

SZEDIMENTÁCIÓS ÉS ELEKTROFORETIKUS MÓDSZEREK

A biokémiai kutatás fontos eszköze a centrifuga, ami a minta gyors forgatásával nagy centrifugális erőket ró az oldatban szuszpendált részecskékre vagy molekulákra, és részecsketömeg szerint szétválasztja őket. El lehet például választani a vörösvérsejteket a plazmától, a sejtmagot a mitokondriumoktól sejt-homogenizátumokban, és el lehet különíteni két különböző fehérjét egymástól.

Biológiai makromolekulákat szét lehet választani az elektromos töltésük alapján is. Az aminosavak és fehérjék nettó pozitív vagy negatív töltéssel rendelkezhetnek az őket tartalmazó oldat savasságától függően. Elektromos térben ezek a töltött molekulák a méretüktől és töltésüktől függően különböző sebességgel mozognak a pozitív vagy negatív töltésű pólusok felé, ami lehetővé teszi az elektromos térrel történő szétválasztásukat.

A szedimentációs sebesség módszer

A szedimentációs sebesség módszer egy analitikai ultracentrifugálási módszer, amely azt méri, hogy a részecskék mekkora sebességgel mozognak egy ultracentrifugában létrehozott centrifugális erő hatására. Az ultracentrifuga egy olyan centrifuga ami egy rotor nagyon gyors forgatására van optimalizálva, és akár 1.000.000 g gyorsulást is létre tud hozni ($g = 9,8 \text{ m/s}^2$). Az analitikai ultracentrifugát Theodor Svedberg találta fel 1923-ban, aki a kolloidokról és fehérjékről ultracentrifuga segítségével kapott kutatási eredményeiért 1926-ban elnyerte a kémiai Nobel-díjat.

Tekintsünk egy testet amely állandó sebességgel süllyed egy folyadékban. A testre ható erők: súlyerő ($F_G = m \cdot g$), közegellenállás ($F_D = f \cdot v$), és a felhajtó erő ($F_B = \frac{m}{\rho_{\text{test}}} \cdot \rho_{\text{folyadék}} \cdot g$), ahol m a test tömege, v a test sebessége, g a gravitációs gyorsulás, f az alakfaktor, ρ a folyadék sűrűsége. Ha a test állandó sebességgel halad, a rá ható erők eredője zérus:

$$F_G = F_D + F_B ;$$

$$f \cdot v = m \cdot g \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{test}}}\right).$$

Az ultracentrifugában sokkal nagyobb gyorsulásokat tudunk előállítani, mint a $g = 9,8 \text{ m/s}^2$ gravitációs gyorsulás a Föld felszínén. A forgó rotorban a minta által érzékelt gyorsulás:

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

Ennek alapján az erők egyensúlyára vonatkozó képlet a következőképpen módosul a centrifugában lévő részecskére:

$$f \cdot v = m \cdot a \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{test}}}\right).$$

A részecske mozgási sebessége arányos a gyorsulással. Más szavakkal, a $\frac{v}{a}$ arány állandó.

$$\frac{v}{a} = \frac{m}{f} \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{test}}}\right) = S.$$

Az S mennyiség a szedimentációs állandó. A szedimentációs állandó nem-SI mértékegysége:

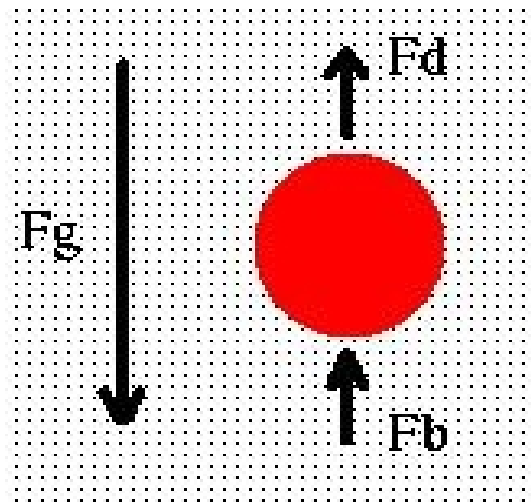
$$[S] = Sv \text{ (Svedberg)} = 10^{-13} \text{ s}.$$

Vegyük a következőkben figyelembe, hogy egy egyszerű összefüggés van az alaki faktor (f) és a diffúziós állandó (D) között:

$$f = \frac{k \cdot T}{D};$$

ahol k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet.

Ha a szedimentációs kísérletet diffúzió méréssel kombináljuk és mind S -t mind D -t kísérletileg meghatározzuk, a test tömegét ki lehet számítani.



A szedimentációs egyensúlyi módszer

A szedimentációs egyensúlyi módszer egy analitikai ultracentrifugálási módszer ami lehetővé teszi hogy meghatározzuk oldatbeli részecskék molekulatömegét. Ezzel a módszerrel meg kell várni, amíg az ülepedés és a véletlen hőmozgás között beáll az egyensúly. Termikus egyensúlyban a részecskék centrifugabeli eloszlását a Boltzmann törvény írja le.

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{-\frac{E_1 - E_2}{k \cdot T}};$$

ahol n_1 és n_2 a részecskék koncentrációja r_1 illetve r_2 távolságban a forgástengelytől, az $E_1 - E_2$ mennyiség pedig a centrifugális erő által végzett munka amikor a részecske r_1 távolságból r_2 távolságba mozdul. Tudva, hogy:

$$E_1 - E_2 = \frac{m}{2} \cdot (r_1^2 - r_2^2) \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{test}}}\right);$$

a következő összefüggést kapjuk:

$$\ln\left(\frac{n_1}{n_2}\right) = \frac{m}{2 \cdot k \cdot T} \cdot (r_1^2 - r_2^2) \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{test}}}\right).$$

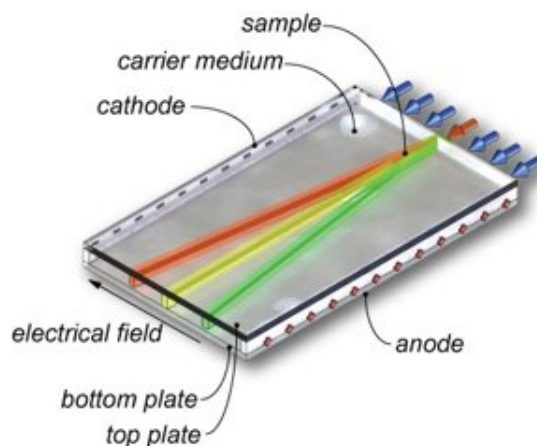
A fenti képlet lehetővé teszi a test tömegének meghatározását anélkül, hogy meg kéne mérni a diffúziós állandót. A módszer további előnye, hogy az eredmények nem függenek az alakfaktortól, mert a mérést egyensúlyban végezzük.

Szabad áramlású elektroforézis

Az elektroforézis olyan technikákat jelent, amelyeknél elektromosan töltött részecskéket elektromos térrel mozgatva választunk szét.

A szabad áramlású elektroforézis egy folyamatosan működő elektroforézis eljárás, amely álló fázis (szilárd hordozóanyag, például gél) nélkül dolgozik. Ha a töltött részecske állandó sebességgel mozog az elektromos térben, a mozgás sebessége (v) arányos az elektromos tér erősséggel (E), ha a térerősség nem túl nagy. Ennek alapján bevezethetjük a részecske μ_e elektroforetikus mobilitását amely a mozgási sebesség és a térerősség közötti arányossági tényező:

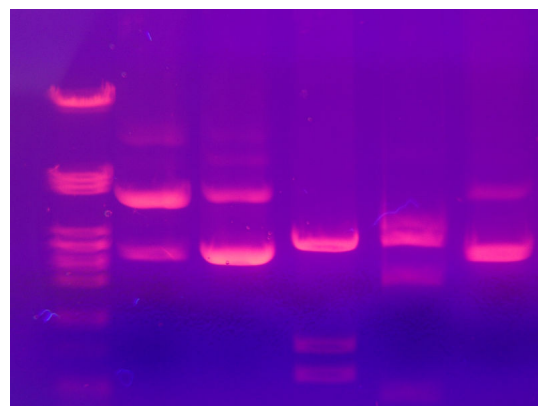
$$\mu_e = \frac{v}{E}.$$



Gél elektroforézis

A gél elektroforézis egy olyan technika amelynek segítségével DNS, RNS vagy fehérje molekulákat választanak szét egymástól oly módon, hogy elektromos feszültséget adnak egy gél mátrixra. Általában analitikai célokra használják, de preparatív módszerként is alkalmazható. A gél egy szilárd, de mégis porózus mátrix.

A módszer részeként a szétválasztandó molekulákat tartalmazó mintát a gélben kialakított zsebekbe tesszük, és elektromos teret kapcsolunk a gélre. A különböző molekulák a tömegüktől és töltésüktől függően különböző sebességgel fognak a gél mátrixban mozogni. Az elektroforézis befejezte után a gélben lévő molekulák festéssel tehetőek láthatóvá.



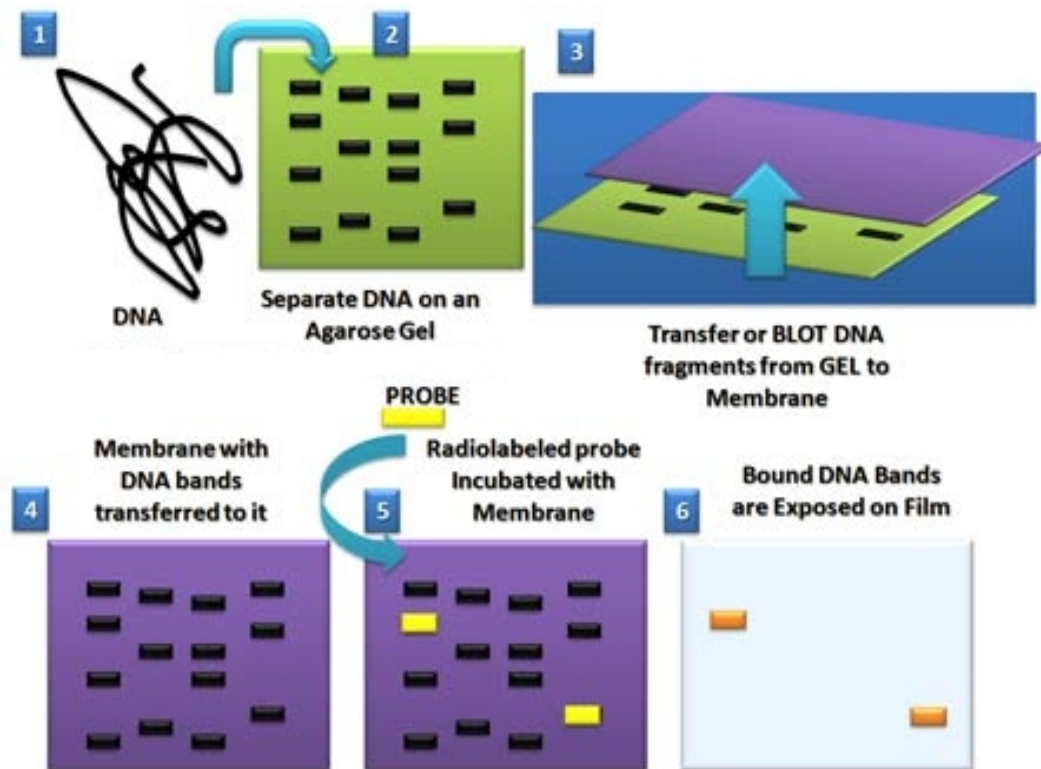
Izoelektromos fókuszálás

Az izoelektromos fókuszálás egy olyan technika, amely a különböző molekulákat az izoelektromos pontjuk alapján választja szét. A technika olyan gélt használ, amelyben a pH helyfüggő a gél

belsejében, ami által a gélben haladó molekula töltése változik a környezet pH-jának függvényében. A negatív töltésű molekulák a pH-gradiensben pozitív elektród felé vándorolnak, miközben a pozitív töltésű molekulák a negatív elektród felé mozognak. Amint egy részecske az ellentétes töltésű pólus felé mozog, addig halad a változó pH-jú közegben, amíg el nem éri azt a pH-értéket, amelyenél a molekula össztöltése nulla (izoelektromos pont). Ezen a ponton a molekulának nincs nettó töltése, a rá ható elektromos erő nulla, a molekula nem vándorol tovább. A folyamat eredményeként a fehérjék éles mozdulatlan sávokba fókuszálódnak a gél azon pontján ahol a pH épp megegyezik a fehérje izoelektromos pontjával. A technika rendkívül nagy felbontású, képes két fehérjét amely egyetlen elemi töltésben különbözik két különböző sávba fókuszálni.

Southern blot

A Southern blot egy olyan módszer, amelyet rutinszerűen használnak a molekuláris biológiában, konkrét DNS-szekvenciák kimutatására DNS-mintákban. Southern blot gél elektroforézist használ DNS méret szerinti elválasztására, majd a méret szerint szétválasztott DNS-t egy membrán szűrőre viszi át, ahol hibridizációs jelöléssel lehet a keresett szekvenciát kimutatni. A módszert a feltalálójáról, Edwin Southern brit biológusról nevezték el.



A western blot és a northern blot a Southern blothoz hasonló módon használhatók fehérje és RNS szekvenciák kimutatására. Ezek a technikák a nevüket Edwin Southern nevének játékos kiforgatásával nyerték.