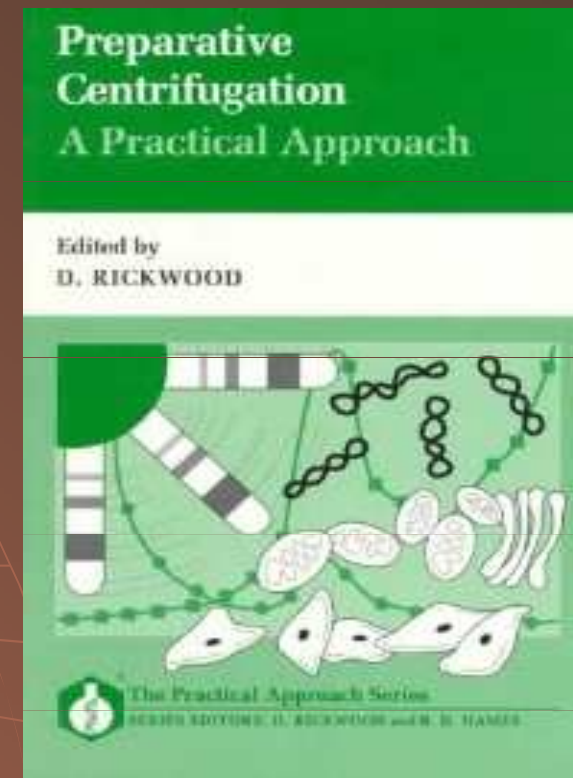
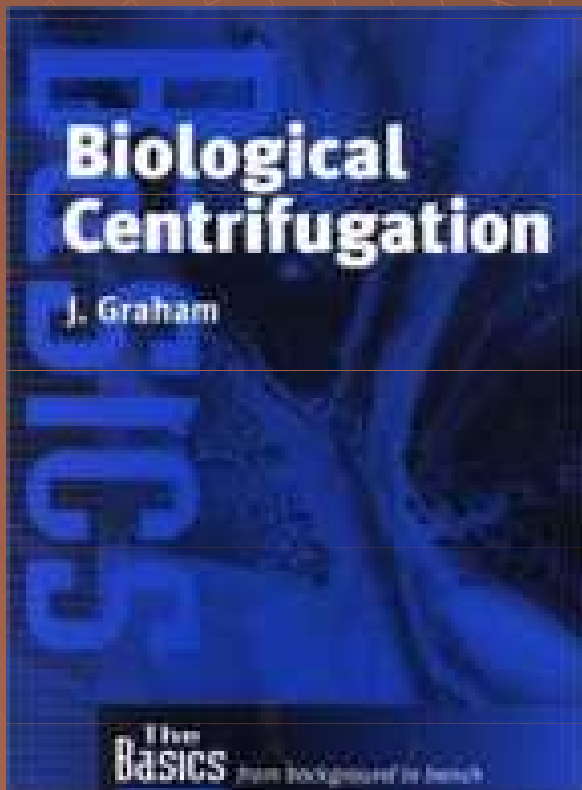


Centrifugace



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

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

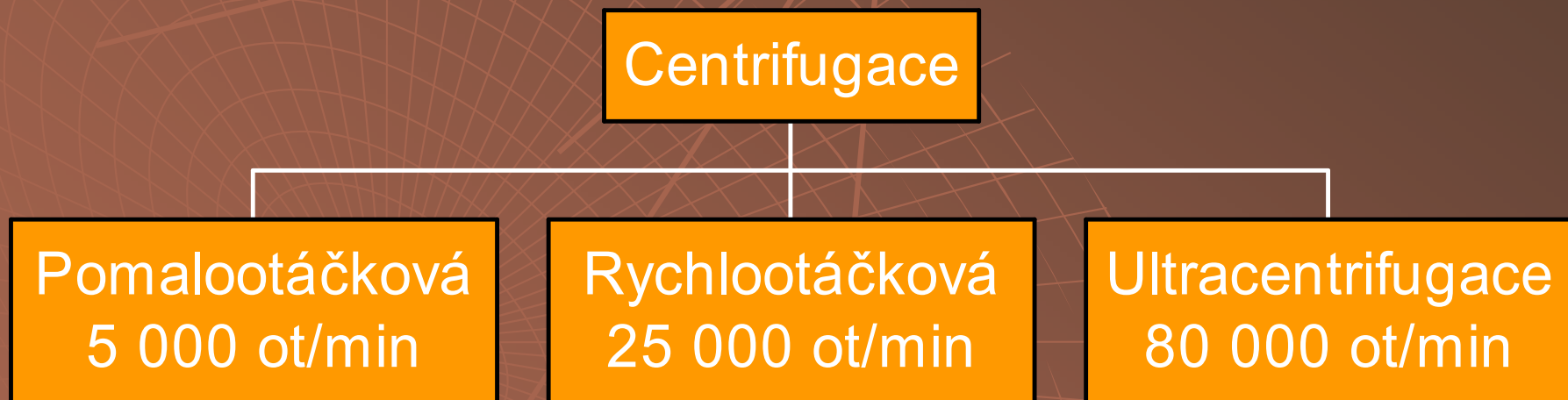
Centrifugace

```
graph TD; A[Centrifugace] --> B[Preparativní]; A --> C[Analytická]
```

Preparativní

Analytická

Rozdělení centrifug



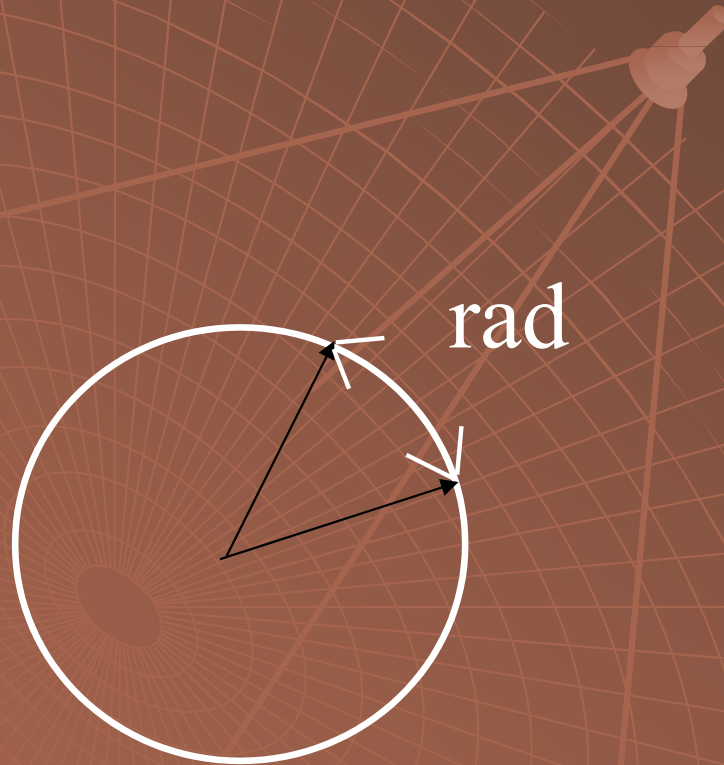
Otáčky → g

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

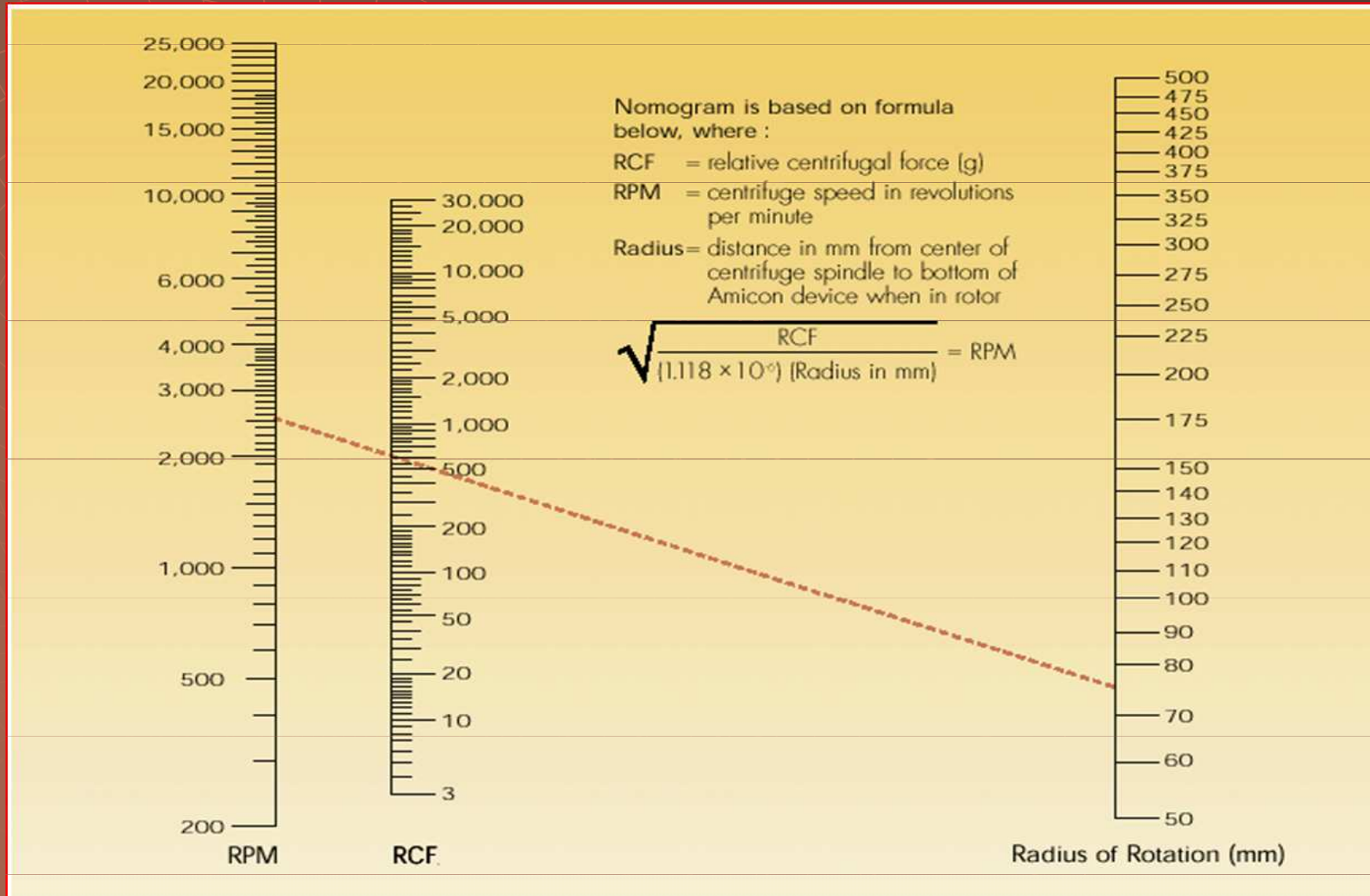
ω - uhlová rychlost
(rad/s)

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

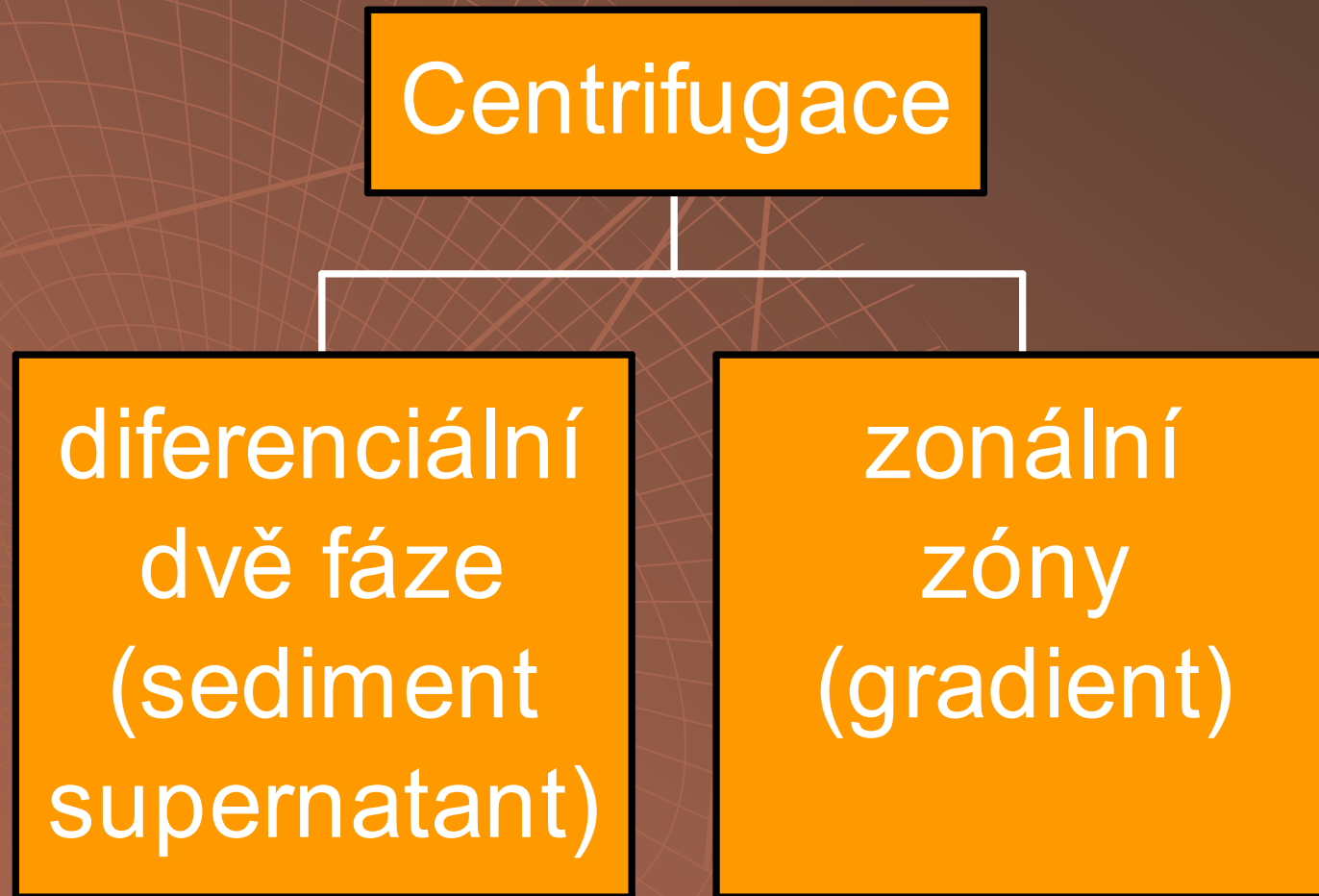
f – otáčky/min



Otáčky → g



Preparativní centrifugace



Metody nanášení vzorku

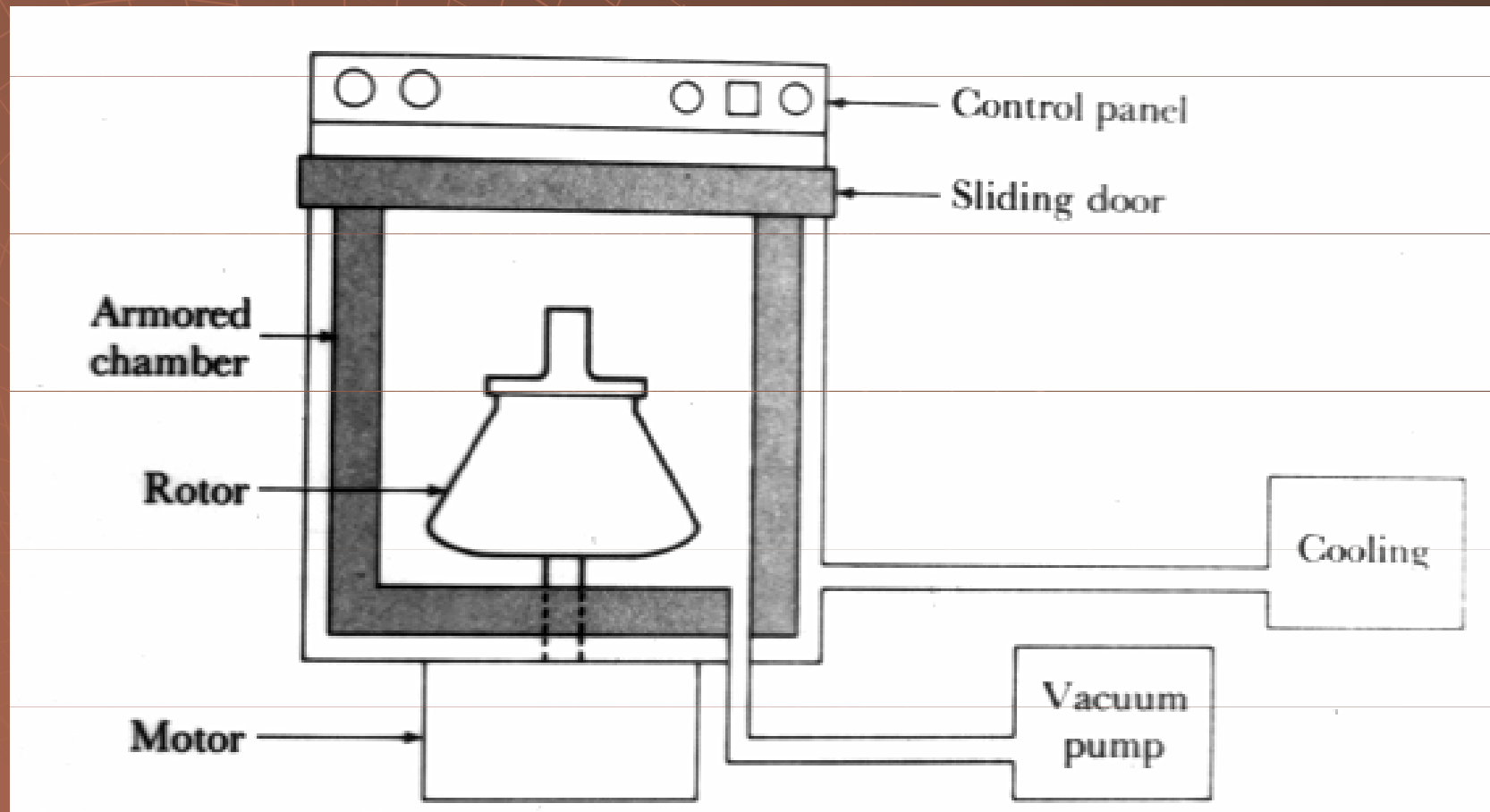
```
graph TD; A[Metoda] --- B[frontální vzorek v celé kyvetě]; A --- C[zonální vzorek - úzká zóna]
```

Metoda

frontální
vzorek v celé kyvetě

zonální
vzorek - úzká zóna

Preparativní centrifuga



Preparativní centrifuga



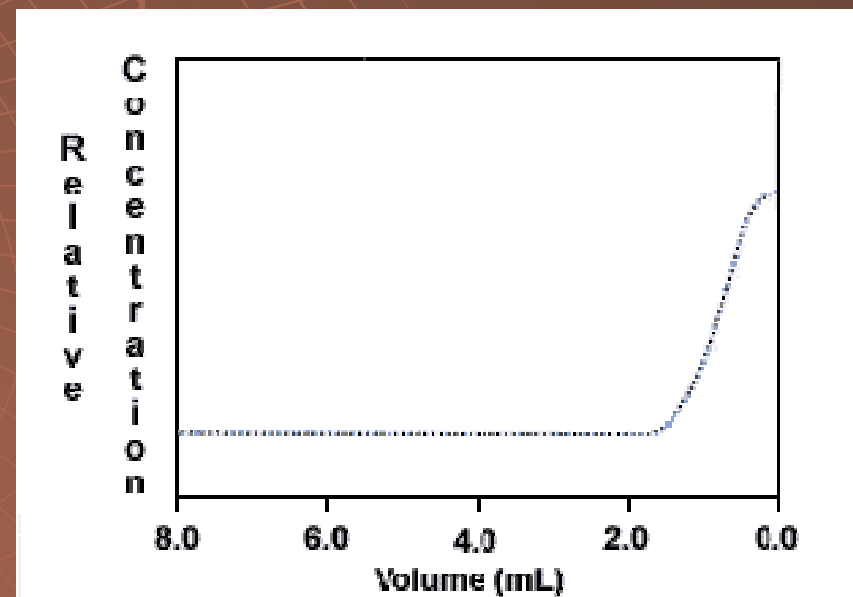
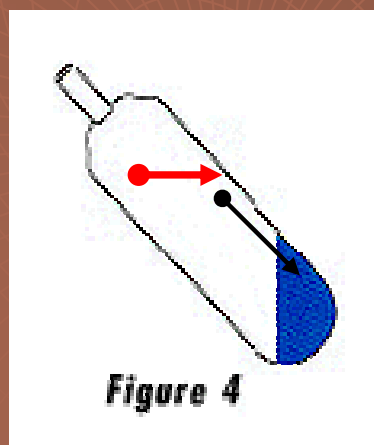
Preparativní ultracentrifuga



Rotory

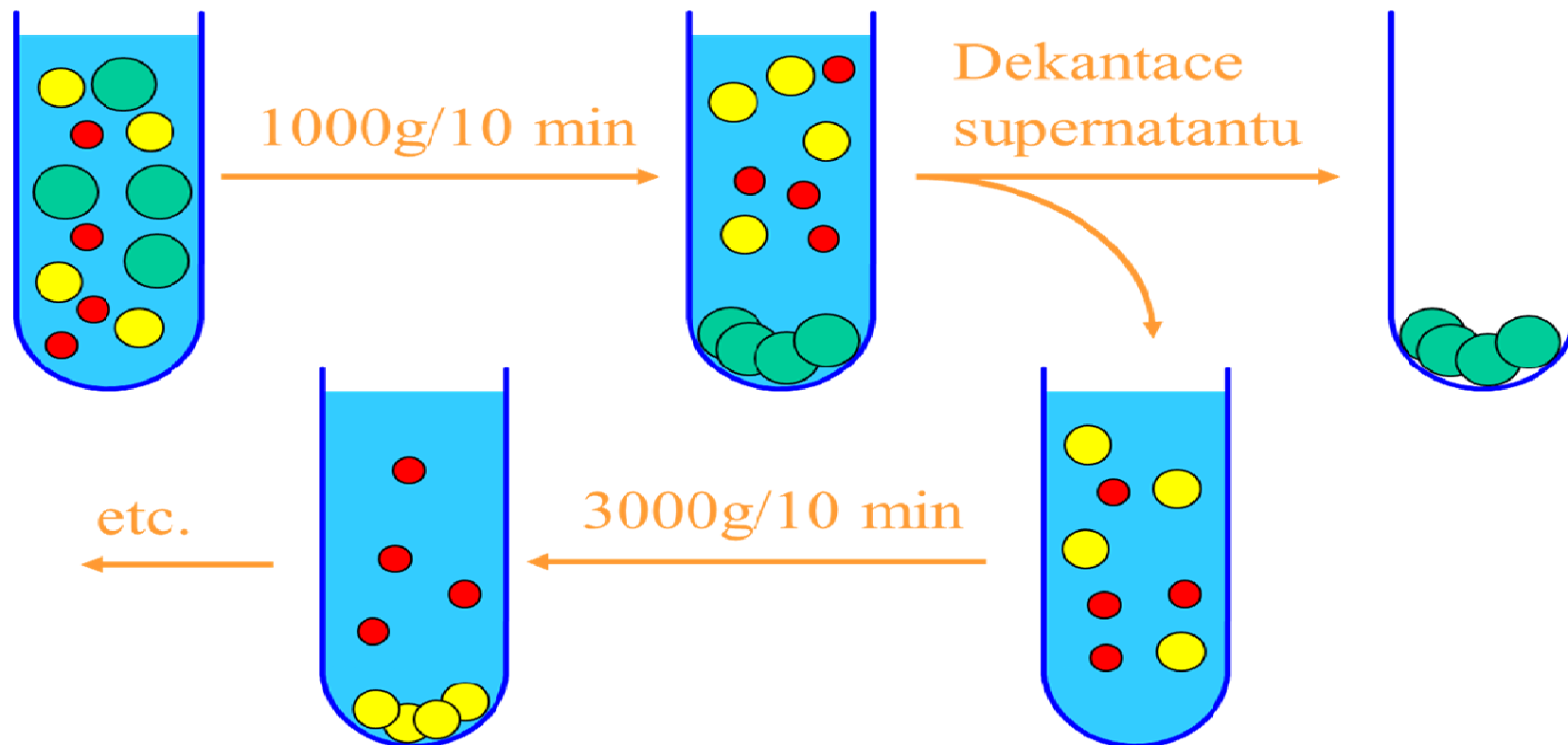
- ◆ Úhlový – diferenciální centrifugace
- ◆ Výkyvné – zonální centrifugace
- ◆ Zonální – bez kyvet, vzorek je uvnitř rotoru

Úhlový rotor

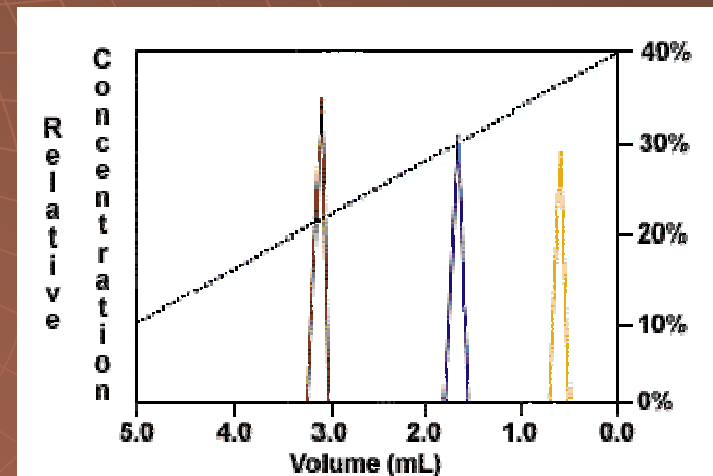
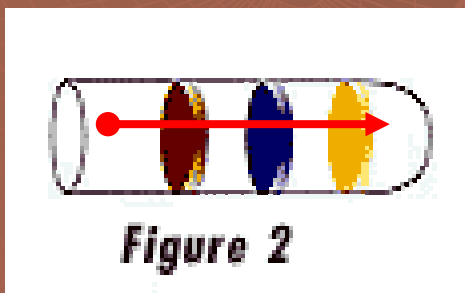


Diferenciální centrifugace

- ♦ opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček = gravitací

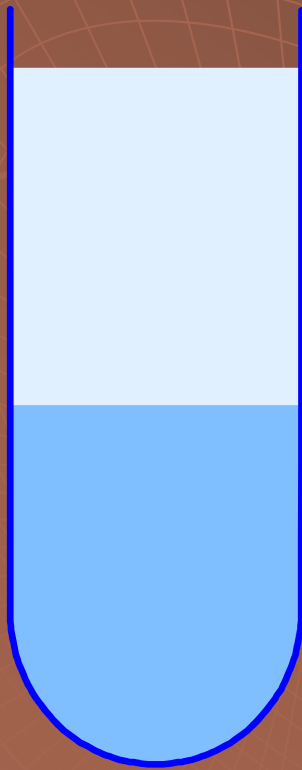


Výkyvný rotor

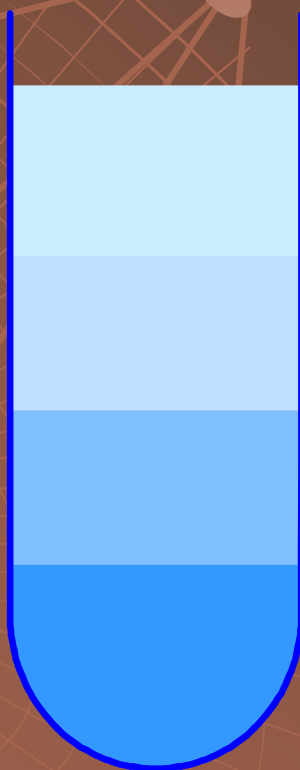


Gradientová centrifugace

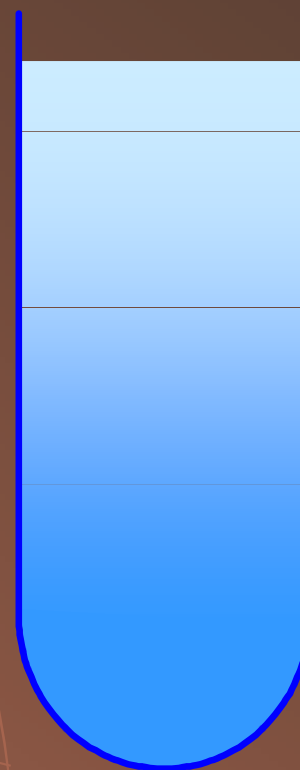
Hustotní bariera



Diskontinuální

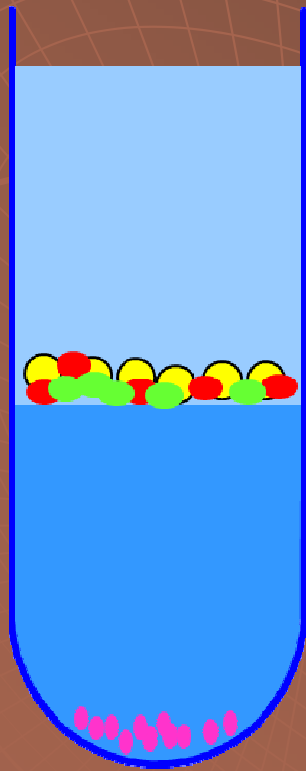


Kontinuální

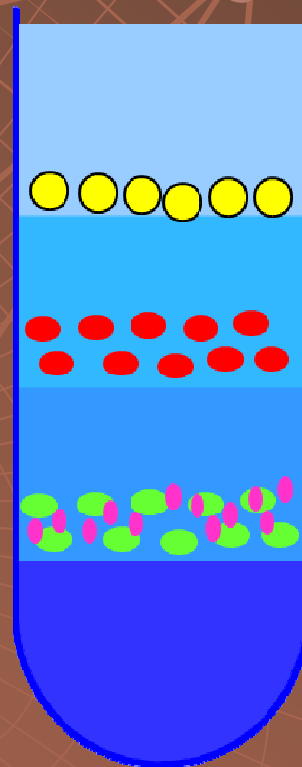


Gradientová centrifugace

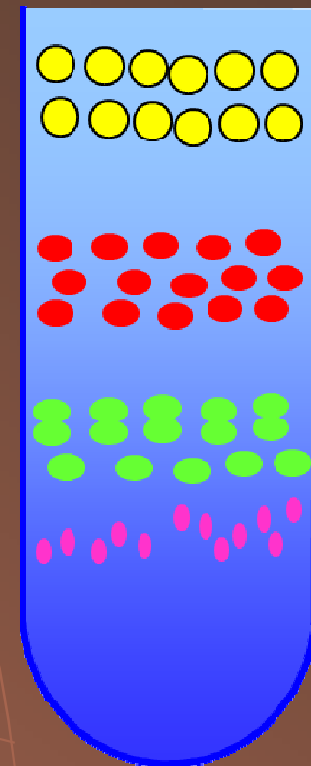
Hustotní bariera



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

- ◆ Ficoll - dextran

- ◆ Percoll – SiO₂

Hypertonické prostředí

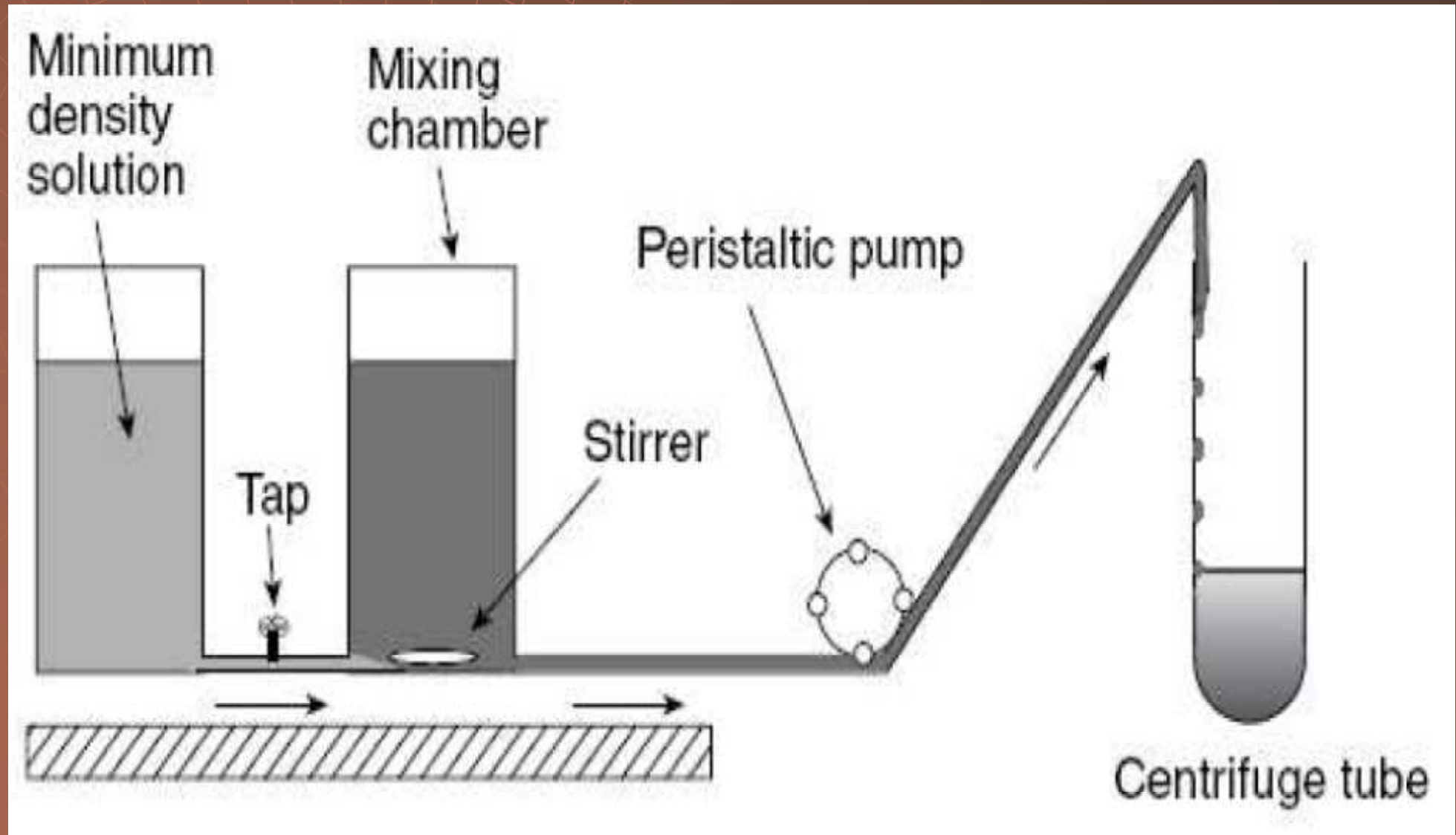
Nutno připravit gradient

- ◆ CsCl

- ◆ Cs₂SO₄

Gradient vzniká během centrifugace

Gradientová centrifugace



Gradientová centrifugace

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

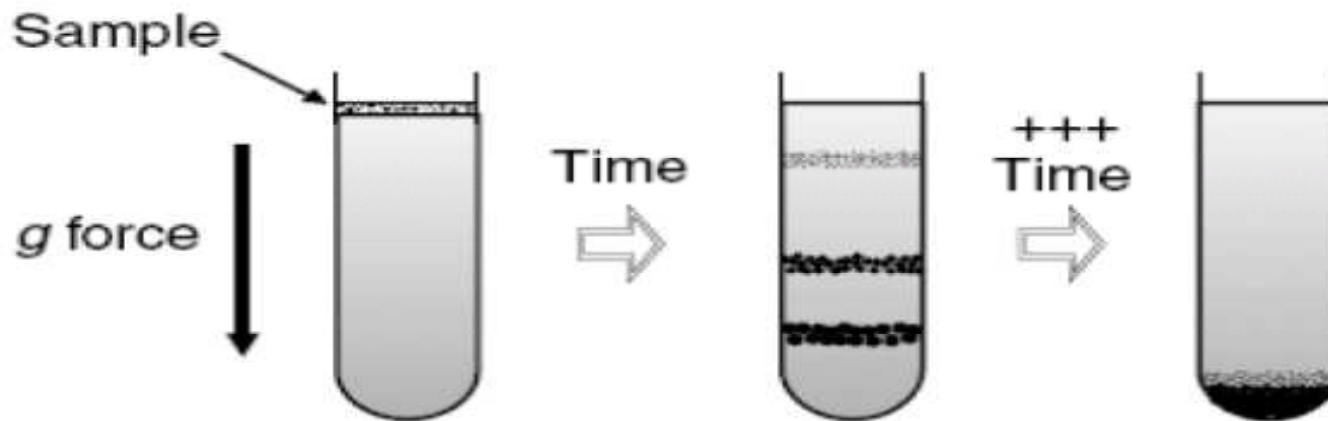
Metoda

Izopyktnická

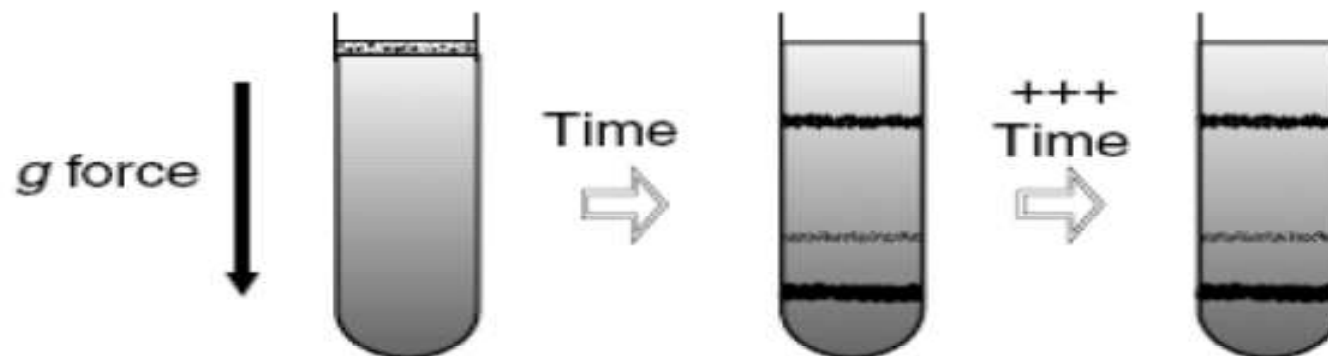
Nerovnovážná

Gradientová centrifugace

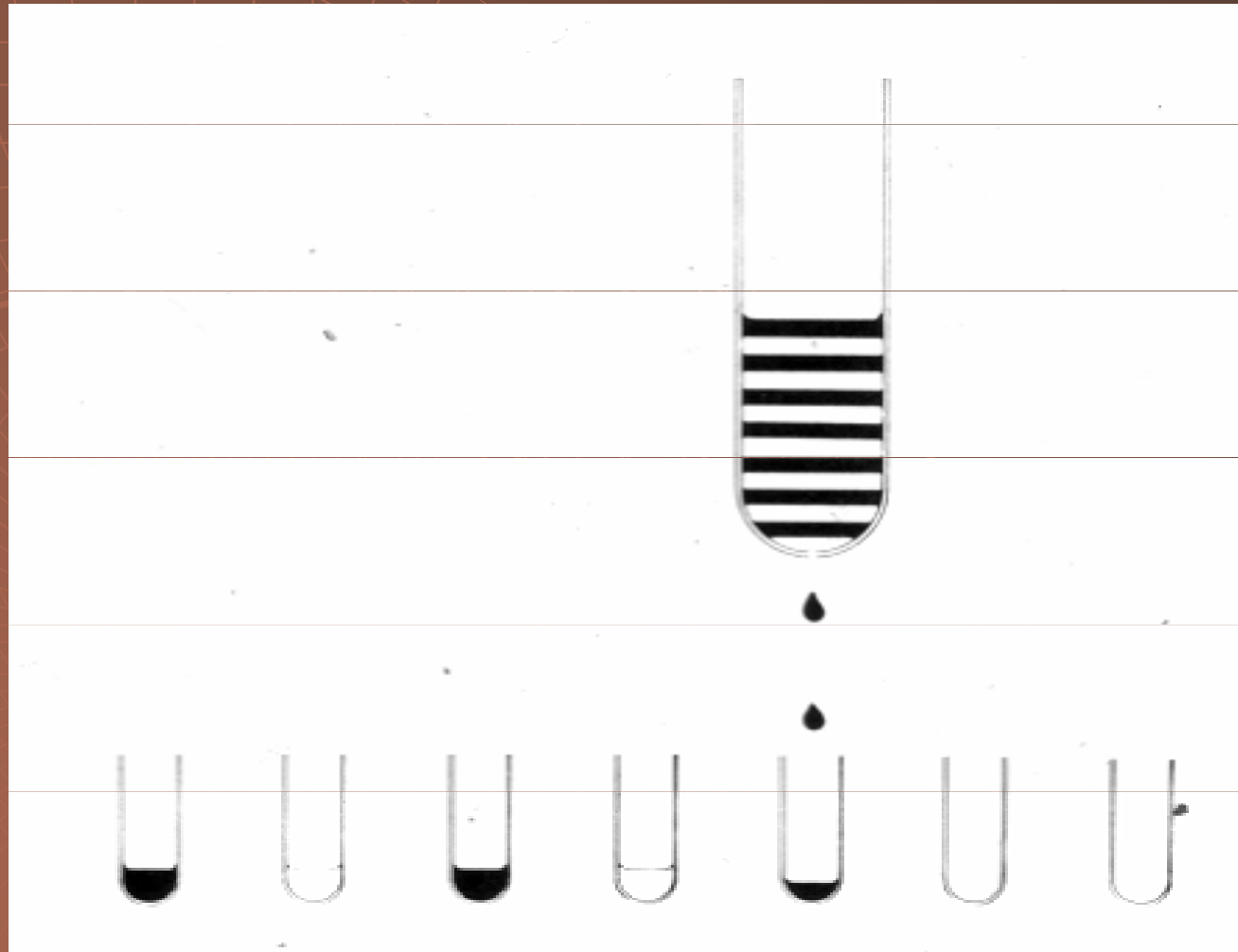
Rate-zonal centrifugation



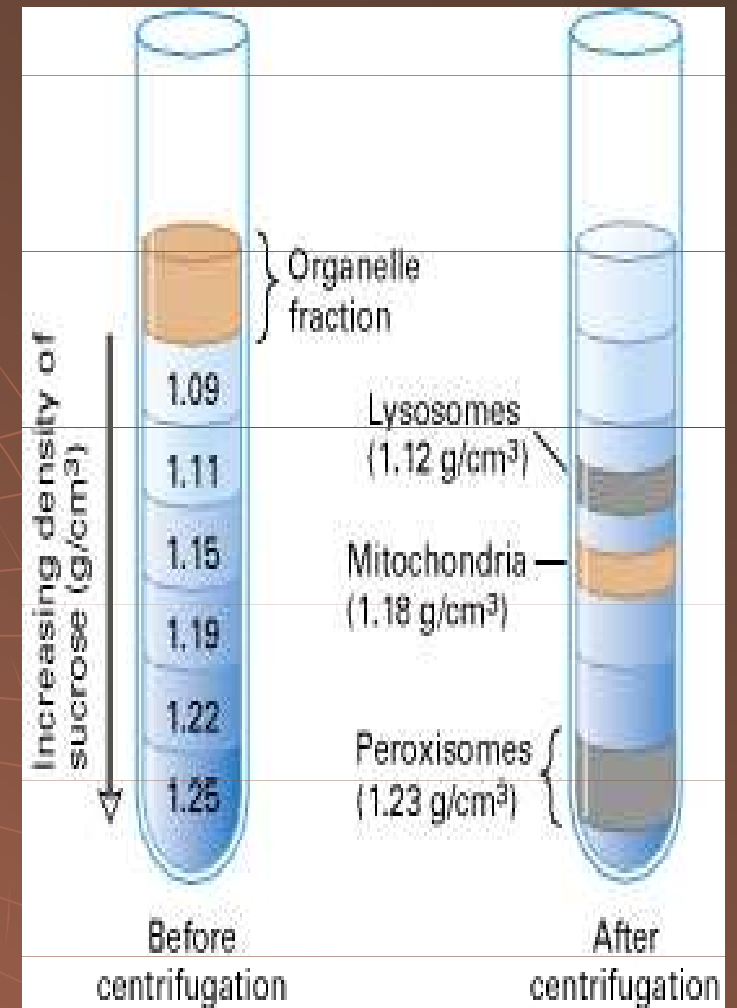
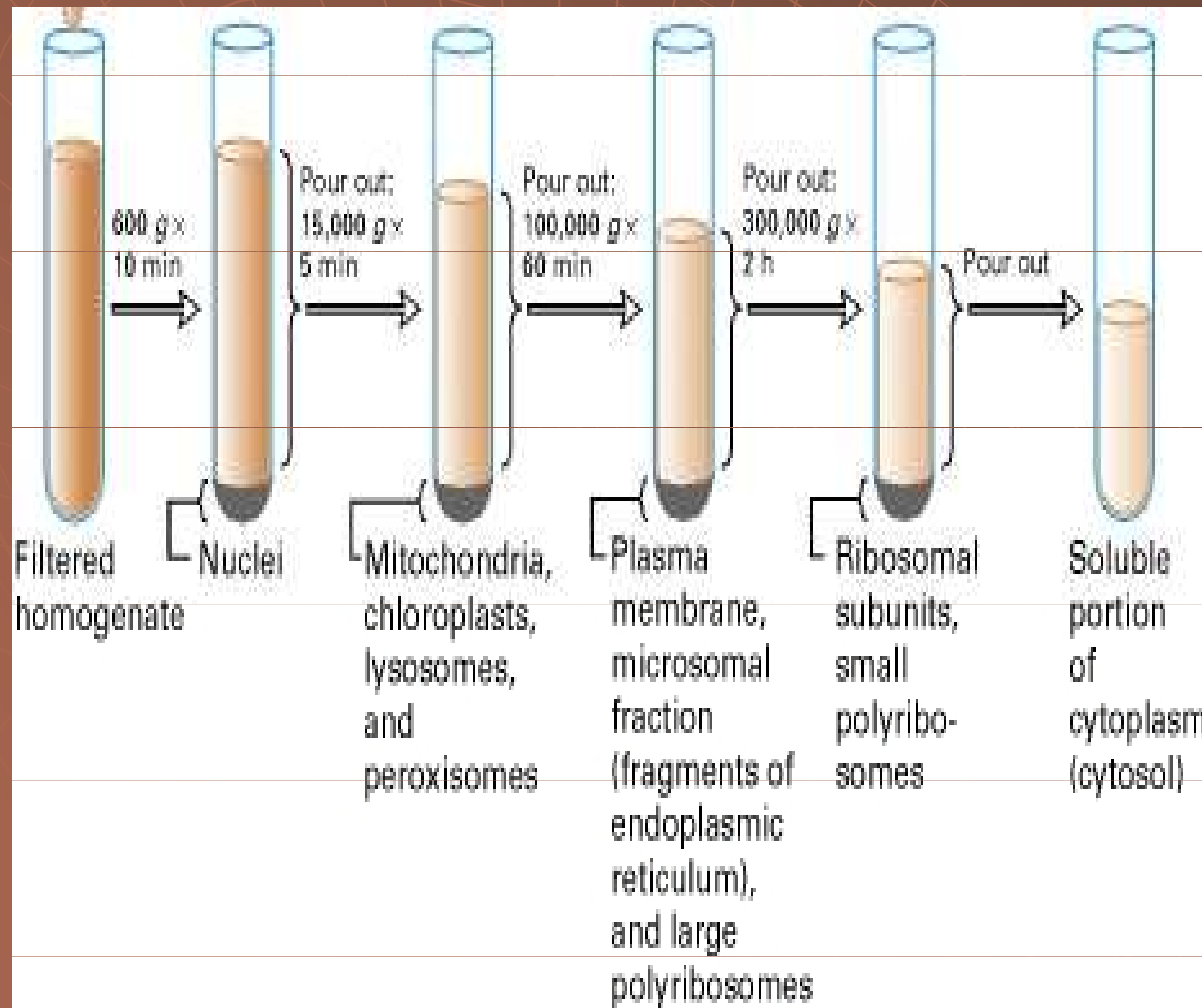
Isopycnic centrifugation



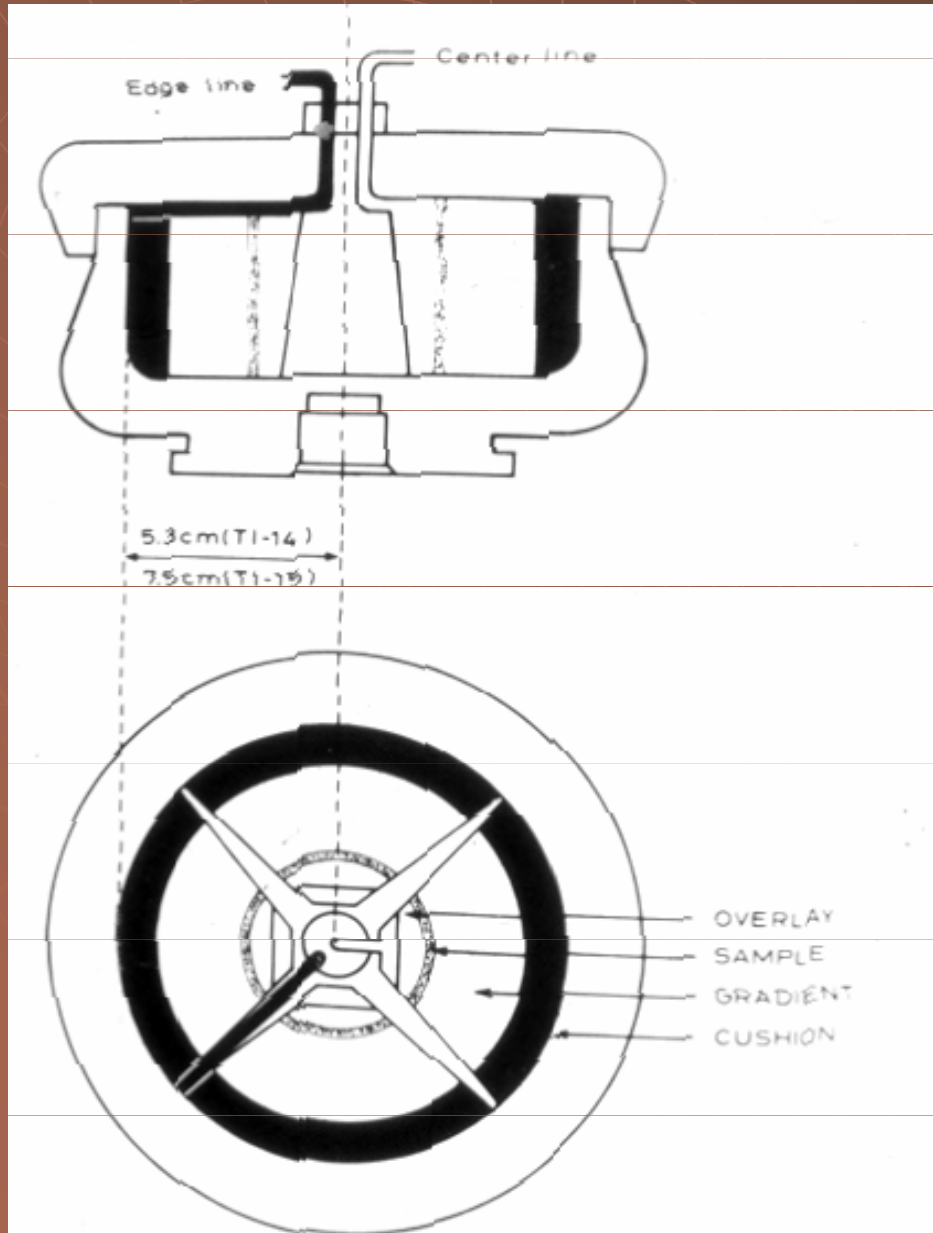
Gradientová centrifugace



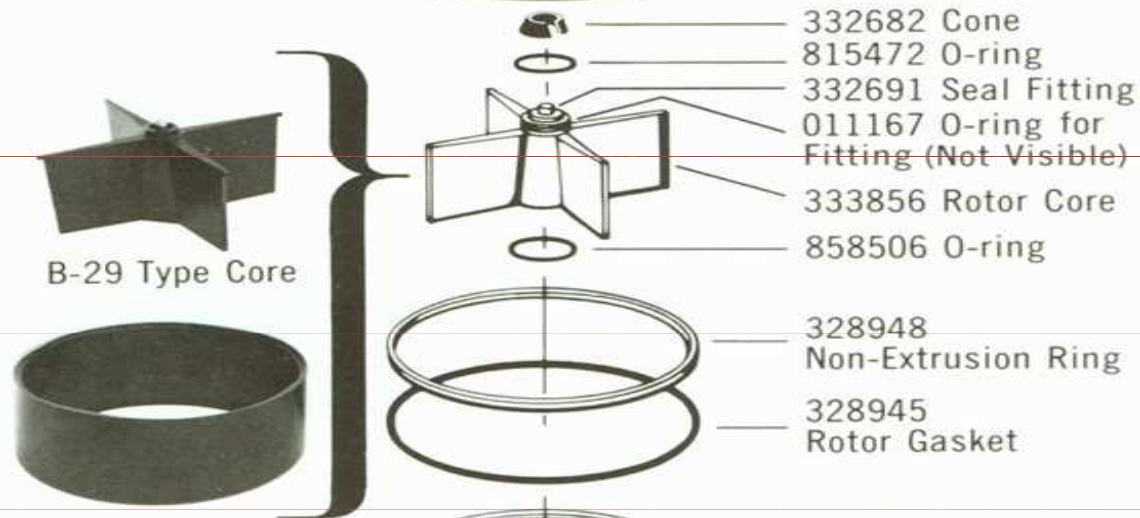
Diferenciální versus gradientová centrifugace



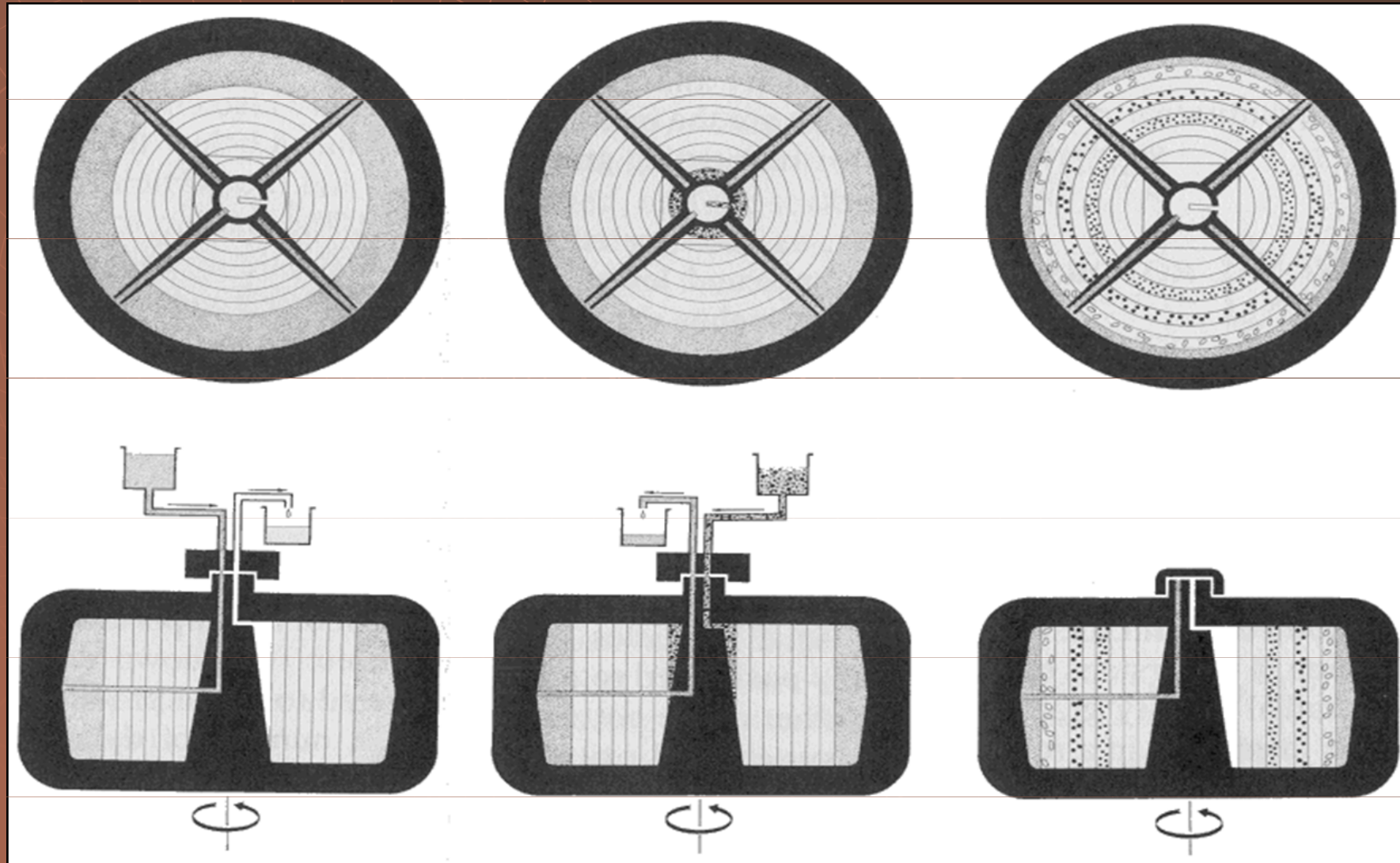
Zonální rotor



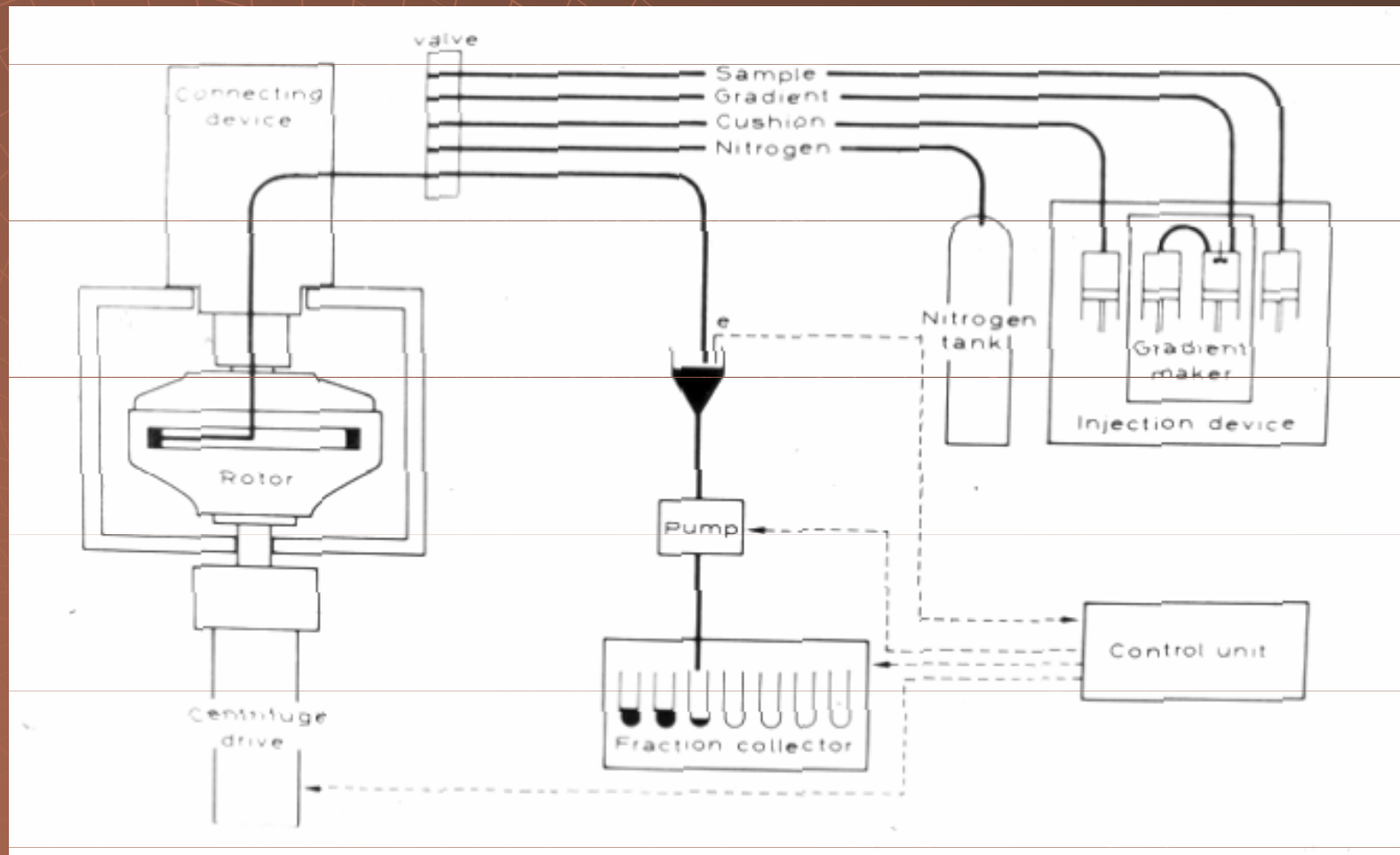
Zonální rotor



Centrifugace se zonálním rotorem

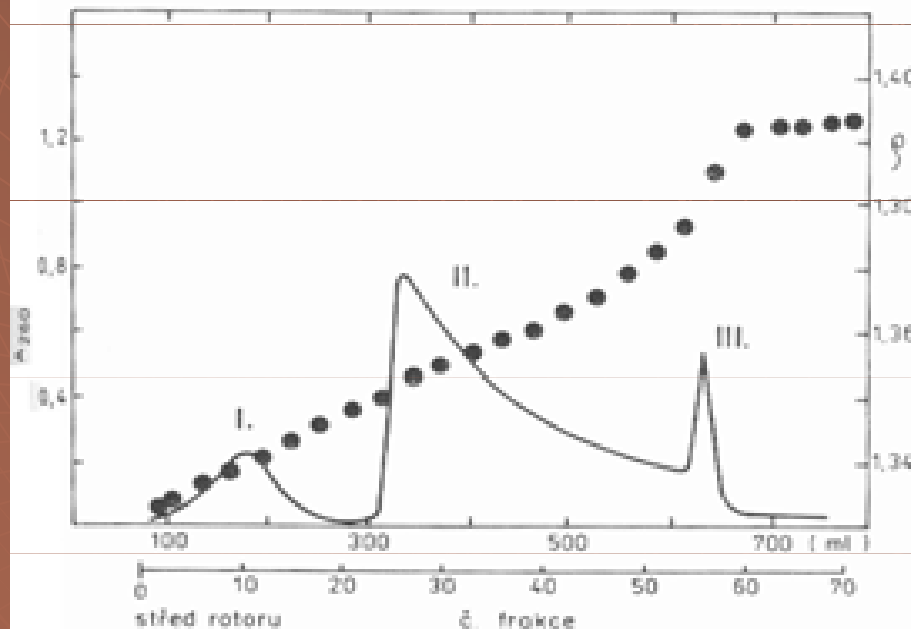


Centrifugace se zonálním rotorem



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

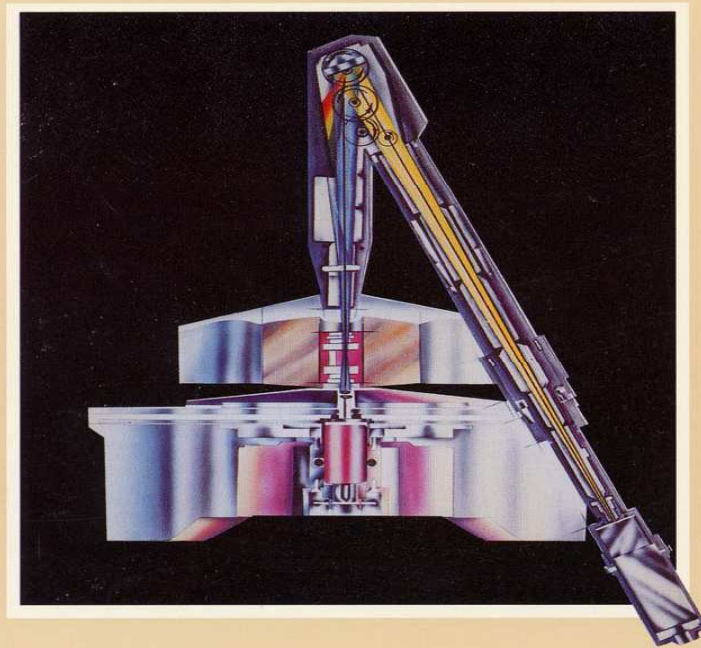
Bílkoviny + RNA
2,5 S

DNA
26 -35 S

agregáty DNA

Analytická ultracentrifugace

Introduction
to
Analytical Ultracentrifugation



BECKMAN

Analytická ultracentrifugace

Chem. Listy 104, 1155–1162 (2010)

Referát

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., Vítězná 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, sedimentačního koeficientu a dalších hydrodynamických vlastností. 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 výřtu 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. Tento referát je publikován ve zkrácené verzi, plnou verzi dvojnásobného rozsahu lze stáhnout ze stránek katedry biochemie UK PíF, <http://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/sluzby>.

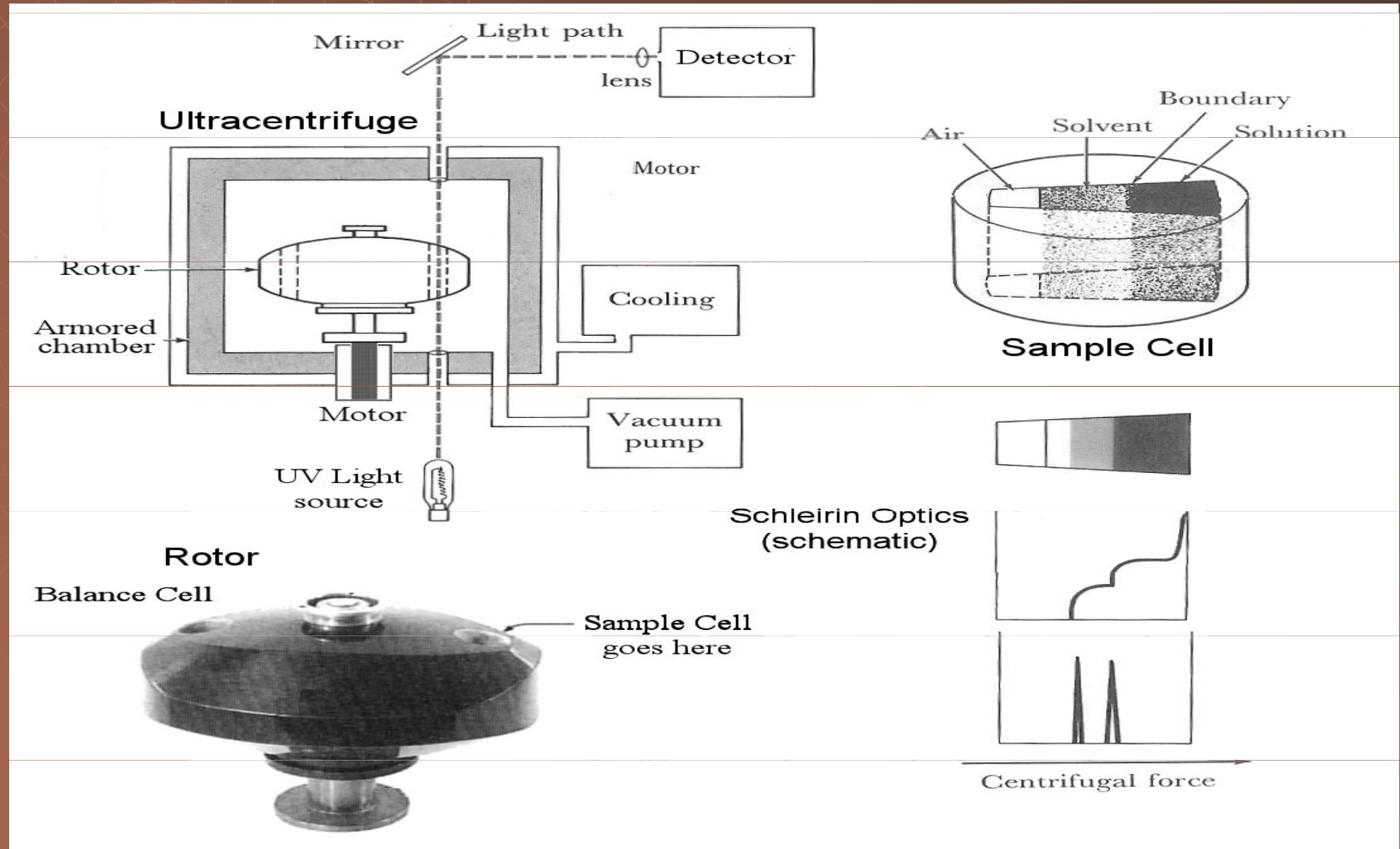
2. Historie analytické ultracentrifugy

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. Spolu s čtyřmi spolupracovníky studoval fyzikální vlastnosti koloidů, zejména jejich difúzi, absorpci světla a sedimentaci, což mu umožnilo potvrdit, že termodynamické zákony plynů lze aplikovat také na disperzní systémy. Pro studium sedimentace sestavil 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.

3. Přístroj a jeho parametry

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 × 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 štěrbiny 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, resp. do něhož je převe-

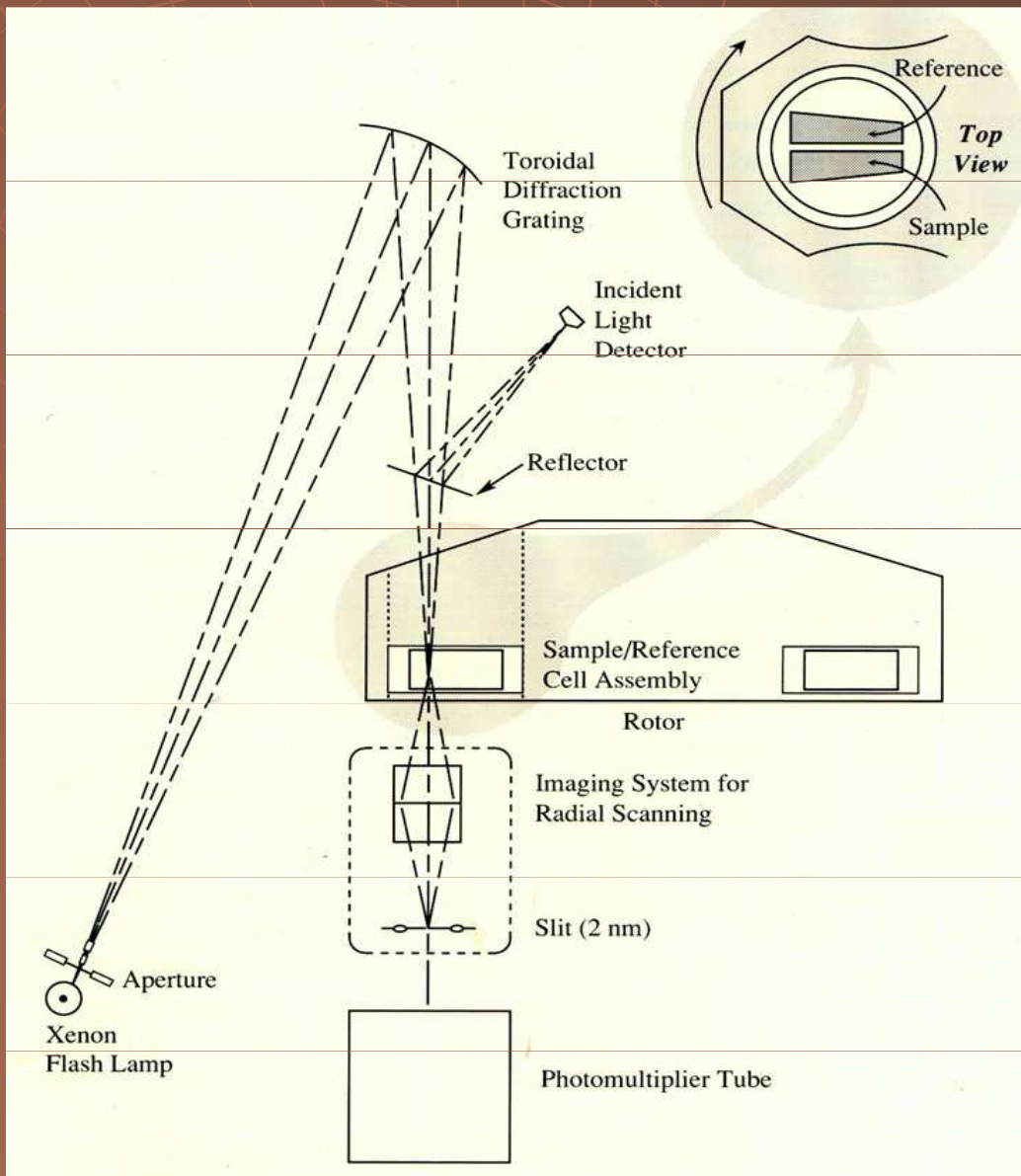
Analytická ultracentrifugace



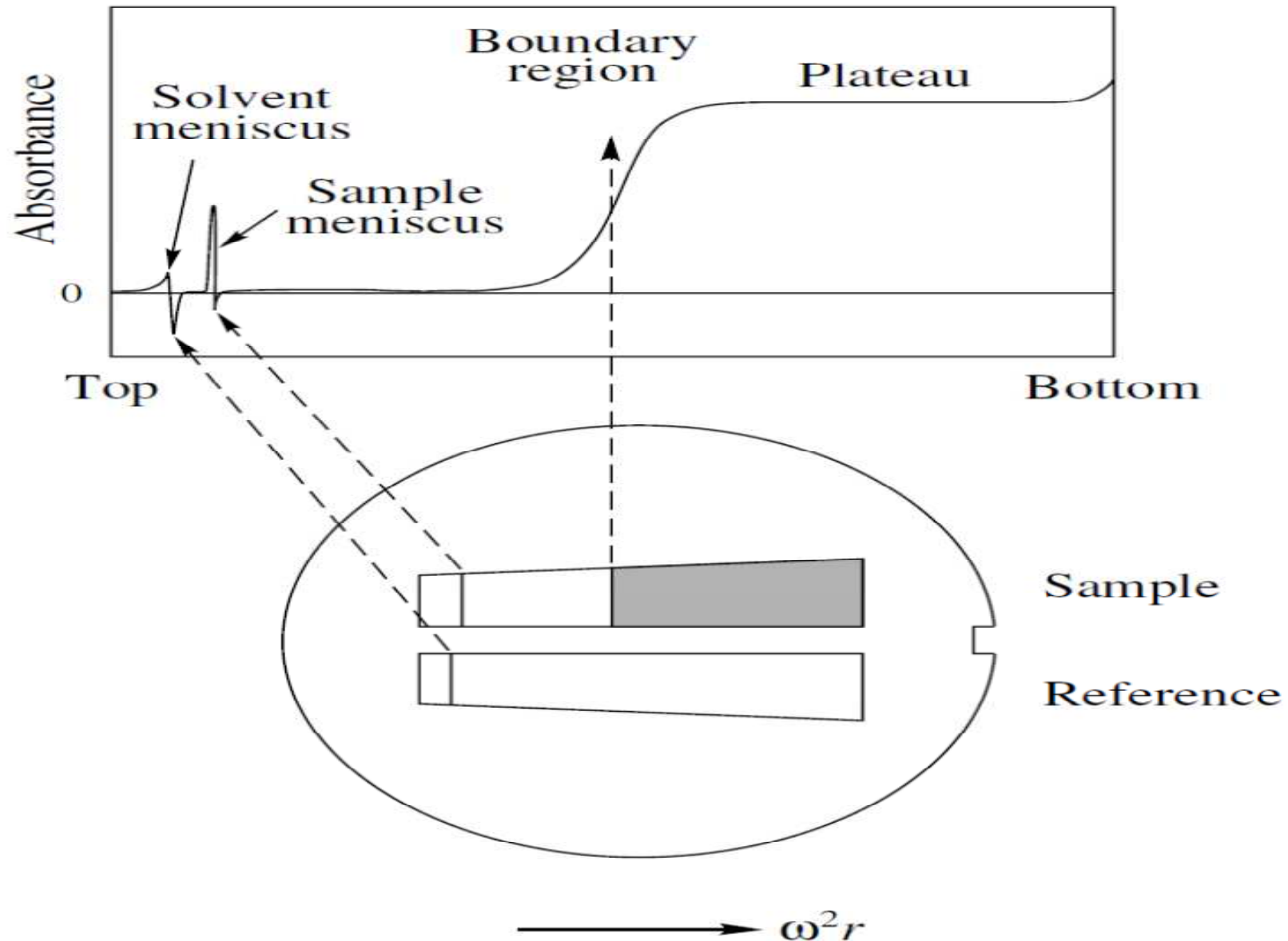
Analytická ultracentrifuga



Optický systém



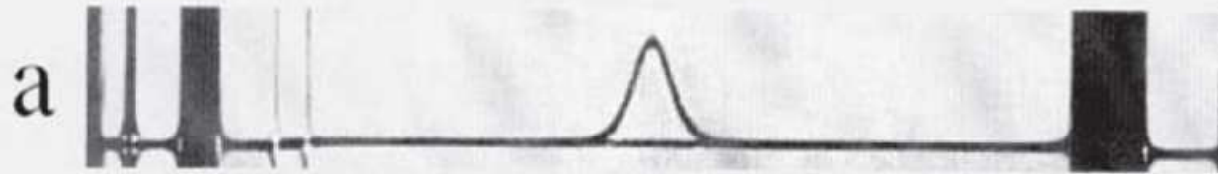
Optický systém



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)

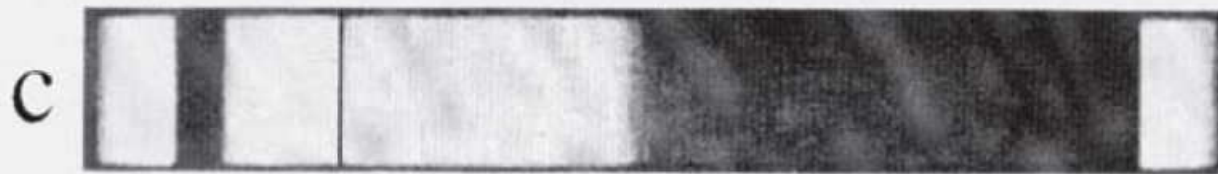
Optický systém



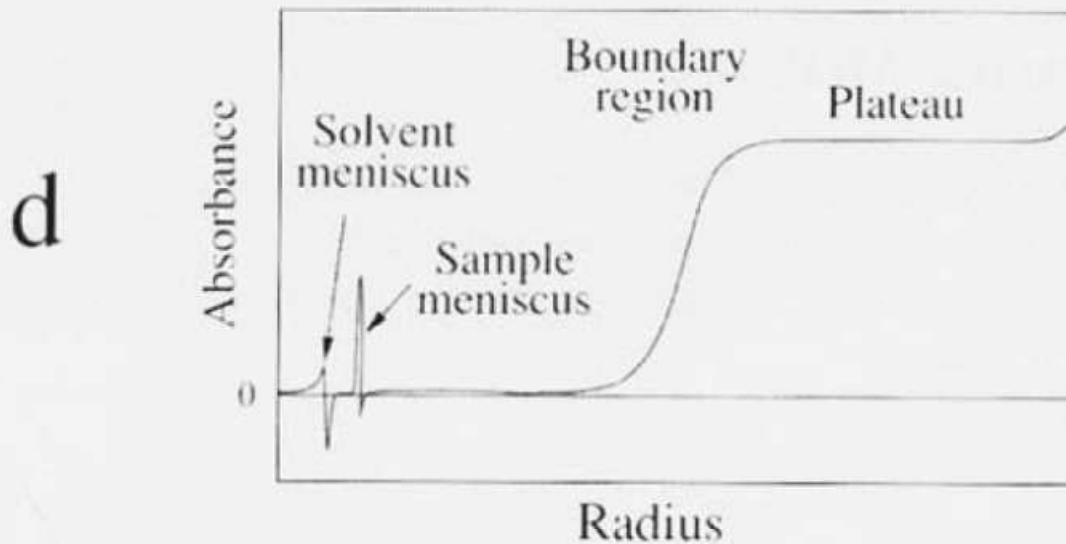
Zkřížená optika



Interferenční optika



Fotografický systém



Absorbční systém

Analytická ultracentrifugace



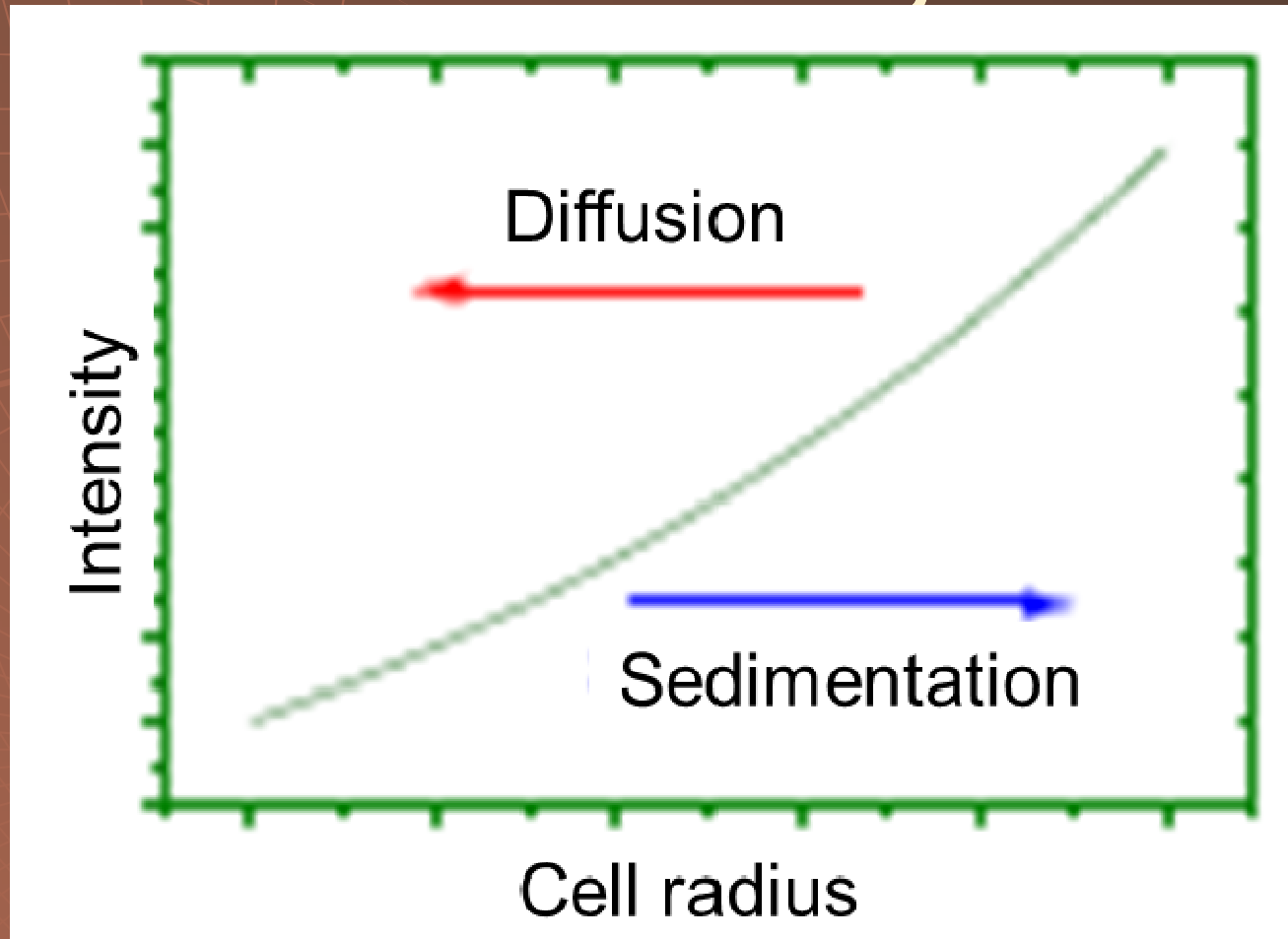
Metoda

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

sedimentační rovnováhy

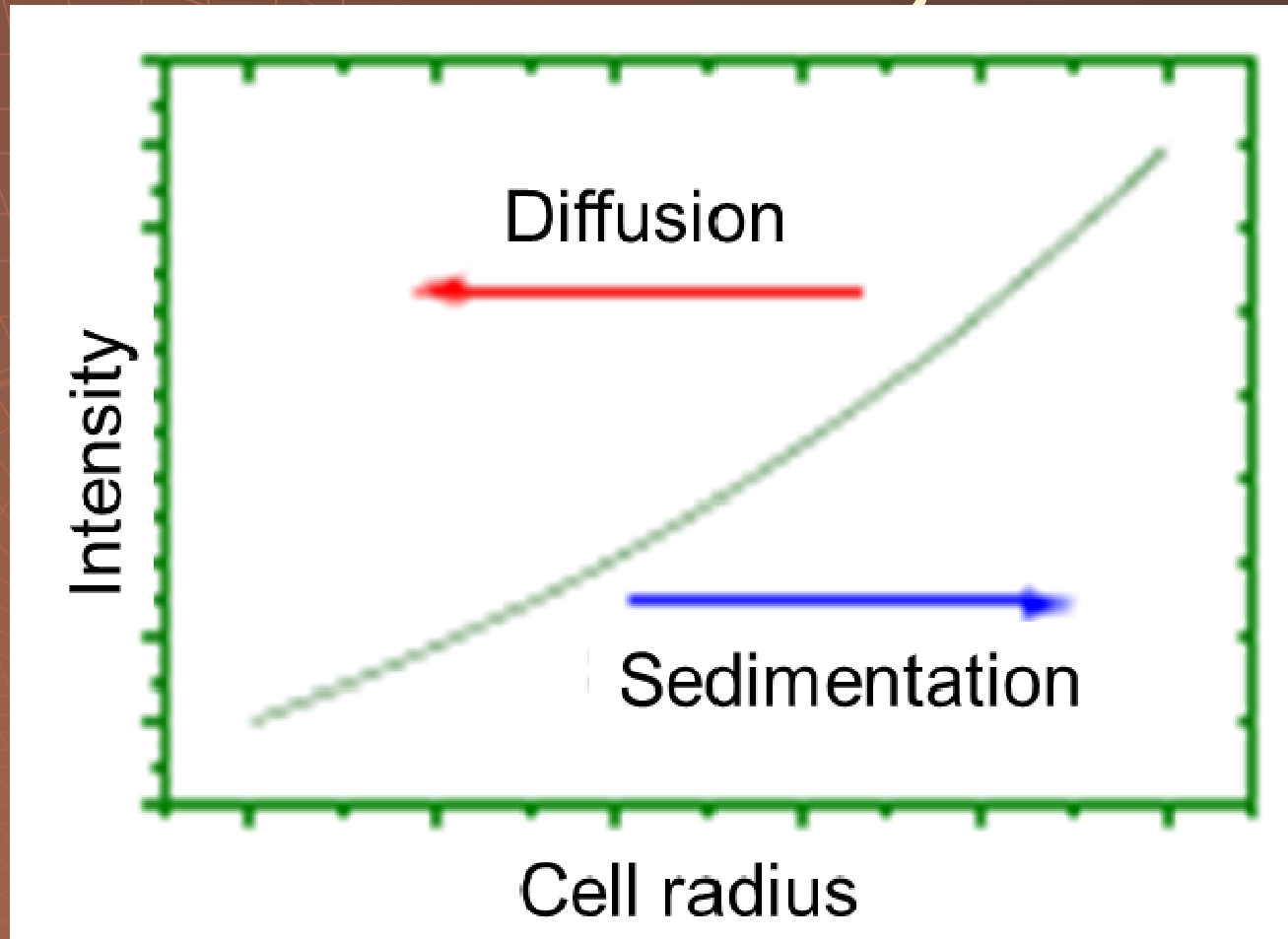
sedimentační rychlosti

Metoda sedimentační rovnováhy



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

Metoda sedimentační rovnováhy



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

M_r - molární hmotnost

ω - úhlová rychlost

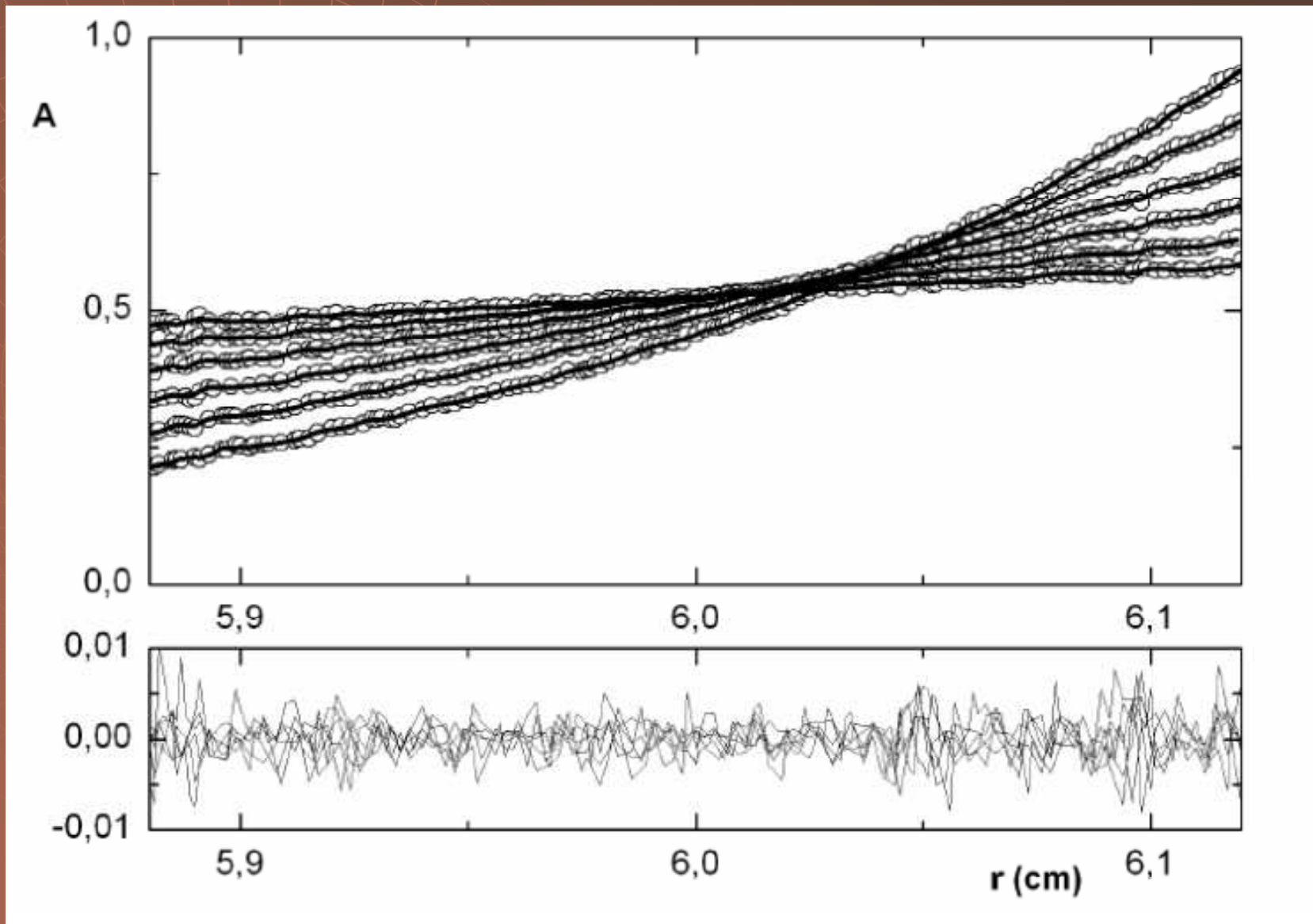
x - vzdálenost od osy otáčení

V - parciální objem

ρ - hustota roztoku

c - koncentrace

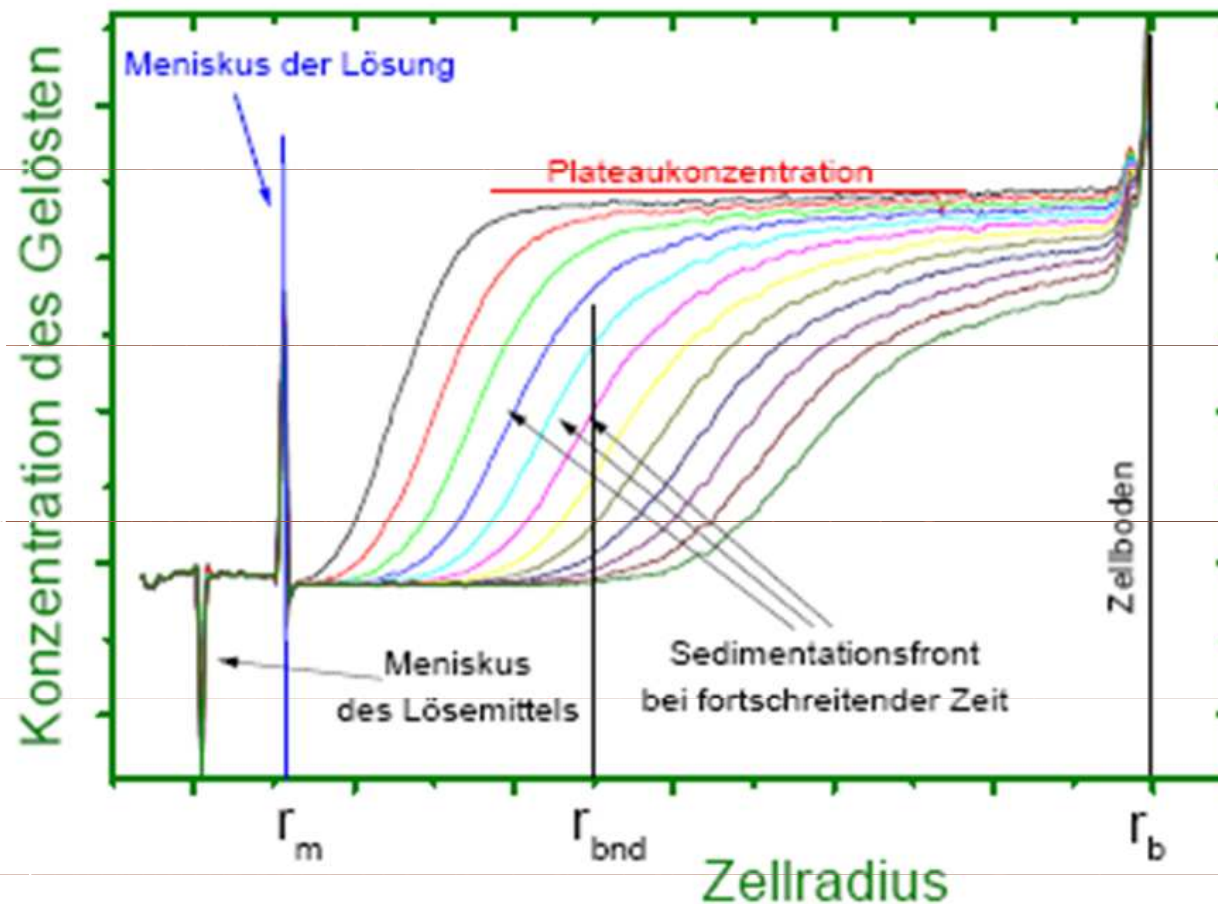
Metoda sedimentační rovnováhy



Metoda sedimentační rovnováhy

- ◆ Termodynamické informace (závisí na M_r)
- ◆ Experimentálně lze stanovit :
 - Relativní molekulovou hmotnost – sacharosa M_r ($M_r = 360$) až po viry ($M_r =$ mnoho milionů)
 - Stav molekul v roztoku - asociace
 - Rovnovážné konstanty v roztoku K
→ výpočet volné energie asociačních reakcí

Metoda sedimentační rychlosti



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

M_r - molární hmotnost

ω - úhlová rychlost

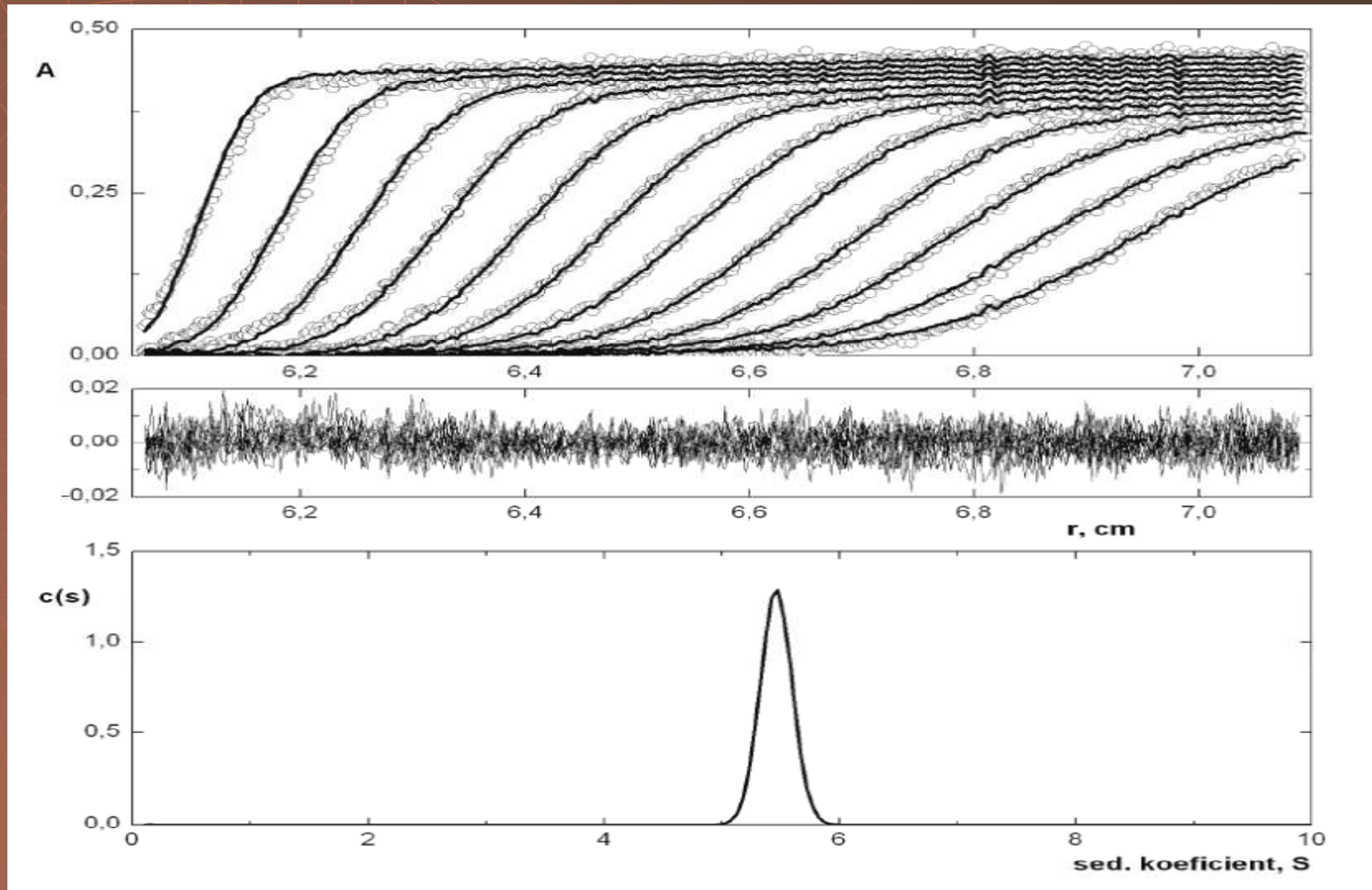
x - vzdálenost od osy otáčení

V - parciální objem

ρ - hustota roztoku

f - frikční koeficient

Metoda sedimentační rychlosti



Metoda sedimentační rychlosti

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