



Elválasztástechnika

- Következő három hét:
 - Makromolekulák analitikája
 - Bioanalitika
 - Proteomika
 - Bioaktív komponensek analitikai
 - Szemelvények az élelmiszeranalitika területéről



Elválasztástechnika alkalmazása a bio-, mezőgazdasági és az élelmiszer analitikában - Makromolekulák jellemzése

Közös véleményformálás:

- Mi az az elválasztástechnika?
- Milyen területen találkoztak alkalmazásával?
- Milyen jellegzetességei vannak a bioanalitikának?



Miről is lesz szó ma és jövő héten?

- Elektroforetikus technikák
 - nativ, SDS – PAGE
 - 2D, IeF, Blotting, immunoanalitika
 - Fast gel system
 - Kapilláris elektroforézis
 - Lab-on-chip technika
 - Kapcsolt technikák (...MS)
- Kromatográfiás technikák
 - gél, SE, IE, RP HPLC,
 - kapcsolt technikák (....-MS)

- Alkalmazási példák



Mire használjuk az elválasztástechnikai módszereket pl. az élelmiszer- és biológiai orientációjú területeken:

- leggyakrabban fehérjék jellemzésére, de
- DNS-vizsgálatokra
- szénhidrát monomerek és polimerek vizsgálatára
- lipidek és lipidkomponensek jellemzésére
- mikrokomponensek meghatározására
- stb., pl...

Miért van szükség pl. a fehérje, mint makromolekula jellemzésére?

Miért van szükség a fehérje, mint makromolekula jellemzésére?

- mert nem csak táplálkozástani (tápanyagforrás) funkciója van
- mert allergiát, érzékenységet okozhat (élelmiszerbiztonság)
- mert eredetazonosításra alkalmas lehet (eredetvédelem)
- stb, pl...

Miért lehetséges?

- A fehérje alegység összetétel általában jellemző a forrás biológiai mátrixra, ezért alapvető és megbízható „információforrás”
- (Ennél megbízhatóbb már csak a DNS lehet, ezekről a molekuláris biológiai módszerek között esik majd szó...)

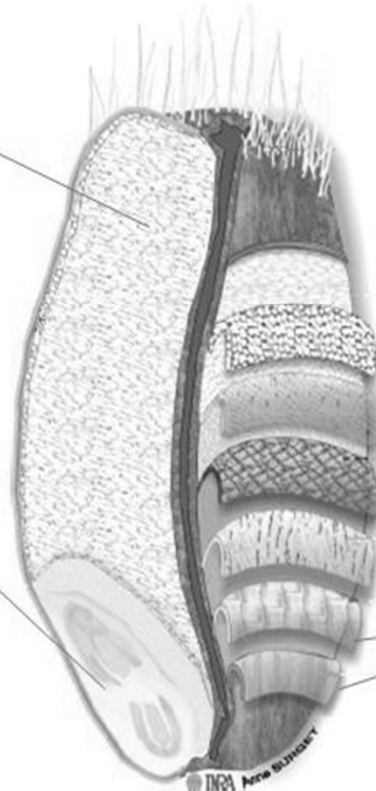
Nézzük, mit „tud” a búza...? – táplálkozástani szempontból többet, mint amit ma hasznosítunk

Endosperm (80-85%)

- Keményítő
- Fehéréje

Embrió (3%)

- Lipidek
- Antioxidánsok
- E vitamin
- B vitaminok
- Ásványi anyagok
- Enzimek
- Növényi szterolok



Aleuron réteg (6-9%)

- Oldható és oldhatatlan ételmi rost (AX, β -glükán)
- Fehérjék
- Antioxidánsok (fenolos savak)
- E vitamin, B vitaminok
- Enzimek
- Fito savak

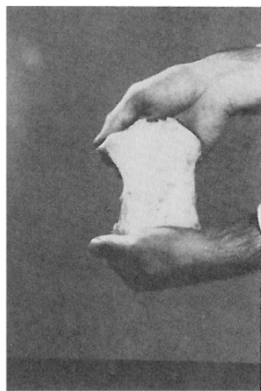
Maghéj (1%)

- Alkilrezorcinok

Termésfal (4-5%; epi-, mezo- és endokarpium)

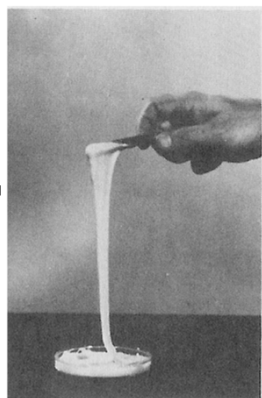
- Oldhatatlan ételmi rost (Ax, cellulóz, lignin)
- Sejtfalhoz kötött antioxidánsok (fenolos savak)

Mit „tud” a búza...? – A technológia tulajdonság alakulásának fő „felelőse” a sikérfehérje



Glutenin

polipeptid-
 alegységekből
 felépült makro-
 polimer
 ELASZTIKUS



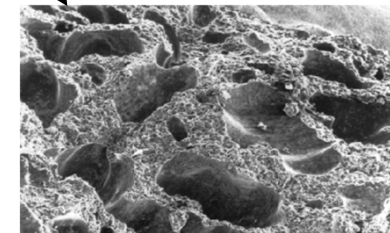
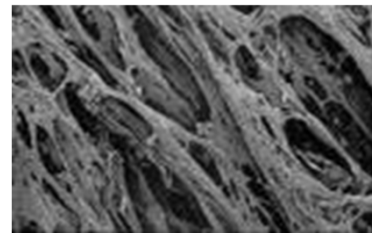
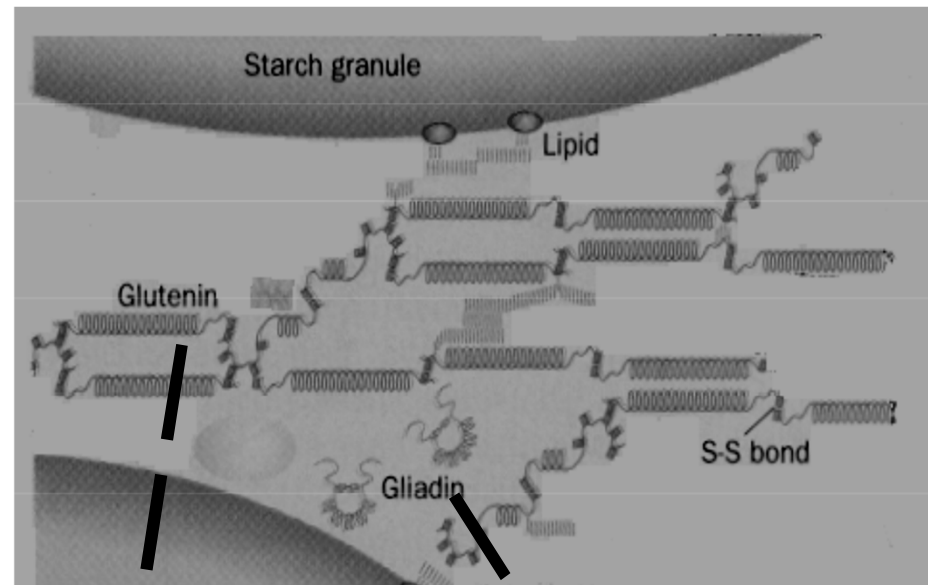
Gliadin

monomer,
 hidrofób
 fehérjék
 PLASZTIKUS

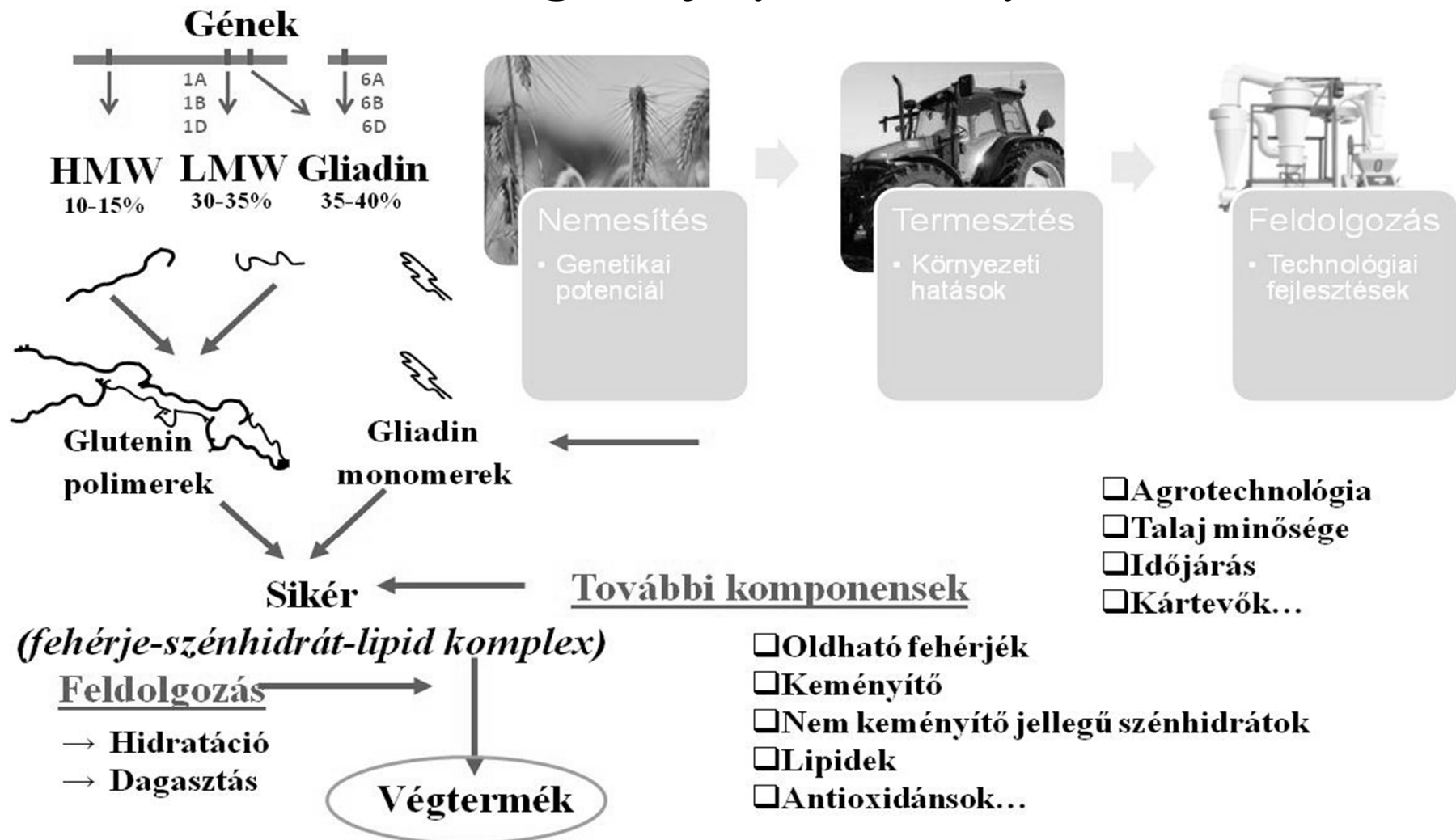


Sikér

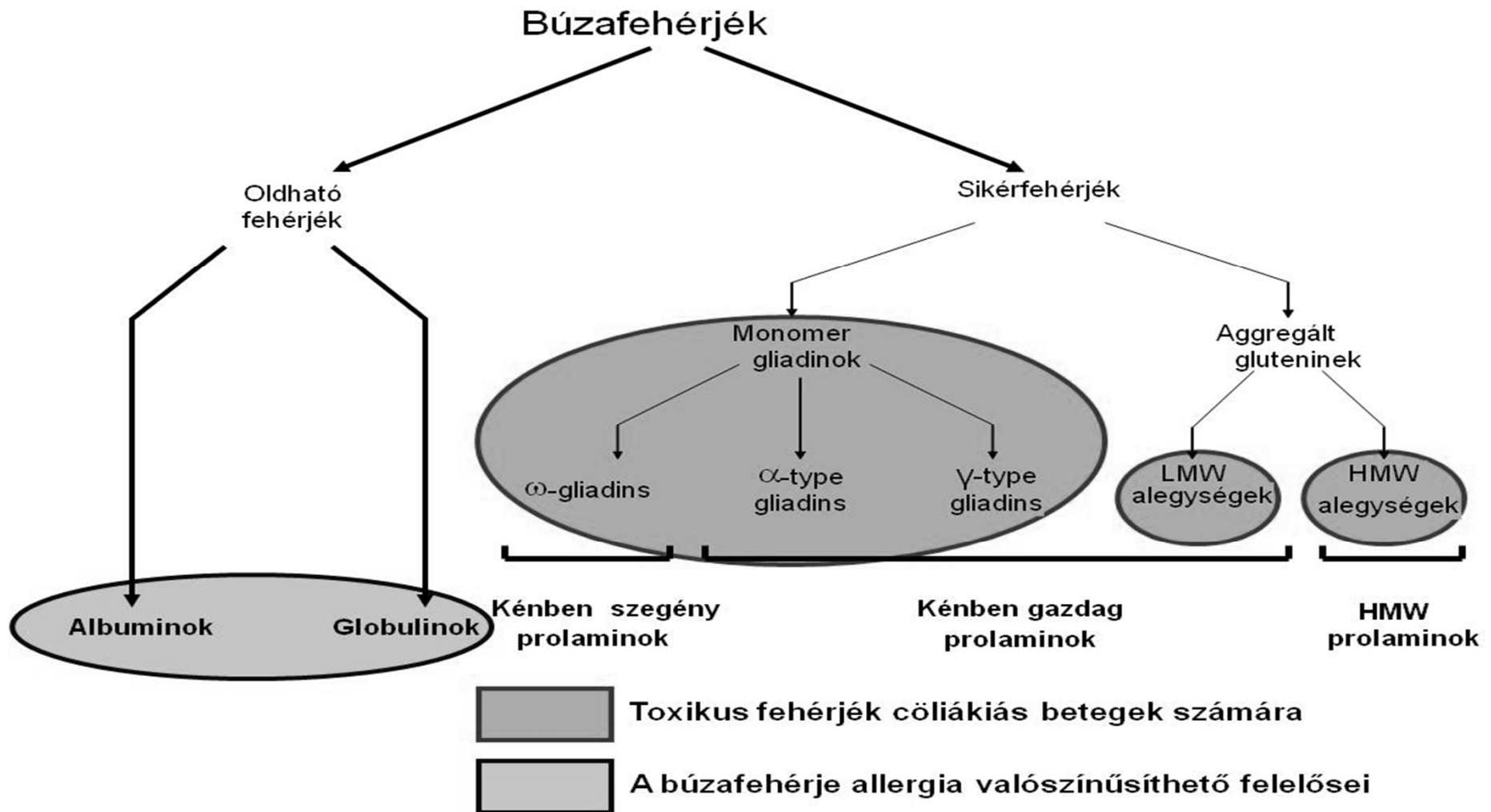
KOMPLEX
 REOLOGIAI
 TULAJDONSÁG



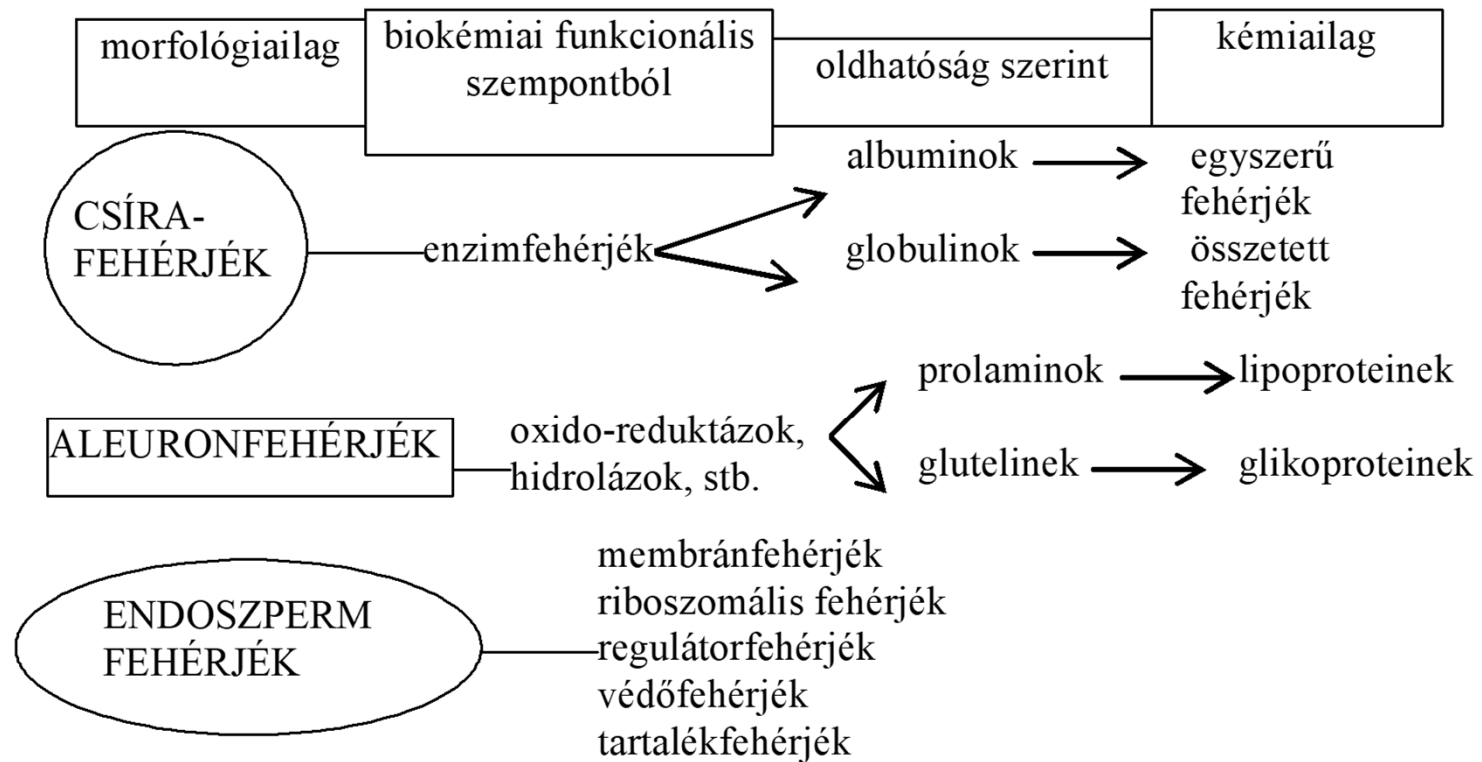
Mit „tud” a búza...? – A fehérjeösszetételt és a technológiai minőséget befolyásoló tényezők



Mit „tud” a búza – egyes fogyasztói csoportoknak a siker (és egyéb gabona-) fehérjék élelmiszerbiztonsági kockázatot jelentenek



Izolálás, tisztítás – csoportosítás



Izolálás, tisztítás – csoportosítás funkció szerint

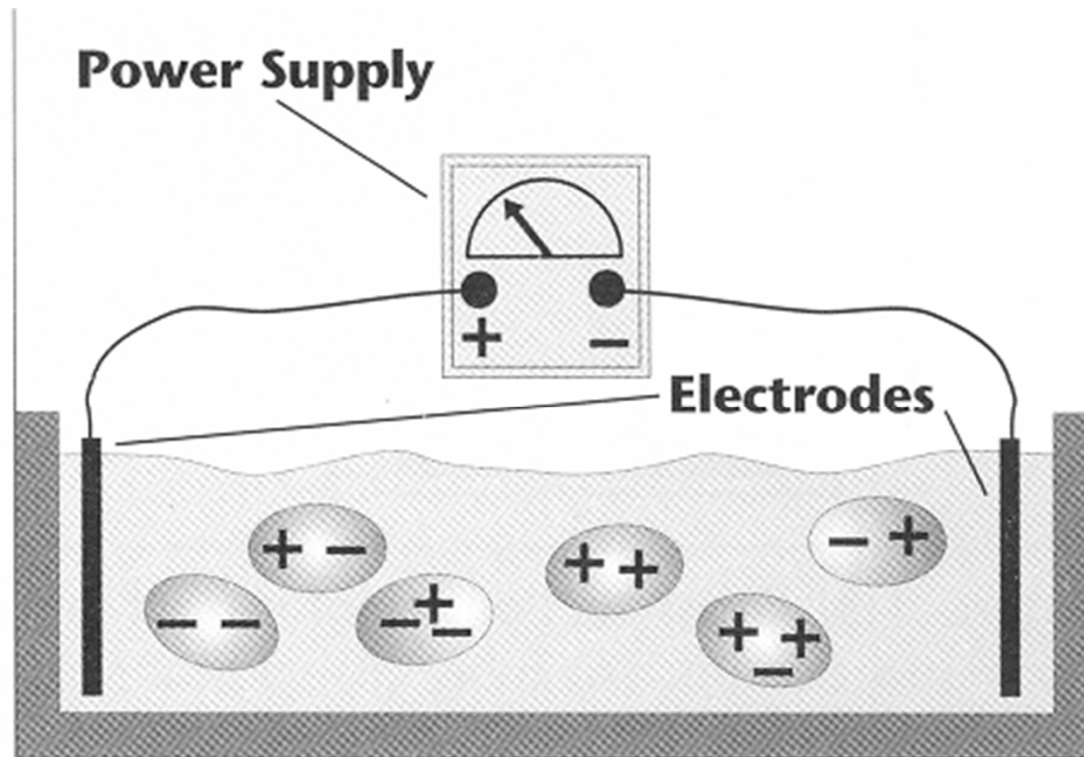
<i>típus, példa</i>	<i>előfordulás, funkció</i>
enzimek tripszin citokróm-c RNS polimeráz	bélben fehérjéket, peptideket hidrolizál elektrontranszporter ribonukleinsav-szintézis
transzportfehérjék hemoglobin hemocianin mioglobin szérumalbumin	oxigénszállítás gerincesek vérében oxigénszállítás gerinctelenek testfolyadékában oxigénszállítás izomban zsírsavszállítás vérben
védőfehérjék ellenanyagok komplement fibrinogén trombin	komplekképzés idegen anyagokkal komplekképzés antigén-ellenanyag rendszerekkel fibrin előanyaga a véralvadásban véralvadás résztvevője
toxinok diphtheria toxin kígyómérgek ricin	bakteriális toxin foszfoglicerideket hidrolizáló enzimek ricinus toxikus fehérje

Izolálás, tisztítás – csoportosítás funkció szerint

<i>típus, példa</i>	<i>előfordulás, funkció</i>
hormonok inzulin adrenokortikotrop növekedési hormon	glükózanyagcserét szabályozza kortikoszteroid-szintézist szabályozza csontok növekedését stimulálja
kontraktilis fehérjék miozin aktin dinein	miofibrillum stacionárius filamentuma miofibrillum mobilis filamentuma cilia és flagellum
szerkezeti fehérjék kollagén elasztin α -keratin fibroin glikoproteinek membrán strukturfehérjék mukoproteidek	fonalas kötőszövetekben (inak, csontok, porc) elasztikus kötőszövetekben bőr, szőr, toll, szarv, pata, stb. selyemben, pókhálóban sejthártya, sejtfal membránban nyálkás váladékokban, ízületi folyadékban
tartalékfehérjék ovalbumin kazein ferritin gliadin zein	tojásban tejben vastároló fehérje a lépben búzában kukoricában
egyéb (funkciójuk nem teljesen ismert) hisztonok protaminok	eukarióták sejtmagjában halspermában

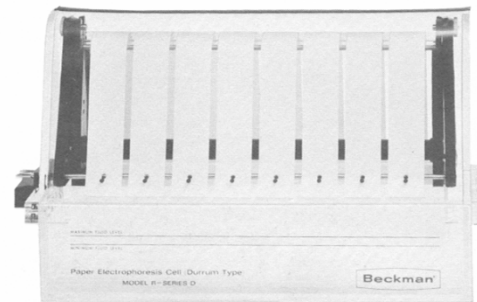
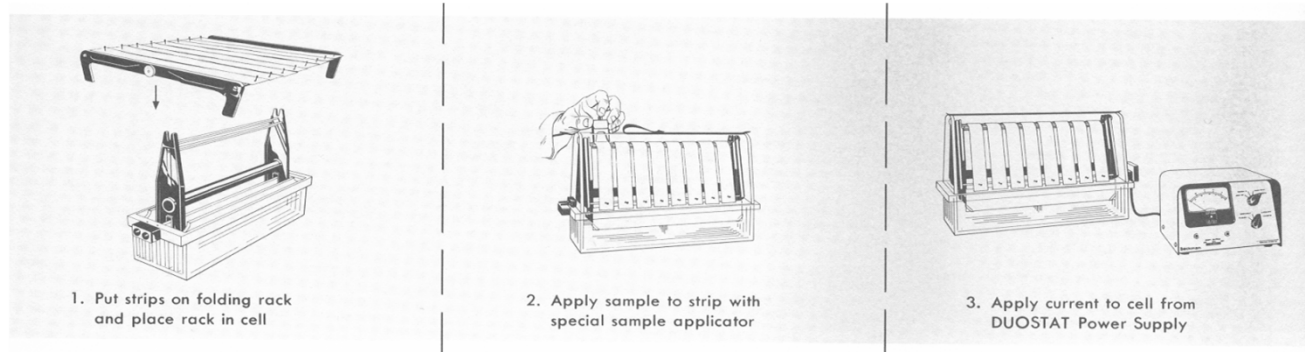
Elektroforetikus módszerek

1. ELV:



Elektroforetikus módszerek

2. Papírelektroforézis – ahonnan indultunk:



ELECTROPHORESIS CELL

Holds strips, electrolyte
and electrodes



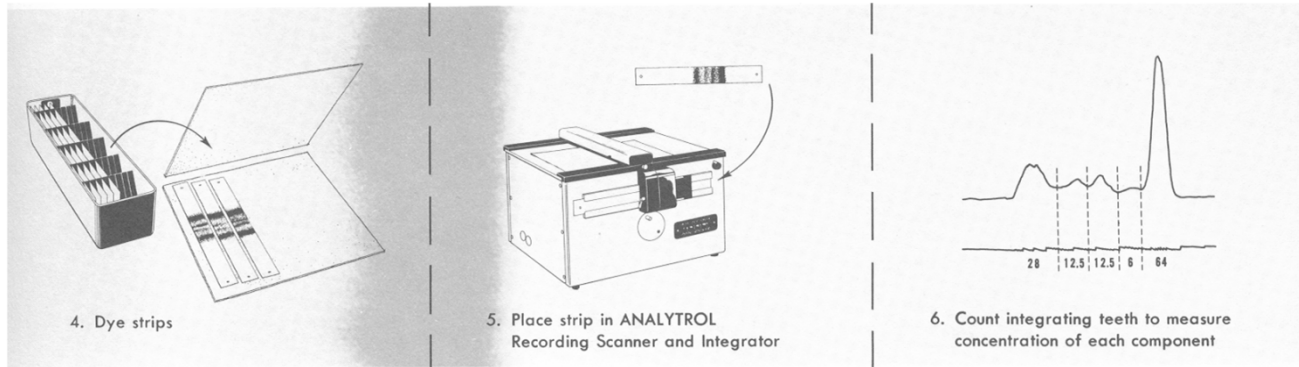
DUOSTAT*

Regulated Power Supply

Supplies constant current to the strips

Elektroforetikus módszerek

2. Papírelektroforézis – ahonnan indultunk:




4. Dye strips

5. Place strip in ANALYTROL
Recording Scanner and Integrator

6. Count integrating teeth to measure
concentration of each component

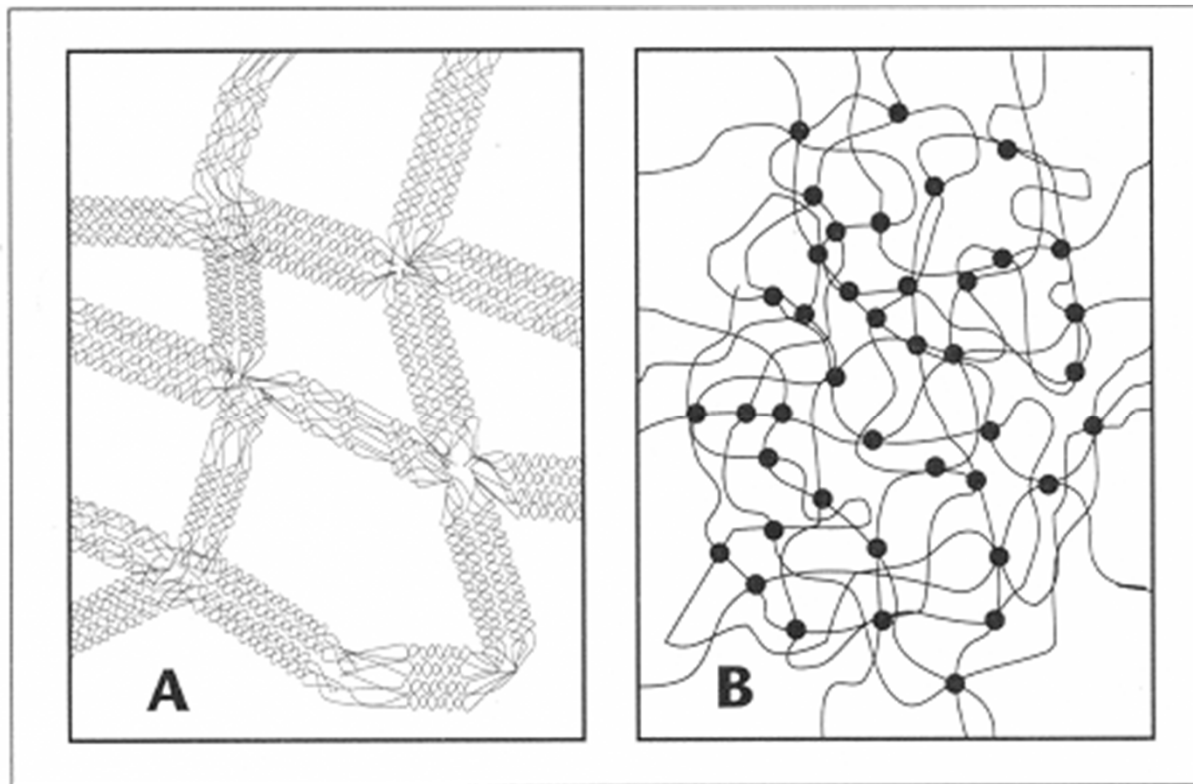
ANALYTROL*
Recording Scanner and Integrator

Scans the strips photoelectrically, draws a curve of dye density and integrates the area under the curve to facilitate measuring the concentration of each component



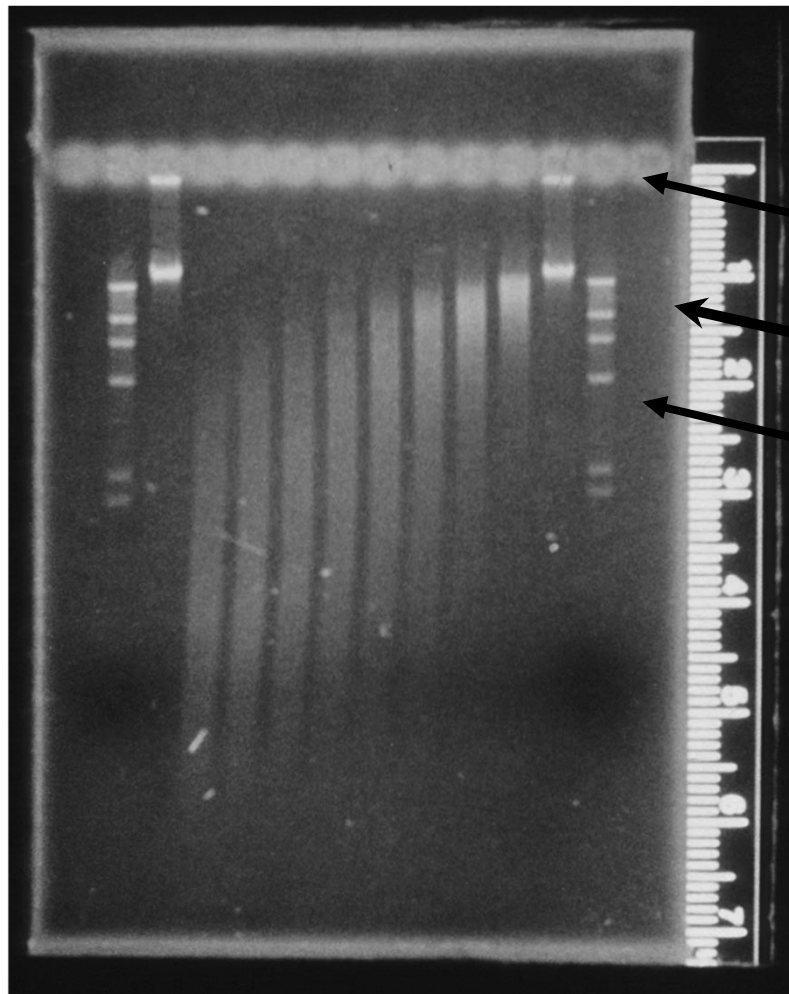
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – agarózgél



Elektroforetikus módszerek

1. Natív gélelektroforézis – agarózgél



Experiment:

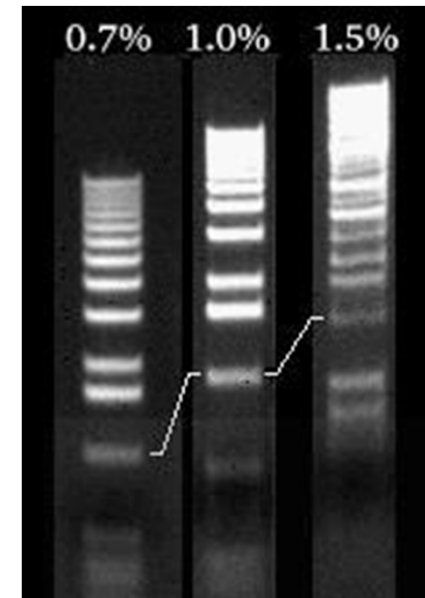
☞ 100 ng K562 DNA

☞ Digest with DNase

~23Kbp

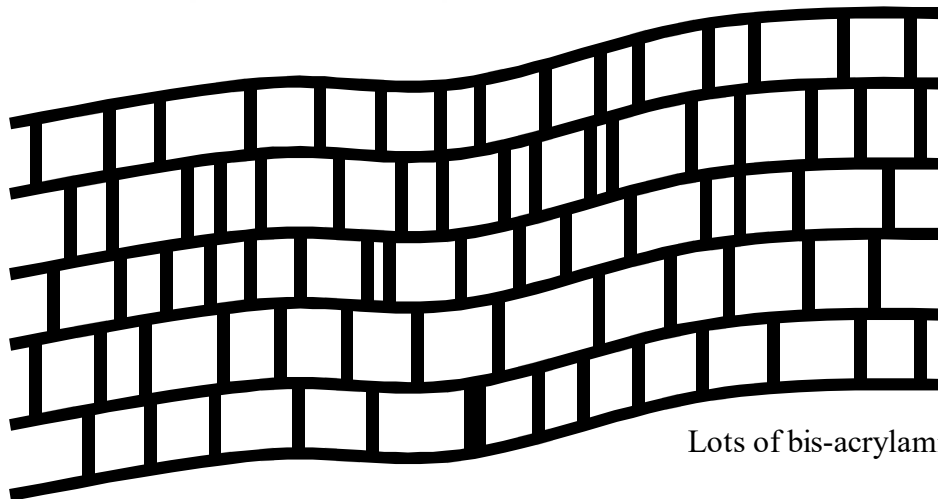
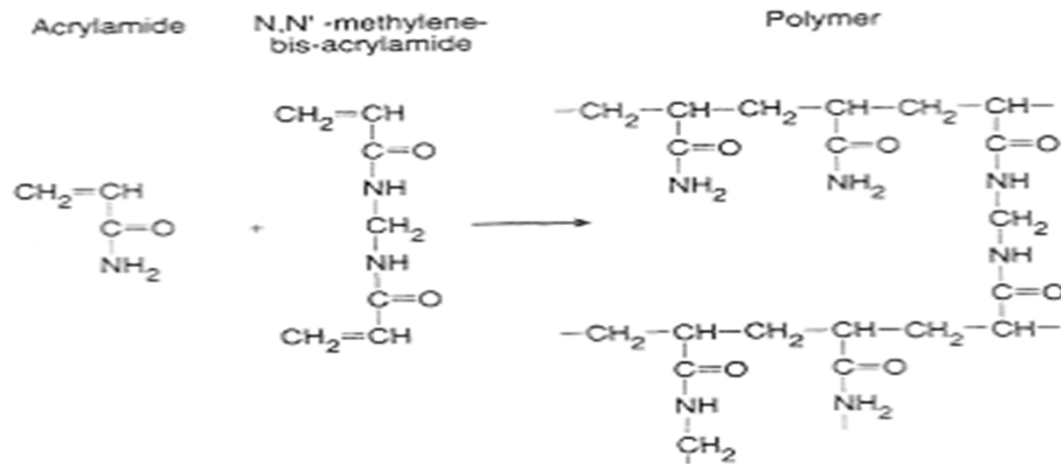
Molecular Weight Ladder

~ 2kbp

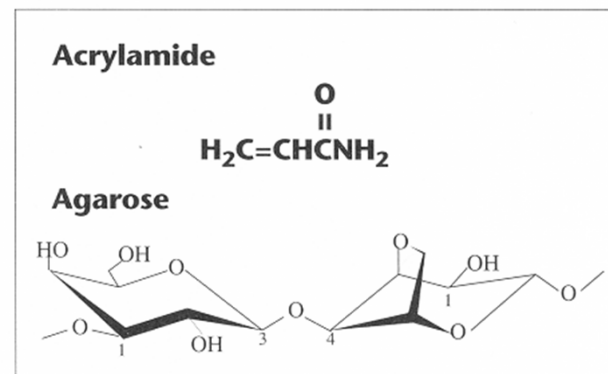


Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – a gél



Lots of bis-acrylamide



Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – gélösszetétel

Table 2: Running gel and stacking gel recipes for 1.5 and 0.75 mm thick gels

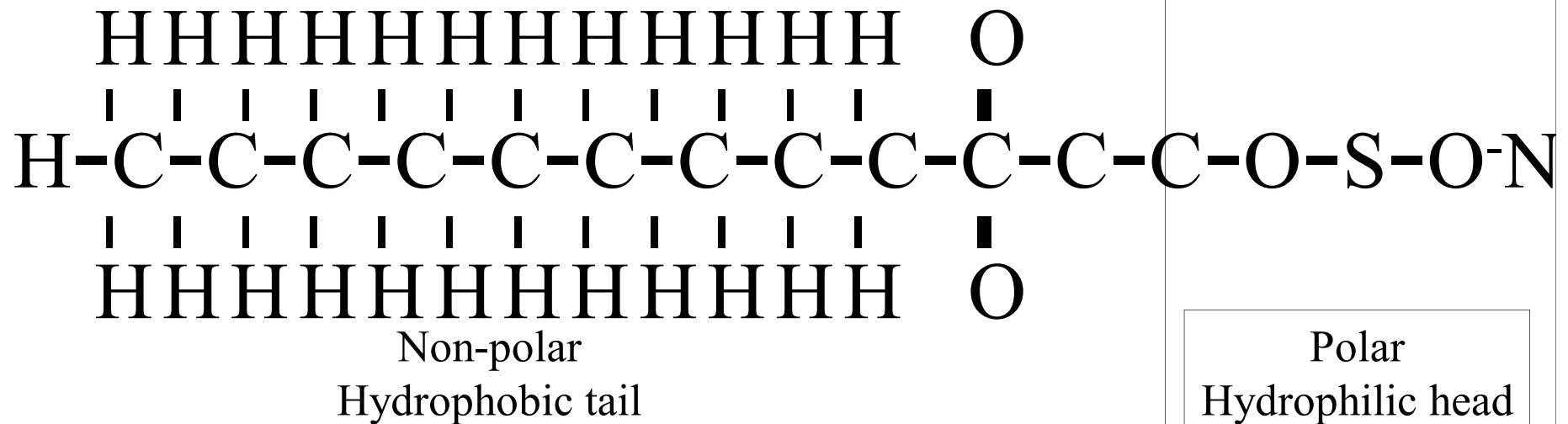
Running Gel Final Gel Concentration (60 ml; 2 ea. 1.5 mm thick SE 600/400 gels)

	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
Monomer Solution	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml
4X Running Gel Buffer	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
10 % SDS	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml	0.6 ml
ddH ₂ O	34.1 ml	29.1 ml	24.1 ml	19.1 ml	14.1 ml
10% Ammonium Persulfate ¹	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED ¹	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

1. Added after deaeration (step 3)

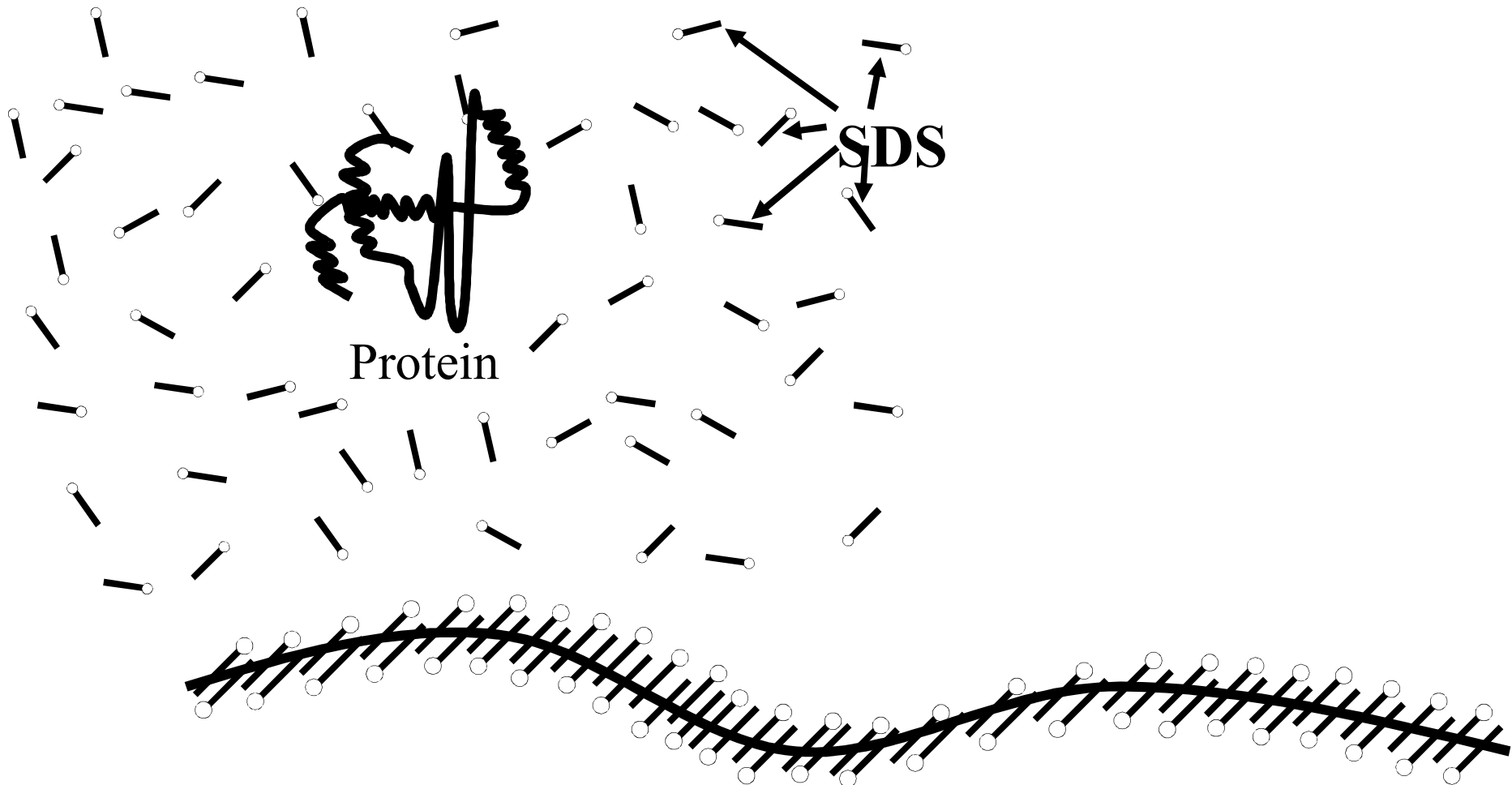
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – SDS hatása a fehérjeszerkezetre



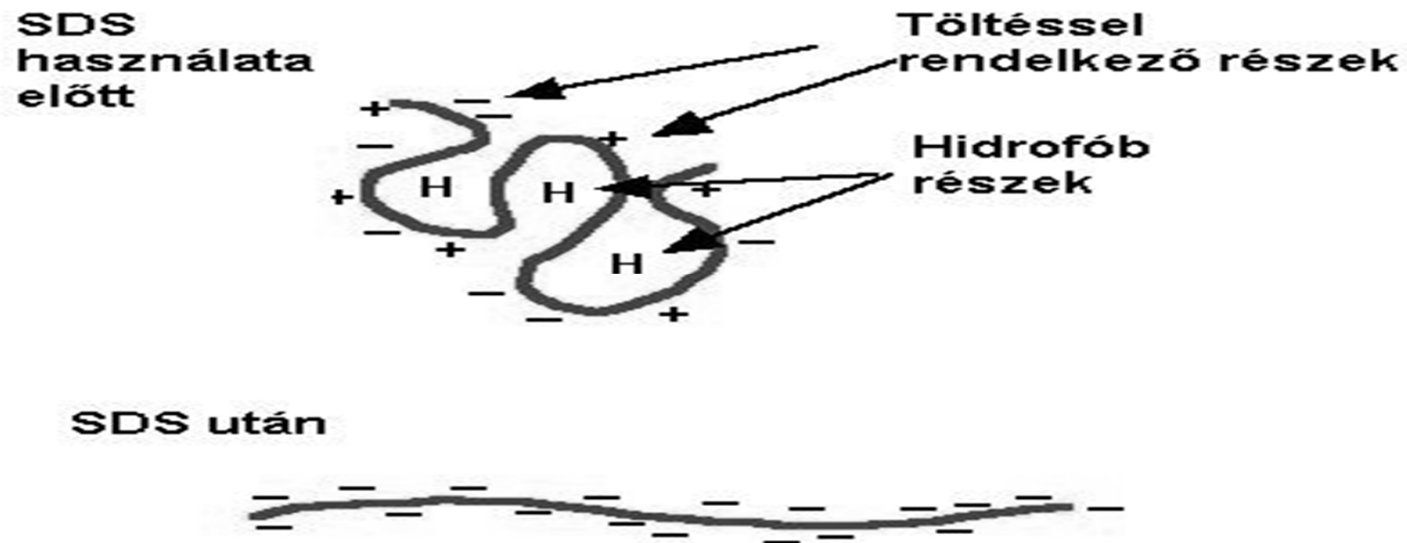
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – SDS hatása a fehérjeszerkezetre



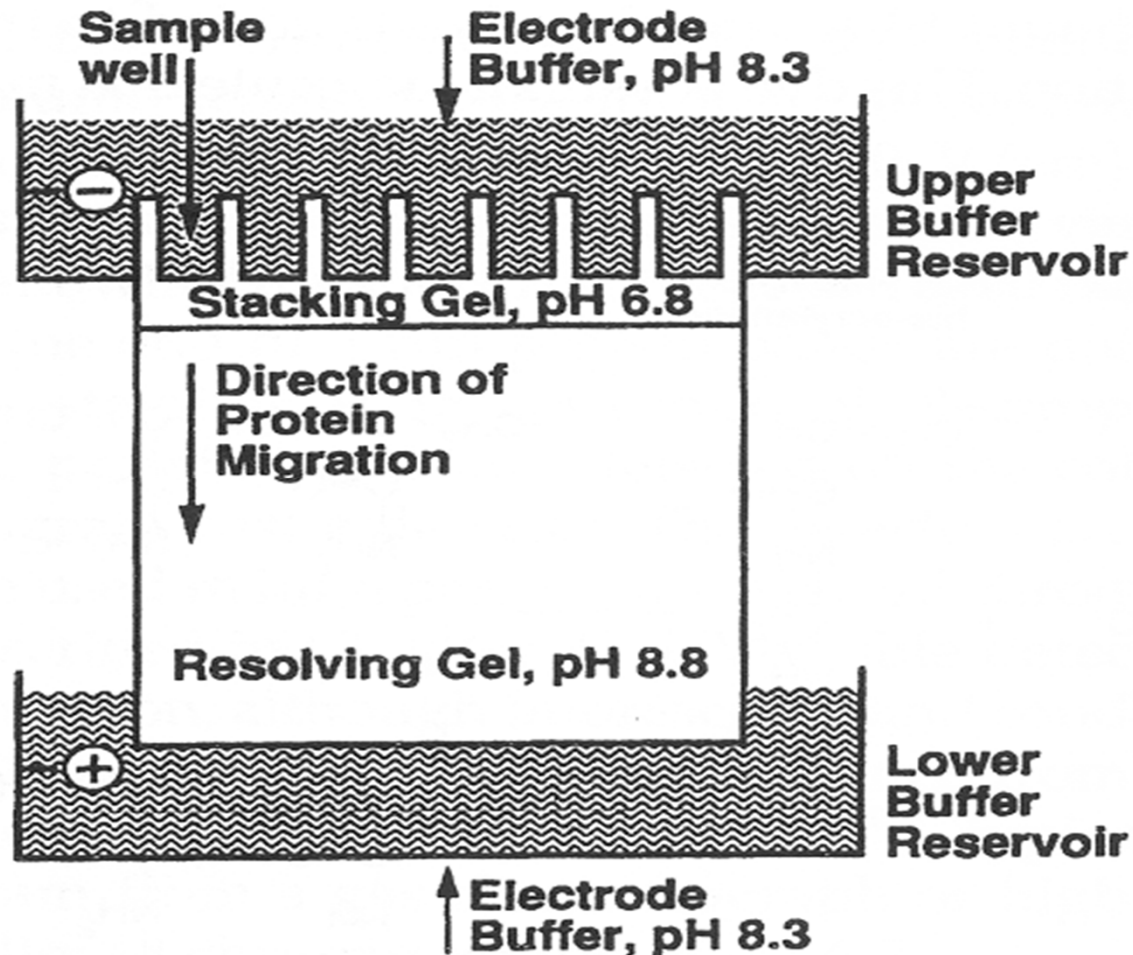
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – SDS hatása a fehérjeszerkezetre



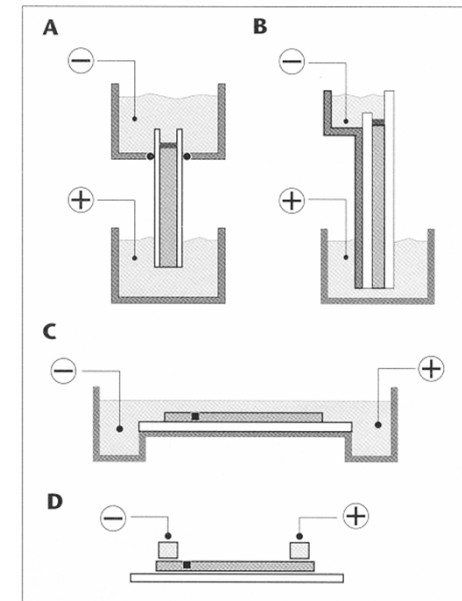
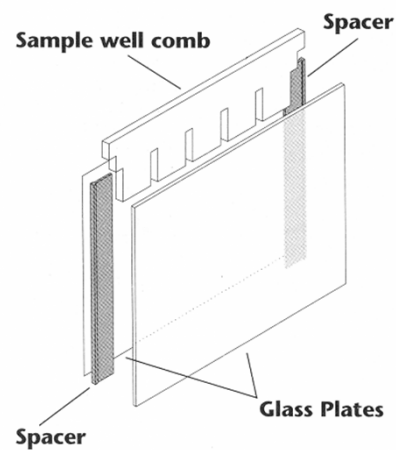
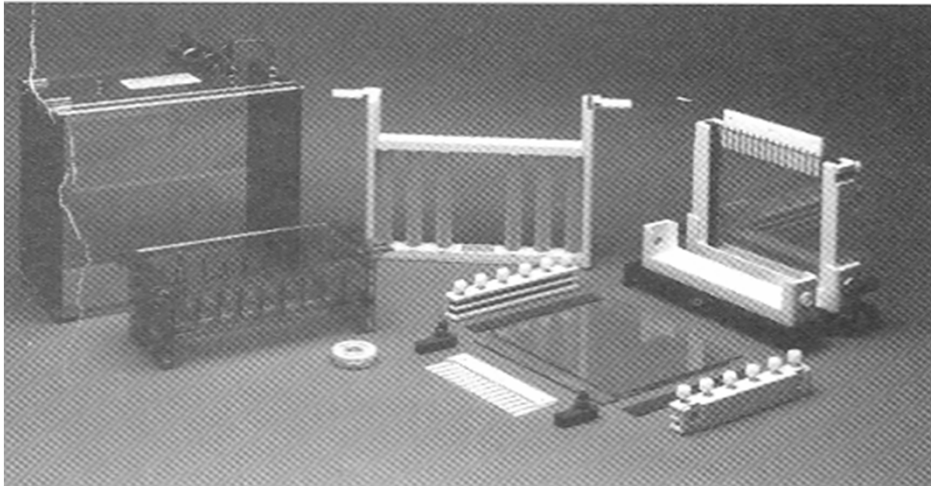
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – működés elve



Elektroforetikus módszerek

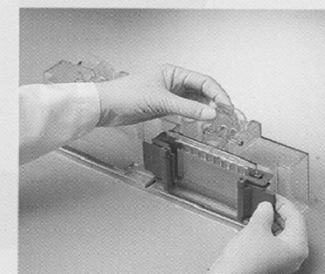
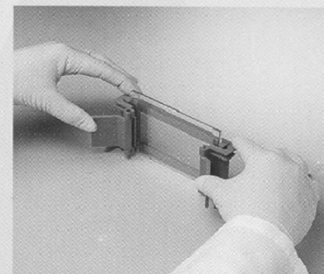
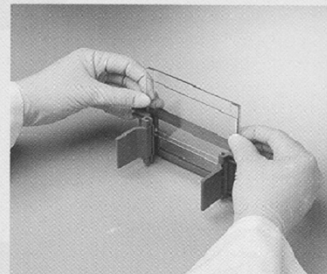
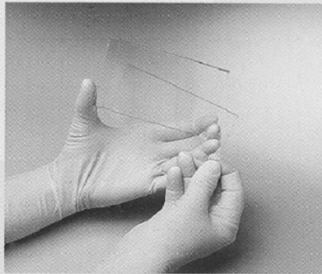
1. Natív és SDS gélelektroforézis – készülékfelépítés



Elektroforetikus módszerek

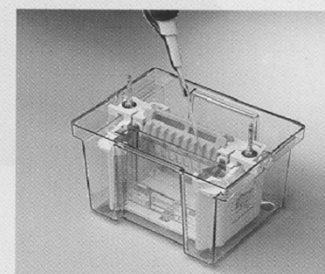
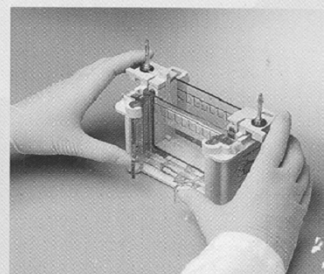
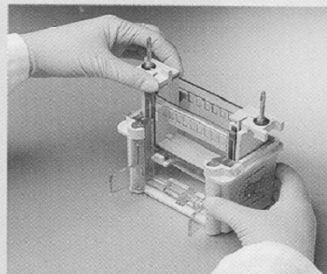
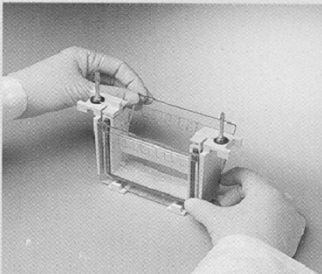
1. Natív és SDS gélelektroforézis – a módszer kivitelezése

Hand casting is simplified.



Permanently bonded spacers guarantee perfect alignment and leak-free casting. For proper alignment, simply assemble the casting frame and glass plates on any flat surface. The spring-loaded lever in the casting stand creates a tight seal against the rubber gasket.

Assembly is trouble free.



Place the gel cassettes in the assembly, transfer to clamping frame, use the patented soft-touch cam closures** to secure the gel cassettes against the gaskets, and you're ready to run!

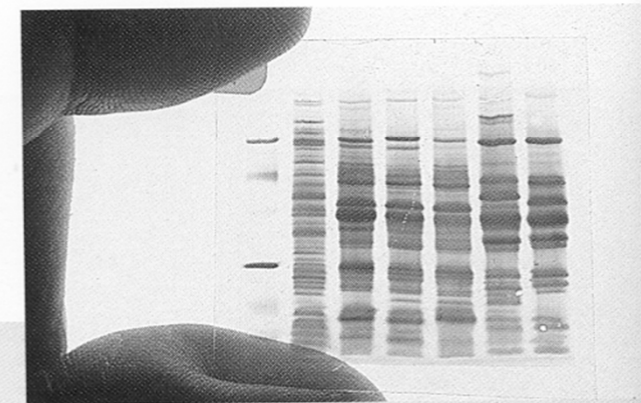
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – automatizálás lehetősége



Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – automatizálás lehetősége



Plastic embedded membrane

Elektroforetikus módszerek

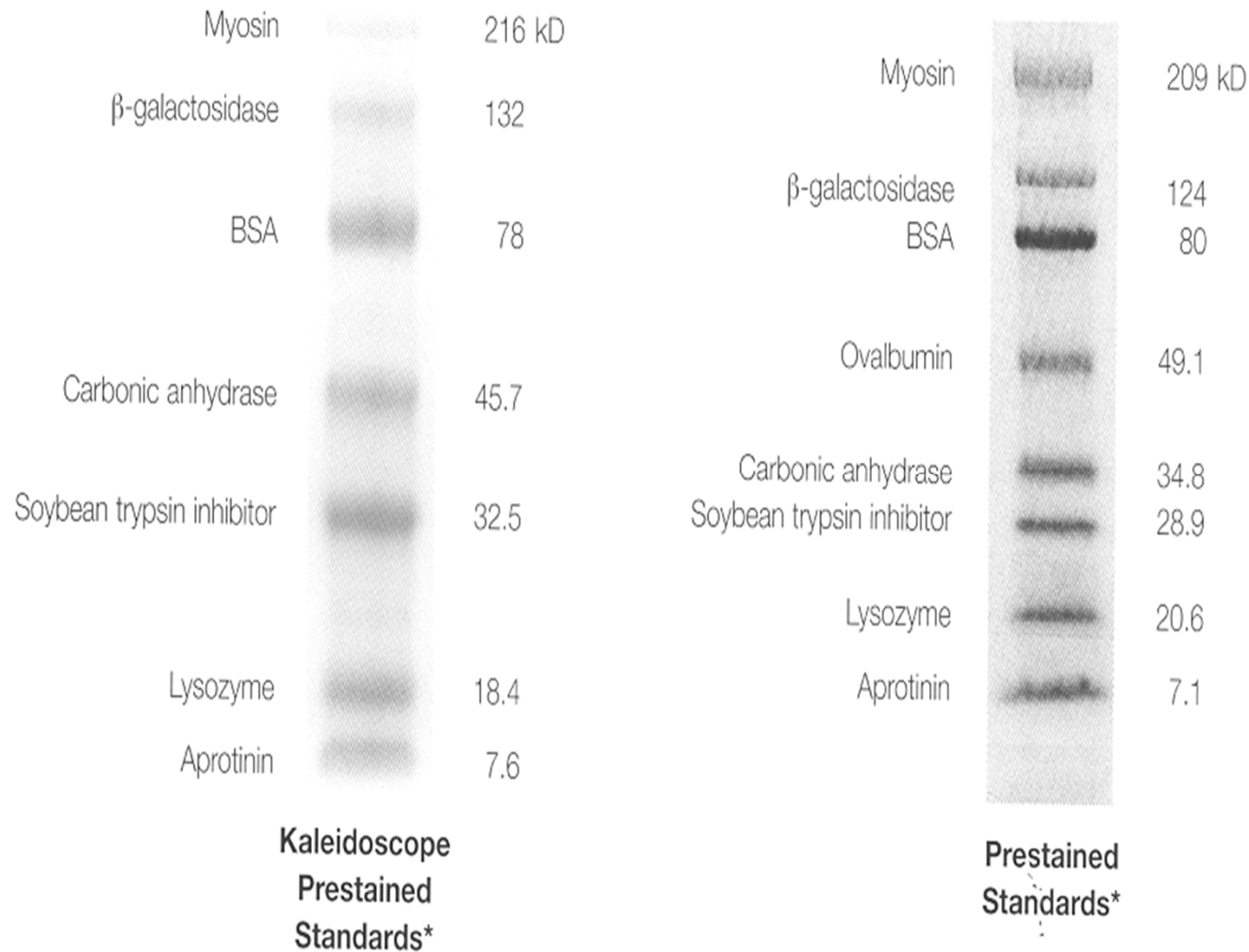
1. Natív és SDS gélelektroforézis – molekulastandardok

Table 1. Protein standards with approximate molecular weights (Sigma Chemical Co.)

α -Lactalbumin, bovine milk	14,200
Trypsin inhibitor, soybean	20,000
Trypsinogen, bovine pancreas	24,000
Carbonic anhydrase	29,000
Glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase	36,000
Albumin, egg	45,000
Albumin, bovine	66,000
Phosphorylase b, rabbit muscle	97,400
β -Galactosidase, <i>E. coli</i>	116,000
Myosin, rabbit muscle	205,000

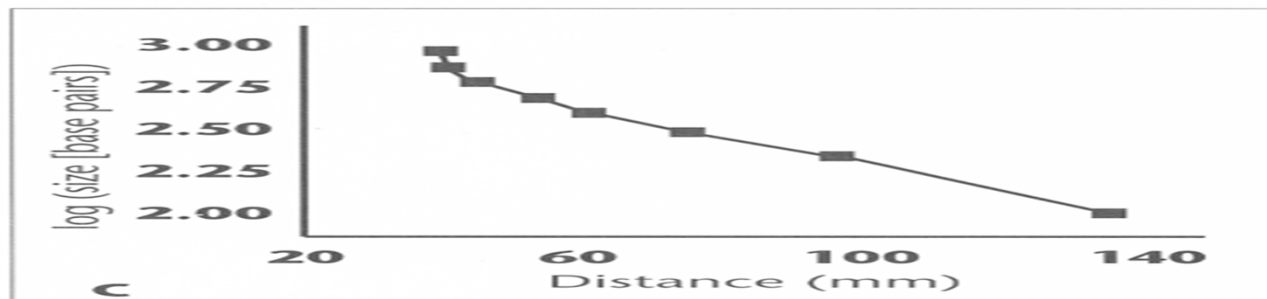
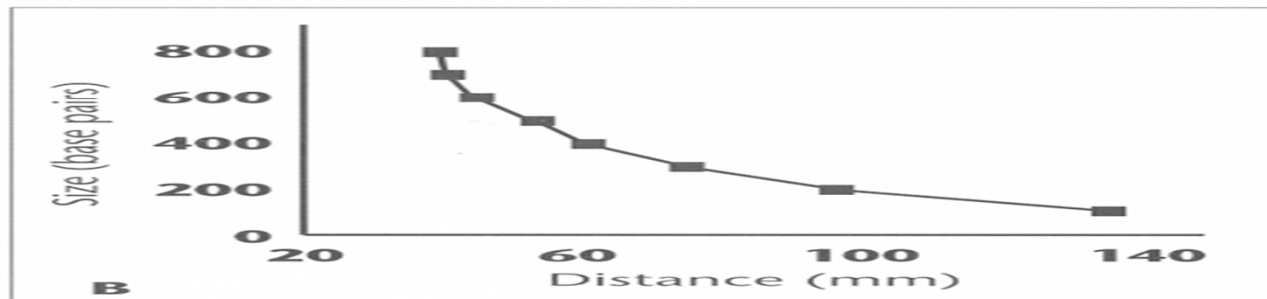
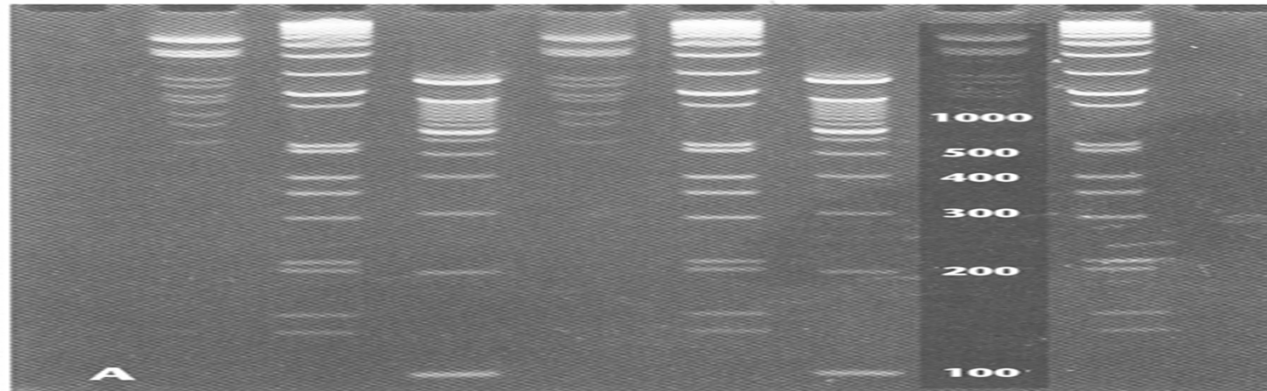
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – molekulastandardok



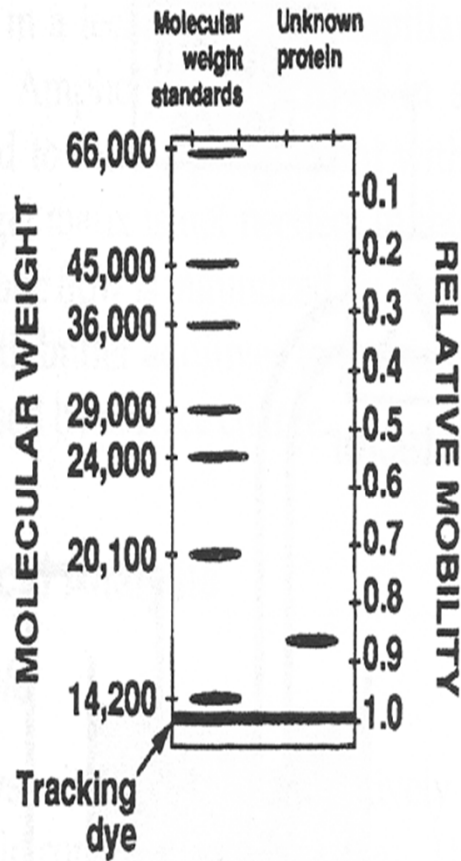
Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – értékelés

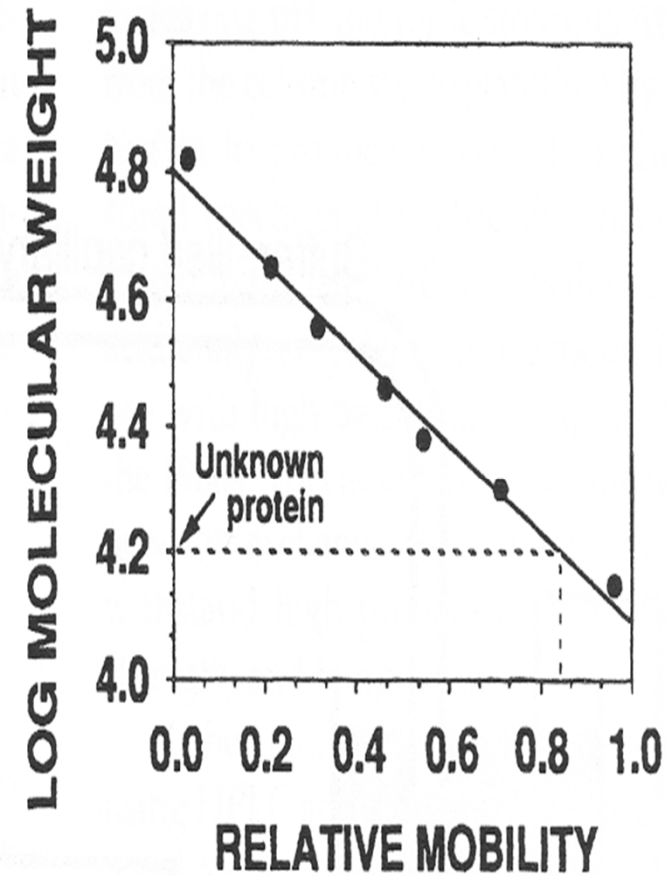


Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – mobilitás



(A)



(B)

Elektroforetikus módszerek

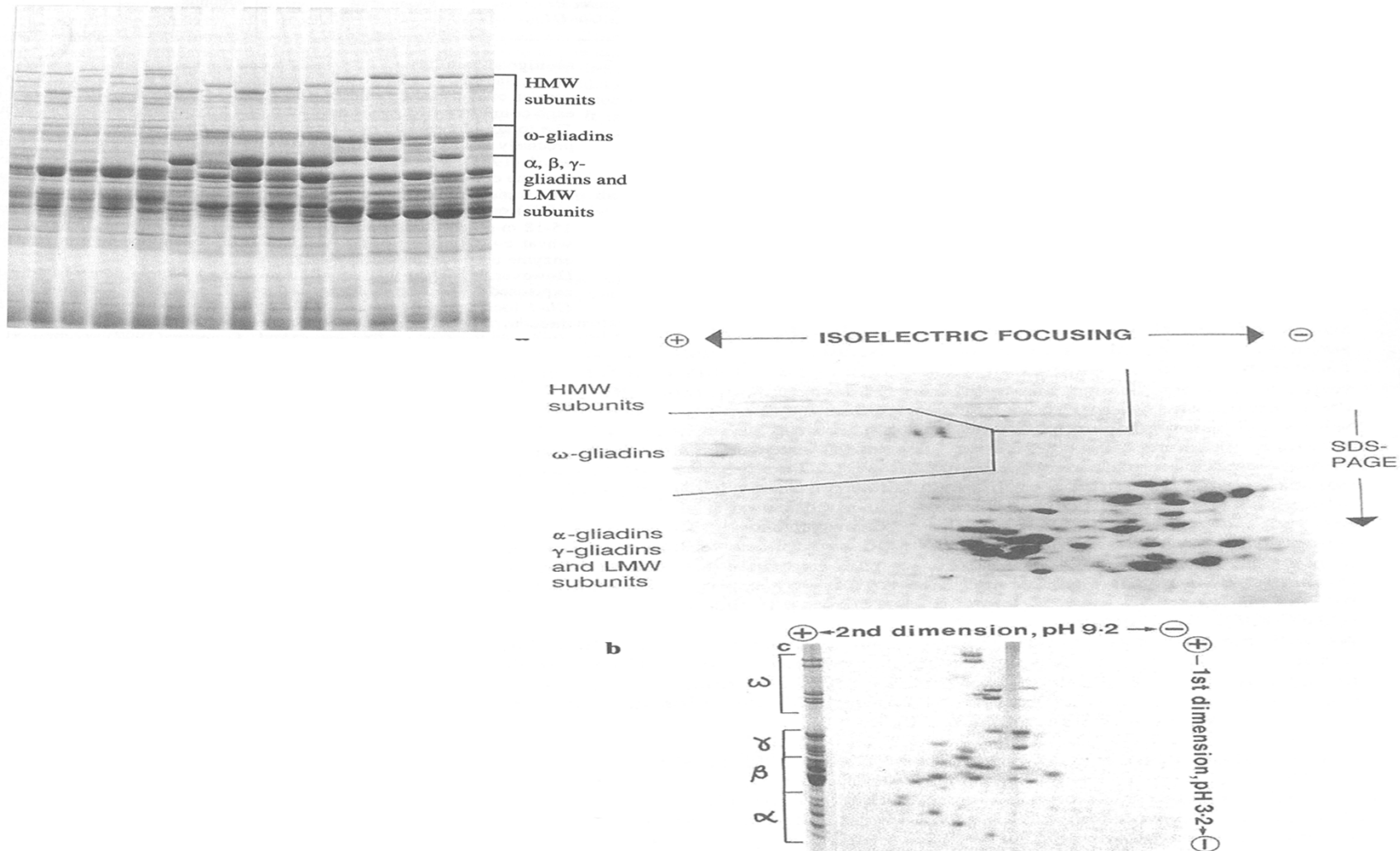
1. Natív és SDS gélelektroforézis – értékelés

Table 7. Protein standards with approximate molecular weights (Sigma Chemical Co.)

Standard	Size	Log Size	Migration Distance	Relative Mobility	Migration Distance, unknown	Relative Mobility, unknown	Estimated Size, unknown
α -Lactalbumin, bovine milk	14,200	4.1523					
Trypsin inhibitor, soybean	20,000	4.3010					
Trypsinogen, bovine pancreas	24,000	4.3802					
Carbonic anhydrase	29,000	4.4624					
Glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase	36,000	4.5563					
Albumin, egg	45,000	4.6532					
Albumin, bovine	66,000	4.8195					
Phosphorylase b, rabbit muscle	97,400	4.9886					
β -Galactosidase, <i>E. coli</i>	116,000	5.0645					
Myosin, rabbit muscle	205,000	5.3118					

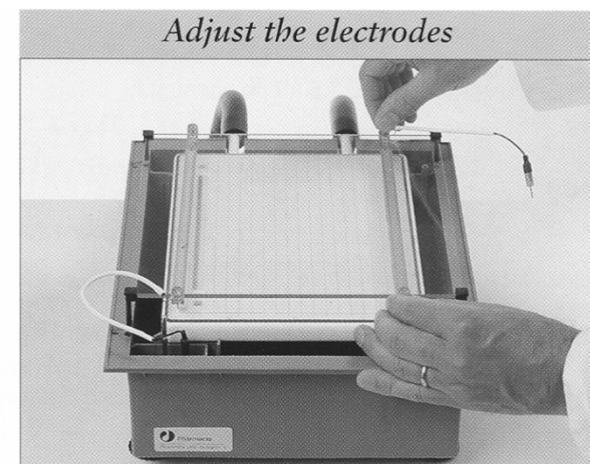
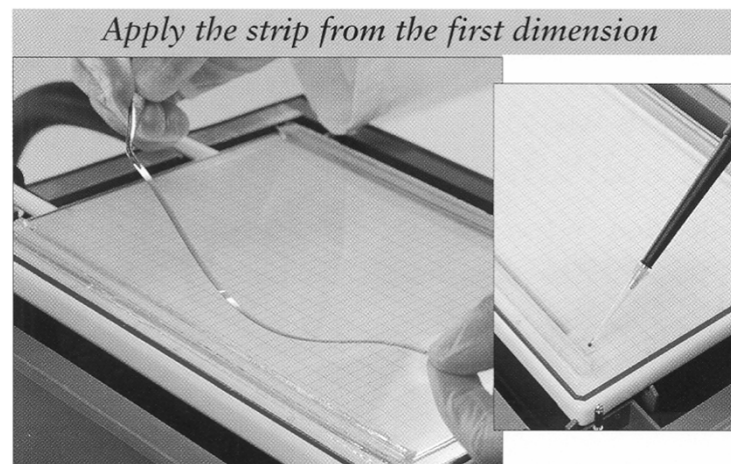
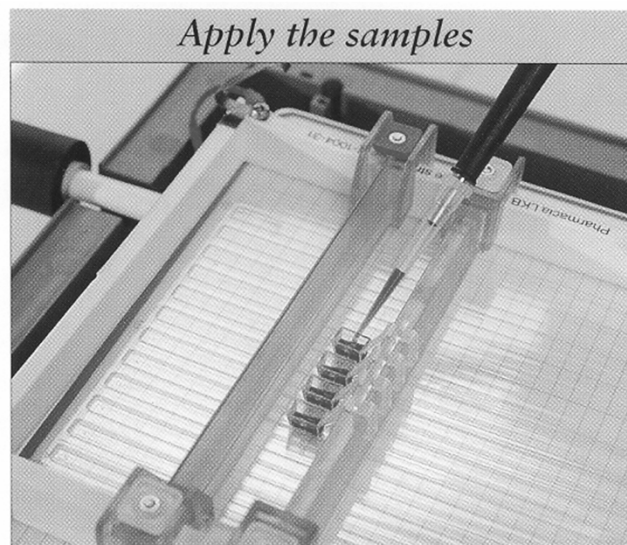
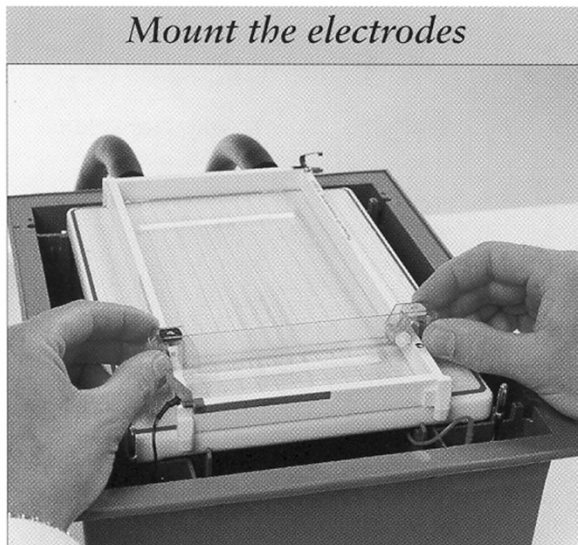
Elektroforetikus módszerek

2. Egyéb módszerek – Izoelektromos fókuszálás



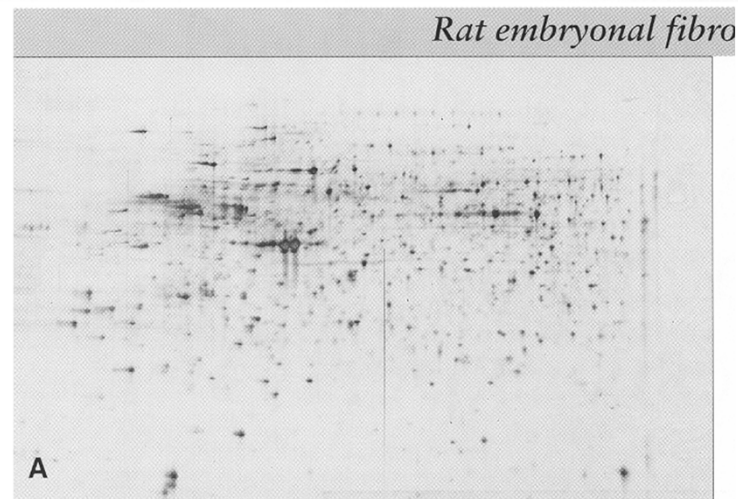
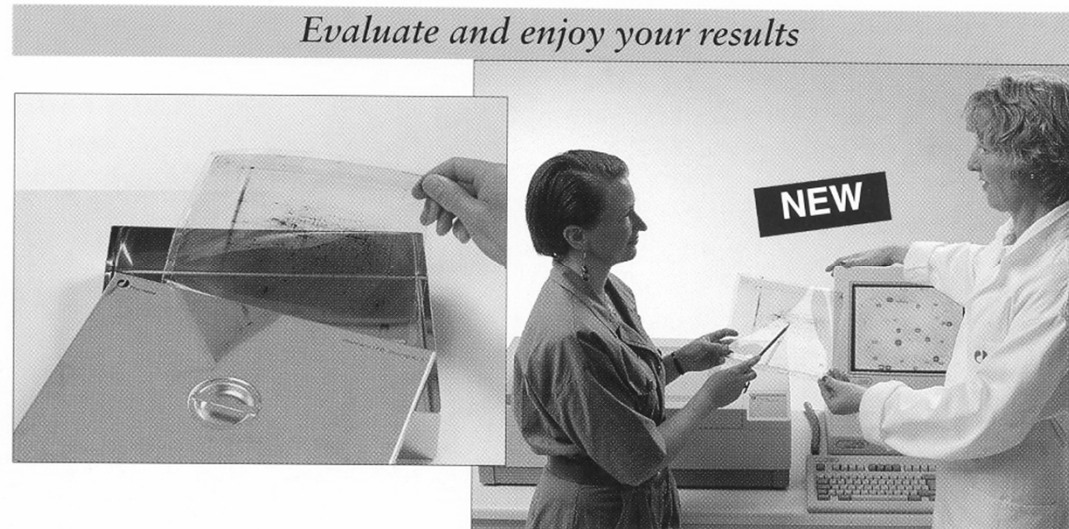
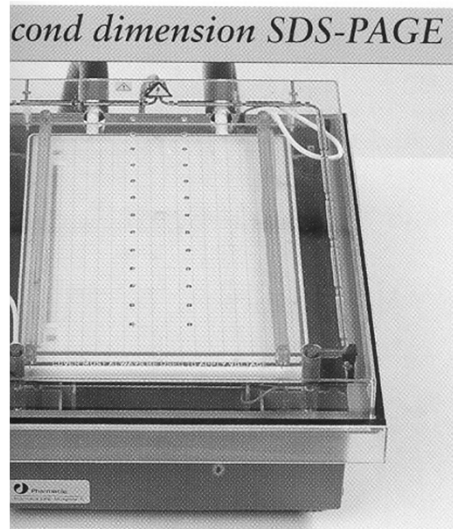
Elektroforetikus módszerek

2. Egyéb módszerek – 2D technika



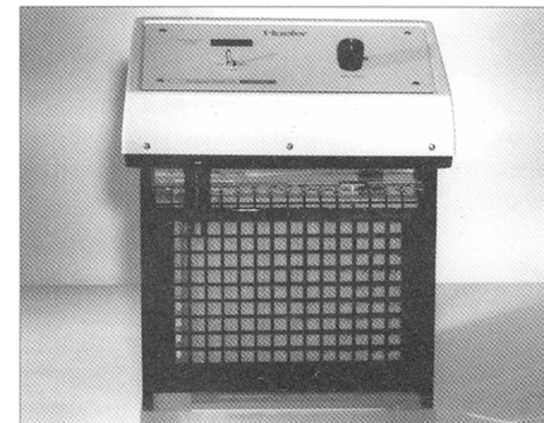
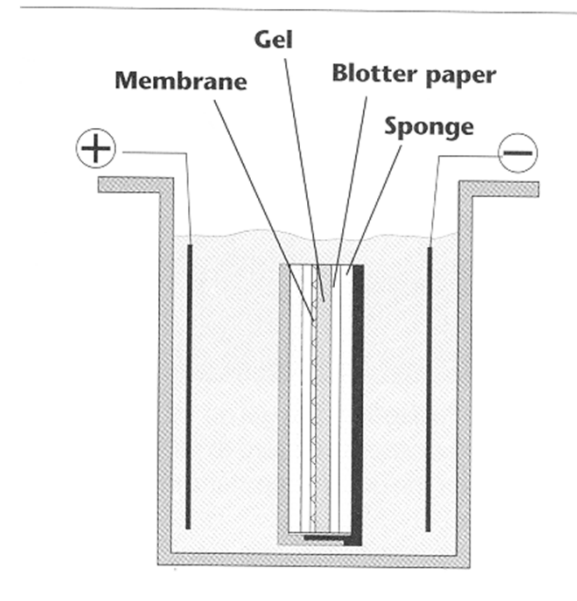
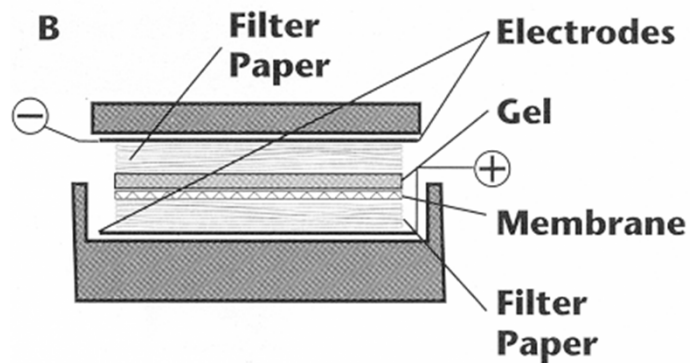
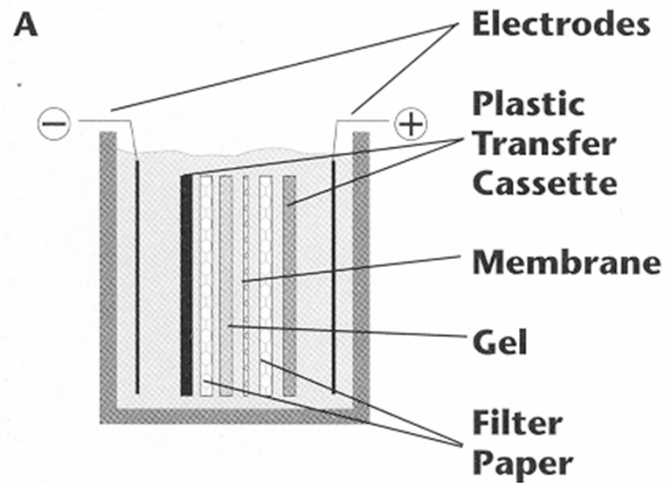
Elektroforetikus módszerek

2. Egyéb módszerek – 2D technika



Elektroforetikus módszerek

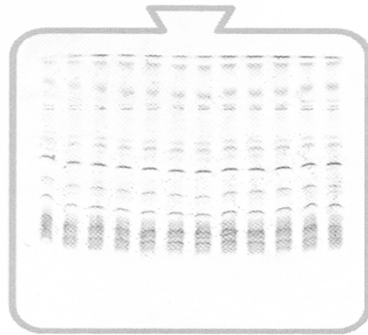
2. Egyéb módszerek – Westernblott



Elektroforetikus módszerek

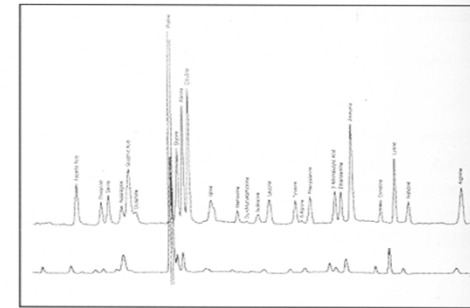
3. Alkalmazási példák

Analysis of potato species



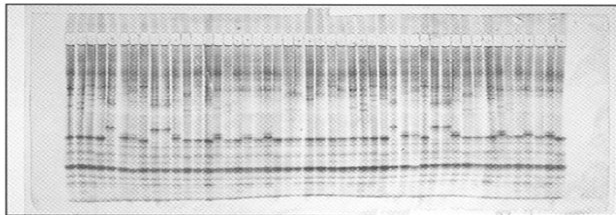
*PhastSystem, PhastGel Dry IEF pH 3.0-9.0.
 Courtesy of Dr. R. Agneessens, Station de Haute, Belgium.*

Amino acid analysis of orange juice



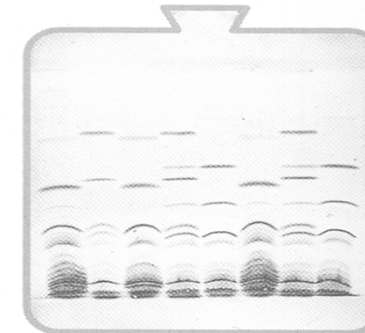
AlphaPlus II System, 15µl sample.

Analysis of hordeins in barley cultivars



Multiphor System, CleanGel™ acid native pH 5.5 with urea and non-ionic detergent. Courtesy of Pharmacia Eurolab, Freiburg, Germany.

Detection of bovine milk in cheese from other species

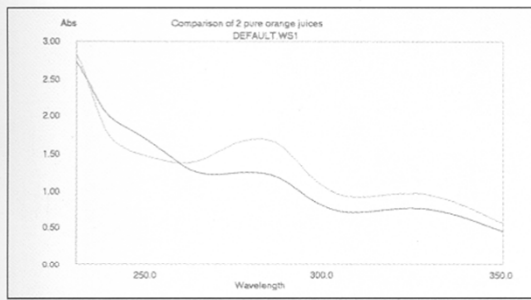


PhastSystem, PhastGel Dry IEF, pH 5.0-8.0 with urea. Methodology courtesy of L. Moio, L. Chianese, F. Addeo, Universit à di Napoli, Italy.

Elektroforetikus módszerek

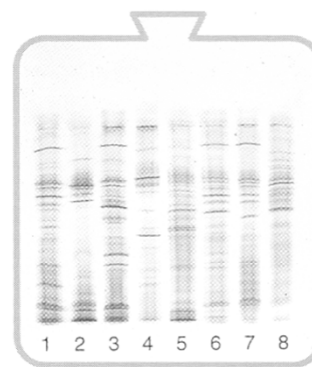
3. Alkalmazási példák

Comparison of two pure orange juices

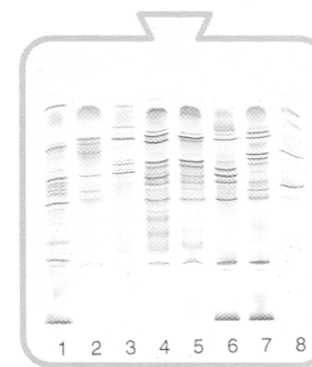


Biochrom 4060 system, 200-800nm @2400nm/min.
 Courtesy of Dr. M. Davies, Cambridge, U.K.

Identification of meat species

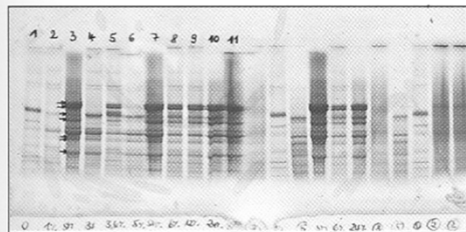


Identification of fish species



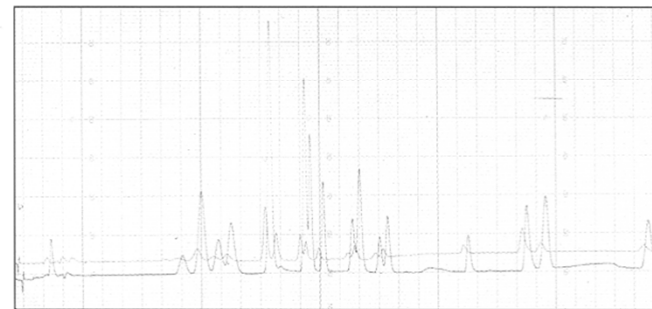
PhastSystem, PhastGel Dry IEF, pH 3.0-9.0. Courtesy of
 Dr. I. Malmheden Yman, National Food Administration, Sweden.

Soya determination in sausages



Multiphor System, ExcelGel SDS 8-18%.
 Courtesy of Dr. E. Feigl, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern, Erlangen, Germany.

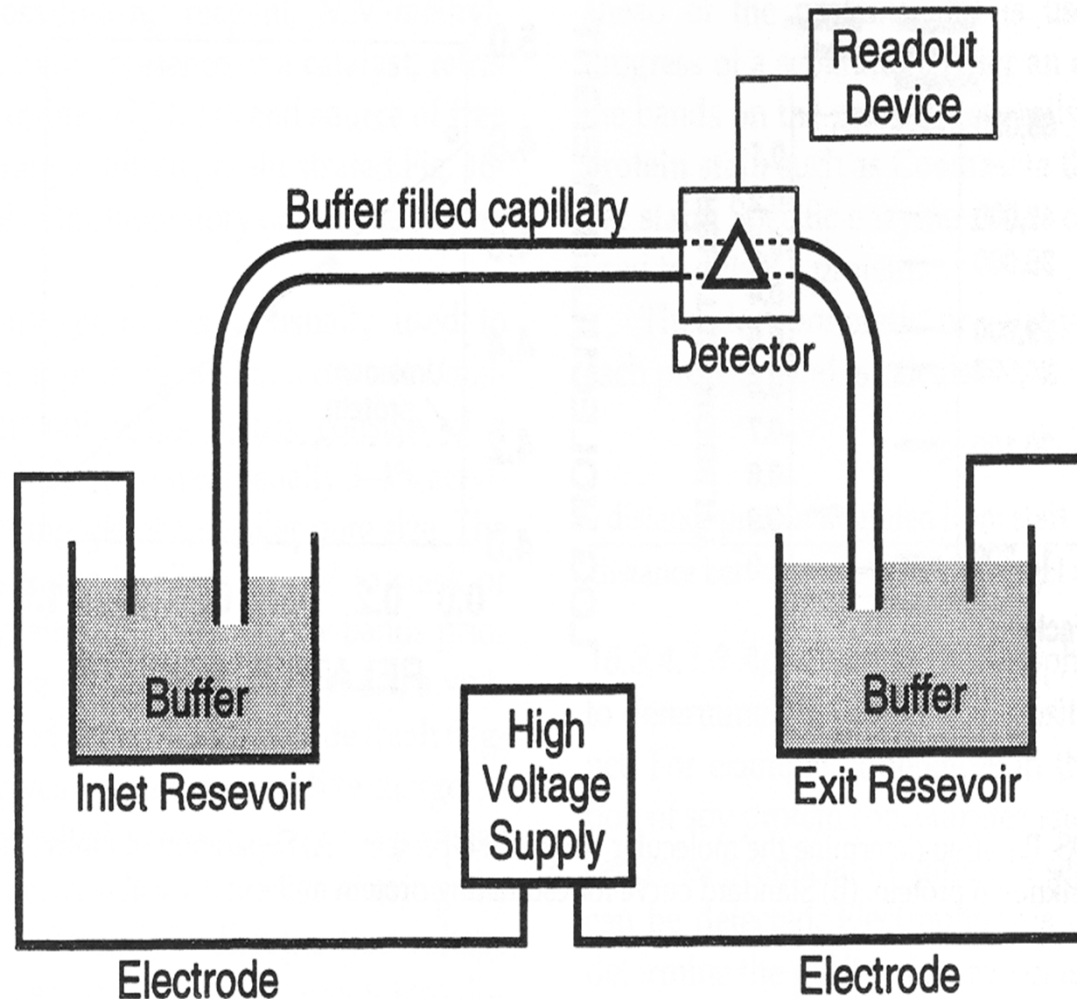
Amino acid analysis of oxidised feedstuffs



AlphaPlus II Na System, E.E.C. method. Courtesy of Dr. Anni Lund, DLG, Århus, Denmark.

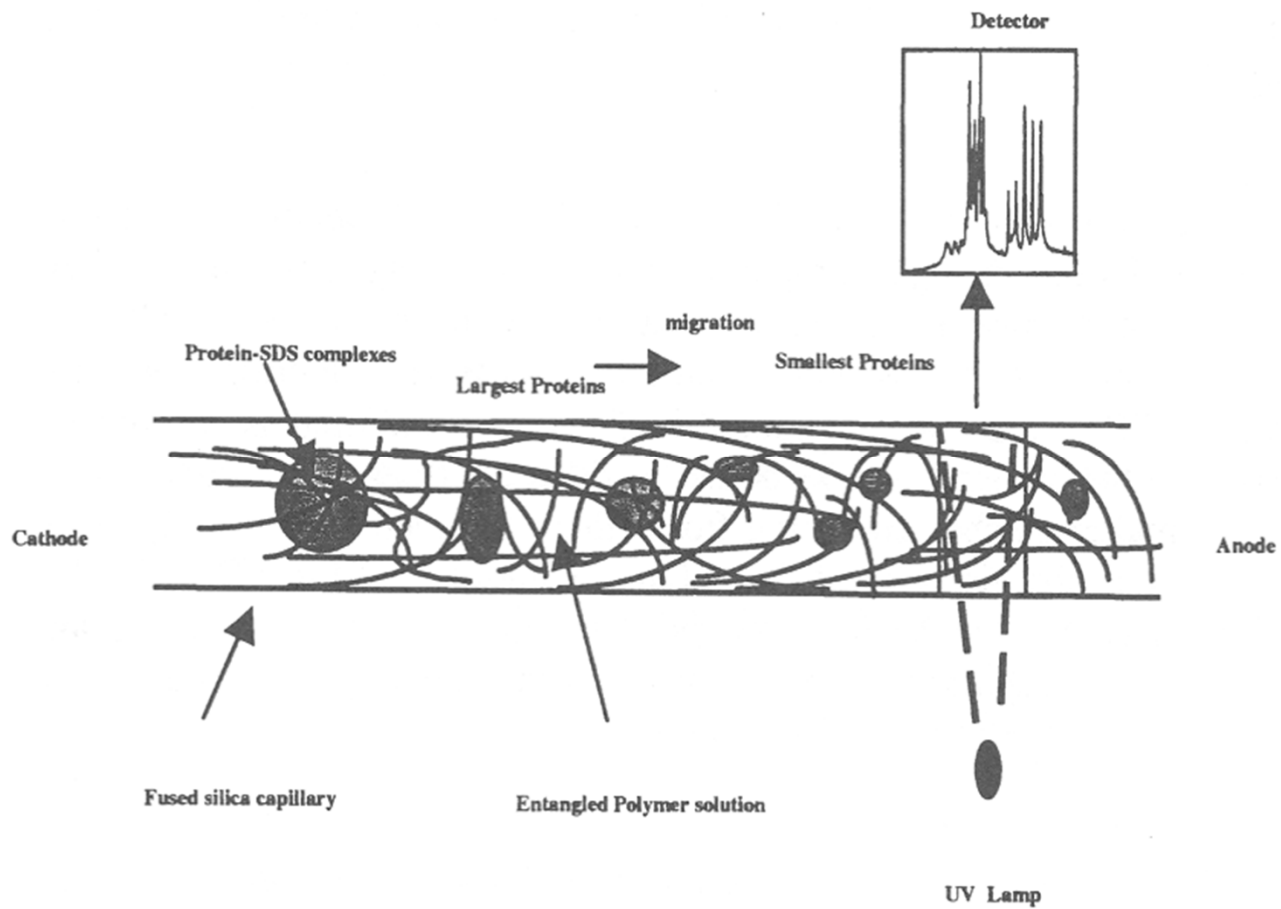
Elektroforetikus módszerek

4. Kapilláris elektroforézis (CE) - Elv



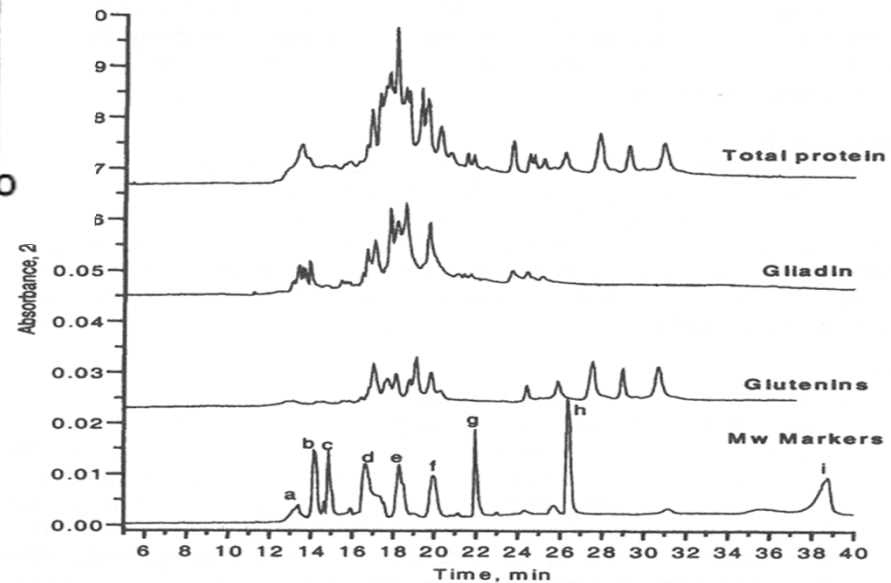
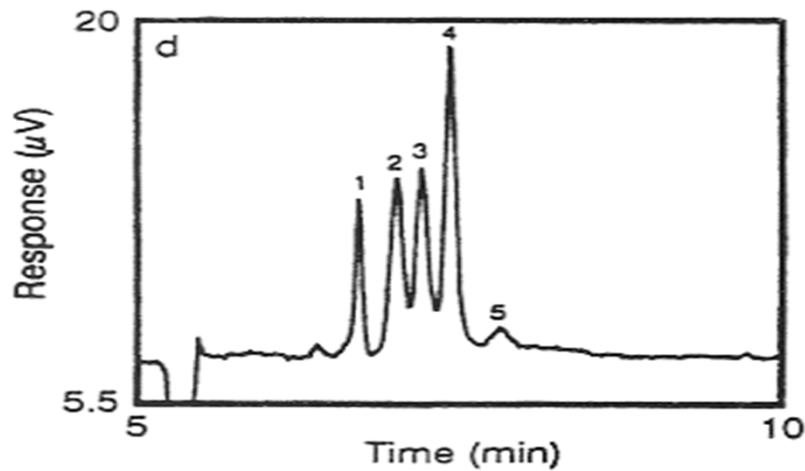
Elektroforetikus módszerek

4. Kapilláris elektroforézis (CE) - elv



Elektroforetikus módszerek

4. Kapilláris elektroforézis (CE) - elv



Búzafehérjék futtatásának eredményei

Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – ELV

- kapilláris elektroforézisből fejlődött ki
- az egyik legmodernebb gyorsvizsgálati módszer

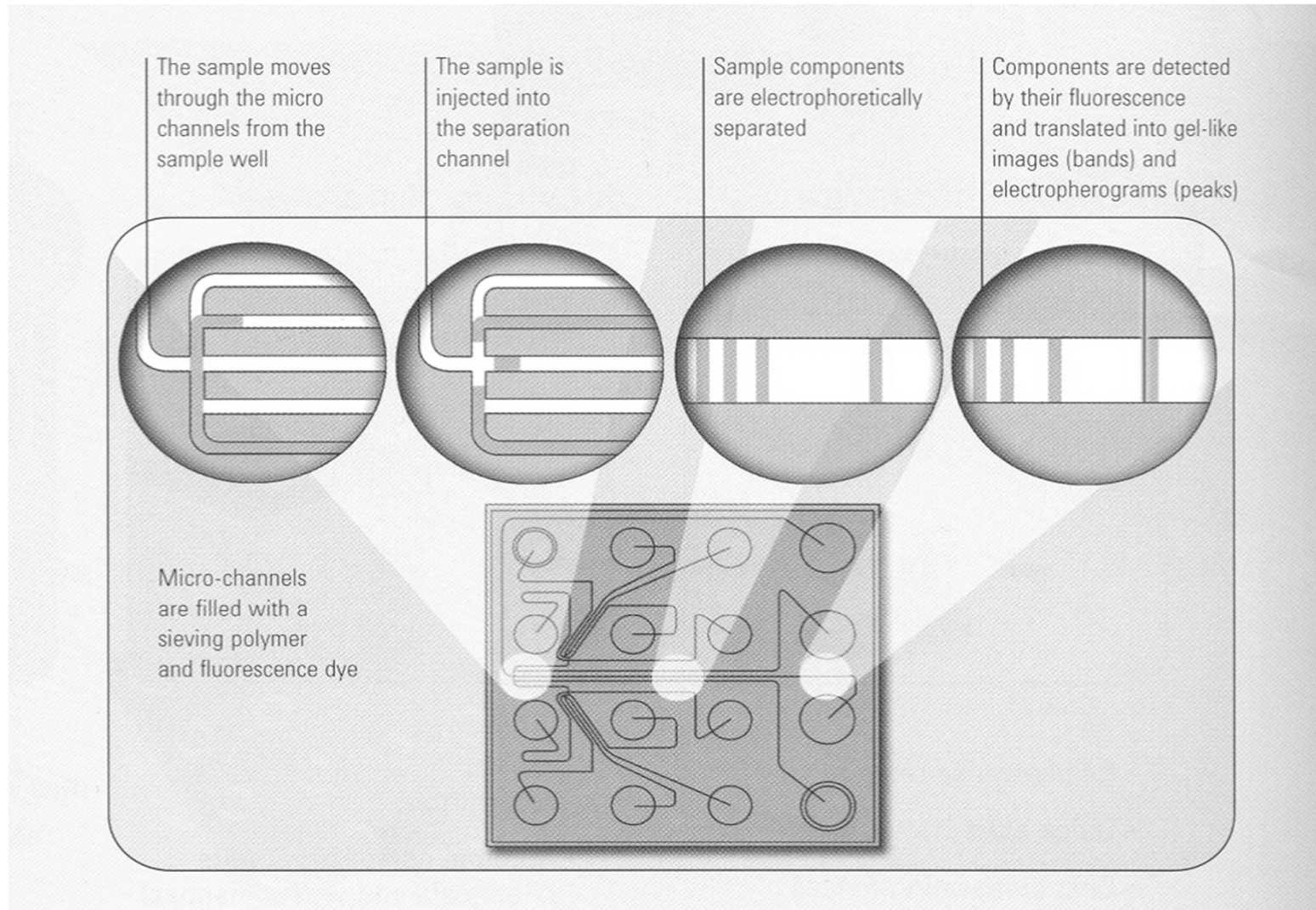
Lab-on-a-chip működése

- 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 fluoreszcens detektorral történik



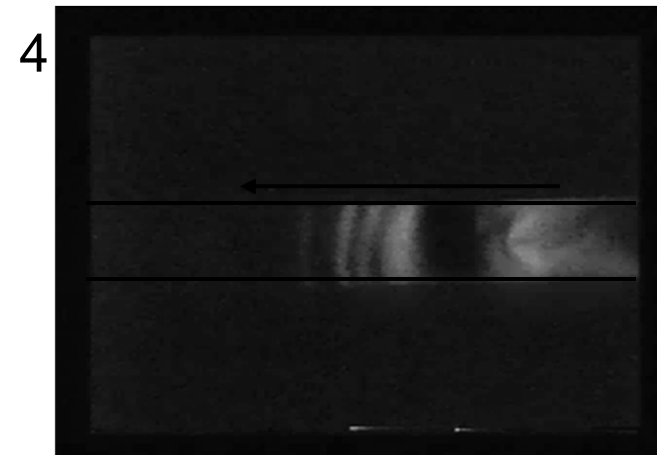
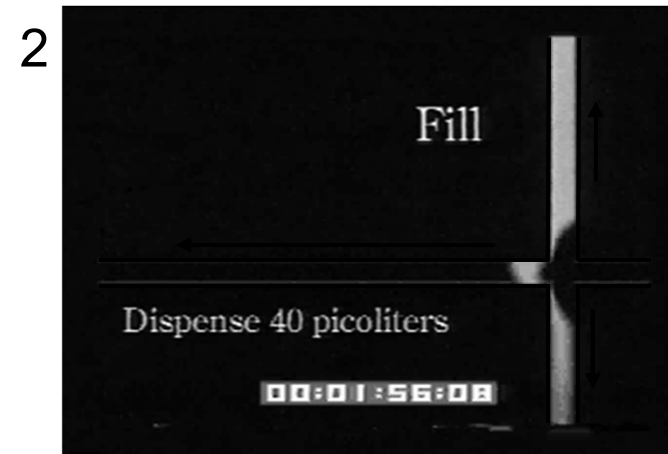
Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – ELV



Elektroforetikus módszerek

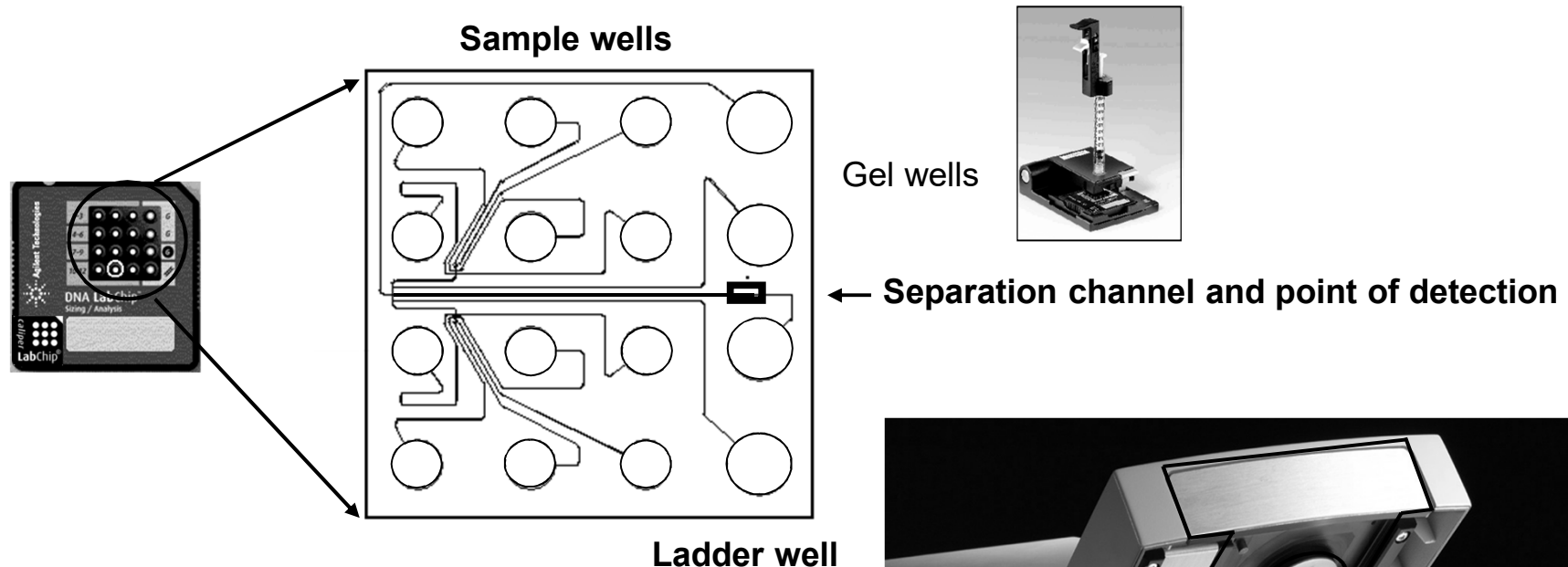
3. Lab-on-a-chip technológia – ELV



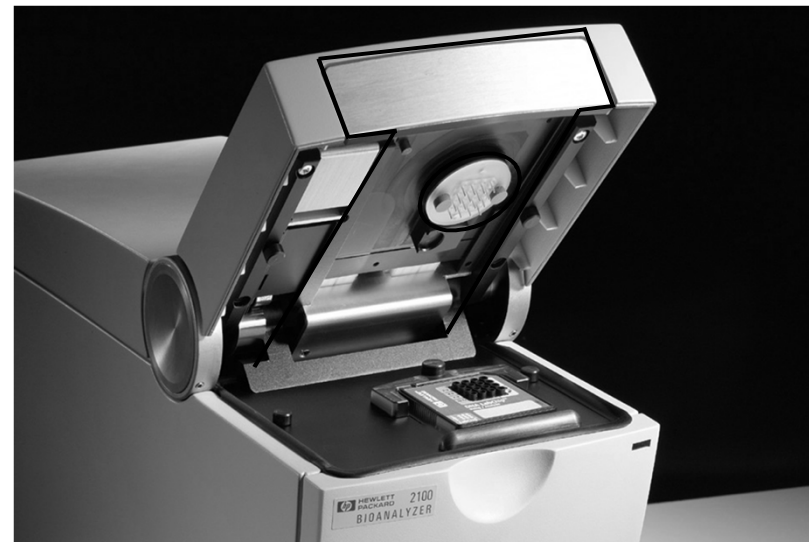
← Direction of electrodriven movement of liquids and molecules within liquids

Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – chipszerkezet, készülékfelépítés



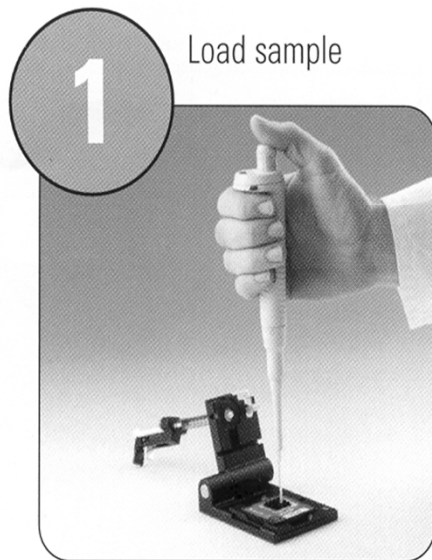
- Chip accommodates sample wells, gel wells and a well for a standard (ladder)
- 16 pin-electrodes in the electrode cartridge (standard equipment) are arranged such that they fit in the wells on the chip



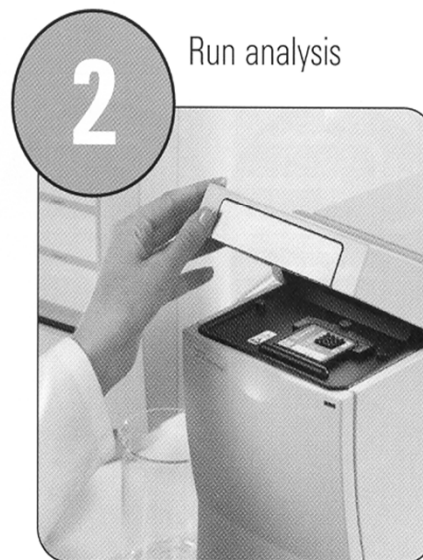
Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – mérés végrehajtása

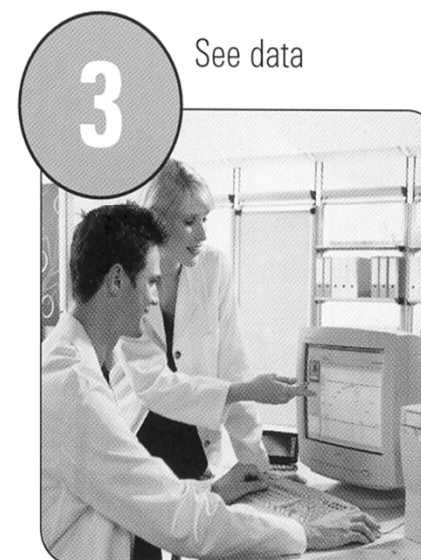
Fast and easy operation



- Ready-to-use reagent kits
- Quick-start instructions
- Chip preparation in less than five minutes
- Sample volumes in the μ l-range



- Start analysis at the press of a button
- Minimal use of hazardous chemicals and waste disposal



- Predefined protocols
- Automated data analysis

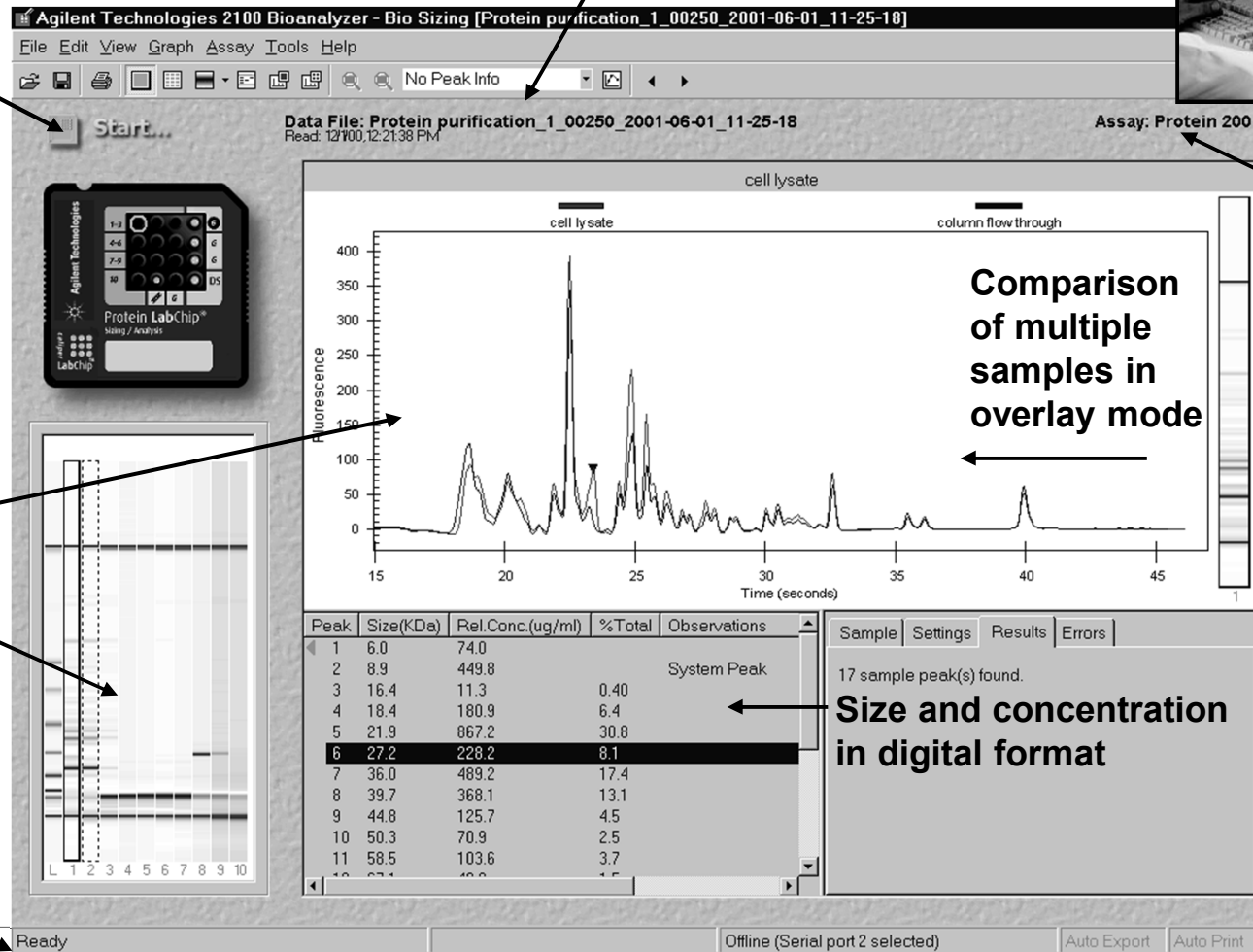
Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – eredmények értékelése



Press
START

File information



Assay
information

Status
information

Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – alkalmazási területek

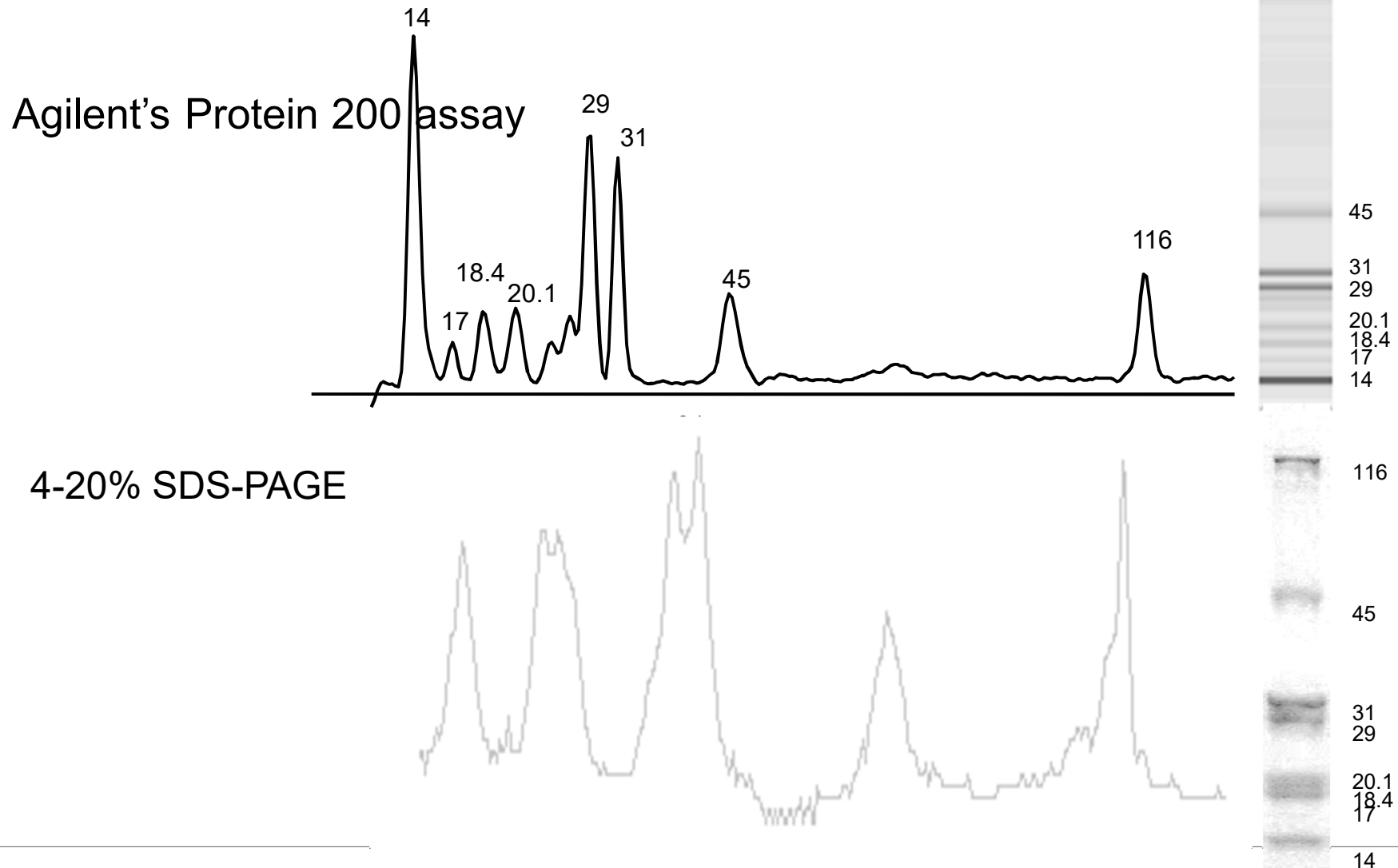
- a módszert jelenleg nukleinsavak (DNS, RNS) és fehérje kapilláris elektroforézises vizsgálatára használják
- orvosbiológiai kutatások
- robbanóanyagok azonosítása
- környezeti és szennyvizek szennyezésének nyomkövetése
- mezőgazdasági vagy kertészeti vizek tápanyag ellenőrzése
- élelmiszerek termelésének minőségi ellenőrzése

Különböző minták analízisére a specifikus alkalmazhatóságot kitek biztosítják.



Elektroforetikus módszerek

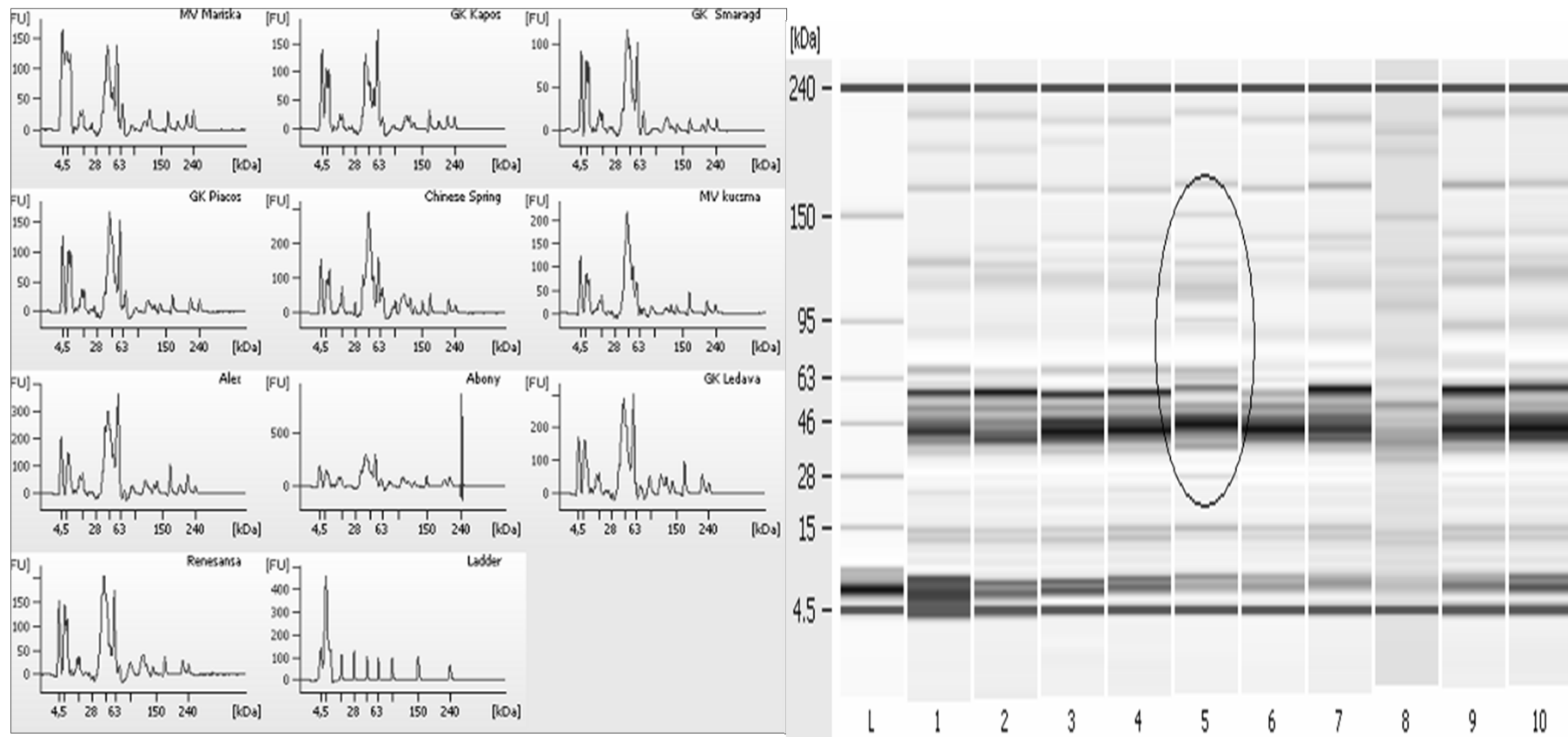
3. Lab-on-a-chip technológia – néhány alkalmazási példa



Elektroforetikus módszerek

3. Lab-on-a-chip technológia – néhány alkalmazási példa

Búzafehérjék vizsgálata, fajtaazonosítás





Makromolekulák jellemzése – 2. Kromatográfiás módszerek

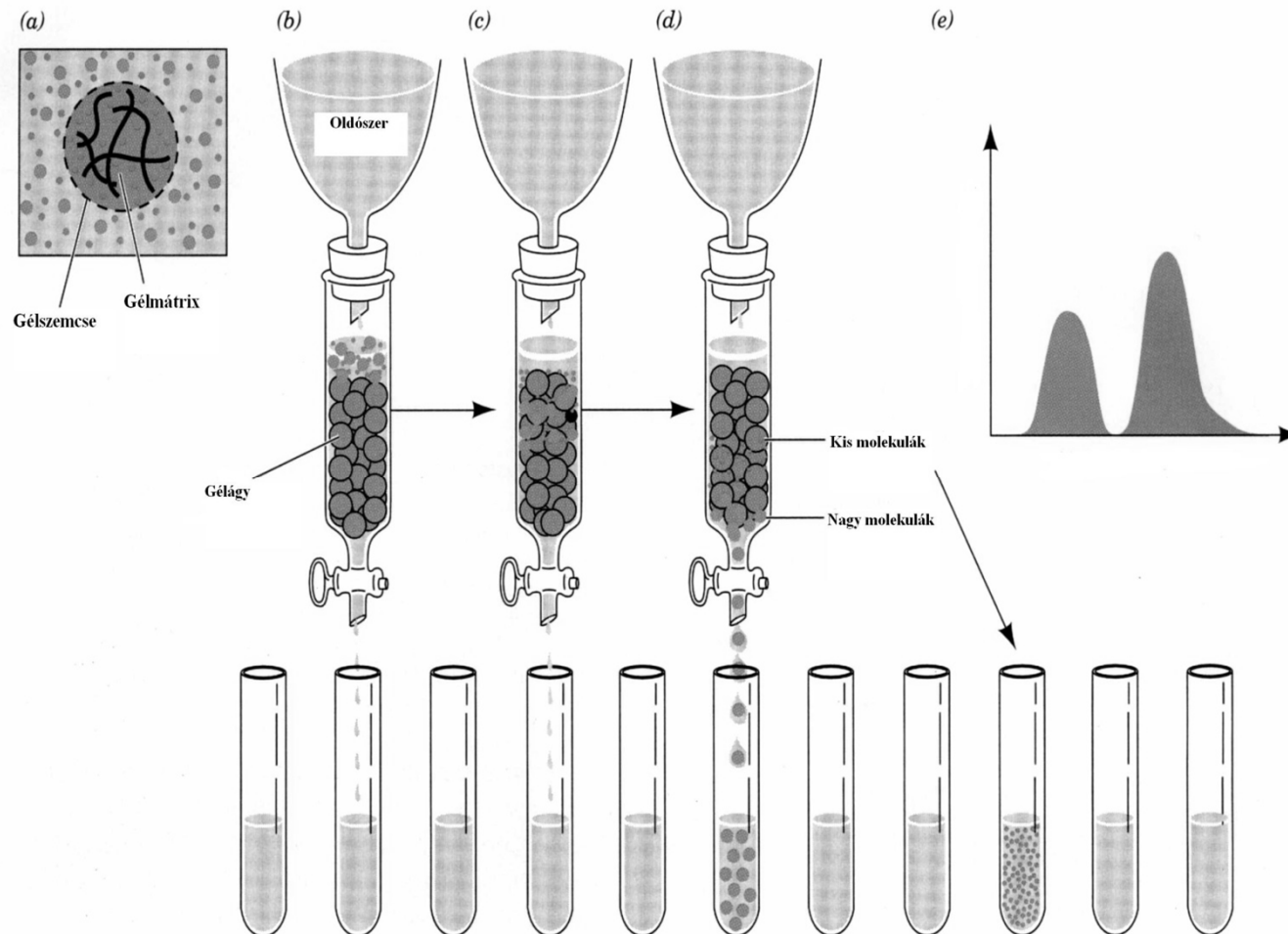
Bioanalitikai módszerek - áttekintés

Elképzelés mára

- Fehérjeprofил jellemzése kromatográfiás módszerekkel
- Bioanalitikai módszerek
- Fehérje alapú bioanalitikai módszerek:
Enzimes és immunanalitika
- Allergomika, Proteomika

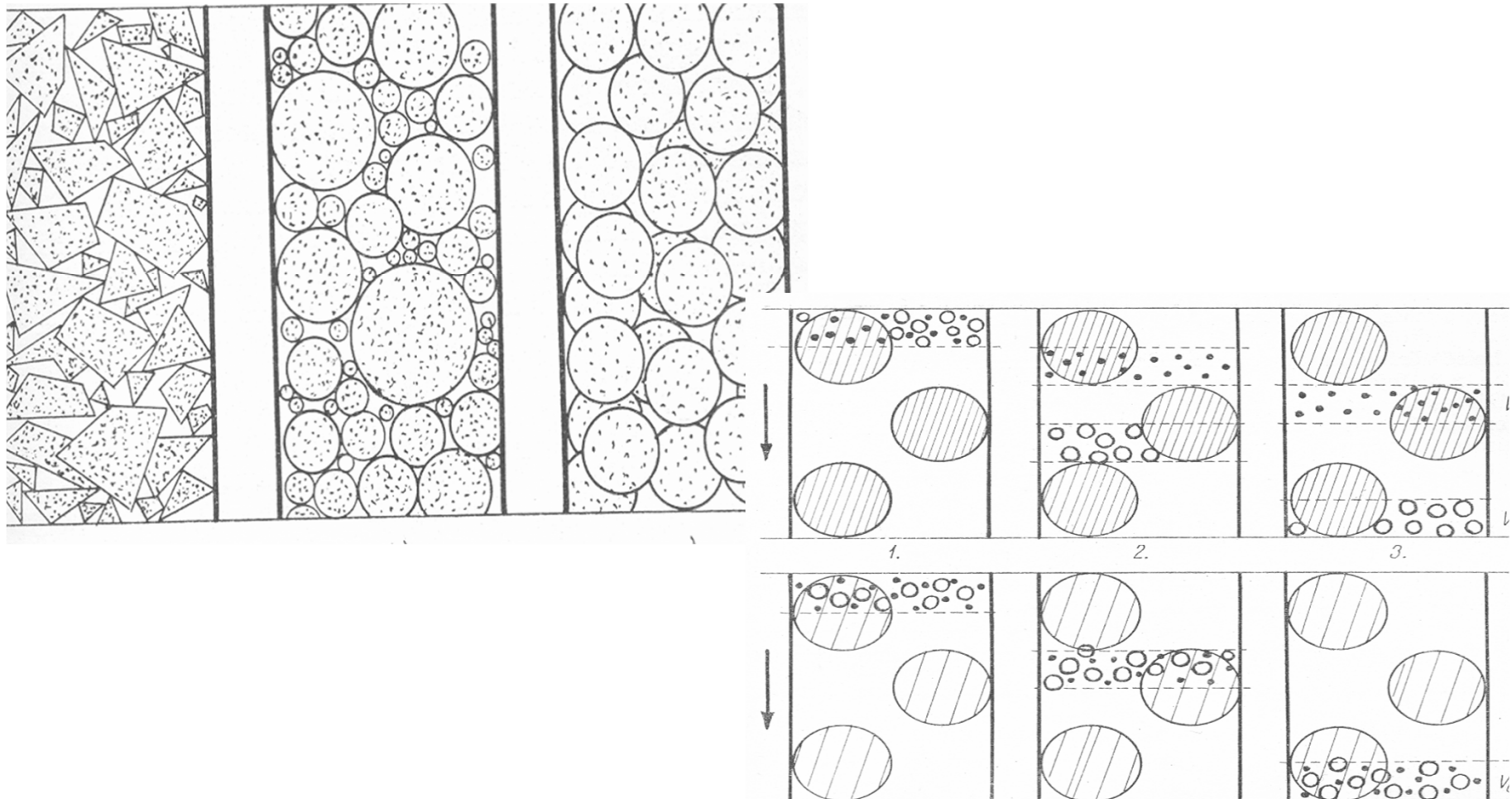
Kromatográfias módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia - ELV:



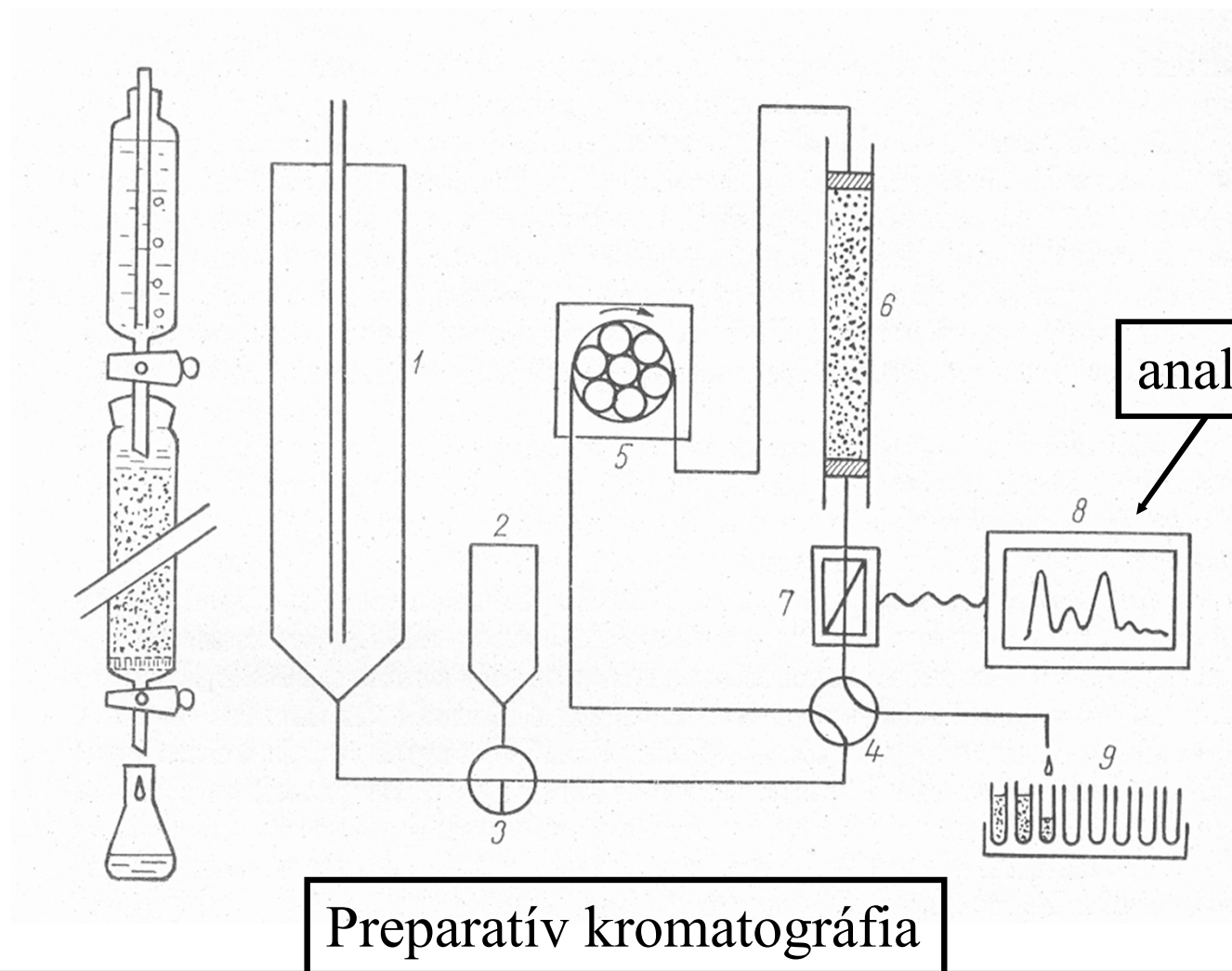
Kromatográfiai módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Töltetek, elválasztás folyamata:



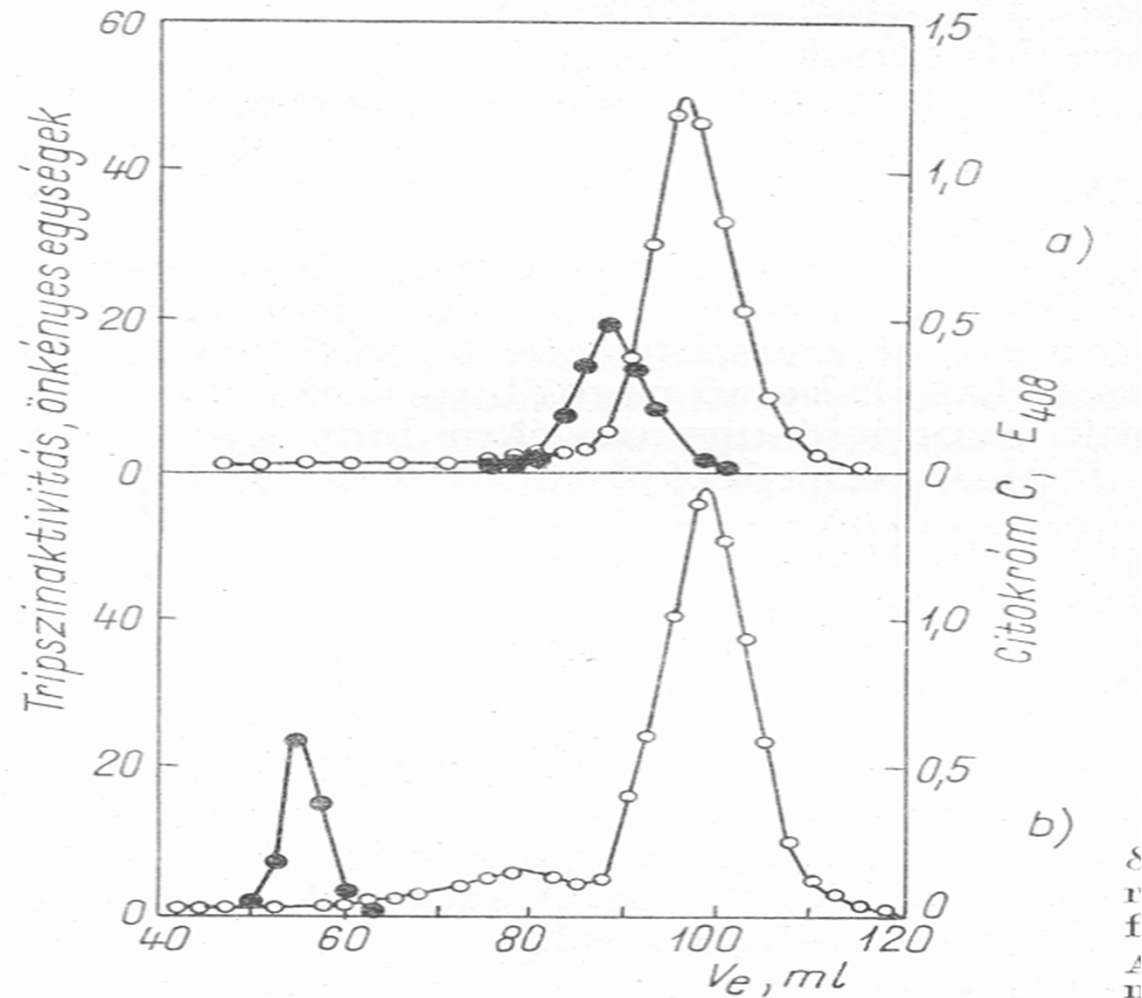
Kromatográfias módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Készülék felépítés – egyszerűsített séma



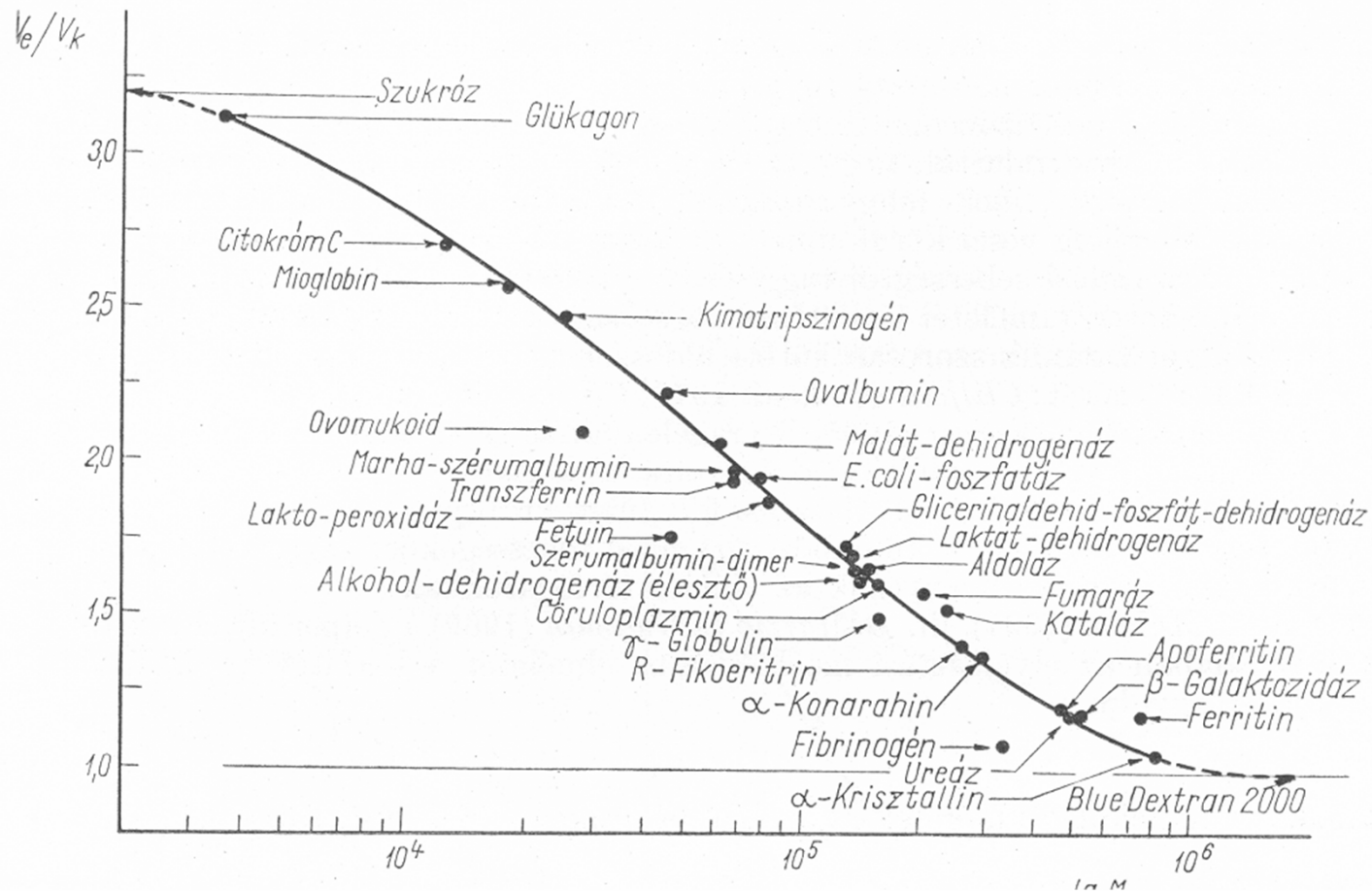
Kromatográfias módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Kromatogram



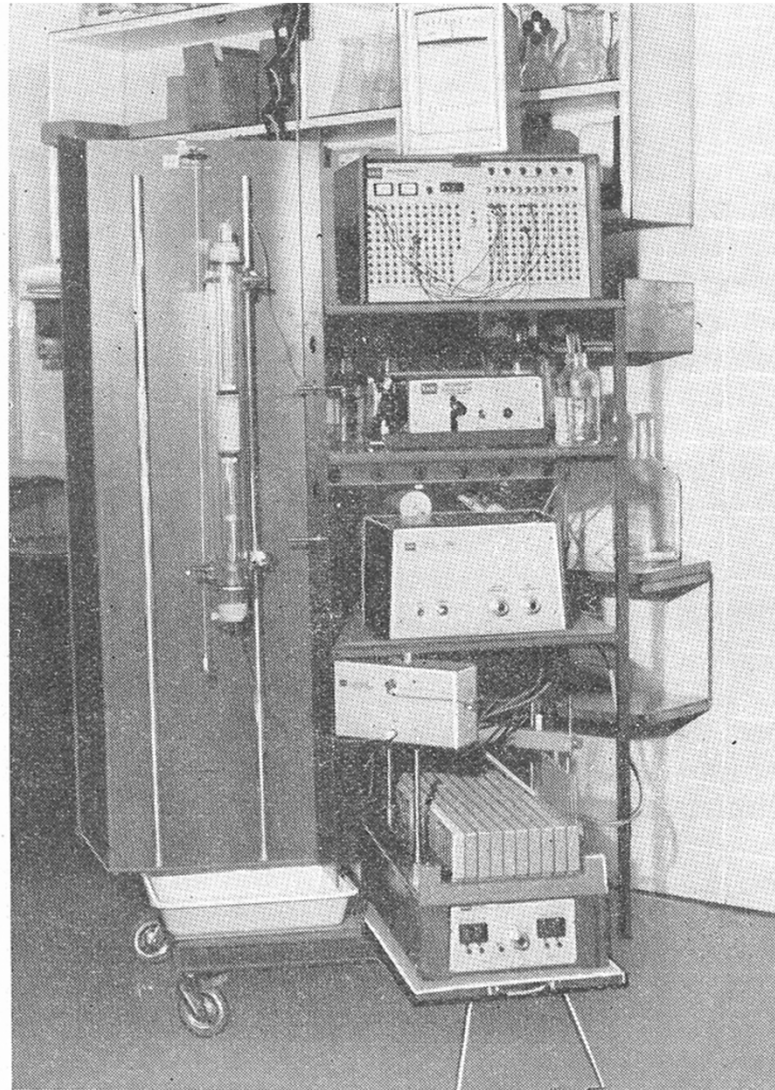
Kromatográfiai módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Kromatogram értékelés, kalibráció logM- V (t) összefüggés



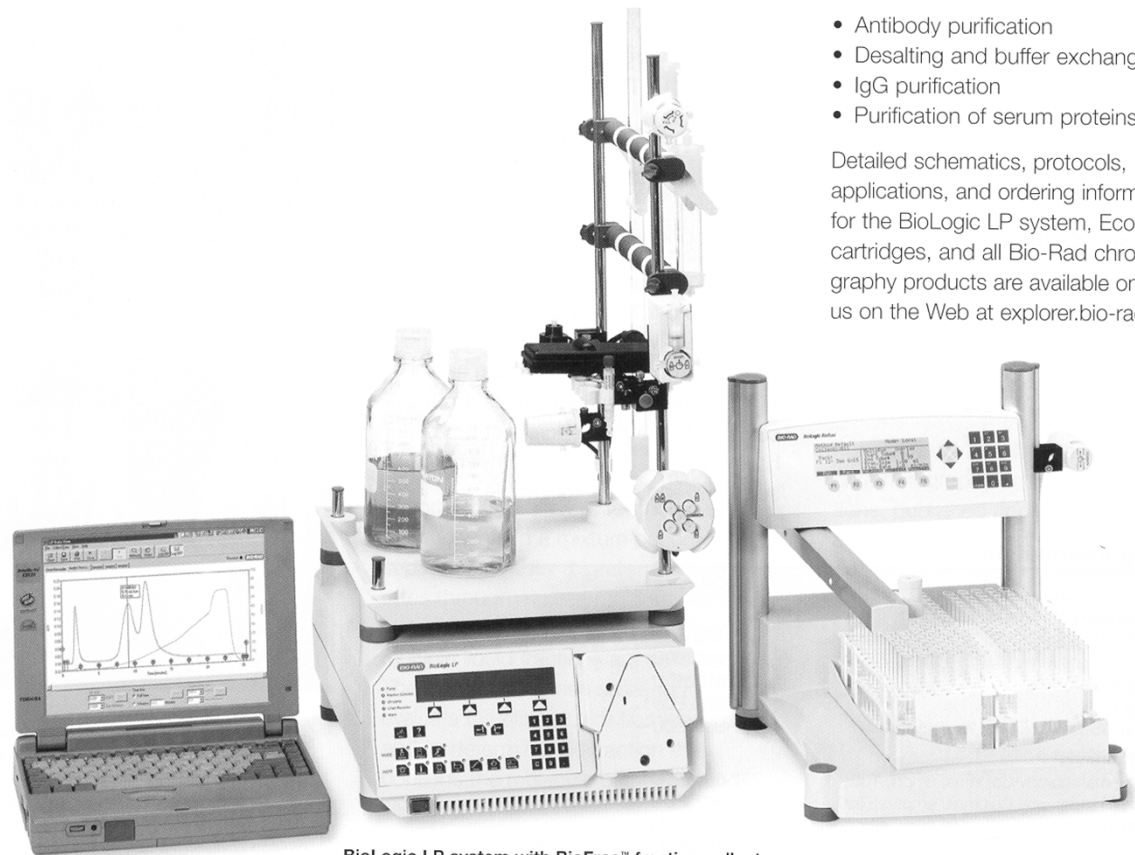
Kromatográfias módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Készülékfelépítés tegnap...



Kromatográfias módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Készülékfelépítés ... ma



- Antibody purification
- Desalting and buffer exchange
- IgG purification
- Purification of serum proteins

Detailed schematics, protocols, applications, and ordering information for the BioLogic LP system, Econc cartridges, and all Bio-Rad chromatography products are available online on the Web at explorer.bio-rad.com

BioLogic LP system with BioFrac™ fraction collector.
LP Data View™ software and computer sold separately.



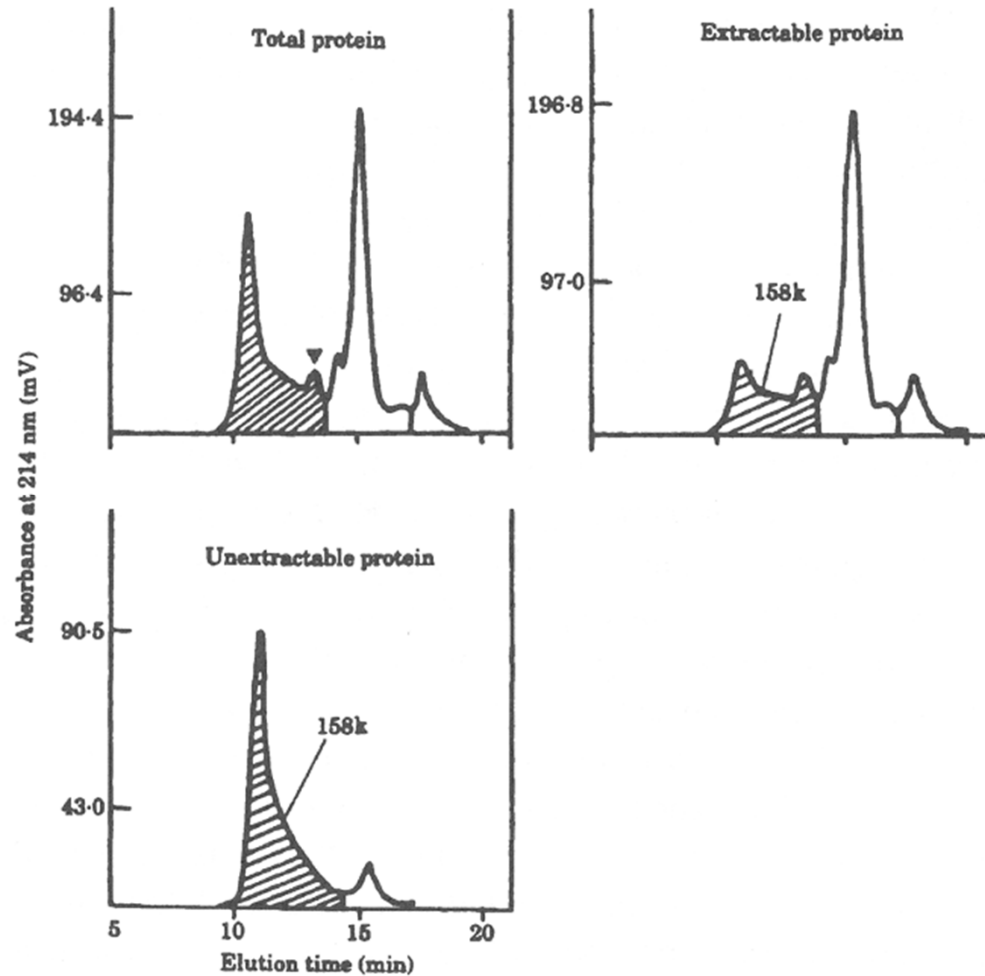
Kromatográfiás módszerek

1. Gélszűrés, gélkromatográfia – Alkalmazási példák

- fehérjetisztítás, sómentesítés
- frakcionálás molekulaméret szerint
- kutatás-fejlesztés
- termékelőállítás

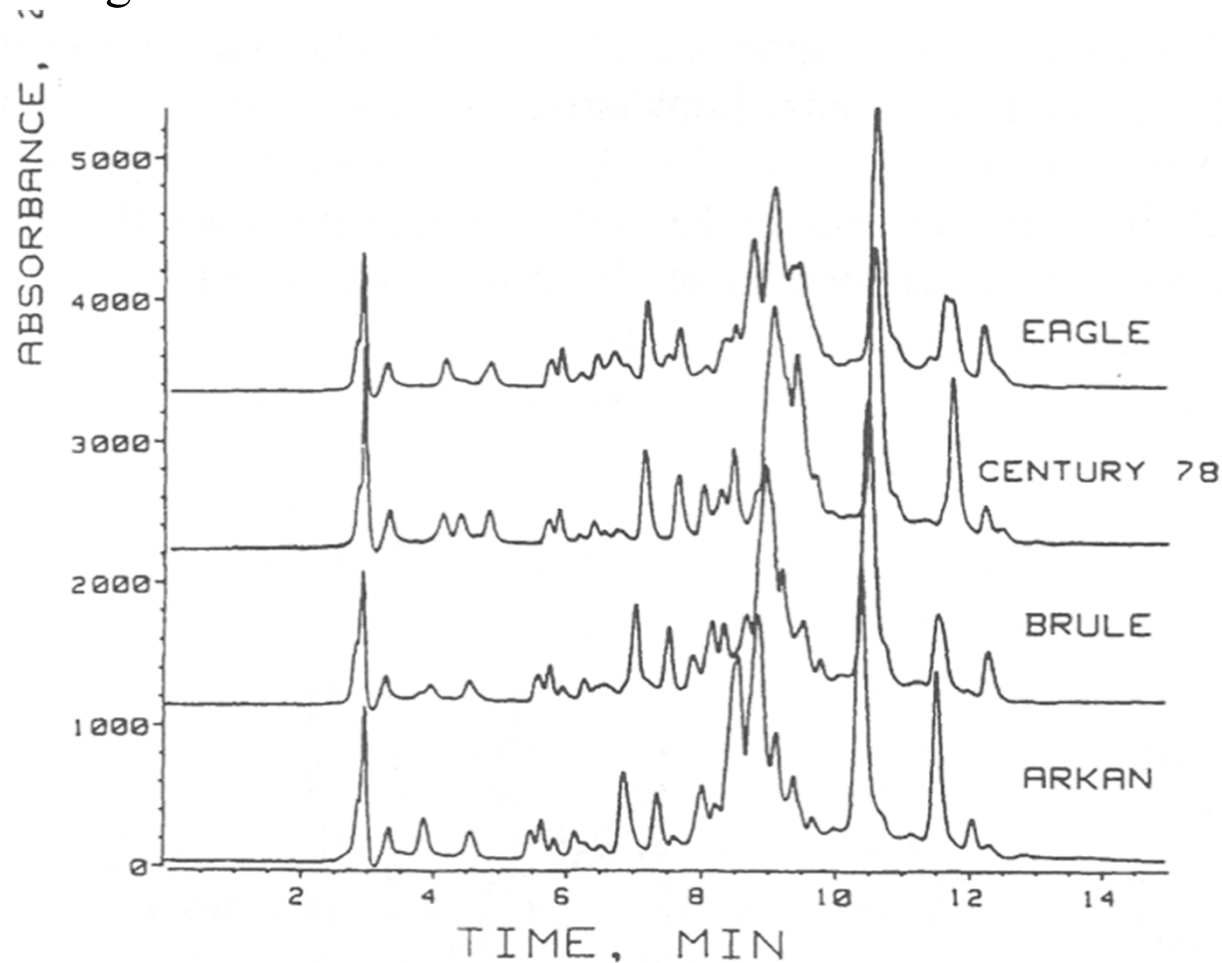
Kromatográfiai módszerek

2. Egyéb kromatográfiai módszerek – SE HPLC

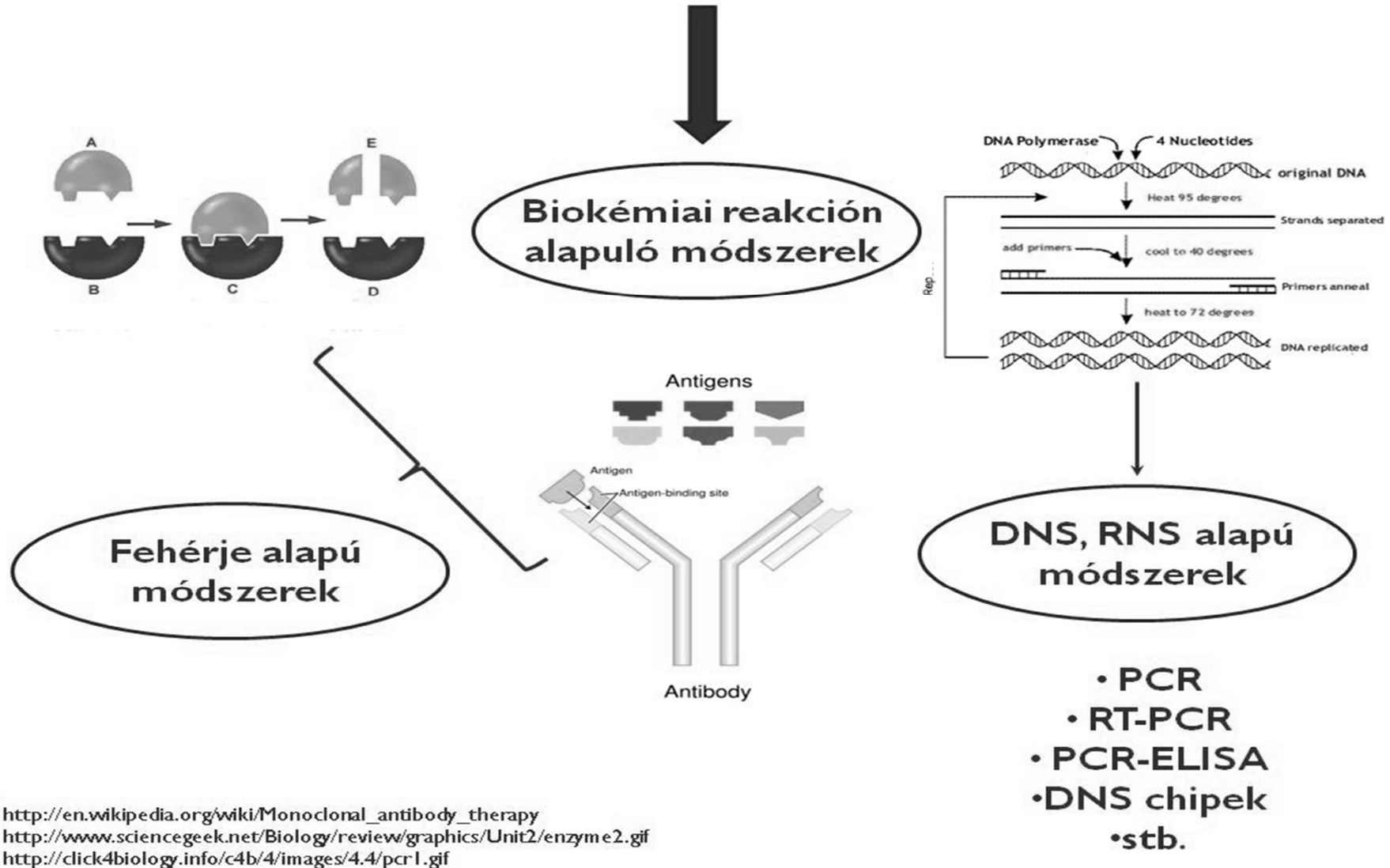


Kromatográfiai módszerek

2. Egyéb kromatográfiai módszerek – RP HPLC

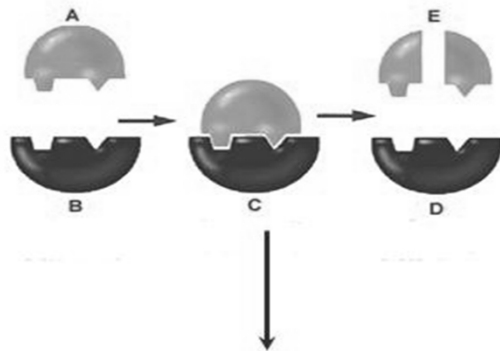


Bioalitikai módszerek



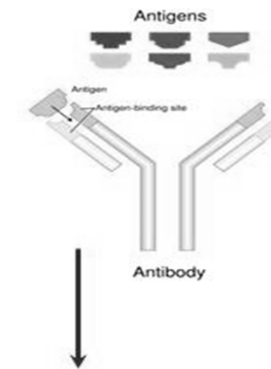
Fehérje alapú módszerek

ENZIMES MÓDSZEREK



- Szubsztrát meghatározás
- Enzimaktivitás mérése
- Immobilizált enzimes technikák

IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK



- Elektroforetikus technikák
- Immunfluoreszcencia, radioimmunológia
- Jelölt ellenanyagot vagy antigént alkalmazó technikák



Enzimes analitikai módszerek - enzimtesztek

Gyorsvizsgálatokra alkalmasak, mert

- időigényük minimális (1 - 3 perc)
- specifikusak (molekula és nem csoport spec.)
- érzékenyek
- eszközigényük minimális

Alkalmazási példák:

Szénhidrátok

D-glükóz
D-fruktóz
D-galaktóz
Szacharóz
Maltóz
Laktóz
Raffinóz
Keményítő

Szerves és szervetlen savak

L-Malonsav
Aszkorbinsav
Tejsav
Oxálsav
Aszpartám
Citromsav
Ecetsav
Karbamid
Lecitin, stb.

Egyebek

Etanol
Koleszterin
Acetaldehid

Higiéniai tesztek

metabolikus végtermékek mérése (pl. piruvát, laktát, ammónia tejben)

Enzimes analitikai módszerek - alkalmazási példák

Advantages:

1. very specific
2. sensitive
3. rapid ($t < 3$ min)
4. applicable for automatic methods \Rightarrow

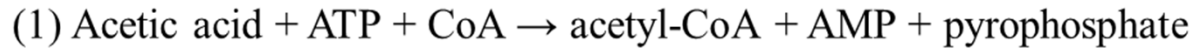
Examples:

	Example
Carbohydrates (monosaccharides, oligosaccharides, polysaccharides)	$\text{D-glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{hexokinase}} \text{ADP} + \text{glucose-6-phosphate}$ $\text{glucose-6-phosphate} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G6P-dehydrogenase}} \text{D-gluconate-/-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$
Inorganic and organic acids (ascorbic acid, formic acid, L-malic acid, aspartic acid, succinic acid, pyruvic acid, citric acid, etc.)	$\text{L-glutamate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{glutamate-DH}} \text{2-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+$ $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{INT} \xrightarrow{\text{diaphorase}} \text{NAD}^+ + \text{formazan}$
Alcohols	$\text{Ethanol} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{alcohol-dehydrogenase}} \text{acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Sterols	$\text{Cholesterol} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{cholesterol-oxidase}} \text{4-cholestenone} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{methanol} \xrightarrow{\text{cathalase}} \text{formaldehyde} + 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Formaldehyde} + \text{NH}_4^+ + 2 \text{acetylacetone} \rightarrow \text{lutidine-dye} + 3 \text{H}_2\text{O}$
Other analytes (acetaldehyde, ammonia, keratin, urea, triglicerides, etc.)	$\text{Urea} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{urease}} 2 \text{NH}_3 + \text{CO}_2$ $\text{NH}_4^+ + \text{2-oxoglutarate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{glutamate-DH}} \text{L-glutamate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$

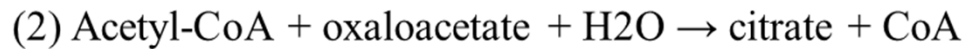
Enzimes analitikai módszerek - alkalmazási példák

Ecetsav meghatározása:

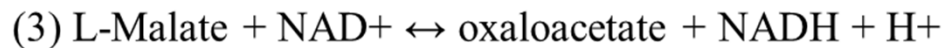
(acetyl-CoA synthetase)



(citrate synthase)

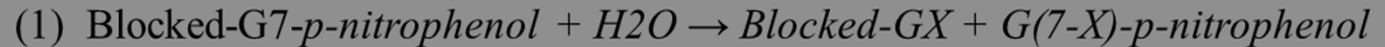


(L-malate dehydrogenase)



Alfa-amiláz aktivitás mérése:

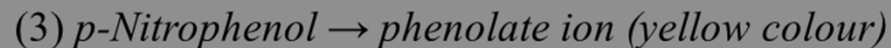
(α -amylase)



(thermostable α -glucosidase)



(alkaline solution)

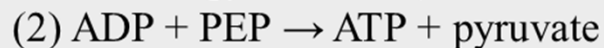


Glicerol-teszt:

(glycerokinase)



(pyruvate kinase)

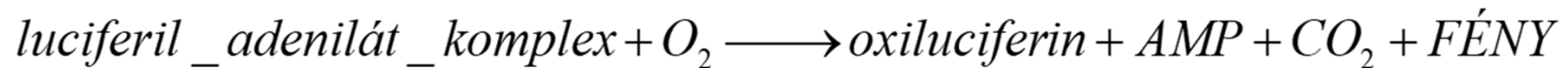
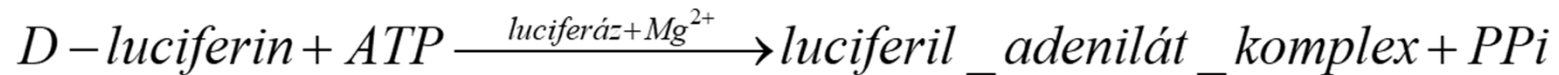


(L-lactate dehydrogenase)



Enzimes analitikai módszerek - alkalmazási példák

- Kemilumineszcencia → biolumineszcencia → ATP biolumineszcencia



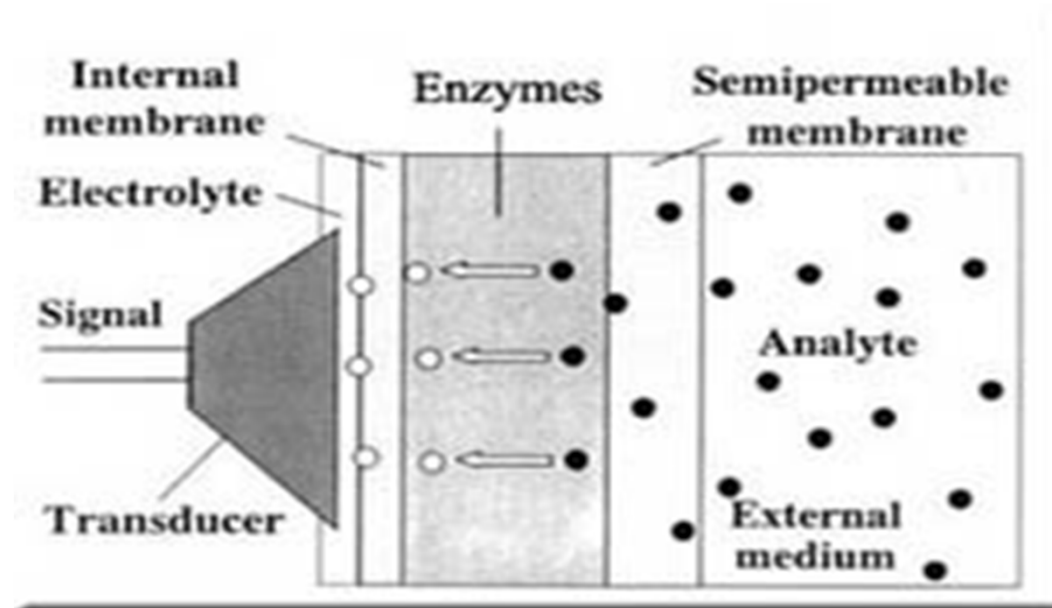
- Fény → ATP → mikroorganizmus

Az ATP-lumineszcencia alkalmazása a tejiparban :

- Fejés: **gépek** (higiénia) és **termék** (nyerstej-minősítés)
 - Tárolás, továbbítás, szállítás: **eszközök** (higiénia)
 - Tárolás: **tartályok** (higiénia) és **termék** (nyerstej-átvétel)
 - Hőkezelés: **berendezések** (higiénia) és **termékek** (minőségellenőrzés)
- Gyártás, töltés: **gyártó és adagoló berendezések** (higiénia) és **termékek** (minőségellenőrzés)
- Csomagolás: **gépek, berendezések** (higiénia) és **végtermék** (minőségellenőrzés)
- Hús- és hústermékek mikrobiológiai ellenőrzése
- Ivóvíz mikrobiológiai ellenőrzése
 - Ipari biomassa vizsgálata
 - Söripari alkalmazások
 - Üdítőital gyártás
 - Vendéglátóipar, catering
 - Kozmetikai ipar

Enzimes analitikai módszerek

Bioszenzorok



Az immobilizált enzimek lehetővé tették az enzimelektrodok alkalmazását. Az enzimek a bioszenzorokban felismerik a szubsztrátot és a megfelelő terméké alakítják át, melyet szenzorok ismernek fel.



Immunanalitikai módszerek

- **Antigén: Antisomatogen (Ag)** = ellenanyag-termelést kiváltó szó rövidített formája. Az érintett immunrendszer sejtjei által (idegenként) felismert struktúrák (sejtek, molekulák) gyűjtőneve.
- **Antitest (At):** Ellenanyag. Az antigén ellen termelt keringő molekula, melyet a B-limfociták termelnek (globulin természetű fehérje). **Immunglobulinnak** is nevezik (**Ig**)

Immunanalitikai módszerek elve

$Ag + At \rightleftharpoons AgAt$
 $Ag + At \rightleftharpoons AgAt \dots AgAt \rightleftharpoons Ag + At$

Ag = antigén vagy analizálandó komponens
 az élelmiszer mátrixban
 At = ellenanyag
 AgAt = immunkomplex

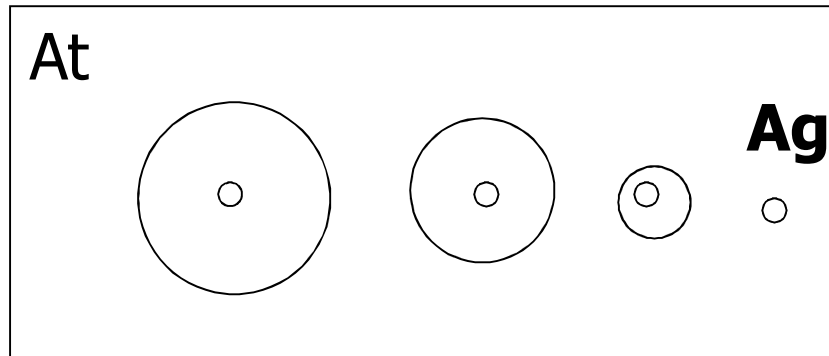
Elsődleges összekapcsolódás: pillanatszerű kötésen alapuló, reverzibilis folyamat
 Másodlagos összekapcsolódás: agglutináció a sejtek között, precipitáció a molekulák között



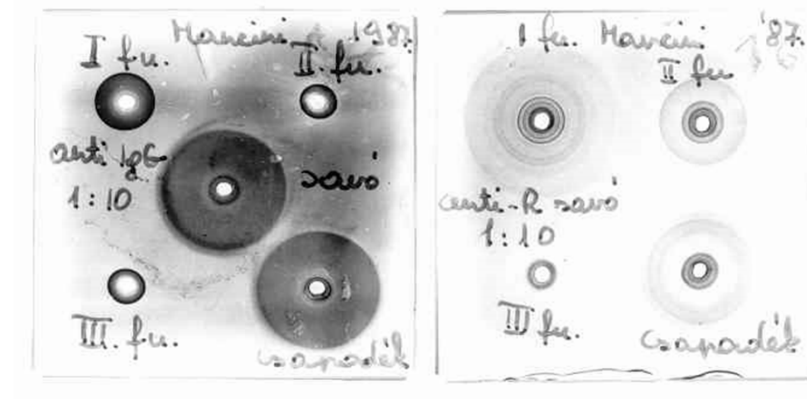
Immunkémiai reakciók

- Elsődleges összekapcsolódás:
 - komplexképzésnek kedvez: fiziológiás körülmények
 - disszociációnak kedvez: detergenssek, alacsony pH, nagy ionerősség, stb.
- Másodlagos ún. szerológiai reakciók:
 - szerológiai reakciónak kedvez: At megfelelő affinitása az Ag-hez, Ag determinánsok kedvező térbeli elhelyezkedése és száma (>1)

Kétdimenziós egyszerű immundiffúzió



Koncentráció változás



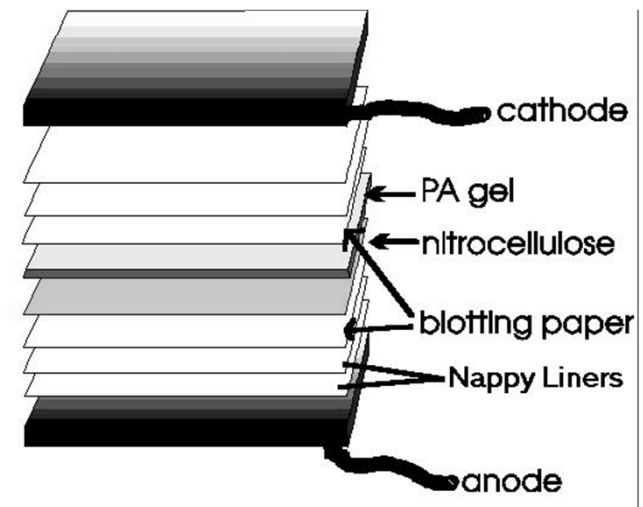
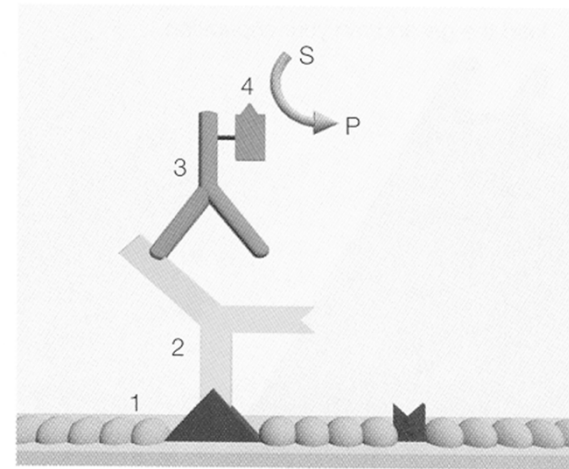
Elektroforetikus módszerek => Immunoblott

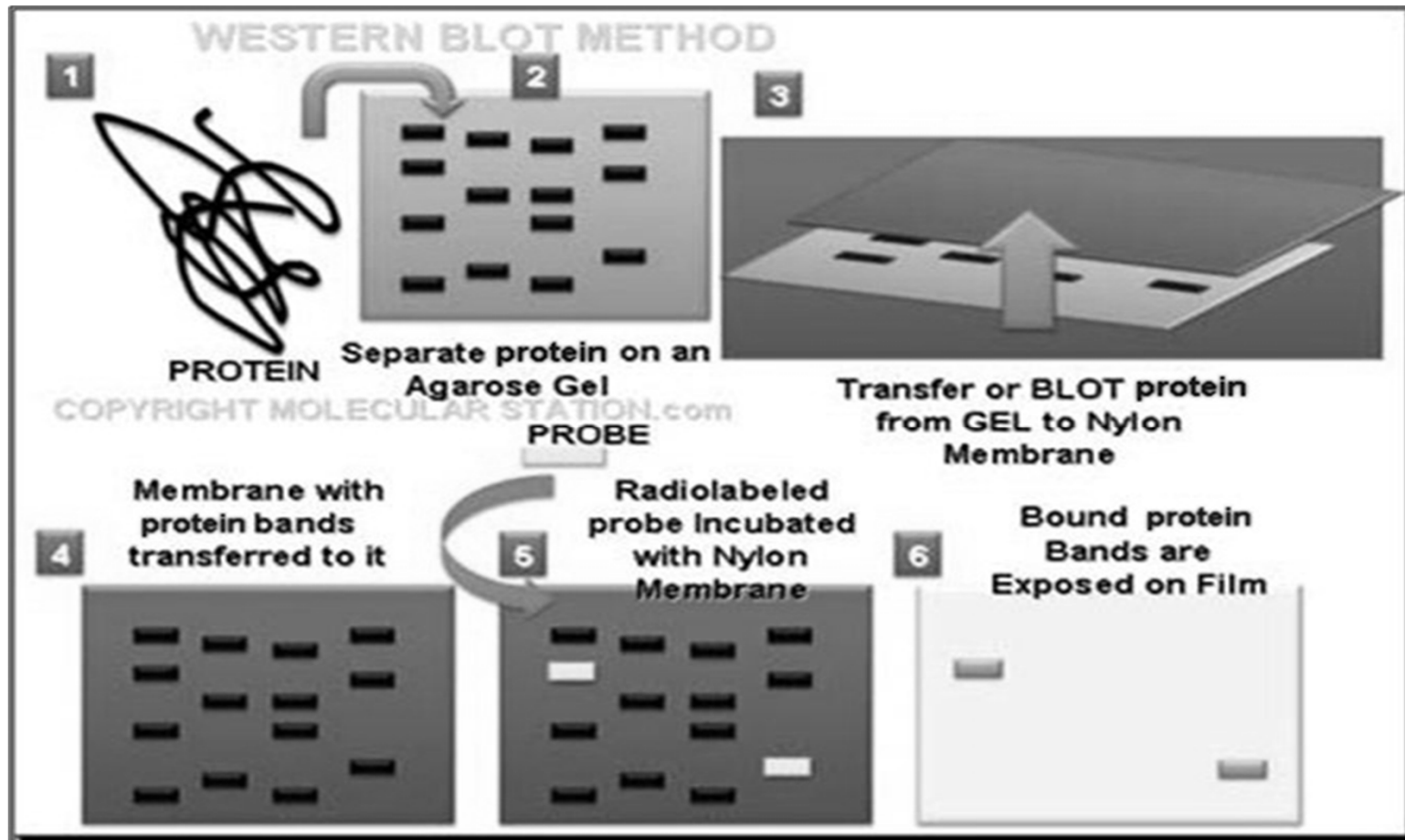
2. Egyéb módszerek – Westernblott

ELV: molekuláris biológiai módszer antitest-specifiki fehérjemeghatározáshoz

LÉPÉSEI:

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

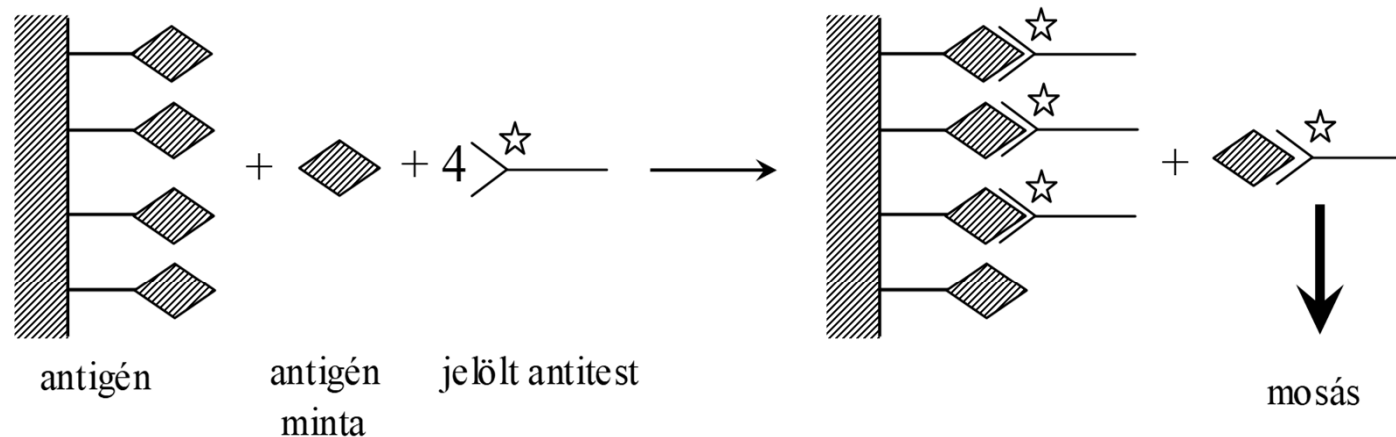




- Western blot: fehérje
- Southern blot: DNS
- Northern blot: RNS

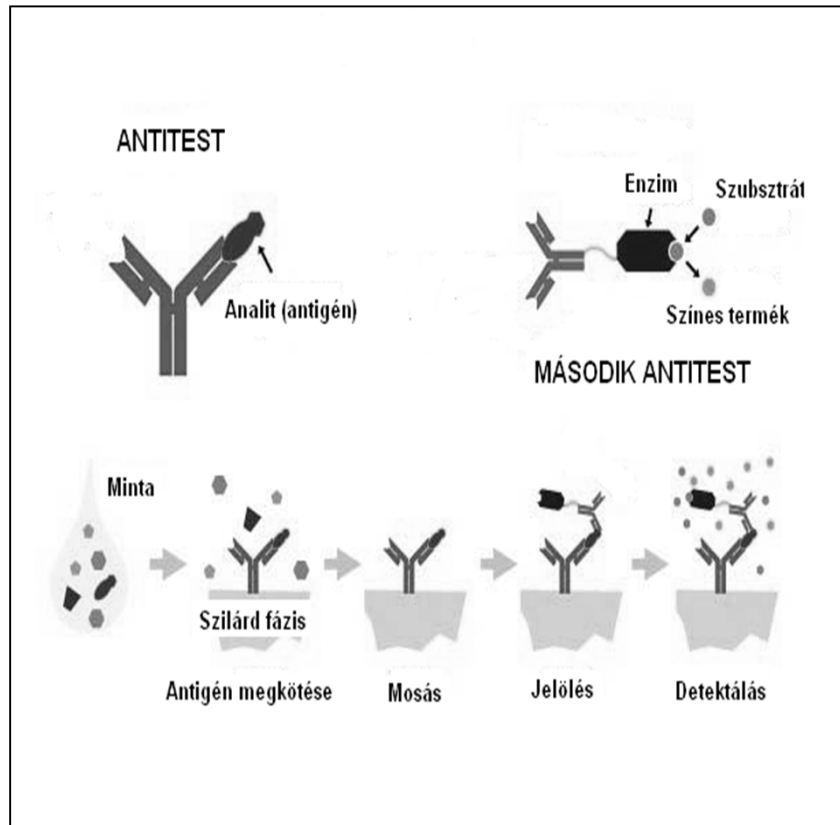
Jelzéses módszerek – ELISA

- **Elve:** antigén-antitest immunreakción alapul

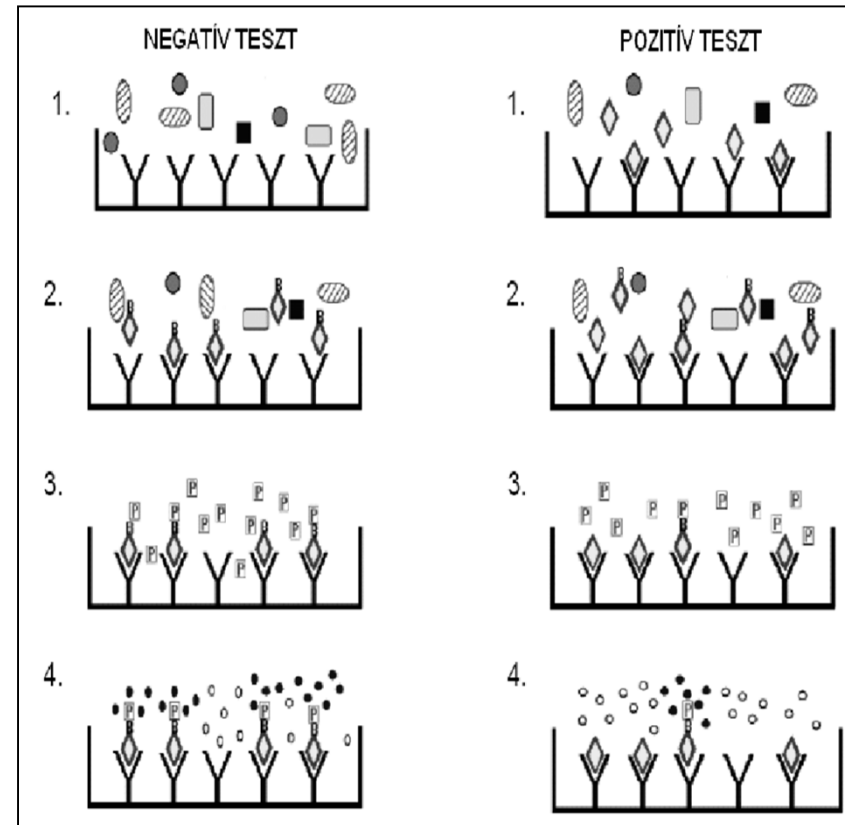


- **Kiértékelés:** abszorbancia mérés-spektrofotométer segítségével, kalibrációs görbe alapján
- **Módszer jellemzői:**
Érzékeny, specifikus, könnyen kivitelezhető, egyidejűleg nagyszámú minta vizsgálatára alkalmas

Példák ELISA-ra

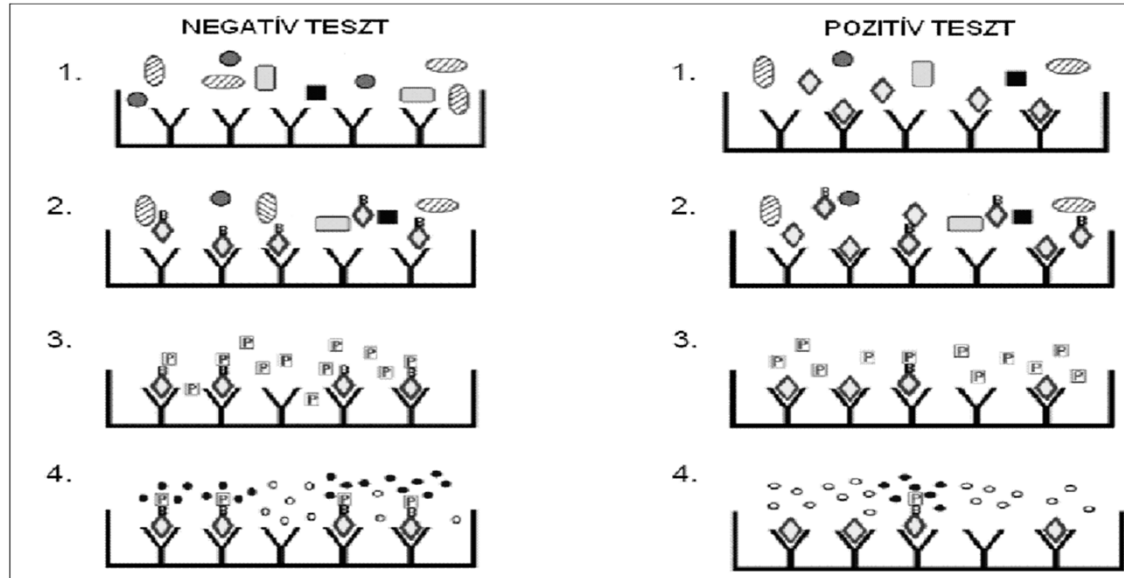


Szendvics ELISA –
*R-Biopharm, RIDASCREEN Fast
 Ei/Egg Kit*

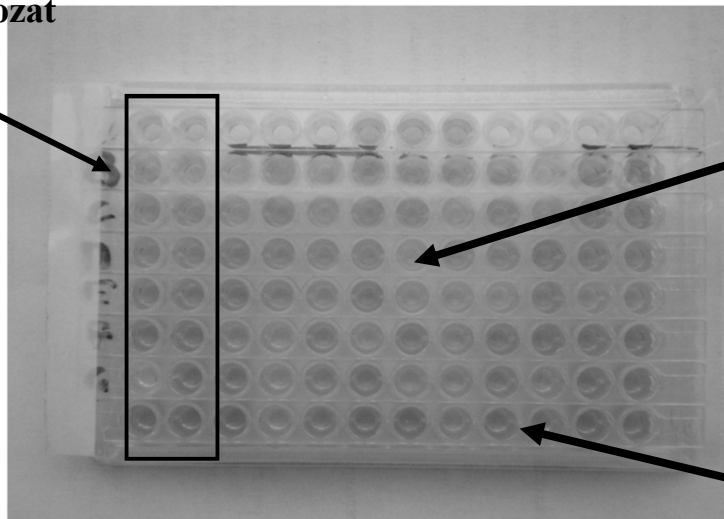


Indirekt kompetitív ELISA-*Tepnel
 BIOKITS Casein Assay Kit*

Példa: kompetitív ELISA

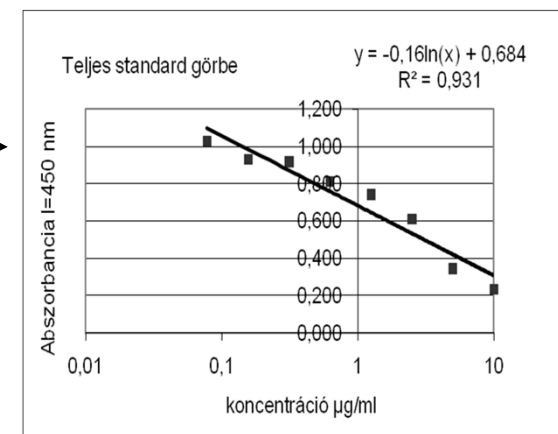


Standard oldatsorozat
(0,1-10ppm)



75 ppm minta

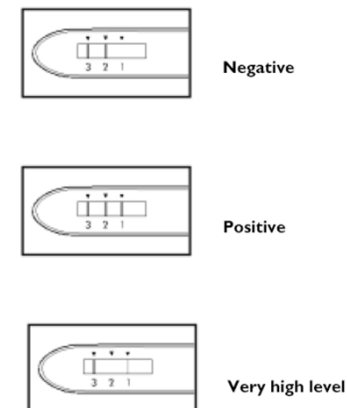
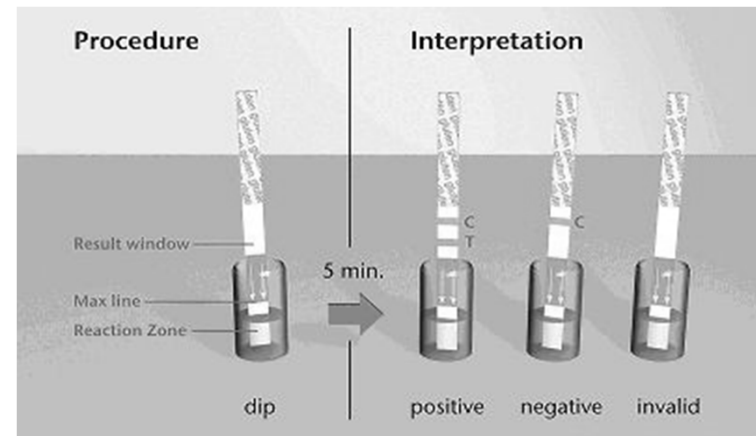
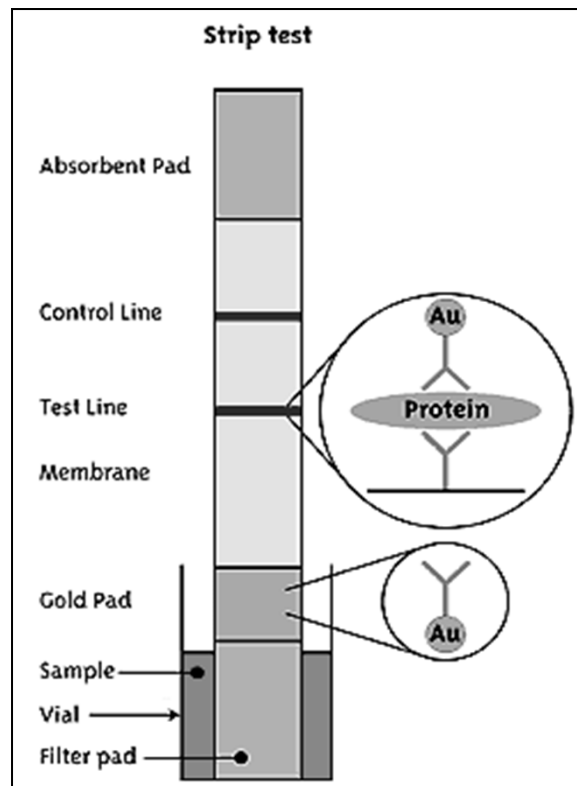
2ppm minta



Immunanalitikai gyorsvizsgálati technikák – immunokromatográfia, deepstick

Elve:

- Szintén immunreakción alapulnak
- Keresztáramlásos technika elvén működnek





Immunanalitikai módszerek – alkalmazási példák

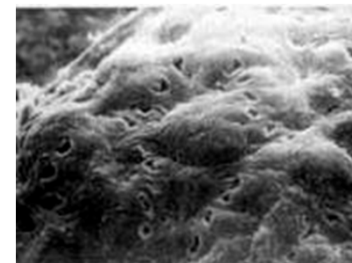
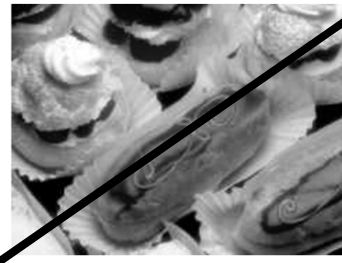
- kémiai és mikrobiológiai szennyezők
- Toxinok
- szermaradványok
- génmódosított szervezetek (GMOk)
- allergének
- mikrobák fajspecifikus meghatározás
- Stb...

Élelmiszer eredetű veszélyforrások – allergia vagy intolerancia

Szinte **bármely étel alkotóelemére lehetünk allergiásak**, vannak azonban olyan élelmiszerek, amelyek gyakrabban keltenek allergiás tüneteket: tehéntej, tojásfehérje, szója, hal, kagyló, földimogyoró, dió, kakaó, búza, paradicsom, szilva, őszi- és kajsziarack, cseresznye, meggy, eper, málna, kivi.

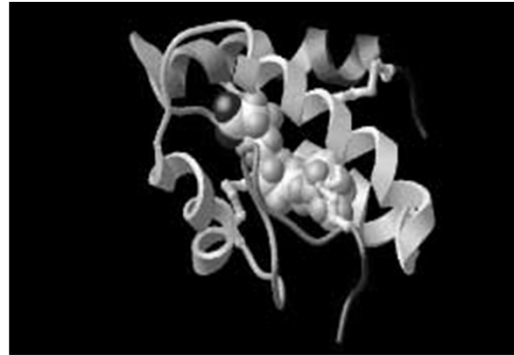
Egy különleges ételallergia: a lisztérzékenység

- A betegséget a gliadin, búza-, árpa-, rozs- és zabliszt fehérjéinek a gluténnak egyik frakciójaként váltja ki.
- A gliadin, az arrodin és az orrodin együttesen károsítja a bél nyálkahártyáját. A gliadinérzékeny egyének vastagbéljében szövettani elváltozások keletkeznek, a beteg bél úgy néz ki, mintha valami "legyalulta" volna a felszívódáshoz rendkívül fontos bélbolyhokat.



Élelmiszer eredetű veszélyforrások – allergia vagy intolerancia

Csak egy példa:



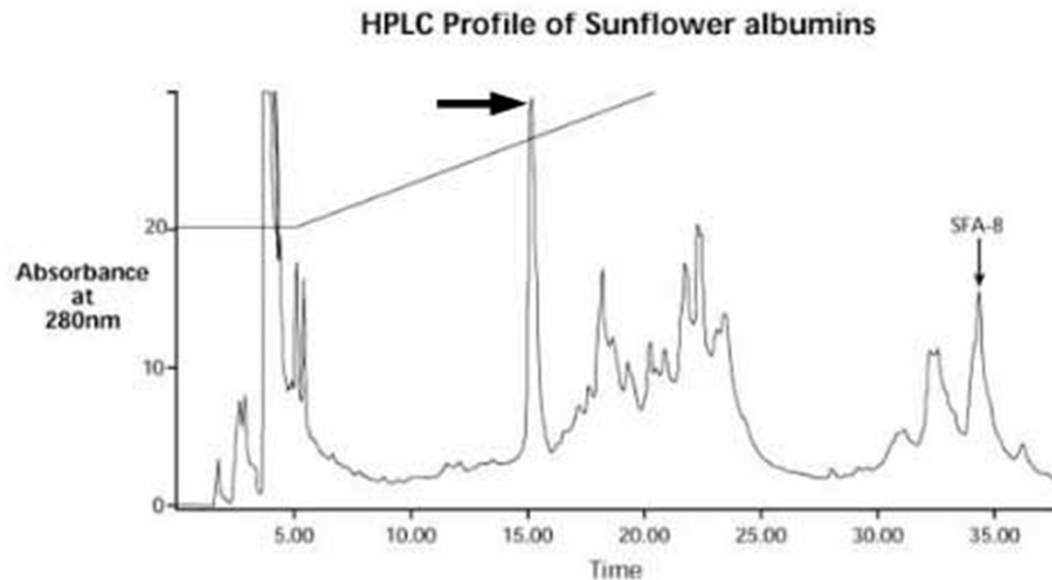
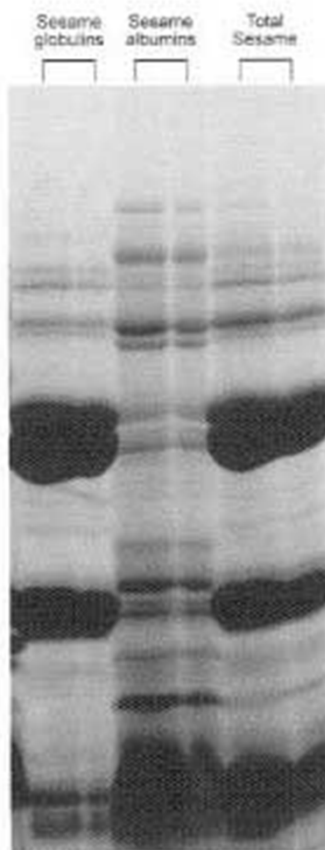
*Árpából izolált lipid-transzfer fehérje. Allergén fehérjeként nem ismert, azonban nagyon hasonlít az almában illetve a barackban található allergénhez – keresztreakciókat okozhat...
(forrás: <http://www.ifr.ac.uk/Protall/NewsletterAug2000.html>)*

Analitikai kihívások:

- fehérjéhez kötődik
- allergén fehérjék nem teljes mértékben azonosítottak
- hatásmechanizmus csak részben ismert
- rutin eljárásként immunanalitikai módszereket alkalmaznak
- gyakorlatilag nincs döntő módszer

....Kapcsolt technikák segíthetnek...

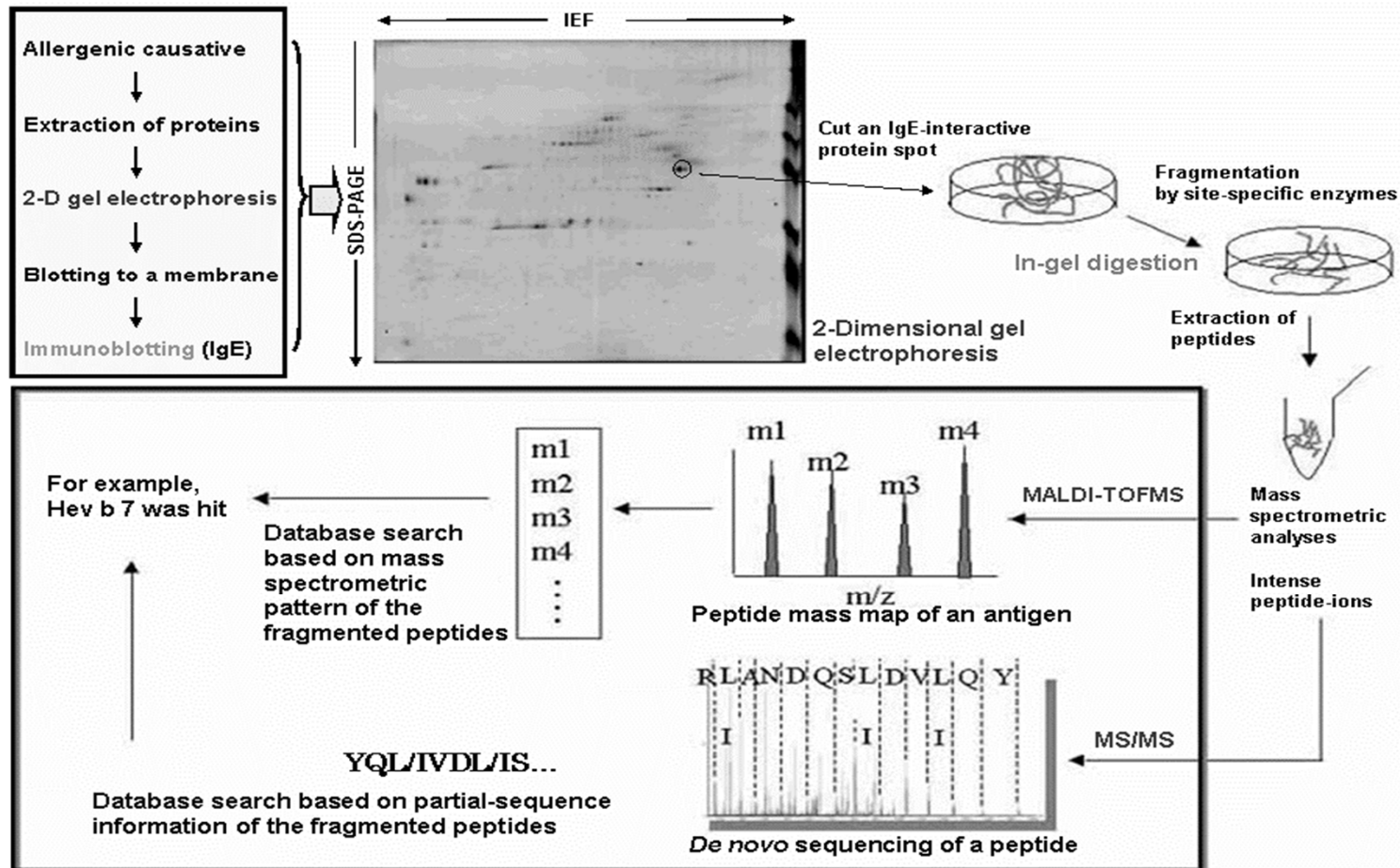
Allergének meghatározása elválasztástechnikai módszerekkel



Szezám mag albumin, globulin és teljes fehérje alegység profil vizsgálat SDS PAGE-vel (valószínű, hogy az allergén fehérjék kis molekúlyú albuminok, de azonosításuk így nem lehetséges.... ,

Napraforgó mag albuminok vizsgálata RP-HPLC-vel. A nyíl a valószínűsíthető allergént jelöli...

Allergének meghatározása elválasztástechnikai módszerekkel – allergenomics felé

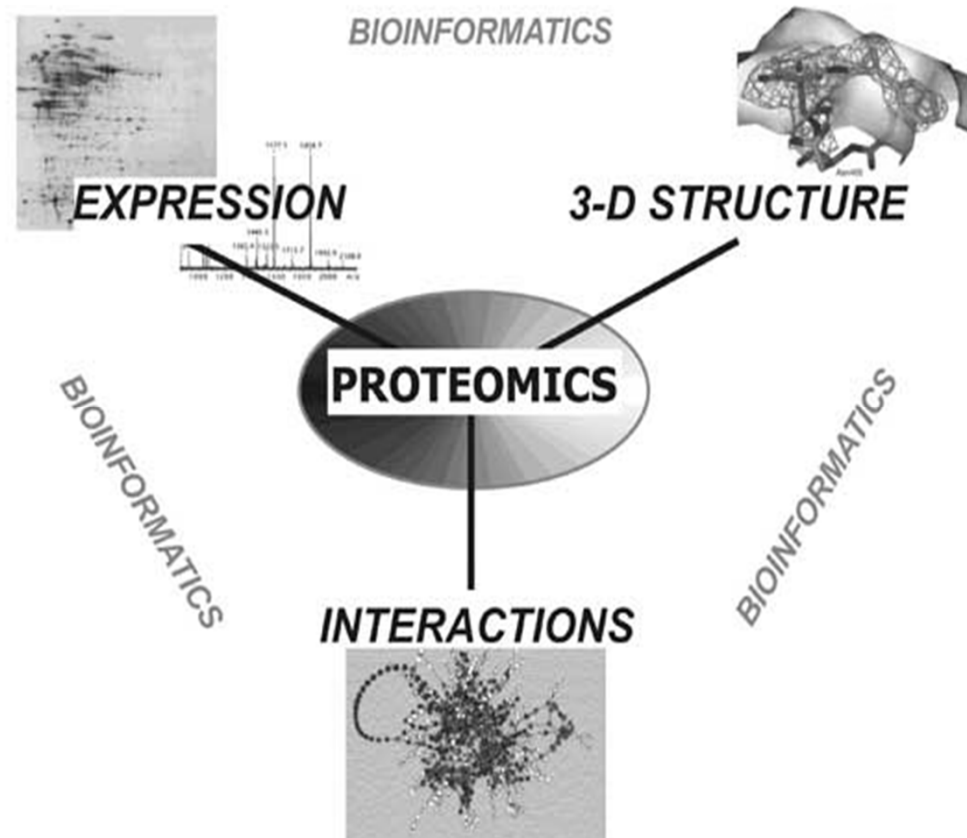


Napraforgó mag albuminok vizsgálata RP-HPLC-vel. A nyíl a valószínűsíthető allergént jelöli...

Egy kis kitérő a proteomika felé...

Mivel foglalkozik a proteomika?

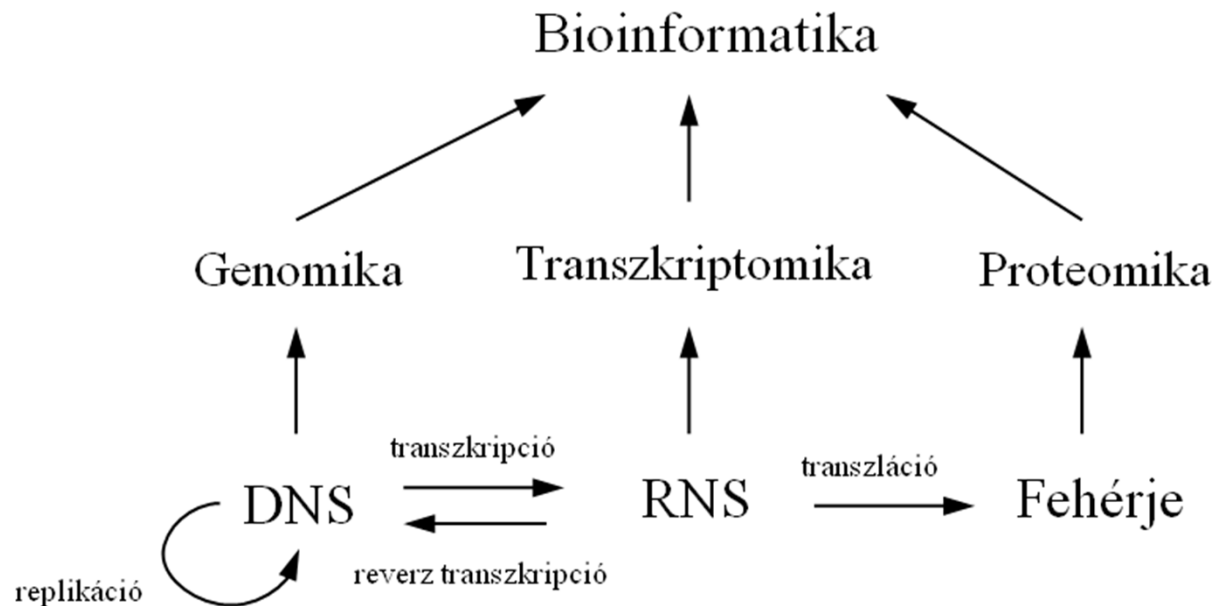
Interdiszciplináris terület, amely a biológiai rendszerekben található fehérjék komplex jellemzésével és dinamikájával foglalkozik. Az elválasztási és analitikai módszereket a modern informatikai megoldásokkal kombinálva nyerünk információt a fehérjék sejtekben betöltött szerepéről.



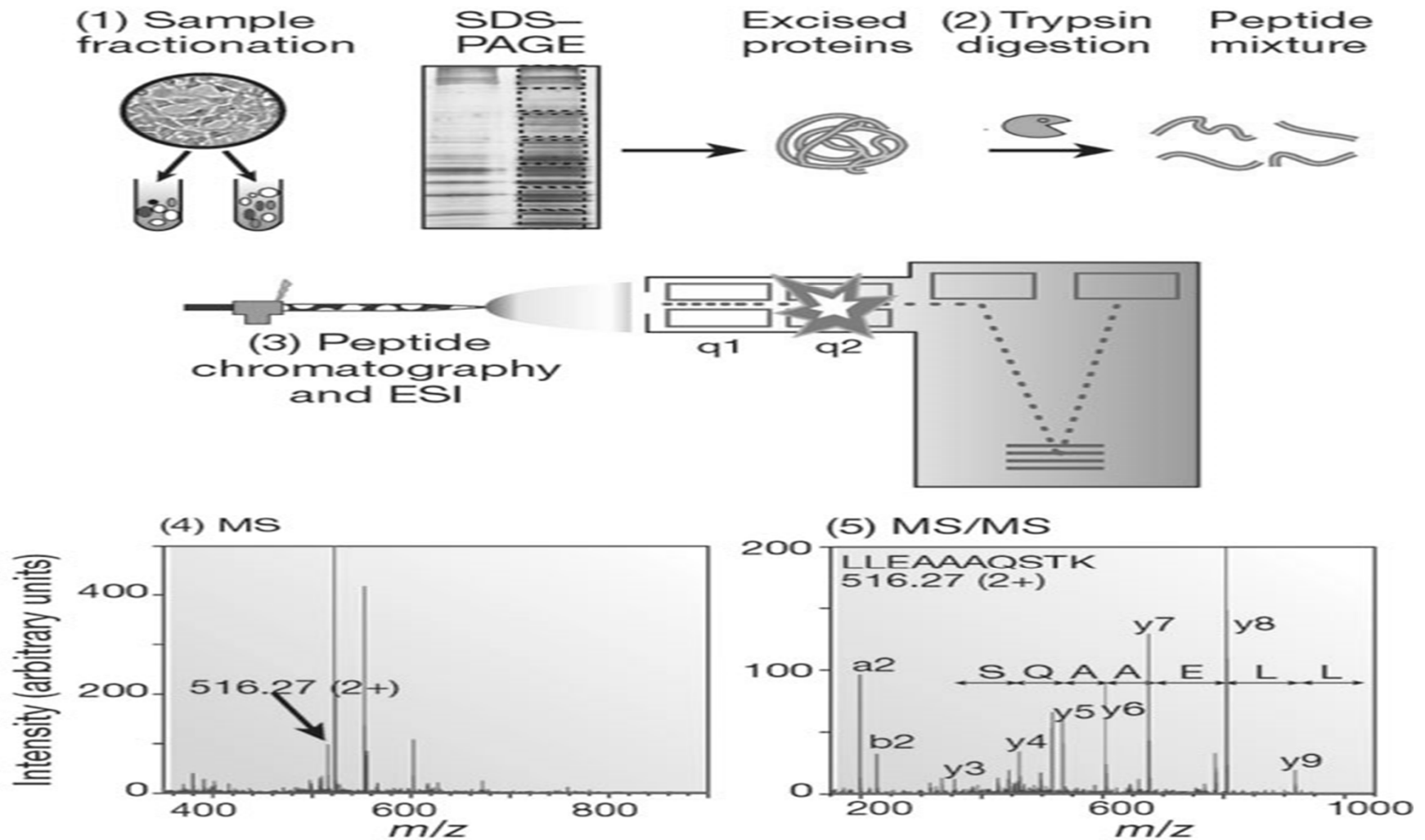
Egy kis kitérő a proteomika felé...

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

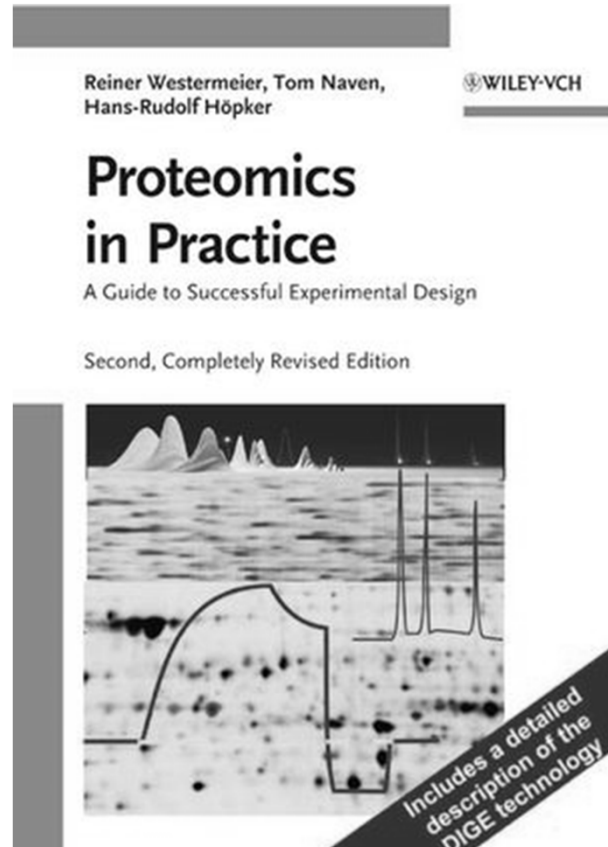
Jelenti fehérjék azonosítását (szekvencia, 3D szerkezet), mennyiségi meghatározását; adatbázisok összeállítását; szerkezeti módosítását (pl.: transzláció utáni), funkciójának, aktivitásának megismerését etc.



Egy kis kitérő a proteomika felé...



Egy kis kitérő a proteomika felé..



PART I: PROTEOMICS TECHNOLOGY

Electrophoresis

Liquid Chromatography

Mass spectrometry

Bioinformatics tools / data mining

Methods under development

PART II. PRACTICAL MANUAL OF PROTEOME ANALYSIS

Strategy where to start

Gel-based workflow

LC-based workflow

Latest trends

Validation with Western blotting

Statistic evaluation

PART III: TROUBLE SHOOTING

Gel-based workflow

LC based workflow

Egy kis kitérő a proteomika felé - alkalmazások

Post-translational Modifications of Proteins - Tools for Functional Proteomics

Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design

Proteomics Sample Preparation

Proteomics of Human Bodyfluids - Principles, Methods, and Applications

Plant Proteomics

Proteome Research - Concepts, Technology and Application

Cancer Genomics and Proteomics - Methods and Protocols

Subcellular Proteomics - From Cell Deconstruction to System Reconstruction

Proteomics of Microbial Pathogens

Cardiovascular Proteomics - Methods and Protocols

Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry

Microbial Proteomics: Functional Biology of Whole Organisms

Quantitative Applications of Mass Spectrometry

Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Disease

Proteomics in Drug Research

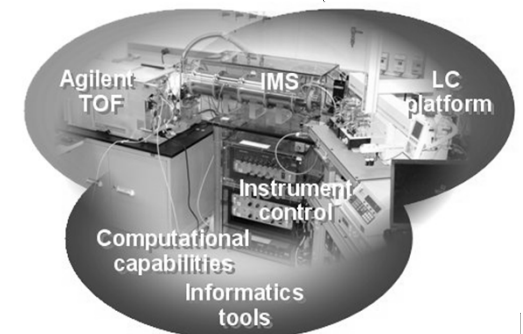
Functional Proteomics - Methods and Protocols

Proteomics of the Nervous System

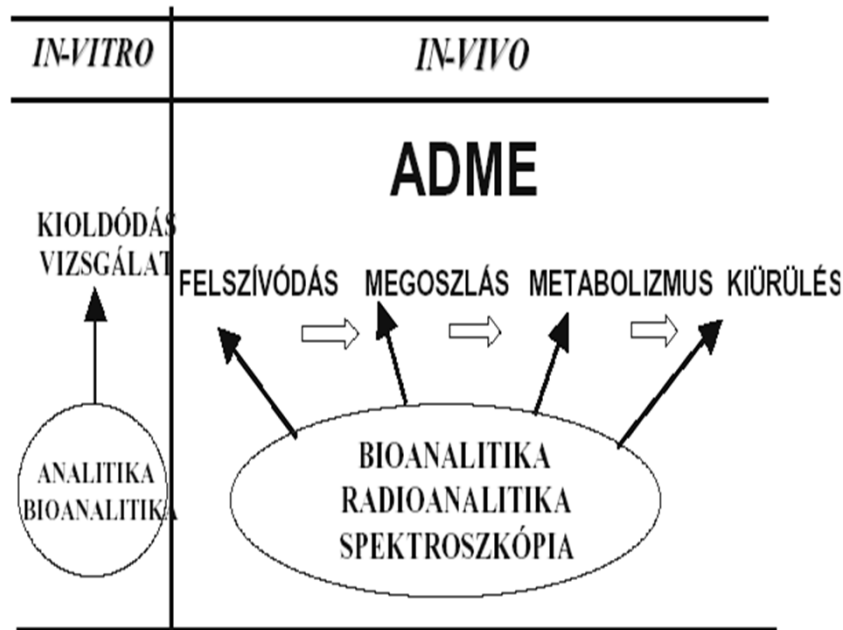
Activity-based Chemical Proteomics

Clinical Proteomics - Methods, Applications, and Tools

Membrane Proteomics



Néhány gondolat a bioanalitikáról -
Farmakokinetika, gyógyszermetabolizmus

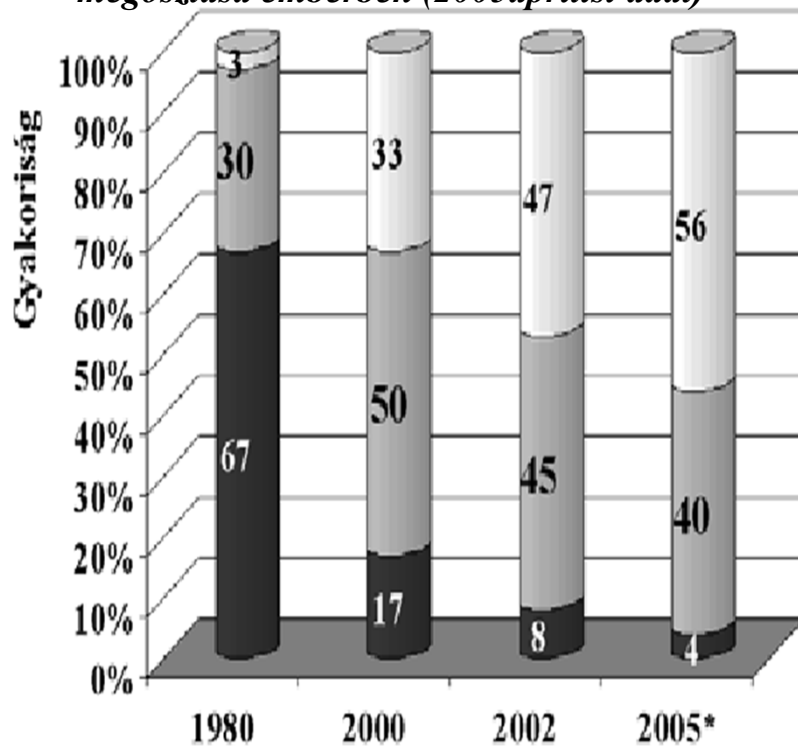


A farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott legfontosabb bioanalitikai technikák és detektálási módjai

Technikák	Detektálási mód
I. Gázkromatográfia	FID
GC	NPD
	ECD
	RD
	MSD (P/N-EI, P/N-CI)
II. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	UV, DAD
HPLC	FLD
	EC
	RD
	RD-MS
	MSD (ESI, APCI, APPI)
	MS/MS (ESI, APCI, APPI)
III. Kapilláris elektroforézis	UV, DAD
CE	FLD
	MSD
IV. Kapillár elektrokratográfia	DAD
CEC	FLD

Néhány gondolat a bioanalitikáról – Farmakokinetika, gyógyszermetabolizmus

*A világon törzkönyvezett legjelentősebb 50
gyógyszerkészítmény plazmaszintjeinek (LLOQ)
megoszlása emberben (2005áprilisi adat)*

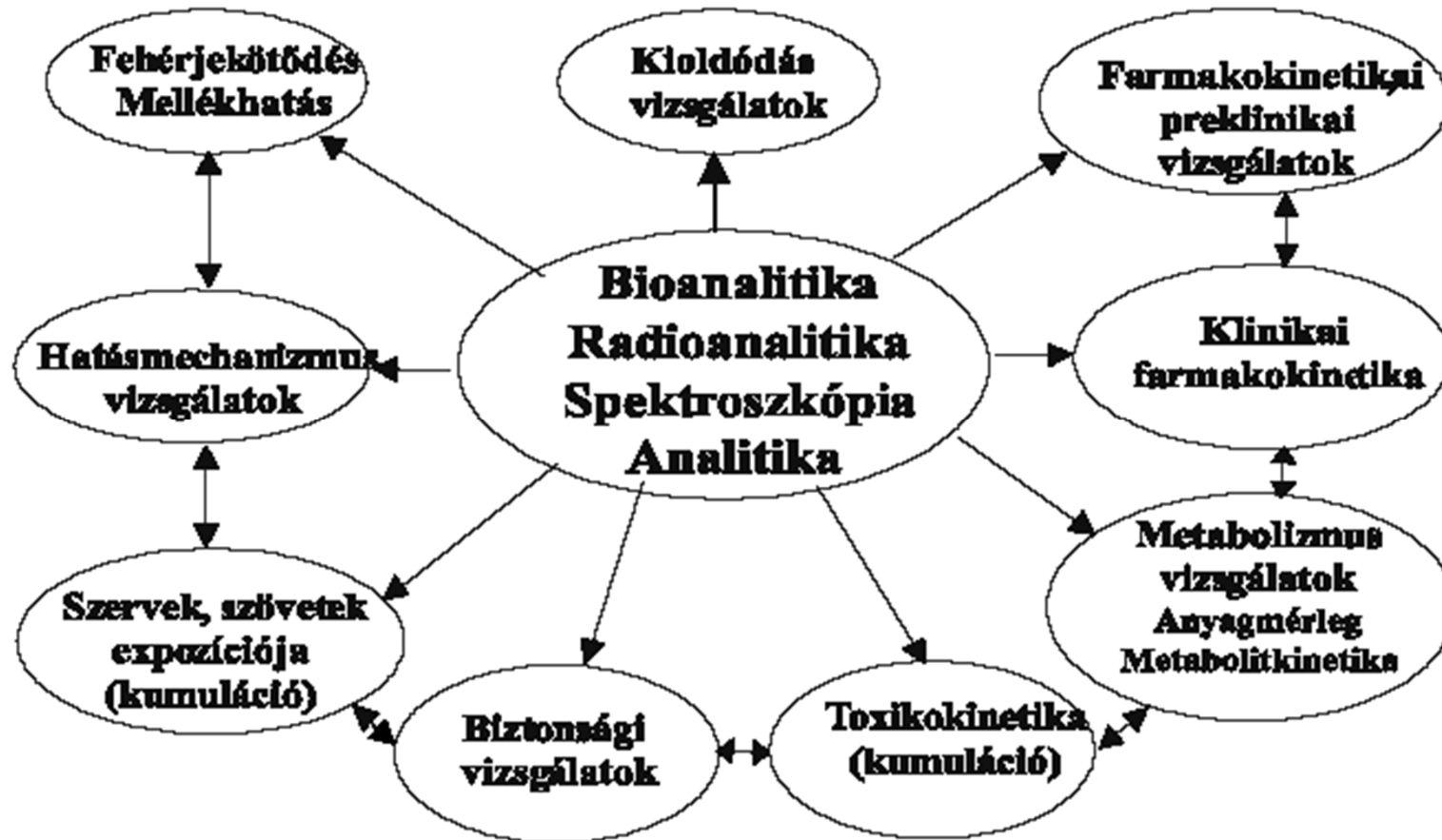


A XXI. század kezdetének metabolizmus
kutatásában alkalmazott vizsgáló módszerek
komplex összefoglalása

Metabolitok izolálása, elválasztása és szerkezetkutatása	Módszer
I. On-line kapcsolt technikák	<ul style="list-style-type: none"> • GC-MS (P/N-EI; P/N-CI) • GC-FTIR • LC-MS (ESI; APCI; APPI) • LC-MS/MS (ESI; APCI; APPI; TOF; TOF/TOF; Ion Trap; PDA) • LC-NMR • LC-NMR-MS/MS • OPLC-RD • OPLC-RD-MS/MS • OPLC-RD-NMR
II. Off-line technikák	<ul style="list-style-type: none"> • NMR • Nanoprobe®-NMR • FAB-MS(-MS) • EI-MS • MALDI • OPLC-DAR-FAB/MS/MS
III. „Kvázi” on-line technika	
IV. Különböző spektroszkópiai módszerek kombinációja	<ul style="list-style-type: none"> • Szerkezetkutatásban különféle technikák kombinációjának alkalmazása
V. Speciális nukleáris technikák	<ul style="list-style-type: none"> • Folyadék szeitillációs spektroszkópia (LSC) • Tradicionális film kontakt autoradiográfia • Teljes test autoradiográfia • Nukleáris égetés • RIA • DAR • PIT Foszfor imaging technikák (radioluminográfia)
VI. Egyéb technikák	<ul style="list-style-type: none"> • Egyensúlyi dialízis (fehérjekötődés) • Enzimes hidrolízis (metabolizmus) • Kombinált eljárások (metabolizmus)

KLEBOVICH Imre: Magyar Kémiai Folyóirat,
III évfolyam, 3. szám, 2005. szeptember

Néhány gondolat a bioanalitikáról –
Bioanalitikai módszerek és a gyógyszerkutatás kapcsolata





Az előadásnak vége 😊!

Kérem ne feledjék, hogy

- Számonkérés a megbeszéltek szerint.
- Konzultáció – bármikor, de légy szíves jelezzék 😊!

Kellemes további napot!



A mai előadásnak vége 😊!

Kérem ne feledjék, hogy

- még egy előadás hátra van, egy hét múlva hétfőn, témája:
 - kapcsolat technikák a bioanalitikában, allergomika, proteomika
 - Immunanalitika
- Akiket illet: Laborbeszámoló 2013. május 14. kedd 10 15- Ch 304.

Kellemes további estét!



Elektroforetikus módszerek

1. Natív és SDS gélelektroforézis – a módszer kivitelezése

