

Elektroforese, een scheidingstechniek alleen voor eiwitten?

Citation for published version (APA):

Everaerts, F. M. (1978). Elektroforese, een scheidingstechniek alleen voor eiwitten? *Chemisch Weekblad Magazine*, (Juni), 25-26.

Document status and date:

Gepubliceerd: 01/01/1978

Document Version:

Uitgevers PDF, ook bekend als Version of Record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.tue.nl/taverne

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

openaccess@tue.nl

providing details and we will investigate your claim.

Elektroforese, een scheidingstechniek alleen voor eiwitten?

Elektroforese is een verzamelnaam voor een aantal scheidingstechnieken (analytisch en preparatief), die gebruikt worden om zowel laagmoleculaire als hoogmoleculaire stoffen, in oplossing, kwalitatief en kwantitatief te analyseren. Daar de scheiding plaats vindt onder invloed van een elektrisch veld, moeten de te scheiden stoffen een elektrische lading hebben.

Oorspronkelijk werd elektroforese gebruikt om de beweging van elektrisch geladen deeltjes in een elektrolyet te bestuderen. De ontwikkeling, voornamelijk in de laatste twintig jaar, heeft ertoe geleid, dat men elektroforese meer en meer analytisch is gaan toepassen. In feite zijn alle elektroforetische scheidingstechnieken terug te voeren tot vier elementaire principes: de zone elektroforese (1), de moving-boundary elektroforese (2, 3), de isotachoforese (2) en de iso-electric focusing (4, 5). Evenwel zal ook aandacht besteed worden aan de 'disc-elektroforese (6) (een combinatie van isotachoforese en zone elektroforese) en immuno-elektroforese (7) (zone elektroforese in combinatie met immunoprecipitatie).

Zone-elektroforese

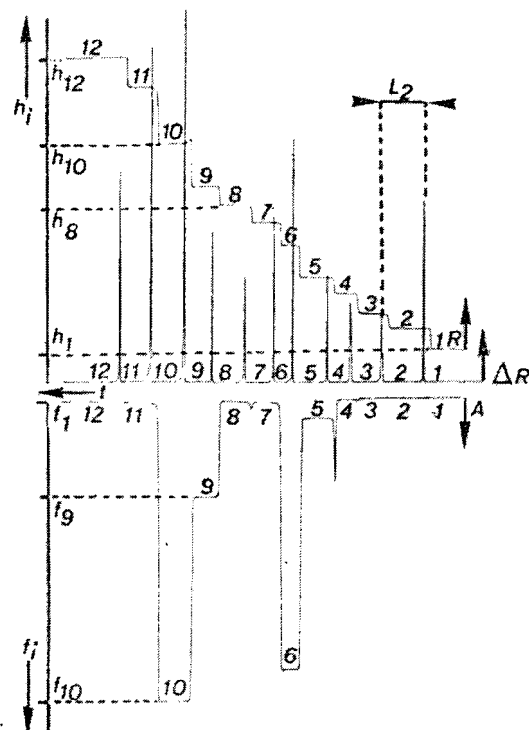
Elektroforeseapparatuur bestaat in principe uit een anoderuimte, een kathoderuimte en een scheidingsruimte. Bij zone elektroforese maakt men gebruik van een draagelektrolyet, waarvan de concentratie hoog is vergeleken met de concentratie van de te scheiden stoffen. Dit draagelektrolyet bevindt zich in de anode- en kathoderuimte en in het scheidingscompartiment. De te scheiden stoffen (ionogene) kunnen in het midden van het scheidingscompartiment worden ingebracht, daar simultaan een scheiding van anionen en kationen uit het monster, in principe, mogelijk is. Het gekozen solvent en de samenstelling van het draagelektrolyet (concentratie, pH en complex vormers) bepalen de effectieve mobiliteit ($\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{sec}^{-1}$) van de ionen. De snelheid, waarmee de ionen zullen migreren, wordt mede bepaald door de grootte van het aangelegde elektrische veld (V cm^{-1}). De afstand, die de monsterionen (onder standaardcondities) afleggen in een bepaalde tijd, geeft kwalitatieve informatie: vergelijkbaar met een retentietijd in de chromatografie. De detectie vindt over het algemeen plaats na de analyse, via een specifieke kleuring. Uit de intensiteit van de kleuring wordt kwantitatieve informatie verkregen. Er moeten echter wel speciale ijktabellen worden gemaakt. Het oplossend vermogen van zone elektroforese is gering (Figuur 1Ba). De methode wordt veelvuldig toegepast voor het scheiden van proteïnen. De analysetijd (inclusief detectie) ligt in de orde grootte van uren. Zone elektroforese is te vergelijken met elutie technieken in de chromatografie.

Moving-boundary elektroforese

Met moving-boundary elektroforese kunnen alleen anionen of kationen, in één analyse, worden gescheiden. De keuze van het elektrolyet in het scheidingscompartiment en de samenstelling van het monster bepalen de analysetijd (2) en de concentraties van de te scheiden stoffen in de diverse zones. Analytisch heeft moving-boundary elektroforese dan ook niet veel meer te



F. M. Everaerts studeerde aan de TH Eindhoven, waar hij in 1968 promoveerde bij Prof. Dr. Ir. A. I. M. Keulemans en Prof. Dr. A. J. P. Martin. Van 1965 tot 1968 was hij als leraar schei- en natuurkunde verbonden aan het Bisschoppelijk College in Weert. In 1967 trad hij in dienst van de TH Eindhoven, waar hij zich in de vakgroep Instrumentele Analyse bezighoudt met elektroforetische scheidingstechnieken, in het bijzonder met isotachoforese.



ISOTACHOFORETISCHE scheiding van een mengsel van kationen: 1 = K^+ ; 2 = Ba^{2+} ; 3 = Na^+ ; 4 = $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$; 5 = Pb^{2+} ; 6 = $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$; 7 = tris⁻; 8 = histidine⁺; 9 = creatinine⁺; 10 = benzidine⁺; 11 = ϵ -amino-capronzuur⁺; 12 = γ -aminoboterzuur⁺. De hoeveelheid van deze ionen is ca 10^{-10} M. Er is gebruik gemaakt van een conductometrische detector (R, ΔR) en een UV absorptie detector (A), die beide tijdens de analyse het passeren van de zones registreren. De waarde van R (h) geeft informatie over de kwaliteit. De afstand tussen de pieken (ΔR : bijvoorbeeld L_2) geeft informatie over de kwantiteit. De UV absorptie detector (lineair signaal A : f) geeft additionele kwalitatieve informatie. De analysetijd bedroeg 12 minuten. Met isotachoforese kunnen cationen, anionen en amfolieten worden gescheiden.

betekenen, alhoewel het vroeger veelvuldig werd toegepast voor de scheiding van proteïnen. Moving-boundary elektroforese is de scheidingsprocedure van isotachoforese en is te vergelijken met de frontale analyse technieken in de chromatografie.

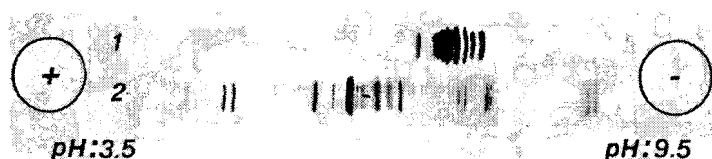
Isotachoforese

Ook bij isotachoforese dient men een keuze te maken of men anionen, dan wel kationen wil scheiden. De te scheiden ionen (bijvoorbeeld anionen) worden ingebracht op het grensvlak van twee verschillende elektrolyeten: het loopelektrolyet en de terminator. Het loopelektrolyet bevindt zich in het scheidingscompartiment en in de anoderuimte. De samenstelling van dit elektrolyet (solvent, concentratie en pH) is erg belangrijk. Het anion heeft een grote mobiliteit en een lage pK waarde. Het bijbehorende tegenion heeft een lage mobiliteit en bufferende capaciteit: $\text{pK}_t \sim \text{pH}_L$; L is loopelektrolyet en t is tegenion. De terminator bevindt zich in de kathoderuimte en

heeft een geringe effectieve mobiliteit. Onder invloed van een elektrisch veld gaan de ionen migreren: het loopion voorop, gevolgd door de monsterionen en tenslotte de terminator. Indien het verschil in effectieve mobiliteit groot genoeg is, zal er een volledige scheiding optreden. De ionen zijn dan gerangschikt in volgorde van effectieve mobiliteit. Het tegenion is afkomstig uit het loopelektrolyt. De zones migreren alle met dezelfde snelheid (isos = gelijk; tachos = snelheid en phoreesthai = laten lopen). Isotachoforese kent het zogenaamde zelfcorrigerend vermogen van de zonegrenzen (2), waardoor de diffusie nauwelijks een rol speelt op het analyseresultaat. Iedere zone heeft een eigen karakteristieke geleidbaarheid en concentratie, welke kleiner worden in de richting van de terminatorzone. De temperatuur, de elektrische weerstand en de veldsterkte nemen toe in de richting van de terminatorzone. De concentraties van de ionen in de verschillende zones zijn eenvoudig te berekenen (2). Doordat iedere zone een karakteristieke concentratie bezit, kan uit het meten van de lengte van een isotachoforetische zone kwantitatieve informatie worden verkregen. Kwalitatieve informatie verkrijgt men door de concentratie, de temperatuur, de elektrische weerstand of de veldsterkte te meten (Figuur 1 A). Met behulp van isotachoforese kan in korte tijd (10-15 minuten) met grote nauwkeurigheid (beter dan 2%), ionogene stoffen (zowel laag- als hoogmoleculaire) worden gescheiden, tot op picomol niveau. De scheidingsparameters kunnen worden gevarieerd door de pH van het loopelektrolyt (het bufferend tegenion) te variëren, door verschillende solvents of mengsels van solvents te kiezen of door gebruik te maken van complex-formatie. Isotachoforese is te vergelijken met verdringingschromatografie.

Isoelectric focusing

Isoelectric focusing kan enkel worden toegepast om amfolieten (bijvoorbeeld proteïnen) te scheiden. Er wordt gebruik gemaakt van een pH gradiënt in het scheidingscompartiment. Dit pH-gradiënt stelt zich na het inschakelen van de elektrische stroom snel in én wordt gestabiliseerd door de aanwezigheid van laagmoleculaire amfolieten, waarvan de mobiliteit vele malen groter is dan die der te scheiden amfolieten. De elektrische geleidbaarheid van deze laagmoleculaire amfolieten, op hun pI punt, is groot vergeleken met die van water. Amfolieten bezitten een mobiliteit welke qua teken en grootte afhankelijk is van de pH. De hoogmoleculaire amfolieten (monster) migreren dan ook in het gevormde pH gradient. Zodra die pH in het gradiënt bereikt wordt, welke gelijk is aan het pI punt van het betreffende amfoliet, is de snelheid nul (focusering). In gelplaten kunnen de gefocuseerde proteïnen op eenvoudige wijze, door middel van een kleurreactie, worden gedetecteerd (figuur 1C). Indien de scheiding in kolommen wordt uitgevoerd, kunnen de gefocuseerde proteïnen worden gedetecteerd door een fotometrische detector en een doorstroomcuvet. Isoelectric focusing heeft een hoogoplossend vermogen, daar het mogelijk is nauwe pH-gradiënten aan te leggen in het scheidingscompartiment. Evenals isotachoforese, kent isoelectric focusing het zelfcorrigerend vermogen van de



ISOELECTRIC FOCUSING: een scheiding van hemoglobine (1) en L-aminozuur-oxidase (2). De analyse werd uitgevoerd op een PAG^R plaat. Als gel is op deze plaat gebruikt poly-acrylamide met als laagmoleculaire amfolieten de Ampholine^R, pH range 3,5-9,5. De analysetijd, inclusief kleuring, bedroeg enkele uren. Foto aan LKB Produkter AB (Bromma, Zweden).

Met dank aan LKB Produkter AB (Bromma, Zweden) voor het beschikbaar stellen van de resultaten, weergegeven in de analyses B en C.

zonegrenzen, waardoor de diffusie nauwelijks een rol speelt op het analyseresultaat. De analysetijd voor de gelplaten, inclusief kleuring, is in de orde grootte van uren. Verschillende monsters kunnen simultaan op de plaat worden geanalyseerd. In verband met de warmteontwikkeling bedraagt de analysetijd voor de experimenten in kolommen in de orde grootte van dagen, daar de stroomdichtheid laag is.

Disc elektroforese

Disc elektroforese is een scheidingsmethode, welke eveneens wordt toegepast voor de scheiding van proteïnen. De techniek dankt haar naam aan het feit dat gebruik gemaakt wordt van twee gelsystemen en verschillende buffersystemen in deze gels (*discontinuous system*). Het eerste gel heeft grote porieën en een lage pH. De ingebrachte proteïnen, in lage concentratie, worden gescheiden in een nauwe geconcentreerde proteïne band volgens de principes van isotachoforese. Deze smalle proteïne band ('ideale' injectie) wordt volgens het principe van de zone elektroforese gescheiden in het tweede, aansluitende, gel op hoge pH. Dit tweede gel bevat bovendien kleine porieën. Hierdoor wordt een hoog oplossend vermogen verkregen, omdat de proteïnen niet alleen op verschil in effectieve mobiliteit, doch ook op grootte en vorm, worden gescheiden. De analysetijd, inclusief kleuring, bedraagt enkele uren.

Immuno elektroforese

Immuno-elektroforese is een scheidingsmethode, welke voornamelijk wordt toegepast voor de scheiding van proteïnen en polysacchariden (figuur 1B). Bij de 'crossed' immuno-elektroforese gaat men als volgt te werk. In een gel met grote porieën, bijvoorbeeld agarose, worden de proteïnen gescheiden volgens het principe van zone elektroforese (figuur 1B (a)). Na de scheiding wordt tegen het scheidingsgel een nieuw gel aangebracht. De proteïnen worden wederom onderworpen aan zone elektroforese (figuur 1B (b)), loodrecht op bewegingsrichting in het eerste gel. In het draagelektrolyt in het tweede gel zijn antilichamen aanwezig tegen de te scheiden proteïnen (antigenen). De mobiliteit van de antilichamen is te verwaarlozen ten opzichte van die der te scheiden proteïnen. Er volgt een immunologische reactie tussen het antigen en het corresponderende antilichaam. Het complex, dat zich vormt, is zichtbaar te maken via kleuring. De interpretatie, zowel kwalitatief als kwantitatief, vereist een grote deskundigheid (7). De analysetijd, inclusief kleuring, bedraagt enkele uren. Een eenvoudige variant is de zogenaamde Laurell (of rocket) immuno-elektroforese. Een mengsel van proteïnen laat men zone elektroforetisch migreren in een gel dat enkel een monospecifiek antilichaam in het draagelektrolyt bevat. Alle proteïnen blijven zone elektroforetisch migreren, behalve dat proteïne, dat een immunologische reactie aangaat met het antilichaam. Er ontstaan precipitatiepieken, waarvan de hoogte evenredig is met de concentratie van het precipiterende proteïne. Deze concentratie is op eenvoudige wijze te bepalen, omdat men met het onbekende monster, enkele monsters met een bekende concentratie simultaan analyseert. Met elektroforetische scheidingstechnieken zijn zowel hoog als laagmoleculaire stoffen te scheiden, welke een elektrische lading bezitten. De minimaal te detecteren hoeveelheid hangt af van de gebruikte methode en detectie. De analysetijd varieert van minuten tot uren. Bij de meeste technieken zijn vele monsters simultaan te analyseren.

1 J. R. Sargent en S. G. George, *Methods in Zone Electrophoresis*, (third edition), BDH Chemicals, LTD, Poole England, 1975.

2 F. M. Everaerts, J. L. Beckers en Th. P. E. M. Verheggen, *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Applications*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford and New York, 1976.

3 L. G. Longsworth in M. Bier (editor), *Electrophoresis: Theory, Methods and Applications* (third edition) Academic Press Inc., London, 1964.

4 P. G. Righetti (editor), *Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis*, North Holland Publ. Company, Amsterdam-Oxford, 1975.

5 N. Catsimpoolas (editor), *Isoelectric Focusing*, Academic Press, New York, San Francisco and London, 1976.

6 H. R. Maurer, *Disk Elektroforese*, de Gruyter, Berlin, 1968.

7 N. H. Axelsen, J. Kröll en B. Weeke (editors), *A Manual of Quantitative and Qualitative Immuno-Electrophoresis*, Scan. Journ. Immun., Vol. 2, No 1, 1973.