

GEEL-, AFIINSUS- JA
KAPILLAARELEKTROFOREES
INSTRUMENTAALANALÜÜSI SÜVAKURSUS

Kert Martma, *PhD*
Tallinna Ülikool

TALLINN 2018

ELEKTROFOREES

Elektroforees on elektriliselt laetud osakeste liikumine vedelikus elektrivälja mõjul: positiivsed osakesed katoodile (-) ja negatiivsed osakesed anoodile (+).

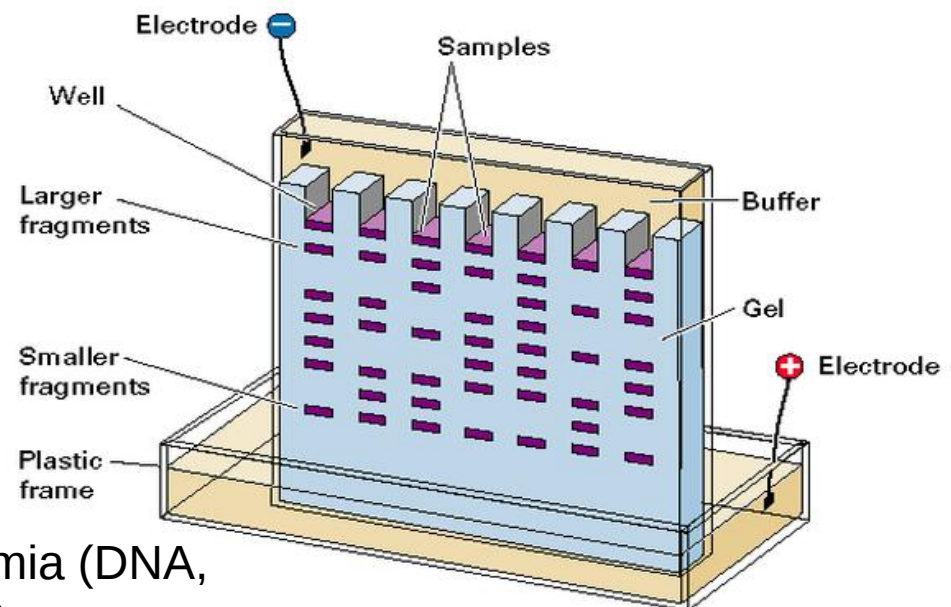
Elektroforees võib toimuda nii vedelikus kui ka geelis, aga ka vedelikuga immutatud tahkises.

Kataforees – osakesed liiguvad elektriväljas katoodile.

Anaforees – osakesed liiguvad elektriväljas anoodile.

Eralduspõhimõte – laeng, suurus.

Kasutamine – analüütiline (bio)keemia (DNA, valgud), elektrokeemia (pinnakatted).



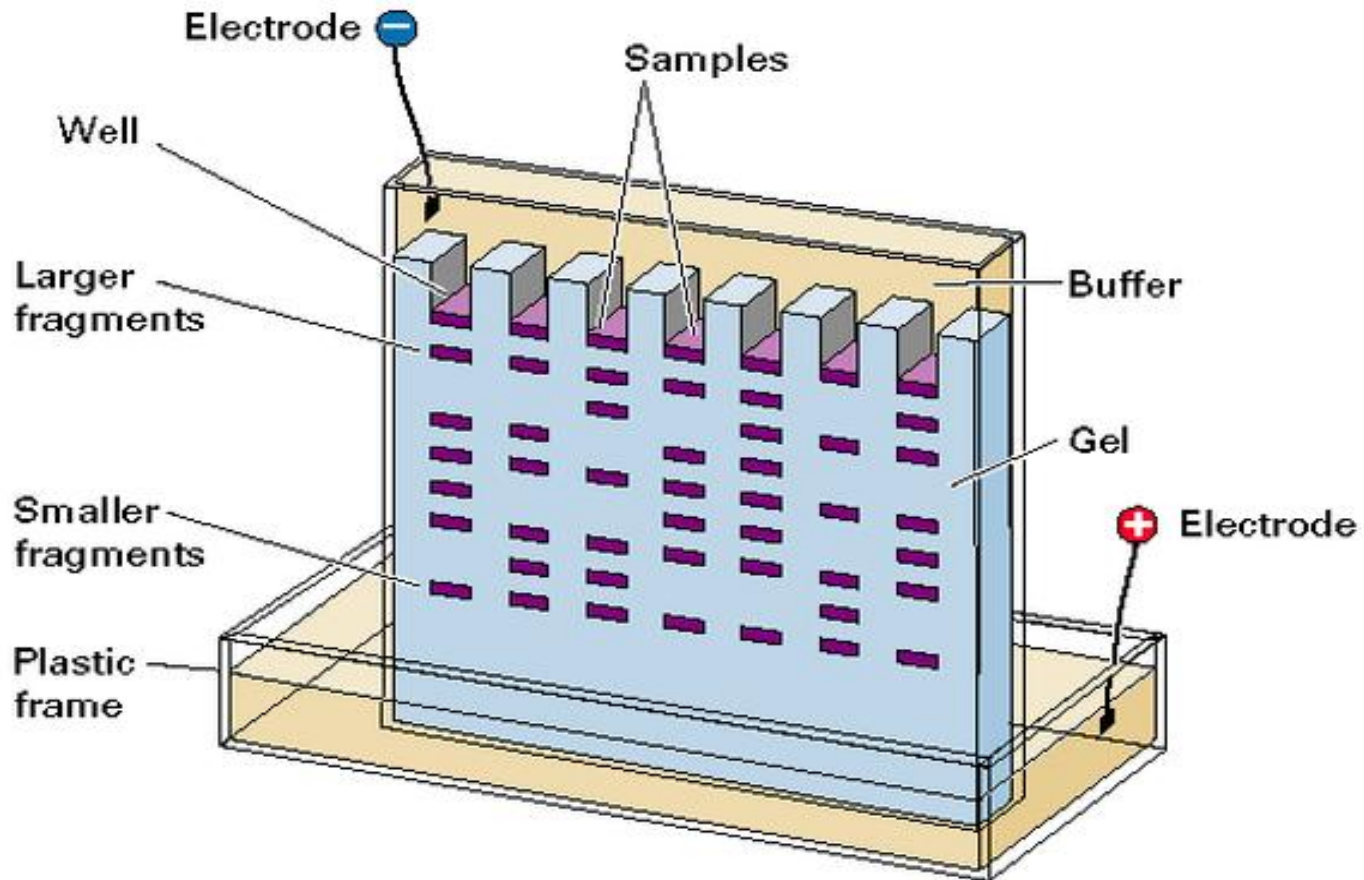
GEELELEKTROFOREES

- Eralduskeskkond – **geel** (agaroos, polüakrüülamiidist, tärkliis vm polümeer).
- Kasutatakse **elektriliselt laetud** molekulide eraldamiseks pikkuse, konformatsiooni või laengu järgi (nt RNA, DNA, valgud).
- Eraldatavate osakeste liikumiskiirus on võrdeline elektrivälja tugevusega ja osakese ioonlaenguga ning pöördvõrdeline keskkonna viskoossusega.
- **Geeli valik** – pooride suurus (nt valgud agaroosi geelis eralduvad vaid laengu järgi).
- **Puhver** – stabiilne pH, elektrijuhtivus.
 - **Ioontugevus** – aktiivsususe näit, mis sõltub iooni laengust ja lahuse molaalsest kontsentratsioonist. On kogu lahust iseloomustav suurus.

Näited: Tris-atsetaat-EDTA (TAE) või Tris-boraat-EDTA (TBE), glütserooli sisaldavad laadimispuhvid (DNA proovi kandmine geelile).

EDTA - etüleendiamiin-tetraatsetaat

GEELELEKTROFOREES

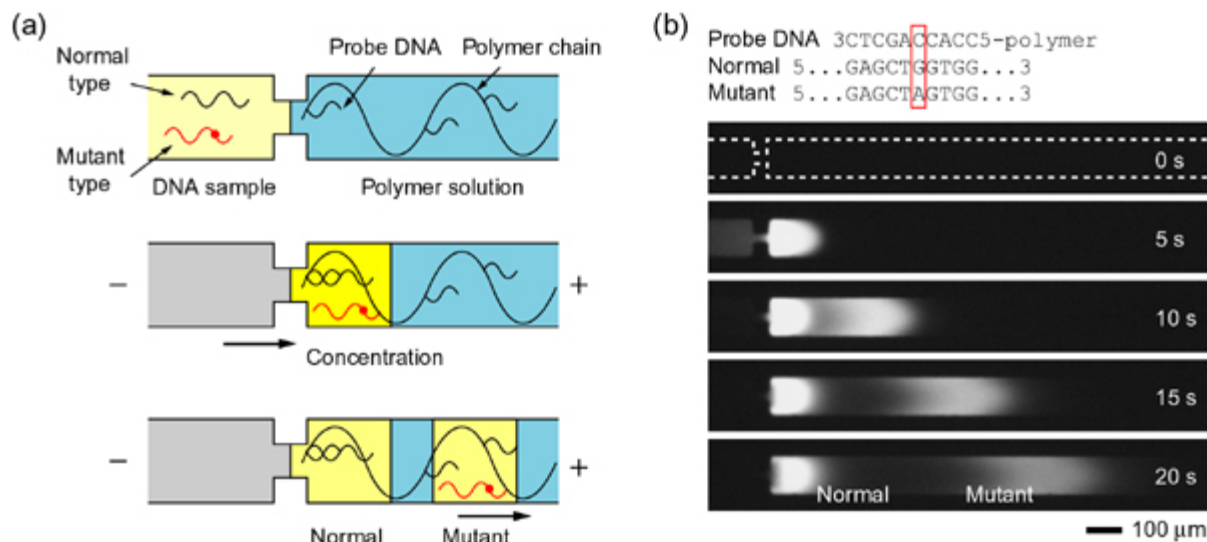


AFIINSUSEKTROFOREES

Eraldamise põhimõte lähtub ainetele ainuomastest keemilistest ja immunoloogilistest vastasmõjudest.

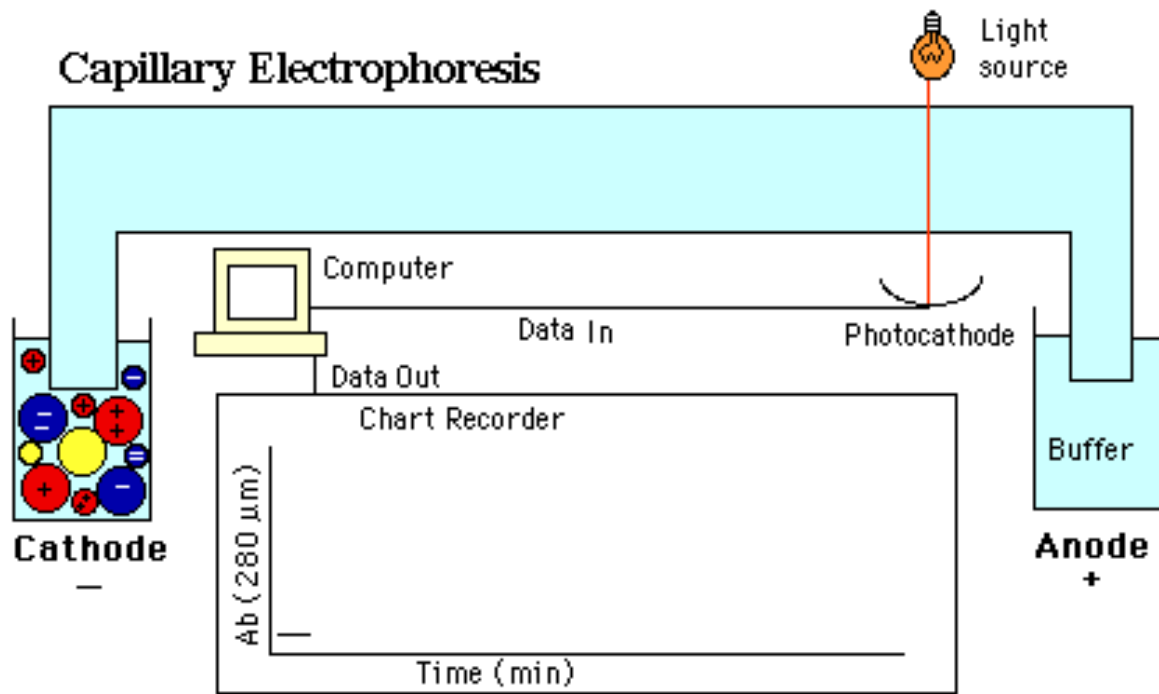
Seondumine maatriksiga (maatriksile seotud ligandiga) ning seejärel eraldamine läbi elektroforeesi.

Kasutusala: valkude, nukleiinhapete ja ensüümide eraldamine ning puhastamine. Valkude kontsentratsiooni määramine ning spetsiifika eristamine. Olulised tegurid on bioloogiline aktiivsus, seostumine (interakteerumine) erinevate molekulidega.



KAPILLAARELEKTROFOREES - CE

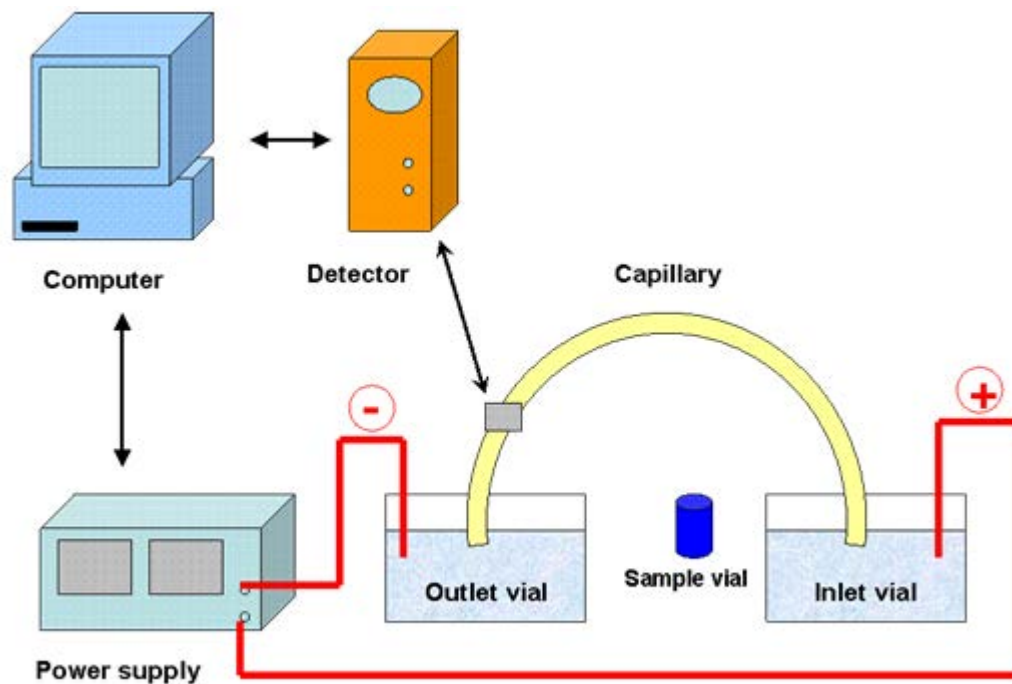
- Ainete elektroforeetiline lahutamine kapillaarkolonnis.
- Ained liiguvad elektriväljas erineva kiirusega, mis sõltub nende massi ja laengu suhtest ning rakendatavast pingest.



KAPILLAARELEKTROFOREES - CE

Proovi sisestamine:

- Rõhu abil
- Elektrokinetiliselt

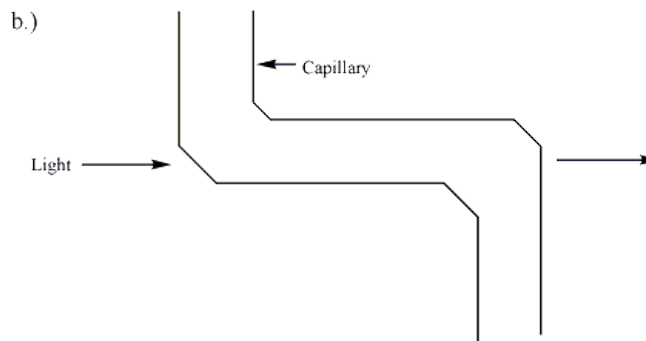
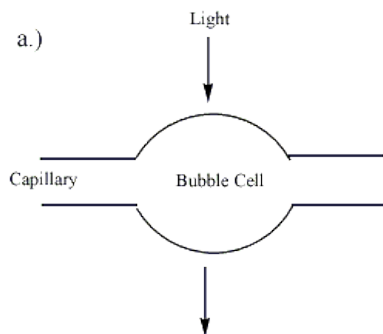
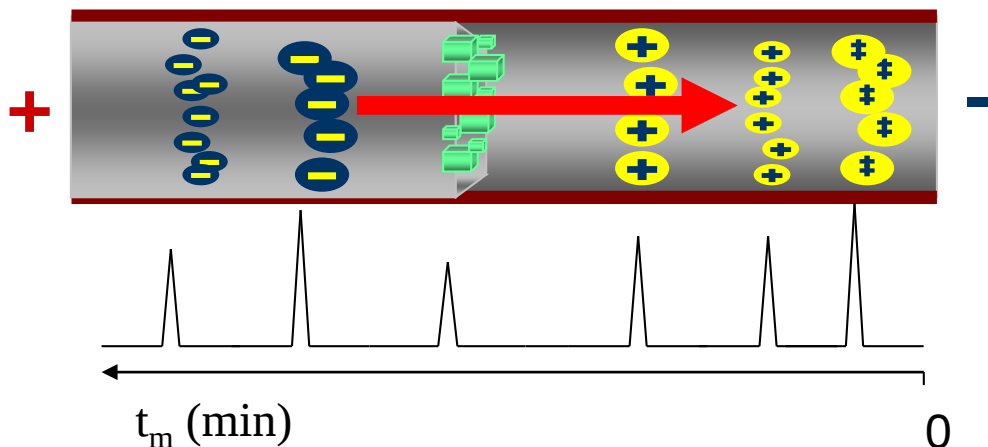


CE EELISED

- Olemuselt lihtne.
- Väikesed proovi kogused (nanoliitrites)
- Kiire analüüs.
- Sobiva meetodi korral hea lahutusvõime.
- Meetod on kvantitatiivne.
- Meetodi eri variatsioonid on rakendatavad alates väikestestioonidest kuni suurte biomolekulideni ja isegi rakkudeni.
- Enamasti ei ole vajalik proovi töötlemine.
- Ühe analüüsi käigus on võimalik lahutada katioone, anioone ja neutraalseid komponente.
- Proovisisestuse protseduurid ja tulemuste töötlus on kergesti kompuuterjuhtimisega automatiseeritavad - protsesside seire reaajas.

KAPILLAARNE TSOONELEKTROFOREES - CZE

- ...ehk lihtsalt klassikaline CE - kapillaaris on puhvri vesilahus – võimaldab lahutada ioone ja laetud molekule



Detektsioon – UV (UV-Vis), fluoresents, mass-spektromeeterilised

MÕJUTAVAD TEGURID

- Puhvri (taustelektrolüüdi) omadused
- Temperatuur
- Voolutugevus
- Kapillaari parameetrid (pikkus, sisediameeter, materjal)
- Süstitava proovi ruumala
- Proovi kontsenetratsioon
- Proovi füüsikalised ja keemilised omadused
- Puhvri ja analüüsitavate ionide liikuvuse erinevus
- Diffusioon
- Interaktsioon/adsorptsioon kapillaariseinaga(le)

EELISED

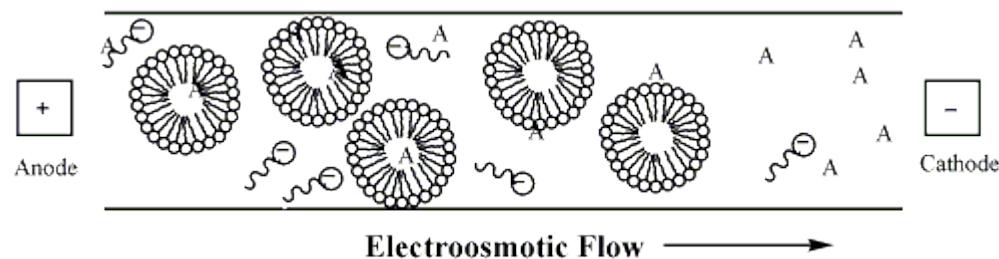
- Lihtne teostus – vähene eeltöötlus
- Kõrgete pingete kasutamine eksperimentide läbiviimisel
- Kiire analüüsi aeg

PUUDUSED

- Ei saa lahutada neutraalseid molekule
- Suurte hüdrofoobsete molekulide puhul (lipiidid) adsorptsioon kapillaari seinale

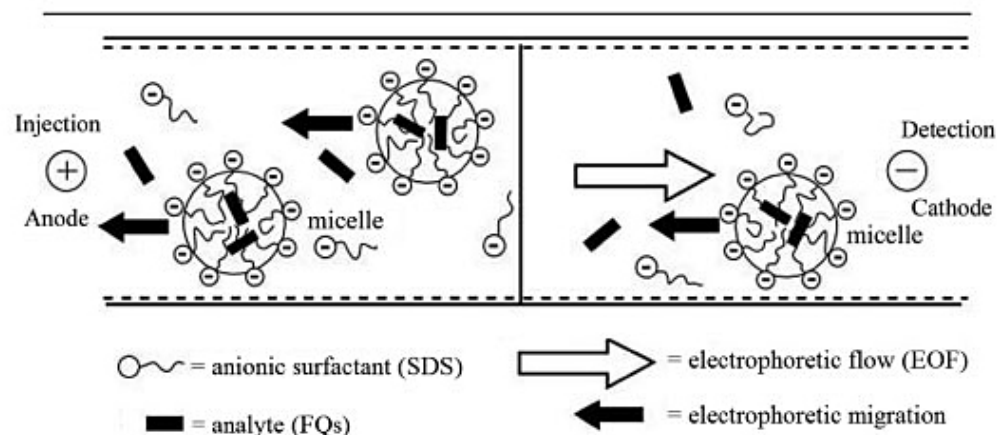
MITSELLAARNE ELEKTROKINEETILINE KROMATOGRAAFIA (MEKC)

- Kapillaari täitvale puhvrile lisatakse pindaktiivset ainet üle kriitilise kontsentratsiooni.
- Pindaktiivsete ainete molekulid moodustavad korrastatud klastreid, mida nimetatakse mitsellideks.
- Üks levinumaid mitselle MEKC-s on naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) mitsell.
- Hüdrofoobsed $C_{12}H_{55}$ molekulite otsad on orienteeritud struktuuri tsentrisse, polaarsed ioonsed rühmad orienteeruvad aga vesilahusesse.



MITSELLAARNE ELEKTROKINEETILINE KROMATOGRAAFIA (MEKC)

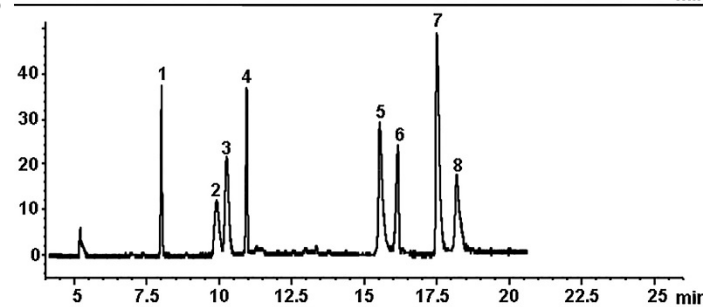
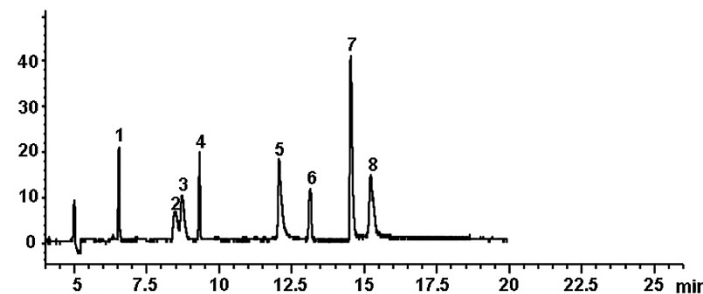
- Negatiivselt laetud mitsellid nagu SDS on oma laengu tõttu tõmmatud anoodi poole, kuid kuna EOF jõud on suurem, siis liiguvad mitsellid aeglaselt katoodi suunas.
- Ained jaotuvad kiiresti liikuva puhvri ja aeglaselt liikuvate mitsellide vahel.
- Mida hüdrofoobsem on aine seda kauem viibib ta mitsellis ja seda hiljem lahkub ta kapillaarist.



MECK - EELISED, PUUDUSED

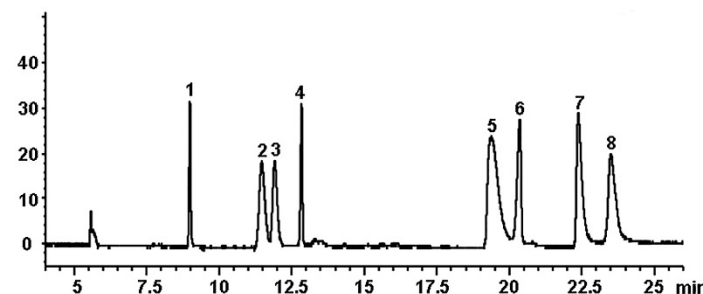
EELISED

- Meetodil on väga suur lahutusvõime. Lahutab nii neutraalseid molekule kui ka ioone sisaldavaid segusid
- SDS on kergesti kättesaadav ja mitte liiga kallis
- Üleminek CZE-lt MEKC-ile on väga lihtne
- Adsorptsioon kapillaari seinaga on teatud määral maha surutud



PUUDUSED

- Analüüsiajad on suhteliselt pikad
- Kaetud kapillaari puhul võivad pindaktiivsed ained katet lõhkuda



KAPILLAARNE GEELELEKTROFOREES (CGE)

- Kapillaari sisse tekitatakse geel
- Proovi eraldamine toimub ioonide suuruse erinevuse tõttu: suuremad molekulid pidurduvad geelis rohkem kui väiksemad molekulid

EELISED

- Saab lahutada selliseid aineid mille raadiuse/laengu suhe on ühesugune, mass aga erinev (näiteks DNA fragmendid)
- Konvektsioonist ja difusioonist põhjustatud tsooni laienemine on märkimisväärselt väiksem kui vaba tsooni elektroforeesi puhul
- EOF ja selle võimalikest muutumistest tingitud reprodutseeritavuse vähenemine on elimineeritud
- Adsorptsiooni kapillaari seinaga ei ole

PUUDSED

- Geeliga täidetud kolonnid on suhteliselt haprad
- Geeliga täidetud kolonnis on raske puhvrit vahetada
- Gravitatsioonilist proovi sisestamist ei saa kasutada
- Saab rakendada ainult madalamaid pingeid

KAPILLAARNE ISOELEKTRILINE FOKUSSEERIMINE (CIEF)

Kapillaaris on geel, milles tekitatakse pH gradient – võimaldab lahutada valkusi

PROBLEEMID VALKUDEGA

- "Kleepuvad" pindadele ja interakteeruvad paljude teiste molekulidega.
- Omadused (hüdrofoobsus, lahustuvus vees, laengute arv jne.) varieeruvad palju.
- "Tõelistes" proovides esineb sageli väga lähedaste omadustega valke.
- Väga tundlikud keskkonnamuutustele (pH, temperatuur, lahuse koostis).

CIEF

- Väga sarnane klassikalisele isoelektrilisele fokusseerimisele:
 1. Tekitatakse pH gradient.
 2. Valgud lahutatakse nende isoelektriliste täppide (punkt, kus valgumolekuli summaarne elektrilaeng on 0) erinevuste alusel.
- Peamine erinevus on selles, et lahutamine toimub kapillaaris.

CIEF

EELISED

- Kapillaar täidetakse geeliga, valgud liiguvad läbi geeli pooride.
- Väga sarnane klassikalisele geelforeesile.
- Kleepumine kapillaari seintele ja difusioon on maha surutud.
- Võimalikud väga suured efektiivsused.
- Väga suur lahutusvõime.

PROBLEEMID

- Kapillaarid on suhteliselt haprad.
- Ei saa kasutada kõrgemaid pingeid ja kõrgemaid ioontugevusi.
- Puhvri vahetamine on keeruline ja aeganõudev.
- Kapillaarid on kallid, nende isevalmistamine ei anna alati väga stabiilseid tulemusi.
- Proovi saab sisestada ainult elektrokineetiliselt.

TÄNAN!