

Versuch 6 — Elektrophorese

Till Biskup

Matrikelnummer: 155567

2. Mai 2000

Einführung

Ziel des Versuches ist es, die Zusammenhänge zwischen der elektrostatischen Struktur auf Zelloberflächen und ihrem elektrokinetischen Verhalten aufzuzeigen. Am Beispiel der Messung der Ionenstärke–Abhängigkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit von Zellen wird die Existenz von elektrischen Überschlußladungen auf Zelloberflächen nachgewiesen.

1 Aufgaben

1. Berechnen Sie die mittleren elektrophoretischen Beweglichkeiten in den Versuchslösungen!
2. Berechnen Sie unter Berücksichtigung der verschiedenen Viskosität der Lösungen die Zeta-potentiale und stellen Sie letztere graphisch als Funktion des DEBYE–HÜCKEL–Parameters dar.

$$\zeta = \frac{\eta b}{\epsilon \epsilon_0}$$
$$\epsilon = 80.4 \quad \text{für H}_2\text{O bei } 20^\circ\text{C} \quad (1)$$
$$\epsilon_0 = 8.8542 \cdot 10^{-12} \frac{\text{F}}{\text{m}}$$

Die isotonen Meßlösungen enthalten neben den angegebenen Salzkonzentrationen noch 5.8 mM Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$). Berechnen Sie die Ionenstärke der Lösungen unter der Annahme, daß der Puffer nur als einwertiges Salz dissoziiert.

3. Berechnen Sie die Oberflächenladungsdichte, σ , über den vereinfachenden linearen Ansatz:

$$\sigma = b\kappa\eta \quad (2)$$

In Gleichung (2) stehen b , κ und η für die Beweglichkeit, den DEBYE–HÜCKEL–Parameter und die Viskosität.

4. Berechnen Sie weiterhin den mittleren Abstand der Ladungen auf der Zelloberfläche. Gehen Sie dabei von der Gesamtanzahl der Ladungen auf der Erythrozytenoberfläche aus und schließen zunächst auf die einer Ladung zugeordnete Fläche!
5. Schätzen Sie ab, wie viele Elementarladungen pro Protein erfaßt werden, wenn man annimmt, daß ca. 1.5 Millionen Proteine auf der Erythrozytenoberfläche vorhanden sind. Die Oberfläche beträgt $137 \mu\text{m}^2$.
6. Stellen Sie das Strömungsprofil der Lösung über den Kammerquerschnitt graphisch dar.

1.1 Elektrophoretische Beweglichkeiten

Die Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeiten erfolgte gemäß folgender Gleichung:

$$b = \frac{\vec{v}}{\vec{E}} = \frac{\frac{\vec{s}}{t_{\text{hin}}} + \frac{\vec{s}}{t_{\text{rück}}}}{2\vec{E}} \quad (3)$$

b = elektrophoret. Beweglichkeit in $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$
 \vec{v} = Geschwindigkeit in $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
 \vec{E} = elektrische Feldstärke in $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$
 \vec{s} = zurückgelegte Wegstrecke in 10^{-6}m
 t = Zeit in s

Da die Zeit jeweils für beide Wegstrecken gemeinsam gemessen wurde, ergibt sich aus Gleichung (3) folgende Vereinfachung:

$$b = \frac{\vec{v}}{\vec{E}} = \frac{2\vec{s}}{2\vec{E} \cdot t_{\text{ges}}} \quad t_{\text{ges}} = t_{\text{hin}} + t_{\text{rück}} \quad (4)$$

Durch Einsetzen der Werte in die Gleichung — für $s = 40 \mu\text{m}$, $\vec{E} = 2 \cdot 10^3 \text{ V}$, t siehe Tabelle — ergaben sich die in der Tabelle dargestellten Werte für die mittlere elektrophoretische Beweglichkeit b .

Messung $t_{\text{hin}} + t_{\text{rück}}$										
c/mM	Messung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	3.12	3.68	3.72	3.55	3.70	3.76	3.32	3.22	3.70	3.50
30	4.44	4.14	4.27	4.26	4.20	4.04	4.11	4.24	4.18	3.96
70	5.16	4.92	4.82	5.16	4.83	5.28	4.71	5.87	5.15	5.04
100	5.28	5.05	4.98	5.02	5.40	5.72	5.35	5.56	5.35	5.18
150	5.39	5.83	5.98	5.80	6.02	5.81	5.80	6.52	6.06	5.96

Mittlere elektrophoretische Beweglichkeiten \bar{b}											
c/mM	Messung (10^{-9})										\bar{b}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
10	6.41	5.43	5.38	5.63	5.41	5.32	6.02	6.21	5.41	5.71	5.7 ± 0.1
30	4.50	4.83	4.68	4.69	4.76	4.95	4.87	4.72	4.78	5.05	4.78 ± 0.05
70	3.88	4.07	4.15	3.88	4.14	3.79	4.25	3.41	3.88	3.97	3.94 ± 0.08
100	3.79	3.96	4.02	3.98	3.70	3.50	3.74	3.60	3.74	3.86	3.79 ± 0.05
150	3.71	3.43	3.34	3.45	3.32	3.44	3.45	3.07	3.30	3.36	3.39 ± 0.05

1.2 Zetapotentiale

Zetapotential

$$\zeta = \frac{\eta b}{\epsilon \epsilon_0} \quad (5)$$

ζ = Zetapotential in V
 η = Viskosität in $\text{Pa} \cdot \text{s}$
 ϵ = Dielektrizitätskonstante
 ϵ_0 = Influenzkonstante: $8.854187817 \cdot 10^{-12} \text{ C} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$

DEBYE–HÜCKEL–Parameter

$$\kappa = \sqrt{\frac{2F^2 I}{\epsilon_0 \epsilon R T}}$$

$$\begin{aligned} \kappa &= \text{DEBYE–HÜCKEL–Parameter in m}^{-1} \\ F &= \text{FARADAY–Konstante: } 9.6485 \cdot 10^4 \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \\ I &= \text{Ionenstärke in mol} \cdot \text{m}^{-3} \\ R &= \text{Gaskonstante: } 8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned} \quad (6)$$

Ionenstärke

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad \begin{aligned} c_i &= \text{Konzentration in mol} \cdot \text{l}^{-1} \\ z_i &= \text{Ladungszahl} \end{aligned} \quad (7)$$

Zetapotentiale		
c/mM	$\eta/\text{Pa} \cdot \text{s}$	ζ/V
10	0.001332	0.0106531
30	0.001281	0.0086095
70	0.001204	0.0066638
100	0.001150	0.0061199
150	0.001074	0.0051100

DEBYE–HÜCKEL–Parameter		
c/mM	$I/\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$	$\kappa/10^9 \text{ m}^{-1}$
10	15.8	1.576
30	35.8	2.373
70	75.8	3.453
100	105.8	4.079
150	155.8	4.950

Für die Darstellung der Zetapotentiale als Funktion des DEBYE–HÜCKEL–Parameters vgl. Abb. 1 auf S. 4.

1.3 Oberflächenladungsdichte

Oberflächenladungsdichte

$$\sigma = b\kappa\eta \quad [\sigma] = \text{C} \cdot \text{m}^{-2} \quad (8)$$

Oberflächenladungsdichte				
c/mM	b	$\kappa/10^9 \text{ m}^{-1}$	$\eta/\text{Pa} \cdot \text{s}$	$\sigma/\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$
10	5.7 ± 0.1	1.576	0.0013	0.012
30	4.78 ± 0.05	2.373	0.0013	0.015
70	3.94 ± 0.08	3.453	0.0012	0.016
100	3.79 ± 0.05	4.079	0.0012	0.018
150	3.39 ± 0.05	4.950	0.0011	0.018

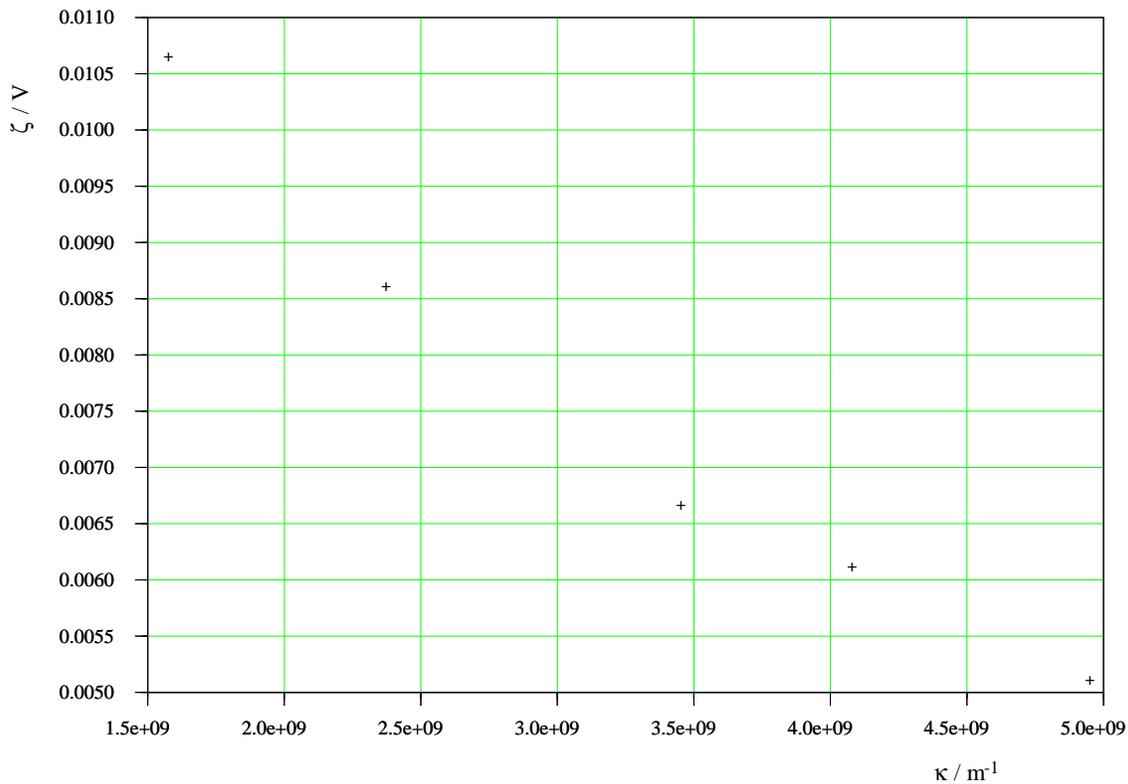


Abbildung 1: Zetapotenziale als Funktion des DEBYE-HÜCKEL-Parameters

1.4 Mittlerer Abstand der Ladungen auf der Zelloberfläche

$$q_{\text{ges}} = \sigma \cdot 1.602177 \cdot 10^{19} \quad \text{Gesamtladung pro } m^2$$

$$q_{\text{ery}} = q_{\text{ges}} \cdot A_{\text{ery}} \quad \text{Gesamtladung pro Erythrocyt}$$

$$A_{\text{ery}} = 137 \cdot 10^{-6} \mu\text{m} \quad \text{Oberfläche Erythrocyt}$$

$$A_q = \frac{A_{\text{ery}}}{q_{\text{ery}}} \quad \text{Fläche pro Ladung}$$

$$d_q = \sqrt{\frac{A_q}{q_{\text{ery}}}} \quad \text{mittlerer Ladungsabstand}$$

Mittlerer Ladungsabstand				
c/mM	$q_{\text{ges}}/10^{17}\text{e}$	$q_{\text{ery}}/10^{13}\text{e}$	$A_q/10^{-16}\text{m}^2$	$d_q/10^{-7}\text{m}$
10	1.92	2.62	5.22	2.28
30	2.33	3.19	4.29	2.07
70	2.62	3.60	3.81	1.95
100	2.85	3.90	3.51	1.87
150	2.89	3.95	3.47	1.86

1.5 Elementarladungen pro Protein

$$q_{\text{prot}} = \frac{q_{\text{ery}}}{A_{\text{ery}}} \quad \text{Elementarladungen pro Protein}$$

e pro Protein	
c/mM	10 ⁶ e
10	17.5
30	21.3
70	24.0
100	26.0
150	26.4

1.6 Strömungsprofil

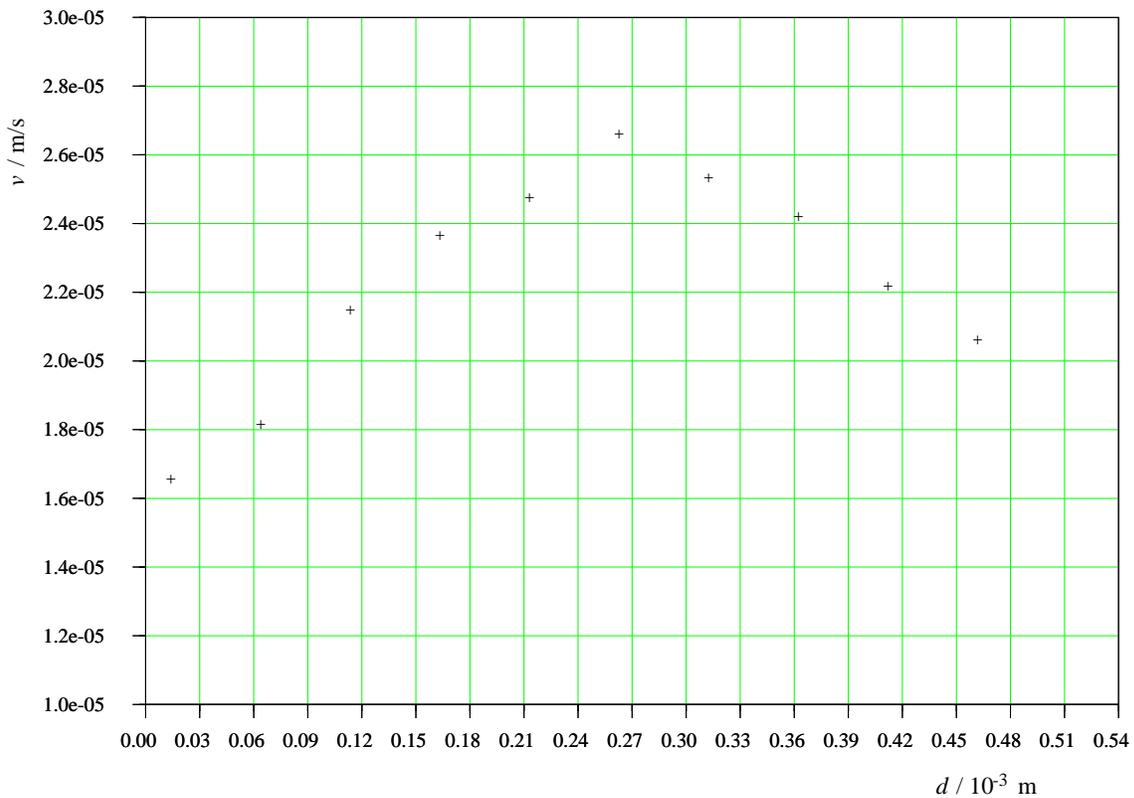


Abbildung 2: Strömungsprofil der Lösung

2 Fehlerdiskussion

Eine konkrete Angabe von Fehlern für die einzelnen Werte gestaltet sich schwierig. Die Fehlerbereiche der Meßgeräte sind so klein — das Konstantstromgerät hatte im Bereich von 1–10 mA einen Fehler von ± 0.1 mA, darüber von ± 0.5 mA, der Fehler der Skala zur ObjektivEinstellung liegt geschätzt bei ± 1 Skaleneinheit —, daß sie in der Berechnung nicht weiter von Belang sein dürften.

Größte Fehlerquelle war sicherlich die Messung der Bewegungszeit der Erythrocyten, Abweichungen in der Dimension 10^{-1} s sind durchaus wahrscheinlich. Hierin ist wahrscheinlich auch die Ursache für das deutlich zu spitze Strömungsprofil zu suchen.

3 Fragen

1. Wie ist das elektrische Potential definiert? Warum liegt in der Unendlichkeit ein geeignetes Bezugspotential vor? Wie mißt man Potentiale?
2. Erläutern Sie die elektrokinetischen Phänomene.
3. Wie ist die Beweglichkeit allgemein definiert? Erklären Sie die elektrophoretische Beweglichkeit.
4. Warum wird zur Erzeugung einer konstanten Feldstärke in der Meßküvette ein Konstantstromgerät verwendet?
5. Erläutern Sie die Entstehung einer stationären Ebene.

3.1 Elektrisches Potential

Das elektrische Potential ψ ist ein Zustandsparameter eines bestimmten Punktes im Raum, der definiert ist durch die Arbeit, die erforderlich ist, um eine Ladung q (1 Coulomb) aus unendlicher Entfernung an diesen Punkt zu bringen. Maßeinheit des elektrischen Potentials ψ ist das Volt (V). Punkte gleichen Potentials liegen auf derselben Äquipotentiallinie bzw. –ebene.

Im Falle des elektrischen Feldes um eine Punktladung q ist das elektrische Potential ψ eine Funktion der radialen Entfernung r :

$$\psi = \frac{q}{4\pi\epsilon_0\epsilon r}$$

3.2 Elektrokinetische Phänomene

Strömungspotential Als Strömungspotential bezeichnet man eine elektrische Potentialdifferenz, die in Strömungsrichtung an einer Oberfläche bzw. in einer engen Kapillare mit Festladungen entsteht. Die Ursache dafür ist die Überlagerung von Strömungsprofil und Ionengradient in der elektrischen Doppelschicht.

Elektroosmose ist der umgekehrte Effekt des Strömungspotentials. Basierend auf den gleichen Grundprinzipien entsteht an einer Oberfläche oder in einem Rohr eine Strömung, wenn ein statisches elektrisches Feld angelegt wird.

Sedimentationspotential auch DORN–Effekt genannt. Läßt man geladene Teilchen im Schwerfeld sedimentieren, so bildet sich in Sedimentationsrichtung eine geringe elektrische Potentialdifferenz in der Flüssigkeit aus.

Elektrophorese Gerichtete Bewegung von suspendierten geladenen Teilchen in einer nichtleitenden Flüssigkeit unter Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes.

Die Ladung der suspendierten Teilchen influenziert eine Wolke entgegengesetzt geladener Ionen, die die Teilchen umgeben. Daher hängt die Kraft auf das Teilchen nicht allein von dessen Ladung, sondern auch von der Ionenkonzentration des Suspensionsmittels ab.

3.3 Beweglichkeit

Die allgemeine Definition der Beweglichkeit w lautet:

$$w = \frac{\vec{v}}{\vec{F}} \qquad \vec{v} = \text{Geschwindigkeit in m} \cdot \text{s}^{-1}$$
$$\qquad \qquad \qquad \vec{F} = \text{Kraft in N}$$

Die elektrophoretische Beweglichkeit b ist definiert als:

$$b = \frac{\vec{v}}{\vec{E}} \qquad \vec{v} = \text{Geschwindigkeit in m} \cdot \text{s}^{-1}$$
$$\qquad \qquad \qquad \vec{E} = \text{elektrische Feldstärke in V} \cdot \text{m}^{-1}$$

3.4 Erzeugung einer konstanten Feldstärke

Ein Konstantstromgerät hat die Eigenschaft, daß sich im Meßvolumen eine konstante Feldstärke ergibt, da hier das Medium homogen ist und das OHMsche Gesetz gilt. Außerdem erzeugt konstanter Strom einen konstanten Spannungsabfall und damit eine konstante Feldstärke.

3.5 Stationäre Ebene

Durch die Wechselwirkung des Feldes mit den Ladungen des wässrigen Teils der Doppelschicht, die meist positiv geladen ist, entsteht am Rand der Lösung eine Strömung zur negativen Elektrode. Aus der Forderung nach einem verschwindenden Summenflux durch einen beliebigen Querschnitt mit geschlossener Kammer ergibt sich ein parabolisches Strömungsprofil mit einer rein hydrodynamisch erzeugten Rückströmung. Beide Strömungen heben sich bei etwa 21% der Kammertiefe der stationären Ebene auf.