

C6200–Biochemické metody

# 12E\_DIFUSIMETRIE

Petr Zbořil

# Princip metody

- Pohyb částic
  - Translační
  - Rotační
- Vliv
  - Velikosti a tvaru (symetrie, hydratace apod.)
  - Prostředí – viskozita (T)

# Translační difuze

- Parametry –  $D$  a  $f$ 
  - $f = RT/D$ ,  $f_0 = 6\pi\eta_0 r N_A$  – 1 mol, koule
  - $v_M = 4\pi r^3/3 = M_r \nabla / N_A =$  objem 1 molekuly
  - $r = \sqrt[3]{(3M_r \nabla / 4\pi N_A)}$ ,  $\nabla =$  parciální specifický objem
- reálná molekula – určení  $f$  měřením
- $F$  (frikční poměr asym. konst.) =  $f/f_0 \in 1 - 3$ 
  - umožňuje odhad a:b, vliv hydratace – nejednoznačné
  - $F_{kor} = F \cdot \sqrt[3]{(\nabla / (\nabla + H))}$ ,  $H =$  objem hydratace

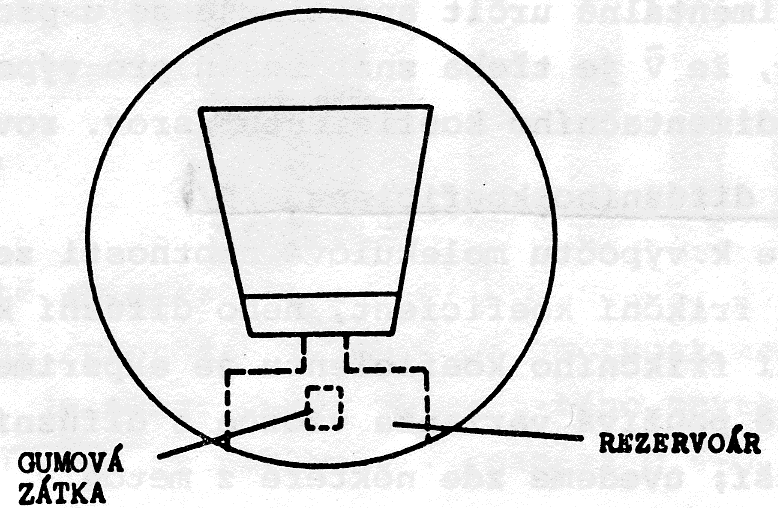
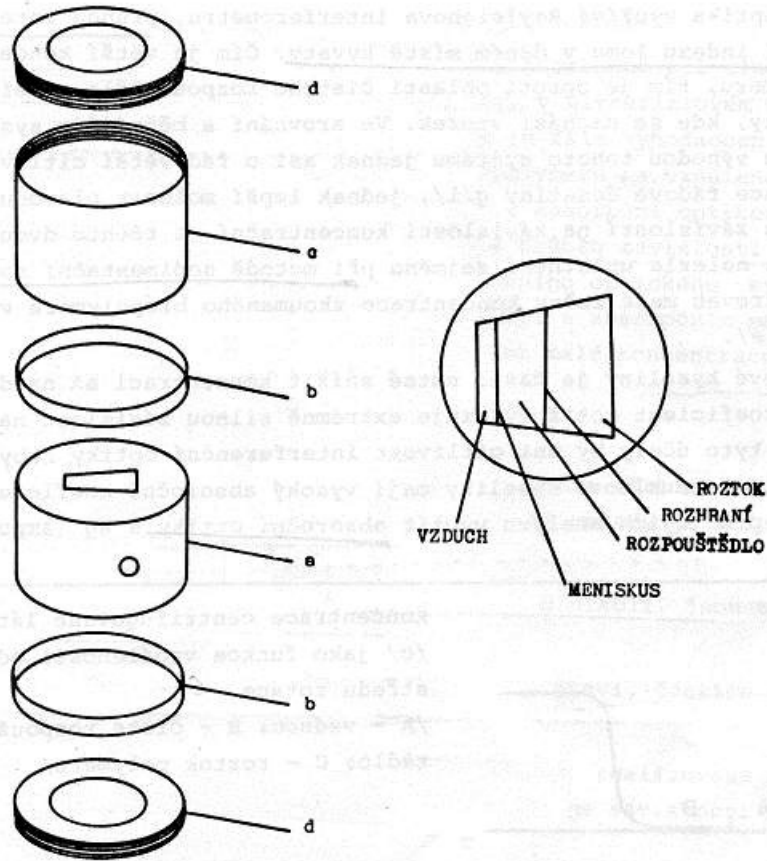
# Translační difuze

## Měření

- Metoda porezní stěny – řádově dny
  - Nádobka rozdělená diafragmou – neselektivní
  - Měření koncentrace v čase –  $dc/dt$  -  $dm/dt$
- Fickův zákon –  **$dm/dt = -D \cdot dc/dx \cdot A$**
- Centrifugací – řádově hodiny
  - Rozšiřování rozhraní mezi  $c_1$  a  $c_2$
  - $4\pi \cdot D \cdot t = (A/Y)^2$  kde  $A$  je plocha a  $Y$  výška píku

# Translační difuze

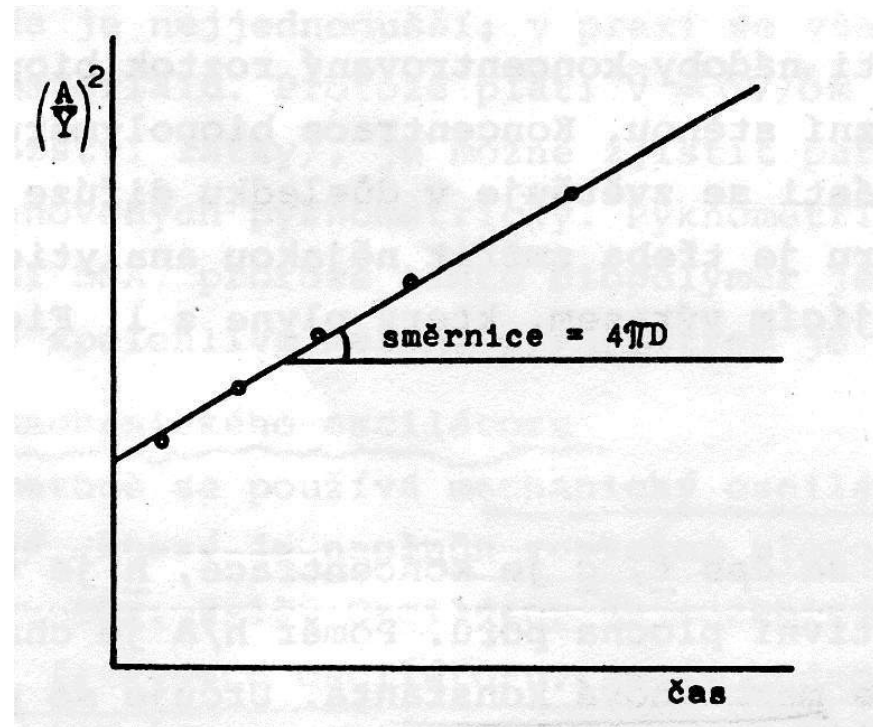
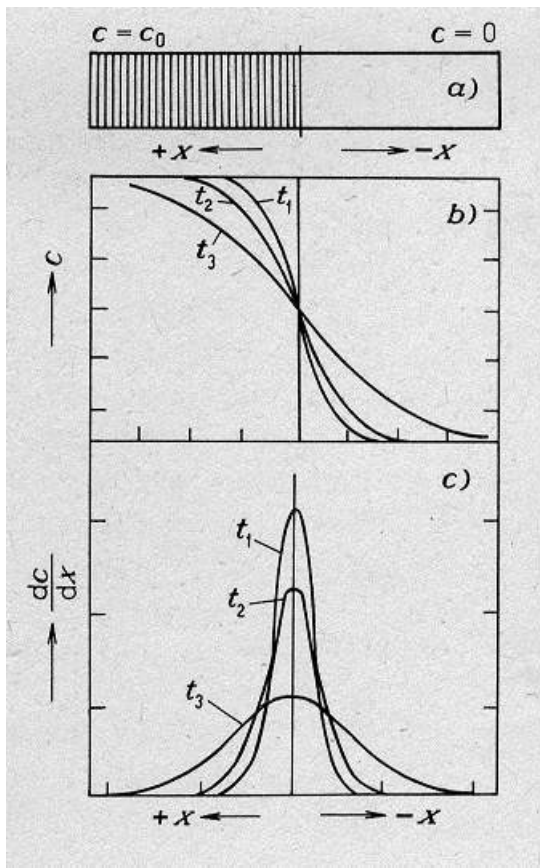
## Centrifugací



# Translační difuze

## Centrifugací – řád hodin

- Rozšiřování rozhraní mezi  $c_1$  a  $c_2$
- $4\pi \cdot D \cdot t = (A/Y)^2$  kde  $A$  je plocha a  $Y$  výška píku



# Rotační difuze

- Parametry
- koeficient rotační difuze  $\Theta$ 
  - kulovitá nehydratovaná částice
  - $\Theta_0 = RT/8\pi\eta_0 N_A r^3$  Perrin
- relaxační čas  $\tau_r$   $\Theta = f(1/\tau_r)$ 
  - pohyblivost kolem 3 os (obvykle stačí 2)
  - pro asymetrickou částici  $\Theta_a, \Theta_b$  (ev.  $\Theta_c$ ) a  $\tau_{ra}, \tau_{rb}$  (ev.  $\tau_{rc}$ )
  - $1/\tau_{rh} = (1/\tau_{ra} + 1/\tau_{rb} + 1/\tau_{rc})/3$

# Rotační difuze

- Měření  $\tau_r$
- relaxační techniky: jednotná orientace se rozvolňuje
- **orientace vnější silou**
  - dvojlom za toku - tečná síla v rychlostním gradientu
  - dielektrická disperse - dipóly orientovány v el. poli
- **výběr stejně orientovaných molekul**
  - polarisace fluorescence

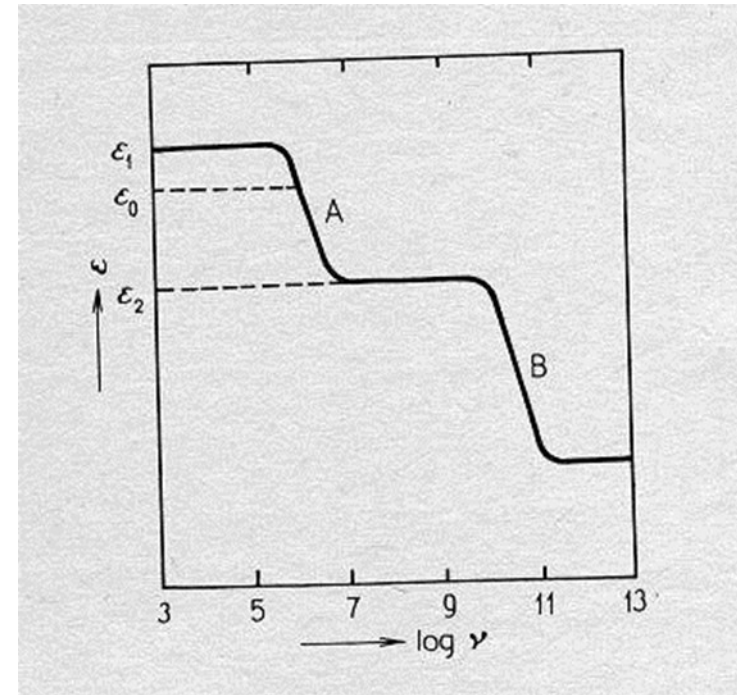


# Dielektrická disperze

- Dielektrická disperze
  - Určení permitivity  $\epsilon$
  - $\epsilon_{\text{rel}} = C/C_0$  (vakuum, prakt. vzduch)
  - Měření impedance  $Z = 1/i.\omega.\epsilon.C_0$
  - $\epsilon_{\text{rel}} = f(\log \omega)$
- $\tau = f(1/\omega)$  pro půlvlnu

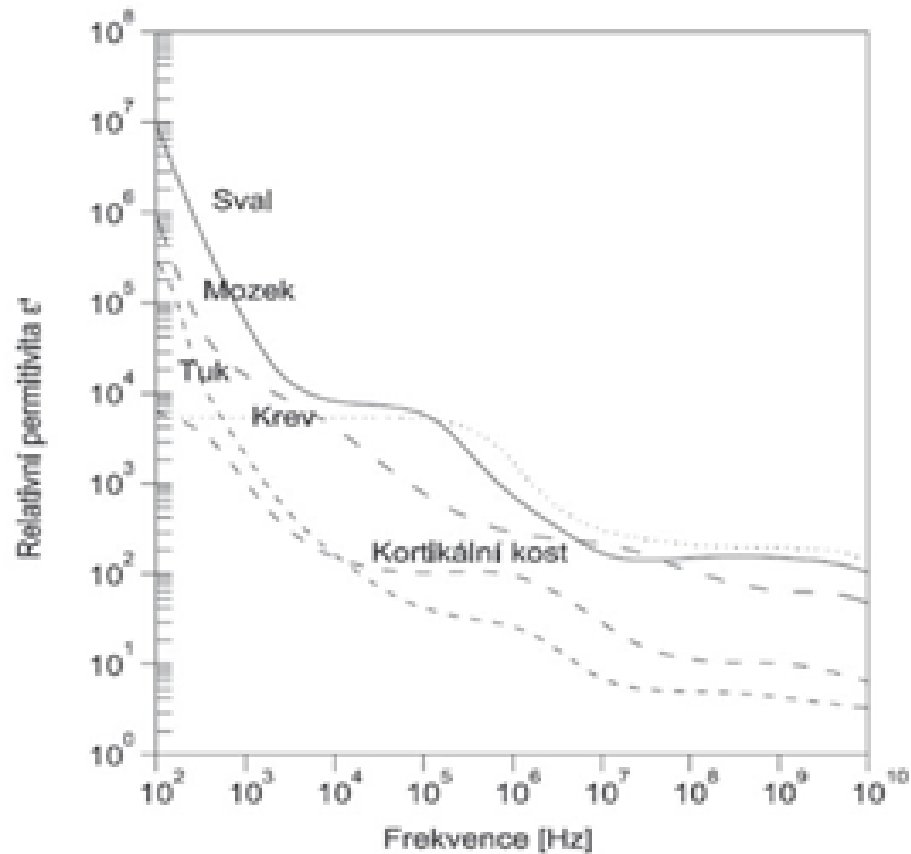
# Dielektrická disperze

- Dielektrická disperze
  - Obecný popis  $\epsilon_{\text{rel}} = f(\log \omega)$
  - $\epsilon_0$  – rozpouštědlo (voda) – resonance
  - $\epsilon_1$  – rozpouštědlo + sol
  - $\epsilon_2$  – rozpouštědlo
  - B – voda se nestačí reorientovat
- $\tau = f(1/\omega)$  pro půlvlnu



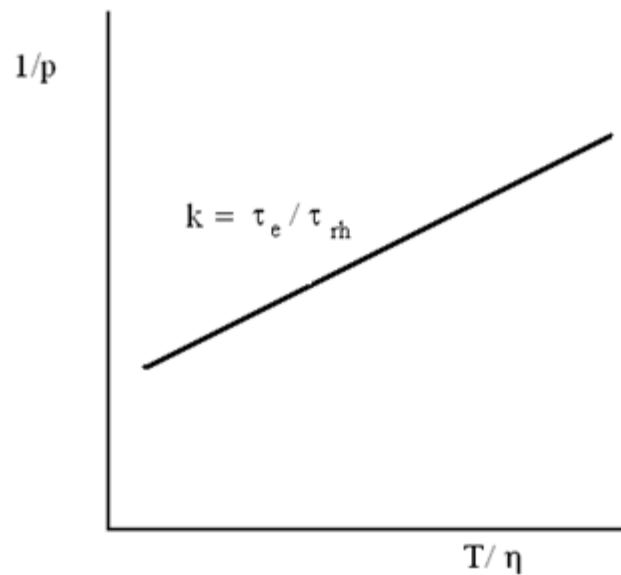
# Dielektrická disperze

- Dielektrická disperze tkání



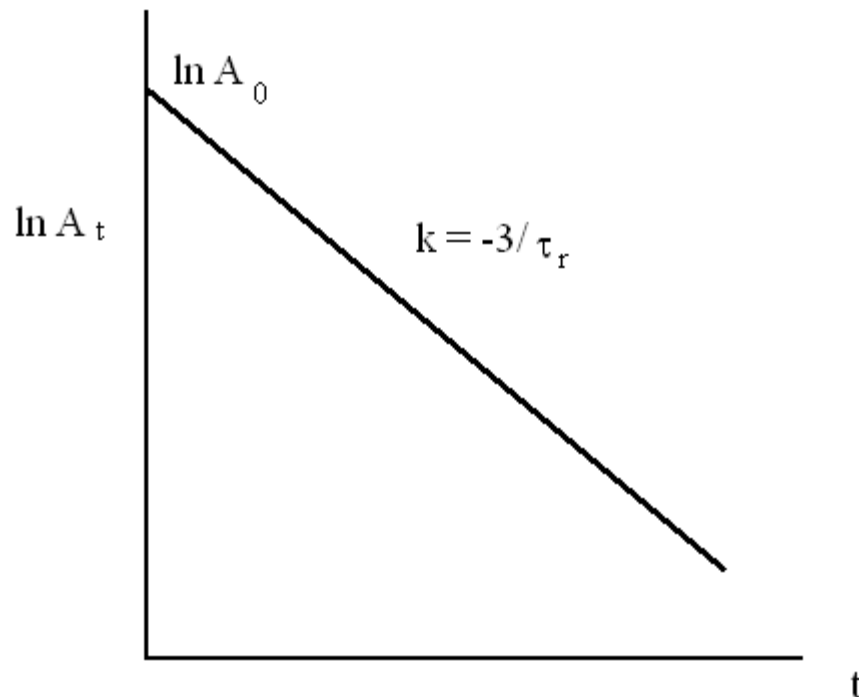
# Polarizace fluorescence

- $p = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp})$ 
  - Měření při různých teplotách
  - Vynesení  $1/p = f(T/\eta_0)$        $k = \tau_{\text{exc}} / \tau_{\text{rh}}$



# Polarizace fluorescence

- $A = (F_{\perp} - F_{\parallel}) / (F_{\perp} + 2F_{\parallel})$ 
  - nanosekundová pulsní technika
  - $A_t = A_0 \cdot e^{-3t/\tau}$        $\ln A_t = -3t/\tau + \ln A_0$



# Zpracování - vynesení

- Využití pro popis tvaru molekuly
  - Kombinace s viskosimetrií
  - **Harding**  $\Lambda = 3 [\eta] \cdot \eta_0 \cdot M_r / \tau_{rh} R T$

