

Szedimentációs és elektroforetikus módszerek

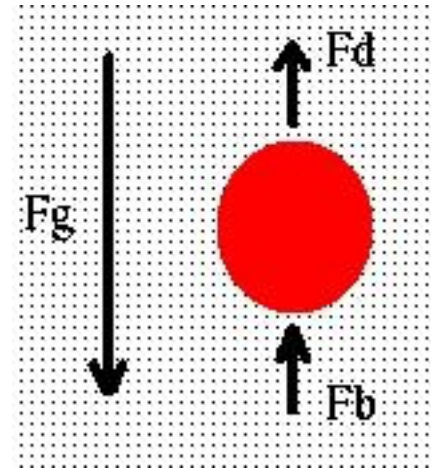
Szedimentációs módszerek fizikai alapjai

Cél: hogyan lehet picike részecskék tömegét meghatározni?

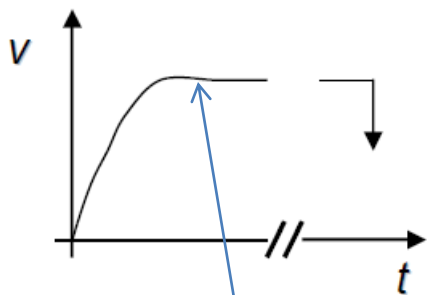
(jóval az AFM és Rtg kora előttről származó, de ma is jó megoldás)

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

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

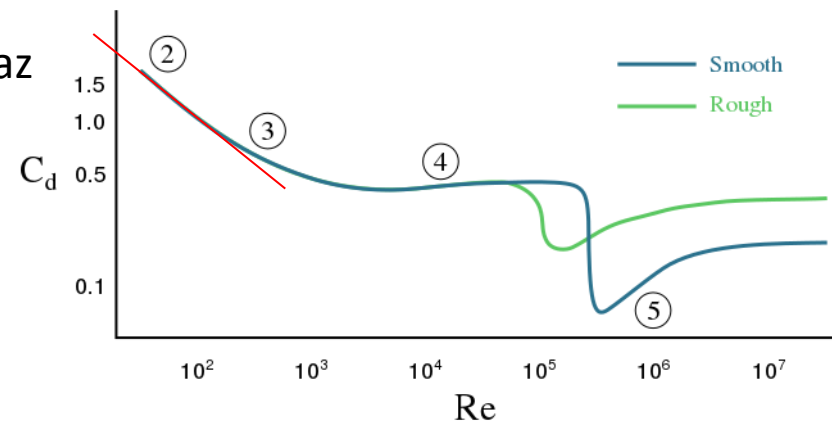
A súrlódási erő:

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.



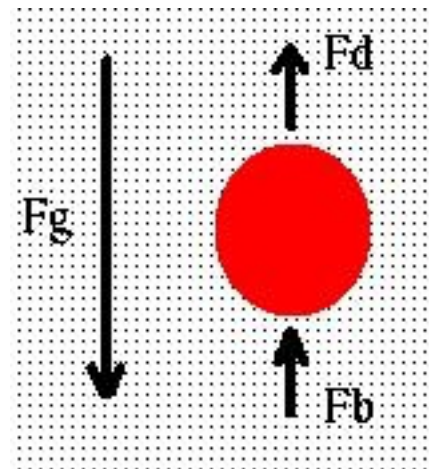
2x-log, és meredekség=-1

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

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

és

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



$$F_g = m \cdot g$$

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

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

Az erőegyensúly ebből adódik:

$\Sigma F = 0$, azaz $F_g - F_b = F_d$, 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.

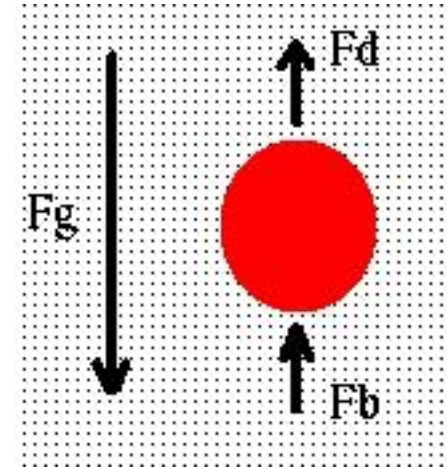
Szedimentáció vagy egyáltalán nem, vagy csak nagyon lassan következik be.

Megoldás: centrifúga!



Tegyük a részecskét egy oldatba, és centrifugáljuk:

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



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

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



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

Ez átrendezhető:

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

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

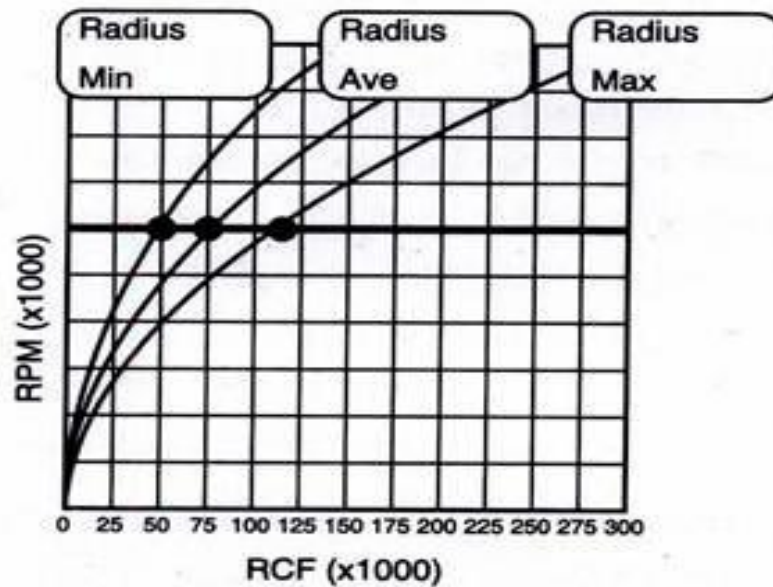


Hasznos egyenletek

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

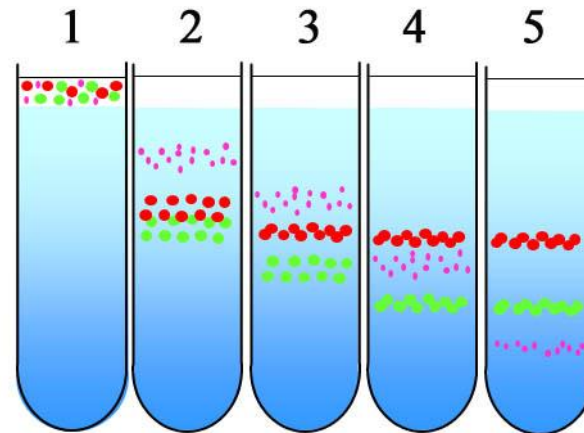
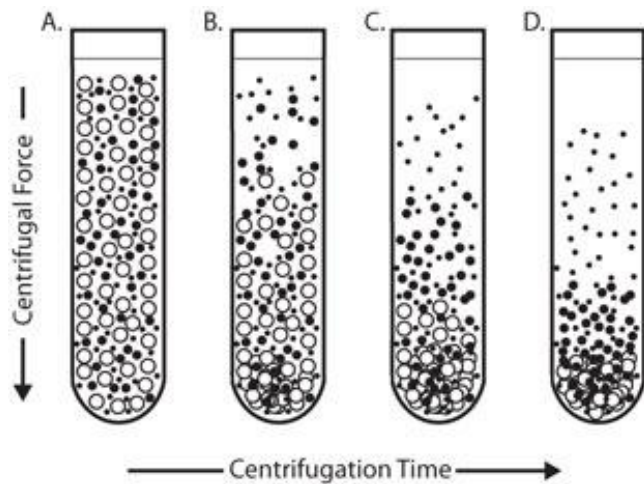
RCF: relative centrifugal field = relatív centrifugális erő

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

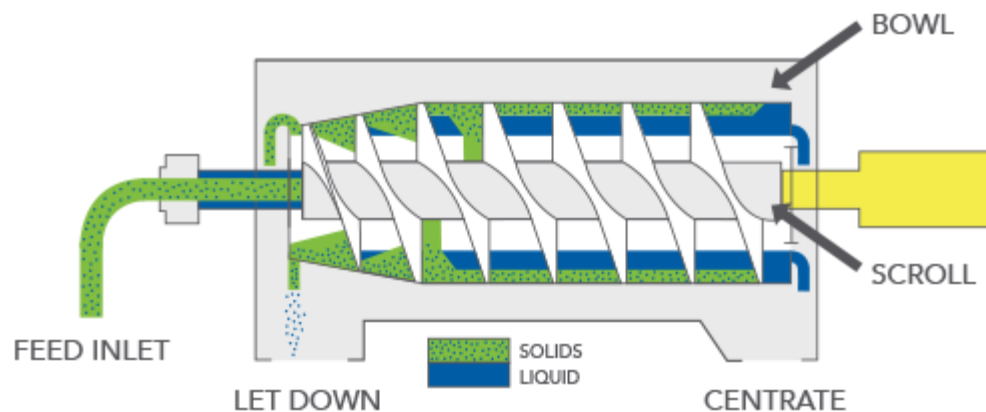
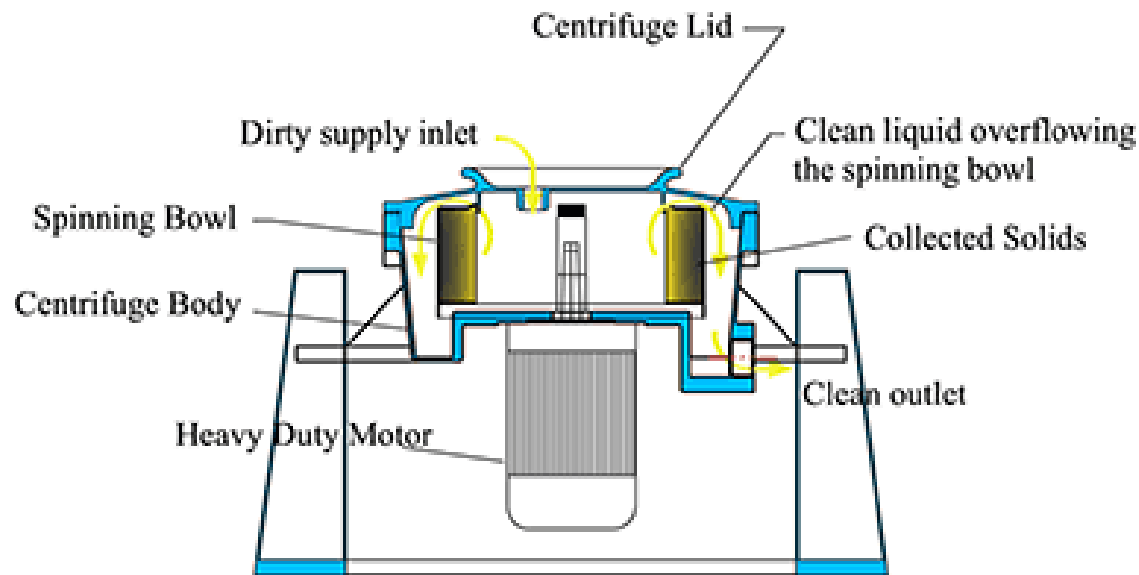


A centrifugacsőben haladva a sugár kicsit változik, evvel az RCF is.

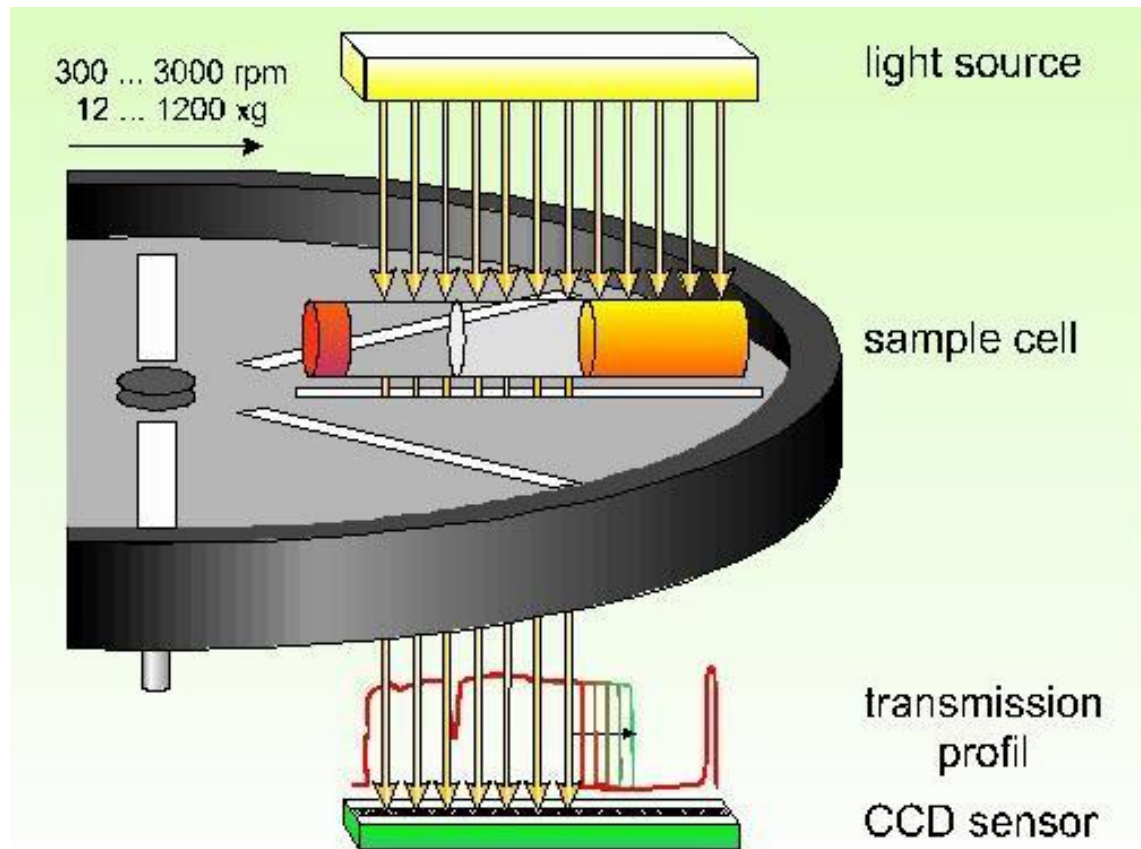
Mivel a sebességek eltérőek, így az egyes részecskék el is válnak
A centrifugálás során.



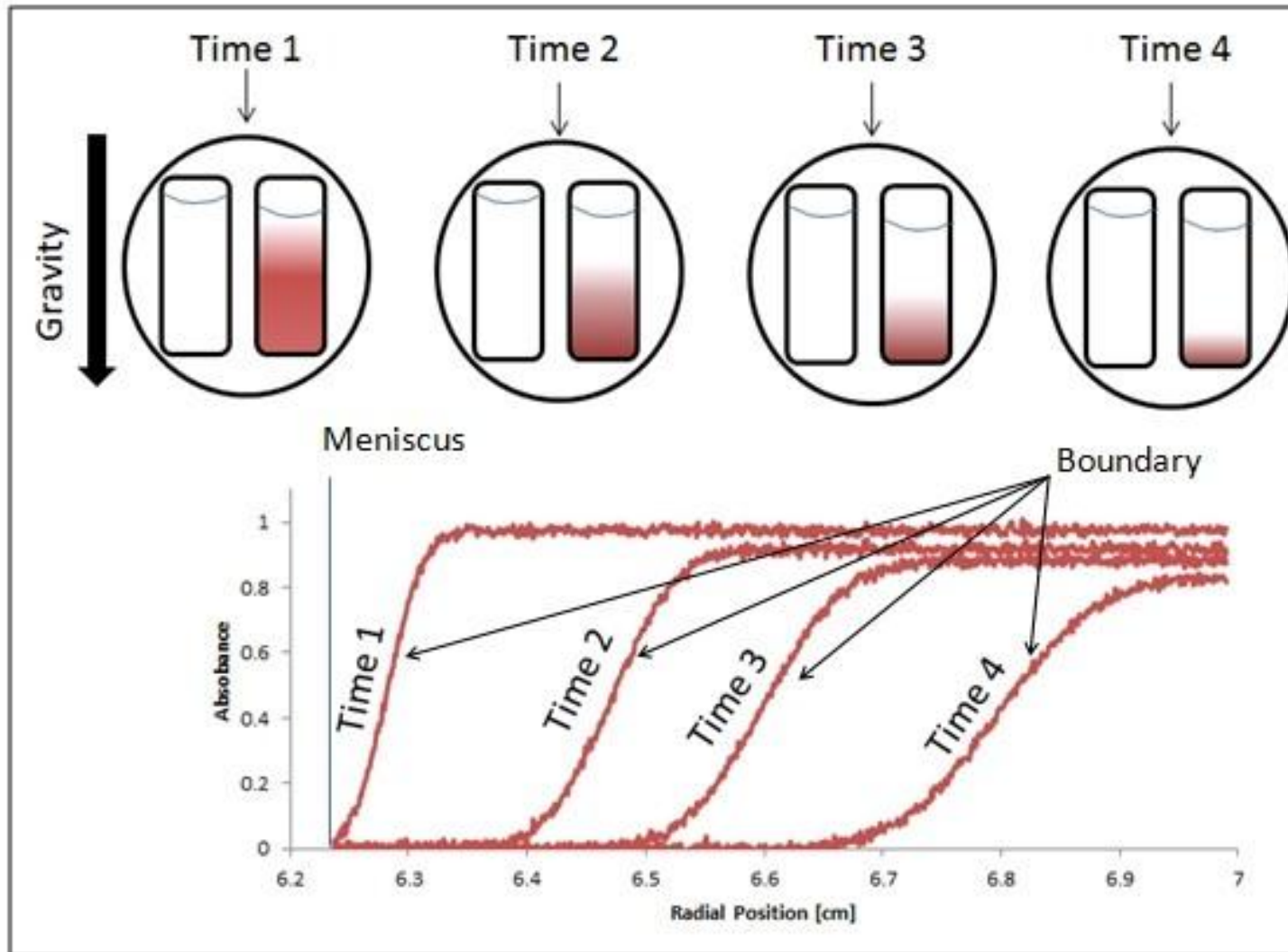
centrifugális szeparátor



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



A határréteg folyamatosan mozog amíg el nem éri az edény alját

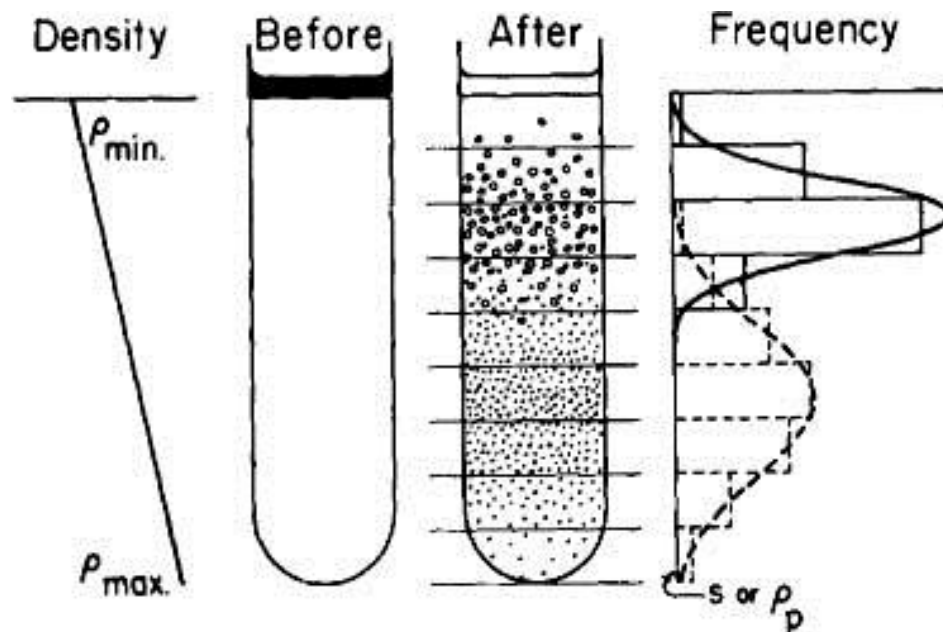


Csak az f alaki tényezőt nem ismerjük.

Csak hogy ez a diffúzióban is benne van:

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

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



Használhatunk sűrűség-gradienst is az oldószerben.

Ekkor a részecskék a saját sűrűségüknek megfelelő rétegben megállnak.

Ezt preparatív, elválasztástechnikai célra lehet használni.

1. Differential sedimentation

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

Centrifugation: \rightarrow *Incomplete sedimentation*

Abscissa of frequency distribution: *Sedimentation coefficient*

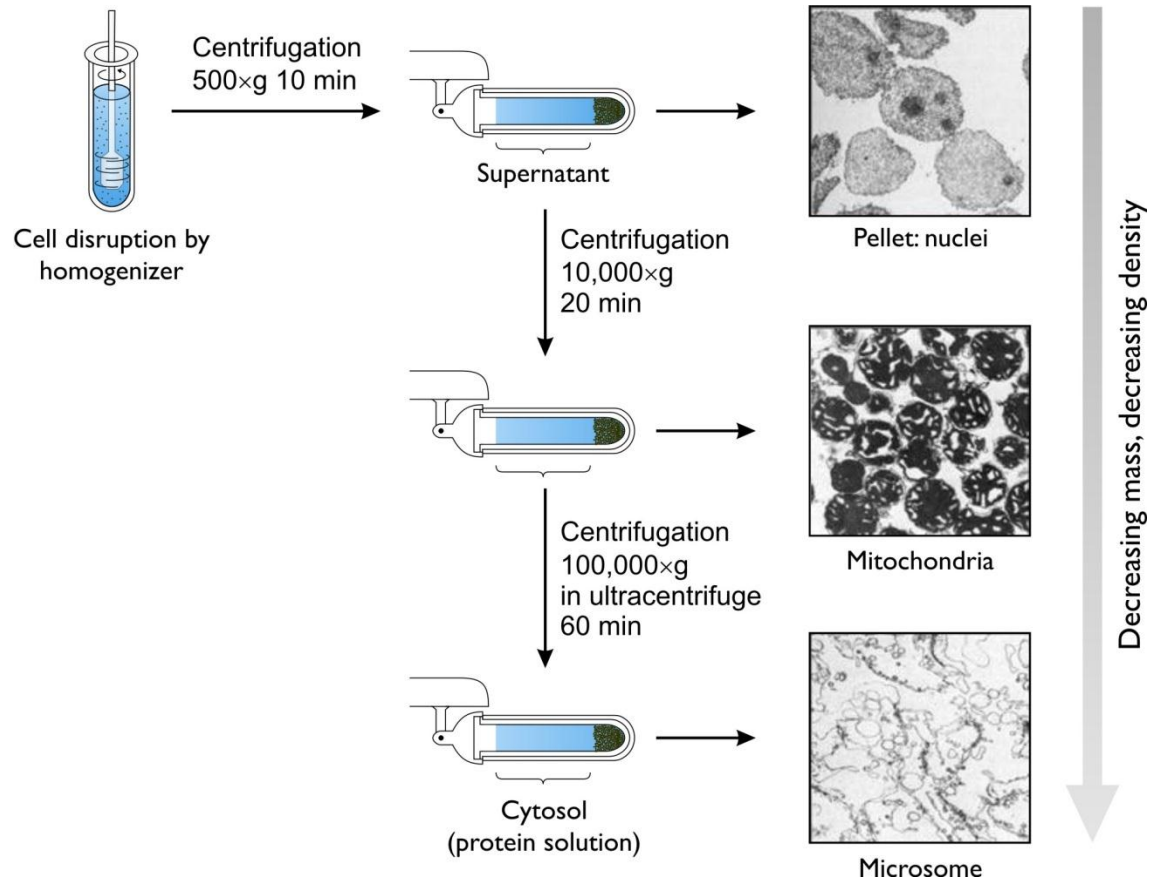
2. Density equilibration

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

Centrifugation: *Prolonged, high speed*

Abscissa of frequency distribution: *Equilibrium density*

Differenciáló centrifugálás



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

Egyensúlyi szedimentációs módszer

Addig várunk, amíg beáll az egyensúly a centrifugálás során.

Csak olyan sebességgel forgatjuk a centrifugát, hogy a diffúzió (Brown mozgás) és a szedimentáció egy egyensúlyt adjon, így lesz egy koncentráció eloszlás, de nem ül le minden a cső aljára.

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

Termikus egyensúlyban felírható a Boltzmann-eloszlás:
(mert nehézségi erőterben vagyunk!)

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

Az energia-tagban a középponttól mért r_1 és r_2 távolságok között végzett munkát kell venni:

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

Kiegészítő anyag

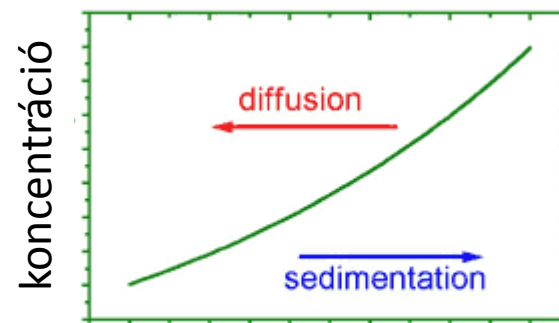
Behelyettesítve a Boltzmann formulába, és ln-t véve:

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

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

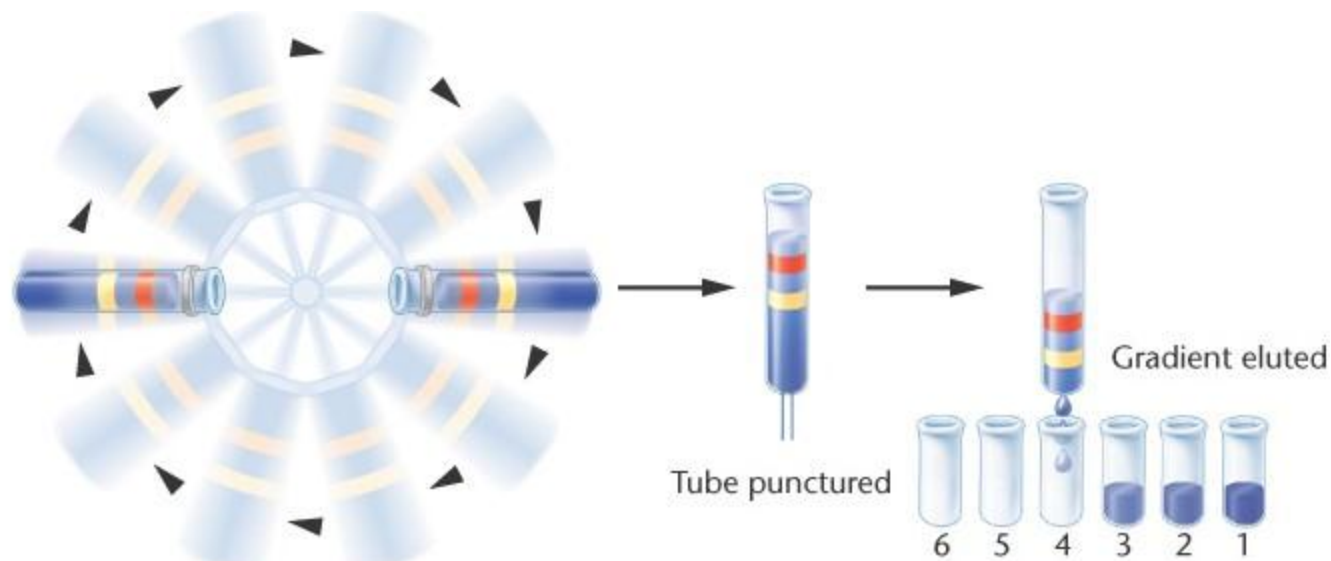
Vagyis ehhez a módszerhez nem kell diffúziót mérni, pontos tömegmérést tesz lehetővé (kb.1-2%), de tudni kell a sűrűséget.

Ha nem tudjuk akkor legalább kétféle oldószerrel kell mérni. (és így két egyenlet, két ismeretlen lesz)

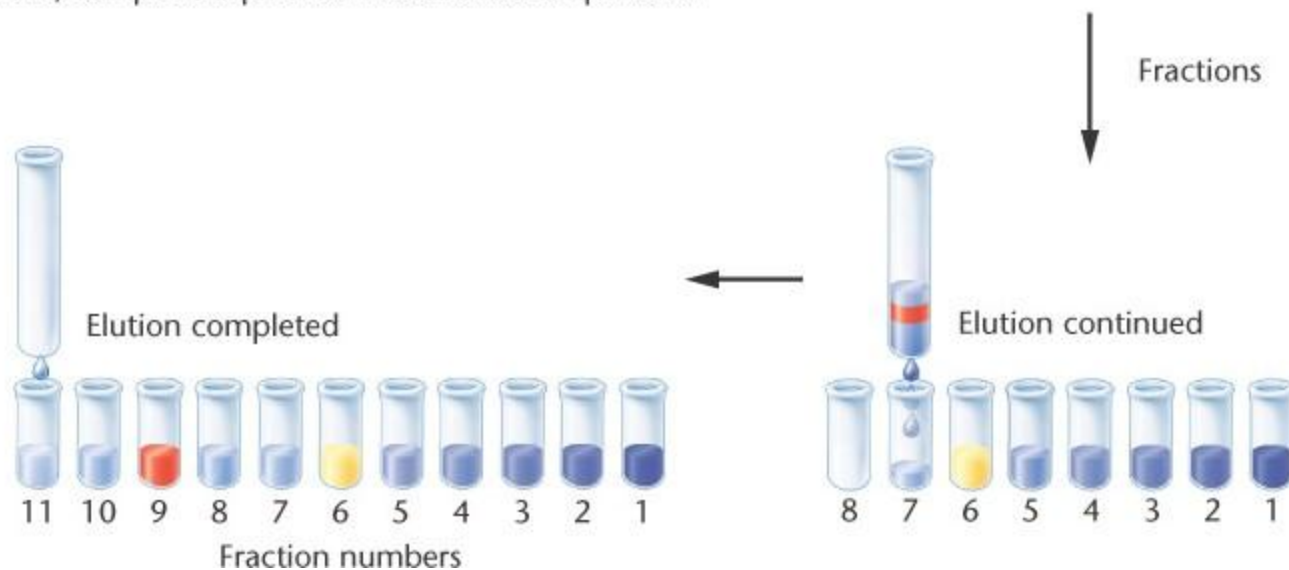


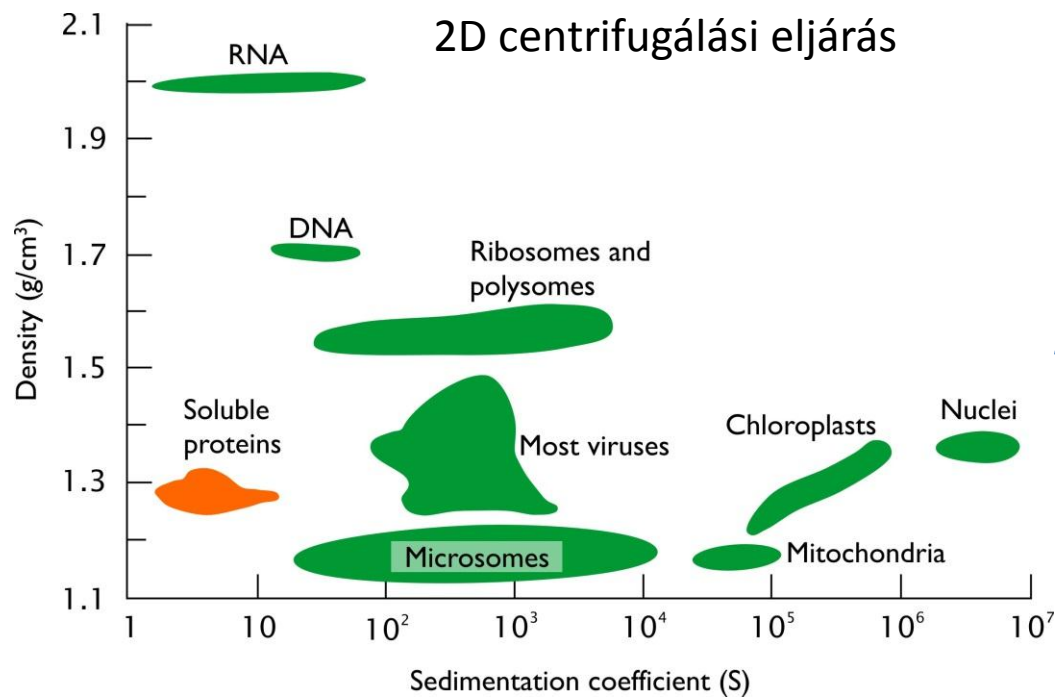
Kiegészítő anyag

Sugárirányú távolság a csőben



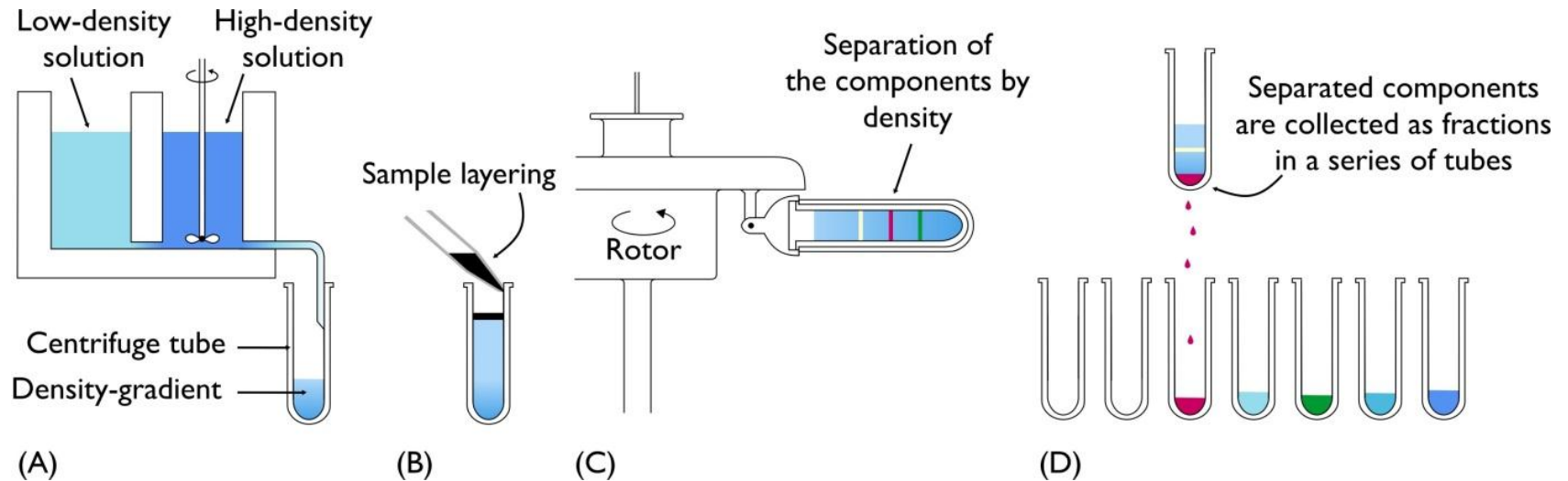
Tubes placed in ultracentrifuge and rotated at high speed; Sample is separated into its two components





Szétválasztás S alapján
differenciál-centrifugálás

Aztán a sűrűség alapján:
gradiens centrifugálás

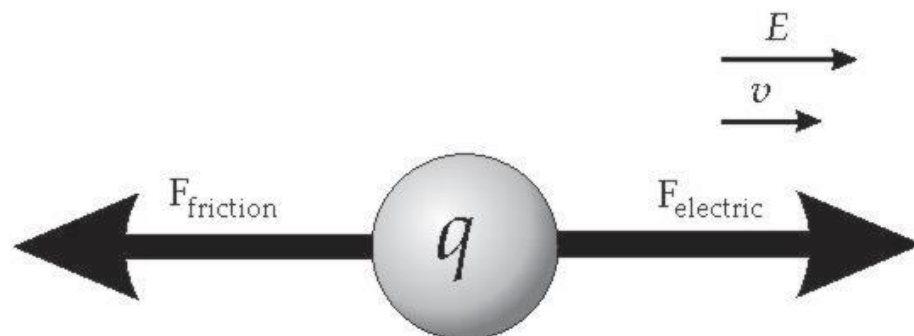


Electroforetikus eljárások

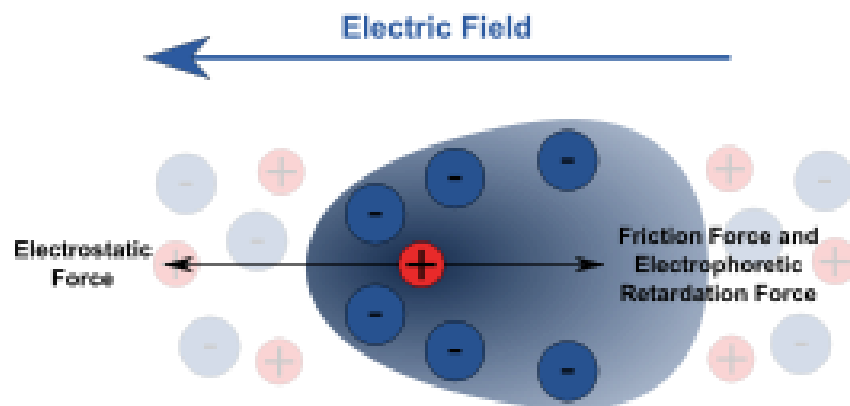
$$\mu_e = \frac{v}{E}$$

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

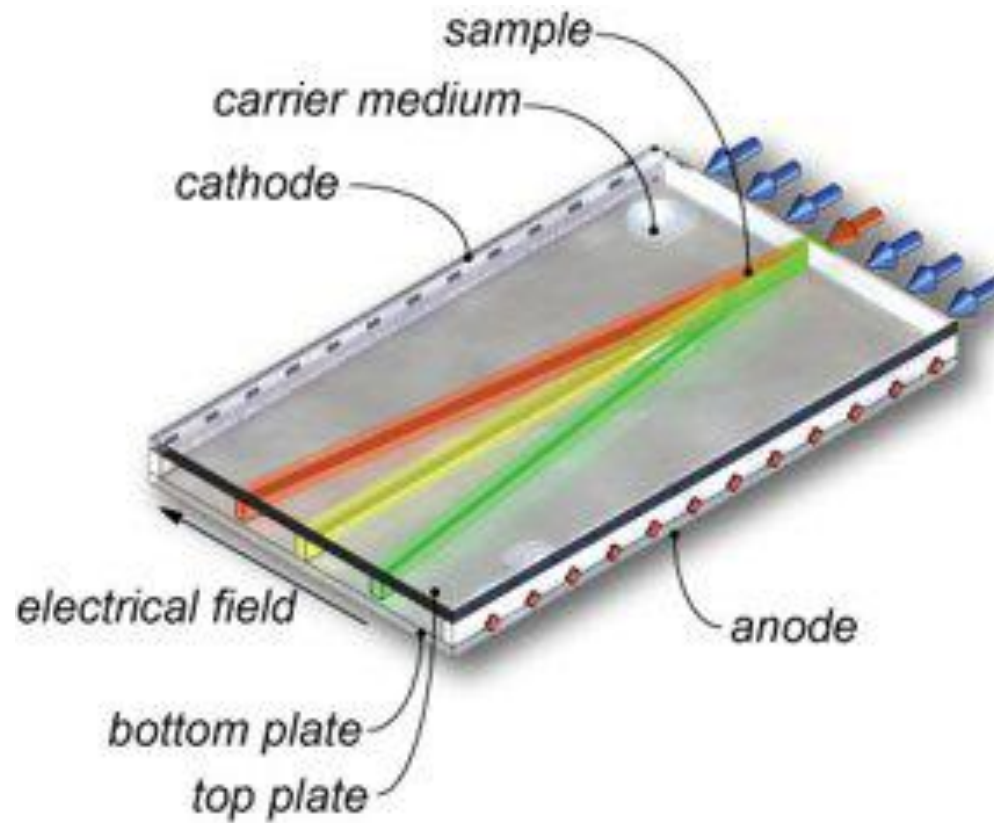
Semleges oldószerben

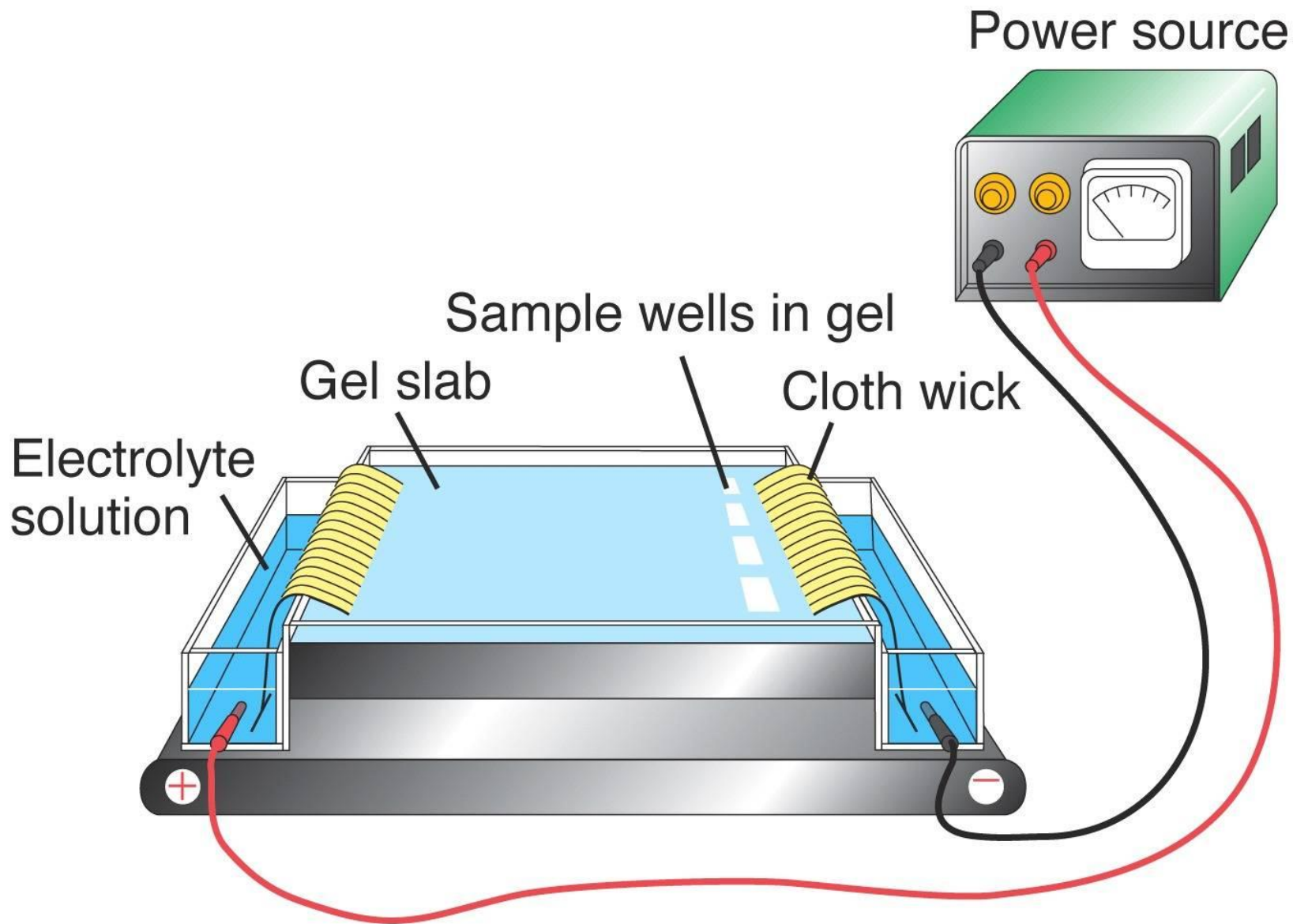


Poláris oldószerben van egy plusz visszatartó erő



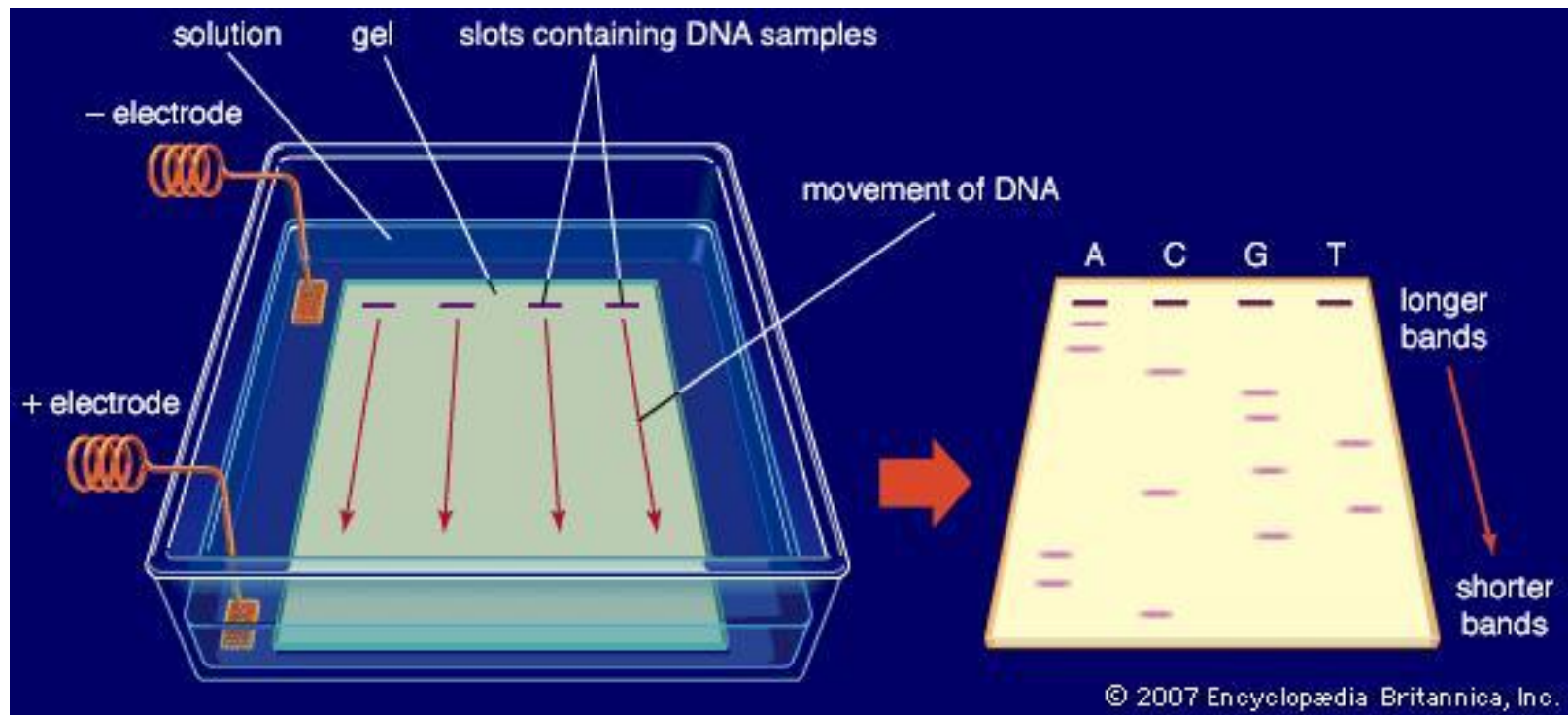
(szabad) áramlásos elektroforézis





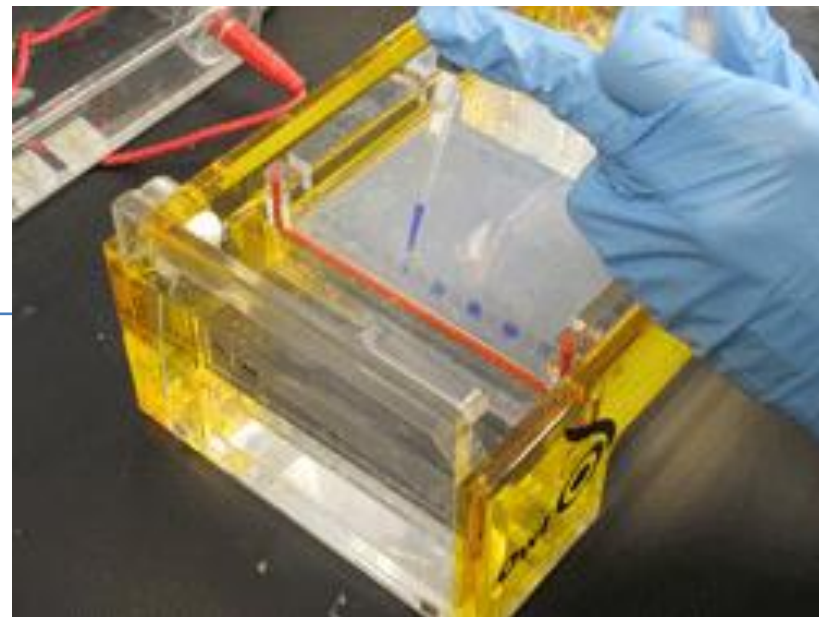
Gél elektroforézis

Ez a **kromatográfiás eljárások** családjába tartozik

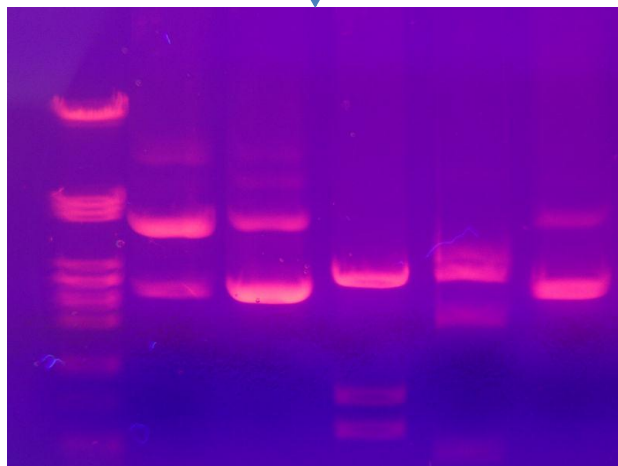
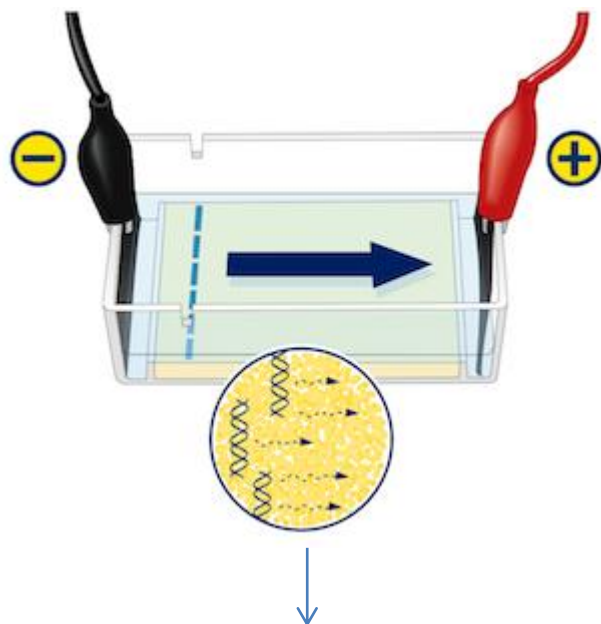


Kromatográfia: kölcsönhatás az álló mátrix, és a mozgó oldat között, ami elválasztást eredményez.

Gél töltés



futtatás



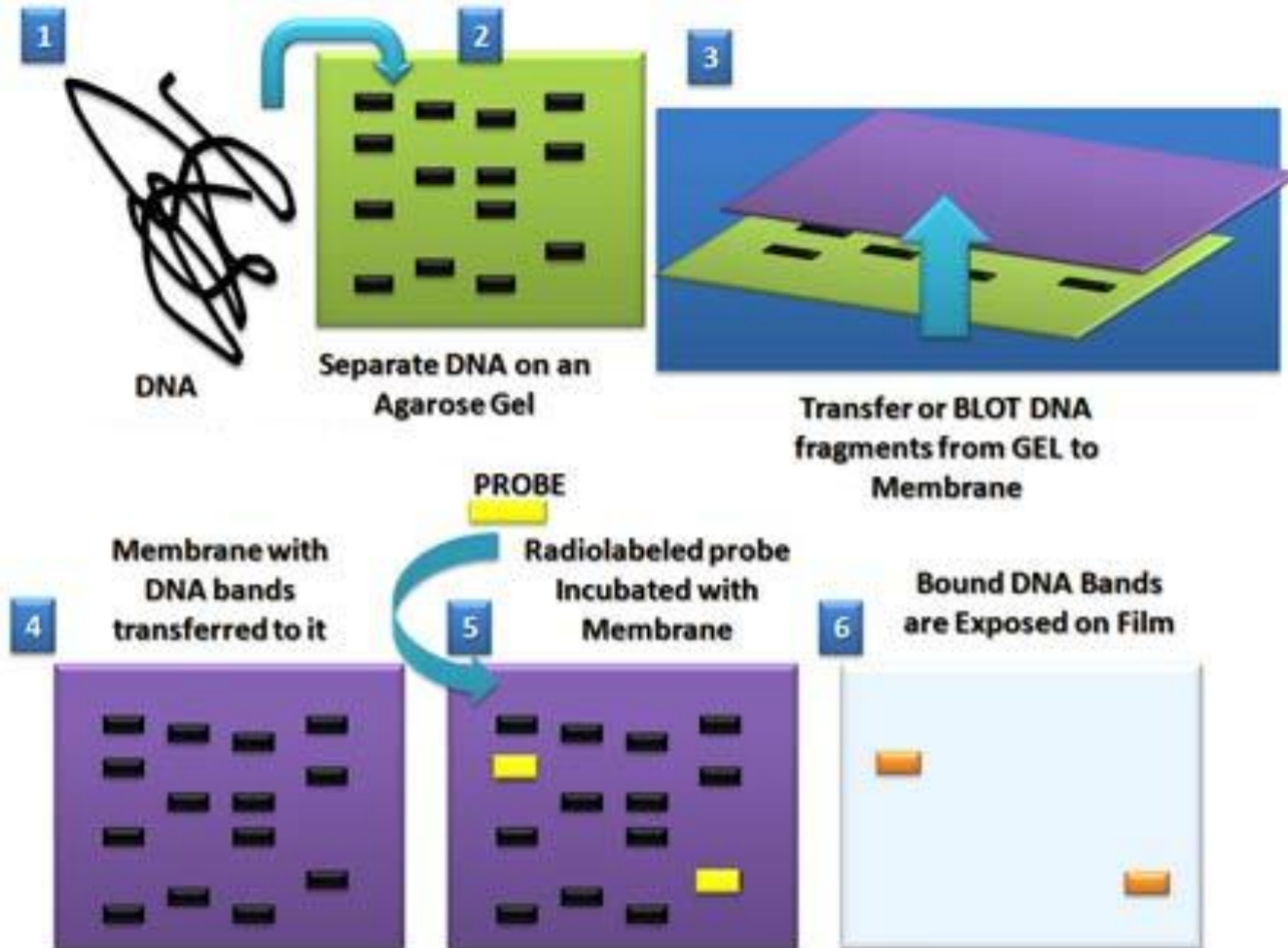
jelölés (itt pl. in-situ)

Gélben jelölni nem könnyű.

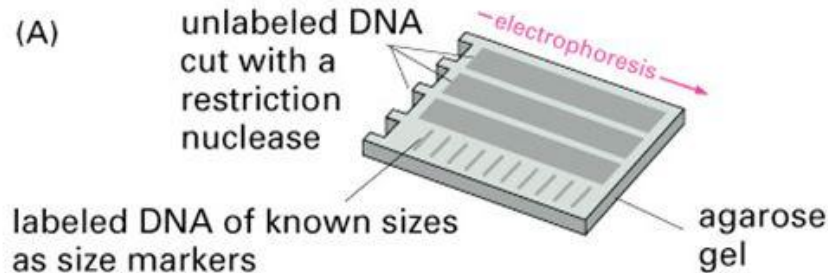
„Blottolás” : átvisszük (és fixáljuk) a gélben kialakult mintázatot egy stabil hordozó membránra. Ebben a mintázat már nem változik meg.

Ezután biztonsággal jelölhető akár sok lépésben is.

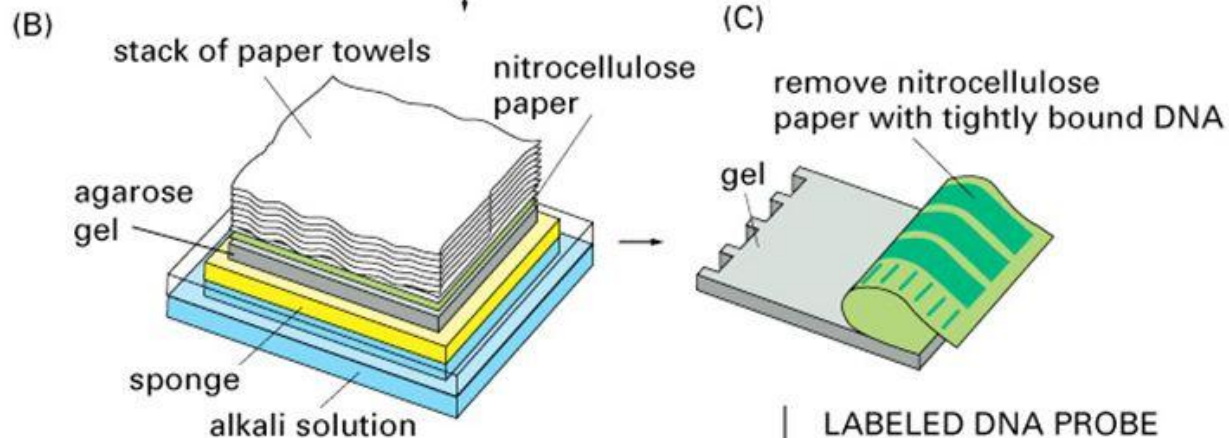
Southern blot (Edwin Southern)



Southern Blot (DNA)

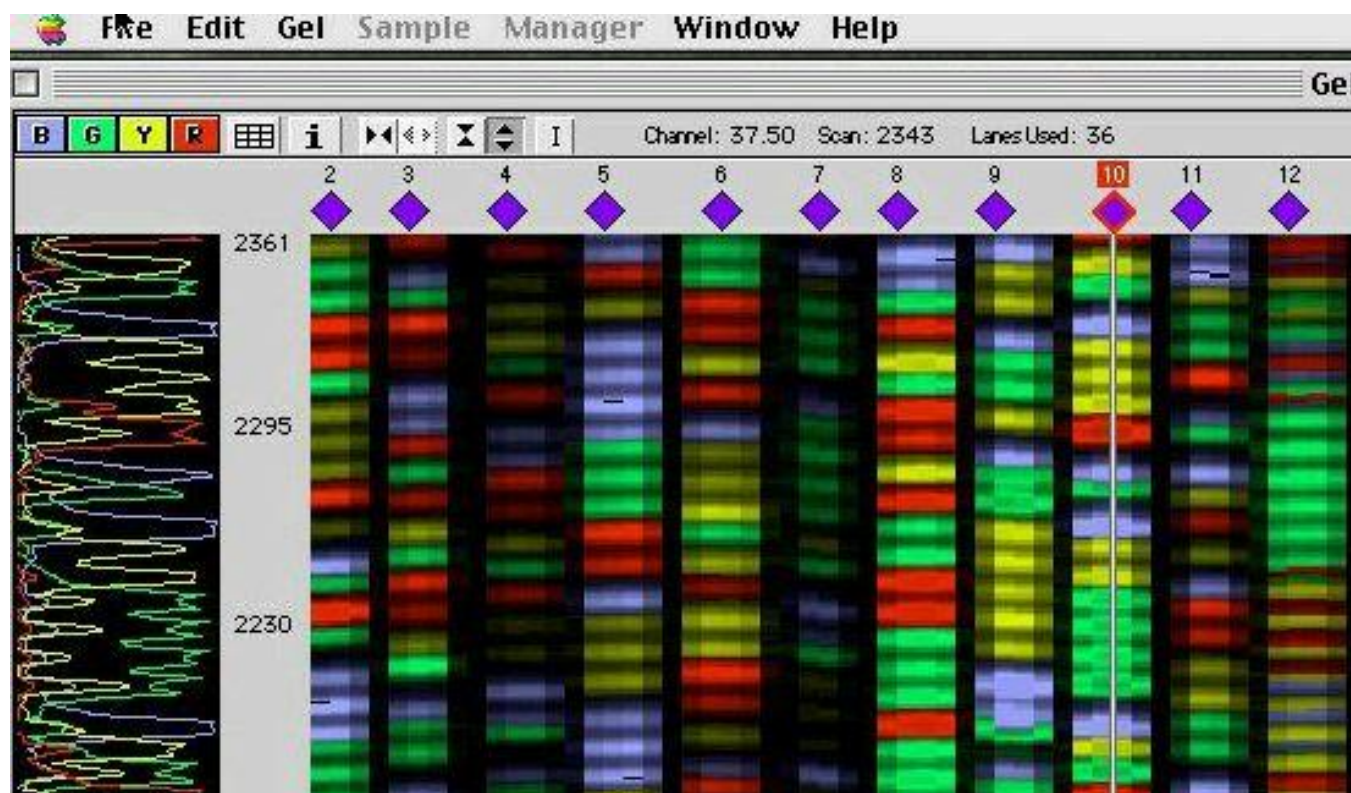
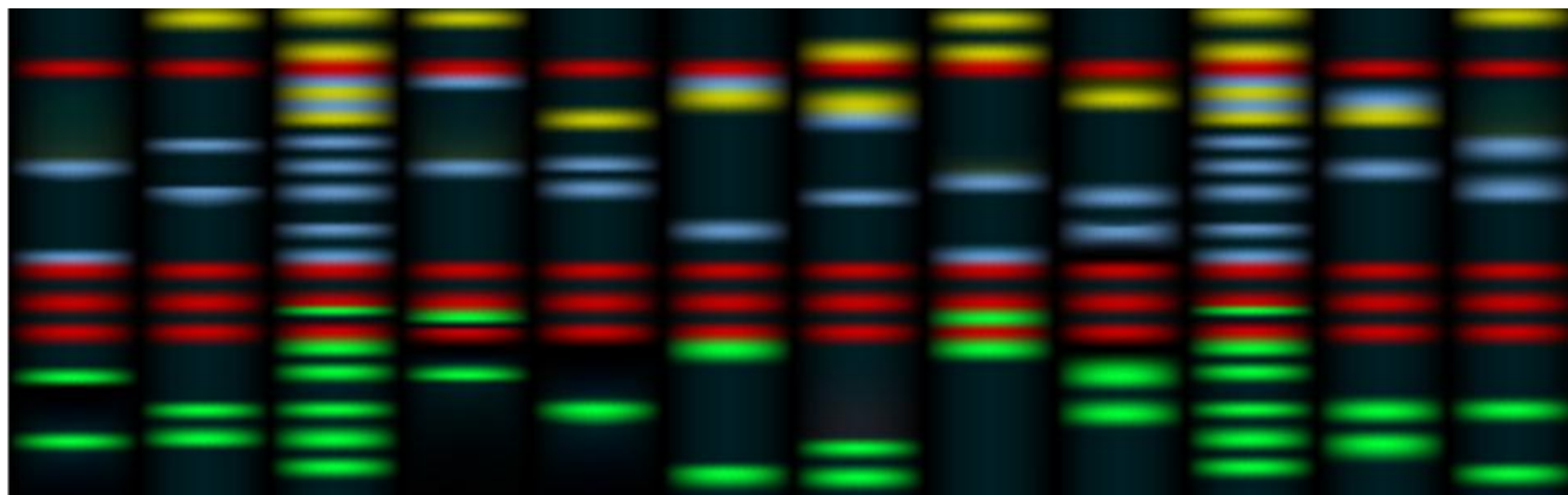


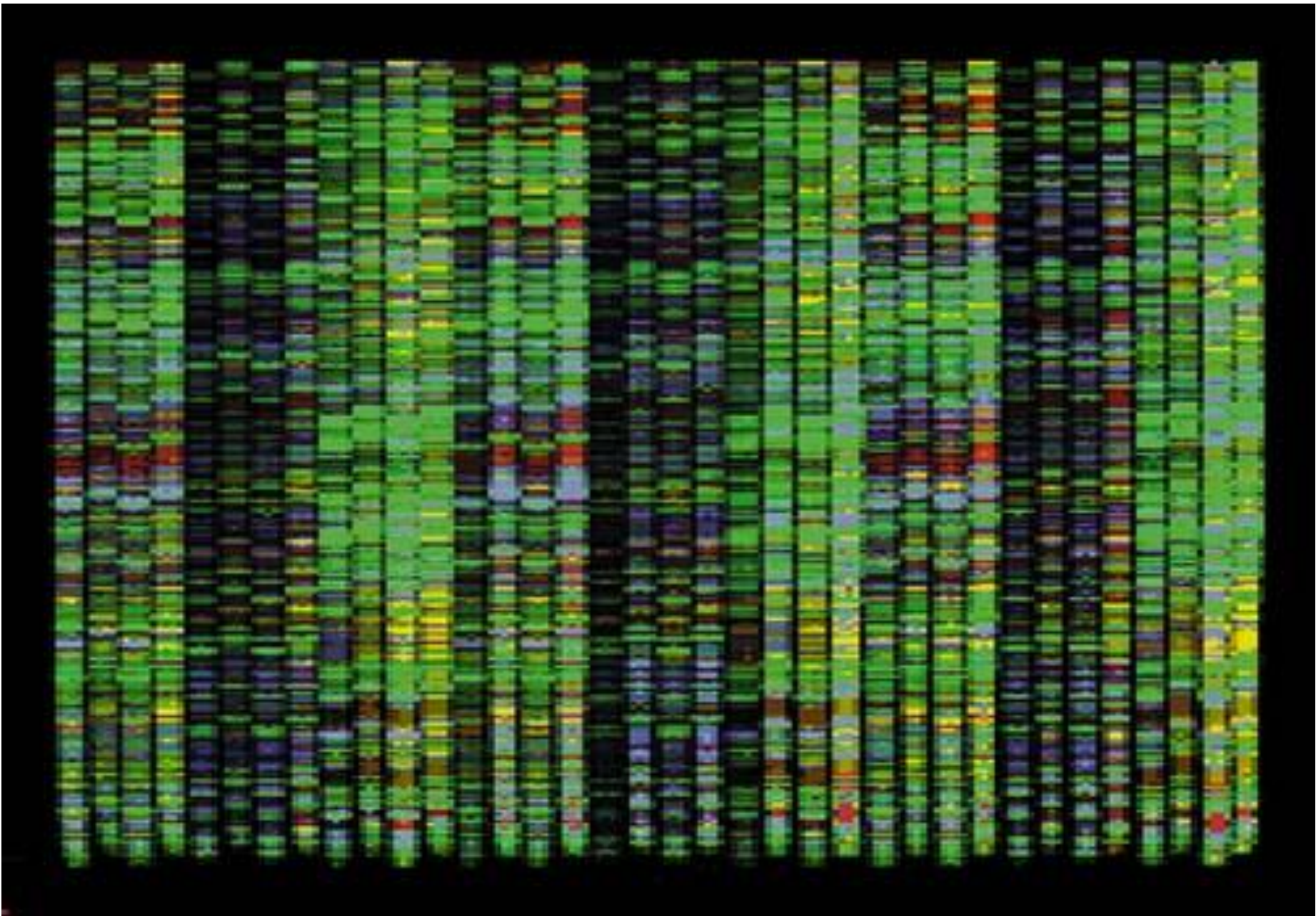
DNA FRAGMENTS SEPARATED BY AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

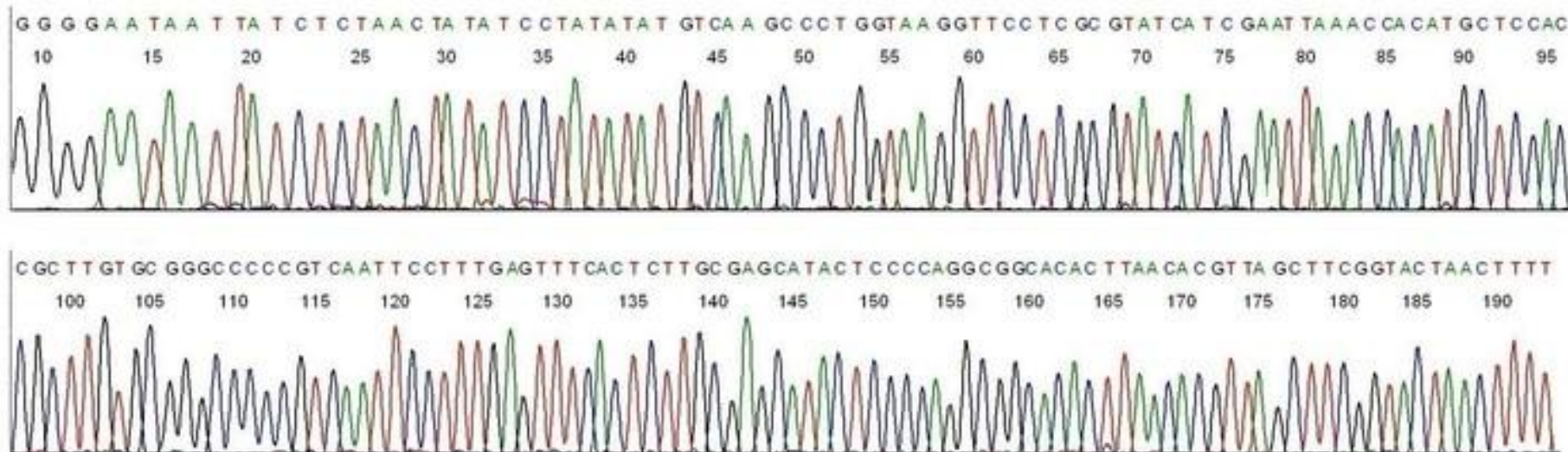


SEPARATED DNA FRAGMENTS
BLOTTED ONTO NITROCELLULOSE PAPER

↓
LABELED DNA PROBE
HYBRIDIZED TO
SEPARATED DNA



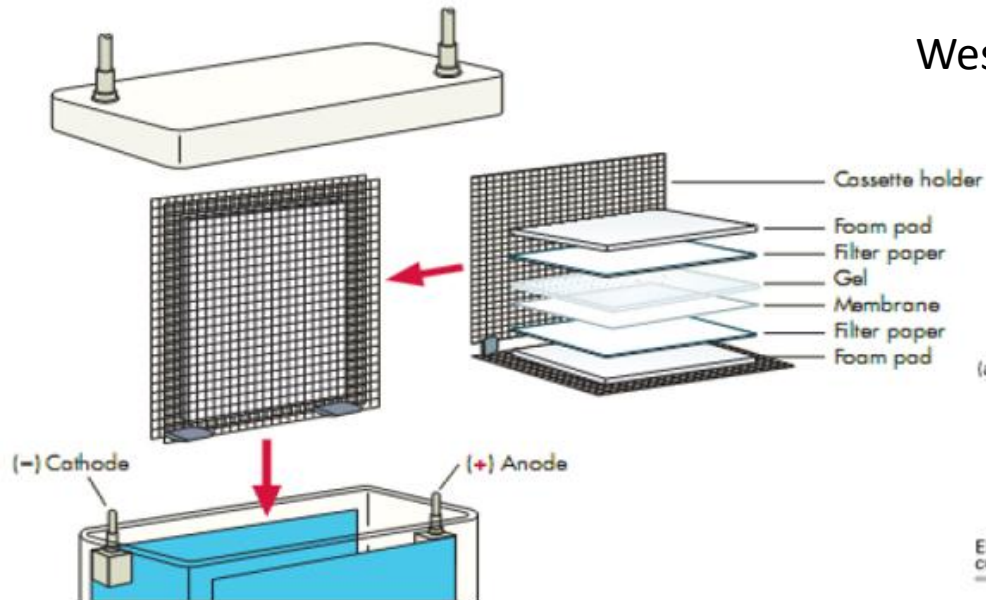




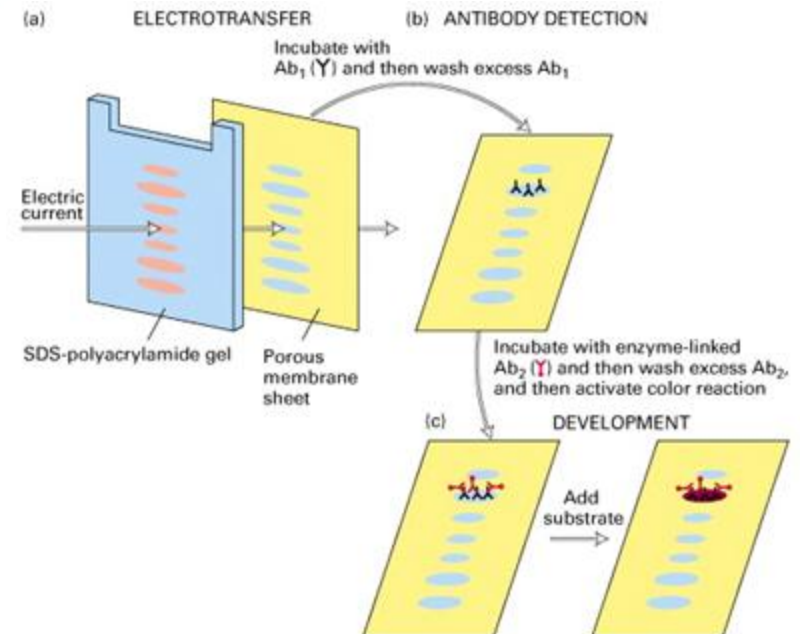
Borrelia burgdorferi CA382, complete genome
 Sequence ID: [gbKP005925.1](#) | Length: 910736 | Number of Matches: 1
 Range 1: 445107 to 445291 [GenBankGraphics](#)

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

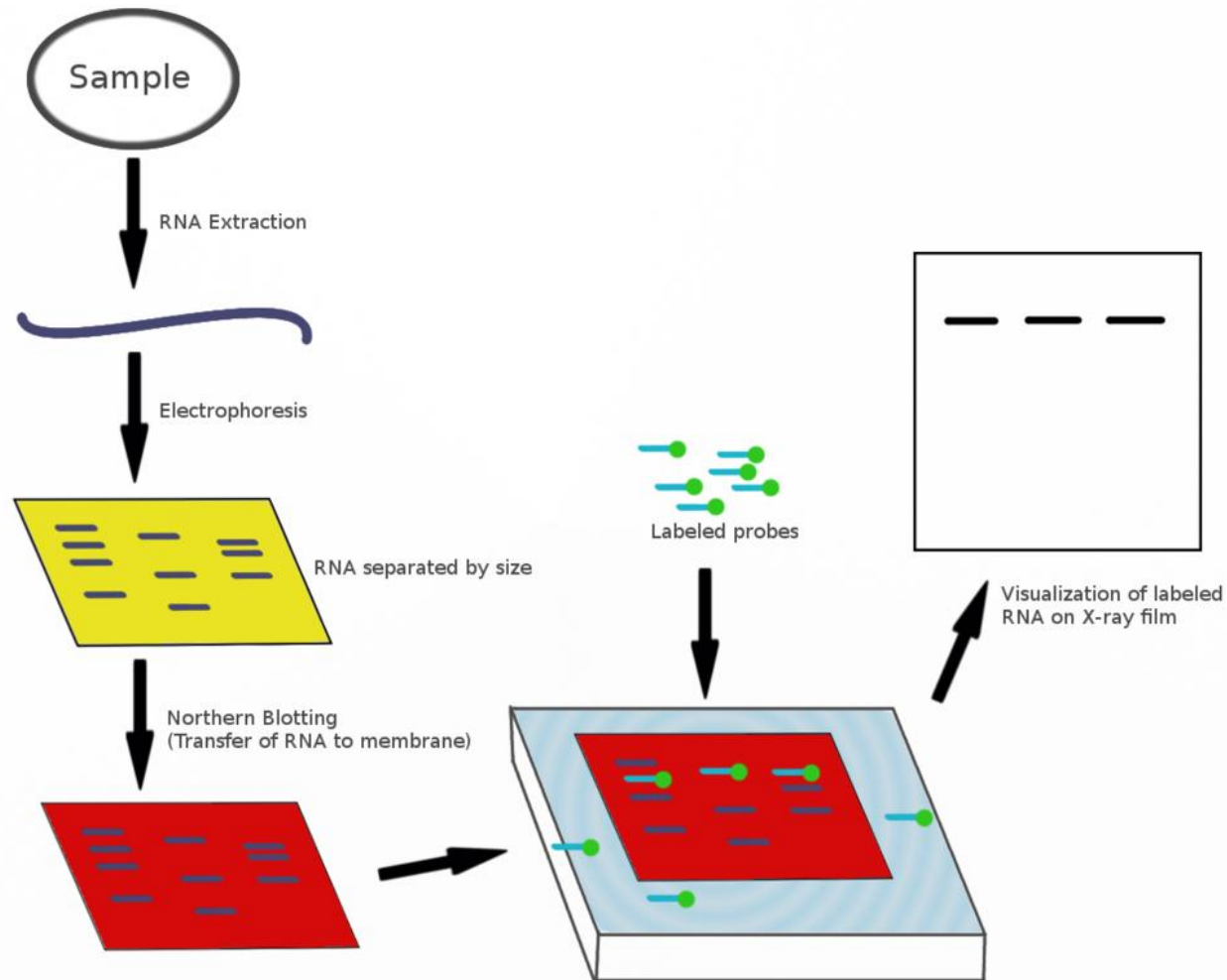
Western és Northern blot: játék az eredeti elnevezéssel



Western blot: fehérje kimutatás

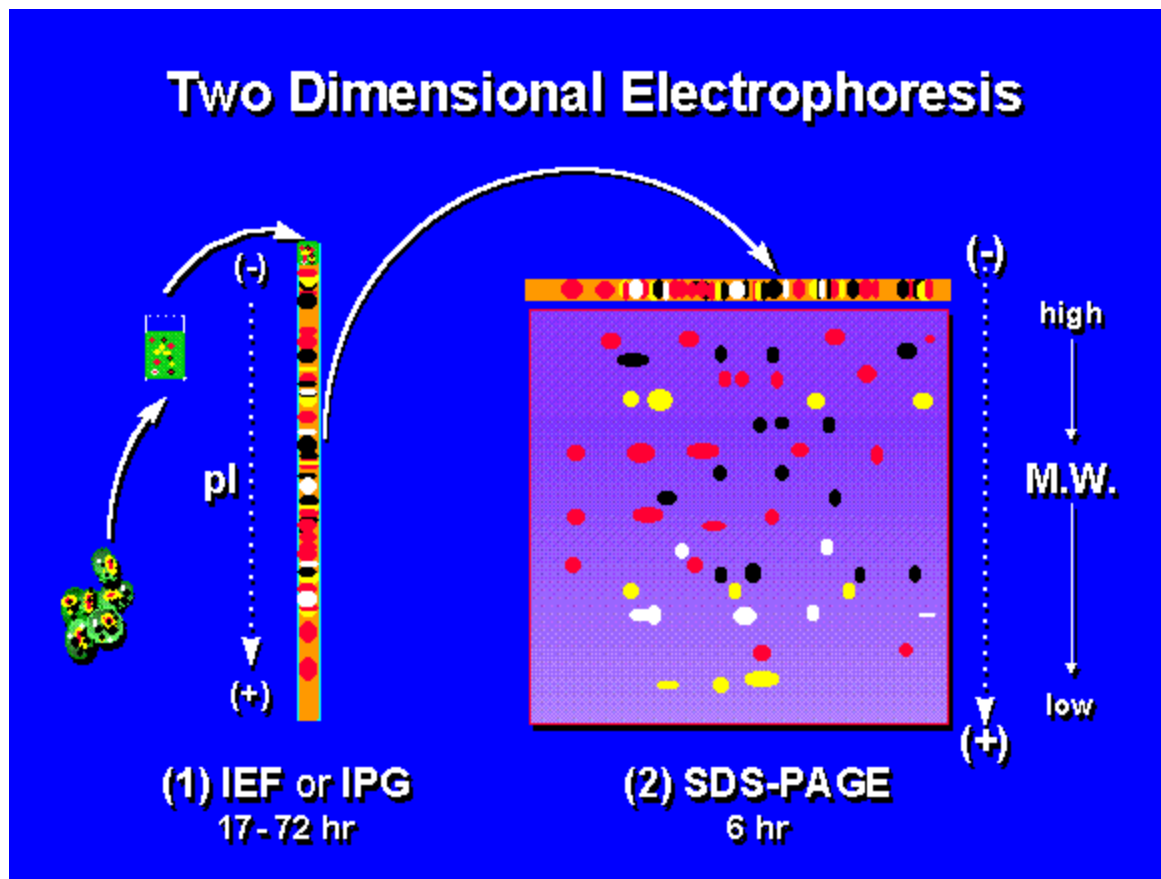


Northern blot: RNS kimutatás, expressziós mintázatok meghatározása



Két dimenziós elektroforézis:

Az első elválasztás után az egyik csíkot „kivágva” egy második elválasztást is végzünk más körülmények között.

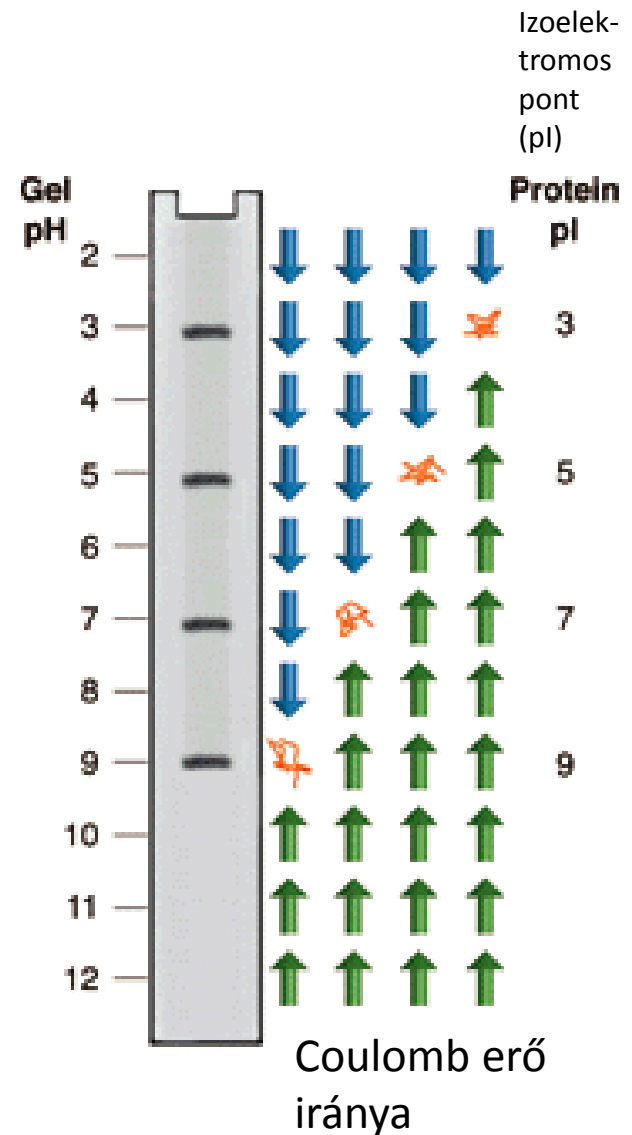


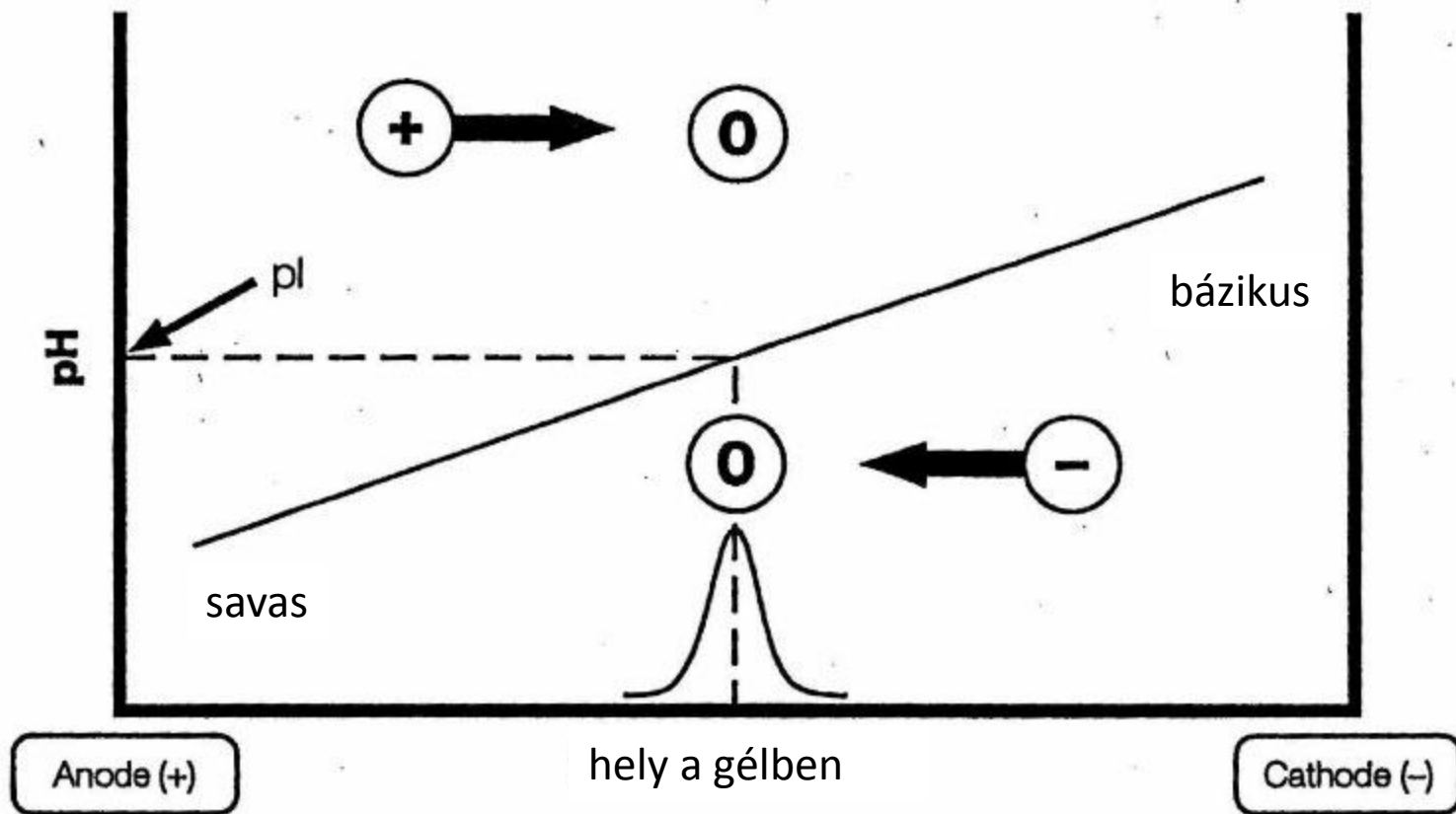
Izoelektromos fókuszálás

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

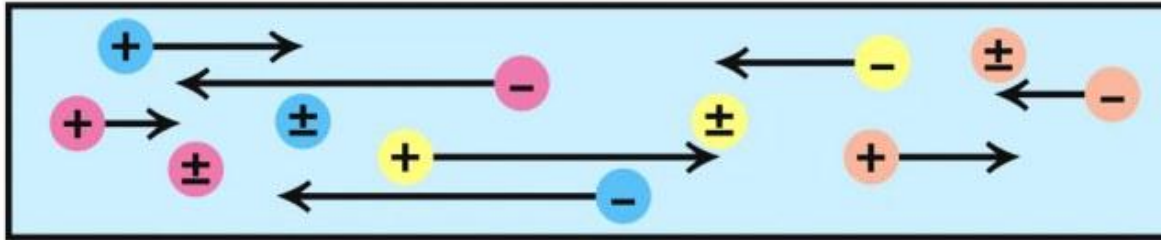




(A)

Low pH
(+)

alacsony
pH



High pH
(-)

magas pH

Low pH
(+)



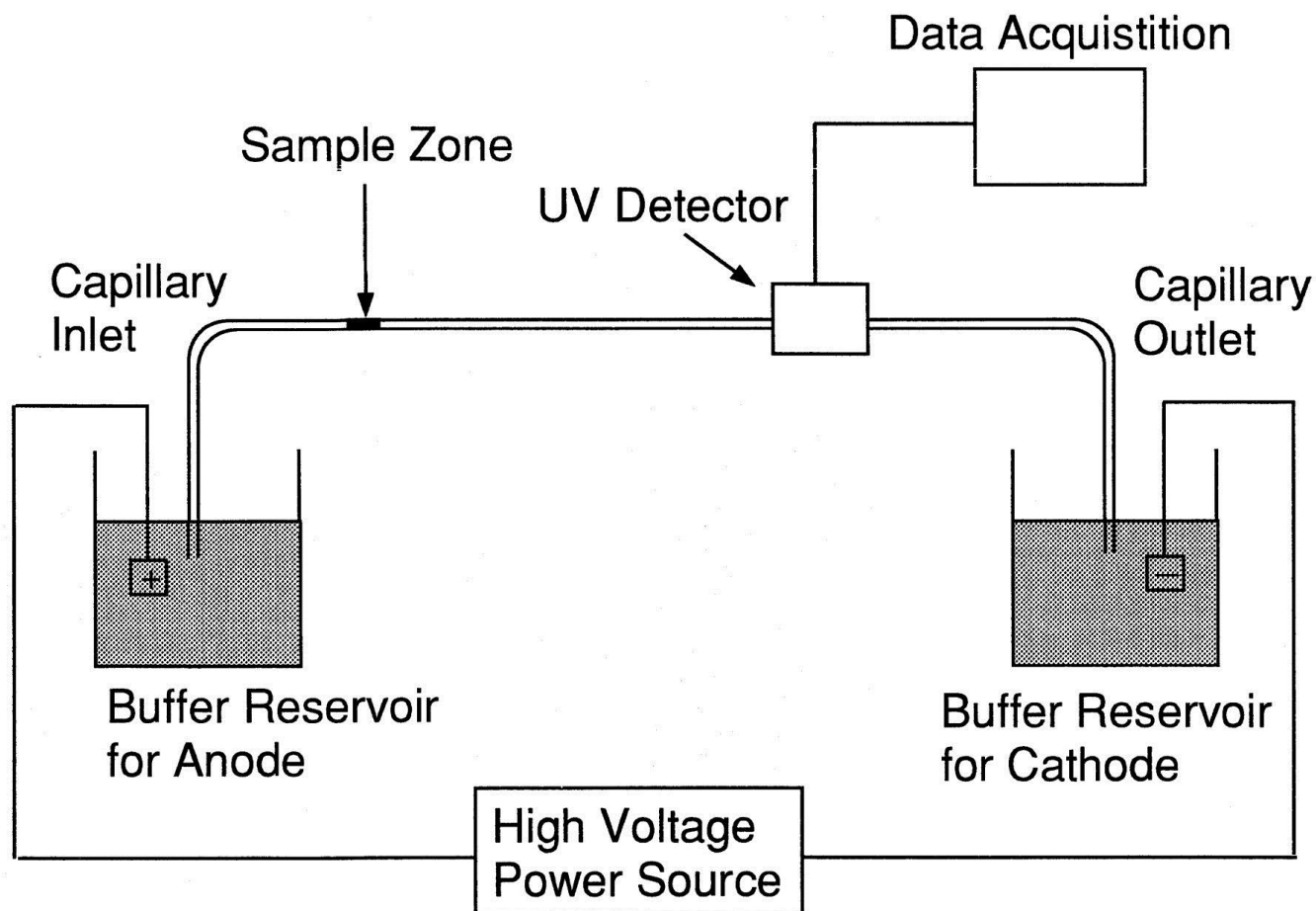
High pH
(-)

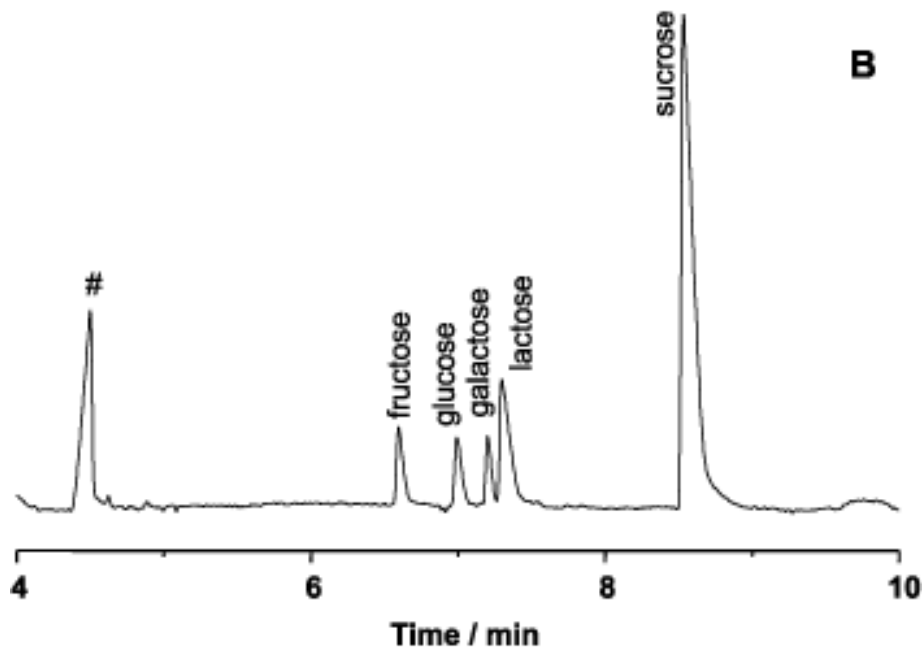
Figure 3.11

Biochemistry, Seventh Edition

© 2012 W. H. Freeman and Company

Kapilláris-elektroforézis





B

Automatizálható, párhuzamosan
több minta elemzésére is
használható

Elektroforetikus spektrum:

A detektor alatt időben eltolva haladnak át a
minta komponensei, mérettől és töltéstől
függően.

