

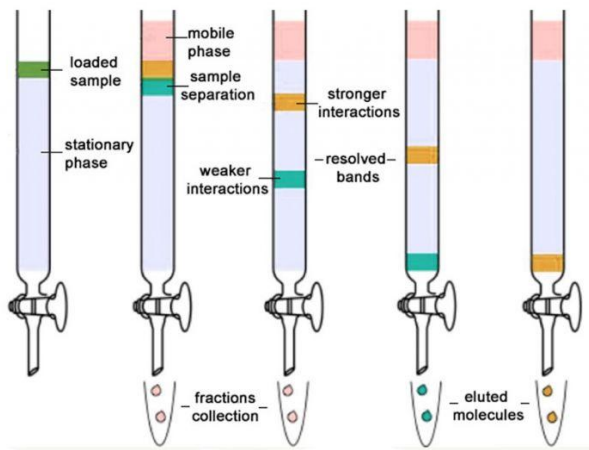
# Centrifugační metody separace biomakromolekul

---

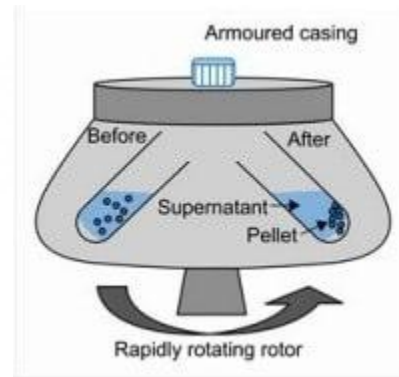
METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

# Metody separace makromolekul

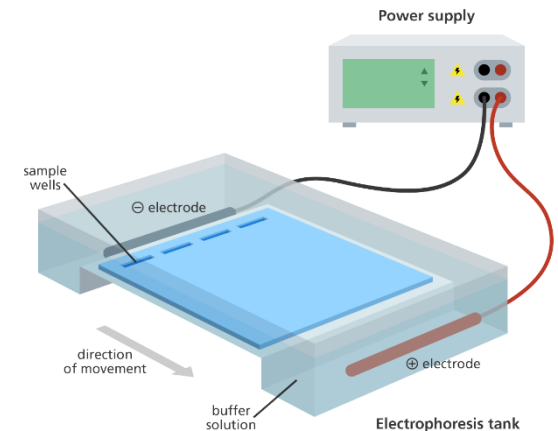
## 1. chromatografické



## 2. centrifugační



## 3. elektromigrační



dělení podle velikosti, tvaru, hustoty, náboje

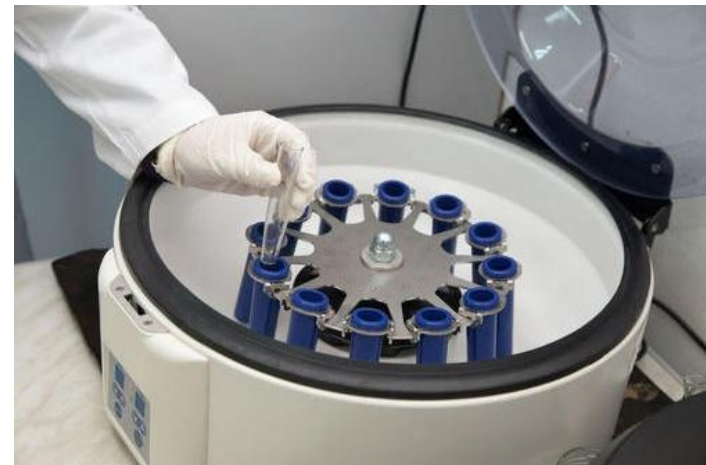
# Centrifugační metody

---

Principem separace je pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivé síly, která vzniká při otáčení rotoru centrifugy

Urychlení sedimentace - izolace, purifikace a charakterizace částí buněk a biomakromolekul

Různé obehmy vzorků, rychlosti rotorů



# Typy centrifugačních metod

---

## 1. Diferenciální centrifugace

směs heterogenních částic v homogenním roztoku

## 2. Zonální centrifugace

směs částic s podobnými vlastnostmi v gradientním roztoku

- Izokinetická centrifugace – sedimentační koeficient  $S$
- Izopyknická (hustotní) centrifugace – vznášivá hustota  $\rho$

# Základní vztahy

$$G = \omega^2 r$$

Centrifugační zrychlení

$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

Úhlová rychlost (**rpm – otáčky za minutu**)

$$G = 4\pi^2 \text{ rpm}^2 r/3600$$

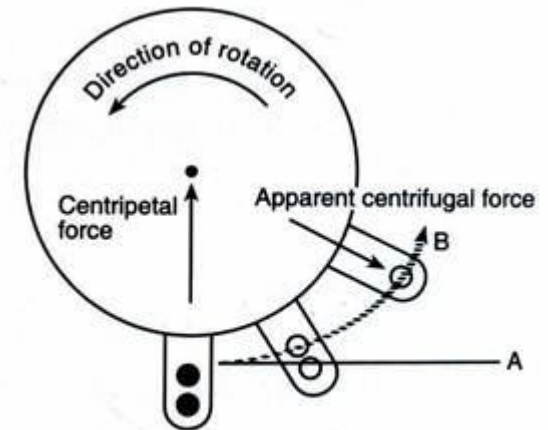
$$\text{RCF} = 4\pi^2 \text{ rpm}^2 r/3600 \times 981$$

RCF - relativní centrifugační síla

$$g = 981 \text{ cm s}^{-2}$$

$$\text{RCF} = (1.118 \times 10^{-5}) \text{ rpm}^2 r$$

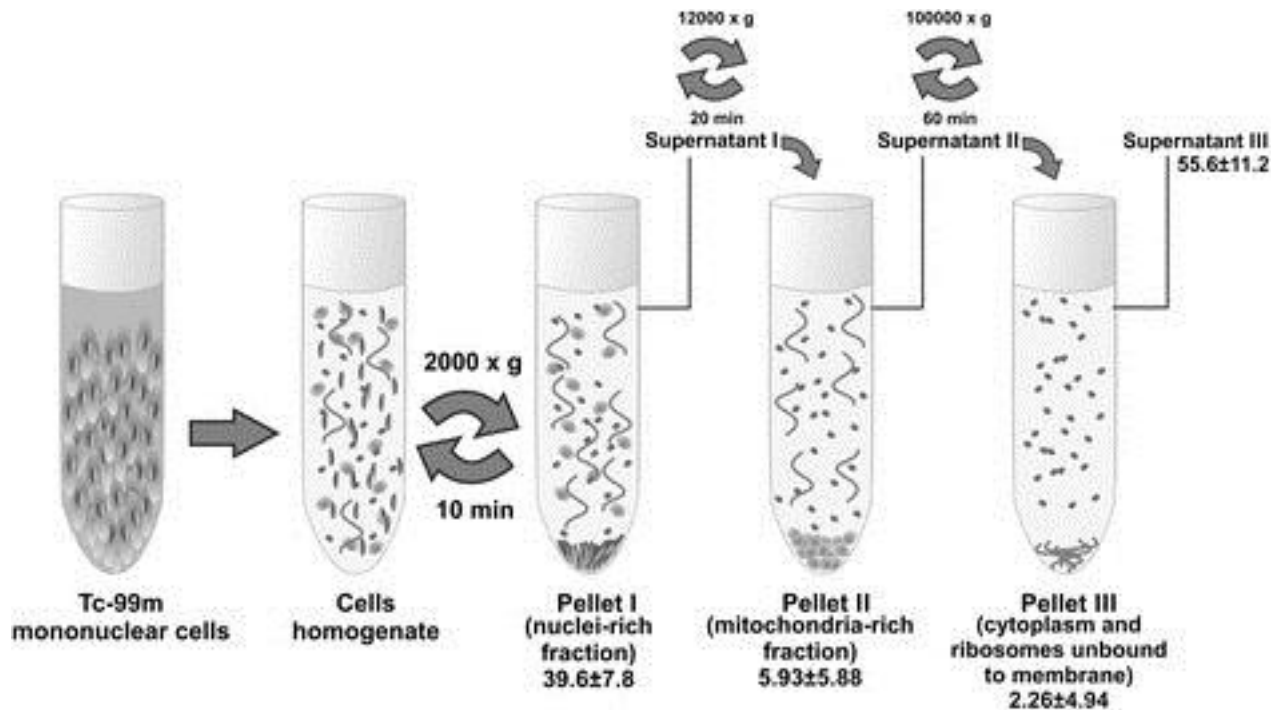
RCF vs. rpm – je třeba znát  
poloměr rotoru centrifugy



**Fig. 5.2:** Different forces during centrifugation

# Diferenciální centrifugace

Separace částic s významně odlišnými vlastnostmi v **homogenním roztoku** – sedimentace částic různou rychlostí – více opakování



Souza, Sergio et al. (2015). 99m-Techetium binding site in bone marrow mononuclear cells. Stem Cell Research & Therapy. 6. 10.1186/s13287-015-0107-0.

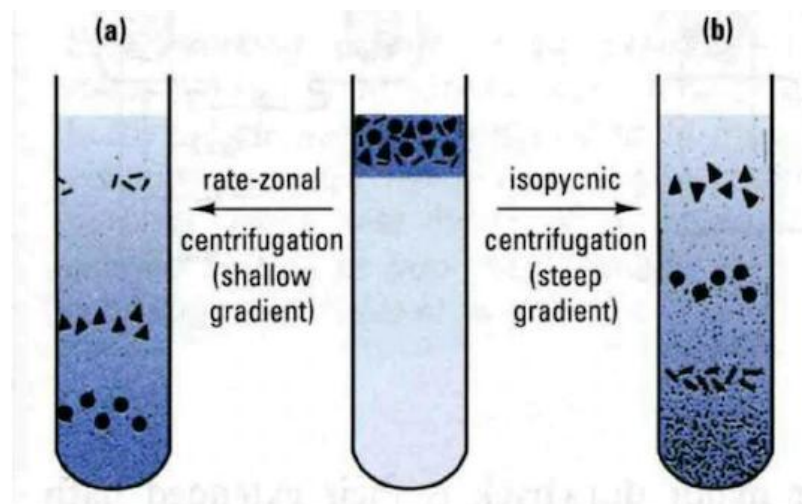
# Zonální centrifugace

Homogenní roztok je nahrazen **gradientním roztokem** – zvyšující se koncentrace v centrifugační zkumavce od hladiny ke dnu

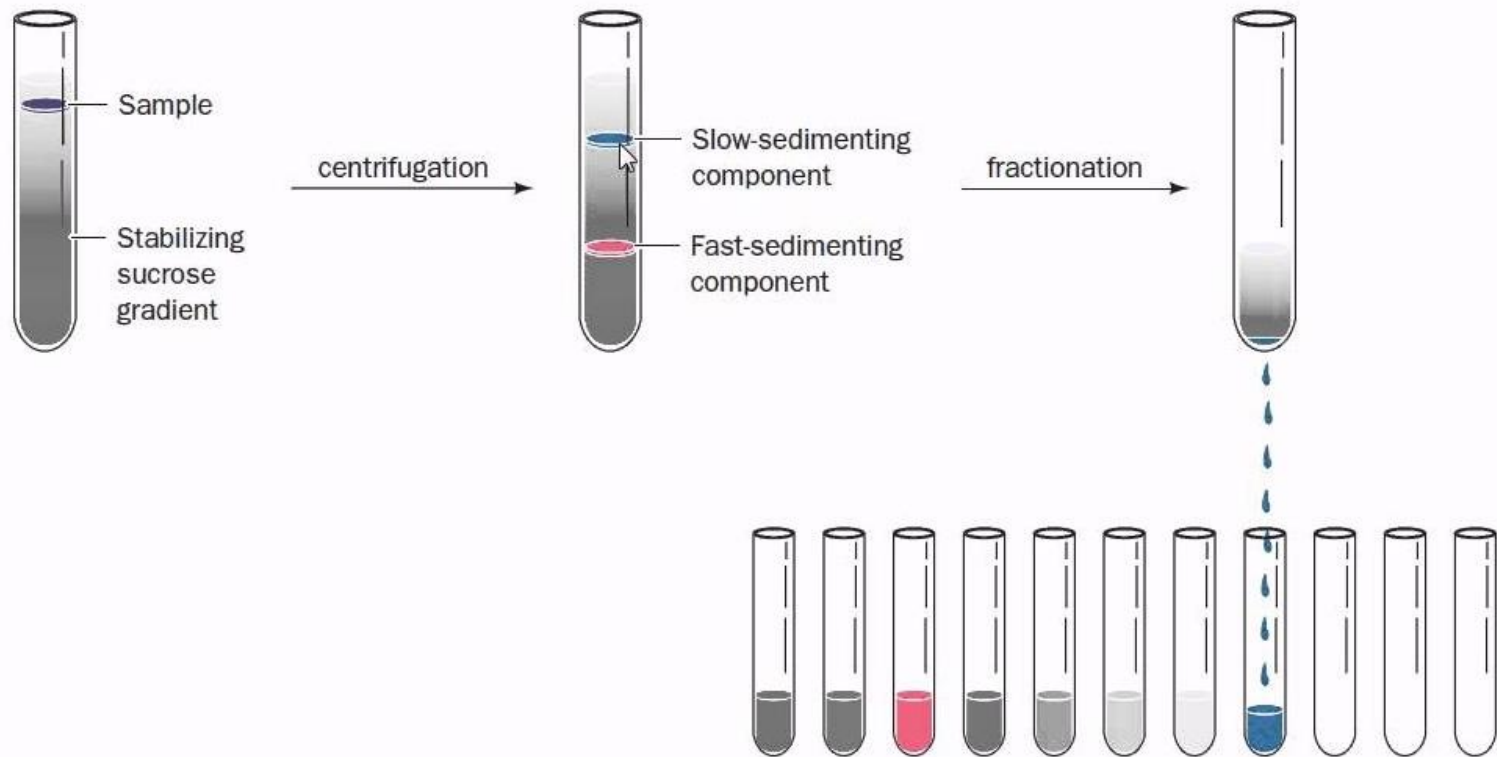
Jednotlivé složky směsi vytváří v gradientním roztoku oddělené zóny

Gradientní roztoky – např. sacharóza, glycerol, CsCl, Percoll

Separace podle velikosti - např. nukleové kyseliny, ribozomální podjednotky



# Zonální centrifugace



**Figure 6-30 Zonal ultracentrifugation.** The sample is layered onto a sucrose gradient (*left*). During centrifugation (*middle*), each particle sediments at a rate that depends largely on its mass.

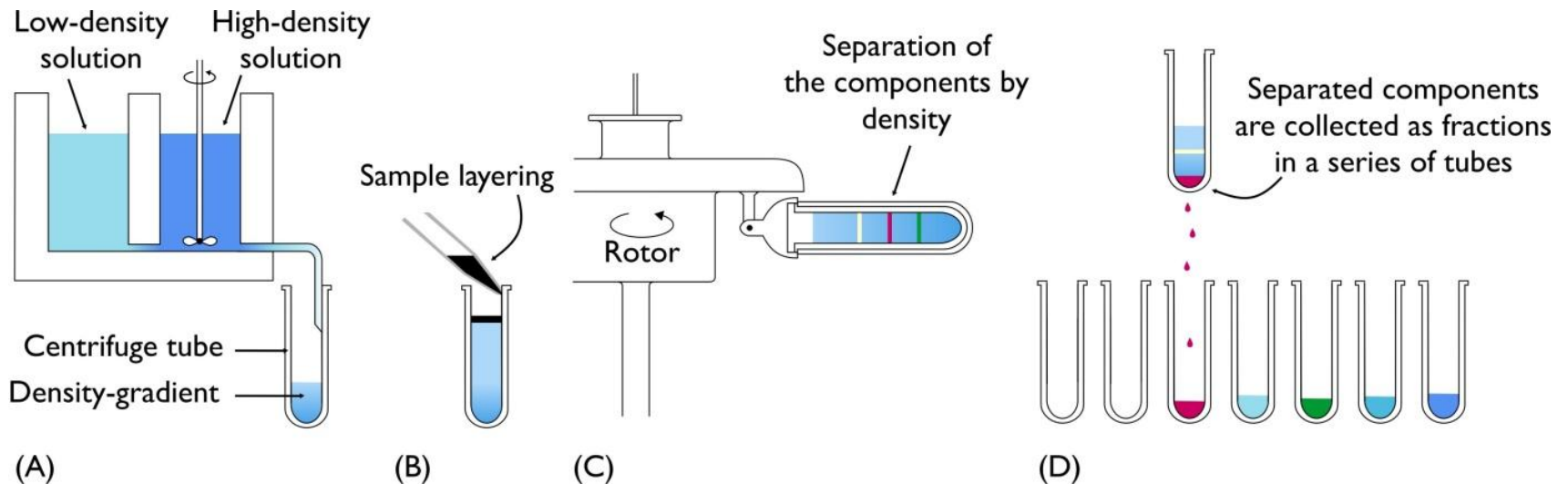
After the end of the run, the centrifugation tube is punctured and the separated particles (zones) are collected (*right*).



# Hustotní gradient

Sacharóza: 1,0 - 1,3 g/ml

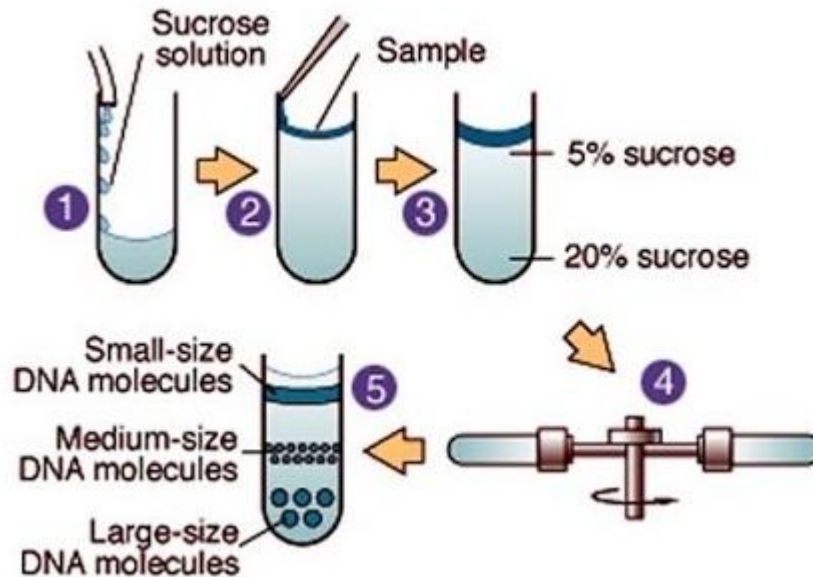
CsCl: 1,0 - 1,9 g/ml



# Izokinetická centrifugace

Rychlost sedimentace částic je v průběhu centrifugace konstantní (stoupající hustota roztoku) – je dána především velikostí částice

Separace nukleových kyselin: 5 – 20 % sacharózový gradient



# Sedimentační koeficient (s)

---

Je třeba znát  $\omega$  a polohy částic  $x_1$  a  $x_2$  ve zkumavce v časech  $t_1$  a  $t_2$

Rozmezí sedimentačních koeficientů biomakromolekul se pohybuje mezi  $10^{-11}$  a  $10^{-13}$  s

Svedbergova jednotka - 1 S (Svedberg) =  $10^{-13}$  s

$$s \, (dt) = \frac{1}{\omega^2} (dx/x) \quad (12-14)$$

Integrating between the limits set above, we obtain

$$s \int_{t_1}^{t_2} dt = \frac{1}{\omega^2} \int_{x_1}^{x_2} dx/x \quad (12-15)$$

and

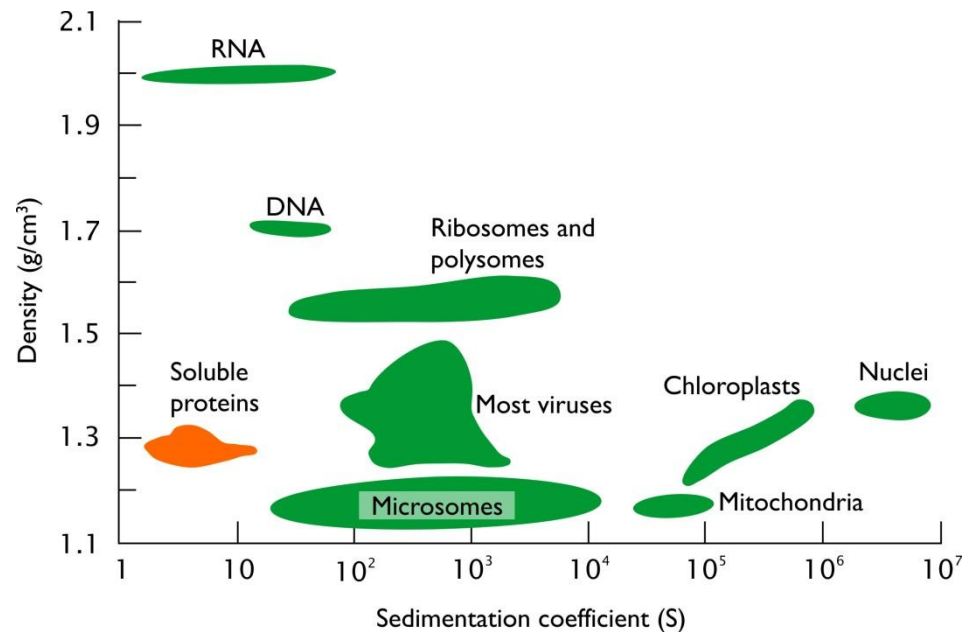
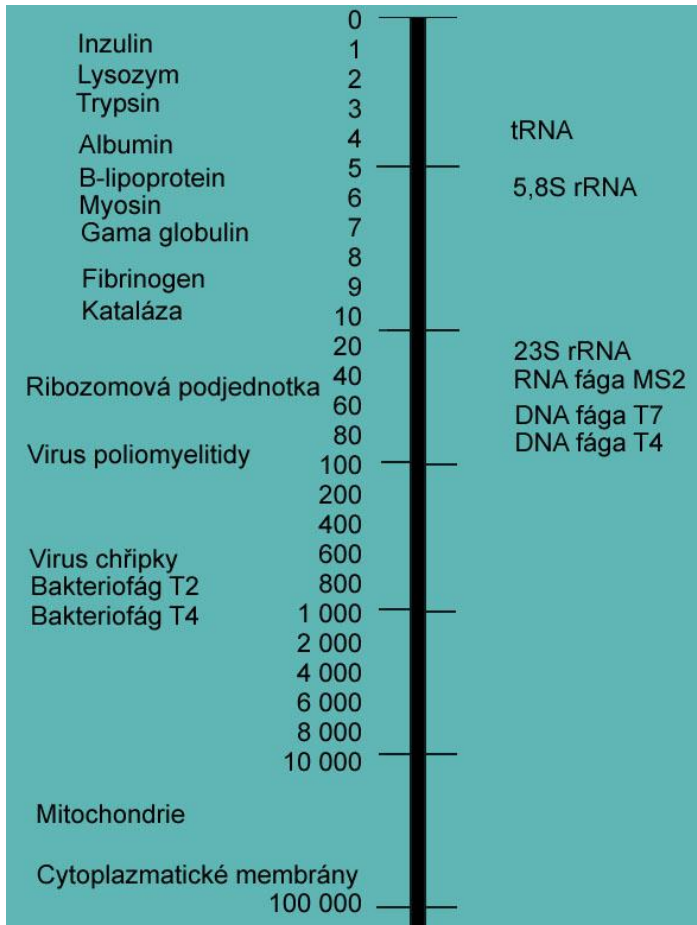
$$s (t_2 - t_1) = \frac{1}{\omega^2} (\ln x_2 - \ln x_1) = \frac{1}{\omega^2} \left( \ln \frac{x_2}{x_1} \right) \quad (12-16)$$

Therefore,

$$s = \frac{1}{\omega^2 (t_2 - t_1)} \ln \frac{x_2}{x_1} \quad (12-17)$$

<http://www.biologydiscussion.com/cell-biology/centrifugation-theory-sedimentation-rate-coefficient-and-other-details>

# Sedimentační koeficient



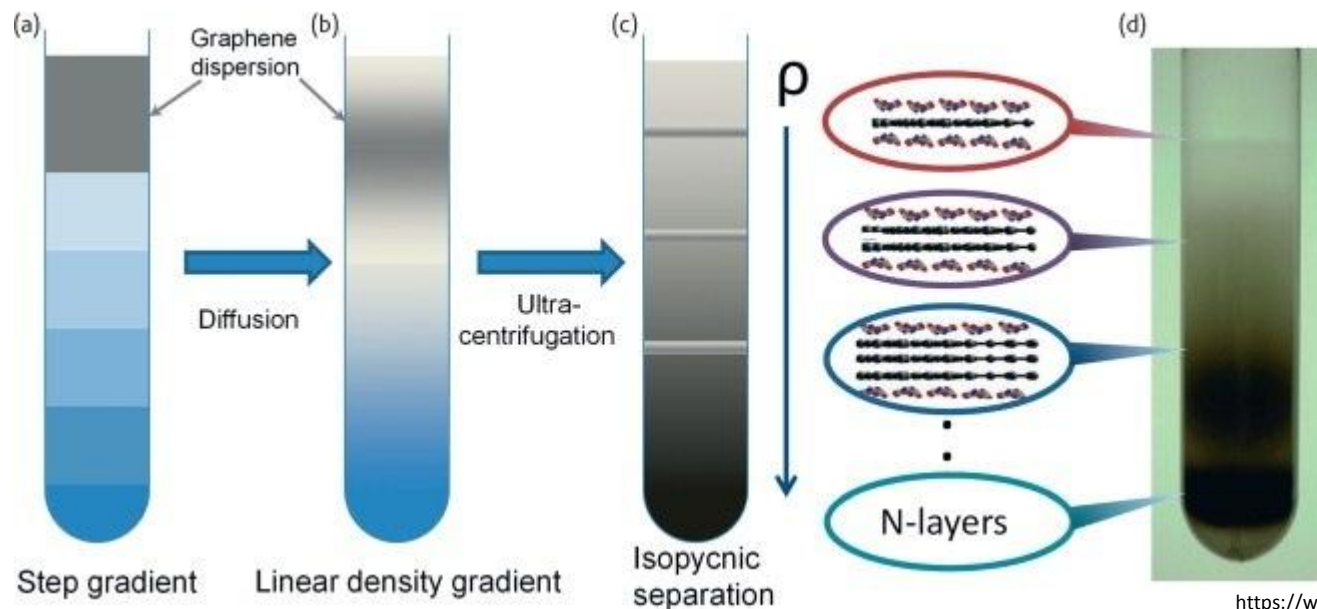
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch05s03.html>

# Izopyknická centrifugace

Částice se dělí podle hustoty (také hustotní centrifugace)

Vytvoření **hustotního gradientu** v centrifugační zkumavce

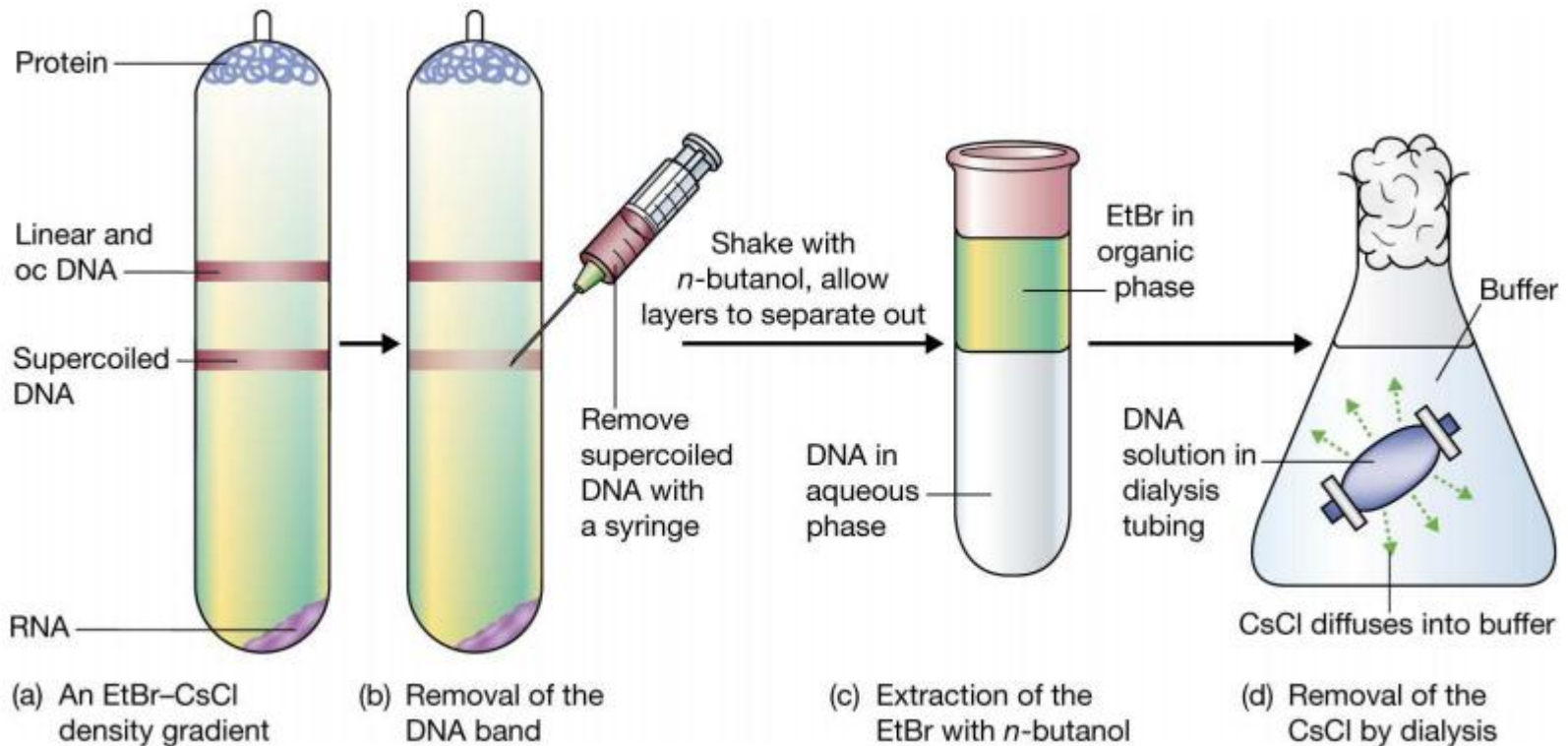
Analyzované částice se pohybují v roztoku do místa o stejné hustotě



<https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-rate-zonal-and-isopycnic-centrifugation>

# Separace superhelikální DNA

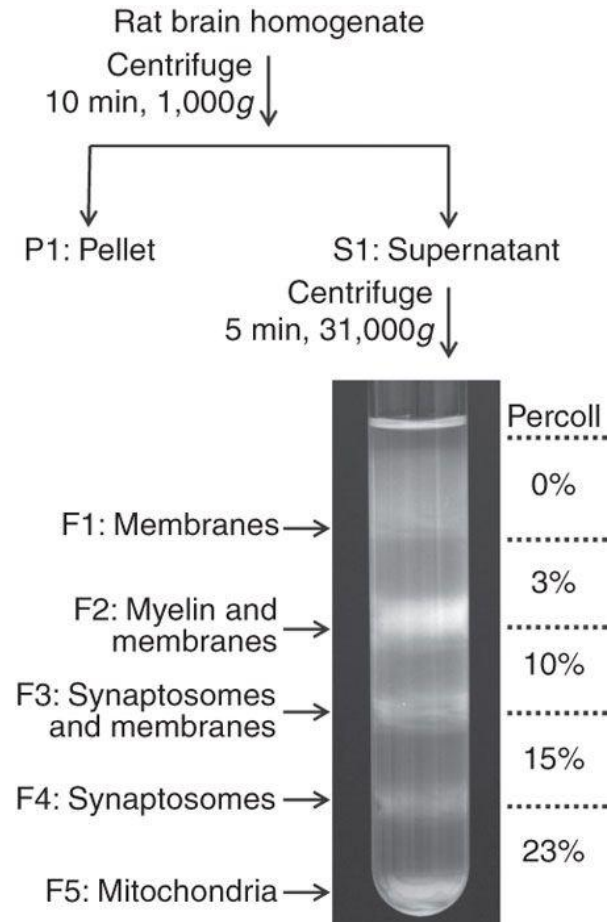
## Gradient CsCl/EtBr



# Separace organel - izolace DNA

Gradient roztoku Percollu –  
separace buněčných částí

Izolace např. mitochondriální  
nebo chloroplastové DNA



Dunkley, Peter et al. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols* volume3, pages 1718–1728 (2008)

# Výpočet % G+C v DNA

## Gradient CsCl

$\rho$  – vznášivá hustota (buoyant density)

- vliv zastoupení bazí v DNA

$$\% \text{ G+C} = (\rho - 1,66) / 0,098 * 100$$

