

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

Elektroforetikus technikák, bioanalitika, kapcsolt módszerek

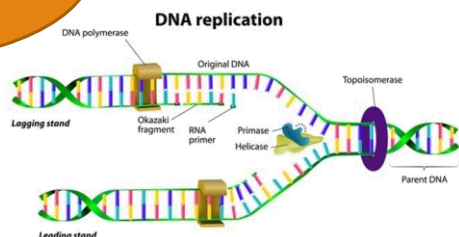
ELVEK ÉS ALKALMAZÁSOK

Bioanalitika - csoportosítás

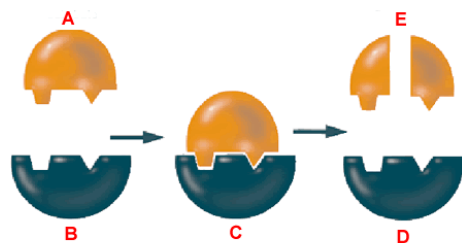


Biokémiail reakción alapuló módszerek

DNS alapú módszerek



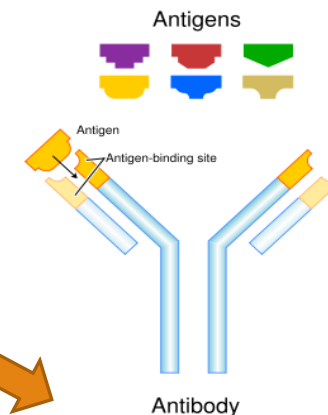
- PCR
- RT-PCR
- PCR-ELISA
- DNS chipek
- ...



Enzimes módszerek

- Szubsztrát meghatározás
- Enzimaktivitás mérés
- Immobilizált enzimes technikák
- ...

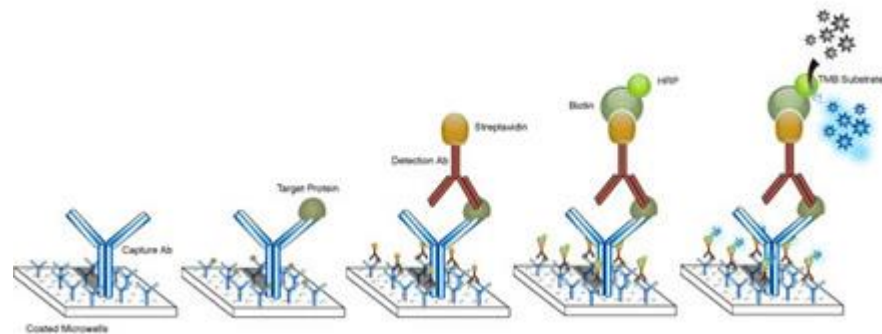
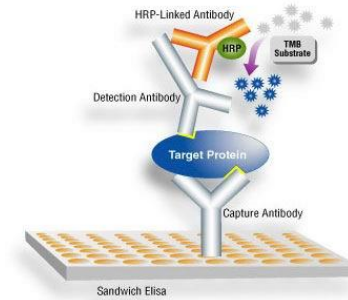
fehérje alapú módszerek



Immunanalitikai módszerek

- ELISA
- LFD
- Immunoblot
- Immundiffúzió
- ...

ELISA



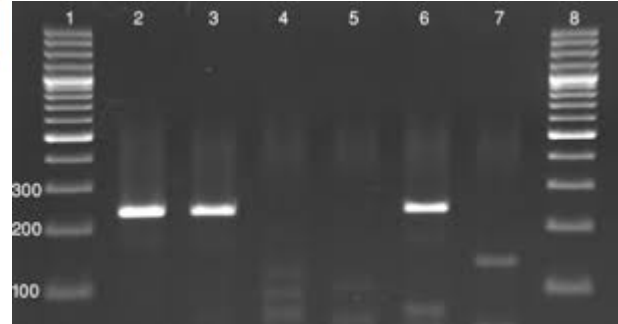
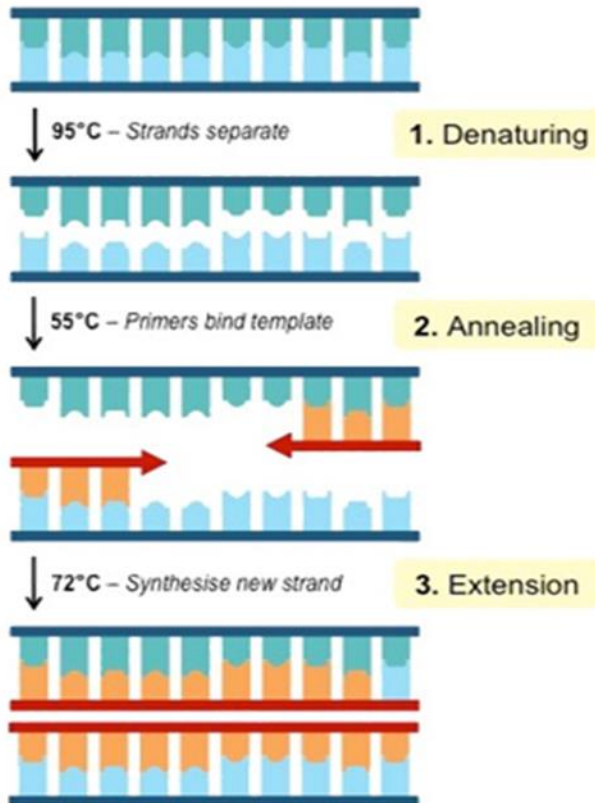
Alkalmazási terület

- kémiai és mikrobiológiai szennyezők
- toxinok
- szermaradványok
- génmódosított szervezetek (gmok)
- allergének
- mikrobák fajspecifikus meghatározás
- stb...

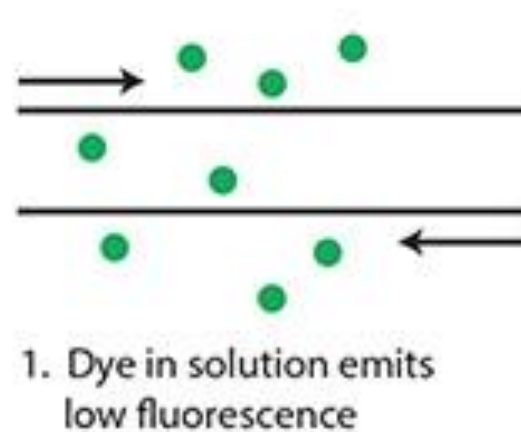
PCR



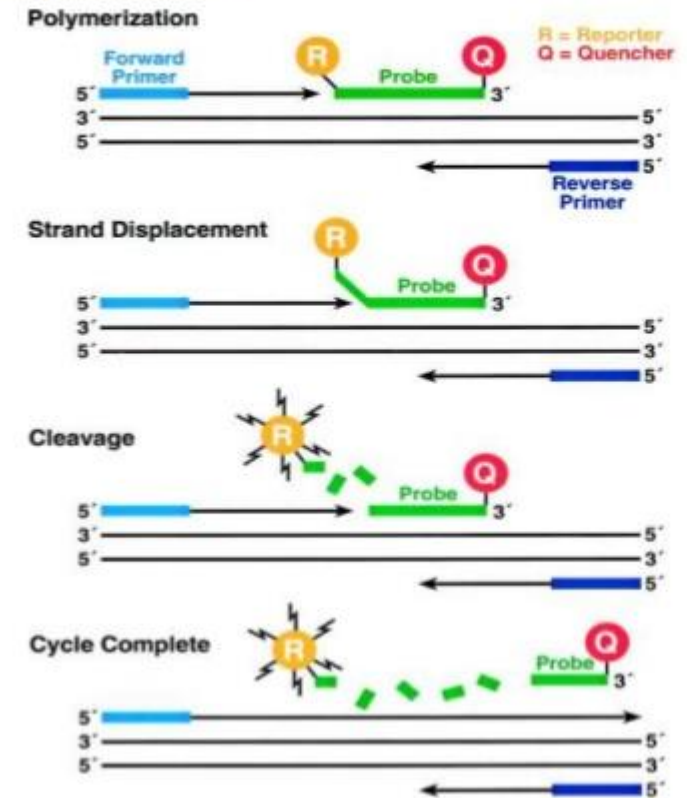
PCR Process (ONE Cycle)



Action of



TaqMan probe :-

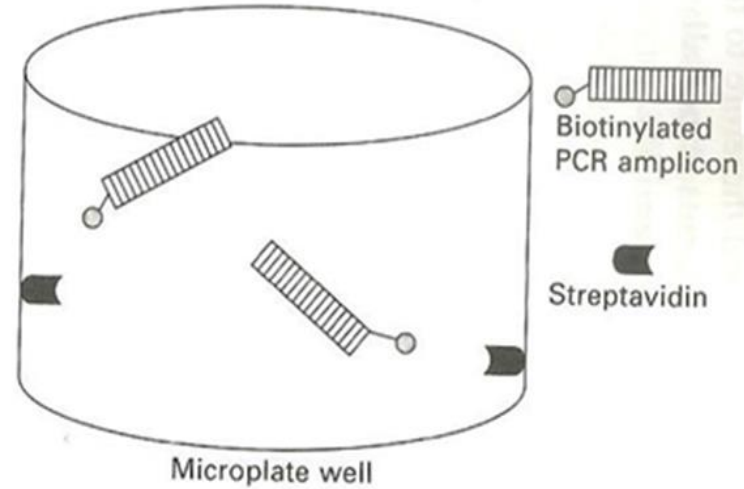


PCR-ELISA

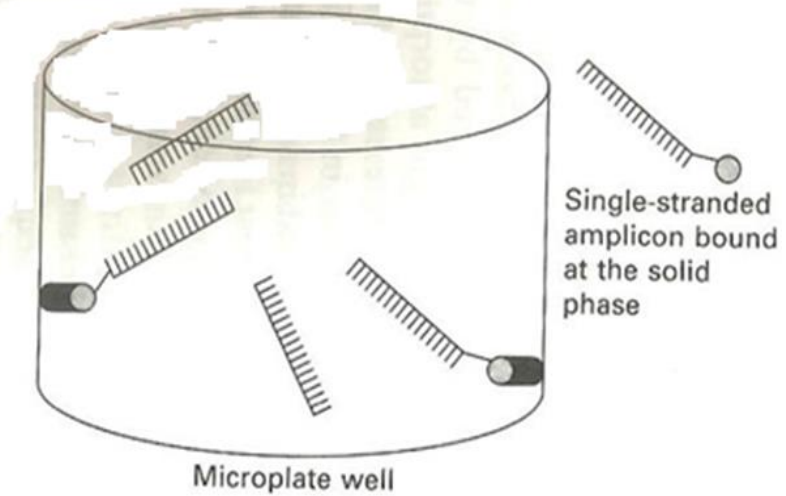
PCR termék immunanalitikai meghatározása

Csak minőségi meghatározás

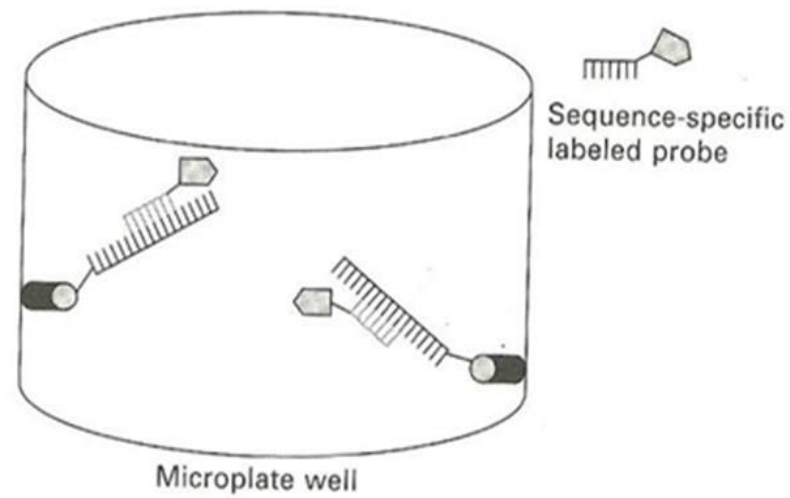
(a) Amplicon-binding to the solid phase



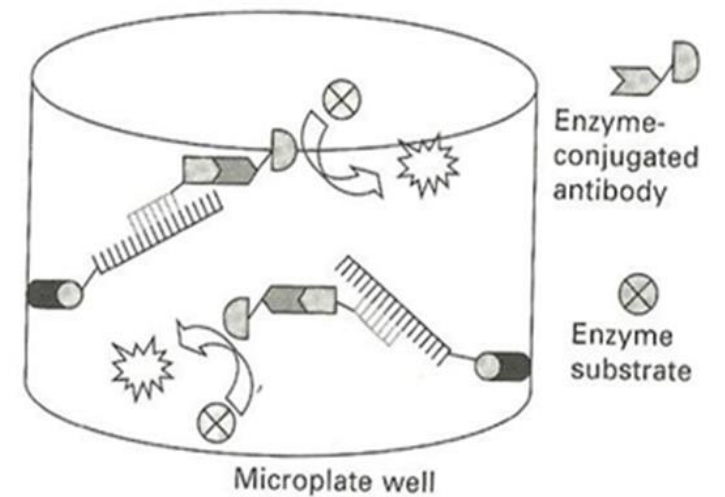
(b) Denaturation of double-stranded amplicons



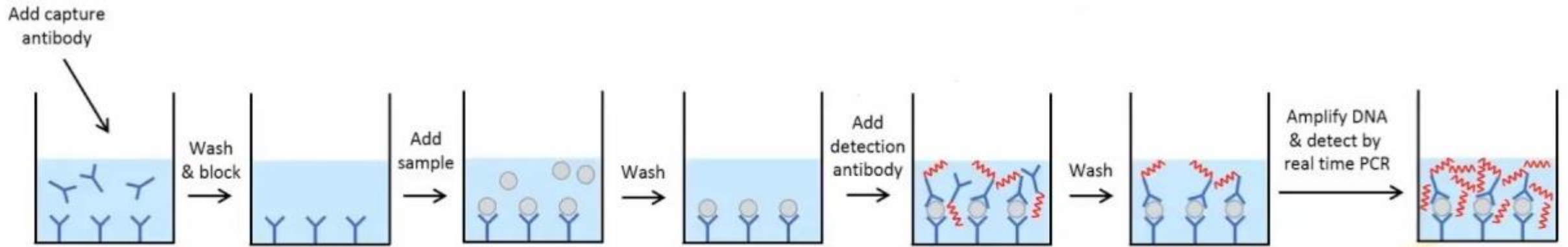
(c) Probe hybridization



(d) Probe detection



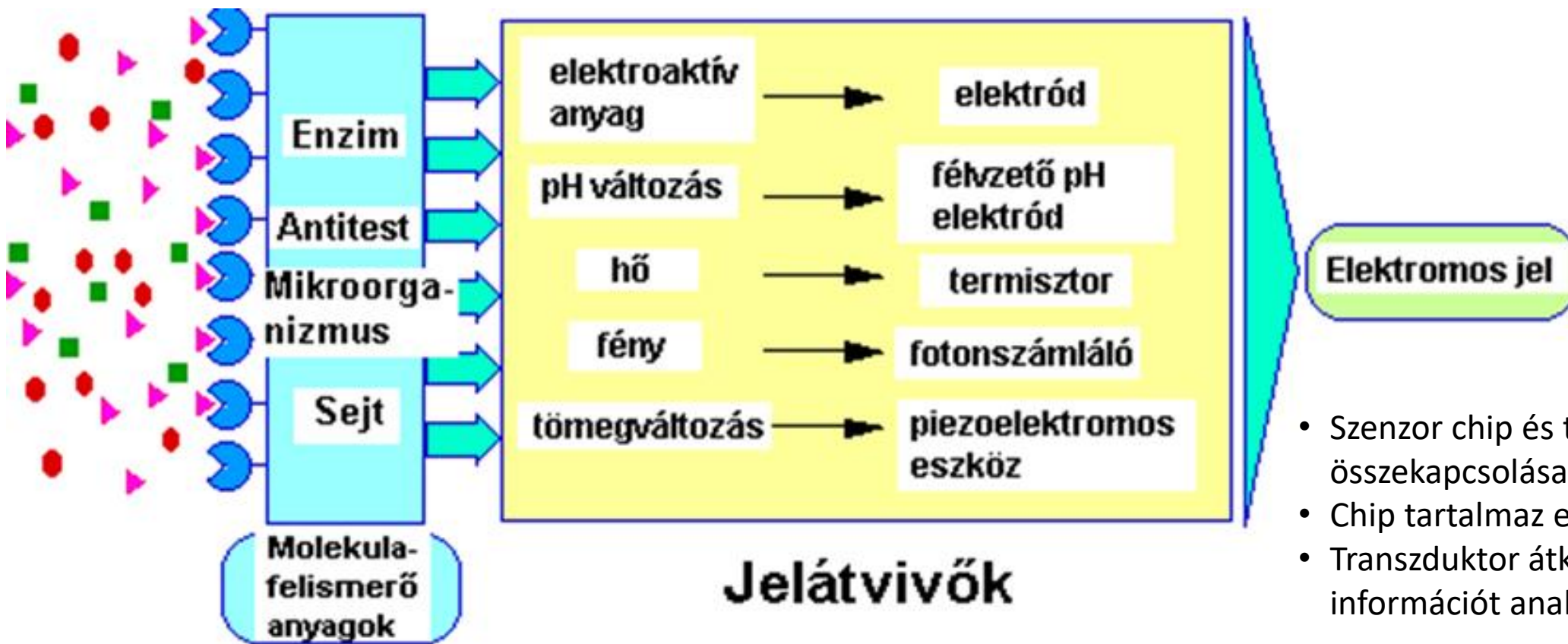
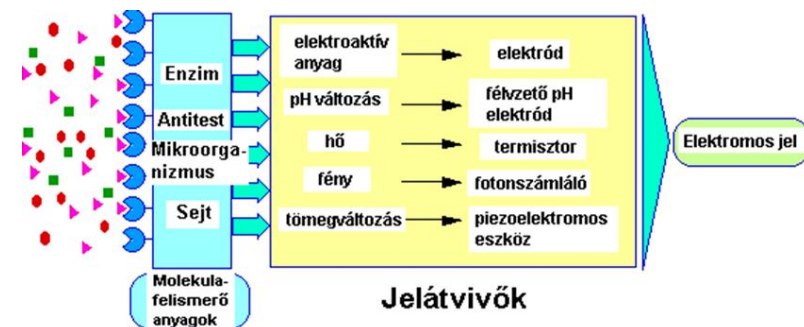
Immuno-PCR



- Jelerősítés PCR technikával
- Marker DNS az antigén antitest komplexen
- Nagyobb érzékenység

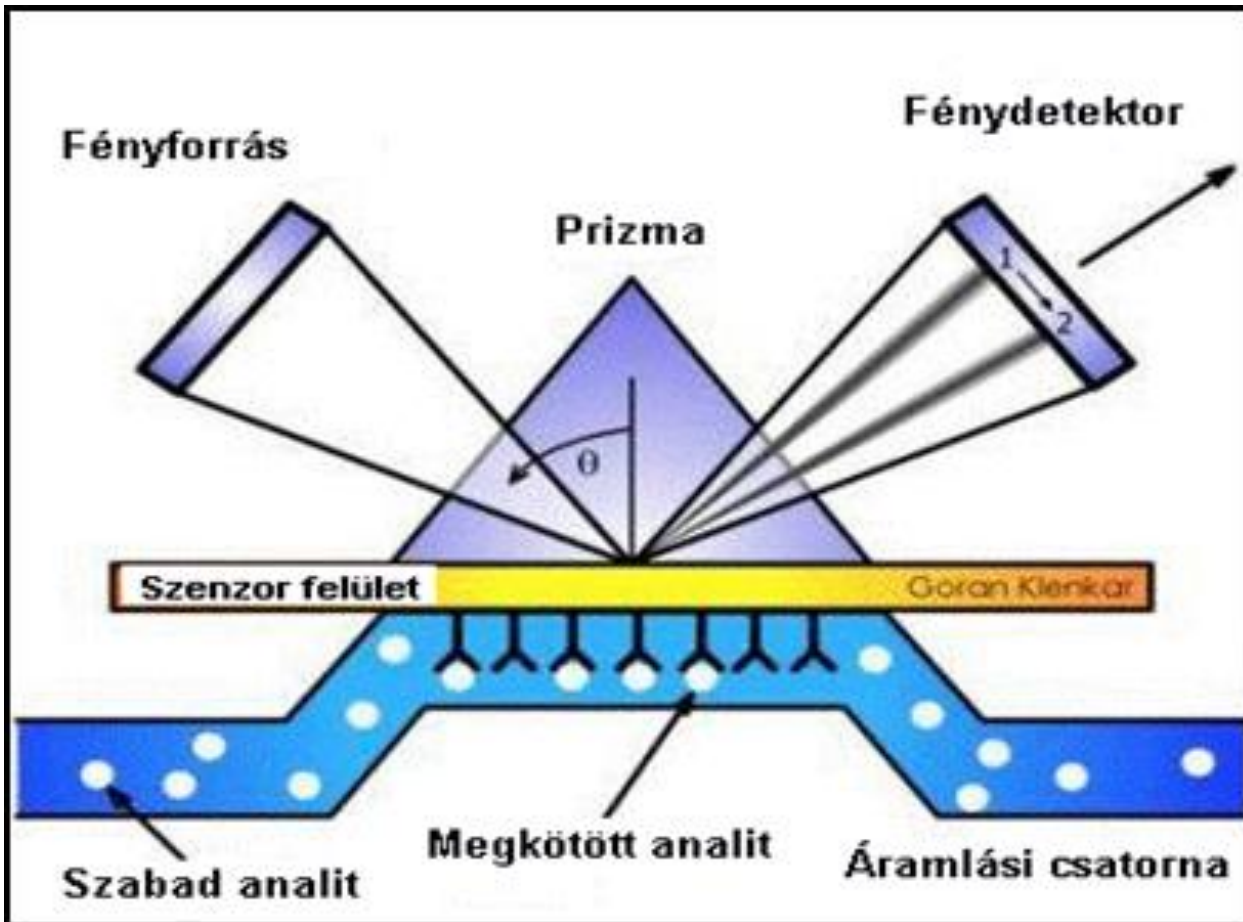
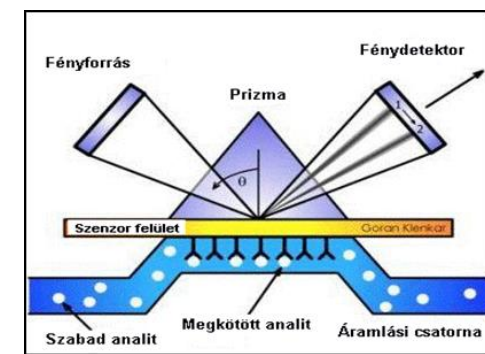


Bioszenzorok



- Szenzor chip és transzduktor összekapcsolása
- Chip tartalmaz egy bioaktív receptort
- Transzduktor átkonvertálja a biokémiai információt analitikai jellé

SPR – felületi plazmon rezonancia



- affinitás-alapú optikai jelátvivő rendszer
- a molekulák közötti kötéseket a felület közelében kialakuló törésmutató lokális változásaiból határozza meg

Alkalmazási terület:

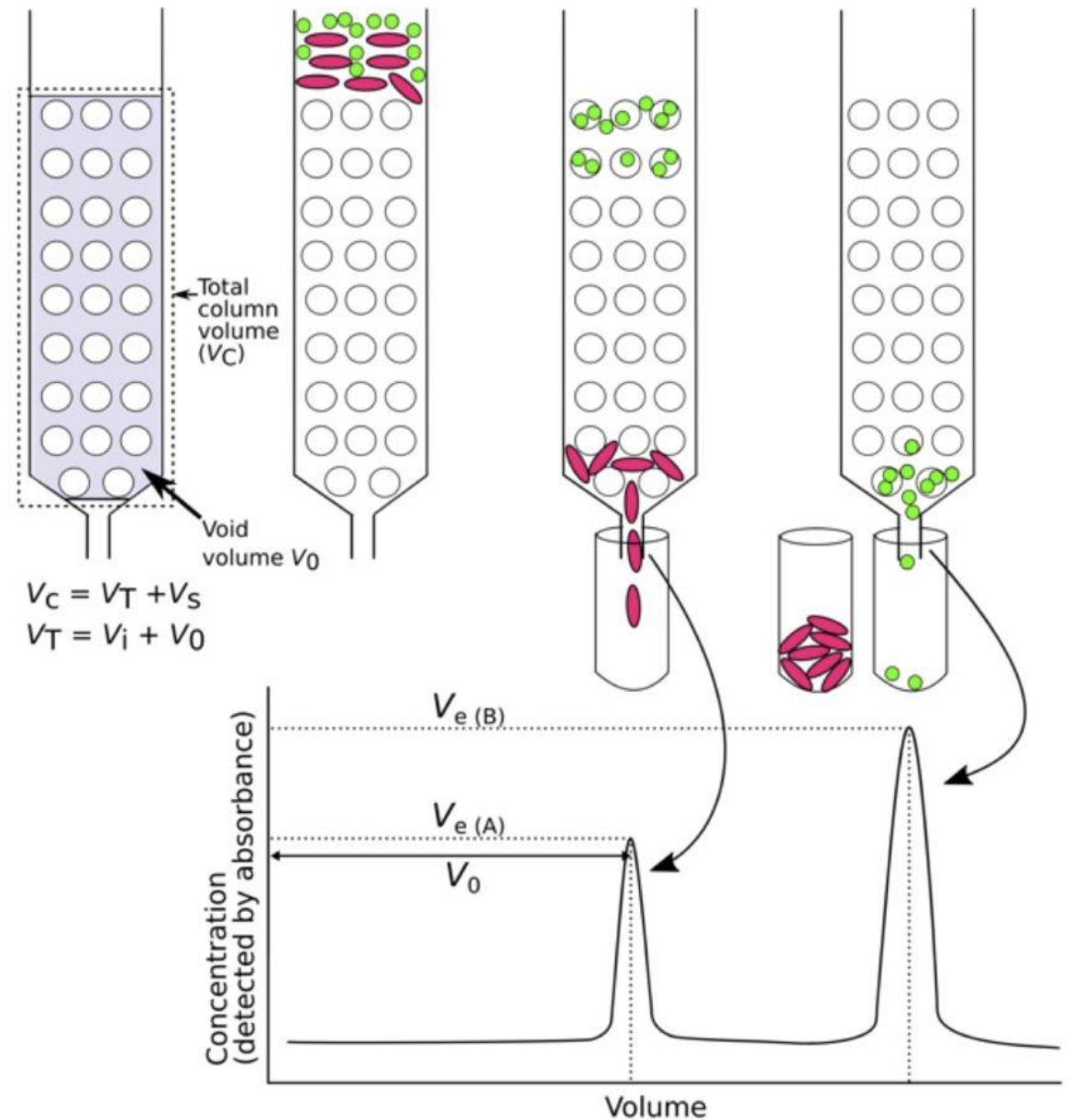
- Vitamin analitika
- Állatgyógyszer maradványok
- Allergén analitika
- Kutatás-fejlesztés

Gélszűrés, gélkromatográfia

Fehérjék méret szerinti elválasztása
Preparatív kromatográfia

Alkalmazási terület:

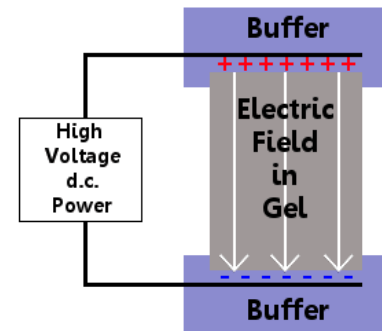
- Fehérjetisztítás, sómentesítés
- Frakcionálás molekulaméret szerint
- Kutatás-fejlesztés
- Termékelőállítás



V_T = total solvent accessible volume, which includes the void volume and the internal pore volume
 V_s = volume of beads inaccessible to solvent
 V_i = internal pore volume

Figure 1

Elektroforézis – definíció



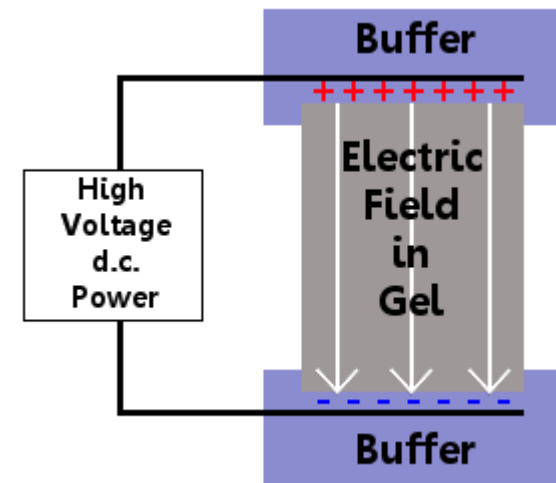
A töltéssel rendelkező részecskék elektromos erőter hatására eltérő sebességgel vándorolnak.

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

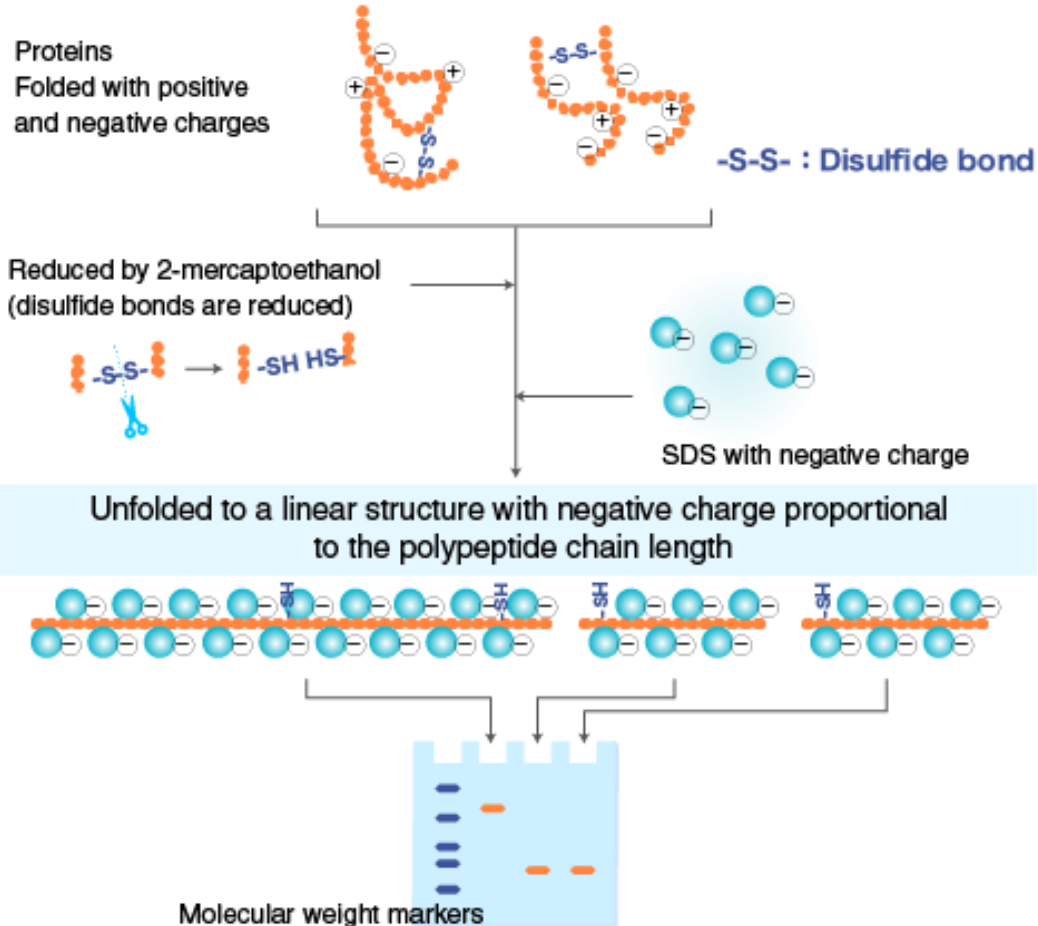
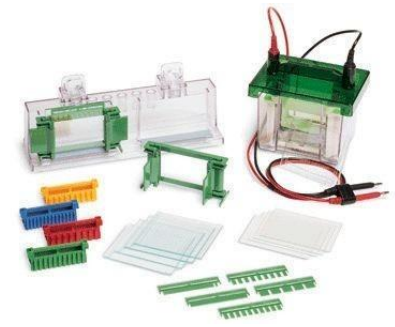
v – az ion sebessége
 μ_e – elektroforetikus mozgékonyság
 E – elektromotoros térerő
 F_e – elektromos erő
 F_s – súrlódási erő
 q – az ion töltése
 η – az oldat viszkozitása
 r – az ion sugara

- 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



Gélelektroforézis



- Nukleinsavak és fehérjék vizsgálata
- Agaróz vagy poliakrilamid gél
- Méret szerinti elválasztás

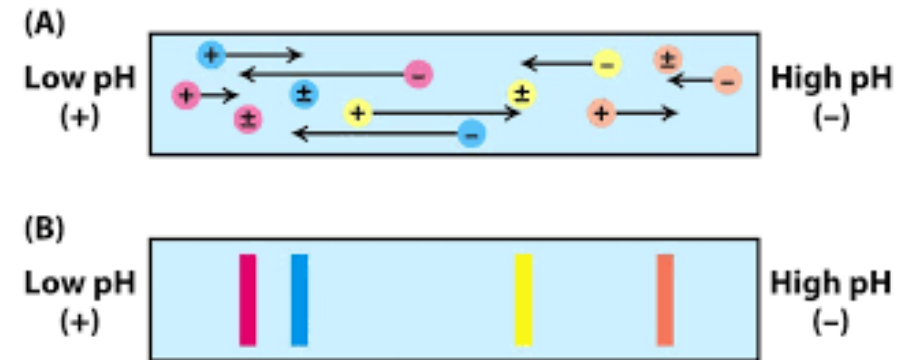
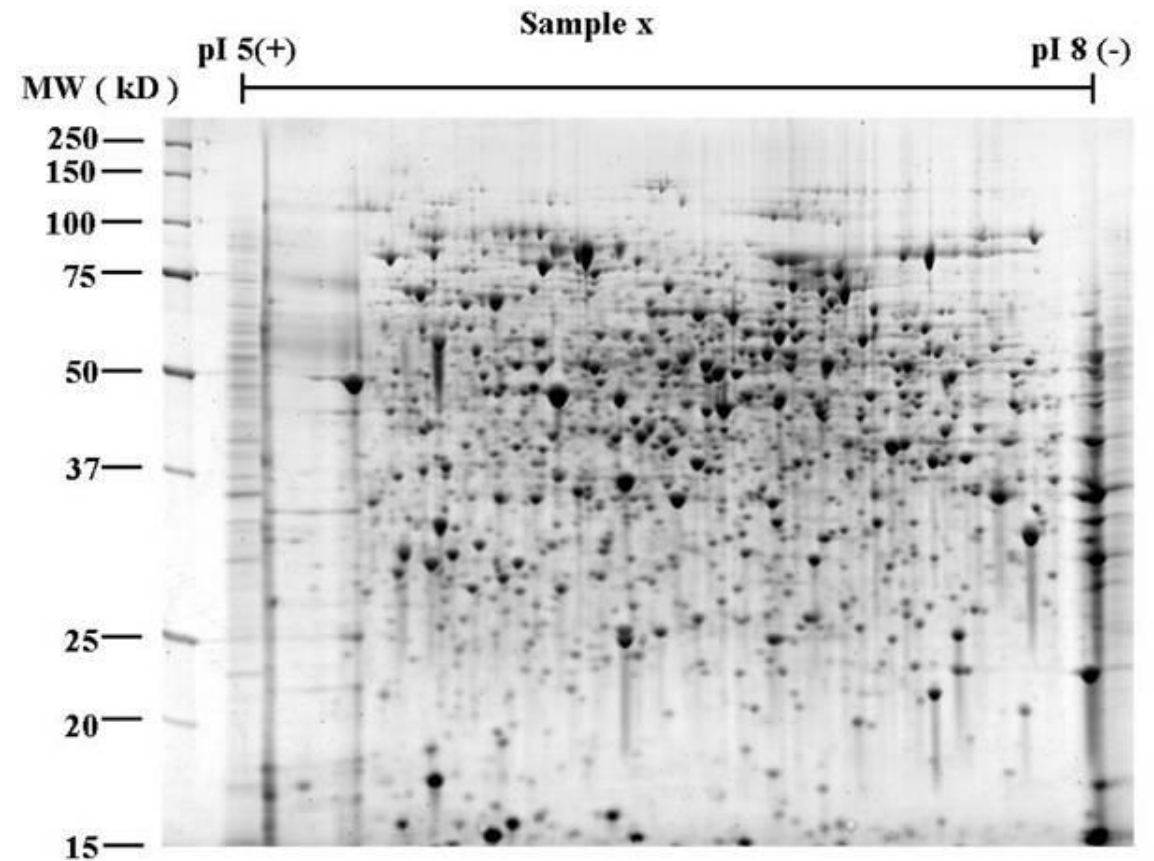
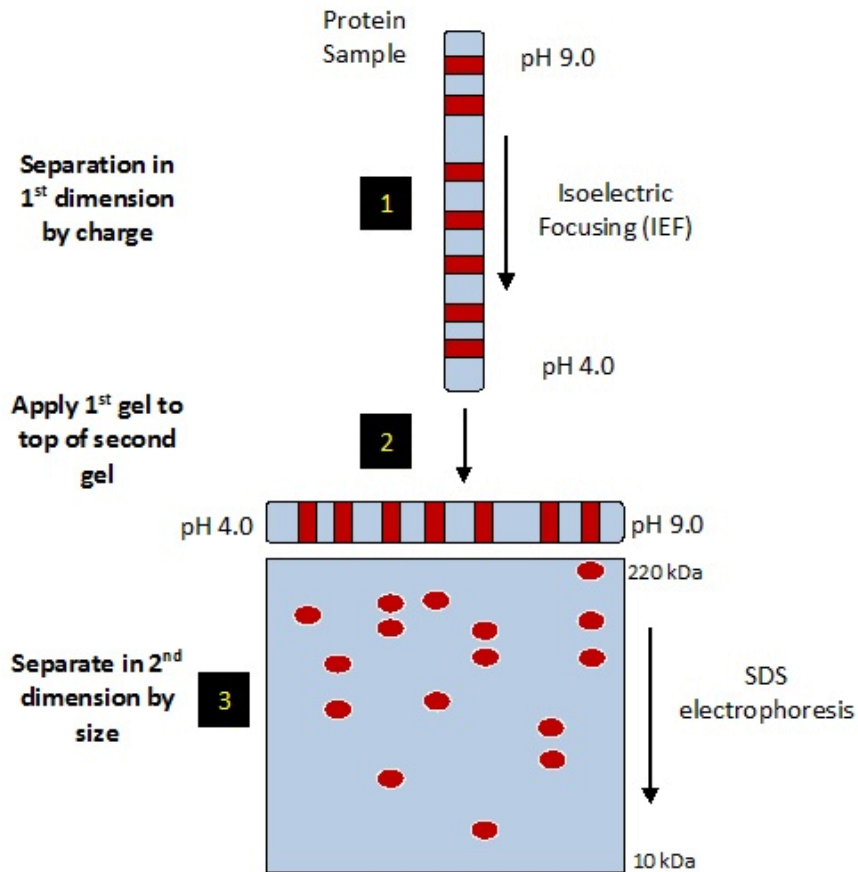
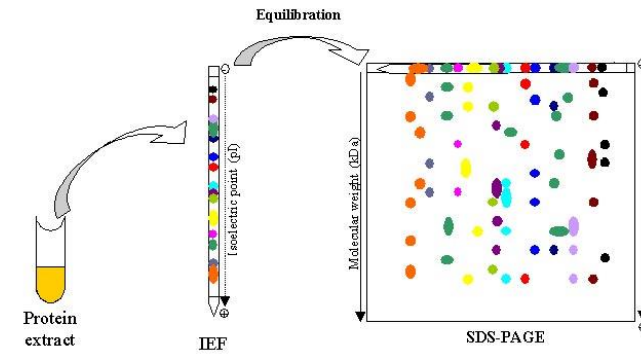


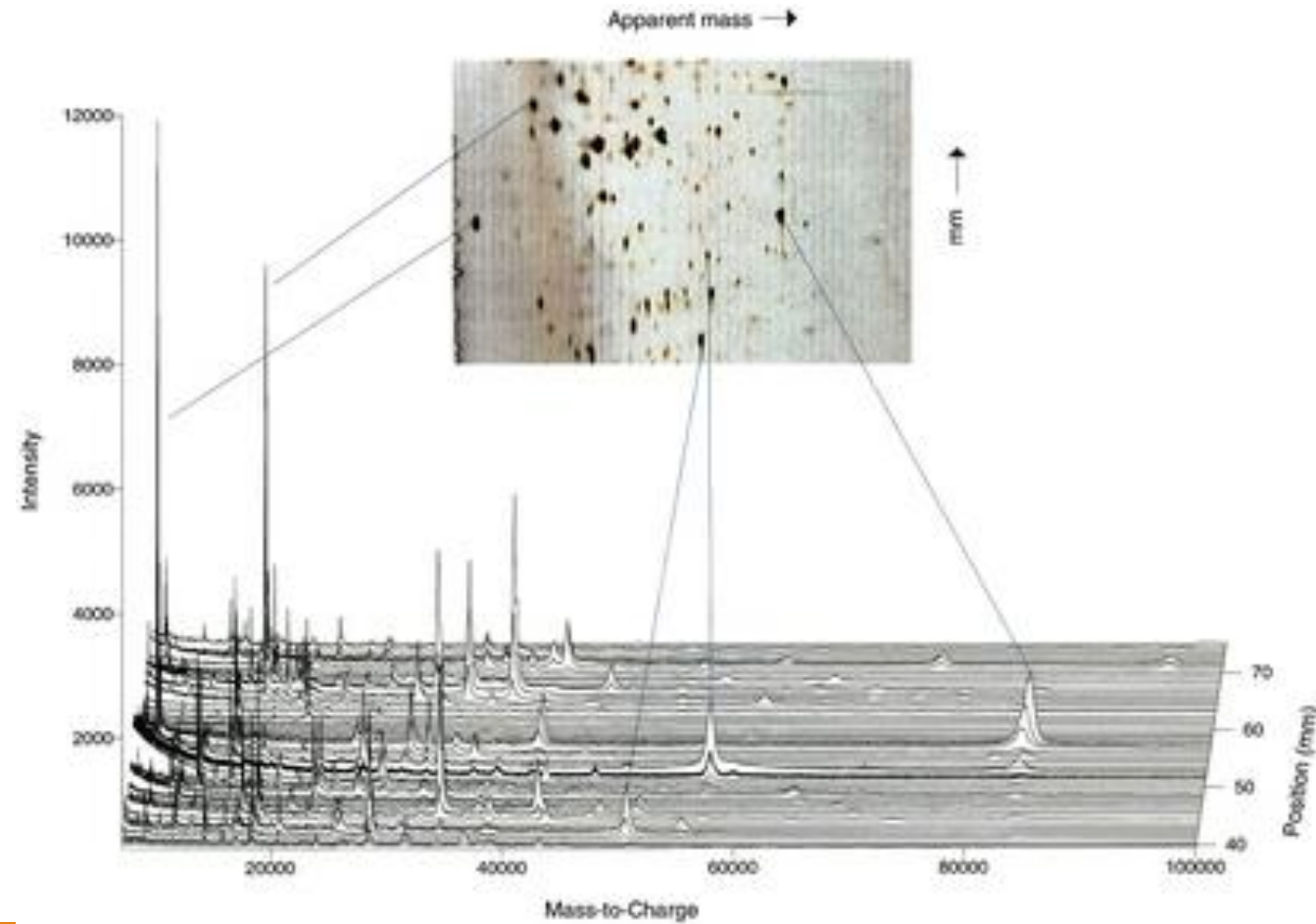
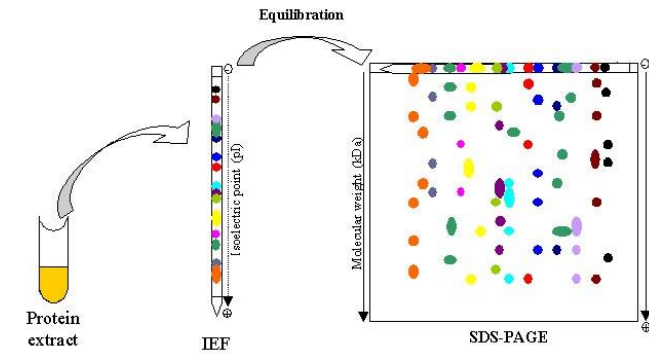
Figure 3.11
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

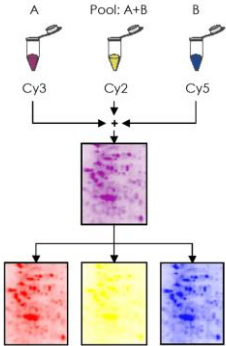
Fehérjék elválasztása izoelektromos pont szerint

2D-gélelektroforézis

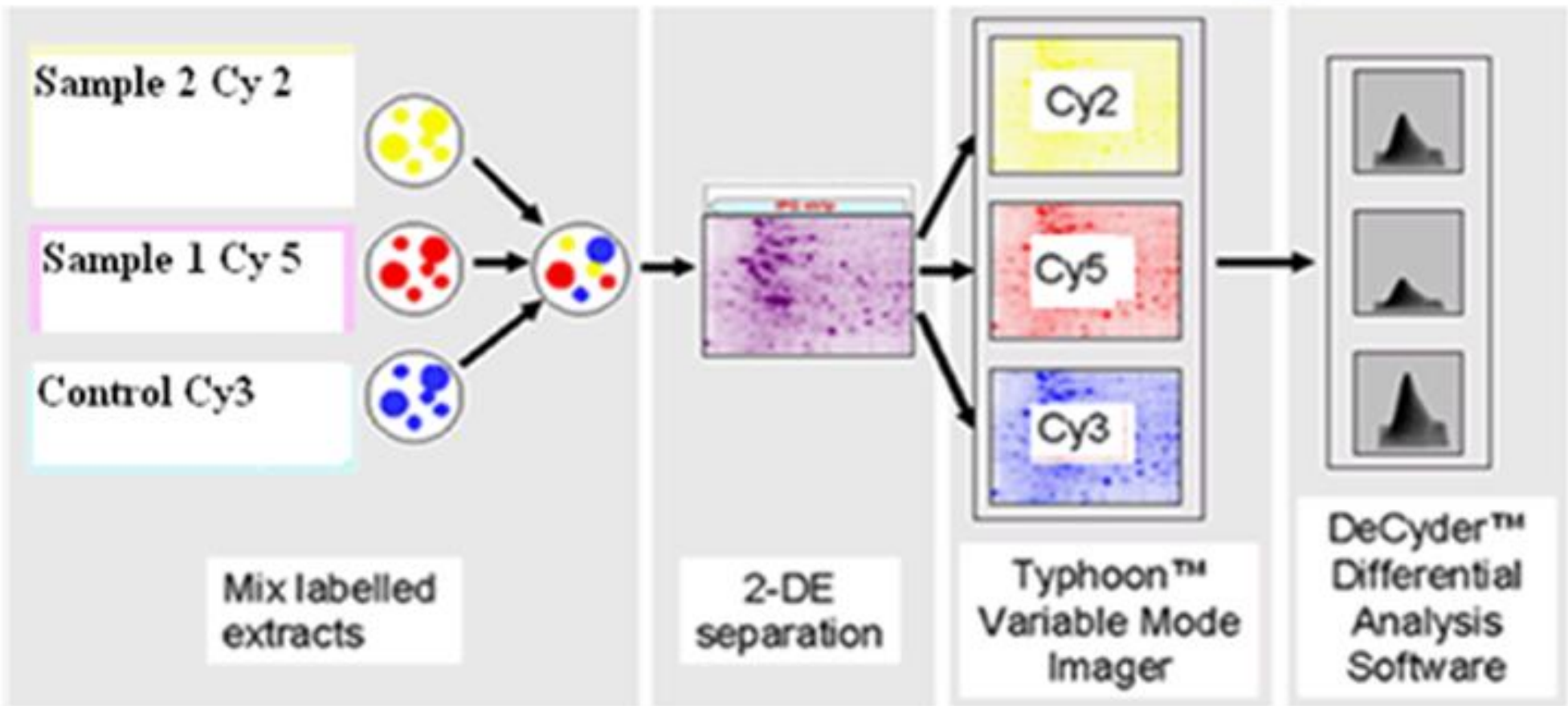


2D-gélelektroforézis + MS

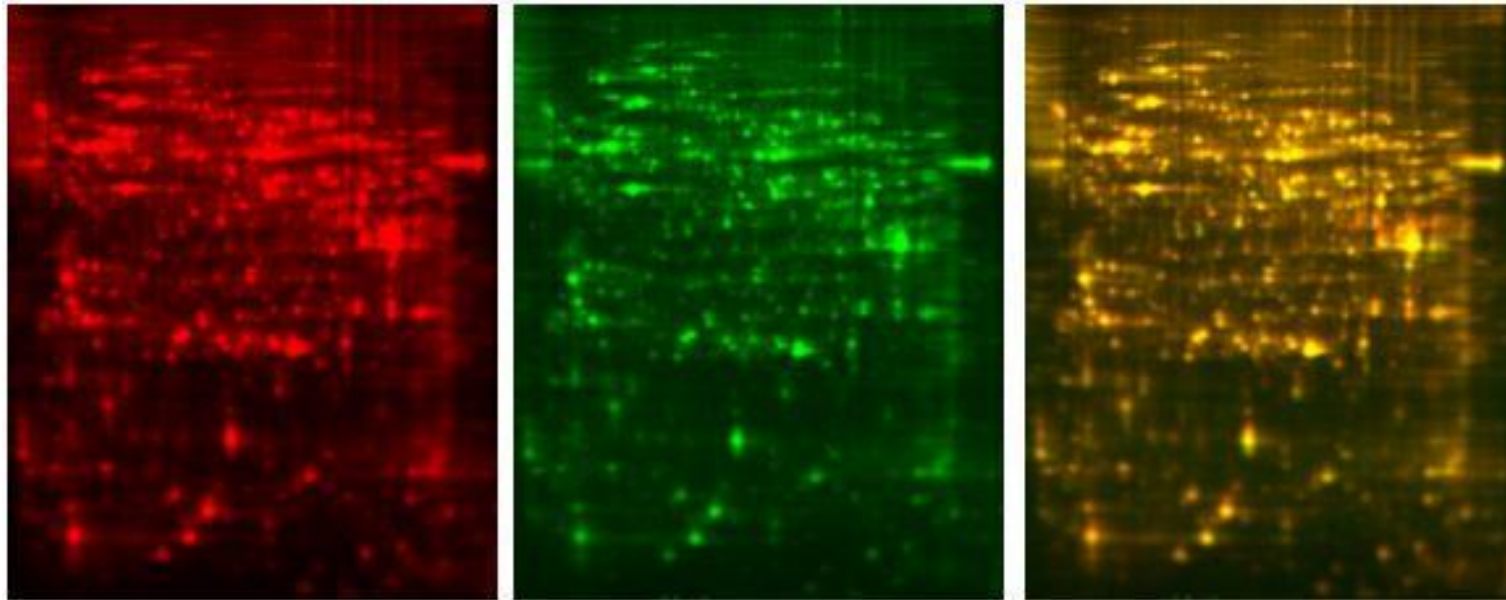
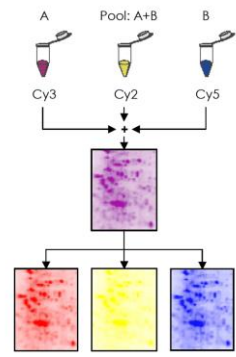




DIGE



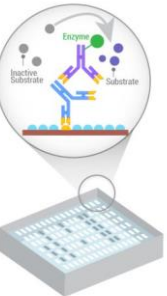
DIGE



Fluoreszcens festés
Összehasonlító elemzés

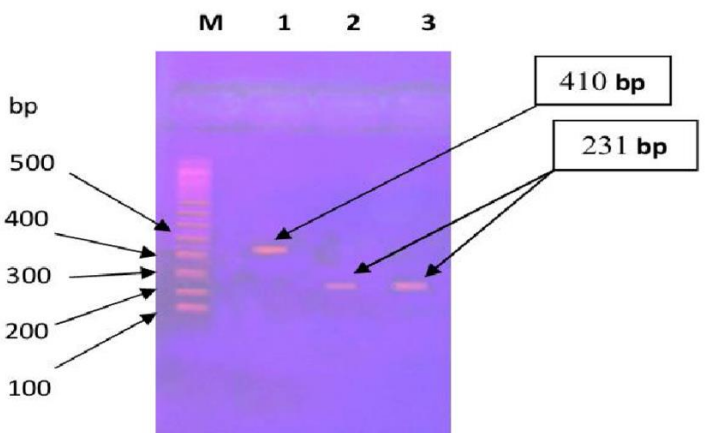
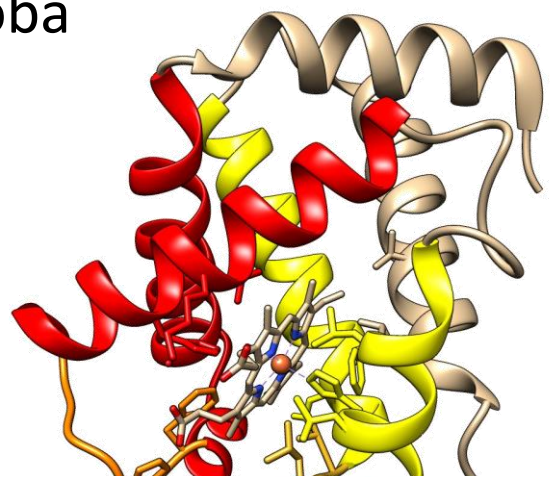
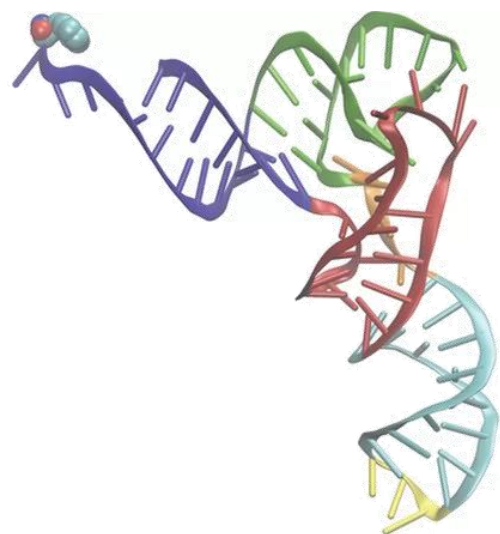
Alkalmazási terület:

- Fehérje azonosítás
- Orvosdiagnosztika
- Kutatás-fejlesztés

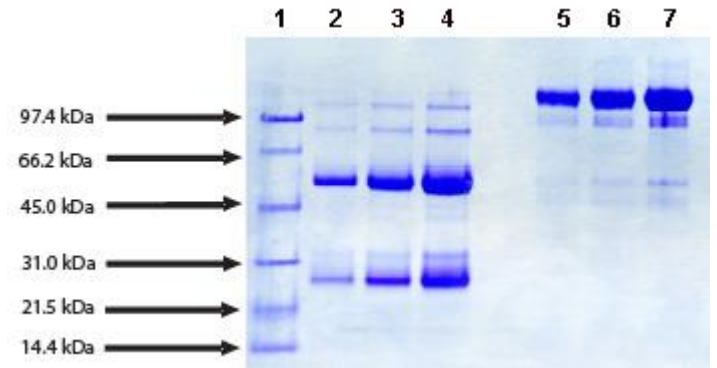


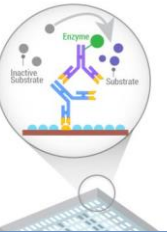
Blottolási technikák

Gélelektroforézis + immunanalitika/jelölt próba

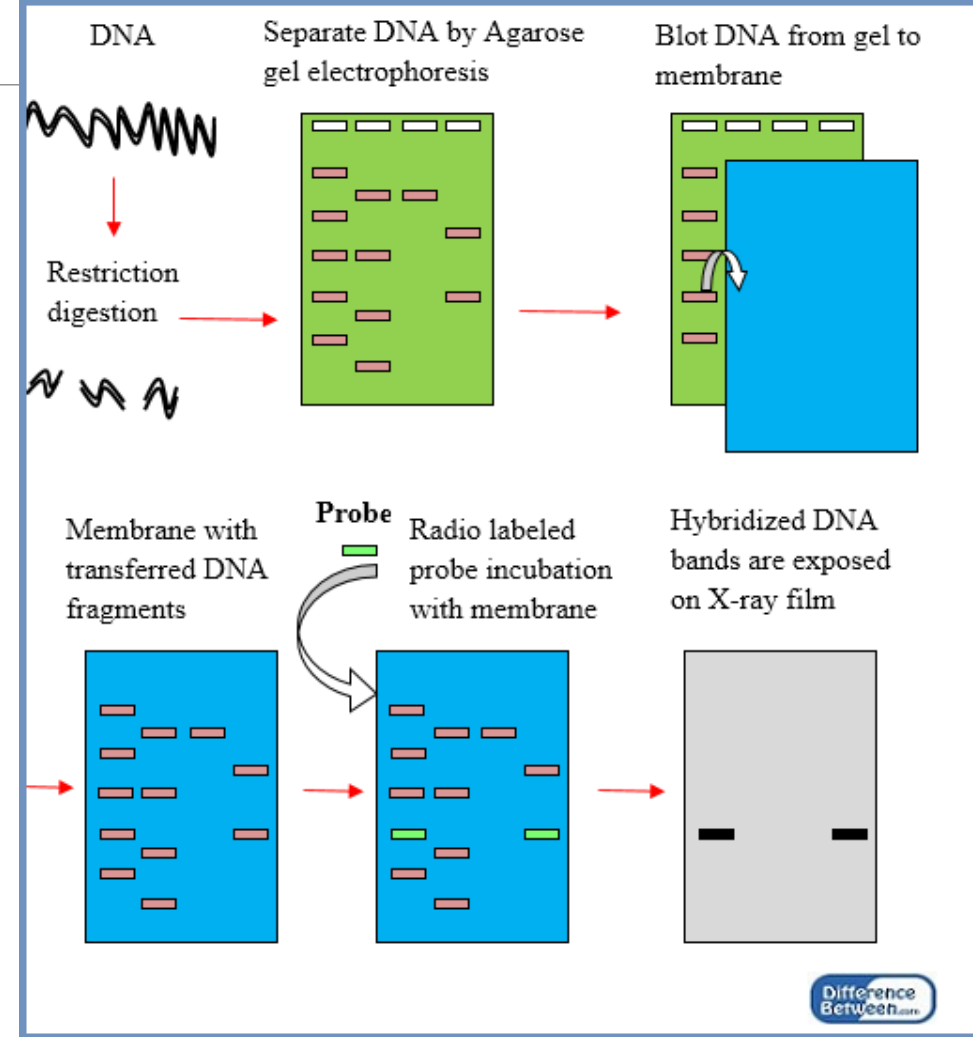
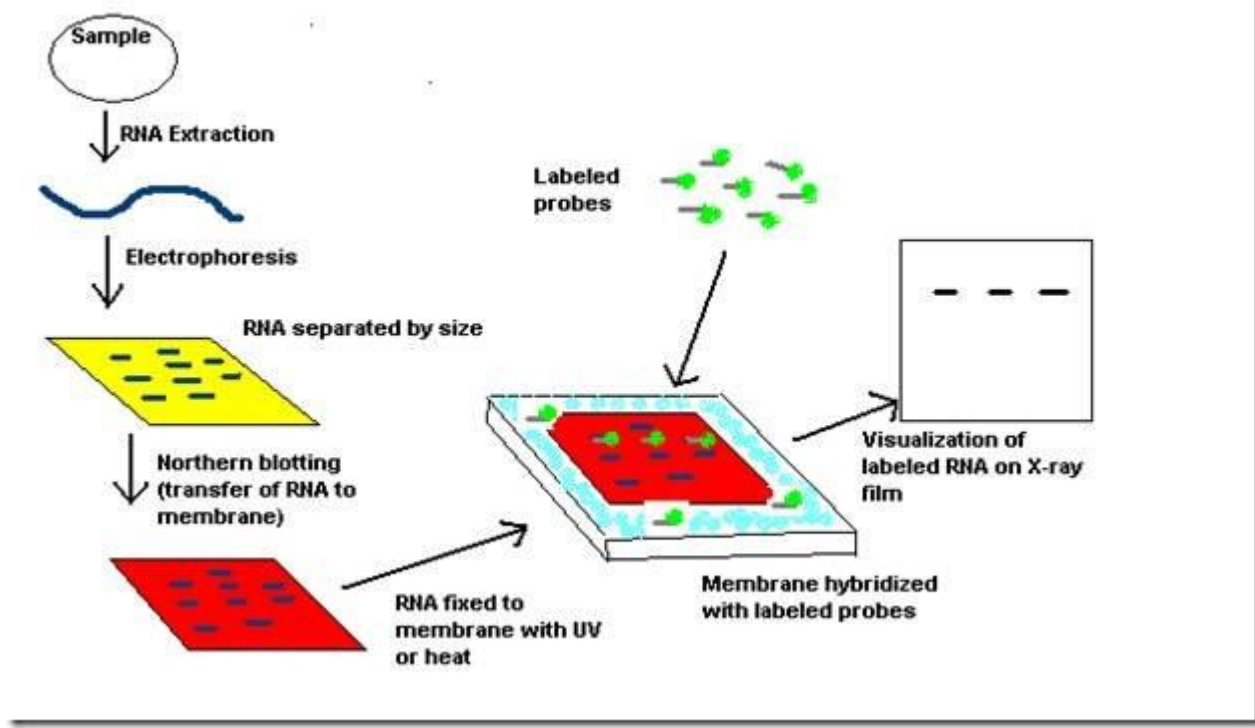


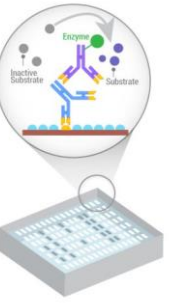
Western blot → fehérjék
 Northern blot → RNS
 Southern blot → DNS



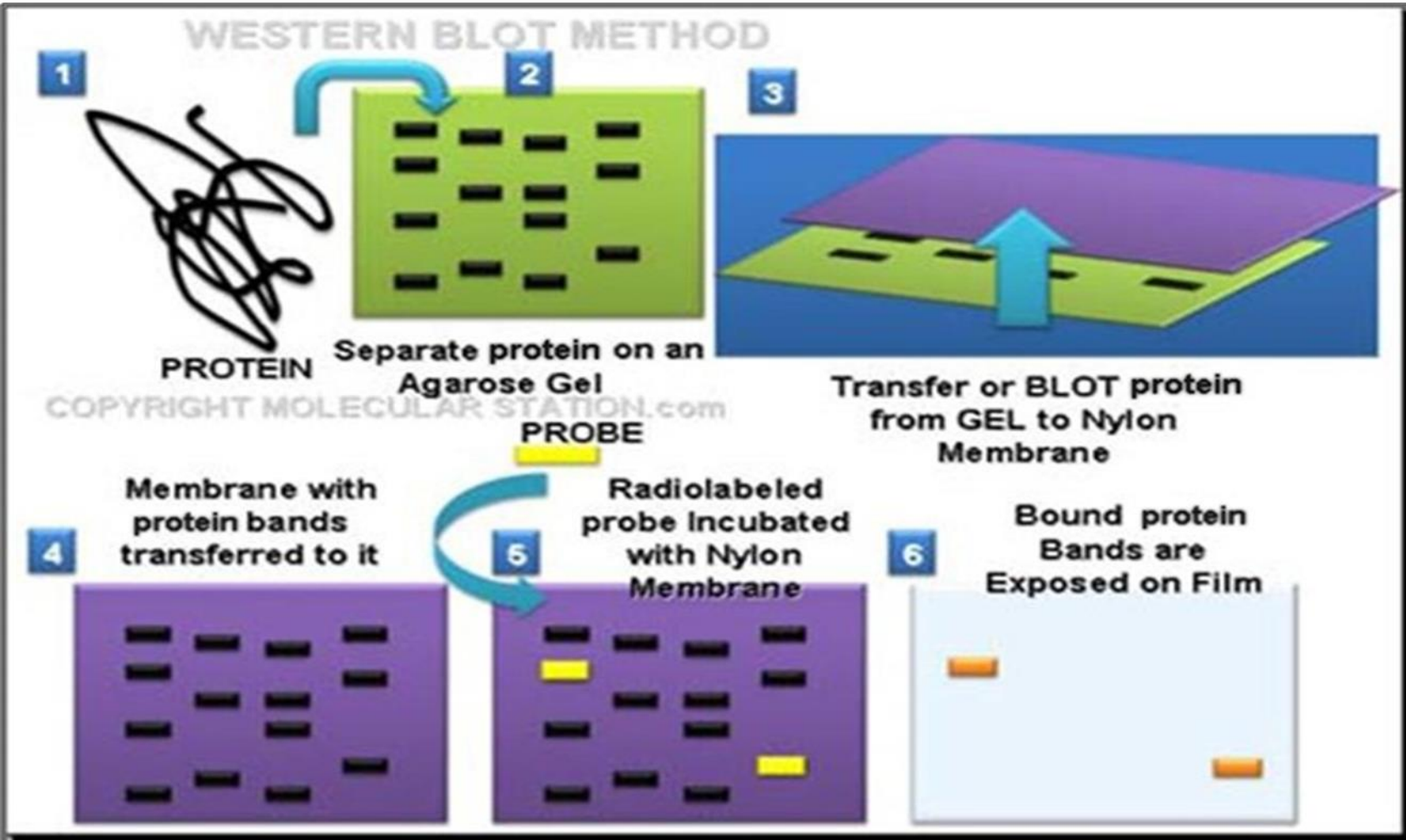


Northern és southern blot



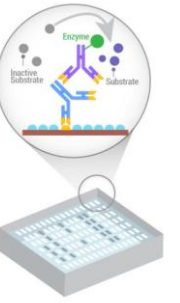


Western blot



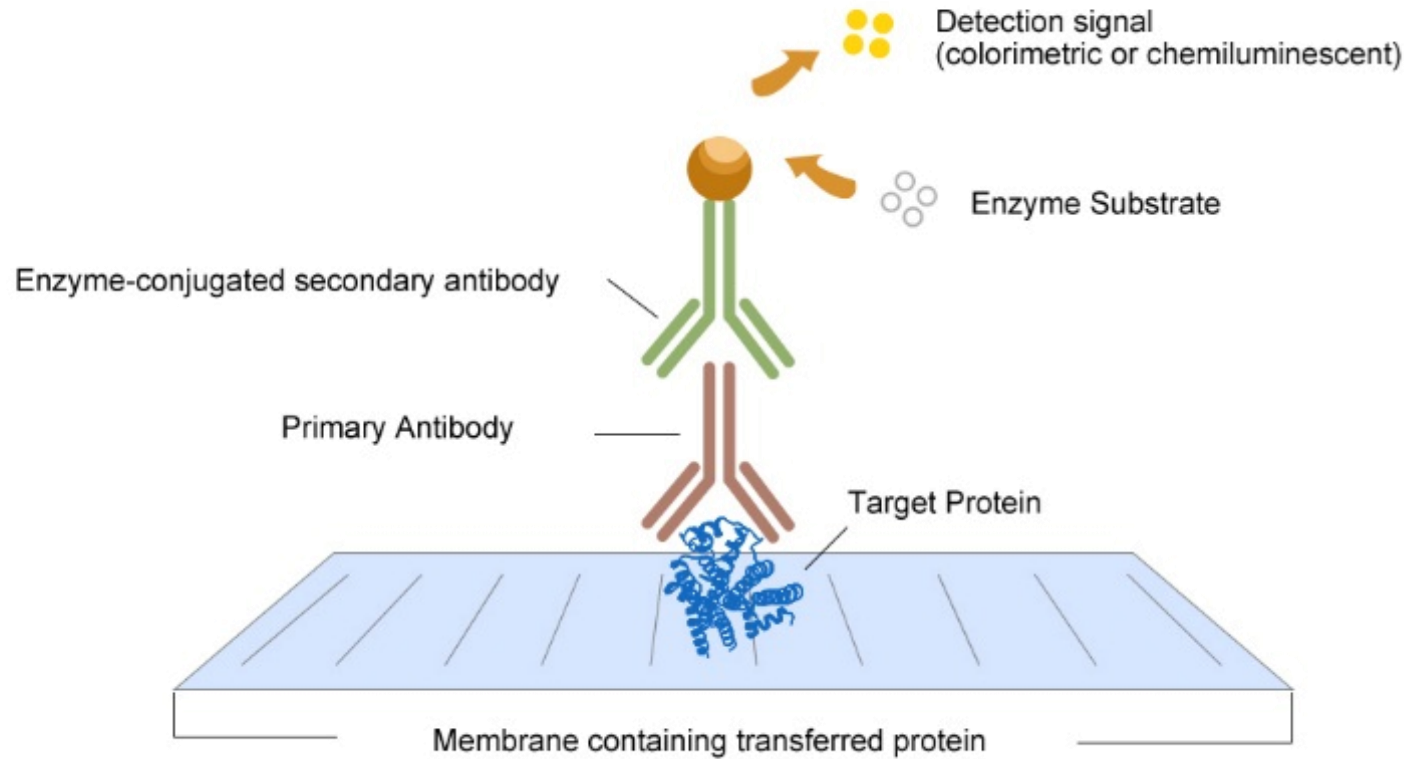
LÉPÉSEI:

1. Gél elektroforézis
2. Fehérjetranszfer nitrocellulózra
3. Blokkolás
4. Első antitest adagolás, mosás
5. Második antitest adagolás - azonosítás

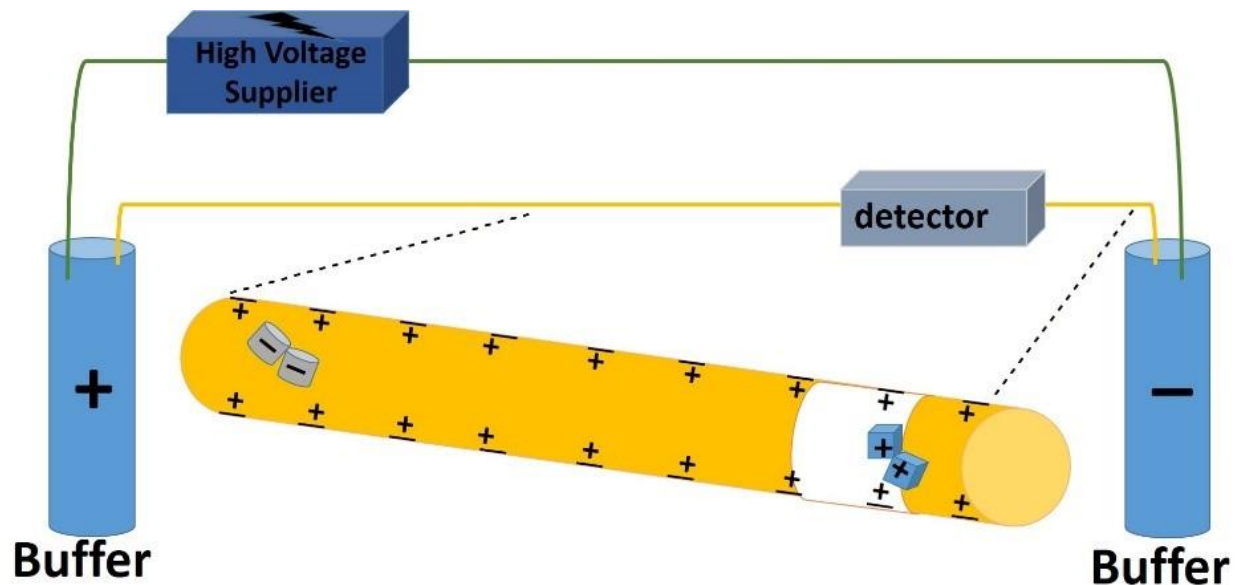
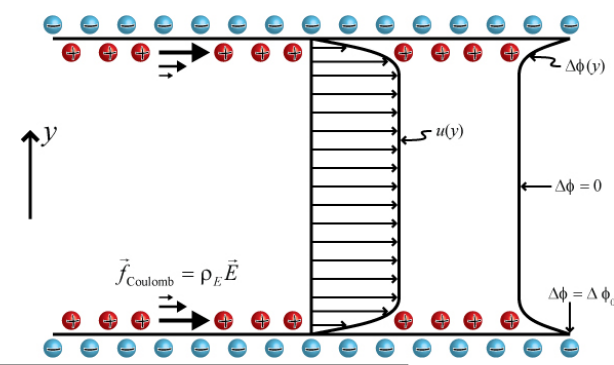


Western blot

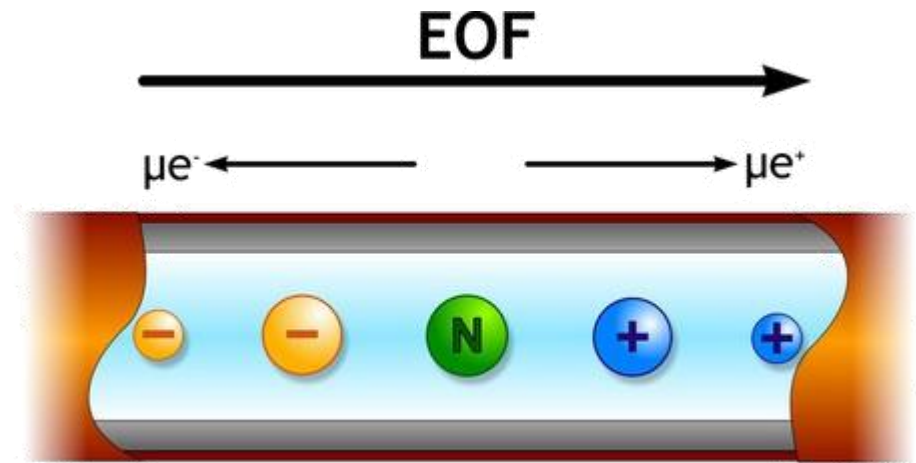
Detection in Western Blots



Kapilláris elektroforézis



WynSep
What you need in separation



Lab-on-a-chip

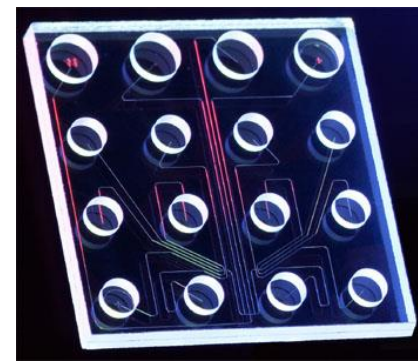
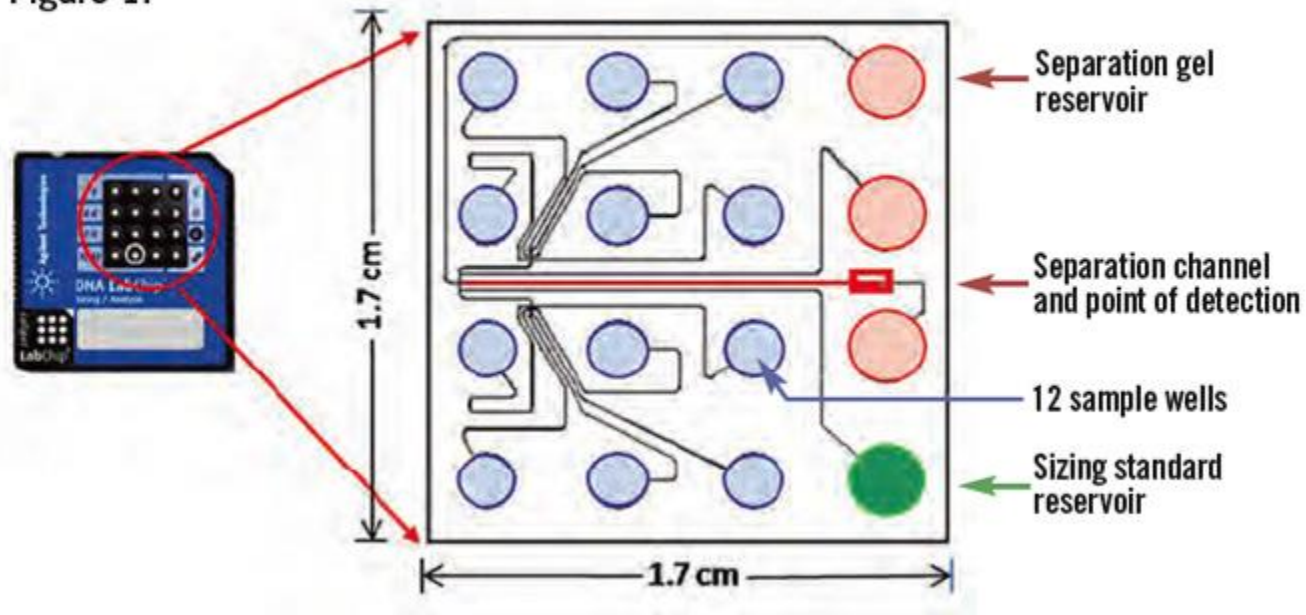
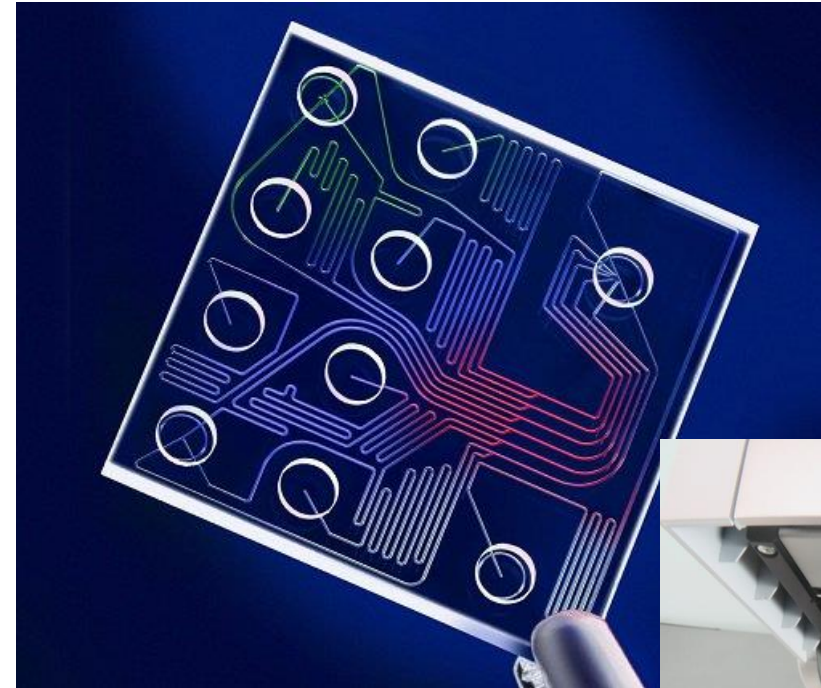
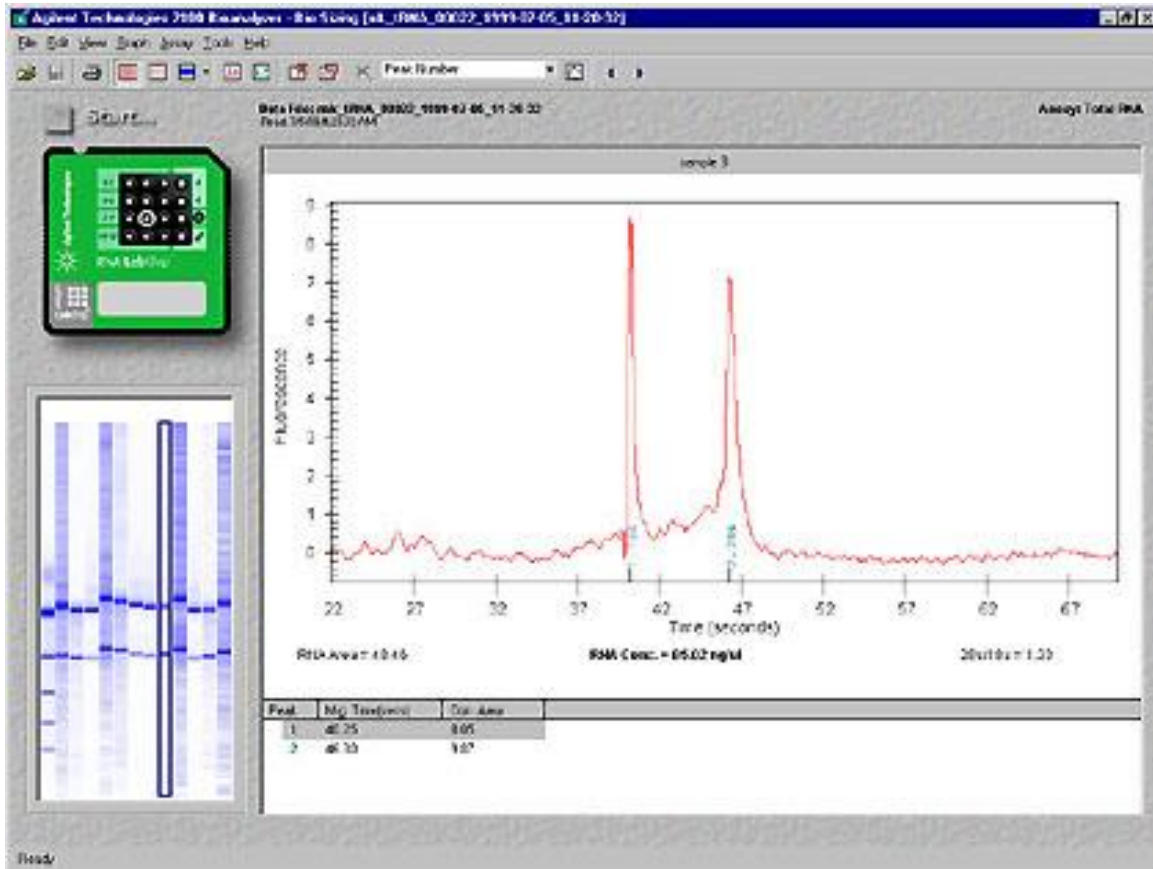
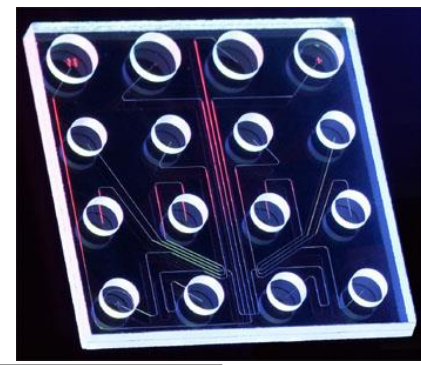


Figure 1.

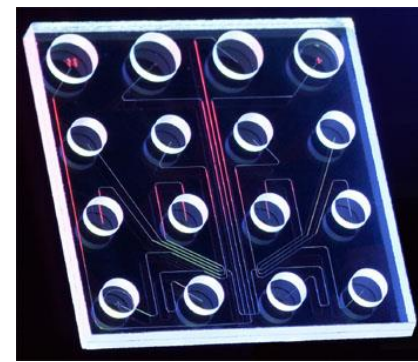


- az SDS tartalmú gél injektálása a kapilláris csatornába történik
- a gél nyomás hatására egyenletesen eloszlik
- a minták feszültség különbség hatására haladnak a gélben
- és a szeparációs csatornában elektrokinetikai erők hatására válnak szét
- a detektálás lézerindukált fluoreszcens detektorral történik

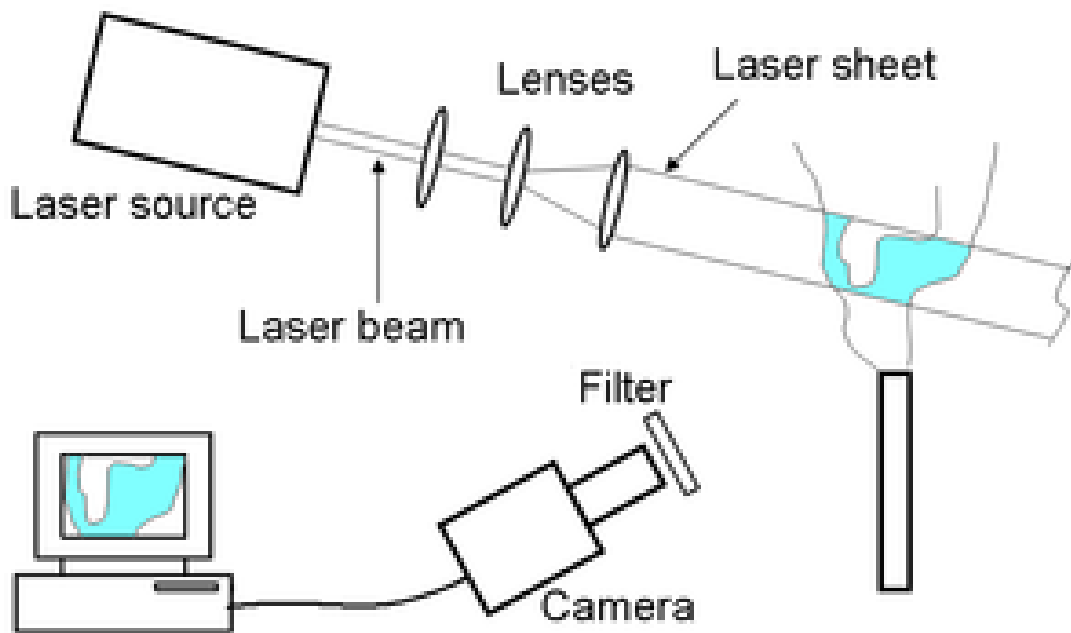
Lab-on-a-chip



Lab-on-a-chip



Lézer indukált fluoreszcens detektor

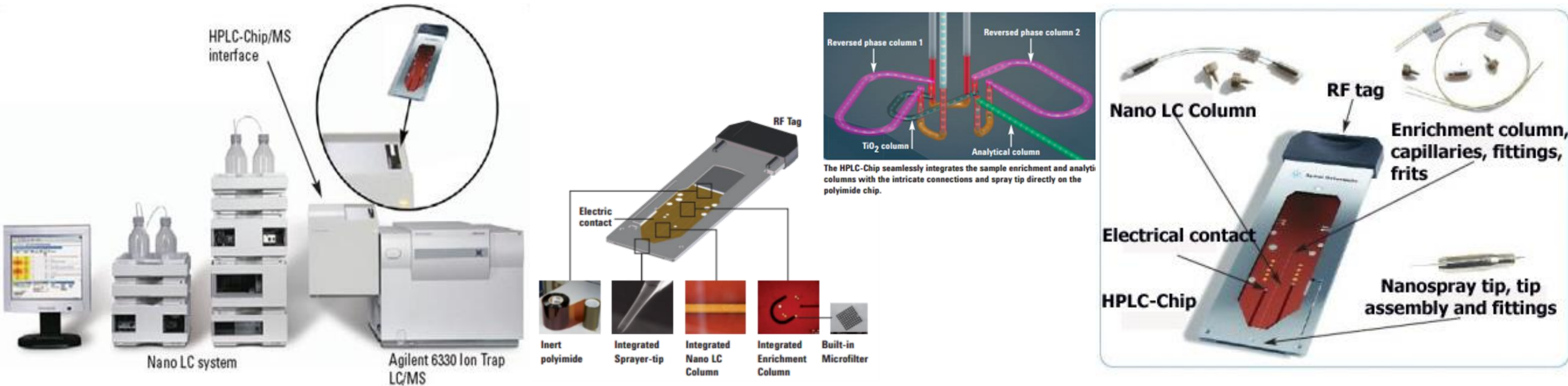
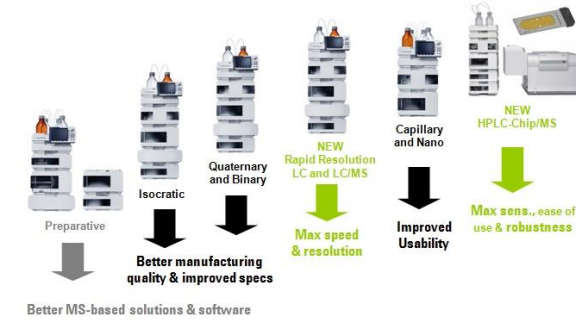


Jelenleg nukleinsavak (DNS, RNS) és fehérjék elválasztására alkalmazható

Alkalmazási terület:

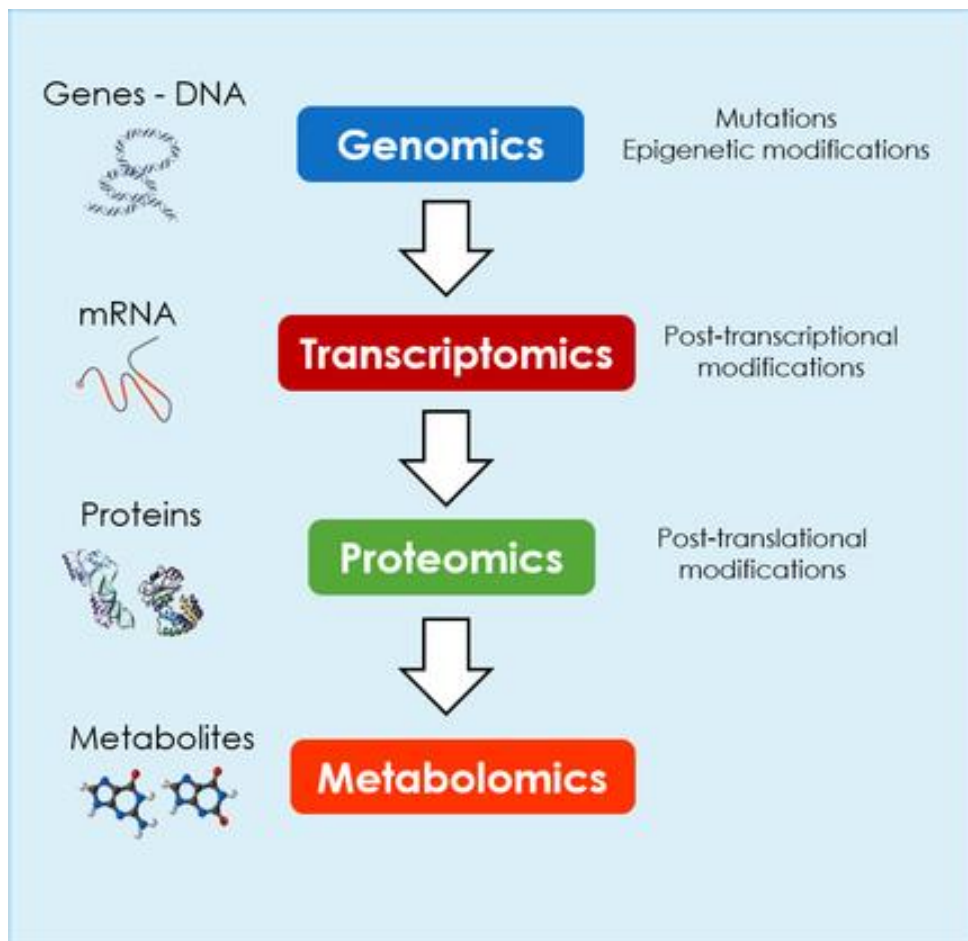
- Orvosbiológiai kutatások
- Robbanóanyagok azonosítása
- Környezeti és szennyvizek szennyezésének nyomonkövetése
- Mezőgazdasági vagy kertészeti vizek tápanyag ellenőrzése
- Élelmiszerek termelésének minőségi ellenőrzése
- Fajtaazonosítás

HPLC Chip



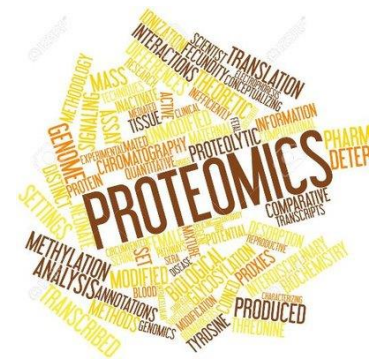
A kapillárisokat chipre integráltan is lehet működtetni (chip-HPLC). Az ilyen irányú fejlesztéseknek az egyik folyamánya lehet, hogy a kromatográfiai rendszerek, és a miniaturizálás fejlesztése nagy sebességgel közelít ahhoz, hogy egy akaratáska méretű hordozható HPLC valóság legyen. Az olyan komponensek, mint a hosszú életű, és kisméretű akkumulátorok, nano méretű folyadékáramot biztosító pumpák, chip HPLC, mikro méretű számítógépes egységek már léteznek, egyedül a kompakt kisméretű detektorok hiányoznak a hordozható, nagy hatékonyságú LC rendszerekhez.

„OMIKA” technológiák



- a gének statikus szekvenicáinak feltárása
- a fehérjék azonosítása
- a dinamikus funkciók és kölcsönhatások feltárása
- ...

Proteomika

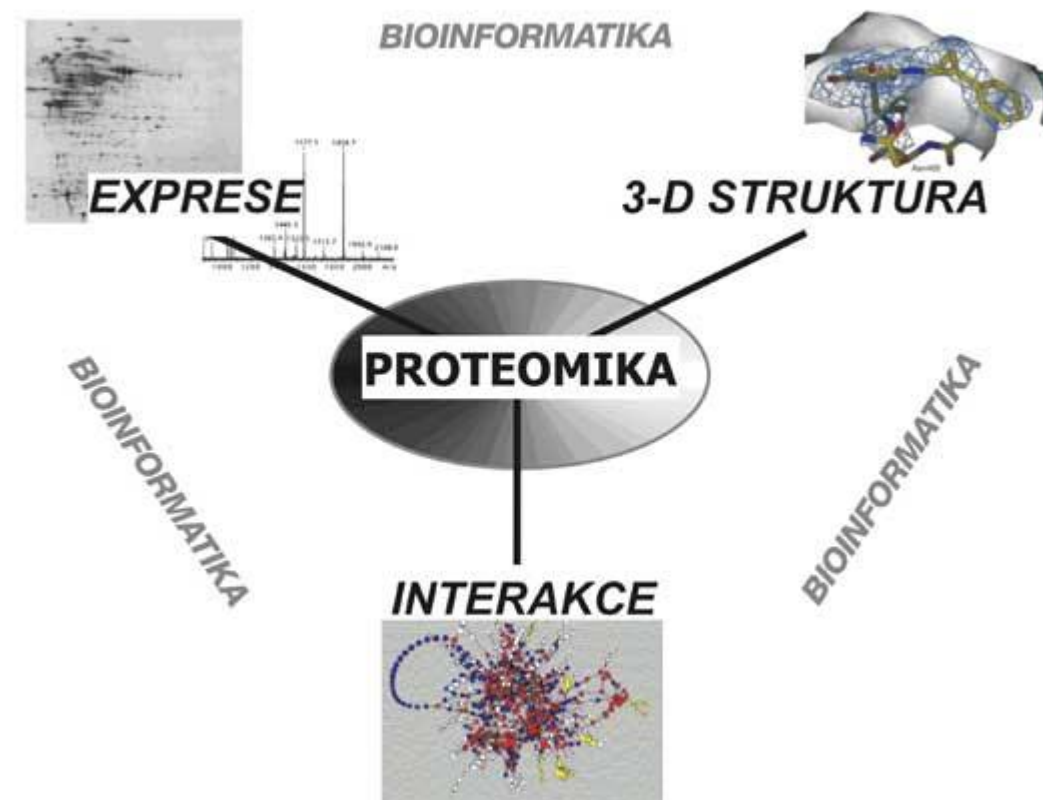


Proteomika: a proteomot (teljes fehérjeállományt) alkotó fehérjék analízise, összetételének vizsgálata

- azonosítás (szekvencia, 3d szerkezet)
- mennyiségi meghatározás
- adatbázisok összeállítása
- szerkezeti módosítások (pl. poszt-transzlációs)
- funkciók
- aktivitás
- ...

Interdiszciplináris terület

- Elválasztástechnika
- Analitika
- Bioinformatika
- Adatbázisok, adatbányászat



Köszönöm a figyelmet!

