

ULTRACENTRIFUGACE

Příprava preformovaného sacharózového gradientu

Ultracentrifugace je separační metoda používaná v molekulární biologii k identifikaci, izolaci, purifikaci a charakterizaci biomakromolekul, buněčných organel, virů apod. Na rozdíl od klasické nízkoobrátkové centrifugace se ultracentrifugací rozumí odstřeďování při vysokých otáčkách, tj., při 20 000 - 100 000 ot/min. Vysokému počtu otáček je přizpůsobena konstrukce ultracentrifugy; nutné je intenzivní chlazení a snížení atm. tlaku v rotorovém prostoru. Rotory jsou vyrobeny z ušlechtilých materiálů, centrifugační zkumavky jsou vyrobeny z hmot odolávajících vysokému přetížení a vzorek ve zkumavce je hermeticky uzavřen. Nutné je přesné vyvážení protilehlých centrifugačních zkumavek (přesnost hmotností se pohybuje řádově v jednotkách mg).

Z hlediska účelu lze centrifugaci rozdělit na:

- a) **preparativní**, kdy cílem je izolace nebo purifikace biomakromolekul.
- b) **analytická**, kdy cílem je identifikace případně charakterizace dané částice (např. stanovení její velikosti (mol. hmotnosti), sedimentačního koeficientu, vznášivé hustoty apod.).

V obou případech je možné podmínky centrifugace zvolit tak, aby dělení částic probíhalo buď v závislosti na jejich velikosti, nebo v závislosti na jejich hustotě.

Pokud mají být navzájem odděleny částice lišící se navzájem svou velikostí (molekulární hmotností), probíhá centrifugace většinou v tzv. sacharózových gradientech, tj. v roztocích sacharózy, jejichž koncentrace u dna centrifugační zkumavky je vyšší než u hladiny.

Nejčastěji se používají lineární gradienty 5 - 20% sacharózy. Vzrůstající hustota roztoku a tím i jeho viskozita eliminují odstředivé zrychlení působící na částice, jehož hodnota se směrem od osy otáčení zvyšuje. Gradient tak zajišťuje konstantní rychlost sedimentace částic, podmiňuje jejich stabilitu a snižuje difúzi usazených částic do okolí. K přípravě gradientů lze použít rovněž dalších látek, např. D₂O, ficoll aj.

Sacharózových gradientů se velmi často používá pro stanovení molekulárních hmotností DNA a proteinů.

V případě, že mají být vzájemně odděleny částice na základě své odlišné specifické hustoty, používá se gradientů chloridu cesného. Roztoky CsCl se vyznačují vysokou hustotou a při centrifugaci samovolně vytvářejí koncentrační a tím i hustotní gradient. Gradient je určen počáteční koncentrací CsCl a rychlostí otáčení. K ustálení gradientu dojde během několika hodin.

Biomakromolekuly, které se na počátku centrifugace promíchají s roztokem CsCl, se při centrifugaci usadí ve vrstvě roztoku (gradientu), odpovídající jejich vznášivé hustotě (její hustota je poněkud odlišná od specifické hustoty).

Detekce biomakromolekul po centrifugaci.

V případě preparativní ultracentrifugace lze částice detekovat vizuálně, jako opalescenční pruhy uvnitř zkumavky. Tyto lze pak odebrat (např. injekční stříkačkou) a dále zpracovat. V případě analytické centrifugace se obsah zkumavky po centrifugaci rozdělí na jednotlivé frakce (např. vykapáním) a každá frakce se odděleně analyzuje z hlediska fyzikálních vlastností (tj. hustota, absorbance, radioaktivita, index lomu apod.). Číslo frakce udává současně i její vzdálenost od povrchu (dna) zkumavky a tím i od středu otáčení. Srovnání fyzikálních veličin jednotlivých frakcí umožní pak identifikovat polohu částic v gradientu a blíže je charakterizovat.

Příprava preformovaného gradientu CsCl

Příprava roztoků CsCl (100 ml) v pufru SM

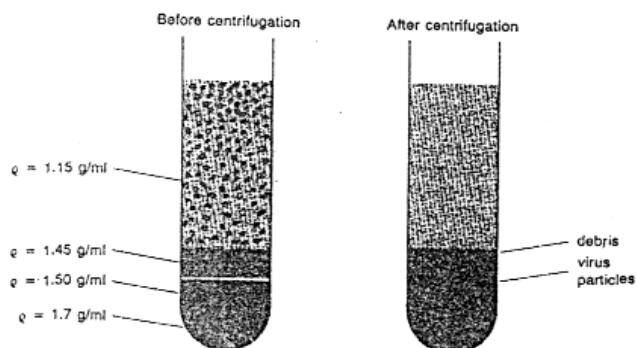
Složení pufru SM: na objem 1 litr: 5,8 g NaCl; 2 g MgSO₄ · 7 H₂O; 50 ml 1M Tris.Cl (pH 7,5);
5 ml 2% želatiny (sterilizace autoklávováním).

Příprava preformovaného gradientu CsCl

Příprava roztoků CsCl (100 ml) v pufru SM

Koncentraci je nutno upravit na základě měření indexu lomu

Density (ρ) (g/ml)	CsCl (g)	SM (ml)	Refractive index (η)
1.45	60	85	1.3768
1.50	67	82	1.3815
1.70	95	75	1.3990



Odběr frakcí po ultracentrifugaci v hustotním gradientu

