecules
- Commonly used for DNA separations.
- Staining can be done before or pouring the gel.

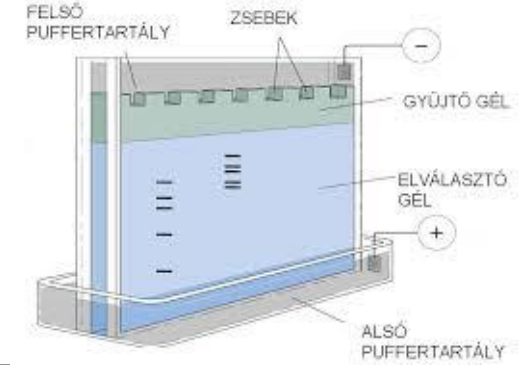
Polyacrylamide Gel

- Cross-linked polymer of acrylamide.
- Gel casted vertically.
- Potent neuro-toxic.
- Separate small molecules.
- Used for DNA or protein separations.
- Staining can be done after pouring the gel.

% Agarose concentration in gel (w/v)	Efficient separation range for linear double stranded DNA molecules (Kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

% Acrylamide	MW Range (kDa)
7	50 - 500
10	20 - 300
12	10 - 200
15	3 - 100

Gélelektroforézis típusai



Natív

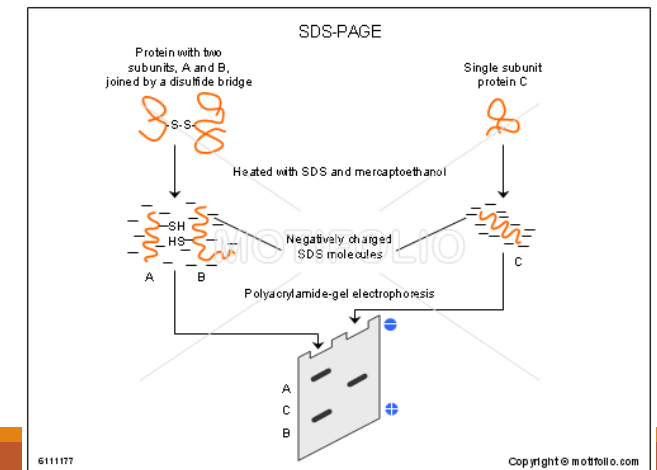
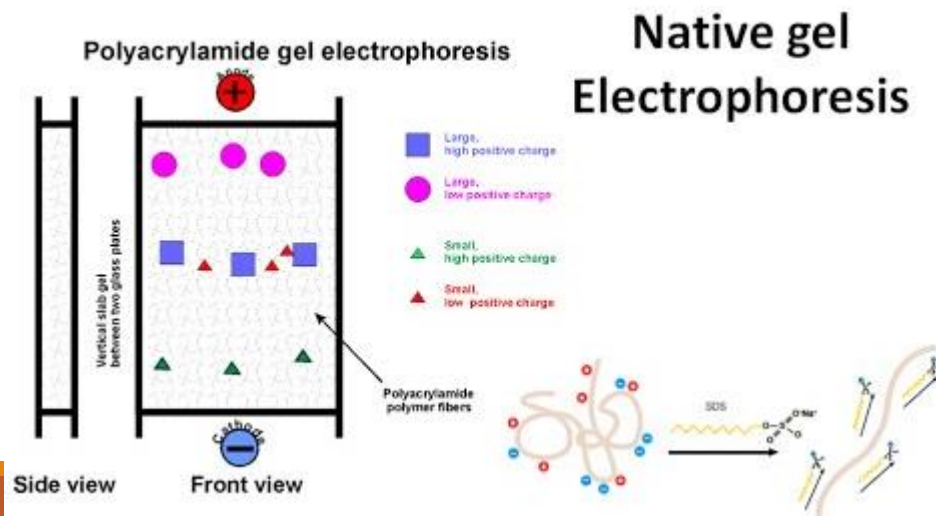
- Lúgos kémhatású puffer
- Aminosav oldalláncok többsége deprotonálódik
- Fehérjék negatív töltésűek lesznek
- Pozitív pólus felé vándorolnak
- Natív konformáció megmarad

Savas

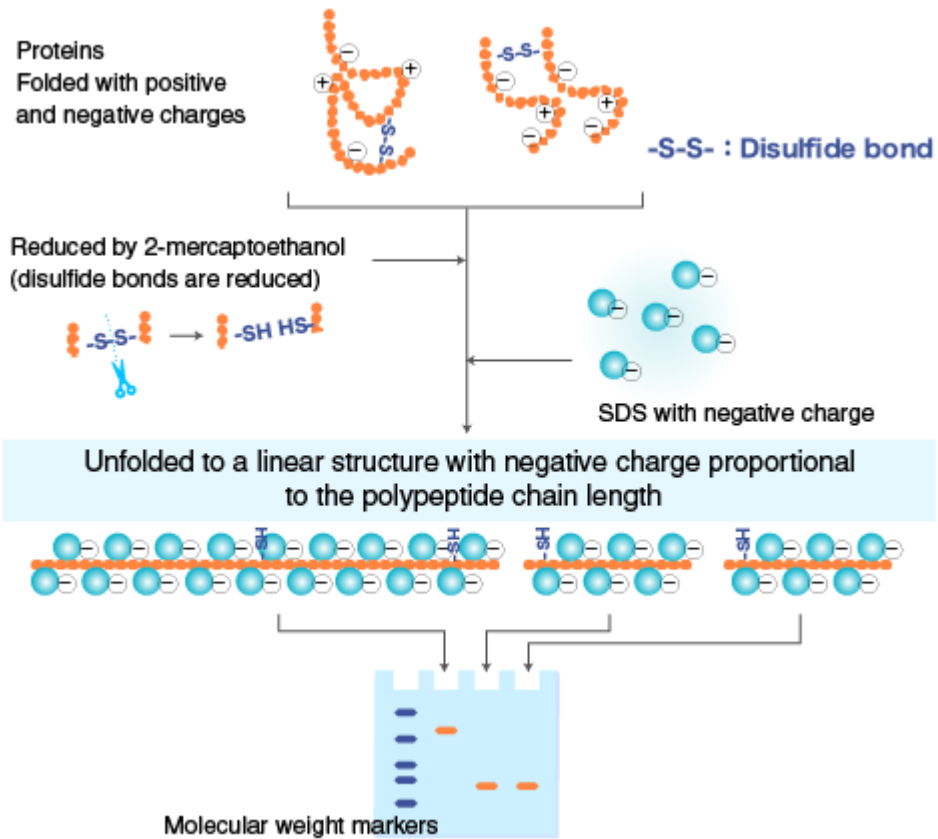
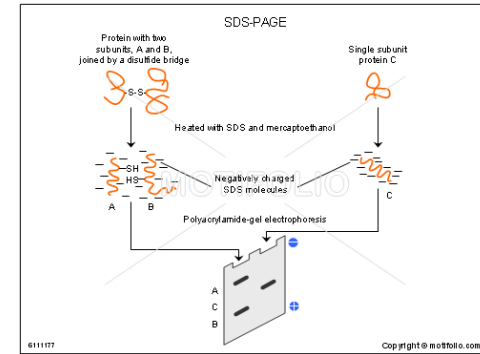
- Natív PAGE egy fajtája
- A használt puffer ecetsav alapú
- Nagy molekulaméretű fehérjék elválasztására használják
- Elválasztás a fehérjék eltérő töltéssűrűsége alapján

SDS

- Redukálószer alkalmazása (β -merkaptoetanol vagy DTT) a diszulfid hidak felbontására
- Detergens alkalmazása (nátrium-dodecilszulfát)
- Aspecifikus kötődés
- Kitekeri a fehérjéket és (megközelítőleg) azonos fajlagos negatív töltéssel burkolja be



Gélelektroforézis – SDS-PAGE



Izoelektromos fókuszálás

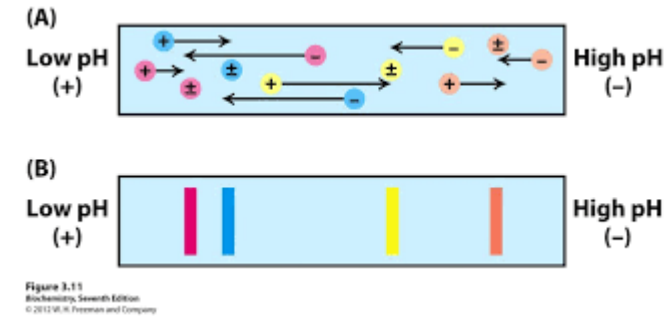
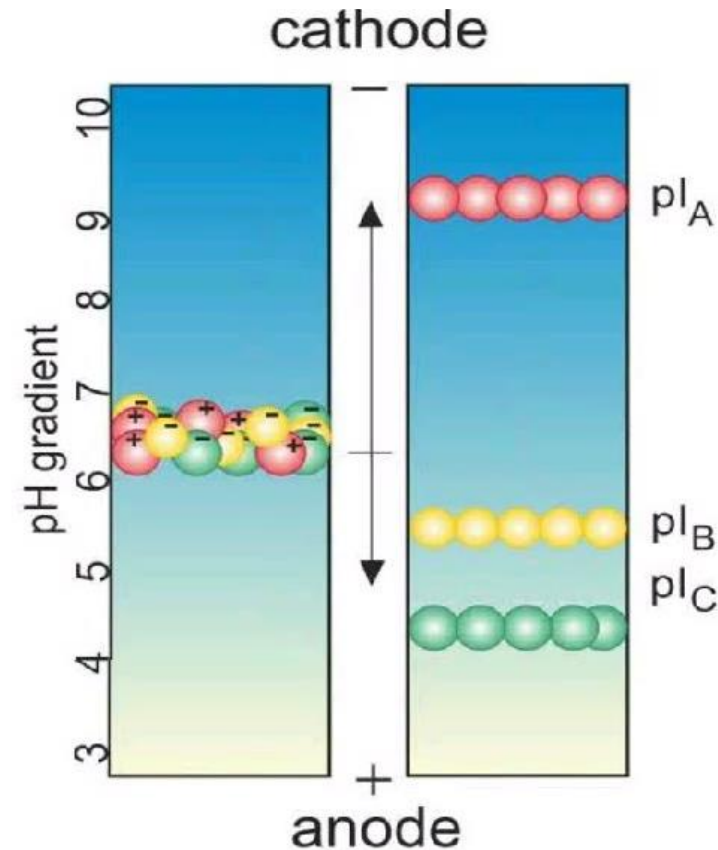
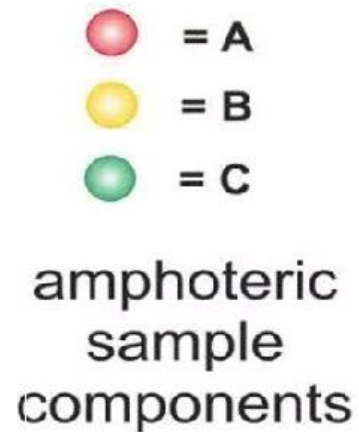
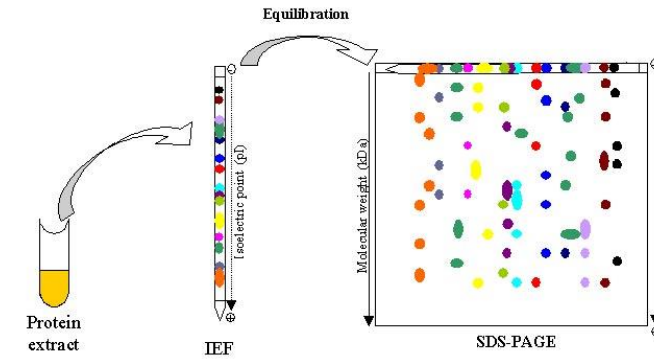


Figure 3.11
Biochemistry, Seventh Edition
© 2011 W. H. Freeman and Company

- Fehérjék elválasztására használható
- Fehérjék amfoterek, vagyis töltésük a környezet pH-jától függően változik
- pH gradiens létrehozása a gélben
- Fehérjék vándorlása az izoelektromos pont felé
- Ha az össztöltés 0, elektromos erőter hatására sem mozdulnak el a gélben

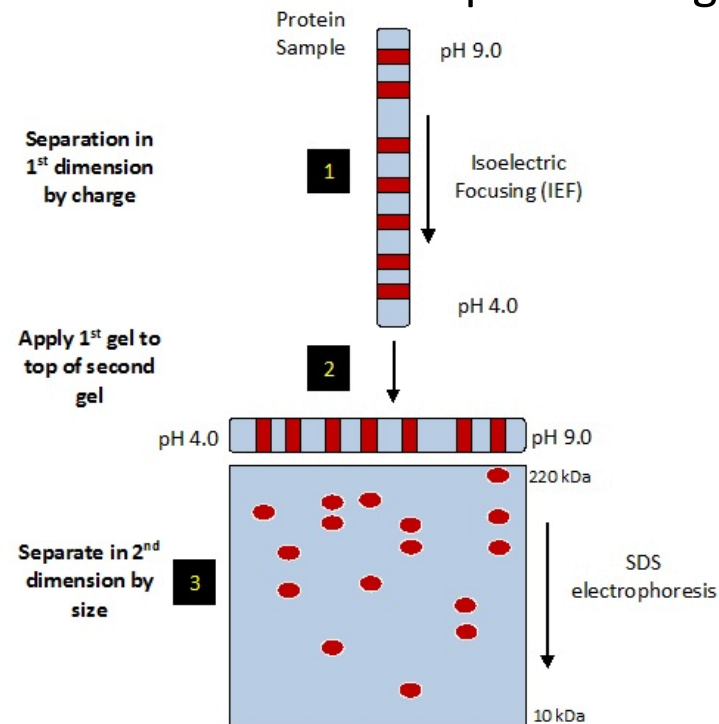


2D gélelektroforézis



- Fehérjék nagy hatékonyságú elválasztása
- Bonyolultabb fehérje-asszociátumok, multienzim komplexek vizsgálatára

- IEF és SDS-PAGE kombinációja
- Töltés és méret szerinti elválasztás



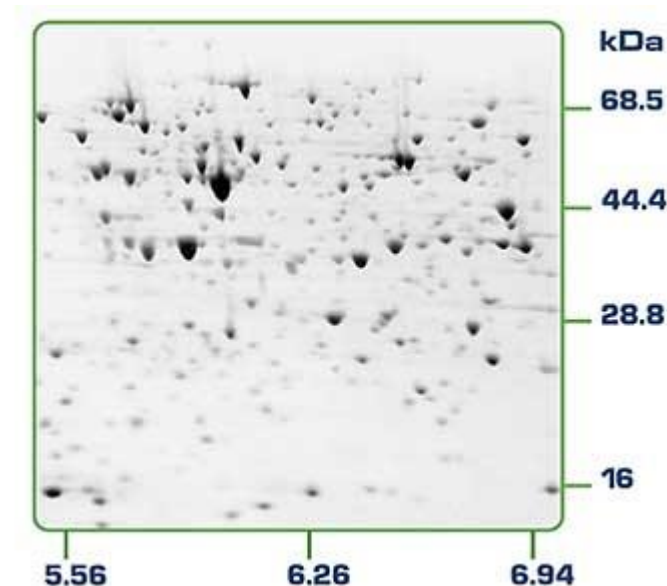
Izoelektromos fókuszálás



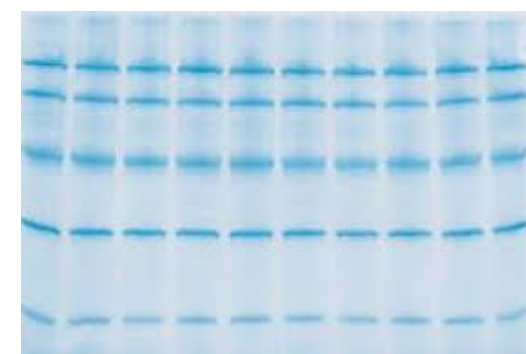
A gélcsík SDS oldatba helyezése



Merőleges futás SDS tartalmú gélen



Gélelektroforézis – detektálás

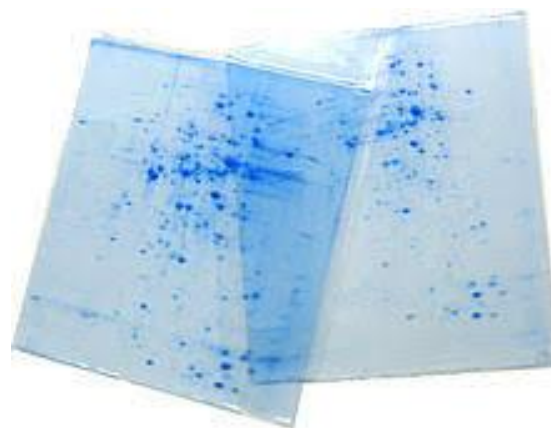
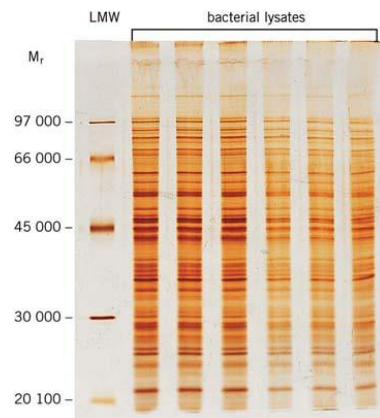
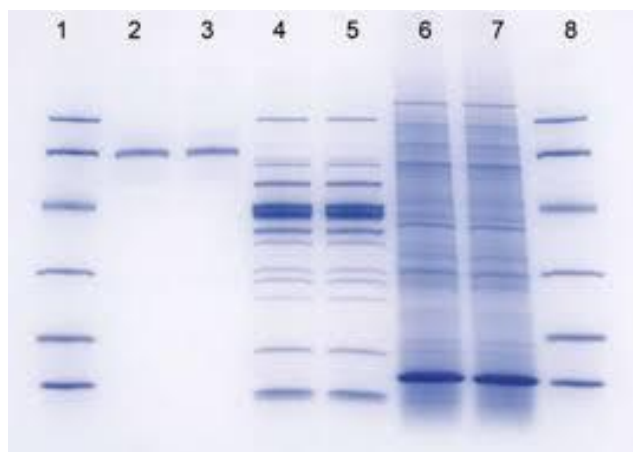


Fehérjék

Aspecifikus festés

- Comassie vagy ezüst festék
- Zink, fluoreszcens festés
- Specifikus funkciós csoport festékek

Szemikvantitatív meghatározás

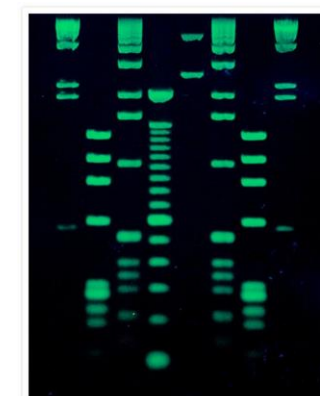
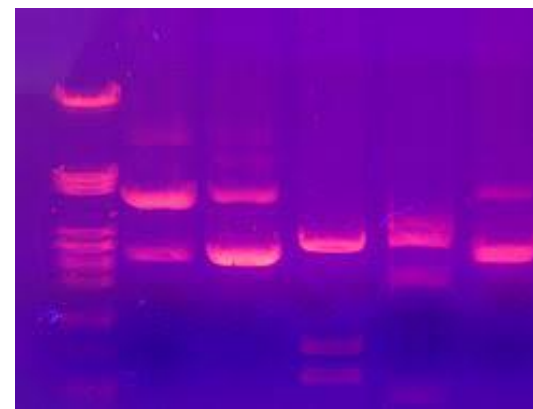


DNS

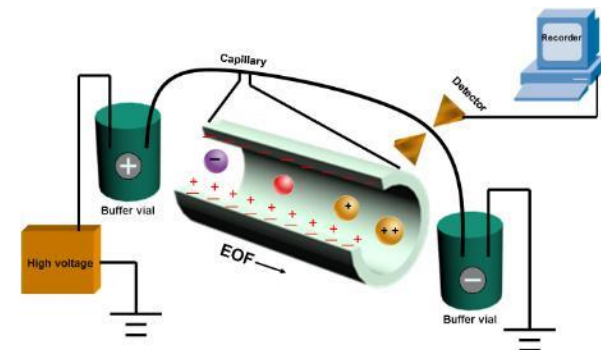
Interkalálódó fluoreszcens festék

- etídium-bromid (olcsó, de mutagén)
- SYBR Safe, Eva Green

Szemikvantitatív meghatározás



Kapilláris elektroforézis – alapok

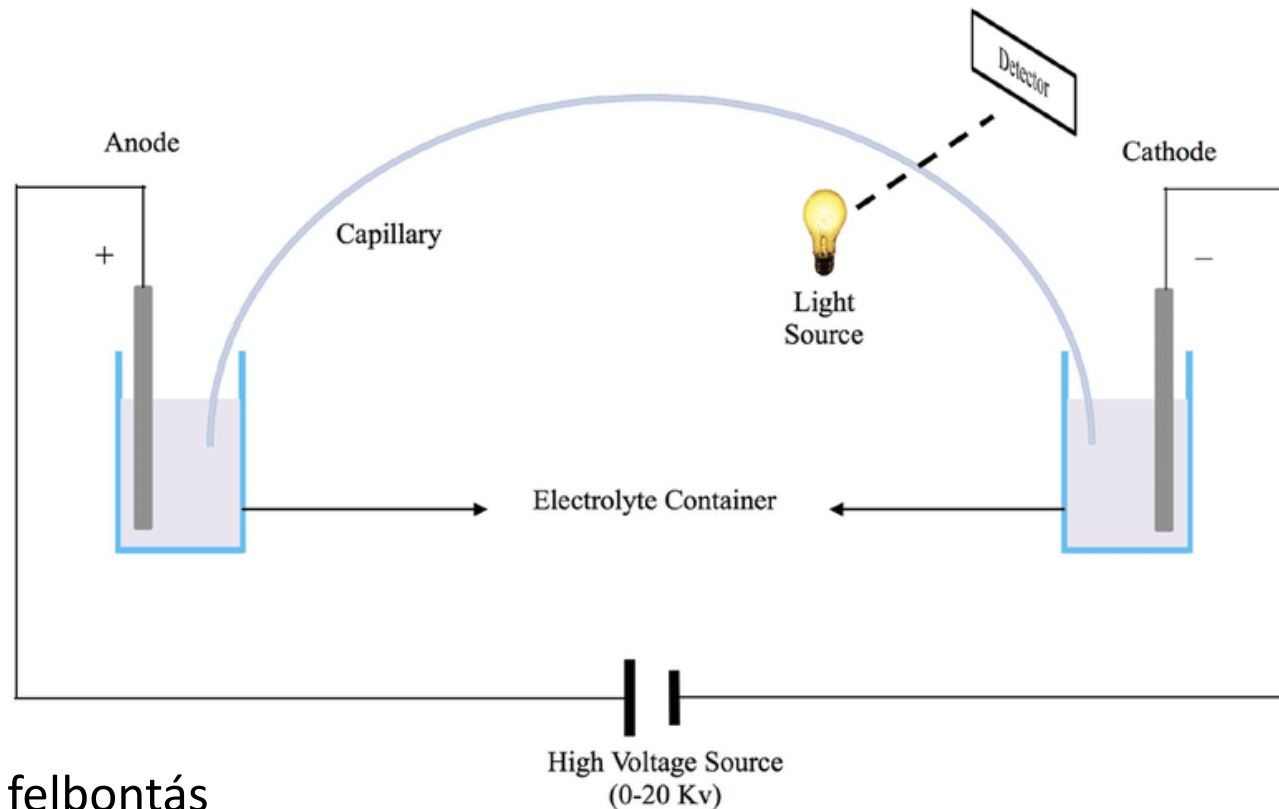


$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

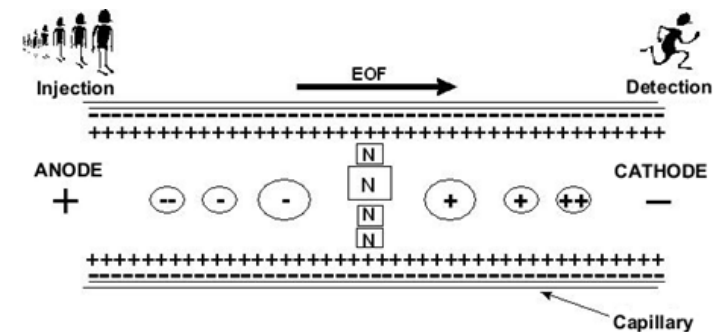
- az oldat töltéssel rendelkező részecskéi elektromos erőter hatására különböző sebességgel mozdulnak el
- elválasztás alapja a töltés/méret arány
- általában 25-75 μm átmérőjű kvarckapilláris
- a kapilláris nagy elektromos ellenállásánál fogva a rendkívül nagy térerő alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé



rövid mérési idő, nagy elválasztási hatékonyság és jó felbontás



Kapilláris elektroforézis – EOF

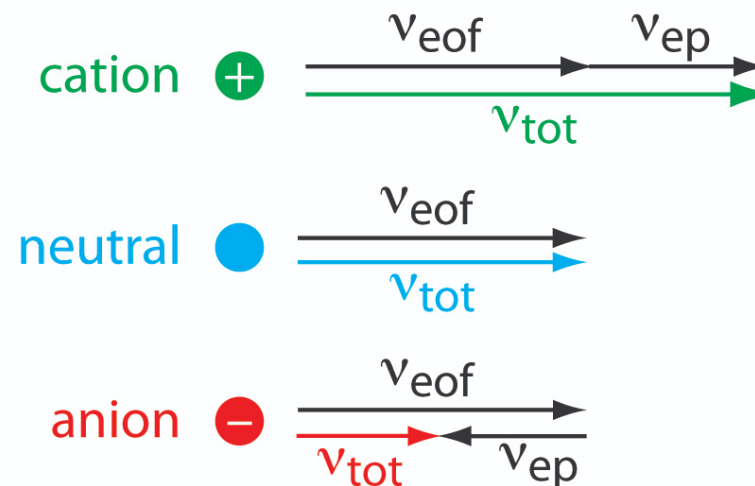
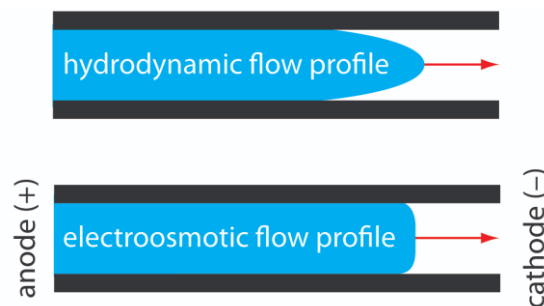
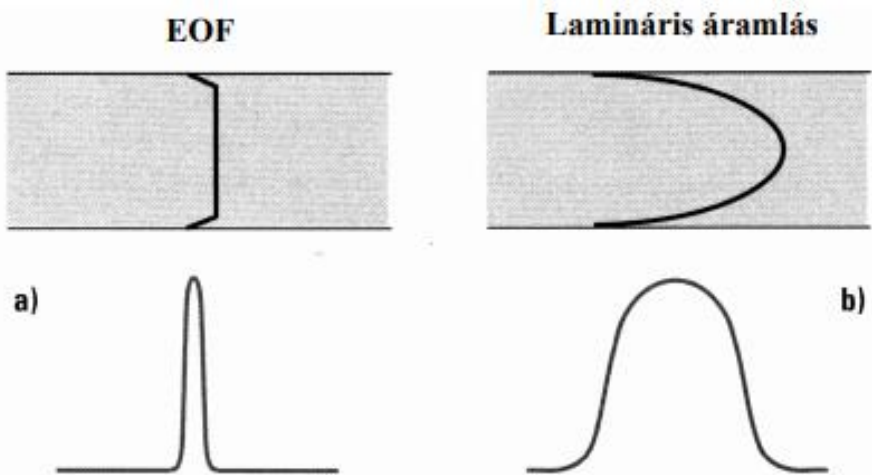


Elektroosmotikus áramlás (EOF)

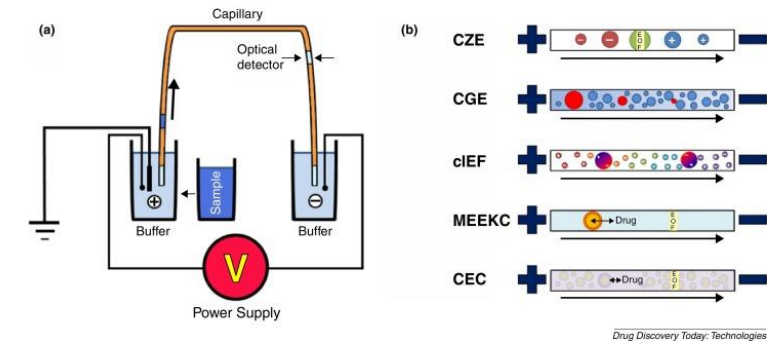


A kapilláris elektroforézis lelke

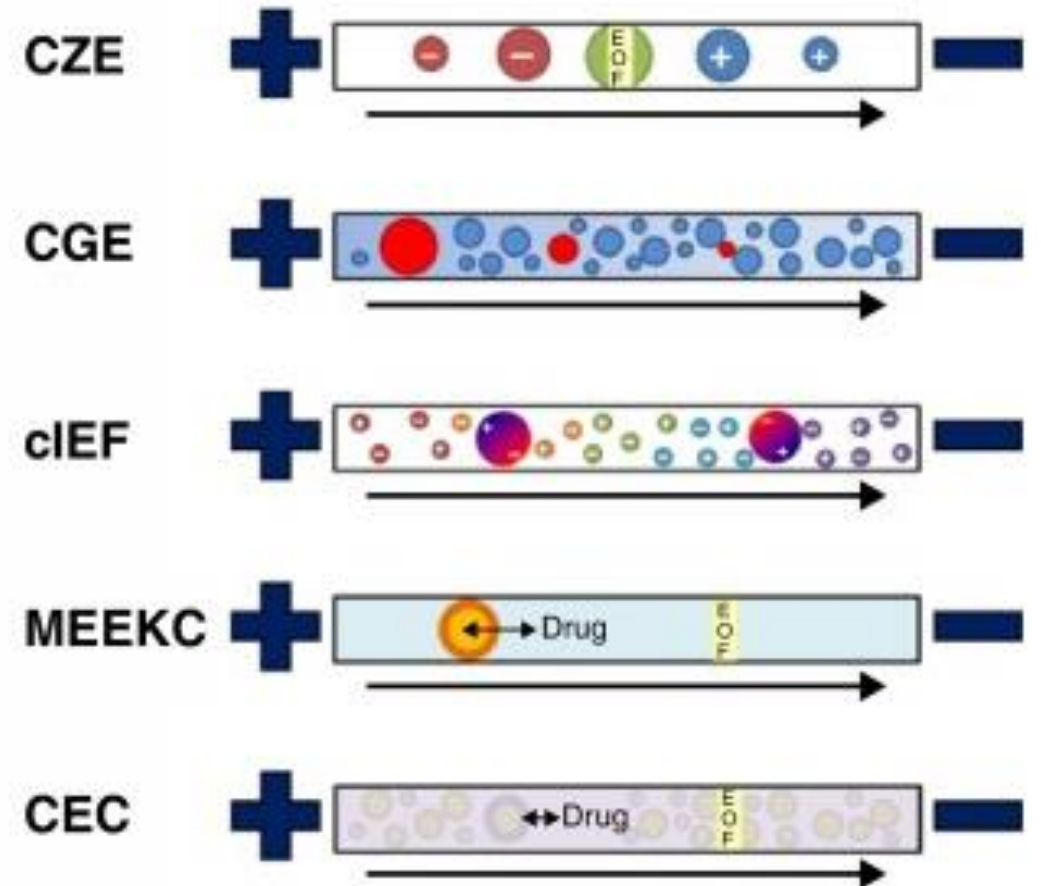
- Kapilláris belső falán negatív töltésű vagy negatív töltésűvé váló csoportok
- A negatív felülethez kationok társulnak
- A fal felületén kettősréteg alakul ki, amely potenciálkülönbséggel jellemezhető
- Feszültség hatására a diffúz kationos réteg elmozdul a katód felé
- Magával viszi a puffer oldat teljes tömegét



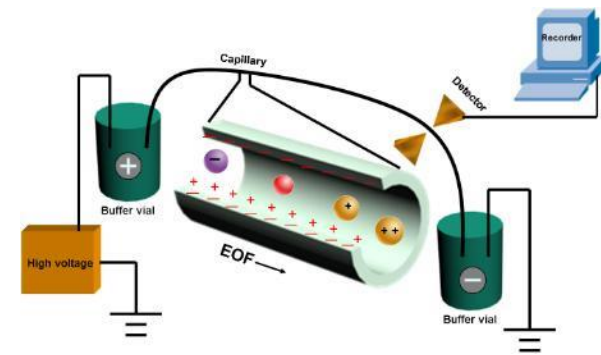
Kapilláris elektroforézis fajtái



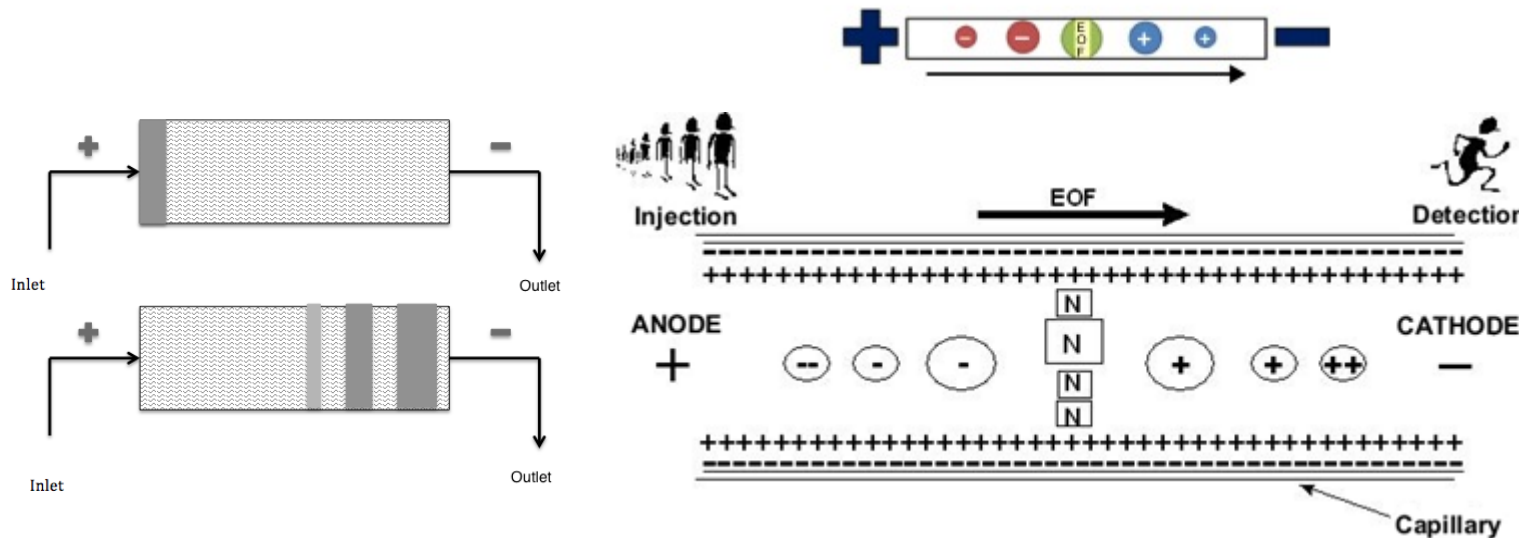
- Kapilláris zóna elektroforézis (CZE)
- Kapilláris gél elektroforézis (CGE)
- Micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC)
- Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)
- Kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF)
- Kapilláris izotachoforézis (cITP)



Kapilláris zóna elektroforézis (CZE)



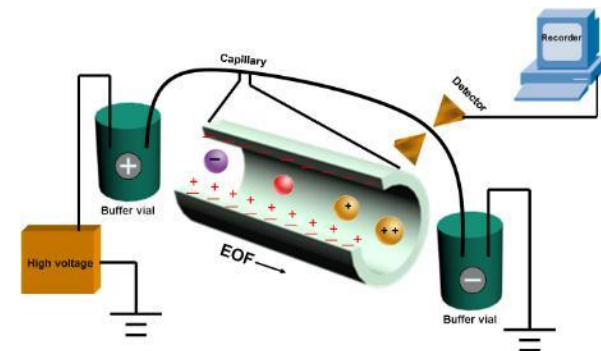
- Pufferoldattal (tompítóoldat) töltött kapilláris, nincs visszatartó közeg
- A minta komponensek diszkrét sávokban, eltérő sebességgel vándorolnak
- Sávok sebessége kizárólag az elektroforetikus mozgékonyságtól és az elektroosmotikus áramlástól függ
- Nagy hatékonyságú elválasztás kicsi tömeg/töltés arány különbség esetén is
- Pufferoldatba királis vegyületet (szelektort) helyezve, királis vegyületek is elválaszthatók



Az elválasztást befolyásoló tényezők:

- Feszültség
- Polaritás
- Hőmérséklet
- Kapilláris
- Pufferoldat paramétere

Kapilláris gél elektroforézis (CGE)



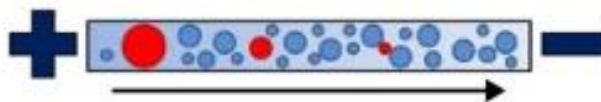
- Géllal töltött kapilláris, gél molekulaszűrőként viselkedik
- Egyenlő töltés/tömeg arányú komponensek elválasztása is lehetséges a méretük alapján
- A minta komponensek diszkrét sávokban, eltérő sebességgel vándorolnak
- Sávok sebessége függ az elektroforetikus mozgékonyságtól, az elektroosmotikus áramlástól és a mérettől is

Folyamatosan borított gélek

- Térhálós poliakrilamid
- Polimerizáció a kapillárison belül
- Monomerek a kapilláris falához kötve
- Gél roncsolás nélkül nem eltávolítható

Dinamikusan borított gélek

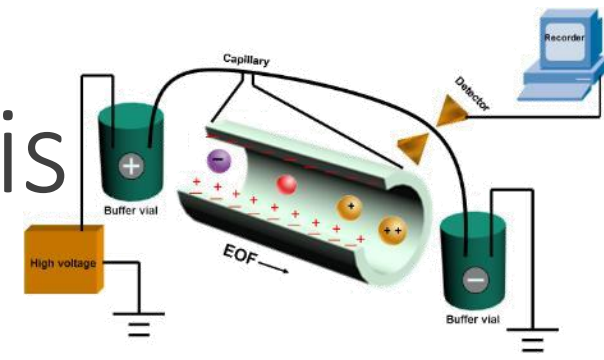
- Hidrofil polimerek (pl. lineáris PA, dextrán)
- Vizes pufferben feloldhatók
- Könnyebben előállítható és eltávolítható



Az elválasztást befolyásoló tényezők:

- Feszültség
- Polaritás
- Hőmérséklet
- Kapilláris
- **Pufferoldat paramétere**
- **Gél porozitása**

Micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MECC)



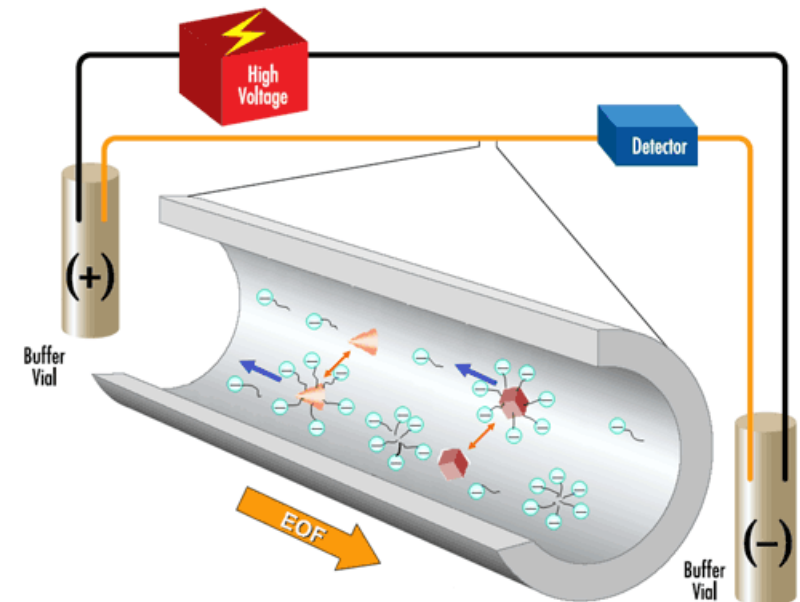
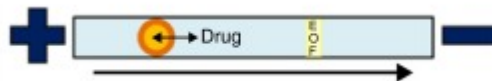
- Az elektrolitoldat felületaktív anyagokat tartalmaz nagy koncentrációban → micellák képződése
- Hidrofób molekulák a micella belsejébe vándorolnak, kevésbé hidrofóbak megoszlanak a micellák és az oldat között, hidrofilek az oldatban maradnak
- Anionos felületaktív anyag (pl. SDS) esetén a micellák az ellenkező irányba mozognak (lassulás)

Semleges anyagok

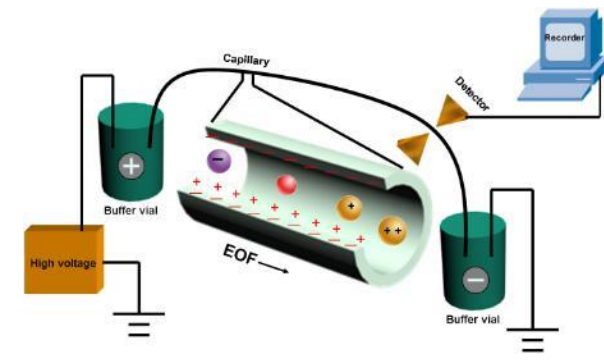
- Nincs elektroforetikus mozgékonyosság
- Vándorlási sebesség a megoszlási hányadostól függ

Töltött anyagok

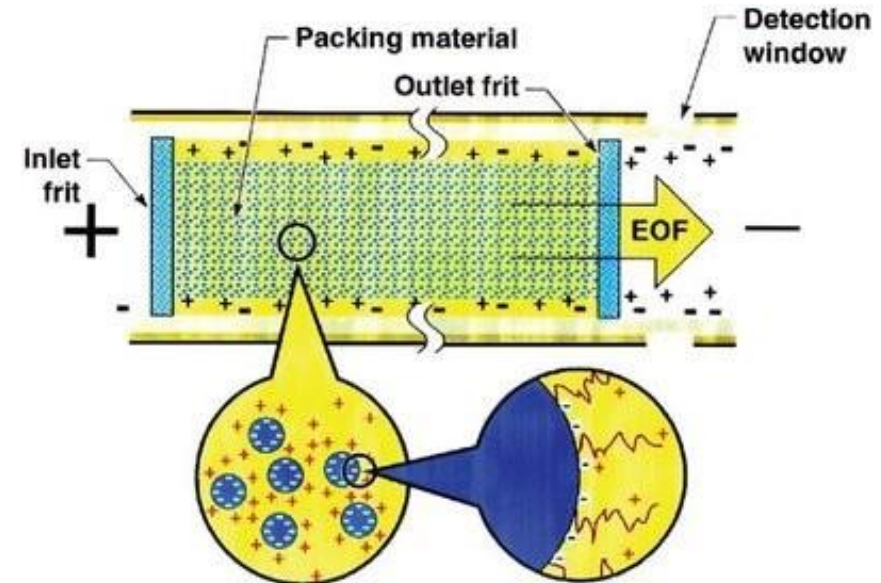
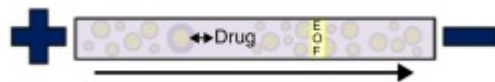
- Van elektroforetikus mozgékonyosság
- Sebesség függ a megoszlási hányadostól és EOF-től



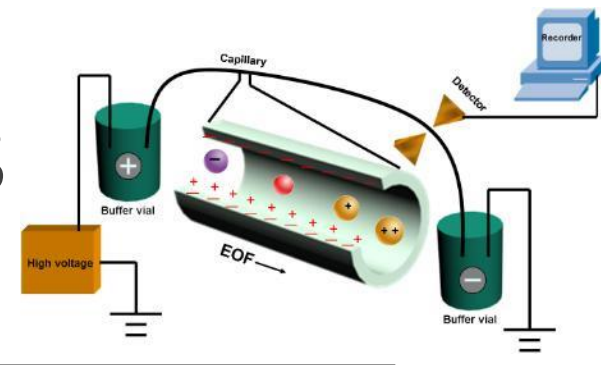
Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)



- Kromatográfias állófázissal töltött kapilláris (általában C8 vagy C18)
- Elválasztás az állófázis és a komponensek eltérő erősségű kölcsönhatásán alapszik
- EOF miatt csökken a csúcsszélesedés és nagyobb az elválasztási hatékonyság
- Vándorlási sebességet befolyásolják az álló és mozgófázis közötti megoszlás és a komponensek elektroforetikus tulajdonságai
- Rövidebb analízis idő

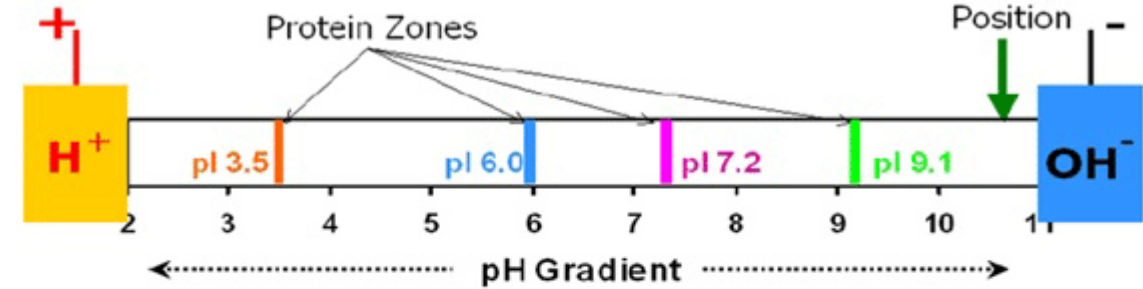


Kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF)

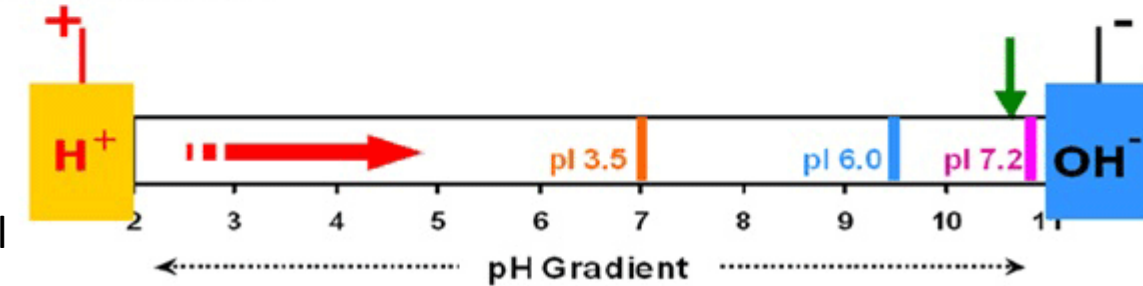


1. Töltés
 - Egy lépésben: mintát az amfolitokkal összekeverjük és együtt juttatjuk a kapillárisba
 - Szakaszos töltés: tompítóoldat, majd amfolitok, majd minta, majd tompítóoldat
2. Fókuszálás
 - feszültség rákapcsolásakor az amfolitok össztöltésük eredőjének megfelelően a katód vagy az anód felé vándorolnak, és így egy pH-gradienst alakítanak ki
 - Közben a minta komponensek izoelektromos pontjukig vándorolnak
3. Mobilizálás
 - Fókuszálás közben, kellően kis EOF alkalmazása mellett
 - Fókuszálás után, nyomás révén
 - Fókuszálás után a céltartályba sót adagolnak, abba az irányba indul meg az áramlás

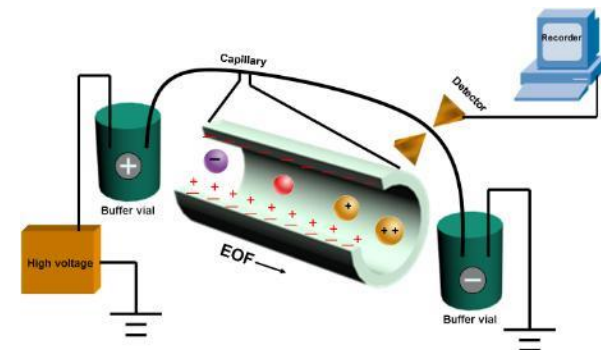
Focusing



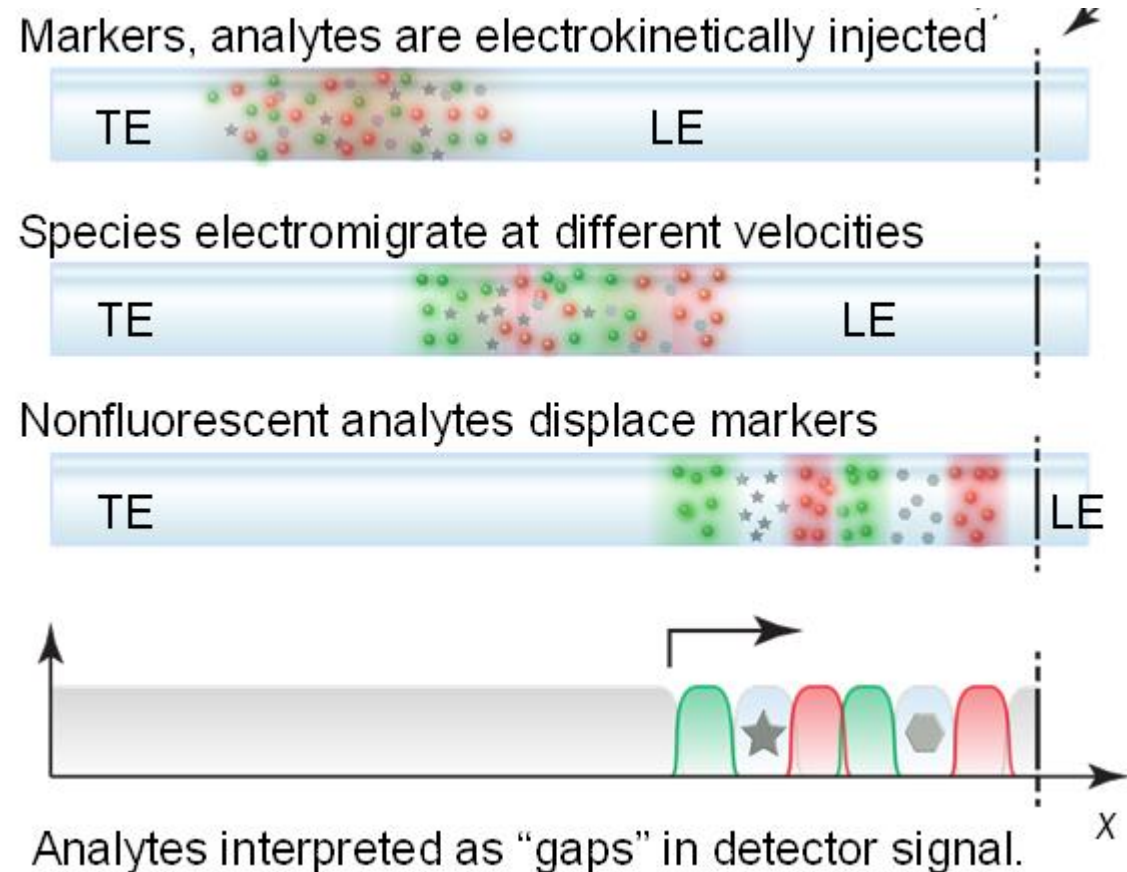
Mobilization



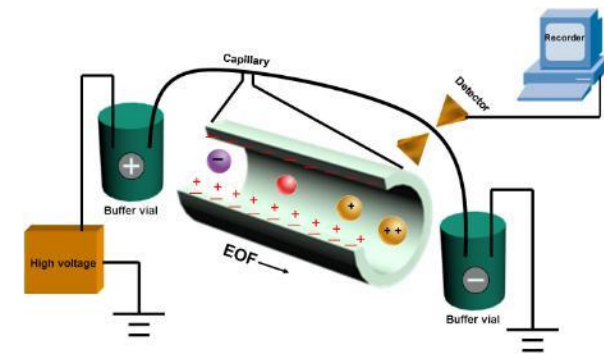
Kapilláris izotachoforézis (cITP)



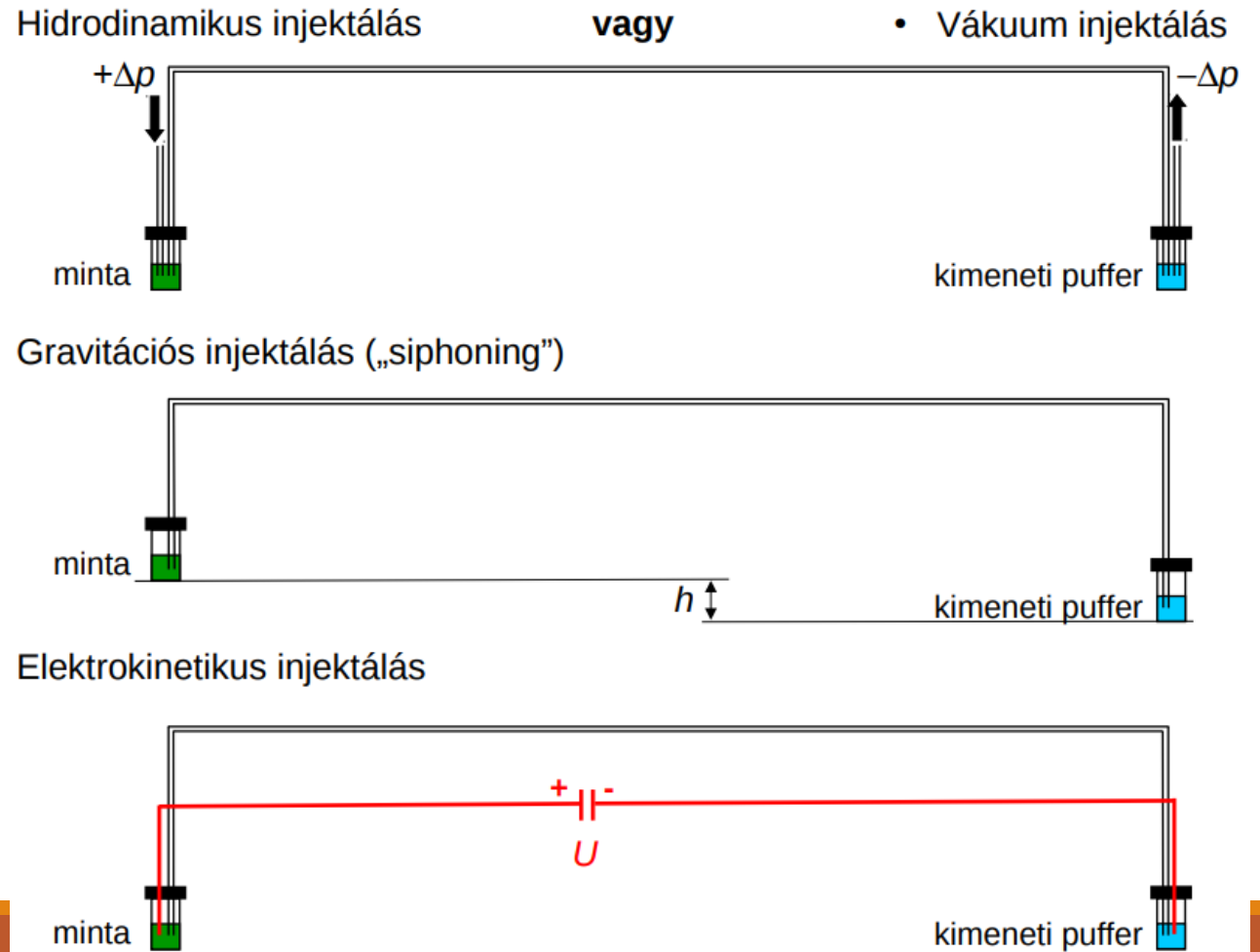
- „Mozgó határfelületek” alkalmazása
- Elválasztás két specifikus elektrolitrendszer segítségével a komponensek mobilitása alapján
- Különböző mobilitású anyagok zónákat alakítanak ki
- Zónák a vezető (leading-LE) és a záró (terminating-TE) elektrolit között vándorolnak
- A legnagyobb mobilitással rendelkező zónában a legkisebb a térerő
- Ha egy ion átdiffundál a szomszédos zónába, sebessége megváltozik és azonnal visszatér a saját zónájába, emiatt a zónák éles határ felülettel különülnek el egymástól
- Egy mérésben vagy csak anionokat vagy csak kationokat lehet meghatározni



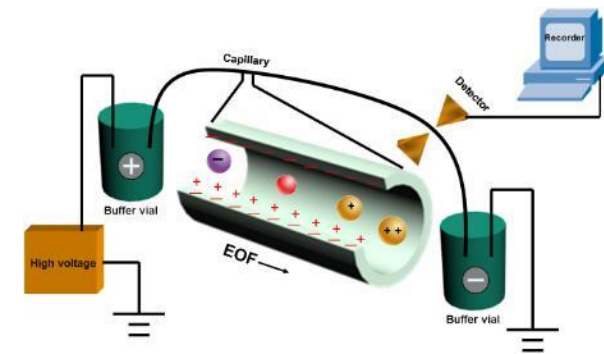
Kapilláris elektroforézis – injektálás



- Nagyon kis mintamennyiség a nagy elválasztási hatékonyság érdekében (1-50 nl)
- Mintadugó hossza nem lehet nagyobb, mint a kapilláris hosszának 1-2%-a



Kapilláris elektroforézis – detektálás



Módszer	LOD (mol/dm ³)	Előnyök/hátrányok
UV-Vis	$10^{-5} - 10^{-8}$	Kromofór csoport vagy származékképzés, spektrális információk
Fluoreszcens	$10^{-7} - 10^{-9}$	Érzékeny, általában származékképzés szükséges
LID	$10^{-14} - 10^{-16}$	Érzékeny, általában származékképzés szükséges, drága
Amperometria	$10^{-10} - 10^{-11}$	Érzékeny, szelektív, de csak elektroaktív vegyületekre
Vezetőképesség	$10^{-7} - 10^{-9}$	Univerzális, speciális hardver szükséges
Indirekt UV, FL, amperom.	10x-100x rosszabb	Univerzális
MS	$10^{-8} - 10^{-9}$	Univerzális, szerkezeti információ, problémás illesztés
NMR	$10^{-4} - 10^{-6}$	Legrészletesebb szerkezeti információ, csak CH csoportok, drága, kereskedelmi forgalomban nem elérhető

Köszönöm a figyelmet!

