

Fehérjék elválasztására alkalmazható mikrofluidikai rendszerek

Bioanalyzer, LabChip rendszerek. A készülékek működési elve, felépítésük, alkalmazásuk.

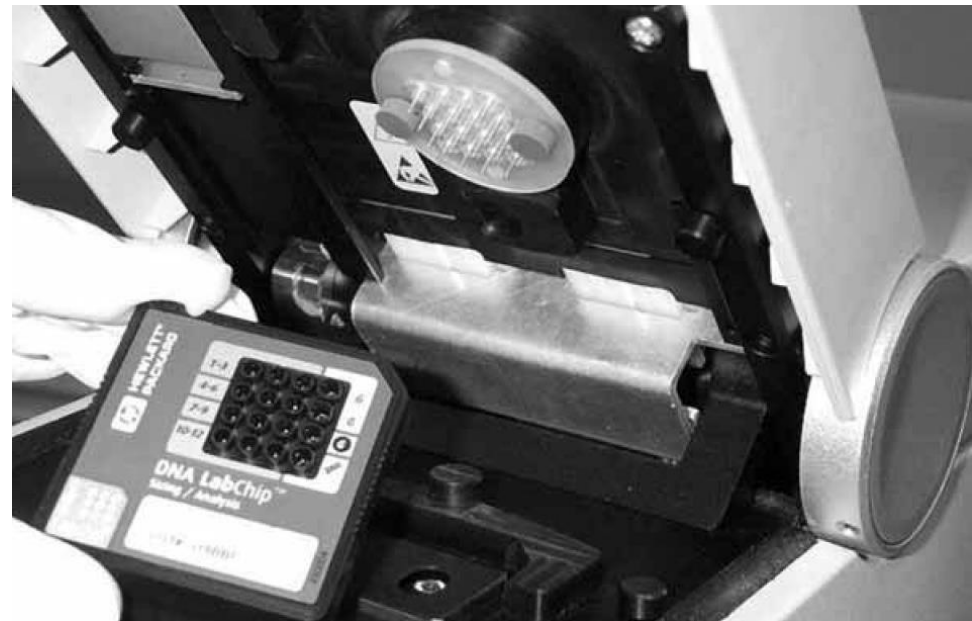
Kapilláris elektroforézis tömegspektrometriás detektálással

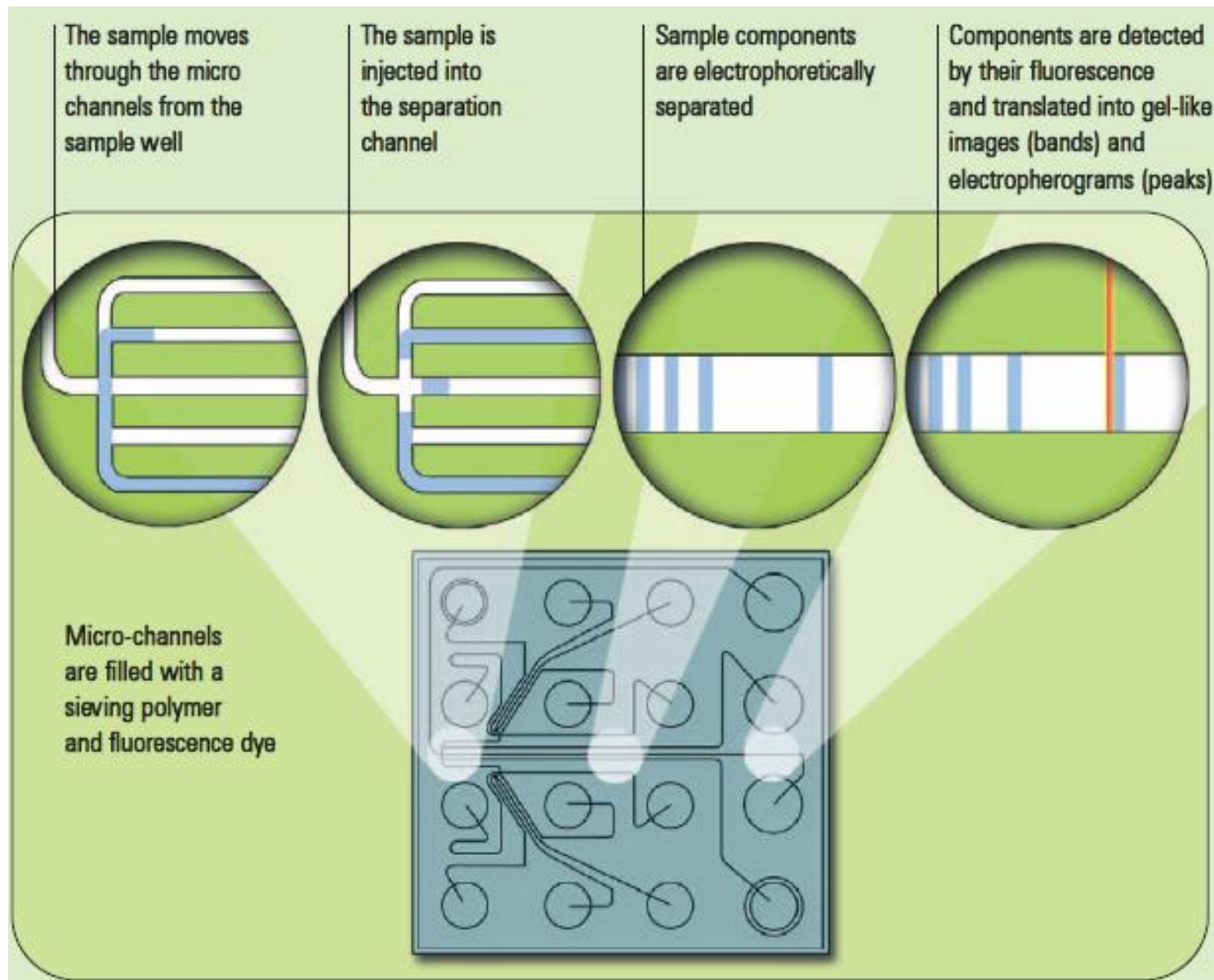
A CE-MS kapcsolások megvalósításának módszerei (Agilent és a Sciex/Beckman cégek kapcsolóelemei). Kiegészítő folyadék (sheath liquid) szerepe, kiválasztásának általános elvei. Alkalmazások,

Csipek a Bioanalyzer készülékhez

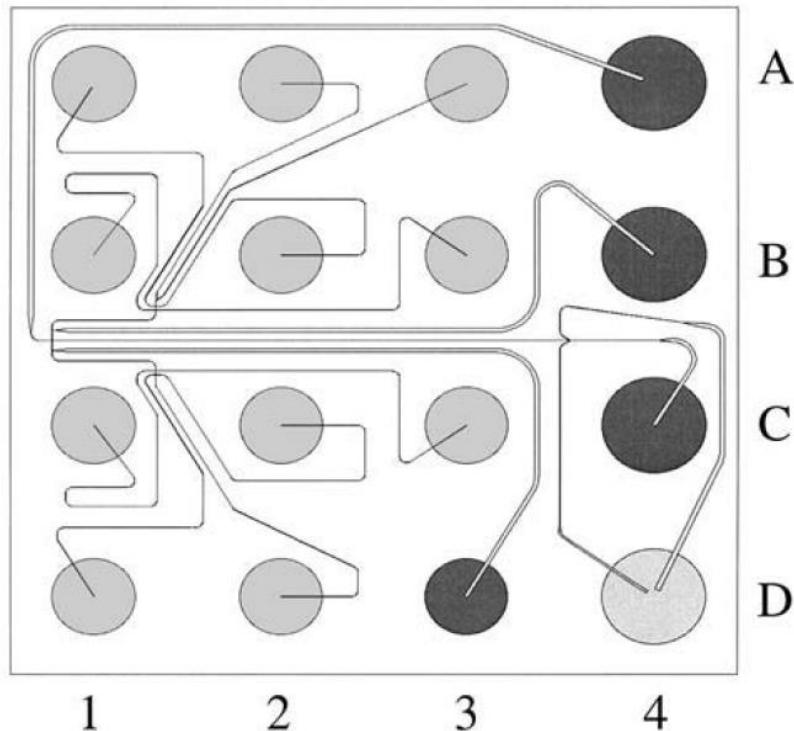


Az Agilent Bioanalyzer 2100 készülék



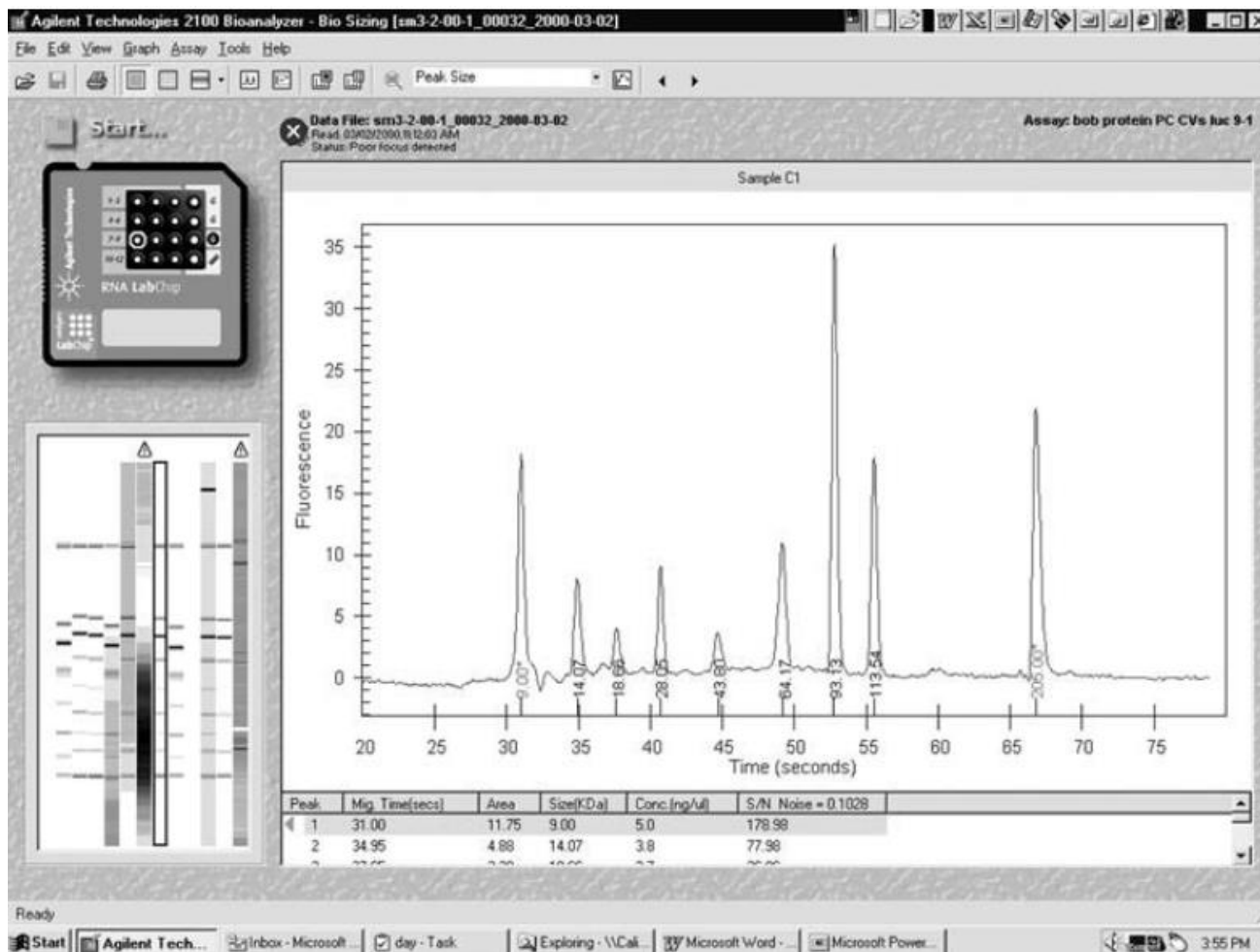


Fehérjék meghatározása Bioanalyzer 2100 készülékkel

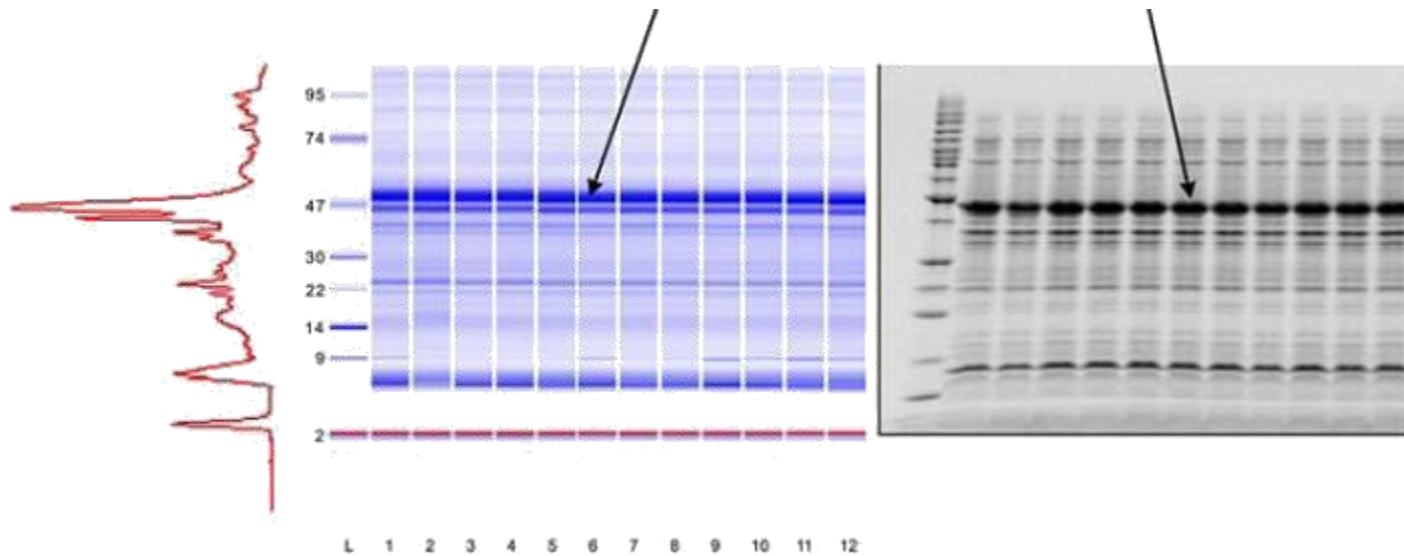


1. Először 12 μL gél-festék keveréket az A4 portba kell pipetázni, majd fecskendő segítségével (3 bar 60 s-ig) az A4 portból a csatornákat feltöltik.
2. 12 μL gél-festék keveréket pipetáznak a B4, C4 és D3 portokba.
3. 12 μL „festéktelenítő” (gél SDS-festék nélkül) oldatot pipetáznak a D4 portba.
4. 6 μL pufferral hígított mintaoldatokat a 10 mintatartó portba pipetázzák. A mintaoldatok az alsó és felső fehérjemarkereket is tartalmazzák.
5. 6 μL pufferral hígított létrastandardot pipetáznak a D2 portba.
6. A csipet ezután a készülékbe helyezik, először a fehérjestandardot áramoltatják a D2 portból a B4 port felé feszültség alkalmazásával, majd miután a felső fehérjemarker eléri az injektálási kereszteződést a feszültséget a C4 és D4 portokra kapcsolják.

Fehérjék meghatározása Bioanalyzer 2100 készülékel

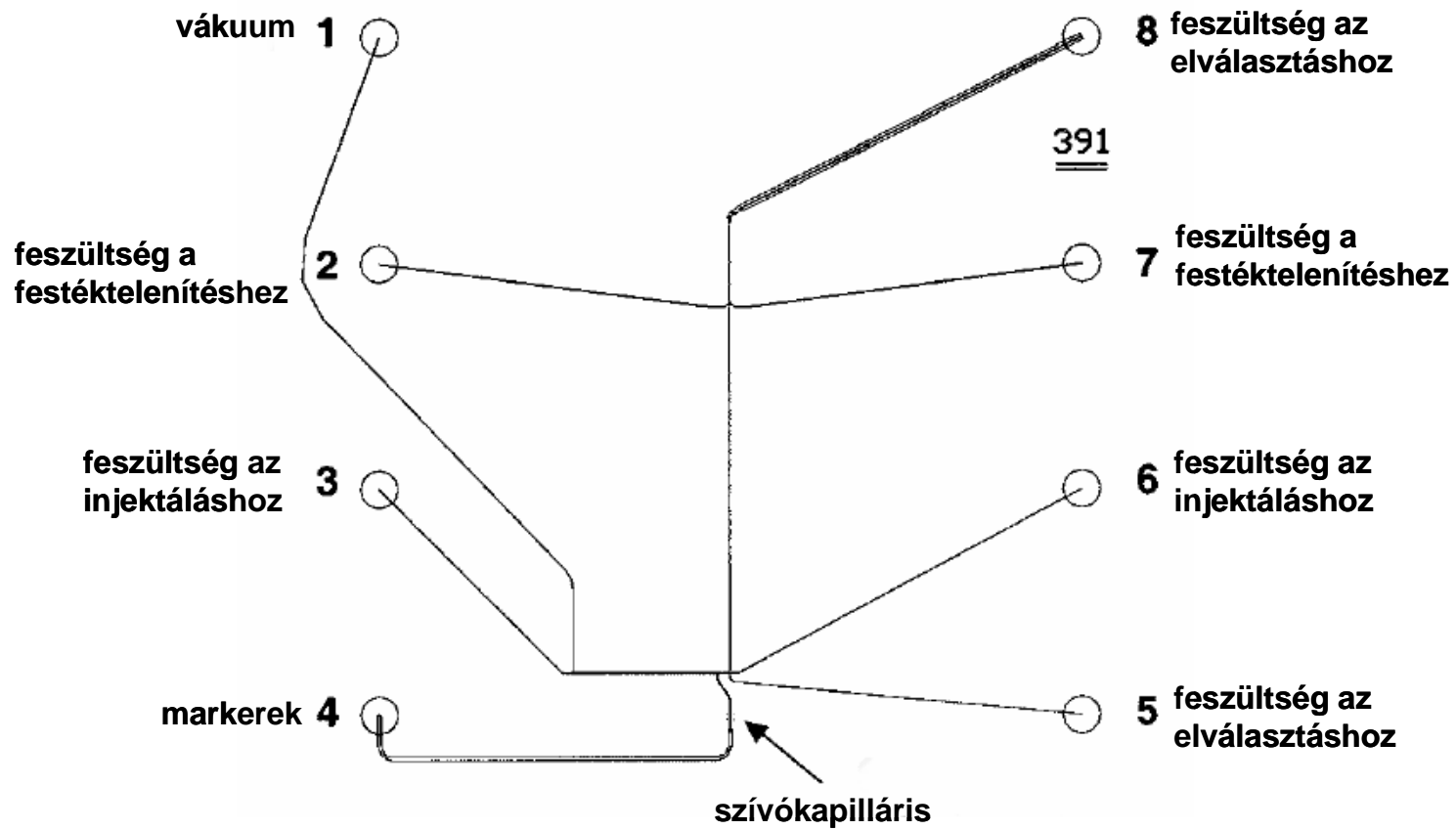


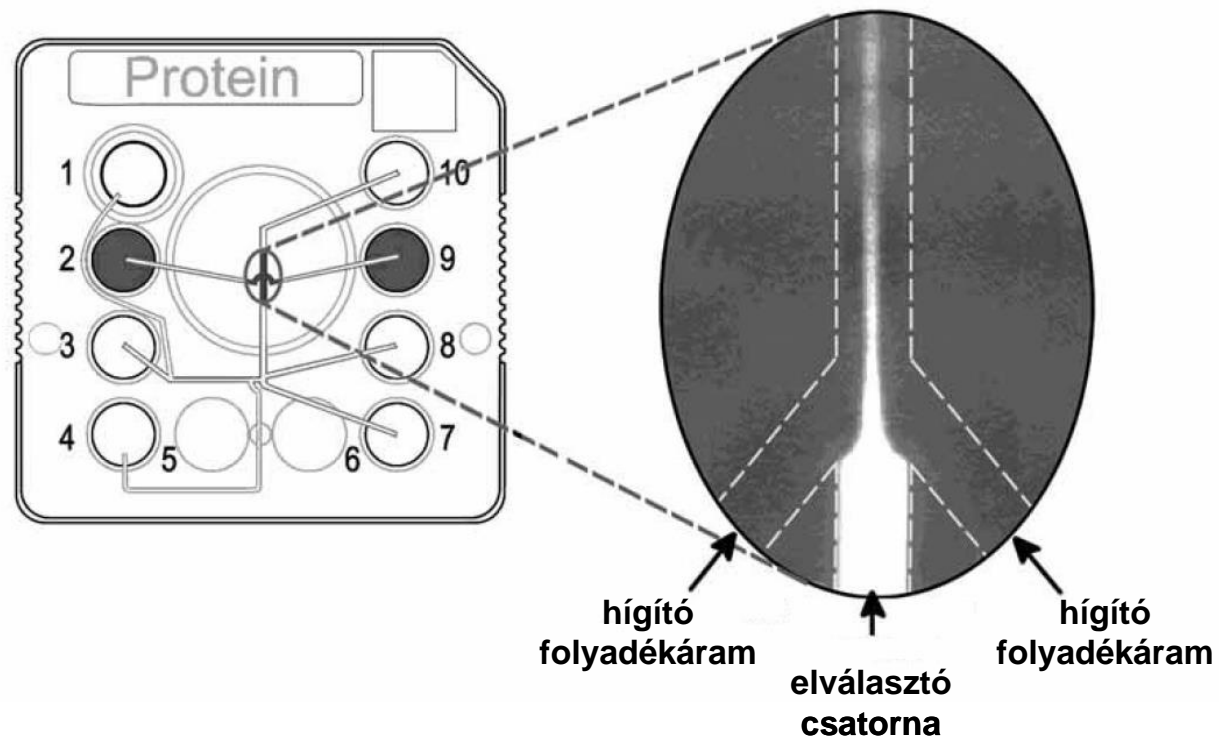
A fehérje elemzések mérési adatainak megjelenítése a Bioanalyzer 2100 készüléknél



A LabChip 90 készülékkel kapott virtuális gél és a klasszikus SDS-PAGE módszerrel kapott gél mintázatának összehasonlítása

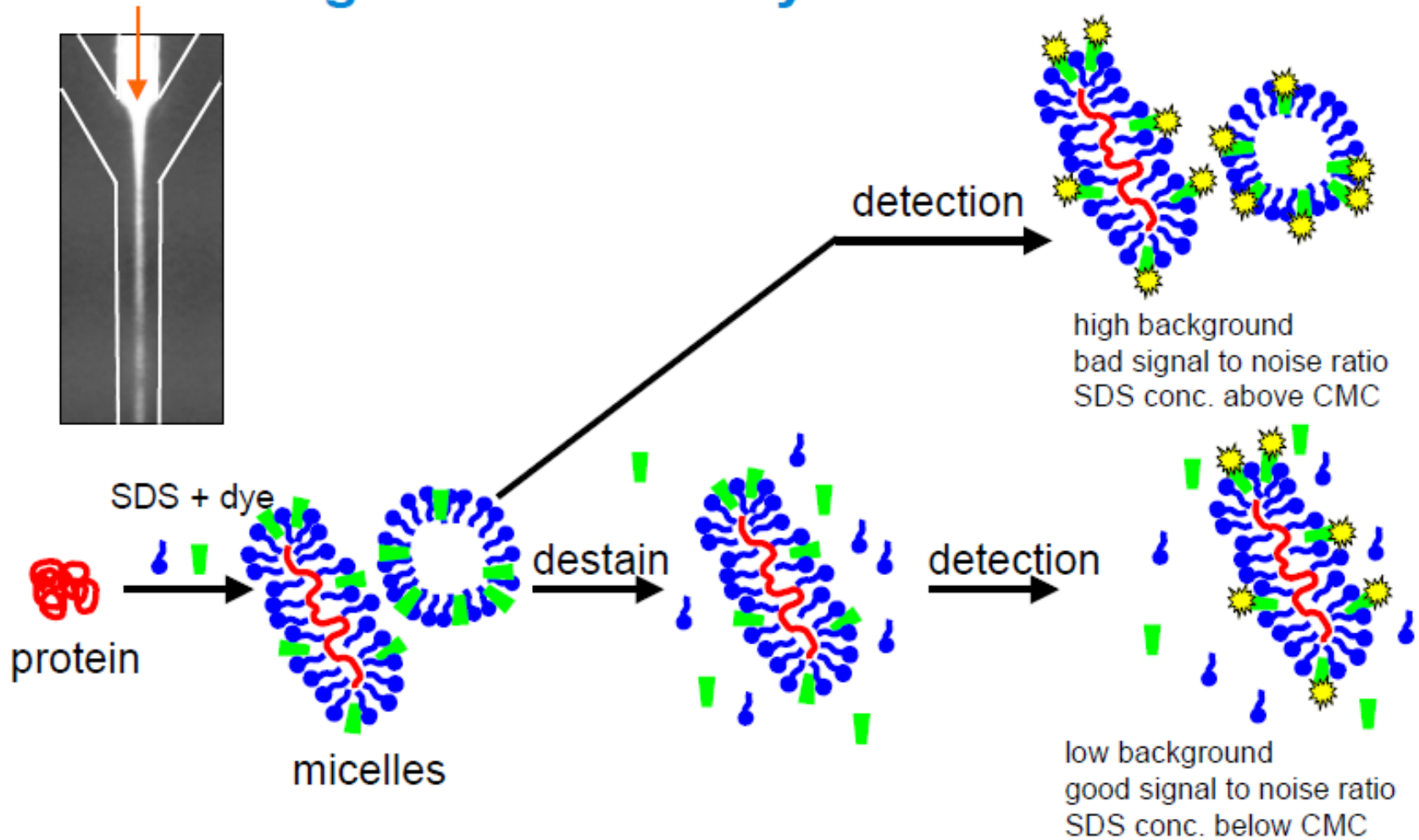
Fehérjék meghatározása LabChip 90 készülékkel



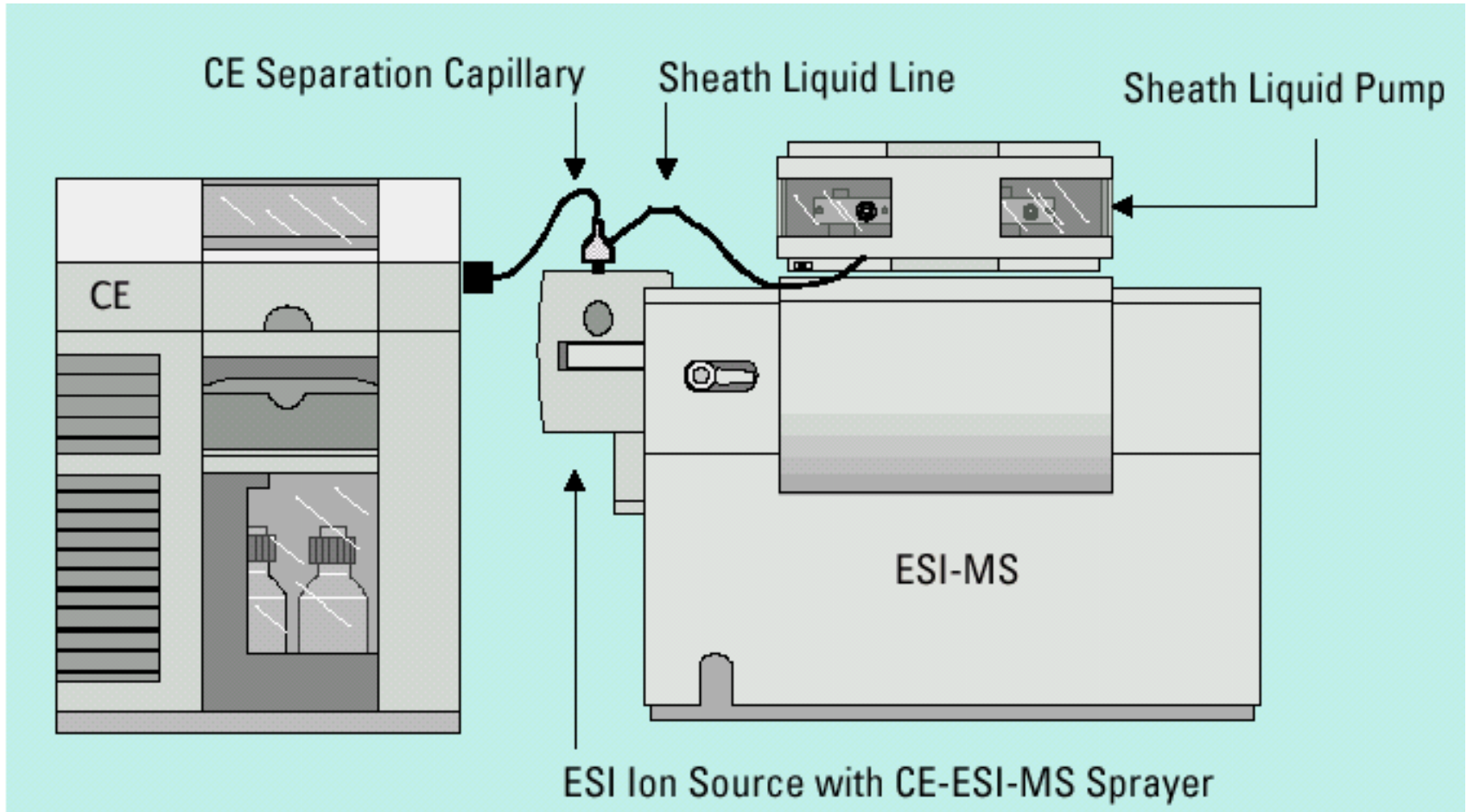


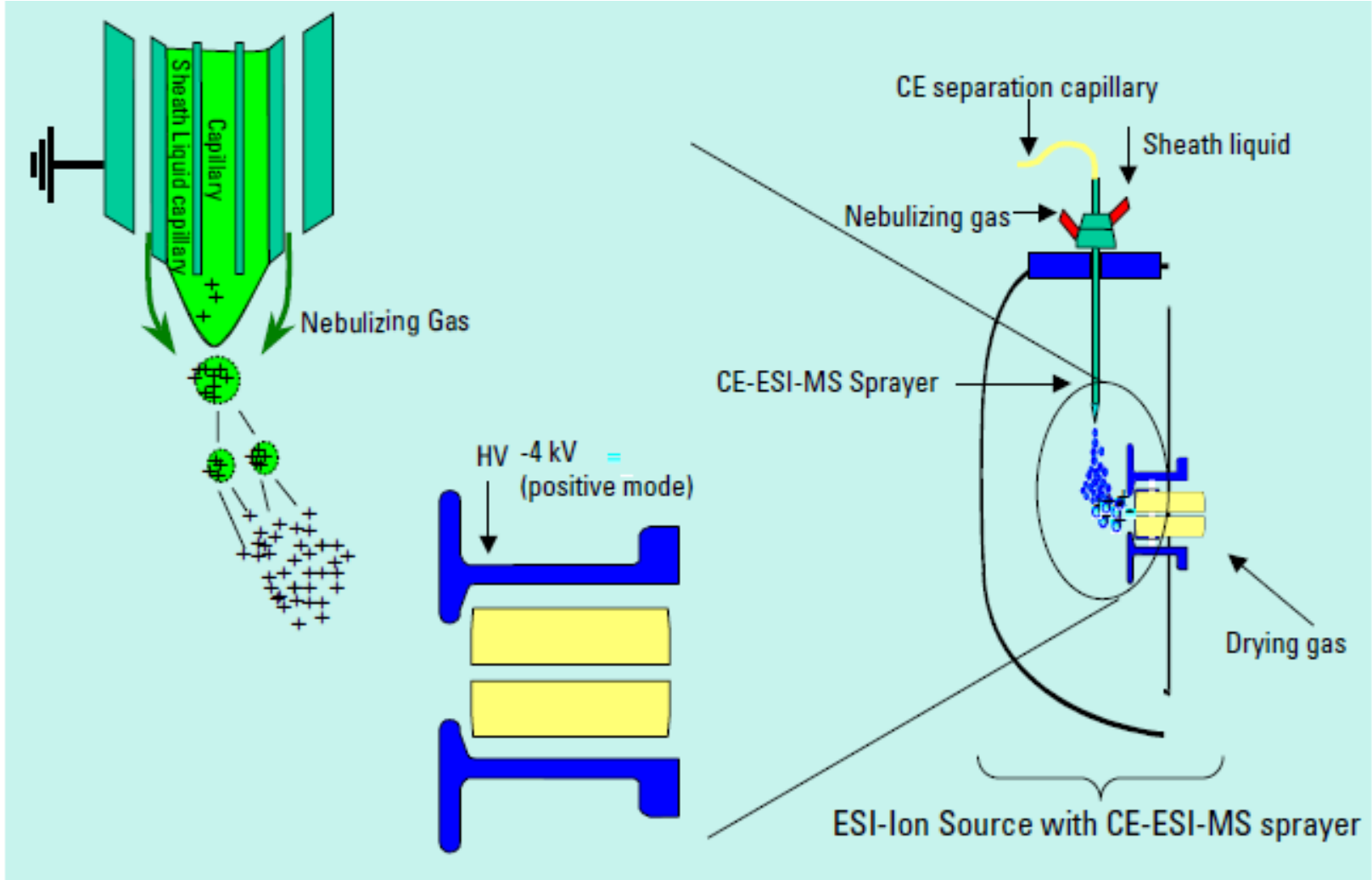
A festék mennyiségének csökkentése (destaining) a csipben a fehérjék elválasztásakor

Protein Chip - Staining and Detection with Intercalating Fluorescent Dye

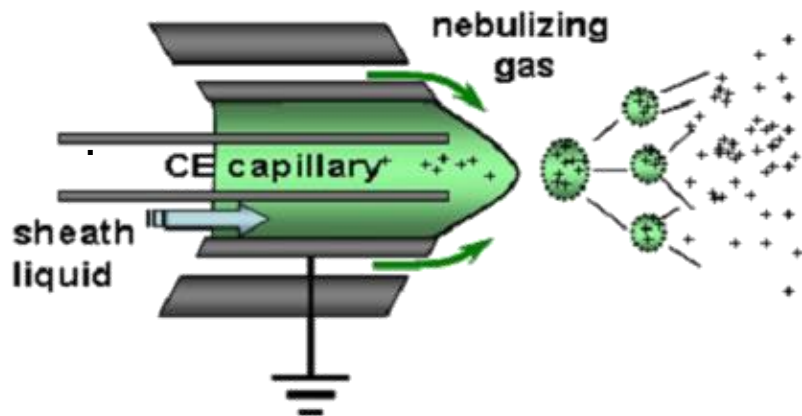
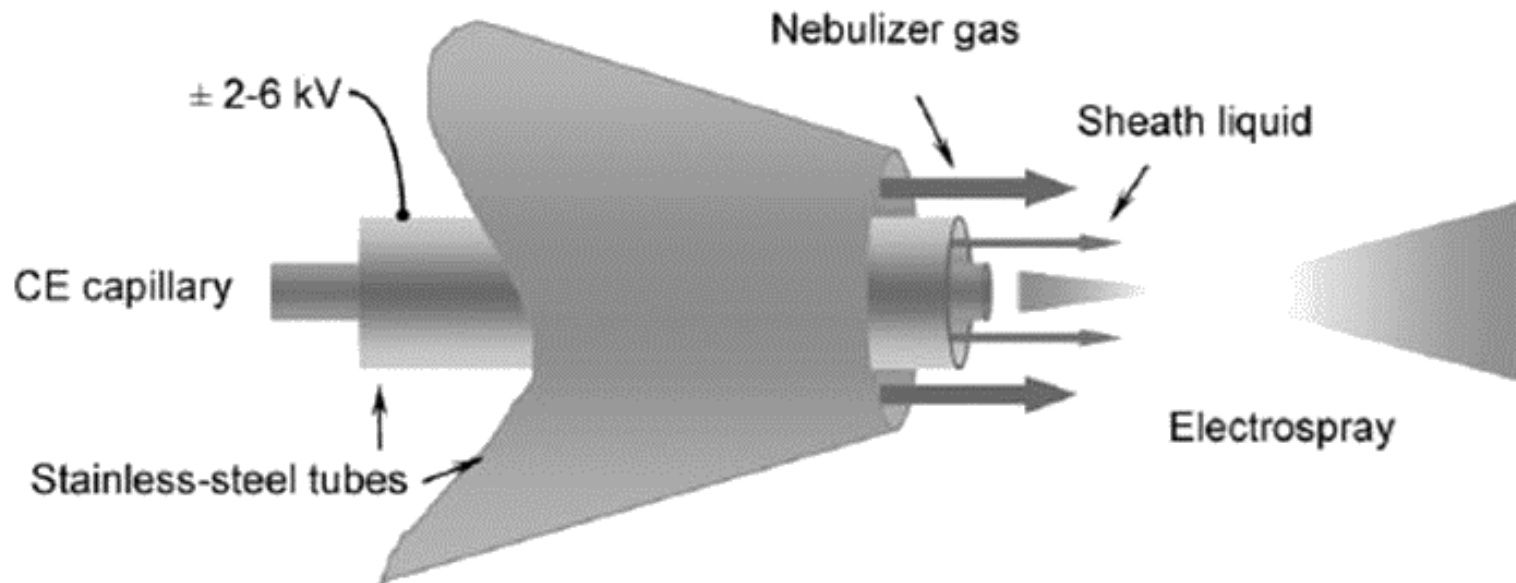


- elektromos kapcsolás
- hidraulikus kapcsolás



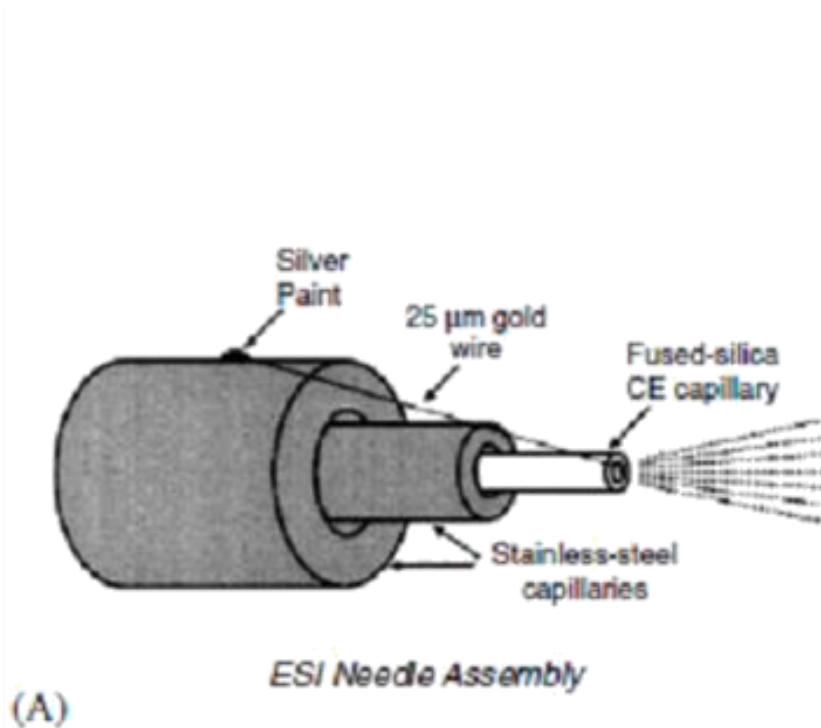


CE-MS interfész segédfolyadékáram segítségével (sheath flow)

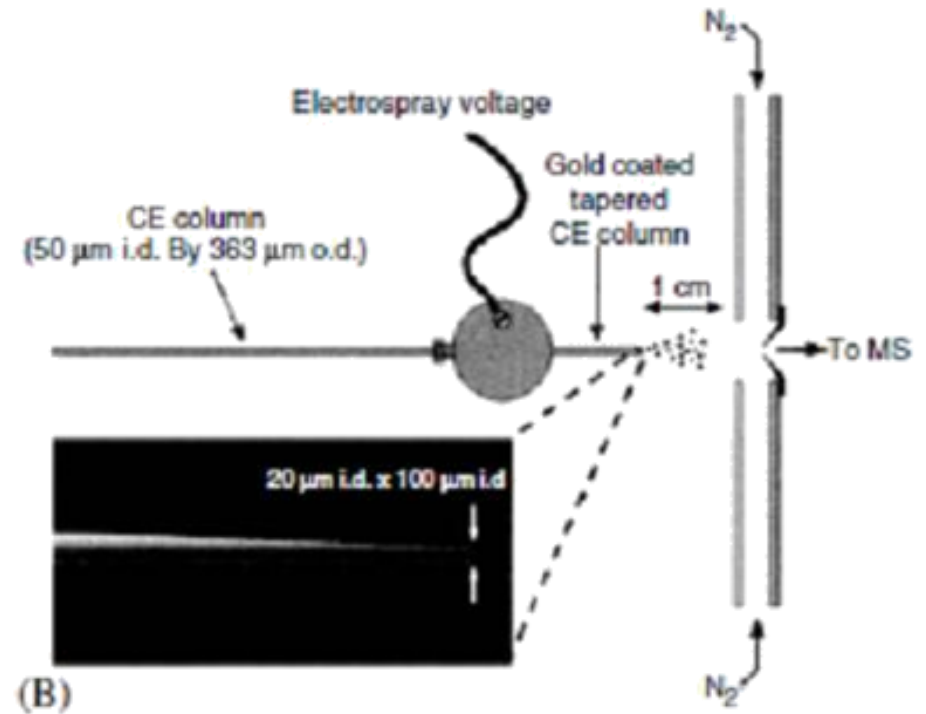


Tri-axial sheath flow CE-MS

CE-MS interfész segédfolyadékáram nélkül (sheathless)

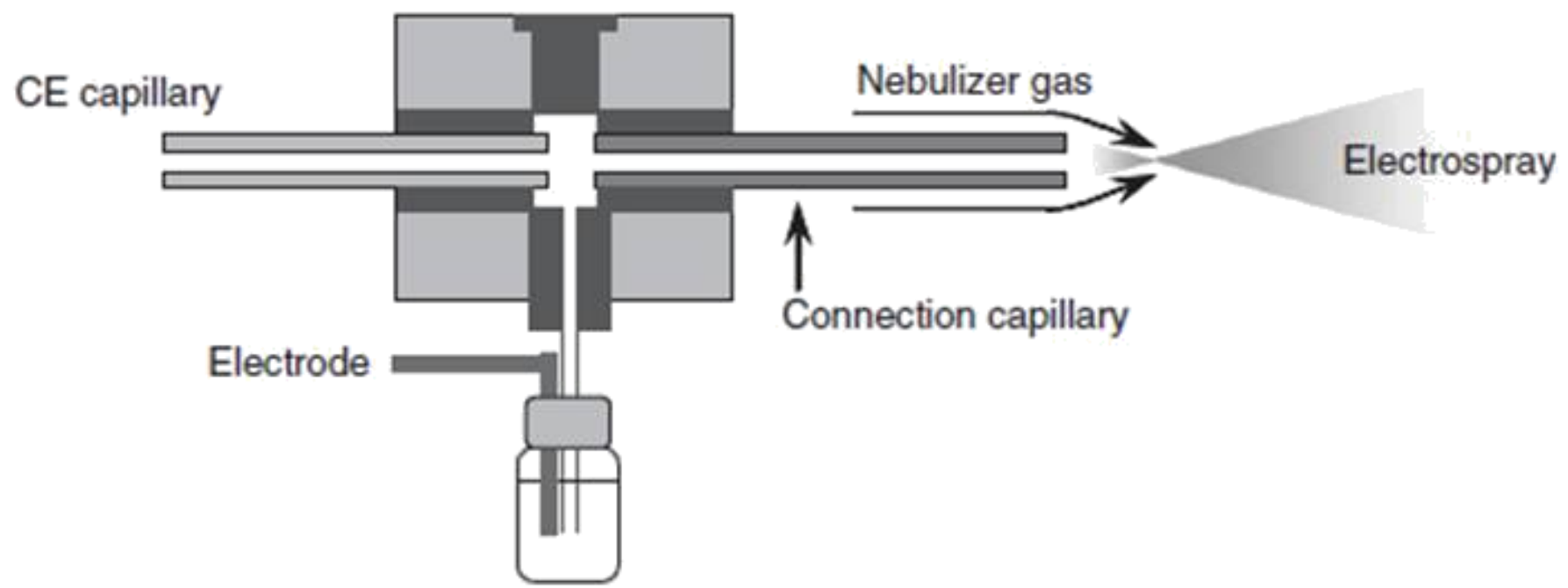


wire-in-capillary



fokozatosan elvékonyított kvarckapillárist
vonnak be aranyfilmmel

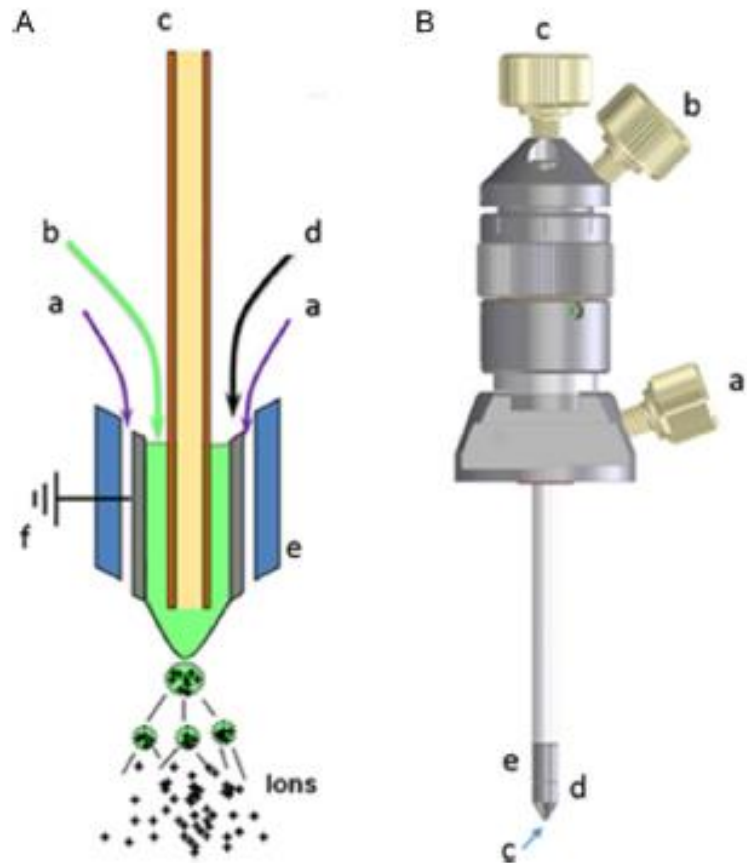
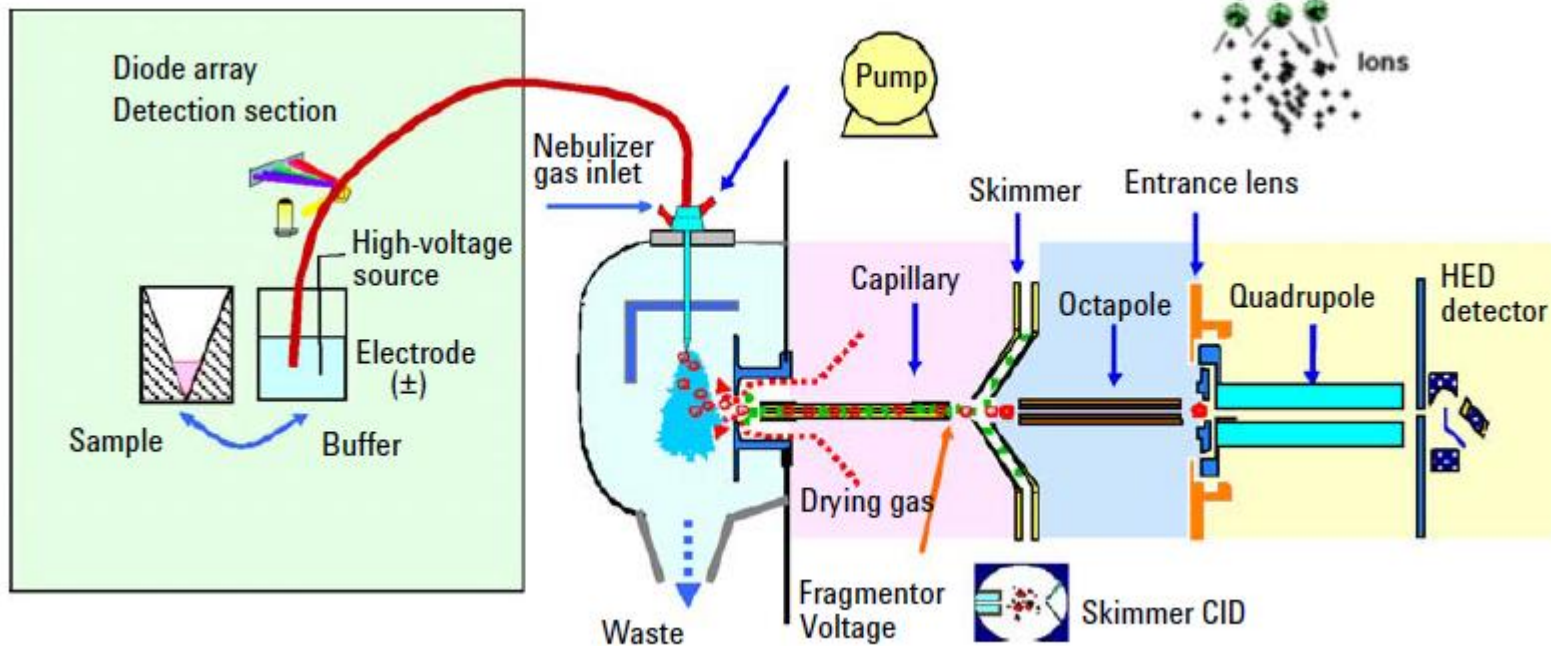
CE-MS interfész folyadékcsatlakozás segítségével (liquid junction)



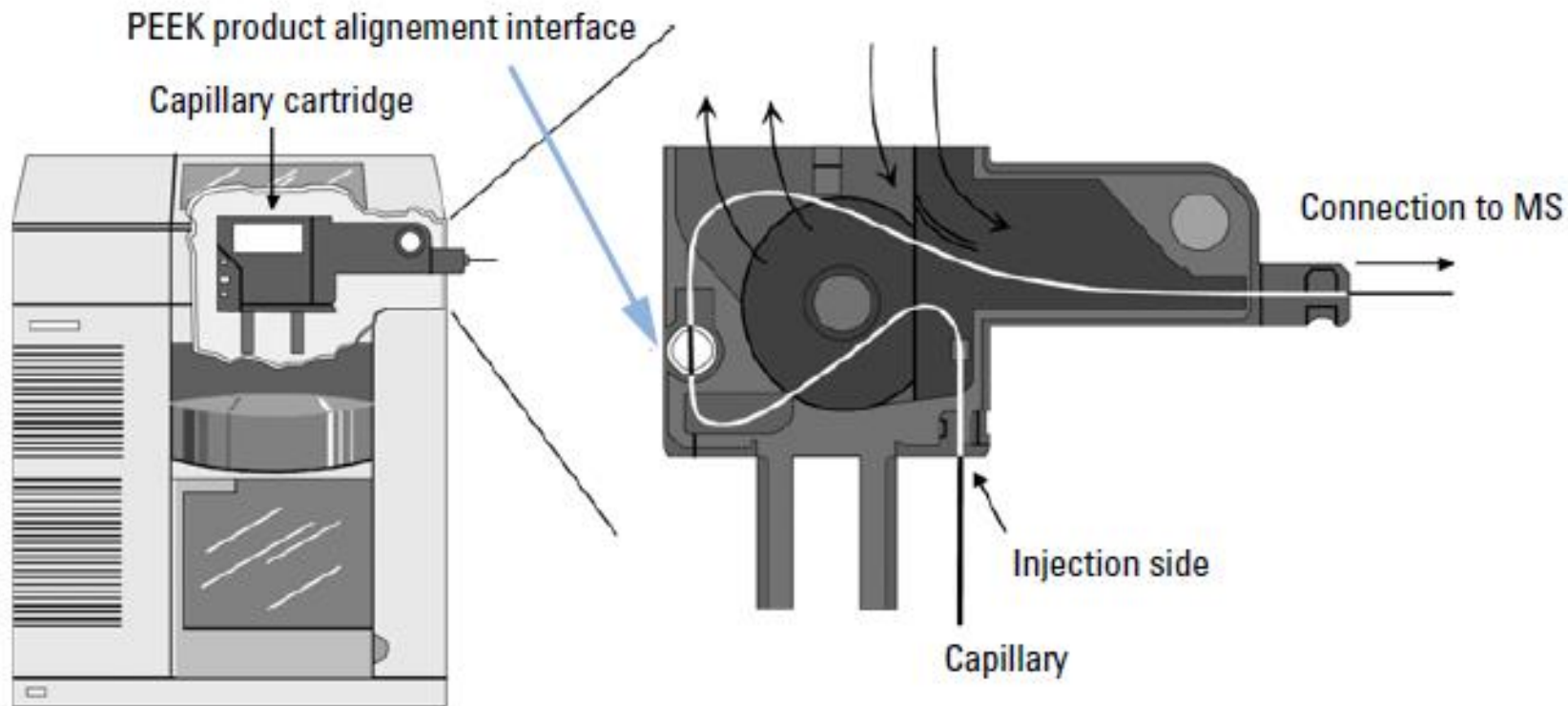
Summary of characteristics of ESI-interfaces designed to hyphenate CE and MS

Design	Electrical contact with CE	Spray	Advantages	Drawbacks
Sheathless	Metal coating Inserted wire	From capillary tip (0–100 nl/min, nano-ESI)	High sensitivity	Less robust (instable coating, clogging, ...) Dependent on EOF
Coaxial sheath liquid	Sheath liquid	Sheath liquid (1–4 µl/min)	Commercially available Stable spray Independent on EOF (buffer)	Low sensitivity
Liquid junction	Liquid gap between CE capillary and ESI needle	Direct from ESI emitter (nano-ESI)	High sensitivity Independent on EOF More robust than sheathless (no coating)	Peak broadening Less robust than coaxial (clogging of tip, contamination)

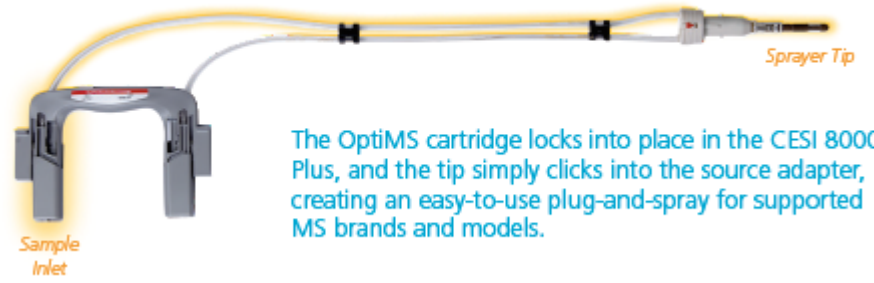
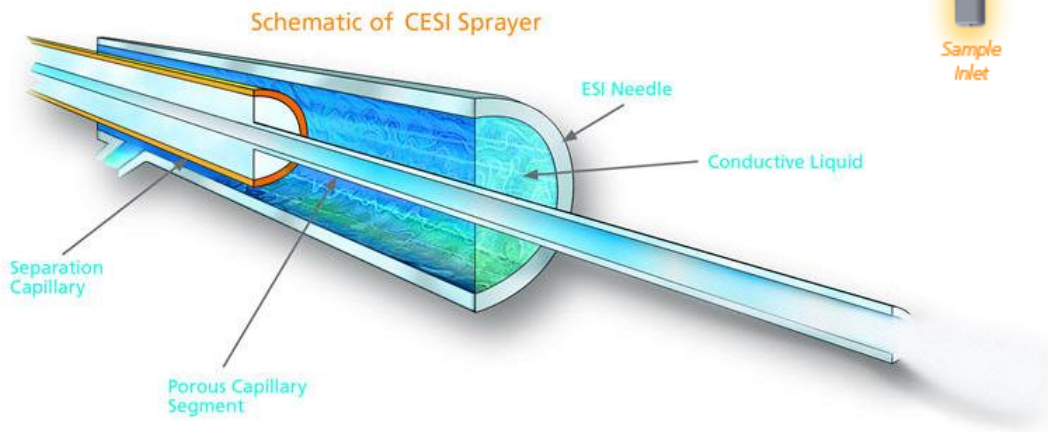
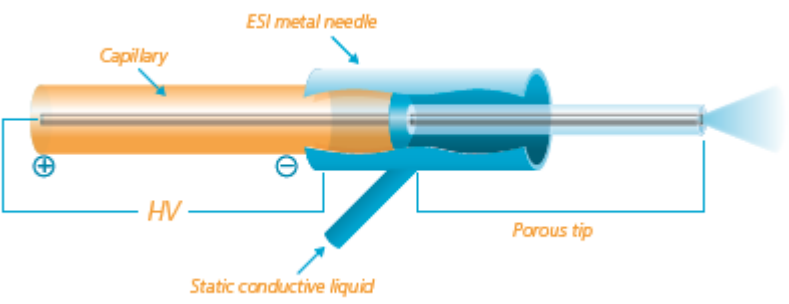
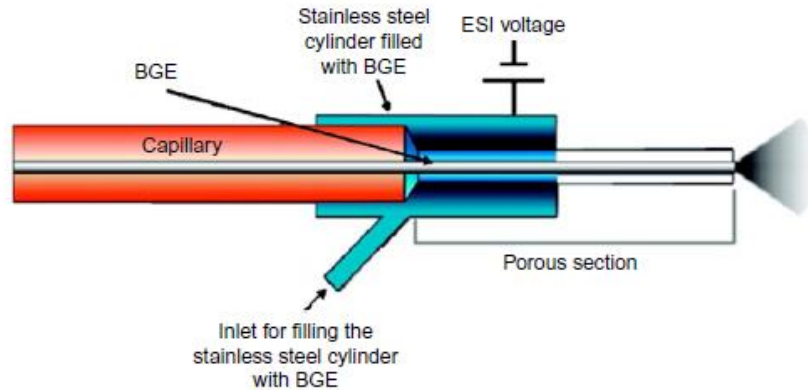
CE-MS



CE-MS, Agilent

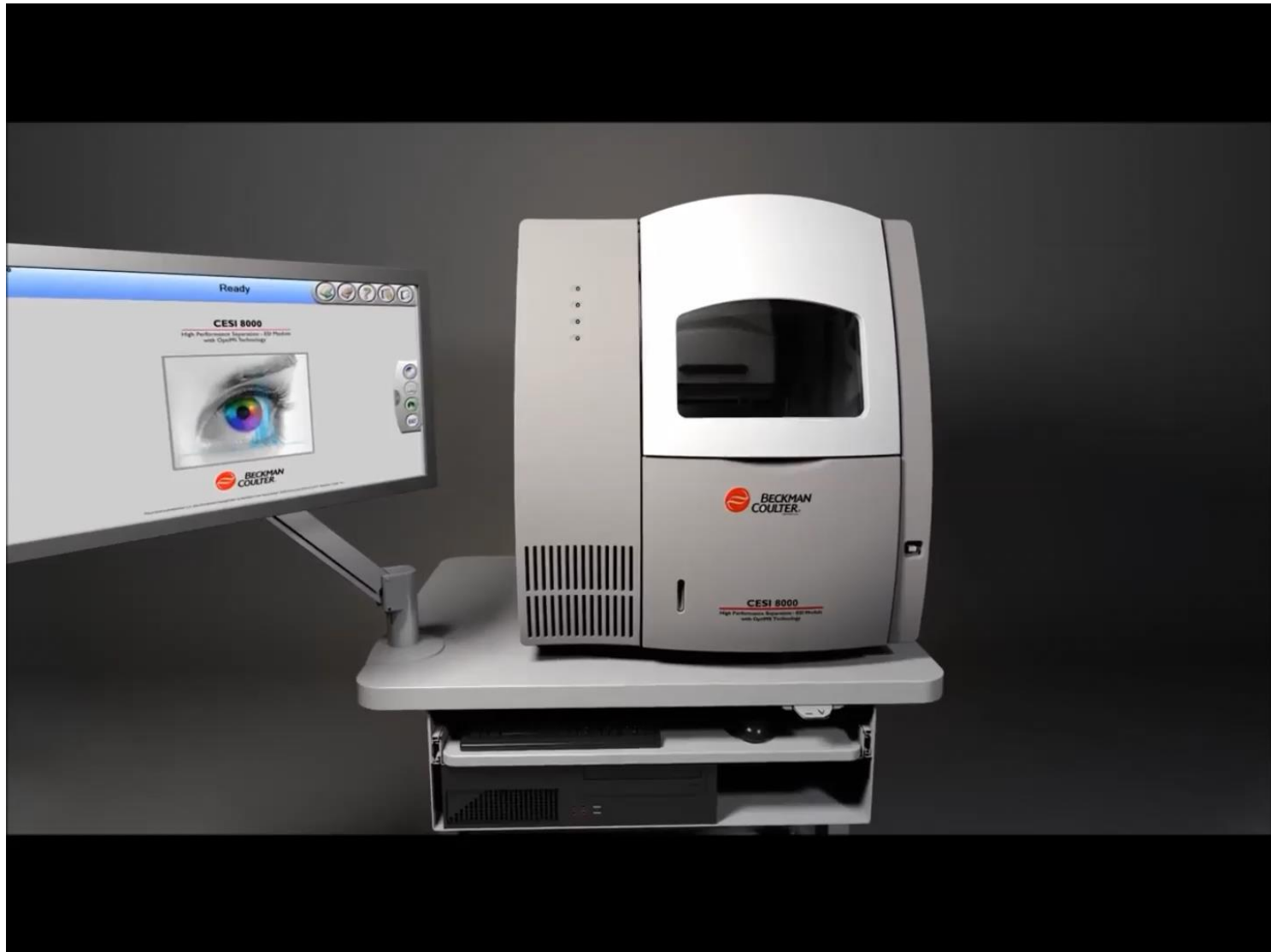


CE-MS, Sciex (CESI)



The OptiMS cartridge locks into place in the CESI 8000 Plus, and the tip simply clicks into the source adapter, creating an easy-to-use plug-and-spray for supported MS brands and models.

CE-MS, Sciex (CESI)



CE-MS módszerfejlesztések szempontjai

CE elválasztás:

- kapilláris hossza, belső átmérője, felülete
- elektrolit pH-ja, ionerőssége, ionok minősége, oldószer

MS detektálás:

- MS paraméterek (ESI és (MS) kapilláris feszültség, fragmentáló feszültség, stb.)
- pótlólagos folyadékáram paraméterei (ionok minősége, oldószer, ionerősség, pH, áramlási sebesség)
- porlasztás paraméterei (porlasztó gáz nyomás, szárítógáz hőmérséklet, sebesség,

CE-MS-nél használatos elektrolitok

optimális:

illékony, könnyen
ionizálódó ion,
stabil pH

nem használható:

nehezen ionizálódó ion
(pl. foszfát, borát),
detergens (MEKC)
polimer (CGE)

Kationokhoz

Capillary	Main usable buffers
Inner wall untreated fused silica capillary	0.1 to 1 M formic acid 0.1 to 1 M acetic acid 10 to 50 mM ammonium formate 10 to 50 mM ammonium acetate <i>(basically acidic to neutral buffers)</i>
Polymer coated capillary (PVA etc.)	Buffers other than formic acid (basically acidic to neutral buffers) (Note the pH-tolerance range of each capillary. For PVA, pH 2.5 to 9.5)

Anionokhoz

Capillary	Main usable buffers
Inner wall untreated fused silica capillary <i>Applied Voltage Positive</i>	10 to 50 mM ammonium acetate 10 to 50 mM ammonium formate <i>(basically neutral to alkaline buffers)</i>
Polymer-coated capillary (PVA etc.) ¹ <i>Applied Voltage Negative</i> <i>During analysis make sure to apply pressure of 20 to 50 mbar!</i>	10 to 50 mM ammonium acetate 10 to 50 mM ammonium formate 10 to 50 mM ammonium carbonate <i>(basically neutral to alkaline buffers) Note the pH-tolerance range of each capillary. For PVA, pH 2.5 to 9.5)</i>

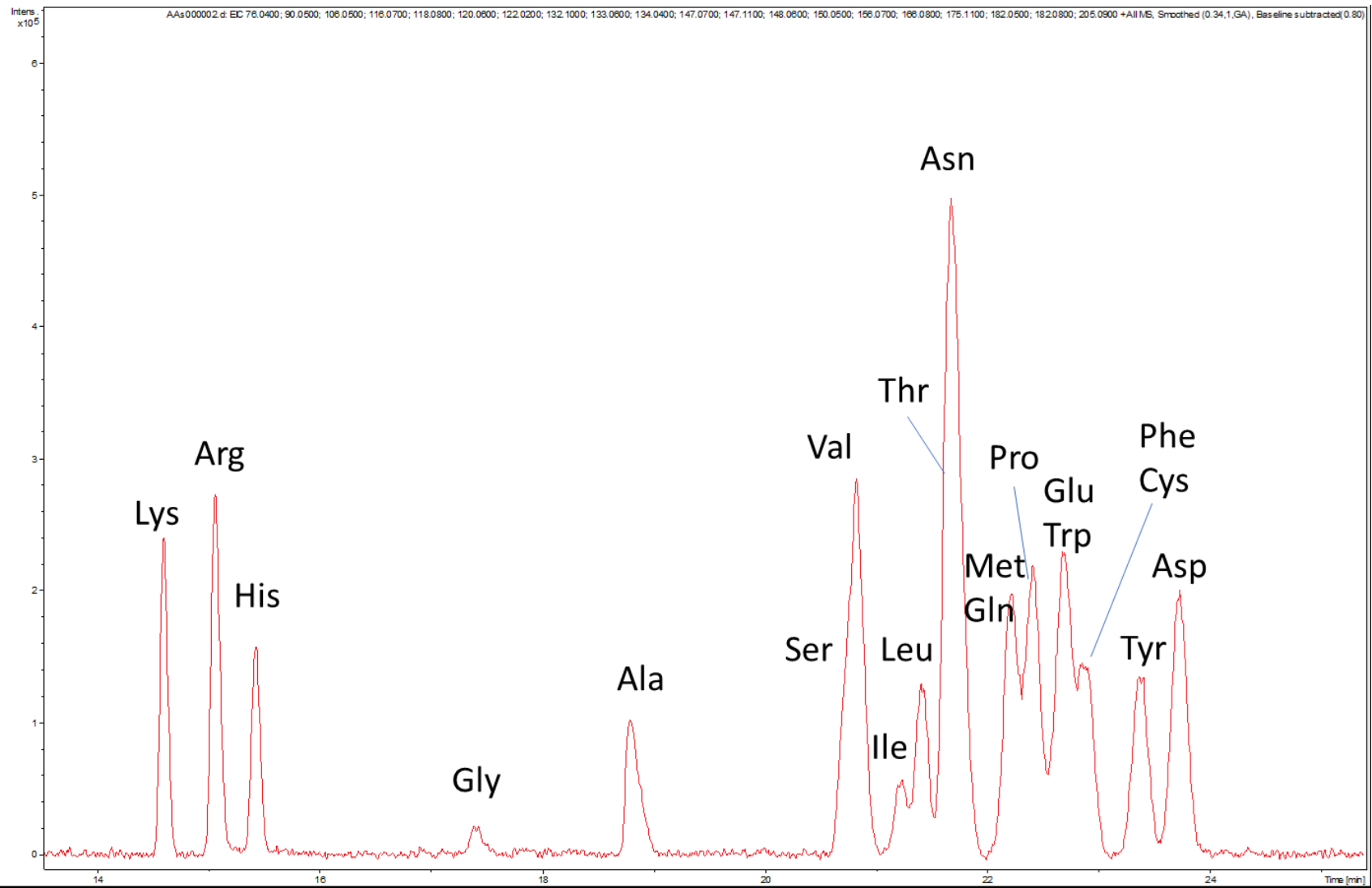
CE-MS-nél használatos pótlólagos folyadékok

optimális:

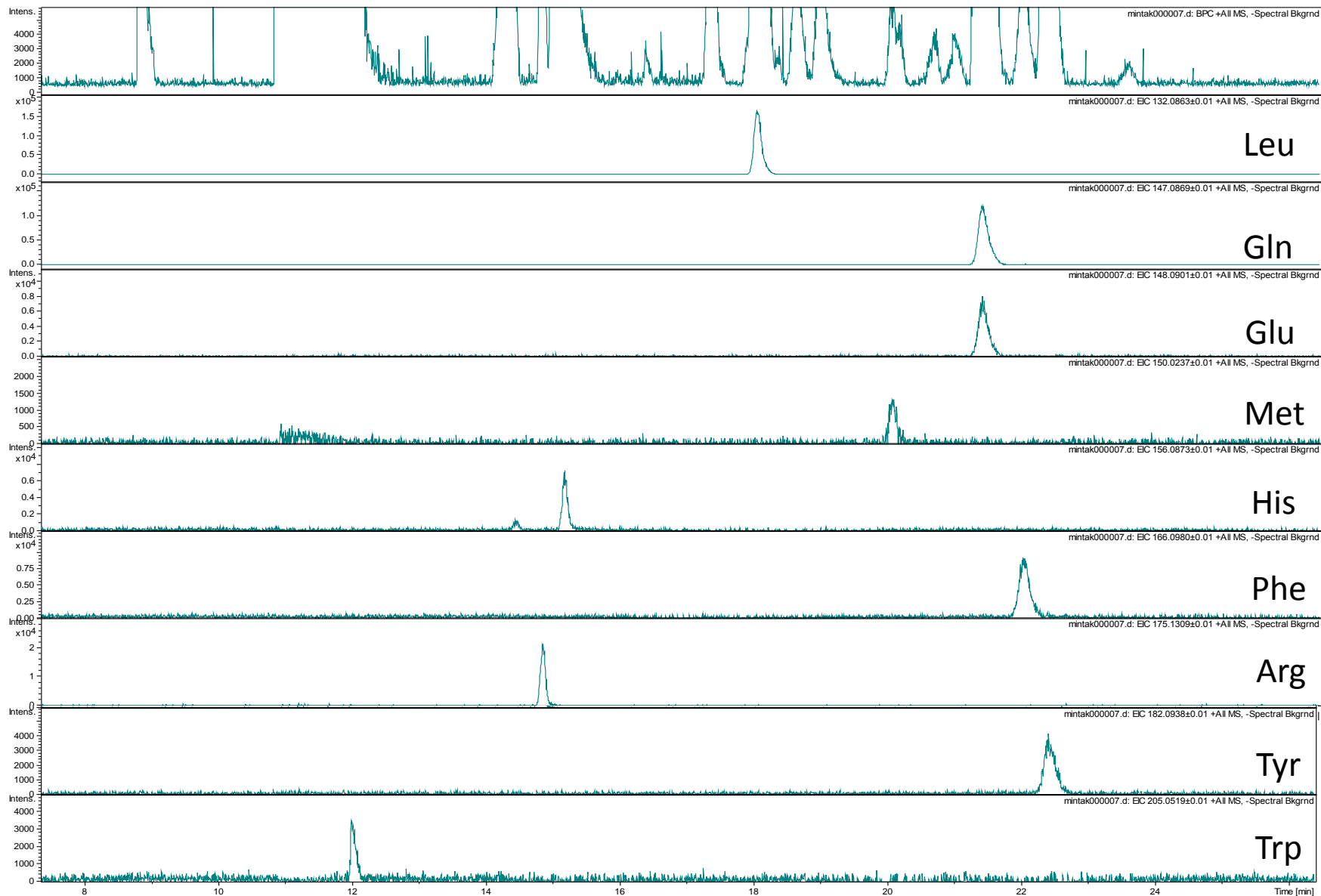
- illékony, könnyen ionizálódó közeg és ion
- könnyű porlaszthatóság (felületi feszültség, viszkozitás)
- stabil pH
- kis ionerősség

Analysis object (ionization method)	Main usable sheath liquids
Cationic (ESI-Positive)	50 % methanol 5 mM ammonium formate in 50 % methanol 5 mM ammonium acetate in 50 % methanol 0.1 to 1 % acetic acid in 50 % methanol 0.1 to 1 % formic acid in 50 % methanol
Anionic (ESI-Negative)	50 % methanol 5 mM ammonium formate in 50 % methanol 5 mM ammonium acetate in 50 % methanol 1 to 10 mM acetic acid in 50 % methanol

CZE-MS

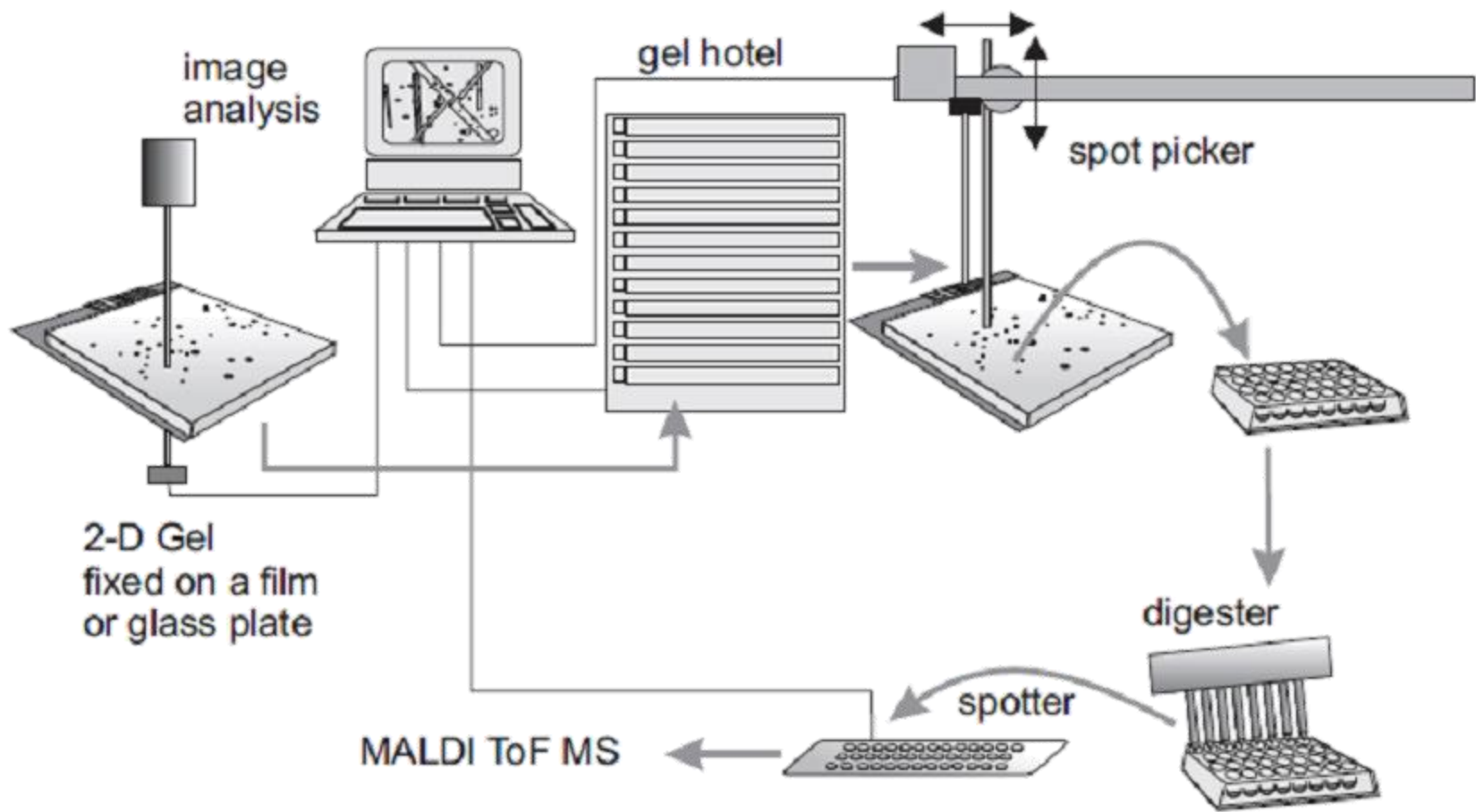


CZE-MS

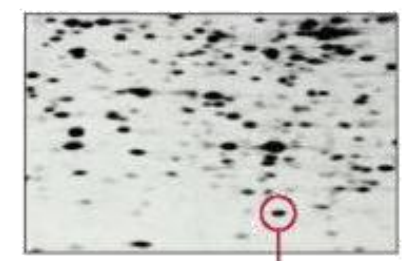


Liquor (agyvíz) minta CZE-MS elemzése (közvetlen injektálás, nincs mintaelőkészítés)

Fehérjék azonosítása MALDI-TOF-MS technikával



Fehérjék azonosítása MALDI-TOF-MS technikával



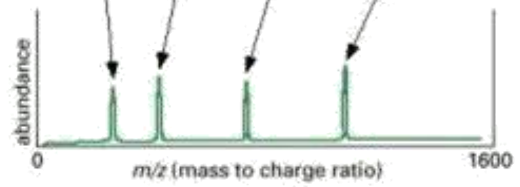
A single protein spot is removed from the 2D gel.



The protein is digested into short segments



Segments are put into a mass spectrometer which determines their masses.



Data is fed into a genomic database to match the peptides with a corresponding gene.

