

## Szedimentációs és elektroforetikus módszerek

Schay G.

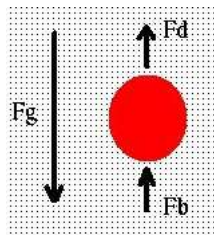
### Szedimentációs módszerek fizikai alapjai

Cél: hogyan lehet picike részecskék tömegét meghatározni?

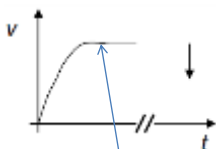
(jóval az AFM és Rtg kora előttről származó, de ma is jó megoldás)

Tegyük a részecskét egy oldatba, és nézzük meg mi lesz:

Ha a sűrűsége  
nagyobb mint az  
oldószeré, akkor le  
fog süllyedni: ez a  
szedimentáció



$F_g$  : gravitációs erő,  $F_d$ : súrlódási erő,  $F_b$ : felhajtóerő.



A részecske addig gyorsul, amíg az  
erő-egyensúly be nem áll.

(és amíg el nem éri az edény alját)

Itt lesz erő-egyensúly

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

és  

$$\frac{\Delta v}{\Delta t} = a$$

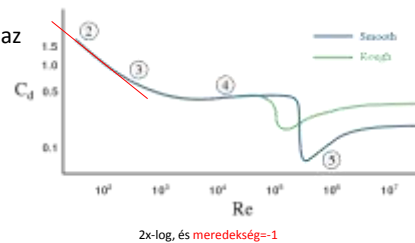
A súrlódási erő:

Általánosan:  $F_d = \frac{1}{2} \rho v^2 \cdot C_d \cdot A$ , ahol A a keresztmetszet és  $C_d$  súrlódási együttható.

Alacsony sebességnél  $C_d \sim 1/Re$ , azaz  $F_d$  egyenesen arányos a sebességgel.

$$Re = \frac{v \cdot L}{\eta/\rho} = \frac{v \cdot L \cdot \rho}{\eta}$$

Itt L a karakterisztikus hossz, ami pl egy gömb-alakú részecske, vagy egy cső esetében az átmérő.

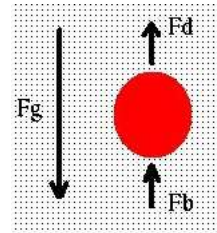


$F_g$ : gravitációs erő,  $F_d$ : súrlódási erő,  $F_b$ : felhajtóerő.

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

és

$$\frac{\Delta v}{\Delta t} = a$$



$$F_g = m \cdot g$$

$$F_d = f \cdot v, \text{ ahol } f \text{ tartalmazza } C_d\text{-t.}$$

$$\text{Archimedes törvényéből pedig } F_b = \rho_{\text{folyadék}} \cdot V_{\text{részecske}}, \text{ de } V_{\text{részecske}} = m/\rho_{\text{részecske}}$$

Az erőegyensúly ebből adódik:

$$\Sigma F = 0, \text{ azaz } F_g - F_b = F_d, \text{ tehát}$$

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

Egy baj van:

Ha a részecskék tényleg kicsik, akkor a hőmozgás elrontja a kísérletet.

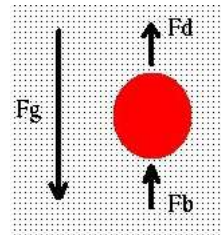
Szedimentáció vagy egyáltalán nem, vagy csak nagyon lassan következik be.

**Megoldás: centrifúga!**



Tegyük a részecskét egy oldatba, és centrifugáljuk:

**F<sub>g</sub> : gravitációs erő**, F<sub>d</sub>: súrlódási erő, F<sub>b</sub>: felhajtóerő.



$g = 9.8 \text{ m/s}^2$  helyett a centrifugában  
 $a = \omega^2$  gyorsulást érzékel a részecske. ( $\omega$  a szögsebesség)

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



$$f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{részecske}}}\right)$$

Ez átrendezhető:

$$S \equiv \frac{v}{r \cdot \omega^2} = \frac{m}{f} \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{részecske}}}\right)$$

Ahol S a szedimentációs állandó. Egysége a Svedberg,  $1\text{Sv} = 10^{-13} \text{ s}$

(Theodor Svedberg , Nobel díj 1926)

A tömeg és a sűrűség egyaránt számít! A nagyobb részecskék gyorsabban ülepednek

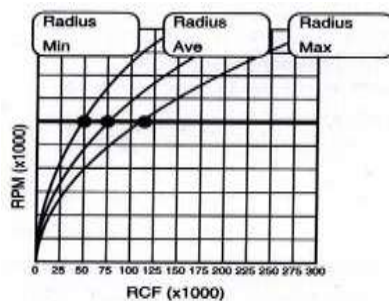


Hasznos egyenletek

$\omega = 2\pi \left(\frac{\text{rpm}}{60}\right)$ , rpm=revolutions per minute=  
percenkénti fordulatszám

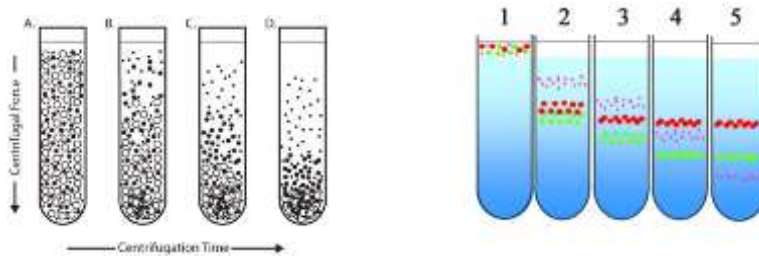
RCF: relative centrifugal field = relatív centrifugális erő

$\text{RCF} = a = r\omega^2 = 4\pi^2 \text{ rpm}^2 / 3600$

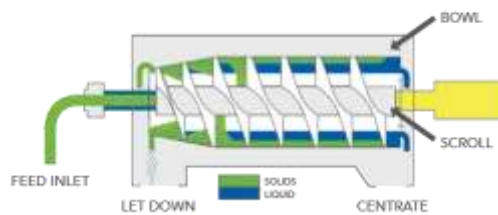
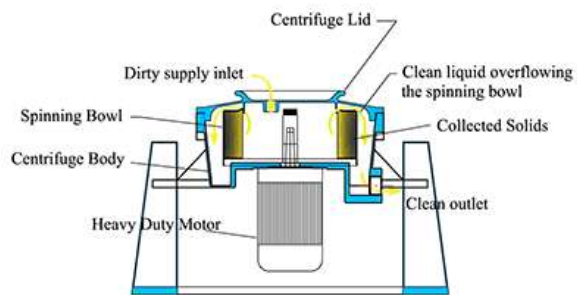


A centrifugacsőben haladva a sugár kicsit változik, ezzel az RCF is.

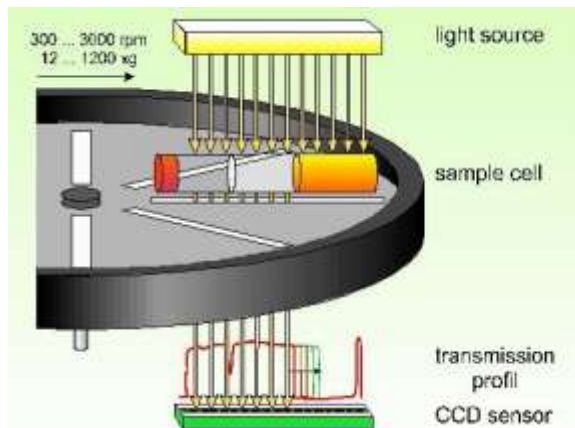
Mivel a sebességek eltérőek, így az egyes részecskék el is válnak  
A centrifugálás során.



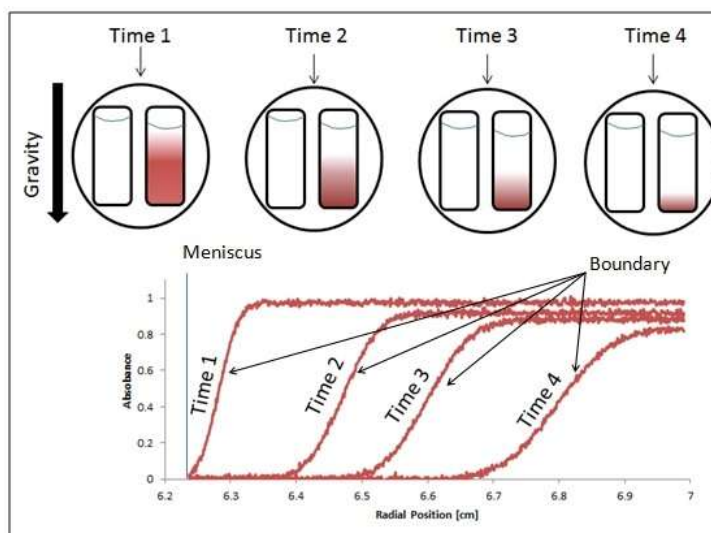
### centrifugális szeparátor



Az elválasztást detektorral lehet követni. Sokszor egy egyszerű abszorbancia is elegendő



A határréteg folyamatosan mozog amíg el nem éri az edény alját

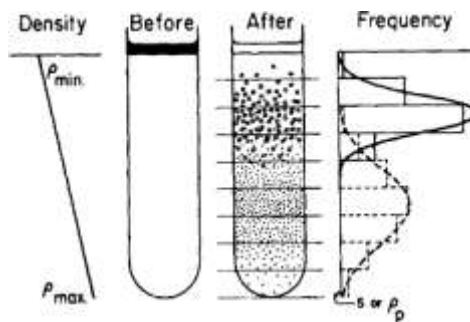


Csak az  $f$  alaki tényezőt nem ismerjük.

Csak hogy ez a diffúzióban is benne van:

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

Tehát ahhoz, hogy a részecske méretét meg tudjuk mondani, meg kell mérni a diffúziós állandót is.



#### 1. Differential sedimentation

Gradient: *Shallow stabilizing,  $\rho_{max} < \rho_{p min}$*

Centrifugation: *— Incomplete sedimentation*

Abscissa of frequency distribution: *Sedimentation coefficient*

#### 2. Density equilibration

Gradient: *Steep,  $\rho_{max} > \rho_{p max}$*

Centrifugation: *Prolonged, high speed*

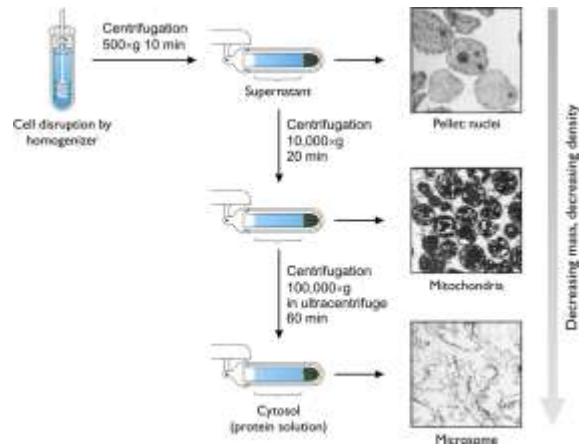
Abscissa of frequency distribution: *Equilibrium density*

Használhatunk sűrűség-gradienst is az oldószerben. Ekkor a részecskék a saját sűrűségüknek megfelelő rétegben megállnak.

Ezt preparatív, elválasztástechnikai célra lehet használni.



### Differenciáló centrifugálás



Ez is egy preparatív módszer, méret szerint választunk el, minden lépésben a felülúszót centrifugáljuk újra.

### Egyensúlyi szedimentációs módszer

Addig várunk, amíg beáll az egyensúly a centrifugálás során.

Ekkor viszont a nettó sebesség 0, tehát a súrlódási erő is 0.

Termikus egyensúlyban felírható a Boltzmann-eloszlás:

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

Az energia-tagban a középponttól mért

$r_1$  és  $r_2$  távolságok között végzett munkát kell venni:

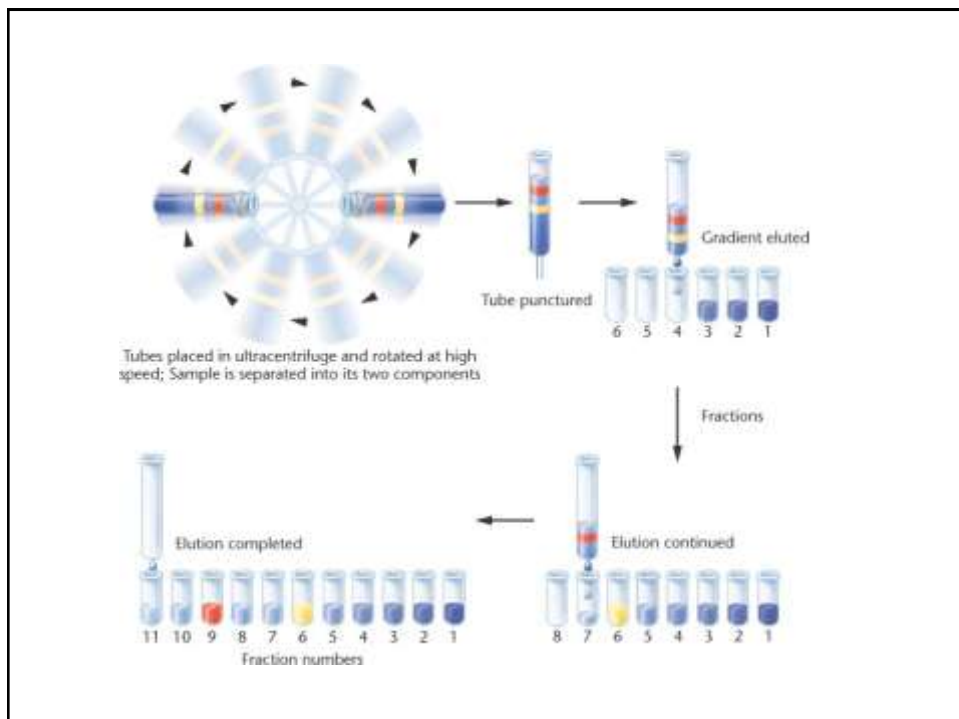
$$\Delta E = \frac{m}{2} (r_1^2 - r_2^2) \omega^2 \left( 1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{részecske}}} \right)$$

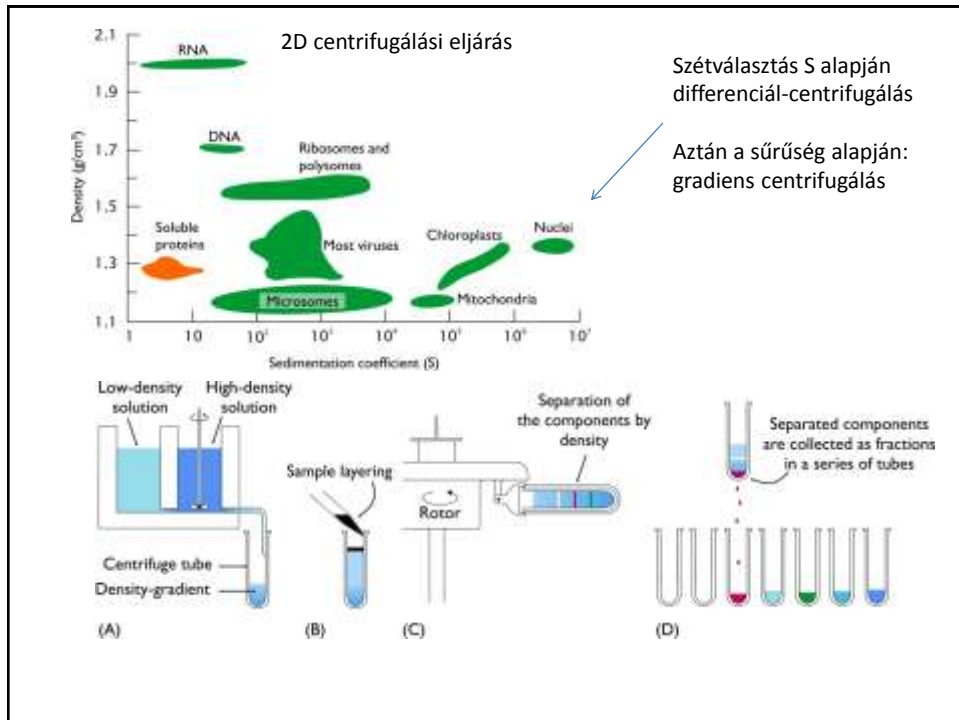
Behelyettesítve a Boltzmann formulába, és ln-t véve:

$$\ln\left(\frac{n_1}{n_2}\right) = \frac{m}{2kT}(r_1^2 - r_2^2)\omega^2\left(1 - \frac{\rho_{\text{folyadék}}}{\rho_{\text{részecske}}}\right)$$

Mivel a koncentrációkból ( $n_1, n_2$ ) számolható, továbbá a sűrűség és a sugár meghatározható, így a tömeg az egyenletből megkapható.

Vagyis ehhez a módszerhez nem kell diffúziót mérni.





## Electroforetikus eljárások

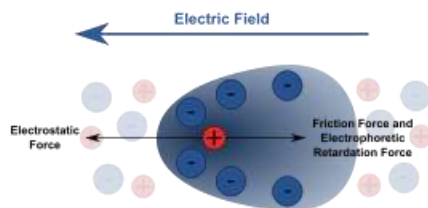
$$\mu_e = \frac{v}{E}$$

Az elektroforetikus mobilitást a sebesség, és az azt létrehozó elektromos tér határozza meg.

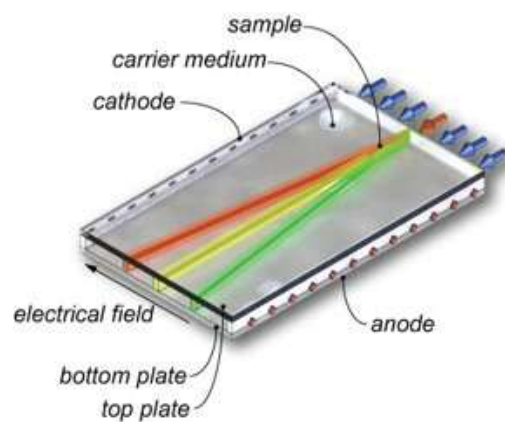
Semleges oldószerben

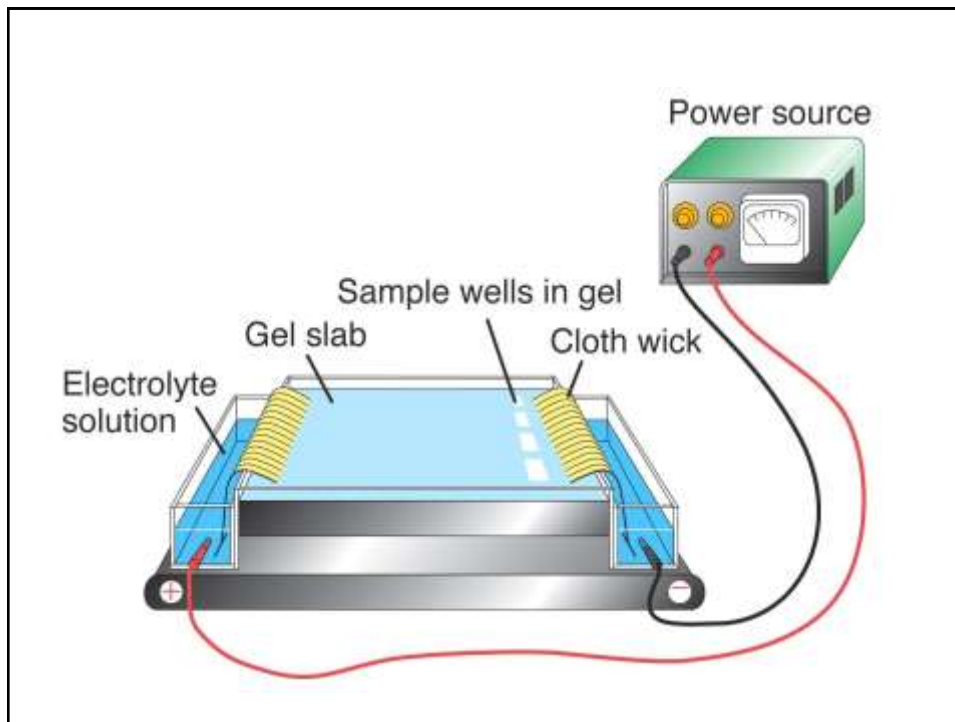


Poláris oldószerben van egy plusz visszatartó erő



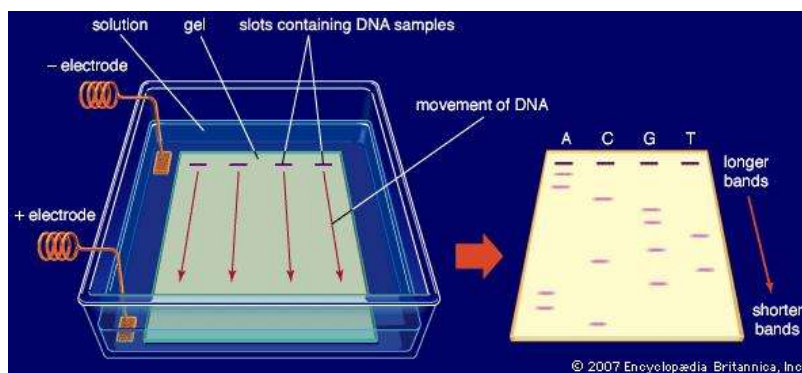
(szabad) áramlásos elektroforézis



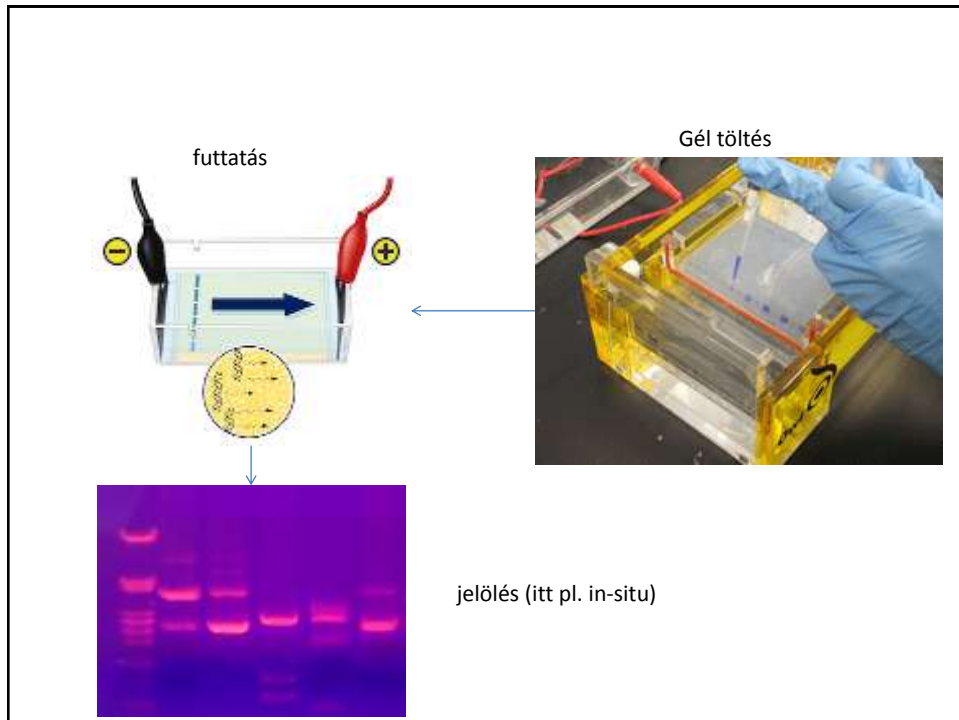


### Gél elektroforézis

Ez a **kromatográfiás eljárások** családjába tartozik



Kromatográfia: kölcsönhatás az álló mátrix, és a mozgó oldat között, ami elválasztást eredményez.

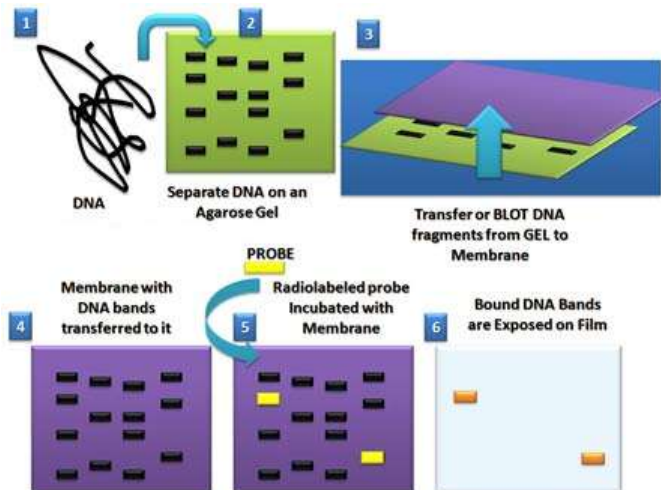


Gélben jelölni nem könnyű.

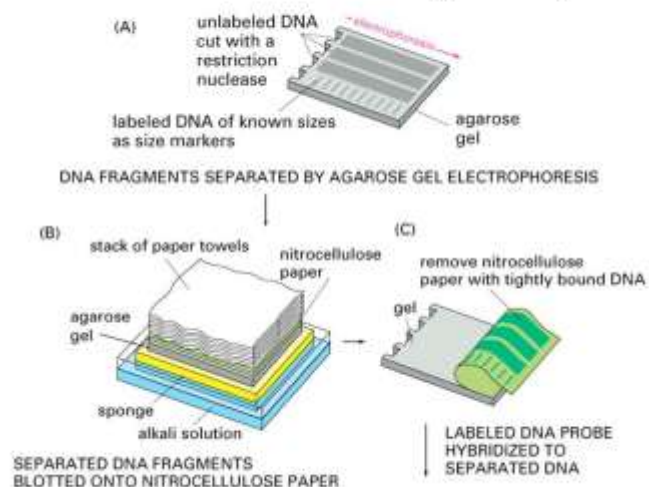
„Blottolás” : átvisszük (és fixáljuk) a gélben kialakult mintázatot egy stabil hordozó membránra. Ebben a mintázat már nem változik meg.

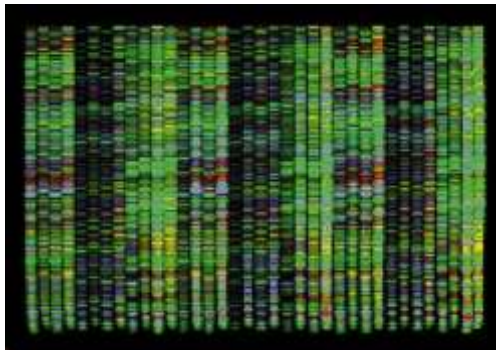
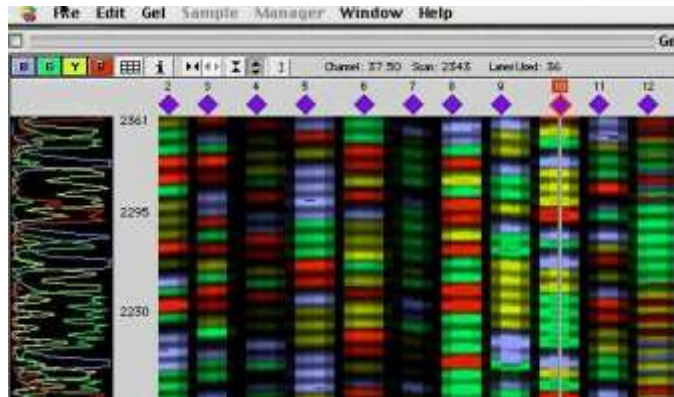
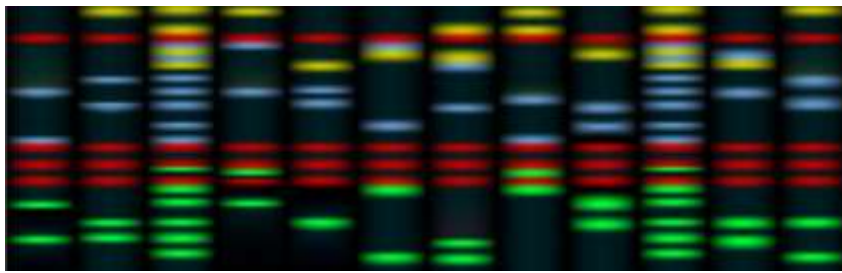
Ezután biztonsággal jelölhető akár sok lépésben is.

## Southern blot (Edwin Southern)

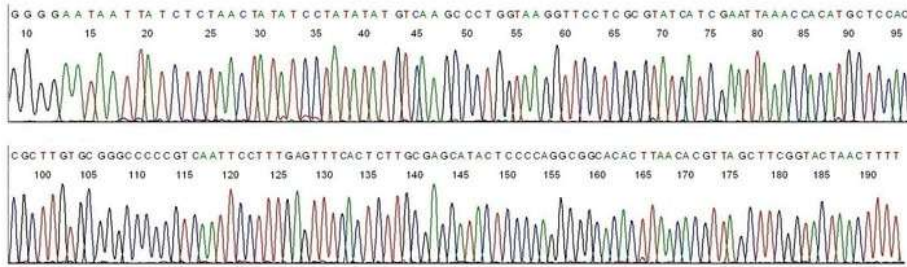


## Southern Blot (DNA)







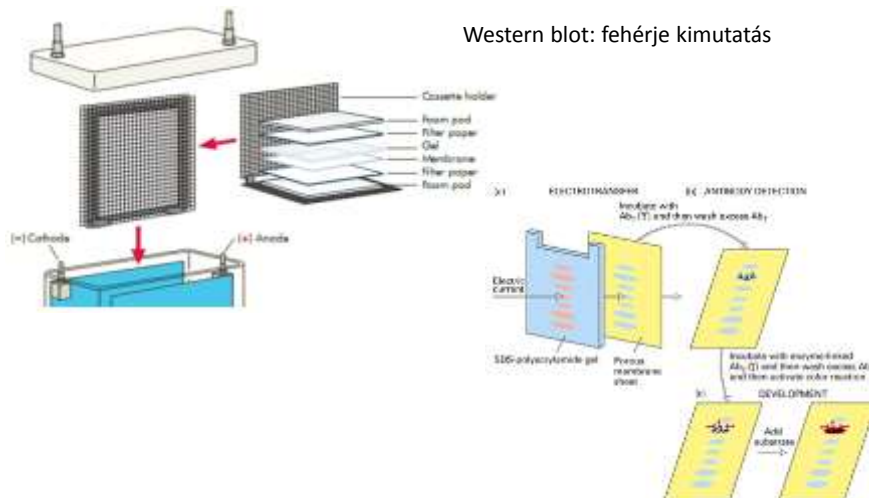


Borrelia burgdorferi CA382, complete genome  
Sequence ID: [gb|C702271.1|](#) Length: 910736 Number of Matches: 1  
Range 1: 445107 to 445291 [GenBankGraphics](#)

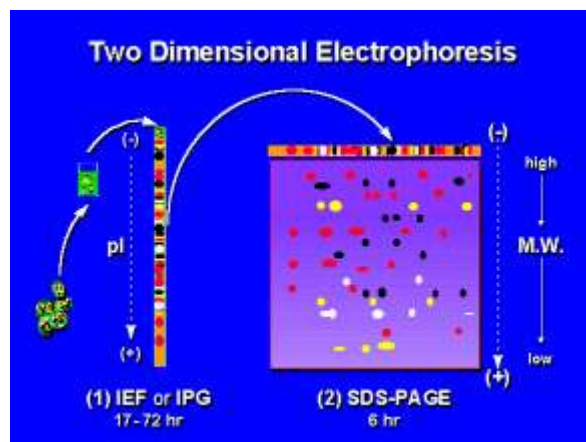
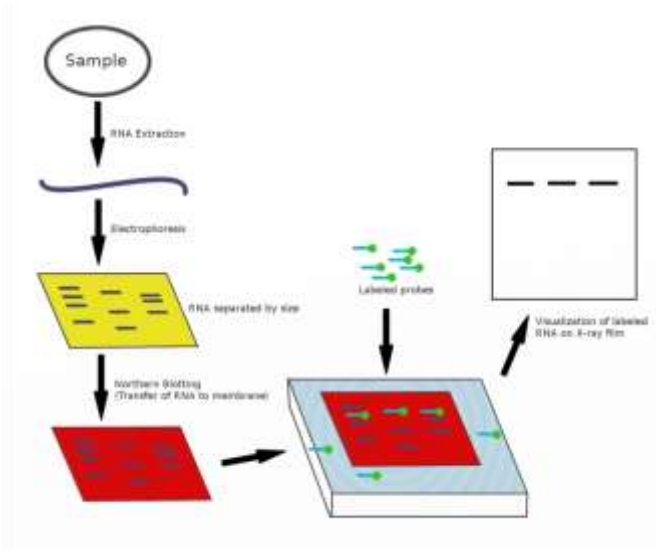
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
342 bits(185)	5e-91	185/185(100%)	0/185(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGGAATAATATCTCTAACTATATCTATATATGTCAAGCCCTGGTAAGGTCCTCGCG	60		
Sbjct 445107	GGGGAATAATATCTCTAACTATATCTATATATGTCAAGCCCTGGTAAGGTCCTCGCG	445166		
Query 61	TATCATCGAATTAAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGCCCGCTCAATTCCTTTGAG	120		
Sbjct 445167	TATCATCGAATTAAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGCCCGCTCAATTCCTTTGAG	445226		
Query 121	TTTCACCTTTCGAGCATATCTCCGAGCGGCACACTTAACACCTTAGCTTCGGTACTAA	180		
Sbjct 445227	TTTCACCTTTCGAGCATATCTCCGAGCGGCACACTTAACACCTTAGCTTCGGTACTAA	445286		
Query 181	CTTTT 185			
Sbjct 445287	CTTTT 445291			

## Western és Northern blot: játék az eredeti elnevezéssel

### Western blot: fehérje kimutatás



Northern blot: RNS kimutatás, expressziós mintázatok meghatározása

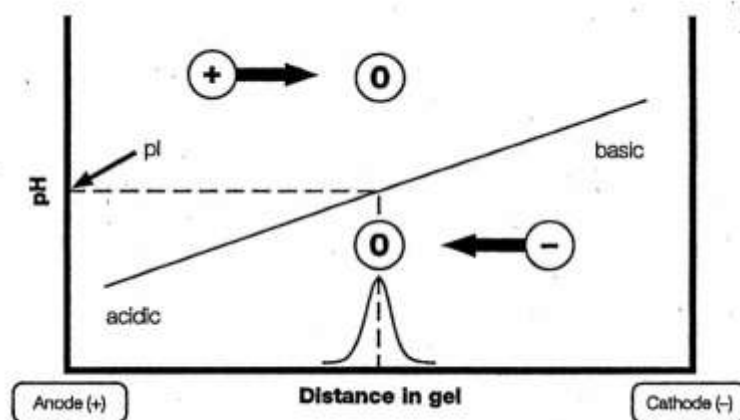
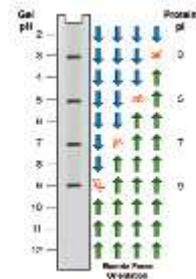


Izoelektromos fókuszálás

pH gradiens

Ott áll meg a molekula ahol eléri az izoelektromos pontot.

Nagy elválasztó-képességű módszer, akár egy elemi töltés-különbséget is ki lehet vele mutatni



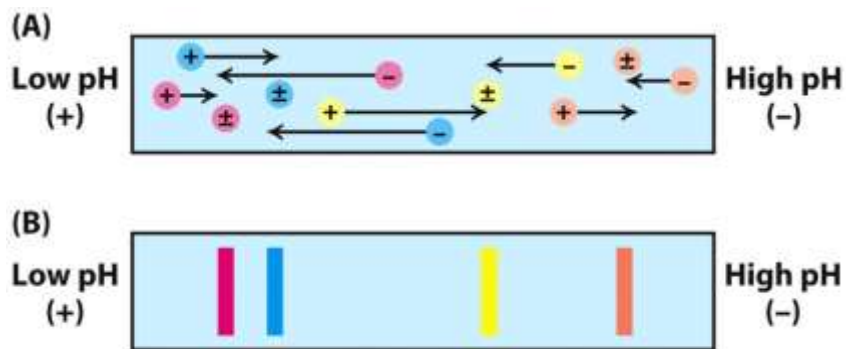


Figure 3.11  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company

### Kapilláris-elektroforézis

