

ELEKTROFORÉZIS TECHNIKÁK

Dr. Pécs Miklós



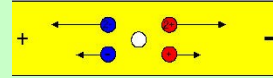
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ELEKTROFORÉZIS

Olyan elválasztási technikák, amelyben a molekulák elektromos erőter hatására különbözőképpen mozdulnak el, és ezáltal szétválaszthatók.



A mozgást két erő 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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforetikus mozgékonyaság:

ahol: q – a molekula töltése
 d – molekula átmérője
 η – viszkozitás/gélsűrűség

$$\mu = \frac{q}{3d\pi\eta}$$

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

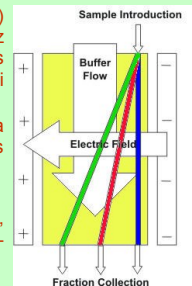
3

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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



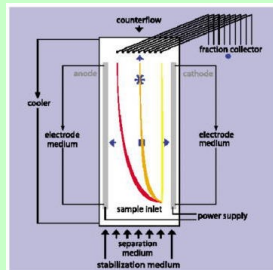
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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.

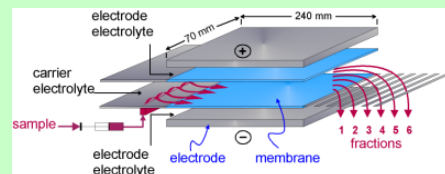


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Technológiai paraméterek:

A puffer/minta tartózkodási ideje: 2-5 perc. Ez elegendő az elváláshoz, de nem hagy időt a diffúziós szétterjedésre.

A minta koncentrációja: nagyobb koncentráció esetén lassul az elválás, ez hosszabb tartózkodási idővel, vagy nagyobb térerősséggel ellensúlyozható.

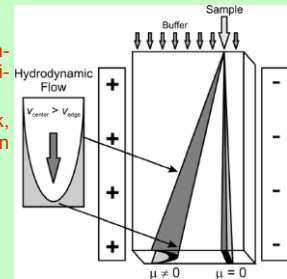
Térerősség: 100-150 V/cm, növelése egy tartományban javítja a szétválást, de előlött sávkiszélesedést okoz.



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

A lamináris áramlás parabolikus áramlási képe miatt a sávok eltorzulnak:

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



A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

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

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



A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

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

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



A SÁVKISZÉLESEDÉS OKAI

Elektromos áram okozta melegedés. Fal hűtése, de ez növeli a Gr-t. Áramerősség csökkentése (10 mV) → kis ionerősségű puffer

Diffúzió: függ a hőmérséklettől, a közeg viszkozitásától, a tartózkodási időtől → hőmérséklet csökkentése, viszkozitás növelése (de elektroforetikus mozgékonyság)

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

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

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



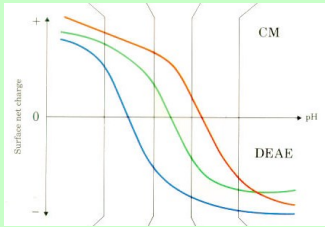
FFE-elválástás problémái

Zavaró hatás	Okozott hiba	Tenniivalók
Szabad áramlás	Sávkiszélesedés	– a Gr szám csökkentése – a hordozó puffer elektromos vezetésének csökkentése
Diffúzió	Sávkiszélesedés	– hőmérséklet csökkentése – a hordozó folyadék viszkozitásának növelése
Elektrooszmózis	Sávkiszélesedés	– a készületek falának bevonása
Adszorpció	Fehérjevesztés	– a készületek falának bevonása – detergens alkalmazása
Kicsapódás	Fehérjevesztés Sávkiszélesedés	– a pufferrendszer megváltoztatása – detergens alkalmazása – stabilizátor
A hordozó puffer gázosodása	Áramlás instabilitása	– a hordozó pufferbe N ₂ , He bekeverése – a hordozópuffer vákuumkezelése
Sűrűségkülönbség	Áramlás instabilitása Sávkiszélesedés	– más puffer választása – semleges anyagok adagolása



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Milyen pH-n érdemes elválasztani?
Ott, ahol a legnagyobb a különbség a töltésben.



FREE FLOW ELEKTROFORÉZIS

Előnyei:

- Folyamatos művelet

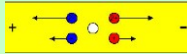
Hátrányai:

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



GÉL ELEKTROFORÉZIS

A közeg, amiben a molekulák mozognak, híd-rogél, leggyakrabban poliakrilamid, néha agaróz. A különböző töltésű molekulák két irányba mennének:



Van ilyen elfo is, de legtöbbször az egyirányú futtatás a cél →

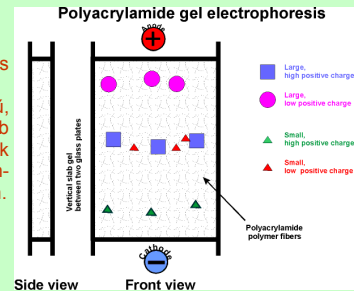
- Ezt elérhetjük:
- pH állítással
 - minta előkezeléssel (SDS)
 - nem törődünk az ellentétes töltésűekkel



AZ ELVÁLASZTÁS ELVE

Méret és töltés szerint.

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

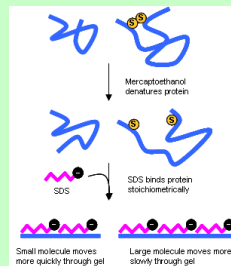


A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

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



KEZELÉS SDS-SEL



A diszulfid hidak az –SH vegyületektől felbomlanak.

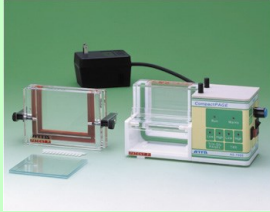
A fehérjére SDS molekulák tapadnak → a pozitív töltéseket leárnyékolják, az apoláris részekre negatív töltéseket ragasztanak → minden fehérje negatív töltésű lesz → mindegyik egy irányba (az anód felé) vándorol → a vándorlási sebességet csak a méret szabja meg!



GÉL ELEKTROFORÉZIS

Technikai paraméterek:
 A feszültség: 50 – 500 Volt
 Az elválasztás mértékét Volt*óra-ban adják meg.
 - tápegység
 - feszültség szabályozó/
 programozó egység

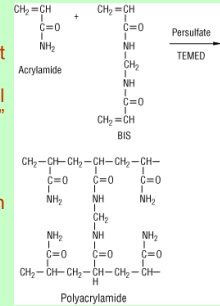
Az elektródok elektrolit-
 kádakon keresztül vi-
 szik át a feszültséget a
 géltre.
 Gyakran hűteni kell.



20

A POLI-AKRILAMID GÉL

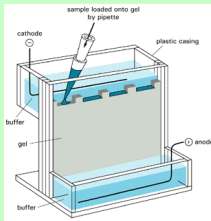
A lineáris poliakrilamid láncokat
 bis-akrilammal térhálósítják.
 Az akrilamid koncentrációjával
 jellemezhető a gél „sűrűsége”
 (3 – 30 %).



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

21

A GÉL ALAKJA



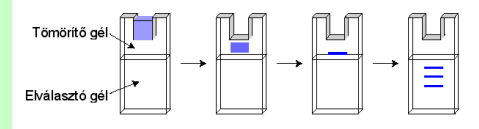
A gél mérete 4x4 cm-től 20x20 cm-
 ig bármekkora lehet.
 Vastagsága 1 - 5 mm.
 A gél tetején mintatartó „zsebeket”
 alakítanak ki, ebbe pipetázzák a
 mintákat.
 Mennyisége: ~ 5 µg/csík
 Sűrűsége szerint a gél lehet:

- homogén
- discontinuous
- gradiens

22

DISC GÉLEK

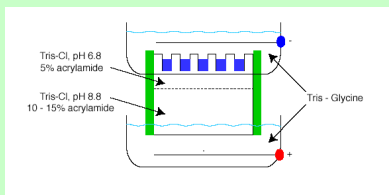
A tényleges futtató gél fölött egy tömörítő gél szakasz
 van. Célja a viszonylag nagy mintatérőgatban lévő
 fehérjék összetömörítése egy csíkba, hogy azután jól
 elváló, jól észlelhető csíkokat kaphassunk.



23

DISC GÉLEK

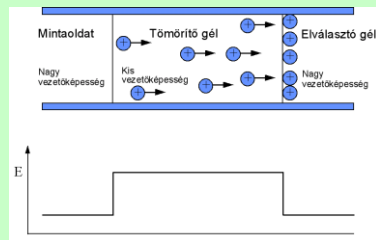
A tömörítő gél szakasz összetétele olyan, hogy ott
 gyorsabban vándorolnak a fehérjék: vezetőképessége és
 sűrűsége kisebb.



24

DISC GÉLEK

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

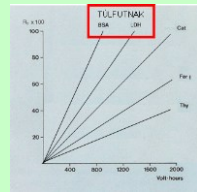


25

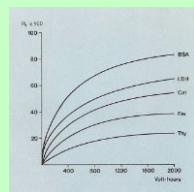
GRADIENS GÉLEK

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

Futás homogén gélen:



gradiens gélen:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

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 használtak.

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

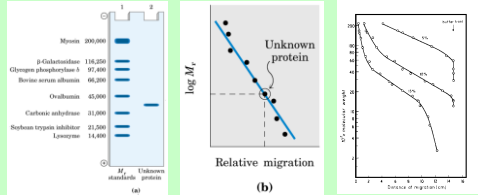


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

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”)



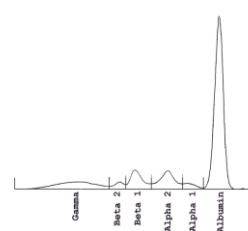
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

VÉRFEHÉRJÉK ELVÁLASZTÁSA

Szérum fehérje elektroforézis

(in agarose gél (Nyitraföldi))



Frakciók	%	Normál %	g/l
Albumin	62.1	59,4 - 73,9	
Alpha 1	2.9	1,2 - 3,1	
Alpha 2	11.9	7,0 - 12,5	
Beta 1	9.4	4,9 - 9,6	
Beta 2	2.8	1,6 - 5,6	
Gamma	11.8	6,9 - 14,7	

$A/G = 1.64$

Normális elektroforitikus mintázat.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Az elektroforézis egy kapillárisban elhelyezkedő puffer oldatban történik.

Műszaki adatok:

Feszültség: 10 - 30 kV

Télerősség: 100-500 V/cm

Átmérő (belső): 25-75 μ m

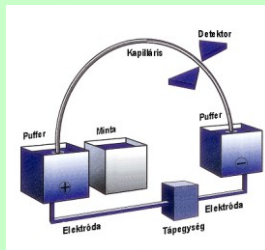
Hossz: 50-100 cm

Anyaga: kvarcúveg

Mintatérfogat: 1-50 nl

Tartózkodási idő: 1-3 perc

Detektálás: UV



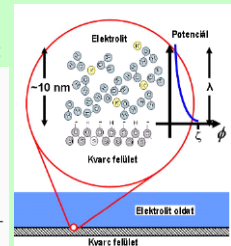
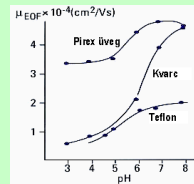
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

MŰKÖDÉSI ELVE

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

A felületi potenciál pH-függő:

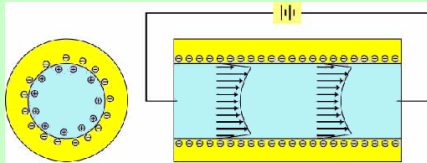


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

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 sebesség-különbség → emiatt nincs sávkiszélesedés.



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 - térerősség

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

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

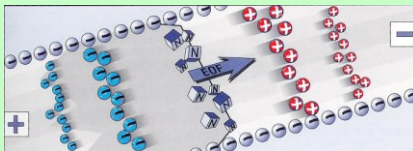


KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

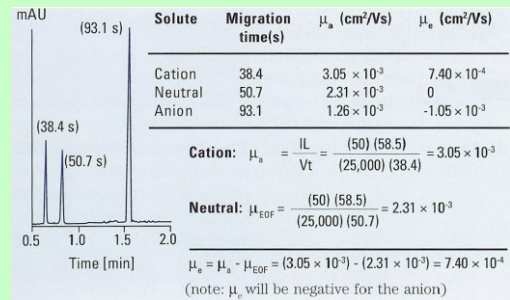
A molekula sebessége a az áramló folyadékéhoz előjel szerint hozzáadódik: $v_{eredő} = v_{EOF} \pm v_{molekula}$

→ a pozitív töltésűek előre szaladnak, a negatívak pedig lemaradnak

→ szétválnak (hasonlít a kromatográfiához)



SEBESSÉG-KÜLÖNBBSÉGEK



BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

Térerősség: növeli a sebességet az elválasztás romlása nélkül. Hátrány: fokozza a melegevést

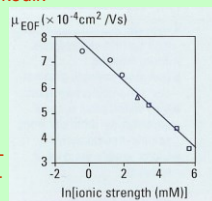
pH: magasabb pH-n jobban működik

Ionerősség: növelése rontja az elválasztást, mert:

- > csökkenti a zéta potenciált
- > növeli az áramerősséget, és ezzel a melegevést
- > torzíja a csúcs alakját

Detergensék: a kationosok lefedik a felületet és ezzel akadályozzák az áramlást

Hőmérséklet, Viszkozitás



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)

