

## Szedimentációs és elektroforetikus módszerek, Tömegspektrometria gyógyszerészhallgatóknak

Dr. Bozó Tamás  
egyetemi adjunktus  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet  
2022. május 5.



## 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

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



Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

2

## Szedimentáció I.



A **szedimentáció** részecskék (molekulák) oldatban (szuszpenzióban) való ülepedésének folyamatát jelenti, amely valamilyen erő (gravitáció, centrifugális erő, elektromosság) hatására valósul meg. A kiülepedett részecskéket üledéknek (laboratóriumi gyakorlatban pelletnek), az oldat fennmaradó részét felülzónának nevezzük. (sedeo (lt); út; sedimentum (lt); üledék)



Virgin Formation,  
Utah délnyugati része, USA



Duna delta felkötése Kr.u. 1-5i



A Duna deltája az őrdei



Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

3

## 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.

$$F_s = f \cdot v$$

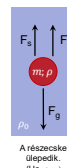
Csak kis sebességeknél ad jó közelítést!

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

v: sebesség

$$u: \text{mobilitás} = \frac{v}{F}$$

gömbre:  $u = \frac{1}{6\pi\eta r}$



A részecske ülepedik.  
(Ha  $\rho_s > \rho_f$ )

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

$$F_f = \rho_f \cdot V \cdot g$$

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

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

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

**Gravitációs erő:**  
 $F_g = m \cdot g$



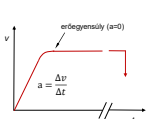
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

4

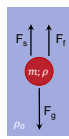
## Szedimentáció IV.

### 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  $\rho_s > \rho_f$ )

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

$$\text{Erőegyensúlyban: } \Sigma F = 0$$

$$F_g = F_f + F_s$$

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

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

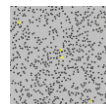


Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

5

## Szedimentáció vs. Brown mozgás

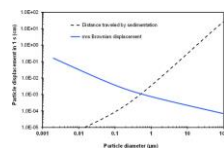
### Probléma: Brownian mozgás



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

Particle (SC)	Diameter, microns	Brownian velocity, m/s	Sediment motion velocity, m/s
RBC	8	$1.5 \times 10^{-6}$	$5.5 \times 10^{-6}$
Latex ball	4	$5.5 \times 10^{-7}$	$1.7 \times 10^{-6}$
Latex ball	2	$1.5 \times 10^{-7}$	$4.3 \times 10^{-7}$
Latex ball	1	$4.2 \times 10^{-8}$	$1.1 \times 10^{-7}$
Milk fat globule	1	$5 \times 10^{-8}$	$2.7 \times 10^{-7}$
Latex ball	0.5	$1.2 \times 10^{-8}$	$2.7 \times 10^{-8}$

Chien et al. Romanán J. Biophys. 2010



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

Genademar P. Nanotechnology, 2015

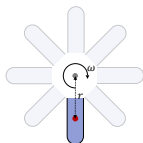


Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

6

## Centrifugálás – elméleti alapok I.

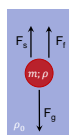
Fizikai alapok:



Szögsebesség:

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

$\Delta\phi$ : szögelfordulás  
 $\Delta t$ : idő



A részecske gyorsabban üledszik (Ha  $\rho > \rho_0$ )

Súrlódási 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: centripetális (forgáshál szarmas) gyorsulás

$$F_c = m \cdot a$$

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

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

forrás sugara

$$E_r = F_c - F_f$$

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

## Centrifugálás – elméleti alapok II.

Erőegyensúlyban:

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

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



Theodor Svedberg  
1884-1971  
1926 kémiai Nobel-díj

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

Egysége: Svedberg; 1 Sv =  $10^{-13}$  s

Néhány példa:

Subcellular entity	Sedimentation coefficient (S)	Diameter (μm)
Nucleus	$10^6$ to $10^7$	3-12
Mitochondria	$10^5$ to $5 \times 10^4$	0.5-4
Lysosomes	$4 \times 10^5$ to $2 \times 10^6$	0.5-0.8
Peroxisomes	$4 \times 10^6$	0.5-0.8
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)

\*Schmidt (1973)

\*Luttmann et al. (2006)

\*Griffith (1994)

Lawrence, Janice & Stewart, Greg. (2010). Purification of viruses by centrifugation.

## Centrifugálás – elméleti alapok II.

Erőegyensúlyban:

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

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

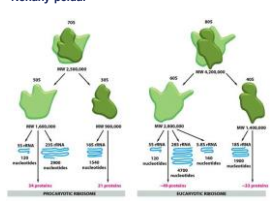


Theodor Svedberg  
1884-1971  
1926 kémiai Nobel-díj

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

Egysége: Svedberg; 1 Sv =  $10^{-13}$  s

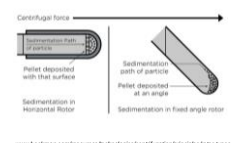
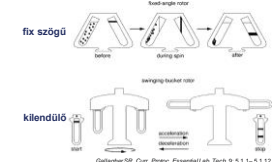
Néhány példa:



## Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – I.

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

**Rotorok:**

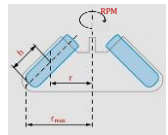


## Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – II.

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

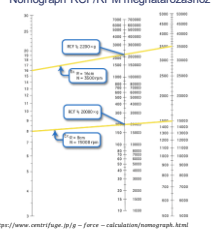
$$RCF = \frac{a}{g} = \frac{r \cdot \omega^2}{g}$$

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



<https://handing-solutions.apporh.com/>

**Nomograph RCF/RPM meghatározáshoz**



## Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – III.

	Analitikai centrifugálás	Preparatív centrifugálás
Cél	Alapvető részecsketulajdonságok vizsgálata: tömeg, méret, alak, kölcsönhatások	Összetett minták egyes alkotórészeinek kinyerése/tisztítása. Biológiai minták feldolgozása (pl. komponensszeparálás) további vizsgálatokhoz.
Példák	<ul style="list-style-type: none"> <li>Molekula/részecsketömeg meghatározás</li> <li>Szupramolekuláris komplexek</li> <li>Molekulatömegének változásainak követése</li> <li>Kül. konformációk és konformációváltozások detektálása</li> <li>Asszociáló molekulák/részecskék aggregációinak meghatározása</li> <li>etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Szubcelluláris frakcionálás</li> <li>Fehérjefrakcionálás</li> <li>DNS tisztítás</li> <li>Kolloidok szeparálása</li> <li>Vírus szeparálás</li> <li>etc.</li> </ul>
Módszerek	<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 kellenek.</li> <li>Vákuum és hűtés szükséges (Az extrém sebesség okozza gyorsulás túlmegegyedést okozza.)</li> <li>Egyes esetekben folyamatos 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>Mikronészecskék kinyerése szuszpenzióból</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Riboszómák, membrán vesikulák, fehérjék, DNS, nanorészecskék, vírusok kinyerése, ill. analitikája</li> </ul>
<b>Felhasználás</b>	Főként preparatív	Analitikai vagy preparatív

## 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>Beckman 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

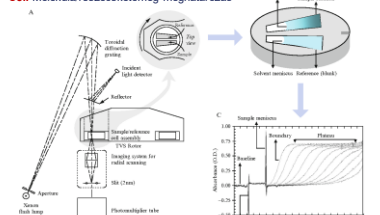


Figure 1: Two-sector centrifuge

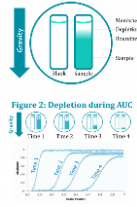


Figure 2: Depletion during ABC

## Szedimentációs sebességi módszer – II.

1. S meghatározása ultracentrifugálással:

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

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

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

$$\rho_0: \text{ könnyen meghatározható} \quad \rho_0 = \frac{m_0}{V_0}$$

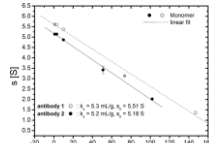
$\rho$ : meghatározható sűrűséggradiens centrifugálással

$f$  a diffúziós együtthatóból ( $D$ ) számítható:

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

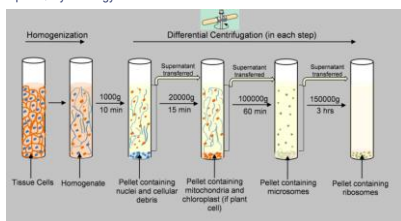
4.  $m$  kifejezhető, mint:  $m = \frac{RTS}{ND \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)}$

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



## Differenciálcentrifugálás

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



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

## Sűrűséggradiens centrifugálás – I.

**Sebesség-zonális (Rate Zonal) centrifugálás**

Sűrűséggradiens hozunk létre centrifugáción belül (közégek: cukrok, polimerak, CsCl)

Rárétegezzük a mintát (max. 10%)

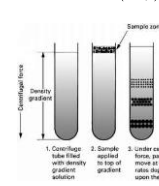
A részecskék az ultracentrifugálás során különböző sebességgel fognak ülepedni a tömegük (azonos sűrűség esetén) szerint.

Sávok = azonos tömegű részecskéfrakciók

Mivel  $\rho > \rho_0$  minden részecske leülepedik a cső aljára, ha túl hosszan centrifugálunk

Példák: fehérjék, sejtalkotók szeparálása

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

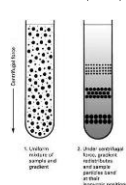


## Sűrűséggradiens centrifugálás– II.

### Izopiknikus centrifugálás

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

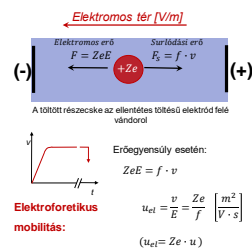
$$f \cdot v = m \cdot r \cdot \omega^2 \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$



## Elektroforetikus módszerek

### Az elektroforézis alapjai

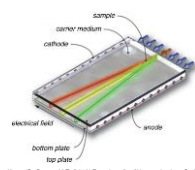
- Elektroforézis: vándorlás elektromos tér hatására
- Biológiai molekulák – általában töltötték fiziológiai körülmények között
- Egy töltött molekula/részecske elektromos térben vándorolni fog
- Ha a töltéelosztás aszimmetrikus a részecske orientálódik a térben
- A vándorlás gyorsul sebességgel történik, amíg  $F$  és  $F_e$  ki nem egyenlítődik – de nem egyensúlyi módszer
- A környezet töltései körbeveszik a részecskét → retardáció
- A részecskék az eltérő mobilitásuk szerint válnak el egymástól



## Elektroforetikus módszerek – II.

### Szabad elektroforézis

- Állófázismentes elválasztási technika
- Folyadékcélában történik az elválasztás – lamináris áramlás
- Akár különböző összetételű (pH; ionerősség, stb.) folyadékretegek alakíthatók ki (lehet natív és denaturáló pI.)
- Az áramlásra merőleges elektromos teret alkalmazunk (nagy feszültségekkel)
- A részecskék a töltéssűrűségük és/vagy izoelektrikus pontjuk szerint szeparálódnak
- Elválasztási tartomány széles: ionizált sejtekig
- Alkalmazás: fehérjekomplexek, membránfehérjék,

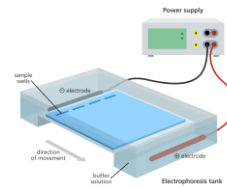


Klein JS, Bower M T. (2016) Encyclopedia of Nanotechnology. Springer, Dordrecht

## Elektroforetikus módszerek – III.

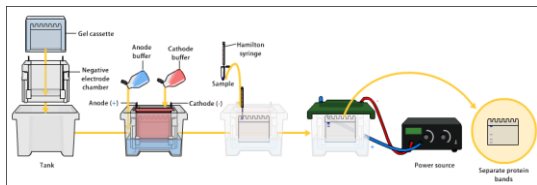
### Gélelektroforézis

- Elválasztás állófázison (gél mátrix) történik
- A gél fizikai barrier képez → lassítja a részecskék mozgását
- Kicsiny mintaterfogatok 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



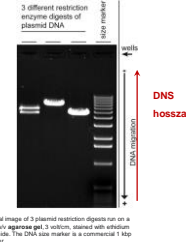
Klein JS, Bower M T. (2016) Encyclopedia of Nanotechnology. Springer, Dordrecht

## Elektroforetikus módszerek – V.

### Gélelektroforézis - gélek

#### Agaróz (0,5-3%)

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



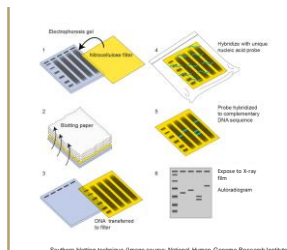
Digital image of 3-pore restriction digests run on a 1% w/v agarose gel. 3 volt/cm, stained with ethidium bromide. The DNA size marker is a commercial 1 kbp ladder.

## Elektroforetikus módszerek – VI.

### Gélelektroforézis - gélek

#### Agaróz (0,5-3%)

- Természetes, algából kivont polisaccharid
- Heterogén pórusméretű gél képez
- Könnyen kezelhető, nem toxikus
- Elsősorban **nukleinsavak** (>50bp), illetve >200 kDa tömegű fehérjék elválasztására
- **Southern blot:** elektroforézist DNS fragmentumok átíratása cellulóz-acetát lemezre → hibridizálás DNS próbakkal → azonosítás radioaktivitás alapján



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

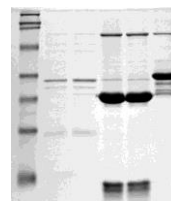
## Elektroforetikus módszerek – VII.

### Gélelektroforézis - gélek



#### Poliakrilamid

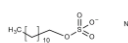
- Akilamid és bisakrilamid polimerizációjával
- Kovalens kötással térhálósított gél
- Egyenletes pórusméret - a monomerkoncentrációval szabályozható
- Akilamid neurotoxikus
- A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) hatékony, rutin módszer **fehérjék** elválasztására (5- 2000 kDa-ig)
- A fehérjék nitrocellulóz vagy PVDF membránra



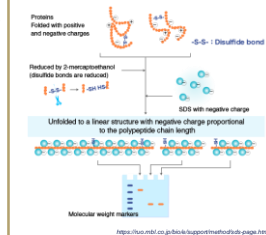
SDS PAGE of proteins (better at left side)

## Elektroforetikus módszerek – VIII.

### SDS-PAGE



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

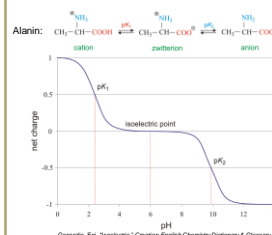


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2680404/page.html>

## Elektroforetikus módszerek – IX.

### Izoelektromos fókuszálás

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



Generated, Eric "Isoelectric" Crockett-English Chemistry Dictionary & Glossary

## Elektroforetikus módszerek – X.

### Izoelektromos fókuszálás

- Számos makromolekula bír mind savas, mind bázikus csoportokkal → az összetétel a pH függvénye lesz
- Izoelektromos pont: az a pH, ahol a molekula nettó töltése 0
- Az elektroforézist pH-gradiens tartalmazó közegben végezzük → a molekulák addig vándorolnak az elektromos térben, amíg el nem érik az isoelektromos pontjukat
- Itt egyensúly alakul ki a diffúzió és az elektroforézis között
- Szétválasztás alapja: isoelektromos pont
- Nagy érzékenység – akár 0,01 pH különbség!

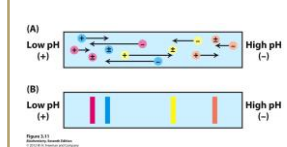
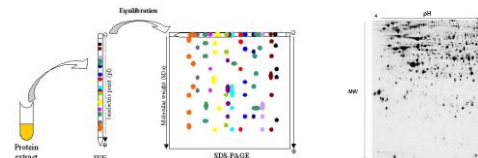


Figure 1.1.1. Isoelectric focusing. © 2010 Sinauer Associates, Inc.

## Elektroforetikus módszerek – XI.

### Kétdimenziós elektroforézis



<https://www.creative-proteomics.com/blog/2d-pghe-2d-electrophoresis-2d-gel/>

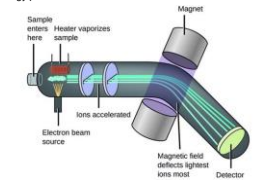
Melander P. (2016) Difference Gel Electrophoresis. Methods in Molecular Biology, vol 1664

## Tömegspektrometria (MS)

### Alapok dióhéjban

- Gázfázisú ionok tömegének meghatározására
- Pikomol-attomol mintamennyiségekből
- Tömegspektrométer fő részei:
  - **Ionforrás:** gázfázisba viszi a molekulákat és ionizálja (eg.: Elektrospray ionizáció, ESI; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)
  - **Analizátor:** gyorsítja az ionokat és elválasztja m/z arányuk alapján elektromos vagy mágneses teret használva
  - **Detektor**
- Más analitikai módszerekkel csatlakozó (LC-MS; GC-MS)
- További részletek: tankönyv: X/7, U/1.5.

Egy példa:



<https://www.bioniktur.com/infoblog/mass-spectrometry-and-mass-flow-control-a-closer-look/>

## Tömegspektrometria (MS) – II.

### Szétválás mágneses térben

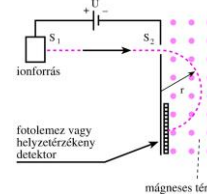
- Elektromos tér ( $U$  gyorsítófeszültség) gyorsítja a  $q$  töltéssel bíró iont, ami nek kinetikus energiája így:

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

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

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

- A pálya sugara ( $r$ ) kikövetkeztethető a részecske becsapódási helyéből a detektoron.  $r = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2mU}{q}}$



Köszönöm a figyelmet!

Dr. Bozó Tamás