# 3. Elválasztási technikák

Az egyes molekulákat bizonyos **fizikai és kémiai tulajdonságaik** (méret, tömeg, elektromos töltés, polaritás) különbözőségét kihasználva tudjuk elválasztani egymástól. Az elválasztáshoz legtöbbször valamilyen külső hajtóerő alkalmazása szükséges. Ilyen hajtóerő például a nyomás, a gravitációs erő, az elektromos vagy mágneses erőtér. Ezeket a hajtóerőket egyesével, vagy akár kombinálva is használhatjuk az egyes elválasztási technikák során. A fejezetben az egyes technikákat ismertetjük, mint látni fogjuk, hasonló elven alapuló elválasztási technikák hajtóereje lehet más és más.

## 3.1. Szűrés, koncentrálás

A legegyszerűbb és legtöbbet használt technikák közé tartoznak, alkalmazásukkor többnyire a részecskék méretének, illetve adott térfogatra vonatkoztatott tömegének különbözőségét használják ki. Legtöbbször szennyeződéseket, mikroorganizmusokat, víruspartikulumokat vagy makromolekulákat szoktunk ezekkel a módszerekkel eltávolítani az oldatból.

**Szűrés** során különböző mérettartományba eső molekulákat tudunk egymástól elválasztani. Valamilyen porózus membránra van szükségünk, amelynek **pórusmérete** meghatározza, hogy mekkora részecskék tudnak átjutni az egyik oldalról a másikra. A molekuláris biológiában elsősorban **mikroorganizmusokat** vagy **makromolekulákat** (pl. fehérjéket) szoktak elválasztani egymástól, vagy más jellegű anyagoktól.

A legegyszerűbb szűrők a medicinában általánosan használatos műanyag fecskendőkre illeszthetőek, a megszűrendő oldatot a fecskendő dugattyújának nyomásával préseljük át a membrán pórusain. Molekuláris biológiában a szűrést leginkább **sterilizálásra** használják.

Ha a szűrő sterilizálva volt, és a pórusméret elég kicsi (átmérője 0,2 µm), akkor ezen a módon tudunk hőérzékeny anyagot (pl. fehérjéket, szénhidrátokat) tartalmazó oldatokat csírátlanítani (ezáltal steril oldatokat kapunk). Ha nagyobb mennyiségű steril oldatra van szükségünk, akkor vákuum segítségével tudjuk átszívatni oldatunkat a szűrőn keresztül (3-1. ábra). Az egyszer használatos steril műanyag szűrők elég drágák, érdemes csak akkor használni őket, ha a csírátlanítás más úton (pl. hőkezeléssel) nem valósítható meg.

3-1. ábra

http://www.vial-seals.com/Images/nalgene-syringe-filters.jpg

2013.08.21.

http://static.coleparmer.com/large\_images/2953002APP.jpg

2013.08.21.

A szűrés egyik speciális esete a **koncentrálás**. Ilyenkor a membrán pórusain keresztül kipréseljük a folyadék többségét, hogy a pórusoknál nagyobb részecskék (víruspartikulumok, fehérjék stb.) a maradék, jóval kisebb térfogatú folyadékrészben immár nagyobb koncentrációban legyenek jelen. A folyadék átpréseléséhez többnyire centrifugális erőt használunk. Igen változatos térfogatú, pórusméretű és felépítésű koncentrátorokat tudunk vásárolni a biotechnológiai cégektől (3-2. ábra).

3-2. ábra

http://scientiis.com/laboratorium/catalog/images/Laboratory/F-2731-3.jpeg

2013.08.21.

A szűrés másik, igen gyakran használt speciális esete a **dialízis**. Akkor használjuk, ha kisebb méretű részecskéktől, pl. bizonyos ionoktól szeretnénk megtisztítani az oldatban lévő makromolekuláinkat (3-3. ábra). A dializálandó oldatunkat megfelelő pórusméretű **dialízis-zsákba** töltjük, melynek két végét speciális csipesszel légmentesen lezárjuk. A zsákot ezután egy nagy térfogatú, az eltávolítandó részecskéket nem tartalmazó folyadékba helyezzük, melynek következtében az eltávolítandó részecskék **lassú diffúzióval** kihígulnak a zacskóban (3-4. ábra). A folyamatot akár többször is megismételhetjük a dializáló oldat rendszeres lecserélésével. A dialízis viszonylag lassú folyamat, érdemes a dializáló oldatot folyamatosan, lassan kevertetni, és a makromolekulák (pl. fehérjék) degradációját megelőzendő hidegben (pl. hideg szobában vagy hűtőben) végezni. A dialízis egyik fejlettebb változata, hogy nem csipesszel lezárt dialízismembrán-zacskóba, hanem előre gyártott **dialízis-kazettába** töltjük a dializálandó oldatot. Ilyenkor a kazetta peremén található lyukon keresztül megfelelő méretű injekciós tűvel fecskendezhetjük be, vagy szívhatjuk ki az oldatunkat (3-5. ábra).

3-3. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikibooks/en/d/dd/Dialysis\_bag.png

2013.08.22.

3-4. ábra

http://www.piercenet.com/media/SnakeSkinBeaker190x233.jpg

2013.08.22.

3-5. ábra

https://static.thermoscientific.com/images/F139899~wl.jpg

2013.08.22.

**3.2. Centrifugálás**

Talán a legelterjedtebb elválasztási forma a **centrifugálás**. Az elválasztás sűrűség szerint történik. A centrifuga tulajdonképpen megnöveli azt a gravitációs erőteret, melynek segítségével a nagyobb sűrűségű molekulák a cső aljára ülepednének, csak nagyon lassan. A sokszorosára (gyakran sok ezerszeresére) növelt erőtér segítségével az ülepedés jelentősen meggyorsítható. Jellemzően centrifugálással lehet **csapadékokat és sejtalkotókat ülepíteni** folyadékokból, különböző **folyadékfázisokat szeparálni** egymástól, vagy **sűrűséggradiens** segítségével szeparálni különböző tömegű partikulumokat, molekulákat. A centrifugálás során sosem szabad elhanyagolni a kiegyensúlyozást; a rotorban úgy kell elhelyeznünk az azonos tömegű csöveket, hogy a centrifugálás során a rotor tengelyére ható erők összege 0 legyen. Ellenkező esetben súlyos, maradandó károsodást okozhatunk a műszerben vagy/és a rotorban.

Igények szerint többféle centrifugatípusból választhatunk. Kis mennyiségű minta esetén **mikrocentrifugát** érdemes használni. A 0,2–2 ml végtérfogatú centrifugacsövekben **szögrotor** segítségével maximum 15 000–30 000 g relatív gyorsulás segítségével választhatjuk el a frakciókat. Nagyobb térfogatú mintákhoz vagy nagyobb fordulatszámhoz nagyobb méretű és teljesítményű centrifugát kell használni. Biológiai mintákról lévén szó, fontos, hogy a centrifugatér hűthető legyen. Leggyakoribb a 4 ºC hőmérsékleten történő centrifugálás. Ezekbe a centrifugákba többnyire különböző nagyságú és alakú centrifugacsövek illeszthetőek, attól függően, milyen rotort és milyen csőtartót használunk a centrifugáláshoz. A rotorok többnyire egymással cserélhetőek; többféle szögrotor és többféle **kilendülőfejes rotor** tartozhat ugyanahhoz a centrifugához. (Szögrotorban a forgás során a minták mindig ugyanabban a szögben állnak, míg kilendülőfejes rotorban a minták a forgás hatására kilendülnek. Utóbbi esetben az ülepítés mindig a cső alja irányába történik.) A rotorok jellege szabja meg az elérhető maximális fordulatszámot is.

Ha nagyon nagy relatív gyorsulásra van szükségünk (például bizonyos sejtalkotók izolálásakor), akkor **ultracentrifugát** kell használnunk. Az ultracentrifugák nagyon alacsony nyomáson és mindig hűtött állapotban üzemelnek, hogy a levegő ellenállása kisebb legyen és a rotorok nagy forgási sebességének hőtermelését kompenzálják. Segítségükkel akár több százezer (akár egymillió) g relatív gyorsulás is elérhető.

3-6.ábra

http://img.medicalexpo.com/images\_me/photo-g/laboratory-micro-centrifuge-68382-102771.jpg

2013.08.22.

http://eshop.eppendorfna.com/upload/productView/Eppendorf-5804R\_Multipurpose-Centrifuge-open.jpg

2013.08.22.

http://fraden.brandeis.edu/figs/techniques/optima\_xli.jpg

2013.08.22.

3-7. ábra

http://eshop.eppendorfna.com/upload/productView/Eppendorf\_5430\_rotor\_F-35-6-30.jpg

2013.08.22.

http://eshop.eppendorfna.com/upload/productView/Eppendorf\_5804-5810\_Rotor-A-4-44\_4x100ml.jpg

2013.08.22.

Ultracentrifuga segítségével használatos a **gradiens centrifugálás** technikája. Ilyenkor viszonylag nagy sűrűségű anyagok segítségével a centrifugacsőben sűrűséggradienst hozhatunk létre a különböző sűrűségű oldatok óvatos egymásra rétegezésével (3-8A. ábra), vagy hosszú ideig tartó, a mintával együtt történő centrifugálással (3-8B. ábra). Az előbbi esetben a **szedimentációs tulajdonságuk**, az utóbbiban a **sűrűségük** alapján választhatóak el az anyagok. Leggyakrabban **cézium-kloridot** (például nukleinsavak és fehérjék elválasztásához), **szacharózt, ficollt** vagy **percollt** (sejtalkotók vagy víruspartikulumok elválasztásához) használnak sűrűséggradiens-képző anyagként.

3-8. ábra

http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/centrifugation-separations.html

2013.08.22.

**3.3. Kromatográfia**

Kromatográfia során a molekulákat egy folytonos (többnyire szilárd, vagy szilárdhoz adszorbeálódott folyadék) „**álló fázis**”, és a mintánkat tartalmazó, az álló fázison keresztülhaladó „**mozgó fázis**” segítségével választjuk el. Az elválasztás a molekulák valamely fizikai vagy kémiai tulajdonsága alapján történik. Aszerint, hogy az elválasztandó molekulák mely jellegzetes tulajdonságát használjuk ki, megkülönböztetünk kizárásos, megoszlási, adszorbciós, ioncserés és affinitás kromatográfiákat. A mozgó fázis jellege szerint megkülönböztetünk **gáz- és folyadékkromatográfiát**. A kromatográfia legtöbbször egy henger alakú (gázkromatográfia esetén spirál alakban feltekert, igen hosszú) csőben történik (**oszlopkromatográfia**, 3-9. ábra), de történhet kromatográfia vékony rétegen (pl. speciális papírlapon) is. Különbözőféleképpen **detektálhatjuk** a kromatográfiás elválasztás eredményét. Detektálhatunk látható, infravörös vagy ibolyántúli **fényt**, **fluoreszcenciát**, **radioaktív sugárzást**, vagy használhatunk **tömegspektrométert** is az azonosításhoz.

3-9. ábra

http://lab-training.com/wp-content/uploads/2011/12/liquid-Chromatography-copy2.jpg

2013.08.23.

**3.3.1. Kizárásos kromatográfia**

Kizárásos kromatográfiával **eltérő méretű** molekulákat tudunk elválasztani egymástól. Az elválasztás lényege, hogy az oszlopot olyan apró gyöngyökkel töltjük meg, amelyeknek a belseje **szivacsszerűen üreges**. (Az apró gyöngyök többnyire agarózból, dextránból vagy poliakrilamidból készülnek, a folyadékban géles állagú anyagot alkotnak. Ezt a kromatográfiatípust ezért gélkromatográfiának is nevezik.) Az elválasztandó anyagot tartalmazó mintát az oszlop tetejére tesszük, majd hagyjuk, hogy az oszlopon keresztülfolyva az elválasztott mintánk végül az oszlop alján távozzon. Az oszlopot felülről folyamatosan folyadékkal tápláljuk, az alul kifolyó mintát pedig frakciónként összegyűjtjük. Az oldatban lévő nagyobb molekulák méretük miatt nem képesek a gyöngyök belsejébe hatolni, ezért a köztük lévő réseken keresztül viszonylag gyorsan az oszlop aljára érnek, így a korábban leszedett frakciókban találhatóak. A kisebb molekulák azonban bejutnak a gyöngyökbe, ott zegzugos útjuk hosszabb ideig tart, ezért csak később érnek az oszlop aljára, így a későbbi frakciókban találjuk majd meg őket.

**3.3.2. Adszorpciós kromatográfia**

Az adszorpciós kromatográfia során azt használjuk ki, hogy az elválasztandó molekuláknak **eltérő a polaritásuk.** Attól függően, hogy az elválasztandó molekulák polaritása inkább az álló fázis, vagy inkább a mozgó fázis polaritásához hasonlít jobban, lassabban vagy gyorsabban fognak mozogni. Itt az oszlop polaritási tulajdonságai határozzák meg, hogy az adott anyag milyen gyorsan halad át rajta. Minél hasonlatosabb a molekula polaritása az oszlopéhoz, annál jobban kötődik hozzá, annál lassabban halad át rajta. Természetesen különböző oldószerek vagy oldószerkeverékek használatával jelentősen változtatható az asszociáció foka. Az adszorpciós kromatográfia egyik fajtája a **gázkromatográfia** is. Itt nem folyadék, hanem inert gáz áramlik az oszlopban (többnyire hélium, nitrogén vagy hidrogén), ez szállítja az elpárologtatott mintából származó molekulákat (3-10. ábra).

3-10. ábra

http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gcdiag.gif

2013.08.23.

http://www.kth.se/polopoly\_fs/1.171222!/image/GC6890.jpg

2013.08.23.

**3.3.3. Megoszlási kromatográfia**

A megoszlási kromatográfia is hidrofil és hidrofób kölcsönhatásokon alapszik. Az elválasztás elősegítésére különböző polaritású komponensekből álló oldószerkeverékeket alkalmazunk. A szilárd fázishoz inkább hasonló polaritású oldószerkomponens molekuláinak egy része a gyöngyökhöz tapad, ezek alkotják a tulajdonképpeni álló fázist. Az elválasztandó anyagok polaritásuknak megfelelően oszlanak meg az álló és a mozgó fázis odószerkomponensei között. Ha a keverékben növeljük az álló fázis polaritási tulajdonságaival megegyező polaritású komponens arányát, akkor az az elválasztandó molekulák motilitásának megnövekedését fogja eredményezni (mivel a mozgó fázis oldószerkeverékének polaritása hasonlóbb lesz az álló fáziséhoz). Tipikus megoszlási kromatográfia a **papír-** és a **vékonyréteg-kromatográfia** (3-11. ábra). Az oldószer mozgatásának hajtóerejét itt a hajszálcsövesség adja. Hidrofil álló fázison inkább a hidrofób oldószer-molekulák, hidrofób álló fázison inkább a hidrofil oldószer-molekulák és a bennük jobban oldódó anyagok haladnak gyorsabban.

3-11. ábra

http://www.uwplatt.edu/chemep/chem/chemscape/labdocs/catofp/chromato/tlc/pic/rfcalc.gif

2013.08.23.

**3.3.4. Ioncserés kromatográfia**

Az ioncserés kromatográfiával **töltéssel rendelkező** részecskéket tudunk elválasztani egymástól. Ilyenkor az álló fázis (az oszlopban lévő gyanta) töltéssel rendelkező funkciós csoportokat tartalmaz, a mozgó fázis ellenkező töltésű molekulái (például az elválasztani kívánt anyagok) képesek megtapadni a gyanta felszínén. Az elúció során az oszlopon átfolyó oldószer összetételét megváltoztatjuk, vagy a pH-t változtatjuk, vagy az ionerősséget növeljük benne. Előbbi esetben a kapcsolódó anyagok töltésének megváltozása, utóbbi esetben az ellenionok kompetíciója miatt a megkötődött anyagok eluálódnak az oszlopról. Az elúció függ az anyagunk **töltésének erejétől**, és az oldószer **ionerősségétől**. Gyakran **lépcsőzetes**, vagy **gradiens elúcióval** lehet egy adott molekulát elválasztani a többitől (az előbbi esetben az oldószer összetételét szakaszosan, az utóbbi esetben folyamatosan változtatjuk).

**3.3.5. Affinitás kromatográfia**

Affinitás kromatográfia esetén az oszlopra olyan anyag van kötve, mely nagy affinitással, **specifikusan köt** az elválasztani kívánt molekulához. Jó példa erre, ha egy enzimfehérjét szeretnénk tisztítani, ekkor a **szubsztrátot**, vagy ahhoz nagyon hasonló molekulát kell kötnünk az oszlophoz. **Specifikus antitestekkel** is tudunk fehérjéket tisztítani affinitás-oszlopon. Az affinitás kromatográfia csak **egyféle** anyag (többnyire egyféle fehérje) megtisztítására szolgál. Az elúció a pH vagy az ionerősség változtatásával, illetve szabad specifikus kötőmolekula (pl. a szubsztrát) nagy feleslegben történő adásával kivitelezhető.

**3.4. Gélelektroforézis**

Gélelektroforézis segítségével a makromolekulálat három fizikai tulajdonságuk, a **méretük**, **alakjuk** és a **töltésük** alapján tudjuk elválasztani. A gél egy **térhálós** szerkezetű anyag, mely a háló fonalai között igen sok vizet (jelen esetben megfelelő ionerejű és kémhatású puffert) tartalmaz. A gélelektroforézist leggyakrabban nukleinsavak és fehérjék elsősorban méret szerinti elválasztására használják. A **nukleinsavak fajlagos** (adott méretre vonatkoztatott) **töltése ugyanannyi**, ezért ha alakjuk is megegyezik (pl. mind lineáris), akkor az elválasztás kizárólag a **méretük szerint** megy végbe. A **fehérjék töltése** függ a bennük lévő **aminosavak minőségétől** és a futtató puffer kémhatásától. Ha azt szeretnénk, hogy a fehérjék is csak a molekulatömegük szerint választódjanak el, és a mozgás sebességét sem a fehérje töltése, sem az alakja ne befolyásolhassa, akkor a fehérjék inter- és intramolekuláris kapcsolatait meg kell szüntetnünk, és a nukleinsavakéhoz hasonló, fajlagosan közel azonos töltést kell létrehoznunk.

Méret szerinti elválasztás esetén nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy az ismeretlen mintáink mellett mindig kell futtatnunk egy ismert tömegű/hosszúságú fehérjéket/nukleinsevakat tartalmazó ún. **molekulamarkert.** A gélelektroforézisnek a térhálót alkotó anyag minőségétől függően két fajtája van: az **agaróz** és a **poliakrilamid** gélelektroforézis.

**3.4.1. Agaróz gélelektroforézis**

Tengeri vörösmoszatokból nyerhető az **agar-agar** nevű gélképző anyag, melyet már a középkori Japánban használtak zselésítésre, táplálékok készítésére. Ma is használják, a molekuláris biológiában és a mikrobiológiában elsősorban baktériumok, élesztőgombák, vagy növényi kalluszok tenyésztéséhez, mint a táptalajok szilárdító közegét. Alapvetően kétféle poliszacharid építi fel, a kémiailag heterogén molekulákból álló agaropektin és a homogén **agaróz**. Az agaróz poliszacharid agarobióz építőkövekből áll, mely egy diszacharid: D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-galaktopiranóz kapcsolódik egymáshoz 1-4 kötéssel (3-12. ábra). Az agarózt porszerű kiszerelésben árusítják, melyet 0,7–4 tömegszázalékban szokták a folyadékhoz (megfelelő összetételű pufferhez) keverni, majd melegítéssel csaknem 100 °C-on **felolvasztani**. A felolvasztott gél kb. 45 °C-ig lehűlve nem szilárdul meg. Megszilárdulás után ismét csak magas hőmérsékleten (100 °C) olvad meg újra. Ezt a jelenséget hiszterézisnek nevezzük (3-13. ábra).

3-12. ábra

http://images.usbio.net/agarose\_polymere.jpg

2013.08.23.

3-13. ábra

http://students.washington.edu

2011.02.12.

A felolvasztott agaróz gélt addig kell kevertetnünk, amíg teljesen homogén, szinte víztiszta nem lesz. Ezután vízfürdővel 50-55 °C-ig kell hűtenünk, mert a túl forró folyadék tönkreteheti a műanyag tálcát. A gélt ezután vízszintes felületre helyezett, megfelelően (pl. ragasztószalaggal) elmaszkolt speciális **tálcába öntjük**. A minták felviteléhez ún. zsebek szükségesek, ezért a gél fölé, az egyik oldal közelébe csaknem a tálca aljáig leérő műanyag „**fésűt**” illesztünk, hogy a gél megszilárdulása után a fésű fogainak helyén üregek (**zsebek**) maradjanak (3-14. ábra). A gél megszilárdulása után a fésűt óvatosan kihúzzuk a zsebekből (érdemes előtte a fésű környékét megnedvesítenünk, hogy a keletkező vákuum ne szakítsa ki a zsebeket). A tálca két végét szabaddá kell tennünk (pl. leszedjük a ragasztószalagot), majd a tálcát egy ún. gélfuttató kádba helyezzük. A kádat megfelelő ionerősségű futtató pufferrel töltjük, hogy az éppen ellepje a gélünket. Ezután pipettázzuk az elválasztandó mintát a gélzsebekbe. Mivel a mintákhoz glicerint kevertünk, azok lesüllyednek a zsebek aljába (ez a szintén a mintákhoz kevert brómfenolkék festék miatt jól látszik). Ha minden mintát betöltöttünk, rátesszük a futtatókádra a tetejét, és elektromos áram segítségével a gélen elválasztjuk makromolekuláinkat (3-15. ábra).

3-14. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2a/Agarose\_Gel,\_with\_Comb\_inserted,\_in\_a\_Gel\_Tray\_(Front,\_angled\_view)\_-\_SketchUp.png

2013.08.23.

3-15. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Agarose-Gelelektrophorese.png

2013.08.23.

Agaróz gélelektroforézis során jellemzően nukleinsavakat választunk el egymástól. A **nukleinsavak negatív töltésűek**, mindig a pozitív pólus felé futnak, csakúgy, mint a vizualizáció elősegítésére felvitt festékek (brómfenolkék, xiléncianol stb.). Futtatás közben a nukleinsavak nem látszanak (a 3-15. ábra kissé megtévesztő lehet), a gélen futó festékek fognak nekünk segíteni, hogy mennyi ideig szükséges az elektroforézist folytatni. Az agarózgél viszonylag nagy tartományban (**0,1–20 kilobázispár**) képes a nukleinsavakat elválasztani, de a gél felbontása elég rossz. Kisebb fragmentek elválasztásához töményebb, nagyobb fragmentek elválasztásához hígabb gélt használunk.

A futtatáshoz használt pufferben Tris-hidroximetil-aminometán (TRIS), etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) és borát vagy acetát található. (A puffer neve ezért **TBE** vagy **TAE**, ugyanaz a puffer található a gélben is.) A megfelelő ideig történt futtatás után a feszültséget kikapcsoljuk, és a gélt **megfestjük**. A nukleinsavak esetében a gélt valamilyen, a nuleinsavakhoz kötődni képes, **interkalálódó fluoreszcens festék** (például **etídium-bromid**, EtBr) oldatában inkubáljuk, majd az elválasztott nukleinsavakat a **fluoreszcens** festéket gerjeszteni képes fénnyel (etídium-bromid esetében **UV-fénnyel**) vizualizálhatjuk (3-16. ábra).

3-16. ábra

http://www.musee-afrappier.qc.ca/images/site/large/gel-agarose-adn-nicole-catellier.jpg

2013.08.23.

**3.4.2. Pulzáló erőterű gélelektroforézis**

**Nagyobb DNS-fragmentek** elválasztása is megvalósítható agaróz gélelektroforézissel. Ehhez azonban az szükséges, hogy a DNS-darabok **ide-oda mozgatásával** elősegítsük a térhálón történő átjutásukat. Ezt úgy oldjuk meg, hogy az elektromos erőtér pozitív pólusa nem mindig a gél alja felé húzza a nukleinsavat, hanem időről időre más irányba is. Ehhez speciális elektroforézis készülék szükséges. Többfajta is ismeretes, a legismertebbek nem lefelé (a gél alja felé), hanem felváltva, bizonyos szögben jobbra-balra rángatják a DNS-t. Ennek a rángatásnak az eredője egy lefelé irányuló futtatás (3-17. ábra).

3-16. ábra

https://lh3.googleusercontent.com/-70aOb5sik9M/ShOg05PUyII/AAAAAAAABuA/d0IIlC\_4XKY/AMG410b.jpg

2013.08.22.

**3.4.3. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)**

Az **akrilamid** (3-18. ábra) kettős kötésének köszönhetően képes polimerizálódni, hosszú láncok képződhetnek. Ha N,N’-metilén-biszakrilamiddal (**biszakrilamid**, bisz) együtt polimerizálódik, az két szomszédos láncba is beépülhet, összekötve azokat. Így egy **térhálós szerkezet** alakulhat ki, mely hidrofil tulajdonsága miatt gélképző anyag. Ez a térháló kovalensen kötött, melegítésre sem olvad meg. A térháló sűrűségét megszabja az oldott akrilamid koncentrációja és az akrilamid/biszakrilamid aránya (3-19. ábra).

3-18. ábra

3-19. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/Acrylamide\_gel\_(zh-cn).svg

2013.08.23.

A gél elkészítéséhez általában előre elkészített akrilamid/bisz tömény (30%, 40%) oldatát szoktuk használni, melyben az akrilamid:biszakrilamid arány előre meghatározott (19:1, 29:1, 37,5:1). A gélt vízzel és pufferrel megfelelő arányban kihígítjuk, szükség esetén detergenst is adunk az oldathoz. A poliakrilamid géleket vertikálisan (függőlegesen) futtatjuk, és így is készítjük el őket. Két üveglapot megfelelő műanyag lapkák (**spacerek**) segítségével olyan közel szorítunk egymáshoz, hogy a két lap közötti távolság igen csekély, 0,75–2 mm legyen. Az üveglapok alját gumipárnára szorítjuk, hogy a közéjük töltött gél alul ne folyjon ki (az oldalán ezt a spacerek akadályozzák meg). Az előbb elkészített akrilamidos folyadékhoz katalizátorokat, **ammónium-perszulfátot** (APS) és tetrametilén-diamint (**TEMED**) adunk, amely elősegíti a polimerizációt. Gyors keverés után az oldatot légmentesen a két üveglap közé kell töltenünk, ahol körülbelül 20 perc alatt megszilárdul (3-20. ábra).

3-20. ábra

http://www.di.uq.edu.au/sparq/images/sdspage.jpg

2013.08.23.

Ha nukleinsavakat futtatunk, futtató puffernek az agaróz gélelektroforézisnél megismert puffert (pl. TAE, TBE) használunk. Általában rövidebb DNS-fragmentumokat (pl. **PCR primerek**) szoktak elválasztani tömény (20%) poliakrilamid gélen, mert a technika sokkal jobb felbontású, mint az agarózgél-elektroforézis. Ilyenkor általában 19:1 akrilamid:biszakrilamid keveréket használunk a gél készítésénél.

Mivel a fehérjék eltérő töltésűek, fehérjék futtatásakor olyan futtató puffert kell választanunk, amely lúgos kémhatású. Ilyenkor a fehérjékben lévő aminosavak oldalláncainak többsége deprotonálódik, a fehérjék **negatív töltésűek** lesznek, és a **pozitív pólus felé** fognak futni. Azonban a fehérjék alakja, feltekeredettségének mértéke, és a fehérje-fehérje kapcsolatok többsége nem változik meg. Mivel a natív konformáció megmaradt, ezt **natív gélelektroforézisnek** hívjuk.

Ha azt szeretnénk, hogy a nyílt láncú nukleinsavakhoz hasonlóan a fehérjék is csak a méretük szerint váljanak el, akkor a fehérjemintánkat megfelelő módon elő kell kezeljük, és a futtatópuffer összetételét is meg kell változtatnunk. A fehérjemintáinkhoz ilyenkor nátrium-dodecil-szulfát (**SDS**) detergenst és valamilyen redukálószert (**β-merkaptoetanolt** vagy ditiotreitolt (**DTT**) adunk. Az SDS a fehérjékhez **aspecifikusan kötődik**, kitekeri a fehérjéket és ionos tulajdonsága miatt megközelítőleg **azonos fajlagos** (negatív) **töltést** biztosít a fehérjéknek. A redukálószer melegítésre elredukálja az intermolekuláris diszulfidhidakat, végleg **megszüntetve** a fehérjék **natív térszerkezetét**. A futtató pufferbe szintén detergenst (SDS) kell tenni, hogy a fehérjék egységesen kitekeredett konformációja ne alakuljon vissza a futtatás során.

SDS-PAGE során többnyire kétfázisú gélt kell öntenünk. Az alsó fázis (**szeparáló gél**) elkészítését már ismertettük, de itt SDS-t is kell az oldatba tennünk. és a gélt is csak bizonyos magasságig (a belógó fésűfogak alsó pereme alá néhány milliméterrel) tölthetjük az üveglapok közti rést. Az öntés után az alsó fázis tetejére valamilyen alacsony felületi feszültségű és fajsúlyú folyadékot (pl. izopropanolt vagy butanolt) kell rétegeznünk, hogy a megszilárdult gél felszíne buborékmentes és teljesen sík alakú legyen. Az alsó fázis megszilárdulása után a maradék alkoholt leöntjük, majd elkészítjük a gél felső fázisát (tömörítő gél) (3-19. ábra). Ez annyiban különbözik az alsó fázistól, hogy hígabb (4-5%, szemben az alsó fázis tipikusan 7,5–12,5%-ától), és kémhatása savasabb (pH: 6,8 az alsó fázis pH: 8,8-hoz képest). Az APS és a TEMED hozzámérése után a felső fázist rátöltjük a már megszilárdult alsó fázis tetejére, majd a fésű óvatos, légmentes beillesztése után hagyjuk azt is megszilárdulni.

A kész gélt tartalmazó üveglapokat hozzáerősítjük a futtatókádhoz, majd a korábban már leírt módszer segítségével óvatosan kihúzzuk a fésűt a zsebekből. A futtatókád alsó és felső tartályát is feltöltjük futtató pufferrel, hogy a gél felső és alsó pereme buborékmentesen illeszkedjen a tartályokban lévő folyadékhoz. Ügyeljünk arra, hogy csak a gél zárja a két pólus közötti áramkört, máshol ne haladhasson át töltés, csak a gélen keresztül. A gél zsebeit futtatás előtt érdemes pipettával kitisztítani, mert az utólag polimerizálódott akrilamid hullámossá teheti a zsebek alját, vagy el is tömheti azokat.

A minták zsebekbe töltését követően az elektroforézis a szokásos módon történik. Ha kétfázisú gélünk van, akkor a tömörítő gélben futva a mintánk a pH-különbségek (itt most nem ismertetendő következményei) miatt összetömörödik, és az elválasztandó fehérjék mintegy egy vonalban érik el a szeparáló gél felszínét. Itt kezdődik el a fehérjék elválása egymástól.

A futtatás befejezése után a fehérjék több módon is detektálhatóak. Vagy aspecifikusan festjük őket **coomassie-** vagy **ezüstfestékkel** (3-21. ábra), vagy a fehérjéket membránra átvive, antitestekkel specifikusan mutathatjuk ki bizonyos fehérjék jelenlétét. (Ezt az utóbbi módszert a későbbiekben részletesen ismertetjük).

3-21. ábra

**3.4.4. Kétdimenziós (2D) gélelektroforézis**

Ha egy sejt vagy sejtalkotó összes fehérjéit szeretnénk vizsgálni, akkor nem elég őket csak a méretük szerint vizsgálni, mert sok hasonló méretű fehérje lehet, amelyek elfedik egymást a gélen. Nagyon valószínű azonban, hogy nem fogunk két olyan fehérjét találni, amelyeknek a tömege és az izoelektromos pontja is ugyanaz. (Az izoelektromos pont az a kémhatás, ahol a fehérjék nettó elektromos töltése 0.) Ezt kihasználva az összes fehérjét el tudjuk választani egymástól, ha **előbb izoelektromos pont szerinti, majd méret szerinti elválasztást** végzünk. Az izoelektromos pont szerinti elválasztást egy **folytonos pH-gradienst** tartalmazó agaróz vagy poliakrilamid **gélcsíkban** hozzuk létre. Ezt hívjuk **izoelektromos fókuszálásnak**. A pH-gradienst a csíkban amfoter jellegű, ikerionos szerkezetű elektrolitok (**amfolitok**) hozzák létre, amelyeket többnyire három komponens statisztikus kondenzációjával hoznak létre. Elektromos áram hatására a fehérjék töltésüknek megfelelően mozognak. Közben protonokat adnak le vagy vesznek fel, a környezetükben lévő pH-tól függően. A vándorlás egész addig folytatódik, amíg a fehérje töltése 0 nem lesz, ott a fehérjék vándorlása megszűnik.

A fókuszálás után a gélcsíkot egy SDS-poliakrilamid gél felszínére helyezzük, és a fehérjéket a **tömegük szerint** megfuttatjuk (3-22. ábra). Az izoelektromosan fókuszált és méret szerint megfuttatott fehérjék elkülönülnek egymástól, bármilyen festési technikával vizualizálhatóak.

3-22. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/2D\_electrophoresis.gif

2013.08.24.

**3.5. Kapilláris elektroforézis**

A kapilláris elektroforézis nem egy vertikális vagy horizontális gélben, hanem egy **kapilláris belsejében** történik. Ebből értelemszerűen következik, hogy egyszerre mindössze egyetlen minta futtatható egy kapillárisban. Többféle elv szerint történhet az elválasztás. A legismertebb az ún. **elektroozmotikus áramlás** elvén működő elválasztási technika, melynek során elsősorban töltéssel rendelkező részecskéket tudunk elválasztani egymástól, tömegük és töltésük alapján.

A leggyakrabban használt technika során a kapilláris fala többnyire **negatívan töltött**, ezért az elektroforézisfolyadék pozitív ionjai kiülnek a kapilláris falára, **mintegy pozitív hengert** képeznek. (A negatív töltést például úgy lehet biztosítani, hogy a kapilláris belső falát egy könnyen deprotonálódó anyaggal, például Si-OH csoportokat tartalmazó szilanollal vonják be. A szilanol már pH=3 fölött deprotonálódik, így a semleges (vagy lúgos) pufferekkel történő elektroforézis során negatív töltést kap.) Amikor elkezdjük az elektroforézist, a pozitív henger a negatív pólus felé kezd vándorolni, húzza magával a henger belsejében lévő folyadékot. Ennek az lesz az eredménye, hogy a kapillárisban lévő folyadékoszlop egyenletesen vándorol a negatív pólus felé. A folyadékoszlopban lévő, elválasztandó anyagok is a negatív pólus felé vándorolnak. A **pozitív** töltésű ionok **gyorsabban**, a **negatívok lassabban** haladnak, mint a semleges molekulák. Minél nagyobb a töltés, és minél kisebb a részecske mérete, annál nagyobb lesz a futás eltérése a folyadékoszlop sebességével mozgó semleges molekuláéhoz képest (3-23. ábra).

Fontos megemlíteni a **kapilláris gélelektroforézist**, mely során különböző nagyságú töltéssel rendelkező polimereket (például DNS-darabokat) tudunk elválasztani egymástól. A kapillárisban ilyenkor egy **gélmátrix** található, mely a nagyobb molekulák mozgását lassítja.

Egy kapilláris elektroforézis készülék gyakran több párhuzamos kapillárist tartalmaz, amely lehetővé tesz több minta egyidejű elválasztását. Az elválasztást a kapillárisok végén valamilyen detektor (**fénydetektor**, **fluoreszcens detektor**) érzékeli. A kapilláris elektroforézis sokkal jobb felbontóképességgel rendelkezik, mint a legtöbb kromatográfiás technika, ezért alkalmazásával már igen **kicsiny** (akár egy nukleotidnyi) **különbségeket** is ki lehet mutatni a minta molekulái között.

3-23. ábra

http://www.doping.chuv.ch/en/lad-ec-zone-eng.jpg

2013.08.24.

http://cdn.grin.com/images/preview-object/document.169088/8fb5e898f0cd96f081f10826fa177ccf\_LARGE.png

2013.08.24.