

Szedimentációs és elektroforetikus módszerek, Tömegspektrometria gyógyszerészhallgatóknak

Dr. Bozó Tamás

egyetemi adjunktus
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
2024. május 16.



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
- Aramlás

Tankönyvi részek

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

Szedimentáció I.



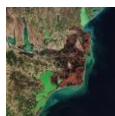
A **szedimentáció** **részecskék** (molekulák) **oldatban** (szuszpenzióban) való **üledékesedésének** folyamatát jelenti, amely **valamilyen erő** (gravitáció, centrifugális erő, elektromosság) **hatására** valósul meg. A kiülepedett részecskéket **üledéknek** (laboratóriumi gyakorlatban **pelletnek**), az oldat fennmaradó részét **felüliszónak** nevezzük. (sedeo [i]; üti; sedimentum [it]; üledék)



Virgin Formation,
Utah délnyugati része, USA



Duna delta fejlődése Kr.u. 1-től



A Duna deltája az úrből

mészidő
iszapdó (aleurolit)



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.

$$F_s = f \cdot v$$

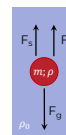
Csak kis sebességeknél ad jó közelítést

$$f: \text{alakfaktora}; \quad f = \frac{1}{u}$$

$$v: \text{sebesség}$$

$$u: \text{mobilitás} = \frac{v}{F}$$

$$\text{gömbre: } u = \frac{1}{6\pi\eta r}$$



A részecske üledéksül.
(Ha $\rho > \rho_0$)

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

$$F_f = \rho_0 \cdot V \cdot g \quad F_f = m \cdot g \cdot \frac{\rho_0}{\rho}$$

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

Gravitációs erő:

$$F_g = m \cdot g$$

ρ_0 : közeg sűrűsége
 ρ : részecske sűrűsége
 V : részecske térfogata
 m : részecske tömege
 g : gravitációs állandó ($9.8 \frac{m}{s^2}$)



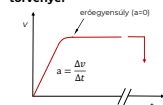
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

4

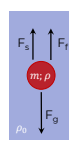
Szedimentáció III.

Fizikai alapok:

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



A részecske sebessége mindaddig növekszik, amíg erdőegyensúly nem alakul ki (vagy elérjük az edény alját).



A részecske üledéksül.
(Ha $\rho > \rho_0$)

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

Erőegyensúlyban: $\Sigma F = 0$

$$F_g = F_f + F_r$$

$$f \cdot v = m \cdot g - m \cdot g \cdot \frac{\rho_0}{\rho}$$

$$f \cdot v = m \cdot g \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)$$

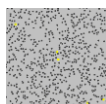


Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

5

Szedimentáció vs. Brown mozgás

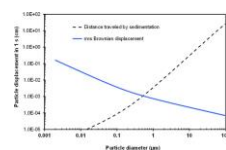
Probléma: Brownian mozgás



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	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$
Latex ball	4	$5.5 \cdot 10^{-7}$	$1.7 \cdot 10^{-6}$
Latex ball	2	$1.6 \cdot 10^{-7}$	$4.3 \cdot 10^{-7}$
Latex ball	1	$4.2 \cdot 10^{-8}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$
Milk fat globule	1	$5 \cdot 10^{-8}$	$2.7 \cdot 10^{-7}$
Latex ball	0.5	$1.2 \cdot 10^{-8}$	$2.7 \cdot 10^{-8}$

Chace et al. Romanian J. Biophys. 2010



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

Genodermis P. Nonengineering 2015

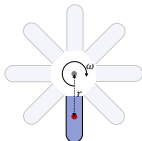


Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

6

Centrifugálás – elméleti alapok I.

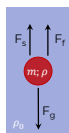
Fizikai alapok:



Szögsebesség:

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

$\Delta\phi$: szögelfordulás
 Δt : idő



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 (forgásból származó) gyorsulás

$$F_c = m \cdot a$$

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

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

forgható sugara

$$\text{Erőegyensúlyban: } F_s = F_c - F_f$$

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

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

7

Centrifugálás – elméleti alapok II.

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

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

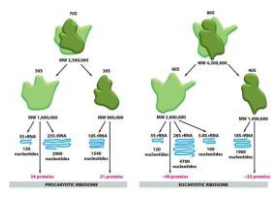


Theodor Svedberg
1884-1971
1926. kémiai Nobel-díj

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:



Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

8

Centrifugálás – elméleti alapok II.

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

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



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 ⁴ to 10 ⁵	3-12 ¹
Mitochondria	10 ⁴ to 5 × 10 ⁴	0.5-4 ²
Lysosomes	4 × 10 ³ to 2 × 10 ⁴	0.5-0.8 ³
Peroxisomes	4 × 10 ³	0.5-0.8 ³
Viruses	42 to >1000	0.02-0.4
Nucleic acids (free)	3.5 to 100	n/a
Ribosomes	80	0.025

¹Hinton and Mullock (1997)

²Schmidt (1973)

³Luttmann et al. (2006)

⁴Griffith (1994)

Lawrence, Jaros & Svedberg, Greg (2005)
Purification of viruses by centrifugation

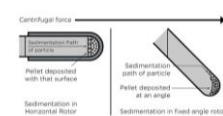
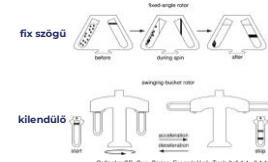
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

9

Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – I.

Centrifugálás: Szuszpenziók, emulziók, illetve többkomponensű folyadékelemek alkotórészeinek szétválasztására alkalmazott művelet, amelyben a szétválás centrifugális erő hatására következik be. A művelet kivitelezésére alkalmazott eszköz a centrifuga. A szétválasztás történhet analitikai és/vagy preparatív céllal.

Rotorok:



www.biolmex.com/resources/technology/centrifugation/properties/rotor-types

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

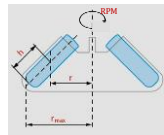
10

Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – II.

Relatív centrifugális erő (Relative centrifugal force, RCF)

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

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



https://pending.solutions.suspendfor

revolutions per minute

RPM

legnagyobb sugár

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

RCF

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

11

Centrifugálás – gyakorlati aspektusok – III.

	Analitikai centrifugálás	Preparatív centrifugálás
Cél	Alapvető részecsketulajdonságok vizsgálata: tömeg, méret, alak, kölcsönhatások	Összetett minták egyes alkotóelemeinek kinyerése/tisztítása. Biológiai minták feldolgozása (pl. komponensszeparálás) további vizsgálatokhoz.
Példák	<ul style="list-style-type: none"> Molekula/részecsketömeg meghatározás Szupramolekuláris komplexek molekulatömegének változásainak követése Kül. konformációk és konformációváltozások detektálása. Asszociálódó molekulák/részecskék aggregációfokának meghatározása etc. 	<ul style="list-style-type: none"> Szubcelluláris frakcionálás Fehérjeterítkezés DNS tisztítás Kolloidok szeparálása Vírus szeparálás etc.
Módszerek	<ul style="list-style-type: none"> Szedimentációs sebességi módszer; Szedimentációs egyensúlyi módszer 	<ul style="list-style-type: none"> Differenciálcentrifugálás Sűrűséggradiens centrifugálás

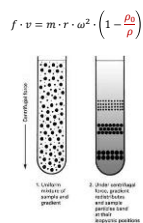
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

12

Sűrűséggradiens centrifugálás– II.

Izopiknikus centrifugálás

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



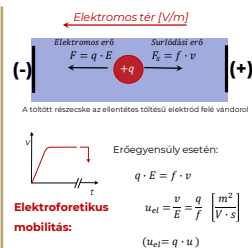
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

19

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 gyorsuló 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
- Analitikai és preparatívus módszer is lehet



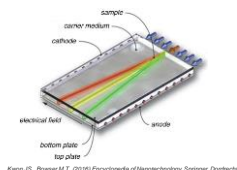
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

20

Elektroforetikus módszerek – II.

Szabad elektroforézis

- Állófázismentes elválasztási technika
- Folyadékcselemben történik az elválasztás – lamináris áramlás
- Akár különböző összetételű (pH: ionerősség, stb.) folyadékretegek alakíthatók ki (lehet natív és denaturáló pL)
- Az áramlásra merőleges elektromos teret alkalmazunk (nagy feszültségekkel)
- A részecskék a töltéssűrűségük és/vagy izoelektromos pontjuk szerint szeparálódnak
- Elválasztási tartomány széles: ionoktól sejtekig
- Alkalmazás: fehérjekomplexek, membránfehérjék, antitest-izozformák, sejtek és sejtalkotók elválasztása...



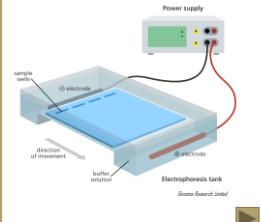
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

21

Elektroforetikus módszerek – III.

Gélelektroforézis

- Elválasztás állófázison (gél mátrix) történik
- A gél fizikai barriert képez + lassítja a részecskék mozgását
- Kicsiny mintatérfogatok alkalmazhatók
- Nagy reprodukálhatóság
- Nagyfeszültség kelt elektromos teret
- A részecskék a méretük és töltésük szerinti sebességgel vándorolnak és válnak el
- A szétvárt frakciók sávokat képeznek – fixálhatók, festhetők, akár kinyerhetők további eljárásokhoz
- Alkalmazás: makromolekulák (DNS, RNS, fehérjék) és fragmentumaik elválasztása
- Főként analitikai módszer, de preparatív célokra is alkalmas

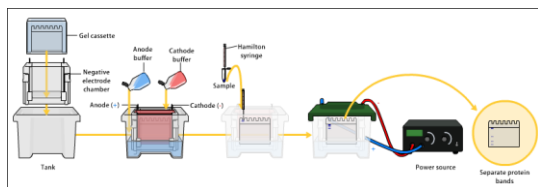


Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

22

Elektroforetikus módszerek – IV.

Gélelektroforézis folyamata



Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

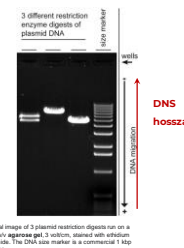
23

Elektroforetikus módszerek – V.

Gélelektroforézis - gélek

Agaróz (0,5-3%)

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



Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

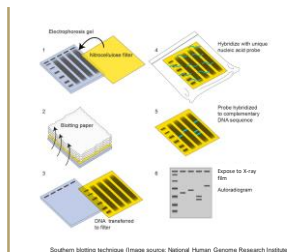
24

Elektroforetikus módszerek – VI.

Gélelektroforézis - gélek

Agaróz (0,5-3%)

- Természetes, algákból kivont polisaccharid
- Heterogén pórusméretű gél képez
- Könnyen kezelhető, nem toxikus
- Elsősorban **nukleinsavak** (>50bp), illetve >200 kDa tömegű fehérjék elválasztására
- Southern blot:** elektroforetikus DNS fragmentumok átitatása cellulóz-acetát lemezre + hibridizáltatás DNS próbákkal + azonosítás radioaktivitás alapján

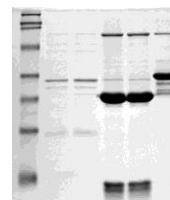


Elektroforetikus módszerek – VII.

Gélelektroforézis - gélek

Poliakrilamid

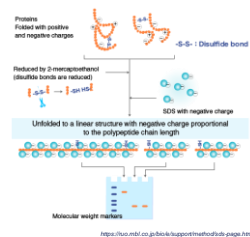
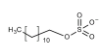
- Akrlamid és bisakrlamid polimerizációjával
- Kovalens kötéssel térhálósított gél
- Egyenletes pórusméret - a monomerkoncentrációval szabályozható
- Akrlamid neurotoxikus
- A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) hatékony, rutin módszer **fehérjék** elválasztására (5-2000 kDa-ig)
- A fehérjék nitrocellulóz vagy PVDF membránra blotolhatók, jelölhetők - **Western blot**



Elektroforetikus módszerek – VIII.

SDS-PAGE

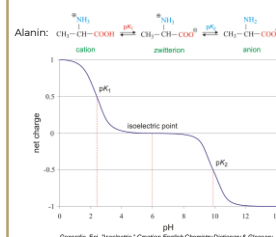
- PAGE denaturáló közegben
- Nátrium-dodecil-szulfát (SDS):** Erős, ionos detergens + kiteríti a fehérjélcsoport, nem ionos kötések felszakadnak, micellát képez körülötte + erős (kb. -1 töltés/aminosav) negatív töltést ad neki
- Merkaptoetanol:** diszulfidhidakat redukálja
- Alkalmazás: fehérjék molekulatömeg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



Elektroforetikus módszerek – IX.

Izoelektromos fókuszálás

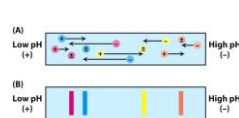
- Számos makromolekula bír mind savas, mind bázikus csoportokkal + az osztottság a pH függvénye lesz
- Izoelektromos pont: az a pH, ahol a molekula nettó töltése 0



Elektroforetikus módszerek – X.

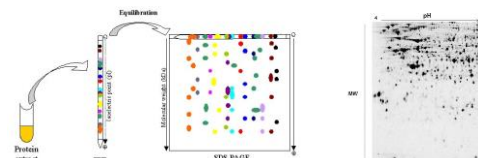
Izoelektromos fókuszálás

- Számos makromolekula bír mind savas, mind bázikus csoportokkal + az osztottság a pH függvénye lesz
- Izoelektromos pont: az a pH, ahol a molekula nettó töltése 0
- Az elektroforézist pH-gradienst tartalmazó közegben végesszük + a molekulák addig vándorolnak az elektromos térben, amíg el nem érik az izoelektromos pontjukat
- Itt egyensúly alakul ki a diffúzió és az elektroforézis között
- Szétválasztás alapja: izoelektromos pont
- Nagy érzékenység – akár 0,01 pI különbség!
- Analitikai és preparatív célokra egyaránt alkalmas
- Főként fehérje-analitika



Elektroforetikus módszerek – XI.

Kétdimenziós elektroforézis



<https://www.creative-proteomics.com/blog/2d-pg-ph-protein-dimension-gel-electrophoresis-2-d/>

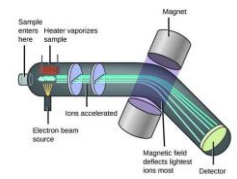
Melander P. (2018) Difference Gel Electrophoresis. Methods in Molecular Biology, vol 1664

Tömegspektrometria (MS)

Alapok dióhéjban

- Cátfázási 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 csatlakozható (LC-MS; GC-MS)
- További részletek tankönyv: X/7, I/15.

Egy példa:



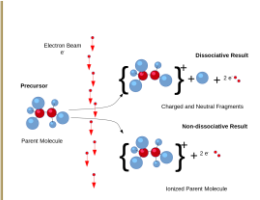
<https://www.brockhost.com/infoblog-1-mass-spectrometry-and-mass-flow-control-close-to-zero-flow/>

MS– Ionizációs módszerek I.

Elektron ionizáció (EI)

- A mintát elektronokkal bombázzák
- „Kemény ionizáció”: nagy energiák → jelentős fragmentáció
- Főként szerves vegyületekre hasznos (MW < 600)
- Molekulaion képződés:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$
- Előnyök:** egyszerű, érzékeny, fragmentumok segítik a molekula azonosítást, molekula üjlényomat spektrumok és könnyítarak
- Hátrányok:** csak volatilis és hőstabil molekulákra, nagymértékű fragmentáció, MW < 1000
- Cyakra csatlakozhat gázkromatográfiával (GC-MS)

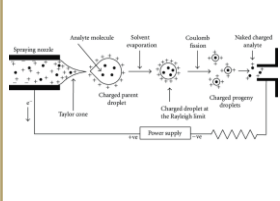


By Evan Mason - Open work, CC-BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EI20140404>

MS– Ionizációs módszerek II.

Elektrospray ionizáció (ESI)

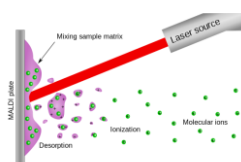
- Mintát folyadékban diszpergálják
- Aeroszol képződik
- Magasfeszültséget alkalmaznak
- „Lágy ionizáció” → fragmentáció nem jellemző → különösen hasznos makromolekulák molekulaion képzésére.
- Előnyök:** pontos, gyors, széles tömegtartomány, csekély fragmentáció
- Hátrányok:** nem ad szerkezeti információt (nincs fragmentálódás)
- Folyadékkromatográfiához csatlakozható (LC-MS)



MS– Ionizációs módszerek III.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

- A mintát energiatranszferáló mátrixszal keverik össze
- Lézerimpulzusok → minta és mátrix abláció és deszorpció
- Molekulák a gázfázisba kerülve ionizálódnak.
- Előnyök:** pontos, gyors, széles tömegtartomány, lágy ionizáció, nem csak volatilis mintákra, szub-pikomol érzékenység
- Hátrányok:** költséges műszer
- Általában repülési-idejű (TOF) spektrométerekkel alkalmazzák



MS – Analizátorok I.

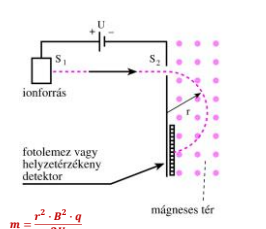
Szétválás mágneses térben

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

$$E_{kinetikus} = Uq = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$
- A felgyorsított ionok mágneses térbe (indukció: B) lépnek, melynek indukciójának merőlegesek a sebességük (v) irányára. A Lorentz erő körpályára kényszeríti őket.

$$F_{centrifugális} = \frac{m \cdot v^2}{r} = q \cdot v \cdot B$$
- A pálya sugara (r) kikövetkeztethető a részecske becsapódási helyéből a detektoron. A tömeg pedig:

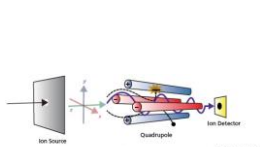
$$m = \frac{r^2 \cdot B^2 \cdot q}{2U}$$



MS – Analizátorok II.

Quadropole tömeganalizátor

- 4 párhuzamos rúdelektrod
- Oscilláló elektromos tér a rudakon – szemközti rudak összekapcsoltak → quadropólus képződik
- Töltött részecskék a rudak között utaznak
- Csak bizonyos m/z hánadosú részecskék érik el a detektort.
- A többi részecske a rudakba csapódik.
- U-t változtatva széles m/z tartomány szkennelhető végig.



MS – Analizátorok III.

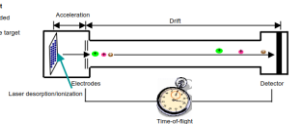
Time-of-flight (TOF) tömeganalizátor

- m/z hányados a detektorhoz érkezés idejéből számítható

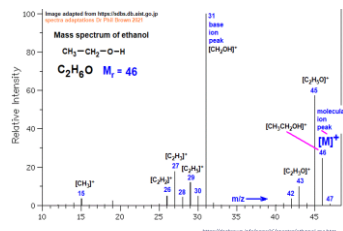
$$E = qU = \frac{1}{2}mv^2$$

A. Measurement

- Matrix embedded analyte on microchip plate target



Tömegspektrum



- Intenzitás vs. m/z
- z (charge number) is used instead of q (charge)
- Molekulaion csúcs + fragmentumok
- Izotópcsúcsok jelentkezhetnek
- Spectrum analysis \rightarrow mintaösszetétel

Köszönöm a figyelmet!

Dr. Bozó Tamás