

# Szedimentációs és elektroforetikus módszerek, tömegspektrometria

gyógyszerészhallgatóknak

**Dr. Bozó Tamás**

egyetemi adjunktus

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet  
2023. május 18.



**SEMMELWEIS**  
EGYETEM 1769

1

## Témakörök

### Témák

- **Szedimentációs módszerek**
  - Szedimentáció
  - Szedimentáció vs. Brown mozgás
  - Centrifugálás
    - Elméleti alapok
    - Gyakorlati aspektusok
    - Típusok
    - Eszközök
    - Módszerek
- **Elektroforézis**
  - Szabad áramlású elektroforézis
  - Gél elektroforézis
  - Izoelektromos fókuszálás
- **Tömegspektrometria alapjai**

### Kapcsolódó gyakorlatok

- Diffúzió
- Áramlás

### Tankönyvi részek

- VI/1.1. Szedimentációs módszerek
- VI/1.2. Elektroforézis és izoelektromos fókuszálás
- I./1.5; X/7. Tömegspektrometria



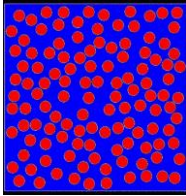
**SEMMELWEIS**  
EGYETEM 1769

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

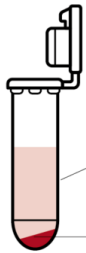
2

2

# Szedimentáció I.



A **szedimentáció** részecskék oldatban (szuszpenzióban) való ülepedésének folyamata, valamilyen erő hatására. Sedeo (lt): ül; *sedimentum* (lt): üledék



**Felülúszó**  
(szupernatáns)

**Pellet**  
(üledék, sedimentum)

<https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/centrifugation/safe-use-of-centrifuges/basics-in-centrifugation/>



Virgin Formation, Utah, USA

mész  
iszap (aleurit)



Duna delta fejlődése Kr.u. 1-től



A Duna deltája az úrból

# Szedimentáció II.

## Fizikai alapok:

**Súrlódási erő** - két érintkező felület között fellépő erő, vagy az az erő, mellyel egy közeg fékezi a benne mozgó tárgyat. Az elmozdulás ellen hat.

$$F_s = f \cdot v$$

Csak kis sebességeknél ad jó közelítést!

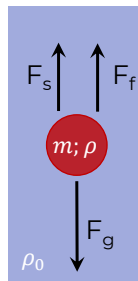
$$f: \text{alakfaktor}; \quad f = \frac{1}{u}$$

$$v: \text{sebesség}$$

$$u: \text{mobilitás} = \frac{v}{F}$$

gömbre:

$$u = \frac{1}{6\pi\eta r}$$



A részecske ülepedik. (Ha  $\rho > \rho_0$ )

**Felhajtóerő** – nyugvó folyadék (vagy gáz) a benne lévő testre felfelé ható erővel hat. Nagysága a test által kiszorított közeg súlyával egyenlő.

$$F_f = \rho_0 \cdot V \cdot g$$

$$V = \frac{m}{\rho}$$

$$F_f = m \cdot g \cdot \frac{\rho_0}{\rho}$$

## Gravitációs erő:

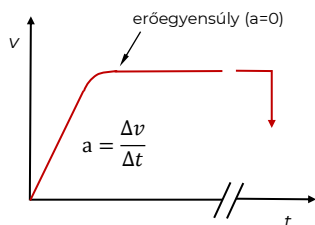
$$F_g = m \cdot g$$

$\rho_0$ : közeg sűrűsége  
 $\rho$ : részecske sűrűsége  
 $V$ : részecske térfogata  
 $m$ : részecske tömege  
 $g$ : gravitációs állandó ( $9.8 \frac{m}{s^2}$ )

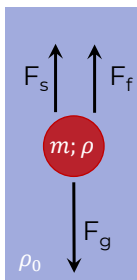
# Szedimentáció III.

## Fizikai alapok:

**Newton II. törvénye:**  $\Sigma F = m \cdot a$



A részecske sebessége mindaddig növekszik, amíg erőegyensúly nem alakul ki (vagy elérjük az edény alját).



A részecske ülepedik. (Ha  $\rho > \rho_0$ )

$$\Sigma F = F_g - F_f - F_s$$

Erőegyensúlyban:  $\Sigma F = 0$

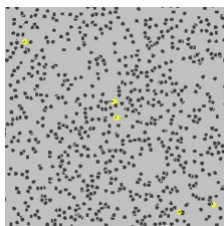
$$F_s = F_g - F_f$$

$$f \cdot v = m \cdot g - m \cdot g \cdot \frac{\rho_0}{\rho}$$

$$f \cdot v = m \cdot g \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$

# Szedimentáció vs. Brown mozgás

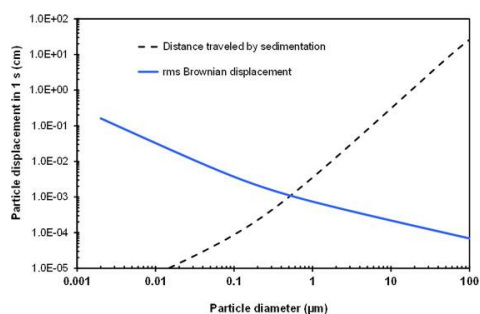
## Probléma: Brown-mozgás



Kicsiny részecskékre (kb.  $< 2 \mu\text{m}$ ) a Brown mozgás megakadályozza ill. csökkenti a szedimentációt.

Particle (SC)	Diameter, microns	Brownian velocity, m/s	Sediment motion velocity, m/s
RBC	8	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$3.5 \cdot 10^{-6}$
Latex ball	4	$5.5 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-6}$
Latex ball	2	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-7}$
Latex ball	1	$4.4 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$
Milk fat particle	1	$5 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-8}$
Latex ball	0.5	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^{-8}$

Chiceaet al. Romanian J. Biophys. 2010

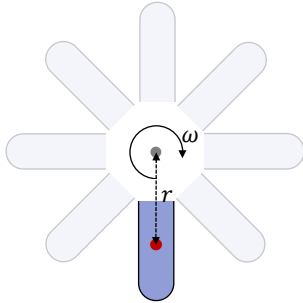


Gömb alakú,  $1000 \text{ kg/m}^3$  sűrűségű részecske Brown elmozdulásának átlagos középértéke (RMS), és a szedimentáció során megtett távolsága LEVEGŐBEN. ( $p=1 \text{ atm}$ ;  $T=293 \text{ K}$ )

Gensdarmes F. Nanoengineering, 2015

# Centrifugálás – elméleti alapok I.

## Fizikai alapok:

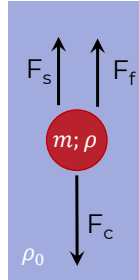


### Szögsebesség:

$$\omega = \frac{\Delta\phi}{\Delta t}$$

$\Delta\phi$  : szögelfordulás

$\Delta t$  : idő



A részecske gyorsabban ülepedik. (Ha  $\rho > \rho_0$ )

### Surlódási erő:

$$F_s = f \cdot v$$

### Felhajtóerő:

$$F_f = m \cdot a \cdot \frac{\rho_0}{\rho} = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \frac{\rho_0}{\rho}$$

### Centrifugális erő:

$$F_c = m \cdot a$$

$$a = r \cdot \omega^2$$

centripetális (forgásból származó) gyorsulás

$$F_c = m \cdot r \cdot \omega^2$$

forgás sugara

### Erőegyensúlyban: $F_s = F_c - F_f$

$$f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$

# Centrifugálás – elméleti alapok II.

Erőegyensúlyban:  $f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$

$$s \equiv \frac{v}{r \cdot \omega^2} = \frac{m}{f} \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$



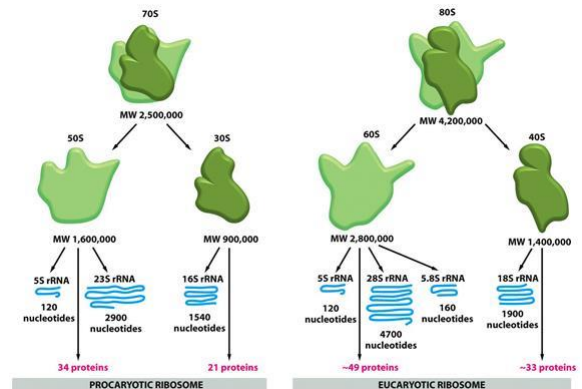
**Theodor Svedberg**  
1884-1971  
1926: kémiai Nobel-díj

### Szedimentációs állandó (S): a

részecske ülepedési sebességének és a centripetális gyorsulás hányadosa. Az adott centripetális gyorsulásnál az egyensúlyi sebesség eléréséhez szükséges idő.

[Svedberg; 1 Sv =  $10^{-13}$  s]

### Néhány példa:



# Centrifugálás – elméleti alapok II.

Erőegyensúlyban:  $f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$

$$S \equiv \frac{v}{r \cdot \omega^2} = \frac{m}{f} \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$



**Theodor Svedberg**  
1884-1971  
1926: kémiai Nobel-díj

**Szedimentációs állandó (S):** a részecske ülepedési sebességének és a centripetális gyorsulás hányadosa. Az adott centripetális gyorsulásnál az egyensúlyi sebesség eléréséhez szükséges idő.

[Svedberg; 1 Sv =  $10^{-13}$  s]

## Néhány példa:

Subcellular entity	Sedimentation coefficient (S)	Diameter (μm)
Nucleus	$10^6$ to $10^{7\frac{1}{2}}$	3–12 <sup>‡</sup>
Mitochondria	$10^4$ to $5 \times 10^{4\frac{1}{2}}$	0.5–4 <sup>‡</sup>
Lysosomes	$4 \times 10^3$ to $2 \times 10^{4\frac{1}{2}}$	0.5–0.8 <sup>‡</sup>
Peroxisomes	$4 \times 10^{3\frac{1}{2}}$	0.5–0.8 <sup>‡</sup>
Viruses	42 to >1000	0.02–0.4
Nucleic acids (free)	3.5 to 100	n/a
Ribosomes	80	0.025

\*Hinton and Mullock (1997)

<sup>‡</sup>Schmidt (1973)

<sup>‡</sup>Luttmann et al. (2006)

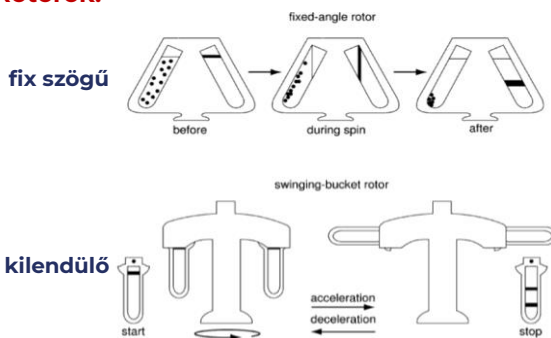
<sup>‡</sup>Griffith (1994)

Lawrence, J & Steward, G. (2010). Purification of viruses by centrifugation.

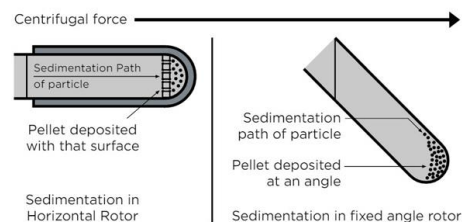
# Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – I.

**Centrifugálás:** Szuszpenziók, emulziók, illetve többkomponensű folyadékelegyek alkotórészeinek szétválasztására alkalmazott művelet, amelyben a szétválás centrifugális erő hatására következik be. A művelet kivitelezésére alkalmazott eszköz a centrifuga. A szétválasztás történhet analitikai és/vagy preparatív céllal.

## Rotorok:



Gallagher SR. Curr. Protoc. Essential Lab. Tech. 9: 5.1.1–5.1.12.



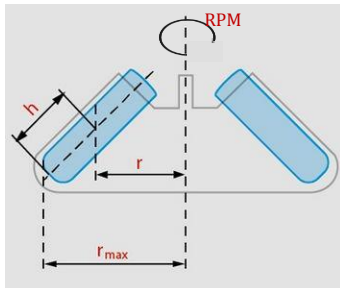
[www.beckman.com/resources/technologies/centrifugation/principles/rotor-types](http://www.beckman.com/resources/technologies/centrifugation/principles/rotor-types)

# Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – II.

## Relatív centrifugális erő (Relative centrifugal force, RCF)

$$RCF = \frac{a}{g} = \frac{r \cdot \omega^2}{g}$$

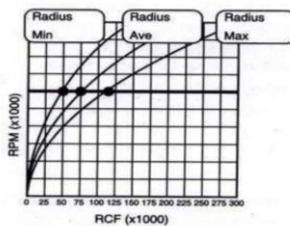
Praktikus formula:  $RCF_{max} = 1,118 \cdot r_{max} \left( \frac{RPM}{1000} \right)^2$



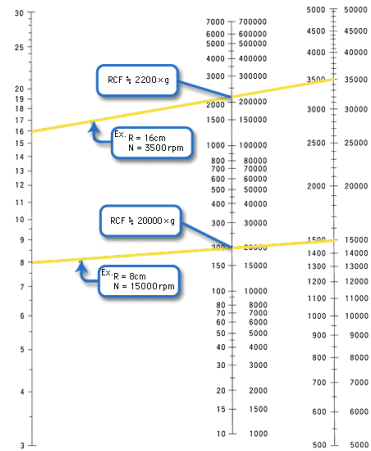
<https://handling-solutions.eppendorf.co>

revolutions per minute

legnagyobb sugár



## Nomograph RCF/RPM meghatározáshoz



<https://www.centrifuge.jp/g-force-calculation/nomograph.html>

# Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – III.

	Analitikai centrifugálás	Preparatív centrifugálás
<b>Cél</b>	Alapvető részecsketulajdonságok vizsgálata: tömeg, méret, alak, kölcsönhatások)	Összetett minták egyes alkotóelemeinek kinyerése/tisztítása. Biológiai minták feldolgozása (pl. komponensszeparálás) további vizsgálatokhoz.
<b>Példák</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Molekula/részecsketömeg meghatározás</li> <li>Szupramolekuláris komplexek molekulatömegének változásainak követése</li> <li>Kül. konformációk és konformációváltozások detektálása.</li> <li>Asszociálódó molekulák/részecskék aggregációfokának meghatározása</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Szubcelluláris frakcionálás</li> <li>Fehérjetisztítás</li> <li>DNS tisztítás</li> <li>Kolloidok szeparálása</li> <li>Vírus szeparálás</li> </ul>
<b>Módszerek</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Szedimentációs sebességi módszer;</li> <li>Szedimentációs egyensúlyi módszer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Differenciálcentrifugálás</li> <li>Sűrűséggradiens centrifugálás</li> </ul>

## Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – IV.

	Centrifugálás	Ultracentrifugálás
<b>Jellemzők</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kiseb RCF értékek (Kb. max.65 000 g)</li> <li>Hűtés és vákuumozás opcionális</li> <li>Nem követjük az ülepedés kinetikáját.</li> <li>A centrifugálás után frakciókat gyűjtünk</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nagy (egészen 1 000 000 g-ig) RCF értékek.</li> <li>Különleges rotorok kellene.</li> <li>Vákuum és hűtés szükséges (Az extrém sebesség okozta gyorsulás túlmelegedést okozna.)</li> <li>Egyes esetekben folyamatközi detektálást végzünk → ülepedés követése</li> </ul>
<b>Példák</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vér-frakcionálás</li> <li>Sejtmagok elválasztása a citoszól komponensektől</li> <li>Mikrorészecskék kinyerése szuszpenzióból</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Riboszómák, membrán vezikulák, fehérjék, DNS, nanorészecskék, vírusok kinyerése, ill.analitikája</li> </ul>
<b>Felhasználás</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Főként preparatív</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Analitikai vagy preparatív</li> </ul>

## Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – V.

Centrifugák	Ultracentrifuga
 <p><b>Eppendorf 5427R</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RPM: max. 16.220</li> <li>RCF: max: 25.000 x g</li> <li>-10 °C to 40 °C</li> <li>30 kg</li> </ul>	 <p><b>Eppendorf Minispin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RPM: 800-13.400</li> <li>RCF: max. 12.100 x g</li> <li>Room temperature</li> <li>4,3 kg</li> </ul>
	 <p><b>Beckmann Coulter Optima XPN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RPM: max. 100.000</li> <li>RCF: max. 802.400 x g</li> <li>0°C to 40 °C</li> <li>485 kg</li> </ul>



# Szedimentációs sebességi módszer

**Cél:** Molekula/részecsketömeg meghatározás

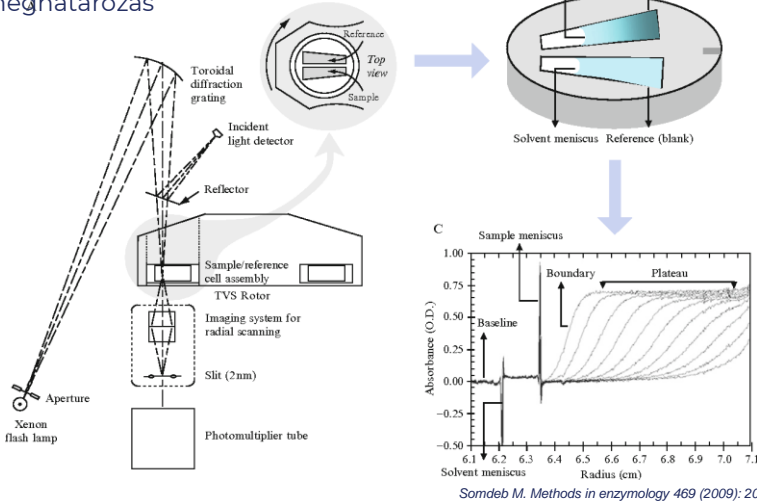


Figure 1: Two-sector centerpiece

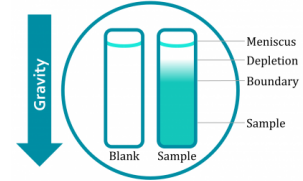
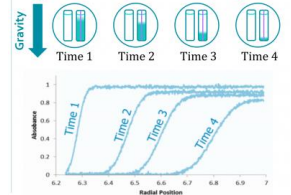


Figure 2: Depletion during AUC



<https://www.coriolis-pharma.com/analytical-services/aggregate-analytics/analytical-ultracentrifugation-sv-auc-se-auc>

Somdeb M. *Methods in enzymology* 469 (2009): 209-36.

15

## Szedimentációs sebességi módszer – II.

1.  $S$  meghatározása ultracentrifugálással:

$$S = \frac{v}{r \cdot \omega^2} = \frac{m}{f} \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$

2. Fejezzük ki a tömeget:  $m = \frac{fS}{\left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)}$

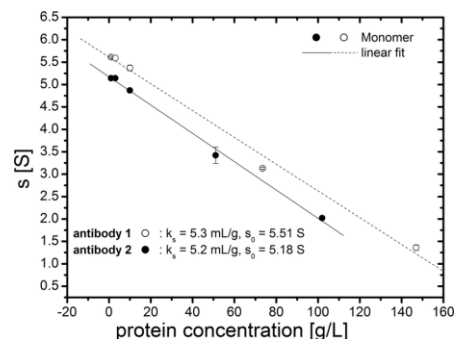
3. Szükséges ismerni:  $f$ ,  $\rho$  és  $\rho_0$  tényezőket

- $\rho_0$ : könnyen meghatározható  $\rho_0 = \frac{m_0}{V_0}$
- $\rho$ : meghatározható sűrűséggradiens centrifugálással
- $f$  a diffúziós együtthatóból ( $D$ ) számolható:

$$f = \frac{kT}{D} = \frac{RT}{ND}$$

4.  $m$  kifejezhető, mint:  $m = \frac{RTS}{ND(1 - \frac{\rho_0}{\rho})}$

**Caveat:**  $S$  koncentrációfüggő → extrapoláljuk 0 koncentrációra



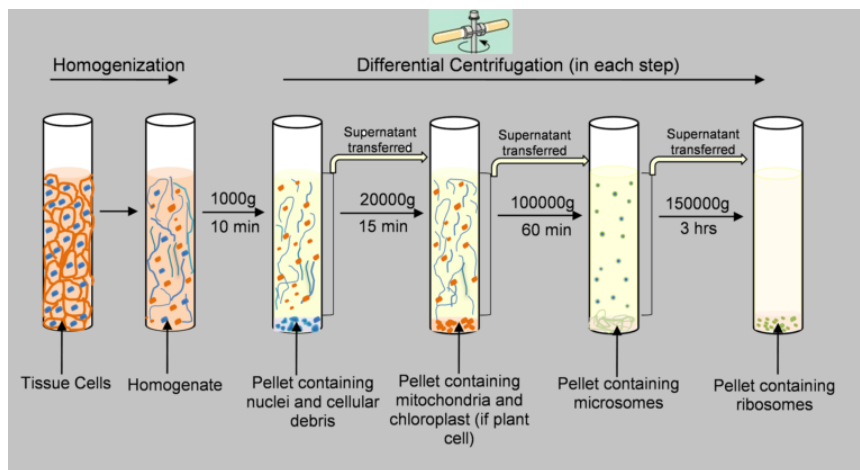
Schilling, K. (2015). *PLoS ONE*. 10. e0120820. 10.1371/journal.pone.0120820.

16



# Differenciálcentrifugálás

**Cél:** Egy szuszpenzió/folyadékkeleg összetevőinek szétválasztása



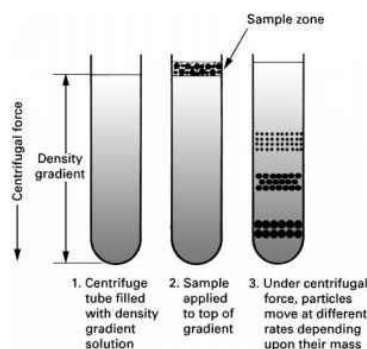
<https://www.broadlearnings.com/lessons/centrifugation/>

## Sűrűséggradiens centrifugálás– I.

### Sebesség-zonális (Rate Zonal) centrifugálás

- Sűrűséggradienst hozunk létre centrifugacsőben (közegek: cukrok, polimerek, CsCl)
- Rarétegezzük a mintát (max. 10%)
- A részecskék az ultracentrifugálás során különböző sebességgel fognak ülepedni a **tömegük** (azonos sűrűség esetén) és **alakjuk** szerint.
- Sávok = azonos tömegű (méretű) részecskefrakciók
- Mivel  $\rho > \rho_0$ , minden részecske leülepedik a cső aljára, ha túl hosszúan centrifugálunk
- Példák: fehérjék, sejtalkotók szeparálása

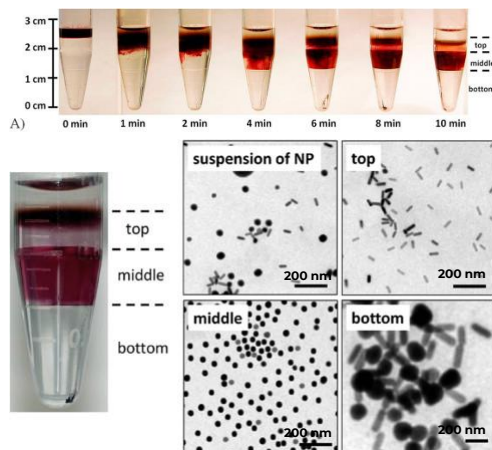
$$f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$



## Sűrűséggradiens centrifugálás– II.

### Sebesség-zonális (Rate Zonal) centrifugálás

- Sűrűséggradienst hozunk létre centrifugacsőben (közegek: cukrok, polimerek, CsCl)
- Rárétegezzük a mintát (max. 10%)
- A részecskék az ultracentrifugálás során különböző sebességgel fognak ülepedni a **tömegük** (azonos sűrűség esetén) és **alakjuk** szerint.
- Sávok = azonos tömegű (méretű) részecskefrakciók
- Mivel  $\rho > \rho_0$ , minden részecske leülepedik a cső aljára, ha túl hosszan centrifugálunk
- Példák: fehérjék, sejtalkotók, nanorészecskék szeparálása



Gold nanoparticles separated by centrifugation in an aqueous three-phase system

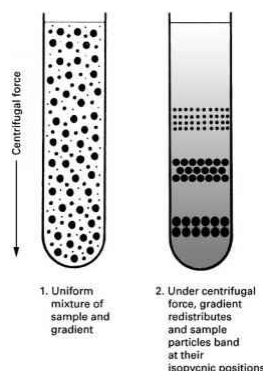
© Akbulut, et al. *Nano Letters* 2012 12 (8), 4060–4064

## Sűrűséggradiens centrifugálás– III.

### Izopiknikus centrifugálás

- Izopiknikus = azonos sűrűségű
- A gradiensformáló közeg és a minta homogén keverékét helyezzük a centrifugacsőbe
- A sűrűséggradiens a centrifugálás során alakul ki
- A részecskék ülepednek vagy felúsznak míg el nem érik a **sűrűségüknek** megfelelő réteget.
- Sávok = azonos sűrűségű részecskefrakciók
- Az egyensúly kialakulása után megtartják a pozíciójukat
- Példák: nukleinsavak szétválasztása CsCl-ban

$$f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$

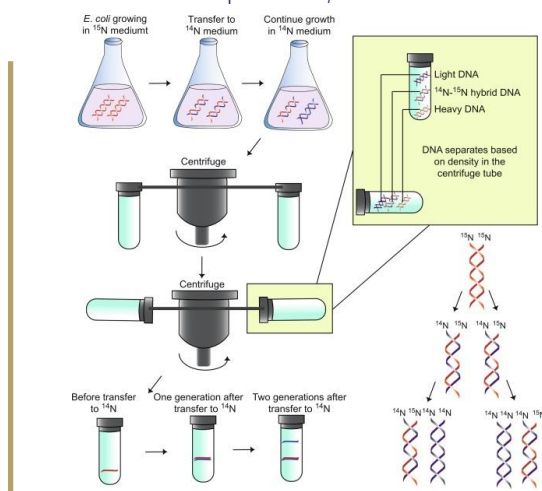


# Sűrűséggradiens centrifugálás– IV.

Meselson-Stahl experiment, 1958

## Izopiknikus centrifugálás

- Izopiknikus = azonos sűrűségű
- A gradiensformáló közeg és a minta homogén keverékét helyezzük a centrifugacsőbe
- A sűrűséggradiens a centrifugálás során alakul ki
- A részecskék ülepednek vagy felúsznak míg el nem érik a **sűrűségüknek** megfelelő réteget.
- Sávok = azonos sűrűségű részecskefrakciók
- Az egyensúly kialakulása után megtartják a pozíciójukat
- Példák: nukleinsavak szétválasztása CsCl-ban

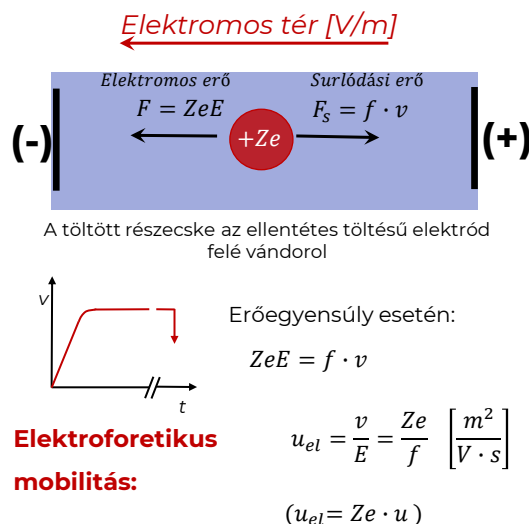


Chang-Hui Shen, Nucleic Acid-Based Cellular Activities, in: Diagnostic Molecular Biology, Academic Press, 2019.

# Elektroforetikus módszerek

## Az elektroforézis alapjai

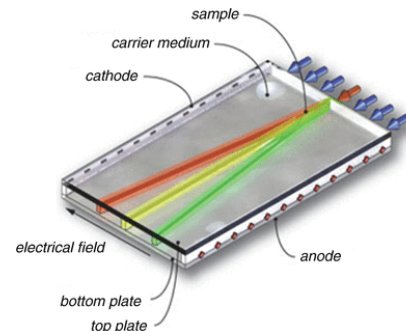
- **Elektroforézis:** vándorlás elektromos tér hatására
- Biológiai molekulák – általában töltöttek fiziológias körülmények között
- Töltött részecske elektromos térben vándorol.
- Ha a töltéseloszlás aszimmetrikus a részecske orientálódik a térben
- A vándorlás gyorsuló sebességgel történik, amíg  $F$  és  $F_s$  ki nem egyenlítődik – de nem egyensúlyi módszer
- A környezet töltései körbeveszik a részecskét + retardáció
- Részecskék elválása: **eltérő mobilitásuk** szerint.
- Analitikai és preparatív módszer is lehet.



## Elektroforetikus módszerek – II.

### Szabad elektroforézis

- Állófázismentes elválasztási technika
- Folyadékcélában– lamináris áramlás
- Különböző összetételű (pH; ionerősség, stb.) folyadékrétegek alakíthatók ki (lehet natív és denaturáló pl.)
- Áramlásra merőleges elektromos tér (nagy U)
- A részecskék a **töltéssűrűségük** és/vagy **izoelektromos pontjuk** szerint szeparálódnak
- Elválasztási tartomány széles: ionoktól sejtekig
- Alkalmazás: fehérjekomplexek, membránfehérjék, antitest-izozformák, sejtek és sejtalkotók elválasztása...

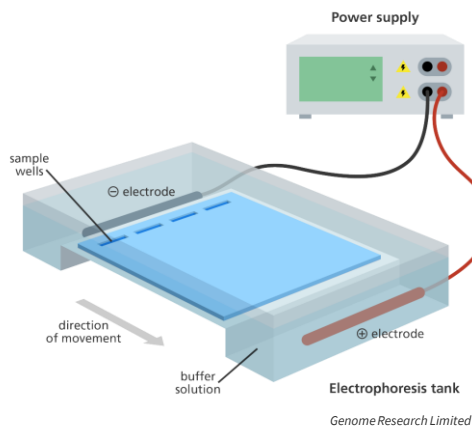


Kwon JS., Bowser M.T. (2016) Encyclopedia of Nanotechnology. Springer, Dordrecht

## Elektroforetikus módszerek – III.

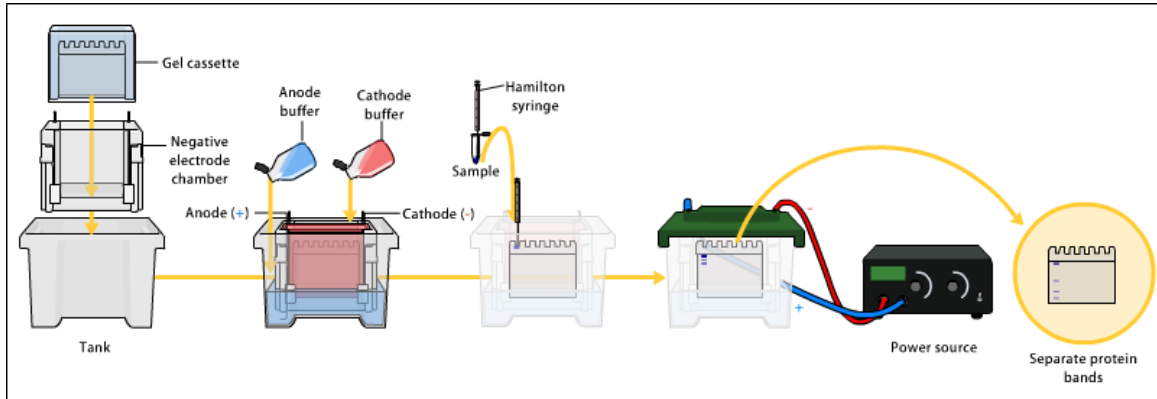
### Gélelektroforézis

- Elválasztás állófázison (gél mátrix) történik
- A gél fizikai barrier → lassítja a részecskék mozgását
- Kicsiny mintatérfogatok alkalmazhatók
- Nagy reprodukálhatóság
- Nagyfeszültség kelt elektromos teret
- A részecskék a **méretük** és **töltésük** szerinti sebességgel vándorolnak és válnak el
- A szétvált frakciók sávokat képeznek – fixálhatók, festhetők, akár kinyerhetők további eljárásokhoz.
- Alkalmazás: makromolekulák (DNS, RNS, fehérjék) és fragmentumaik elválasztása
- Főként analitikai módszer, de preparatív célokra is.



# Elektroforetikus módszerek – IV.

## Gélelektroforézis folyamata



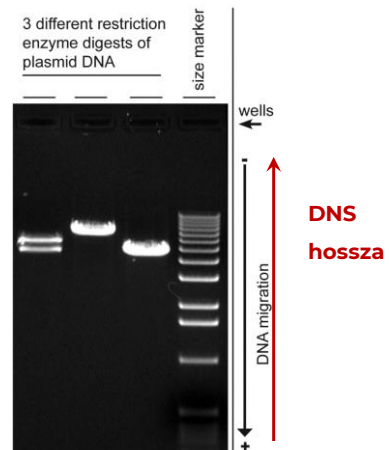
Kwon JS., Bowser M.T. (2016) Encyclopedia of Nanotechnology. Springer, Dordrecht

# Elektroforetikus módszerek – V.

## Gélelektroforézis - gélek

### Agaróz (0,5-3%)

- Természetes, algákból kivont poliszacharid
- Heterogén pórusméretű gél képez
- Könnyen kezelhető, nem toxikus
- Elsősorban **nukleinsavak** (>50bp), illetve >200 kDa tömegű fehérjék elválasztására



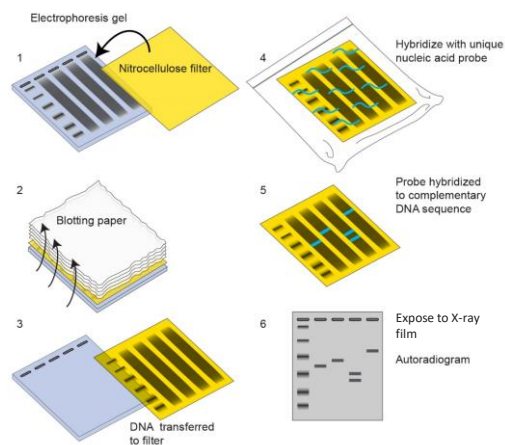
Digital image of 3 plasmid restriction digests run on a 1% w/v agarose gel, 3 volt/cm, stained with ethidium bromide. The DNA size marker is a commercial 1 kbp ladder..

## Elektroforetikus módszerek – VI.

### Gélelektroforézis - gélek

#### Agaróz (0,5-3%)

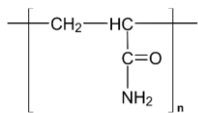
- Természetes, algákból kivont poliszacharid
- Heterogén pórusméretű gél képez
- Könnyen kezelhető, nem toxikus
- Elsősorban **nukleinsavak** (>50bp), illetve >200 kDa tömegű fehérjék elválasztására
- **Southern blot:** elektroforetizált DNS fragmentumok átítatása cellulóz-acetát lemezre  
→ hibridizáltatás DNS próbákkal → azonosítás radioaktivitás alapján



Southern blotting technique (Image source: National Human Genome Research Institute)

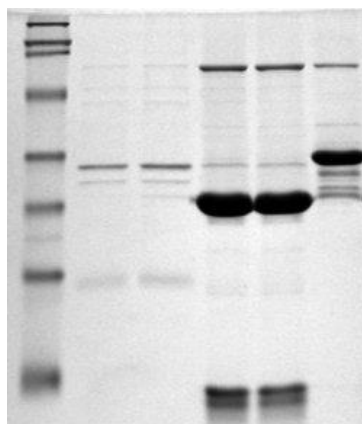
## Elektroforetikus módszerek – VII.

### Gélelektroforézis - gélek



#### Poliakrilamid

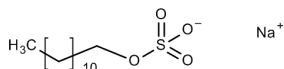
- Akrilamid és bisz akrilamid polimerizációjával
- Kovalens kötással térhálósított gél
- Egyenletes pórusméret - a monomerkoncentrációval szabályozható
- Akrilamid neurotoxikus
- A **poliakrilamid gélelektroforézis** (PAGE) hatékony, rutin módszer **fehérjék** elválasztására (5- 2000 kDa-ig)
- A fehérjék nitrocellulóz vagy PVDF membránra blotolhatók, jelölhetők → **Western blot**



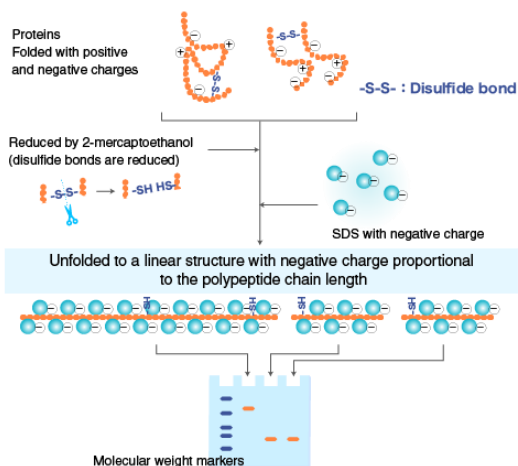
SDS PAGE of proteins (ladder at left side)

# Elektroforetikus módszerek – VIII.

## SDS-PAGE



- PAGE denaturáló közegben
- **Nátrium-dodecil-szulfát (SDS)**: Erős, ionos detergens → kiteríti a fehérjeláncot, nem ionos kötések felszakadnak, micellát képez körülötte → erős (kb. -1 töltés/aminosav) negatív töltést ad neki
- **Merkaptoetanol**: diszulfidhidakat redukálja
- Alkalmazás: fehérjék molekulasúlyuk szerinti szétválasztása, molekulasúly meghatározása

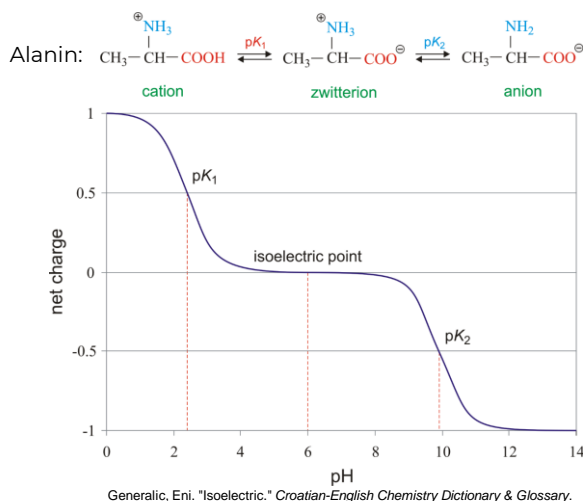


<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html>

# Elektroforetikus módszerek – IX.

## Izoelektromos fókuszálás

- Számos makromolekula bír mind savas, mind bázikus csoportokkal → az össztöltés a pH függvénye lesz
- **Izoelektromos pont**: az a pH, ahol a molekula nettó töltése 0

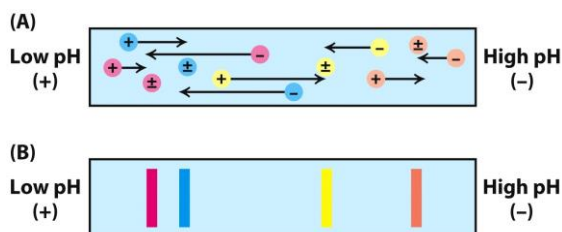




# Elektroforetikus módszerek – X.

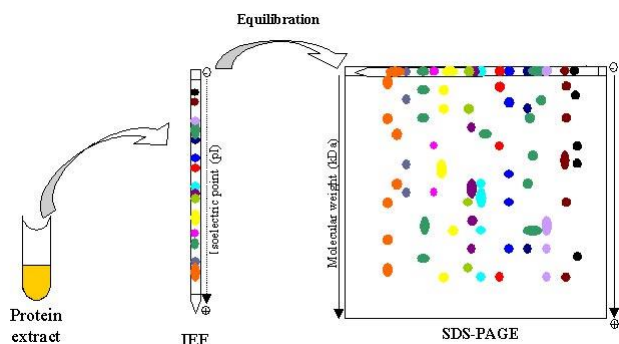
## Izoelektromos fókuszálás

- Az elektrofozézist pH-gradienst tartalmazó közegben végezzük → a molekulák addig vándorolnak az elektromos térben, amíg el nem érik az izoelektromos pontjukat
- Itt egyensúly alakul ki a diffúzió és az elektroforézis között
- Szétválasztás alapja: izoelektromos pont
- Nagy érzékenység – akár 0,01 pI különbség!
- Analitikai és preparatív célokra egyaránt alkalmas
- Főként fehérje-analitika

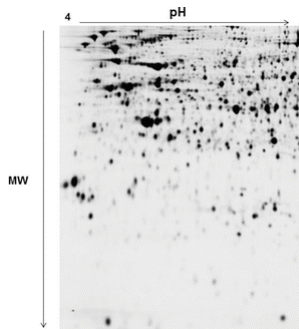


# Elektroforetikus módszerek – XI.

## Kétdimenziós elektroforézis



<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/two-dimensional-gel-electrophoresis-2-de/>



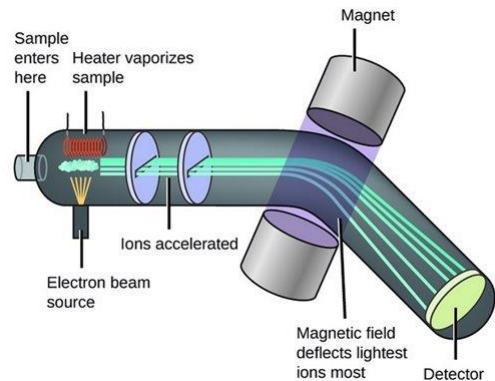
Meleady P. (2018) Difference Gel Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, vol 1664.

# Tömegspektrometria (MS)

## Alapok dióhéjban

- Gázfázisú ionok tömegének meghatározására
- Pikomol-attomol mintamennyiségekből
- Tömegspektrométer fő részei:
  - Ionforrás:** gázfázisba viszi a molekulákat és ionizálja (eg.: EI, ESI; MALDI)
  - Analizátor:** gyorsítja az ionokat és elválasztja  $m/z$  arányuk alapján elektromos vagy mágneses teret használva
  - Detektor**
- Más analitikai módszerekkel csatolható (LC-MS; GC-MS)

Egy példa:

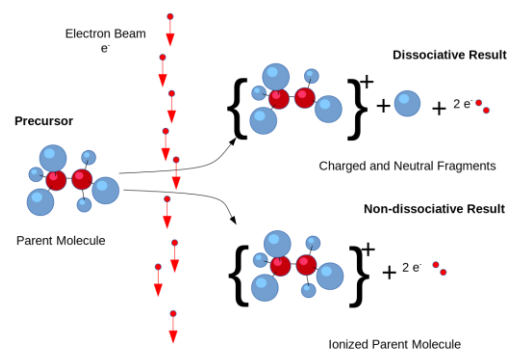


<https://www.bronkhorst.com/int/blog-1/mass-spectrometry-and-mass-flow-control-a-closer-look-at-ion-them/>

## MS – Ionforrások I.

### Elektron ionizáció (EI)

- Gázfázisú mintát bombáznak elektronokkal
- „Kemény ionizáció”: nagy elektronenergiák → erős fragmentáció
- Leginkább szerves, kis tömegű (MW < 600) molekulákra
- Molekulaion képződése:
 
$$M + e^- \rightarrow M^{+ \cdot} + 2e^-$$
- Előnyök:** egyszerű, érzékeny, fragmensek → molekulaazonosítás, kereshető „űjlenyomat-spektrumok”
- Hátrányok:** illékony és hőstabil molekulát kíván, túlzott fragmentáció, tömeghatár: MW < 1000
- Gyakran csatolják gázkromatográfiával (GC-MS)

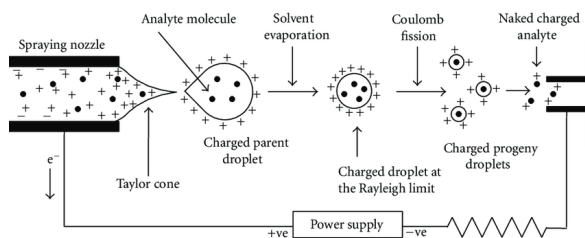


By Evan Mason - Own work, CC BY-SA 4.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=37928204>

## MS– Ionforrások II.

### Elektrospray ionizáció (ESI)

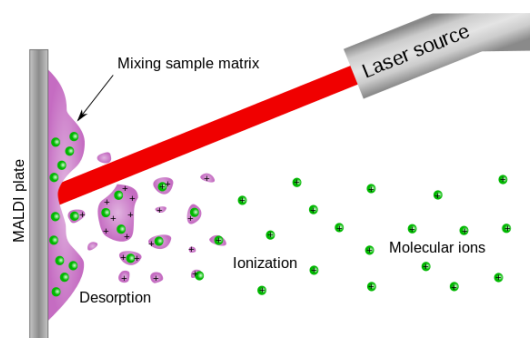
- Analizálandó minta folyadékfázisban oldva
- Aeroszolképzés
- Nagyfeszültség → folyadékfázis feltöltése
- „Lágy ionizáció” → csekély fragmentáció → főként molekulaionok (fehérjeanalitika)
- **Előnyök:** pontos, gyors, széles tömegtartomány, csekély fragmentáció
- **Hátrányok:** nem szolgál szerkezeti információval (kevés fragment)
- Folyadékkromatográfiával csatolható (LC-MS)



## MS– Ionforrások III.

### Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

- A mintát energiaelnyelő mátrixhoz keverik
- Lézerimpulzus → abláció, deszorpció és mátrix-ionizáció
- A minta molekuláit a mátrix molekulák gázfázisban ionizálják (pl. proton/ion addíció) → kvázi-molekulaionok
- **Előnyök:** pontos, gyors, széles tömegspektrum, lágy ionizáció, nem-illékony mintákra is, szub-pM érzékenység
- **Hátrányok:** költséges
- Általában time-of-flight (TOF) detektálás



# MS – Tömeganalizátorok

## Szétválás mágneses térben

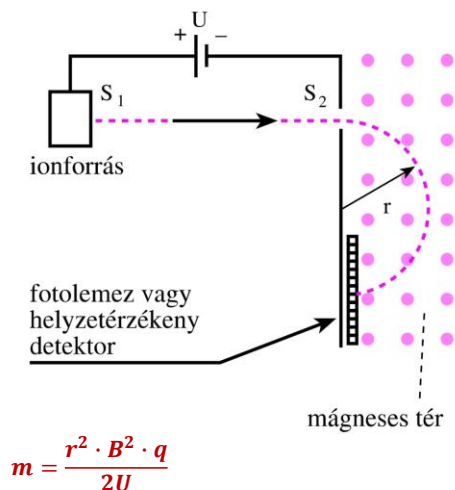
- Elektromos tér ( $U$  gyorsítófeszültség) gyorsítja a  $q$  töltéssel bíró iont, ami nek kinetikus energiája így:

$$E_{kinetikus} = Uq = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$

- A felgyorsított ionok mágneses térbe (indukció:  $B$ ) lépnek, melynek indukcióvonalai merőlegesek a sebességük ( $v$ ) irányára. A Lorentz erő körpályára kényszeríti őket.

$$F_{centripetális} = \frac{m \cdot v^2}{r} = q \cdot v \cdot B$$

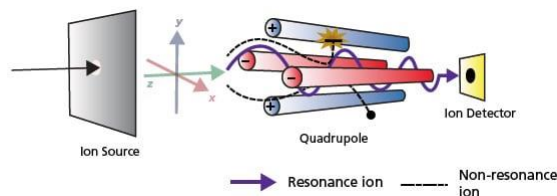
- A pálya sugara ( $r$ ) kikövetkeztethető a részecske becsapódási helyéből a detektoron. A tömeg:



# MS – Tömeganalizátorok II.

## Kvadropól tömeganalizátor

- 4 párhuzamos fémrúd – szemben páronként azonos potenciál
- Változó elektromos tér  $\rightarrow$  4 pólus
- Ionok a 4 rúd közti térben utaznak
- Csak a megfelelő  $m/z$  arányúak érik el a detektort egy adott feszültségnél.
- A többi ion a rudaknak ütközik.
- Feszültség változtatásával széles  $m/z$  skála pásztázható végig.



# MS – Tömeganalizátorok III.

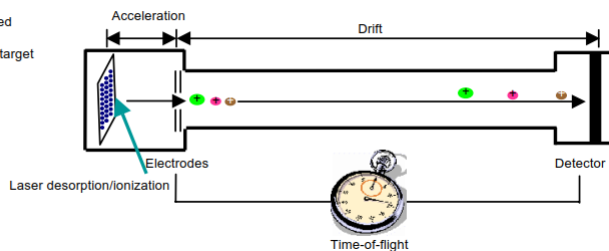
## Reülési idő (Time-of-flight, TOF) tömeganalizátorok

- $m/z$  arány az ion beérkezési idejéből származtatható

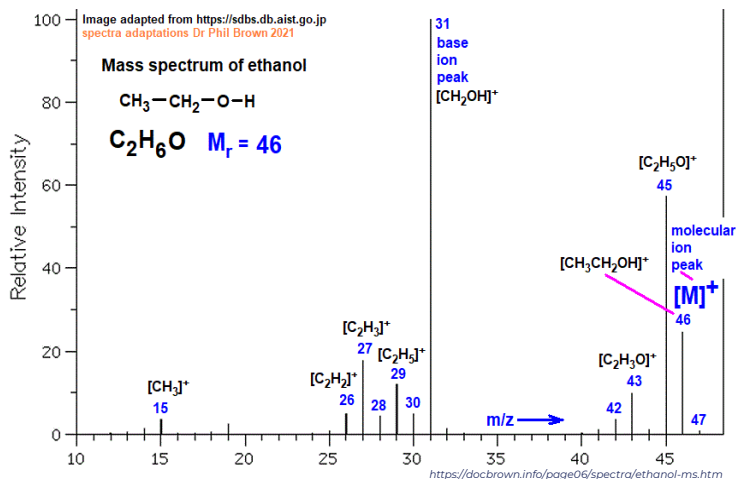
$$E = qU = \frac{1}{2}mv^2$$

### A. Measurement

- Matrix-embedded analyte on microtiter plate target



## Tömegspektrum



- Intenzitás vs.  $m/z$  hisztogram
- $m/z$ : tömeg/töltés arány
- $z$  töltésszám  $q$  (töltés) helyett
- Molekulaion csúcs + fragmentumok
- Izotópcszúcsok → nuklidösszetétel
- Spektrum analízis → mintaösszetétel



# Köszönöm a figyelmet!

Dr. Bozó Tamás

