

## ELEKTROFORÉZIS TECHNIKÁK

Dr. Pécs Miklós  
Dr. Fehér Csaba



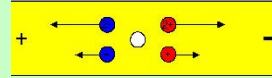
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## ELEKTROFORÉZIS

Olyan elválasztási technikák, amelyben a molekulák elektromos erőter 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 (ülededés)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

## ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforetikus mozgékonyág:

ahol:  $q$  – a molekula töltése

$d$  – molekula átmérője

$\eta$  – viszkozitás/gélsűrűség

Az állandósult sebesség:

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

$$v = \mu \cdot E$$

$E$  – térerősség

A közeg szerint, amiben a mozgás végbemegy, megkülönböztethető:

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



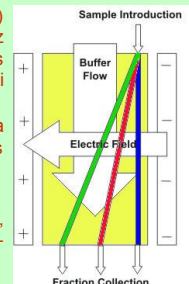
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

## 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)



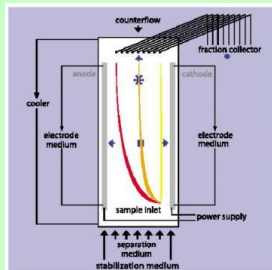
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

## FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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

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

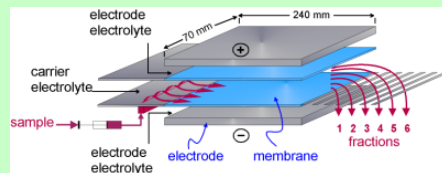


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

## FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Technológiai paraméterek:

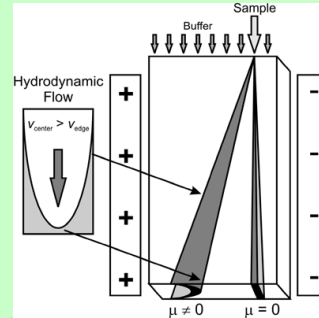
A puffer/minta tartózkodási ideje: 2-5 perc. Ez elegendő az elválasztáshoz, de nem hagy időt a diffúziós szétterjedésre.

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 előlött sávkiszélesedést okoz.



## FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS



## A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

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

Leírása: Grashof szám:

$$Gr = \frac{g\beta\Delta d_n^3}{\nu^2}$$

ahol:  $g$  – nehézségi gyorsulás  
 $\beta$  – a hordozó folyadék hőtágulási együtthatója  
 $\Delta t$  – a folyadék és a fal hőmérséklet különbsége  
 $d_n$  – a kamra hidraulikus átmérője  
 $\nu$  – a folyadék kinetikai viszkozitása



## A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Ha a Grashof szám egy határérték fölé emelkedik, rendszeren 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 mozgékonyaság)

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



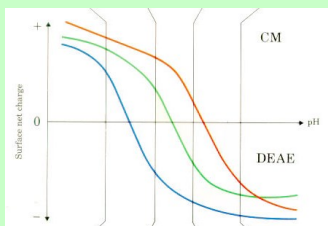
## FFE-elválasztás problémái

Zavaró hatás	Okozott hiba	Tenniivalók
Szabad áramlás	Sávkiszélesedés	– a $Gr$ szám csökkentése – a hordozó puffer elektromos vezetéseinek csökkentése
Diffúzió	Sávkiszélesedés	– hőmérséklet csökkentése – a hordozó folyadék viszkozitásának növelése
Elektroozmózis	Sávkiszélesedés	– a készleték falának bevonása
Adszorpció	Fehérjevesztés	– a készleték falának bevonása – detergens alkalmazása
Kicsapódás	Fehérjevesztés Sávkiszélesedés	– a pufferrendszer megváltoztatása – detergens alkalmazása – stabilizátor
A hordozó puffer gázosodása	Áramlás instabilitása	– a hordozó pufferbe $N_2$ , He bekeverése – a hordozópuffer vákuumkezelése
Sűrűségkülönbség	Áramlás instabilitása Sávkiszélesedés	– más puffer választása – semleges anyagok adagolása



## FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Milyen pH-n érdemes elválasztani?



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Előnyei:

- Folyamatos művelet

Hátrányai:

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

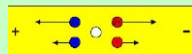


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## GÉL ELEKTROFORÉZIS

A közeg, amiben a molekulák mozognak, hídromgél, 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



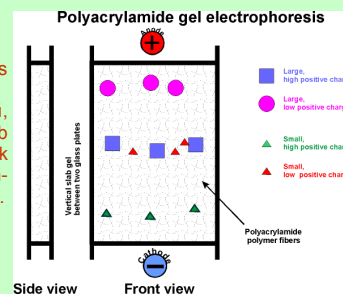
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

## AZ ELVÁLASZTÁS ELVE

Méret és töltés szerint.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

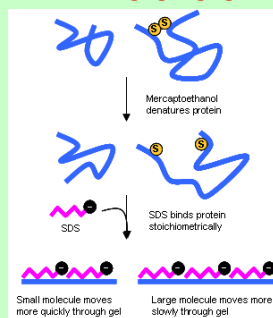
- Beállítjuk a minta sűrűségét (cukoroldattal vagy glicerinnel)
- Markert adunk hozzá (olyan festék, ami a futtatásnál „elől” halad, és ezzel vizuálisan követhető a folyamat → a legtöbbször bróm-timolkék)
- Denaturálás („befőzés”): kezelés redukáló szerekkel és detergensenel (legtöbbször merkaptó-etanollal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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

## KEZELÉS SDS-SEL



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

## GÉL ELEKTROFORÉZIS

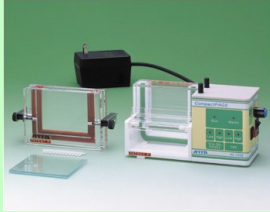
Technikai paraméterek:

A feszültség: 50 – 500 Volt

Az elválasztás mértékét Volt\*óra-ban adják meg.

- tápegység
- feszültség szabályozó/programozó egység

Az elektródok elektrolit-kádakon keresztül vizszik át a feszültséget a géltre.  
Gyakran hűteni kell.



20

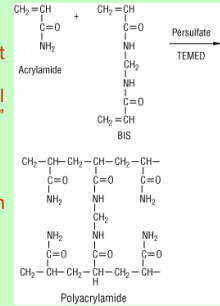
## A POLI-AKRILAMID GÉL

A lineáris poliakrilamid láncokat bis-akrilammal térhálósítják.

Az akrilamid koncentrációjával jellemezhető a gél „sűrűsége” (3 – 30 %).

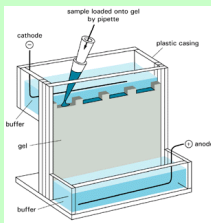
A polymerizációhoz szükséges:  
TEMED – tetrametil-etilén-diamin katalizátor

Ammónium-persulfát – iniciátor  
Oxigénmentes közeg



21

## 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: ~ 5 µg/csík

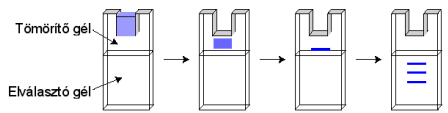
Sűrűsége szerint a gél lehet:

- homogén
- discontinuous
- gradiens

22

## DISC GÉLEK

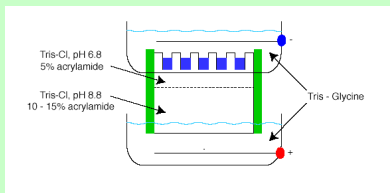
A tényleges futtató gél fölött egy tömörítő gél szakasz van. Célja a viszonylag nagy mintatérőfogatban lévő fehérjék összetömörítése egy csíkba, hogy azután jól elváló, jól észlelhető csíkokat kaphassunk.



23

## DISC GÉLEK

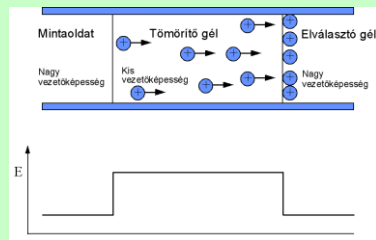
A tömörítő gél szakasz összetétele olyan, hogy ott gyorsabban vándorolnak a fehérjék: vezetőképessége és sűrűsége kisebb.



24

## DISC GÉLEK

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

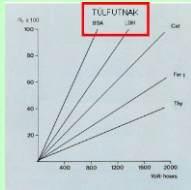


25

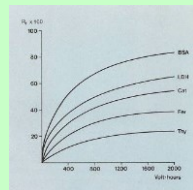
## GRADIENS GÉLEK

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

Futás homogén gélen:



gradiens gélen:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

## A KÉSZ GÉLEK KIÉRTÉKELÉSE

A fehérjecsíkok szabad szemmel nem láthatók, ezért festési eljárásokkal „hívják elő”. Fixálás - festés - halványítás.

**Fixálás:** savas reagensekkel (perklórsav, szulfosalicilsav)

**Festés:**

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

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

**Amido Black, Fast Green** – ritkábban használtak.

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

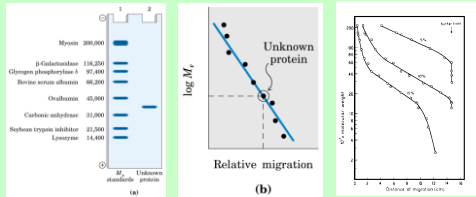


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

## 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”).



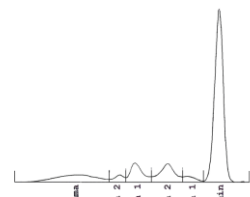
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

## VÉRFEHÉRJÉK ELVÁLASZTÁSA

### Szérum fehérje elektroforézis

(Cin ágazóse gél (Nyitra gél))



Frakciók	%	Normál %	g/l
Albumin	62.1	59,4 - 73,9	
Alpha 1	2.9	1,2 - 3,1	
Alpha 2	11.9	7,0 - 12,5	
Beta 1	9.4	4,9 - 9,4	
Beta 2	2.8	1,6 - 5,6	
Gamma	11.8	6,9 - 14,7	

$A/G = 1.64$

Normális elektroforétikus mintázat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforézis egy kapillárisban elhelyezkedő puffer oldatban történik.

Műszaki adatok:

Feszültség: 10 - 30 kV

Térorósság: 100-500 V/cm

Átmérő (belső): 25-75  $\mu$ m

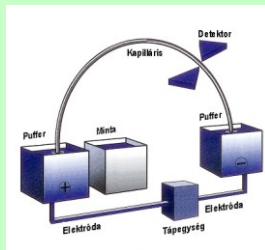
Hossz: 50-100 cm

Anyaga: kvarcüveg

Mintatérőfogat: 1-50 nl

Tartózkodási idő: 1-3 perc

Detektálás: UV



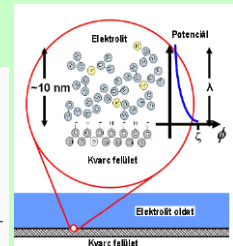
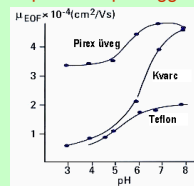
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

## MŰKÖDÉSI ELVE

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

A felületi potenciál pH-függő:

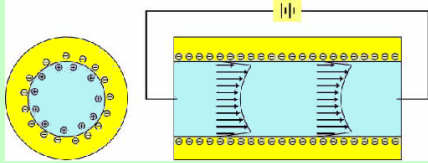


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## 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:  $v_{EOF} = (\epsilon\zeta/\eta)E$

ahol:  $\epsilon$  - dielektromos állandó

$\zeta$  - zéta potenciál

$\eta$  - viszkozitás

$E$  - térerősség

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

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

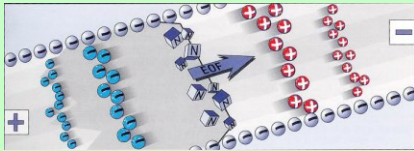


## KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

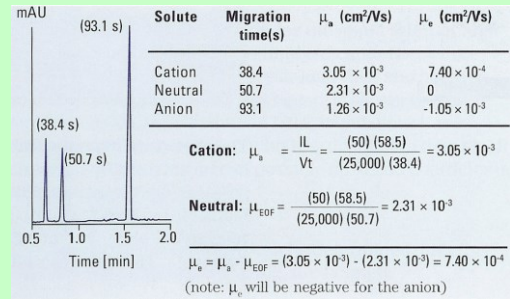
A molekula sebessége a az áramló folyadékéhoz előjel szerint hozzáadódik:  $v_{eredő} = v_{EOF} \pm v_{molekula}$

→ a pozitív töltésűek előre szaladnak, a negatívak pedig lemaradnak

→ szétválnak (hasonlít a kromatográfiához)



## SEBESSÉG-KÜLÖNBΣÉGEK



## BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

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

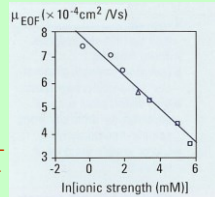
**pH:** magasabb pH-n jobban működik

**Ionerősség:** növelése rontja az elválasztást, mert:

- csökkenti a zéta potenciált
- növeli az áramerősséget, és ezzel a melegedést
- torzítja a csúcs alakját

**Detergens:** a kationosok lefedik a felületet és ezzel akadályozzák az áramlást

**Hőmérséklet, Viszkozitás**



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

