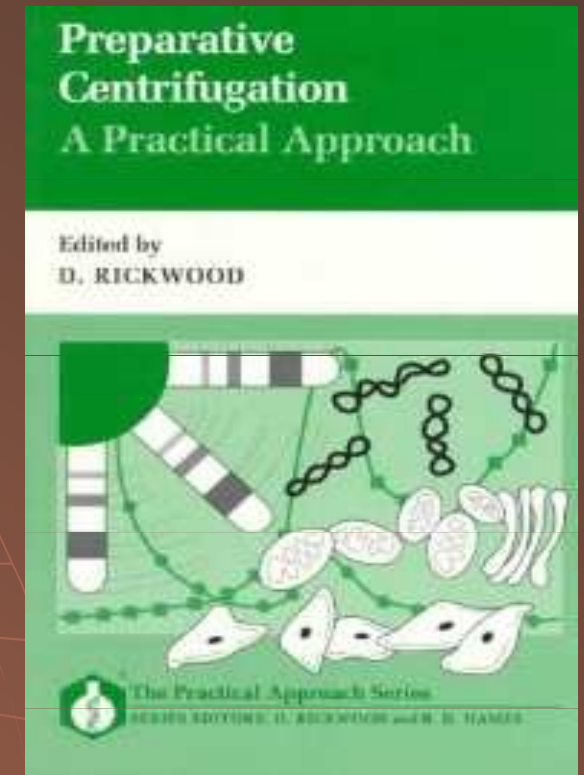
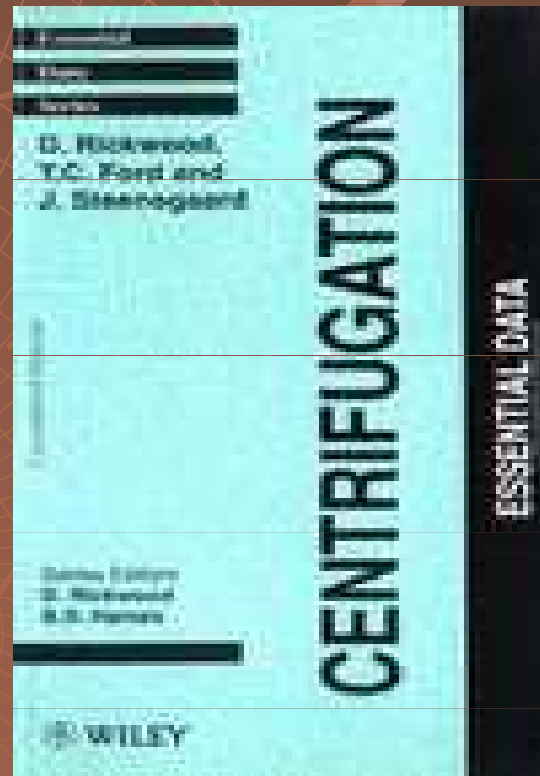
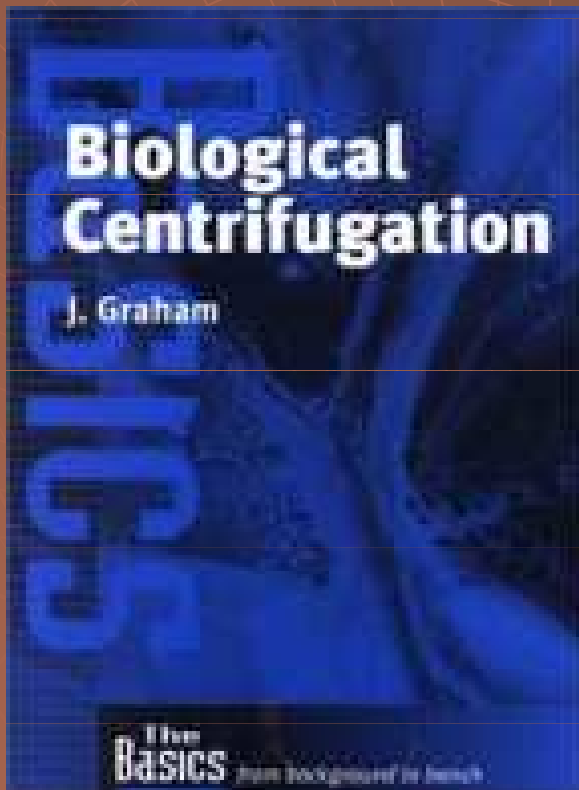


Centrifugace



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Literatura



Centrifugace

Důvodem použití centrifug je nutnost urychlit sedimentaci pevných částic v kapalném prostředí.

Na sedimentaci má vliv

1. vlastnost látky: velikost, tvar, hustota

2. vlastnost prostředí (rozpuštědla):
hustota, viskozita

Centrifugace

20. léta 20. století - **Svedberg** - počátky laboratorních centrifug a analytické centrifugace; teoretické základy metody

50. léta - Brakke - centrifugace v gradientu hustoty

Současnost - znovuzobjevení analytické ultracentrifugace

Theodor Svedberg (1884-1971)



Nobelova cena za chemii 1926

pojmenována po něm
Svedbergova jednotka pro vyjádření
sedimentačního koeficientu

Centrifugace

- ◆ Odstranění hrubých částic z roztoku
Sediment (pelet) – supernatant
- ◆ Izolace organel nebo biomakromolekul
- ◆ Stanovení základních parametrů –
MW, hustota, sedimentační koeficient

Použití

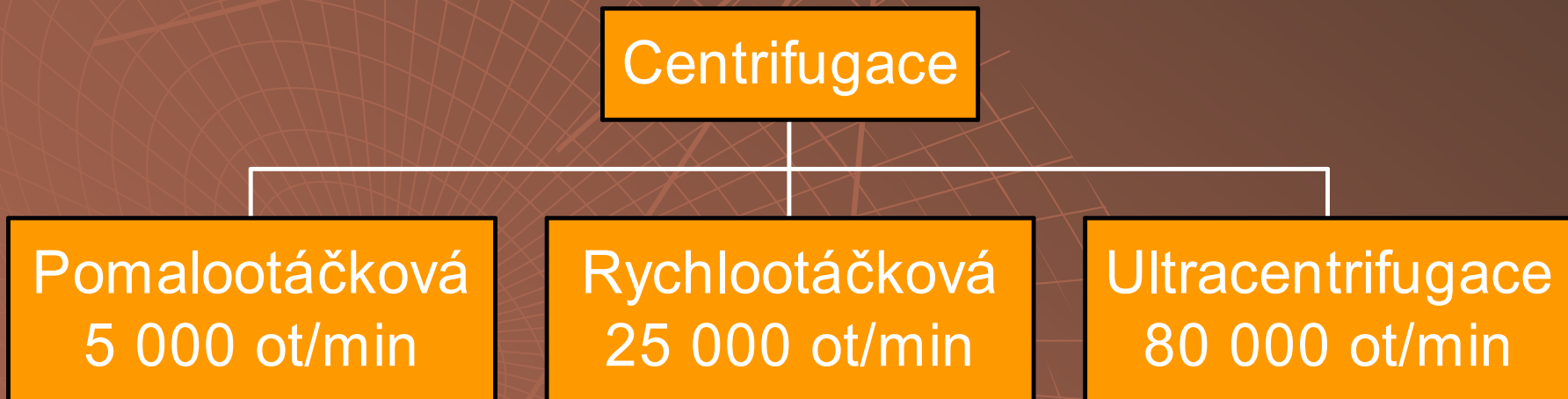
Centrifugace

A hand with the index finger pointing towards the word 'Centrifugace' in the diagram.

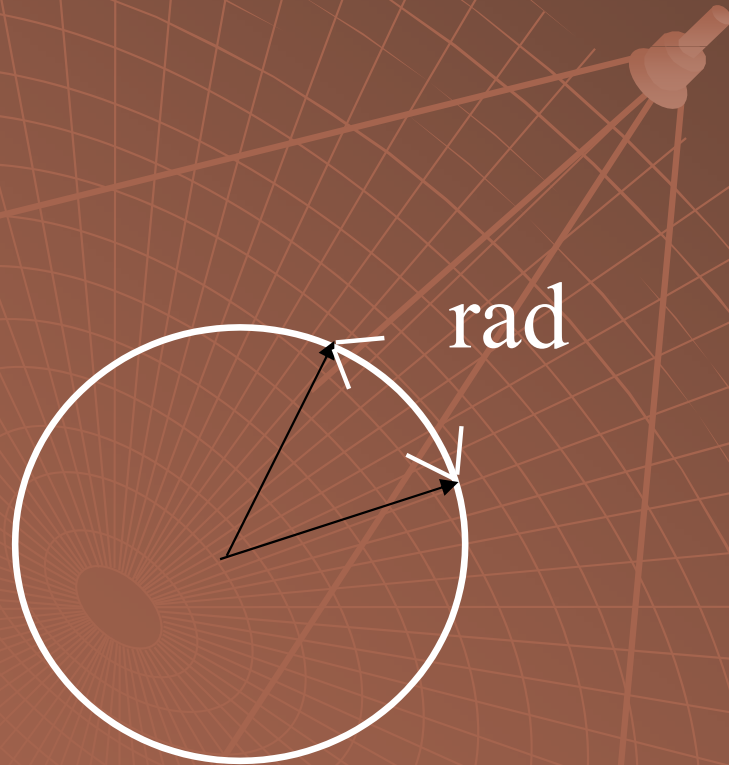
Preparativní

Analytická

Rozdělení centrifug



Otáčky → g



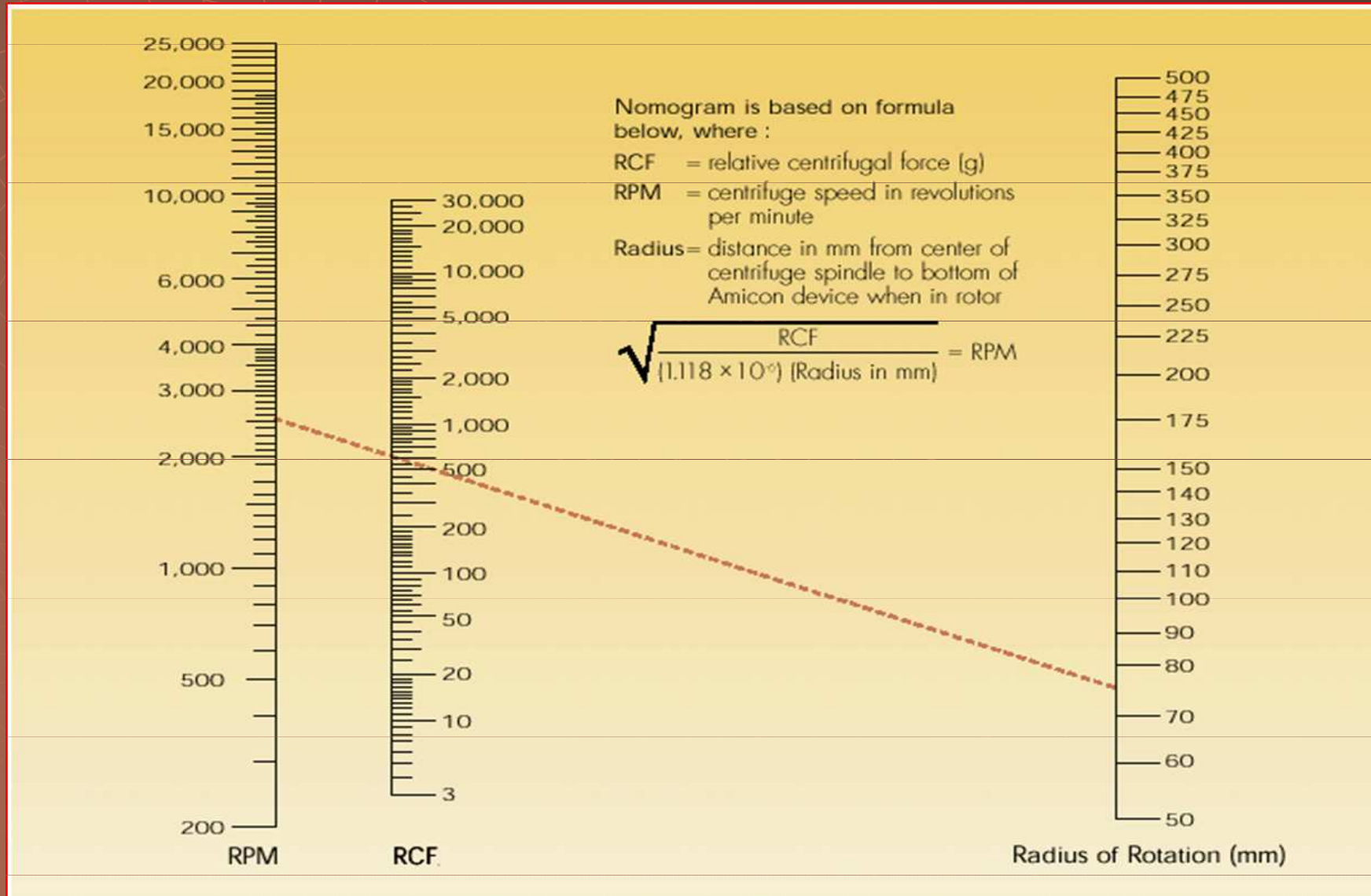
$$g = \omega^2 \cdot r$$

ω - uhlová rychlost
(rad/s)

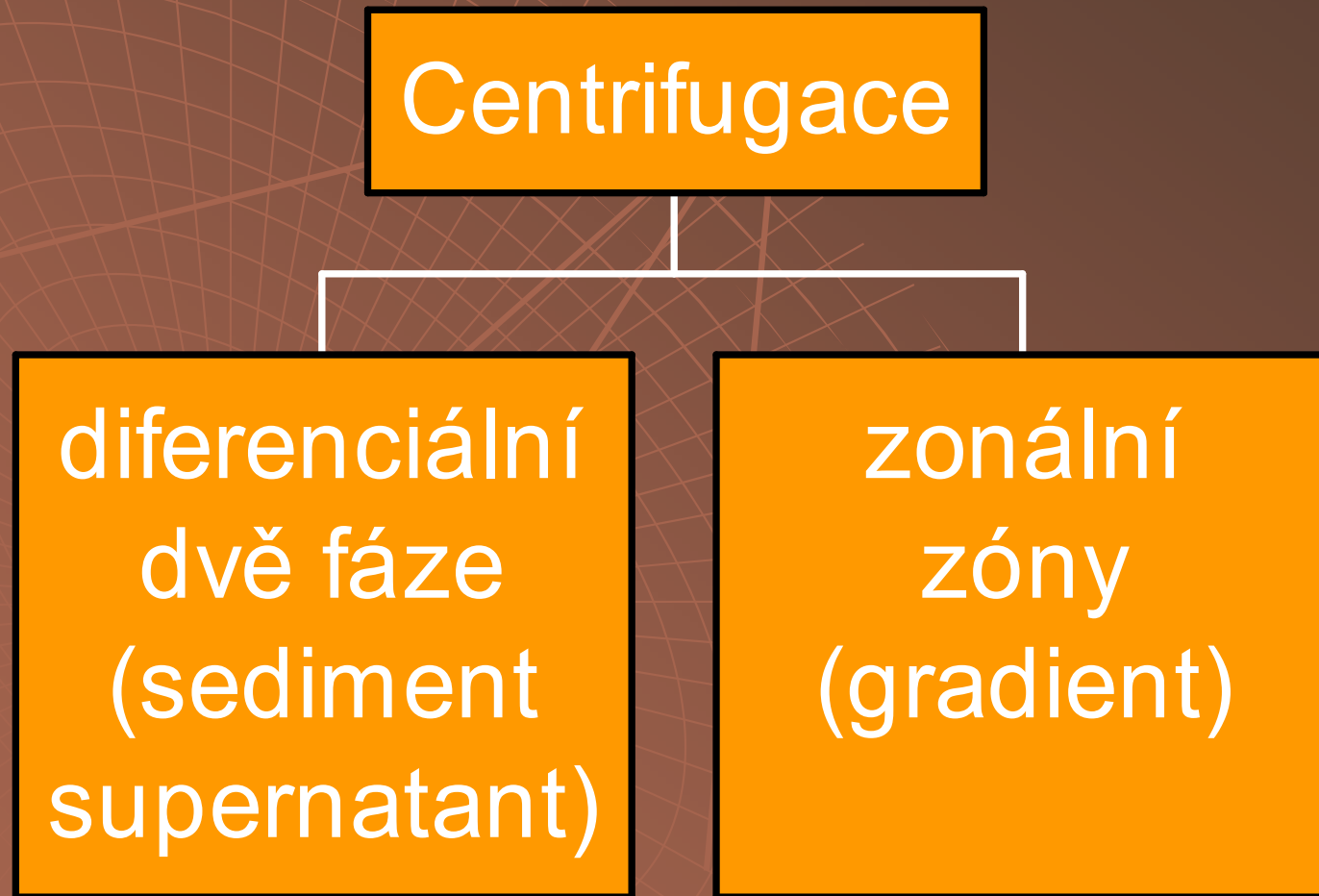
$$\omega = 2\pi \cdot f$$

f – otáčky/min

Otáčky → g



Preparativní centrifugace



Metody nanášení vzorku

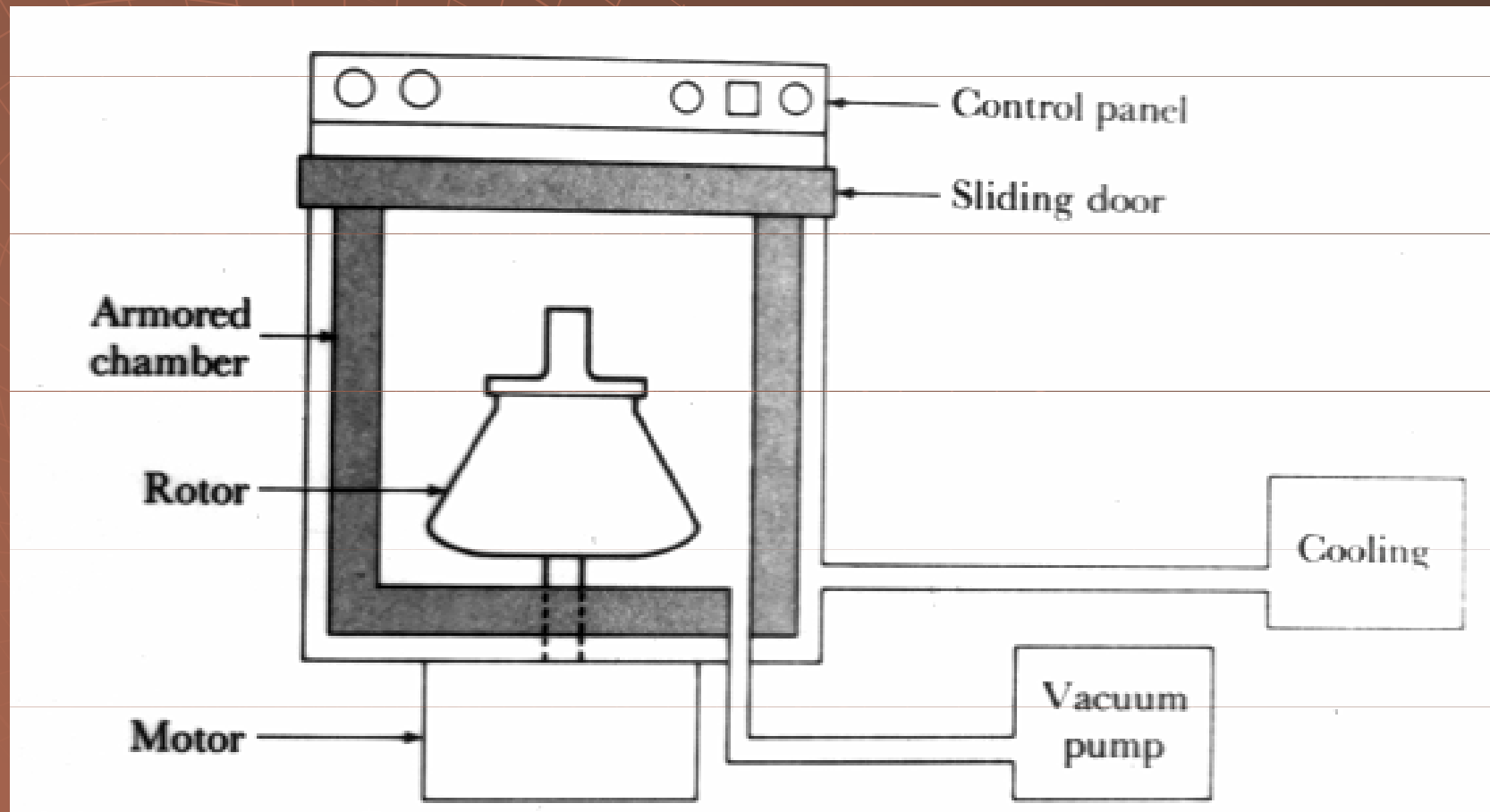
```
graph TD; A[Metoda] --> B["frontální vzorek v celé kyvetě"]; A --> C["zonální vzorek - úzká zóna"]
```

Metoda

frontální
vzorek v celé kyvetě

zonální
vzorek - úzká zóna

Preparativní centrifuga



Preparativní centrifuga



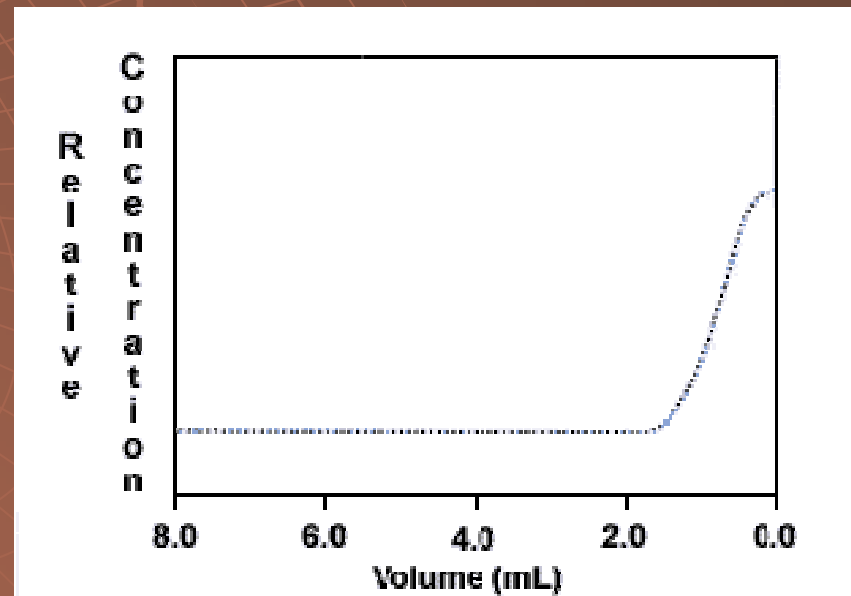
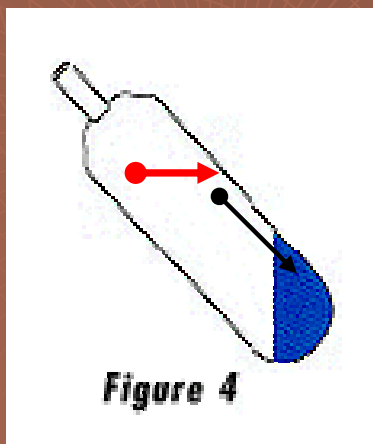
Preparativní ultracentrifuga



Rotory

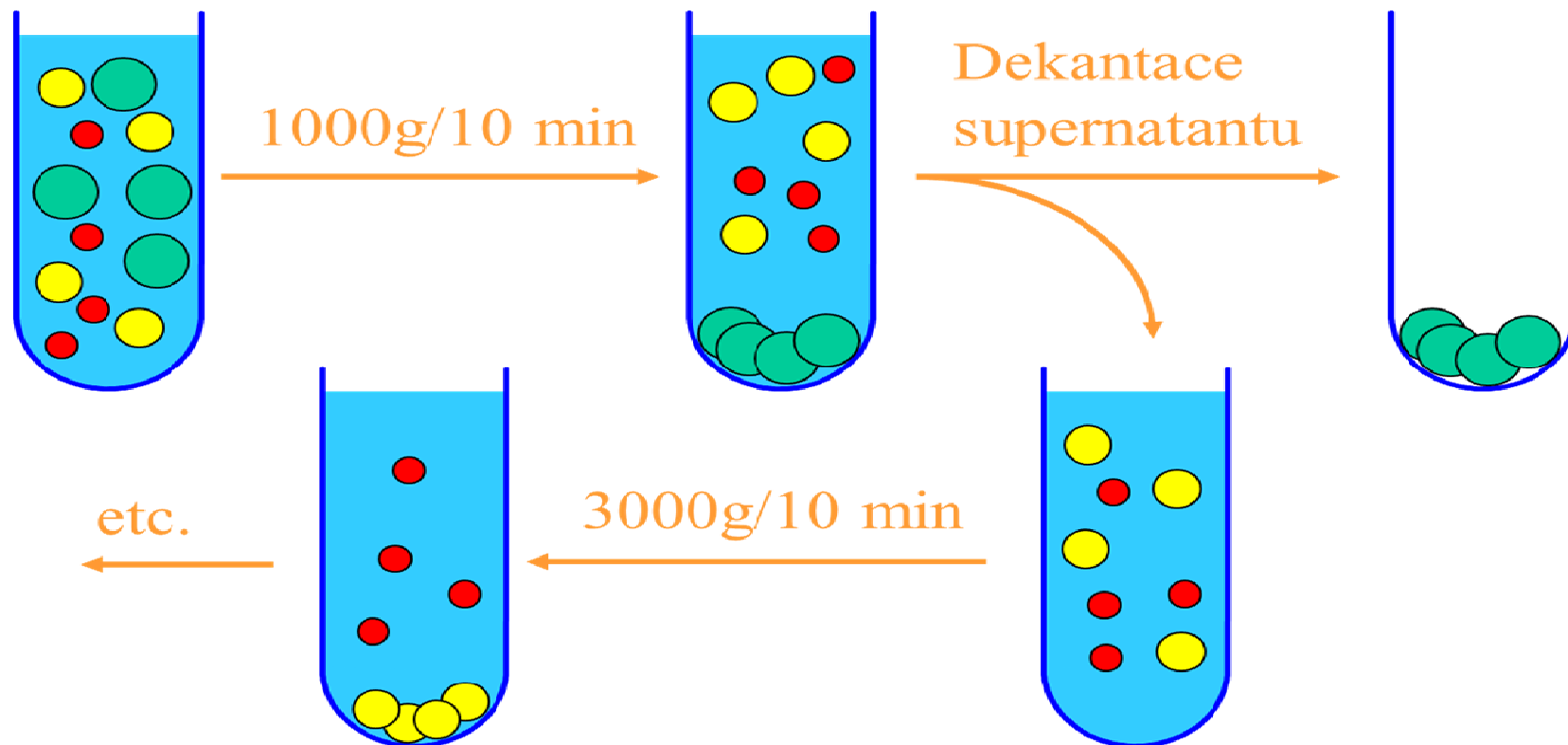
- ◆ Úhlový – diferenciální centrifugace
- ◆ Výkyvné – zonální centrifugace
- ◆ Zonální – bez kyvet, vzorek je uvnitř rotoru

Úhlový rotor

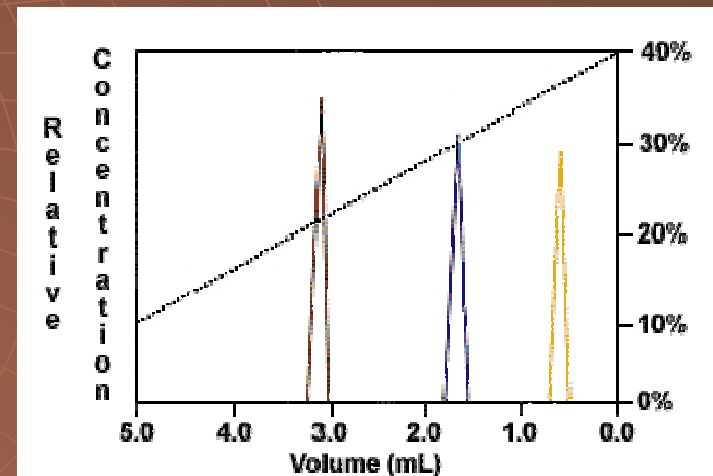
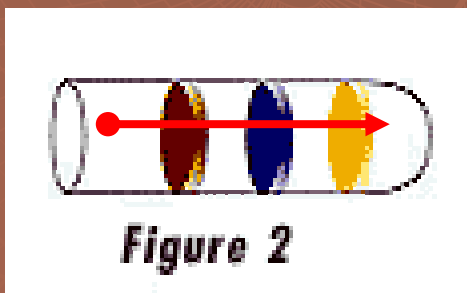


Diferenciální centrifugace

- ♦ opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček = gravitací

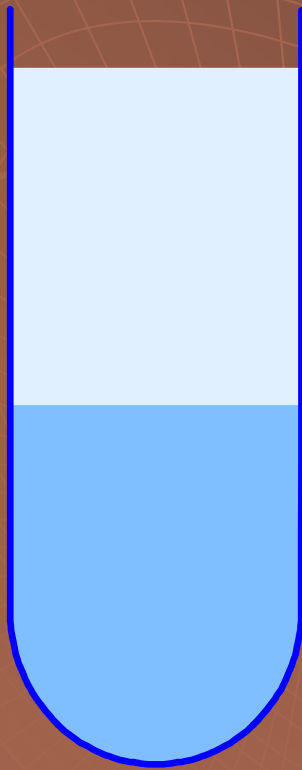


Výkyvný rotor

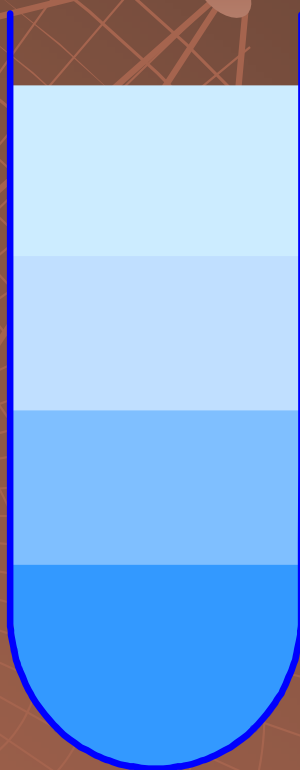


Gradientová centrifugace

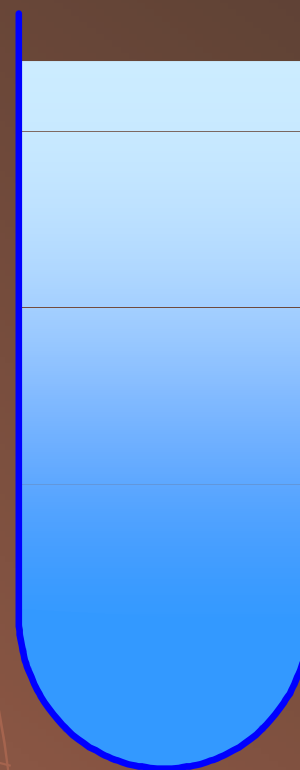
Hustotní bariera



Diskontinuální

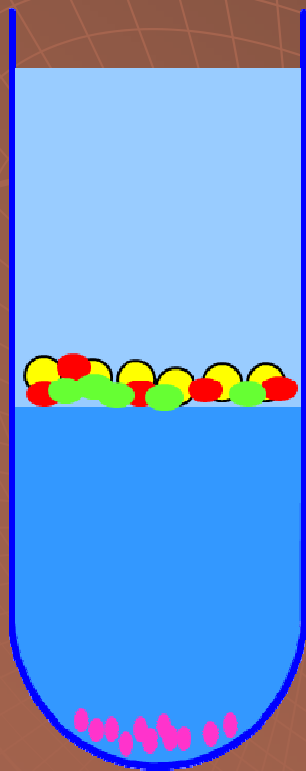


Kontinuální

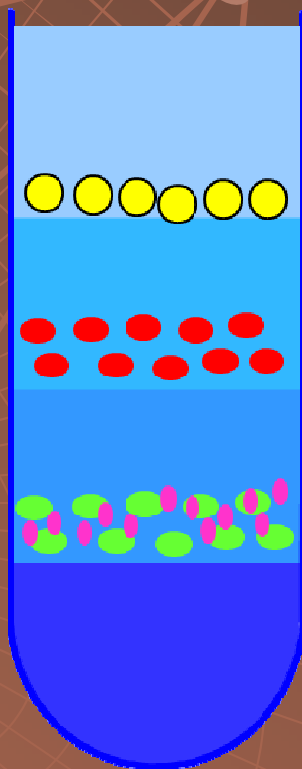


Gradientová centrifugace

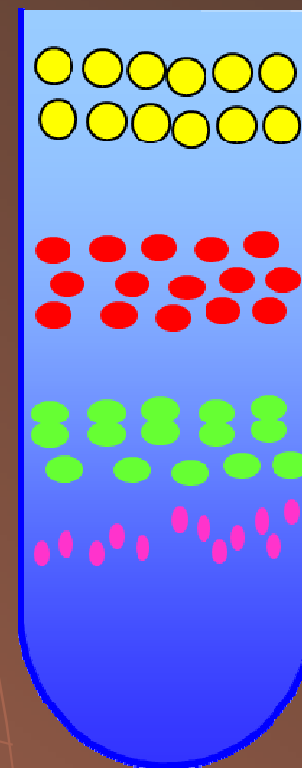
Hustotní bariera



Diskontinuální



Kontinuální



Gradientová centrifugace média

Kriteria pro výběr centrifugačního media:

- ◆ musí v roztoku tvořit gradient
- ◆ nesmí interferovat se vzorkem
- ◆ musí být lehce odstranitelné ze vzorku

Gradientová centrifugace média

- ◆ Sacharosa

- ◆ Glycerol

Hypertonické prostředí

- ◆ Ficoll - dextran

- ◆ Percoll – SiO₂

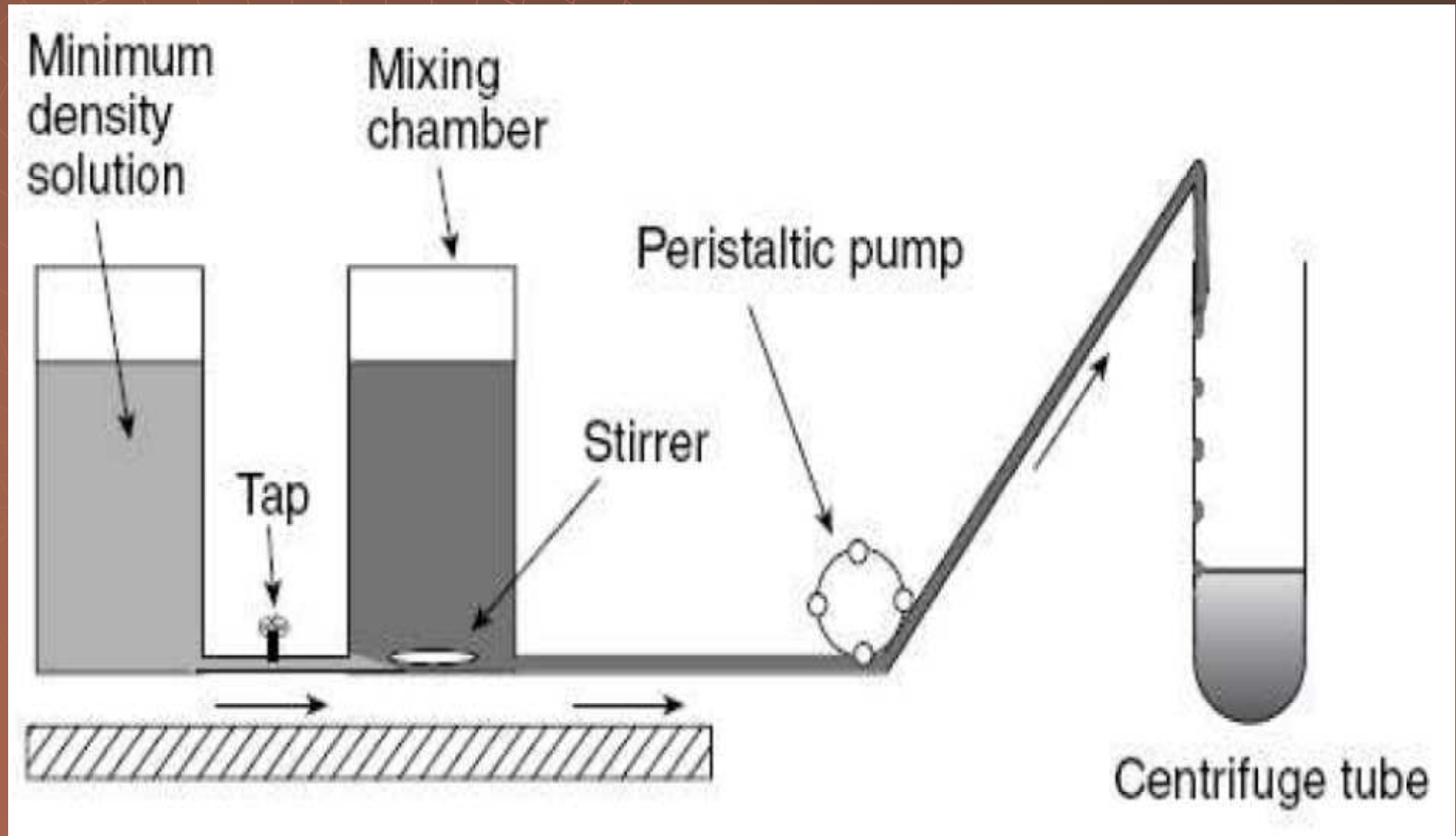
Nutno připravit gradient

- ◆ CsCl

- ◆ Cs₂SO₄

Gradient vzniká během centrifugace

Gradientová centrifugace



Gradientová centrifugace

```
graph TD; A[Metoda] --> B[Izopyktnická]; A --> C[Nerovnovážná];
```

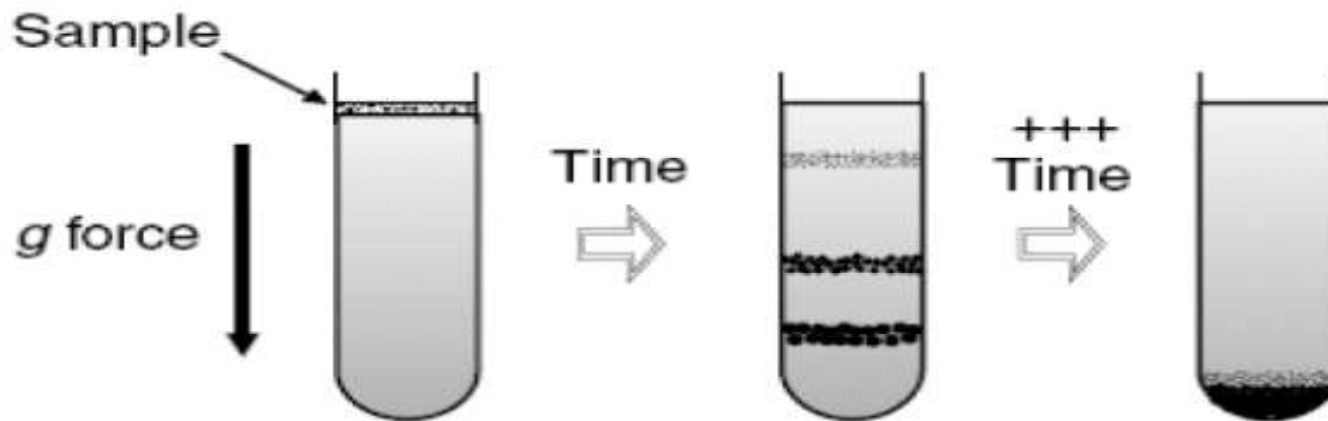
Metoda

Izopyktnická

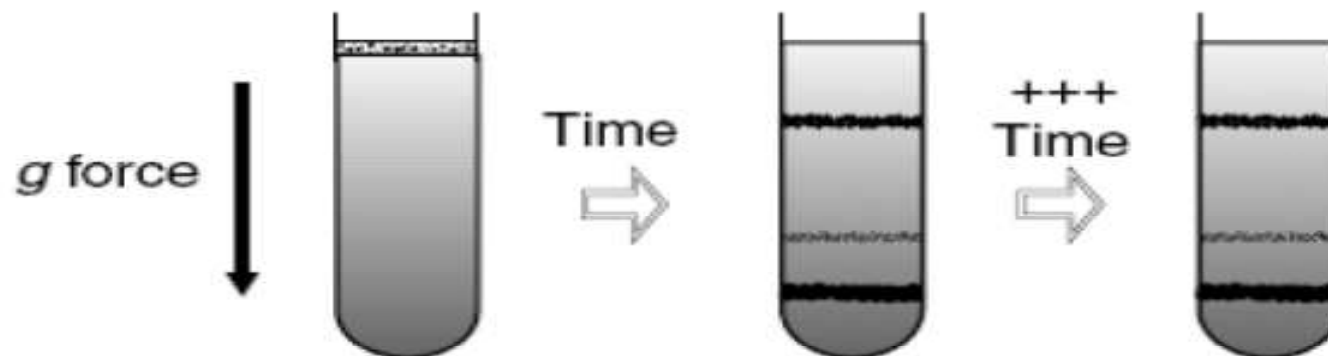
Nerovnovážná

Gradientová centrifugace

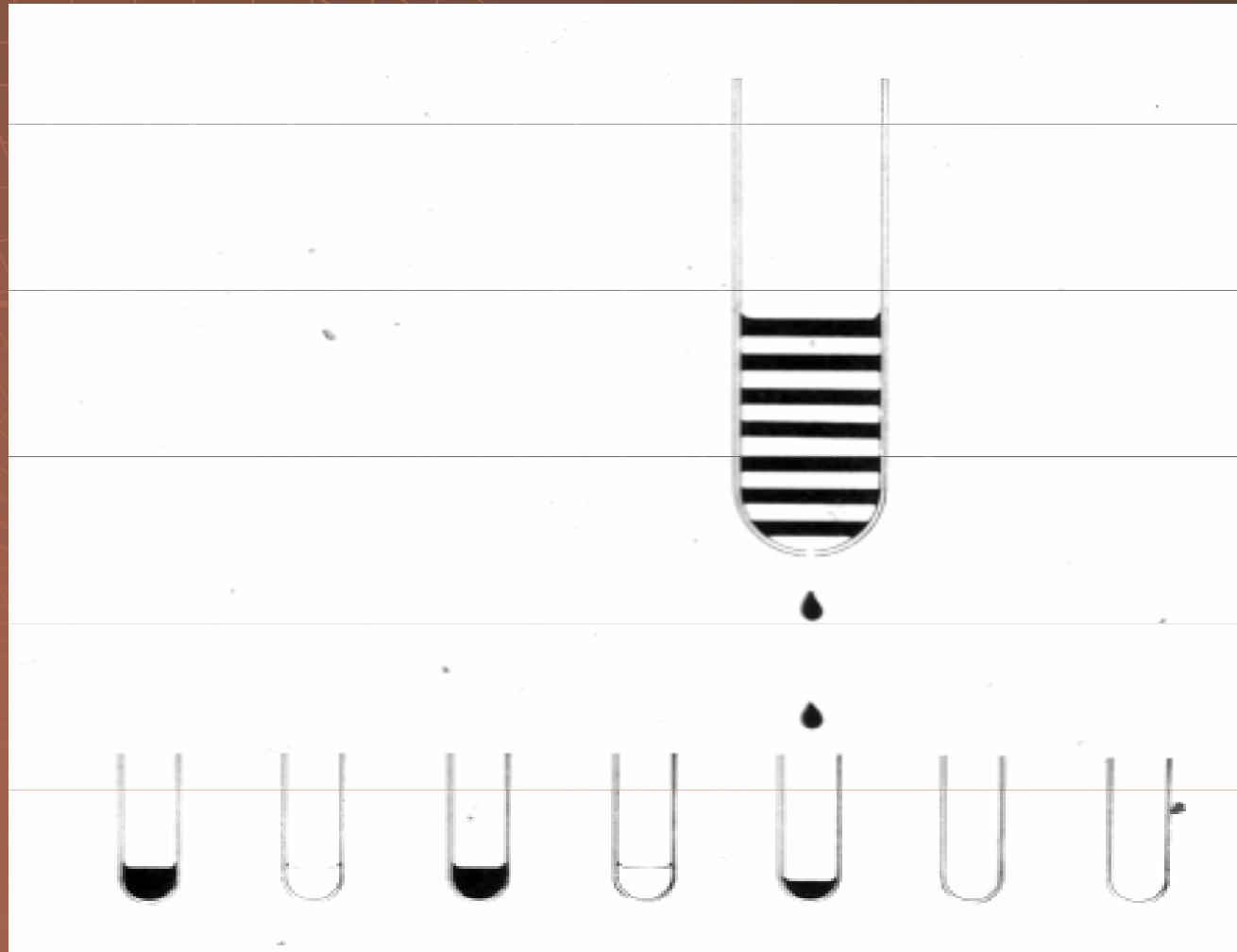
Rate-zonal centrifugation



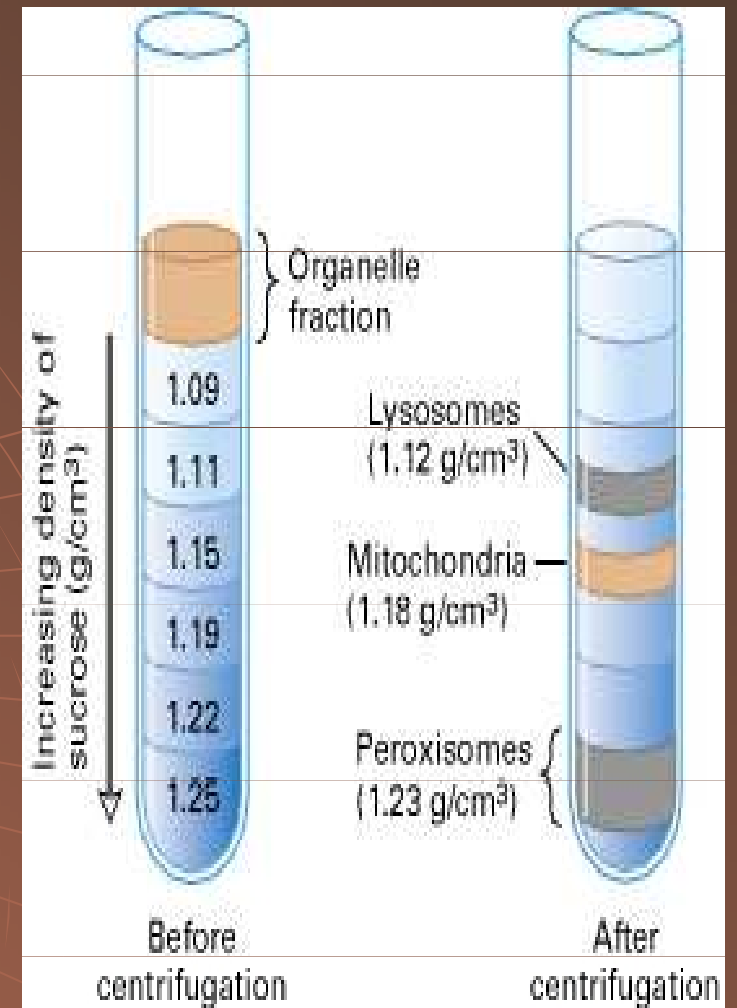
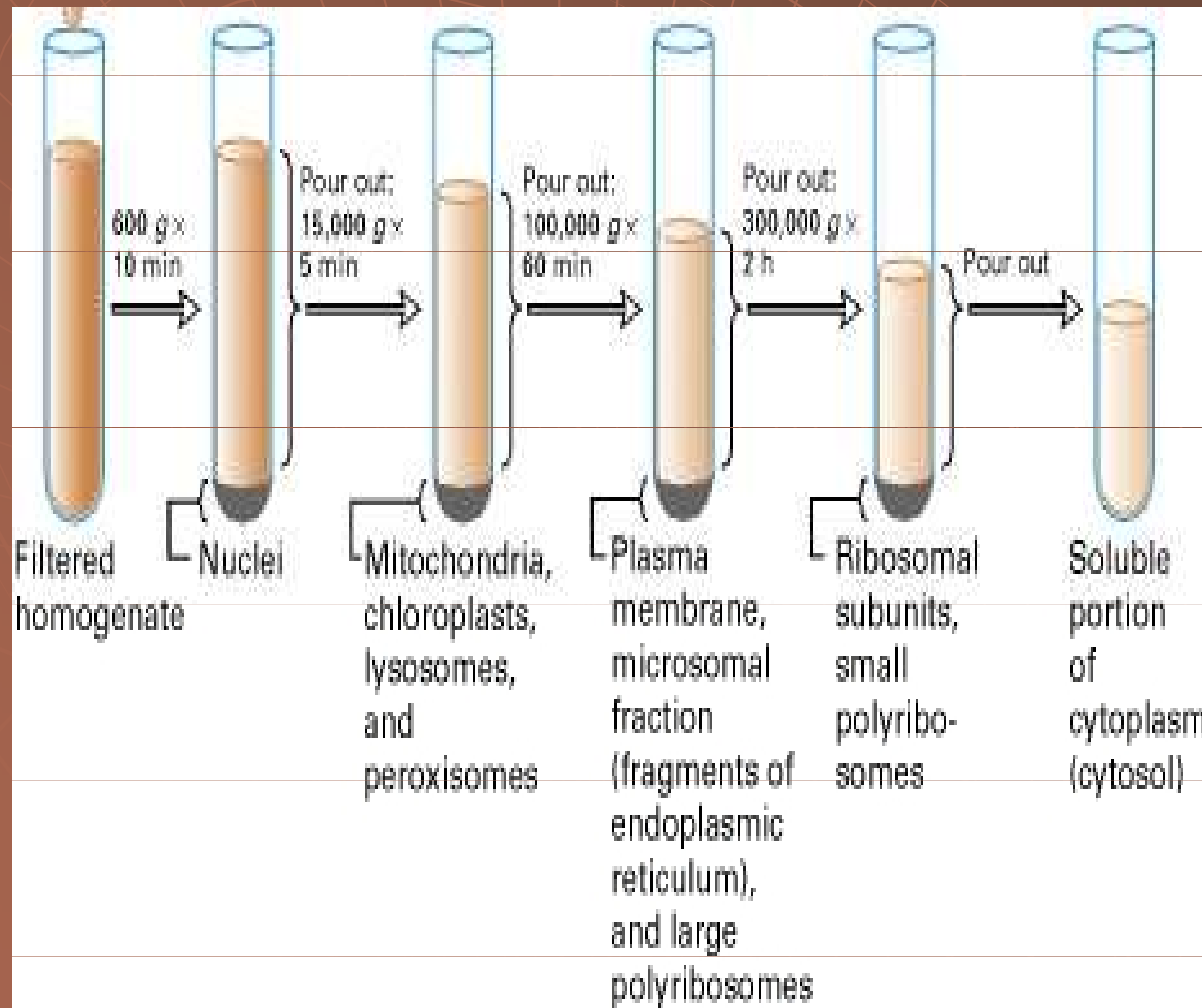
Isopycnic centrifugation



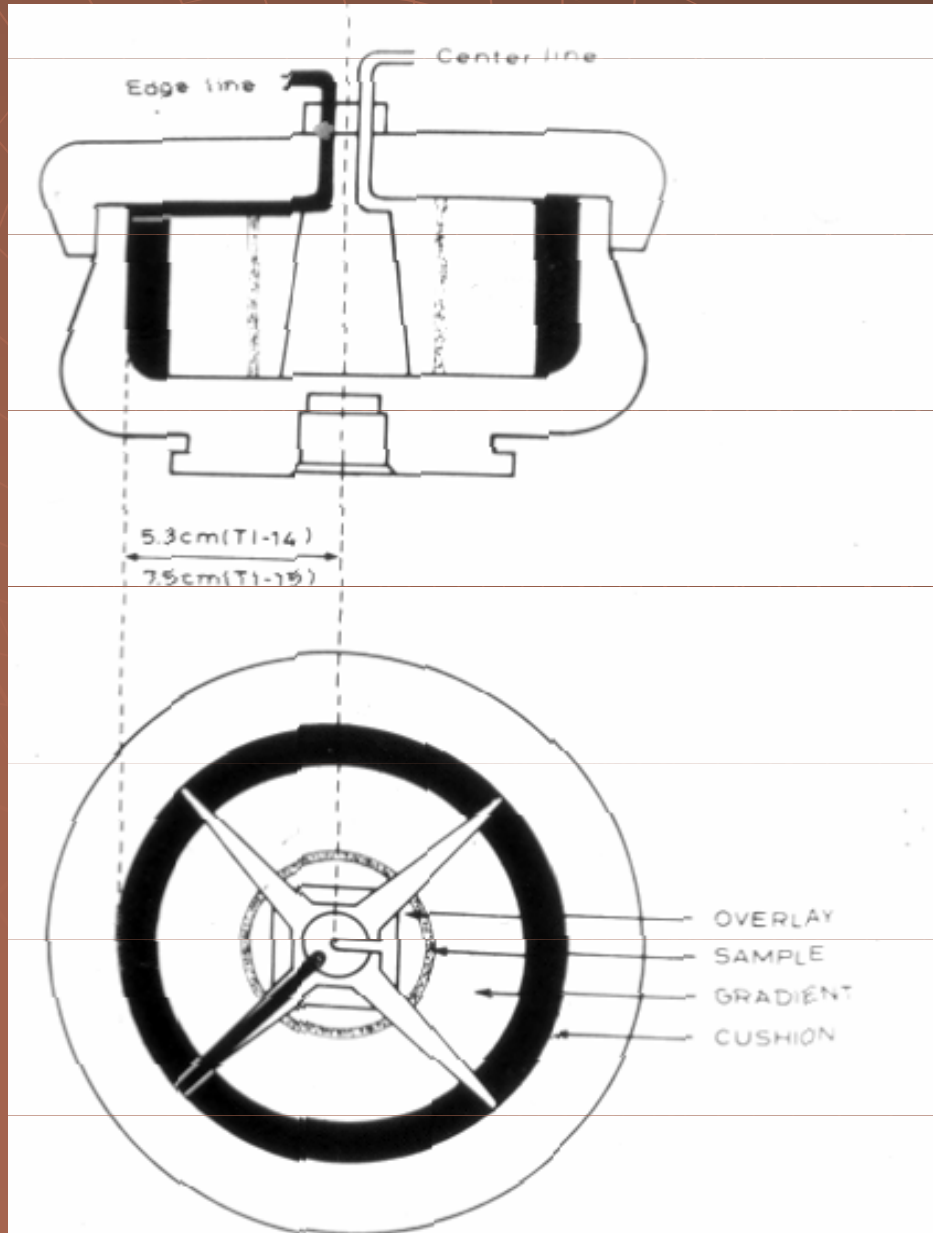
Gradientová centrifugace



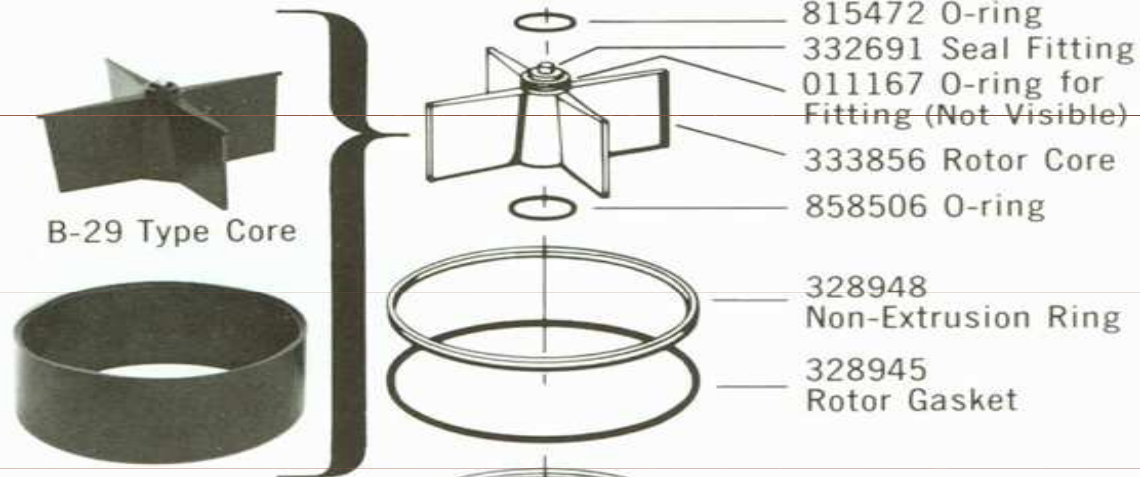
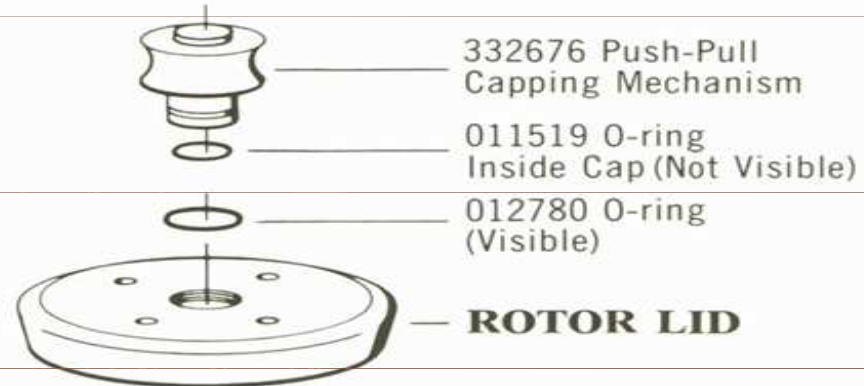
Diferenciální versus gradientová centrifugace



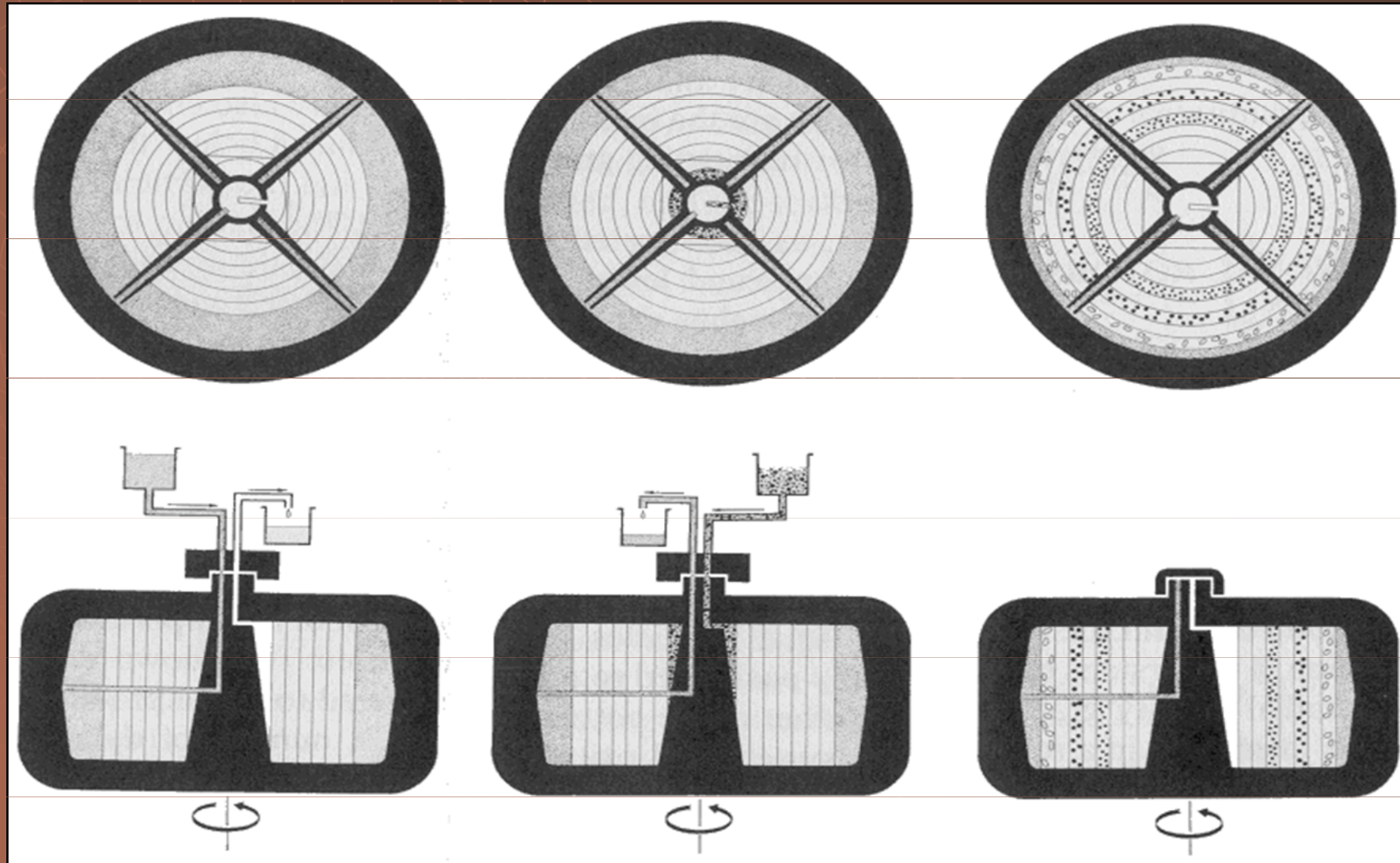
Zonální rotor



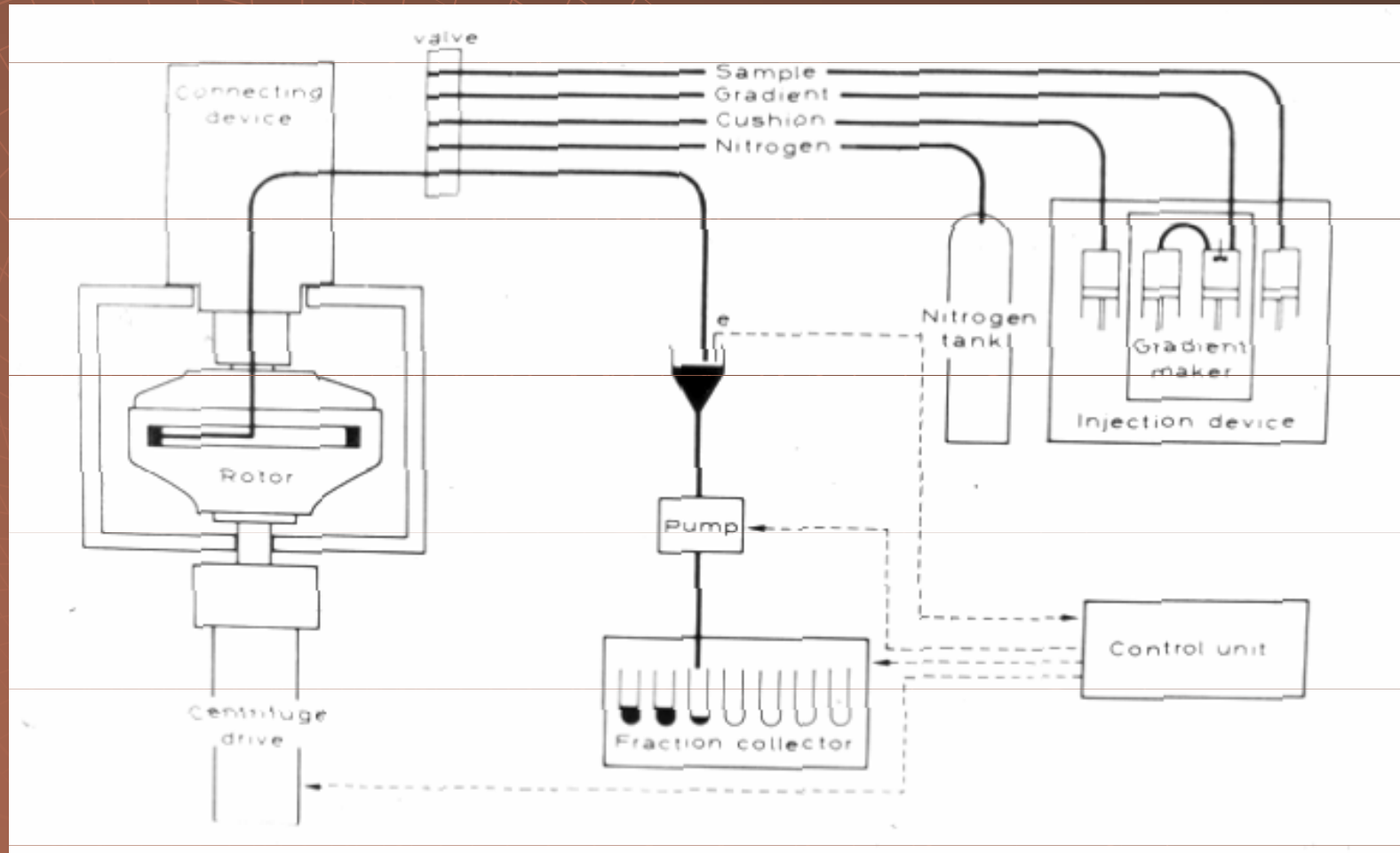
Zonální rotor



Centrifugace se zonálním rotorem

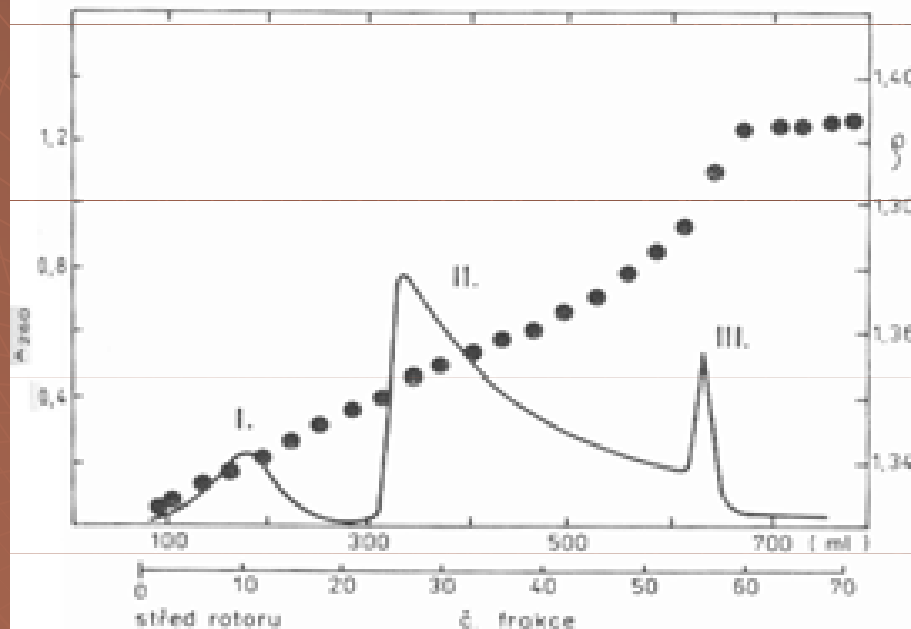


Centrifugace se zonálním rotorem



Centrifugace se zonálním rotorem

Čištění transformační DNA z *b.subtilis* centrifugací v zonálním rotoru



27 mg surové DNA/15 ml

Gradient sacharosy 5-30%

Citrátový pufr pH 7,0

Cushion – 50 ml 42% sach.

Overlay – 100 ml pufru

Plnění - 2 000 ot/min

Dělení – 40 000 ot/min 7 hod

Jímané frakce 10 ml

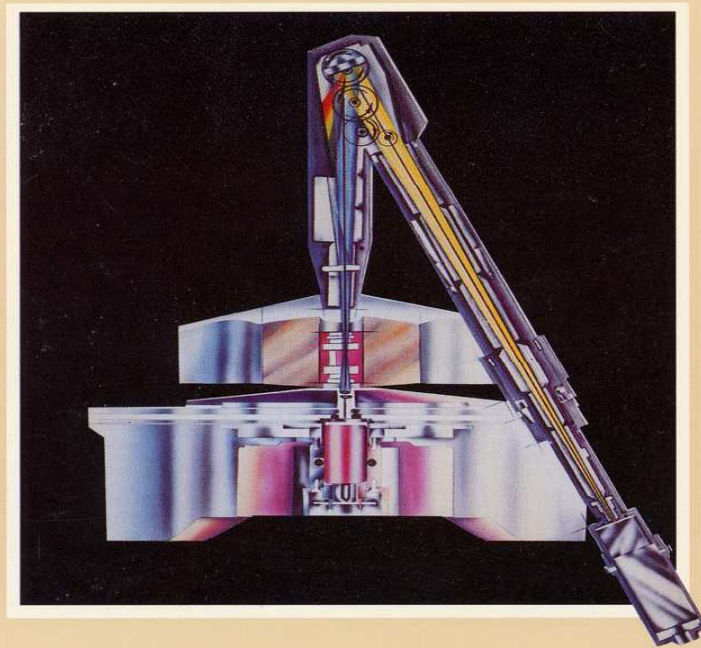
Bílkoviny + RNA
2,5 S

DNA
26 -35 S

agregáty DNA

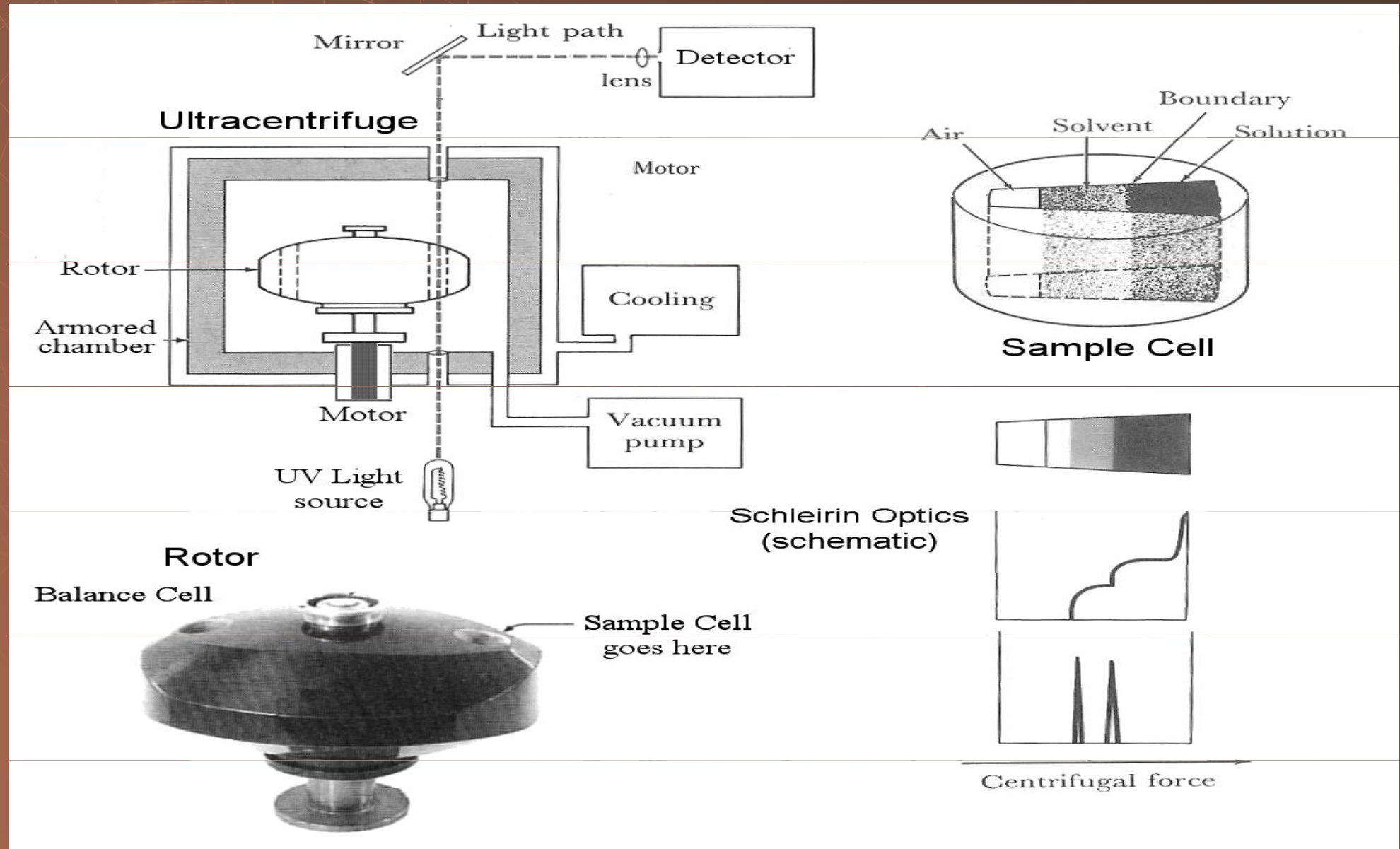
Analytická ultracentrifugace

Introduction
to
Analytical Ultracentrifugation



BECKMAN

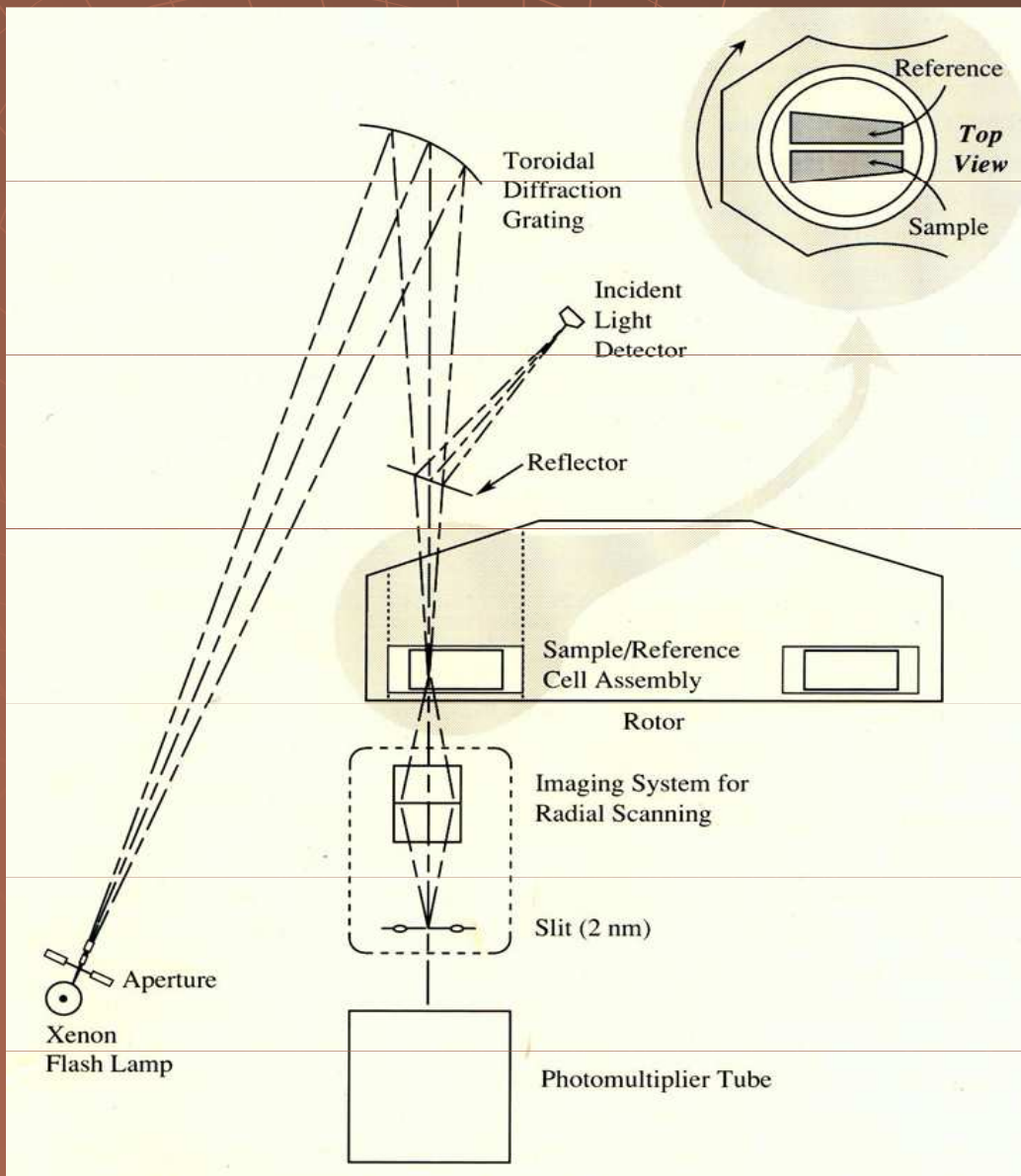
Analytická ultracentrifugace



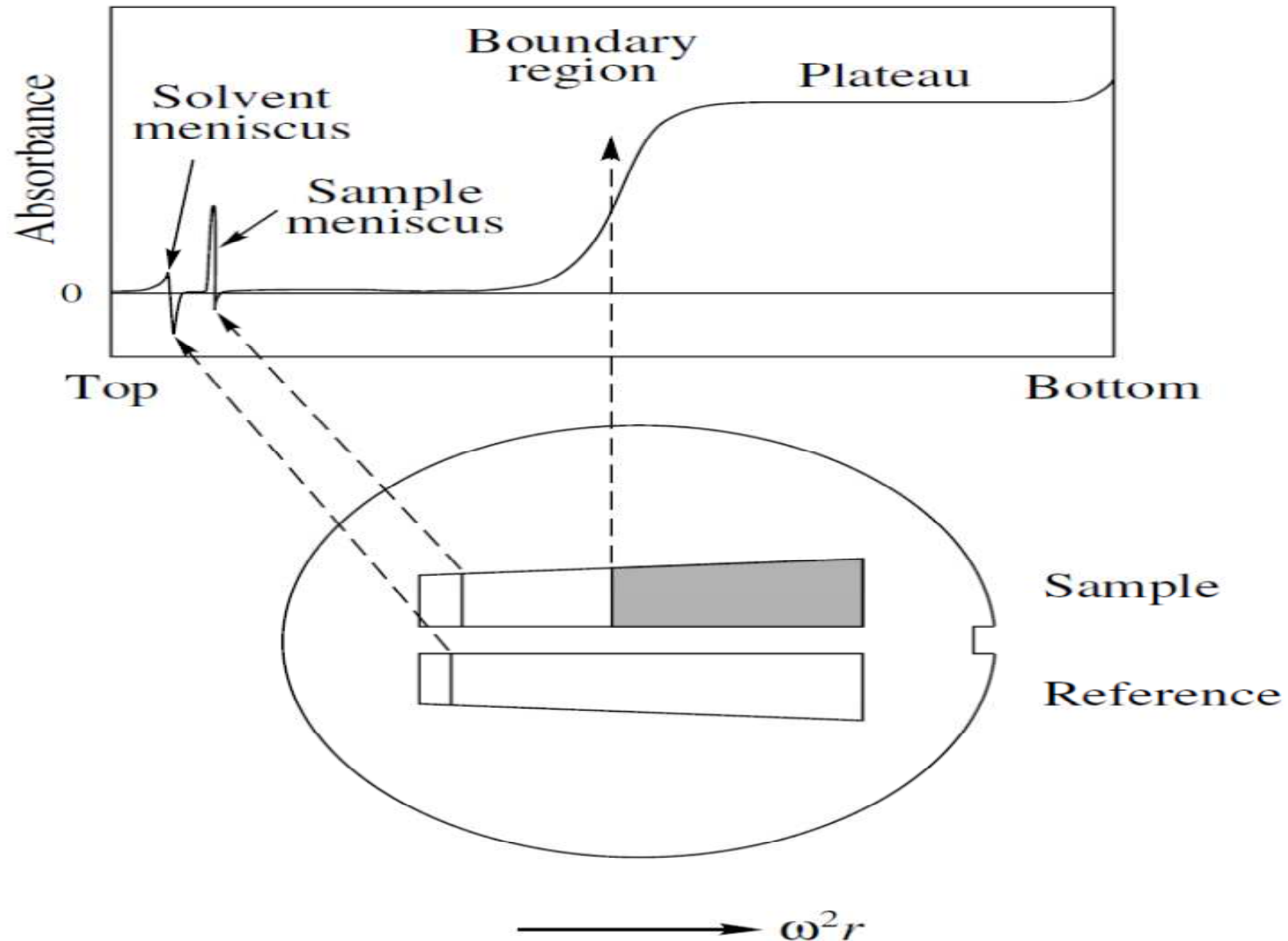
Analytická ultracentrifuga



Optický systém



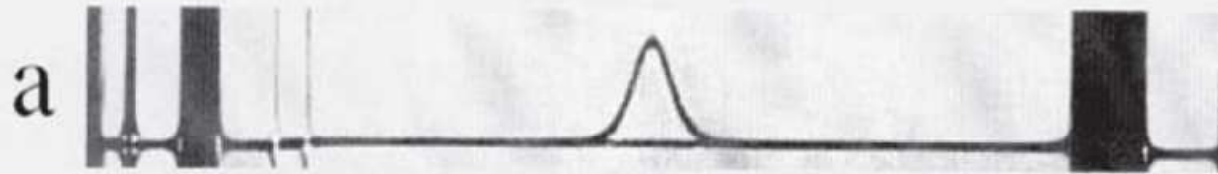
Optický systém



Optický systém

- Absorbční optický systém
 - UV-VIS od 200 do 800 nm
detekce makromolekul obsahujících silný chromofor
- Rayleighův interferenční optický systém
 - měří změny indexu lomu
analýza makromolekul neobsahujících silný chromofor (např. polysacharidů) nebo vzorků obsahujících v pufru silně absorbující látky (např. ATP/GTP, DTT oxidovaný)

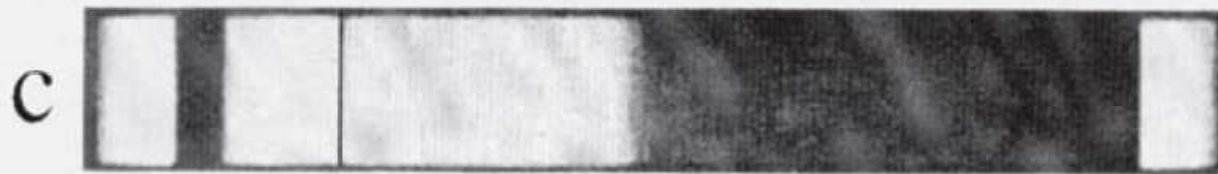
Optický systém



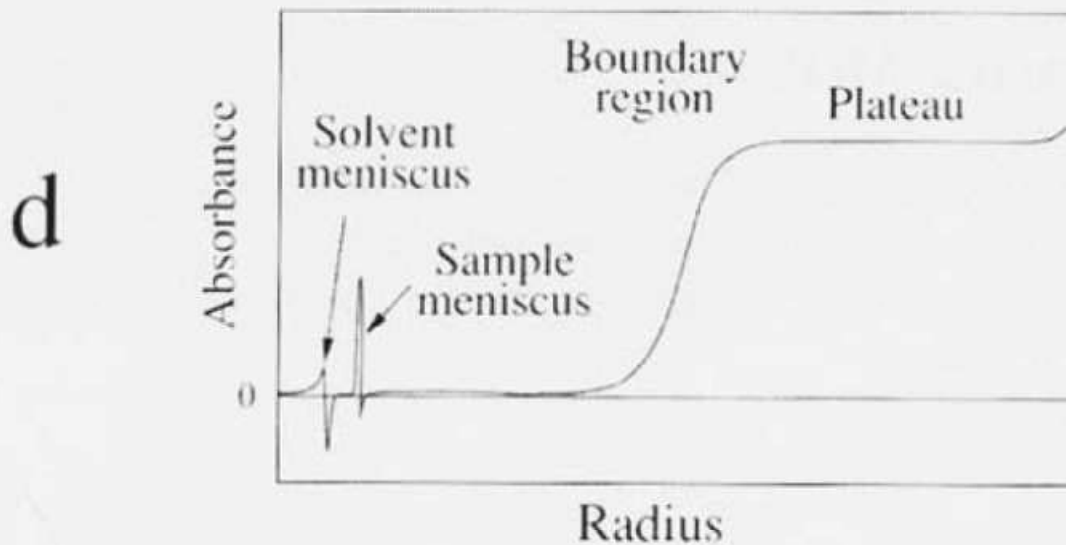
Zkřížená optika



Interferenční optika



Fotografický systém



Absorbční systém

Analytická ultracentrifugace



Metoda

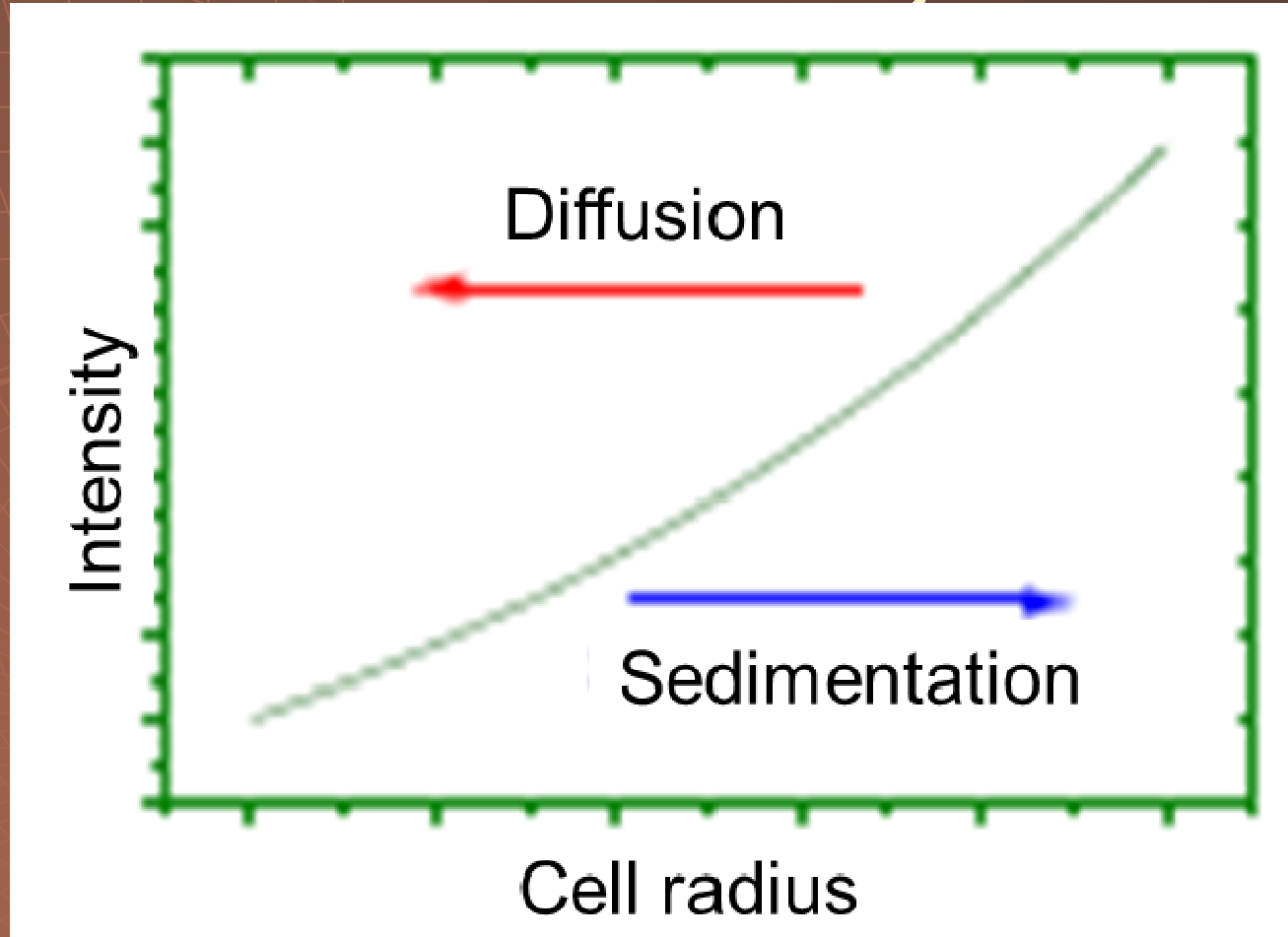
```
graph TD; A[Metoda] --> B[sedimentační rovnováhy]; A --> C[sedimentační rychlosti];
```

The diagram shows a rotor of an analytical ultracentrifuge with a particle at the top. Two paths are shown: a curved path representing sedimentation equilibrium and a straight path representing sedimentation velocity. The text 'Metoda' is in a yellow box above the paths, which then branches into two yellow boxes: 'sedimentační rovnováhy' and 'sedimentační rychlosti'.

sedimentační rovnováhy

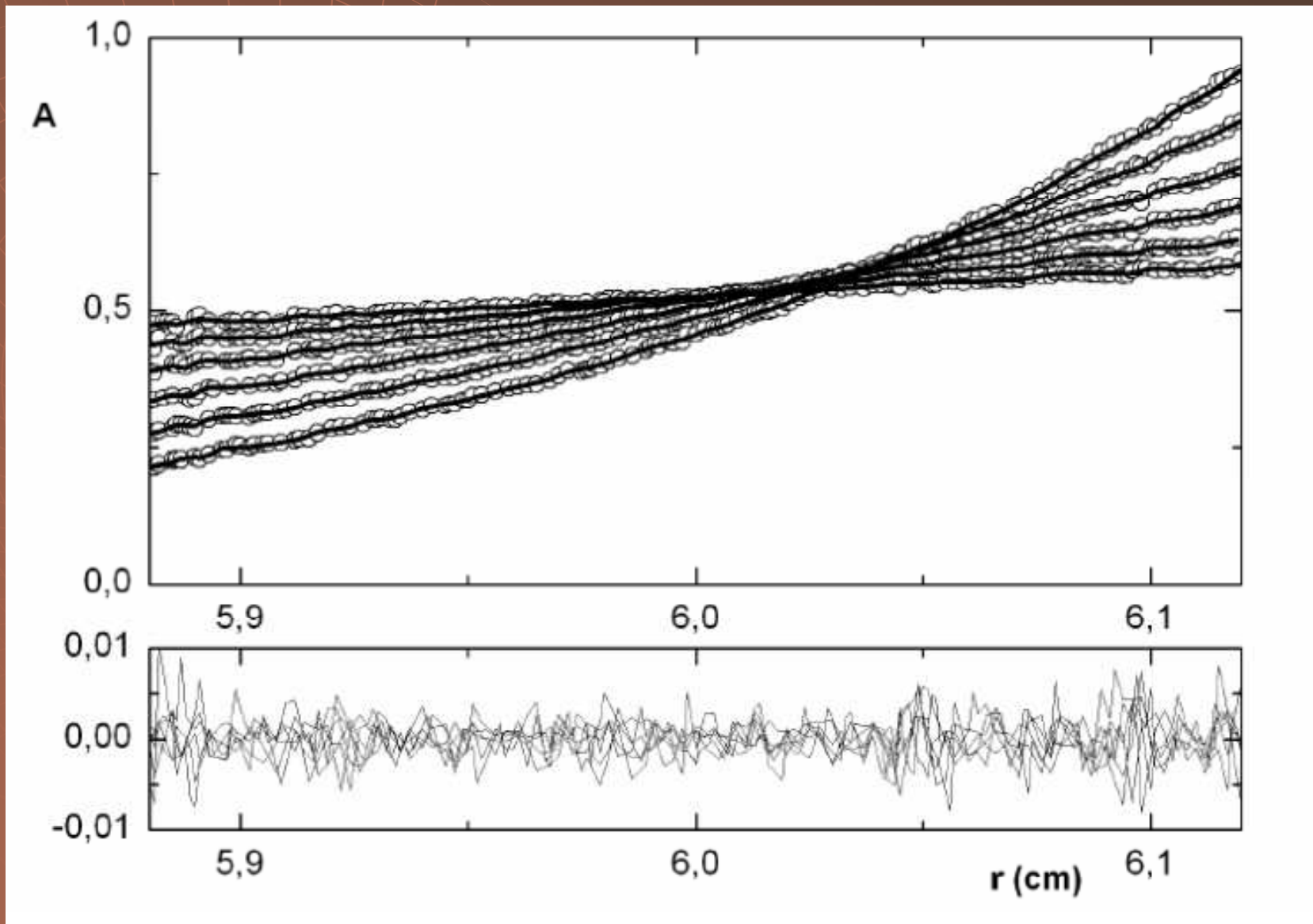
sedimentační rychlosti

Metoda sedimentační rovnováhy



$$M_r = \frac{2RT}{(1-V\rho)} \frac{d \ln c}{dx^2}$$

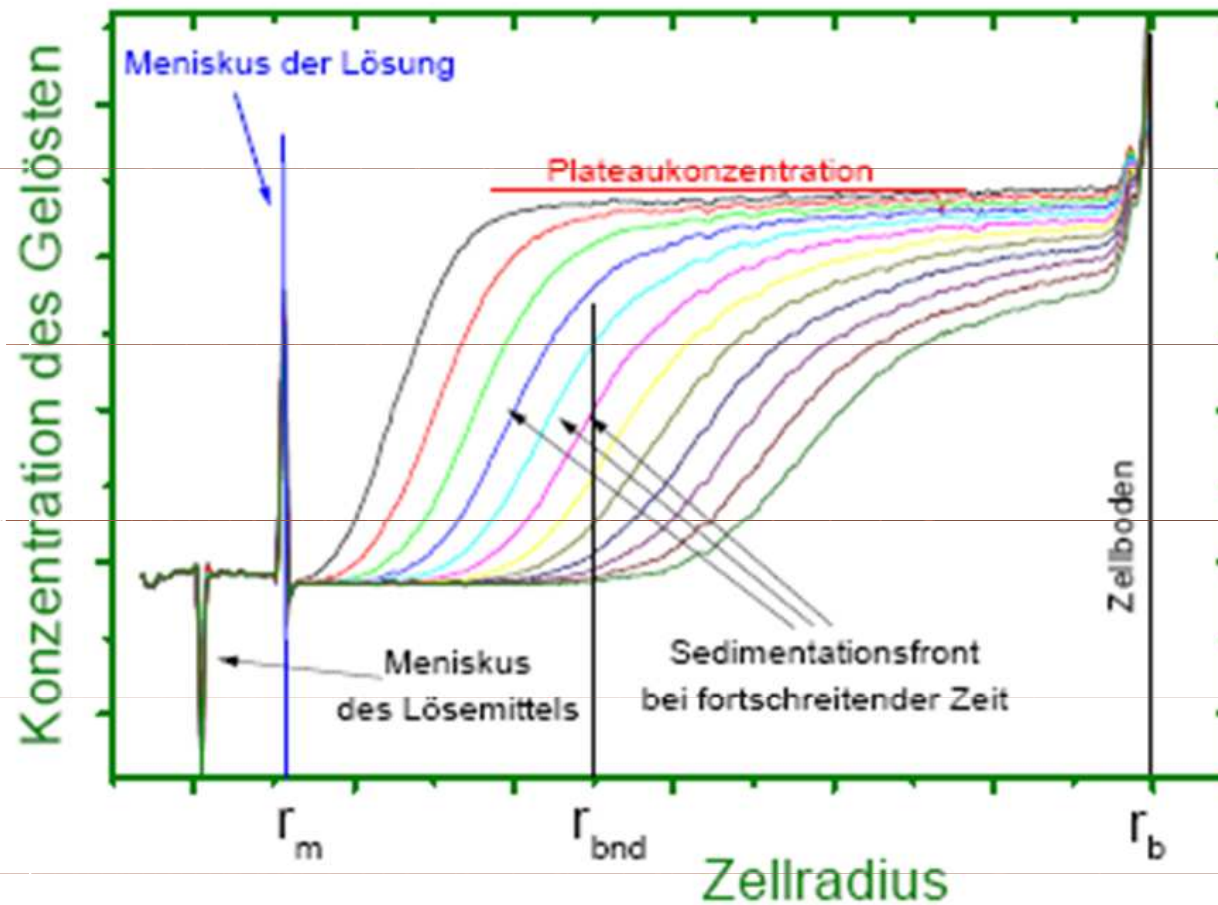
Metoda sedimentační rovnováhy



Metoda sedimentační rovnováhy

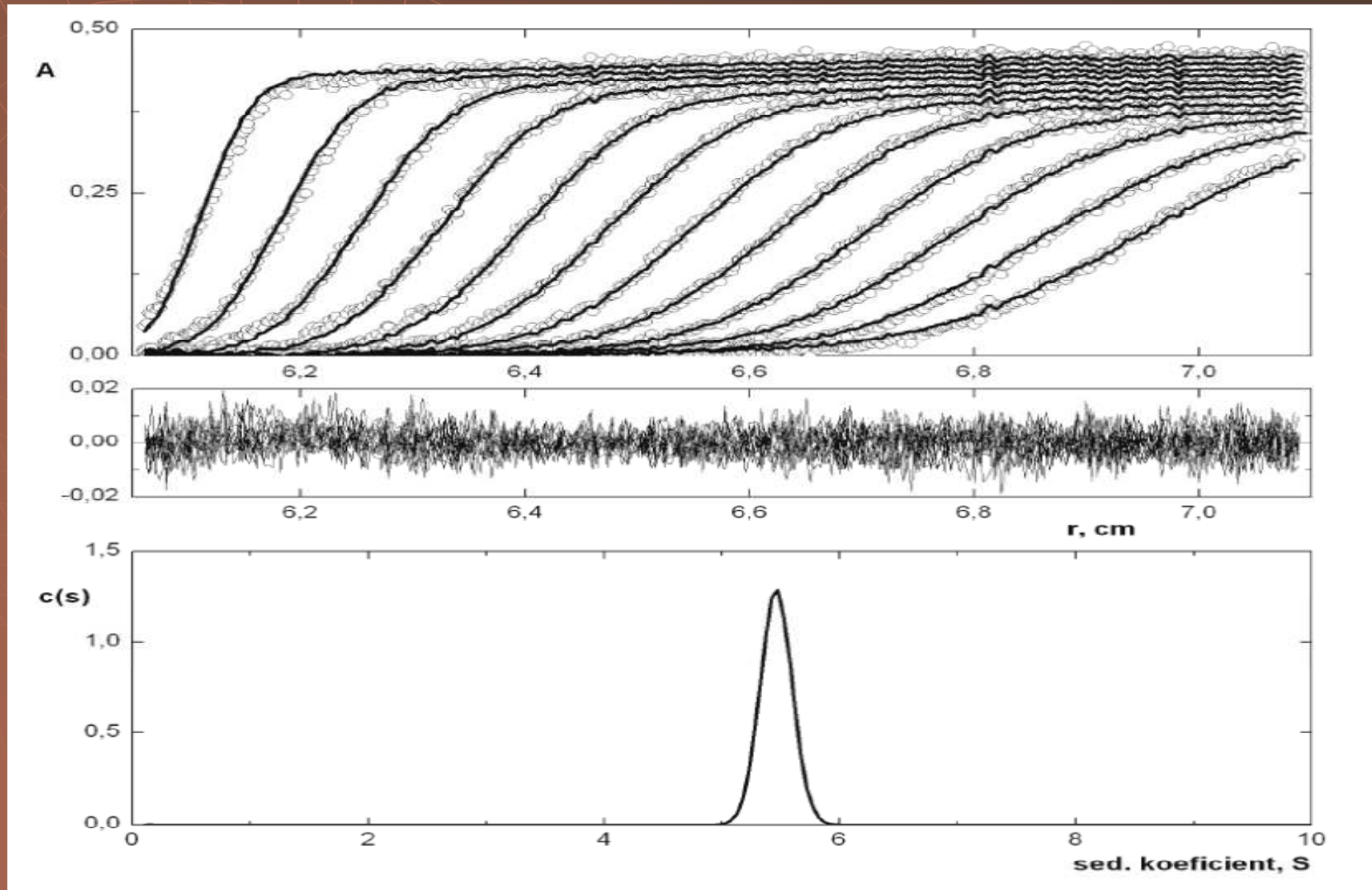
- ◆ Termodynamické informace
- ◆ Experimentálně lze stanovit :
 - Relativní molekulovou hmotnost M_r
 - Stav molekul v roztoku - asociace
 - Rovnovážné konstanty v roztoku K
→ výpočet volné energie asociačních reakcí

Metoda sedimentační rychlosti



$$v = \frac{\omega^2 x M_r (1 - V\rho)}{f}$$

Metoda sedimentační rychlosti



Metoda sedimentační rychlosti

- ◆ Hydrodynamické parametry
- ◆ Experimentálně lze stanovit :
 - Sedimentační koeficient s
 - Difuzní konstantu D nebo frikční faktor f
 - Relativní molekulovou hmotnost M_r
 - Tvar molekuly v roztoku