

KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

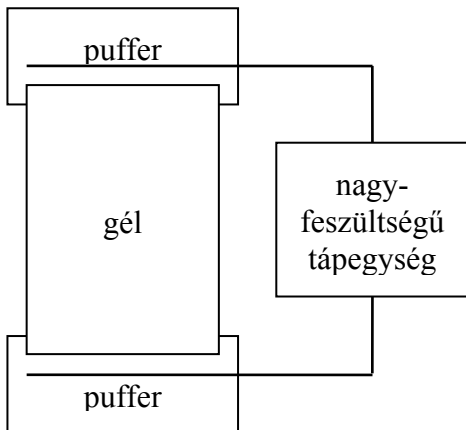
dolgozat az *Elválasztási műveletek a biotechnológiai iparokban* c. tárgyhoz

DIENES DÓRA
I. ÉVF. PHD HALLGATÓ
1999

Bevezetés - Elektroforézis

Az elektroforézis olyan elválasztási technika, melynek alapja az ionok elektromos térbeli mozgékonyága. A pozitív töltésű ionok a negatív elektród, a negatív töltésűek pedig a pozitív elektród irányába vándorolnak. Gyakran biztonsági okokból az egyik elektród a földre van kötve, és a másik potenciálját ehhez képest állítják pozitívrá vagy negatívrá. Az ionok vándorlási sebessége különböző, ezért lehetséges az elválasztásuk. A vándorlási sebességet az ion teljes töltése, mérete és formája befolyásolja.

Az elektroforézishez szükséges: erősáramú tápegység, elektródák, puffer és egy közeg, ami a fuffert tartalmazza. Ez a közeg lehet szűrőpapír, cellulóz-acetát csík, poliakrilamid gél, vagy kapilláris cső. A nyitott kapilláris csövek különböző anyagok elválasztásánál használatosak, a biológiai minták (fehérje keverékek) esetében általában a többi közeget használják. Az elválasztás befejeztével a közeget megfestik, hogy láthatóvá váljanak az elválasztott komponensek.

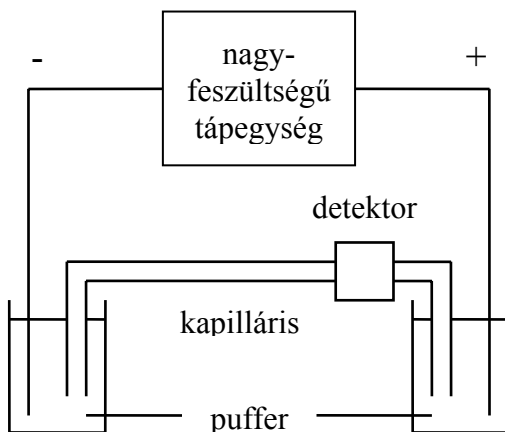


Izoelektromos fókuszálás alkalmazásával az eljárás felbontása jelentősen növelhető. Ennél a technikánál a gélben pH gradiens van, ezért a fehérjék csak addig vándorolnak benne, míg el nem érik azt a helyet, ahol a pH azonos az izoelektromos pontjukkal. Ezen a pH-n a fehérje semleges töltésűvé válik, nem vándorol tovább, vagyis a gél egy keskeny sávjában fókuszálódik.

Speciális elektroforézis technikák a disc-elektroforézis, a kapilláris elektroforézis és a gél-elektroforézis (SDS-PAGE).

Kapilláris elektroforézis

Az elektroforézist kis átmérőjű kapillárisban kivitelezve lehetővé válik nagy elektromos mező alkalmazása, mert a kis kapilláris hatásosan adja le a keletkező hőt. Az elektromos mező növelésével hatékonyabb elválasztás érhető el rövidebb idő alatt.



A kapillárisok belső átmérője 50-100 μm , hosszuk 0,5-1 m. Az alkalmazott feszültség 10-30 kV. Az elektroosmotikus áramlás következtében minden komponens a negatív elektród felé vándorol, ezért a kis mennyiségű mintát (10 μl) a kapilláris pozitív végénél injektálják, és az elválasztott komponenseket a kapilláris negatív vége közelében detektálják.

A kapilláris elektroforézis a folyadékkromatográfia és az elektroforézis viszonylag újszerű formája, melynek jellemzői:

- elektroforetikus elválasztás kapilláris csőben,
- nagy térerő alkalmazása (gyakran nagyobb, mint 500 V/cm),
- modern detektálási technika, mint az elektroferogram, mely gyakran hasonlít egy kromatogramra,
- hatékonysága eléri vagy meghaladja a kapilláris gázkromatográfiáét,
- az elválasztáshoz szükséges idő nagyon rövid,
- a mennyiségi analízis könnyen automatizálható,
- kis mennyiségű reagens szükséges,
- más analitikai elválasztási technikákkal összehasonlítva széleskörű elemzést tesz lehetővé.

Jelentős eltérések vannak a kromatográfia és a kapilláris elektroforézis nomenklatúrája között. Például a kromatográfiában alapvető kifejezés a retenciós idő, ezzel szemben az elektroforézisben ideális körülmények között nincs retenció, itt analóg kifejezés a migrációs idő (t_m). A migrációs idő azt az időtartamot jelöli, mely alatt az oldott anyag eljut a kapilláris elejétől a detektorablakig.

Egyéb alapvető kifejezések: elektroforetikus mobilitás m_{ep} (cm^2/Vs), elektroforetikus áramlási sebesség n_{ep} (cm/s), és elektromos térerő E (V/cm).

Ezen faktorok kapcsolata: $m_{ep} = n_{ep} / E$.

Elektroozmotikus áramlás (EOF)

A szilikát üveg kapilláris felülete negatív töltésű funkciós csoportokat tartalmaz, melyek vonzzák a pozitív töltésű ellenionokat. A pozitív töltésű ionok a negatív elektród felé vándorolnak, és magukkal viszik az oldószer molekulákat is. Ezt az oldószer mozgást nevezik elektroozmotikus áramlásnak. Az elválasztás során a töltéssel nem rendelkező molekulák az elektroozmotikus áramlással majdnem azonos sebességgel mozognak, ezért esetükben az elválasztás csak igen kismértékű. A pozitív töltésű ionok gyorsabban, a negatív töltésűek pedig lassabban mozognak.

Kapilláris elektroforézis módszerek osztályozása

A kapilláris elektroforézises módszereket osztályba sorolhatjuk az alapján, hogy töltetet tartalmaz-e a kapilláris, ill. aszerint, hogy milyen komponenseket tartalmaz a puffer stb.

Alapvetően a következő módszereket különböztetjük meg:

- kapilláris zónaelektroforézis (CZE),
- kapilláris gélelektroforézis (CGE),
- micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MECC vagy MEKC),
- kapilláris elektrokromatográfia (CEC),
- kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF),
- kapilláris izotahoforézis (CITP).

Kapilláris zónaelektroforézis

A kapilláris zónaelektroforézisben egy pufferral töltött 50-100 mm-es kapillárist helyezünk két puffertartály közé. A két puffertartályba elektródokat helyezünk, melyek között 10-30 kV feszültségkülönbséget alkalmazunk. A feszültségkülönbség hatására az ionok, töltésüktől függően az anód vagy a katód felé vándorolnak. A feszültségkülönbség okozta elektroforetikus vándorlási sebességet a puffer összetételétől függően a kapillárisban létrejövő oldószer áramlás befolyásolja. A kapilláris elektroforézisben tehát a vizsgálandó anyag vándorlási sebességét a feszültségkülönbség hatására létrejövő elektroforetikus hatás és elektrooszmotikus áramlás szabja meg.

Az elektrooszmotikus áramlás oka a kapilláris fal közelében kialakult kettősréteg. A kettősréteg egyik pólusa a kapilláris fala (helyhez kötött töltés), másik pólusa az oldatban van. A folyadékban a töltéseloszlás nem egyenletes (diffúz réteg), az ionos részek között oldószer molekulák vannak. A kapillárisra adott feszültségkülönbség hatására a diffúz réteg elmozdul. A töltéssel rendelkező részecskékkel együtt az oldószer molekulák is vándorolnak, s így annak ellenére, hogy az anód és a katód rész között nincs nyomáskülönbség, áramlás jön létre.

A kapilláris zóna elektroforézis a legszélesebb körben alkalmazott módja a kapilláris elektroforézisnek. Használható kationos és anionos anyagok elválasztására egyszeri analízissel. Az elektromos erőtér hatására a töltéssel rendelkező molekula vándorol a kis átmérőjű csőben, ezt a vándorlási sebességet megváltoztatja az elektrooszmózis. A kapilláris zóna elektroforézis során a kationok és az anionok ellentétes irányba áramlanak. Az elektroforetikus és az endozmózisos áramlás iránya megegyezik, ha a komponens töltése pozitív, ellentétes, ha negatív. Mivel általában nagyobb az elektrooszmotikus áramlás, mint az oldott komponensek vándorlási sebessége (mobilitása), valamennyi anyag a katód felé halad. Egy tipikus analízis során a kationok eluálódnak először, mivel vándorlási irányuk megegyezik az elektrooszmotikus áramlás irányával. A semleges molekulák is vándorolnak az elektromos erőtérben, vándorlási idejük között azonban nincs különbség. Mivel nem mobilisek és mozgásuk csak az elektrooszmotikus áramlás hatására jön létre, nem történik elválasztás. Az anionok lassan eluálódnak, mivel az elektrooszmotikus áramlással ellentétes irányba vándorolnak.

Kapilláris gélelektroforézis (CGE)

A kapilláris gélelektroforézis a hagyományos gél-lap elektroforézis kapilláris elektroforézis megfelelője. Biológiai makromolekulák (oligonukleotidok, DNS restrikciós fragmensek és fehérjék) méreten alapuló elválasztására használják. Főbb előnyei a gél-lap elektroforézissel szemben, hogy sokféle gél-mátrix használható és széles tartományban változhat az összetétel.

A kapillárist géllal töltve az megakadályozza az elektrooszmotikus áramlást. Ekkor az elválasztás ugyanúgy történik, mint a hagyományos gélelektroforézisnél, de a kapilláris miatt jobb felbontás és nagyobb érzékenység érhető el, valamint lehetővé válik az on-line detektálás.

Az elektroforézis szelektivitása nagy molekulatömegű anyagok elválasztásakor nő, ha a kapillárist eltérő pórusátmérőjű géllal töltjük meg. Az elektromos erőtér hatására a töltéssel rendelkező molekulák a töltés/ionosugár alapján eltérő sebességgel vándorolnak, melyet az ún. molekula szűrőhatás megváltoztat. A kapillárisba poliakrilamidot, agarózt vagy egyéb géleket tölthetünk. Elsősorban fehérjék és nukleinsavak elválasztására használjuk a poliakrilamid (PAGE) és Na-dodecil-szulfát (SDS) töltetet (SDS-PAGE). A kvarckapillárisban a gél polimerizációját kémiai módszerrel vagy g-sugárzással végzik. A gél lehet térhálós (3 dimenziós szerkezetű) vagy lineáris.

Sok esetben megfelelő szelektivitás érhető el, ha a kapillárist polimer oldattal töltjük. A töltött csőben az elektrooszmózis okozta anyagvándorlás megszűnik. Gélelektroforézissel csak töltéssel rendelkező molekulák elválasztását tudjuk megoldani.

Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)

A kis átmérőjű kapillárist fordított fázisú állófázissal (3,5 mm szemcseátmérőjű) töltjük meg. A feszültség hatására elektroosmotikus vándorlás alakul ki. A minta egyes komponensei különböző mértékű kölcsönhatásba lépnek az álló fázissal, így eltérő idő alatt jutnak végig a csőn. A HPLC-ben a komponensek szállítása a nyomáskülönbség hatására létrejövő mozgó fázis áramlással történik, a kapilláris elektrokromatográfiában ezzel szemben a potenciálkülönbség hatására létrejövő elektroosmotikus áramlással.

A kapilláris elektrokromatográfiában egyenletes sebességprofil alakul ki, ez csökkenti a csúcshévesedést. A CEC kinetikai hatékonysága sokkal nagyobb, mint a HPLC-nek. Az elválasztás szelektivitása - a folyadékromatográfiához hasonlóan - az álló és mozgó fázis közötti megoszlástól függ.

Micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC vagy MECC)

A micelláris elektrokinetikus kromatográfia egy egyedülálló módja a kapilláris elektroforézisnek, mivel képes semleges és töltéssel rendelkező molekulák elválasztására.

Micelláris elektrokinetikus kromatográfiánál a kapilláris zónaelektroforézisnél alkalmazott pufferbe a kritikus micellekoncentrációnál (CMC) nagyobb koncentrációban ionos felületaktív anyagot teszünk. Az esetek többségében nátrium-dodecil-szulfátot (SDS). Az SDS 8 mM koncentráció felett szobahőmérsékleten 58 egységből álló aggregátumot képez. Az apoláris szénhidrogén láncok úgy asszociálódnak, hogy a puffer felé az aggregátum negatív töltésű. A negatív töltésű aggregátumok külön fázisként kezelhetők (pszeudo állófázis), így a töltéssel rendelkező és a semleges molekulák megoszlanak a puffer és a pszeudo álló fázis között.

Az SDS aggregátum negatív töltésű, tehát elektroforetikusán vándorol az anód irányába. Ha puffer pH-ja > 3 , akkor a katód irányába elektroosmotikus áramlás indul. Amennyiben az endozmotikus áramlás sebessége nagyobb, mint az elektroforetikus, akkor a negatív töltésű aggregátum a negatív pólus irányába mozog. Ha az SDS a vizsgált komponenset oldja (egyensúly alakul ki a puffer és a pszeudo stacioner fázis között), akkor a molekula az SDS vándorlási sebességével mozog a kvarccsőben. Ha az egyensúlyi állandó értéke nagy (a molekula az SDS aggregátumban tartózkodik), akkor a molekula maximális vándorlási ideje megegyezik az SDS vándorlási idejével. Ha a vizsgált komponens kölcsönhatása elhanyagolható az SDS aggregátum mellett, akkor a vándorlási idejét az endozmotikus áramlás sebessége szabja meg. Az endozmotikus áramlási sebességű mozgó komponens vándorlási ideje adja a minimális időt. A minimális és a maximális közötti idő az ún. migrációs időablak.

A micelláris elektrokinetikus kromatográfia szelektivitása a felületaktív anyag megválasztásával, valamint a pufferben modifikátorok alkalmazásával befolyásolható.

A vándorlási időt a körülmények változtatásával csak a két határérték között változtathatjuk. Lehetőség van semleges molekulák és olyan anyagok elválasztására is, melyek oldhatósága az alkalmazott pufferrendszerben kicsi.

Kapilláris izoelektromos fókuszálás

A kapilláris izoelektromos fókuszálás az izoelektromos pontok (pI) különbségén alapuló eljárás, biomolekulák (főként fehérjék) elválasztására használják.

Azok a vegyületek, melyek savas és bázikus csoportot is tartalmaznak, nagy hatékonysággal elválaszthatók, ha a kvarc kapillárisban pH gradiens hozunk létre. A kapillárist amfolitok és a minta keverékével töltik fel. A pH gradiens elérésére az anódot savas, míg a katódot bázikus oldatba merítik. A vegyületek vándorlásuk során elérik a kapillárisnak azt a pontját, ahol a nettó töltés nulla lesz (izoelektromos pont), ezen a helyen koncentrálnak. Ezeket a zónákat hidrodinamikusan (nyomáskülönbség hatására) vagy elektroforetikus mobilizáljuk. Utóbbi esetben az anód oldali savas oldatot bázikusra cseréljük, a molekulák (pl. fehérjék) negatív töltésűvé válnak, és az anód felé mozdulnak el.

A kapilláris belső felületén semleges polimer bevonatot készítve kiküszöbölhető az elektrooszmózisos áramlás.

Kapilláris izotahoforézis (CITP)

A mintát két különböző puffer, két eltérő ionmozgékonyosságú elektrolit közé helyezük. Anionok elválasztásakor, a nagy elektroforetikus mozgékonyosságú ionokat tartalmazó oldatot az anód oldalra, a kis elektroforetikus mozgékonyosságú ionokat tartalmazó oldatot a katód oldalra helyezük. A nagy elektroforetikus mozgékonyosságú ionokat tartalmazó oldatokat "leading", míg a kis elektroforetikus mozgékonyosságú ionokat tartalmazó oldatot "terminating" elektrolitnak ill. puffernek nevezzük.

A minta komponensei a nagy ionerősségű helyről zónában vándorolnak a kis ionerősségű hely irányába. Közben az eltérő ionerősségű zónák határán koncentrálnak. Az összes zóna azonos sebességgel vándorol és minden anyag felveszi a vezető elektrolit koncentrációját. Utóbbi miatt az izotahoforézis jól használható technika híg oldatok analízise esetén is, mivel a minták többszörös koncentrációja érhető el vele.

Az elektrooszmotikus hatást polimerrel borított kvarc kapillárisok alkalmazásával zárjuk ki. Az elektromos térerő változása eredményezi a kapilláris mentén a zónák kialakulását, s így az eltérő elektroforetikus mozgékonyosságú ionok elválasztását.

A feszültség és a hőmérséklet hatása

Az endozmotikus és az elektroforetikus áramlás sebessége is arányos a térerősséggel, így nagyobb feszültséget alkalmazva az elválasztás ideje lecsökken. Mint azt elméletileg megjósolták, a rövidebb szeparációs idő nagyobb hatékonyságot eredményez, mivel a diffúzió sávszélesítő hatása jelentős. A feszültség növelését a Joule hő limitálja. Az optimális feszültség kísérletileg megállapítható: a feszültséget a felbontóképesség romlásáig növelve.

Mind az elektroforetikus mobilitás, mind az elektrooszmotikus áramlás fordítottan arányos a viszkozitással. A viszkozitás a hőmérséklet függvénye, tehát fontos a hőmérséklet kontroll. A hőmérséklet növekedésével a viszkozitás csökken, az elektroforetikus mobilitás nő. Néhány puffer, mint a Tris a hőmérséklet emelkedésével pH-érzékenyebbé válik. Komplex elválasztásnál (pl. fehérjék) kis pH eltolódás is megváltoztathatja a szelektivitást.

Az elválasztásokat általában 25 °C-on végzik (közel szobahőmérsékleten). A kapilláris folyadék-hűtése megfelelő hőmérséklet kontrol még magas koncentrációjú puffer és nagy átmérőjű kapilláris esetén is. Ha nem biztosítható a hőmérséklet tartása kisebb átmérőjű (a hőtermelődésként kevésbé csökkenti az áramlást) vagy hosszabb kapillárist használnak (a hő

nagyobb felületen adódik le). Alternatíva lehet a puffer koncentrációjának csökkentése, de ez csökkenti a koncentrációt.

Műszeres háttér

A CE-ben nagyfeszültséget alkalmazunk, de a feszültség növelésének határt szab a kapillárisban képződő hő. Ha a hő nem tud a kapilláris falán keresztül eltávozni, akkor a kapillárisban sugárirányú hőmérséklet gradiens alakul ki. Ennek hatására az elválasztott komponensek visszakeverednek. A gyakorlatban 10-30 kV feszültség alkalmazása általános, melynek hatására 5-50 mA áram mérhető.

A CE rendszer felépítése

A mintaadagolás úgy történik, hogy a Pt elektródot és a kvarc kapilláris végét egy mechanika a mintatartóba helyezi. A minta nyomáskülönbség (hidrodinamikus adagolás) vagy nagyfeszültségű impulzus hatására (elektrokinetikus adagolás) kerül a kapillárisba. Az automata mintaadagolóval (reprodukálhatóság) adagolt mintatérfogat 1-40 nl. A kapilláris anyaga az esetek többségében kvarcüveg.

A kapilláris elektroforézisnél alkalmazott detektorok hasonlóak, mint a HPLC-ben alkalmazottak, beleértve az abszorbancián, fluoreszcencián, elektrokémián és tömegspektrometrián alapuló mérési módszereket is. UV detektáláshoz a kvarc kapillárisról eltávolítjuk a védő poliimid réteget és UV fényrel átvilágítjuk. A kimutatási határt az optikai úthossz szabja meg, mely megegyezik a kapilláris átmérőjével. Az optikai úthossz növelésére a detektálásnál buborékot képezünk, vagy meghajlítjuk a kapillárisot és tengelyirányból világítjuk meg.

CE alkalmazása

A kapilláris elektroforézis alkalmazásának fő területe a nagy molekulatömegű ionos anyagok (fehérjék, polipeptidok, nukleinsavak) és az optikailag aktív komponensek meghatározása. Az enantiomer szelektivitás elérhető optikailag aktív anyag (pl. b-ciklodextrin származék) pufferhez való adagolásával. Újabb módszerek alkalmasak anionok gyors meghatározására.

A CE megfelelő additívok alkalmazásával minden olyan területen alkalmazható, mint a HPLC. A CE-ben az oldószer felhasználás minimális, így előnyösebb környezetvédelmi szempontból.