

Műszeres analitika II. (TKBE0532)

11. előadás Elektroforetikus analitikai technikák

Dr. András Melinda

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Elektroforézis: Egy oldatban lévő különböző molekulatömegű és töltésű részecskék elektródák (anód: +, katód: –) közötti elektromos erőter hatására ellentétes töltésük szerint vándorolnak.

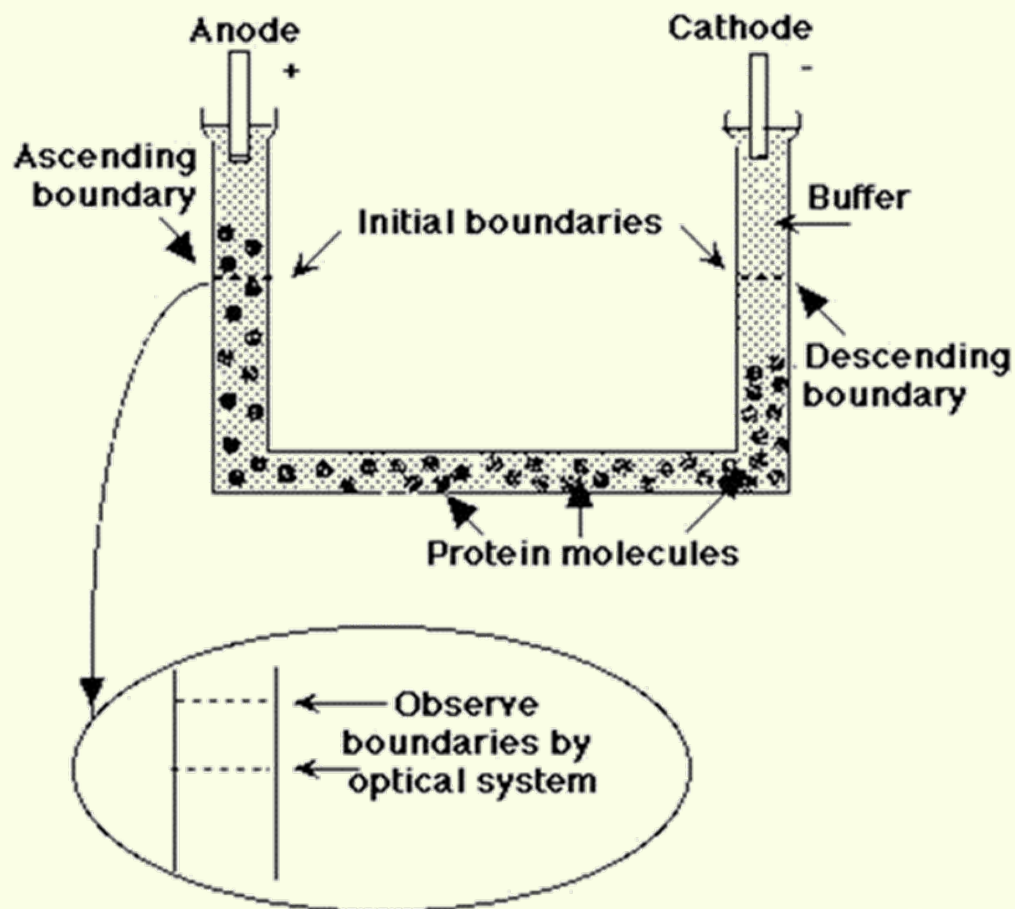
- gélelektroforézis (1950)
- kapilláris elektroforézis (1985)
- chip elektroforézis (1995)

Felhasznált, ajánlott irodalom:

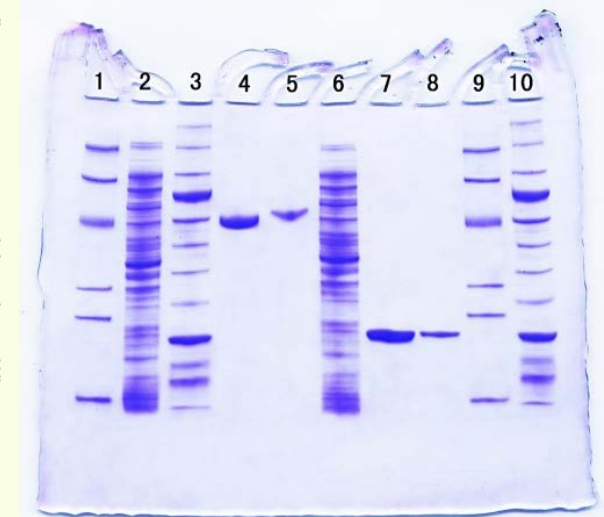
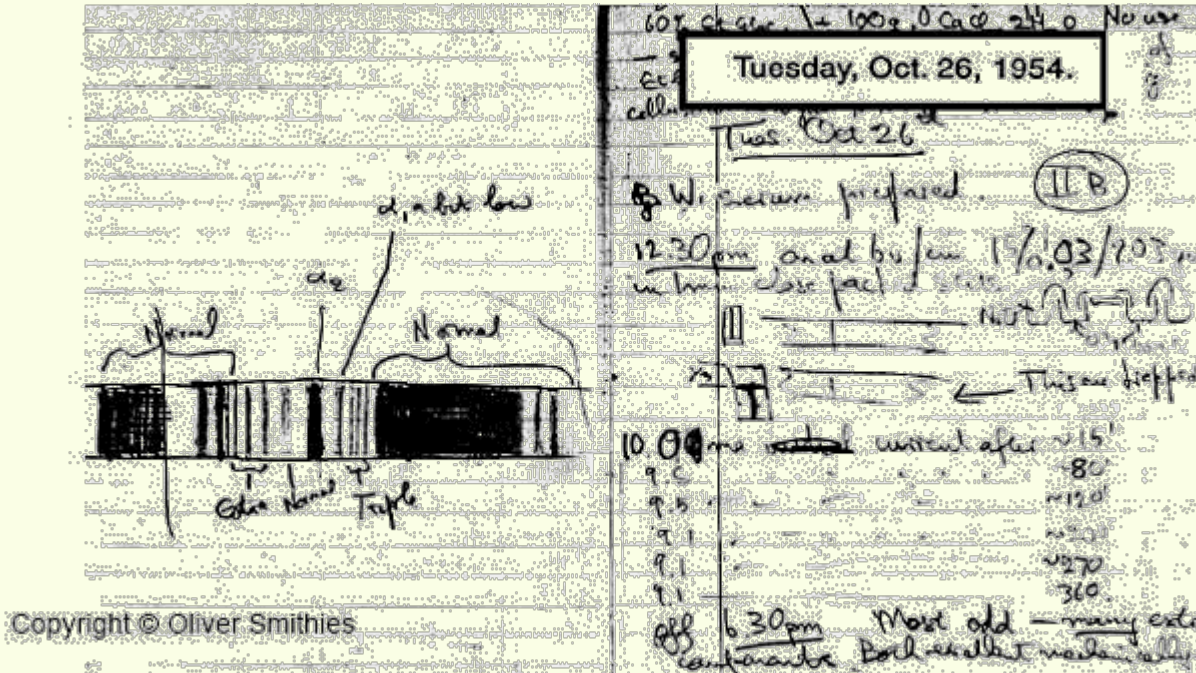
- H. Engelhardt, W.Beck: Capillary electrophoresis, Vieweg, Braunschweig, 1996
- E. Westermeier: Electrophoresis in practice, Wiley, 2005
- D.N. Heiger: High Performance Capillary Electrophoresis, HP, Waldbronn, 1992
- Gáspár A.: Kapilláris zónaelektroforézis, Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000
- Műszeres analitikai gyakorlatok silabuszai (gélelektroforézis, CE, MEKC)

Elektroforézis

- 1897 Kohlrausch: Törvények az ionok vezetőképességéről
- 1937 Tiselius: Fehérjék elválasztása elektroforézissel



➤ 1955 Smithies: Gélelektroforézis



Oliver Smithies: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

- 1967 Hjertén: Zónaelektroforézis oldatokban (ZE)
- 1981 Jorgenson: Kapilláris elektroforézis (CE, CZE)

Gélelektroforézis

- Makromolekulák (fehérje, DNS, RNS) molekulatömeg szerinti elválasztása.
- Az elektroforetikus elválasztás különböző géleken (pl. keményítő, poliakrilamid, agaróz) történhet .
- Az a gél szerkezet, amelynek átlagos pórusnagysága közel esik az elválasztandó komponens méretéhez, azokkal a komponensekkel szemben „szűrőként” viselkedik. Az átlagos pórusnagyságot jelentősen meghaladó ionok nem vagy csak lassan, a kisebb ionok gyorsabban hatolnak át a gél pórusain.

SDS-PAGE (nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis):

A fehérjék denaturálódnak a felületükre adszorbeálódó negatív töltésű SDS következtében. Az adszorbeálódott SDS miatt a töltés/tömeg arány állandóvá válik, így a fehérjék elválasztása a molekulatömegük alapján történik.

Ismert molekulatömegű fehérjék (fehérje létra) segítségével a módszer alkalmas különböző fehérjék molekulatömegének meghatározására. Az elválasztott polipeptidláncok láthatóvá tehetők különböző festési eljárásokkal.

Natív-PAGE:

Az elektroforézist nem denaturáló (SDS-től mentes) közegben végzik.

Agaróz gélelektroforézis: A nagyobb méretű DNS, ill. RNS molekulák elválasztásához a poliakrilamidnál nagyobb pórusméretű agaróz gél használatos.

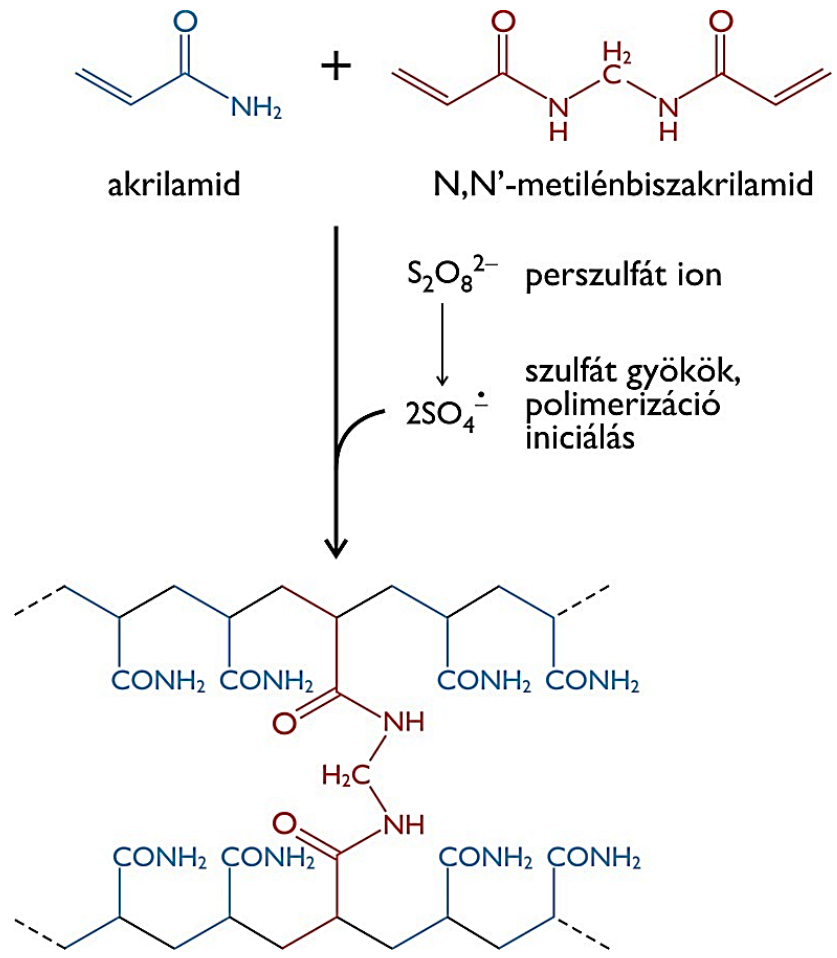
SDS-PAGE

A gél szerkezete:

A poliakrilamid géleket akrilamid monomer és N,N'-metilén-biszakrilamid térhálósító polimerizációjával állítják elő katalizátor és iniciátor jelenlétében.

iniciátor: ammónium-perszulfát

katalizátor: tetrametil-etilén-diamin (TEMED)



SDS-PAGE

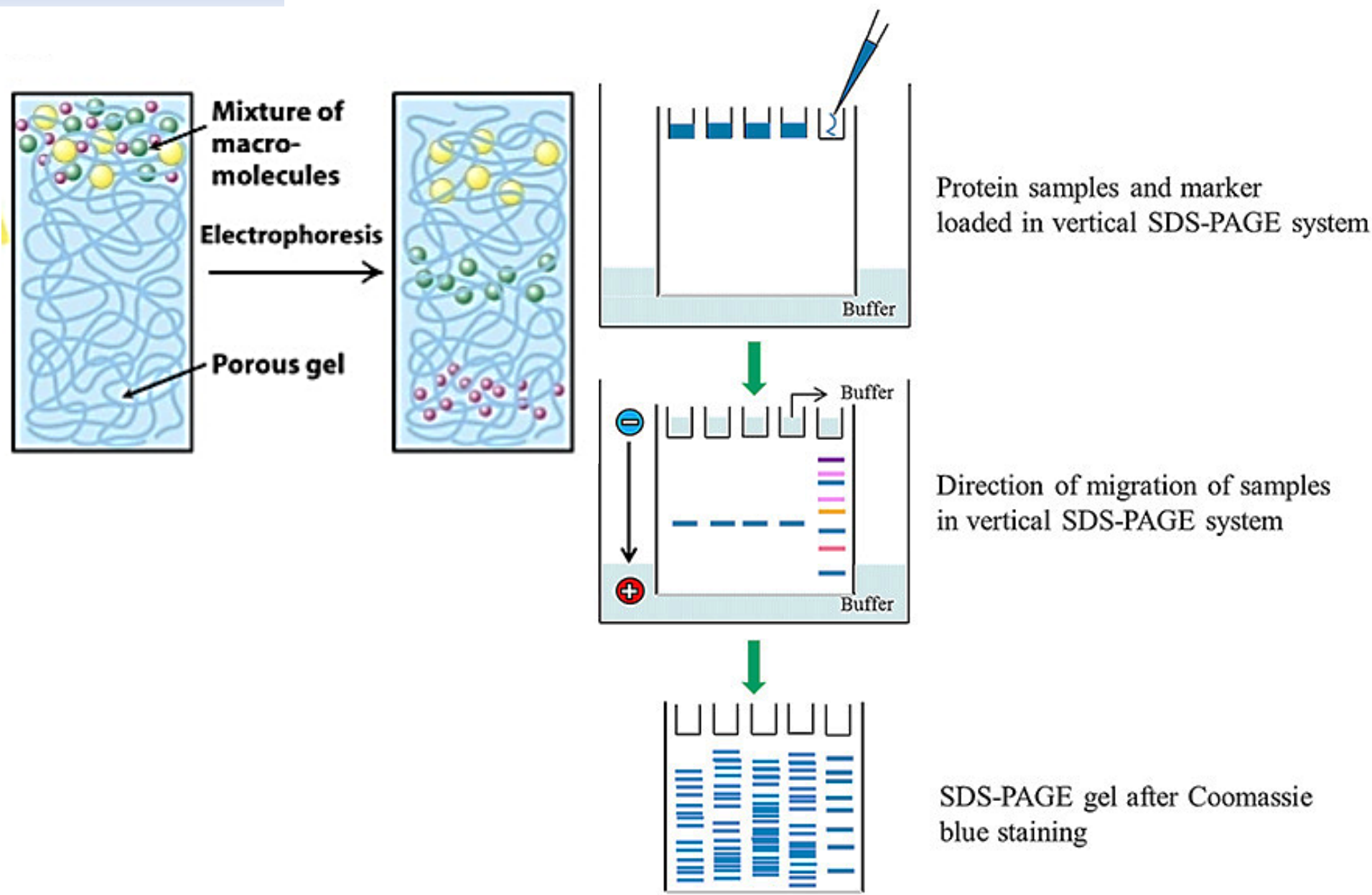
- Akrilamid: 4-20 % (m/m)
- Keresztkötő metilén-biszakrilamid a monomernek 1-3%-a
- Gél pórusmérete az akrilamid monomer koncentrációjának és a térhálósító (metilén-biszakrilamid) százalékos arányának változtatásával befolyásolható.
- A gél méret szerinti molekulaszűrő hatását a gél pórusmérete szabja meg
- A monomer koncentrációjának csökkentésével és a keresztkötő komponensek csökkentésével a gél üregnagysága (porozitása) növelhető.
- TEMED koncentráció határozza meg a poliakrilamid láncok hosszát, így a gél mechanikai stabilitását.

Akrilamid koncentráció (%)	Az elválasztás lineáris tartománya (kDa)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5	57-212

SDS-PAGE

- SDS (nátrium-dodecil-szulfát) egy anionos detergens, amely kitekeri a fehérjét (denaturálja, apoláros részével a fehérjék hidrofób magját fellazítja), és mivel anionos negatív töltéssel látja el a fehérjét.
- SDS-nek köszönhetően az összes fehérje töltése és alakja (pálca) közel azonos lesz.
- A kötődött SDS mennyisége arányos a polipeptidlánc hosszával, vagyis a fehérjék molekulaméretével.
- A molekulaméret arányos a molekulatömeggel, tehát SDS-PAGE így végső soron molekulatömeg szerint szeparál.
- A vándorlás sebessége és a molekulaméret logaritmusuk fordított arányban vannak egymással.
- A mintához brómfenolkék vagy metilénkék markert adnak, melyekkel követhető az elválasztás.
- Az elválasztott fehérjéket festési eljárást (Coomassie kék) követően teszik láthatóvá a gélben.
- Ismert molekulatömegű fehérjék (létra) segítségével a vizsgált fehérje molekulatömege meghatározható.

SDS-PAGE

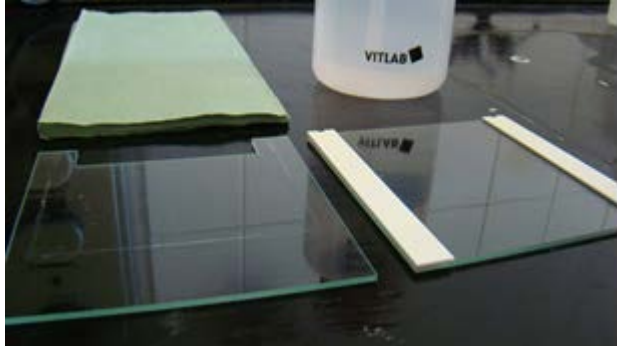


Protein samples and marker loaded in vertical SDS-PAGE system

Direction of migration of samples in vertical SDS-PAGE system

SDS-PAGE gel after Coomassie blue staining

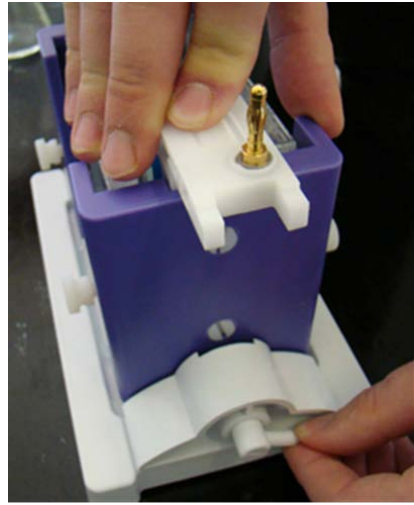
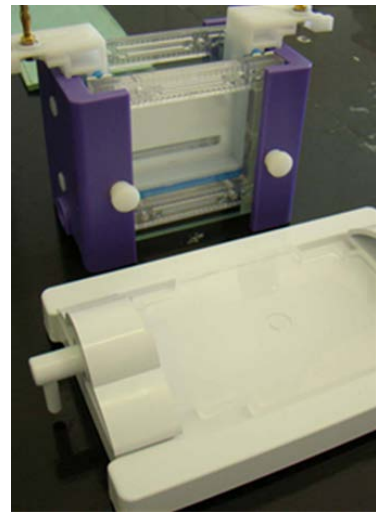
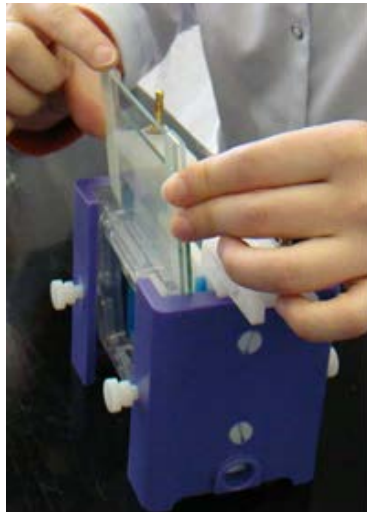
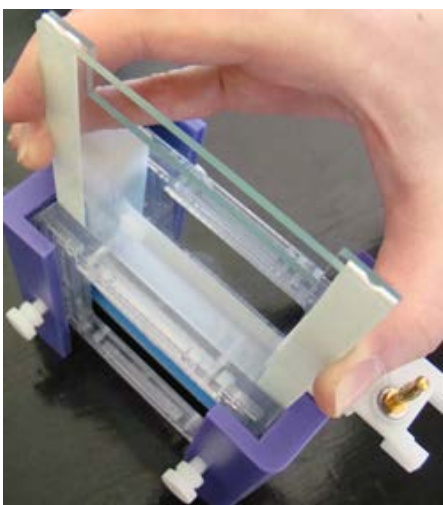
SDS-PAGE lépései



Az elektroforézis két egymással párhuzamos üveglap között kialakított gél lemezben történik, melyben egyszerre egymás mellett több minta futtatható.



Az üveglap megfelelő felületének alkoholos tisztítása

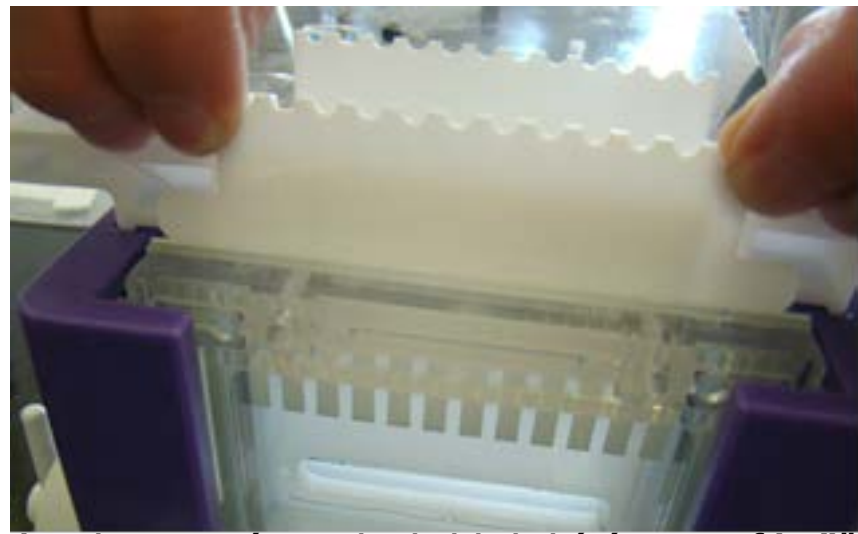


Összeillesztett üveglapok készülékbe helyezése.
Az üveglapok között 1 mm rés van.

SDS-PAGE lépései



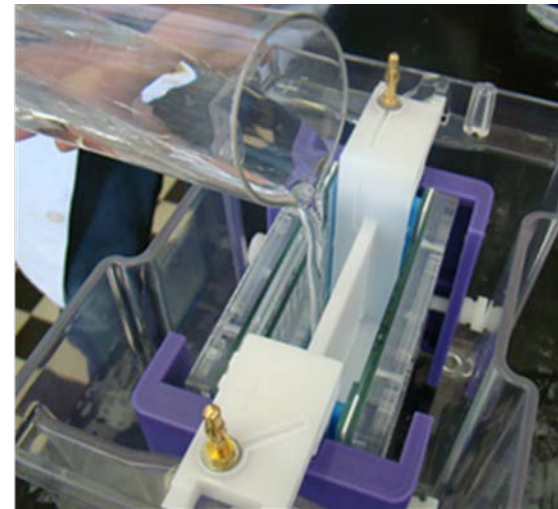
Az elkészített géloldat üveglapok közé juttatása, a polimerizációhoz 10-30 perc szükséges.



A mintatartó zsebek kialakítása a „fésű” géloldatba történő helyezésével.

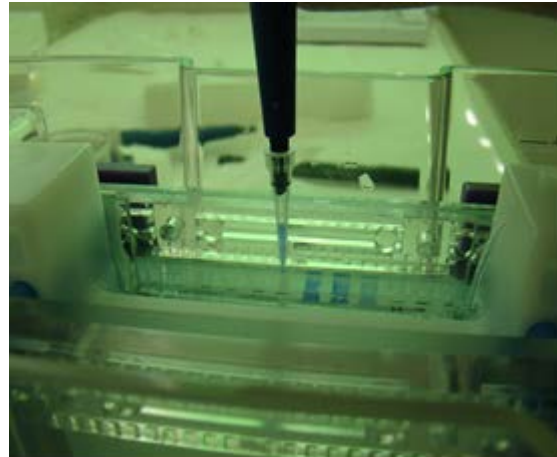
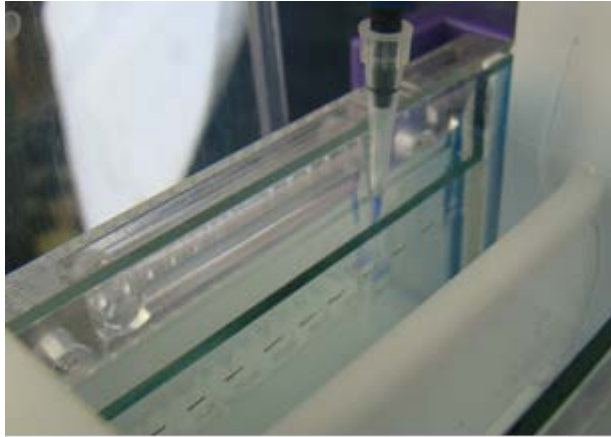


A fehérje minták elkészítése, brómfenolkék tartalmú pufferrel való hígítása.

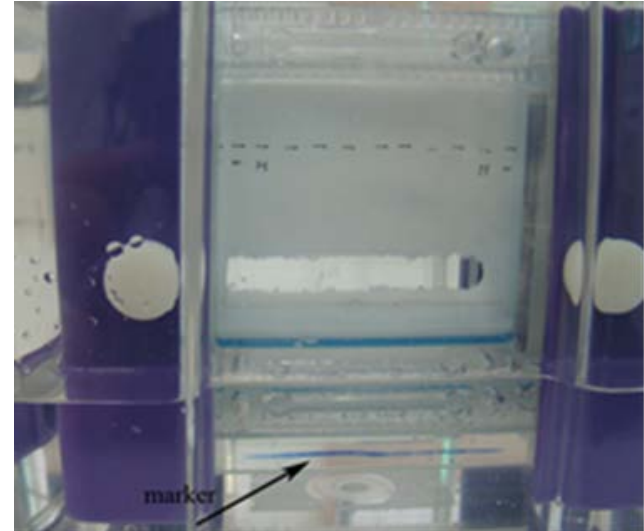
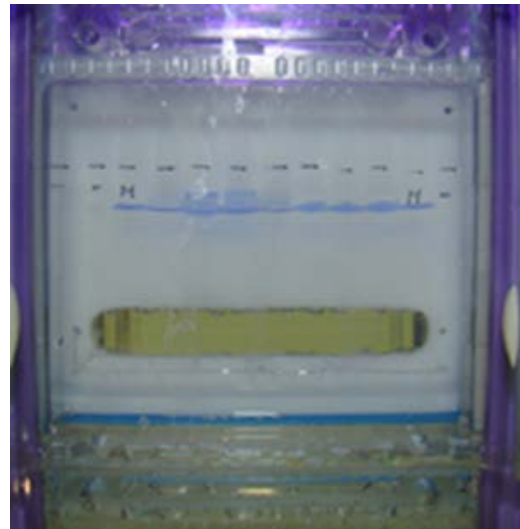


A gél megszilárdulása után a fésű eltávolítása, és a készülék feltöltése futtató pufferrel.

SDS-PAGE lépései



A minták bejuttatása a gél zsebeibe pipetta segítségével.

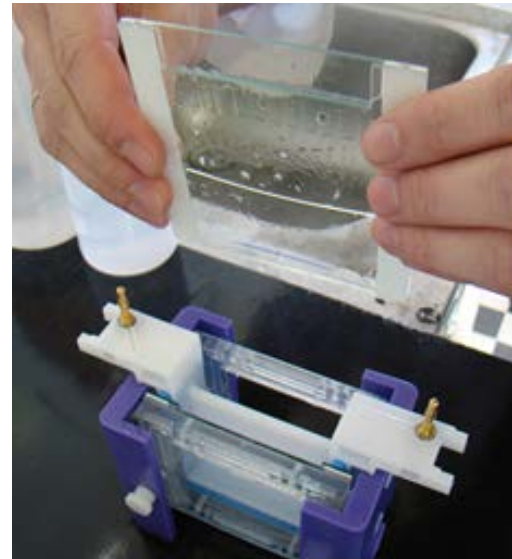


Készülék fedelének, elektródoknak a csatlakoztatása, az elektroforézis elindítása. Amikor a marker 1 cm híján eléri a gél alját, kapcsoljuk ki a tápegységet.

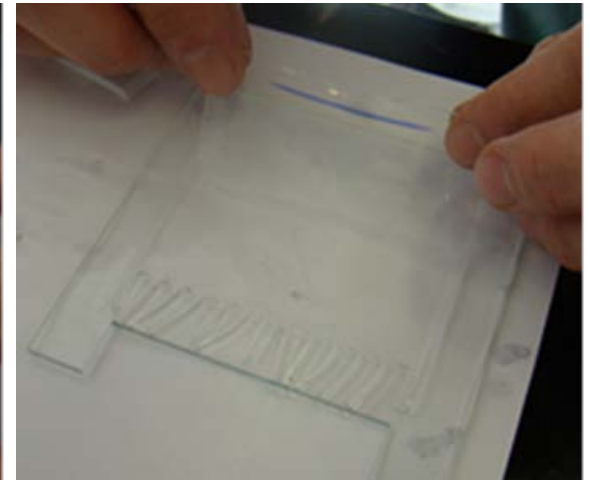
SDS-PAGE lépései



Az elemzés befejeztével a futtató puffer kiöntése a készülékből.



Az üveglapok kiemelése

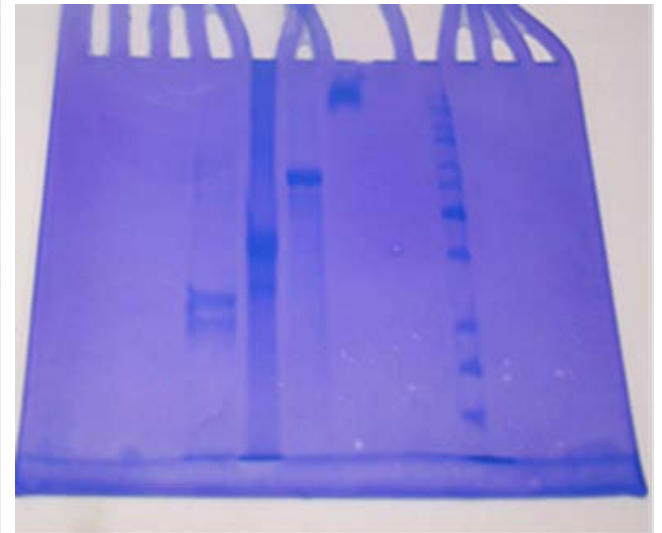


A gél eltávolítása az üveglapok közül.

SDS-PAGE lépései



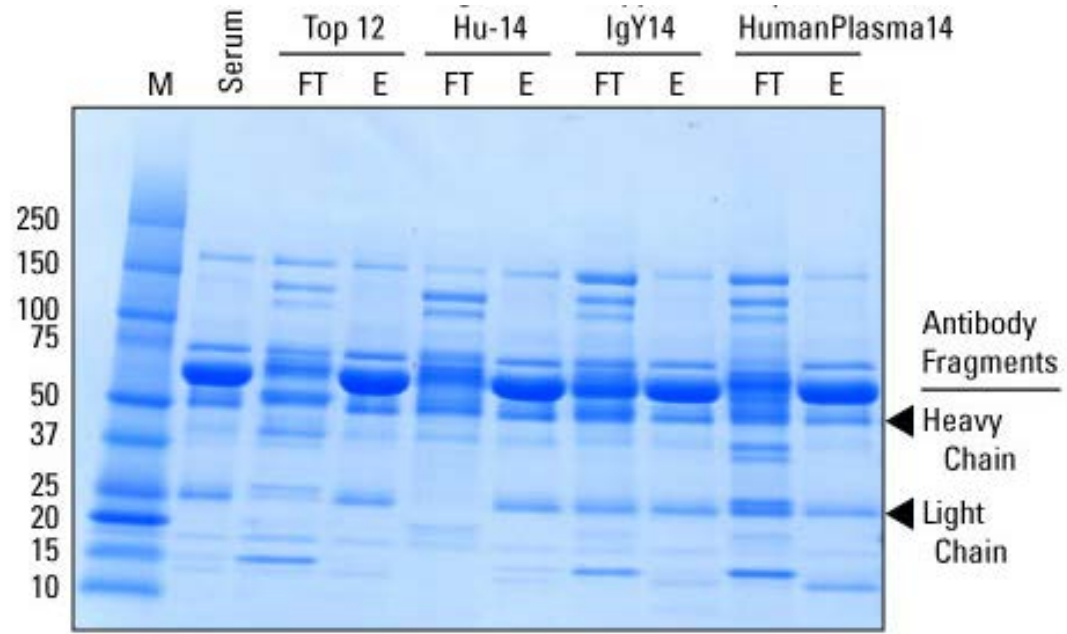
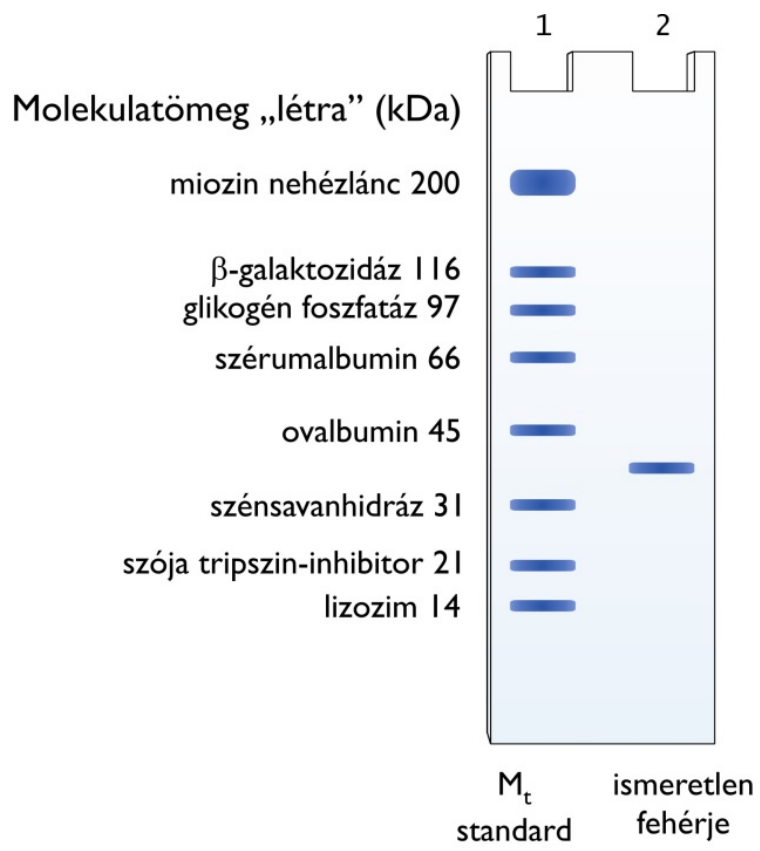
A gél festése Coomassie kék festékkel.



Gél színtelenítése, a felesleges festő oldat eltávolítása, értékelés.

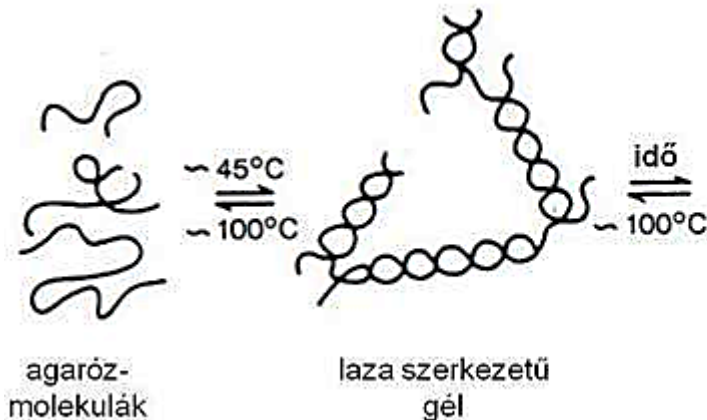
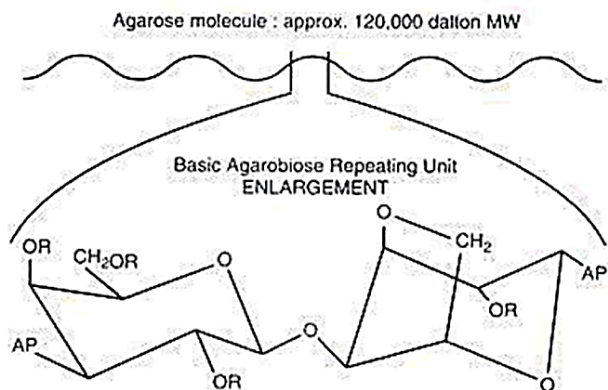
SDS-PAGE

Ismert molekulatömegű fehérjék (létra) segítségével a vizsgált fehérje molekulatömege meghatározható.



Agaróz gélelektroforézis

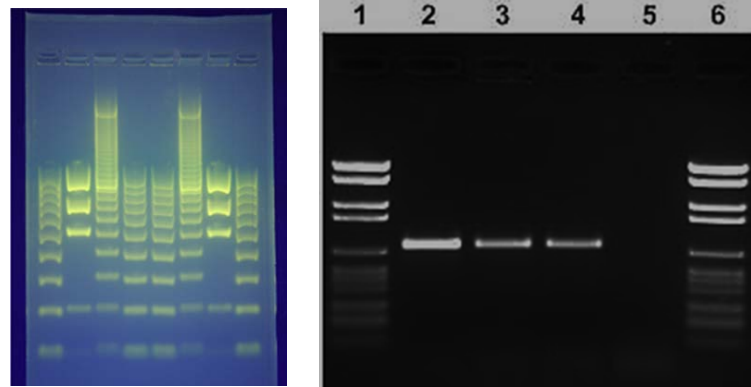
- Az agaróz gél pórusmérete jóval nagyobb, mint a poliakrilamid-gélé, ezért agarózzal nukleinsavak (RNS, DNS) és nagyméretű fehérjék választhatók el.
- Az agaróz gél agarózból és pufferből tevődik össze.
- Az agaróz (agar-agar) tengeri vörös algából kivont poliszacharid, galaktóz lineáris polimerje.
- Forrásban lévő vízben oldható fel, a szilárd gél szerkezet 32-40°C alá hűlve alakul ki oly módon, hogy a lineáris szálak dupla helikális szerkezetbe rendeződnek, melyeket hidrogén kötések stabilizálnak
- Az agaróz koncentrációja határozza meg a pórusméretet.
- A mobilitás fordítottan arányos a molekulásúly 10-es alapú logaritmusával.



Az agaróz gél szerkezete

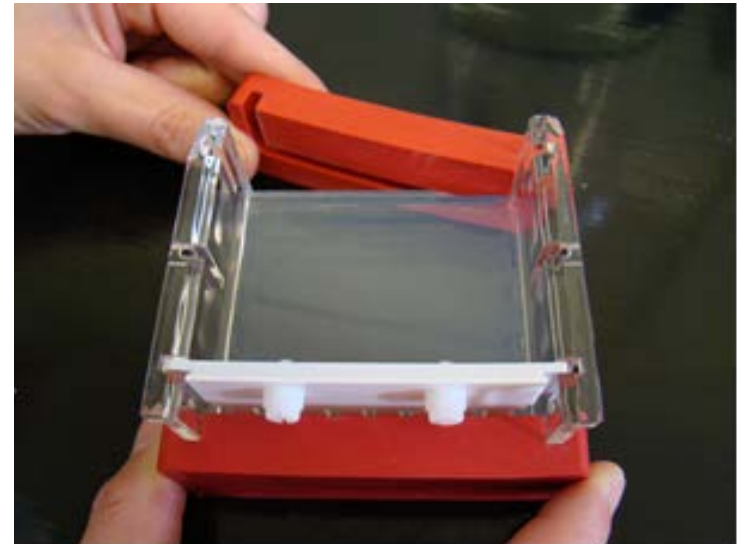
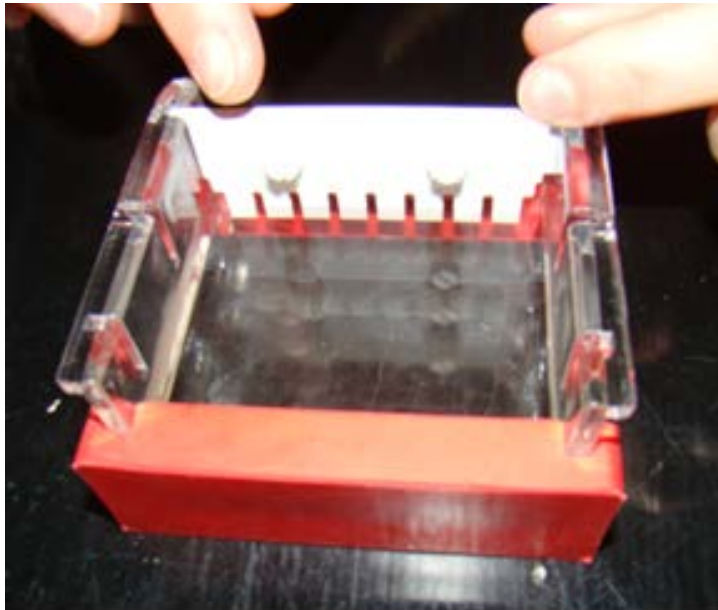
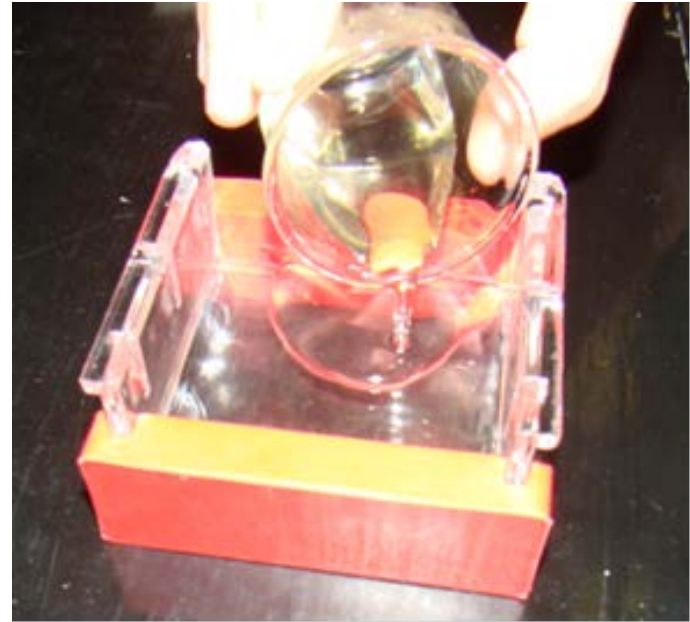
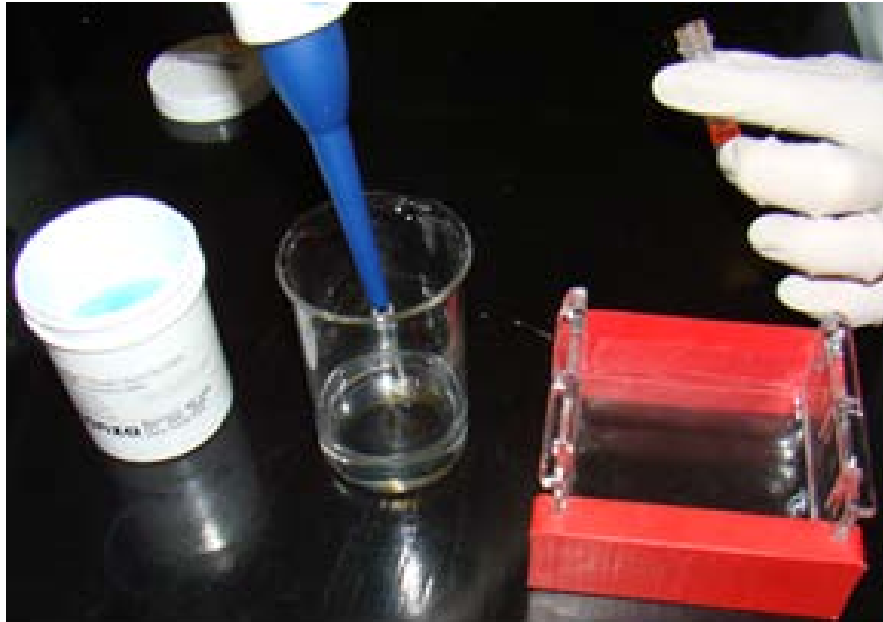
Agaróz gélelektroforézis

- A mintákat minta pufferrel keverik össze, mely kétféle festéket, brómfenol-kéket és xilén-cianolt, valamint nagy sűrűségű glicerint tartalmaz. A brómfenolkék a futási frontot, a xilén-cianol a futás legvégét mutatja. A glicerint a mintát a zsebek alján tartja.
- A DNS fragmensek speciális fluoreszcens jelölő molekulával, etídium-bromiddal tehetőek láthatóvá, mely a kettős szálú DNS közé interkalálódik, és UV fényel gerjesztve látható fényt emittál. Etídium-bromid erősen mutagén, ezért már más DNS festéket (Gelstar) használnak helyette, amelyet gélöntéskor adnak az elegyhez.
- A láthatóvá tett DNS/RNS fragmentumok méretét molekulásúly markerhez (létra) történő viszonyítással határozhatjuk meg.
- Agaróz gélből a DNS fragmensek akár ki is nyerhetők és további biológiai munkához felhasználhatók.

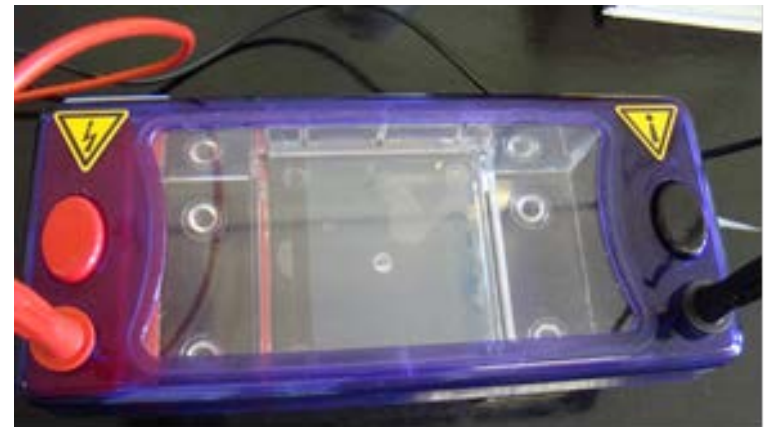
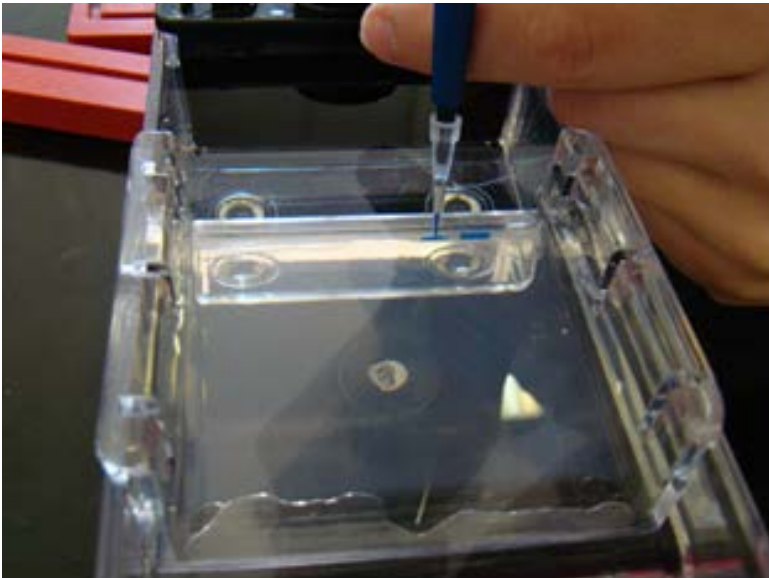
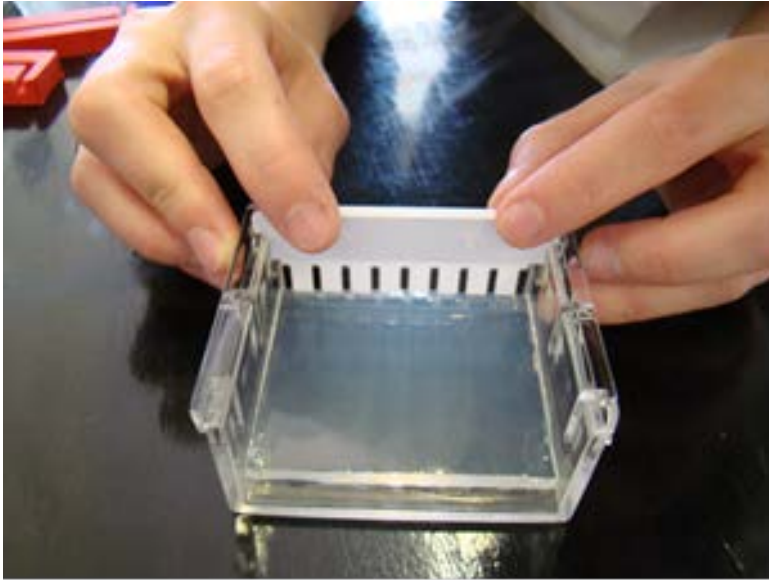


Agaróz gélelektroforézissel elválasztott, fluoreszkáló festékekkel festett DNS mintázatok

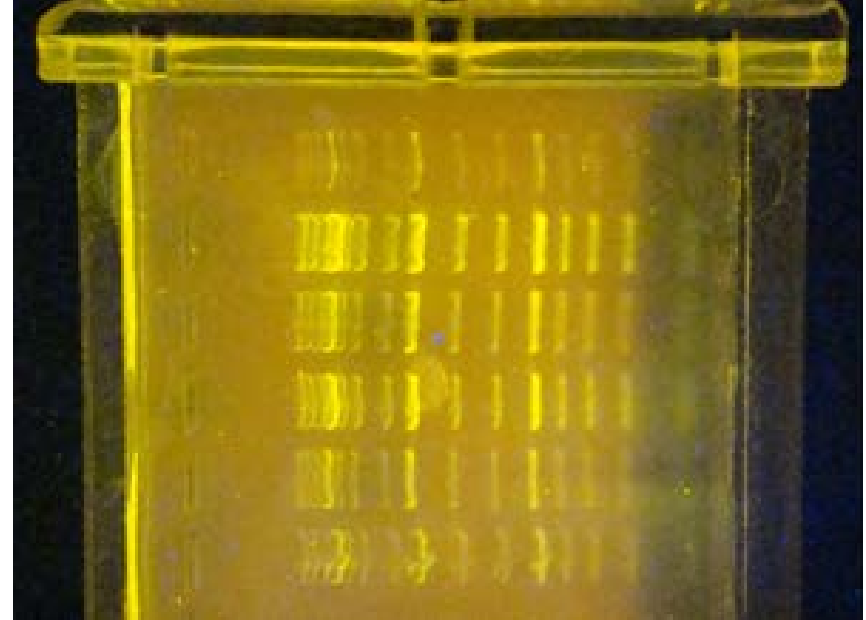
Agaróz gélelektroforézis lépései



Agaróz gélelektroforézis lépései

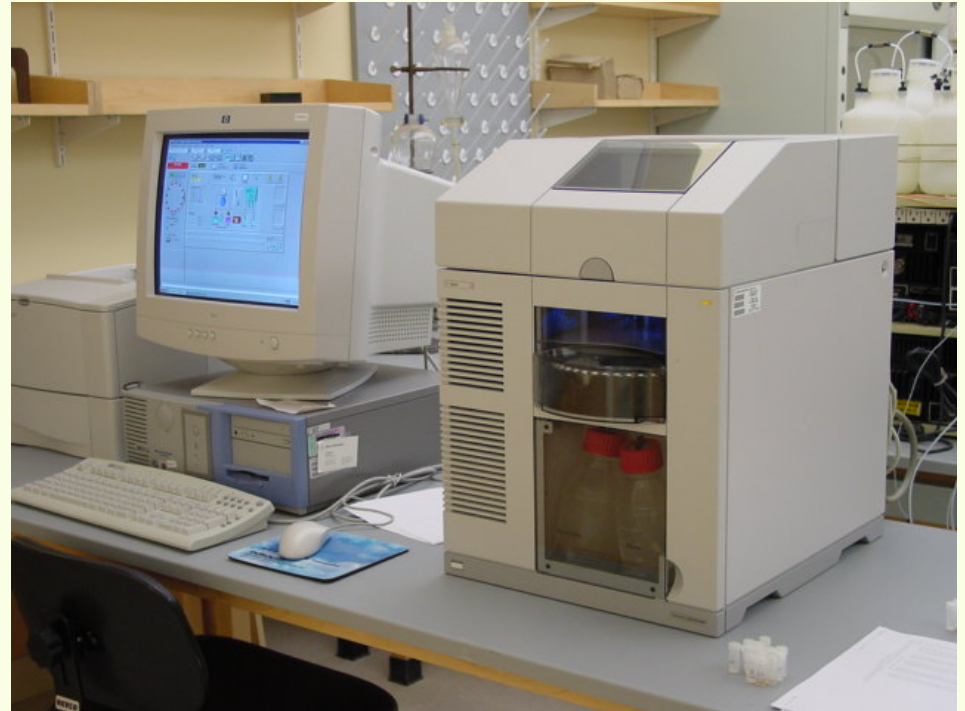


Agaróz gélelektroforézis lépései



Kapilláris elektroforézis

- 1981 Jorgenson: Kapilláris elektroforézis (CE, CZE)
- 1988 Első kereskedelmi CE készülék



- 1992 Manz, Harrison: Mikrocsip kapilláris elektroforézis

Kapilláris elektroforézis

1. A módszer elve:

- Elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak. A részecske elektroforetikus mozgékonyágát a töltése, mérete és a közeg viszkozitása határozza meg.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

μ : elektroforetikus mozgékonyág

q : részecske töltése

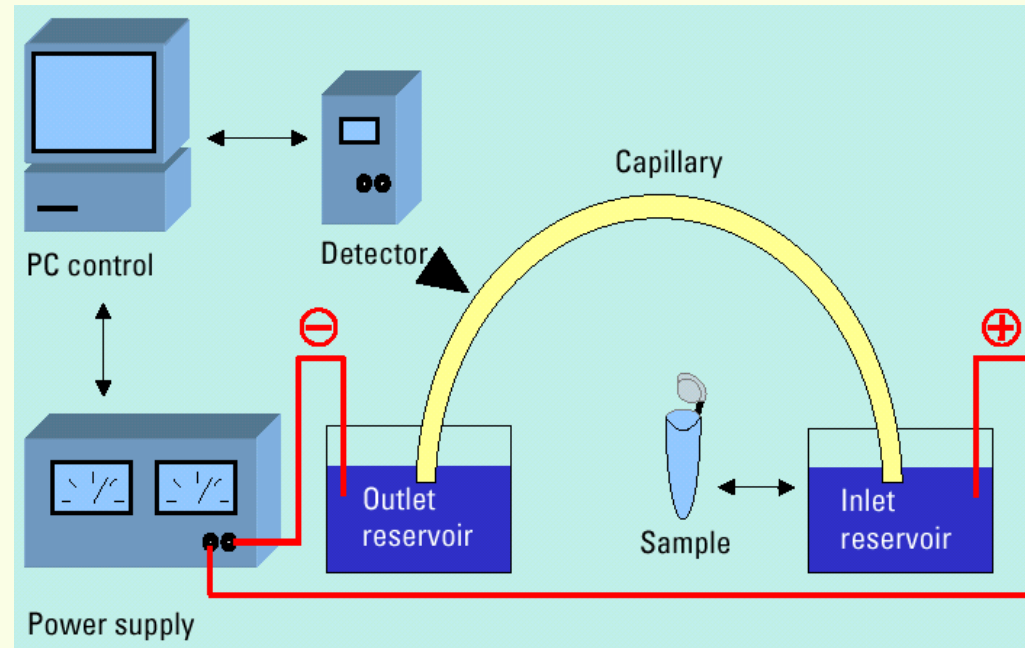
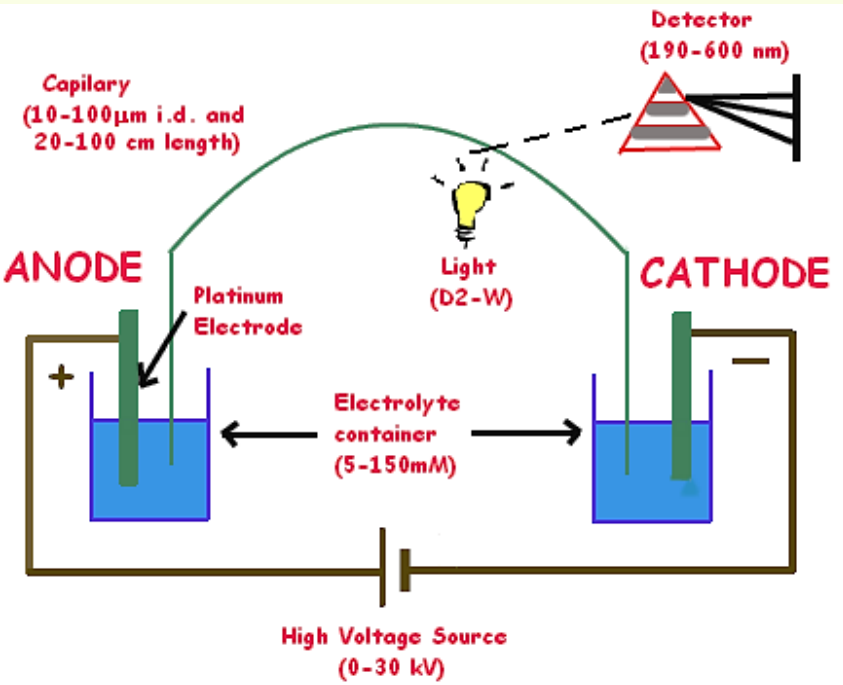
η : közeg viszkozitása

r : részecske sugara

- A kromatográfiás technikák mellett a legfontosabb elválasztástechnikai módszer.
- Szervetlen és szerves komponensek, kis- és nagymolekulák egyaránt vizsgálhatók.

Kapilláris elektroforézis

2. A készülék felépítése



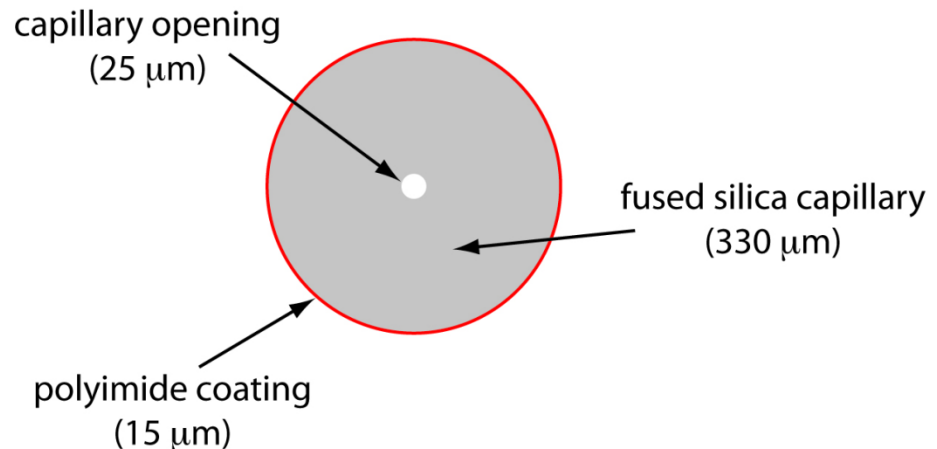
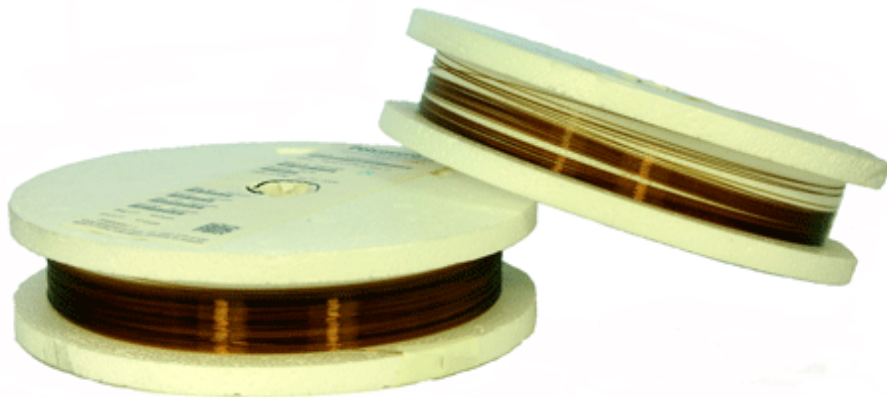
1. Puffer oldattal töltött kvarc kapilláris
2. Puffert tartalmazó edények
3. Platina elektródok

4. Nagyfeszültségű tápegység
5. Detektor
6. Adatfeldolgozó egység

Kapilláris elektroforézis

Kapilláris:

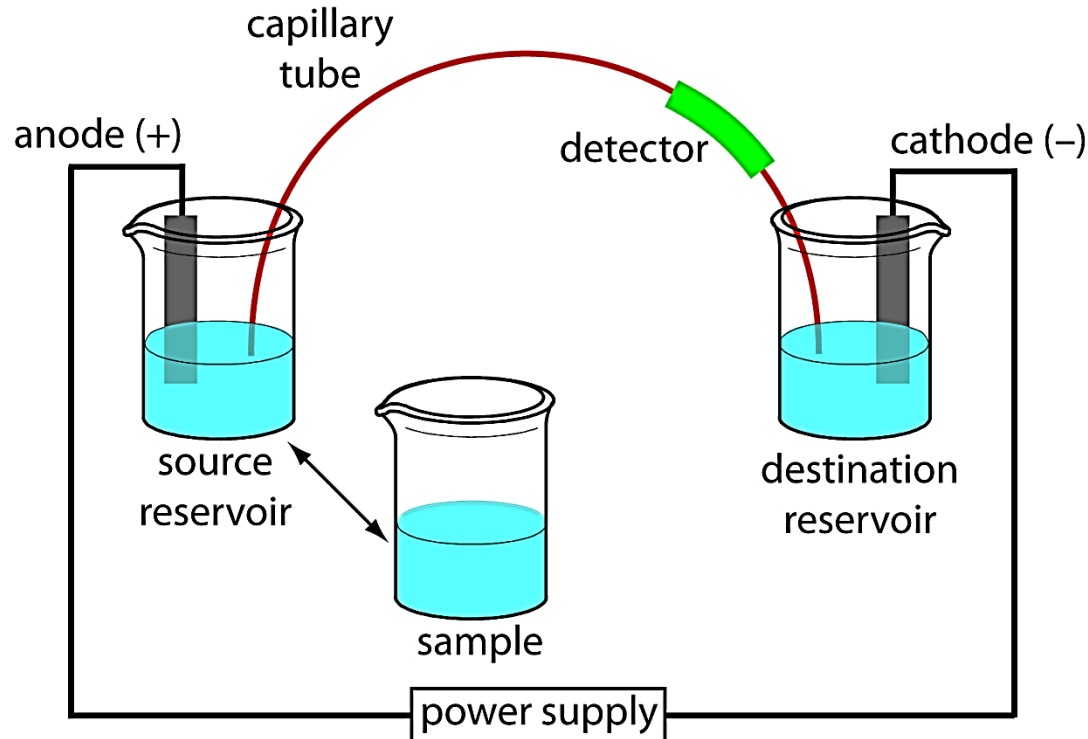
- Kémiaailag és elektromosan inertnek, UV-Vis fényt áteresztőnek, hajlékonynak, szilárdnak kell lennie → KVARC
- Az elválasztás 25-100 μm belső átmérőjű, 30 cm-1 m hosszúságú, puffer oldattal töltött **kvarc kapillárisban** történik.
- Kívülről poliimid réteggel borított (ne törjön el, és a könnyű kezelhetőség miatt).
- Kapilláris kondicionálása: az elválasztás előtt a kapilláris belső felületének mosogatása NaOH vagy HCl oldattal és pufferrel a reprodukálható kapilláris felület kialakításához.
- A kvarc kapilláris két vége egy-egy platina elektródba lóg, ezek így merülnek bele a megfelelő puffert tartalmazó két kis edénykébe (inlet, outlet vials), melyek egy nagyfeszültségű tápegységgel vannak összekötve.



Kapilláris elektroforézis

Injektálás:

1. a puffert tartalmazó edény cseréje a mintát tartalmazó edényre
2. a mintabevitel nyomás (hidrodinamikus injektálás), vagy feszültség (elektrokinetikus injektálás) alkalmazásával történik. Kis mintamennyiség jut a kapillárisba: 1-10 nl.
3. Injektálás után a mintát tartalmazó edény visszacserélése a pufferes edényre.



Elválasztás:

- A mintainjektálás folyamata után az inlet és outlet pufferes edénybe merülő Pt elektródokra nagy feszültséget (10-30 kV) kapcsolnak, ezzel elindul az elektroforézis, azaz elektromos erőterben a részecskék tömeg/töltés szerinti vándorlása.

Detektálás:

1. optikai: UV-VIS spektrofotometriás detektálás:

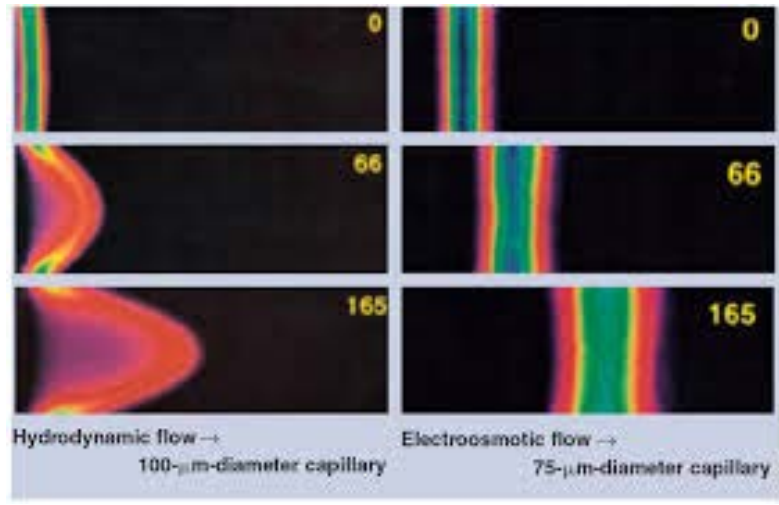
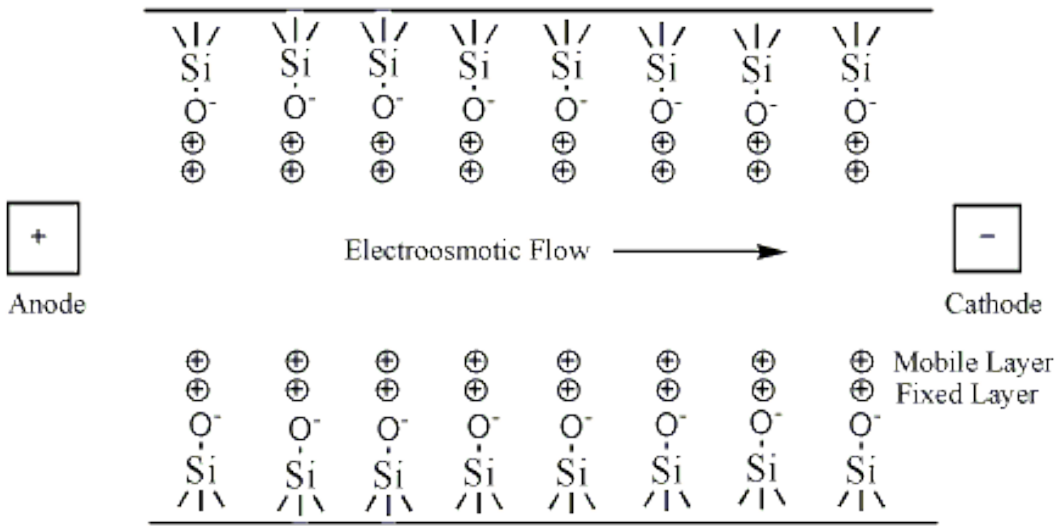
- deutérium lámpa, diódasoros detektor
- a kvarc kapilláris falán történik a detektálás, a rövid optikai úthossz miatt kicsi a kimutatási határ (Lambert-Beer törvény: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$)

2. elektrokémiai: vezetőképességi detektálás

3. kapcsolt technika, CE-MS, tömegspektrométerrel való kapcsolás

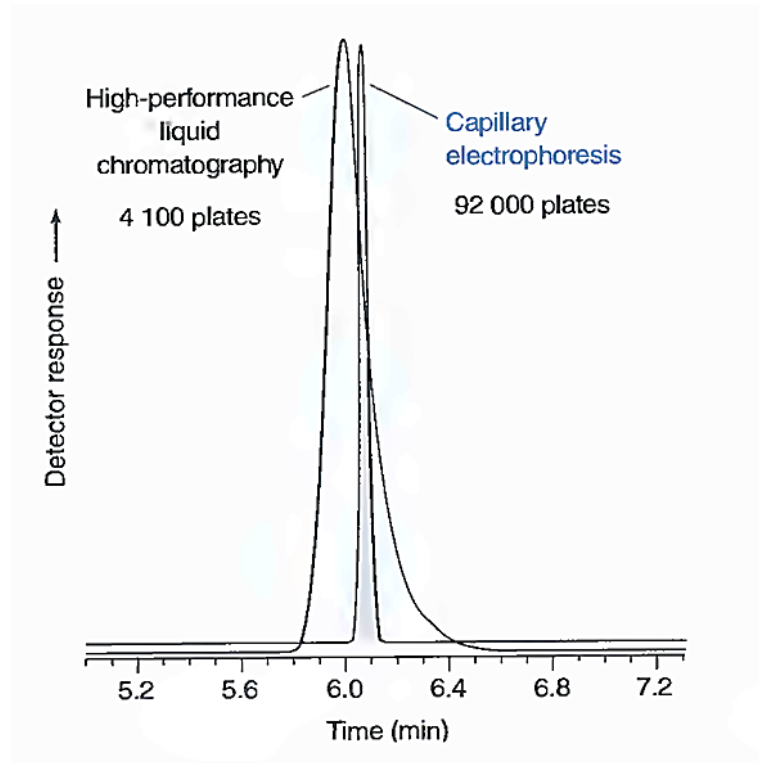
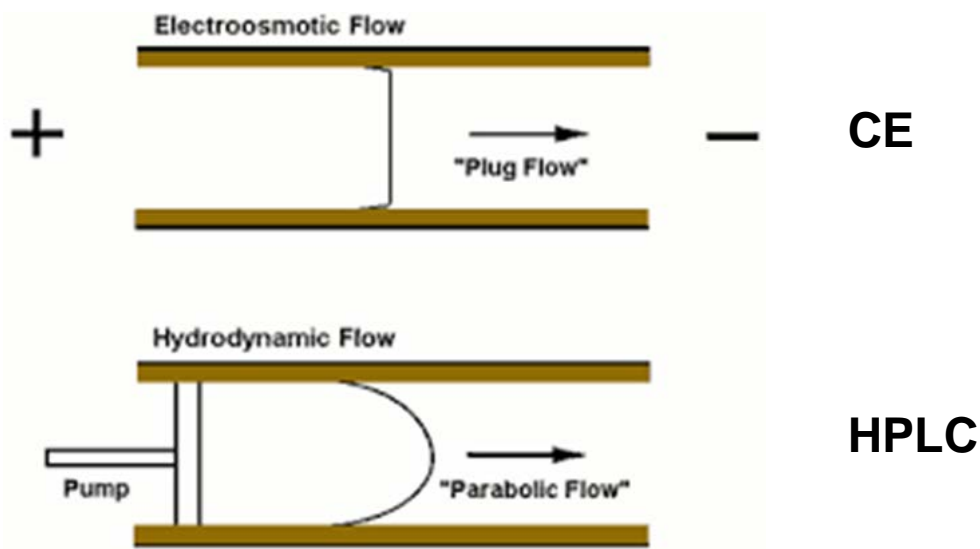
Elektroosmotikus áramlás (EOF)

Miért van, hogy a negatív ionok is eljutnak a negatív pólus felé?
Az elektroosmotikus áramlás miatt.



Az EOF a folyadék kapillárisbeli tömegtranszportja, mely a kapilláris belső falán kialakult felületi töltések (kettős réteg) következménye.

Kapilláris elektroforézis, EOF



Kapilláris elektroforézis, elektroferogramok kiértékelése

Minőségi analízis:

Elektroferogramon látható csúcsok azonosítását jelenti.

- Migrációs idők alapján, adott csúcs migrációs idejének (mozgékonyosságának) összehasonlítása ismert standard vegyület eredményeivel, fontos, hogy az elválasztás paraméterei tökéletesen egyezzenek a két esetben.
- A kérdéses vegyületből adjunk a mintához, a csúcsnak nagyobbnak kell lennie váll kialakulás nélkül.
- UV-VIS spektrofotometriás detektálás esetén spektrum felvétele
- CE-MS

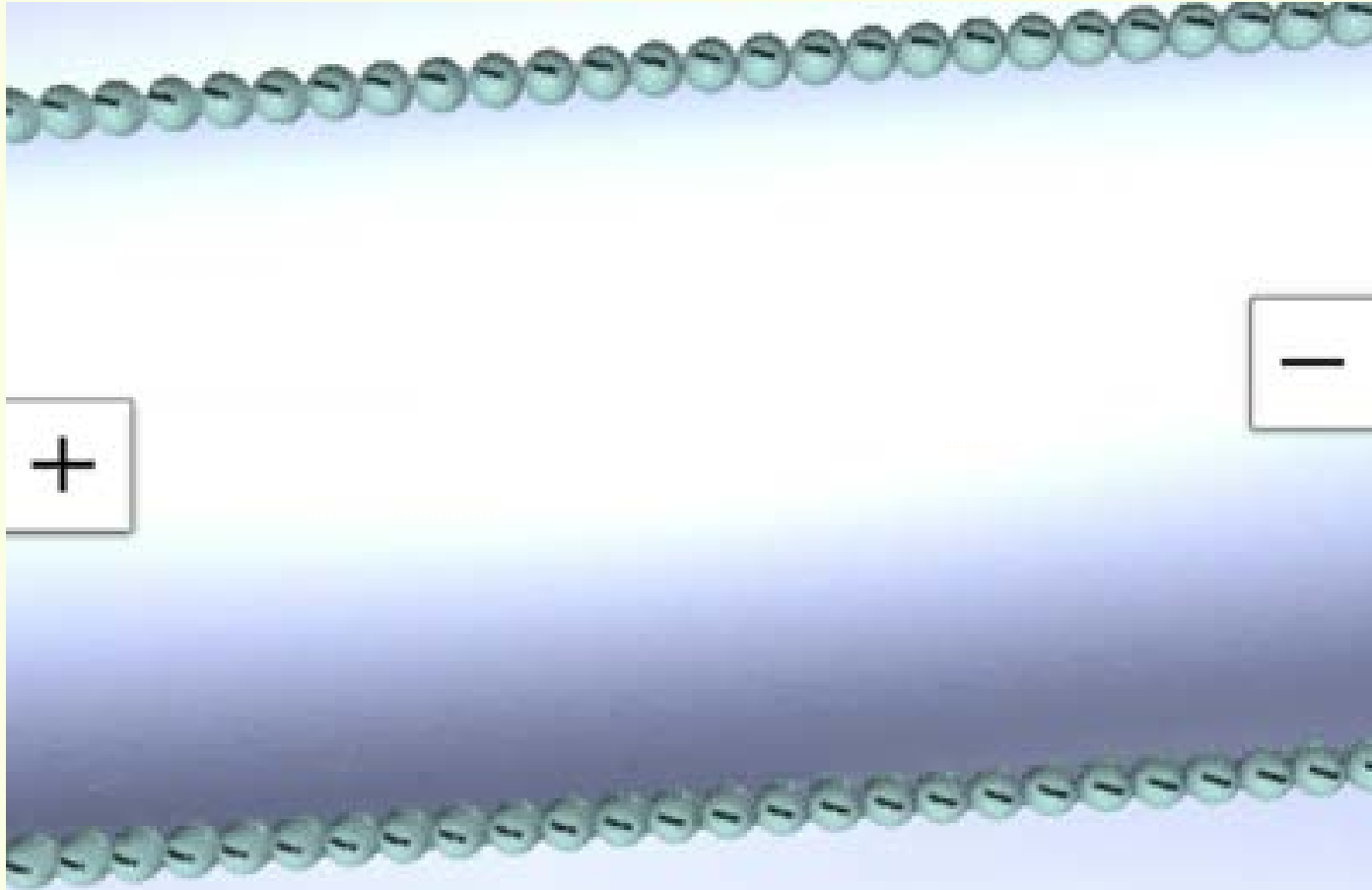
Mennyiségi analízis:

- Az elektroferogram csúcsának magassága és területe arányos a minta koncentrációjával (Lambert-Beer törvény).

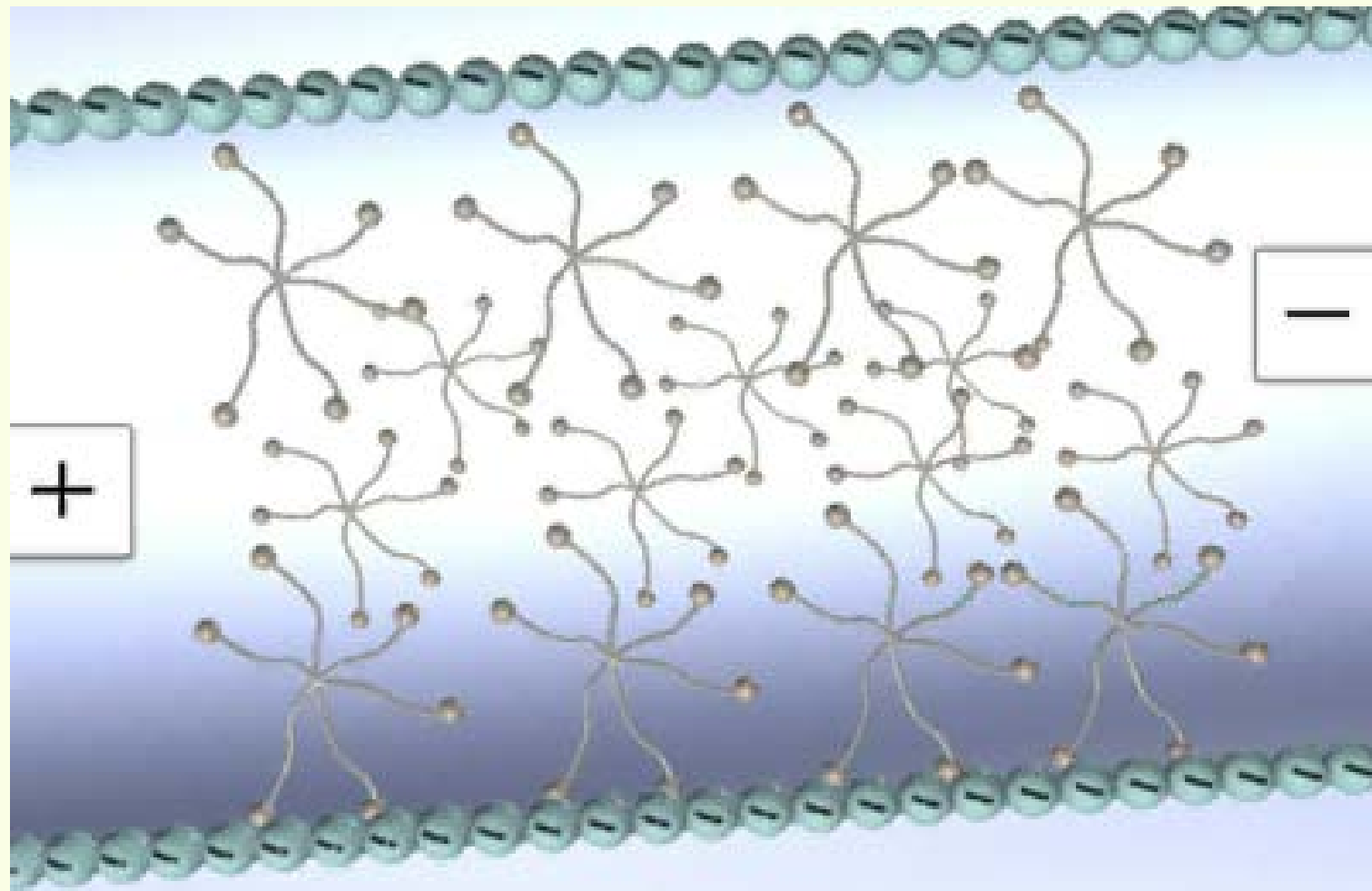
A kapilláris elektroforézis módszerei

Kapilláris elektroforézis módszerei	Alkalmazott háttérektrólit	Felhasználás
Kapilláris zóna elektroforézis (CZE)	foszfát puffer, borát puffer, HEPES stb	töltéssel rendelkező szervetlen és szerves komponensek
Micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MEKC)	Felületaktív detergens, pl. Nátrium dodecil szulfát (SDS)	Töltés nélküli vegyületek
Kapilláris gélelektroforézis (CGE)	SDS tartalmú nagy molekulatömegű polimer mátrixoldat	Fehérjék, DNS, RNS
Kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF)	pH gradiens	aminosavak, peptidek, fehérjék izoelektromos pontjuk szerint
Kapilláris izotachoforézis (CITP)	vezető és záró elektrólit	ionok
Királis kapilláris elektroforézis (CCE)	királis szelektor	királis molekulák
Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)	kromatográfias állófázissal töltött kapillárisban mintát és mozgófázist EOF szállítja	kismolekulák

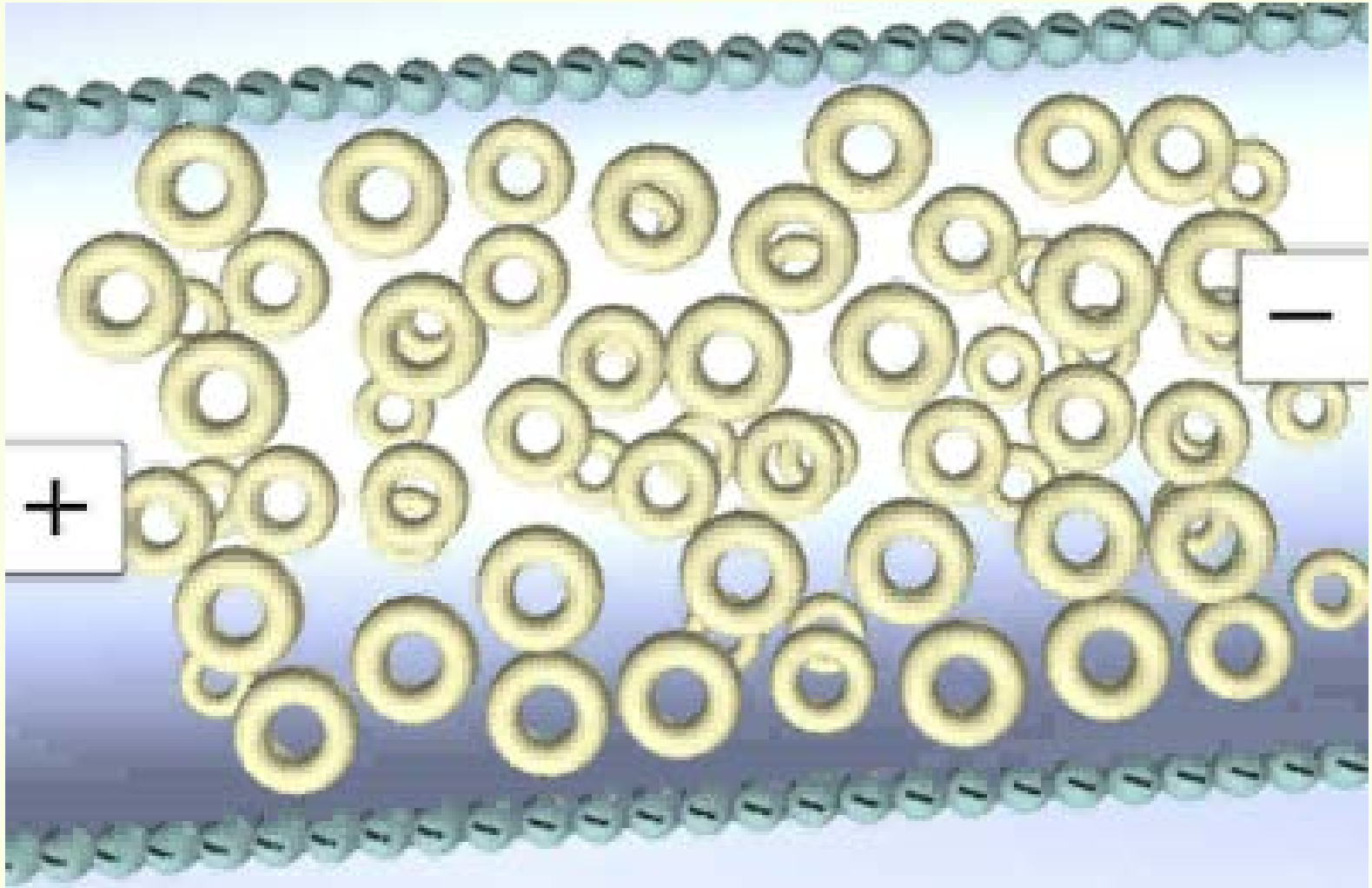
Kapilláris zónaelektroforézis, CZE



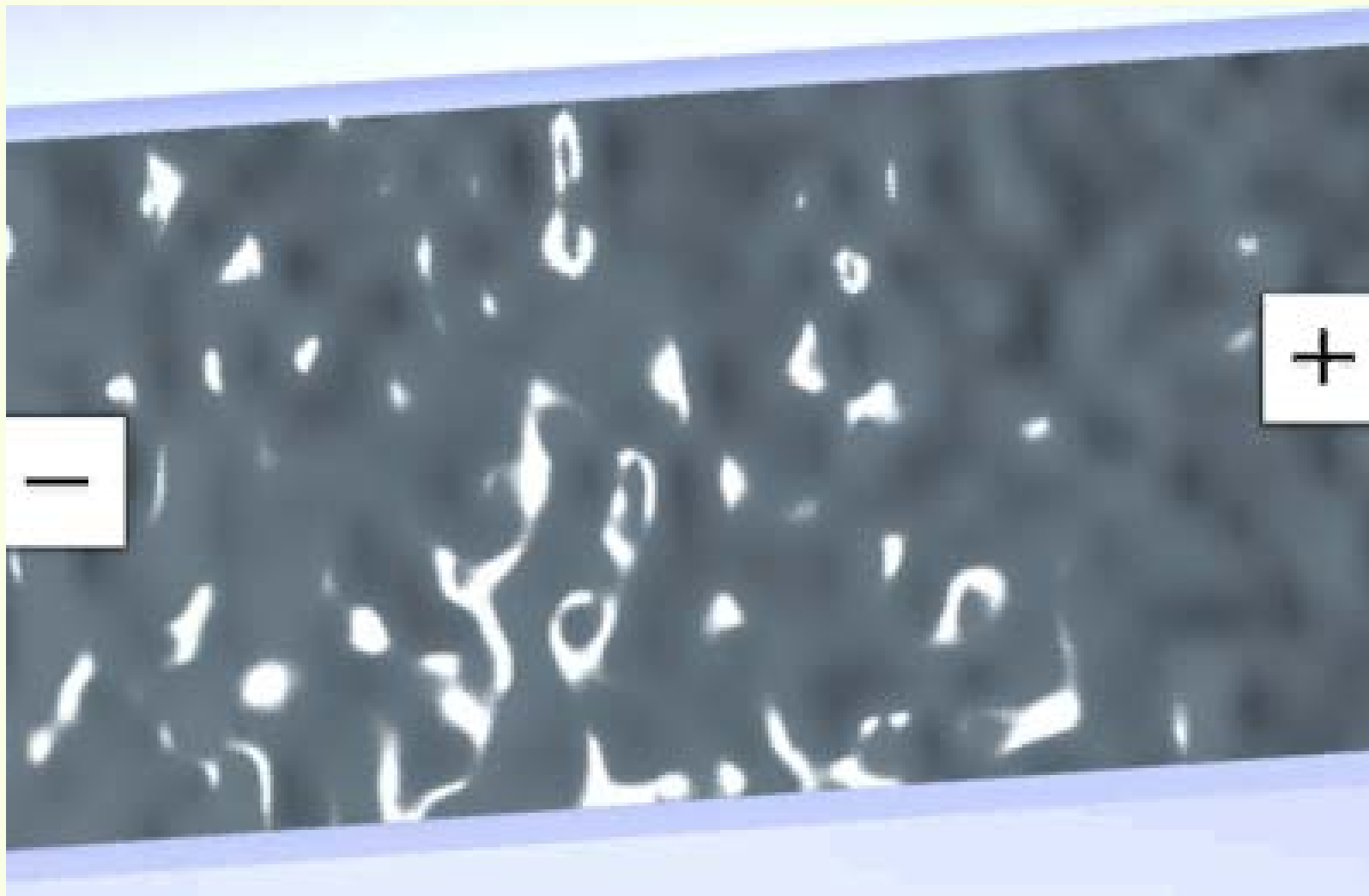
Micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia, MEKC



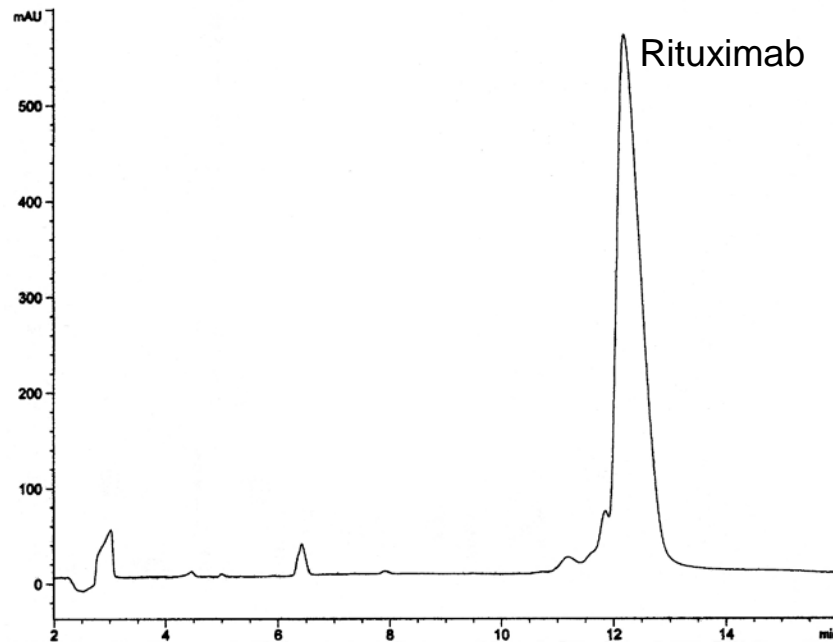
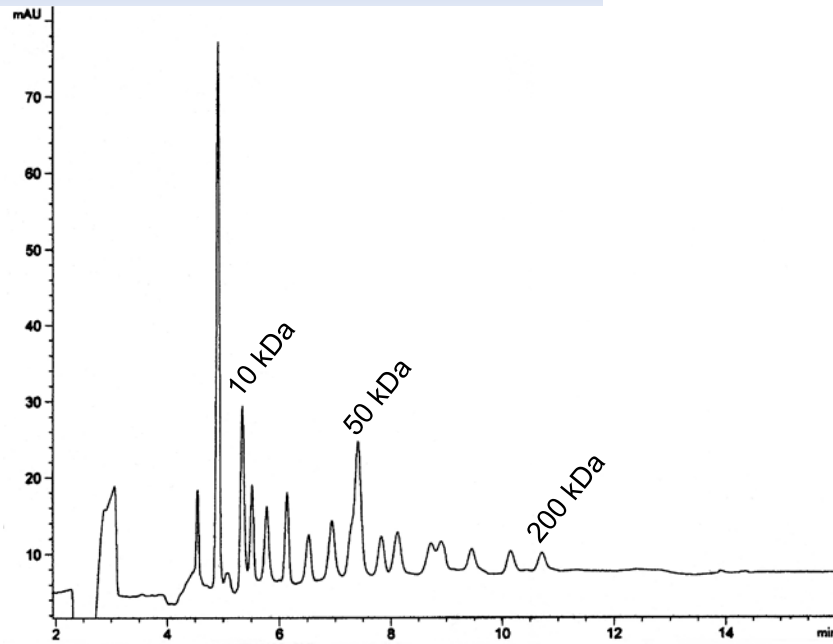
Kiláris kapilláris gélelektroforézis, CCE



Kapilláris gélelektroforézis, CGE

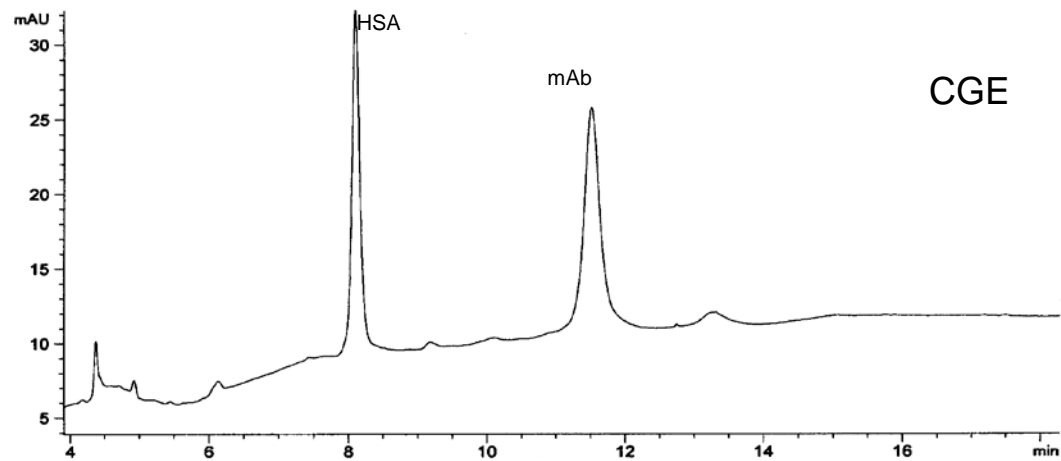
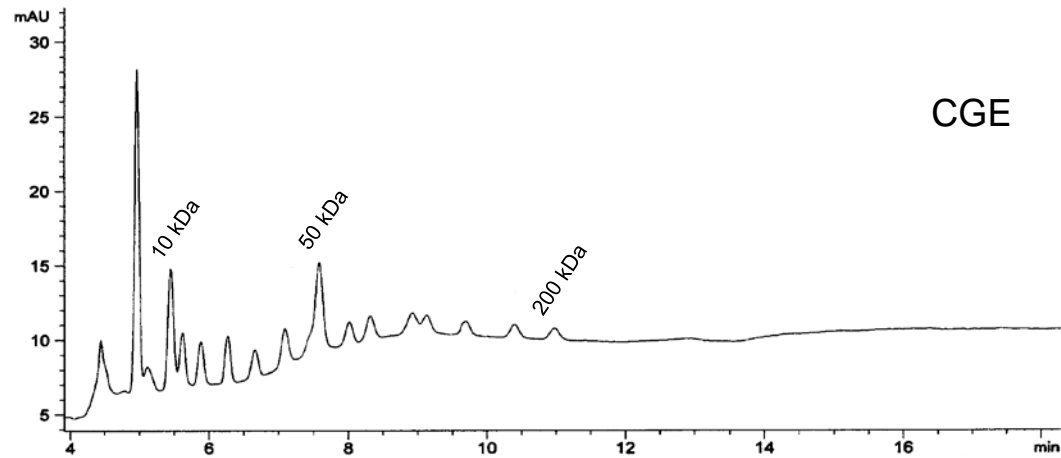


Kapilláris gélelektroforézis, CGE



Körülmények: CGE, SDS-MW gél puffer, $l_{tot}=33,5$ cm, $l_{eff}=8,5$ cm, i.d.=50 μ m, injektálás: +7,5 kV·50 sec, +15 kV, $\lambda=200$ nm

Kapilláris gélelektroforézis, CGE



Körülmények: CGE, SDS-MW gél puffer, $l_{\text{tot}}=33,5$ cm, $l_{\text{eff}}=8,5$ cm, i.d.=50 μM , injektálás: +7,5 kV·50 sec, +15 kV, $\lambda=200$ nm

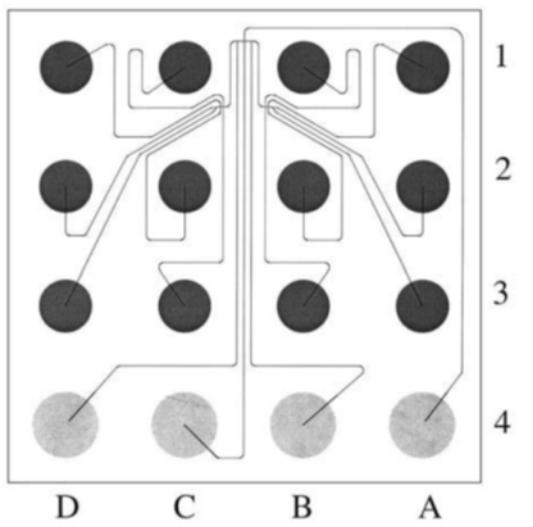
Bioanalyzer, microchipek DNS és fehérjék meghatározásához



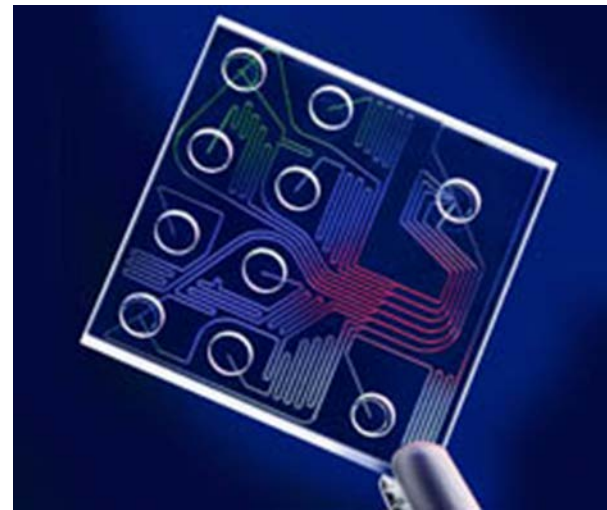
Bioanalyzer 2100 készülék



Chipek a Bioanalyzer készülékhez



A mikrosatorna mintázata



Bioanalyzer, microchipek DNS és fehérjék meghatározásához

