

Dělicí techniky nukleových kyselin

- **Metody**
 - Centrifugační
 - Elektromigrační
 - Chromatografické
- **Vlastnosti využívané pro dělení biomakromolekul**
 - Molekulová hmotnost
 - Konformace a tvar
 - Náboj
 - Hustota

Rozdělení centrifugačních technik

- A. Diferenciální centrifugace** - separace směsi heterogenních částic v homogenním roztoku
- B. Zonální centrifugace** - separace směsi částic s podobnými vlastnostmi v gradientním roztoku
 - a) **Izokinetická centrifugace** – separace podle rychlosti sedimentace částic
 - Stanovení sedimentačního koeficientu S
 - b) **Izopyknická centrifugace** – separace podle hustoty částic
 - Stanovení vznášivé hustoty ρ

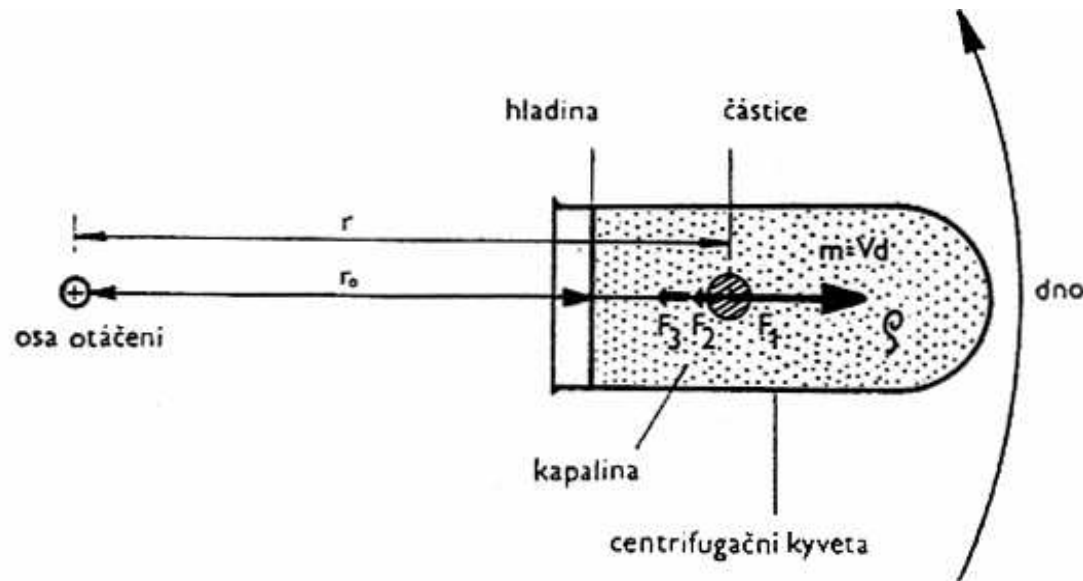
Typy centrifugace podle účelu

- Preparativní centrifugace
- Analytická centrifugace

Centrifugační metody

- Centrifugace patří k separačním metodám, které se v molekulární biologii používají k
 - Izolaci
 - Purifikaci
 - Charakterizaci
informačních makromolekul a nadmolekulárních struktur
- Základním principem separace založené na centrifugačních technikách je pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy
- Chování částic při centrifugaci je dáno jejich fyzikálními vlastnostmi a povahou prostředí, v němž centrifugace probíhá.

Teoretické principy centrifugace



Síly F_1 , F_2 , F_3 působící při centrifugaci na pohybující se částice; r_0 = vzdálenost od středu otáčení v čase $t = 0$, r = vzdálenost částice od osy otáčení v čase $t > 0$, V = objem, d = hustota částice, ρ = hustota kapaliny



5 to 30% Sucrose gradients

Protein sample

Molecules sediment according to their size, shape and density.

Výpočet relativní odstředivé síly

$$RCF = \frac{m\omega^2 r}{mg} = \frac{\omega^2 r}{g} = \frac{4\pi^2 n^2 r}{g} = \frac{4\pi^2}{60^2} (rpm)^2 r$$

$$RCF = 1,12r \left(\frac{rpm}{1000} \right)^2$$

$$rpm = 1000 \times \sqrt{\frac{RCF}{1,12r}}$$

RCF – relativní odstředivá síla (relative centrifugal force)

rpm – počet obrátek za minutu

r – vzdálenost od středu otáčení, poloměr rotoru [mm]

- 1000×g, 5 min bakteriální buňky
- 3000×g, 10 min chloroplasty, jádra
- 10 000×g, 10 min mitochondrie, inkluzní tělíska
- 40 000×g, 30 min membrány, mikrozómy, peroxizómy aj.
- 200 000×g, 16 hr velké proteinové komplexy (ribozómy)
- 400 000×g, 24 hr proteiny 50 kDa

Nomogram pro přepočet relativní odstředivé síly (RCF) a otáček rotoru (rpm)

RCF = relativní odstředivá síla

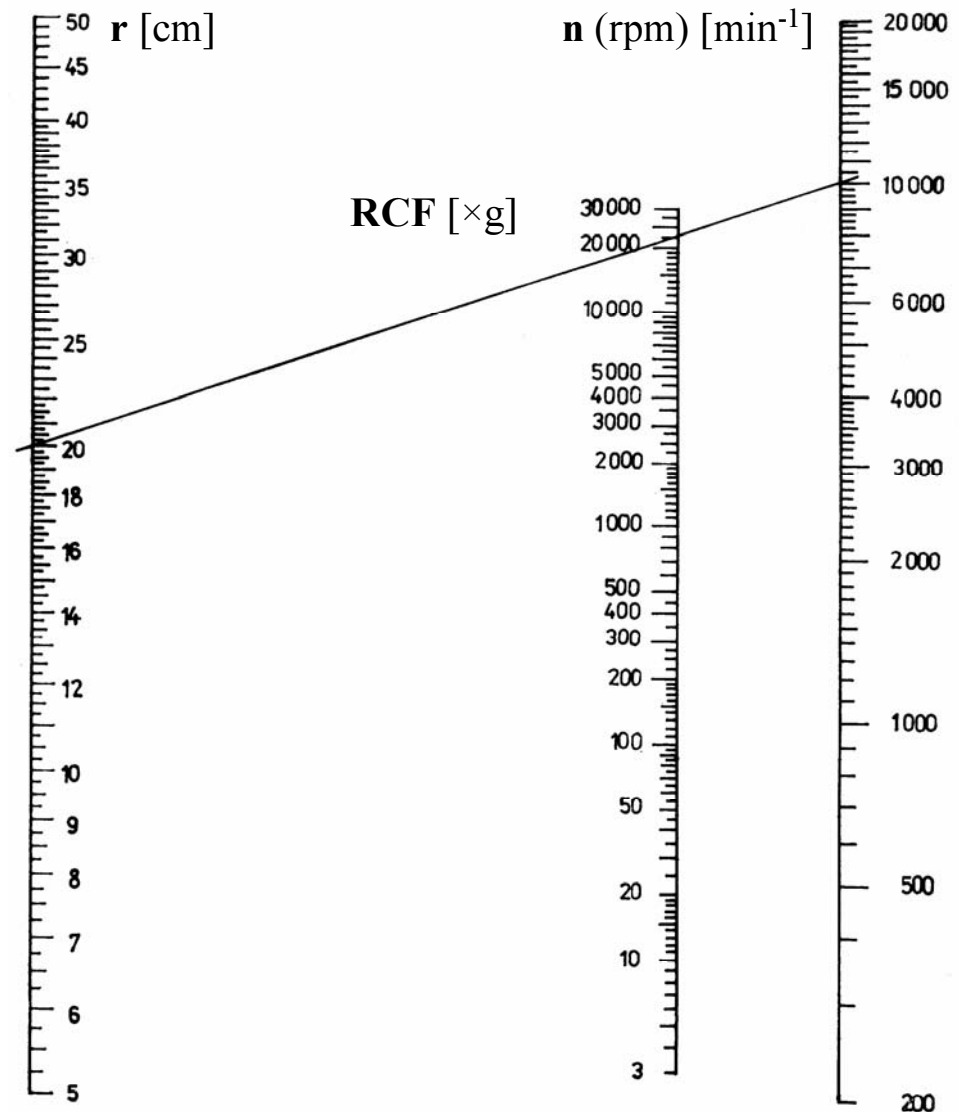
r = vzdálenost od středu
otáčení (poloměr rotoru) v cm

n = počet otáček za minutu (rpm)

V publikacích je nutno udávat

- RCF, dobu centrifugace a teplotu
- rpm, typ centrifugy, typ rotoru, dobu centrifugace a teplotu

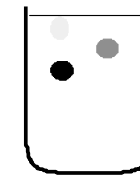
Teplota je vzhledem k velkému vlivu na viskozitu důležitá.



Diferenciální centrifugace

- Jestliže se centrifugaci v homogenním roztoku podrobí směs částic lišících se podstatně svou velikostí, hmotností nebo hustotou, budou jednotlivé složky směsi 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, např.
 - buněčných jader
 - buněčných membrán
 - ribozomů
 - nukleových kyselin
 - mitochondrií
 - proteinů

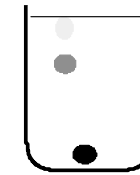
Diferenciální centrifugace



Směs látek v roztoku.



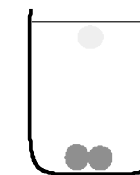
Centrifugace při nízkých otáčkách (1 000 g).



Shromáždění sedimentu.



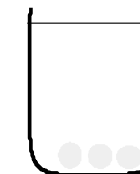
Centrifugace supernatantu při středních otáčkách (20 000 g).



Shromáždění sedimentu.



Centrifugace supernatantu při vysokých otáčkách (80 000 g).

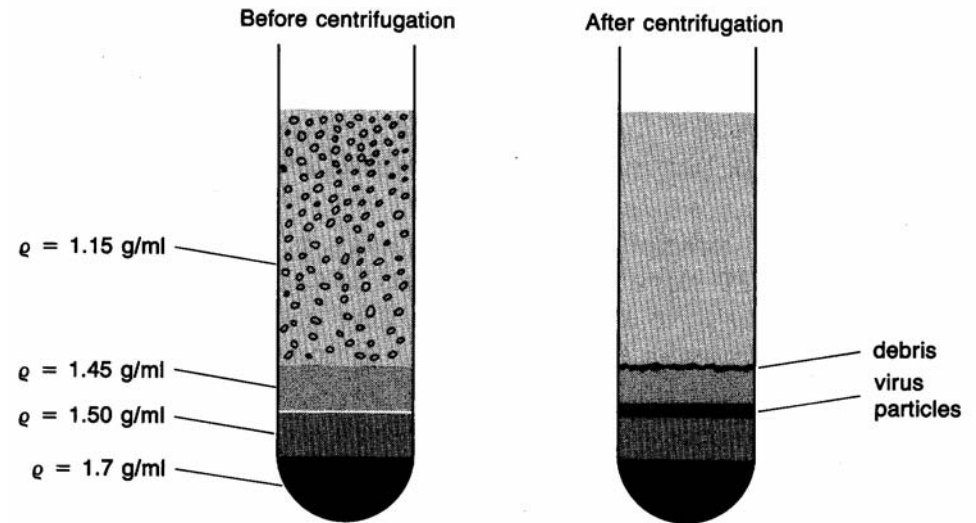


Zonální centrifugace

- Rychlost sedimentace jednotlivých komponent přítomných ve výchozí směsi není vždy odlišná natolik, aby je bylo možné diferenciální centrifugací oddělit
 - různé typy nukleových kyselin
 - ribozomální podjednotky
 - jiné částice, vykazující podobné vlastnosti
- Pro oddělování neboli separaci těchto látek se využívá zonální centrifugace, *při níž je homogenní roztok v centrifugační zkumavce nahrazen roztokem, jehož koncentrace od povrchu ke dnu zkumavky narůstá.*
- Takový roztok se označuje jako **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.

Zonální centrifugace

- Před zahájením centrifugace se vzorek obsahující směs částic nanese v tenké vrstvě na povrch gradientního roztoku v centrifugační zkumavce.
- Jednotlivé složky výchozí směsi budou v závislosti na své velikosti, tvaru a hustotě sedimentovat gradientním roztokem různou rychlostí a vytvářet dobře oddělené zóny.
- Gradient roztoku zároveň zabraňuje proudění uvnitř zkumavky, udržuje stabilitu a ostrost vytvořených zón a umožňuje jejich odebrání.

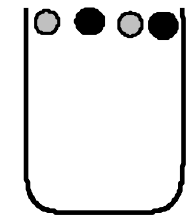


Hustotní gradienty

- Gradienty mohou být podle toho, zda se koncentrace roztoku mění plynule nebo stupňovitě.
 - Kontinuální
 - Diskontinuální
- Diskontinuální gradient je předem připravený gradient v centrifugační zkumavce *postupným navrstvováním roztoků o různé koncentraci*. Vzorek je pak nanesen na jeho povrch.
- V obou případech jsou po ukončení centrifugace částice příslušného druhu zkoncentrovány do úzkých pruhů, které lze detegovat a izolovat stejným způsobem jako při zonální centrifugaci.
- K přípravě hustotních gradientů se používají látky, které se vyznačují vysokou rozpustností.
- Běžně používanými látkami jsou.
 - **chlorid cesný**
 - **sacharóza**
- 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.

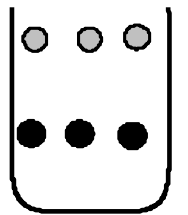
2 typy zonální centrifugace

Izokinetická centrifugace



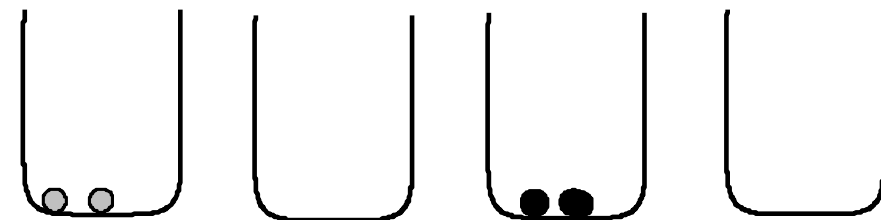
*Vzorek nanesený
na povrch 5 - 20 %
sacharóзовého
gradientu.*

Centrifugace.



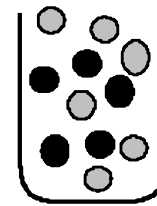
*Pomaleji sedimentující
částice.
Rychleji sedimentující
částice.*

Frakcionace obsahu zkumavky.



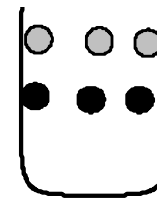
Sběr frakcí.

Izopyknická centrifugace



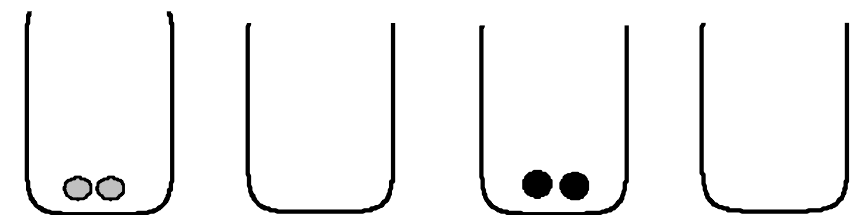
*Roztok CsCl
obsahující
směs částic.*

Centrifugace.



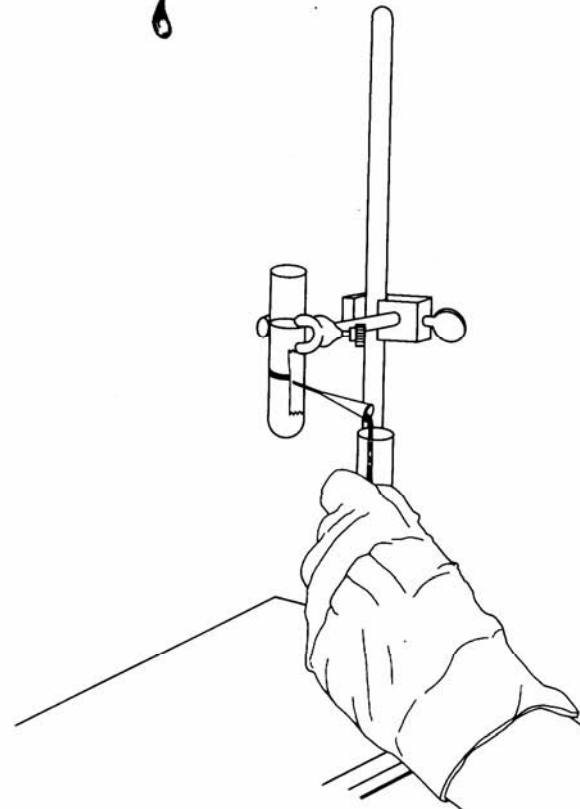
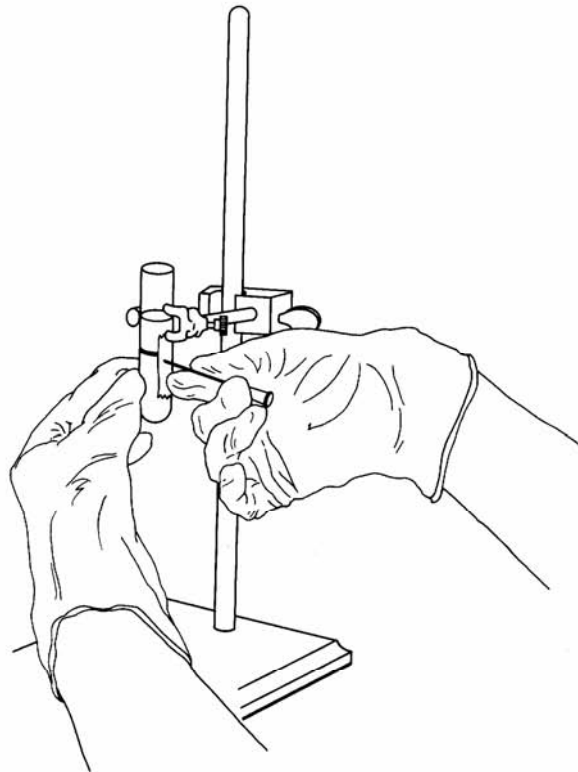
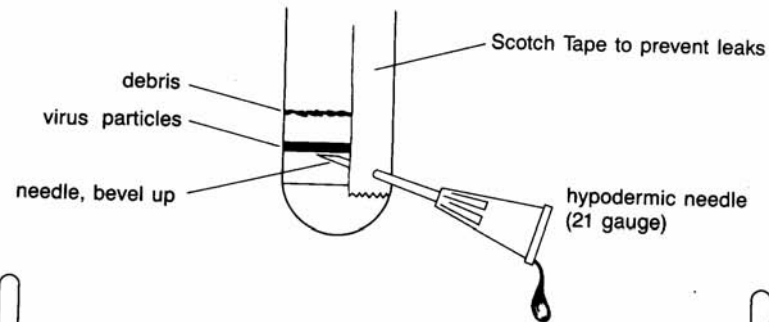
*Částice s nižší hustotou.
Částice s vyšší hustotou.*

Frakcionace obsahu zkumavky.



Sběr frakcí.

Odběr frakcí po ultracentrifugaci v hustotním gradientu



Sběr frakcí

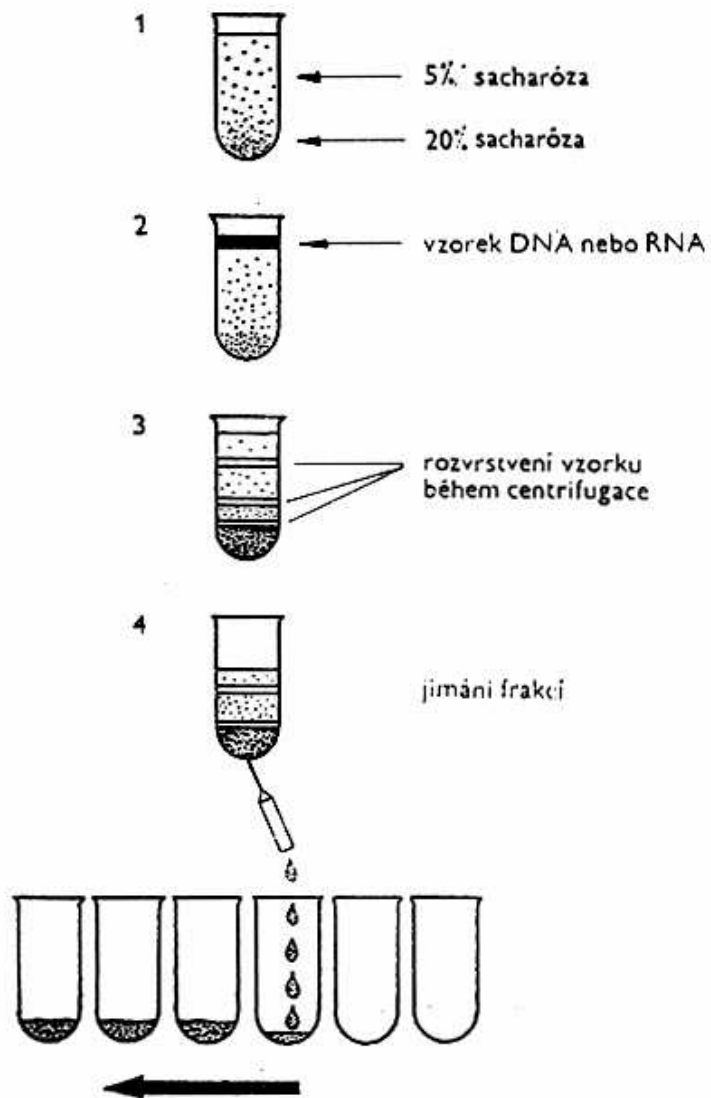
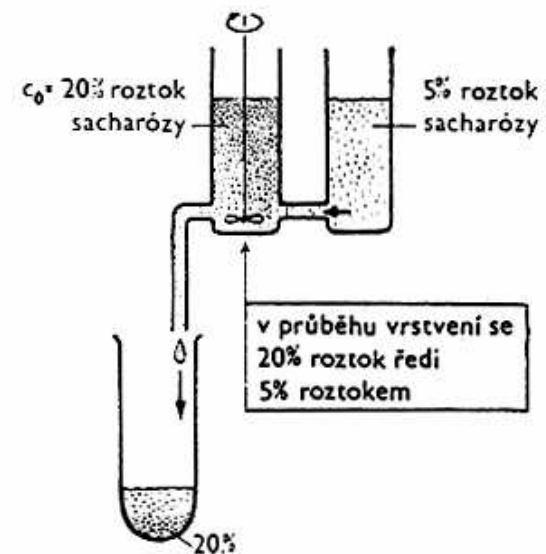


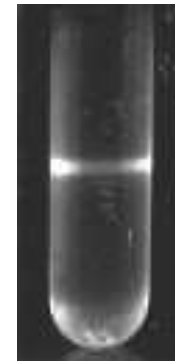
Schéma ultracentrifugace
v sacharózovém gradientu



Zařízení na vrstvení lineárního
sacharózového gradientu

Izokinetická centrifugace

- Volbou vhodných podmínek při zonální centrifugaci lze dosáhnout toho, aby *rychlost sedimentace částic byla v průběhu centrifugace konstantní*.
- Tento způsob centrifugace se využívá k podrobnější charakterizaci částic, např. K přesnému stanovení jejich velikosti.
- Při analýze nukleových kyselin se obvykle používá 5-20% sacharózový gradient, v němž se koncentrace sacharózy lineárně mění od hladiny ke dnu zkumavky.
- Pohyb vytvořených zón lze monitorovat
 - Přímo během centrifugace pomocí speciálních zařízení (analytické centrifugy)
 - Stanovit polohu po ukončení centrifugace
 - Spektrofotometricky
 - Změřením radioaktivity jednotlivých frakcí
- Rychlost, při níž částice sedimentuje, závisí na její velikosti, tvaru a hustotě a je ovlivňována vlastnostmi prostředí a podmínkami, při nichž centrifugace probíhá.



**Chloroplastová DNA
po ultracentrifugaci
v gradientu CsCl-EtBr**

Sedimentační koeficient

- Veličina, kterou lze rychlost pohybu částice při izokinetické centrifugaci charakterizovat, se označuje jako *sedimentační koeficient* nebo též *hodnota S*. Rychlost sedimentace částice při centrifugaci lze vyjádřit obecným vztahem:

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

kde r je vzdálenost částice od osy otáčení,

t je doba centrifugace,

a je odstředivé zrychlení,

S je sedimentační koeficient,

ω je úhlová rychlost rotoru při otáčení.

- Po integraci uvedeného vztahu získáme rovnici pro sedimentační koeficient

$$S = d(\ln r) / \omega^2 dt = \ln r^2 / r_1 / \omega^2 (t_2 - t_1),$$

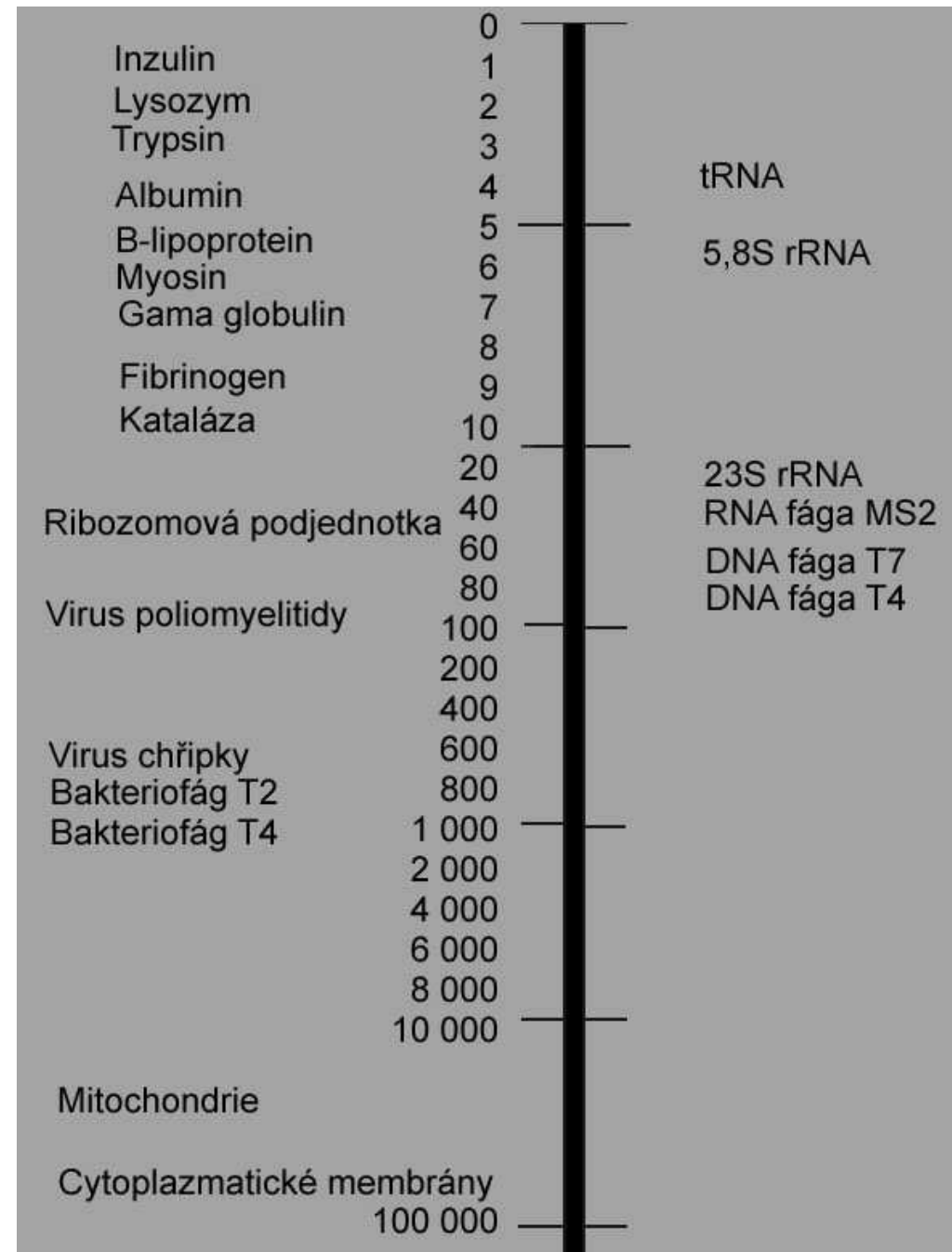
z níž lze vypočítat hodnotu sedimentačního koeficientu analyzované částice, jestliže známe její polohy r_1 a r_2 v centrifugační zkumavce v příslušných časových intervalech t_1 a t_2 a rychlost otáčení.

- Abychom mohli srovnat hodnoty S stanovené při různých podmínkách centrifugace, jsou získané hodnoty přepočítány na **standardní sedimentační koeficient** $S^0_{20,w}$, které charakterizují rychlost sedimentace částic o koncentraci blízké nule ve vodě při 20°C.

Sedimentační koeficient

- Hodnoty sedimentačních koeficientů se pro většinu informačních makromolekul a molekulárních komplexů pohybují v rozmezí řádů 10-11 až 10-13 sekund.
- Vyjadřují se proto ve **Svedbergových jednotkách (S)**, kde
1 S (Svedberg) = 10-13 sekundy.
- Hodnot sedimentačních koeficientů se využívá k popisu a charakterizaci informačních makromolekul, buněčných organel a jejich struktur.
- Příkladem je označování jednotlivých druhů
 - ribozomových RNA
 - 23S-rRNA
 - 16S-rRNA
 - ribozomových podjednotek
 - 30S
 - 50S
- Pro jednotlivé typy informačních makromolekul lze *pomocí empirických vztahů z hodnot sedimentačních koeficientů vypočítat rovněž jejich molekulové hmotnosti.*

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



Výpočet molekulové hmotnosti DNA z hodnoty S

$$S_{20,w}^0 = a \cdot M^K$$

M = molární hmotnost nukleové kyseliny

a, K = empirické konstanty

Výpočet srovnáním s vnitřním standardem

$$\frac{L_x}{L_{ST}} = \left(\frac{M_x}{M_{ST}} \right)^K$$

L = vzdálenost od hladiny

M = molární hmotnost

K = empirická konstanta

Izopyknická centrifugace

- Při této metodě centrifugace, označované též jako **hustotní centrifugace** nebo **centrifugace do rovnováhy**, *se částice oddělují podle své hustoty.*
- Nejjednodušší provedení této metody spočívá v přípravě homogenní směsi analyzovaných částic ve vhodném mediu a následné centrifugaci.
- Během centrifugace tato media *sama vytvoří koncentrační a tím i hustotní gradient*, v němž *se částice analyzovaných látek pohybují oběma směry tak dlouho, dokud nedosáhnou polohy, v níž je hustota roztoku shodná s hustotou částic.*
- 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.

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

Výpočet % (G+C)

- Separace částic na základě jejich odlišné hustoty se používá k jejich izolaci a charakterizaci.
- Je známo, že 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

$$\% (G+C) = (\rho - 1,660/0,098) \cdot 100$$

kde ρ = vznášivá hustota vzorku dvouřetězcové DNA.

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.