

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

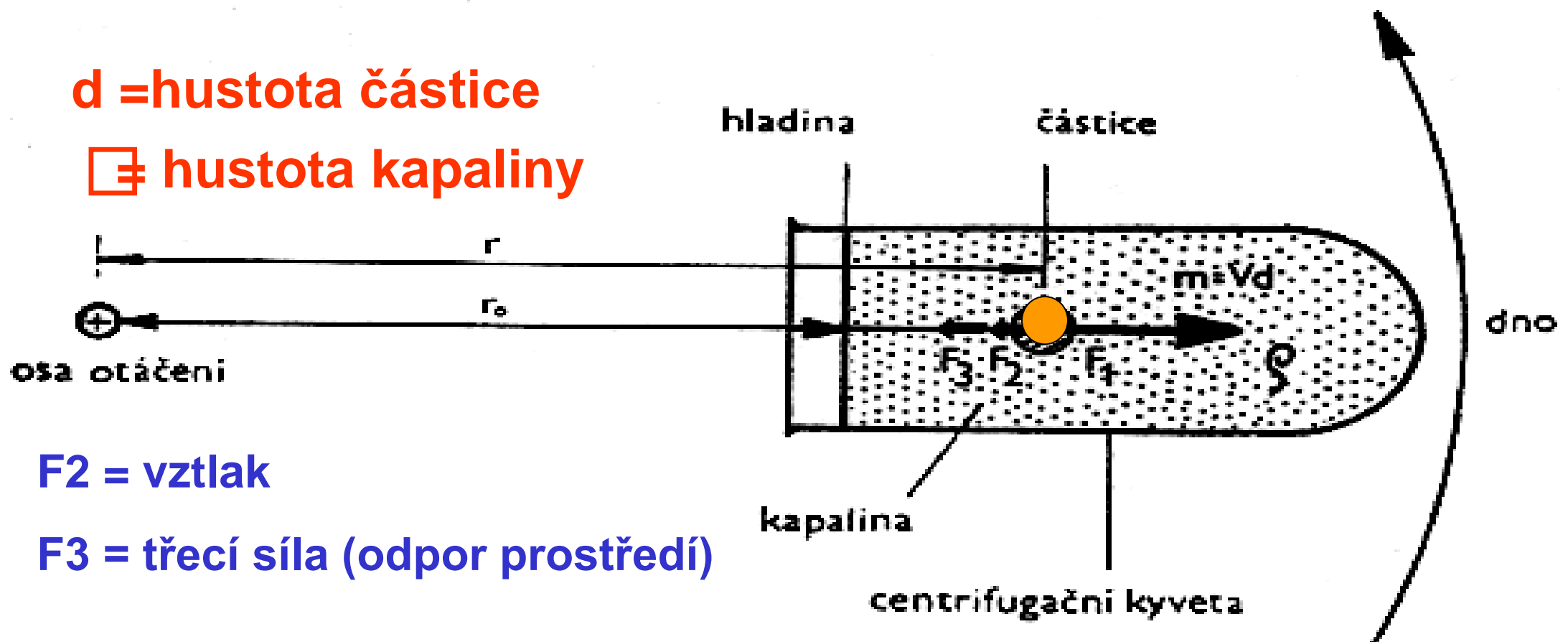
$$F_1 = m \omega^2 r \quad \omega = 2\pi n \quad n = \text{rpm}$$

ω - úhlová rychlost

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

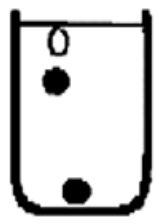
zonální centrifugace v hustotním gradientu

diferenciální centrifugace



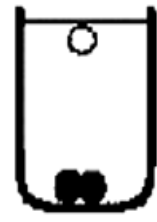
směs látek v roztoku

centrifugace při nízkých otáčkách (1 000 g)



shromáždění sedimentu

centrifugace supernatantu při středních otáčkách (20 000 g)



shromáždění sedimentu

centrifugace supernatantu při vysokých otáčkách (80 000 g)

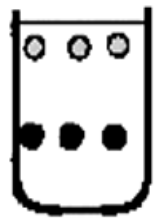


izokinetická centrifugace



vzorek nanesený na povrch 5 - 20 % sacharóзовého gradientu

centrifugace



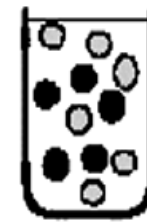
pomaleji sedimentující částice
rychleji sedimentující částice

frakcionace obsahu zkumavky



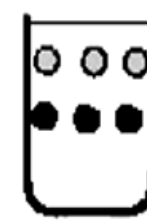
sběr frakcí

izopyknická centrifugace



roztok CsCl obsahující směs částic

centrifugace



částice s nižší hustotou
částice s vyšší hustotou

frakcionace obsahu zkumavky



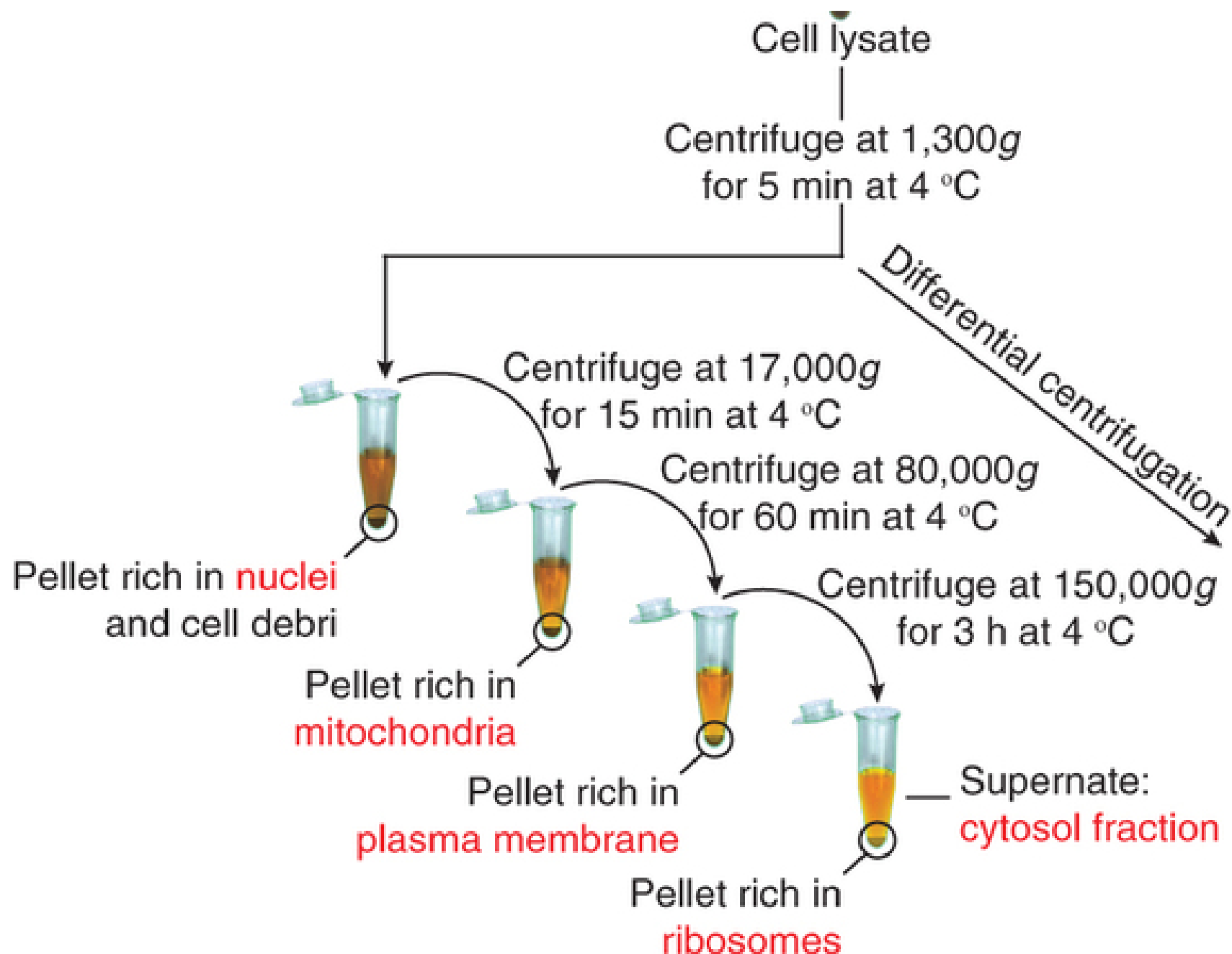
sběr frakcí

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

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

Využití: charakterizace informačních makromolekul buněčných organel apod.

Hodnoty S (v rozpětí 10^{-13} - 200×10^{-13})

např. $30S = 30 \times 10^{-13} s$

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

Příprava lineárního sacharóзовého gradientu

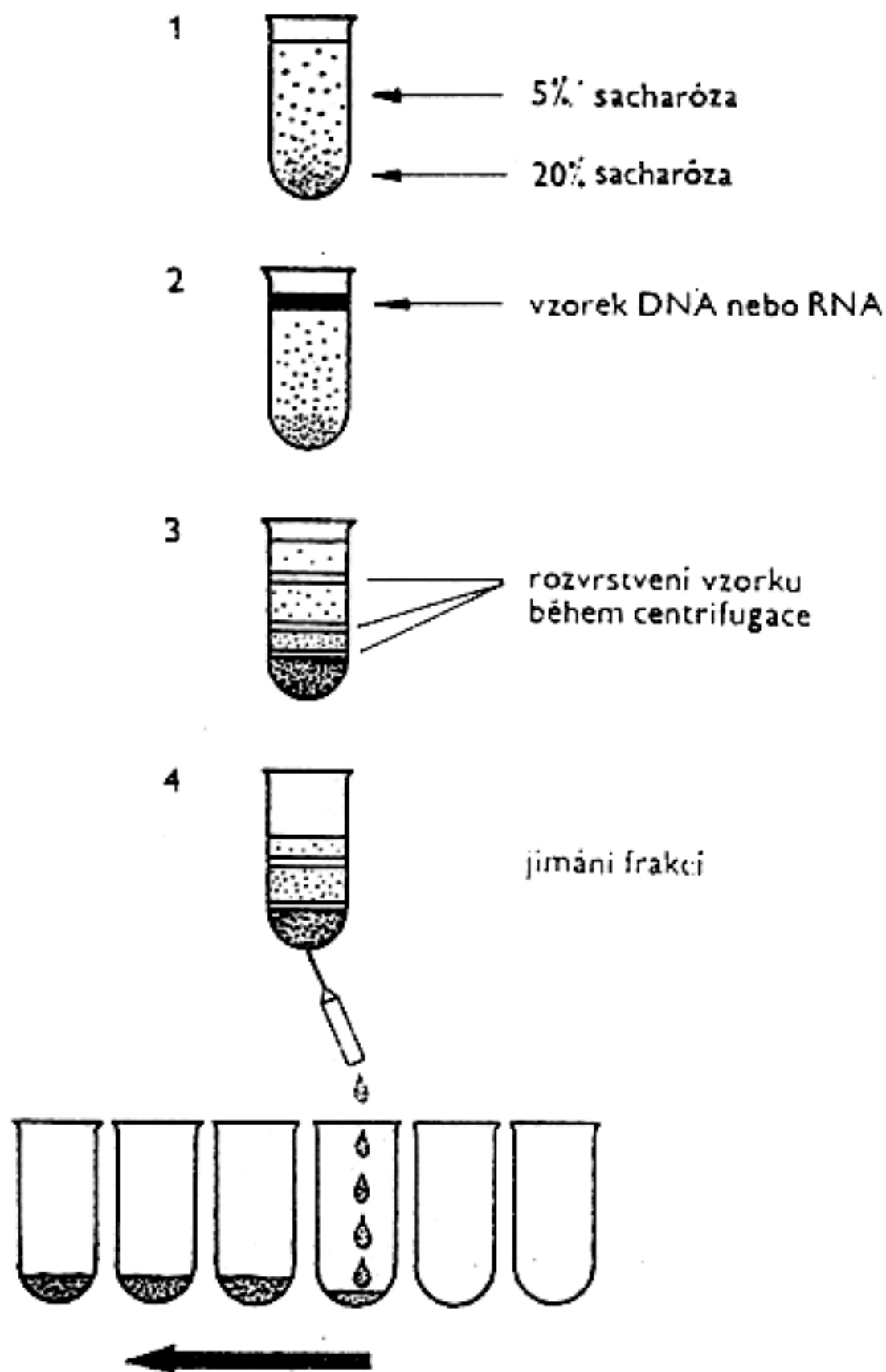
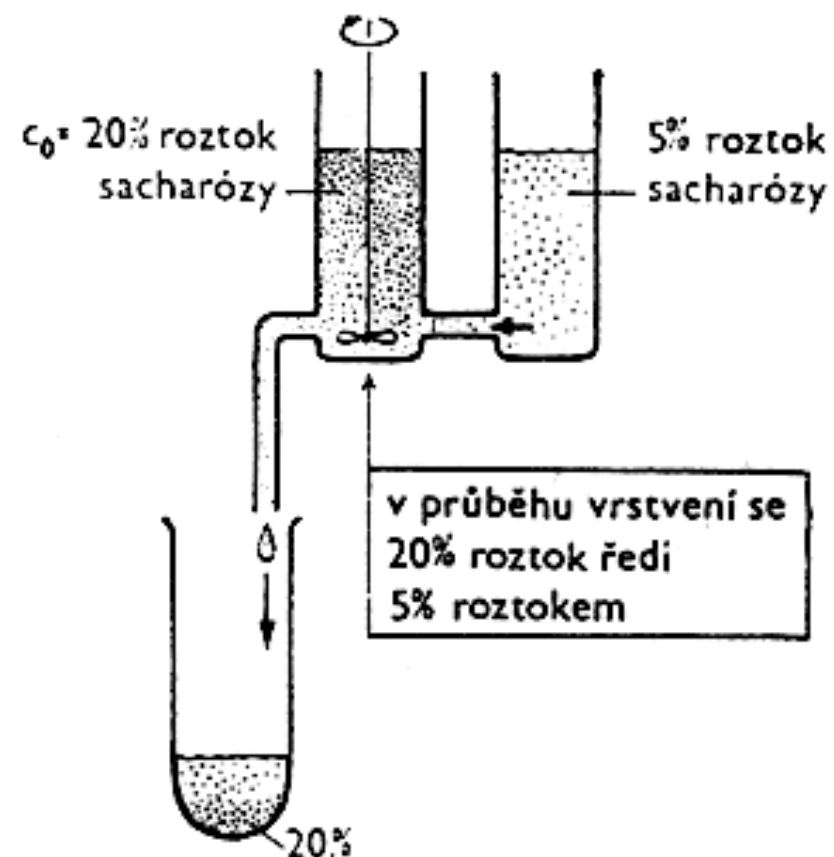


Schéma ultracentrifugace
v sacharóзовém gradientu



Zařízení na vrstvení lineárního
sacharóзовého gradientu

Izopyknická centrifugace

Na začátku může být 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