

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA A JEJÍ VYUŽITÍ V BIOCHEMICKÉ LABORATOŘI

ONDŘEJ VANĚK^{a,b} a KAREL BEZOUŠKA^{a,b}

^a Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

kenav3@seznam.cz, bezouska@biomed.cas.cz

Došlo 15.7.10, přijato 26.8.10.

Klíčová slova: analytická ultracentrifuga, sedimentační rychlost, sedimentační rovnováha, molekulová hmotnost, rovnovážná konstanta

Obsah

1. Úvod
2. Historie analytické ultracentrifugy
3. Přístroj a jeho parametry
4. Přehled aplikací
5. Sedimentační rychlost
6. Sedimentační rovnováha
7. Analýza sedimentačních dat
8. Příklady analýz
9. Závěr

1. Úvod

Cílem sedimentační analýzy prováděné pomocí analytické ultracentrifugy je charakterizace sedimentujících částic z hlediska jejich molekulové hmotnosti a sedimentačního koeficientu, popřípadě některých dalších hydrodynamických vlastností, například difuzního koeficientu. Ze sedimentačních dat lze získat odhad velikosti a tvaru částic, údaje o distribuci jednotlivých typů sedimentujících částic ve vzorku a v neposlední řadě studovat rovnovážné systémy, včetně určení příslušných rovnovážných konstant. Vztáhneme-li pojem sedimentující částice například na molekulu proteinu, je z výše uvedeného výčtu hlavních aplikací této metody zřejmé, že v oblasti výzkumu biomakromolekul, především proteinů a nukleových kyselin, může mít sedimentační analýza velké uplatnění. Je to navíc jedna z nemnoha metod, které umožňují určit molekulovou hmotnost přímo, bez nutnosti kalibrace či interakce s maticí, a to přímo ve vodném prostředí (nejčastěji v pufru) za fyziologických podmínek. A tak přestože se jedná o metodu již bezmála sto let starou, nachází stále velké uplatnění nejen ve vědě a výzkumu, ale

i ve farmaceutickém průmyslu. Cílem tohoto referátu je podat přehled o principech a praktických aplikacích sedimentační analýzy s důrazem na analýzu biomakromolekul.

2. Historie analytické ultracentrifugy

Historii analytické ultracentrifugy započal její konstruktér a objevitel metody sedimentační analýzy Theodor Svedberg (1884–1971)¹. Rodák ze švédského Fleräng, okres Gävleborg, se stal v roce 1904 studentem univerzity v Uppsale, která už také zůstala jeho hlavním celoživotním působištěm. V letech 1912–1949 zastával na této univerzitě funkci profesora fyzikální chemie. Svedbergova práce se týkala převážně koloidů a makromolekulárních látek. Ve své doktorské práci „Studien zur Lehre von den kolloiden Lösungen“ (1908), nyní považované za klasiku, popsal novou metodu výroby koloidních částic a podal přesvědčivé důkazy platnosti teorií vytvořených Einsteinem a von Smoluchovským o Brownově pohybu, čímž poskytl konečný důkaz existence molekul. Spolu s četnými spolupracovníky studoval fyzikální vlastnosti koloidů, zejména jejich difuzi, absorpci světla a sedimentaci, což mu umožnilo potvrdit, že termodynamické zákony plynů lze aplikovat také na disperzní systémy.

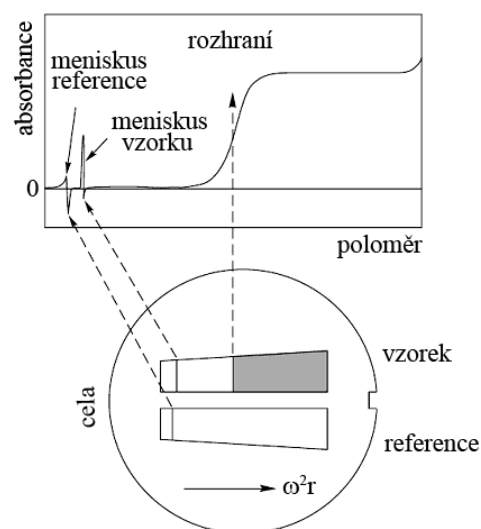
Pro studium sedimentace sestrojil analytickou ultracentrifugu, s níž sledoval sedimentaci velkých molekul (proteinů, sacharidů, polymerů) v roztoku a tato pozorování uvedl do vztahu k molekulové velikosti a tvaru sedimentujících molekul. Ukázal tak, že molekuly daného čistého proteinu mají všechny stejný tvar a že s využitím analytické ultracentrifugy lze prokázat přítomnost kontaminujících látek. Za práci na disperzních systémech mu byla roku 1926 udělena Nobelova cena za chemii. V jeho Nobelově přednášce² z 19. 5. 1927 se můžeme dočíst: „Změny koncentrací látek byly pozorovány fotografováním roztoku během jeho otáčení. Dosažená odstředivá síla byla přibližně pouze 150 × g, bylo tedy možno sledovat pouze koloidy relativně malého stupně disperze. S tímto přístrojem byly určeny velikosti částic koloidů zlata jen nad 20 μm poloměr. Příští rok (1924) Rinde a autor sestrojili centrifugu, která dosahovala tíhového pole přibližně až 7000 × g (max. rychlost kolem 12 000 ot min⁻¹). S tímto přístrojem - který jsme nazvali ultracentrifugou - bylo možné určit distribuci velikosti a velikost takových částic, které již nebylo možno pozorovat v ultramikroskopu. V letech 1925–1926, po získání prostředků z Anderssonovy lékařské výzkumné nadace a Nobelova chemického fondu, Lysholm a autor sestrojili novou ultracentrifugu, která umožňovala studium roztoků v tíhovém poli až 100 000 × g (max. rychlost kolem 42 000 ot min⁻¹).“

3. Přístroj a jeho parametry

Z pohledu základního uspořádání metody se sice od dob Theodora Svedberga nic nezměnilo - vzorek v roztoku je v centrifuzě vystaven tíhovému poli a jeho sedimentace je sledována speciálním optickým systémem - nicméně instrumentace metody přeci jen doznala významného pokroku. Vzhledem k tomu, že již přes padesát let se vývoji a výrobě analytické ultracentrifugy věnuje zejména firma Beckman Coulter, výčet technologických možností metody je omezen na popis současného typu analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-A/XL-I tohoto výrobce. Z hlediska odstředivé síly lze dosahovat tíhového pole v rozmezí přibližně 60 až 300 000 \times g (min. rychlost 1000 ot min^{-1} , max. Rychlost 60 000 ot min^{-1}). Molekulové hmotnosti částic, které tak lze pomocí analytické centrifugy studovat, se pohybují přibližně v rozsahu 100 Da až 10 GDa.

Sedimentaci biomakromolekul lze sledovat pomocí dvou nezávislých optických systémů, absorbanční (XL-A) i interferenční optiky (XL-I). Absorbanční optika sestává ze zábleskové xenonové lampy, monochromátoru (200-800 nm), pohyblivé štěrby a fotonásobiče. V klasickém uspořádání je vzorek umístěn do kyvety se dvěma sektory. Do jednoho je umístěn analyzovaný vzorek, druhý sektor obsahuje kontrolní vzorek, zpravidla pufr v němž je vzorek rozpuštěn, respektive do něhož je převeden dialýzou. Svazky světla prochází oběma sektory kyvety rovnoběžně s osou otáčení, štěrbina umístěná pod kyvetou se pohybuje v radiálním směru (kolmém na osu otáčení, rovnoběžně se směrem působení odstředivé síly), výsledkem je tedy závislost absorbance vzorku (měřené oproti kontrolnímu vzorku) na poloměru otáčení (obr. 1). Interferenční optika naproti tomu pracuje se dvěma širokými svazky laseru, které procházejí oběma sektory kyvety v celé její radiální šířce. Po průchodu kyvetou dochází k interferenci obou svazků a vzniklé interferenční proužky jsou složitým optickým systémem přeneseny až na CCD kameru, kterou jsou zaznamenány. V případě sedimentace vzorku dochází ke změnám indexu lomu světla ve vzorku oproti kontrole, což se projeví zakřivením interferenčních proužků a jejich posunem oproti referenci. Tvar a posun proužků snímány kamerou lze přímo pozorovat v reálném čase na obrazovce řídicího počítače, obraz je matematicky zpracován pomocí metod Fourierovy transformace a výsledkem je opět závislost posunu interferenčních proužků (která přímo odpovídá změnám koncentrací látek v roztoku) na poloměru otáčení.

Je třeba si uvědomit, že technická náročnost konstrukce analytické ultracentrifugy nespočívá jen v optice samotné, ale je také nutno zabezpečit synchronizaci měření obou optických systémů s pohybem rotoru a pozicemi jednotlivých kyvet a jednotlivých sektorů v nich, a to právě až do poměrně vysokých otáček. Běžně lze analyzovat 1–21 vzorků současně, dle typu rotoru a použitých kyvet - vedle standardních kyvet se dvěma sektory, využívaných především pro metodu sedimentační rychlosti, se velmi často používají také kyvety se šesti sektory, vhodné především pro metodu sedimentační rovnováhy. Absorbanční optika je



Obr. 1. Schéma kyvety se dvěma sektory a odpovídajícího sedimentačního záznamu. Roztok vzorku je umístěn do jednoho sektoru a roztok rozpouštědla (zpravidla pufru) po vzájemné rovnovážné dialýze je umístěn do druhého sektoru jako kontrola. Sektor reference se obvykle plní o něco více než sektor vzorku, aby meniskus reference nezakrýval sedimentační profil vzorku. Vzorek působením odstředivé síly sedimentuje směrem ke dnu kyvety a dojde tak k vytvoření sedimentačního rozhraní

vhodná především pro sledování sedimentace proteinů (230 či 280 nm) a nukleových kyselin (260 nm) či dalších chromofor nesoucích makromolekul, přičemž lze pracovat v koncentračním rozmezí přibližně 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ až 1 mg ml^{-1} . Interferenční optiku lze naopak s výhodou využít při studiu neabsorbujících látek, například polysacharidů, nebo koncentrovaných roztoků látek absorbujících. Spotřeba vzorku je typicky 400 μl pro sedimentační rychlost a 110 μl pro sedimentační rovnováhu, přičemž analýza je nedestruktivní a vzorek lze po jejím ukončení odebrat zpět a použít pro jiné účely. Poslední technickou inovací celého systému a současnou hranicí možností celé metody je sledování fluorescence vzorku, které je nyní možné s komerčně dostupným optickým systémem firmy AVIV Biomedical (Lakewood, USA, www.avivbiomedical.com).

4. Přehled aplikací

Při studiu chování makromolekul hledáme často odpovědi na následující otázky³:

- Je vzorek homogenní? Je čistý? Nebo je v něm přítomna více než jedna molekula?
- Pokud je vzorek složen z jedné komponenty, jaká je její molekulová hmotnost?
- Pokud je přítomno více druhů molekul, jaká je distribuce jejich molekulových hmotností?
- Můžeme získat odhad velikosti a tvaru makromolekul? Jsou kompaktní a sférické, jako globulární proteiny, anebo

protáhlé a úzké, tvaru tyčinky, jako DNA; nebo jsou rozvolněné a obsahují mnoho solventu, jako mnoho organických polymerů ve vhodném rozpouštědle?

e) Můžeme mezi makromolekulami detekovat vzájemnou interakci? Agregace povede ke změně molekulové hmotnosti - může detailní studium změn molekulové hmotnosti jako funkce koncentrací jednotlivých komponent osvětlit průběh reakce (např. reverzibilní či nevratná?), stechiometrii a sílu vazby?

f) Pokud se změní konformace makromolekul, jejich tvar bude mírně odlišný. Jsou tyto změny měřitelné?

g) Můžeme vzít v potaz neideální chování makromolekul způsobené tím, že reálné molekuly zaujímají prostor?

Odpovědi na výše uvedené otázky můžeme získat pomocí sedimentační analýzy v analytické ultracentrifuze, a to provedením dvou základních typů experimentů: sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy. Těmto experimentům a způsobům, jak nám mohou napomoci zodpovědět výše uvedené otázky se budeme dále detailně věnovat. Sedimentační rychlost a sedimentační rovnováha poskytují komplementární informace. Často je užitečné použít k vyřešení daného problému obou technik zároveň.

5. Sedimentační rychlost

Měření sedimentační rychlosti je hydrodynamická technika, která je citlivá k hmotnosti a tvaru makromolekul. V tomto experimentu se díky použití dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček začnou všechny makromolekuly stejnoměrně pohybovat směrem ke dnu kyvety (sedimentovat). Po krátké době se tak vytvoří pohybující se rozhraní (angl. termín „boundary“) mezi sedimentujícími makromolekulami a oblastí roztoku, ve které se již makromolekuly nenacházejí (obr. 2). Toto rozhraní se pohybuje konstantní rychlostí od menší směrem ke dnu kyvety a rychlost tohoto pohybu je sledována pomocí série snímků zaznamenávaných v pevném časovém intervalu. Vlivem difuze však zároveň dochází k rozmývání rozhraní, což se na snímcích projeví změnou jeho tvaru z původně ostrého, téměř svislého, do protáhlého tvaru sigmoidy. Z rychlosti pohybu a tvaru rozhraní tak lze určit sedimentační a difuzní koeficient dané makromolekuly.

Sedimentační koeficient makromolekuly s je určen jejími molekulárními parametry vyjádřenými ve slavné Svedbergově rovnici^{3,4}:

$$s = u/\omega^2 r = M(1 - \tilde{v}\rho)/N_A f = MD(1 - \tilde{v}\rho)/RT$$

kde je u pozorovaná radiální rychlost pohybu makromolekuly (sedimentace rozhraní), ω^2 úhlová rychlost rotoru, r vzdálenost od osy otáčení, $\omega^2 r$ odstředivá síla, M molekulová hmotnost, \tilde{v} parciální specifický objem molekuly, ρ hustota roztoku, N_A Avogadrova konstanta, f frikční koeficient, D difuzní koeficient a R univerzální plynová konstanta; k úpravě Svedbergovy rovnice do tvaru na pravé straně bylo použito vztahu $D = RT/N_A f$. Hodnota sedimentačního koeficientu se běžně udává v jednotkách Svedberg (S), přičemž 1 S odpovídá 10^{-13} sekundy. Hodnotu frikční-

ho koeficientu pro hladkou, kompaktní kulovitou částici můžeme určit pomocí Stokesova zákona:

$$f_0 = 6\pi\eta R_0$$

kde f_0 je frikční koeficient sférické částice, η je viskozita roztoku a R_0 je poloměr koule. Můžeme pak zkombinovat Svedbergovu a Stokesovu rovnici, v níž je poloměr koule R_0 vyjádřen jako $(3M\tilde{v}/4\pi N_A)^{1/3}$ do tvaru:

$$s_{\text{koule}} = [M(1 - \tilde{v}\rho)]/[N_A 6\pi\eta(3M\tilde{v}/4\pi N_A)^{1/3}]$$

Dosadíme-li za všechny konstanty číselné hodnoty (η pro vodu při 20°C), získáme sedimentační koeficient koule vyjádřený pouze pomocí M , \tilde{v} a ρ (v jednotkách: $M - \text{Da}$, $s - \text{S}$, $\tilde{v} - \text{ml g}^{-1}$ a $\rho - \text{g ml}^{-1}$):

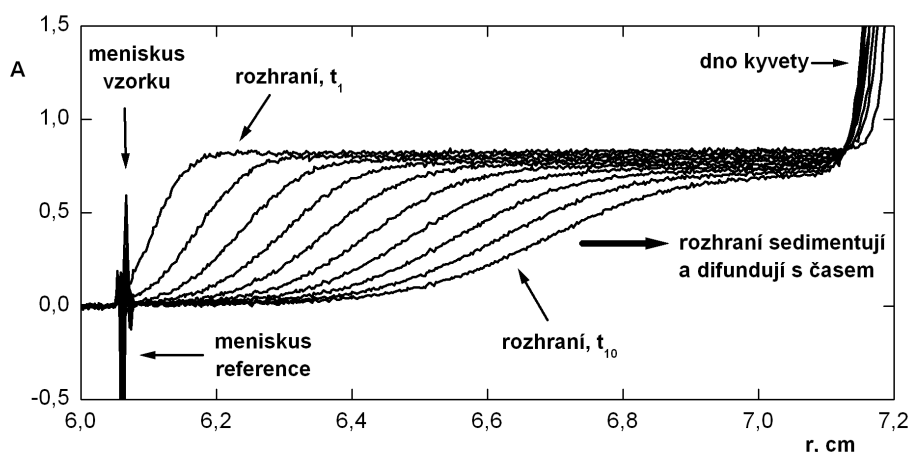
$$s_{\text{koule}} = 0,012[M^{2/3}(1 - \tilde{v}\rho)]/\tilde{v}^{1/3}$$

Pomocí této zjednodušené rovnice lze předpovídat sedimentační koeficienty pro hladké, kompaktní kulovité proteiny ve vodě při 20°C. Tato hodnota sedimentačního koeficientu je maximální možná hodnota, kterou lze získat pro protein o dané hmotnosti, protože koule má nejmenší plochu povrchu v kontaktu s rozpouštědlem a tedy protein by měl i nejmenší frikční koeficient, f_0 . Pro účely srovnání dat z různých laboratoří či různých experimentálních podmínek je třeba převést experimentálně určenou hodnotu sedimentačního koeficientu do standardního stavu vody při 20°C. Standardní rovnice korekce je vyjádřena jako:

$$s_{20,v} = s_{T,p}(\eta_{T,p}/\eta_{20,v})(1 - \tilde{v}\rho_{20,v})/(1 - \tilde{v}\rho_{T,p})$$

kde T a p označuje hodnoty odpovídající experimentální teplotě a použitému pufru, zatímco index 20,v označuje standardní podmínky. Poměr maximálního a pozorovaného sedimentačního koeficientu, $s_{\text{koule}}/s_{20,v}$, je roven poměru pozorovaného a minimálního frikčního koeficientu, f/f_0 , což udává maximální možnou odchylku od tvaru koule. Toho lze využít pro odhad velikosti a tvaru částice, jak bude ukázáno v následujícím příkladu.

Pro jednoduchost uvažujeme sedimentaci pouze jednoho druhu částic v experimentálním systému. Rychlost pohybu rozhraní jako funkce času určuje hodnotu sedimentačního koeficientu. Jakmile byla určena hodnota $s_{20,v}$, můžeme si položit následující otázku: je tato hodnota $s_{20,v}$ konzistentní s molární hmotností sekvence monomeru proteinu? Pomocí rovnice pro výpočet s_{koule} můžeme určit maximální hodnotu $s_{20,v}$ pro monomer proteinu. Pokud je experimentální hodnota $s_{20,v}$ výrazně vyšší, lze usoudit, že kvartérní struktura proteinu není monomerní, zatímco nižší hodnota by naznačovala protáhlý tvar monomeru proteinu daný větším frikčním koeficientem. Předpokládejme například, že máme protein o molární hmotnosti 50 kDa a \tilde{v} 0,73 ml g⁻¹ a provedli jsme sedimentačně rychlostní experiment ve fosfátovém pufru s chloridem sodným (PBS) a získali jsme experimentální hodnotu sedimentačního koeficientu 5,67 S. To po korekci odpovídá hodnotě $s_{20,v}$ 5,87 S. Na základě molární hmotnosti monomeru proteinu jsme vypočítali maximální hodnotu $s_{20,v}$ jako 4,93 S. Experimentální hodnota $s_{20,v}$ je zjevně mnohem vyšší než teoretická hodnota pro monomer proteinu tvaru koule, což svědčí o tvorbě větší částice. Dimer proteinu tvaru koule by měl teoretickou hodnotu $s_{20,v}$ 7,77 S. Poměr $s_{\text{koule}}/s_{20,v}$ určuje maximální asymetrii tvaru proteinu, f/f_0 , a pro výše uvede-



Obr. 2. **Měření sedimentační rychlosti.** Soubor deseti snímků byl zaznamenán analytickou ultracentrifugou ProteomeLab XL-I s použitím absorbanční optiky při 280 nm. První a poslední snímek je označen t_1 a t_{10} , časový rozdíl mezi jednotlivými křivkami činí 25 min. První křivka zaznamenaná po 25 min sedimentace již vykazuje mírné rozmýtí v důsledku difuze, které se zvětšuje během měření vzorku (40 kDa rekombinantní NK buněčný receptor rClrb, 45000 ot min⁻¹)

ný příklad dostáváme $ff_0 = 1,33$, což odpovídá tvorbě dimeru proteinu středně protáhlého tvaru. Nyní můžeme provést jednoduché hydrodynamické modelování hypotetického proteinového dimeru. Celková asymetrie tvaru ff_0 může být rozdělena do dvou příspěvků, asymetrie geometrického tvaru a hydratační expanze:

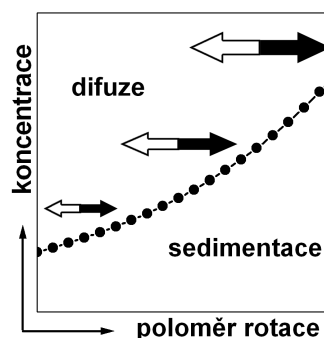
$$ff_0 = ff_{\text{var}}[(\bar{v}_2 + \delta\bar{v}_1)/\bar{v}_2]^{1/3}$$

kde δ označuje hydrataci proteinu v gramech vody na gram proteinu (obvyklá hodnota 0,3) a symboly parciálních specifických objemů 1 a 2 označují rozpouštědlo a protein. Tvar v závorkách na pravé straně rovnice odpovídá objemové asymetrii způsobené hydratací proteinu, čili hydratačnímu frikčnímu poměru ff_{hyd} . V našem případě, kdy ff_0 je 1,33, dostaneme pro $\delta = 0,3$ frikční poměry $ff_{\text{hyd}} = 1,12$ a $ff_{\text{var}} = 1,19$. Nejjednodušší hydrodynamická analýza tvaru vychází z aproximace tvaru proteinu jako protáhlého či zploštělého elipsoidu. S využitím vhodného programu lze určit ff_{var} a poměr os daného elipsoidu. Náš hypotetický dimer proteinu by byl hydrodynamicky ekvivalentní protáhlému elipsoidu o poměru os 4, s rozměry os 17,3 nm (2a) a 4,3 nm (2b). Z výše uvedeného příkladu je zřejmé, že z jednoho sedimentačně rychlostního experimentu lze získat poměrně velké množství informací. V současnosti lze navíc pomocí sedimentačně rychlostního experimentu poměrně spolehlivě studovat i rovnovážné reakce⁵.

6. Sedimentační rovnováha

Sedimentační rovnováha je termodynamická technika, která je citlivá k hmotnosti, ale ne ke tvaru makromolekul^{3,4}. V tomto experimentu je malý objem na počátku uniformního roztoku centrifugován při poněkud nižších otáčkách, než jaké by byly potřeba pro sedimentačně rychlostní experiment. Jak rozpuštěné látky začínají sedimentovat ke dnu kyvety a jejich koncentrace u dna se zvyšuje, difuze

začíná působit proti sedimentaci. Po jistém čase se tyto dva protikladné procesy dostanou do vzájemné rovnováhy a koncentrace rozpuštěných látek se exponenciálně zvyšuje směrem ke dnu kyvety (obr. 3). Po dosažení rovnováhy je distribuce koncentrace rozpuštěných látek v kyvetě nezávislá na čase a již se dále nemění. Čas potřebný k dosažení rovnováhy závisí na druhé mocnině délky sloupce roztoku ve směru působení odstředivé síly: pro délku sloupce roztoku 3 mm trvá dosažení rovnováhy 18 hodin, sloupec dlouhý 1 mm se dostane do rovnováhy za přibližně 2 hodiny. Pro 3 mm dlouhý sloupec ve standardní 12 mm vysoké (výškou je míněna optická délka kolmá ke směru odstředivé síly) dvousektorové kyvety je třeba 120 μ l roztoku vzorku, 1 mm dlouhá kyveta vyžaduje pouze 40 μ l (to odpovídá typicky 1–10 μ g proteinu, tedy množství srovnatelné s obvyklou nanáškou na gelovou elektroforézu).



Obr. 3. **Schématické znázornění procesů při sedimentační rovnováze.** Tok rozpuštěných částic v důsledku sedimentace (černá šipka) vzrůstá s poloměrem rotace. Tento proces je za rovnováhy vyrovnán tokem částic vlivem difuze (bílá šipka), která vzrůstá s gradientem koncentrace

Nejdůkladnější přístup k analýze sedimentační rovnováhy vychází z použití termodynamiky – za rovnováhy je celkový potenciál roztoku ve všech místech kyvety stejný. Z jednoduššího mechanistického úhlu pohledu za rovnováhy nepozorujeme žádný celkový tok částic v roztoku, takže tok částic způsobený difuzí a sedimentací je přesně stejný ve všech místech kyvety. Protože tok částic způsobený sedimentací je úměrný $\omega^2 r$ a r se zvyšuje směrem ke dnu kyvety, musí být u dna kyvety tendence k sedimentaci vyšší. Následně zde musí být i větší vyrovnávací tendence k difuzi v opačném směru. Protože difuze je řízena gradientem chemického potenciálu (který je závislý na koncentračním gradientu), musí se směrem ke dnu kyvety zvyšovat koncentrační gradient. Lze ukázat, že pro jedinou, ideální, neasociující částici platí³:

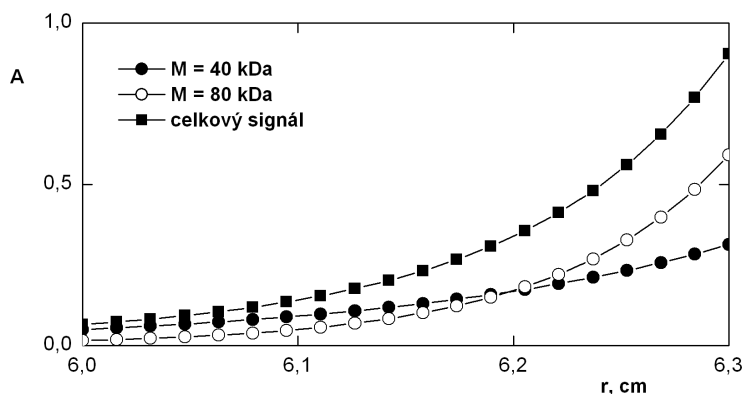
$$M = 2RT/[(1 - \bar{v}\rho)\omega^2] d(\ln c)/dr^2$$

kde M je molární hmotnost částice (v g mol^{-1}), ω je úhlová rychlost rotoru a c je koncentrace částic (v g dm^{-3}) v radiální vzdálenosti r od osy otáčení; a tedy graf závislosti $\ln c$ vs. r^2 pro jedinou, ideální částici v sedimentační rovnováze bude mít směrnici přímo úměrnou M .

Sedimentačně rovnovážný experiment je jedna z nejlepších metod určování molekulové hmotnosti makromolekul³. Je použitelný pro širokou škálu molekulových hmotností, od sacharózy ($M_r = 360$)⁶ až po viry ($M_r =$ mnoho milionů)⁷. Pro nízkomolekulární látky je potřeba dosáhnout vysokých otáček, spodní hranice měřitelné molekulové hmotnosti tak závisí na maximálním počtu otáček dosažitelného s daným rotorem, centrifugou a kyvetou. Horní limit molekulových hmotností závisí na stabilitě rotoru při nízkých otáčkách a šířce menisku. Vysoká stabilita pohonné jednotky současného modelu analytické ultracentrifugy umožňuje použít velmi nízkých otáček (minimum je 1000 ot min^{-1}) a posouvá tak horní hranici stanovitelných molekulových hmotností ještě výše.

Pomocí sedimentační rovnováhy provedené ve fyziologických pufrch můžeme určit molekulové hmotnosti stabilních nativních oligomerů proteinů či proteinových

komplexů, zatímco při použití denaturujících roztoků chaotropních činidel, například močoviny či guanidin hydrochloridu o vysoké koncentraci, lze určit molekulovou hmotnost podjednotek (za předpokladu, že známe příslušný parciální specifický objem v použitém denaturujícím rozpouštědle). Pokud je v roztoku přítomno více částic o různé molekulové hmotnosti, které spolu navzájem neinteragují (heterogenní roztok, například směs několika různých proteinů), každá z nich se dostane do rovnováhy a výsledná pozorovaná distribuce částic v roztoku za sedimentační rovnováhy je superpozicí křivek rovnovážné distribuce jednotlivých částic směsi (obr. 4). Toho lze využít například při charakterizaci čistoty, resp. homogenity proteinového preparátu – pokud se nasbíraná data nepodaří uspokojivě vyhodnotit s použitím modelu odpovídajícímu jediné očekávané částici, naznačuje to buď, že v roztoku jsou přítomny nějaké další částice o jiné molekulové hmotnosti (kontaminující proteiny či oligomerní agregáty vlastního sledovaného proteinu), nebo že sledovaný protein se za daných experimentálních podmínek nechová ideálně. Neidealita, která má původ jak v tom, že makromolekuly zabírají v roztoku nenulový prostor, tak v tom, že mezi nimi dochází kvůli jejich náboji k elektrostatickým interakcím, má tendenci snižovat pozorovanou molekulovou hmotnost oproti hmotnosti skutečné. Tyto efekty jsou ovšem potlačeny na zanedbatelnou úroveň, pokud pracujeme se zředěnými roztoky (koncentrace proteinů pod 1 mg ml^{-1}) a použitím pufrů o dostatečně vysoké iontové síle (alespoň 50 mM koncentrace NaCl nebo ekvivalentních elektrolytů, lépe však použít koncentrace $150 - 300 \text{ mM}$). Neidealita v chování makromolekul je tedy závislá na jejich koncentraci, provedeme-li sérii měření se zvyšující se koncentrací makromolekul, bude se jejich pozorovaná molekulová hmotnost se zvyšující se koncentrací snižovat. Naopak v případě heterogenity či asociačních reakcí se bude pozorovaná molekulová hmotnost s jejich koncentrací zvyšovat a toho lze využít k rozlišení těchto procesů³.



Obr. 4. Sedimentační rovnováha směsi dvou různých makromolekul. Data byla simulována pro neinteragující ideální částice o hmotnosti 40 kDa a 80 kDa při $15000 \text{ ot min}^{-1}$ a $\bar{v} = 0,73 \text{ ml g}^{-1}$ pro obě částice. Celkový měřený signál směsi je součtem překrývajících se dílčích signálů rovnováh jednotlivých komponent směsi

Skutečným vrcholem využití sedimentační rovnováhy je studium reverzibilních rovnovážných asociačních reakcí^{4,8}. Když se makromolekula účastní asociační reakce, např. $2A \rightleftharpoons A_2$, stupeň asociace se bude zvyšovat se zvyšující se koncentrací makromolekuly. U menisku bude převažovat monomer proteinu, zatímco u dna kyvety se budou ve větší míře vyskytovat oligomery. Za předpokladu, že bylo dosaženo rovnováhy, koncentrace všech komponent systému splní podmínky sedimentační rovnováhy a zároveň rovnice chemické rovnováhy, ve všech bodech kyvety. Takto lze sledovat jak rovnovážné reakce vedoucí k tvorbě oligomerů téže částice (např. monomer-dimer, monomer-tetramer, monomer-dimer-tetramer, monomer-n-mer, atp.), tak i heterogenní interakce, kdy dvě či více částic reverzibilně tvoří komplex s definovanou stechiometrií. Takové interakce odpovídají reakčním schémátům jako například $A + B \rightleftharpoons AB$; $A + 2B \rightleftharpoons AB_2$; $AB + B \rightleftharpoons AB_2$; a podobně. Pomocí sedimentační rovnováhy lze měřit a určit rovnovážné asociační konstanty reakcí řádu 10^4 až 10^8 a za příznivých podmínek i konstanty nižší či vyšší. Dále lze obvykle určit také stechiometrii reakce. To zahrnuje jednak studium jednotlivých komponent reakce A i B samostatně a dále jejich směsí v různých molárních poměrech (včetně ekvimolárního), při různých otáčkách rotoru.

Pro vyhodnocení takové sady sedimentačních dat, které se provádí globální analýzou všech jednotlivých experimentů, je výhodné, můžeme-li předpokládat, že parciální specifický objem komplexu můžeme odvodit z hmotnostních frakcí parciálních specifických objemů dílčích komponent, a dále známe-li extinkční koeficienty a výchozí koncentrace dílčích komponent. Uplatněním těchto parametrů lze zpřesnit vyhodnocení do té míry, že nám např. umožní rozlišit správný model reakce či správnou stechiometrii. Další pomoc se nabízí v případě studia reakcí, kdy dílčí komponenty mají rozdílné absorpční vlastnosti (např. komplex proteinu s DNA, dvou proteinů s různými chromofory nebo proteinu a peptidu, který obsahuje 5-hydroxytryptofan či jiný uměle zavedený chromofor)⁹. Můžeme pak sbírat data při několika různých vlnových délkách a využít tuto dodatečnou informaci pro přesnější vyhodnocení, které by jinak bylo značně obtížné (např. při vazbě peptidu na protein, protože vzniklý komplex má skoro stejnou hmotnost jako protein samotný)¹⁰.

7. Analýza sedimentačních dat

Ačkoliv pokročilá matematická teorie popisující experimenty sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy mohou být poměrně složité (a je nad rámec možností tohoto referátu se jimi detailně zabývat), existuje dnes mnoho relativně sofistikovaných a přitom uživatelsky snadno přístupných programů, které umožňují analýzu sedimentačních dat a jejich vyhodnocení i neodborným uživatelům. Jejich přehled spolu s popisem jejich aplikací lze nalézt v literatuře^{4,11}. Nicméně pro získání smysluplných výsledků a jejich správnou interpretaci je v každém

případě zapotřebí pochopení základních principů metody, popsaných v předchozím textu.

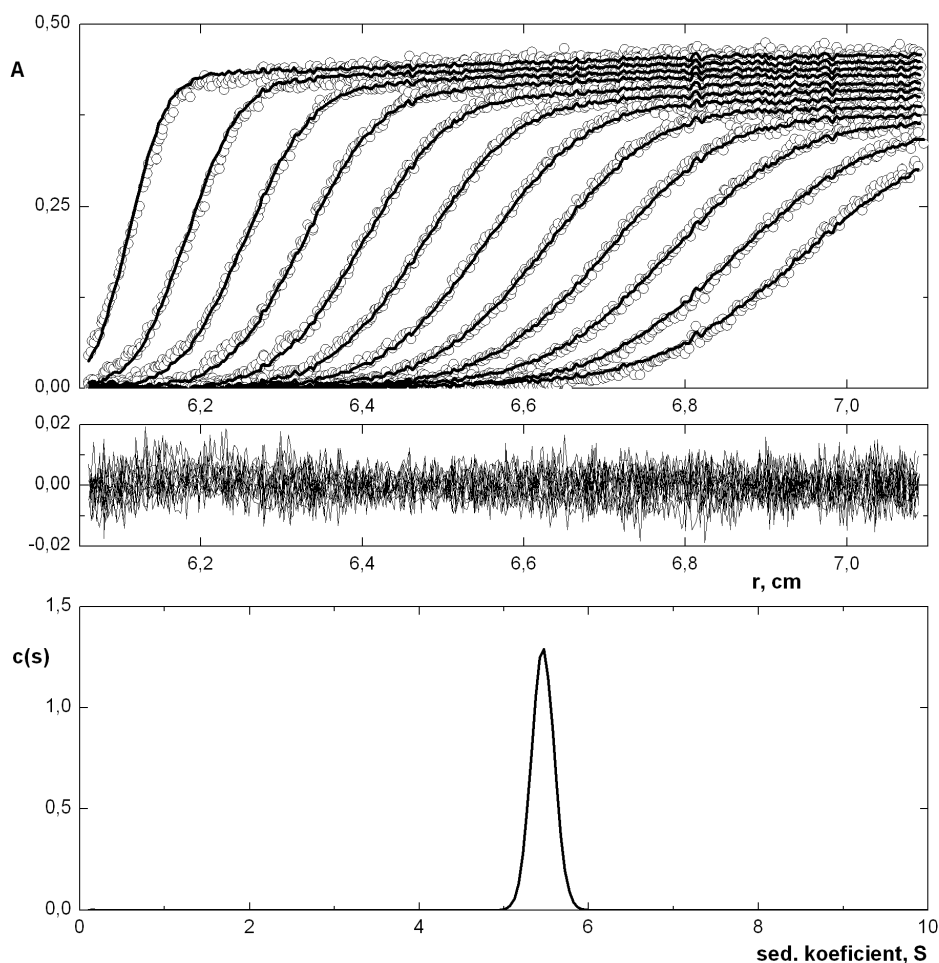
Kromě vlastních známých experimentálních proměnných, jako počet otáček rotoru a použitá teplota, je pro přesnou analýzu sedimentačních dat nezbytné znát také hustotu a viskozitu použitého pufru a parciální specifický objem analyzované makromolekuly. Obě tyto veličiny lze sice stanovit experimentálně, z praktických důvodů jsou ovšem zpravidla aproximovány. Hustotu a viskozitu lze spočítat z tabelovaných hodnot na základě znalosti složení pufru. Parciální specifický objem lze pro proteiny ve většině případů spolehlivě odvodit na základě jejich aminokyselinové sekvence (u glykoproteinů a detergenty solubilizovaných membránových proteinů navíc ze znalosti jejich složení). Obě aproximace lze získat s pomocí programu SEDNTERP¹². Tento program také v návaznosti na předchozí aproximace umožňuje převést zadanou experimentálně pozorovanou hodnotu sedimentačního koeficientu do standardního tvaru $s_{20,v}$ a z těchto dat následně odvodit velikost částice pro tři různé možné tvary: protáhlý elipsoid, zploštělý elipsoid a váleček.

Ačkoli v předchozích desetiletích byly pro analýzu dat ze sedimentačně rychlostních experimentů využívány především různá zjednodušení a aproximace, v současnosti je díky rozvoji výpočetní techniky možné vyhodnotit tyto data přímo pomocí proložení experimentálních bodů sedimentačních rozhraní funkcí vycházející z řešení Lammovy rovnice⁴. Lammova rovnice je parciální diferenciální rovnice, která popisuje transport částic v sektorech kyvety používané pro sedimentačně rychlostní experimenty¹³:

$$\partial\chi(r,t)/\partial t = 1/r \partial/\partial r [rD\partial\chi(r,t)/\partial r - s\omega^2 r^2 \partial\chi(r,t)]$$

kde je popsána evoluce distribuce koncentrace makromolekuly χ jako funkce času t a radiální pozice r za spolupůsobení sedimentace a difuze. Modelování sedimentačních dat pomocí Lammovy rovnice naplno využívá informace obsažené v celém souboru sedimentačních dat, který typicky sestává z 10^5 bodů při poměru signálu k šumu mezi 100 a 1000. Tento přístup je závislý na modelu – snažíme se experimentální data co nejlépe popsat pomocí modelů jako jediná ideální částice, rovnováha monomer-dimer, atd. a je třeba rozhodnout, který model vysvětluje získaná sedimentační data nejlépe. Přesnost určení sedimentačních koeficientů roste s počtem otáček rotoru a typicky se pohybuje mezi 0,1 % a 1 %.

Nelineární regresi metodou nejmenších čtverců lze provést řadou programů pracujících v operačním prostředí Windows, jako je Lamm¹⁴, Svedberg¹⁵ a především Sedfit¹⁶, nebo v prostředí Linux pomocí programu UltraScan¹⁷. Programy Lamm a Svedberg používají přibližná analytická řešení Lammovy rovnice, zatímco UltraScan a Sedfit využívají různá přímá číselná řešení. Výhoda druhého postupu spočívá v jeho obecnosti, kdy umožňuje určení sedimentačních koeficientů i v případě, že nedojde k vytvoření viditelného sedimentačního rozhraní, a postačuje pouze to, že dojde k redistribuci částic vlivem užitých odstředivé síly. V praxi lze Sedfit použít pro modelování širokého spektra sedimentačních procesů, od redistribu-



Obr. 5. Ukázka analýzy dat ze sedimentační rychlosti programem Sedfit. Nahoře: soubor změřených sedimentačních profilů vzorku (kroužky, pro srozumitelnost zobrazen pouze každý pátý snímek) a výsledek jejich modelování dle Lammovy rovnice (křivky). Uprostřed: zbytkový graf ukazující přesnost modelování. Dole: distribuce sedimentačního koeficientu v analyzovaném vzorku. Podrobný popis uveden v textu

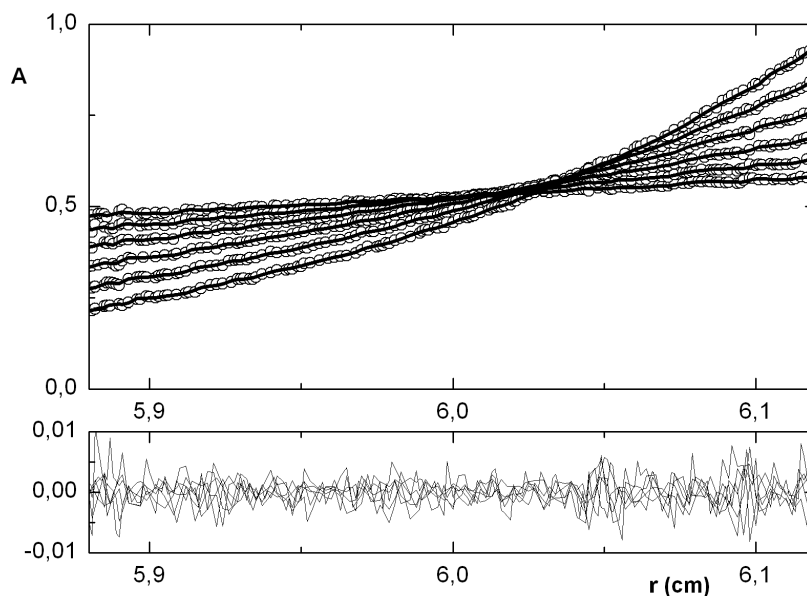
buce solí (typicky pod 0,1 S), přes sedimentaci malých molekul, proteinů a jejich komplexů, až po velké částice, jako kapsidy virů či disperzní částice (přes 1000 S). Sedfit také obsahuje celou sadu nástrojů pro potlačení systematického šumu a optických artefaktů použitých detekčních systémů (časově a radiálně neproměnný šum a kalibrace základní linie).

Asi nejjednodušším způsobem, jak analyzovat data ze sedimentačně rychlostního experimentu je použít výnos distribuce sedimentačního koeficientu, $c(s)$. Distribuce sedimentačního koeficientu je definována jako:

$$a(r,t) = \int c(s)\chi(s,D(s),r,t)ds + \varepsilon$$

kde $a(r,t)$ odkazuje na pozorovaná sedimentační data, $c(s)$ na koncentraci částic o sedimentačním koeficientu mezi s a $s + ds$ a $\chi(s,D(s),r,t)$ na řešení Lammovy rovnice. Matematické metody řešení této rovnice byly popsány¹⁶ a jsou vloženy do programu Sedfit, příklad analýzy provedené po-

mocí tohoto programu je znázorněn na obr. 5. Roztok rekombinantní rozpustné formy potkaního NK buněčného receptoru NKR-P1B s FcHis kotvou (cca 110 kDa glykosylovaný kovalentní dimer proteinu) o koncentraci 1 mg ml^{-1} byl centrifugován při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a $36\,000 \text{ ot min}^{-1}$ po dobu 5 hod a každých 5 min byl zaznamenán jeho sedimentační profil jako absorbance při 300 nm (obr. 5, nahoře, kroužky, pro srozumitelnost zobrazen pouze každý pátý snímek). S tímto souborem dat bylo poté v programu Sedfit provedeno modelování dle Lammovy rovnice s následnou nelineární regresí funkce včetně uplatnění korekcí pro vyloučení optických artefaktů (obr. 5, nahoře, křivky). Parciální specifický objem proteinu a hustota pufru byly aproximovány pomocí programu SEDNTERP. Grafická reprezentace nejvíce citlivá k správnosti modelu („goodness of fit“) je tzv. zbytkový graf (angl. termín „residual plot“). V něm jsou vyneseny rozdíly mezi hodno-



Obr. 6. Ukázka analýzy dat ze sedimentační rovnováhy programem Sedphat. Nahoře: soubor změřených sedimentačních profilů vzorku (kroužky) a výsledek jejich modelování (křivky). Dole: zbytkový graf ukazující přesnost modelování. Podrobný popis uveden v textu

tami každého z experimentálně získaných bodů a odpovídajícího bodu na křivce vypočítané podle rovnice modelu (obr. 5, uprostřed), přičemž známkou dobrého modelu je náhodné rozložení hodnot kolem nuly s amplitudou odpovídající úrovni experimentálního šumu (pro absorbanční data asi 0,01) a absence systematických odchylek u všech křivek. Systematická chyba modelu se projeví zakřivením a nenáhodným rozložením bodů v tomto grafu, což poukazuje např. na probíhající rovnovážnou reakci, asociaci, agregaci či neideální chování zkoumaného systému. Výsledkem celé analýzy je graf distribuce sedimentačního koeficientu $c(s)$, který ukazuje zastoupení částic o daném sedimentačním koeficientu v analyzovaném vzorku s intervalem spolehlivosti 95 % (obr. 5, dole), tato metoda je tak velmi citlivá k přítomnosti nečistot či agregátů v proteinovém preparátu či naopak může odhalit probíhající rovnovážnou reakci, která není zahrnuta v použitém modelu. Integrací plochy pod vrcholem distribuce dostaneme hodnotu pozorovaného sed. koeficientu, $5,46 \pm 0,12$ S, která dobře odpovídá očekávané velikosti dimeru proteinu.

V případě sedimentační rovnováhy je přímým výstupem molekulová hmotnost a u složitějších systémů i další parametry, jako např. disociační konstanta. Metody analýzy dat ze sedimentační rovnováhy jsou založené především na přímém modelování získaných dat pomocí matematické funkce odpovídající vybranému fyzickému modelu, jako jediná ideální částice, monomer – n -mer při autoasociaci nebo $A + B \rightleftharpoons AB$ při heteroasociaci a následně nelineární regrese metodou nejmenších čtverců. Zde pak ještě více než u analýzy dat ze sedimentační rychlosti záleží na rozlišení správnosti různých modelů na základě

kvalitativního posouzení zbytkového grafu i přesné statistické analýzy porovnání skutečných dat a různých modelů mezi sebou navzájem. Je třeba získat data z různých otáček rotoru při různých výchozích koncentracích a poměrech studovaných látek a obvykle je nutné provést globální modelování všech získaných dat, která mohou být doplněna i o data se sedimentační rychlostí či dalších technik, tak, aby bylo možno dospět k jednoznačnému řešení. Program Sedphat¹⁸, verze programu Sedfit pro globální modelování více experimentů současně (sedimentačních rovnováh, rychlostí i dat z dynamického rozptylu světla), obsahuje řadu matematických modelů a lze ho tak použít k analýze i poměrně složitých systémů.

Pro jednoduchý systém, jakým je roztok čistého proteinu, který sedimentuje jako ideální částice, je však analýza poměrně jednoduchá (obr. 6). Roztok lysozymu o koncentraci $0,15 \text{ mg ml}^{-1}$ byl centrifugován při 20°C postupně při 9000, 12 000, 15 000, 18 000, 21 000 a 24 000 ot min^{-1} vždy 18 hod a poté byla zaznamenána jeho rovnovážná distribuce při daném počtu otáček jako absorbance při 280 nm (obr. 6, nahoře, kroužky). S tímto souborem dat byla poté v programu Sedphat provedena globální analýza pro model jedné ideální částice s uplatněnými korekcemi pro vyloučení optických artefaktů (obr. 6, nahoře, křivky); parciální specifický objem lysozymu a hustota pufru byly aproximovány pomocí programu SEDNTERP. Kvalitu výsledného modelu analýzy lze opět posoudit ze zbytkového grafu (obr. 6, dole). Výsledkem celé analýzy je hodnota molekulové hmotnosti, která byla v tomto případě vypočtena jako $14\,163 \pm 175$ Da s intervalem spolehlivosti 95 %. Molekulová hmotnost

lysozymu je 14 305 Da, je ovšem třeba si uvědomit, že vypočtená molekulová hmotnost silně závisí na predikci parciálního specifického objemu a proto je třeba uvažovat přesnost spíše v řádu několika set Da.

8. Příklady analýz

Také jste se asi ve škole při hodině biologie podívali, jak je možné, že se ribozom prokaryot, např. bakterií, skládá ze dvou podjednotek, 30S a 50S, které dohromady tvoří celý ribozom 70S - a nikoli 80S, jak by se dalo ze součtu „velikostí“ podjednotek očekávat. U eukaryotického ribozomu je tento rozdíl dokonce ještě větší, 40S a 60S podjednotky tvoří „pouze“ 80S ribozom. Toto je asi nejznámější příklad využití analytické ultracentrifugy, se kterým se jistě potkal téměř každý student přírodních věd. Ribozom poprvé pozoroval roku 1955 rumunský buněčný biolog George E. Palade pomocí elektronového mikroskopu jako „těžké částice či granule“¹⁹ a byl to jeden z důvodů, proč mu byla spolu s Albertem Claudem a Christianem de Duvellem roku 1974 udělena Nobelova cena za fyziologii²⁰. V těchto dobách sehrála analytická ultracentrifugace důležitou roli při charakterizaci složení buňky na úrovni velikostí částic menších než jaké bylo možno přímo pozorovat pomocí tehdejších metod mikroskopie. Vlastnosti takových pozorovaných částic bylo užitečné popisovat pomocí rychlosti jejich sedimentace v tíhovém poli centrifugy, což v sobě obnášelo informaci jak o jejich hmotnosti, tak i tvaru. To je také důvod, proč dodnes popisujeme podjednotky ribozomu pomocí velikostí jejich sedimentačních koeficientů a proč se jejich velikosti nedají „sčítat“. Jen pro doplnění, struktura ribozomu je dnes díky rentgenové krystalografii známa na atomovém rozlišení a za její vyřešení byla Venkatramanu Ramakrishnanovi, Thomasu A. Steitzovi a Adě E. Yonathové roku 2009 udělena Nobelova cena za chemii²¹.

V současnosti se analytická ultracentrifugace uplatňuje především při studiu biomakromolekul a jejich komplexů na jedné straně a při rutinní kontrole kvality biofarmaceutik, především terapeutických protilátek, na straně druhé²². Při vývoji nových léčiv a před jejich komerčním uvedením na trh totiž farmaceutické firmy zpravidla musí změnit výrobní proces terapeutika z malého, laboratorního měřítka do velké průmyslové produkce (např. při přechodu z fáze II do fáze III klinických zkoušek). Přitom je třeba zajistit, že přípravek má stále tytéž identické vlastnosti, v případě monoklonálních protilátek se jedná především o kontrolu homogenity preparátu z hlediska nepřítomnosti agregátů - a právě to je ideální použití pro metodu sedimentační rychlosti, která je citlivá i vůči malému množství přítomných agregátů²³. Navíc lze pomocí analytické ultracentrifugy sledovat stav preparátu přímo v roztoku, v jakém bude prodáván v ampuli, testovat ho opakovaně po jeho skladování, a podobně. Z komerčního hlediska je to v současnosti pro analytickou ultracentrifugu patrně dominantní oblast využití. Vedle toho je farmaceutickými firmami využívána také k validaci výsledků měření jiných

metod charakterizace makromolekul, jako je gelová filtrace, metody měření velikosti částic pomocí rozptylu světla a další²⁴.

Aplikace analytické ultracentrifugace ve vědě a výzkumu jsou nespočetné a je mimo možnosti tohoto a pravděpodobně i jakéhokoli jiného referátu podat o nich kompletní obraz. Už roku 1999 konstatují Cole a Hansen ve svém výborném přehledu¹¹, že za posledních pět let přibýlo asi 500 vědeckých publikací využívajících analytickou ultracentrifugaci a že tudíž není možné takový přehled zprostředkovat. Přesto vybírají a přehledně rozebírají alespoň ty nejdůležitější. Z výčtu je patrné, že na přelomu milénia stále ještě dominovaly aproximativní přístupy k vyhodnocování sedimentačních dat, zatímco v posledních deseti letech až do současnosti už převažují přístupy přímé výpočetní analýzy dat, poněkud více využívající programů Sedfit a Sedphat. Zapátráme-li v současné literatuře, zjistíme, že analytická ultracentrifugace významně přispěla např. ke studiu oligomerizace tubulinu²⁵, která je dynamicky regulována pomocí proteinů asociovaných s mikrotubuly (heteroasociace), studovaných pomocí analytické ultracentrifugace, izotermální titrační kalorimetrie a NMR²⁶. Časté je též využití ve strukturní biologii, pro ověření toho, zda oligomerní stav molekuly pozorovaný v krystalu je také tvořen za nativních podmínek v roztoku, jako např. při studiu krystalové struktury proteinu m153 myšího cytomegaloviru, který imituje přirozené MHC-I molekuly napadené buňky a přispívá tak k úniku viru před imunitní odpovědí²⁷. Podobně i studium struktury bakteriálních Lon proteas využívá kombinace dat z analytické ultracentrifugy a elektronové mikroskopie, popisujících nativní oligomery, a z krystalových struktur jednotlivých zkrácených domén Lon proteas k rekonstrukci struktury celé molekuly²⁸. Pěkný příklad využití sedimentační rovnováhy pro studium protein-proteinových interakcí nabízí např. práce K. F. Tóthové o asociaci histonového chaperonu proteinu NAPI („Nucleosome Assembly Protein 1“) a jeho komplexech s histony²⁹. Při studiu samoasociace apolipoproteinů E3 a E4 (které jsou geneticky spojeny s Alzheimerovou chorobou a aterosklerózou) bylo využito série delečních mutantů a sedimentační rychlosti i rovnováhy k určení závislosti deagregace těchto proteinů na přítomnosti lipidů³⁰. Příklad využití fluorescenčního detekčního systému nabízí např. studium oligomerizace p53 proteinu³¹ nebo studium lipidů indukované tvorby tetrameru apolipoproteinu C-II, vedoucí k tvorbě amyloidových vláken³².

V září roku 2009 se ve švédské Uppsale konalo u příležitosti 125. výročí narození Theodora Svedberga mezinárodní symposium o analytické ultracentrifugaci a k této příležitosti bylo také vytvořeno speciální číslo časopisu *Macromolecular Bioscience*³³, v němž je možno nalézt kromě několika vzpomínkových esejů a review o historii a současných možnostech metody také vědecké články zabývající se pokroky ve vývoji programů pro analýzu sedimentačních dat a také o uplatnění metody při studiu např. postupného spojování proteinů tvořících základnu

bakteriofága T4 (molekulárního stroje zodpovědného za infekci cílové buňky)³⁴, potlačení tepelné agregace glykogenfosforylasy b vlivem chaperoninu GroEL³⁵, samoasociace proteinů vnější membrány (Omp, „outer membrane proteins“) v závislosti na snižující se koncentraci močoviny³⁶, interakci proteinu tepelného šoku 27 (Hsp27) s fosforylasou kinasou (PhK; EC 2.7.1.38) za podmínek zhuštěného roztoku (angl. termín „crowding“)³⁷, či detailní studii vlivu dsRNA na dimerizaci a aktivaci proteinkinasy R (PKR), která vede k inhibici proteosyntézy a je klíčovou složkou antivirové imunitní odpovědi³⁸. V naší laboratoři jsme využili této techniky pro objasnění nativního stavu leukocytárního antigenu CD69^{39,40} i dalších námi studovaných receptorů (obr. 2, 5 a 6).

9. Závěr

Analytická ultracentrifugace je velice užitečná technika, která umožňuje charakterizovat chování makromolekul přímo v roztoku za nativních podmínek z hlediska jejich hydrodynamických a termodynamických vlastností, a to bez nutnosti interakce s jakoukoli maticí či povrchem. Po delší odmlce během druhé poloviny dvacátého století prožívá nyní tato metoda svou renesanci, a to díky dostupnosti moderních přístrojů a zároveň dříve nemyslitelného rychlého a výkonného zpracování získaných dat pomocí počítače. Ve spojení se současnými metodami analýzy sedimentačních dat jsou experimenty prováděné v analytické ultracentrifuze schopné důkladně prověřit čistotu vzorku, charakterizovat mechanismy vzniku a zániku makromolekulárních komplexů, určit stechiometrii podjednotek, detekovat a charakterizovat změny v konformacích makromolekul a měřit rovnovážné konstanty a termodynamické parametry auto- i heteroasociujících systémů. Je to vhodná metoda pro určování molárních hmotností za nativních podmínek a jedna z klíčových metod pro studium interakcí mezi makromolekulami, jako jsou interakce protein-protein, protein-nukleová kyselina a protein-malá molekula. Zásadou podpory, kterou rozvoji této experimentální techniky věnovalo vedení chemické sekce UK PĚF v Praze je nyní tato experimentální technika ve svém moderním provedení dostupná i pro uživatele v České Republice. Případní zájemci o možnosti využití této experimentální techniky mohou získat další informace u autorů, nebo prostřednictvím webových stránek katedry biochemie UK PĚF <http://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/sluzby>.

Zakoupení a provoz analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) bylo umožněno finanční podporou chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a MŠMT ČR (projekty MSM 21620808 a IM0505).

LITERATURA

- http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1926/svedberg-bio.html, staženo 22.6.2010.
- http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1926/svedberg-lecture.html, staženo 22.6.2010.
- <http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/361847.pdf>, staženo 22.6.2010.
- Lebowitz J., Lewis M. S., Schuck P.: *Protein Sci.* 11, 2067 (2002).
- Brown P. H., Balbo A., Schuck P.: *Eur. Biophys. J.* 38, 1079 (2009).
- Van Holde K. E., Baldwin R. L.: *J. Phys. Chem.* 62, 734 (1958).
- Bancroft F. C., Freifelder D.: *J. Mol. Biol.* 54, 537 (1970).
- <http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/362784.pdf>, staženo 22.6.2010.
- Ucci J. M., Cole J. L.: *Biophys. Chem.* 108, 127 (2004).
- Balbo A., Minor K. H., Velikovskiy C. A., Mariuzza R. A., Peterson C. B., Schuck P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 81 (2005).
- Cole J. L., Hansen J. C.: *J. Biomol. Tech.* 10, 163 (1999).
- <http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>, staženo 22.6.2010.
- Lamm O.: *Ark. Mat. Astr. Fys.* 21B, 1 (1926).
- Behlke J., Ristau O.: *Biophys. Chem.* 95, 59 (2002); program dostupný z <http://www.rasmb.bbri.org/software/PC/lamm-behlke>, staženo 22.6.2010.
- Philo J. S.: *Biophys. J.* 72, 435 (1997); program dostupný z <http://www.jphilo.mailway.com/svedberg.htm>, staženo 22.6.2010.
- Schuck P.: *Biophys. J.* 78, 1606 (2000); program dostupný z <http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>, staženo 22.6.2010.
- Demeler B., Saber H., Hansen J. C.: *Biophys. J.* 72, 397 (1997); program dostupný z <http://www.ultrascan.uthscsa.edu>, staženo 22.6.2010.
- Schuck P.: *Anal. Biochem.* 320, 104 (2003); program dostupný z <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/default.htm>, staženo 22.6.2010.
- Palade G. E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 59 (1958).
- http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1974, staženo 22.6.2010.
- http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009, staženo 22.6.2010.
- Berkowitz S. A.: *AAPS J.* 8, 590 (2006).
- Brown P. H., Balbo A., Schuck P.: *AAPS J.* 10, 481 (2008).
- Philo J. S.: *Curr. Pharm. Biotech.* 10, 359 (2009).
- Correia J. J.: *Methods Cell Biol.* 95, 275 (2010).
- Devred F., Barbier P., Lafitte D., Landrieu I., Lippens G., Peyrot V.: *Methods Cell Biol.* 95, 449 (2010).
- Mans J., Natarajan K., Balbo A., Schuck P., Eikel D., Hess S., Robinson H., Simic H., Jonjic S., Tiemessen

- C. T., Margulies D. H.: *J. Biol. Chem.* 282, 35247 (2007).
28. Duman R., Löwe J.: *J. Mol. Biol.* (2010), doi: 10.1016/j.jmb.2010.06.030.
 29. Tóth K. F., Mazurkiewicz J., Rippe K.: *J. Biol. Chem.* 280, 15690 (2005).
 30. Chou C. Y., Jen W. P., Hsieh Y. H., Shiao M. S., Chang G. G.: *J. Biol. Chem.* 281, 13333 (2006).
 31. Brandt T., Petrovich M., Joerger A. C., Veprintsev D. B.: *BMC Genomics* 10, 628 (2009).
 32. Ryan T. M., Howlett G. J., Bailey M. F.: *J. Biol. Chem.* 283, 35118 (2008).
 33. Cölfen H.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.201000201.
 34. Yap M. L., Mio K., Ali S., Minton A., Kanamaru S., Arisaka F.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.201000042.
 35. Eronina T. B., Chebotareva N. A., Bazhina S. G., Kleymenov S. Y., Naletova I. N., Muronetz V. I., Kurganov B. I.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.200900396.
 36. Tan A. E., Burgess N. K., Deandrade D. S., Marold J. D., Fleming K. G.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.200900479.
 37. Chebotareva N. A., Makeeva V. F., Bazhina S. G., Eronina T. B., Gusev N. B., Kurganov B. I.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.200900397.
 38. Cole J. L.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.201000069.
 39. Vaněk O., Nálezková M., Kavan D., Borovičková I., Pompach P., Novák P., Vinay K., Vannucci L., Hudeček J., Hofbauerová K., Kopecký V. Jr., Brynda J., Kolenko P., Dohnálek J., Kadeřávek P., Chmelík J., Gorčík L., Žídek L., Sklenář V., Bezouška K.: *FEBS J.* 275, 5589 (2008).
 40. Kavan D., Kubičková M., Bílý J., Vaněk O., Hofbauerová K., Mrázek H., Rozbeský D., Bojarová P., Křen V., Žídek L., Sklenář V., Bezouška K.: *Biochemistry* 49, 4060 (2010).

O. Vaněk^a and K. Bezouška^{a,b} (^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, ^b Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic, Prague, Czech Republic): **Analytical Ultracentrifuge and its Utilization in Biochemical Laboratory**

Sedimentation analysis of macromolecules carried out with analytical ultracentrifuge is a powerful method for the study of proteins, nucleic acids and other polymers and their various complexes. Monitoring sedimentation of macromolecules in the centrifugal field allows their hydrodynamic and thermodynamic characterization in solution, i.e. in native conditions, without interactions with any matrix or surface. This allows direct measurement of molecular weight and sedimentation coefficient of macromolecules, monitoring of sample purity and homogeneity, prediction of size and shape of sedimenting species and, last but not least, study of equilibrium reactions, including determination of their stoichiometry and equilibrium constants. In the present review, we first focused on the history of the technique and properties and potentials of a modern instrument. Two types of experiments performed using analytical ultracentrifuge, sedimentation velocity and equilibrium, are discussed, together with a brief introduction into sedimentation theory. In the end, sedimentation data analysis is discussed and some examples of utilization of analytical ultracentrifugation are provided. Combination of new instrumentation and computational software for data analysis has led to major advances in characterization of proteins and their complexes. After temporary silence in the past decades, analytical ultracentrifugation at presence experiences renaissance in proteomic research.