

IZOEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS

Gélben, illetve folyadékban végrehajtott elektroforézis technika, amely a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján választja el. Azt használja ki, hogy a fehérjéknek izoelektromos pontjukon (pH) nincs töltése, az elektromos erőterben nem mozdulnak.

Ehhez pH gradienst kell létrehozni, egy speciális pufferrendszer → „polybuffer” segítségével.



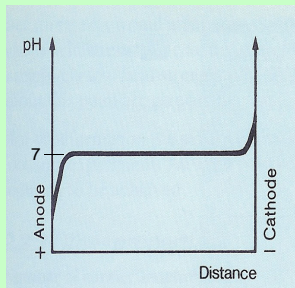
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

POLYBUFFER

Első lépésként nézzünk egy olyan gélt, amiben csak víz van:

Az elektródokon a vízbon-tás miatt egy nagyon vékony rétegben sav, illetve lúg keletkezik.



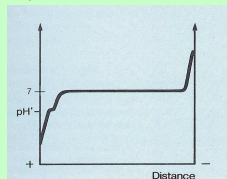
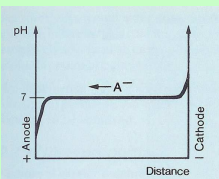
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

POLYBUFFER

Ha ebbe a rendszerbe egy ikerionos anyagot, pl aminosavat teszünk, akkor az a semleges közegben mutatott töltésének megfelelő irányba indul el.

Amikor odaér az izoelektromos pH-jú helyre, ott elveszti a töltését és megáll. Az anyag pufferkapacitása miatt a pH profilban itt egy kis plató keletkezik.

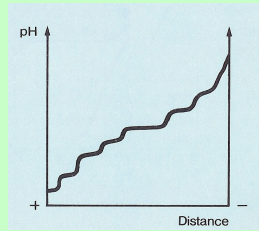


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

POLYBUFFER

Ha sok ilyen vegyületet oldunk egyszerre (pl. a 20 aminosav), akkor mindegyik létrehoz egy kis platót/hullámot a görbén. A cél olyan keverék, amely gyakorlatilag lineáris pH gradienst hoz létre egy tartományban.



POLYBUFFER

Milyen legyen ez a keverék?

- Nagyon sok lépcsője legyen
- Minden komponensnek legyen pufferkapacitása (csak így tud lépcsőt csinálni)
- Legyen vezetőképessége
- A molekulák legyenek kicsik (MW 300 – 1000 Da, gyors diffúzió)
- Ne legyen UV elnyelése $\lambda=280$ nm-nél (detektálás)
- Ne lépjen kölcsönhatásba semmivel

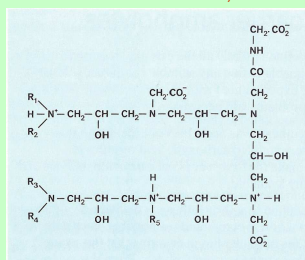


POLYBUFFER

Leggyakrabban egy három-komponensű rendszer statisztikus kondenzációjával hozzák létre. Sokféle termék, és mindegyiken belül több ionizálható csoport is van.

Monomerek:

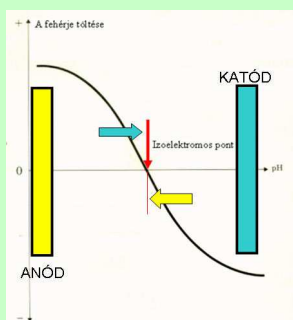
- glicin
- epiklórhidrin
- dialkil-amin



FÓKUSZÁLÁS

A különböző pH-n a fehérjék különböző töltésűek, de mind-egyiket az IEP felé mozgatja az erőter.

Minél távolabb van az IEP-től, annál nagyobb a töltése, annál nagyobb erő mozgatja. Minden fehérje a saját IEP-ján fókuszálódik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

KIVITELEZÉS

A pH-gradiens kialakítását és a fehérjék fókuszálását lehet külön is végezni, de lehet egy lépésben is. → A polybuffer komponensei kisebbek, gyorsabban diffundálnak, hamarabb „megtalálják a helyüket”, mint a fehérjék.

Mindegy, hol visszük be mintát, a fehérjék is megtalálják a helyüket. Beoldhatjuk akár az egész polybuffer mennyiség-be is, akkor is fókuszálódnak.

Ha készen van, akkor vagy gyorsan ki kell értékelni (UV denzitometria), vagy fixálni és előhívni → a térerő lekapcsolásával ugyanis szétdiffundálnak a sávok.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

SÁVSZÉLESSÉG

A sávok szélessége a fehérje és a puffer tulajdonságaitól függ:

$$\sigma = \sqrt{\frac{-D}{(du/dpH)(dpH/dx)}}$$

σ – szórás

D – diffúziós állandó

du/dpH – az elektroforetikus mozgékonyaság változása a pH függvényében az IEP-nél (a fehérje jellemző-je)

dpH/dx – a pH gradiens az adott helyen (a puffer jellemzője)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

FELBONTÁS

A felbontó képesség is mindkét anyag tulajdonságaitól függ:

RESOLVING POWER IN ISOELECTRIC FOCUSING

$$\Delta pI = 3.07 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{-E(du/dpH)}}$$

E – térerősség

A ΔpI elérheti a 0,001 értéket is.



JELLEMZŐ PARAMÉTEREK

Feszültség: 1000 – 3000 Volt

Áramerősség: 100 – 200 mA

Kifejlesztés: 2000 – 12000 Voltóra

Időtartam: 1 – 8 óra

Felbontás: 0,001 – 0,003 pH egység



IEF ÉRTÉKELÉSE

Előnyei:

- Egyszerű, egy gél, egy puffer, kezeletlen minta
- Jó felbontás
- Preparatív szintig léptéknövelhető

Hátrányok:

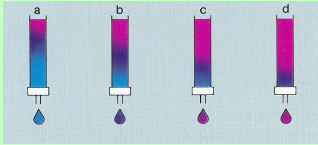
- Speciális (drága) puffer



KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Elvét tekintve hasonló az előzőhöz (fókuszálás IEF szerint) de nem gélben, hanem egy ioncserélő oszlopon történik.

Ha egy adott pH-ra beállított/egyensúlyba hozott ioncserélő oszlopra más pH-jú puffert engedünk, akkor az fokozatosan „megtitrálja” az oszlopot, a pH változás nem lépcsősen történik, hanem egy átmeneti görbe mentén.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

KROMATOFÓKUSZÁLÁS

A cél itt is az, hogy térben lineáris pH gradienst hozzunk létre. Ehhez ugyanolyan puffert használunk, mint a gélben, de elektromos erőter helyett egy speciális ioncserélő gyantán.

Az ioncserélő is sokféle, különböző erősségű ionizálható csoportot tartalmaz (itt is van külön anion és kationcserélő).

Ahogy a puffer halad az oszlopban, komponensei fokozatosan titrálják meg a töltet csoportjait, az átmeneti pH-jú zóna kiszélesedik és közel lineárisává válik.



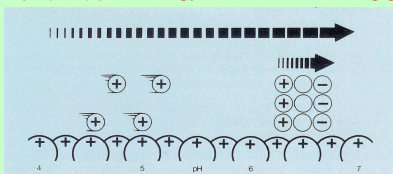
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Ennek a lineáris gradiensnek is fókuszáló hatása van. A pufferben haladó fehérjék csak az IEP-jükig mehetnek előre, mert ennél töltésük előjelet vált, és megkötődnek, bevárják a későbbi jövőket. A pH változásával leválnak, és az adott pH-jú (IEP) ponttal együtt vándorolnak végig a tölteten.

A puffer sokkal gyorsabban halad, mint a fehérjék.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Több fehérje esetén mindegyik a saját IEP-jének megfelelő helyen vándorol végig az oszlopon, a végén elkülönült sávokban lépnek ki.

The diagram illustrates the mechanism of ion exchange chromatography. A column contains a stationary phase with positive charges (+). A buffer with a pH gradient is applied, moving from left to right. Protein 1, which has a net negative charge at pH 6, binds to the stationary phase. As the pH increases to 7, the protein's net charge becomes zero (its isoelectric point, IEP), and it is released from the column. Protein 2, which has a net negative charge at pH 7, binds to the stationary phase. As the pH increases to 8, its net charge becomes zero, and it is released. The flow rate and rate of migration are indicated by arrows at the top.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 16

KROMATOFÓKUSZÁLÁS

A minta beadagolási ideje itt sem kötött, akár többször injektálhatunk, a komponensek ugyanoda fókuszálódnak.

A felbontás annál jobb, minél laposabb a gradiens → kis puffer koncentrációt célszerű alkalmazni. Az a jó, ha a teljes elúció 10 – 15 oszloptérfogattal megy le.

Detektálás: mint bármely fehérje kromatográfiánál (UV).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Előnyei:

- Jó felbontás, ~ 0,02 pH

Hátrányai:

- Izoelektromos pH-n a fehérjék könnyen kicsapódnak

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 18
