

ELEKTROFORÉZIS TECHNIKÁK

Dr. Pécs Miklós
Dr. Fehér Csaba

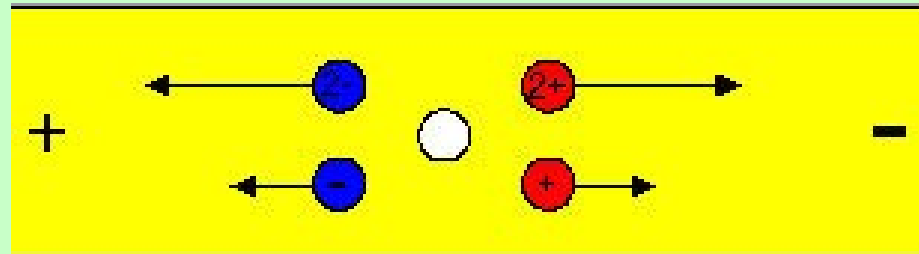


Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



ELEKTROFORÉZIS

Olyan elválasztási technikák, amelyben a molekulák elektromos erőtér 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)



ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforetikus mozgékonyág:

ahol: q – a molekula töltése

d – molekula átmérője

η – viszkozitás/gélsűrűség

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

Az állandósult sebesség:

$$v = \mu \cdot E$$

E – térerősség

A közeg szerint, amiben a mozgás végbemegy, megkülönböztethető:

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

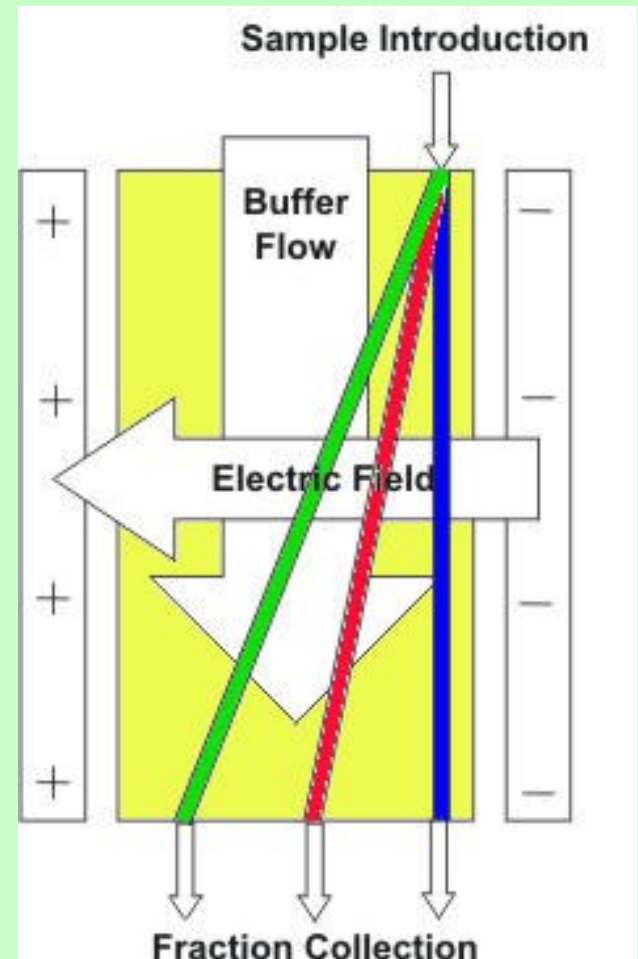


FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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

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

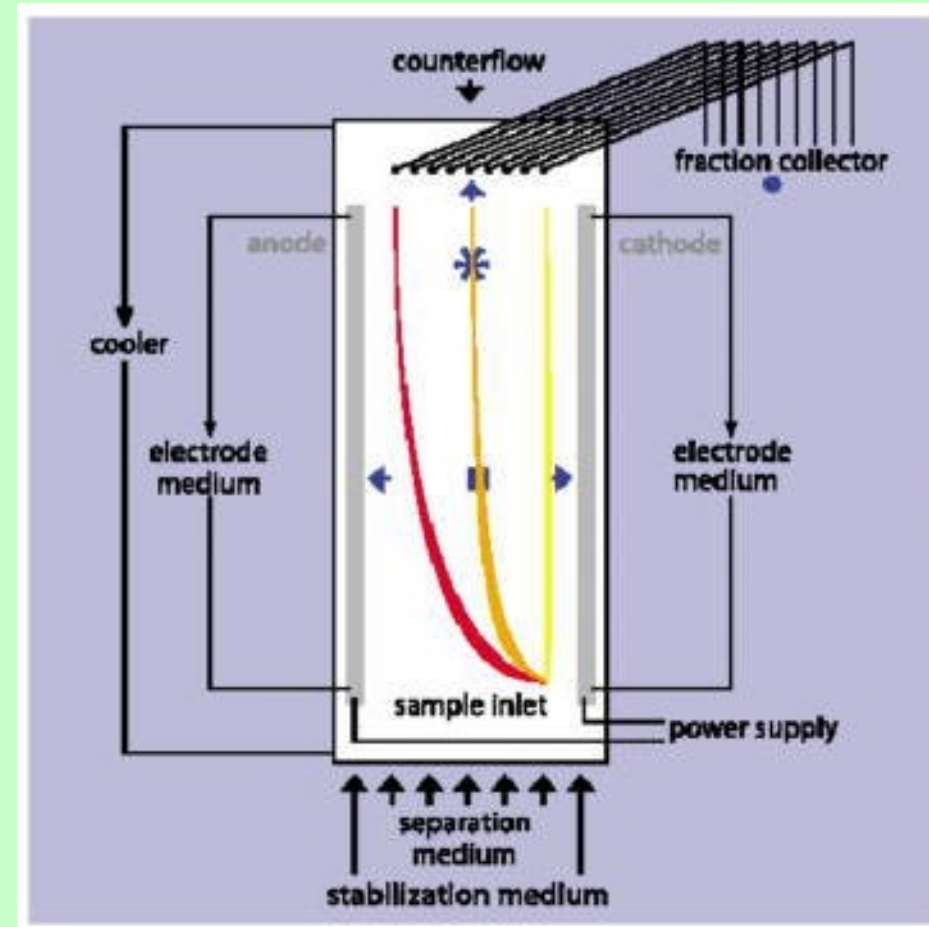
A térerősséghez nagy feszültség kell, (100-150 V/cm); ahhoz, hogy ne melegedjen, kis áramerősség (mA)



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

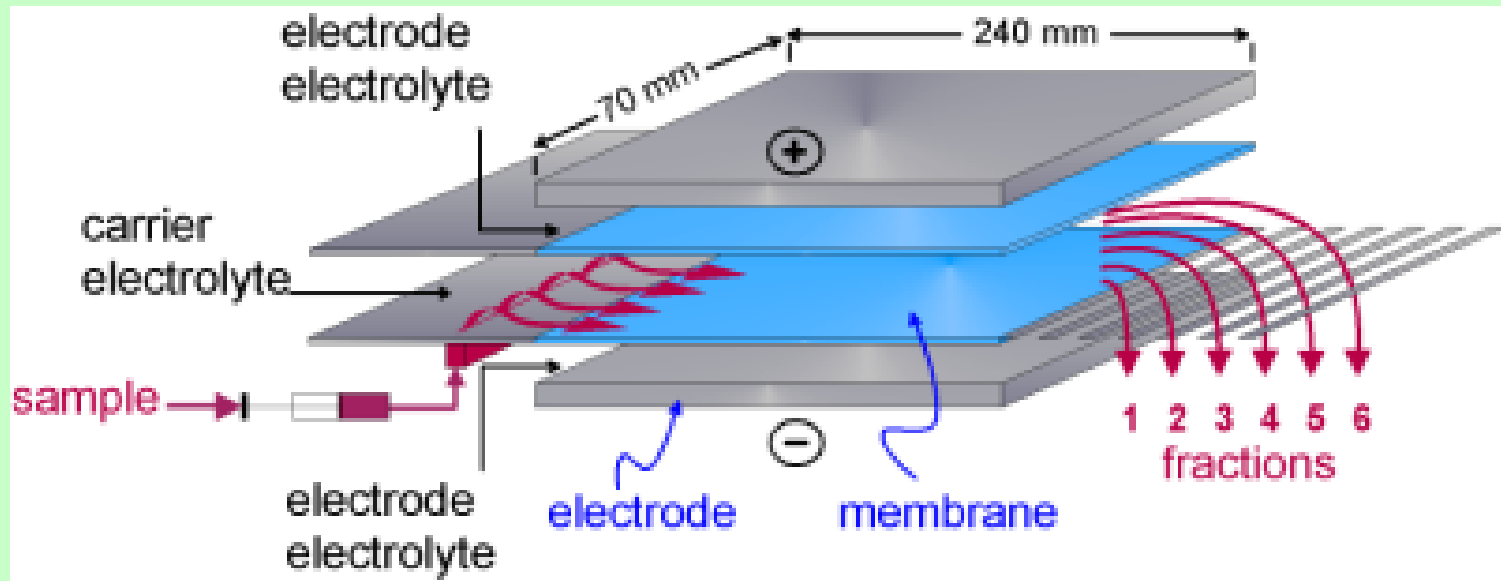
Az elektródák lehetnek inert fémből, vagy nagy felület esetén membránnal elválasztott áramló pufferben.

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



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Technológiai paraméterek:

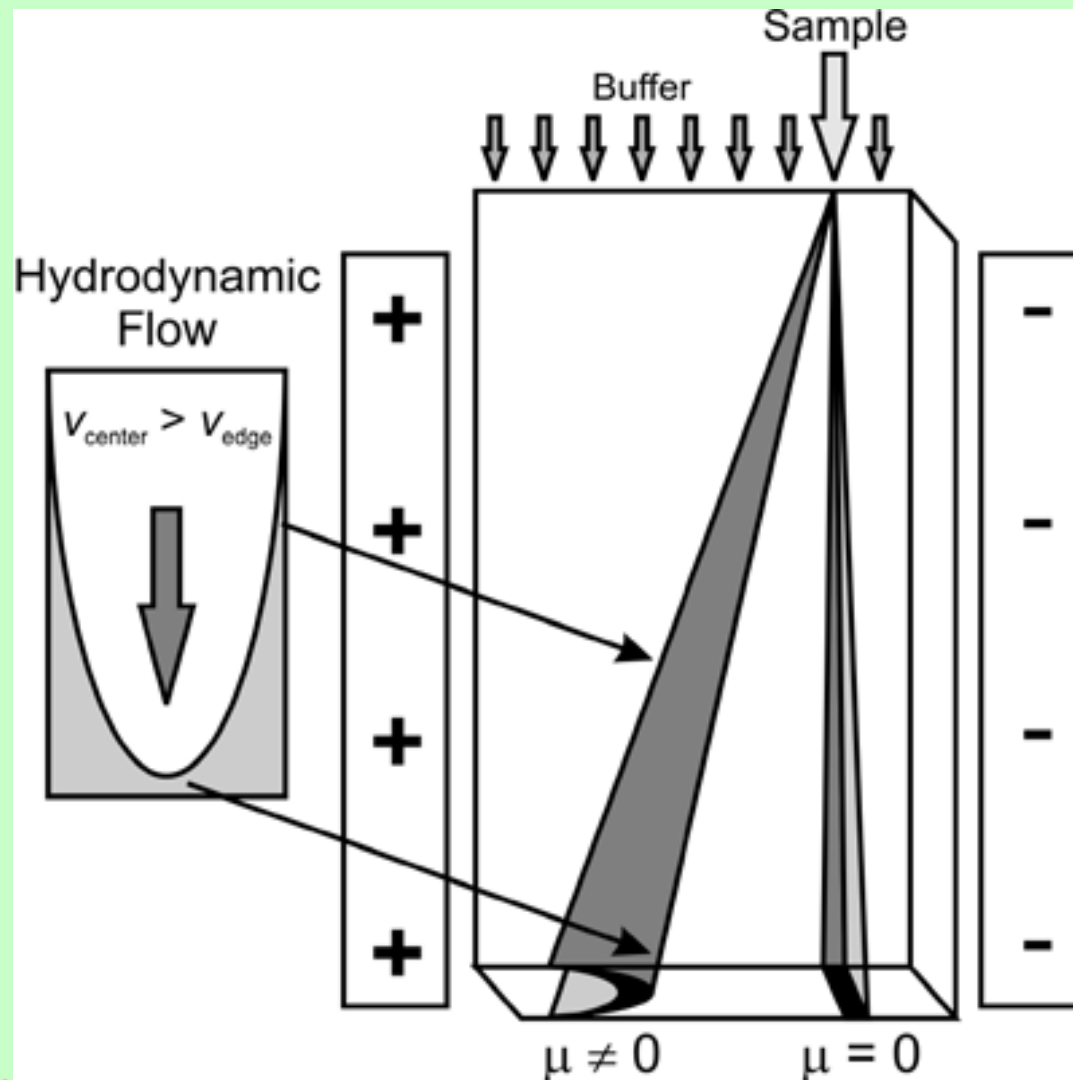
A puffer/minta tartózkodási ideje: 2-5 perc. Ez elegendő az elválasztáshoz, de nem hagy időt a diffúziós szétterjedésre.

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 szétválasztást, de e fölött sávkiszélesedést okoz.



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS



A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

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

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

Elektromos áram okozta melegedés. Fal hűtése, de ez növeli a Gr-t. Áramerősség csökkentése (10 mV) -> kis ionerősségű puffer

Diffúzió: függ a hőmérséklettől, a közeg viszkozitásától, a tartózkodási időtől → hőmérséklet csökkentése, viszkozitás növelése (de elektroforetikus mozgékonyág)

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

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

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



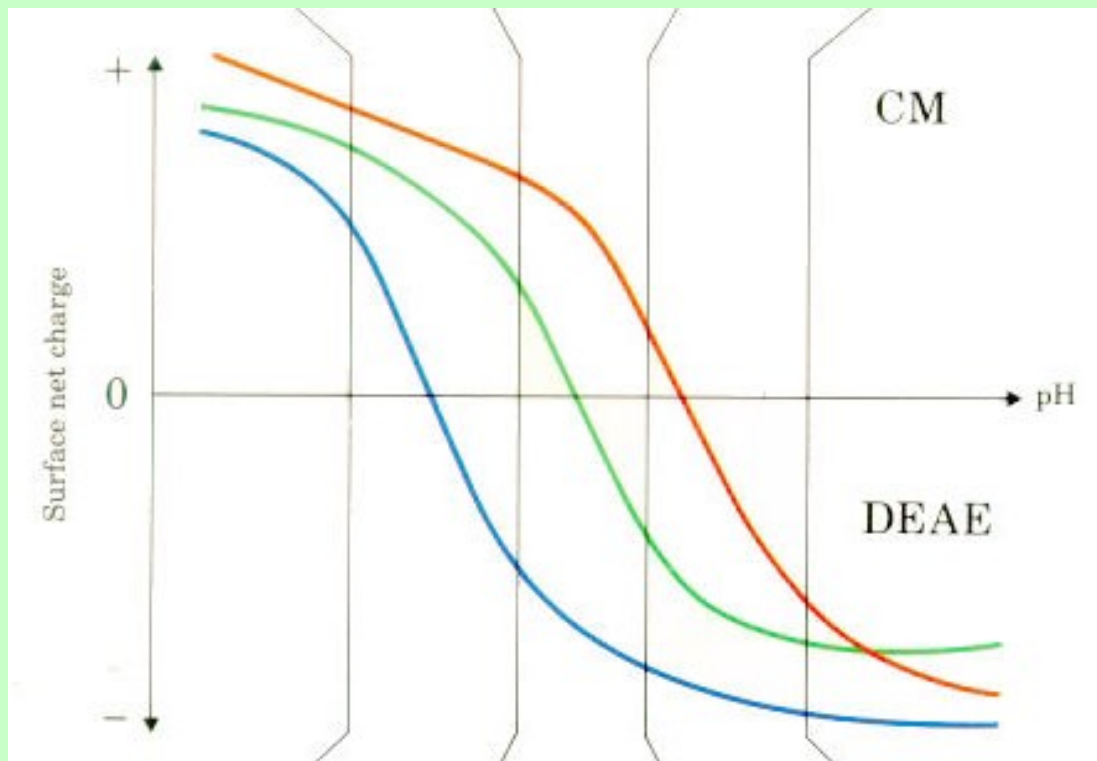
FFE-elválasztás problémái

Zavaró hatás	Okozott hiba	Tennivalók
Szabad áramlás	Sávkiszéledés	<ul style="list-style-type: none"> – a Gr szám csökkentése – a hordozó puffer elektromos vezetésének csökkentése
Diffúzió	Sávkiszéledés	<ul style="list-style-type: none"> – hőmérséklet csökkentése – a hordozó folyadék viszkozitásának növelése
Elektrooszmózis	Sávkiszéledés	<ul style="list-style-type: none"> – a készülék falának bevonása
Adszorpció	Fehérjeveszteség	<ul style="list-style-type: none"> – a készülék falának bevonása – detergens alkalmazása
Kicsapódás	Fehérjeveszteség Sávkiszéledés	<ul style="list-style-type: none"> – a pufferrendszer megváltoztatása – detergens alkalmazása – stabilizátor
A hordozó puffer gázosodása	Áramlás instabilitása	<ul style="list-style-type: none"> – a hordozó pufferbe N₂, He bekeverése – a hordozópuffer vákuumkezelése
Sűrűségkülönbség	Áramlás instabilitása Sávkiszéledés	<ul style="list-style-type: none"> – más puffer választása – semleges anyagok adagolása



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Milyen pH-n érdemes elválasztani?



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Előnyei:

- Folyamatos művelet

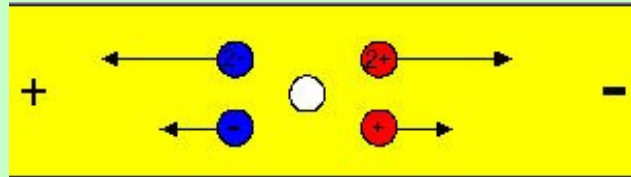
Hátrányai:

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



GÉL ELEKTROFORÉZIS

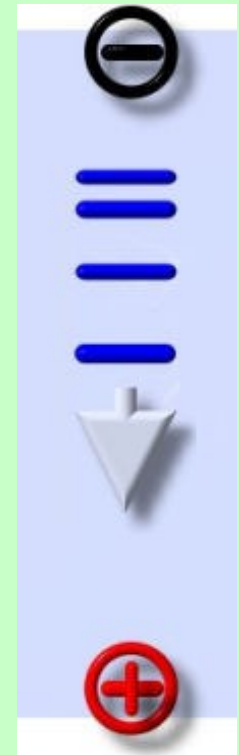
A közeg, amiben a molekulák mozognak, híd-rogél, leggyakrabban poliakrilamid, néha agaróz. A különböző töltésű molekulák két irányba mennének:



Van ilyen elfo is, de legtöbbször az egyirányú futtatás a cél →

Ezt elérhetjük:

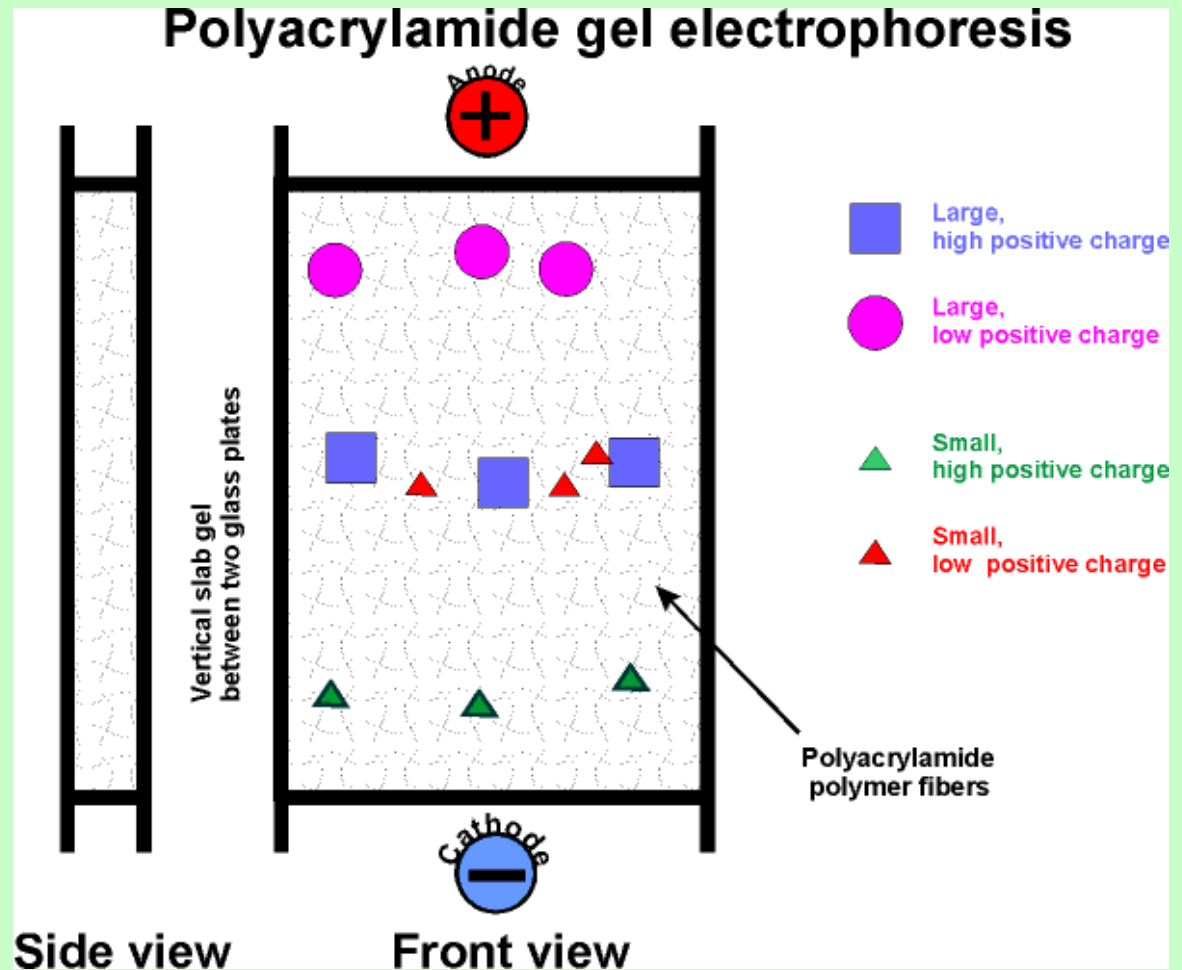
- pH állítással
- minta előkezeléssel (SDS)
- nem törődünk az ellentétes töltésűekkel



AZ ELVÁLASZTÁS ELVE

Méret és töltés szerint.

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

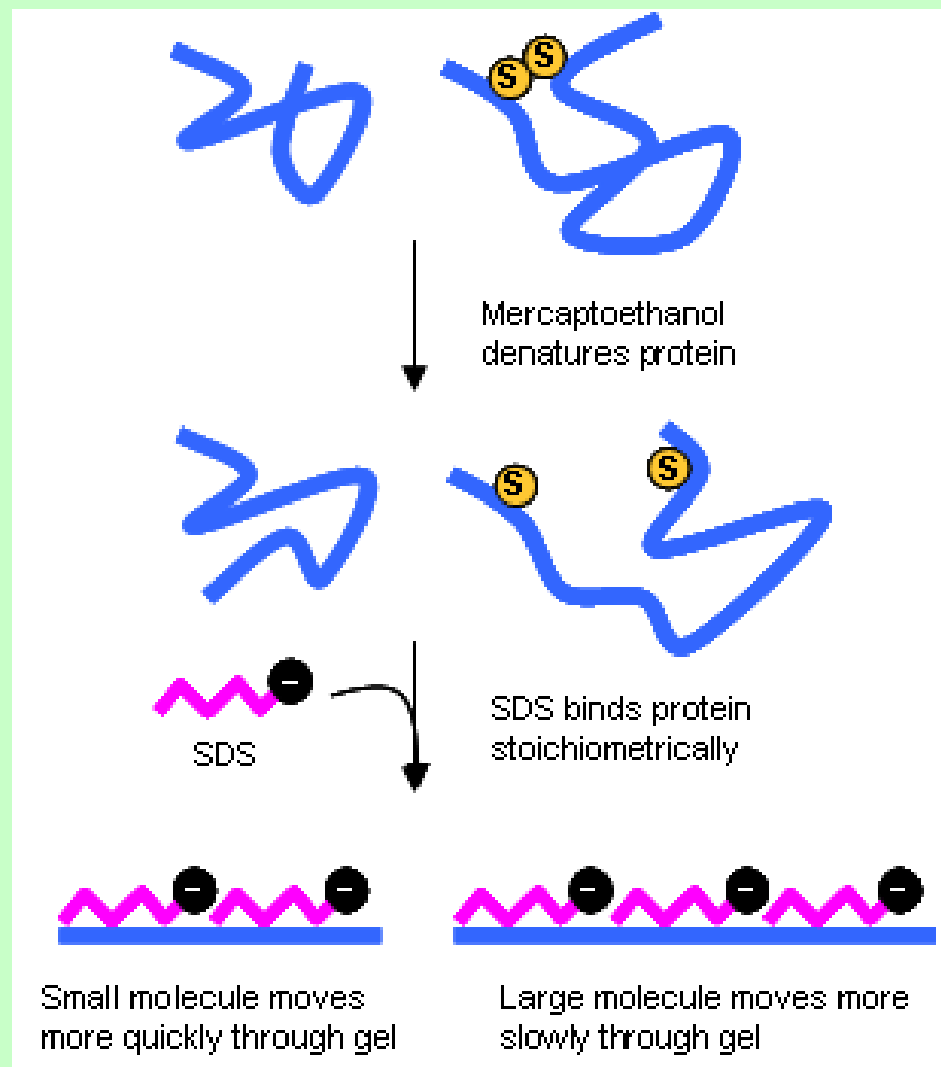


A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

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



KEZELÉS SDS-SEL



GÉL ELEKTROFORÉZIS

Technikai paraméterek:

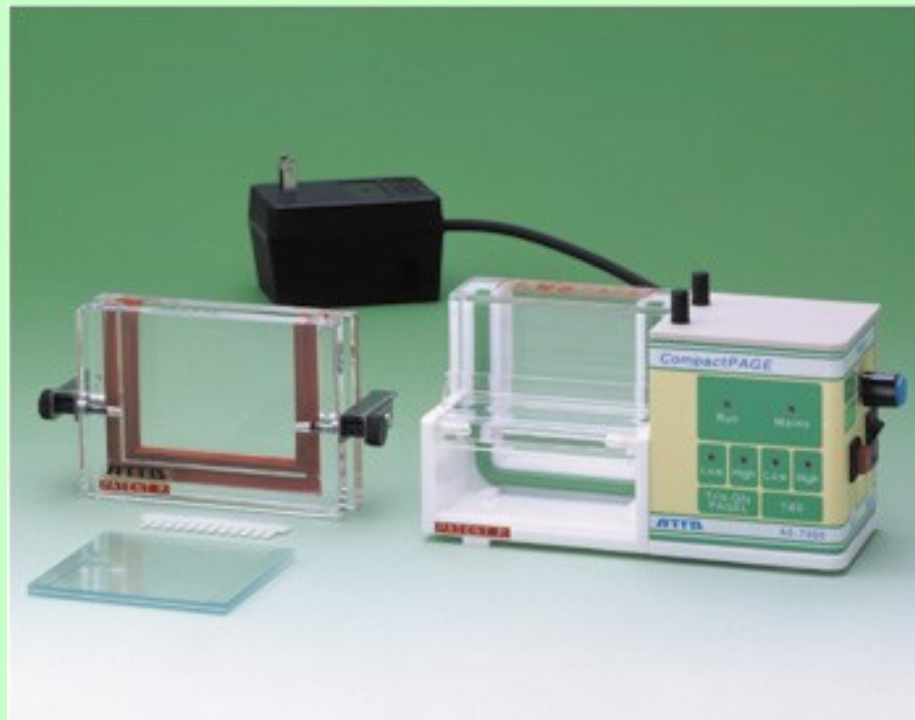
A feszültség: 50 – 500 Volt

Az elválasztás mértékét Volt*óra-ban adják meg.

- tápegység
- feszültség szabályozó/
programozó egység

Az elektródok elektrolit-
kádakon keresztül vi-
szik át a feszültséget a
gélre.

Gyakran hűteni kell.

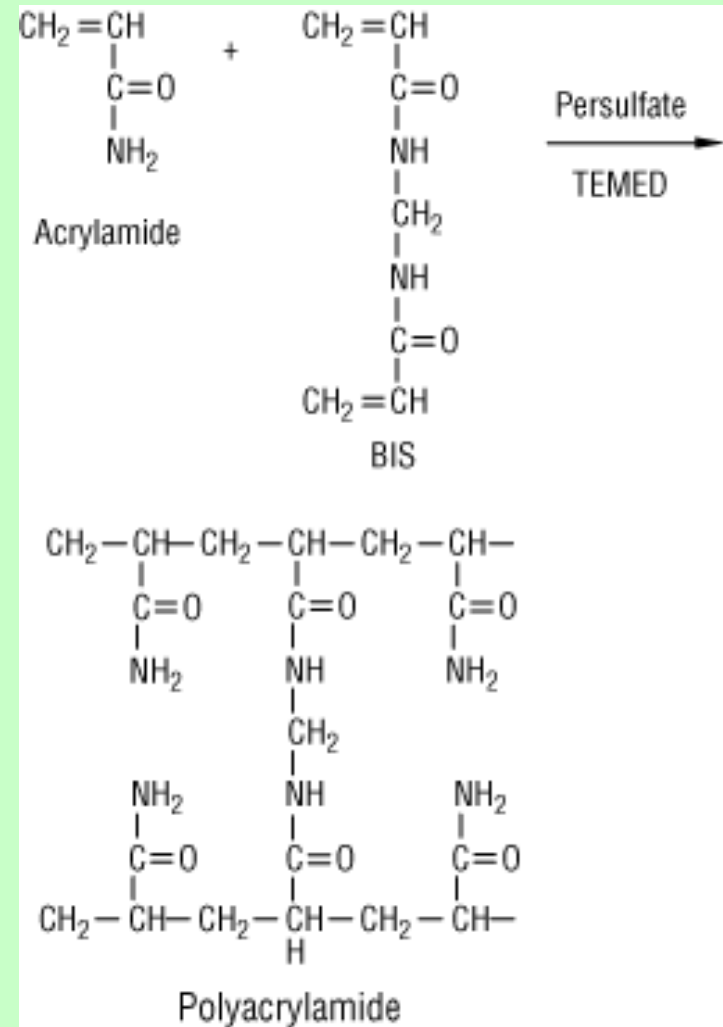


A POLI-AKRILAMID GÉL

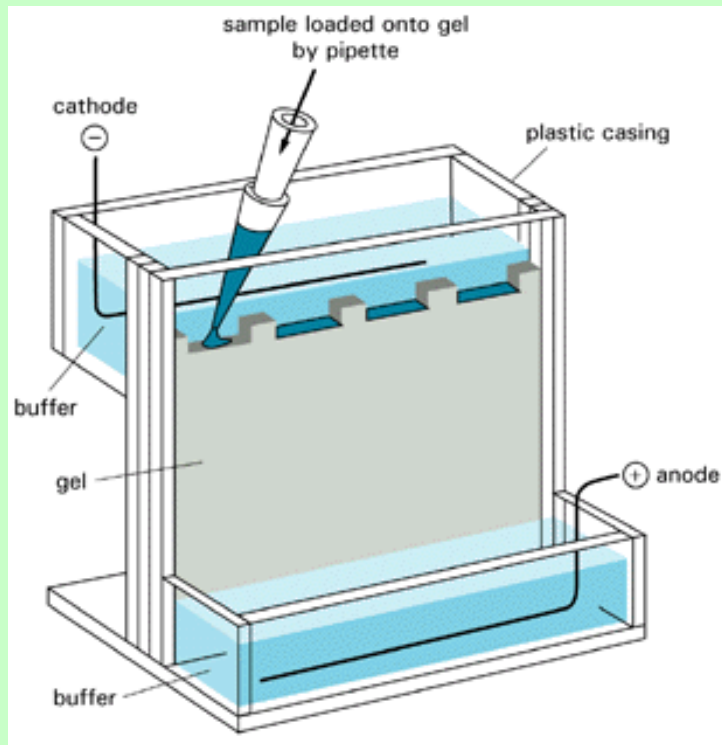
A lineáris poliakrilamid láncokat bis-akrilamiddal térhálósítják.
- koncentrációjával jellemezhető a gél „sűrűsége” (3 – 30 %).

A polimerizációhoz szükséges:
TEMED – tetrametil-etilén-diamin katalizátor

Ammónium-perszulfát – iniciátor
Oxigénmentes közeg



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 pipetázzák a mintákat.

Mennyisége: $\sim 5 \mu\text{g}/\text{csík}$

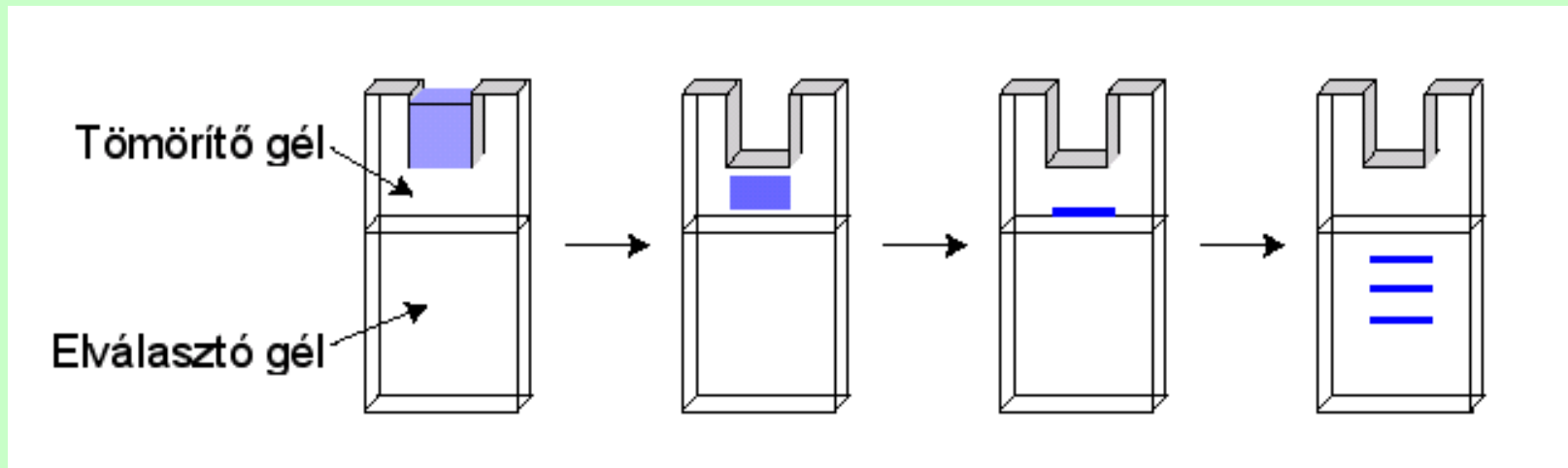
Sűrűsége szerint a gél lehet:

- homogén
- discontinuous
- gradiens



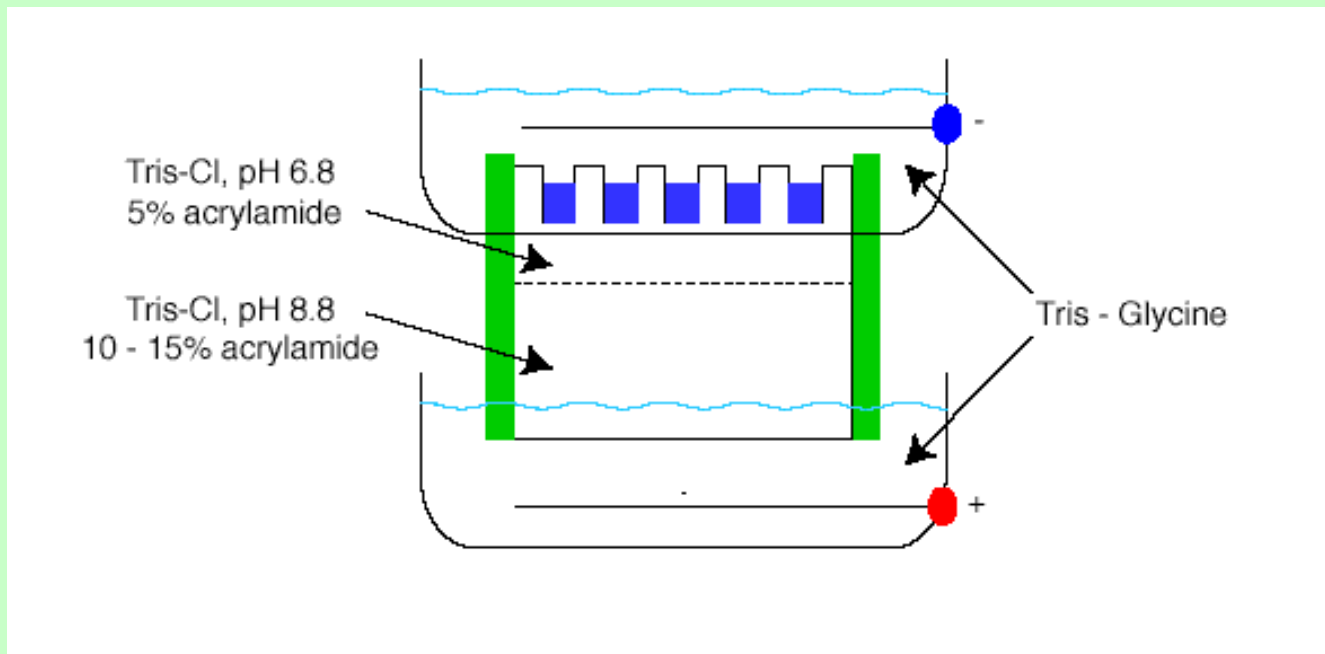
DISC GÉLEK

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



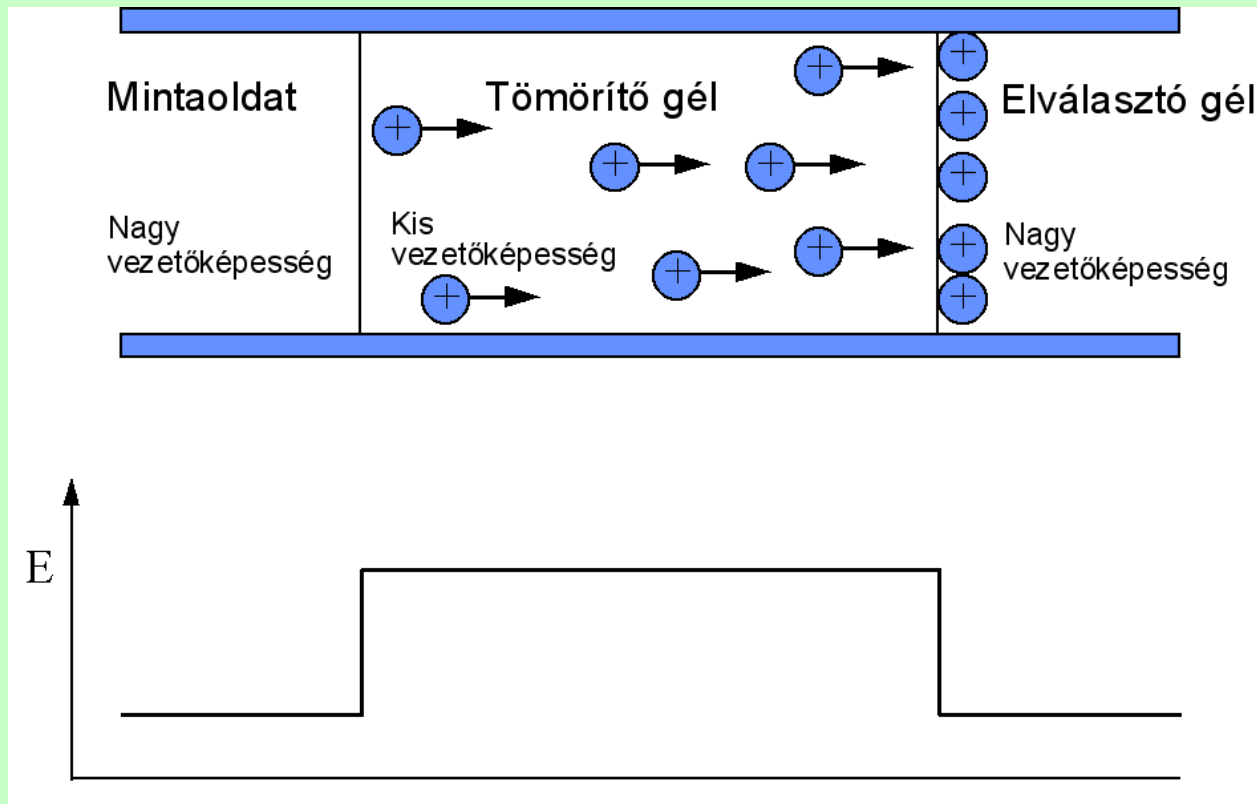
DISC GÉLEK

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



DISC GÉLEK

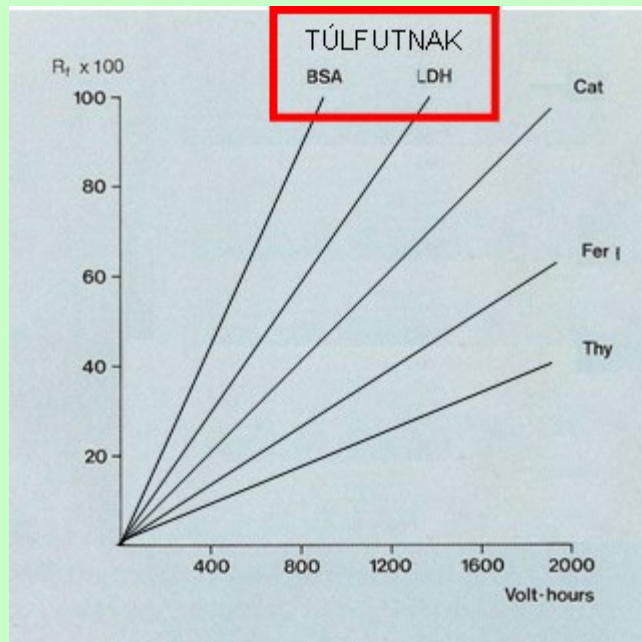
Amikor a molekulák kiérnek a tömörítő gél szakaszból, akkor hirtelen lefékeződnek, összevárják egymást.



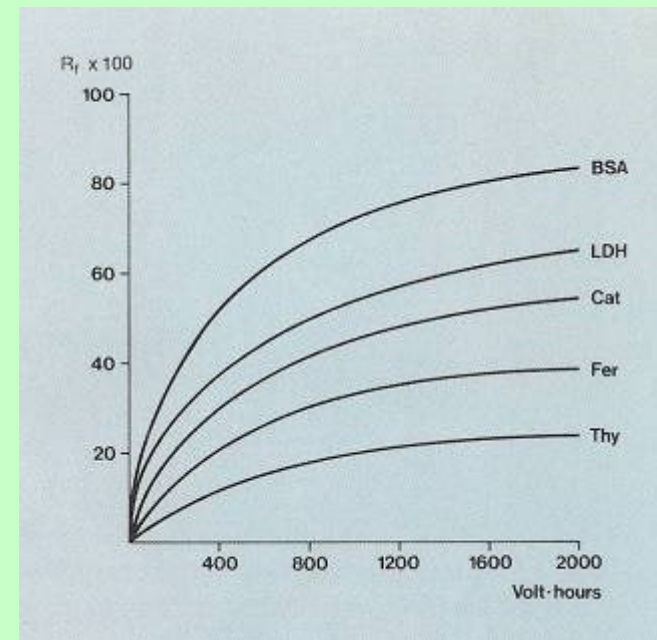
GRADIENS GÉLEK

A gél sűrűsége a futtatási szakasz mentén folyamatosan változik, növekszik. Célja: egy gélen szélesebb mólsúly-tartomány átfogása.

Futás homogén gélen:



gradiens gélen:



A KÉSZ GÉLEK KIÉRTÉKELÉSE

A fehérjecsíkok szabad szemmel nem láthatók, ezért festési eljárásokkal „hívják elő”. Fixálás - festés - halványítás.
Fixálás: savas reagensekkel (perklórsav, szulfoszalicilsav)

Festés:

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

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

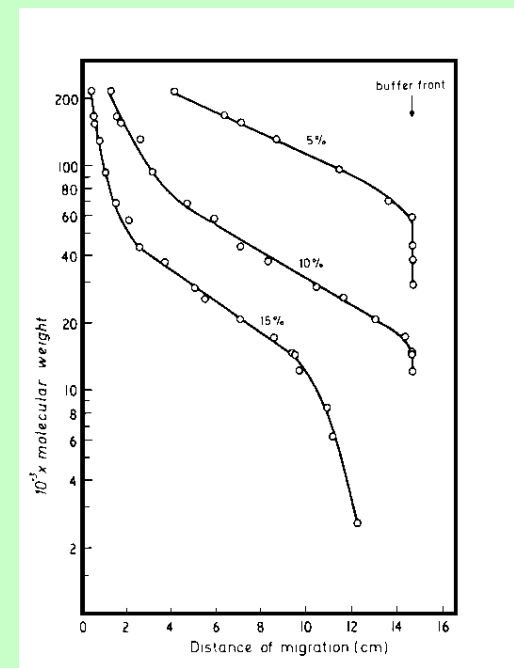
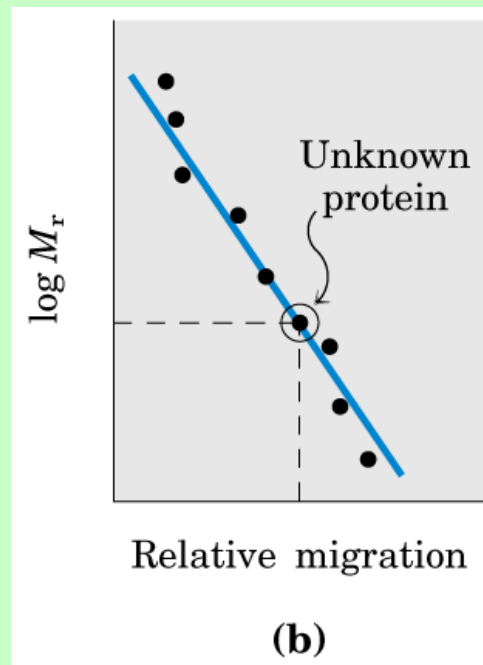
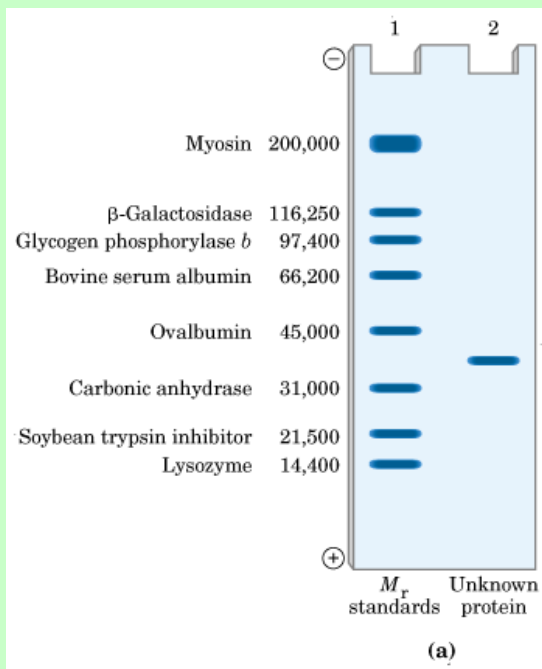
Amido Black, Fast Green – ritkábban használatosak.

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



A KÉSZ GÉLEK KIÉRTÉKELÉSE

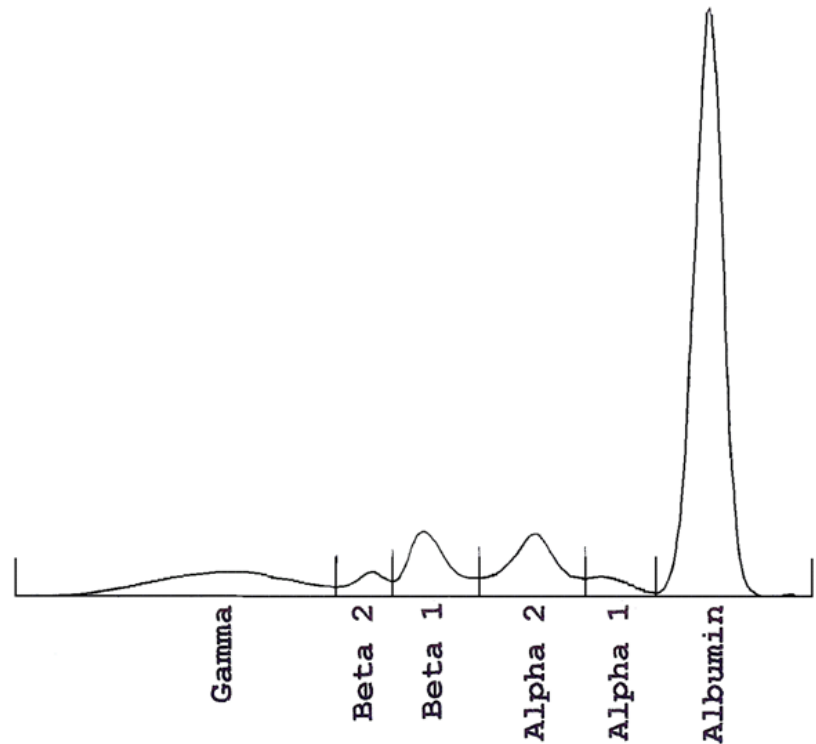
Az SDS-PAGE méret szerint választja el a molekulákat. A mólsúly meghatározásához a futtatást kalibrálni kell. Ezért minden gélen futtatnak ismert móltömegű fehérjéket (kalibrációs „létra”)



VÉRFEHÉRJÉK ELVÁLASZTÁSA

Szérum fehérje elektroforézis

On agarose gel (Hydragel)



Frakciók	%	Normal %	g/l
Albumin	62.1	59,4 - 73,9	
Alpha 1	2.9	1,2 - 3,1	
Alpha 2	11.0	7,0 - 12,2	
Beta 1	9.4	4,9 - 9,4	
Beta 2	2.8	1,6 - 5,6	
Gamma	11.8	6,9 - 14,7	

$$A/G = 1.64$$

BME Alkalmazkodó Normális elektroforetikus mintázat.



KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforézis egy kapillárisban elhelyezkedő puffer oldatban történik.

Műszaki adatok:

Feszültség: 10 - 30 kV

Térerősség: 100-500 V/cm

Átmérő (belső): 25-75 μm

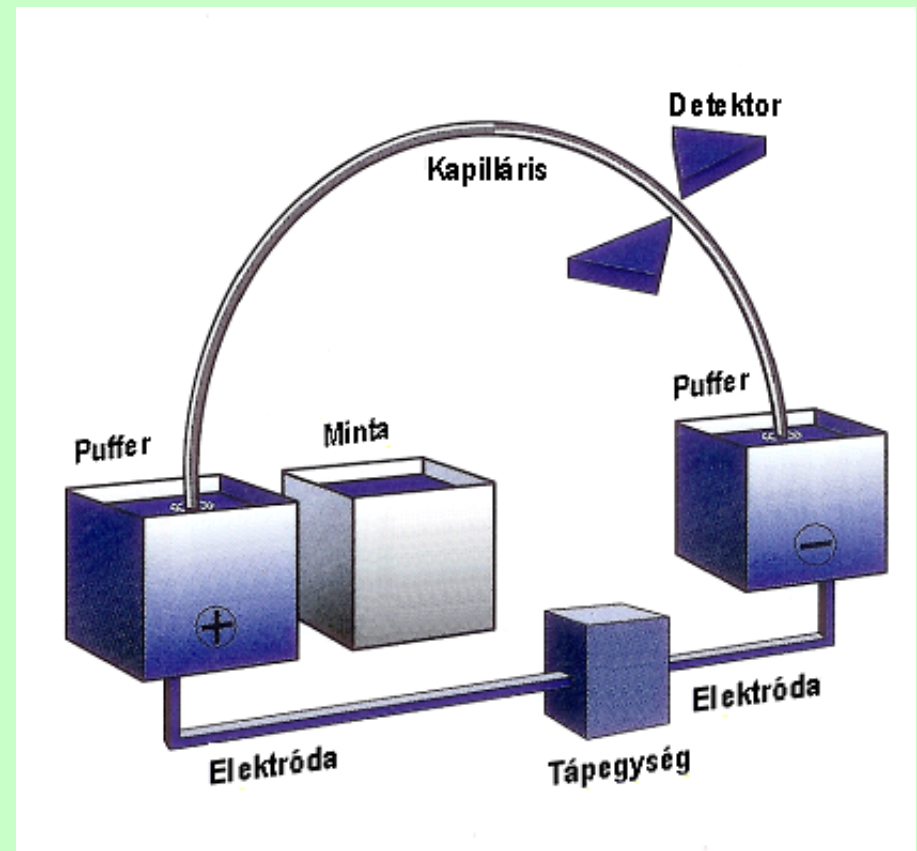
Hossz: 50-100 cm

Anyaga: kvarcüveg

Mintatérfogat: 1-50 nl

Tartózkodási idő: 1-3 perc

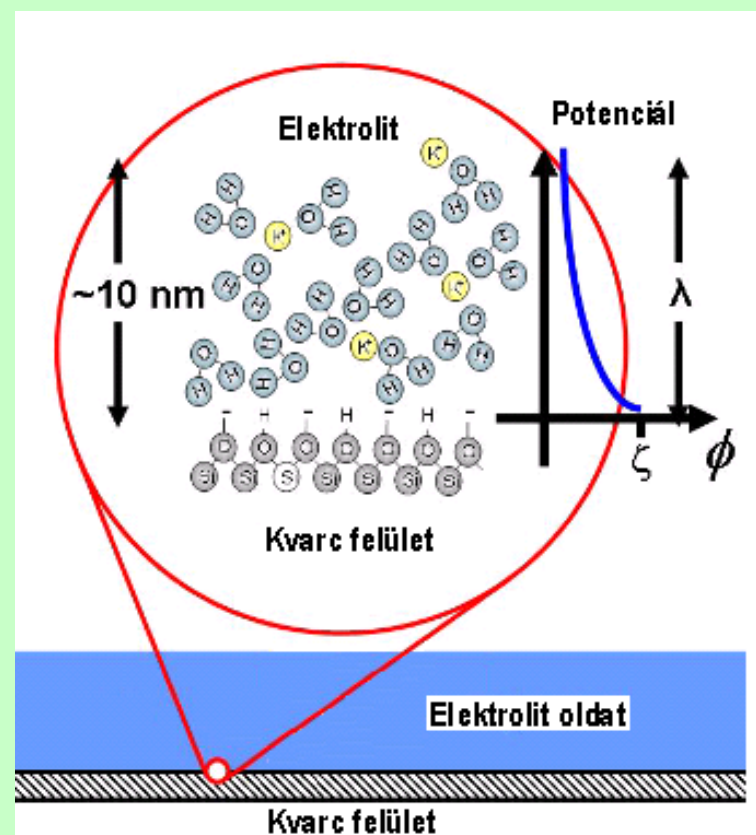
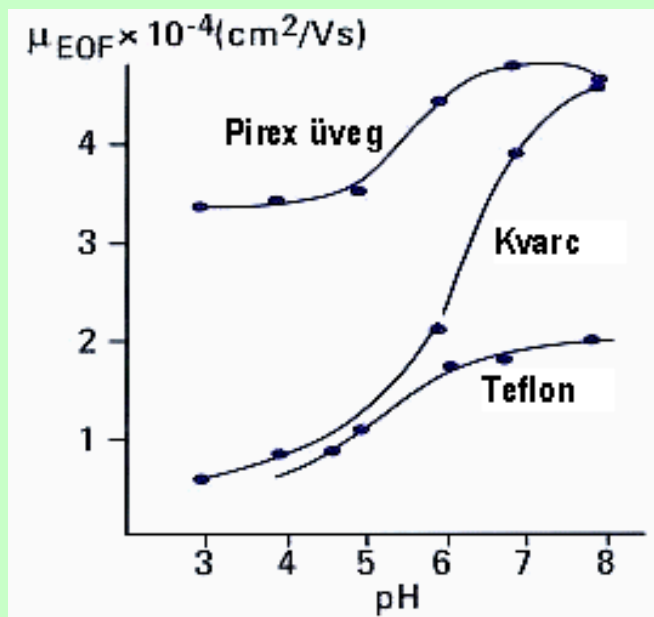
Detektálás: UV



MŰKÖDÉSI ELVE

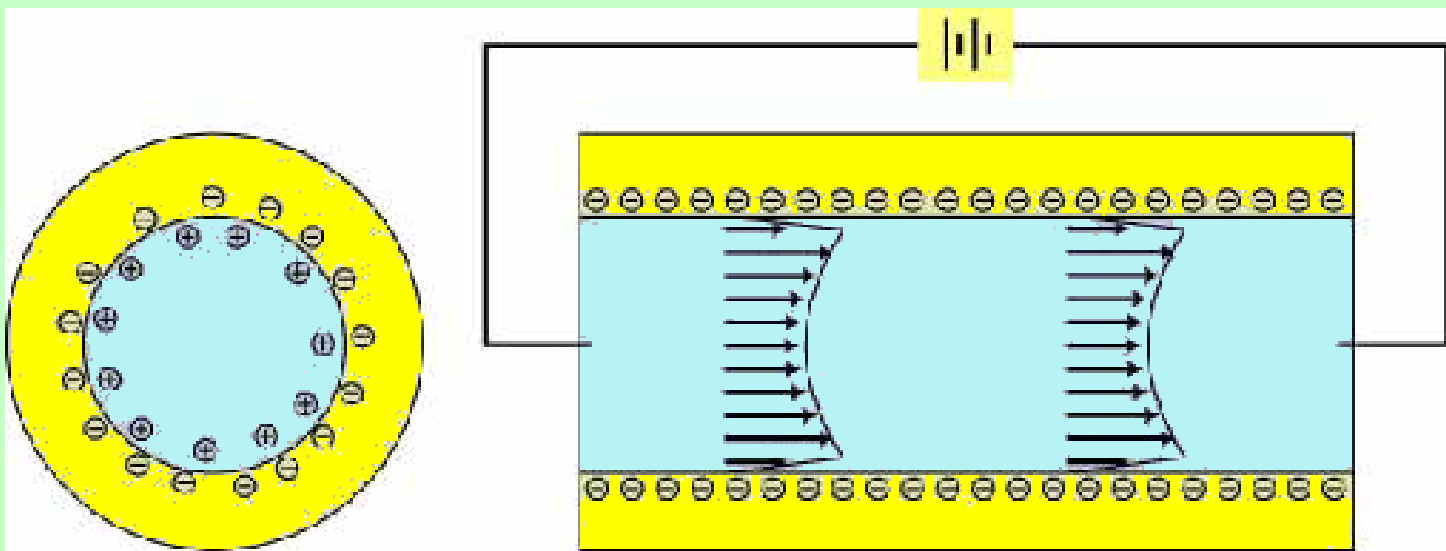
Az elektrooszmózis alapul: a kvarccső belső felülete negatív töltésű, erre kationokból egy ellenion-réteg rakódik le (ld. korábban a felületi potenciáloknál).

A felületi potenciál pH-függő:



ELEKTROOZMÓZIS

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



ELEKTROOZMÓZIS

A leírásnál kétféle sebességet kell megkülönböztetni:

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

ahol: ε - dielektromos állandó

ζ - zéta potenciál

η - viszkozitás

E – térerősség

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

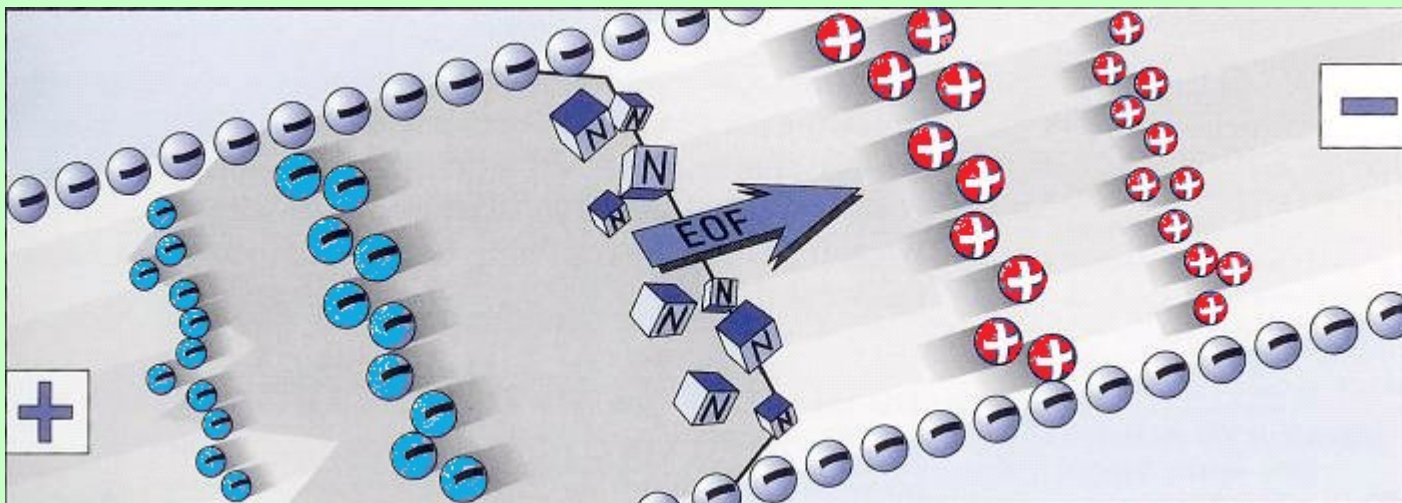
$$v = q \cdot E / 3d\pi\eta = \mu \cdot E$$



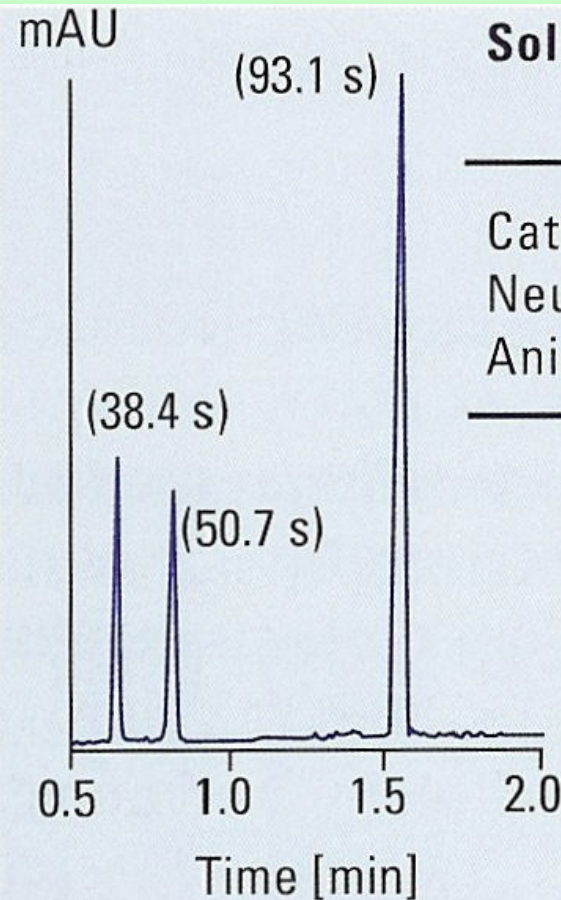
KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

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

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



SEBESSÉG-KÜLÖNBSÉGEK



Solute	Migration time(s)	μ_a (cm ² /Vs)	μ_e (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}

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

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

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

(note: μ_e will be negative for the anion)



BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

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

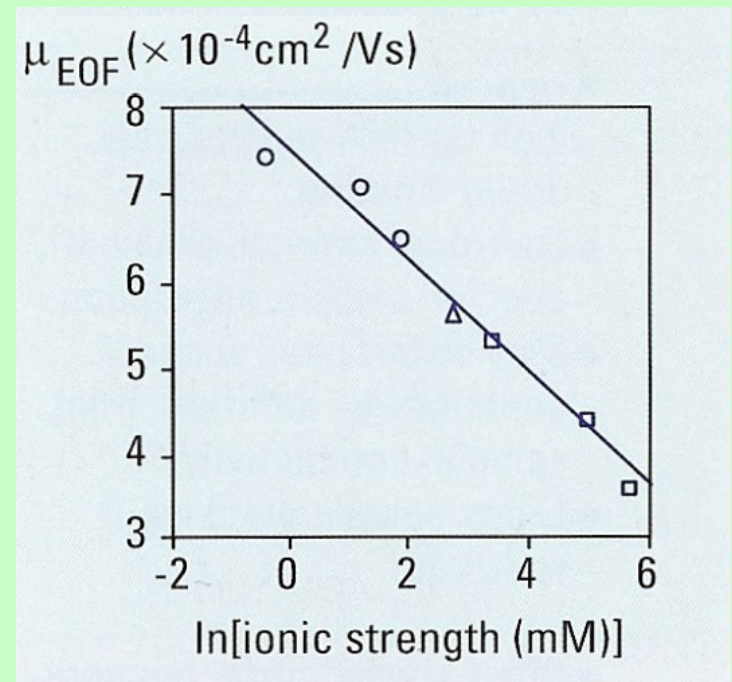
pH: magasabb pH-n jobban működik

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

Hőmérséklet, Viskozitás



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 ioncsere szintén töltés alapján választ szét, lassabb, rosszabb a felbontása, de léptéknövelhető)

