



DLS, FCS, електрофорез

Володимир ШВАДЧАК

ПНУ

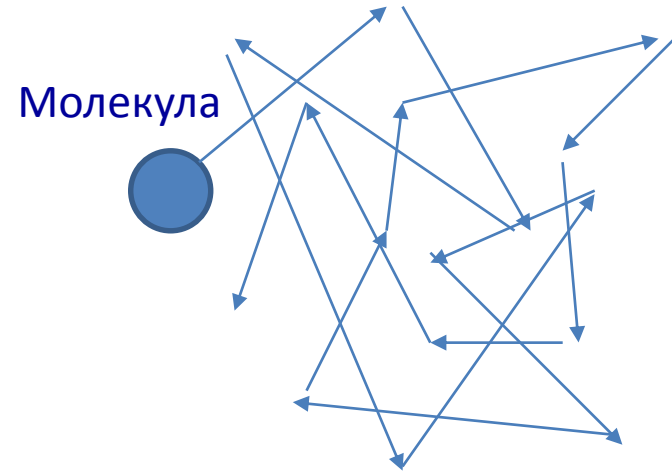
11-05-2023

Зміст лекції

1. *FCS*
2. *FCCS*
3. *DLS*
4. *Електрофорез*

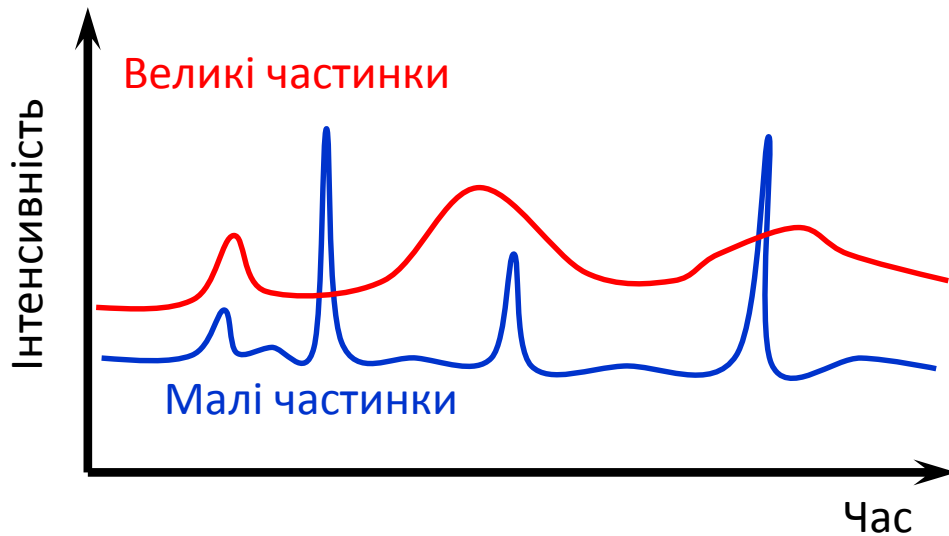
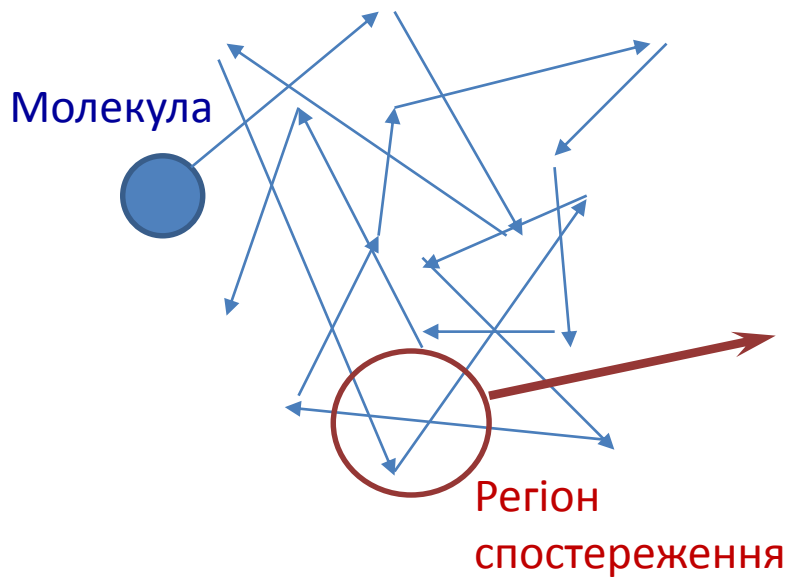
Дифузія і розмір молекул

Стохастичний рух молекул в розчині



Дифузія і розмір молекул

Стохастичний рух молекул в розчині

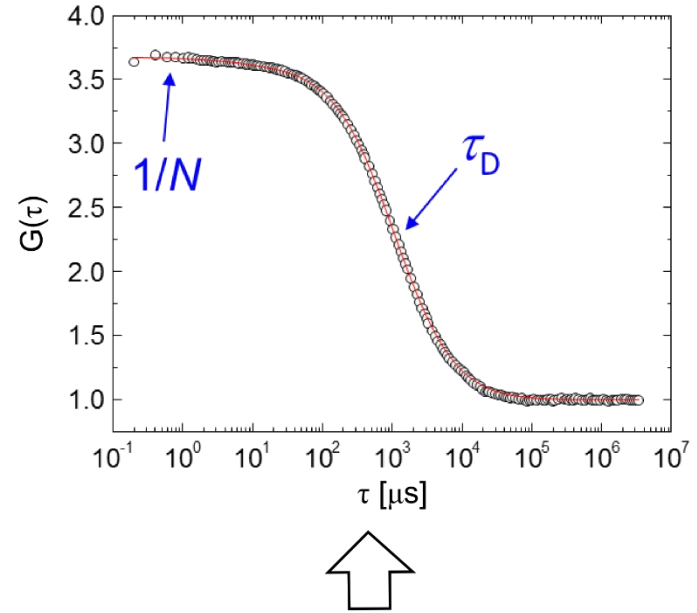
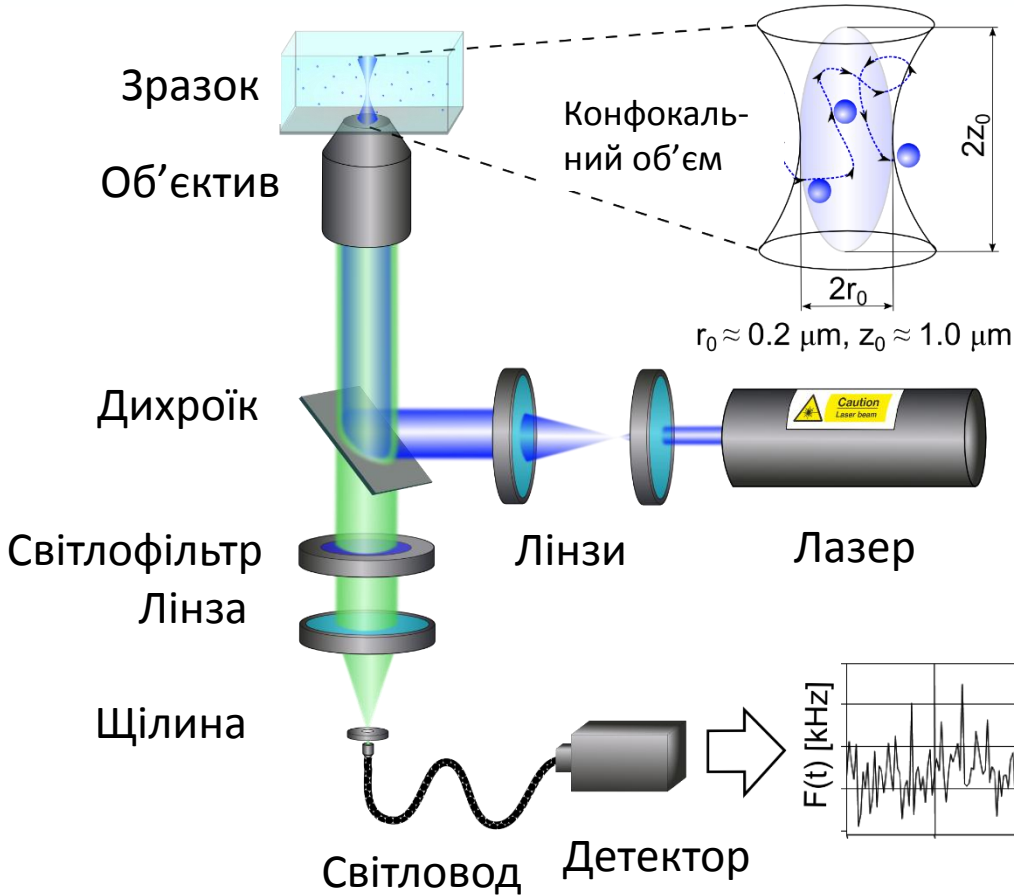


Ширина піків залежить від того як швидко рухається молекула в розчині, а це – всвою чергу, - від розміру молекули

! Потреба в низькій концентрації речовини

FCS

Автокореляція – як чато точки рознесені в часі на задану величину є частинами одного піку



Вимірювання переважно на мікроскопах. Малий кофокальний об'єм.

FCS

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2021.644450/full>

https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_correlation_spectroscopy

<https://www.biophysics.org/Portals/0/BPSAssets/Articles/schwille.pdf>

Приклад використання FCS в експериментах:

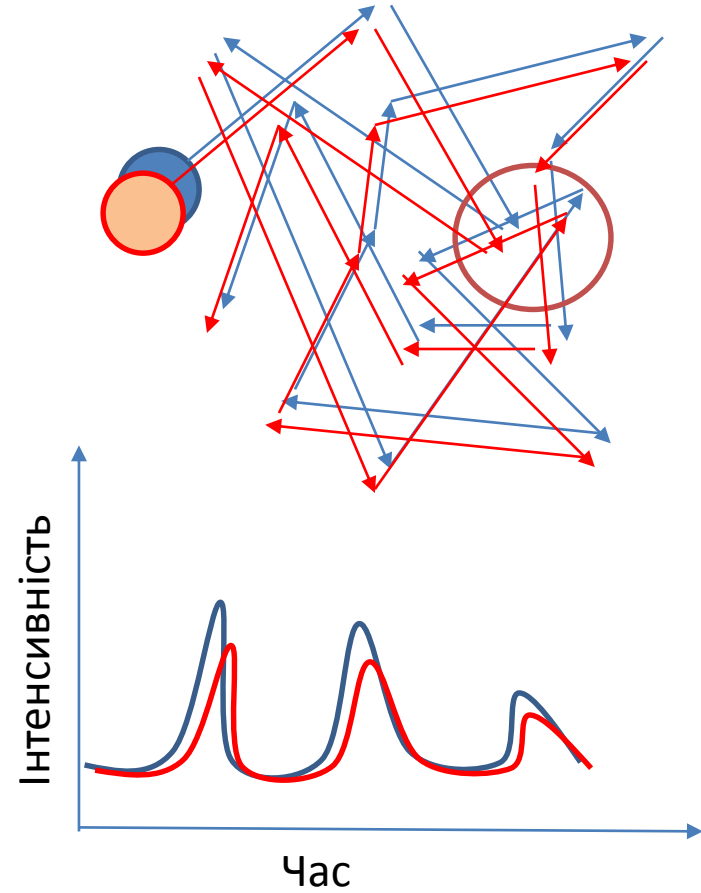
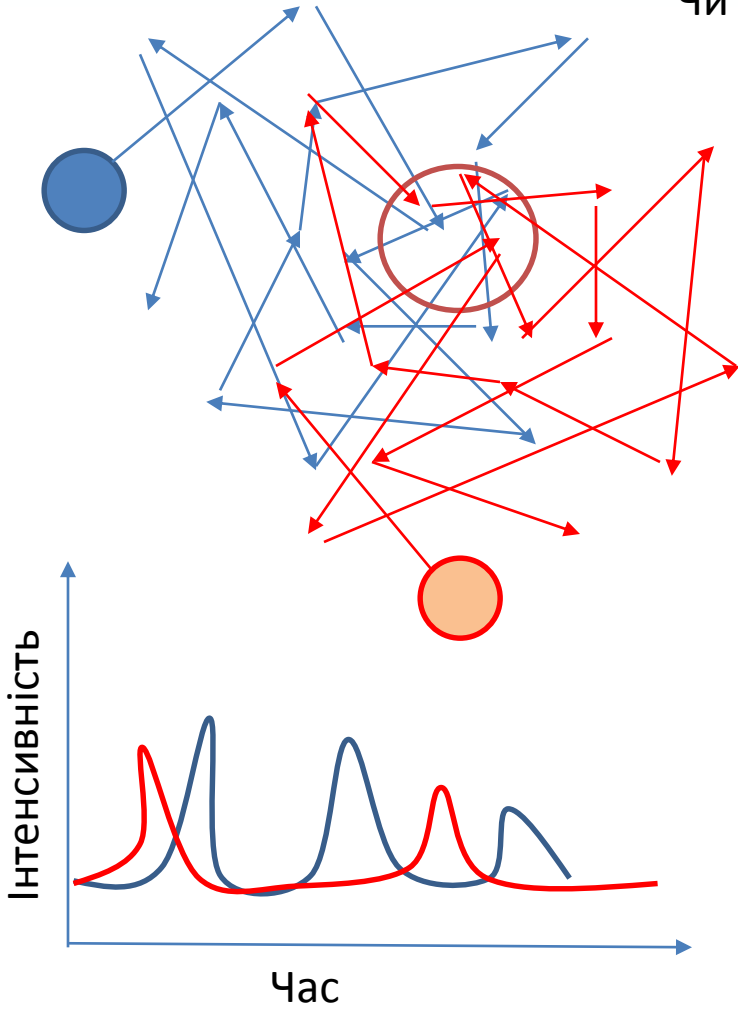
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349506726443>

2-фотонне збудження → дуже малий кофокальний об'єм.

2-фокусний FCS → Точне вимірювання коефіцієнту дифузії, краща детекція зміни розміру.

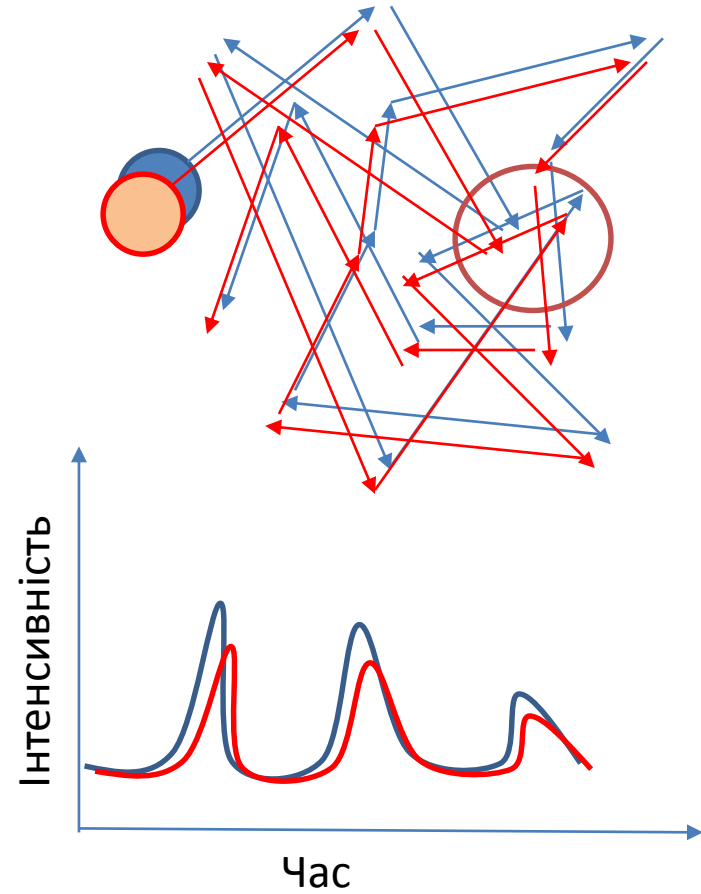
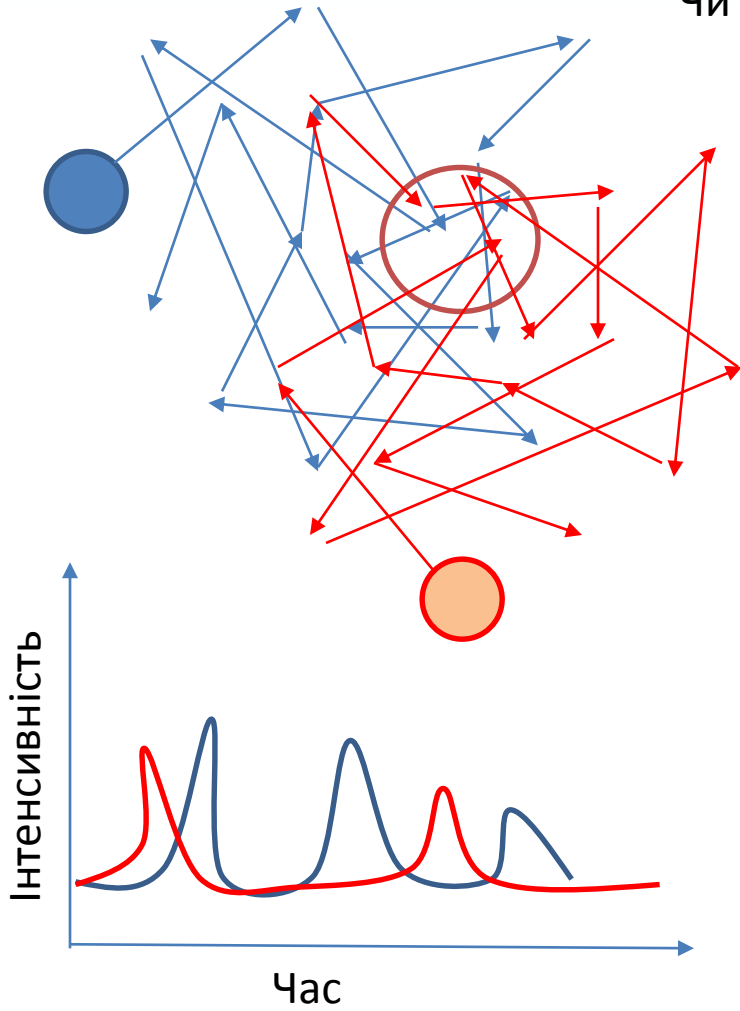
FCCS

Чи мігрують дві речовини разом?

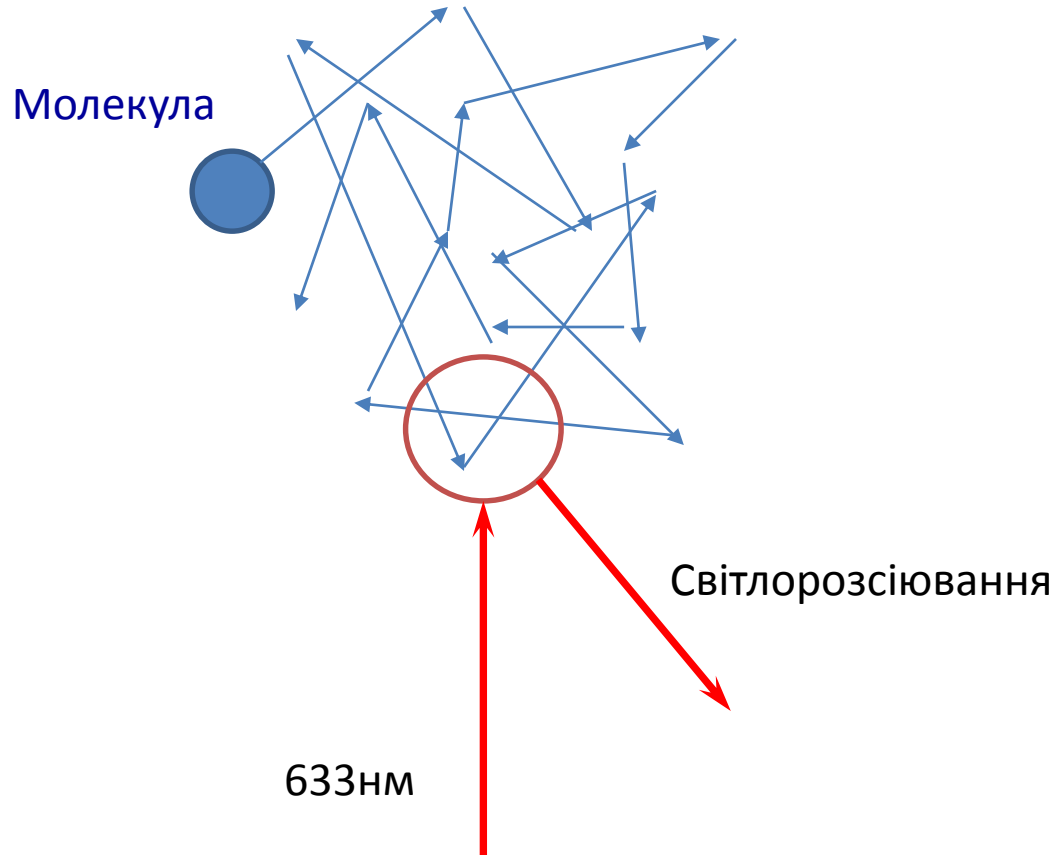


FCCS

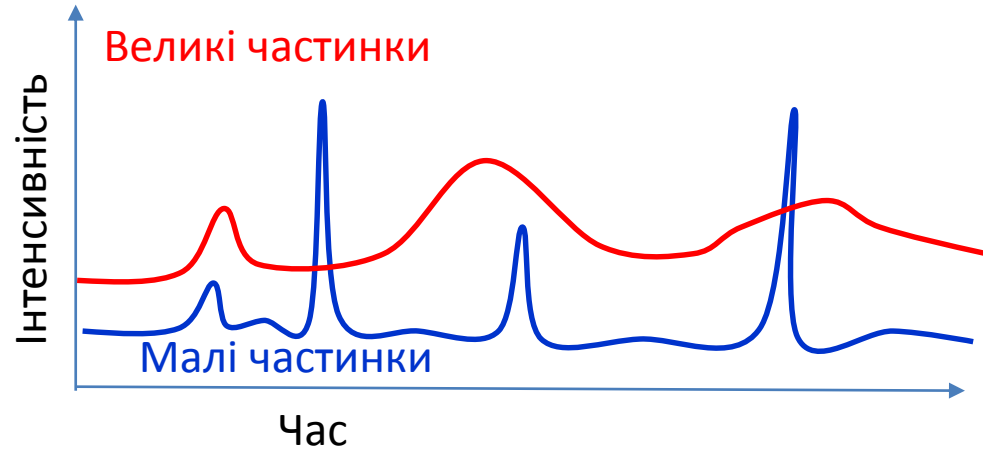
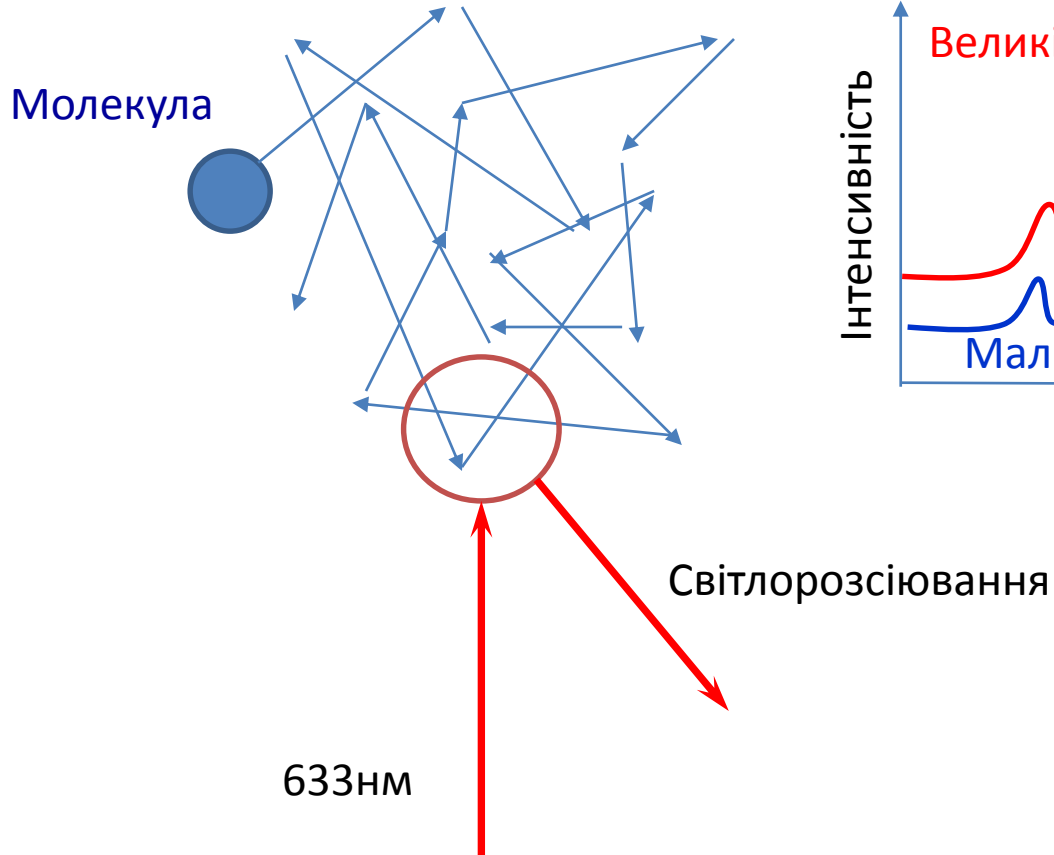
Чи мігрують дві речовини разом?



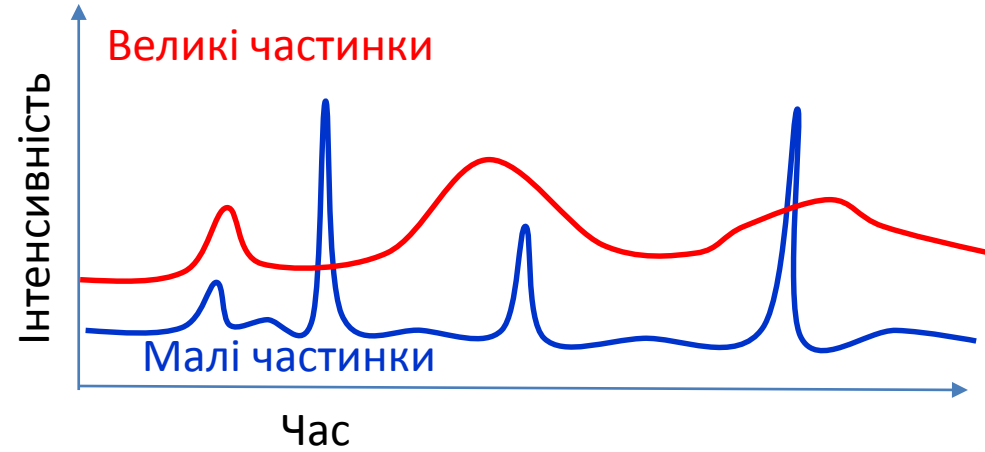
DLS



DLS



DLS

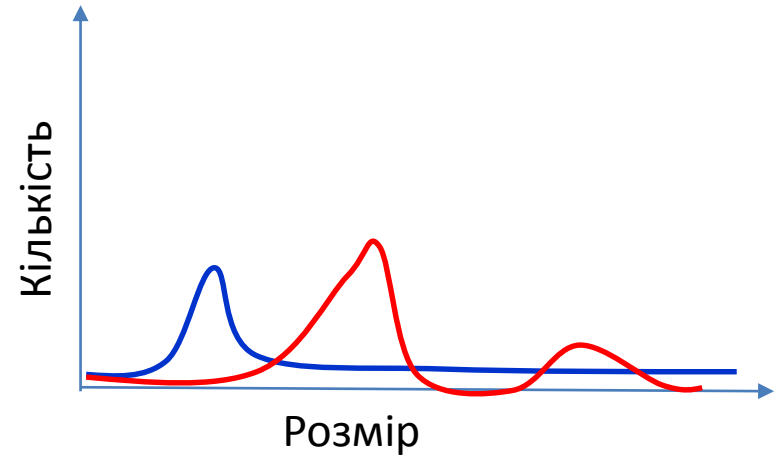
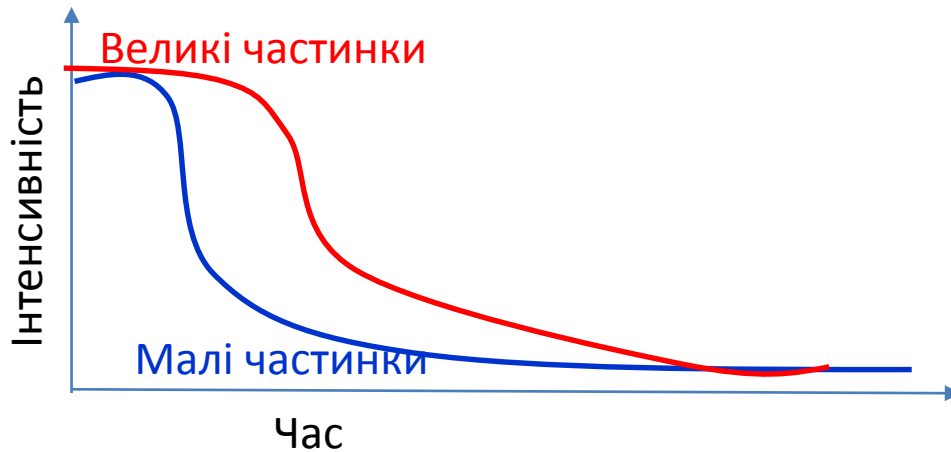


$$I \sim r^6$$

Зручно міряти об'єкти біля
10-500 нм

Наприклад ліпосоми,
великі протеїни,
наночастинки

Передбачає що форма
схожа до сферичної



DLS



~ 100мкл зразка, ~15хв на одне вимірювання, ~60k\$ на пристрій

Z-sizer дозволяє міряти дифузію під дією потенціалу (міряти поверхневий заряд)

Электрофорез



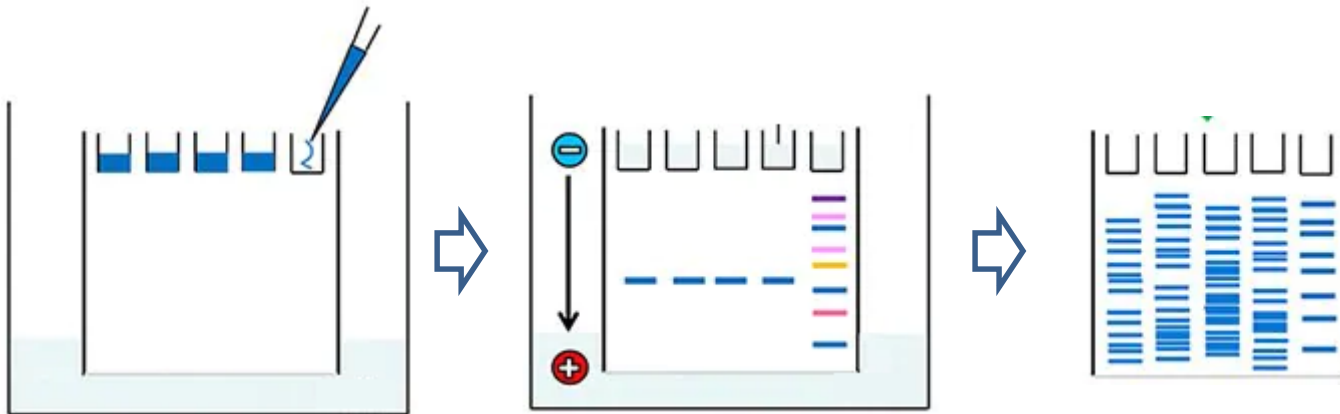
Електрофорез

SDS-PAGE

(SDS поліакрилаамідний гель)

В денатуруючих умовах

- 1) Руйнуємо дисульфідні зв'язки (бета-меркаптоетанол), нагрівання. Протеїн переходить в лінійну форму і зв'яє молекули SDS в кількості пропорційній довжині (або що майже те саме, масі). Заряд – аніонний за рахунок SDS.
- 2) Наносимо на поліакрилаамідний гель (~15%). Вмкаємо напругу яка викликає міграцію (більші молекули мігрують повільніше)
- 3) витягаємо, миємо, скануємо

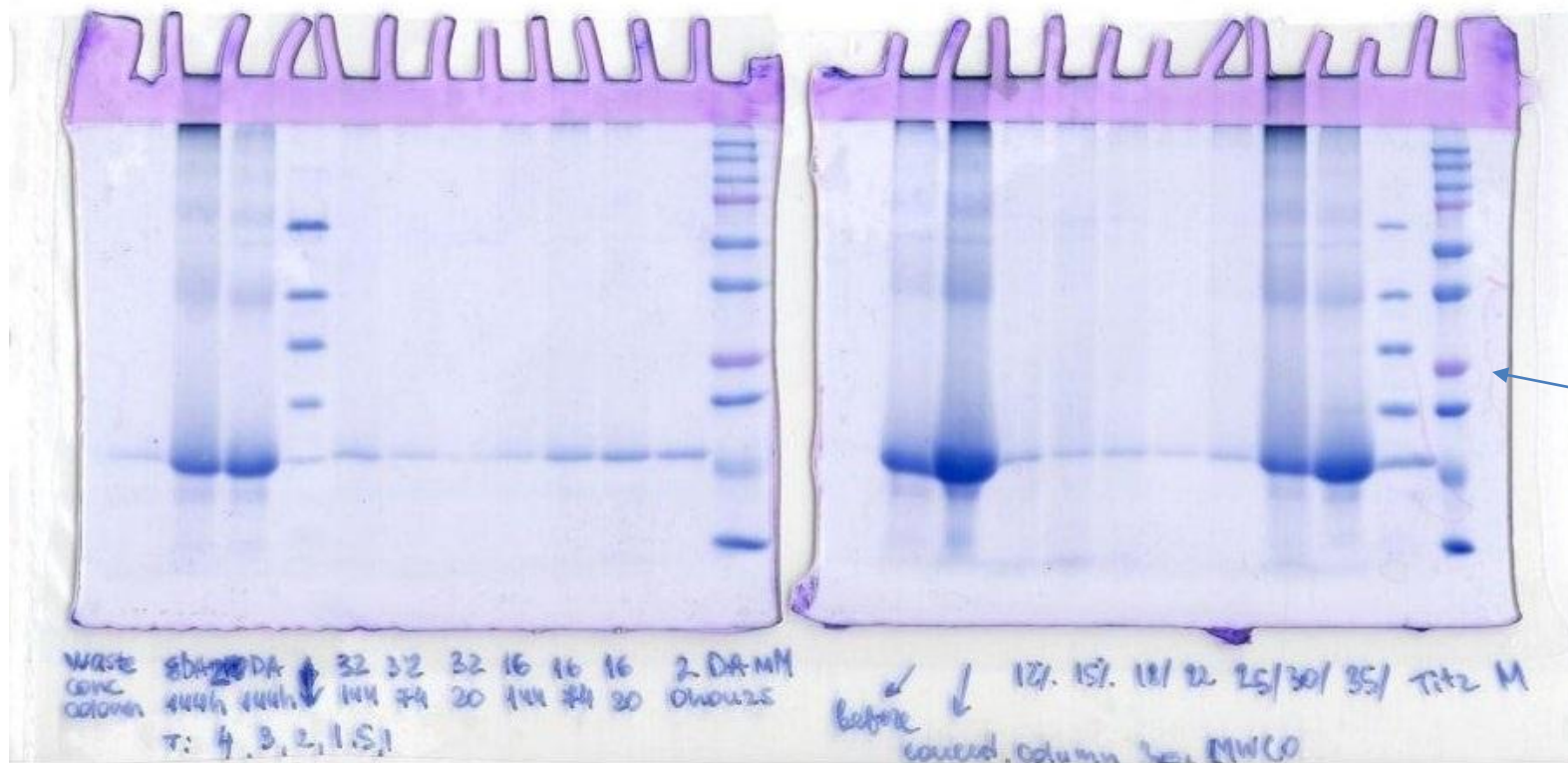


Електрофорез

SDS-PAGE

(SDS поліакрилаамідний гель)

Барвник кумасі синій



Електрофорез

Зразки наносять в «лемлі буфері»

Бромфеноловий синій 0,004%

2-меркаптоетанол 10%

гліцерол 20%

SDS 4%

Tris-HCl 0.125 M

Профарбовування

Кумасі 0,1%

оцтова кислота 10%

метанол 40%

Змивання

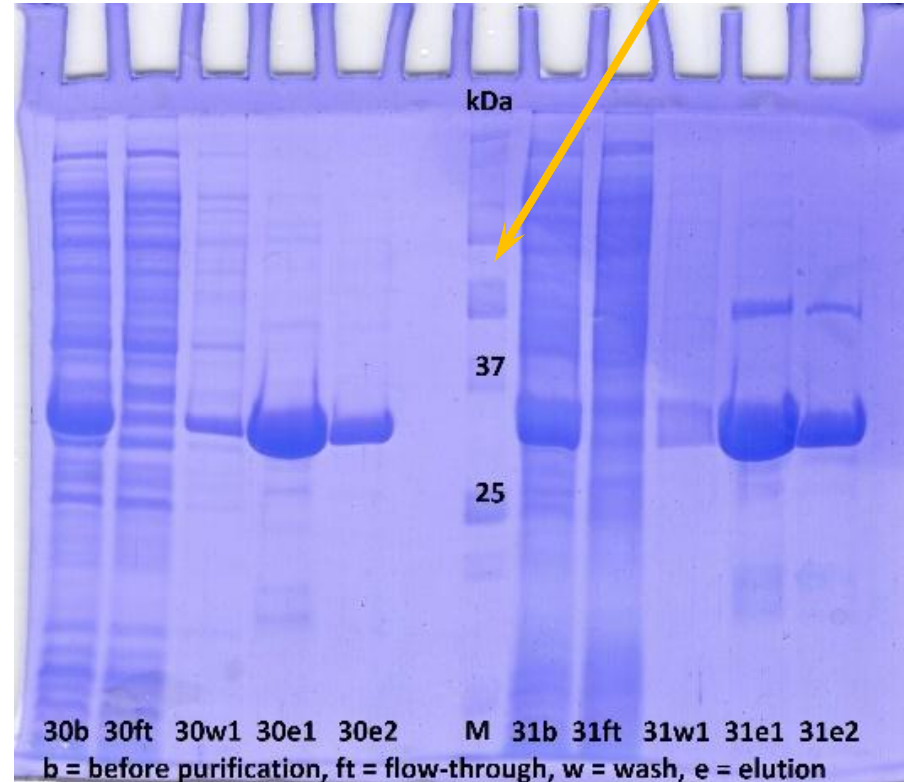
оцтова кислота ~10%

метанол ~70%

SDS-PAGE

Приклад гелів при очистці
протеїну через His-таг

“драбина”
стандартів маси
3 відомих протеїнів



Електрофорез



Налаштування напруги, слудкувати щоб «не втік»

Електрофорез

Електрофорез ДНК

Агарозний гель

Горизонтальний

Негативий заряд. Малі ДНК
рухаються швидше

Можна використовувати

ЕтидійБромід (EtBr) –

інтеркалюючий барвник,

селективна флуоресценція з
ДНК

Приклад електрофорезу
ДНК

