

## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

---

---

---

---

---

---

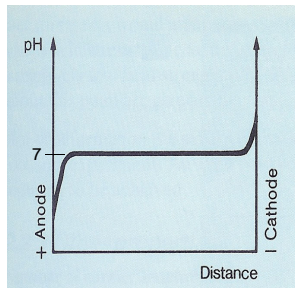
---

---

## POLYBUFFER

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

---

---

---

---

---

---

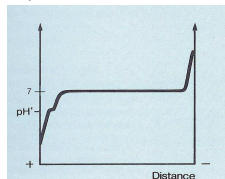
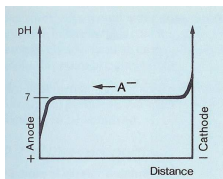
---

---

## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

---

---

---

---

---

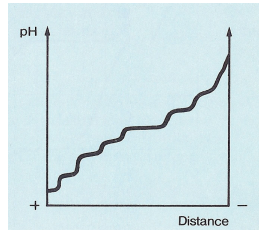
---

---

---

### 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### POLYBUFFER

Milyen legyen ez a keverék?

- Nagyon sok lépcsője legyen
- Minden komponensnek legyen pufferkapacitása (csak így tud lépcsőt csinálni)
- Legyen vezetőképessége
- A molekulák legyenek kicsik (MW 300 – 1000 Da, gyors diffúzió)
- Ne legyen UV elnyelése  $\lambda=280$  nm-nél (detektálás)
- Ne lépjen kölcsönhatásba semmivel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

---

---

---

---

---

---

---

---

---

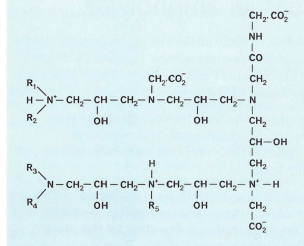
---

### 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

---

---

---

---

---

---

---

---

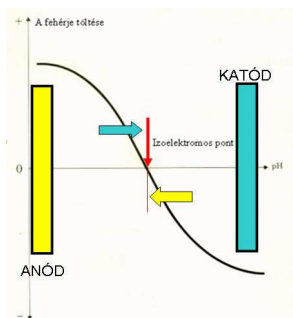
---

---

## 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 mennyiség-be 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## SÁVSZÉLESSÉG

A sávok szélessége a fehérje és a puffer tulajdonságaitól függ:

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

$\sigma$  – szórás

$D$  – diffúziós állandó

$du/dpH$  – az elektroforetikus mozgékonyaság változása a pH függvényében az IEP-nél (a fehérje jellemző-je)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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  $\Delta pI$  elérheti a 0,001 értéket is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## IEF ÉRTÉKELÉSE

Előnyei:

- Egyszerű, egy gél, egy puffer, kezeletlen minta
- Jó felbontás
- Preparatív szintig léptéknövelhető

Hátrányok:

- Speciális (drága) puffer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

---

---

---

---

---

---

---

---

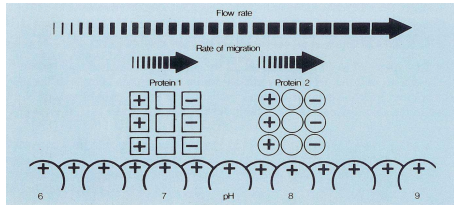
---

---



## KROMATOFÓKUSZÁLÁS

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## KROMATOFÓKUSZÁLÁS

Előnyei:

Jó felbontás, ~ 0,02 pH

Hátrányai:

Izoelektromos pH-n a fehérjék könnyen kicsapódnak



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---