

IZOELEKTROMOS 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.

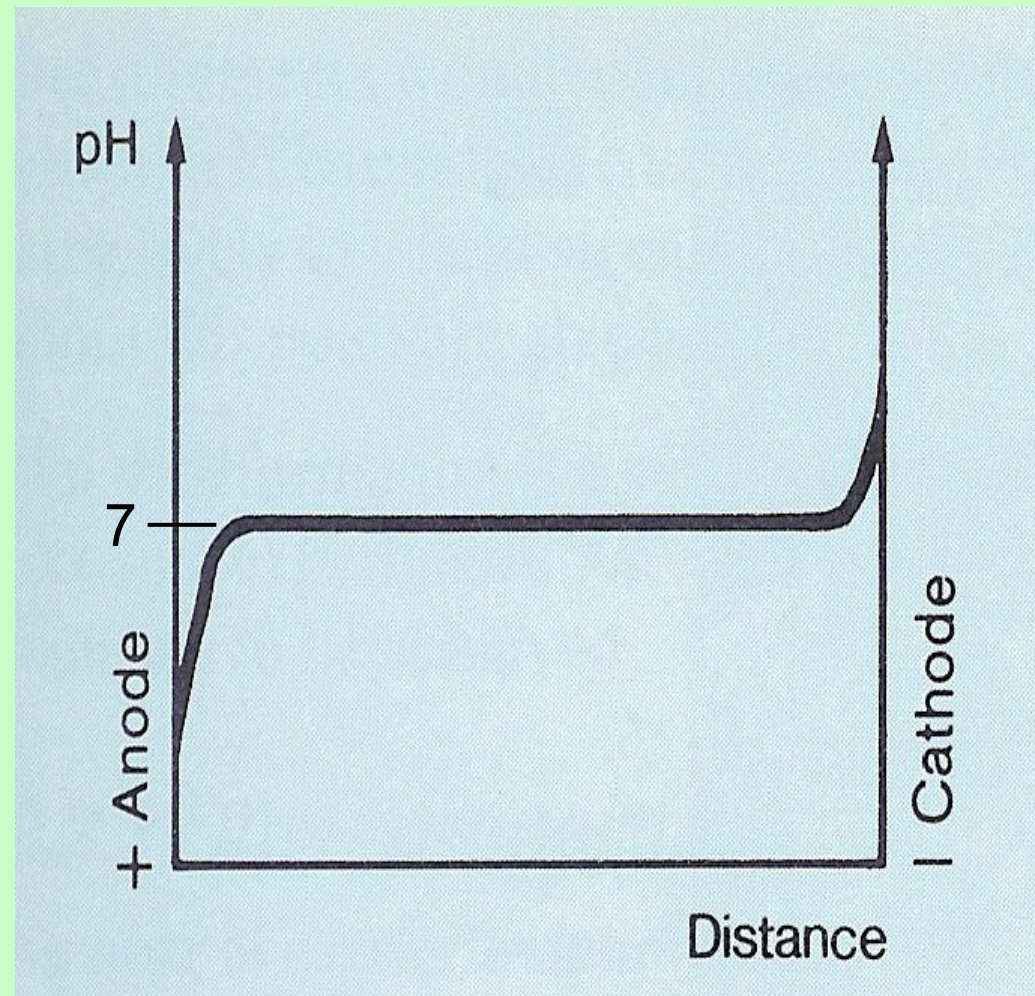
Ehhez pH gradienst kell létrehozni, egy speciális pufferrendszer → „polybuffer” segítségével.



POLYBUFFER

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

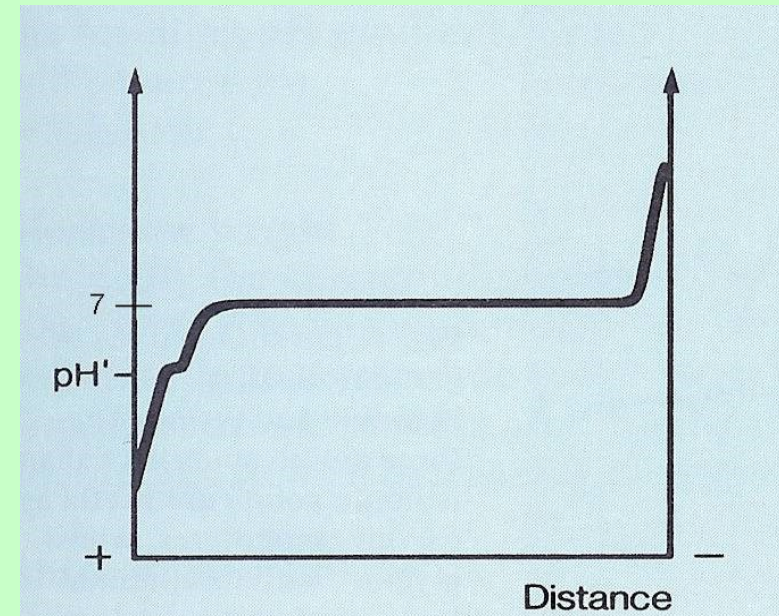
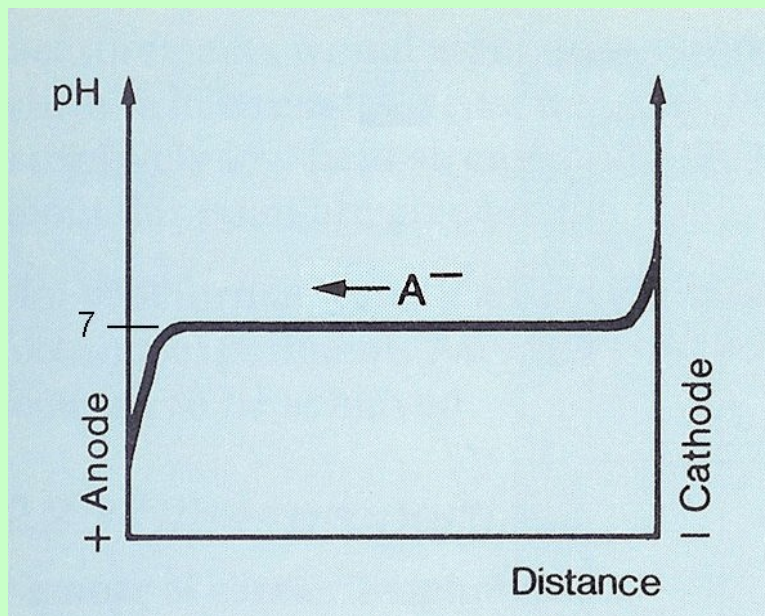
Az elektródokon a vízbon-
tás miatt egy nagyon vé-
kony rétegben sav, illetve
lúg keletkezik.



POLYBUFFER

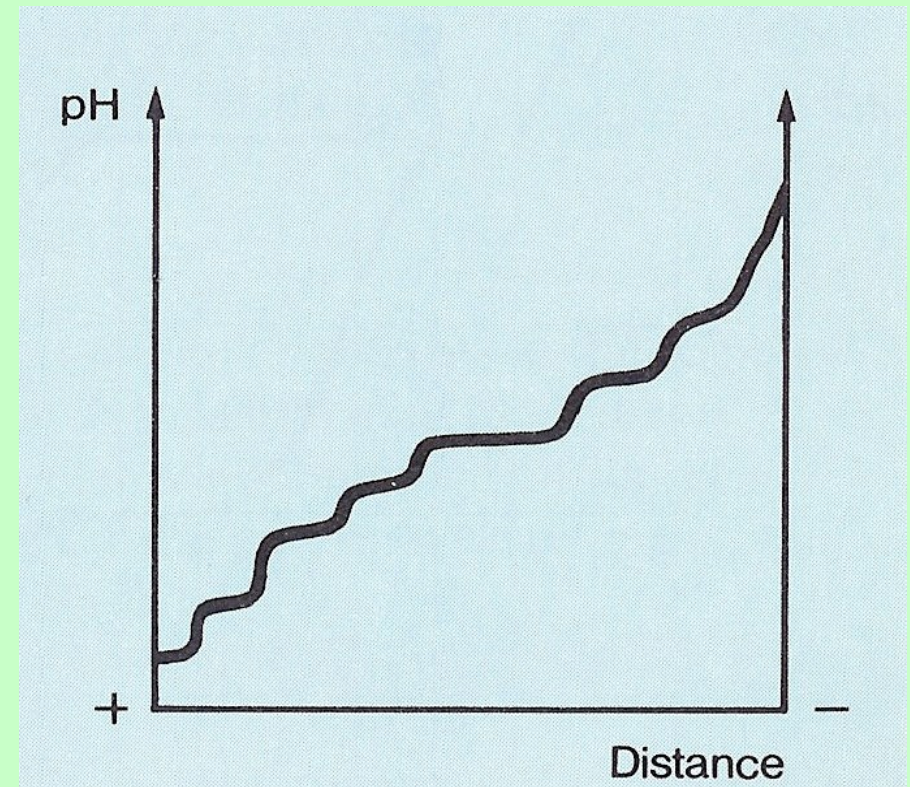
Ha ebbe a rendszerbe egy ikerionos anyagot, pl aminosavat teszünk, akkor az a semleges közegben mutatott töltésének megfelelő irányba indul el.

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.



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 vezetőképesége
- A molekulák legyenek kicsik (MW 300 – 1000 Da, gyors diffúzió)
- Ne legyen UV elnyelése $\lambda=280$ nm-nél (detektálás)
- Ne lépjen kölcsönhatásba semmivel

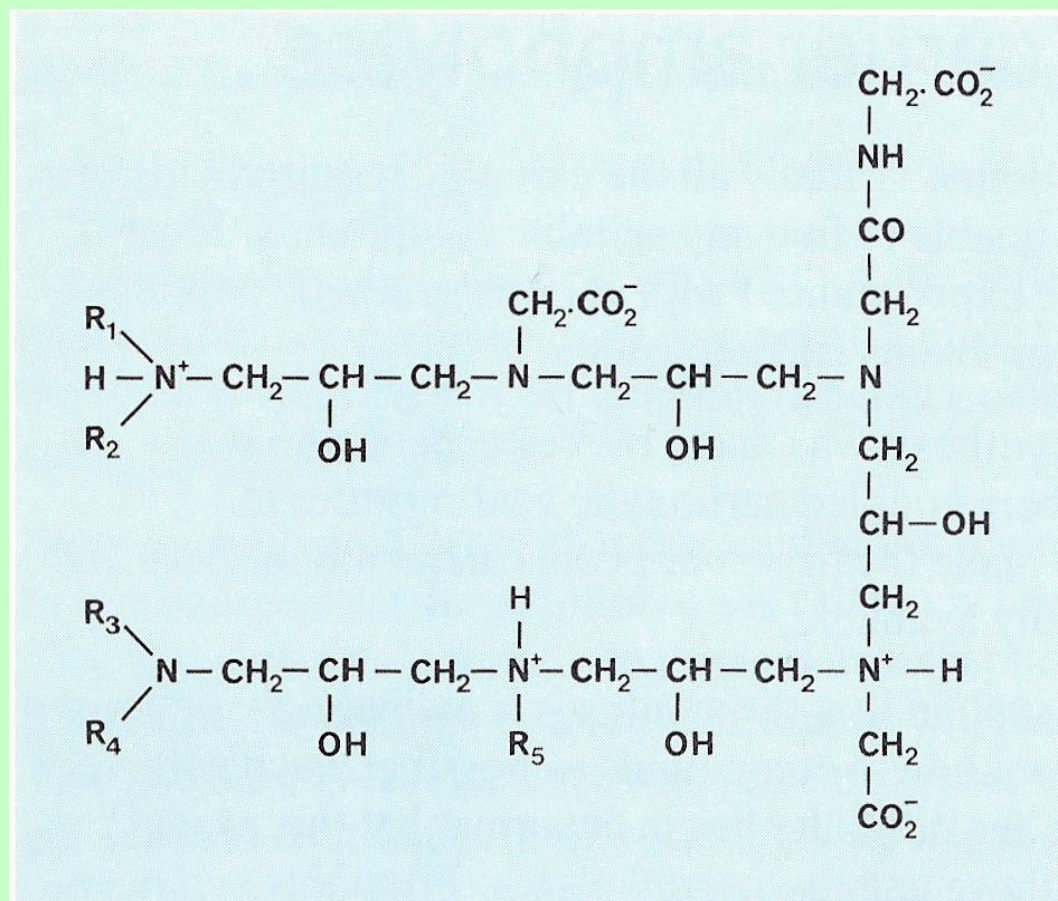


POLYBUFFER

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

Monomerek:

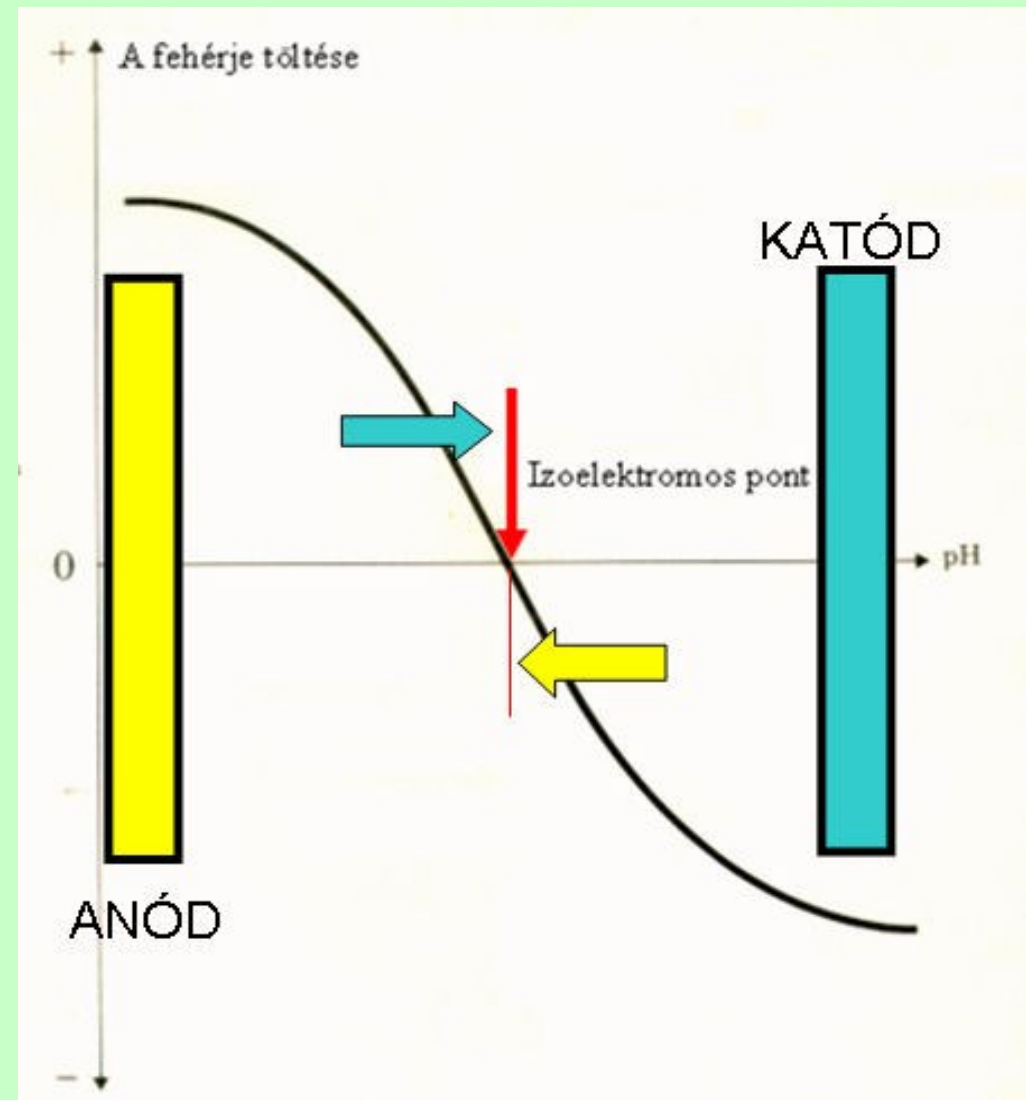
- glicin
- epiklórhidrin
- dialkil-amin



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.



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 mennyiségbe 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.



SÁVSZÉLESSÉG

A sávok szélessége a fehérje és a puffer tulajdonságaitól függ:

ZONE WIDTH IN ISOELECTRIC FOCUSING

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

σ – szórás

D – diffúziós állandó

$d\mu/dpH$ – az elektroforetikus mozgékonyág változása a pH függvényében az IEP-ban (a fehérje jellemzője)

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



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 – térősség

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:

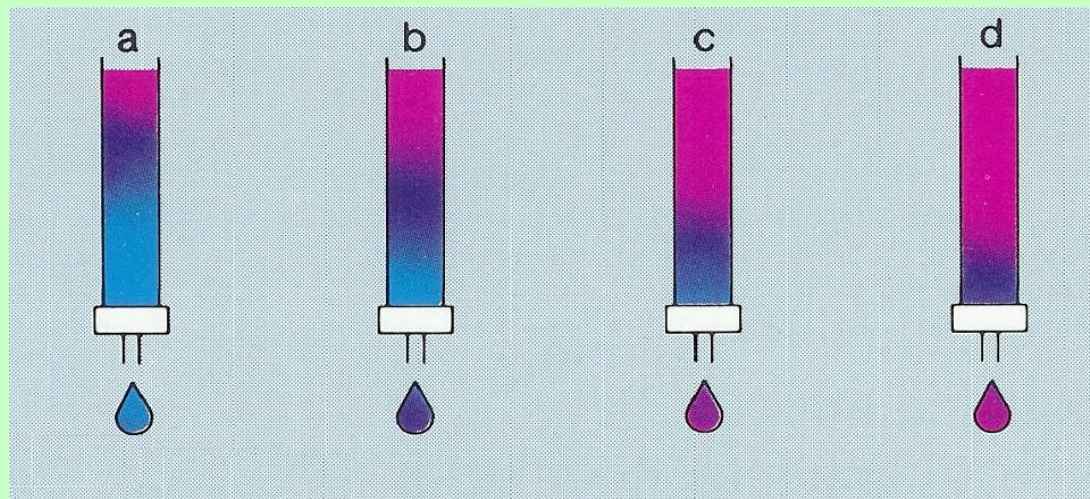
- Speciális (drága) puffer



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.



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).

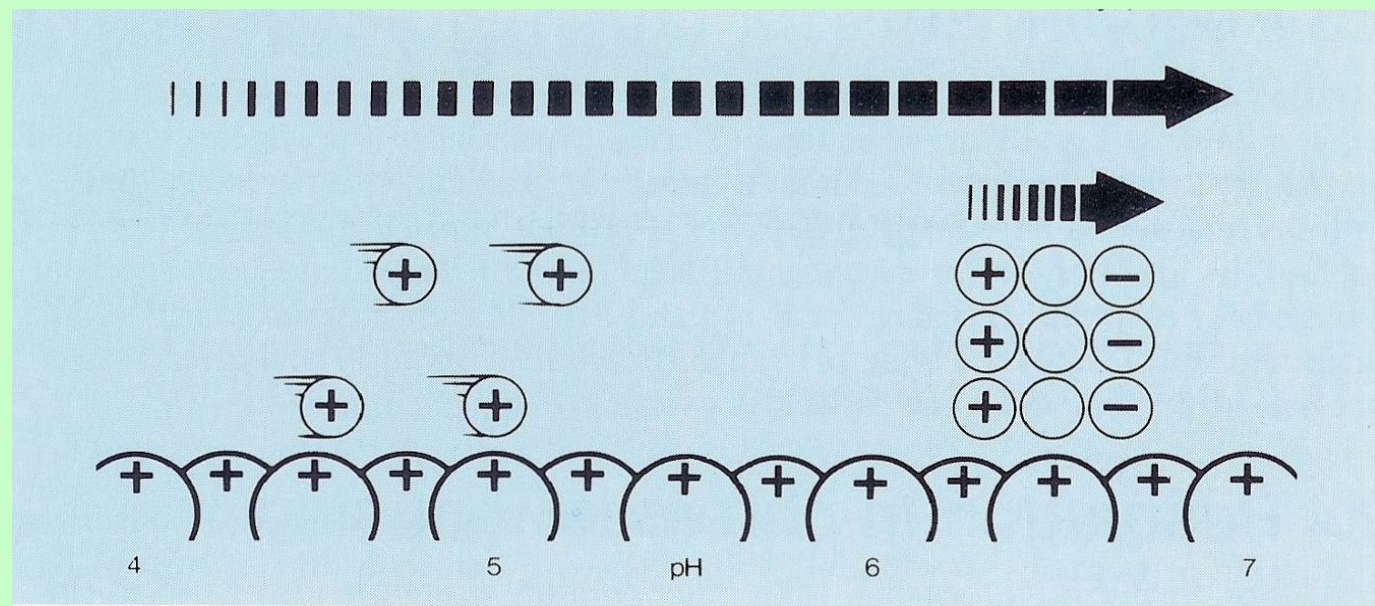
Ahogy a puffer halad az oszlopban, komponensei fokozatosan titrálják meg a töltet csoportjait, az átmeneti pH-jú zóna kiszélesedik és közel lineárisává válik.



KROMATOFÓKUSZÁLÁS

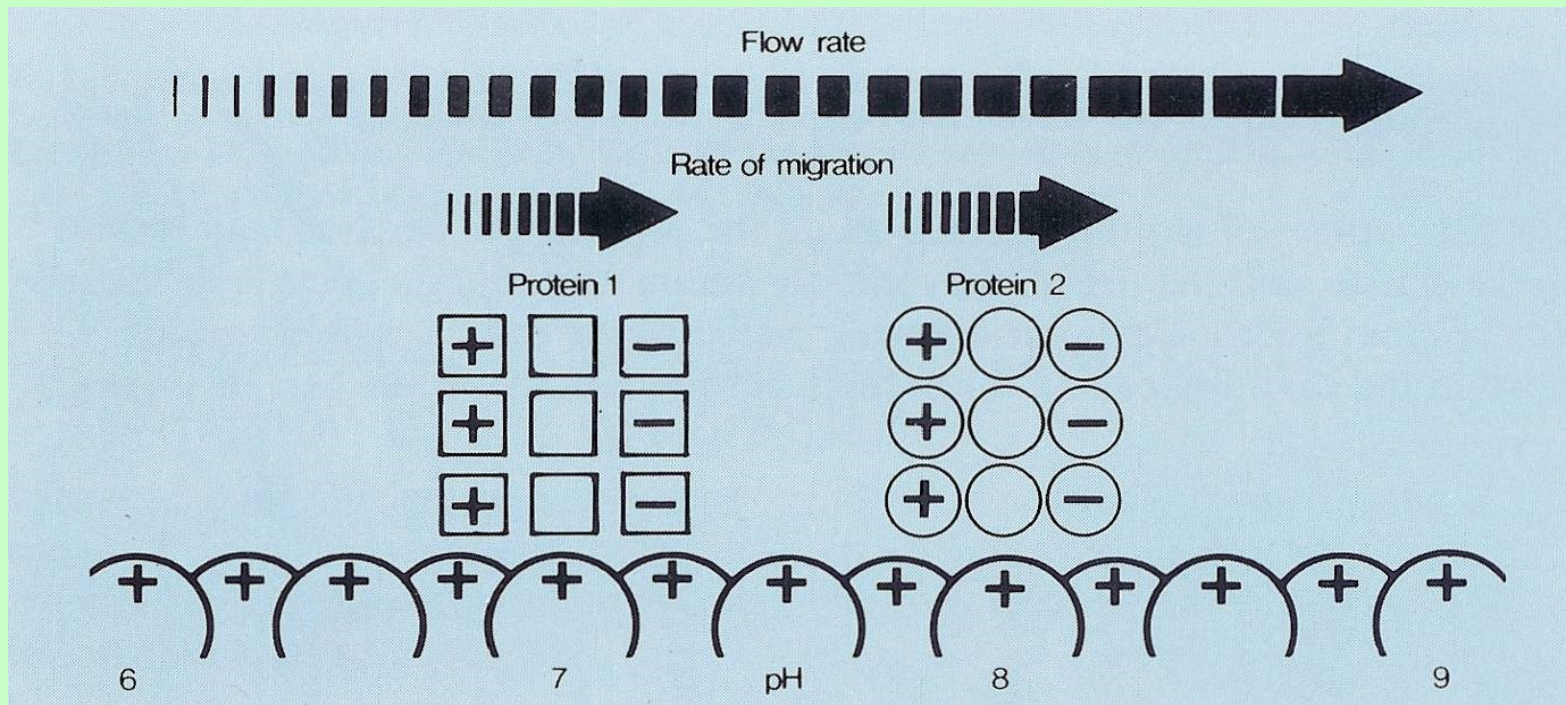
Ennek a lineáris gradiensnek is fókuszáló hatása van. A pufferben haladó fehérjék csak az IEP-jükig mehetnek előre, mert ennél töltésük előjelet vált, és megkötődnek, bevárják a később jövőket. A pH változásával leválnak, és az adott pH-jú (IEP) ponttal együtt vándorolnak végig a tölteten.

A puffer sokkal gyorsabban halad, mint a fehérjék.



KROMATOFÓKUSZÁLÁS

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



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).



KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Előnyei:

Jó felbontás, ~ 0,02 pH

Hátrányai:

Izoelektromos pH-n a fehérjék könnyen kicsapódnak

