

01/2010:20254

2.2.54. IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS⁽³⁾

ÁLTALÁNOS ELVEK

Az izoelektromos fókuszálás (IEF) olyan elektroforézis-módszer, amellyel a fehérjéket izoelektromos pontjaik szerint választhatjuk el. Az elválasztást amfoter elektrolitokból (amfolitokból) álló keveréket tartalmazó poliakrilamid vagy agaróz géllemezen végezzük. Elektromos erőter hatására az amfolitok vándorolnak a gélben, miközben pH-gradienst alakítanak ki. Egyes esetekben rögzített pH-gradienssel rendelkező géleket használnak; az ilyen géleket úgy állítják elő, hogy a gél meghatározott régióiba - az előállítás folyamán - gyenge savakat és bázisokat építenek be. Amikor egy fehérje eléri az izoelektromos pontjával (pI) megegyező pH-értékű gélfraakciót, töltése semlegesítődik, és nem vándorol tovább. Az amfolit-keverék megválasztásával különböző pH-tartományú gradienseket lehet kialakítani.

ELMÉLETI SZEMPONTOK

Amennyiben egy fehérje izoelektromos állapotában van, eredő töltése nulla és elektromos erőterrel nem lehet a gél-mátrixban elmozdítani. Diffúzió révén azonban elmozdulhat. A pH-gradiens a fehérjét arra kényszeríti, hogy izoelektromos pontjának megfelelő helyen maradjon, vagyis azon a helyen koncentrálódjék. Ezt a koncentráló hatást nevezzük fókuszálásnak. Az elektromos feszültség növelése vagy a minta mennyiségének csökkentése a sávok jobb elválását eredményezi. A feszültség növelésének határt szab a fejlődő hő; ezt lehetőség szerint el kell vezetni. Vékony gélek és termosztatikus cirkulátorral szabályozott, hatékony hűtőlemez alkalmazásával éles fókuszálás érhető el anélkül, hogy a gél megégne. Az elválasztás jellemzésére meghatározzuk a két szomszédos sáv elválásához szükséges, legkisebb pI-különbséget (ΔpI):

$$\Delta pI = 3 \times \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

ahol

D = a fehérje diffúziós együtthatója,

dpH/dx = a pH-gradiens,

E = az elektromos térerősség (volt/centiméterben),

$d\mu/dpH$ = az oldott anyag mozgékonyágának változása a pH-val a pI környékén.

⁽³⁾ Ez a fejezet gyógyszerkönyvi harmonizációs eljárásán esett át. Lásd 5.8 Gyógyszerkönyvi harmonizáció (9.15) c. fejezetet.

Mint hogy D és $-d\mu/dpH$ adott fehérjére nézve állandók, az elválasztást a pH-tartomány szűkítésével és az elektromos térerősség intenzitásának növelésével lehet javítani.

Amfolit hordozóval készített IEF-gélen a fehérjesávok közti felbontás meglehetősen jó. A felbontás tovább javítható rögzített pH-gradiensek alkalmazásával; ilyenkor a rögzített pH-gradienst alkotó pufferanyagok - a hordozó amfolitokkal egyébként analóg - részecskéinek a gél-mátrix belsejében kopolimerizált állapotban kell lenniük. Amfolit-hordozókkal készített gél alkalmazásával azokat a fehérjéket választhatjuk el, amelyeknek izoelektromos pontjai között legalább kb. 0,02 pH-egységnyi különbség van, míg a rögzített pH-gradiensek olyan fehérjék elválasztására is alkalmasak, amelyek között mindössze 0,001 pH-egység az izoelektromos pontok eltérése.

GYAKORLATI SZEMPONTOK

Különleges figyelmet kell fordítani a vizsgálati minta sajátosságaira, ill. a minta előkészítésére. Sót tartalmazó minta gondokat okozhat; legmegfelelőbb, ha a mintát - ha lehet - ionmentesített vízzel vagy 2 % amfolitot tartalmazó vízzel szükség esetén dialízist vagy gélszűrést alkalmazva készítjük elő.

A poliakrilamidból készült vékonyréteg-gélekben végzett fókuszáláshoz szükséges időtartamot úgy határozhatjuk meg, hogy a gél különböző pontjaira színes fehérjét (pl. hemoglobint) viszünk fel, majd létrehozuk az elektromos teret; az egyensúlyi állapotot akkor érjük el, amikor a különböző helyekre felvitt fehérje egyazon sávrendszert ad. Vannak előíratok, melyek a fókuszálás végbemenetelét a minta felvitele után eltelt idő megadásával biztosítják.

Az IEF-gél segítségével azonossági vizsgálatot végezhetünk oly módon, hogy a gélen zajló vándorlást standard készítmény és IEF-hitelesítő fehérjék vándorlásával hasonlítjuk össze; az IEF-gél határérték-vizsgálatban is alkalmazható, ha az IEF-gélen mutatkozó sávintenzitást vizuálisan, standard készítmény sávintenzitásával hasonlítjuk össze. Az eljárás félkvantitatív vizsgálatra is alkalmas, ha a sávok relatív fehérje-koncentrációjának meghatározására a sávintenzitásokat denzitométerrel vagy más, hasonló eszközzel mérjük.

KÉSZÜLÉK

Az izoelektromos fókuszálásra alkalmas készülék részei:

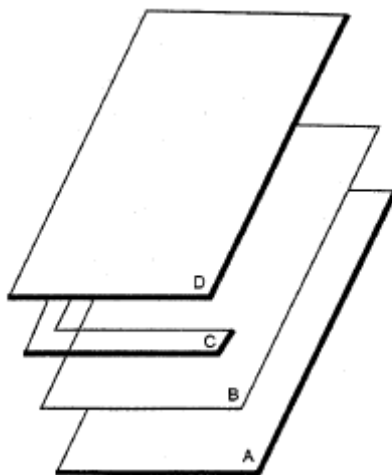
- állandó feszültséget, áramerősséget és teljesítményt biztosító, szabályozható generátor; általában 2500 V feszültséget használnak, mivel adott kísérleti körülmények között ezt tekintik optimálisnak; 30 W-ig növelhető állandó teljesítmény ajánlott.
- merev műanyagból készült IEF-kamra, a gél ráhelyezésére szolgáló, megfelelő anyagból készült, hűthető lemezzel,
- műanyagfedő platinaelektródokkal, amelyek az anód-, ill. a katód-elektrolittal átítatott, megfelelő szélességű, hosszúságú és vastagságú papírcsíkokon keresztül érintkeznek a géllal.

IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS POLIAKRILAMID GÉLEKBEN; AZ ELJÁRÁS RÉSZLETES ISMERTETÉSE

Az alább ismertetett módszer egy vastag poliakrilamid gél-lemezen kivitelezett IEF eljárás részletes leírása; ha a vonatkozó cikkelyben nincs más előírás, ezt az eljárást kell alkalmazni.

A GÉL KÉSZÍTÉSE

Öntőforma. Az öntőforma (2.2.54.-1. ábra) elemei: egy üveglap (A), amelyre - a géllal való bánásmód megkönnyítésére - egy poliészter-filmet (B) fektetünk, egy vagy több távtartó (C), egy második üveglap (D), továbbá csipeszek, amelyek a felsorolt elemeket összetartják.



2.2.54.-1. ábra. Az öntőforma

7,5%-os poliakrilamid gél. 29,1 g *R* akrilamidot és 0,9 g *R* metilénbiszakrilamidot 100 ml *R* vízben oldunk. Az így készült oldat 2,5 térfogatrészét elegyítjük a megfelelő cikkelyben előírt amfolit-keverékkel és az elegy térfogatát *R* vízzel 10 térfogatrészre egészítjük ki. Gondos elegyítés után az oldatot gázmentesítjük.

Az öntőforma előkészítése. A poliészter-filmet az alsó üveglapra fektetjük és a távtartót, majd a második üveglapot rendre ráhelyezzük; a csipeszekkel összefogjuk az elemeket. Ezután az oldatot (lásd fentebb) mágneses keverőre helyezzük, *R ammónium-perszulfát* 100 g/l töménységű oldatából 0,25 térfogatrészt, *R tetrametiletilén-diamin*ből szintén 0,25 térfogatrészt elegyítünk hozzá és az így nyert oldattal haladéktalanul megtöltjük az öntőforma üveglapok közti terét.

VIZSGÁLAT

Az öntőformát szétszedjük, a gélt - a poliészter-film segítségével - áttesszük a hűtött hordozólemeze, majd - ügyelve arra, hogy közben ne keletkezzenek légbuborékok -

néhány milliliter alkalmas folyadékkal átnedvesítjük. A vonatkozó cikkely előírásai szerint elkészítjük a vizsgálati oldatokat és az összehasonlító oldatokat. A minta felviteléhez kb. 10×5 mm méretű papírszeletkéket helyezünk a géltre és mindegyiket átitatjuk az előírt mennyiségű vizsgálati, ill. összehasonlító oldattal. A gél kalibrálásához, pH-markerként, előírt mennyiséget viszünk fel egy fehérjéből készített oldatból; amelyet olyan fehérjéből kell összeállítani, melyeknek izoelektromos pontjai ismertek. Vannak olyan eljárások, amelyekhez a vizsgálati oldat elhelyezésére alkalmas vájatokkal rendelkező géleket állítanak elő; ilyen esetekben mellőzhető az impregnált papírszeletkék használata. Két papírcsíkot, amelyeket a gél két végéhez illesztünk, átitatunk a megfelelő elektrolit-oldatokkal: az anódhoz illeszkedőt savval, a katódhoz illeszkedőt lúggal impregnáljuk. Az anód- és a katód-oldat összetételét a vonatkozó cikkely adja meg. Ezeket a papírcsíkokat a gél két végén, a szélektől néhány milliméternyire helyezzük el. A fedelet úgy tesszük fel, hogy az elektródok érintkezzenek a pólusoknak megfelelő papírcsíkokkal. Ezután - a cikkelyben előírt elektromos paraméterekkel - megkezdhetjük az izoelektromos fókuszálást. Az elektromos áramot akkor kapcsoljuk ki, amikor a standard fehérje-keverék vándorlása stabilizálódott. A minta felvitelére használt papírszeletkéket és az elektródokhoz illeszkedő két papírcsíkot csipesz segítségével eltávolítjuk. A gélt *R poliakrilamid gélen történő izoelektromos fókuszálásra szánt fixáló oldatba* merítjük. Enyhe rázogatás közben, 30 percen át, szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az oldatot leöntjük és a géltre 200 ml *R szintelenítő oldat*ot öntünk. Rázogatás közben, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd a gélt leitatjuk, és *R Coomassie festőoldat*ot öntünk rá. Ezzel 30 percen át inkubáljuk. A gélt *R szintelenítő oldat*ban passzív diffúzióval szintelenítjük mindaddig, amíg a sávok a világos háttérben jól láthatóvá válnak. A cikkelyben előírtak szerint megállapítjuk az elektroferogramon megjelenő sávok helyzetét és intenzitását.

ELTÉRÉSEK A RÉSZLETESEN ISMERTETETT ELJÁRÁSTÓL (VALIDÁLÁSHOZ KÖTÖTT ELTÉRÉSEK)

Amikor egy vizsgálatban az izoelektromos fókuszálás általános módszerére történik utalás, bizonyos mértékig eltérhetünk a módszertől vagy az eljárástól, de az eltéréseket validálni kell. Ilyen eltérések:

- a kereskedelemről beszerezhető, kész géllemezek, illetve kereskedelmi festő és szintelenítő készletek alkalmazása,
- rúdgélek alkalmazása,
- különböző méretű gélkazetták alkalmazása, beleértve ultravékony (0,2 mm) géleket,
- a minta felvitelére alkalmazott eljárás megváltoztatása, beleértve a minta térfogatának megváltoztatását, vagy nem-papírból készült maszkok, ill. szeletkék alkalmazását a minta felvitelére,
- a kifejlesztés körülményeinek megváltoztatása, beleértve az elektromos térnek a gél méreteitől és a berendezéstől függő változtatását és rögzített vándorlási időtartamok alkalmazását a sáv-stabilitás szubjektív megállapítása helyett,
- előfókuszálási szakasz beiktatása,

- automatizált műszerek alkalmazása,
- agaróz gélek alkalmazása.

AZ IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁSI ELJÁRÁS VALIDÁLÁSA

Ha a részletesen leírt eljáráshoz képest alternatív módszereket alkalmazunk, ezeket validálni kell. Az elválasztás validálásához a következő feltételeket alkalmazhatjuk:

- előírt tulajdonságokkal rendelkező, stabil pH-grádiens kialakítása, pl. ismert izoelektromos ponttal rendelkező, színes pH-markerek alkalmazásával,
- összehasonlítás olyan elektroferogrammal, amelyet a vizsgálandó készítménynek megfelelő referenciaanyaghoz mellékelnek,
- a cikkelyben előírt, egyéb validációs feltételek.

A CIKKELYBEN ELŐÍRT ELTÉRÉSEK AZ ÁLTALÁNOS MÓDSZERTŐL

Az általános módszertől való azon eltéréseket, amelyeket bizonyos anyagok analízise megkövetel, a vonatkozó cikkelyek részletesen előírják. Ilyenek pl.:

- karbamid hozzáadása a gélhez (a fehérje oldatban tartásához többnyire elegendő, ha koncentrációja 3 M, de ez 8 M-ig növelhető); néhány fehérje ugyanis kicsapódik az izoelektromos ponton. Ebben az esetben a fehérje oldatban tartásához a gél képzése folyamán kell beépíteni a karbamidot. Karbamid alkalmazása esetén - a fehérjék karbamileződésének megakadályozása érdekében - kizárólag frissen készített oldatok használhatók,
- alternatív festési eljárások alkalmazása,
- gél-adalékanyagok - mint pl. nem-ionos detergensek (pl. oktilglükozid) vagy ikerionos detergensek (pl. CHAPS vagy CHAPSO) - alkalmazása, illetve amfolitok hozzáadása a mintához, a fehérjék tömörülésének, kicsapódásának megakadályozására.

FONTOS SZEMPONTOK

A mintákat a gél bármely pontjára felvihetjük, kivéve az elektródok közelébe, mert meg kell óvnunk a fehérjéket a szélsőséges pH-jú környezettől. A módszer kifejlesztése folyamán érdemes az analitikusnak három fehérje-felviteli helyet kipróbálni a gélen (középen és a két végén); a gél ellentétes végeire felvitt fehérjéből nyert sávok nem feltétlenül azonosak.

A katódos csúszásként ismert jelenség – amikor a pH-gradiens időben egyre rosszabbá válik – olyankor fordul elő, ha túl hosszú ideig tart a fókuszálás. Noha erre a jelenségre még nincs megfelelő magyarázat, kialakulásában vélhetően az elektrooszmózis és szén-dioxid-abszorpció játszik szerepet. A katódos csúszást úgy érzékeljük, hogy a

fókuszált fehérje levándorol a gél katódos végéről. A rögzített pH-gradiensek alkalmasak lehetnek az ilyen probléma megoldására.

Fontos, hogy azt az ágyat, amelyen a gél nyugszik, hatékonyan hűtsük (közel 4°C-ra). A nagy térerő alkalmazása az izoelektromos fókuszálás folyamán túlmelegedést idézhet elő és ez befolyásolja a fókuszált gél minőségét.