

## 2. Centrifugační metody separace makromolekul

Motto semináře:  
*„A přece se točí“*

Metody molekulární biologie pro farmaceuty

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.  
hosek@mail.muni.cz

Ústav molekulární farmacie  
FaF MU

# Orientace v bludišti metod pro separaci biologických makromolekul

**Vlastnosti využívané pro dělení biologických makromolekul obecně**



**Molekulová hmotnost**

**Konformace a tvar**

**Náboj**

**Hustota**

# **Orientace v bludišti metod pro separaci biologických makromolekul**

## **Metody separace**

**Elektromigrační**

**Chromatografické**

**Centrifugační**

# Orientace v bludišti metod pro separaci biologických makromolekul

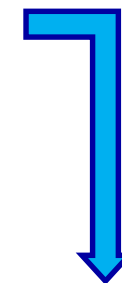
## Metody separace

**Elektromigrační** 

**Elektroforetická separace  
biologických makromolekul**

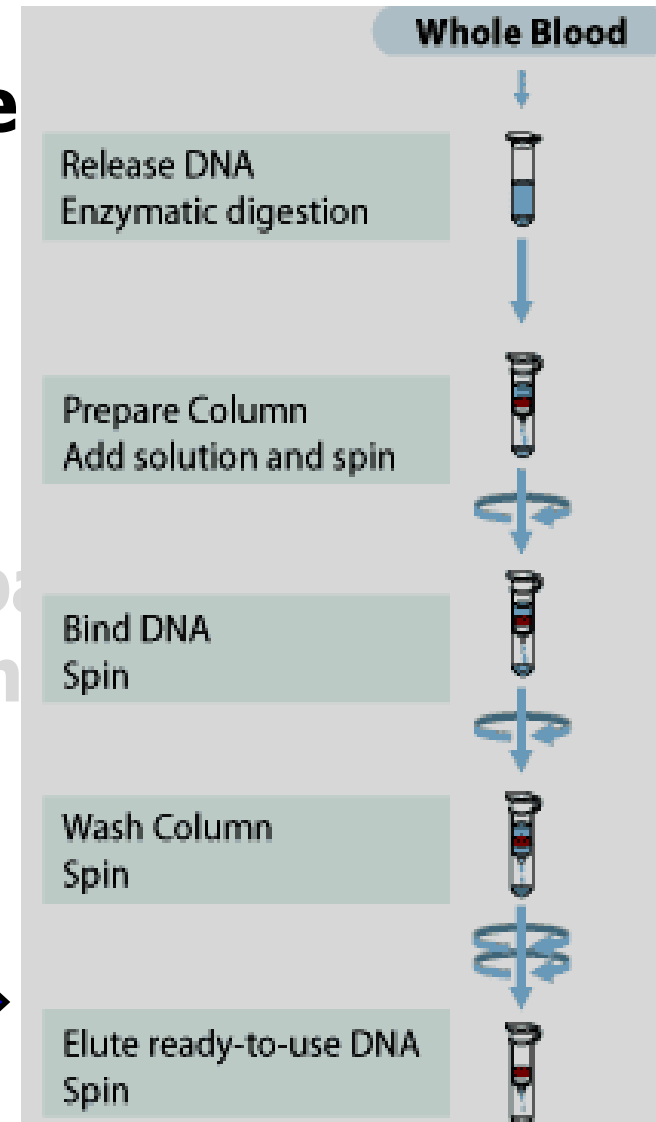
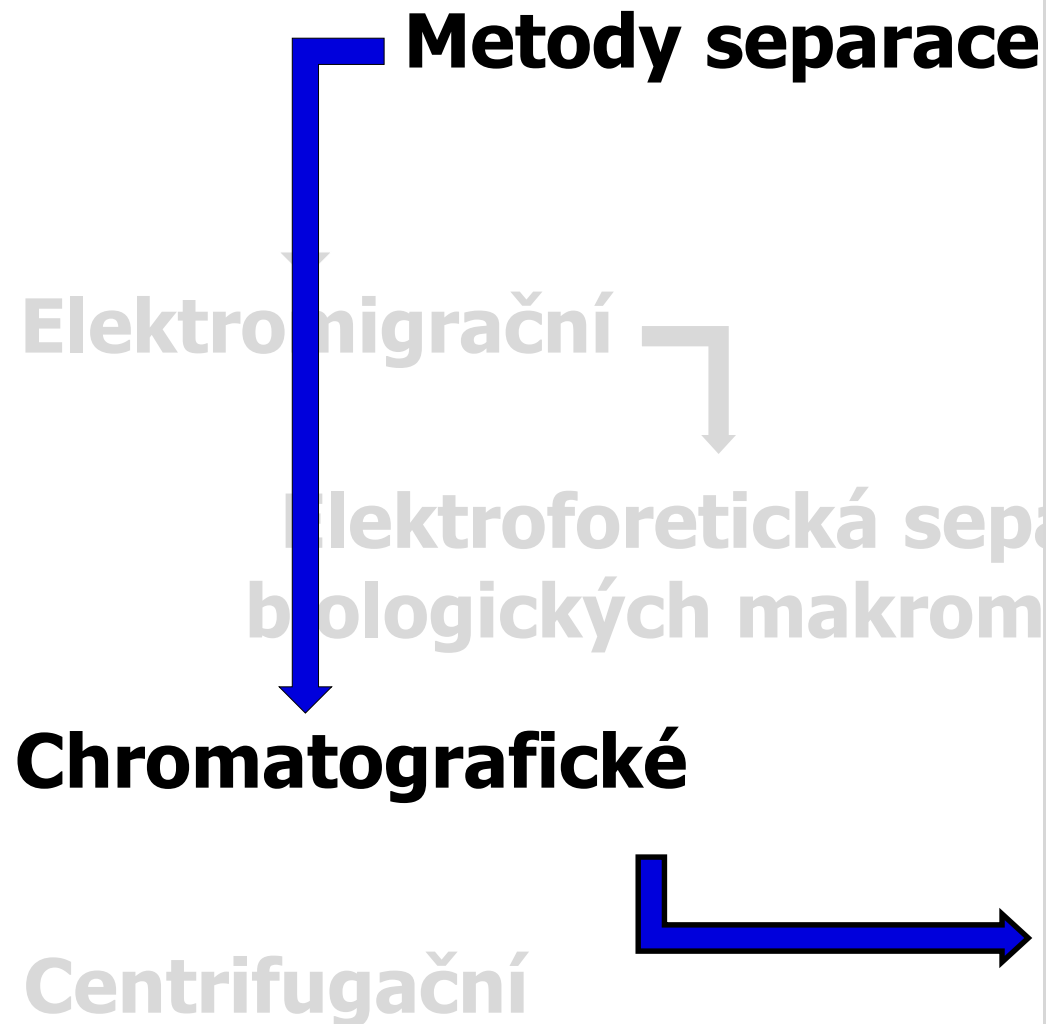
Chromatografické

Centrifugační

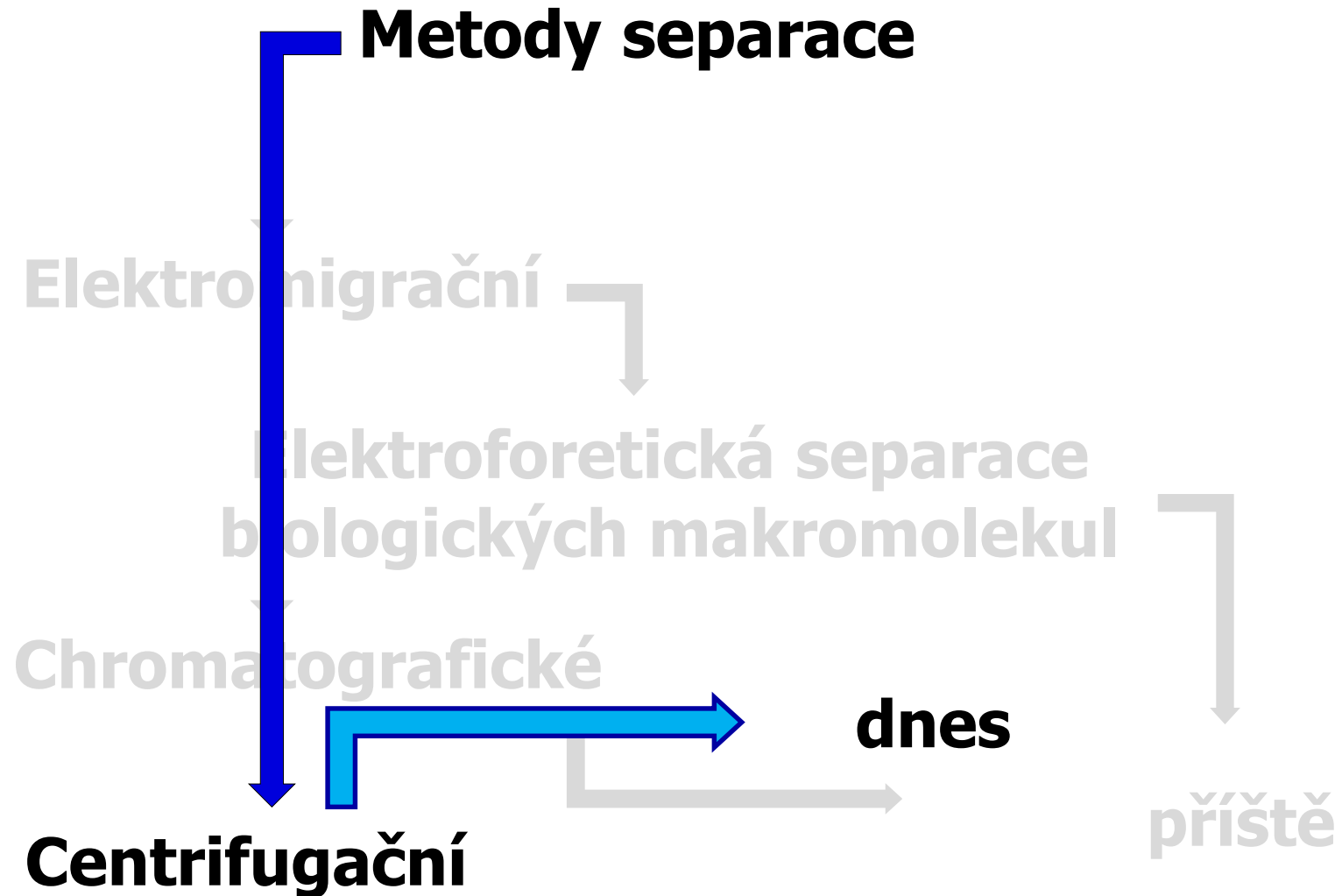


**příště**

# Orientace v bludišti metod pro separaci biologických makromolekul



# Orientace v bludišti metod pro separaci biologických makromolekul





## **Pohyb látek v gravitačním poli - centrifugace -**

# Centrifugační metody

## PRINCIP

Pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy.

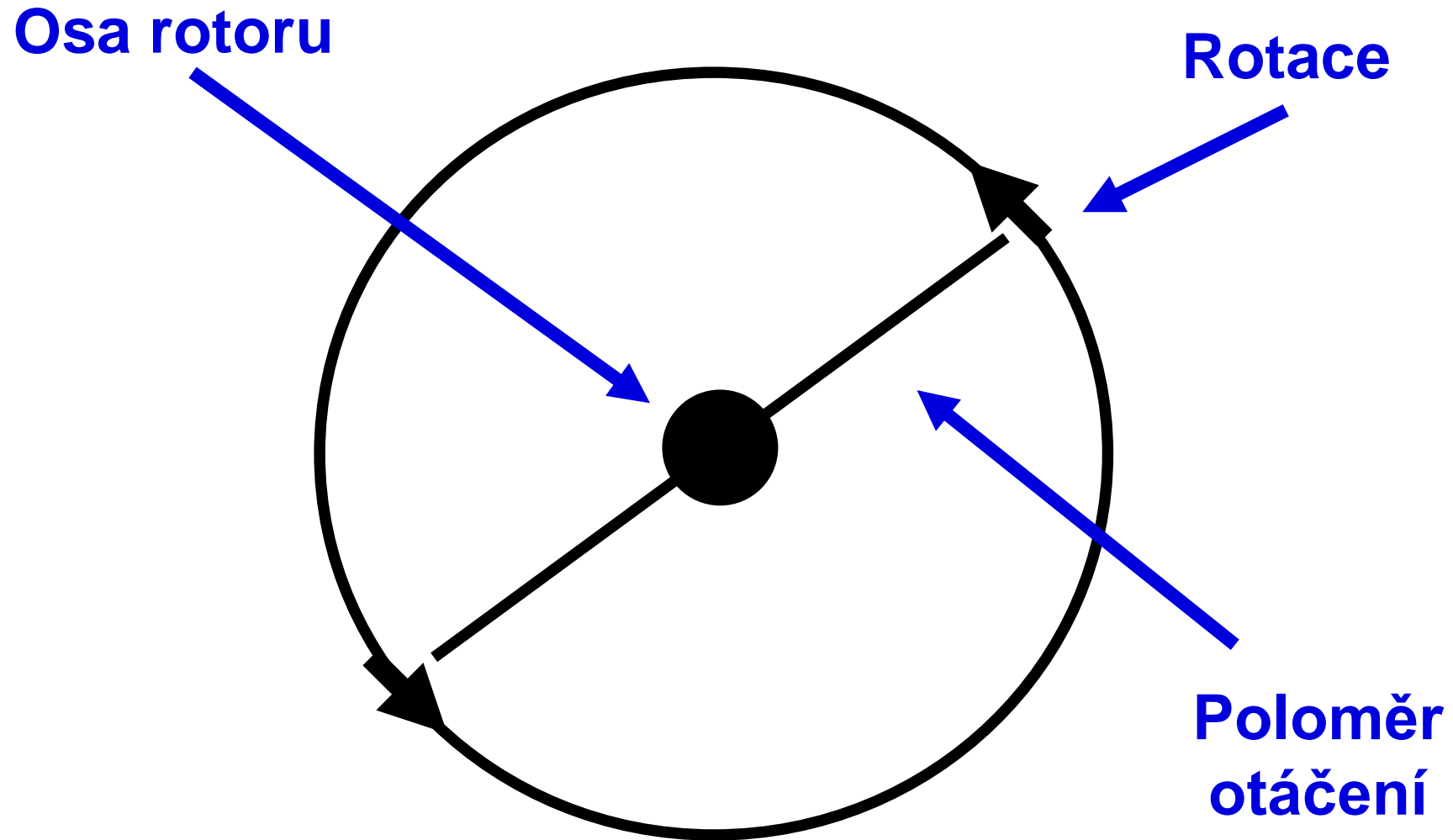
Chování částic je dáno:

1. jejich vlastnostmi
2. povahou prostředí





# Princip centrifugace



# Centrifugy



1011 w/ 1014



1011 w/ 1025



# Rozdělení centrifugačních technik

**Diferenciální centrifugace**

**Zonální centrifugace**

# Rozdělení centrifugačních technik

## Diferenciální centrifugace

**Separace směsi  
heterogenních částic  
v homogenním roztoku**

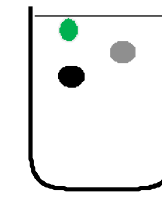
# Rozdělení centrifugačních technik

**Separace směsi**  
**částic s podobnými vlastnostmi**  
**Zonální centrifugace**  
**v gradientním roztoku**

# Diferenciální centrifugace

- Částice se liší podstatně velikostí, hmotností nebo hustotou = složky směsi budou sedimentovat různou rychlostí.
- Opakovanou centrifugací lze z původní směsi při postupném zvyšování otáček získat jednotlivé složky nebo frakce ve formě sedimentu.
- Výchozí krok pro hrubou separaci a izolaci složek z lyzátů buněk nebo homogenátů tkání

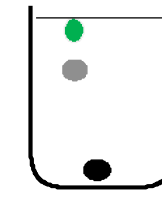
## Diferenciální centrifugace



*Směs látek v roztoku.*



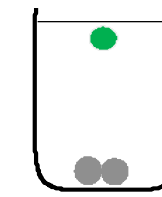
*Centrifugace při nízkých otáčkách (1 000 g).*



*Shromáždění sedimentu.*



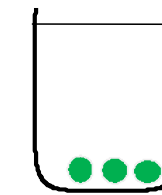
*Centrifugace supernatantu při středních otáčkách (20 000 g).*



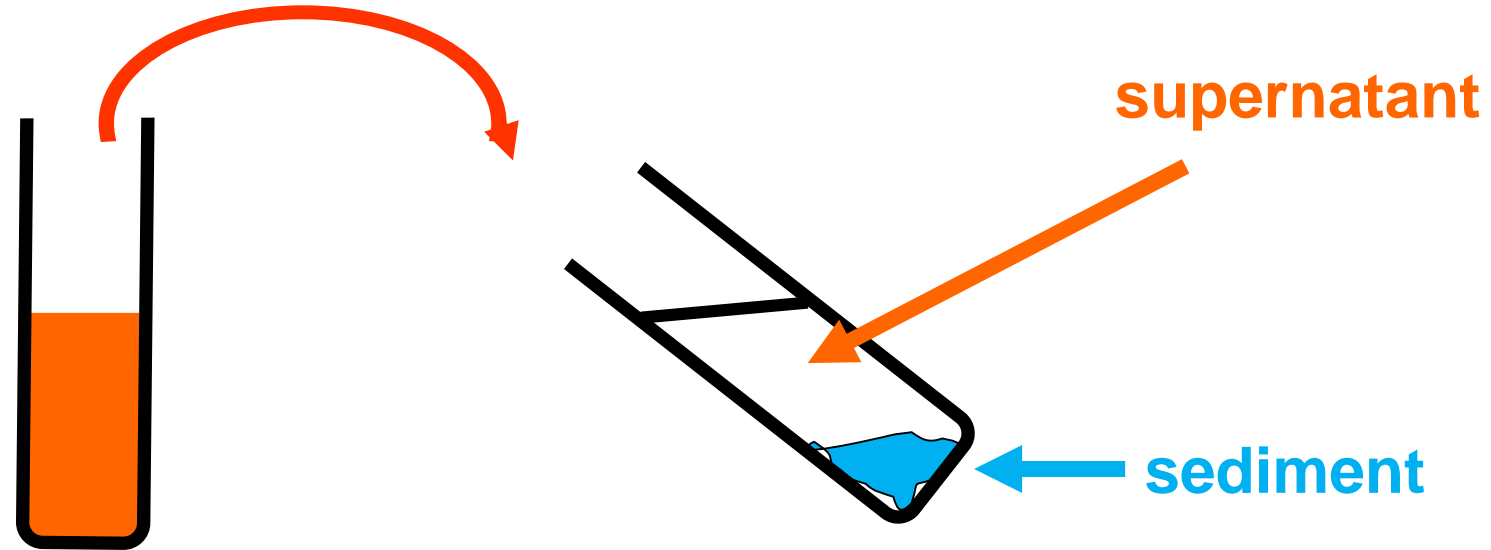
*Shromáždění sedimentu.*



*Centrifugace supernatantu při vysokých otáčkách (80 000 g).*

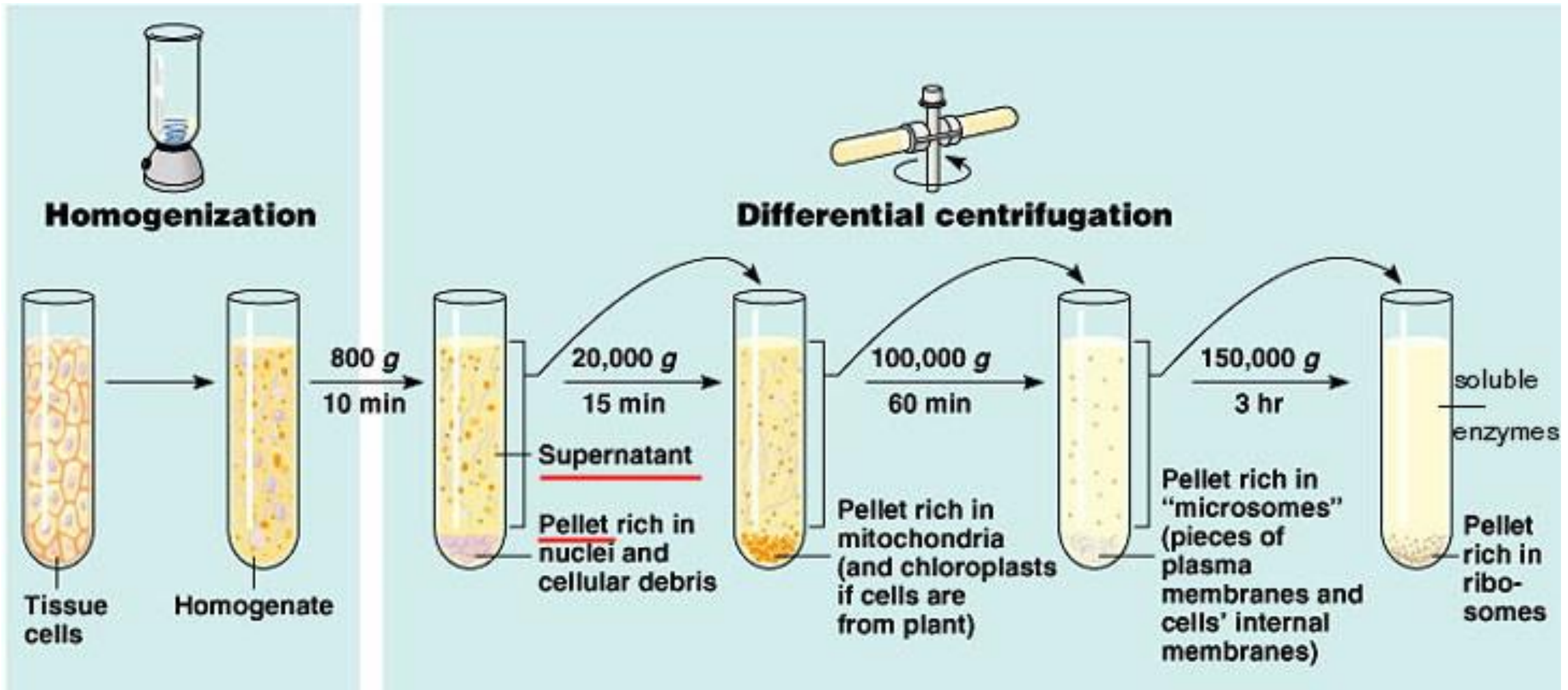


# Diferenciální centrifugace



**separace jader, ribozómů, mitochondrií,  
buněčných membrán, nukleových kyselin,  
proteinů**

# Diferenciální centrifugace - praxe





# Diferenciální centrifugací **nelze** oddělit

- různé typy nukleových kyselin
- ribozomální podjednotky
- jiné částice, vykazující podobné vlastnosti

**To řeší zonální centrifugace**

# Zonální centrifugace

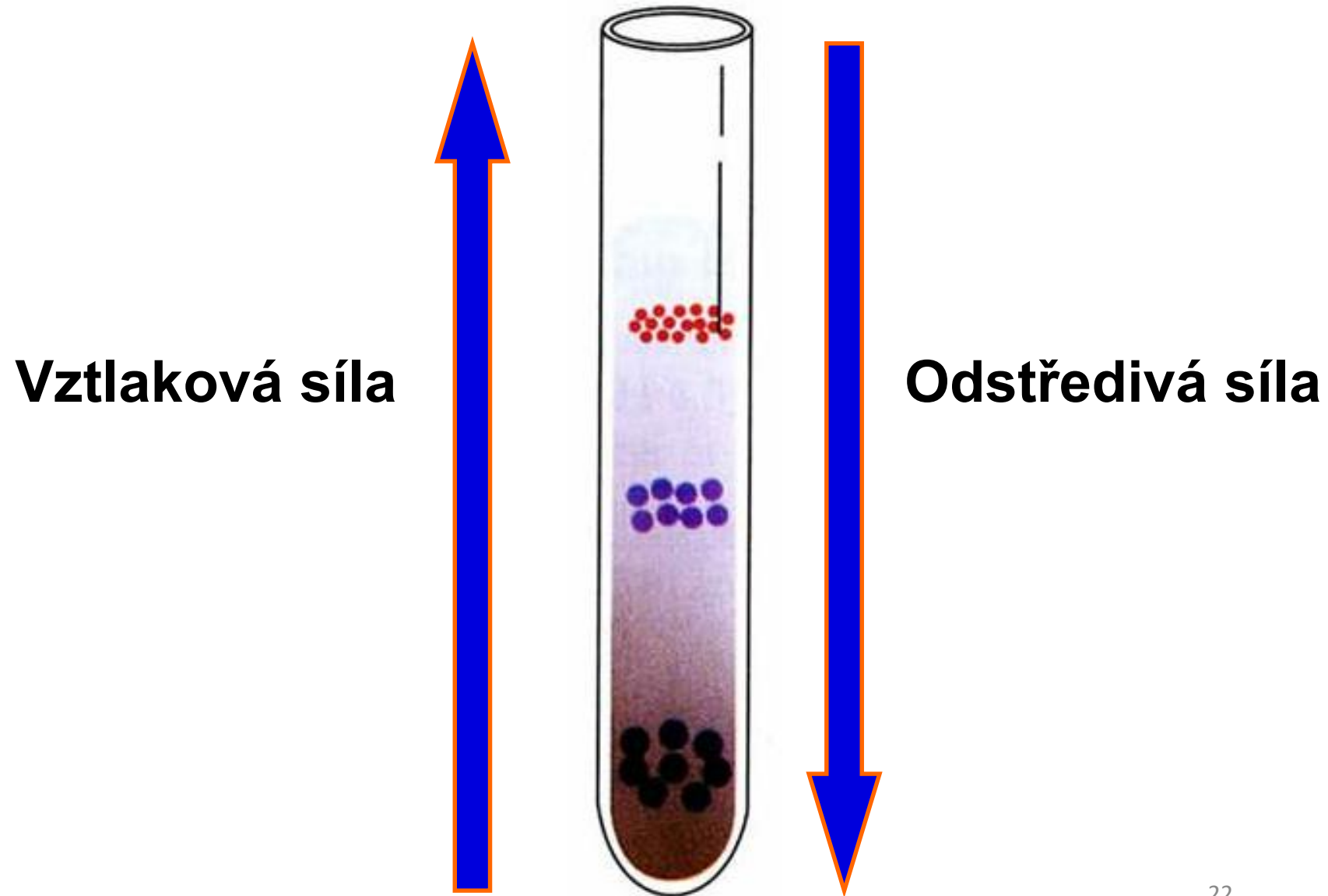
## Izokinetická centrifugace

- separace podle rychlosti sedimentace částic
- stanovení **sedimentačního koeficientu S**

## Izopyknická centrifugace

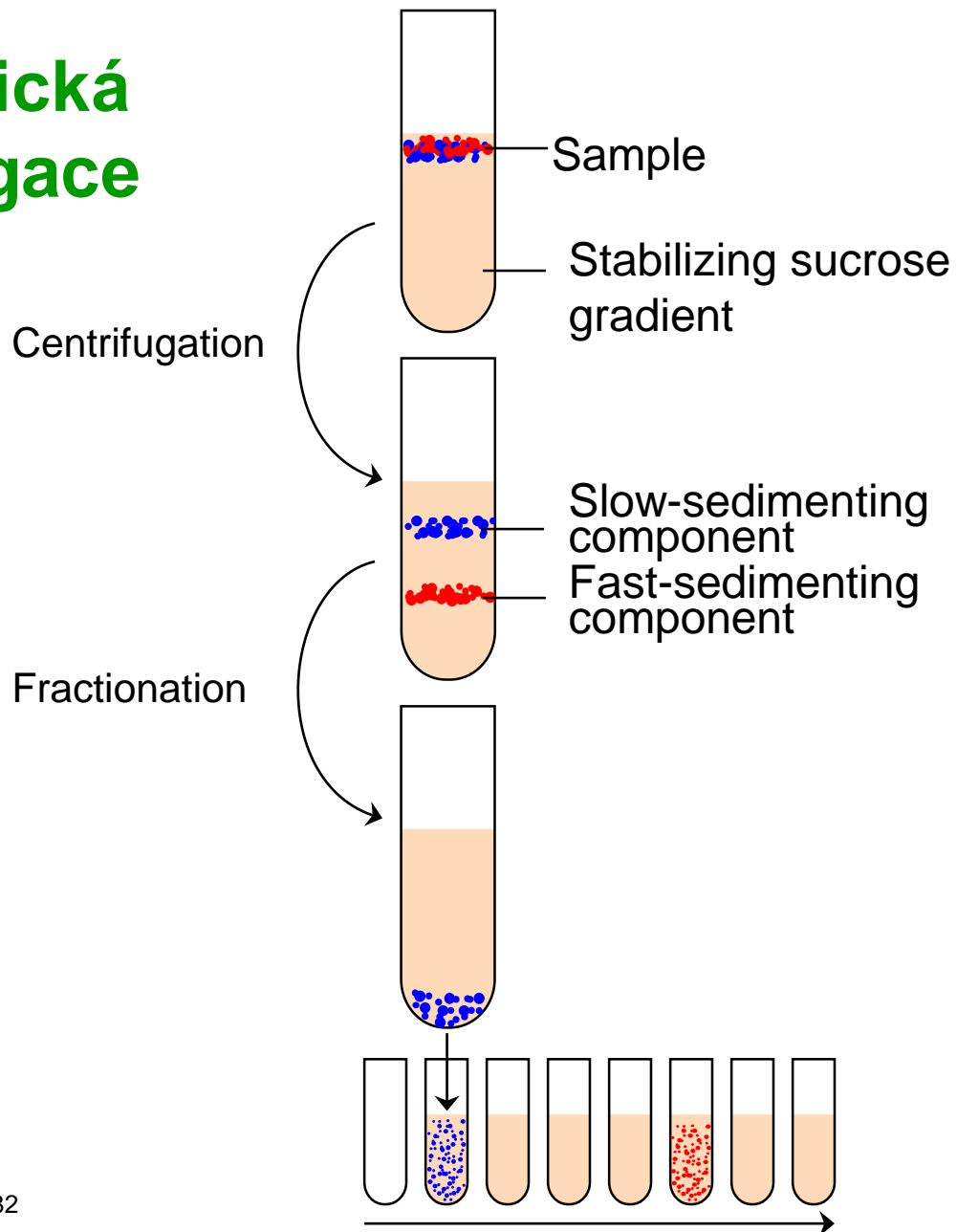
- separace podle hustoty částic

# *Síly při zonální centrifugaci*

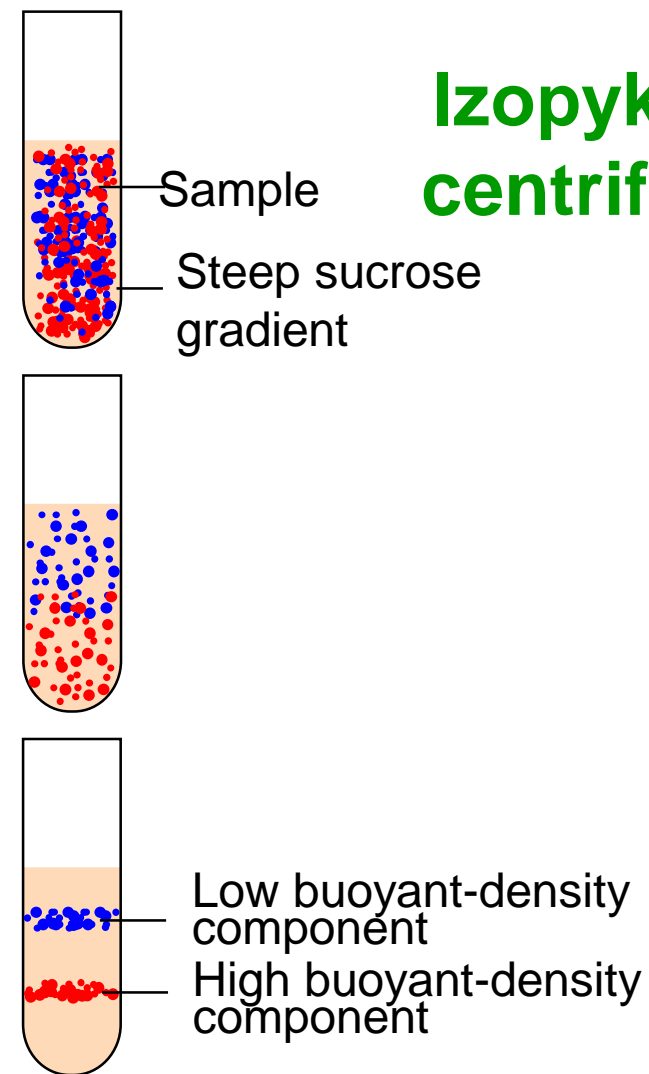


# Rate-zonal centrifugation versus equilibrium density gradient centrifugation

## Izokinetická centrifugace



## Izopyknická centrifugace



# Zonální centrifugace

- **Homogenní roztok nahrazen** roztokem, jehož koncentrace od povrchu ke dnu zkumavky narůstá (**gradientní roztok**)
- K jeho přípravě se používají dobře rozpustné a vůči analyzovaným částicím inertní látky – **sacharóza, glycerol**
- Vzrůstající hustota a viskozita gradientního roztoku eliminují vliv zvyšujícího se odstředivého zrychlení směrem od osy otáčení, čímž brání nárůstu rychlosti sedimentace částic v průběhu centrifugace.

# Provedení zonální centrifugace

vzorek



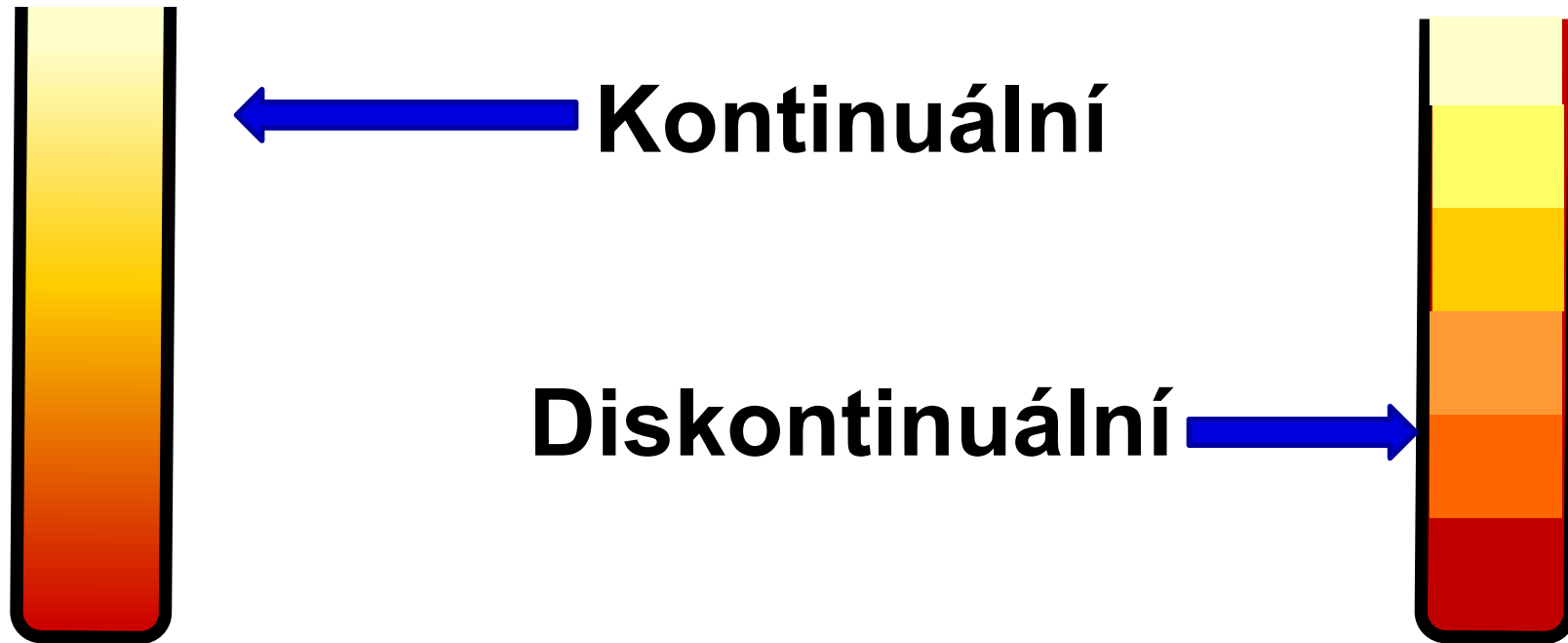
vzrůstající hustota a viskozita

gradient eliminuje vliv zvyšujícího se odstředivého zrychlení

částice se rozvrství podle

- velikosti
- tvaru
- hustoty

# Hustotní gradient

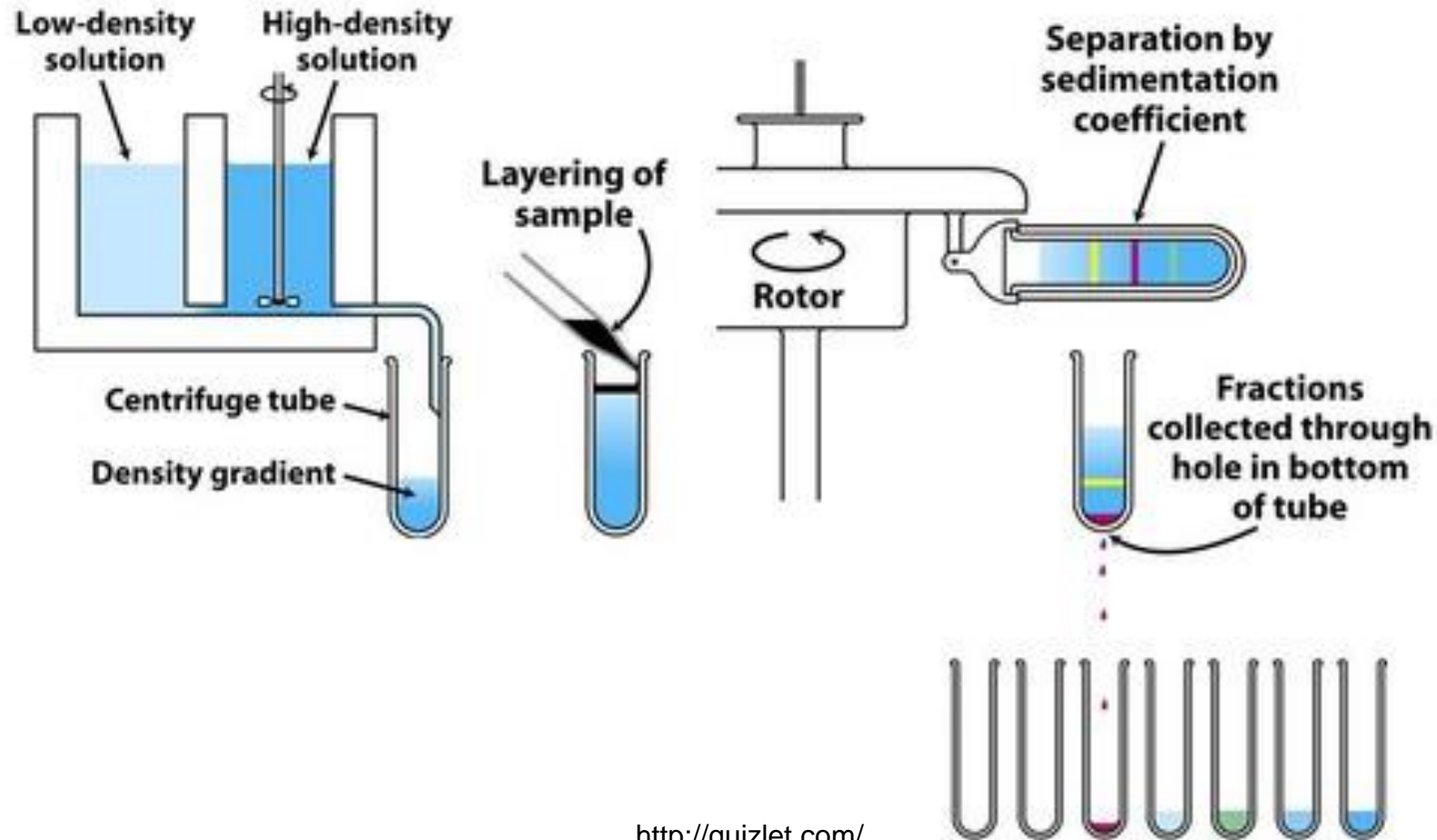


V obou případech jsou po ukončení centrifugace částice příslušného druhu zkoncentrovány do úzkých pruhů

# Příprava kontinuálního gradientu

## Protein Purification

### Ultracentrifugation





# Hustotní gradient

Běžně používanými látkami k přípravě hustotních gradientů jsou:

**chlorid cesný**

**Sacharóza**

**Ficoll**

# Hustotní gradient

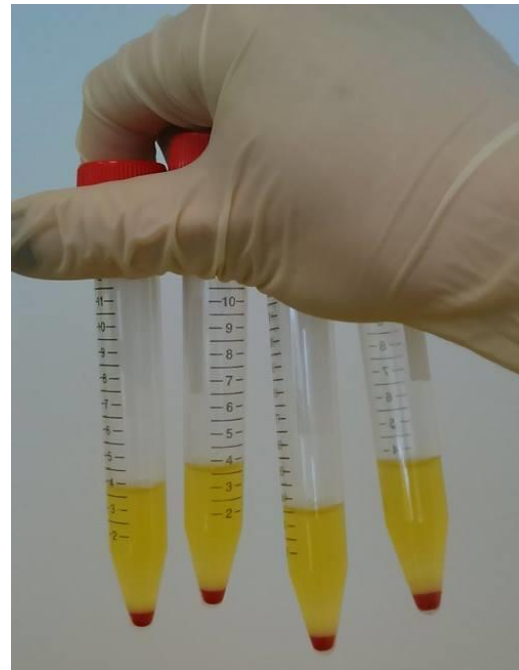
Rozdíly v hustotách se pohybují v rozmezí 1,0-1,3 g/ml u sacharózy a 1,0-1,9 g/ml u CsCl, což **umožňuje oddělit** a izolovat např.

**buněčná jádra  
mitochondrie  
nukleové kyseliny atp.**

Čistota získaných preparátů je vysoká

# Zonální centrifugace - praxe

- Izolace neutrofilů z plné krve – využití polysacharózy Histopaque ( $\rho = 1,07 - 1,1 \text{ g/mL}$ )



# Izokinetická centrifugace

Tento způsob centrifugace se využívá k  
podrobnější charakterizaci částic

např. k přesnému stanovení jejich velikosti

# Izokinetická centrifugace

např. při analýze nukleových kyselin se obvykle používá **5-20% sacharózový gradient**, v němž se koncentrace sacharózy lineárně mění od hladiny ke dnu zkumavky.

***rychlost sedimentace částic je  
v průběhu centrifugace konstantní.***

# Izokinetická centrifugace

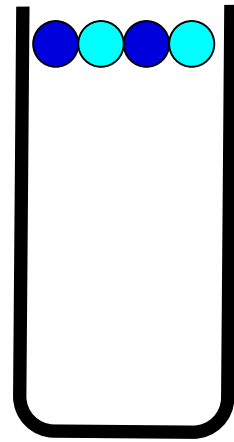
**rychlost**, při níž částice sedimentuje, závisí na

velikosti částice  
tvaru částice  
hustotě částice

a je ovlivňována

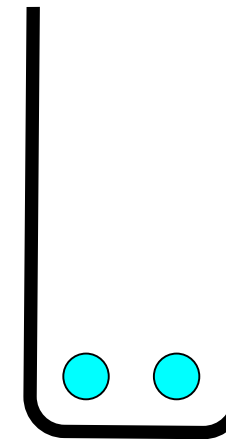
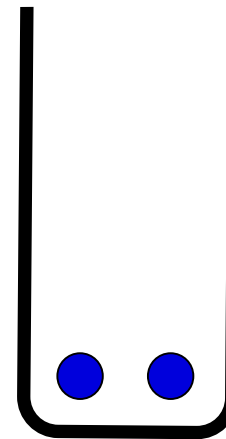
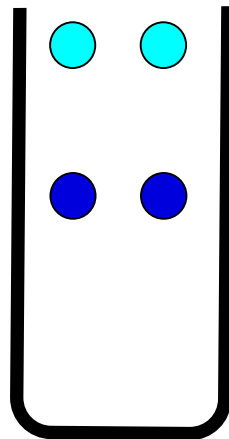
vlastnostmi prostředí  
podmínkami centrifugace

# Izokinetická centrifugace



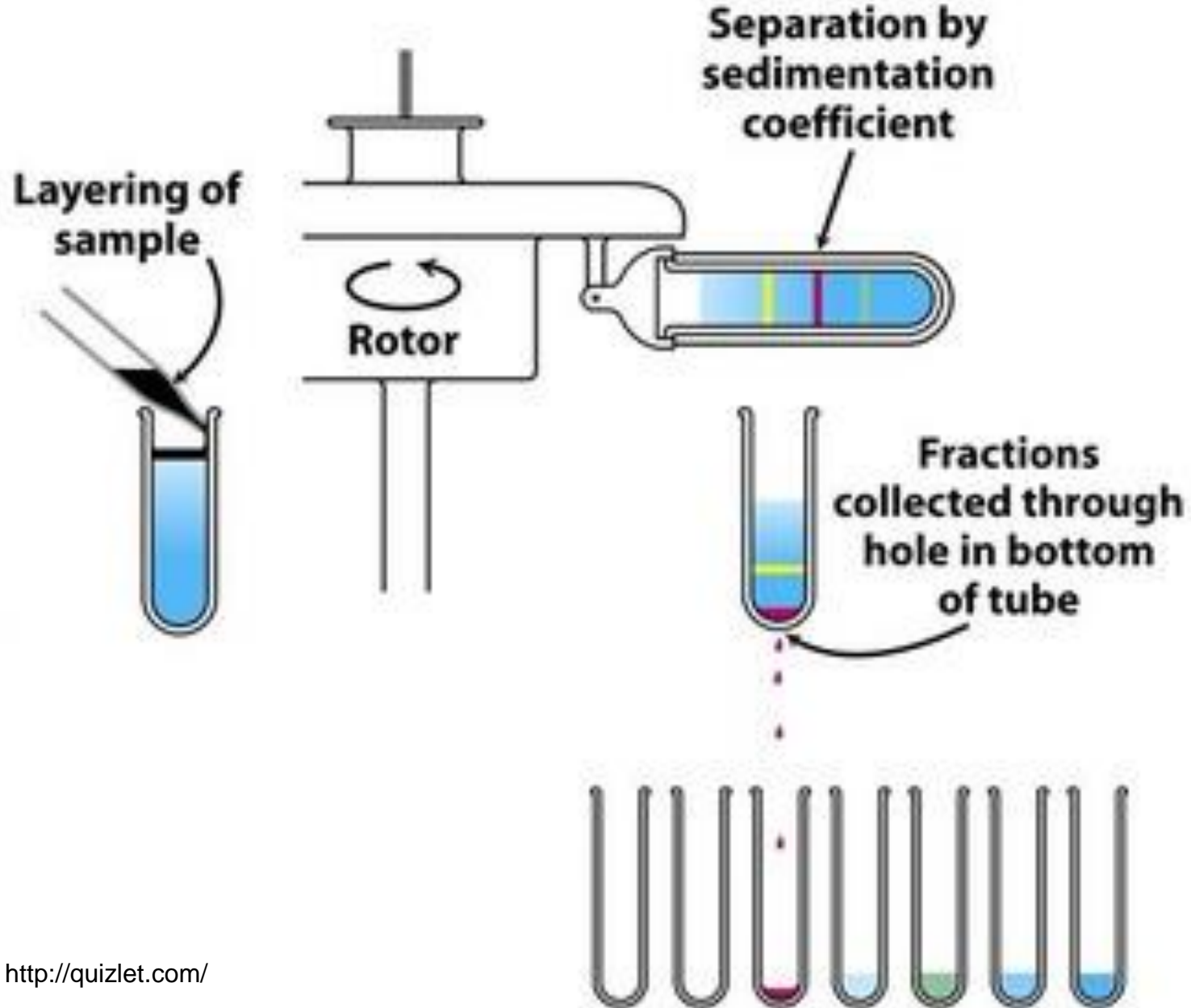
vzorek nanesený na povrch  
gradientu (5-20% sacharóza)

centrifugace



frakcionace obsahu  
zkumavky

# Izokinetická centrifugace





# Sedimentační koeficient

Charakterizuje rychlost pohybu částice při centrifugaci

$$dr/dt = S \cdot a = S \cdot \omega^2 \cdot r$$

**r** = vzdálenost od osy otáčení

**t** = doba centrifugace

**S** = sedimentační koeficient

**a** = ostředivé zrychlení

**$\omega$**  = úhlová rychlost

**1 Svedberg =  $10^{-13}$  sekundy**

**23S-rRNA, 16S-rRNA, rib. podjednotky 30S, 50S**

# Sedimentační koeficient

$$S = \frac{v_t}{r\omega^2} = \frac{m}{6\pi\eta r_0}$$

**S = sedimentation coefficient**

**$v_t$  = terminal velocity**

**r = distance from the axis of rotor**

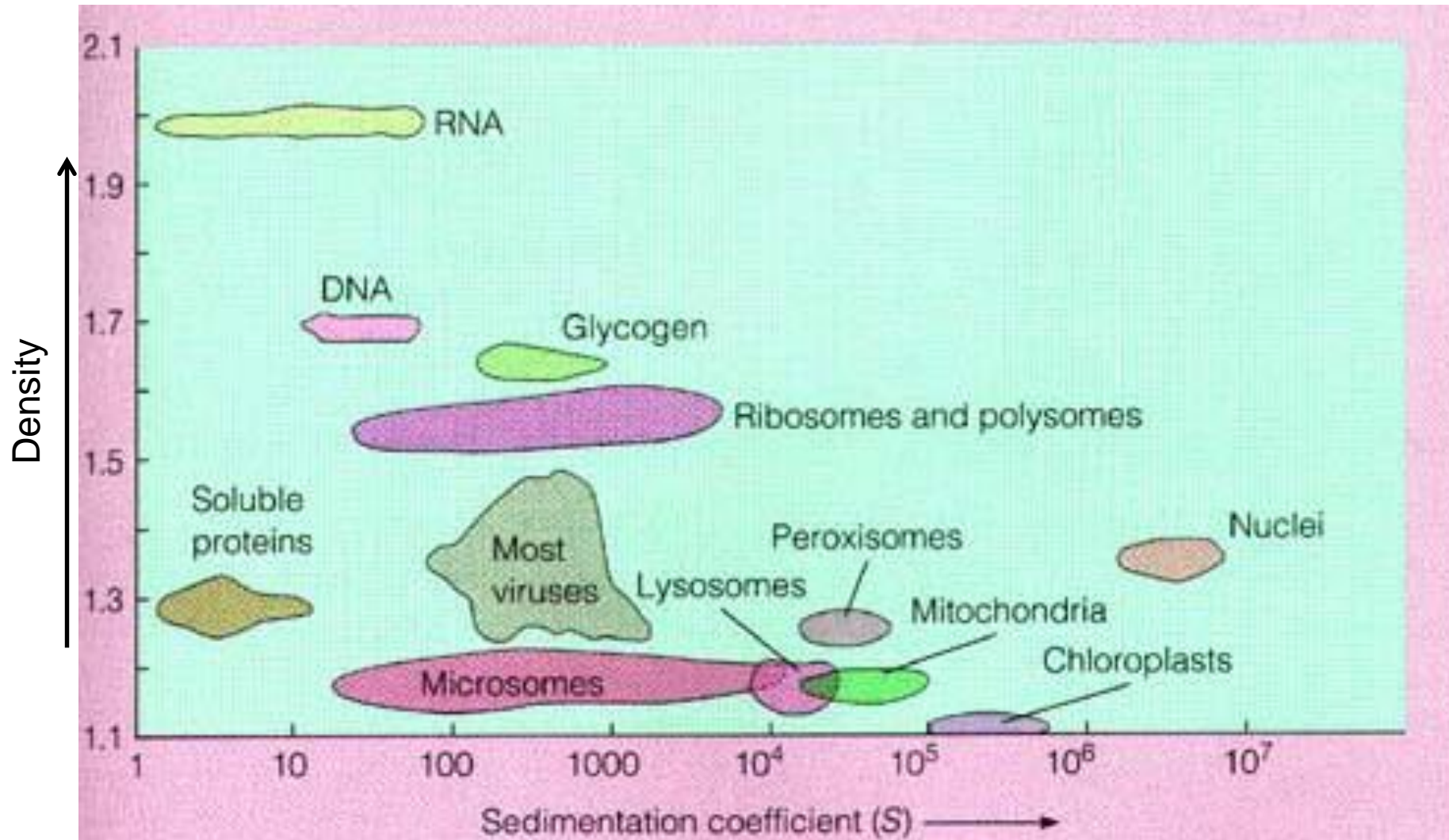
**$\omega$  = rotational speed (angular velocity)**

**m = weight of particle**

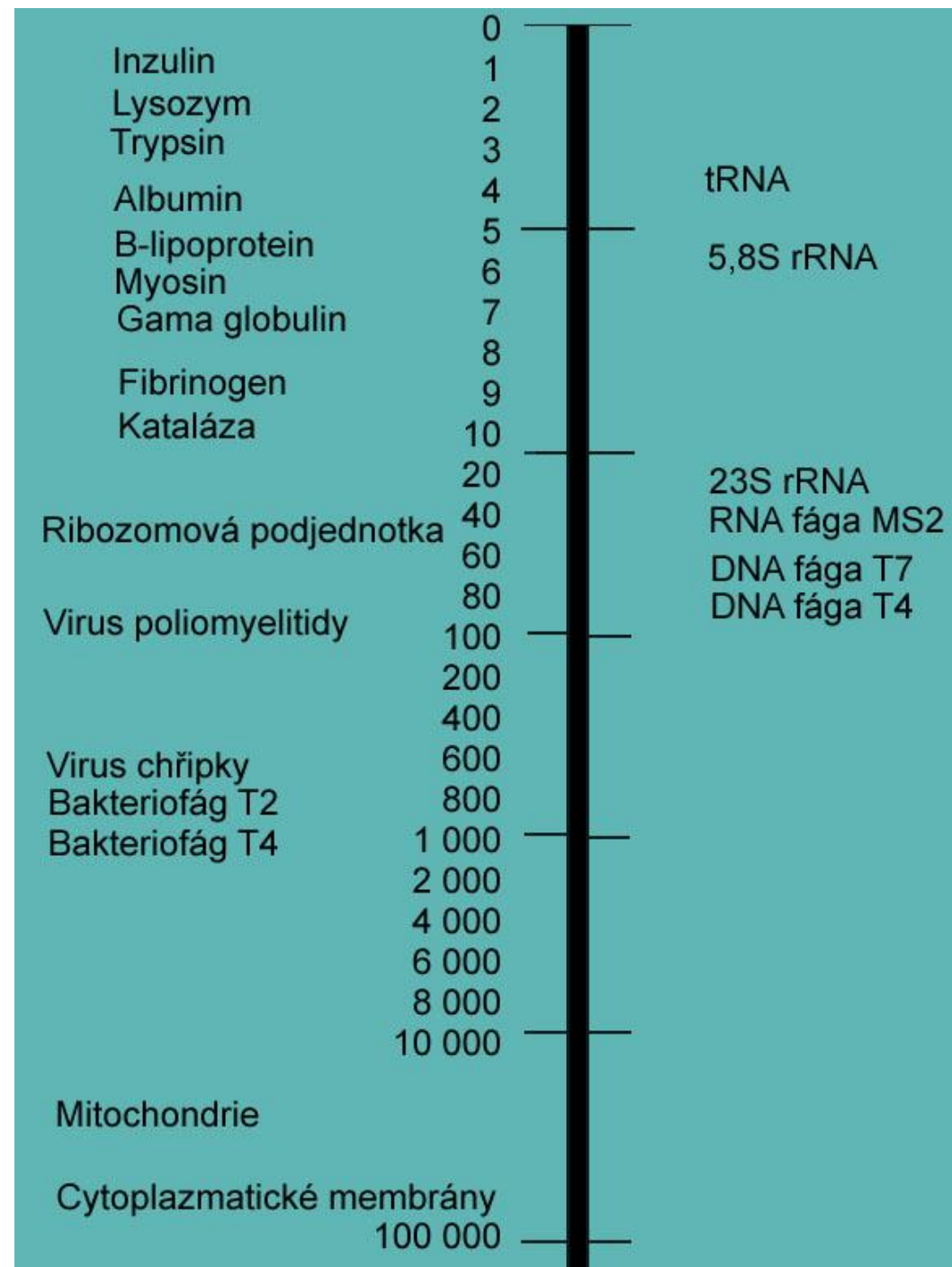
**$\eta$  = viscosity of the medium**

**$r_0$  = radius of the particle**

# Příklady hodnot standardních sedimentačních koeficientů $S^{\circ}_{20,w}$



**Příklady hodnot  
standardních  
sedimentačních  
koeficientů  $S^{\circ}_{20,w}$**



# Izopyknická centrifugace

**hustotní centrifugace nebo centrifugace  
do rovnováhy**

*částice se oddělují podle své hustoty*

# Izopyknická centrifugace

během centrifugace si medium **samo**  
**vytvoří koncentrační a tím**  
**hustotní gradient**

*částice nalyzovaných látek se pohybují*  
*oběma směry tak dlouho*

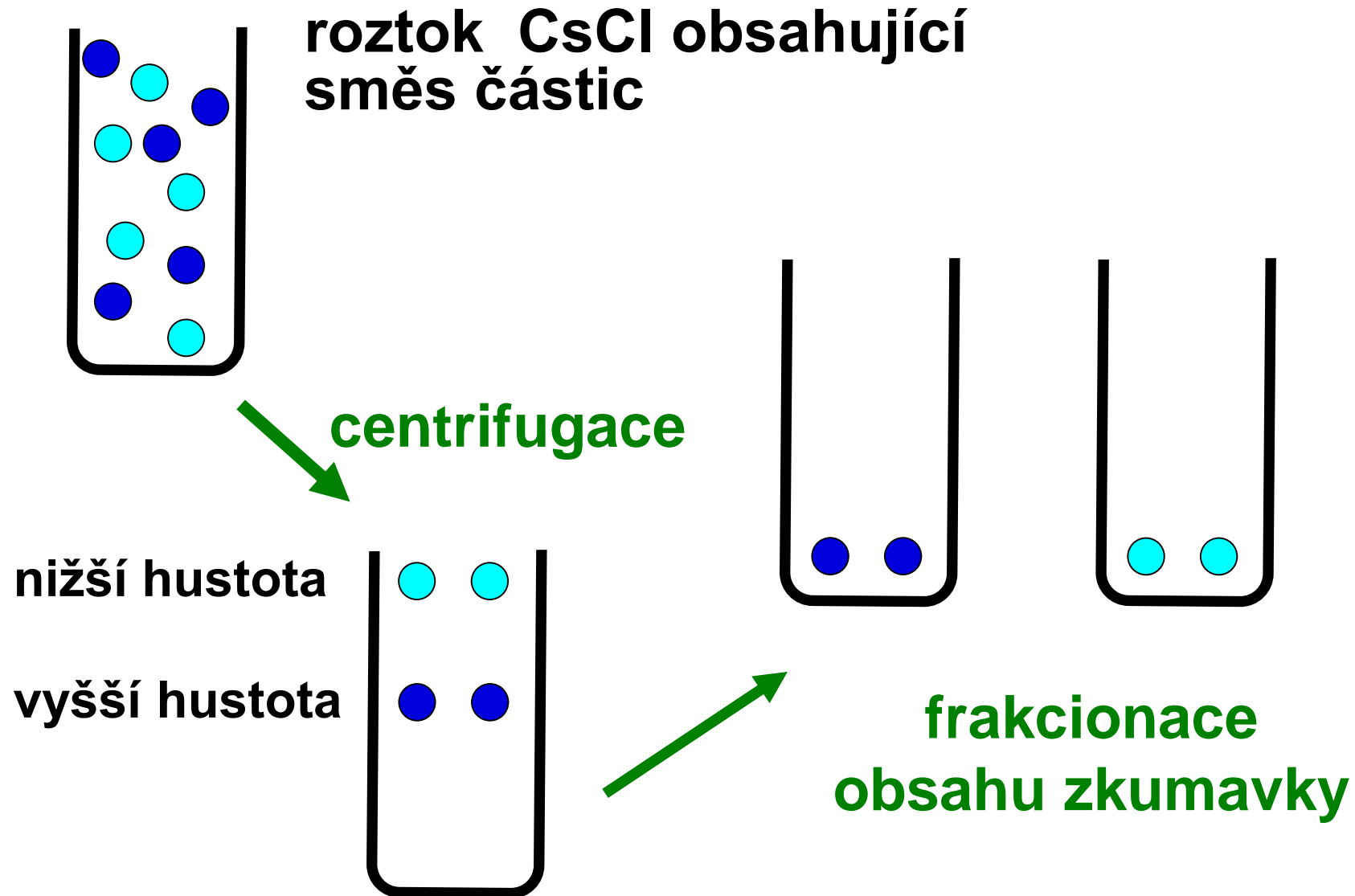
*dokud nedosáhnou polohy, v níž je hustota*  
*roztoku shodná s hustotou částic*

# Izopyknická centrifugace

Takto stanovená hustota se označuje jako  
**vznášivá hustota.**

Její hodnoty jsou ovlivněny interakcí částic s  
ionty roztoku a jsou obvykle vyšší než je  
hustota částic v buňkách.

# Izopyknická centrifugace





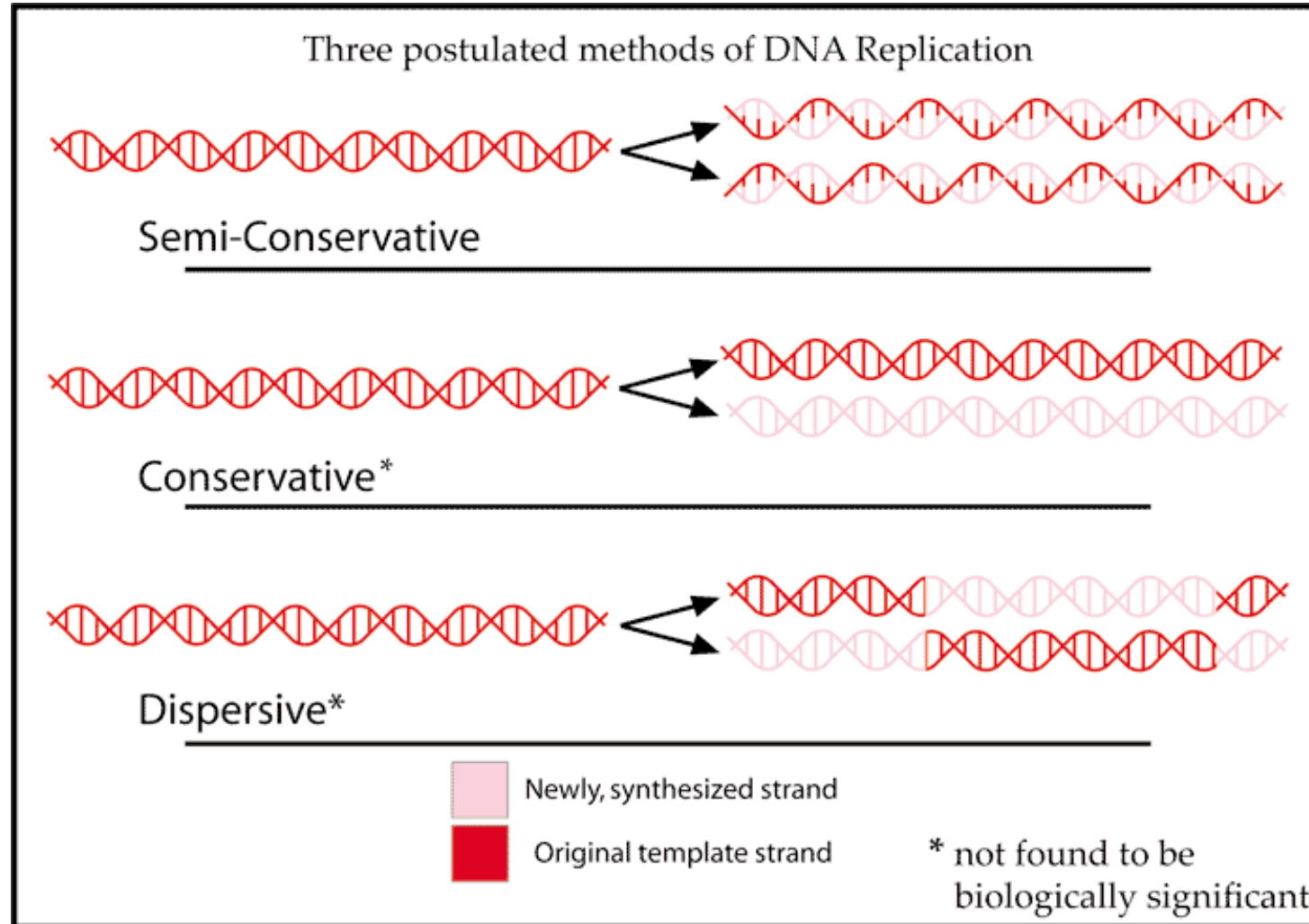
# Stanovení vznášivé hustoty izopyknickou centrifugací

$$\rho^{25\text{ }^{\circ}\text{C}} = 10,8601 \times n^{\text{D}}_{25\text{ }^{\circ}\text{C}} - 13,4974$$

$n^{\text{D}}_{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$  = index lomu roztoku CsCl

# Izopyknická centrifugace - praxe

## Meselson-Stahl experiment 1958



MESELSON, M; STAHL, FW. The replication of DNA in *E. coli*.  
*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1958, roč. 44, s. 671-682.

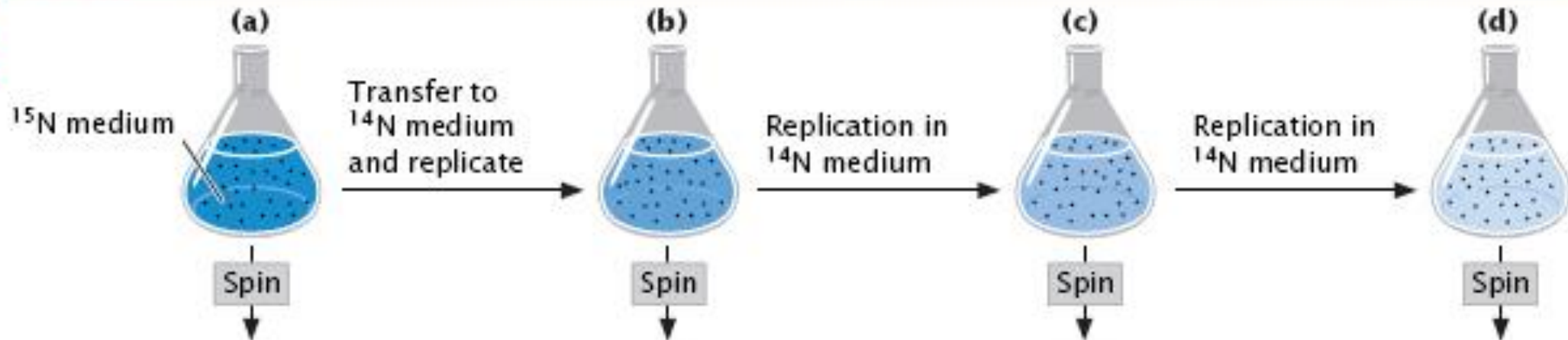
# Meselson-Stahl experiment - design

palyapbio.edu.glogster.com

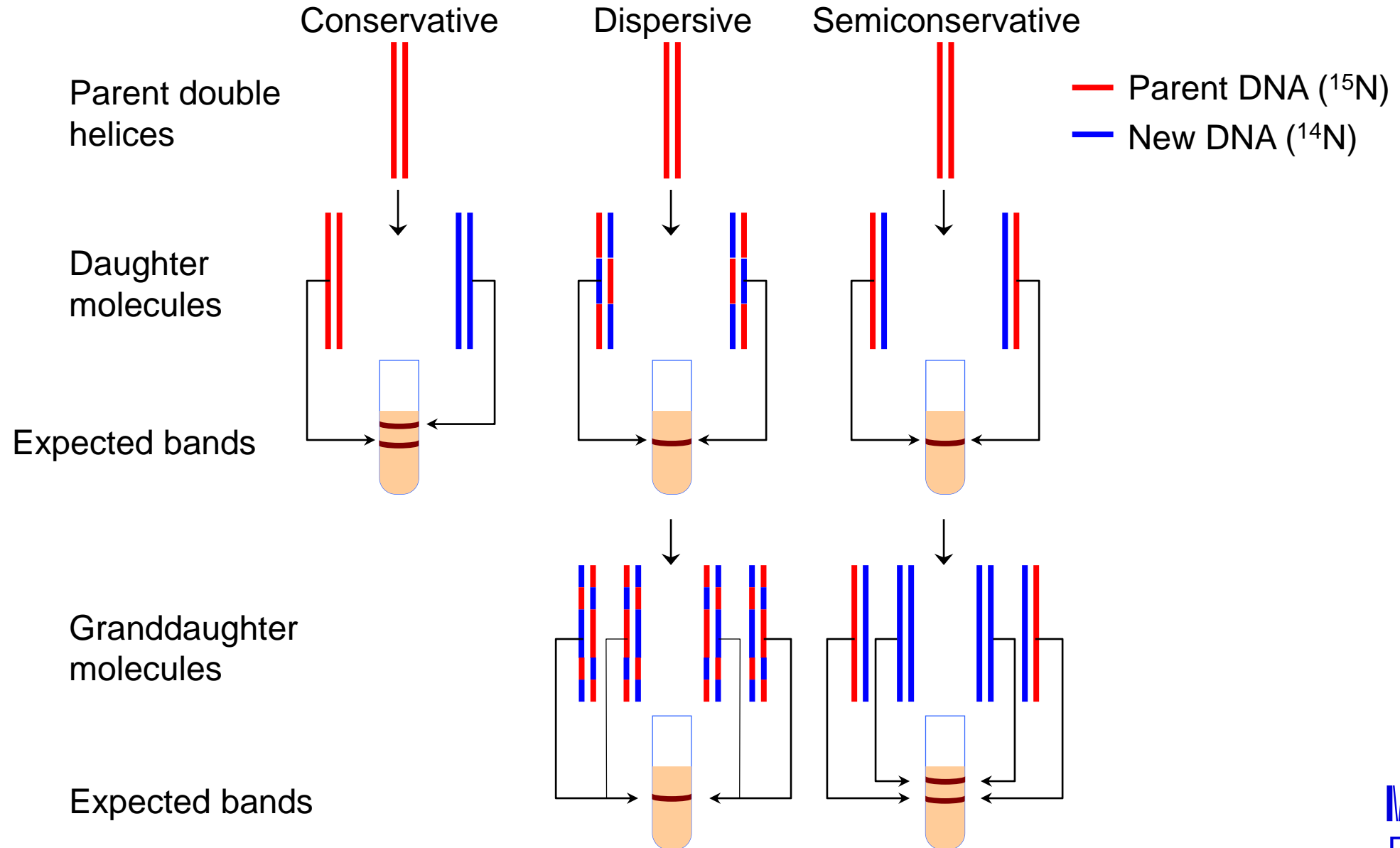
## Experiment

**Question:** Which model of DNA replication—conservative, dispersive, or semiconservative—applies to *E. coli*?

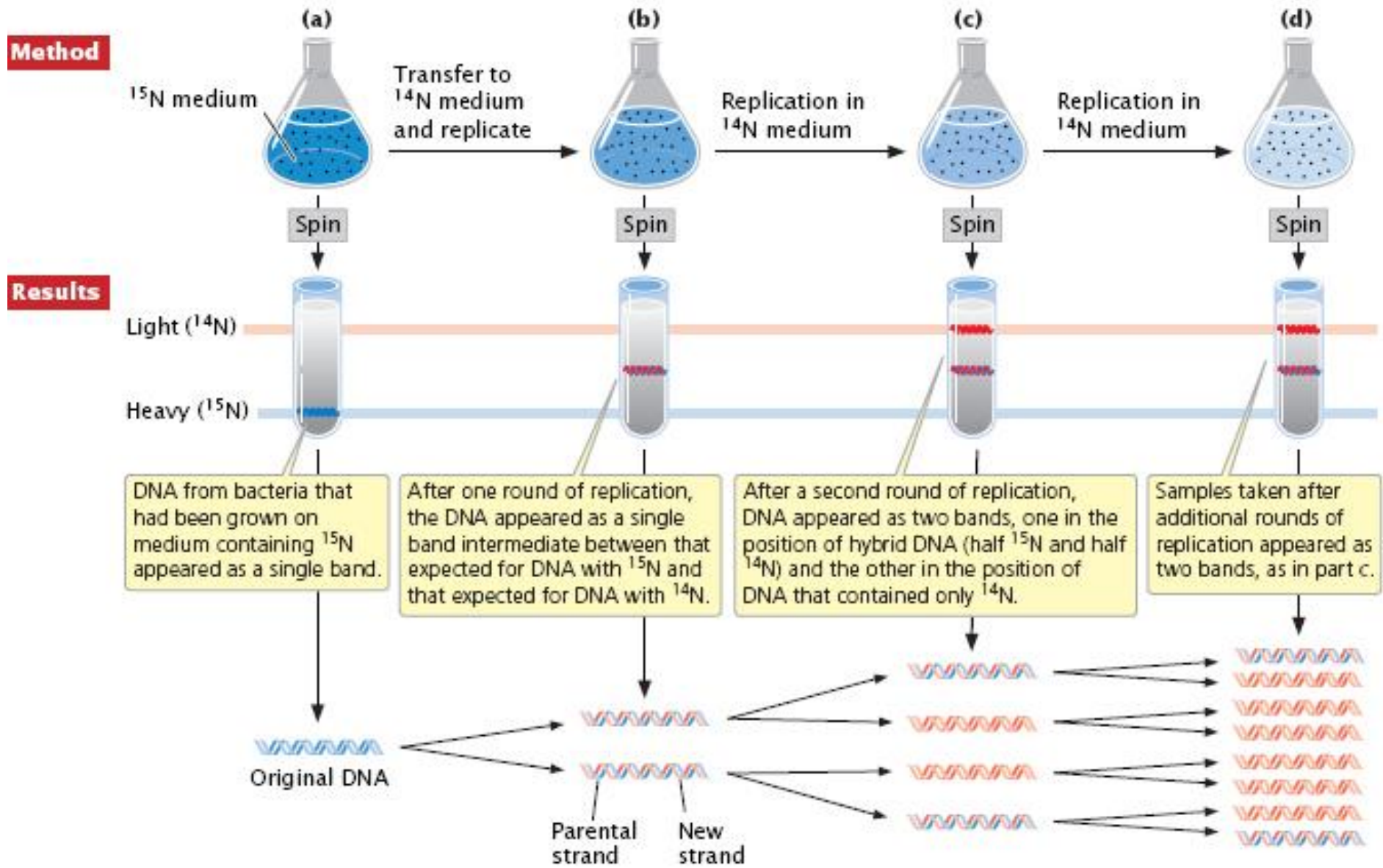
## Method



# The Meselson-Stahl experiment – predicted results

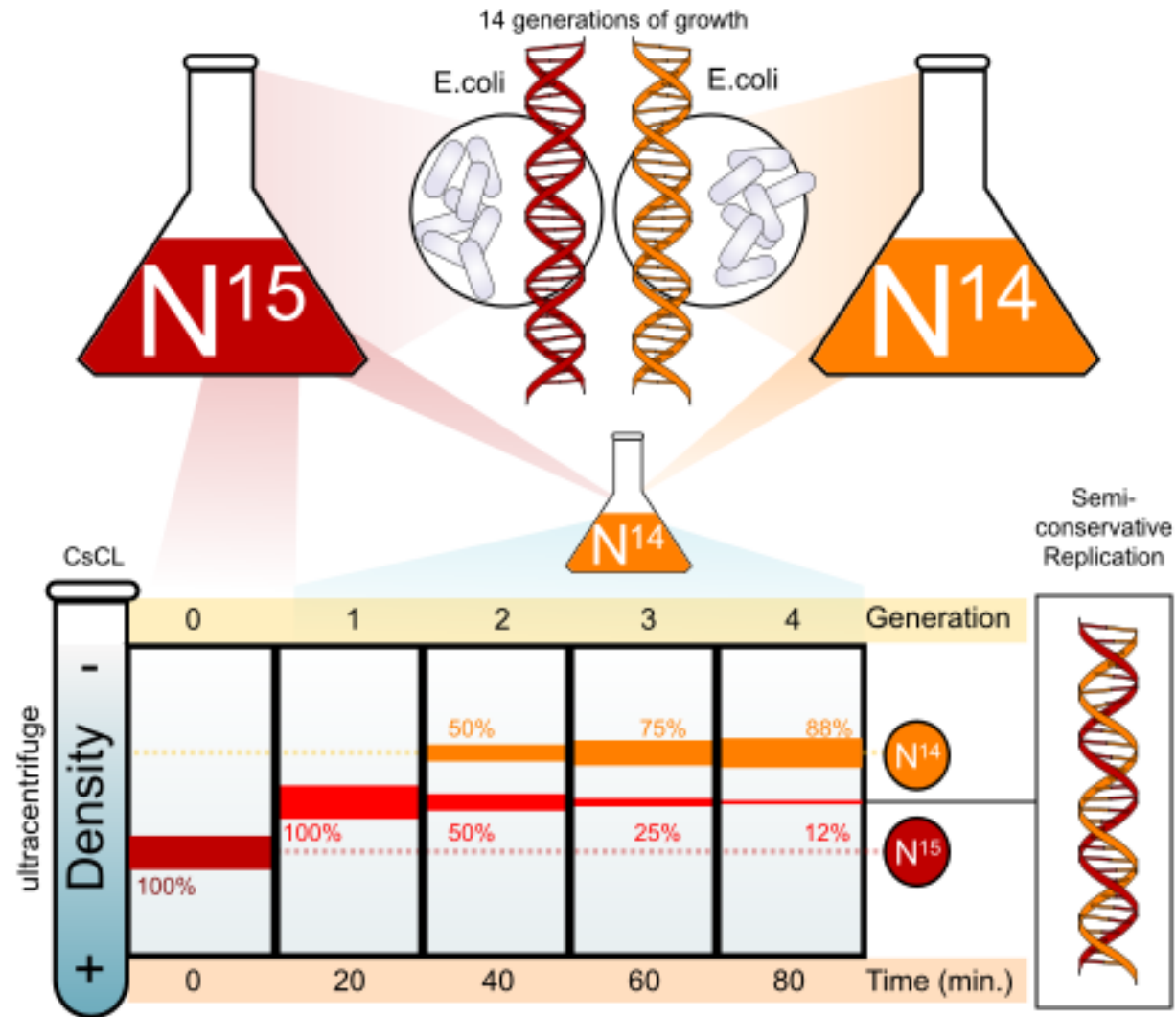


# Meselson-Stahl experiment - results



# Izopyknická centrifugace - praxe

## Stahl Meselson experiment 1958



MESELSON, M; STAHL, FW. The replication of DNA in E. coli. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1958, vol. 44, pp. 671-682.

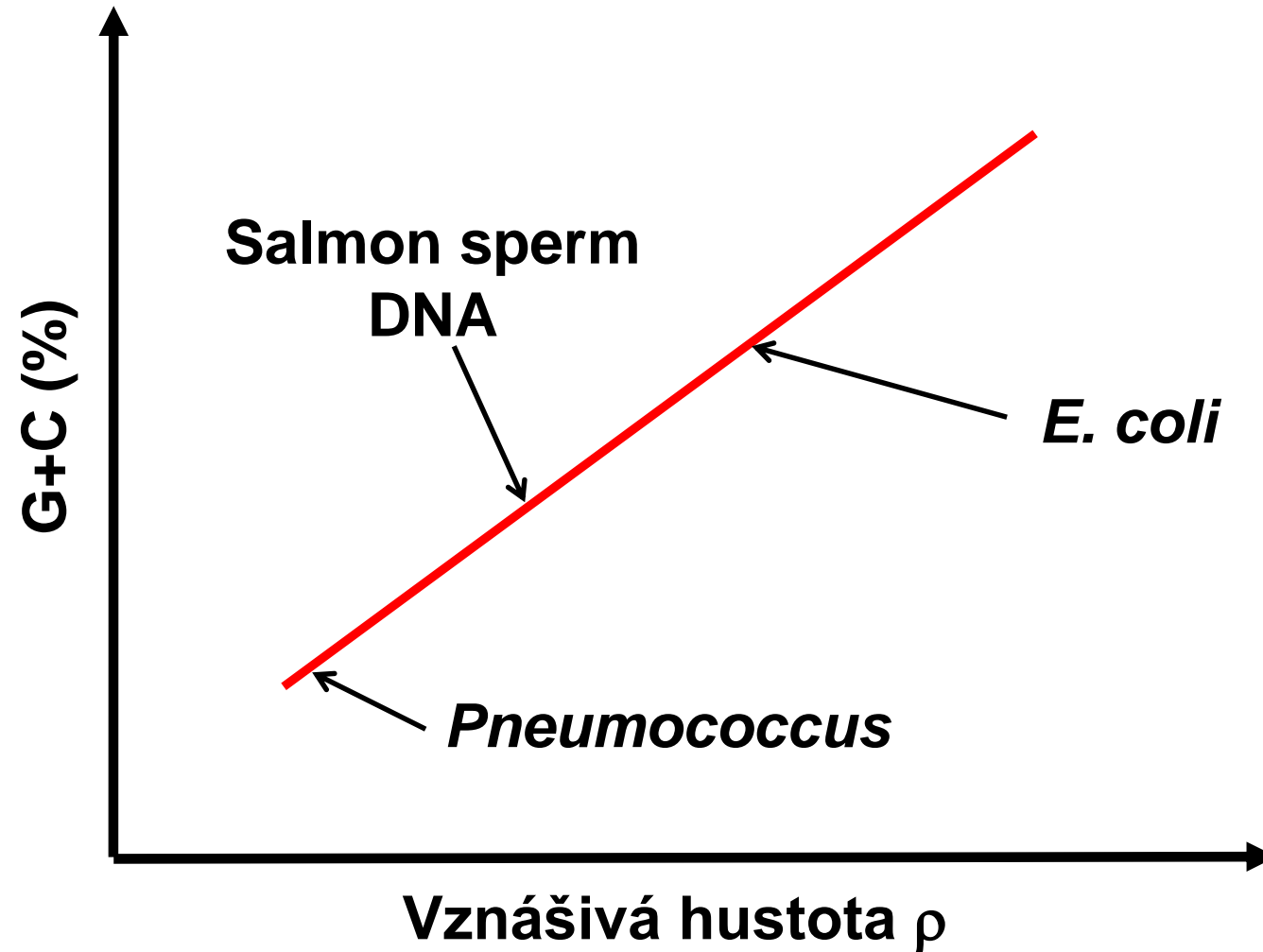
# Výpočet % (G+C)

- na vznášivou hustotu dvouřetězcové DNA má vliv zastoupení jednotlivých typů párů bází, čehož se využívá ke stanovení podílu GC-párů ve vzorcích DNA
- Platí, vztah

$$\% (\mathbf{G + C}) = \frac{\rho - 1.66}{0.098} \times \mathbf{100}$$

kde  $\rho$  = vznášivá hustota vzorku dvouřetězcové DNA.

# Výpočet % (G+C) - praxe





# Separace různých forem DNA

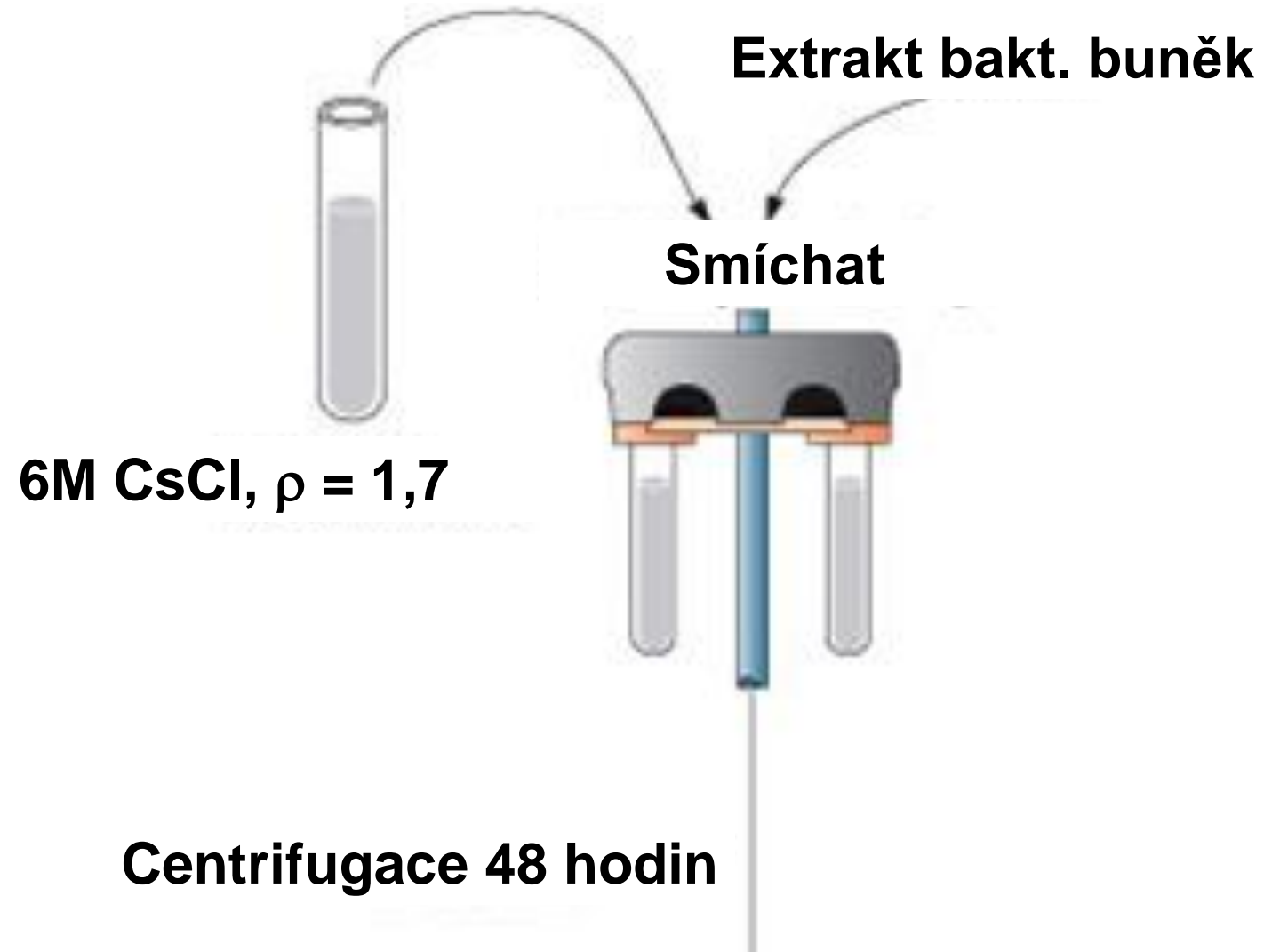
- Speciálním případem využití izopyknické centrifugace je rozdělení odlišných strukturních typů DNA v gradientech CsCl za přítomnosti etidium-bromidu.
- **Po navázání etidiumbromidu na DNA se její vznášivá hustota významně snižuje**, přičemž množství navázaného etidiumbromidu a tím i pokles hustoty DNA závisí na jejím strukturním typu.
- **To umožňuje vzájemně separovat** a izolovat různé formy DNA, např. kovalentně **uzavřené kružnice plazmidových DNA** od otevřených a **lineárních molekul plazmidové a chromozomové DNA**.

# Izopyknická centrifugace - praxe

Chci pomocí centrifugace **oddělit lineární jadernou DNA od kružnicové mitochondriální DNA** (nebo plasmidy od bakteriálního chromosomu).

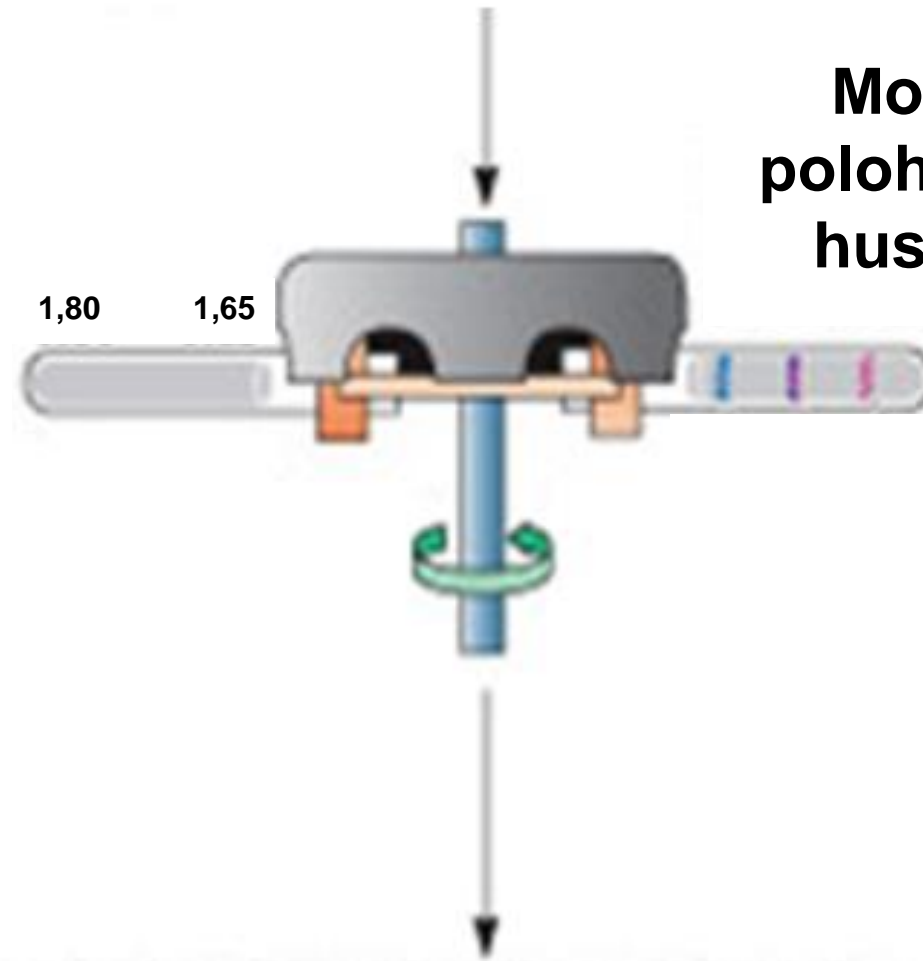
**Jak na to?**

# Izopyknická centrifugace - praxe



# Izopyknická centrifugace - praxe

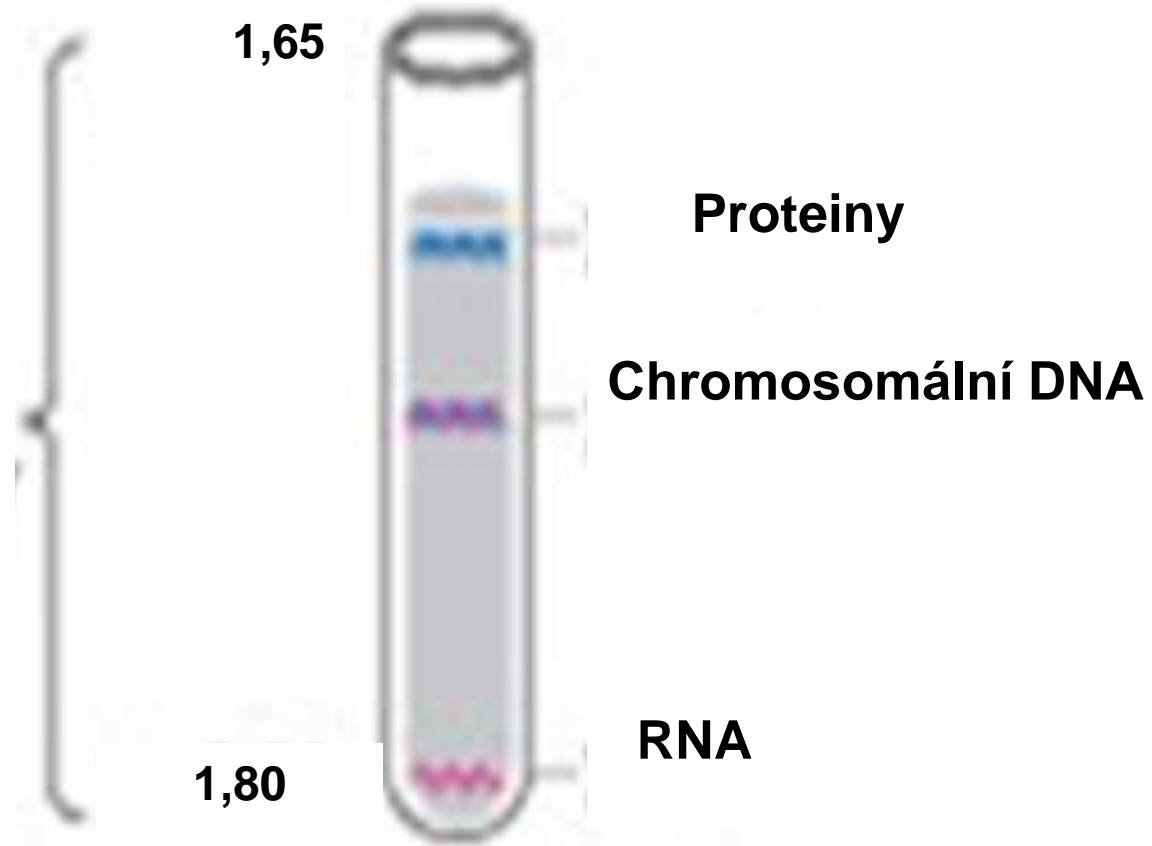
Hustota v g/ml



Molekuly zaujmou  
polohu v místě shodné  
hustoty s roztokem

# Izopyknická centrifugace - praxe

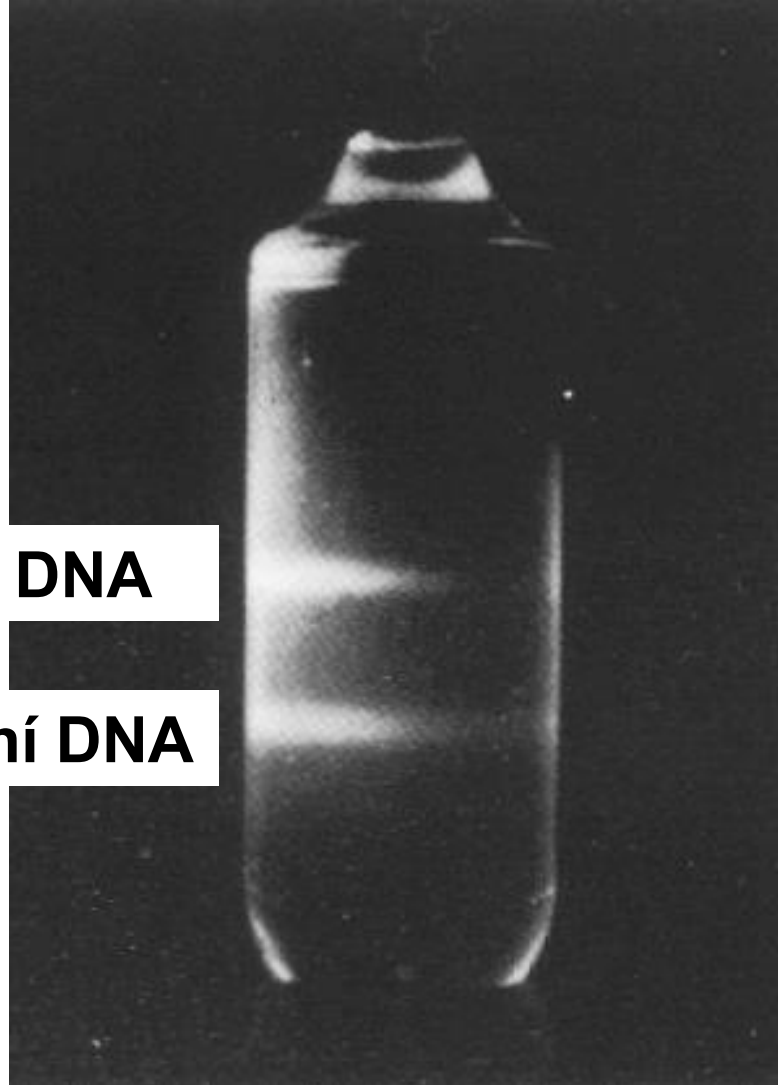
Hustota CsCl



# Izopyknická centrifugace – praxe - reálný obrázek -

**Chromozomální DNA**

**Mitochondriální DNA**



# Centrifugace – praktický vzorec

$$\text{RCF} = 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$$

**RCF = relative centrifugal force (hodnota g)**

**rpm = repeats per minute**

**r = poloměr otáčení (cm)**