

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

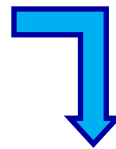
Chromatografické

Centrifugační

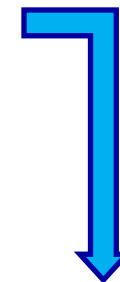
Orientace v bludišti metod pro separaci biologických makromolekul

Metody separace

Elektromigrační



**Elektroforetická separace
biologických makromolekul**

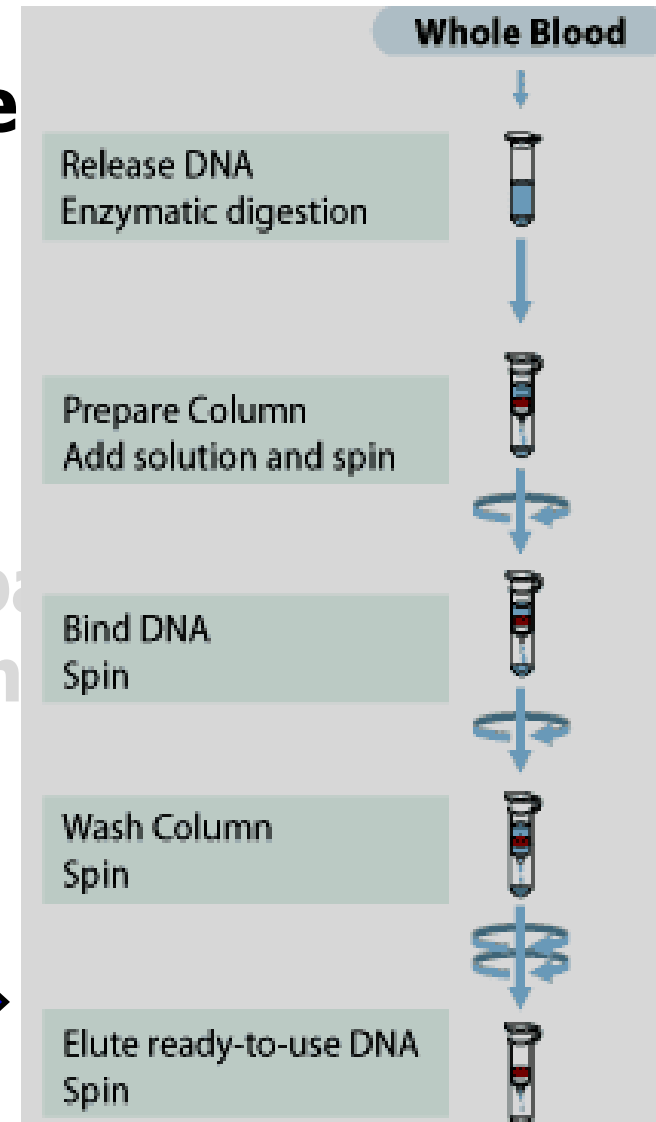
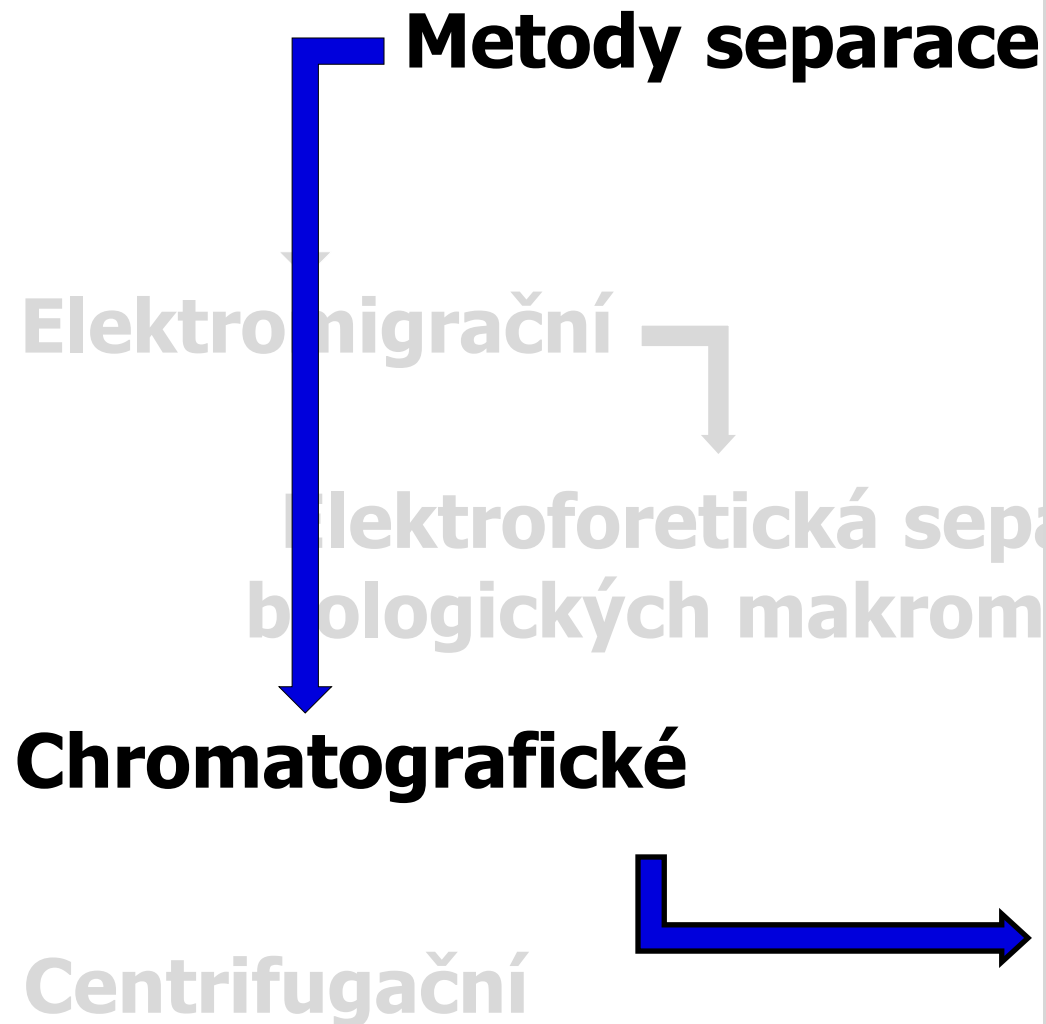


Chromatografické

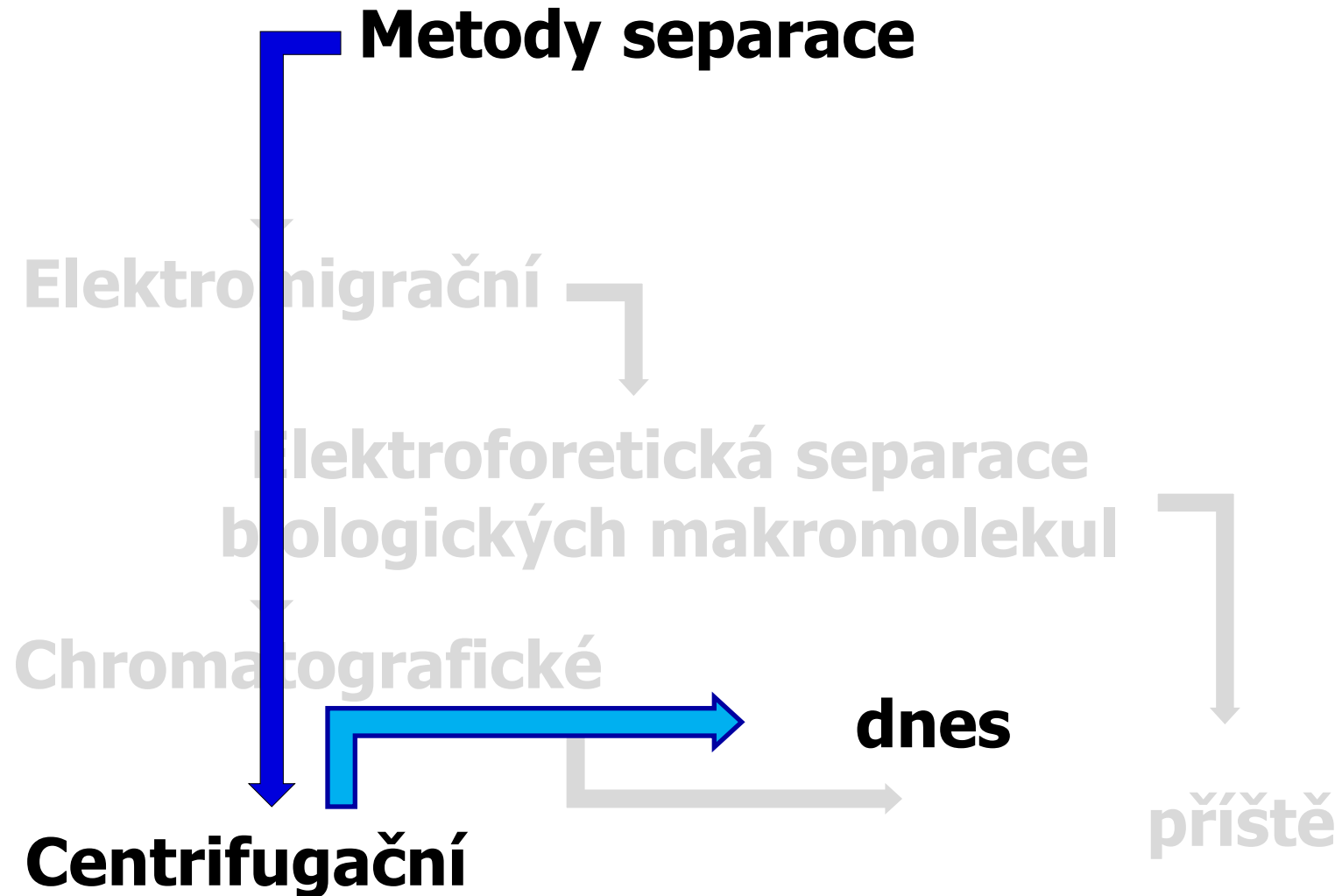
Centrifugační

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

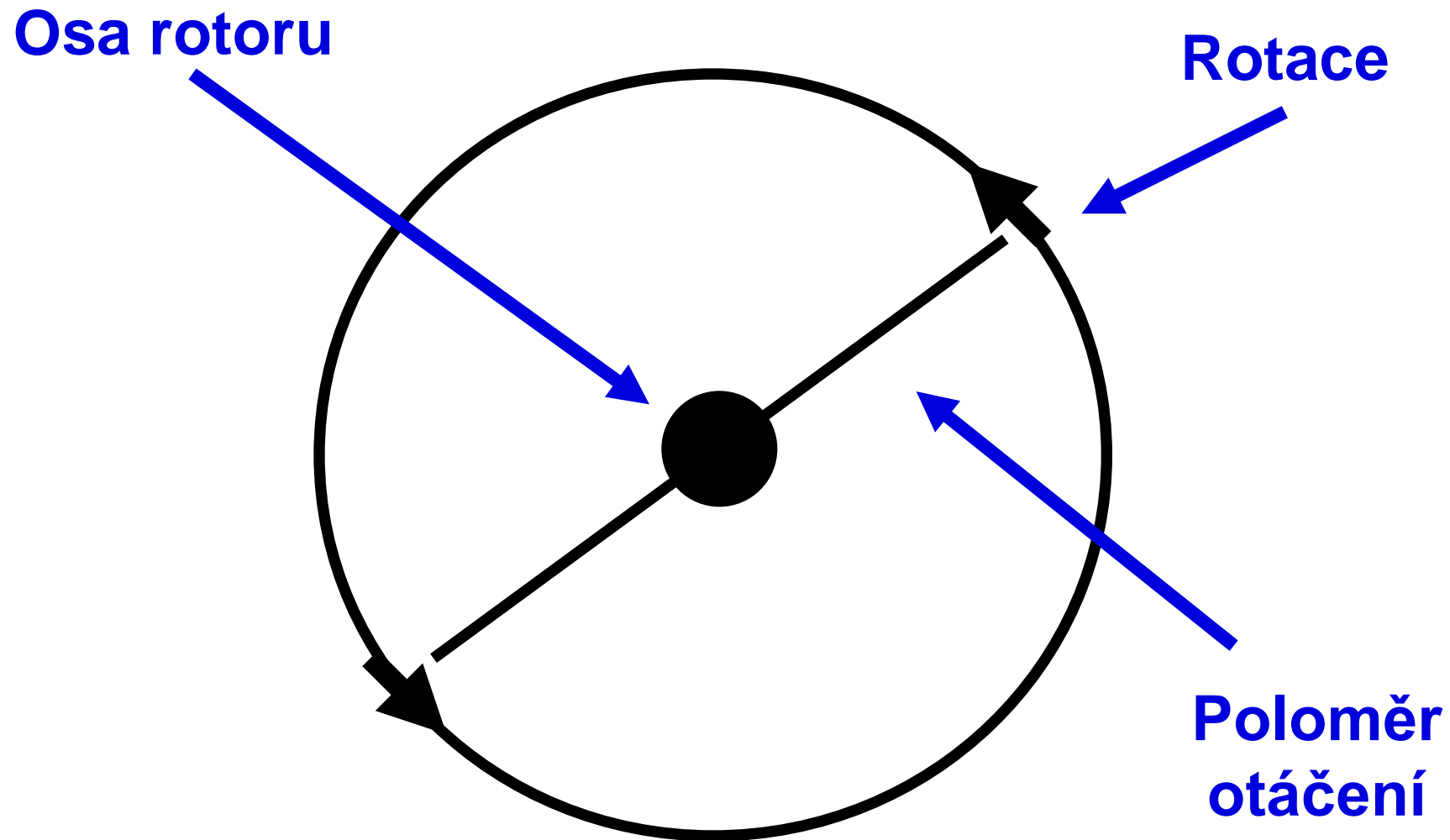
Pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy.

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**

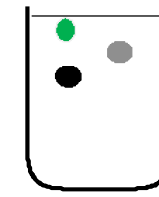
Rozdělení centrifugačních technik

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

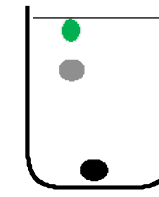
Diferenciální centrifugace



Směs látek v roztoku.



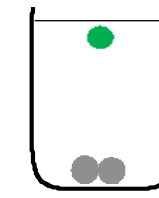
Centrifugace při nízkých otáčkách (1 000 g).



Shromáždění sedimentu.



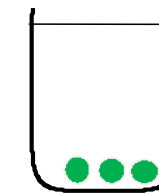
Centrifugace supernatantu při středních otáčkách (20 000 g).



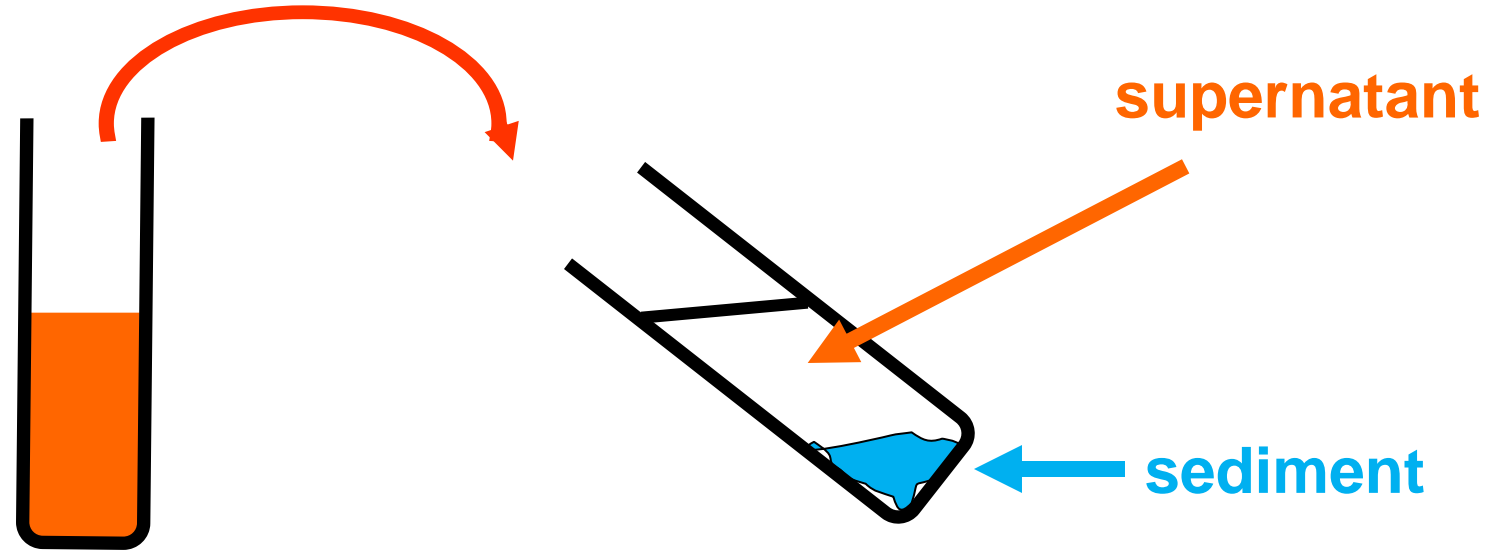
Shromáždění sedimentu.



Centrifugace supernatantu při vysokých otáčkách (80 000 g).

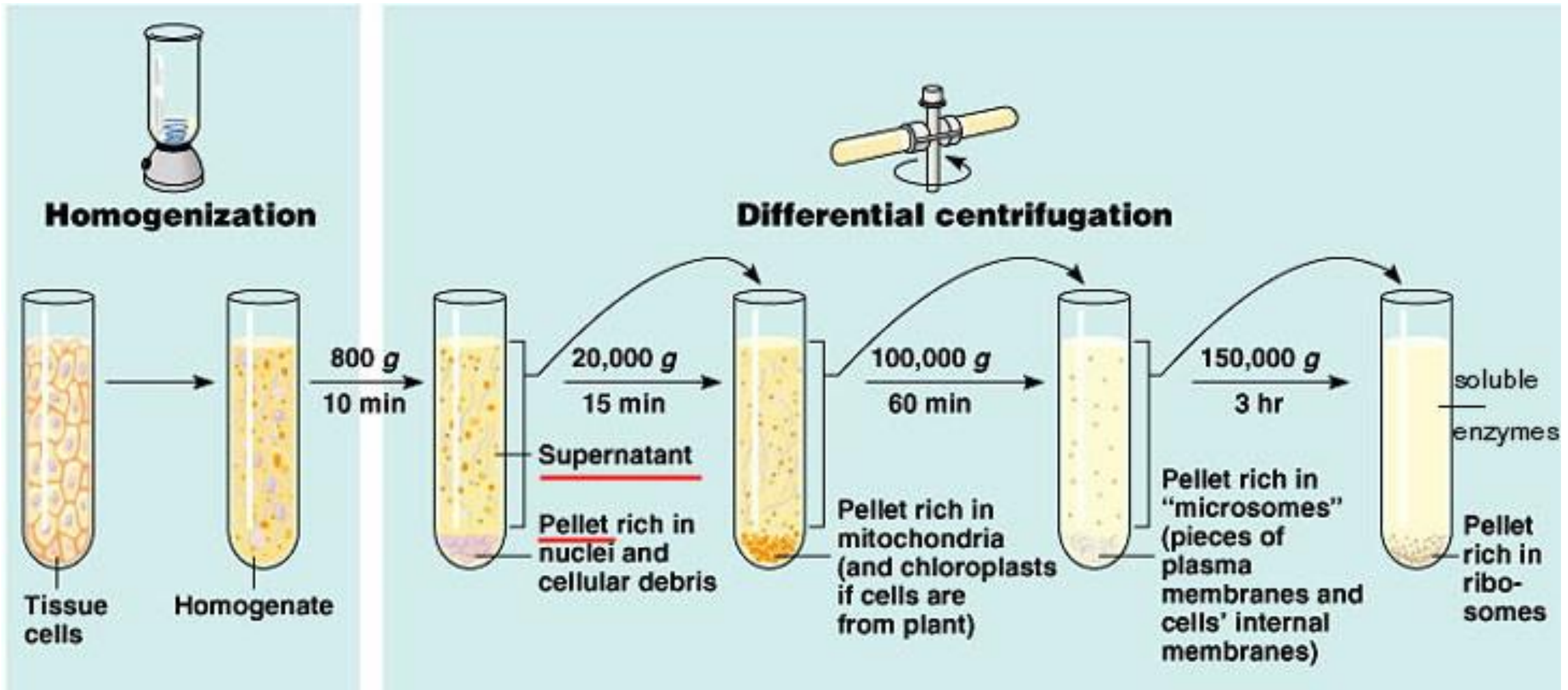


Diferenciální centrifugace



**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

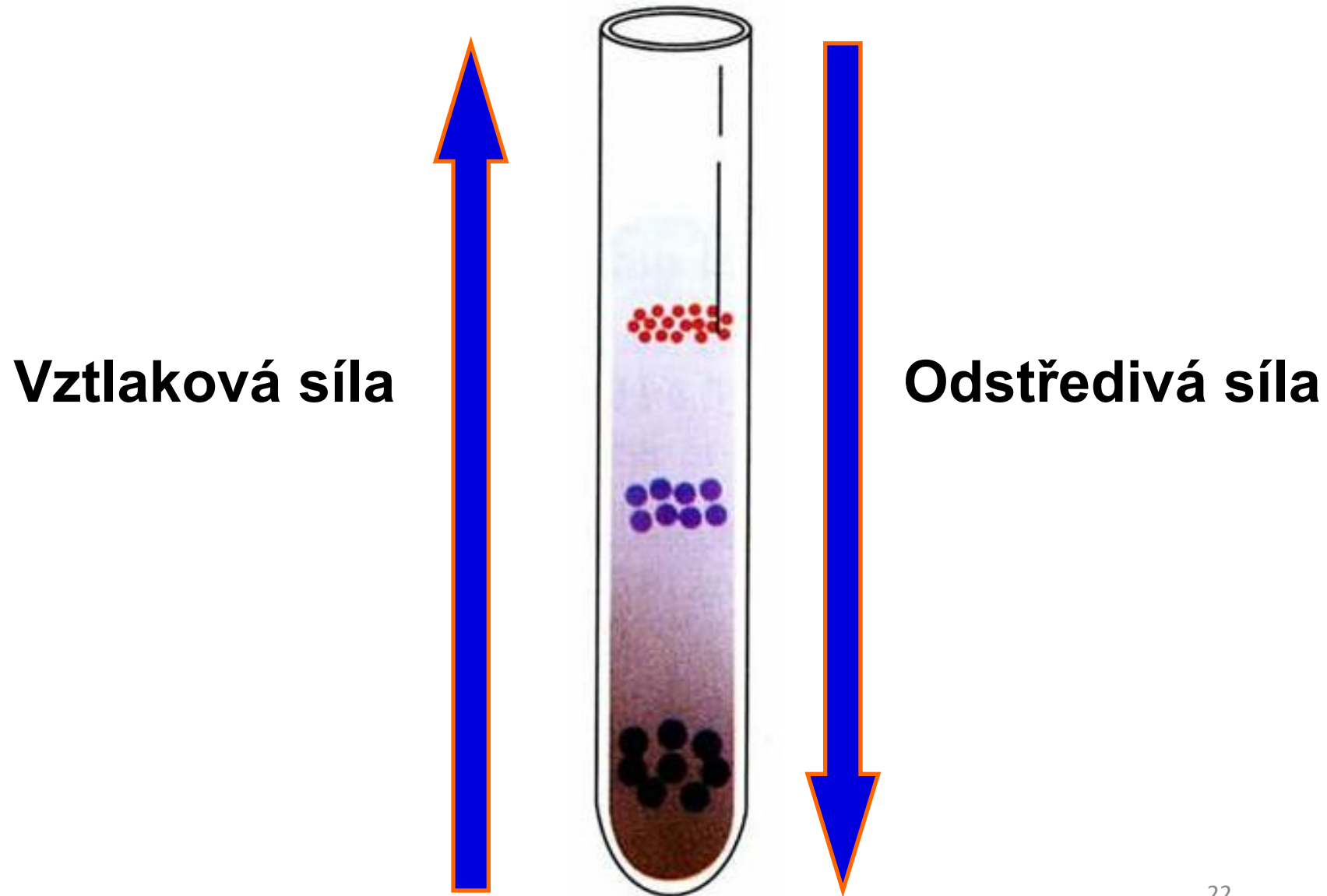
Izokinetická centrifugace

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

Izopyknická centrifugace

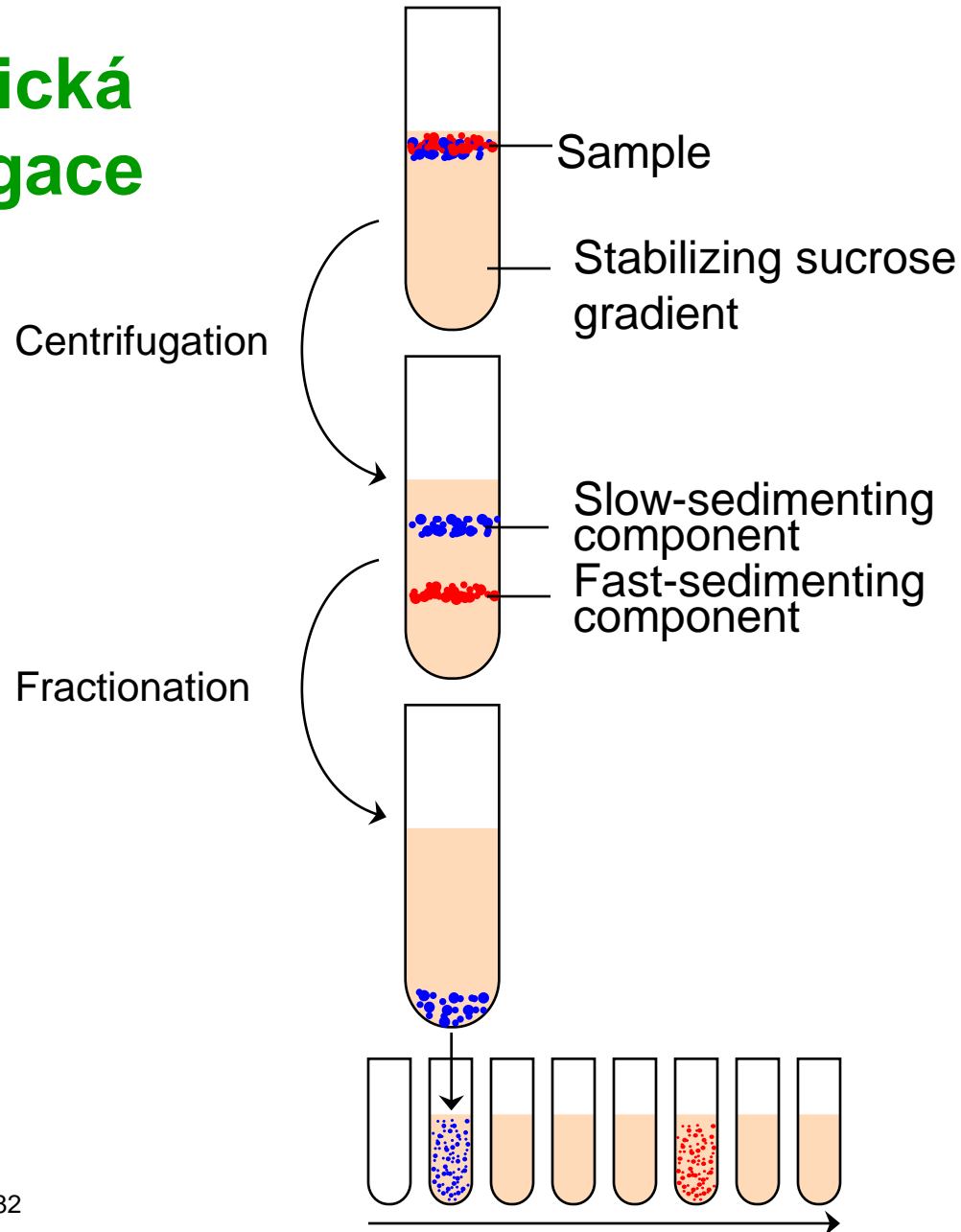
- separace podle hustoty částic

Síly při zonální centrifugaci

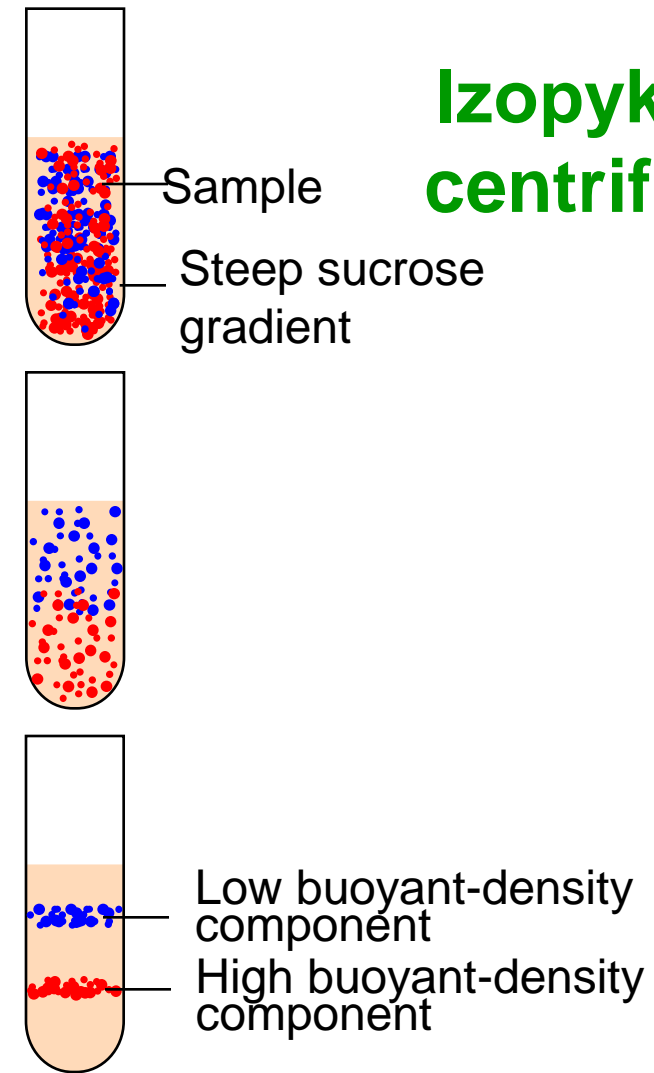


Rate-zonal centrifugation versus equilibrium density gradient centrifugation

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**
- Vyrůstající 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

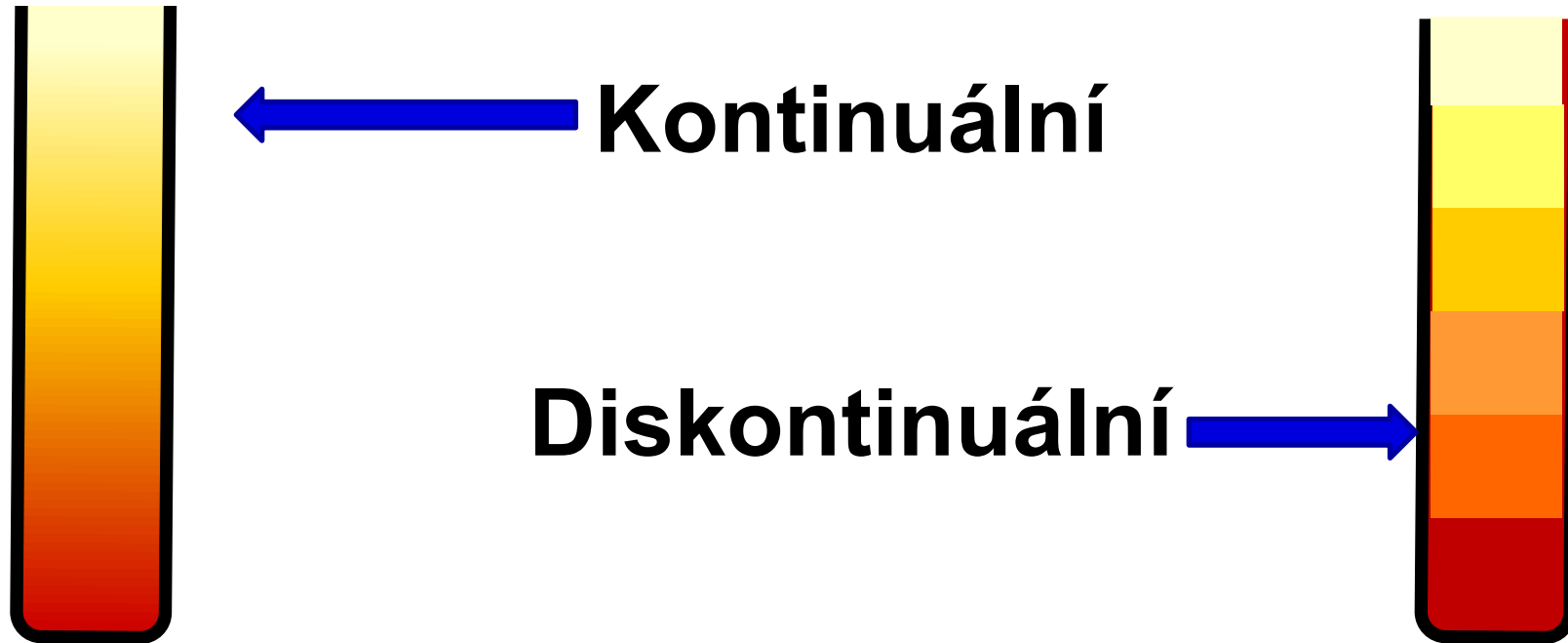


gradient eliminuje vliv zvyšujícího se odstředivého zrychlení

částice se rozvrství podle

- velikosti
- tvaru
- hustoty

Hustotní gradient

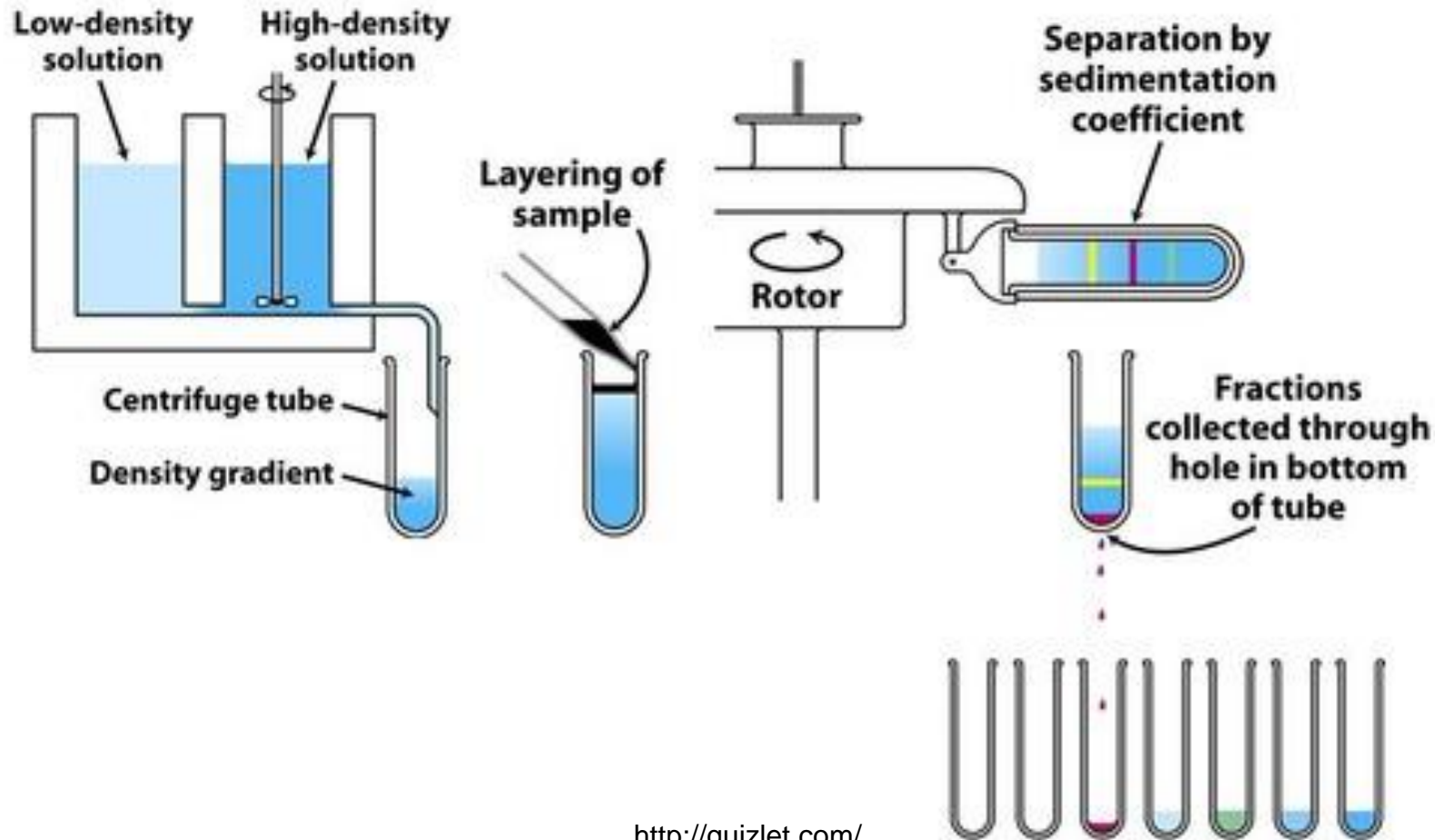


V obou případech jsou po ukončení centrifugace částice příslušného druhu zkoncentrovány do úzkých pruhů

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 ($\rho = 1,07 - 1,1 \text{ g/mL}$)



Normativní hodnoty jsou:

- plná krev: $1052 - 1063 \text{ kg/m}^3$
- plazma: 1027 kg/m^3
- erytrocyty: 1090 kg/m^3

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

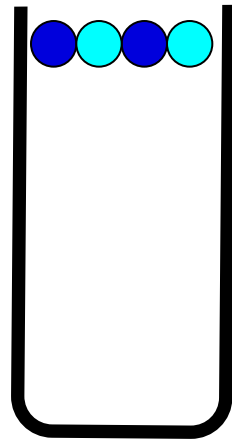
rychlost, při níž částice sedimentuje, závisí na

velikosti částice
tvaru částice
hustotě částice

a je ovlivňována

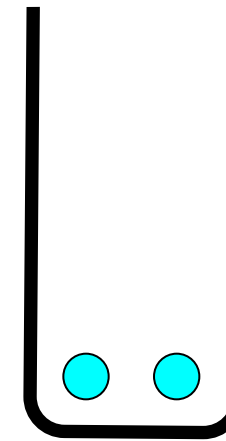
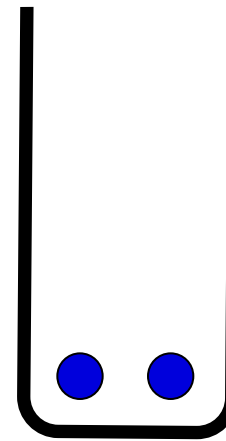
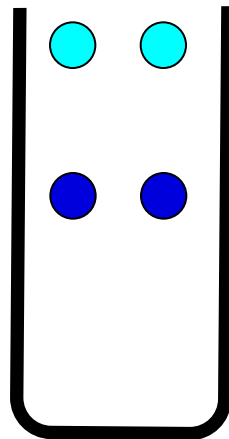
vlastnostmi prostředí
podmínkami centrifugace

Izokinetická centrifugace



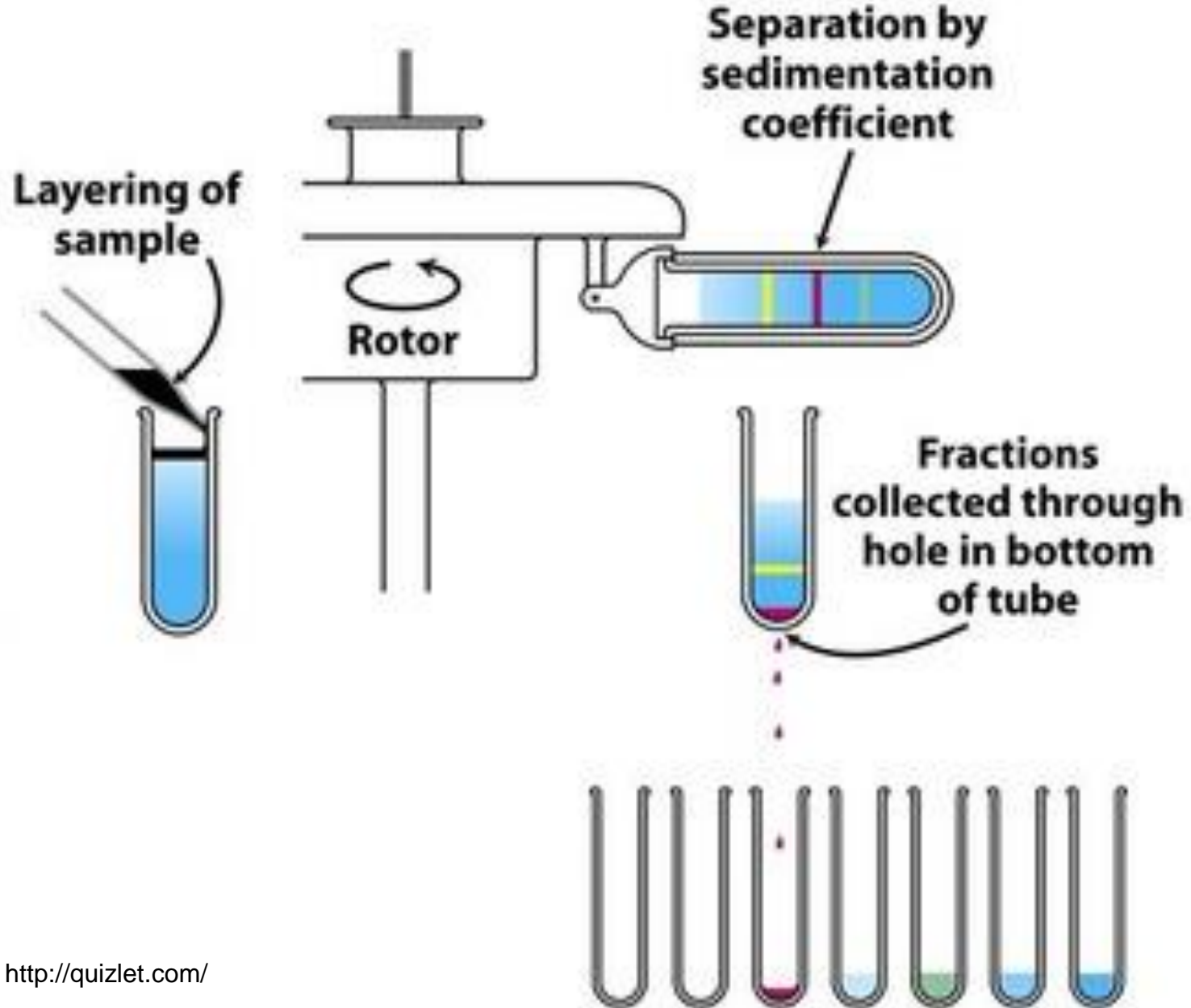
vzorek nanesený na povrch
gradientu (5-20% sacharóza)

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

ω = 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

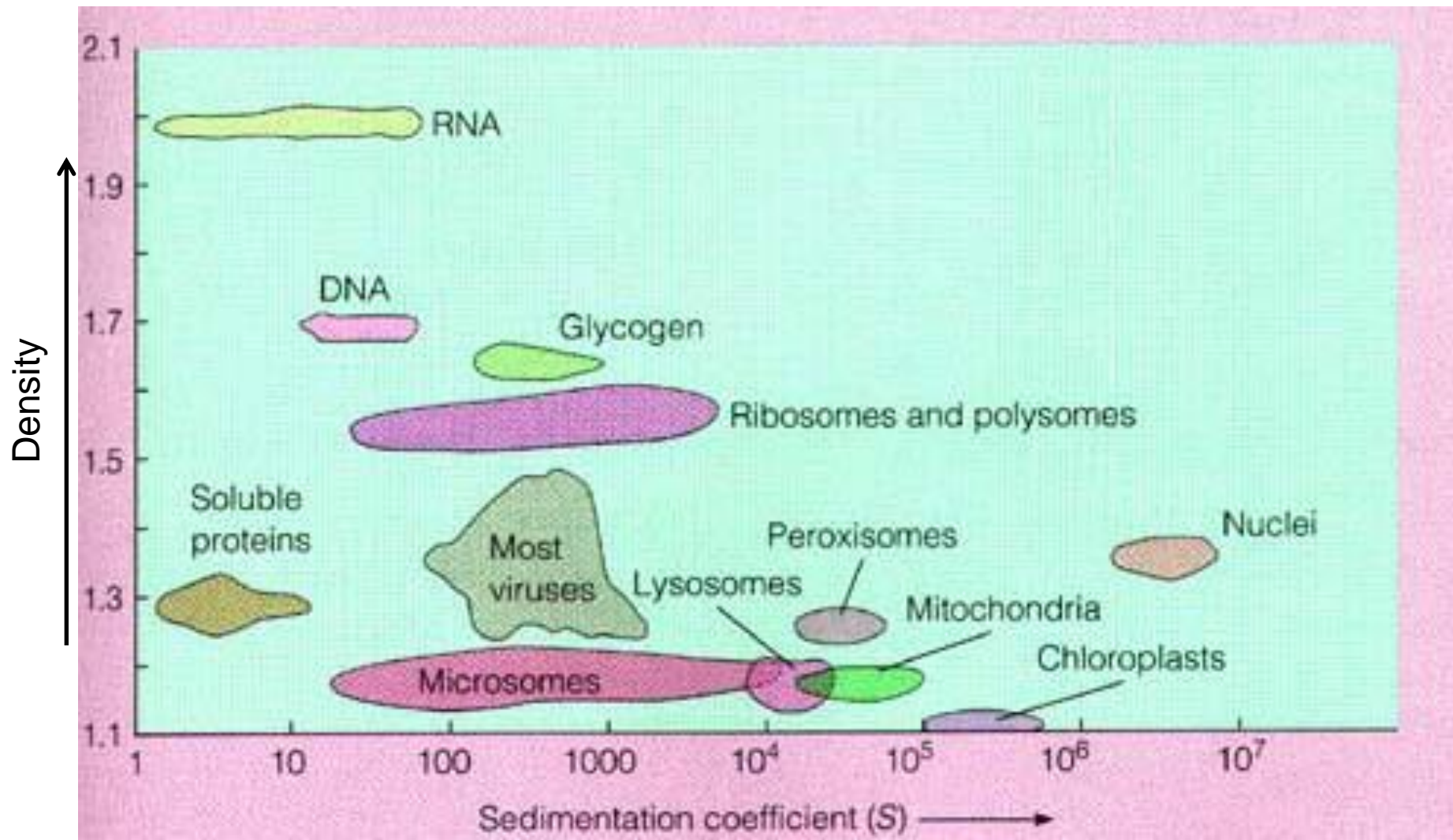
ω = rotational speed (angular velocity)

m = weight of particle

η = viscosity of the medium

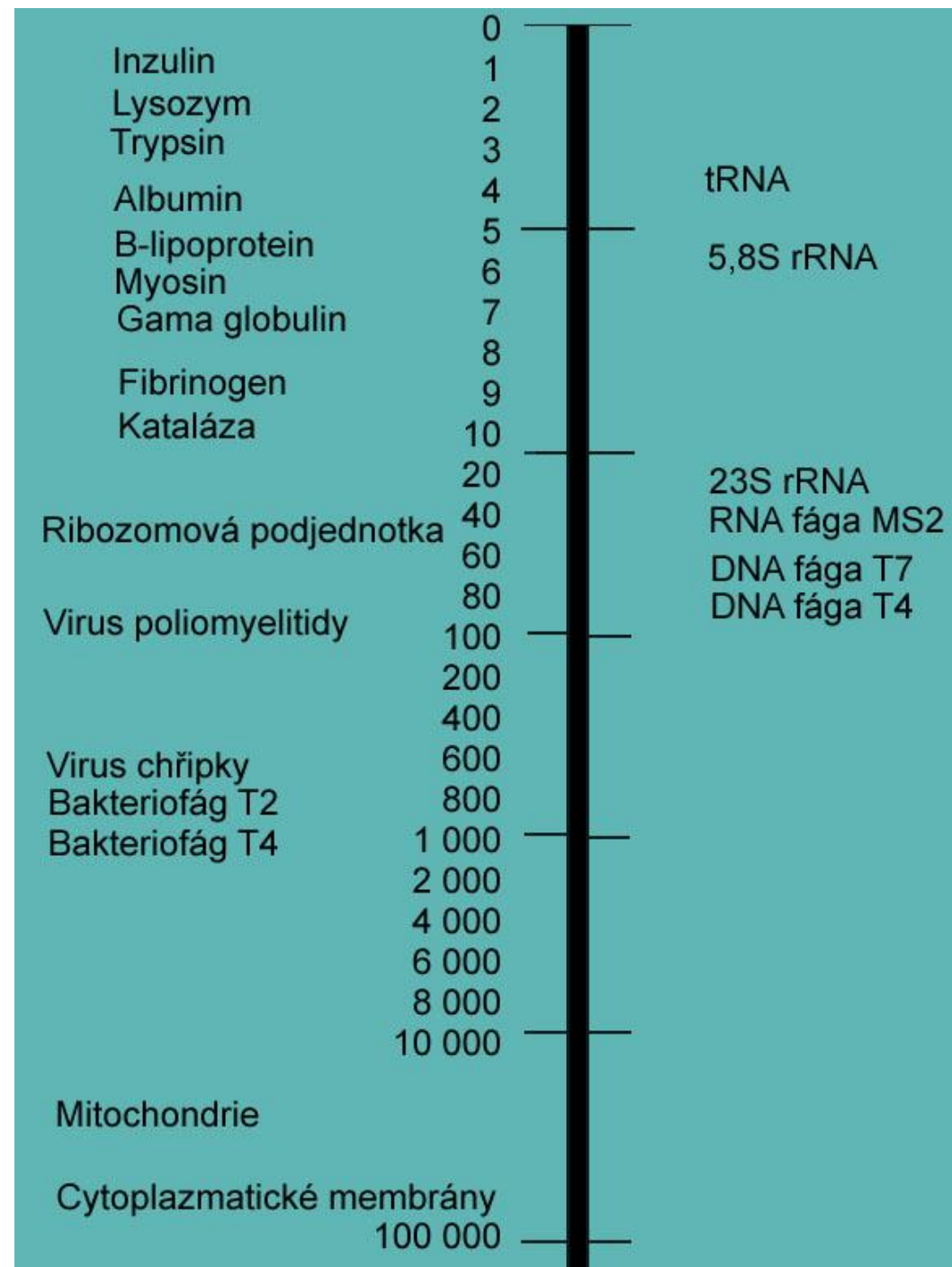
r_0 = radius of the particle

Příklady hodnot standardních sedimentačních koeficientů $S_{20,w}^{\circ}$



<http://jpkc.scu.edu.cn>

**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 analyzovaných látek se pohybují
oběma směry tak dlouho

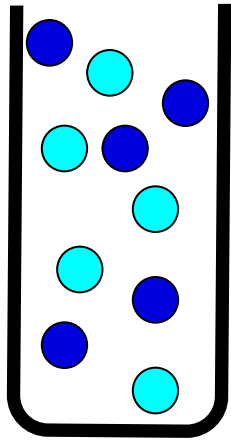
dokud nedosáhnou polohy, v níž je hustota
roztoku shodná s hustotou částic

Izopyknická centrifugace

Takto stanovená hustota se označuje jako
vznášivá hustota.

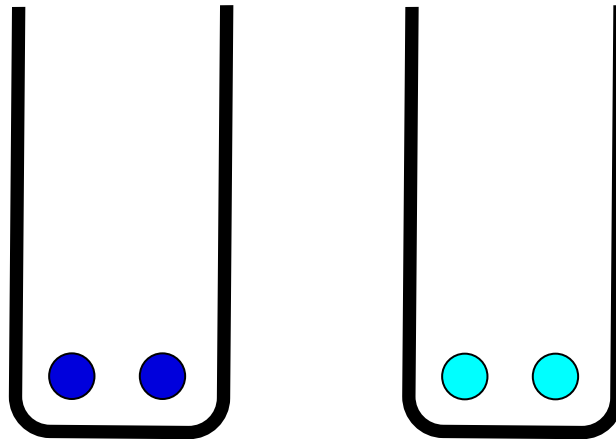
Její hodnoty jsou ovlivněny interakcí částic s
ionty roztoku a jsou obvykle vyšší než je
hustota částic v buňkách.

Izopyknická centrifugace



roztok CsCl obsahující
směs částic

centrifugace



frakcionace
obsahu zkumavky

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

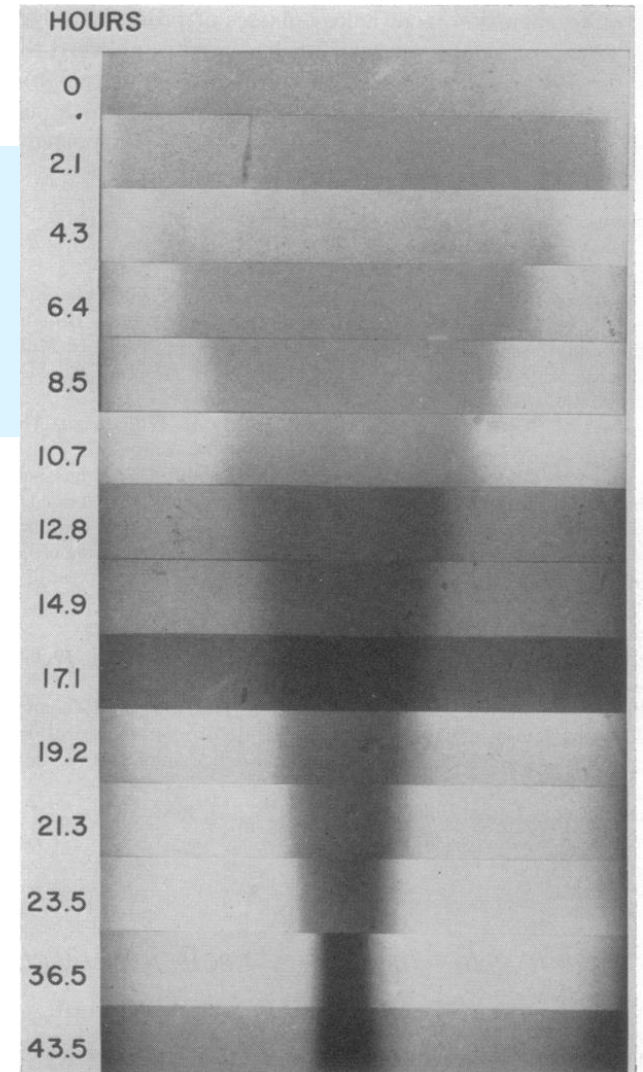


FIG. 1.—Ultraviolet absorption photographs showing successive stages in the banding of DNA from *E. coli*. An aliquot of bacterial lysate containing approximately 10^8 lysed cells was centrifuged at 31,410 rpm in a CsCl solution as described in the text. Distance from the axis of rotation increases toward the right. The number beside each photograph gives the time elapsed after reaching 31,410 rpm.

nižší hustota

vyšší hustota

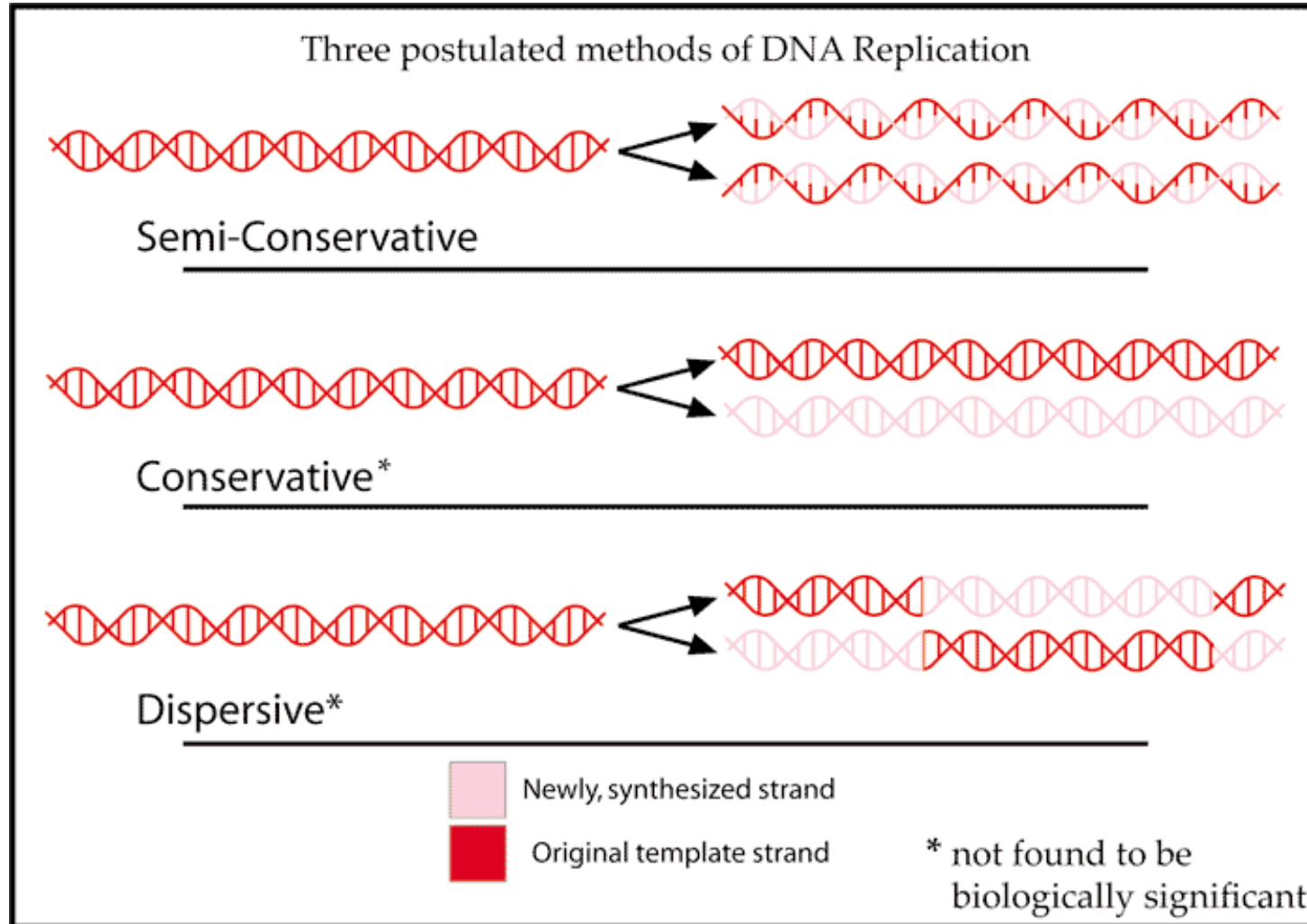
Stanovení vznášivé hustoty izopyknickou centrifugací

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

$n^{\text{D}}_{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$ = 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.

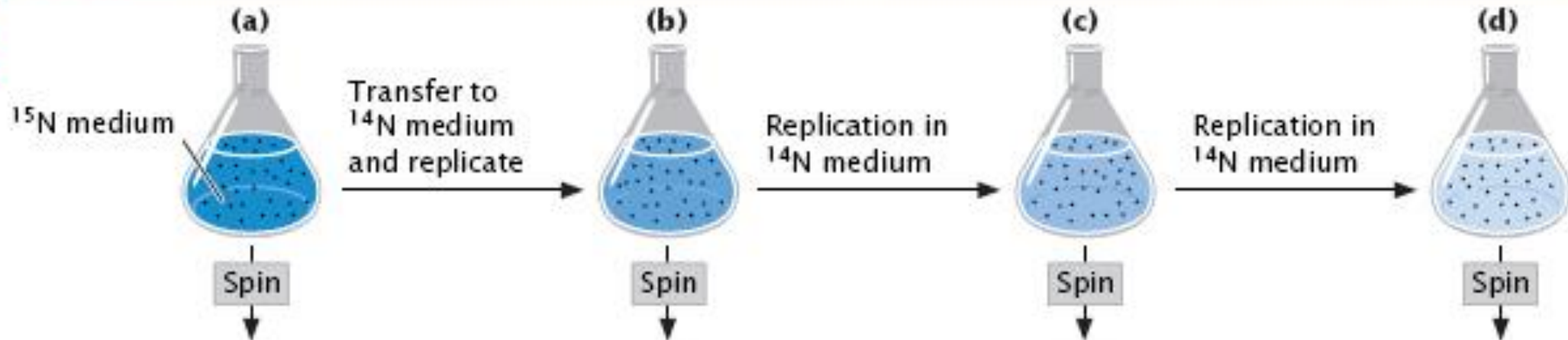
Meselson-Stahl experiment - design

palyapbio.edu.glogster.com

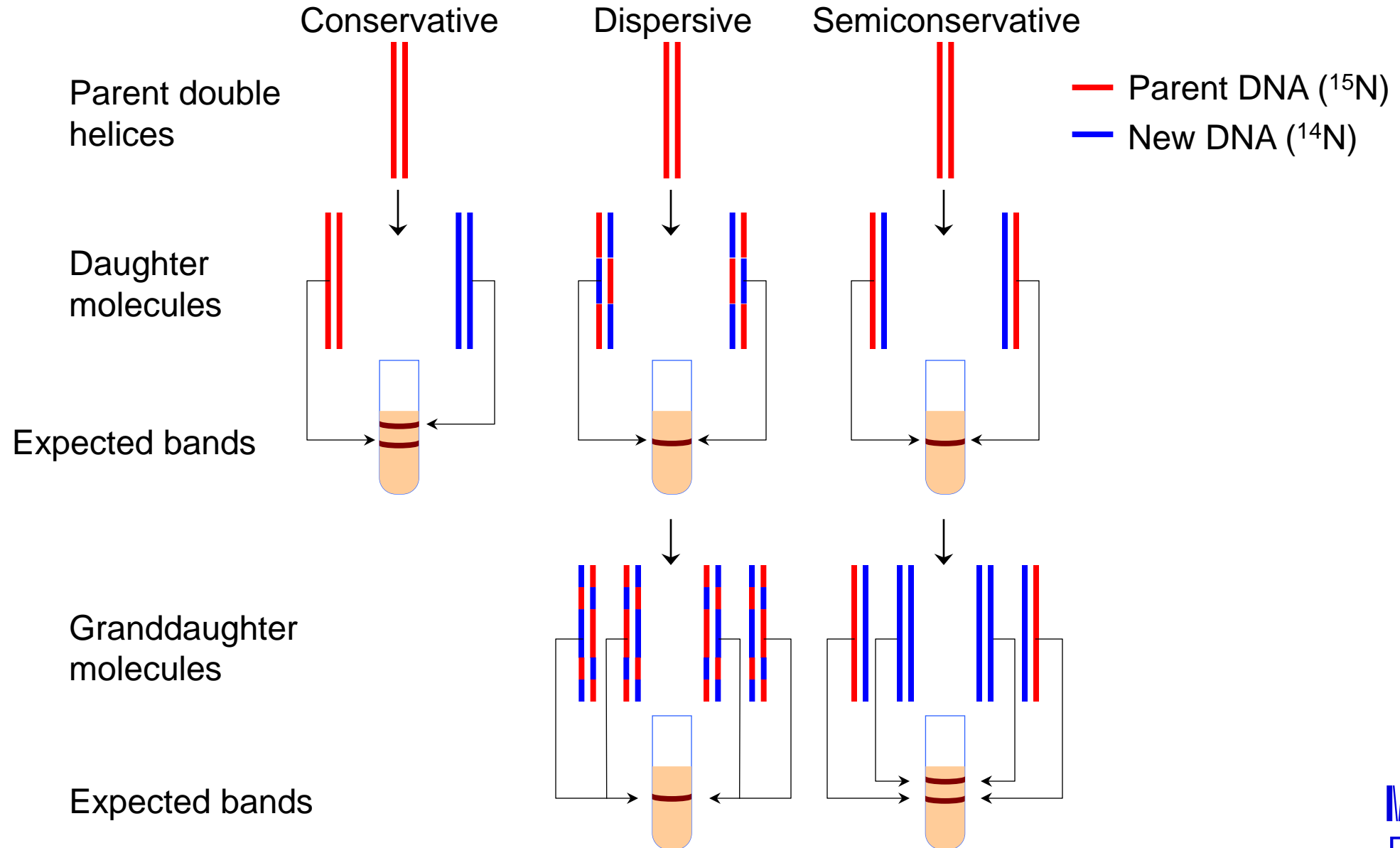
Experiment

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

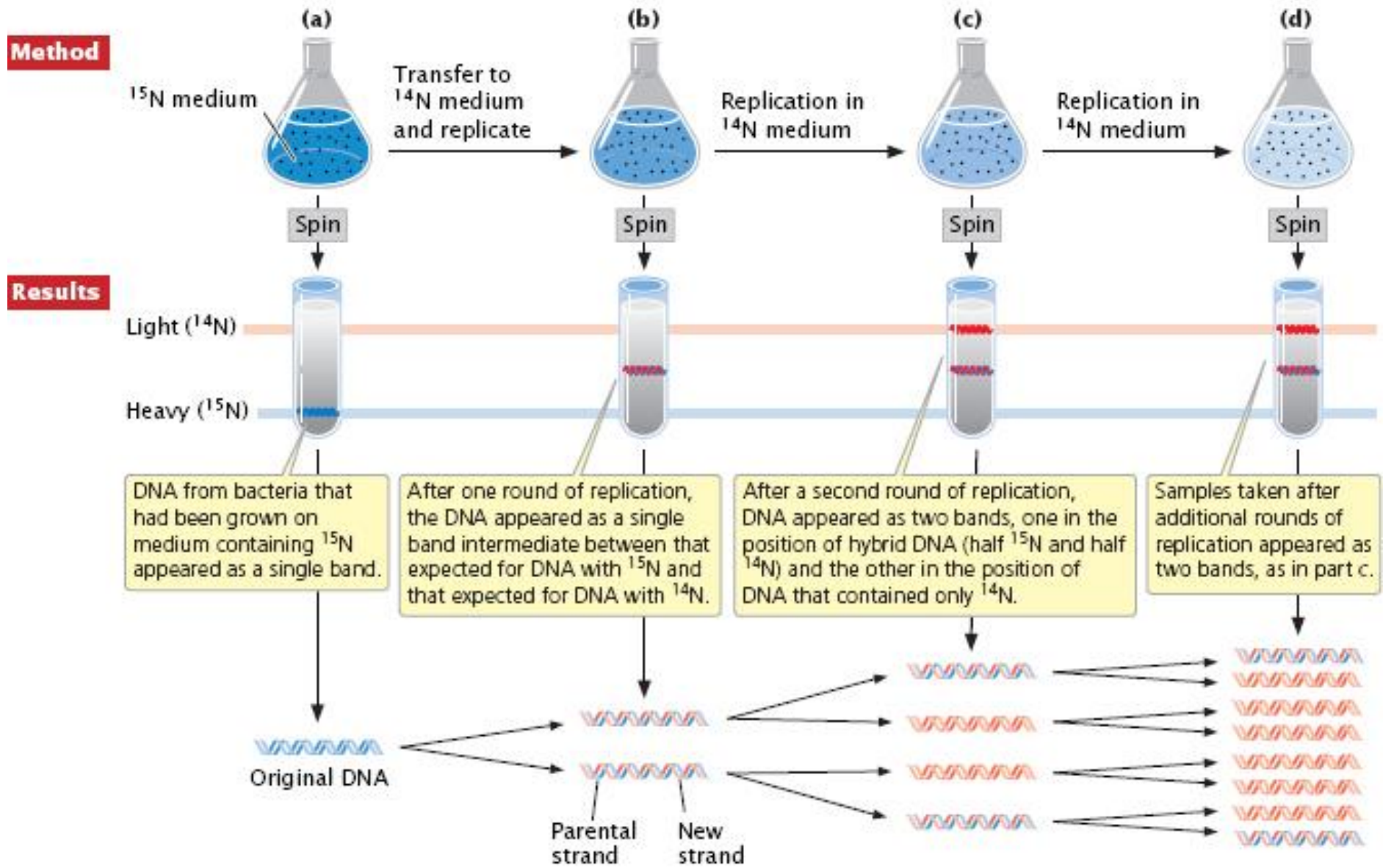
Method



The Meselson-Stahl experiment – predicted results

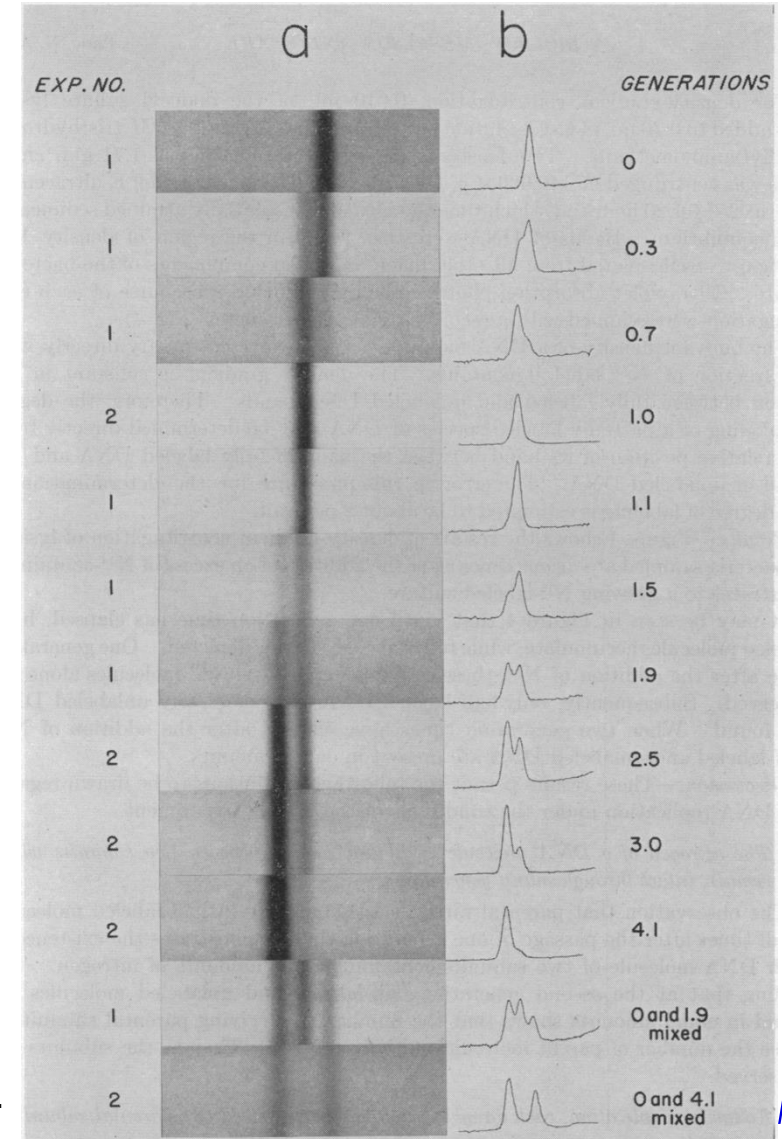
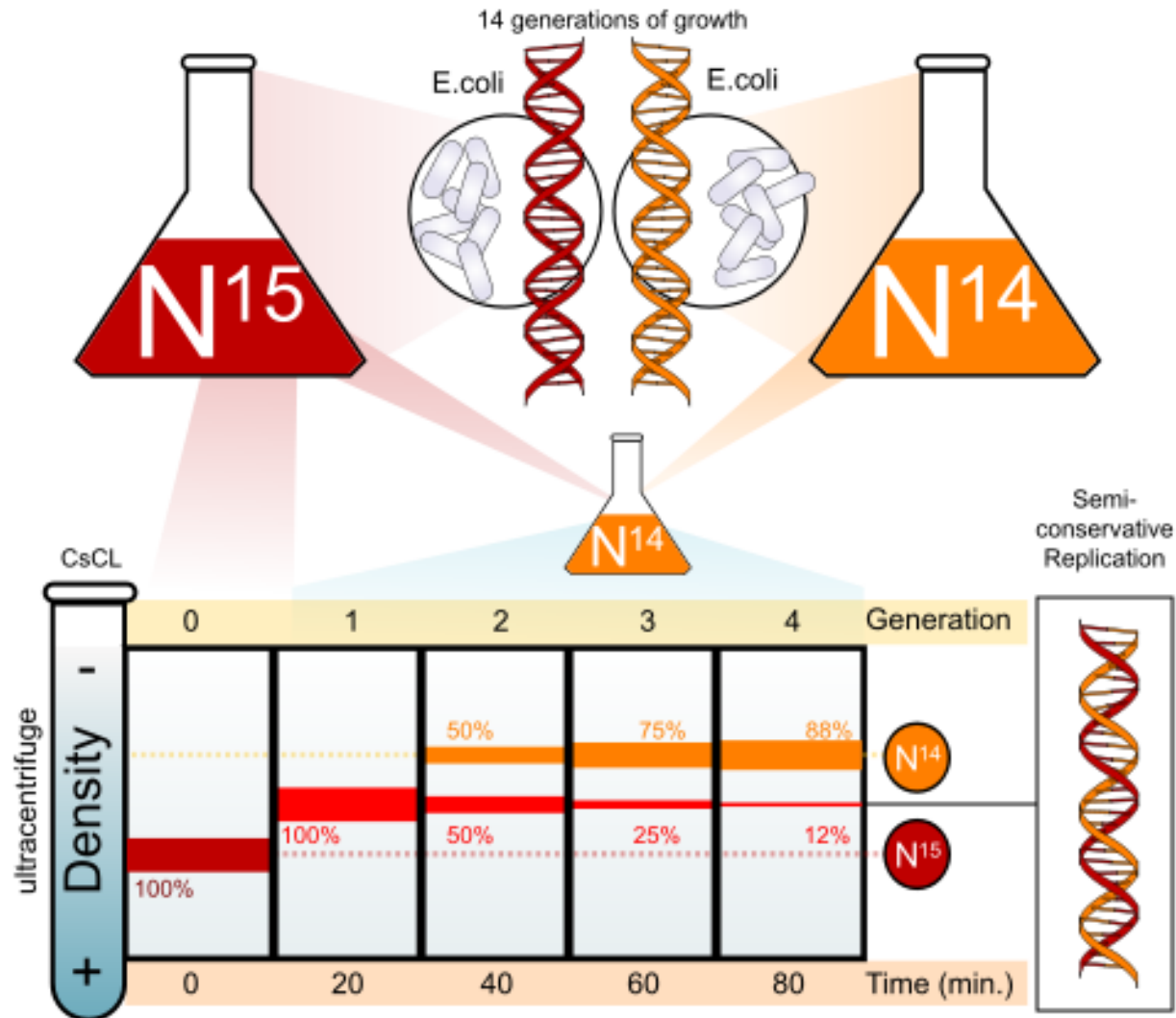


Meselson-Stahl experiment - results



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.

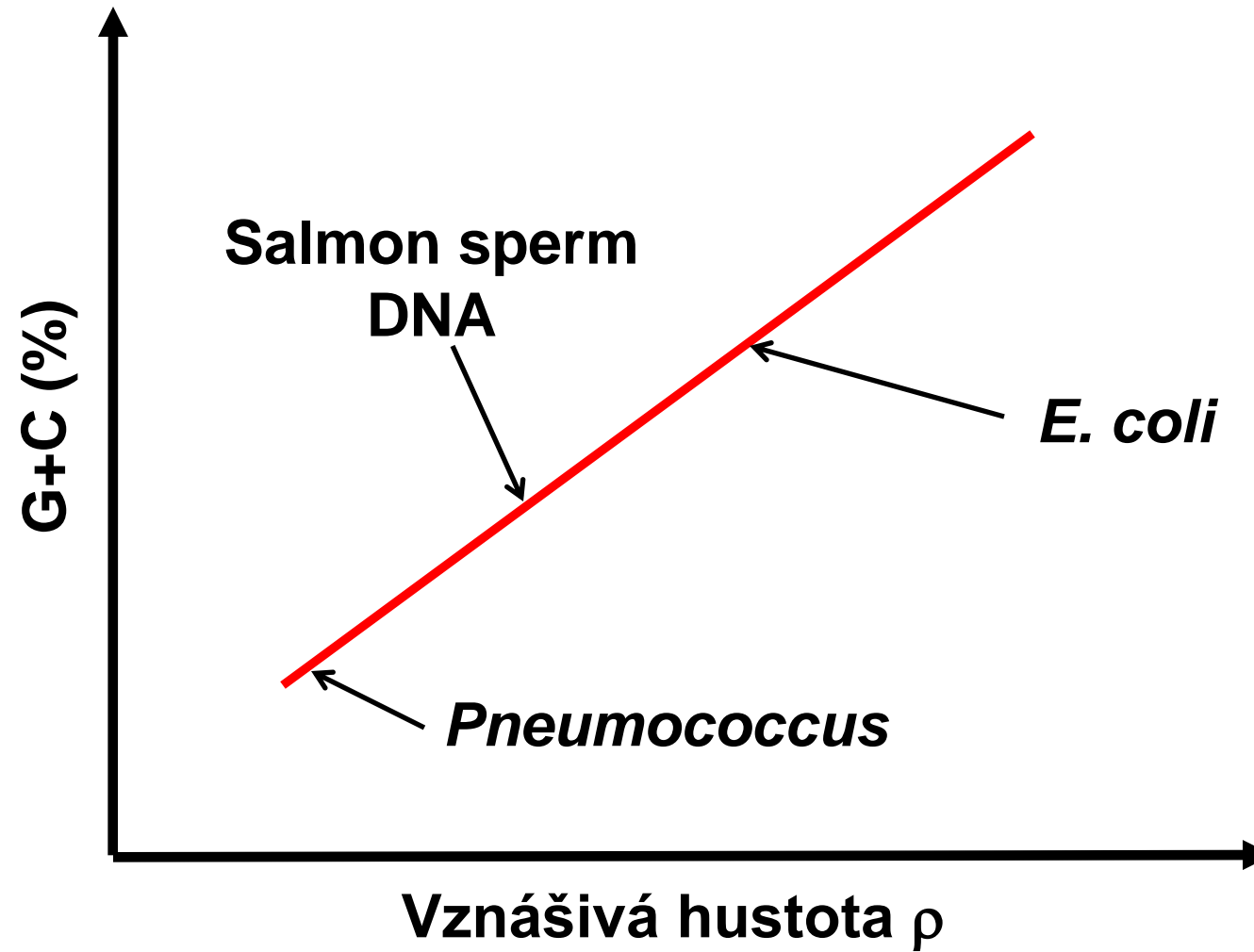
Výpočet % (G+C)

- 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 ρ = vznášivá hustota vzorku dvouřetězcové DNA.

Výpočet % (G+C) - praxe



Separace různých forem DNA

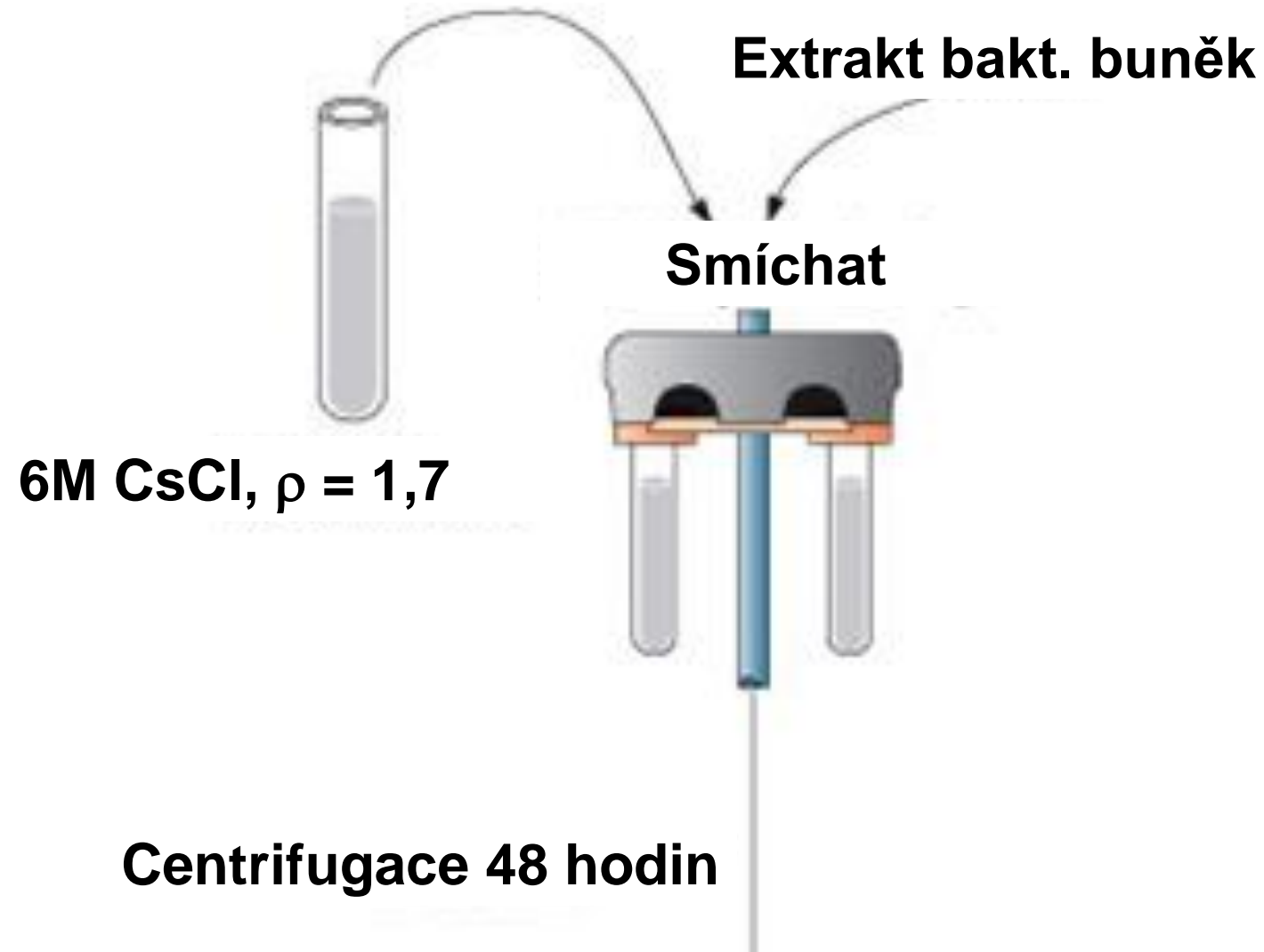
- Speciálním případem využití izopyknické centrifugace je rozdělení odlišných strukturních typů DNA v gradientech CsCl za přítomnosti etidium-bromidu.
- **Po navázání etidiumbromidu na DNA se její vznášivá hustota významně snižuje**, přičemž množství navázaného etidiumbromidu a tím i pokles hustoty DNA 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

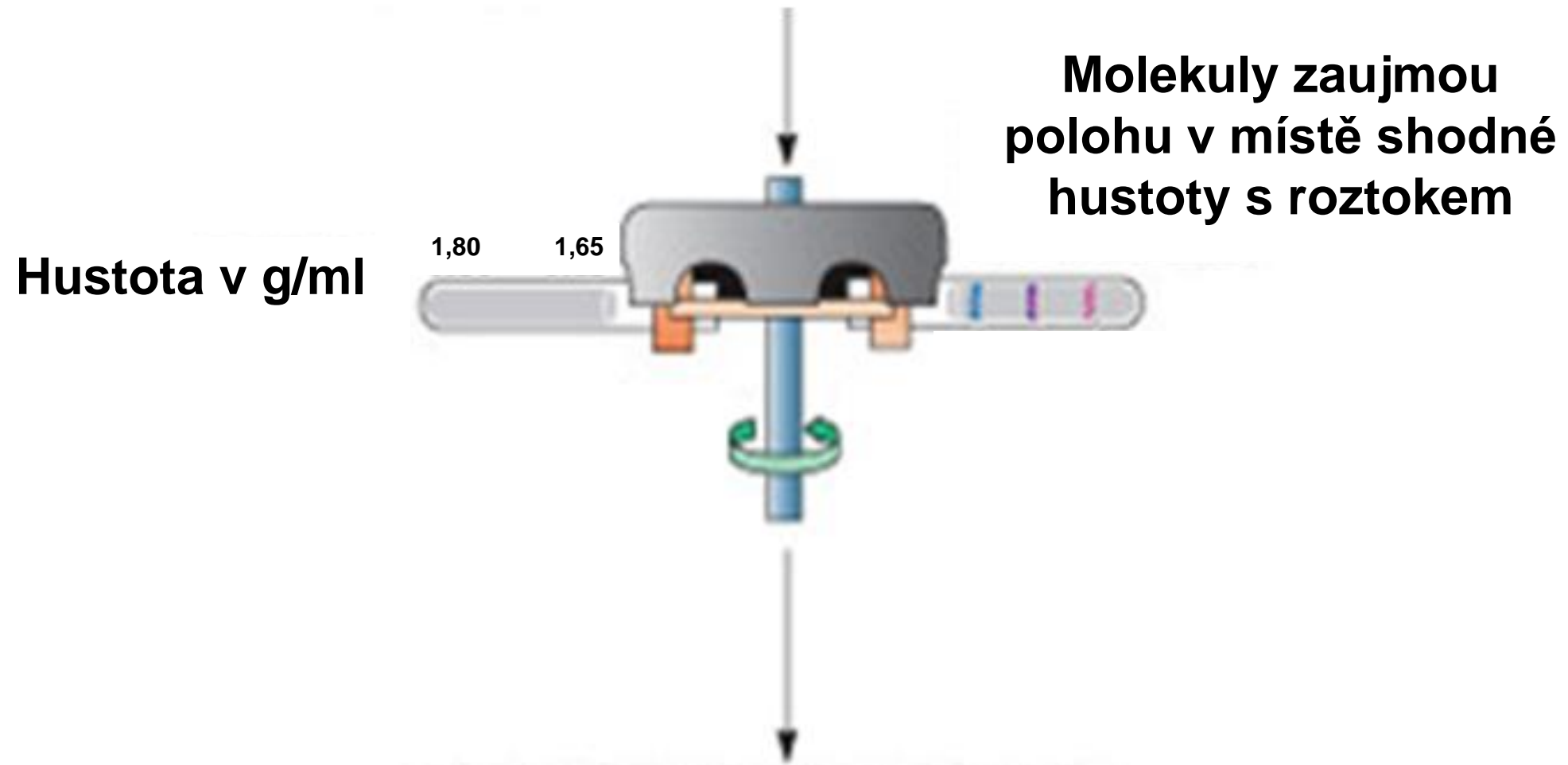
Chci pomocí centrifugace **oddělit lineární jadernou DNA od kružnicové mitochondriální DNA** (nebo plasmidy od bakteriálního chromosomu).

Jak na to?

Izopyknická centrifugace - praxe

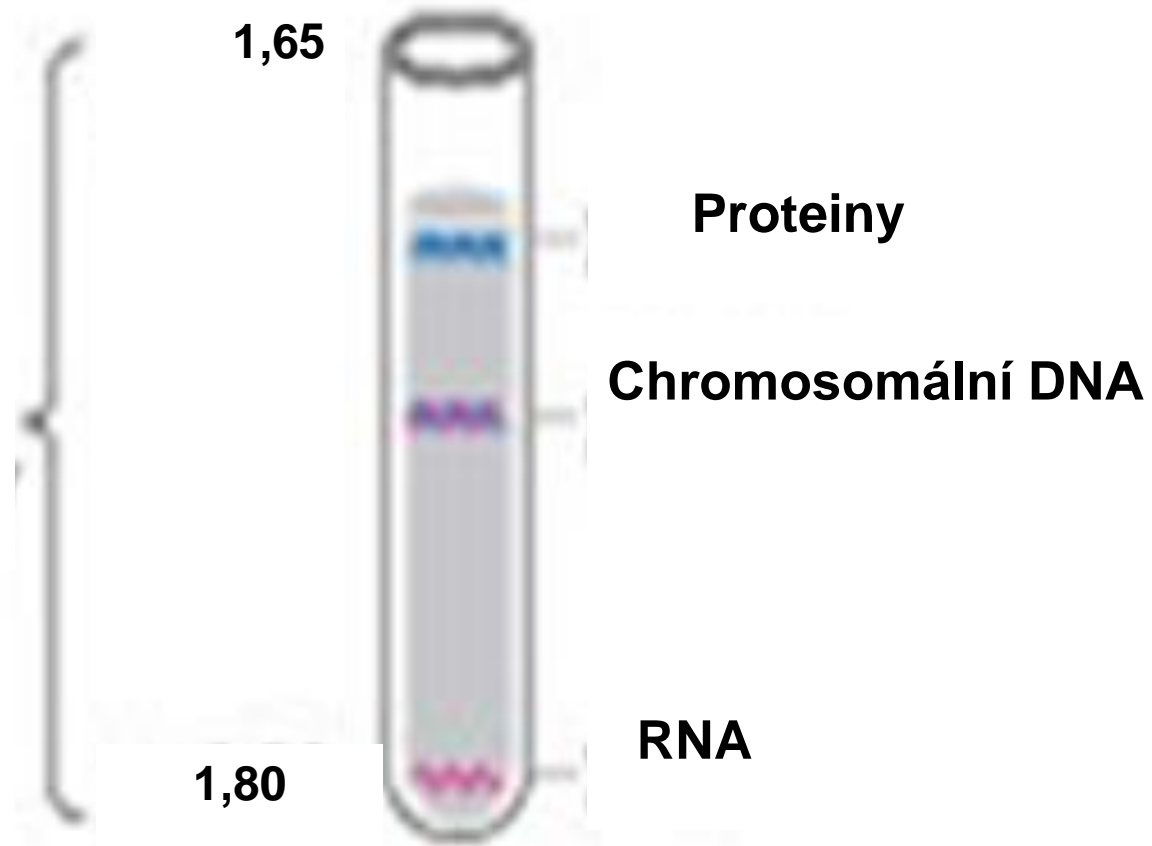


Izopyknická centrifugace - praxe



Izopyknická centrifugace - praxe

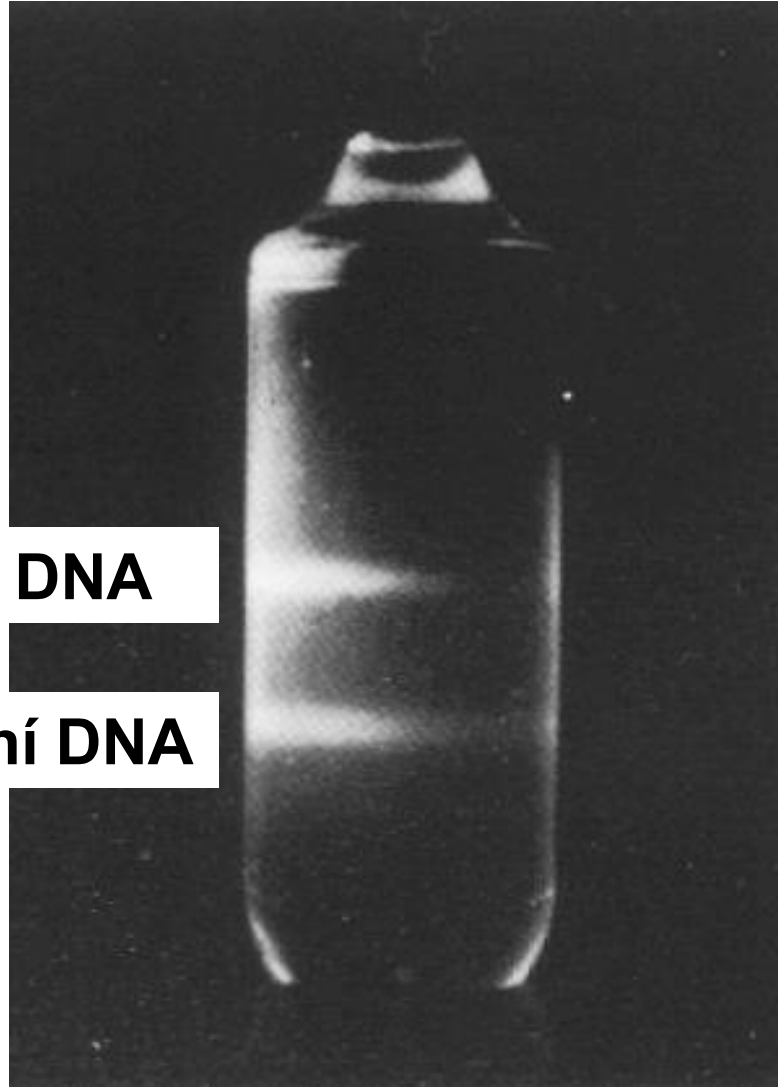
Hustota CsCl



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)