

Szedimentációs és elektroforetikus módszerek

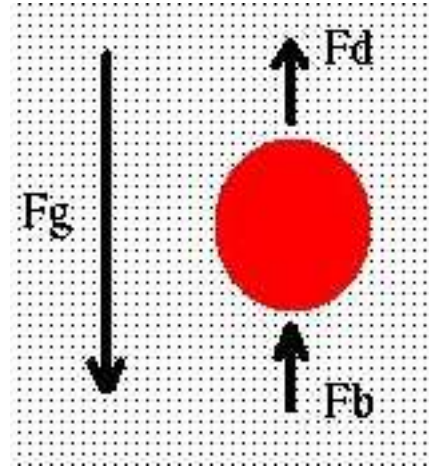
Szedimentációs módszerek fizikai alapjai

Cél: hogyan lehet picike részecskék tömegét meghatározni?

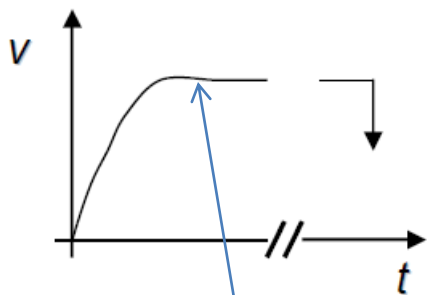
(jóval az AFM és Rtg kora előttről származó, de ma is jó megoldás)

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

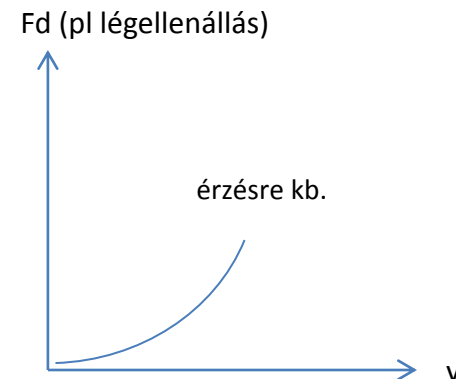
Newton-II. törvénye: $\Sigma F = m \cdot a$

és

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

A súrlódási erő:

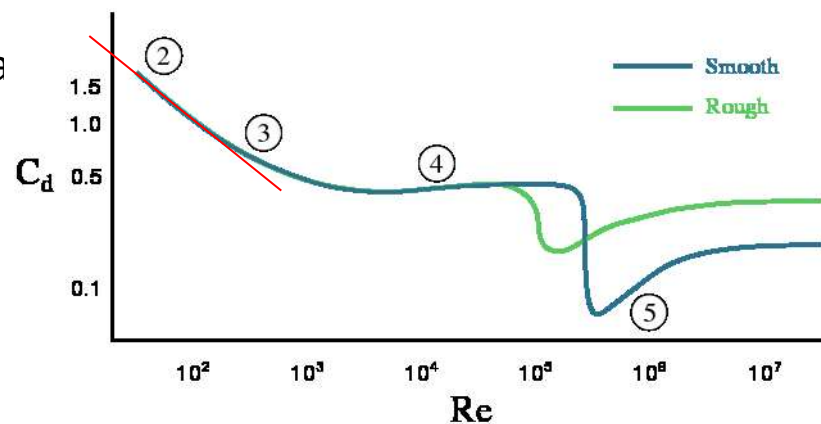
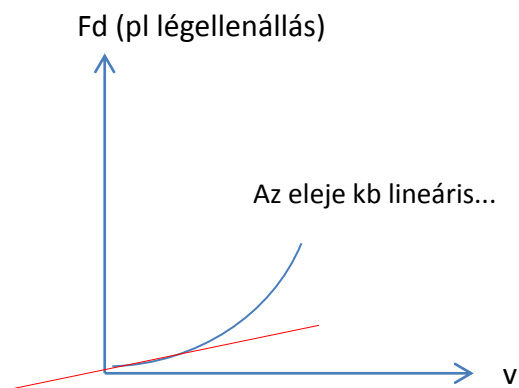
Általánosan: $F_d = \frac{1}{2} \rho v^2 \cdot C_d \cdot A$, ahol A a keresztmetszet és C_d súrlódási együttható.



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 a átmérő.

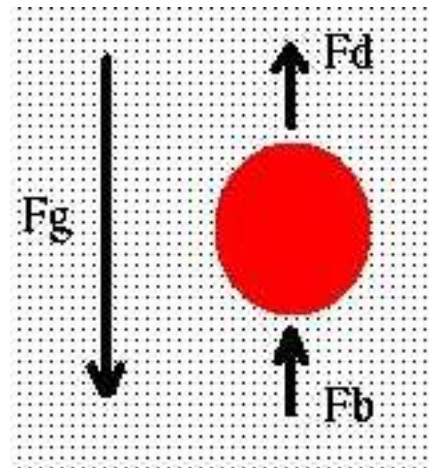


F_g : gravitációs erő, F_d : súrlódási erő, F_b : felhajtóerő.

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

és

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



$$F_g = m \cdot g$$

$F_d = f \cdot v$, 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:

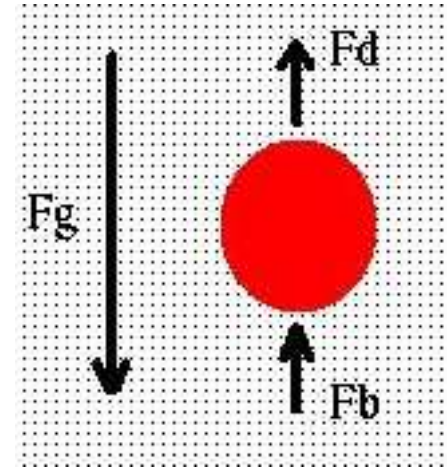
F_g : gravitációs erő, F_d: súrlódási erő, F_b: felhajtóerő.



$g = 9.8 \text{ m/s}^2$ helyett a centrifugában

$a = \mathbf{r\omega^2}$ gyorsulást érzékel a részecske. (ω a szögsebesség)

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



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

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

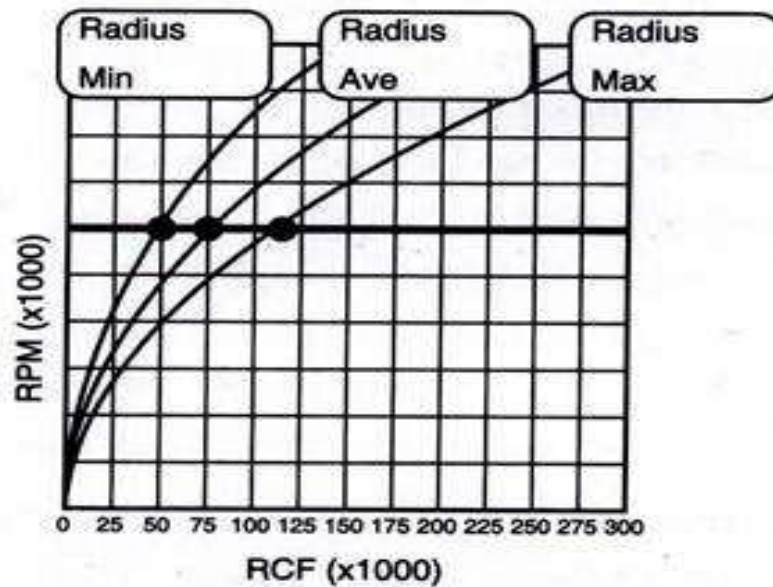


Hasznos egyenletek

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

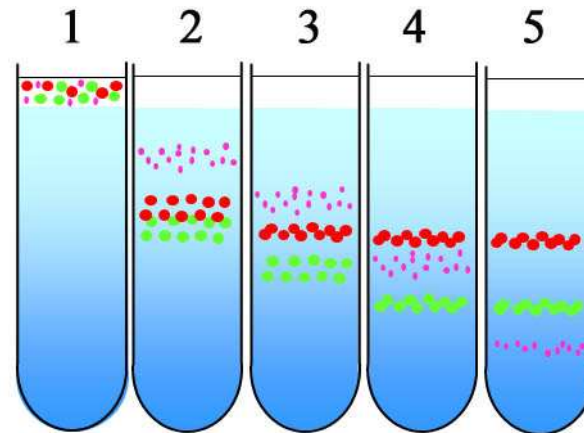
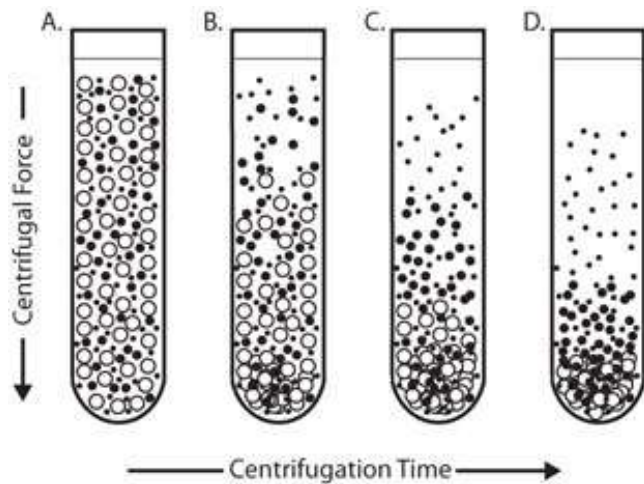
RCF: relative centrifugal field = relatív centrifugális erő

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

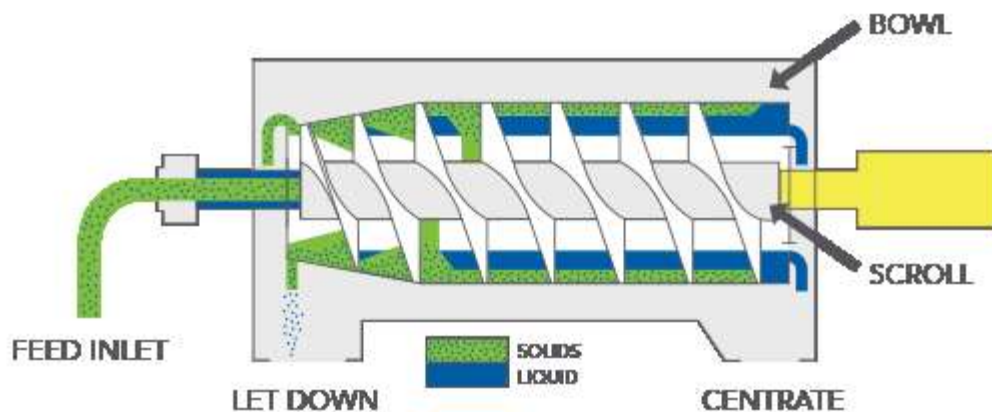
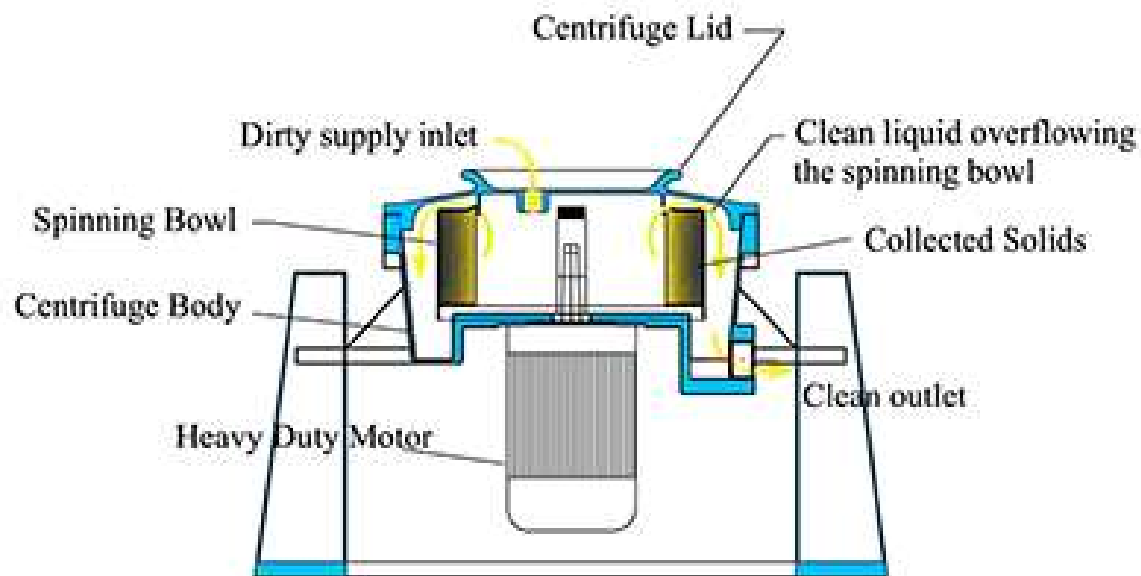


A centrifugacsőben haladva a sugár kicsit változik, ezzel az RCF is.

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



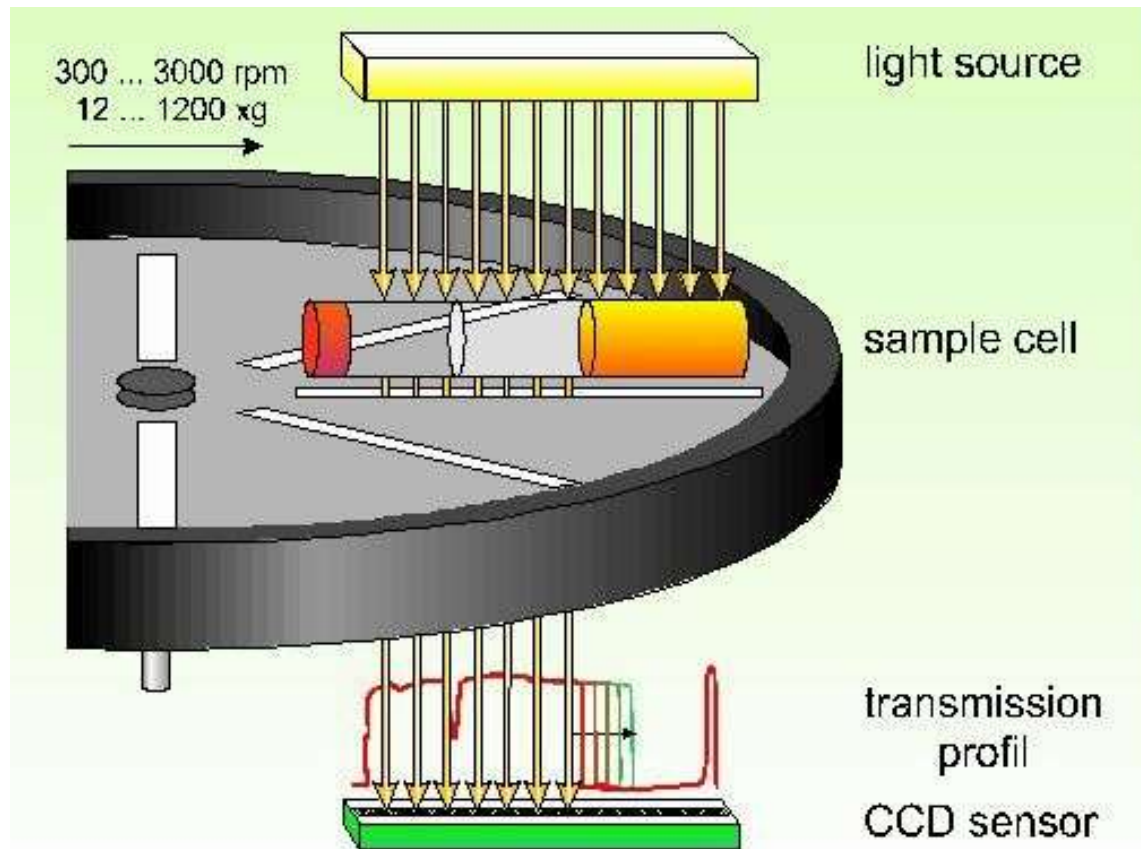
centrifugális szeparátor



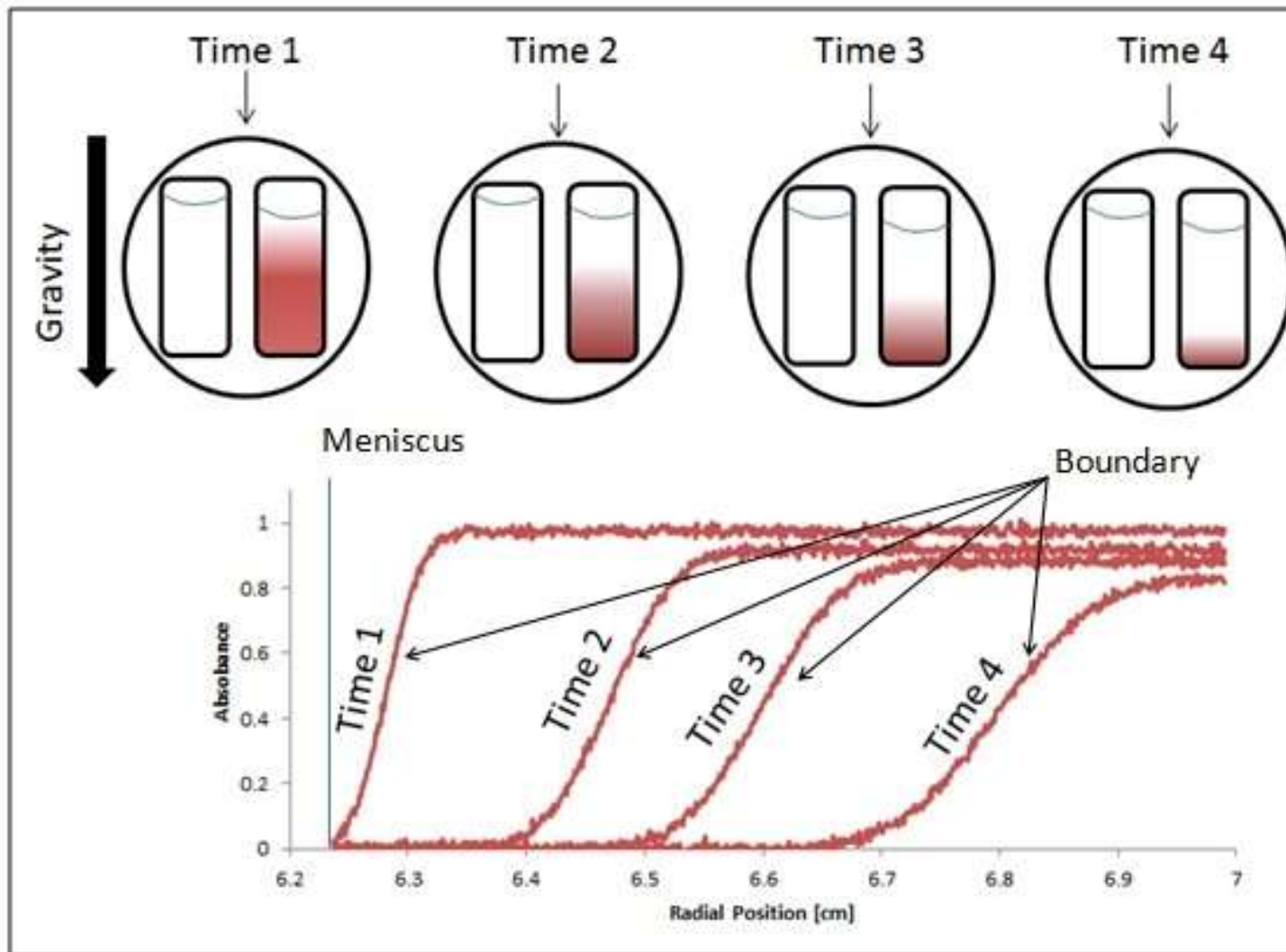
Hétköznapiakban:
gyümölcscentrifuga



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



A határréteg folyamatosan mozog amíg el nem éri az edény alját

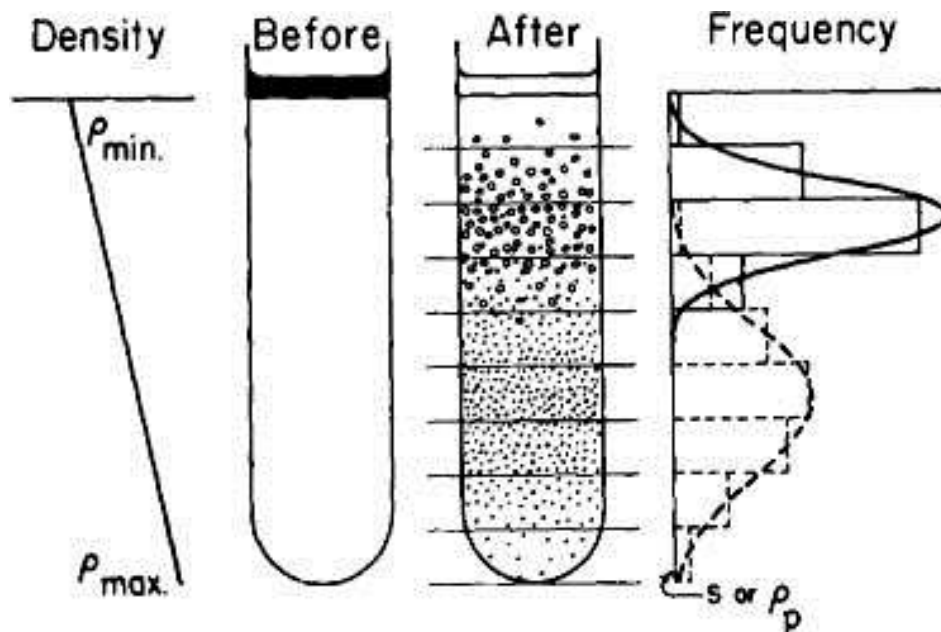


Csak az f alaki tényezőt nem ismerjük.

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, $\rho_{max} < \rho_{pmin}$*

Centrifugation: \rightarrow *Incomplete sedimentation*

Abscissa of frequency distribution: *Sedimentation coefficient*

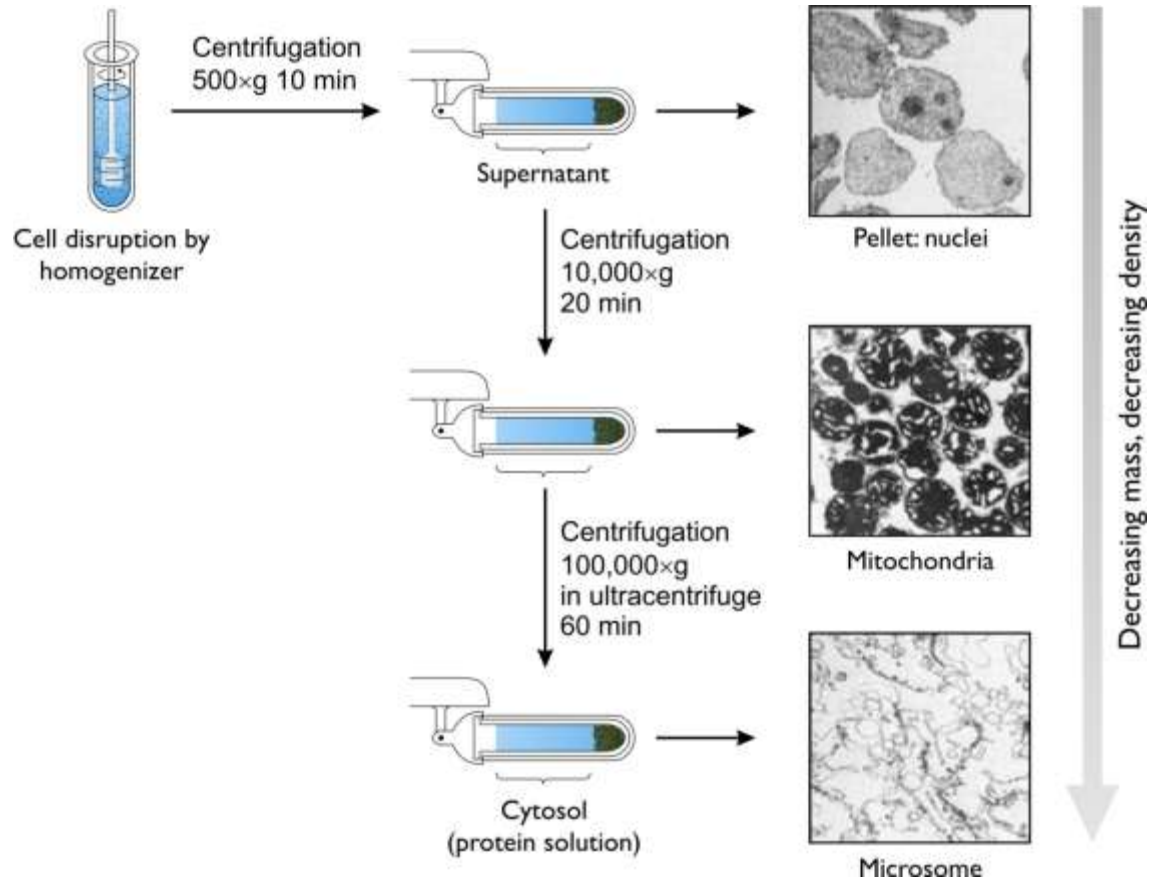
2. Density equilibration

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

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

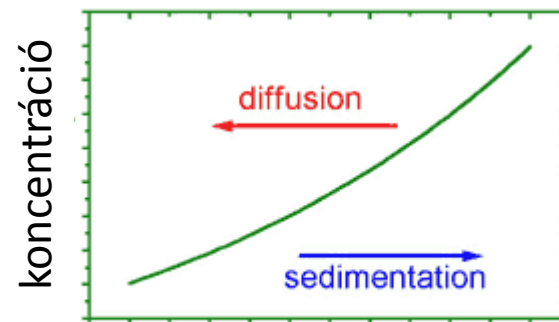
Behelyettesítve a Boltzmann formulába, és ln-t véve:

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

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.

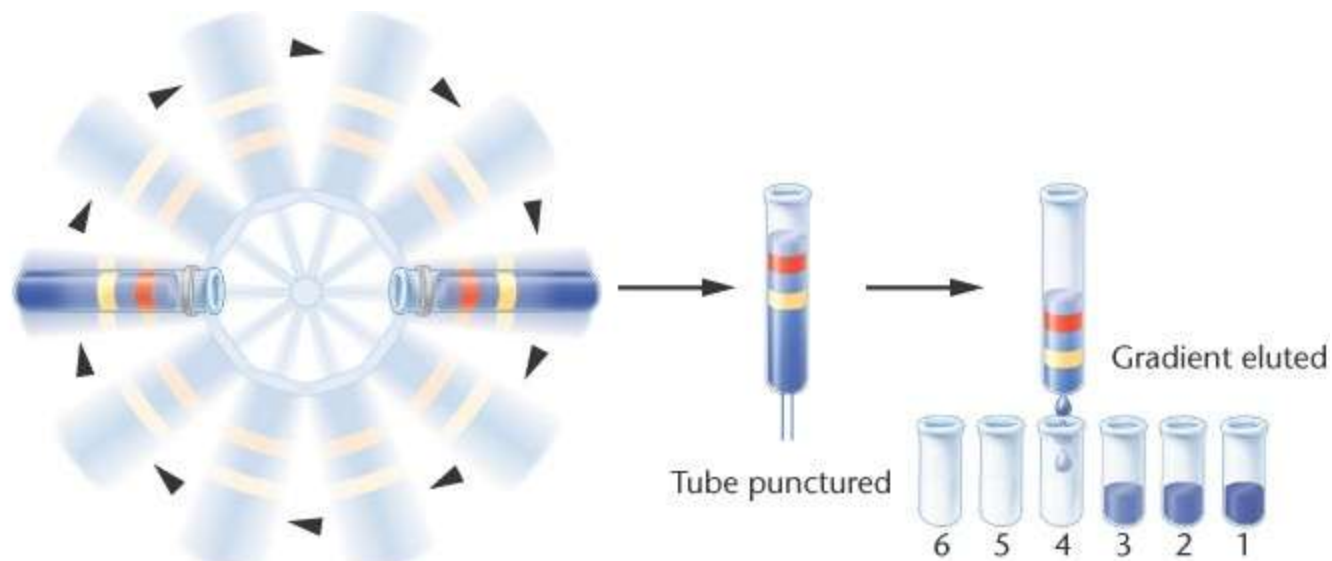
Vagyis ehhez a módszerhez nem kell diffúziót mérni, pontos tömegmérést tesz lehetővé (kb.1-2%), de tudni kell a sűrűséget.

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

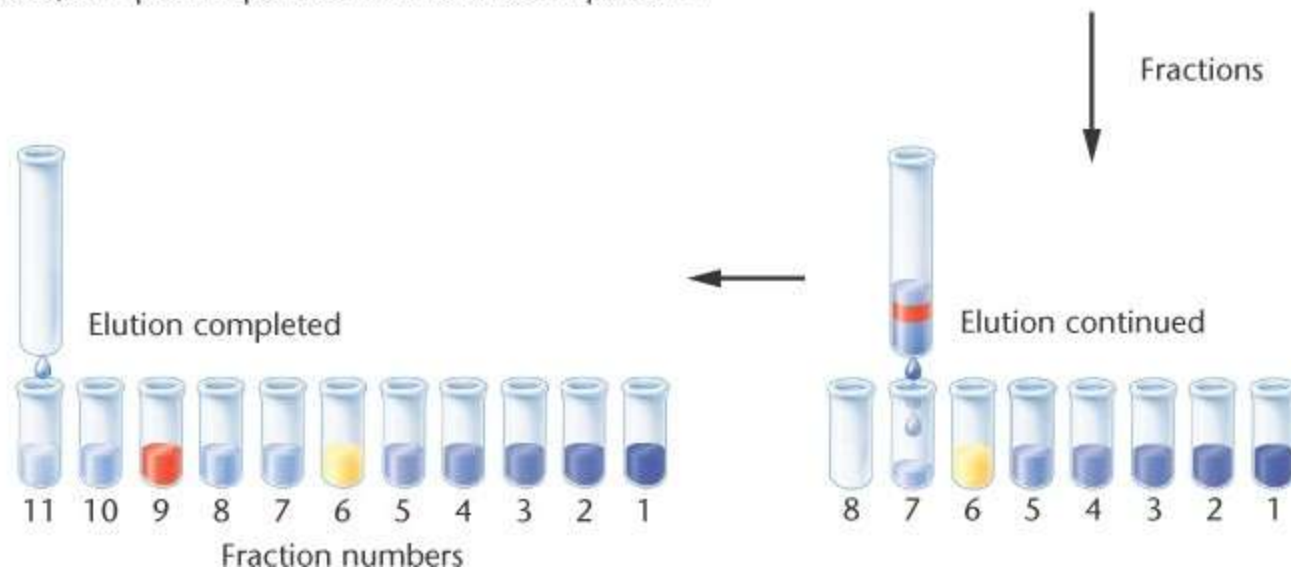


Kiegészítő anyag

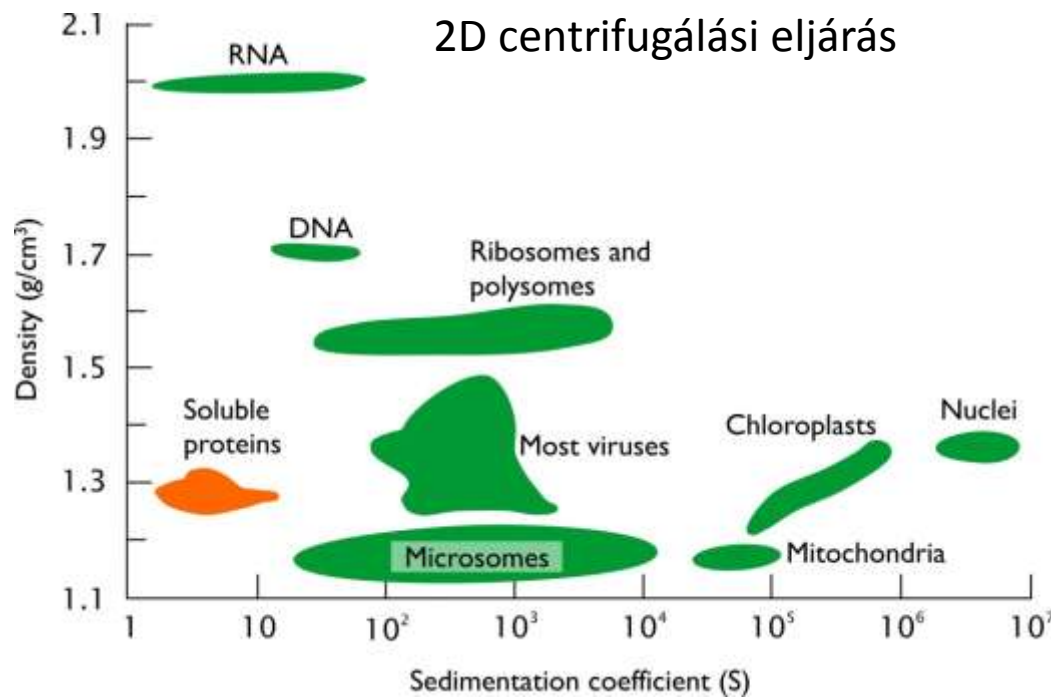
Sugárirányú távolság a csőben



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

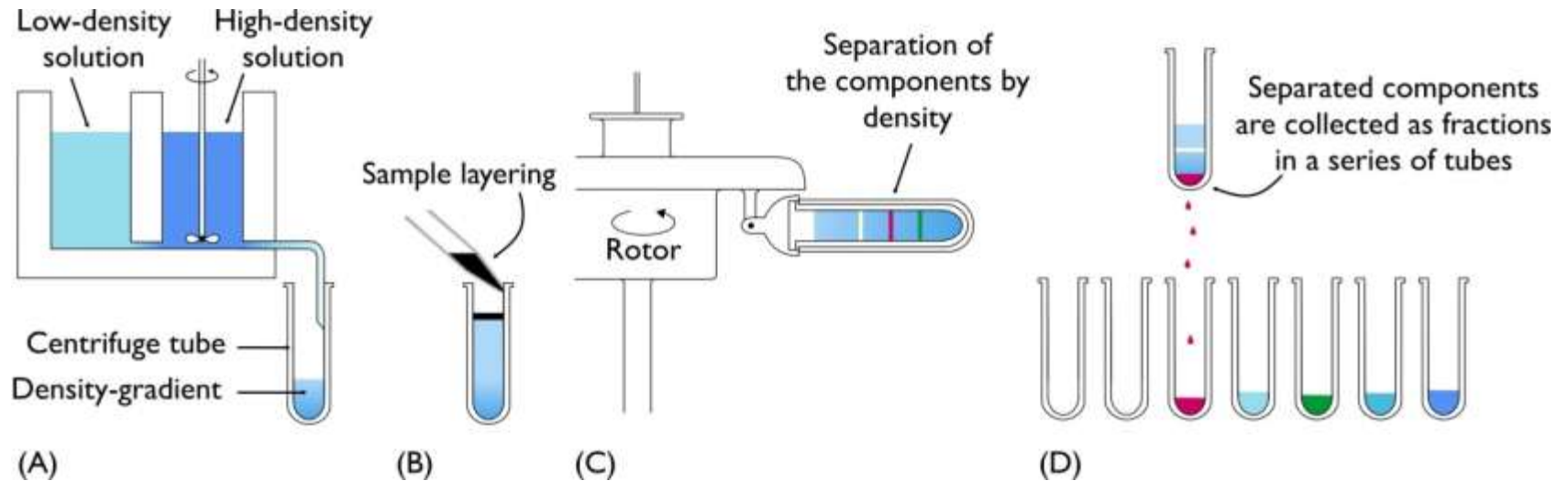


2D centrifugálási eljárás



Szétválasztás S alapján
differenciál-centrifugálás

Aztán a sűrűség alapján:
gradiens centrifugálás

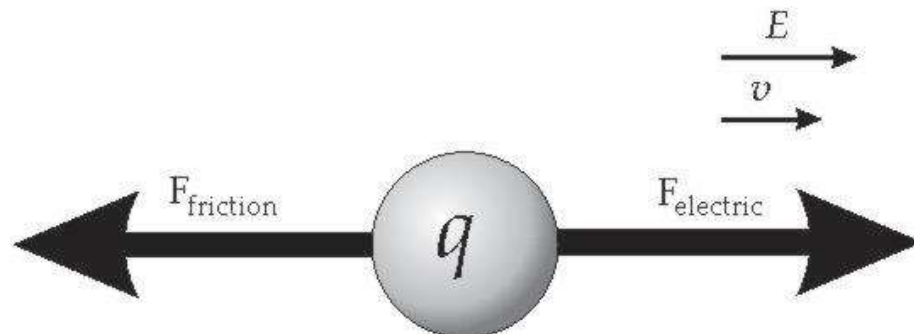


Electroforetikus eljárások

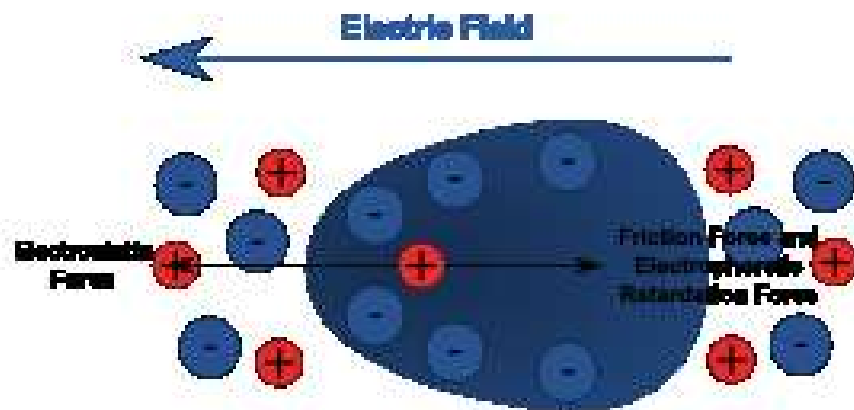
$$\mu_e = \frac{v}{E}$$

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

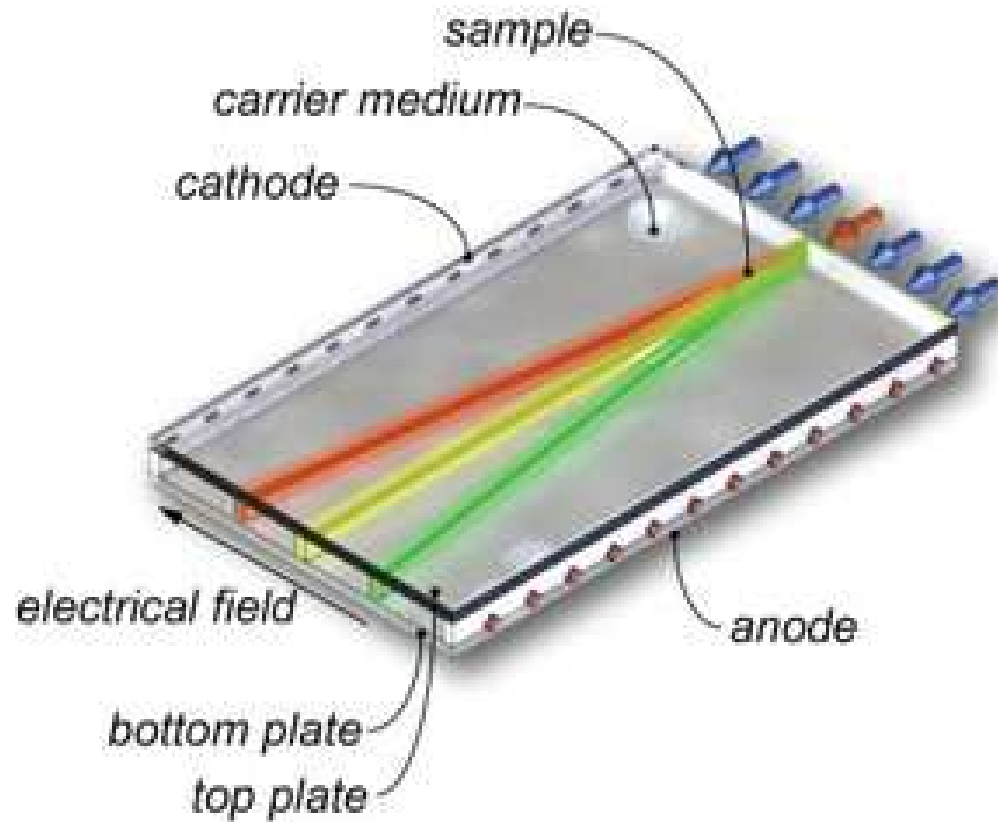
Semleges oldószerben

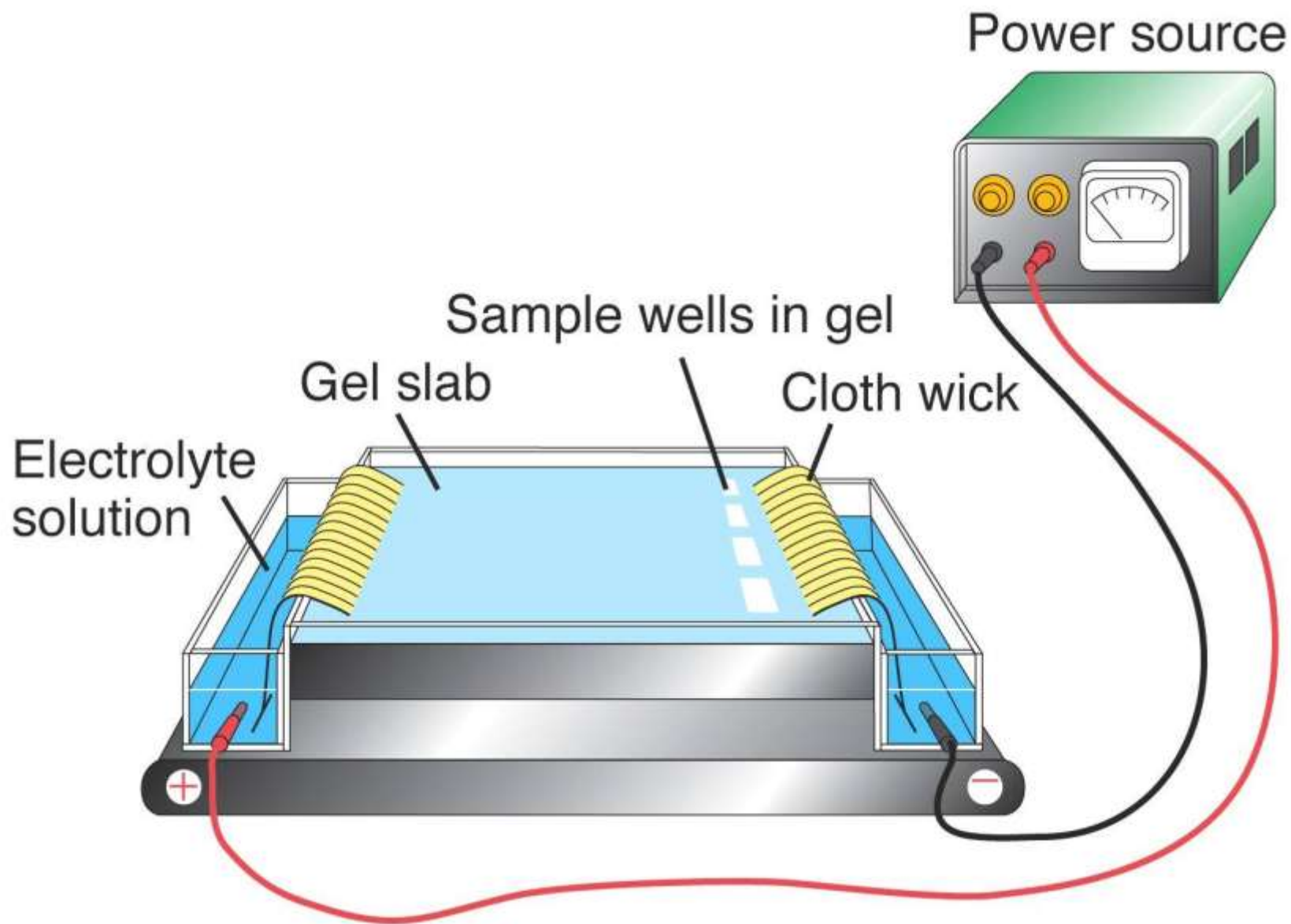


Poláris oldószerben van egy plusz visszatartó erő



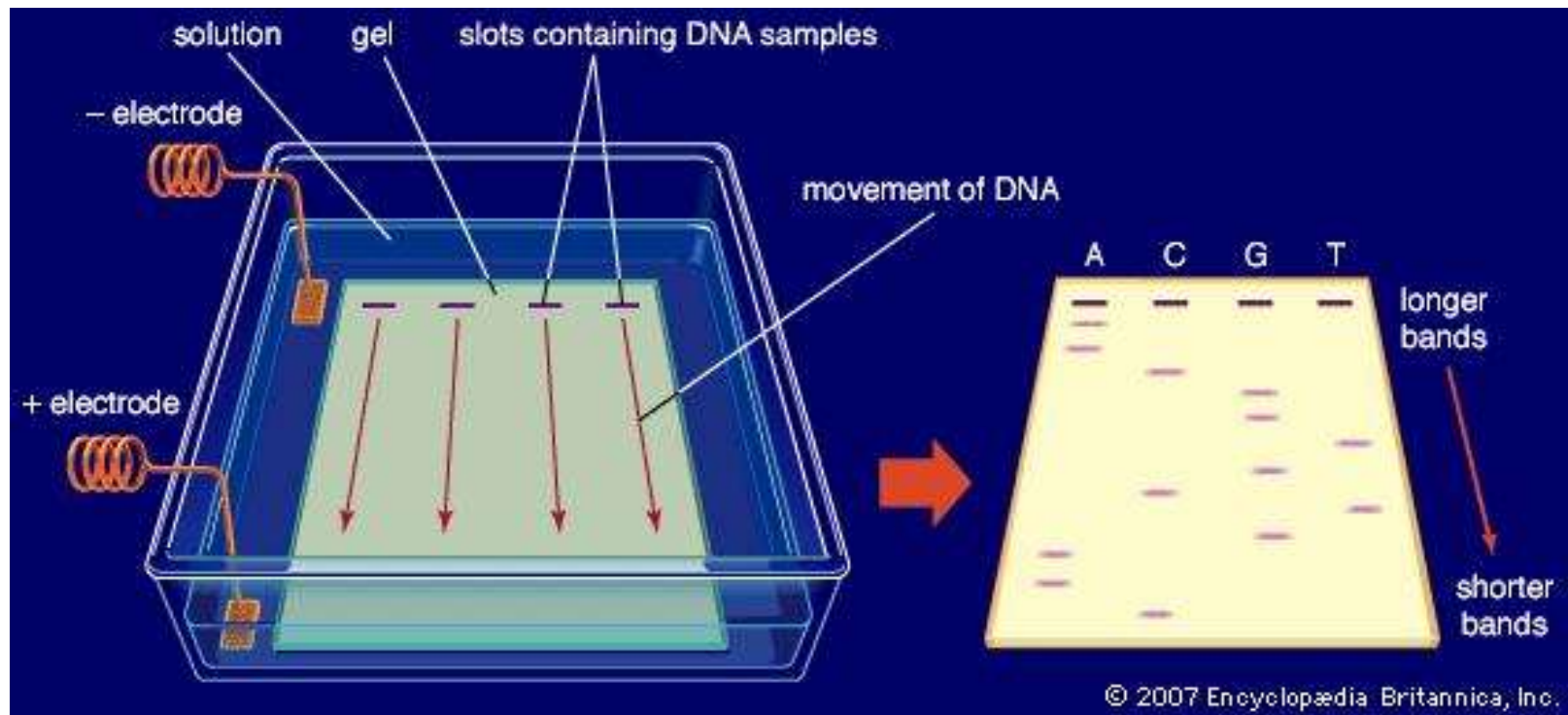
(szabad) áramlásos elektroforézis





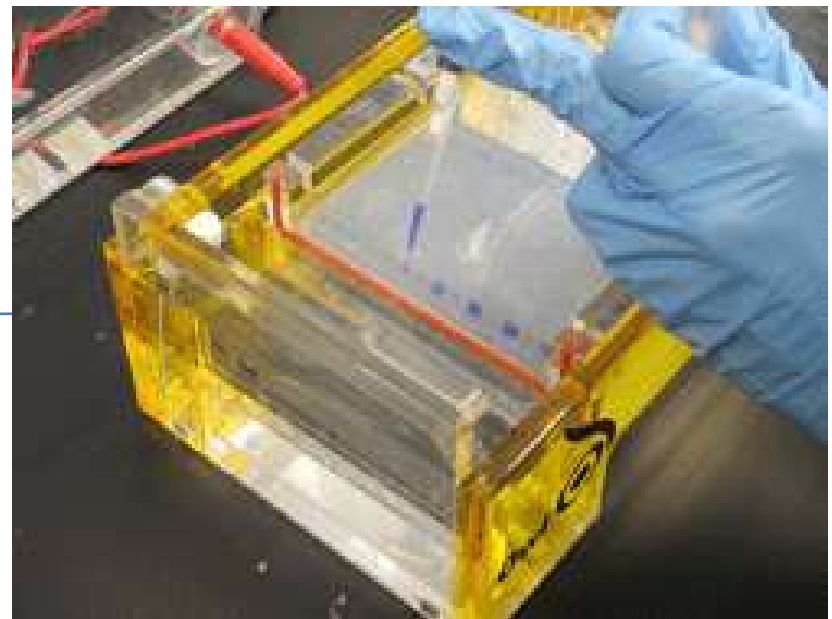
Gél elektroforézis

Ez a **kromatográfiás eljárások** családjába tartozik

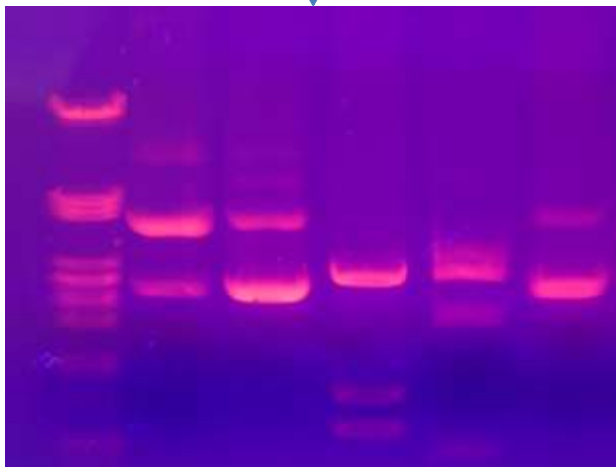
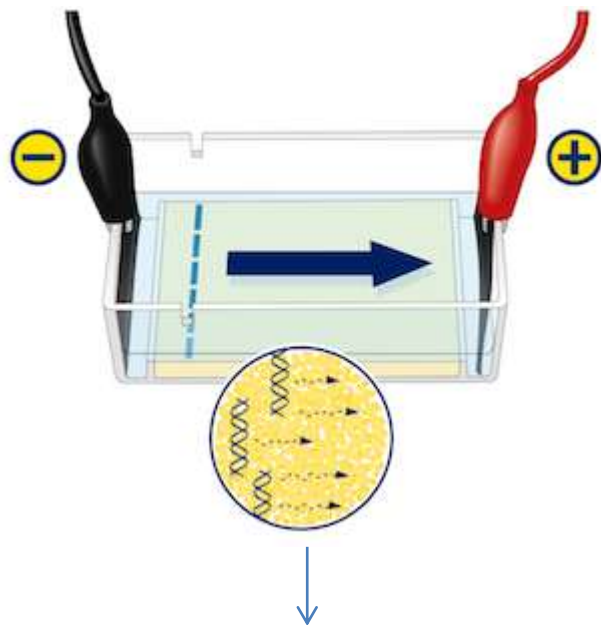


Kromatográfia: kölcsönhatás az álló mátrix, és a mozgó oldat között, ami elválasztást eredményez.

Gél töltés



futtatás



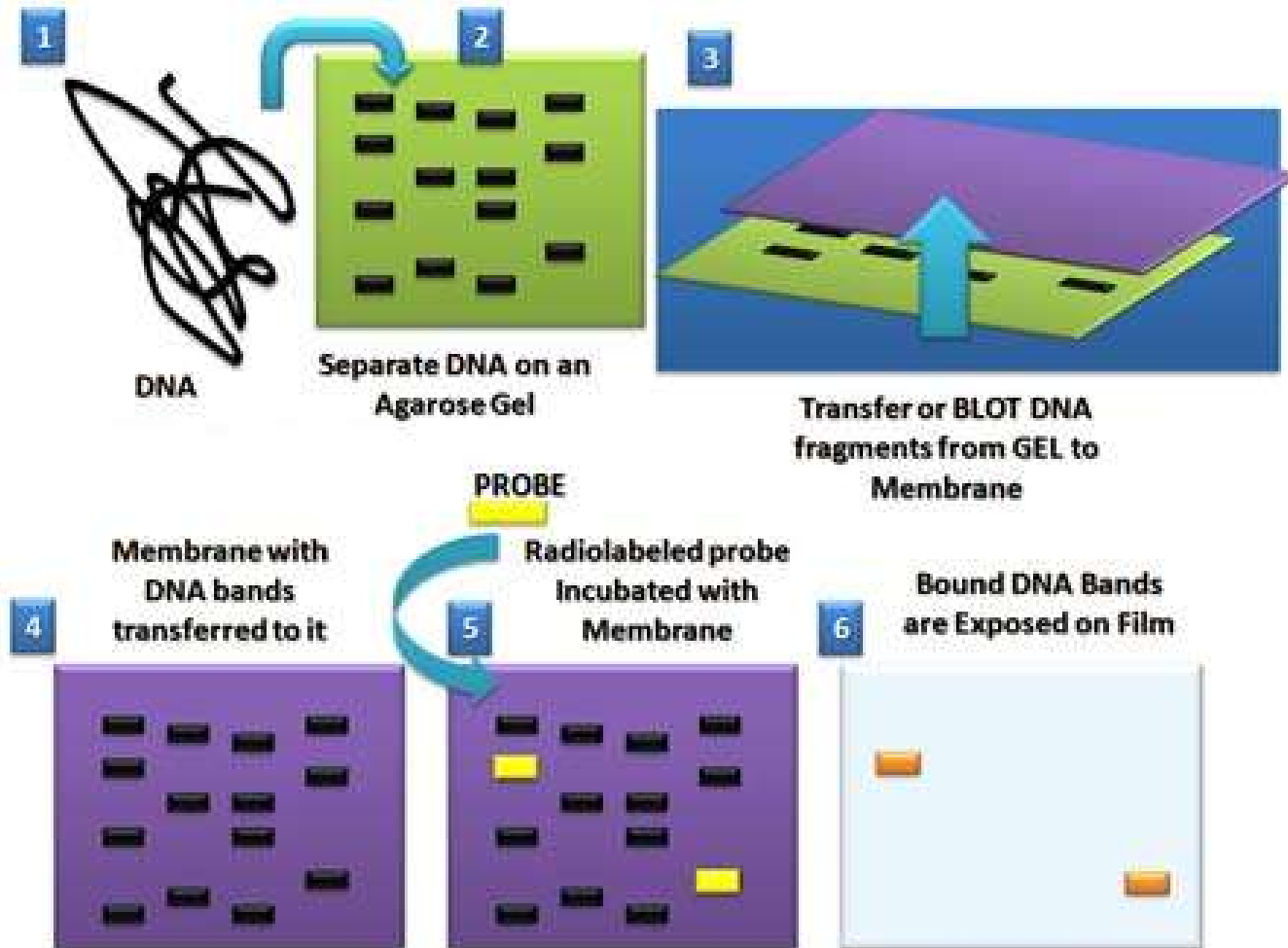
jelölés (itt pl. in-situ)

Gélben jelölni nem könnyű.

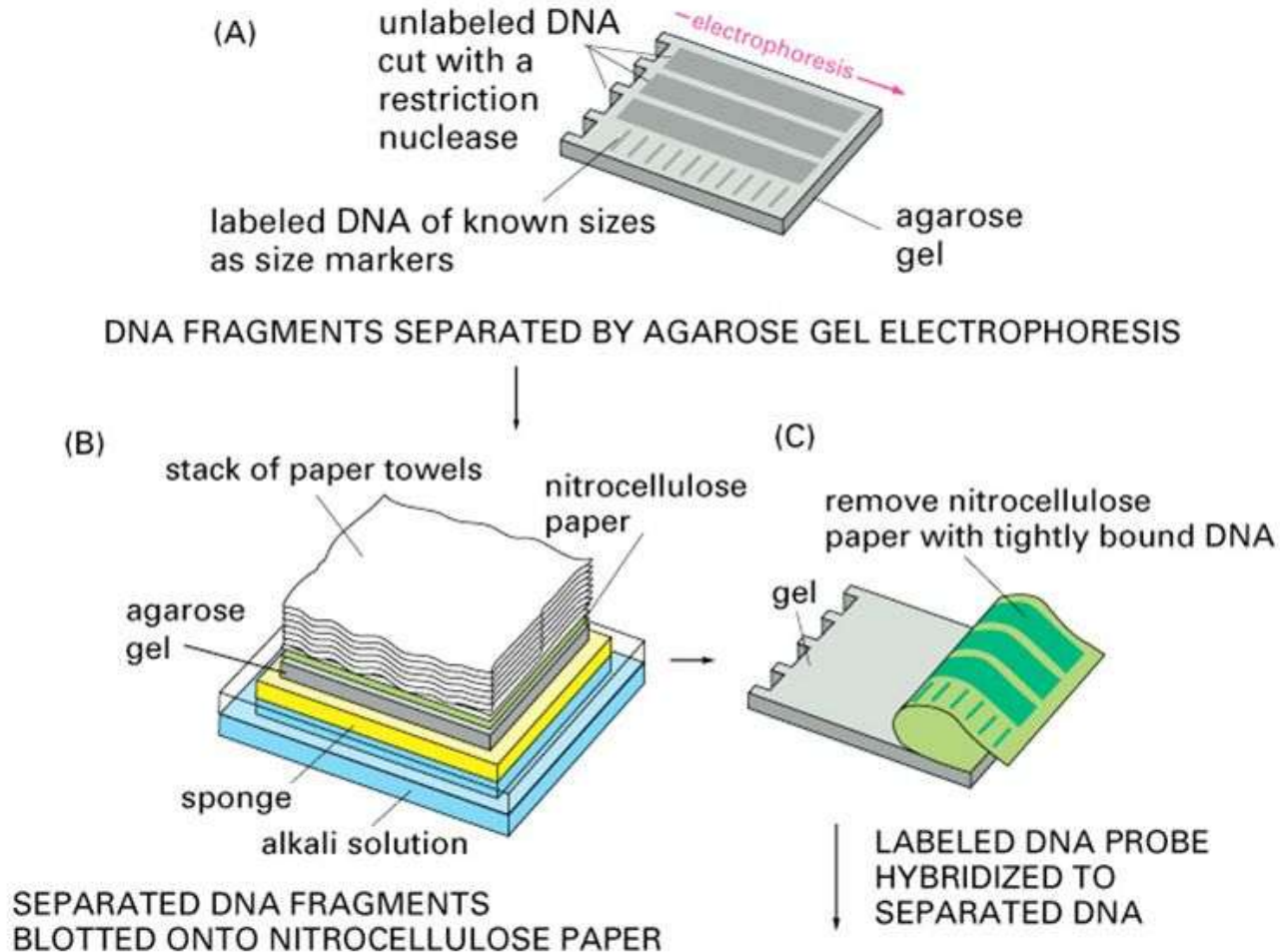
„Blottolás” : átvisszük (és fixáljuk) a gélben kialakult mintázatot egy stabil hordozó membránra. Ebben a mintázat már nem változik meg.

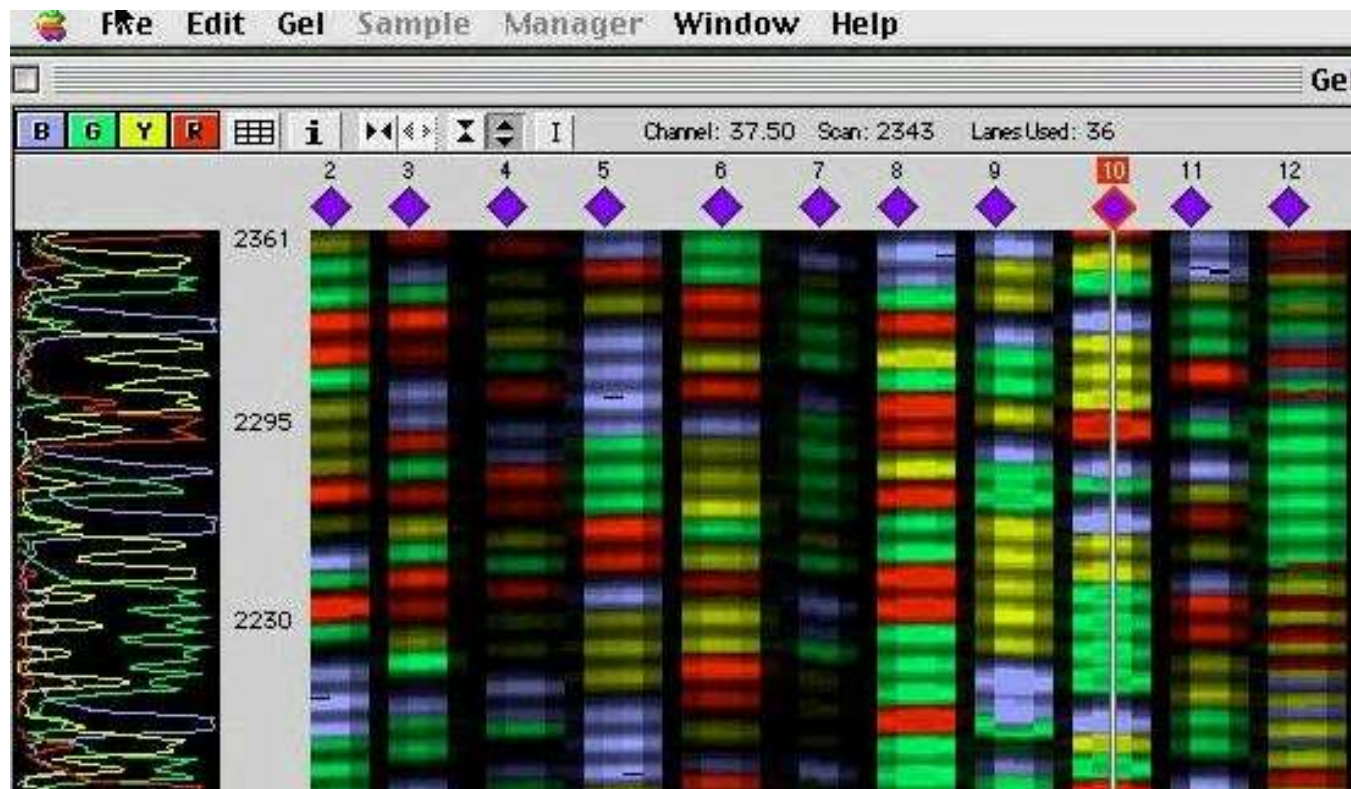
Ezután biztonsággal jelölhető akár sok lépésben is.

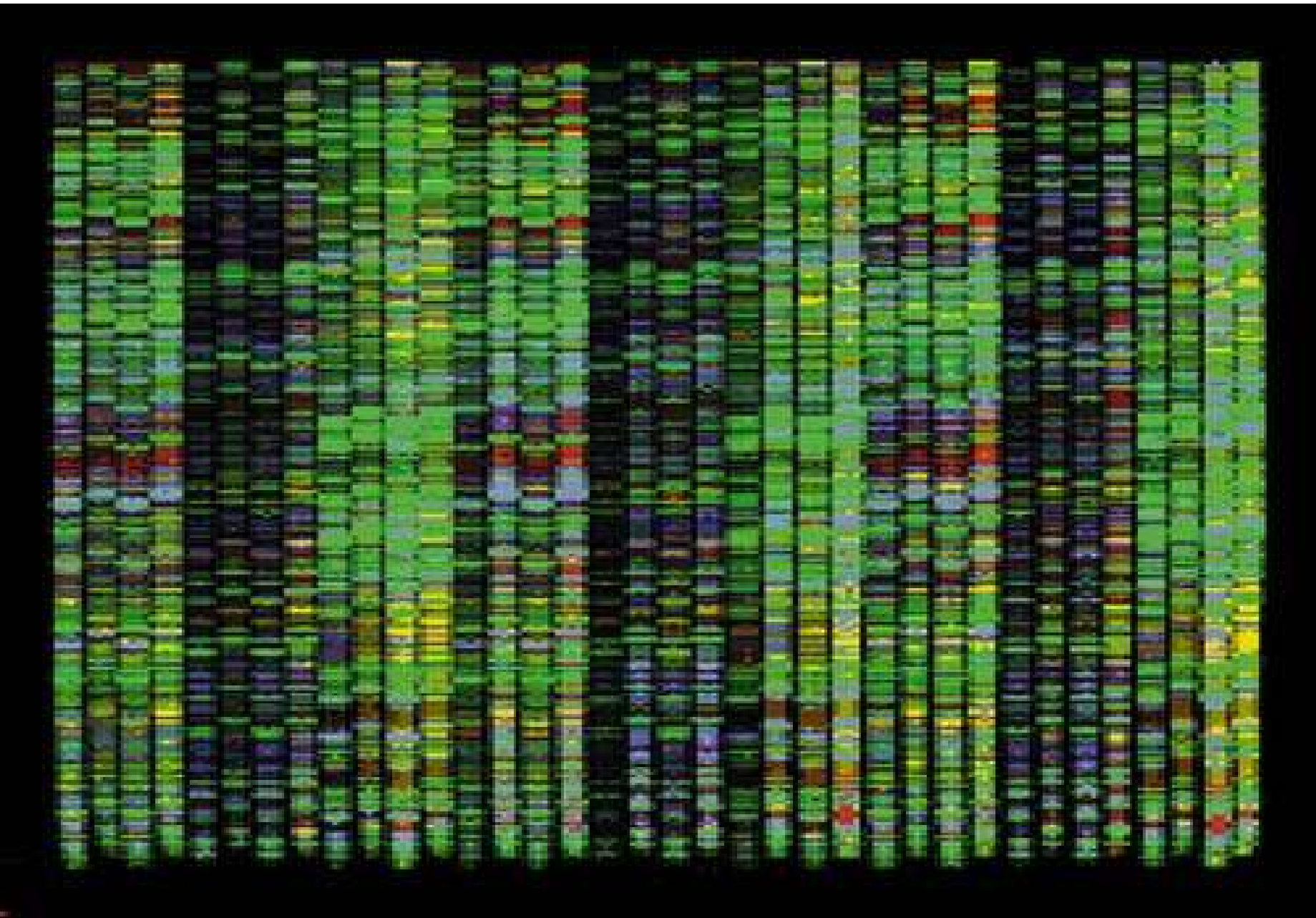
Southern blot (Edwin Southern)

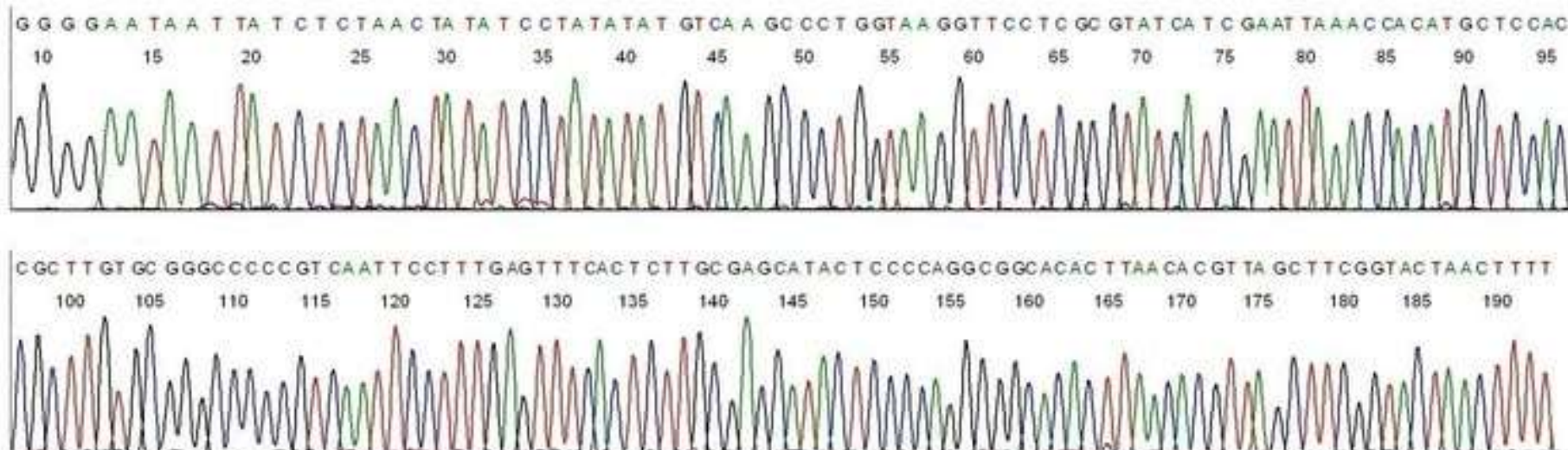


Southern Blot (DNA)





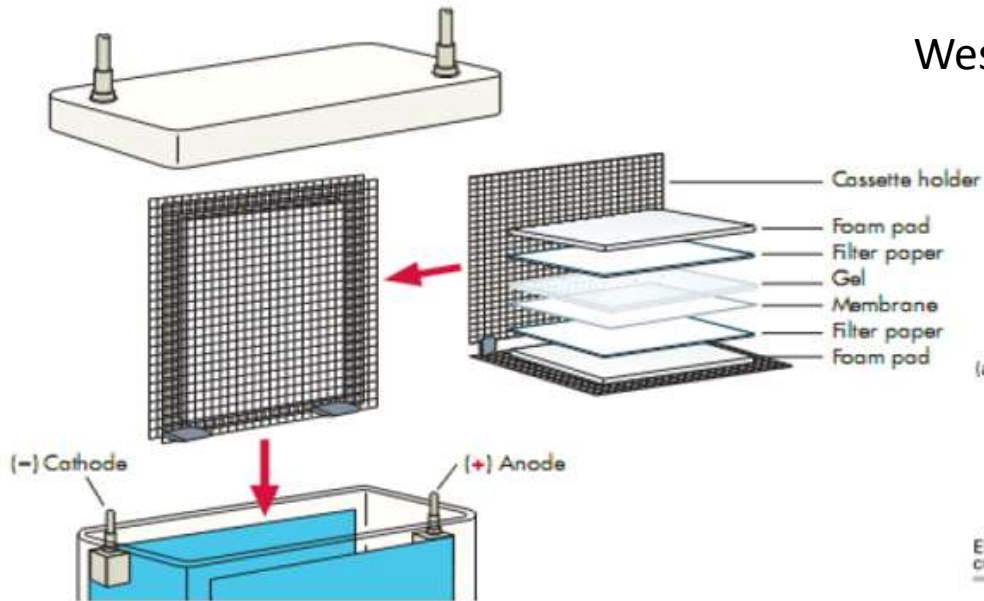




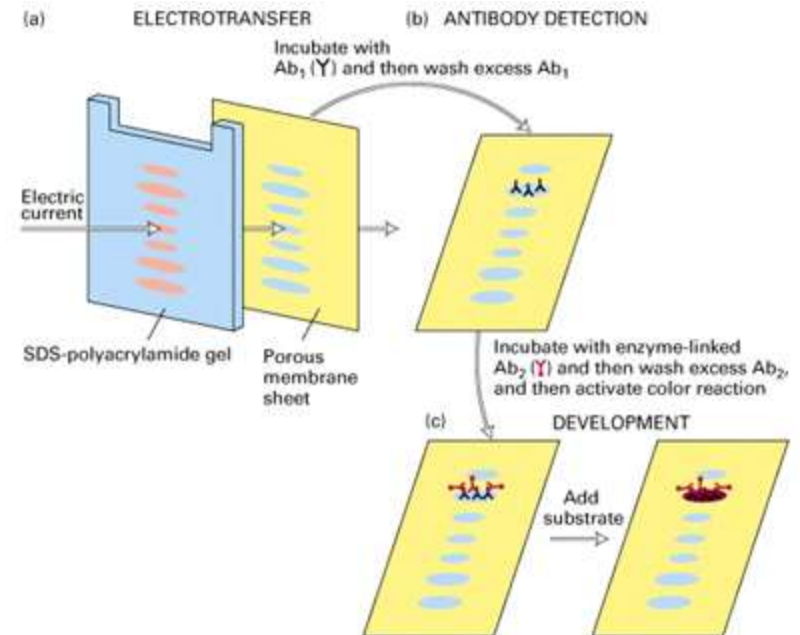
Borrelia burgdorferi CA382, complete genome
 Sequence ID: [gbKP005925.1](#) Length: 910736 Number of Matches: 1
 Range 1: 445107 to 445291 [GenBankGraphics](#)

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

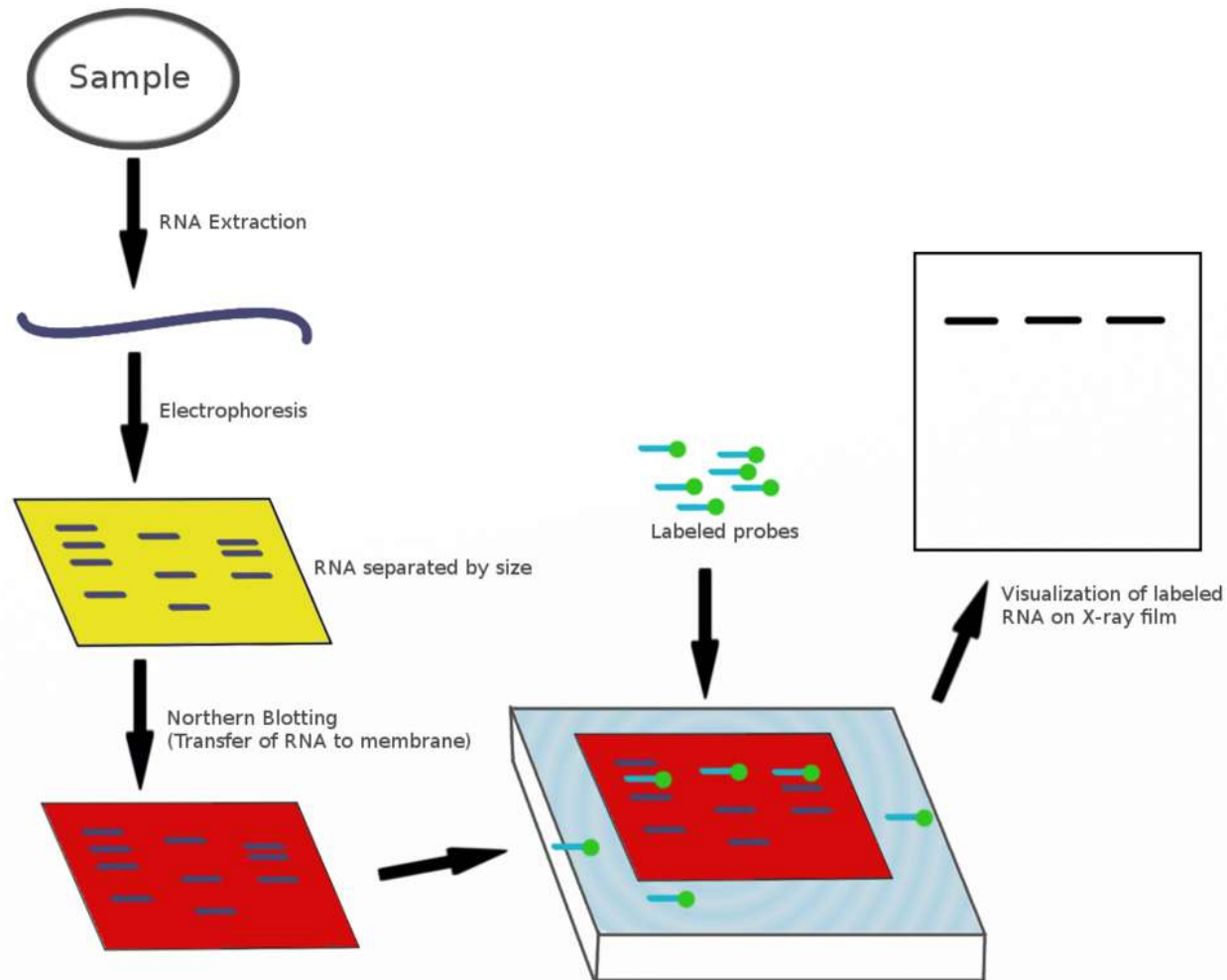
Western és Northern blot: játék az eredeti elnevezéssel



Western blot: fehérje kimutatás

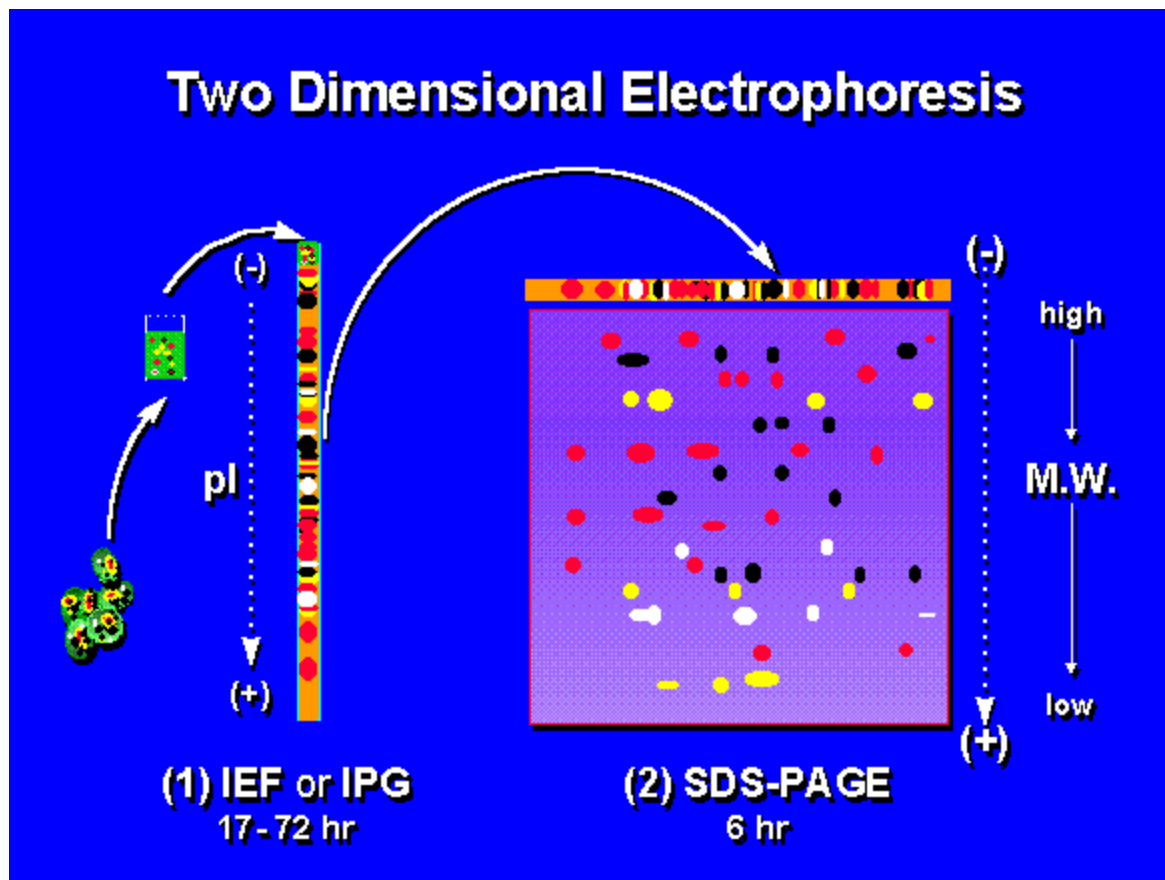


Northern blot: RNS kimutatás, expressziós mintázatok meghatározása



Két dimenziós elektroforézis:

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

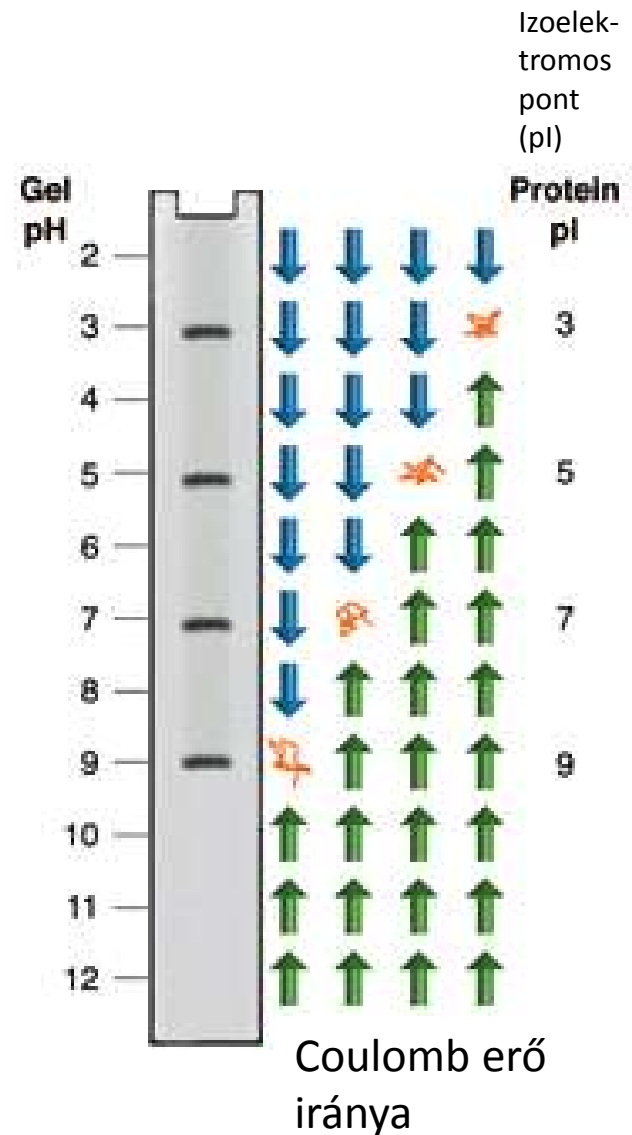


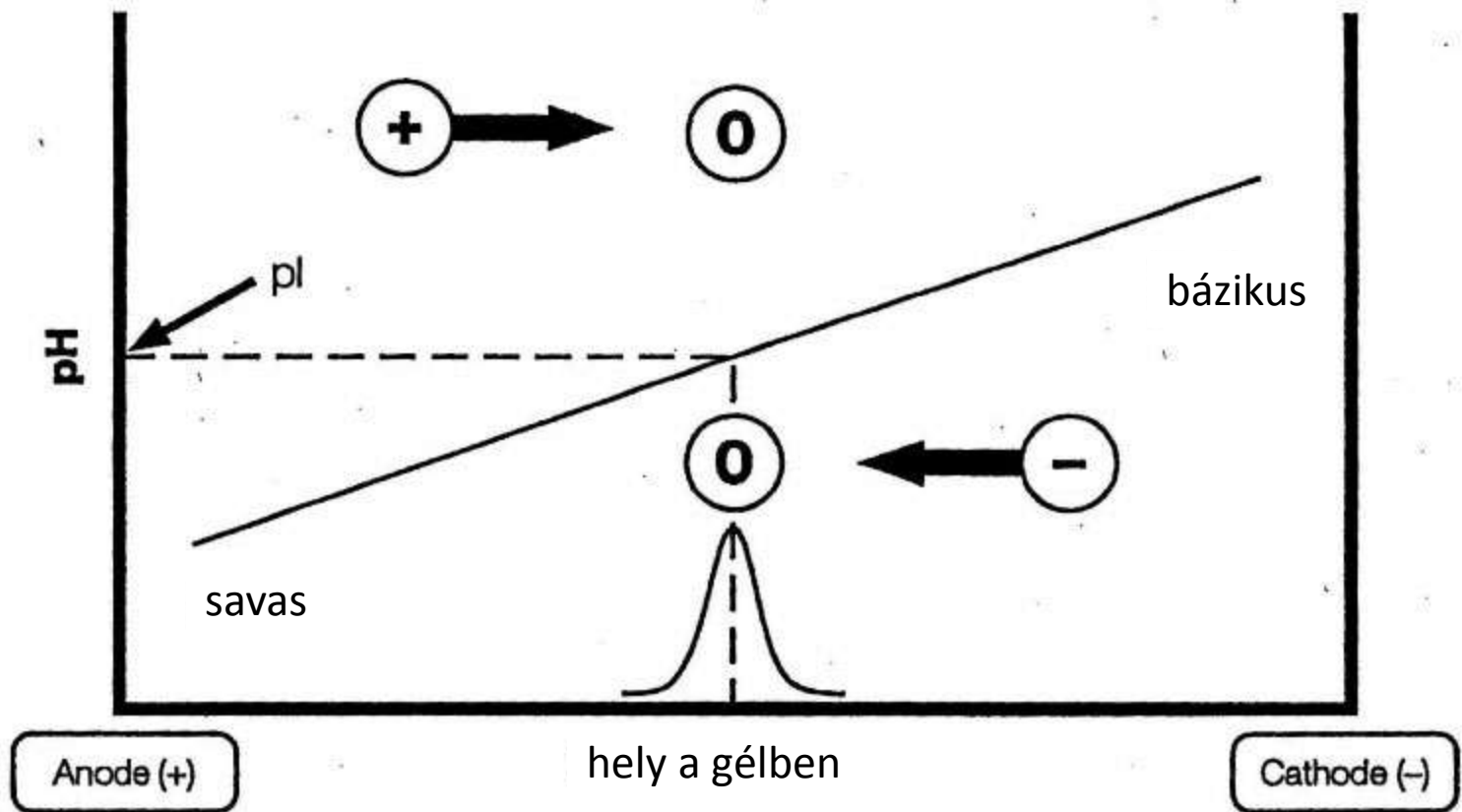
Izoelektromos fókuszálás

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

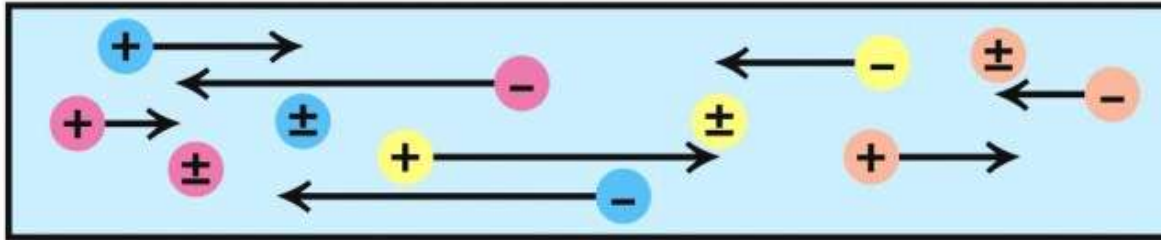




(A)

Low pH
(+)

alacsony
pH



High pH
(-)

magas pH

Low pH
(+)



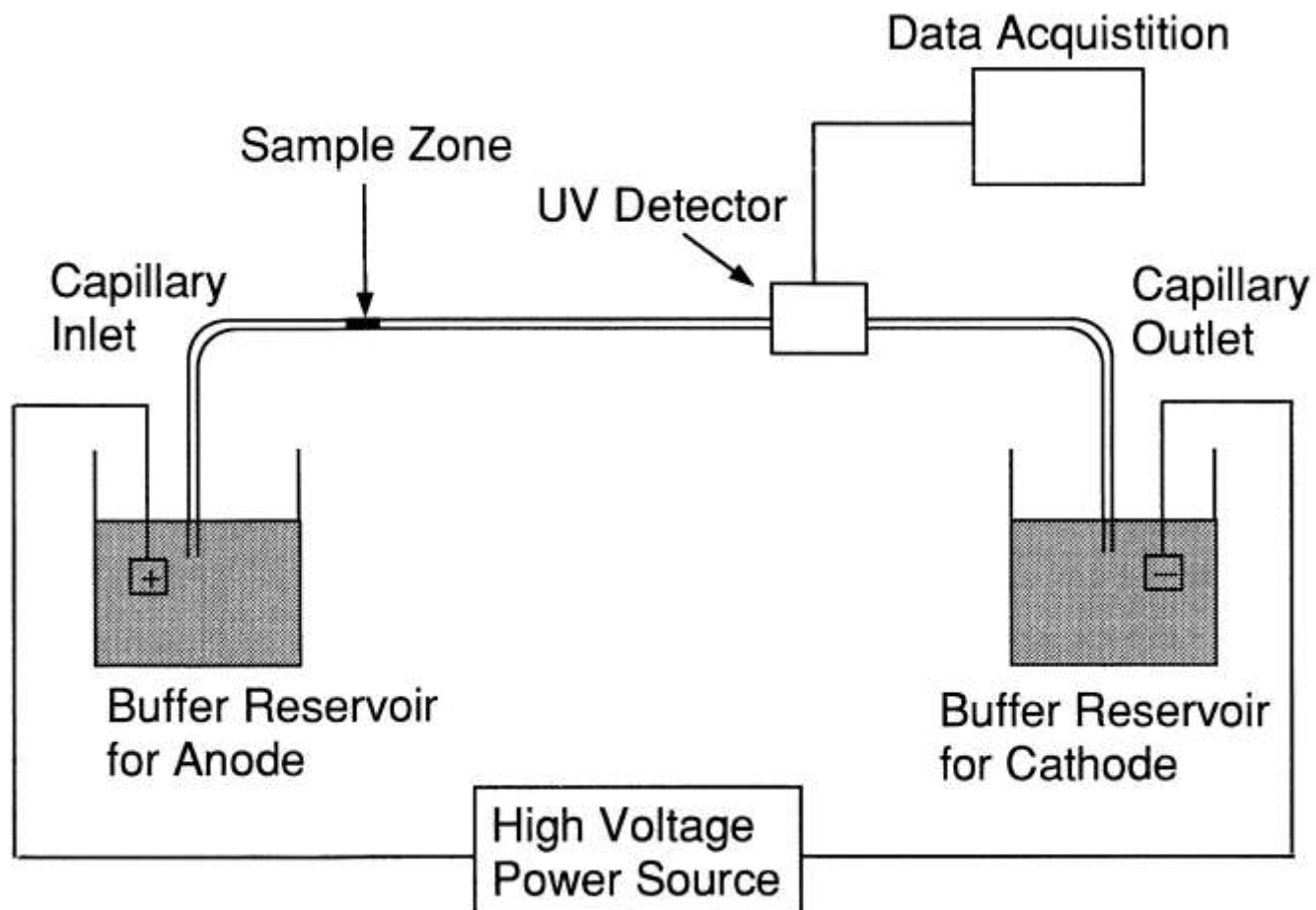
High pH
(-)

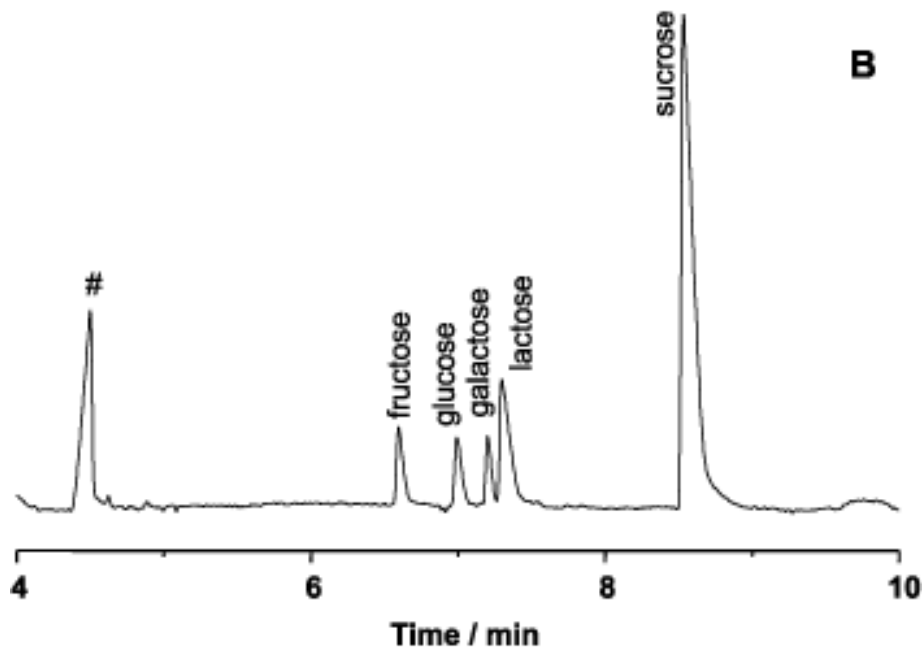
Figure 3.11

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.

