

## Szabadon folyó elektroforézis (Free Flow Electrophoresis)

Számos laboratóriumi rutin eljárásnál (pl. fehérjék tisztaságának ellenőrzése) alkalmaznak elektroforetikus, főleg gélelektroforetikus technikák, különböző fajtáit. Ez a gyakori alkalmazás az elválasztás kiemelkedő eredményességének és az elválasztási körülmények viszonylagos enyhességének köszönhető. Az elektroforézis folyamatossá tétele (folyamatos áramlású készülékek kifejlesztése) lehetővé tette, hogy ez az analitikai technika, preparatív fehérje elválasztásra alkalmassá váljon [1].

Az elektroforetikus technikák különböző részecskék és molekulák elválasztására használhatók. Az elválasztás alapja, a részecskék különböző speciális mozgékonyasága az elektromos térben. Ez a mozgékonyaság függvénye a nettó elektromos töltésüknek, a méretüknek és a közeg viszkozitásának. Eltérően a hagyományos gél elektroforézistől ( pl. PAGE), a szabadon folyó elektroforézis (FFE) a minta komponenseit folyamatosan szeparálja egy folyékony pufferben. Ezért a FFE elválasztás esetén a minta komponensek nettó elektromos töltése a legfontosabb a mozgékonyaságot meghatározó tényezők közül.

### Preparatív elektroforézis definíciója

Az elektroforézis fő fogalma és meghatározója az elektroforetikus mozgékonyaság. Induljunk ki egy részecskéből — ez lehet egy molekula, szervetlen vagy szerves részecske, mikroorganizmus vagy egy emlős sejt — amely egy puffer oldatban található a homogén és állandó elektromos térben. Amint a részecske adott elektromos töltéssel rendelkezik, az elektromos térben elmozdul, méghozzá a felé az elektród felé, amelyik a töltésével ellentétes. Az elektromos térerősség és a súrlódási erő egyensúlyának következtében a részecske sebessége állandó. Ez függ a nettó elektromos töltéstől ( $q$ ), a merev gömbnek feltételezett részecske sugarától ( $r$ ), az elektromos térerősségtől ( $E$ ) és a puffer dinamikai viszkozitásától ( $\eta$   $L$ ). Ha a sebességet állandónak vesszük és leosztjuk az  $E$ -vel, az elektroforetikus mozgékonyaságot kapjuk meg ( $\mu$ ).

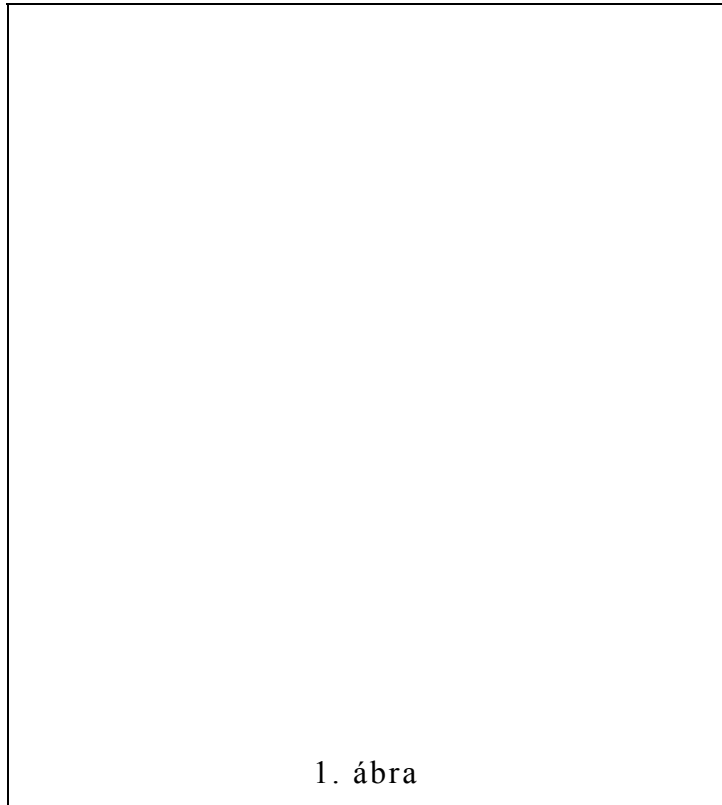
$$\mu = \frac{q}{6 \pi \eta_L r}$$

A részecskék fontos jellemzője a nettó elektromos töltésük, amelyet alapvetően a pH határoz meg, de a környező puffer ionerőssége és más tulajdonságai is befolyásolnak. A fehérje molekula láncban számos aminosav található, amely töltéssel rendelkezhet. Ezek pozitív vagy negatív töltést hordoznak (esetleg mind kettőt), megfelelően a körülöttük lévő folyadéknek és a pH-nak. A makromolekula harmadlagos és negyedleges szerkezetét az egyedi aminosavak környezetnek megfelelő töltése határozza meg. Pufferben a fehérje molekulák egy bizonyos pH-n elektromosan semlegesé válnak, ez a fehérje izoelektromos

pontja (pI). A pontosan ilyen pH-jú pufferben a fehérjék könnyen kicsapódnak az gyenge taszító erőknek és a fellépő van der Waals vonzóerőknek köszönhetően.

A "szabadon folyó" kifejezés azt jelenti, hogy az elektroforézis folyamatosan egy pufferben történik, amely nincs géllal stabilizálva az áramlási hatások ellen. A gélelektroforézisban adott mennyiségű fehérjét választanak szét, adott idő alatt, míg az FFE-ban az elválasztás folyamatosan jön létre, úgy hogy az elválasztó folyadék (pl. a hordozó puffer) és a beadagolt minta folyamatosan az elektromos tér hatása alatt van (az áramlási irányra merőlegesen) és a minta komponensek ennek hatására mozdulnak el specifikusan az egyik vagy a másik elektród felé (1. ábra).

Négyfajta szabadon folyó elektroforetikus technika ismert. Zóna és field-step elektroforézis, izoelektromos fókuszálás és izotachoforézis. Az elválasztási technikák közötti választás elsősorban a feladat igényétől függ. A leggyakrabban használt technika a zóna elektroforézis (FFZE), mivel technikailag egyszerű és fizikokémiai értelmezése könnyű. A továbbiakban erről a technikáról írok.



1. ábra

Az elválasztás eredményességét zavaró hatások

Az elektroforetikus elválasztás hatását a legkisebb oldalirányú szélesség, azaz az egyes komponenseket tartalmazó sávok élessége és a sávok közötti lehetséges legnagyobb távolság határozza meg. Ezeket csökkentő hatások:

1. Az elektromos áram által a közegben keltett melegedés, amely az elválasztó folyadék szabad áramlását okozza. Ez sűrűség gradiensek keletkezéséhez vezethet, abban az esetben falakat hűtik, valamint instabil sűrűség rétegződéshez axiális irányban.
2. Komponensek diffúziója.

3. Töltés elválasztás miatti elektrooszmózis; a preparációs kamra falánál ez a jelenség laterális irányú elválást eredményez a falak közelében.
4. Az összetevők adszorpciója a belső falra vagy a készülék más részeire, pl. csövekre és buborékcsapdákra.
5. A vizsgált fehérje kicsapódása, melyet a szeparációs puffer összeférhetlenségi reakciói pl. pH, ionerősség és bizonyos ionok okozhatnak.
6. A hordozó puffer gázosodása, mely buborékok keletkezéséhez vezet a szeparációs kamrában. Ez a szeparált fehérjék instabil frakcionálását okozza, nem alakulnak ki stabil frakciók.
7. A hordozó puffer és a minta közötti sűrűség vagy viszkozitás különbségek a komponensek keveredését és ennek következtében a sávok kiszélesedését okozzák.

Az 1. táblázat a zavaró hatások következményét és azok lehetséges kiküszöbölését tartalmazza.

A FFE technika fejlődése során speciális lépéseket tettek a közegben folyó szabad áramlás kontrolálása érdekében, mely nagy hatással van az elválasztás hatékonyságára. Ezt a problémát leíró dimenzió-mentes szám a Grashof szám:

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

$g$ : nehézségi gyorsulás

$\beta$ : a hordozó folyadék hőtágulási együtthatója

$\Delta t$ : a folyadék és a fal hőmérséklet különbsége

$d_n$ : kamra hidraulikus átmérője

$\nu$ : a folyadék kinetikai viszkozitása

A szeparációs kamra tartalmának összekeveredése akkor fordul elő, mikor a Gr szám egy kritikus értéket meghalad. Adott geometriájú FFE készülék esetén az anyag és a fal közötti hőmérséklet különbség a legjelentősebb. Az FFE készülékek tervezésekor a  $d_n$  csökkentésével a Gr szám értéke a kritikus érték alatt tartható. Ugyan ez a cél elérhető a közeg kin. viszkozitásának növelésével ( $\nu$ ) is.

Zavaró hatás	Okozott hiba	Tennivalók
Szabad áramlás	Sávkiszélesedés	- a Gr szám csökkentése -A hordozó puffer elektromos vezetéseinek csökkentése
Diffúzió	Sávkiszélesedés	-hőmérséklet csökkentése -A hordozó folyadék viszkozitásának növelése
Elektrooszmózis	Sávkiszélesedés	- a készülék falának bevonása

Adszorpció	Fehérje veszteség	- a készülék falának bevonása - detergens alkalmazása
Kicsapódás	Fehérje veszteség Sávkiszéledés	- a puffer-rendszer megváltoztatása - detergens alkalmazása - Stabilizátor
A hordozó puffer gázosodása	Áramlás instabilitása	-A hordozó pufferbe N <sub>2</sub> , He bekeverése -A hordozó puffer vákuum kezelése
Sűrűség különbség	Áramlás instabilitása Sávkiszéledés	- más puffer választása - Semleges anyagok adagolása

1. táblázat

### Elektroforetikus készülékek

FFE készülék tervezésénél fontos, hogy a kamra hidrodinamikusan átmérője kicsi legyen. Ez elérhető megfelelően szűk réssel ellátott szeparációs kamrában. Ez a rés lehet hosszú és lapos csatorna oldal elektródokkal vagy kör alakú (gyűrű) radiálisan elhelyezkedő elektródokkal.

### ELPHOR VaP készülék

Lapos geometriájú készülék és ilyen rés esetében a transzverzális vezetés ritka. A hordozó puffer axiálisan folyik át a résen. A parabolikus áramlási profil kialakulása (állandósulása) után injektálják az elválasztandó mintát az áramlásba, a lehetséges legvékonyabb résen keresztül. Az elektromos tér hatása alatt a minta komponensei elhagyják a beinjektált puffert, és a vivő pufferben mozgékonyaságuk alapján elválnak.

Az ELPHOR VaP készülék szeparációs kamrájának hossza 500 mm, az elektródok közötti távolság 100 mm, rés szélessége 0.5mm és a hidraulikus átmérője 1mm. A készülék teljesítménye 250 mg fehérje/h fölött van. A szeparációs kamrában a vivő puffer lefelé áramlik. A kamra alján 90 frakciószedő egység található.

## BIOSTREAM készülék [2]

CJB Developments fejlesztésében készült, henger alakú készülék (2. ábra). Folytonos és szimultán szeparálásra alkalmas. Az elektroforézis egy gyűrűben áramló pufferben történik, melynek lamináris áramlását forgatással biztosítják. Csak zóna elektroforézisre használható készülék. A szeparátor teljesítménye 50 g fehérje/h .

Biosteam működése:

Az elektroforézis egy 3mm vastag és 600 mm hosszú gyűrűben zajlik a szeparátor külső és belső hengere között. Az így kapott hidraulikus átmérő 6mm. A vivő puffer stabil lamináris áramlását a külső henger forgása (2.5 1/s) biztosítja (rotor) és ezzel megelőzi a turbulens áramlás problémáját, amelyet más esetekben . ellenállásból eredő melegedés eredményez. A belső henger álló helyzetben van (stator). Koncentrikusan a gyűrűre a forgó és az álló rész egy szakaszán található az elektródok és ezek elektrolitjai. A külső henger átmérője 89mm, ez alkotja az anódot. A vivő folyadék és az elektród elektrolitok egy regenerált cellulózból készült dialízis membránnal vannak

elválasztva, amelyet egy belső pórusos alátámasztás tart. Az egyenáramú elektromos tér az elektródok között jön létre. Az elválasztandó keveréket (mintát) a vivő folyadékba injektálják be az álló rész alján található szűk nyíláson keresztül. A minta komponensei az elektromos tér hatására válnak szét úgy, hogy különböző mértékben mozognak a gyűrű külső fala felé, és koncentrikus gyűrűket alkotnak. A kedvező sűrűség rétegződést felfelé való áramlással biztosítják. Az álló rész tetején található a csapdával ellátott minta gyűjtő tányérok. A csapda párok területén vékony nyílás található, amelyen keresztül az oldatréteg befolyhat a tányérok kialakított labirintusba. Ez a labirintus biztosítja, hogy a folyadék áramlása

2. ábra

egyenletes legyen, és ez bontja a folyadékot 30 frakcióra, melyek visszakeveredés nélkül jutnak a gyűjtő edényekbe.

A szabadon folyó (preparatív) elektroforézis nagyon sokféle fehérje elválasztására alkalmas. A Biosteam készüléket használható és a gyártó ajánlja enzimek elválasztására (nyers tripszin extraktum alkotóira bontása, izom extraktum enzimek elválasztása); vérplazma, immunglobulinok szétválasztására; monoklonális antitestek tisztítására (IgM).

Nath és munkatársai [3] a szabadon folyó elektroforézis beállítási paramétereit, mint: az elektromos térerősség (100-150 V/cm), puffer tartózkodási idő (2-5 perc), puffer összetétel, minta áramlási sebesség (5-6 ml/h) és mintakonzentráció, vizsgálták, a felbontás, sávszélesség és a teljesítmény szempontjából. A kísérleteket VaP-22 készüléken végezték, modell fehérje keveréket (D- és L-hidroxiizokaprát (Hic) dehidrogenáz) és formát-dehidrogenázt (FDH), formaldehid-dehidrogenáz (FADH) és metanol-oxidáz (MOD) keverékét használva.

- Puffer típusa

A puffer kiválasztása az egyik olyan tényező, ami segítheti, ill. gátolhatja az elválasztást. E. coli sejtszuszpenziót Tris-HCl pufferben (hordozó puffer) futtatták. 280 nm detektálva két  $\beta$ -galaktozidáz csúcsot detektáltak, azonban ezek igen szélesek voltak. Az első 10 frakció, míg a második 60 frakció széles volt az összesen 90 frakció közül. Tris-acetát puffert alkalmazva szintén két  $\beta$ -galaktozidáz csúcsot detektáltak 280 nm-en, de ezek jelentősen keskenyebbek voltak (5 ill. 10 frakció). Ezért fontos a megfelelő puffer kiválasztása.

- Puffer tartózkodási idő ( $t_V$ )

Ha a puffer tartózkodási ideje magas 5 min. vagy e fölötti (ez 5 ml/min folyási sebességnél igaz) a minta átfolyási ideje, ami meghatározza a teljesítményt, alacsony lesz  $< 1.5$  ml/h, ha a cellában a szükséges lamináris áramlást biztosítani akarjuk, mivel magasabb minta áramlási sebesség turbulenciát okozhat. Így magas puffer tartózkodási idő esetén a minta hosszú időn keresztül az elektromos tér hatása alatt áll, ami az enzimek és fehérjék elválasztásánál sávkiszéledést okoz. Így a magas tartózkodási idő nem kedvez a jó sávélességének sem. Azonban a túl alacsony tartózkodási idő ( $< 2$  perc) használata sem kedvező, mivel ez esetben valószínűleg nem jön létre teljes elválás.

- Minta áramlási sebesség ( $v_M$ )

A puffer kamrabeli tartózkodási ideje határozza meg a minta áramlási sebességét és ez által a teljesítményt is. Modell fehérjével végzett kísérleteikben rövid puffer tartózkodási időt (2 perc) használtak azért, hogy magas minta áramlási sebességet alkalmazhassanak. A kísérletek során a minta koncentráció befolyását tapasztalták a minta áramlási sebességére.

- Minta koncentráció (c)

Azonos puffer tartózkodási idő és lamináris áramlás esetén a maximális minta áramlási sebesség alacsonyabb volt magasabb minta koncentráció esetén. ( $t_v=2.5$  min;  $c=2.5$ mg/ml esetén  $v_m=5$ ml/h, míg  $c=25$ mg/ml esetén  $v_m=3.5$ ml/h )

- Elektromos térerősség

A növekvő térerősség a kísérletekben sávkiszéledést okozott és nagyobb áramlási terhelést. Ha magas (140 V/cm) elektromos teret kombináljuk az alacsony puffer tartózkodási idővel (2 perc, ami 6 ml/h áramlási sebességet és 40mg/ml fehérje koncentrációt jelent), D-, L-Hic dehidrogenáz elválasztásánál éles csúcsokat és jó felbontást érhetünk el. Magas elektromos térerősség szükséges a jó felbontású, biztos elválasztáshoz, ha magas a minta koncentrációt vagy alacsony a puffer tartózkodási időt alkalmazunk.

A fent bemutatott paramétereket a teljesítmény szempontjából vizsgálták. Modell fehérje kísérleteknél a minta áramlási sebessége a meghatározó tényező, ami függ a puffer tartózkodási idejétől és a mintakonzentrációtól.  $t_v=2$  perc,  $E=140$  V/cm és a mintakonzentráció  $c=40$  mg/ml injekciós pontonként (Többszörös (2x) injektálást használtak a kihozatal növelésére) a teljesítmény 500 mg fehérje/h volt, ami 5x magasabb az irodalomban eddig leírtaknál.

FDH, FADH és MOD enzimek elválasztására 50% nedves tartalmú *Candida boidinii* szuszpenziót használtak, aminél FFZE technikát és többszörös injektálást használtak. Minden kísérletben az eredmények reprodukálhatóak, a csúcsok élesek és a felbontás tökéletes volt. A kísérletet 12 órán át végezték azért, hogy az elválasztás stabilitását ellenőrizzék. Az elválasztást stabilnak találták.

Kísérleteket végeztek ultracentrifugált *E. coli* durva extraktumával, mely 10% sejtet tartalmazott. DN-ázt adtak az extraktumhoz, hogy a nukleinsavakat kisebb fragmentumokra bontsák és így a szuszpenzió viszkozitását csökkentsék. A sejtörmelék és a fehérjék jól elváltak egymástól és 4x tisztulást értek el  $\beta$ -galaktozidáznál.

Összefoglalva a szabadon folyó elektroforézis jól alkalmazható ( mint a fenti kísérleti eredmények is mutatják) fehérjék, sejtalkotók elválasztására ill. tisztítására és mind ipari, félüzemi és laboratóriumi körülmények között jól alkalmazható

#### Irodalom:

- 1 Rutte, R. *Free flow electrophoresis as a purification step of high versatility for bioproducts* Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem. 93, 1038-1042 (1989)
- 2 Biostream katalógus

3 Nath, S.; Schütte, H.; Hustedt, H.; Deckwer, W.D. *Continuous separation of proteins by free-flow zone electrophoresis* Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem. 93, 1042-1046 (1989)