

Separace molekul nukleových kyselin centrifugací

Centrifugace se používá v molekulární biologii k izolaci, čištění a charakterizaci biopolymerů a nadmolekulárních útvarů. Přináší též informace o vznášivé hustotě a sedimentačním koeficientu, pomocí kterého lze za určitých podmínek vypočítat molekulovou hmotnost biopolymeru.

Během centrifugace působí na částici odstředivá síla

$$F_1 = m \omega^2 r$$

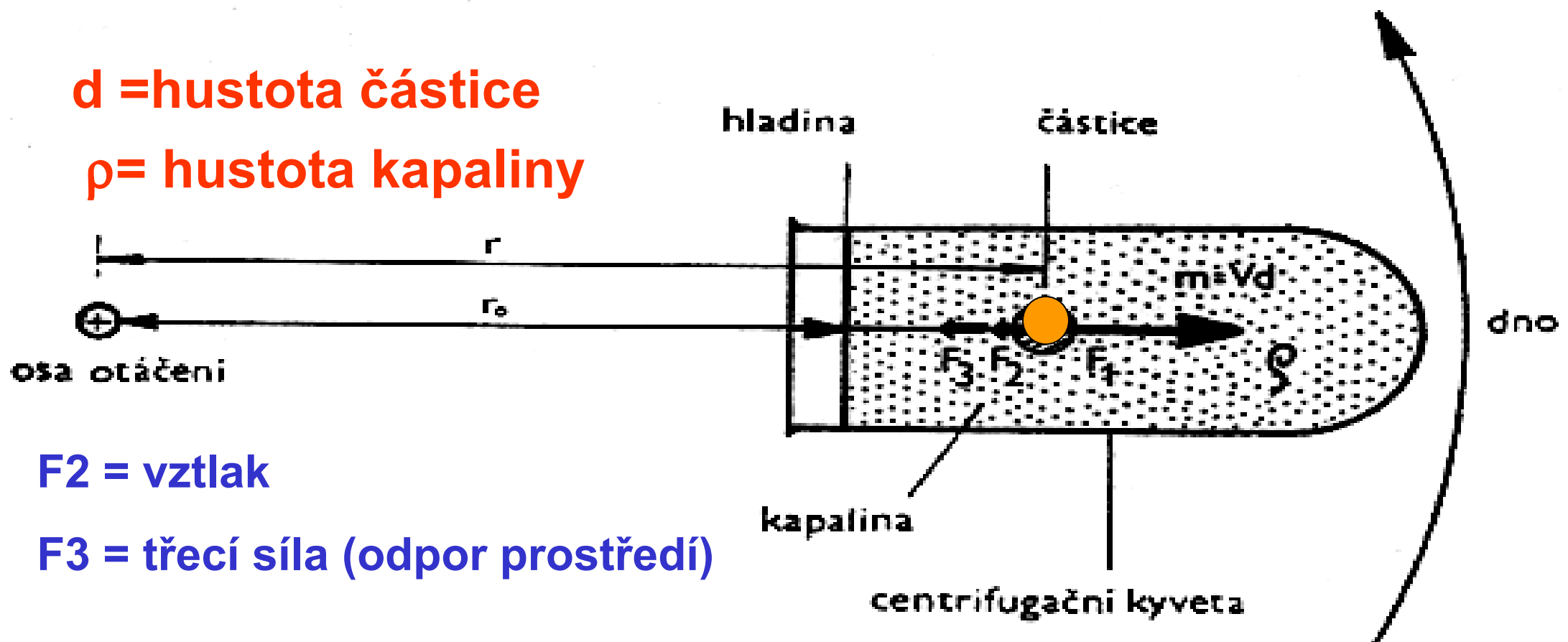
ω - úhlová rychlost

$$\omega = 2\pi n \quad n = \text{rpm}$$

n – počet otáček

d = hustota částice

ρ = hustota kapaliny



F_2 = vztlak

F_3 = třecí síla (odpor prostředí)

Relativní odstředivá síla

Parametry centrifugace se nejčastěji vyjadřují relativní odstředivou silou **RCF**.

$$\text{RCF} = \frac{m \omega^2 r}{m \cdot g} = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (\text{jednotka} = g)$$

RCF se uvádí v násobcích gravitačního zrychlení g nebo počtem otáček za minutu.

$$g = 980 \text{ cm/s}^2$$

$$\underline{\text{RCF} = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot n^2 \cdot r}$$

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

Izokinetická – podle rychlosti sedimentace

- stanovení sedimentačního koeficientu

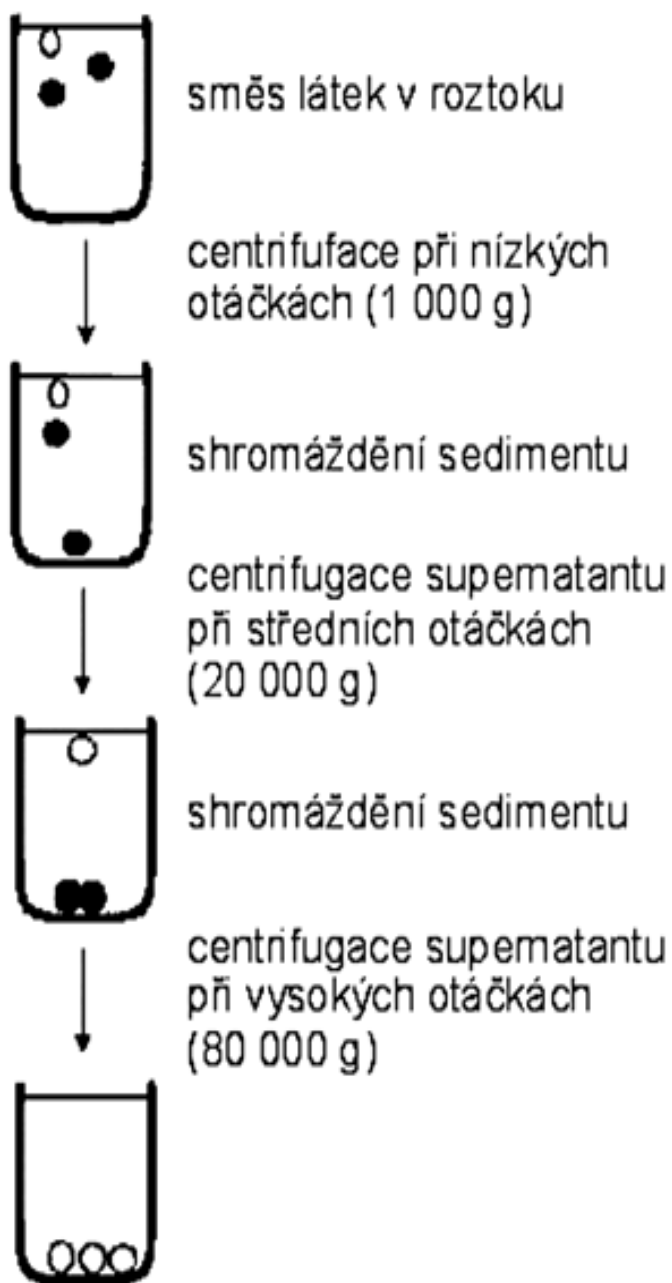
Izopyknická – podle hustoty částic

- stanovení vznášivé hustoty

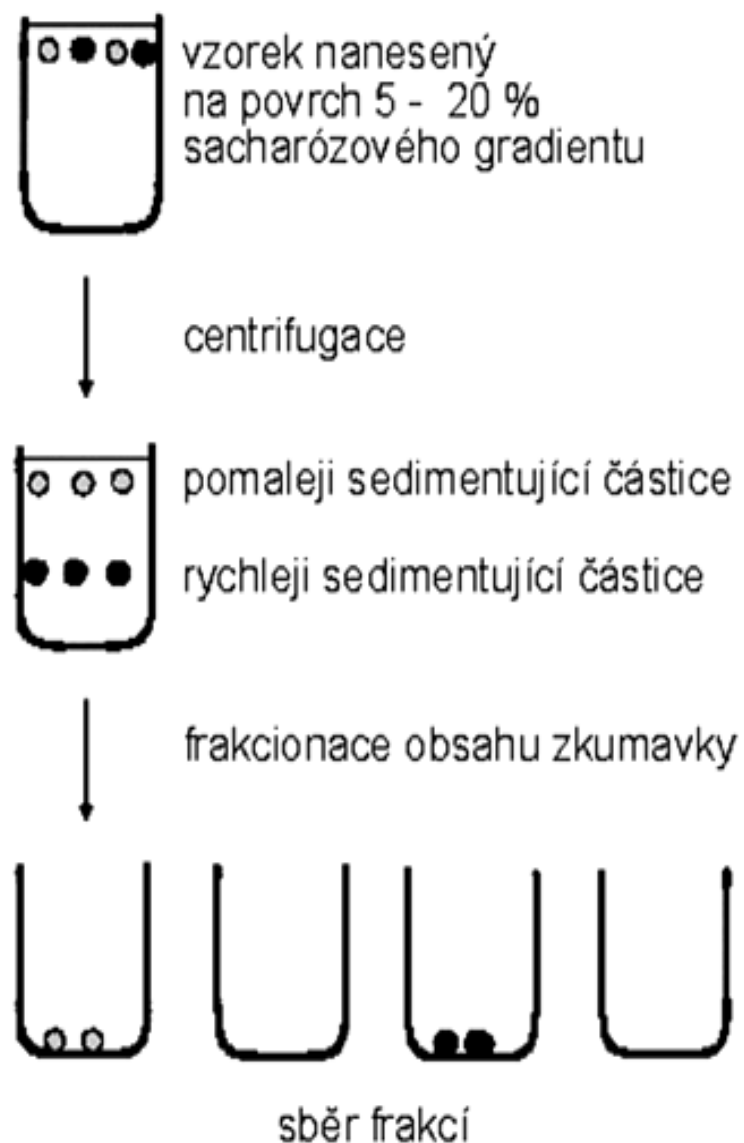
ZÁKLADNÍ TYPY CENTRIFUGACE

zonální centrifugace v hustotním gradientu

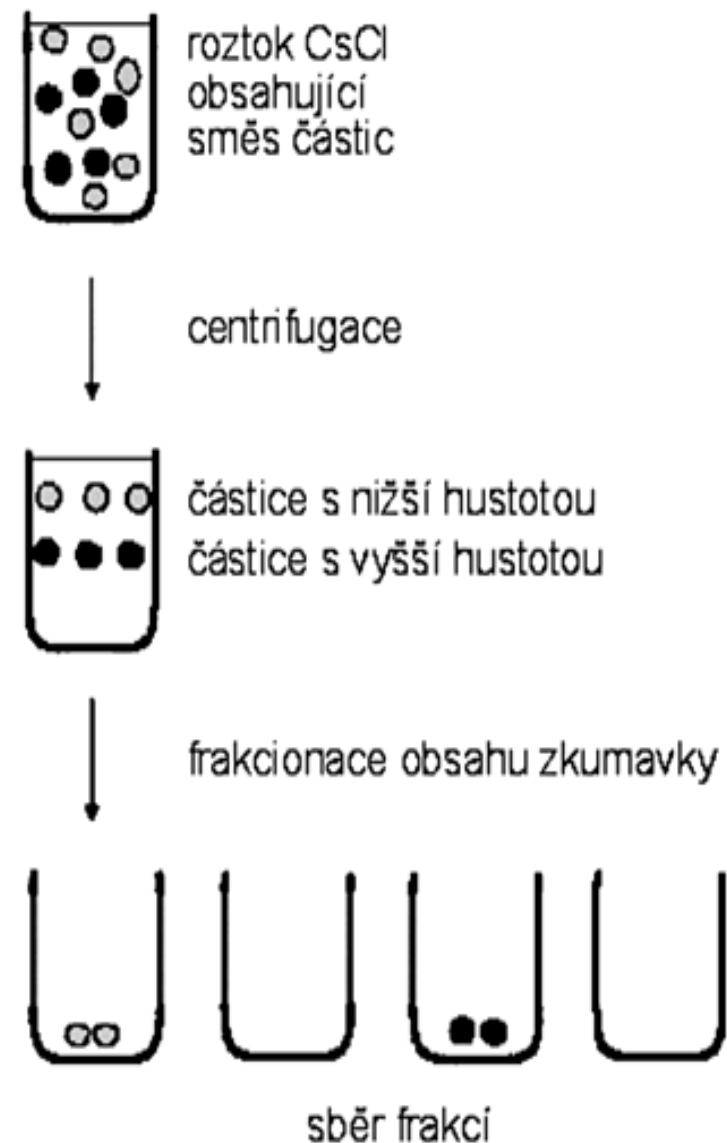
diferenciální centrifugace



izokinetická centrifugace



izopyknicická centrifugace

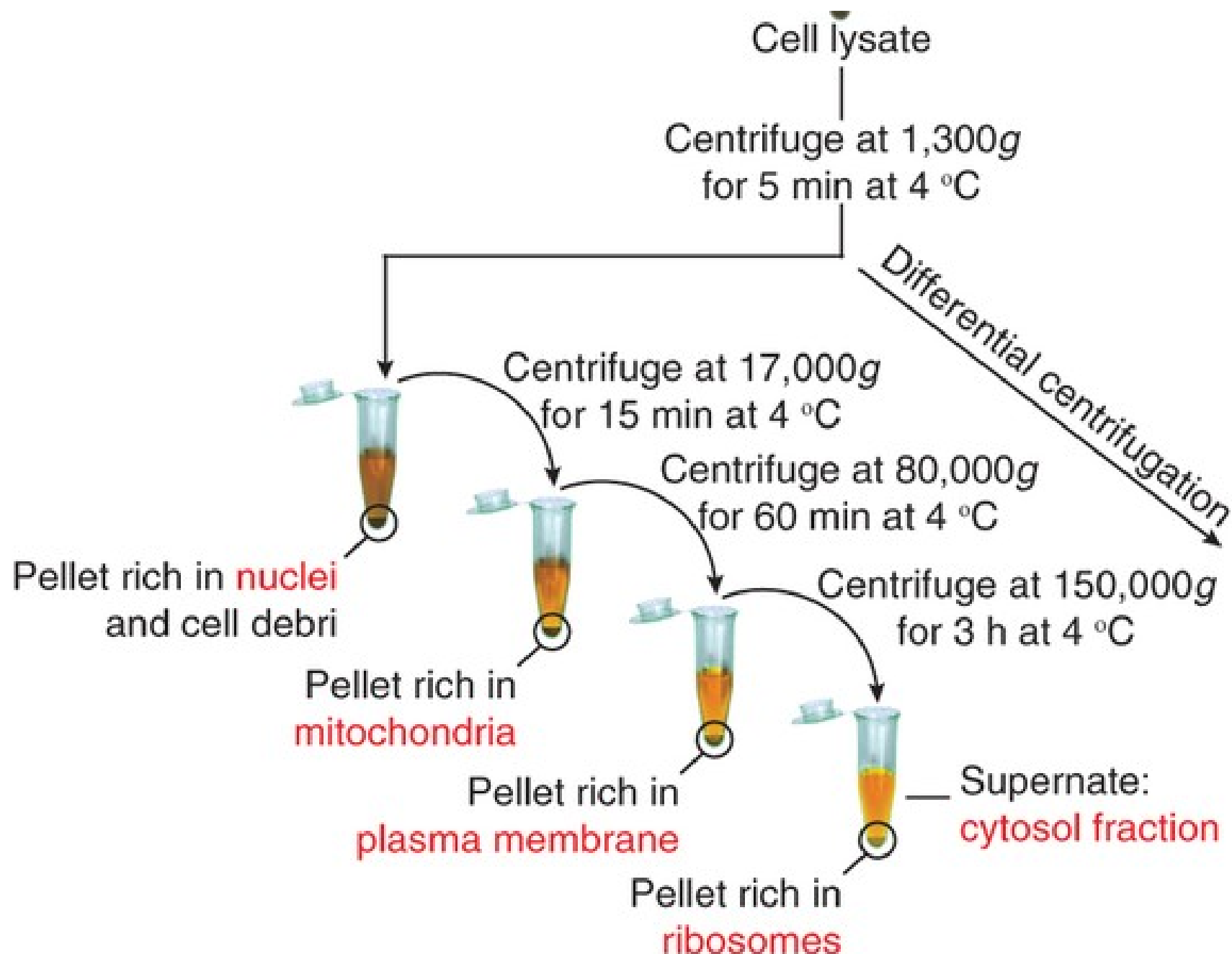


Diferenciální centrifugace

částice s různou velikostí, hmotností – jiná rychlost sedimentace

Opakovaná centrifugace se zvyšujícími otáčkami – frakce

př. buněčná jádra, ribozomy, mitochondrie ...



Izokinetická centrifugace

Vhodné podmínky – konstantní rychlost sedimentace

Vzorek nanášíme na povrch gradientu

Rychlost sedimentace ovlivněna

- velikost, tvar
- hustota
- vlastnosti prostředí
- podmínky centrifugace

Využití k charakterizaci částic – př. určení velikosti

př. sacharózový gradient – 16S rRNA, 5S rRNA

Stanovení sedimentačního koeficientu

Sedimentační koeficient

$$dr/dt = S \times \omega^2 \times r$$

r - vzdálenost částice od osy otáčení

t - doba centrifugace

S - sedimentační koeficient

ω - úhlová rychlost rotoru

Hodnota sedimentačního koeficientu se udává ve Svedbergových jednotkách

$$1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s.}$$

Využití: charakterizace informačních makromolekul buněčných organel apod.

Hodnoty **S** (v rozpětí 10^{-13} - $200 \cdot 10^{-13}$)

např. $30\text{S} = 30 \cdot 10^{-13} \text{ s}$

23S RNA, 16S RNA, nebo ribozómy 30S, 50S

Příprava lineárního sacharóзовého gradientu

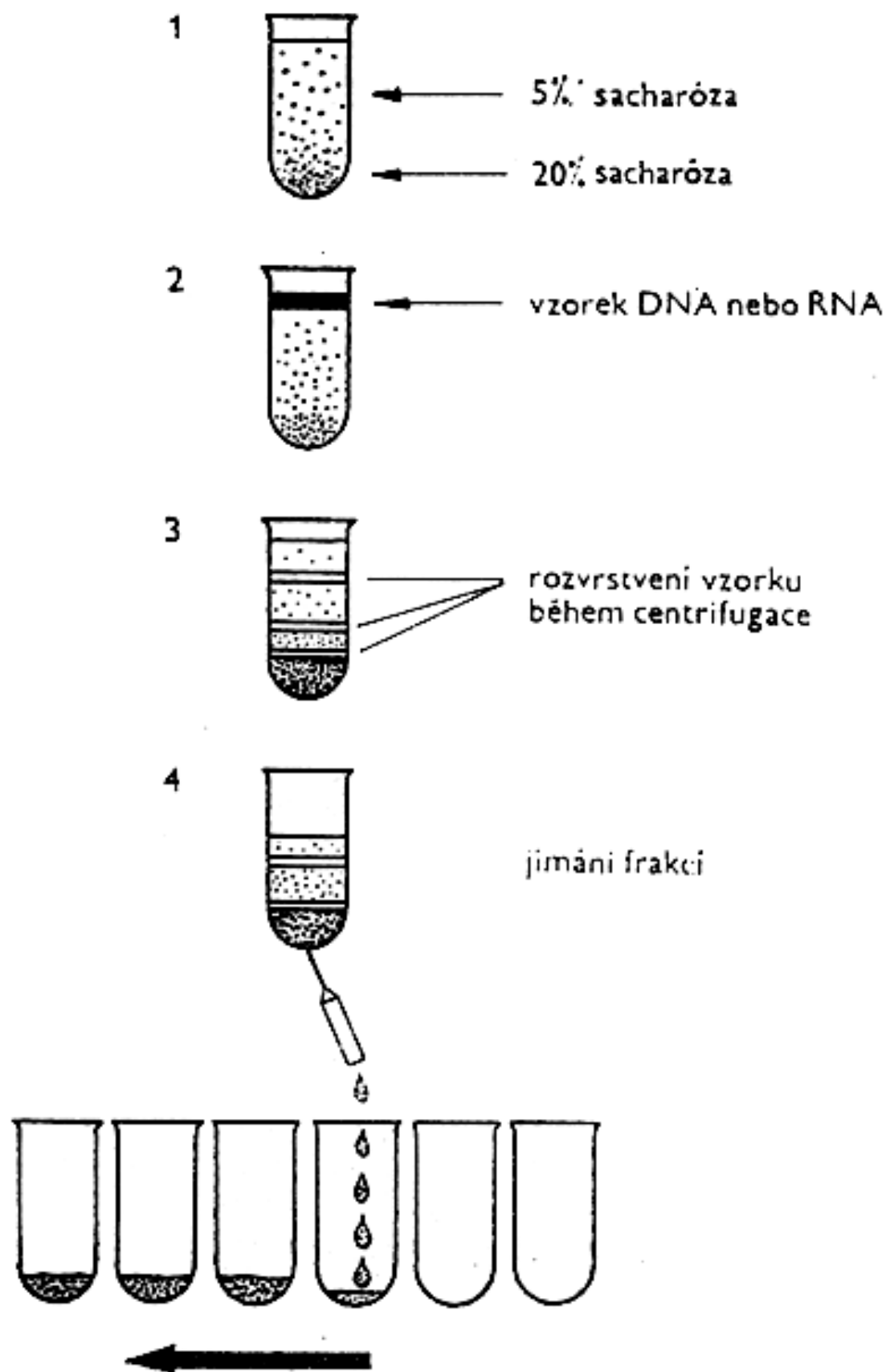
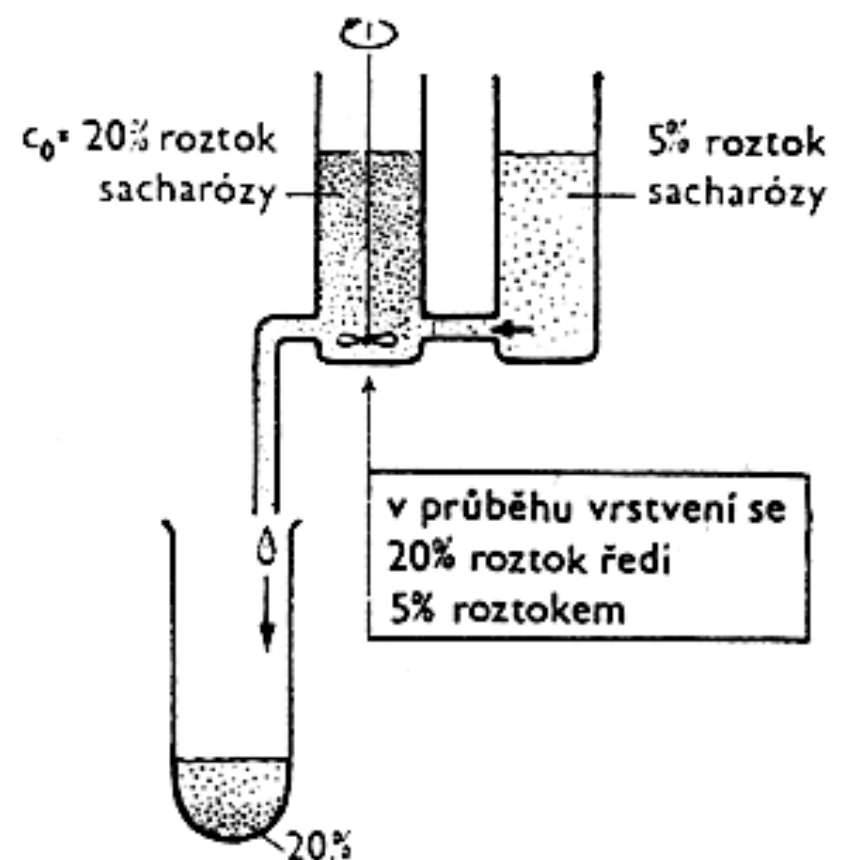


Schéma ultracentrifugace v sacharóзовém gradientu



Zařízení na vrstvení lineárního sacharóзовého gradientu

Izopyknická centrifugace

Na začátku může být homogenní směs látek

Během centrifugace se samovolně vytváří koncentrační (hustotní) gradient – částice se pohybují oběma směry dokud nedosáhnou polohy, kdy je jejich hustota shodná s hustotou roztoku

Gradient CsCl

- separace různých forem plazmidové DNA (ccc vs oc vs lineární)
- separace molekul DNA s různým množstvím G+C