

11. fejezet ELEKTROFORÉZIS TECHNIKÁK

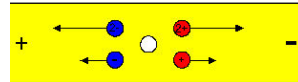
Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
(Oktatási célra)

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)

2

ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforetikus mozgékonyaság:

ahol: q – a molekula töltése

d – molekula átmérője

η – viszkozitás/gélsűrűség

Az állandósult sebesség:

$$v = \mu \cdot E$$

E – térerősség

A közeg szerint, amiben a mozgás végbemegy, megkülönböztethető:

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

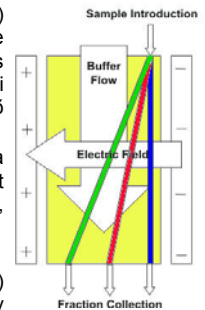
3

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

A folyadék egy lapos (~mm vastag) cellában laminárisan áramlik. Erre 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 (100-150 V/cm) nagy feszültség kell, ahhoz, hogy ne melegedjen, kis áramerősség (mA)

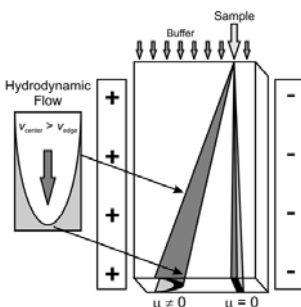


4

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

A lamináris áramlás parabolikus áramlási képe miatt a sávok eltorzulnak:

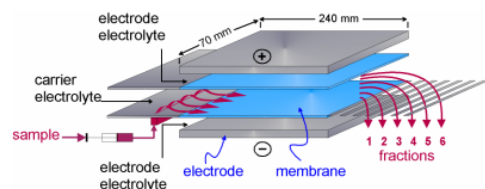
A fal mellett áll a folyadék, a réteg közepén gyorsan áramlik.



5

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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



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.

7

A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

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

Leírása: Grashof szám:

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

ahol: g – nehézségi gyorsulás

β – a hordozó folyadék hőtágulási együtthatója

Δt – a folyadék és a fal hőmérséklet különbsége

d_n – a kamra hidraulikus átmérője

ν – a folyadék kinetikai viszkozitása

8

A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Ha a Grashof szám egy határérték fölé emelkedik, rendezetlen áramlások lépnek föl. A Gr csökkenthető

- a kamra hidraulikai átmérőjének csökkentésével
- a viszkozitás növelésével (pl. glicerinnel)

9

A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Diffúzió: függ a hőmérséklettől, a közeg viszkozitásától, a tartózkodási időtől → hőmérséklet csökkentése, viszkozitás növelése

Elektrooszmózis: a cella falára töltésük révén adszorbeálódó ionok a térerősség hatására „elcsúsznak” a felületen és ezáltal áramlást hoznak létre → a fal bevonása, pl. teflonnal

Buborékok: az oldott gázok felszabadulása → a pufferek gázmentesítése (ultrahang, He)

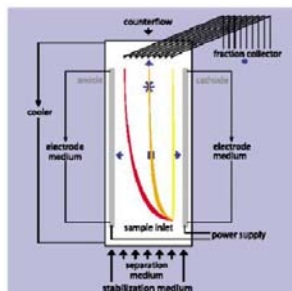
A hordozó puffer és a minta közötti sűrűség/viszkozitás különbsége → azonos puffer

10

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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

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

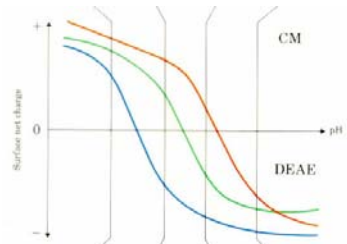


11

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Milyen pH-n érdemes elválasztani?

Ott, ahol a legnagyobb a különbség a töltésben.



12

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Előnyei:

- Folyamatos művelet

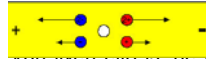
Hátrányai:

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

13

GÉL ELEKTROFORÉZIS

A közeg, amiben a molekulák mozognak, hídrogél, leggyakrabban poliakrilamid, néha aga-róz. A különböző töltésű molekulák kétirányba mennének:



vannak olyan esetek is, de legtöbbször az egyirányú futtatás a cél →

Ezt elérhetjük: - pH állítással

- minta előkezeléssel (SDS)

- nem törődünk az ellentétes töltésűekkel

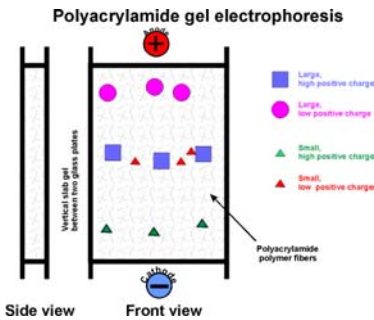


14

AZ ELVÁLASZTÁS ELVE

Méret és töltés szerint.

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



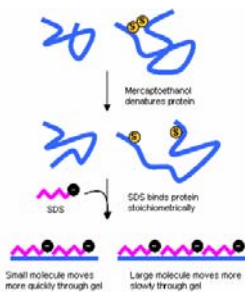
15

A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

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

16

KEZELÉS SDS-SSEL



A diszulfid hidak felbomlanak.

A fehérjére SDS molekulák tapadnak

→ a pozitív töltéseket leárnyékolják, az apoláris részekre ne-gatív töltéseket ragasztanak

→ minden fehérje negatív töltésű lesz

→ mindegyik egy irányba (az anód felé) vándorol

→ a vándorlási sebességet csak a méret szabja meg!

17

GÉL ELEKTROFORÉZIS

Technikai paraméterek:

A feszültség: 50 – 500 Volt

Az elválasztás mértékét Volt*óra-ban adják meg.

- tápegység

- feszültség szabályozó/programozó egység

Az elektródok elektrolitkádákon keresztül viszik át a feszültséget a géltre.

Gyakran hűteni kell.



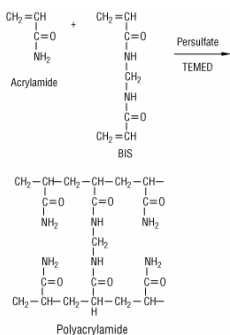
18

A POLI-AKRILAMID GÉL

A lineáris poliakrilamid láncokat bis-akrilammal térhálósítják.

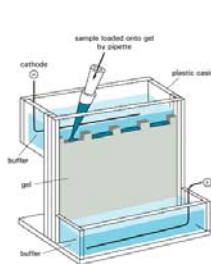
Az akrilamid koncentrációjával jellemezhető a gél „sűrűsége” (3 – 30 %).

A polimerizációhoz szükséges:
 TEMED – tetrametil-etilén-diamin katalizátor
 Ammónium-perszulfát – iniciátor
 Oxigénmentes közeg



19

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

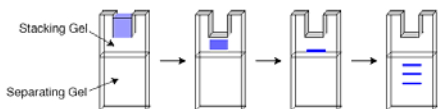
Sűrűsége szerint a gél lehet:

- homogén
- discontinuous
- gradiens

20

DISC GÉLEK

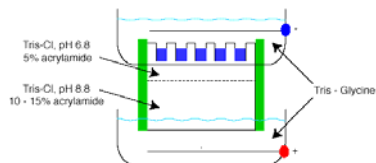
A tényleges futtató gél fölött egy tömörítő gél szakasz van. Célja a viszonylag nagy mintatér fogatban lévő fehérjék összetömörítése egy csíkba, hogy azután jól érzékelhető csíkokat kaphassunk.



21

DISC GÉLEK

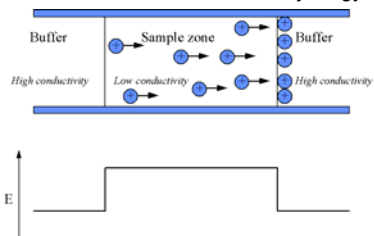
A tömörítő gél szakasz összetétele olyan, hogy ott gyorsabban vándorolnak a fehérjék: vezetőképessége és sűrűsége kisebb.



22

DISC GÉLEK

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

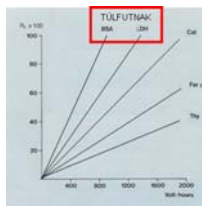


23

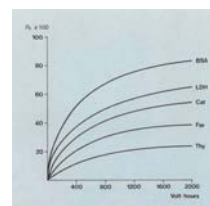
GRADIENS GÉLEK

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

Futás homogén gélen:



gradiens gélen:



24

A KÉSZ GÉLEK KIÉRTÉKELÉSE

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

Fixálás: savas reagensekkel (perklórsav, szulfoszalicilsav)

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.

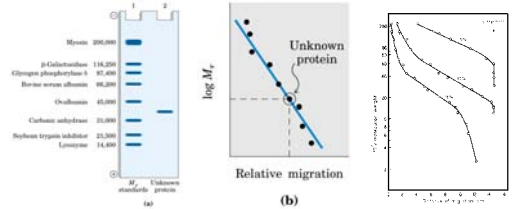
Amido Black, Fast Green – ritkábban használatosak.

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

25

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”)



26

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforézis egy kapillárisban elhelyezkedő puffer oldatban történik.

Műszaki adatok:

Feszültség: 10 - 30 kV

Térférség: 100-500 V/cm

Átmérő (belső): 25-75 μ m

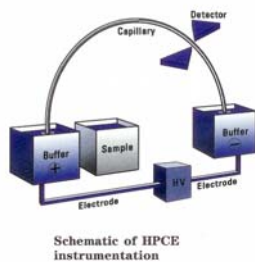
Hossz: 50-100 cm

Anyaga: kvarcüveg

Mintatérfogat: 1-50 nl

Tartózkodási idő: 1-3 perc

Detektálás: UV

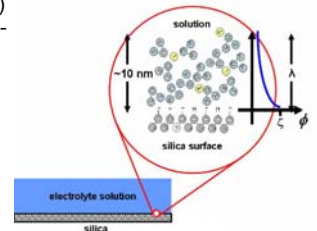
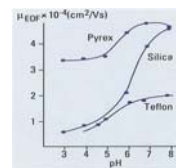


27

MŰKÖDÉSI ELVE

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

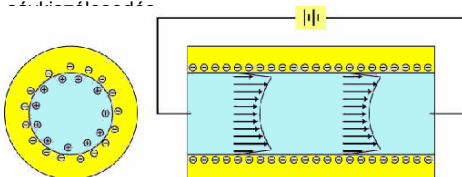
A felületi potenciál pH-függő:



28

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 sebességkülönbség \rightarrow emiatt nincs



29

ELEKTROOZMÓZIS

A leírásnál kétféle sebességet kell megkülönböztetni:

A folyadék áramlási sebessége: $v_{EOF} = (\epsilon\zeta/\eta)E$

ahol: ϵ - dielektromos állandó

ζ - zéta potenciál

η - viszkozitás

E - térférség

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

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

30

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

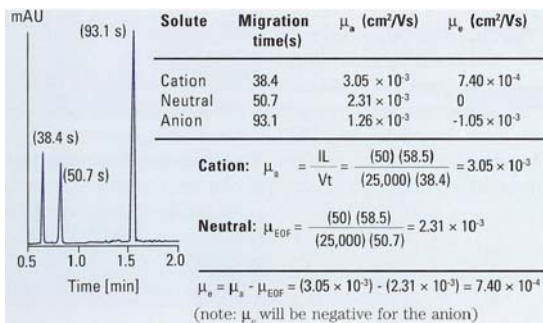
A molekula sebessége a az áramló folyadékéhoz előjel szerint hozzáadódik: $V_{eredő} = V_{EOF} \pm V_{molekula}$

- a pozitív töltésűek előre szaladnak, a negatívak pedig lemaradnak
- szétválnak (hasonlít a kromatográfiához)



31

SEBESSÉG-KÜLÖNBSÉGEK



32

BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

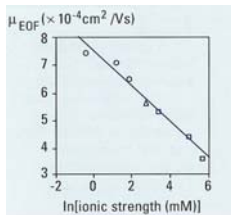
Ténerősség: növeli a sebességet az elválasztás romlása nélkül. Hátrány: fokozza a melegedést

pH: magasabb pH-n jobban működik

lonerősség: 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



33

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

34