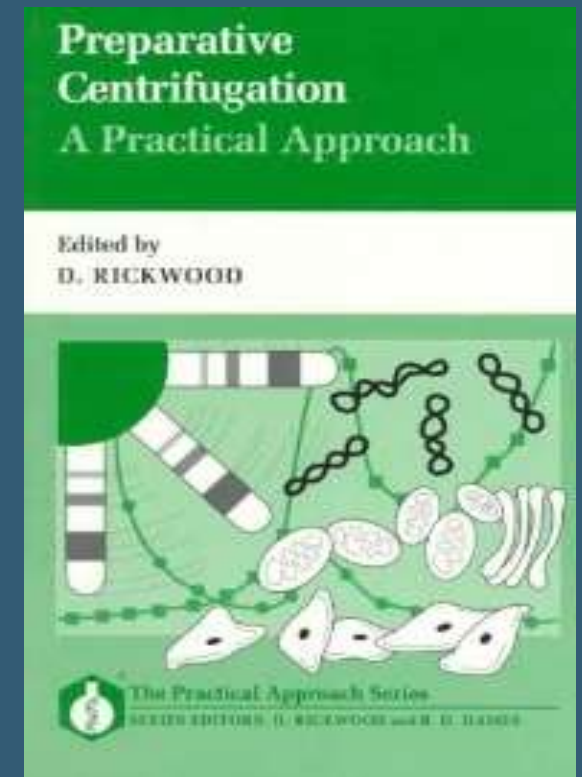
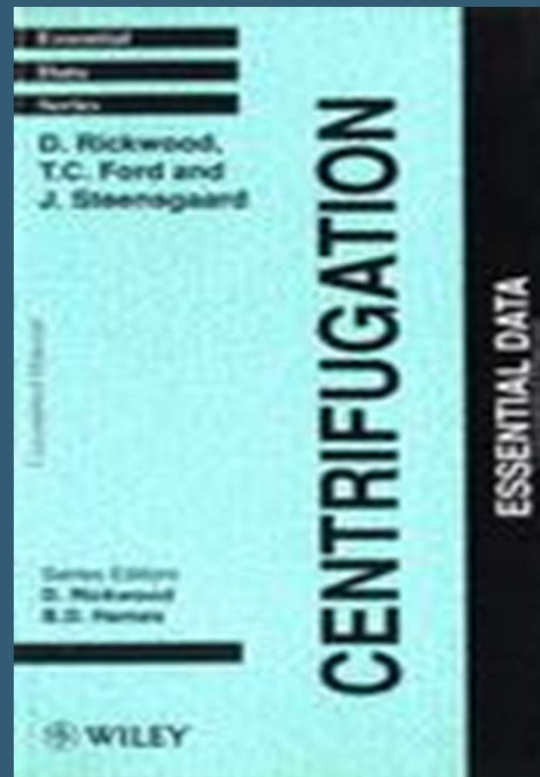
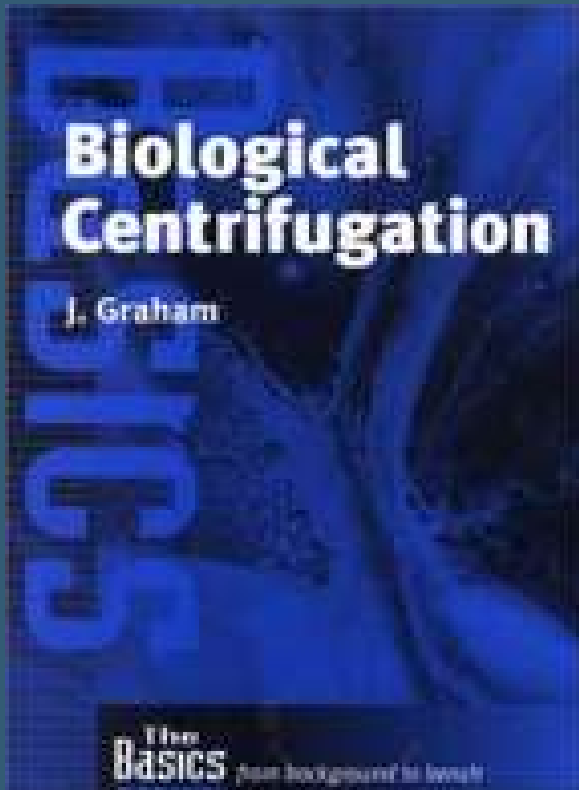


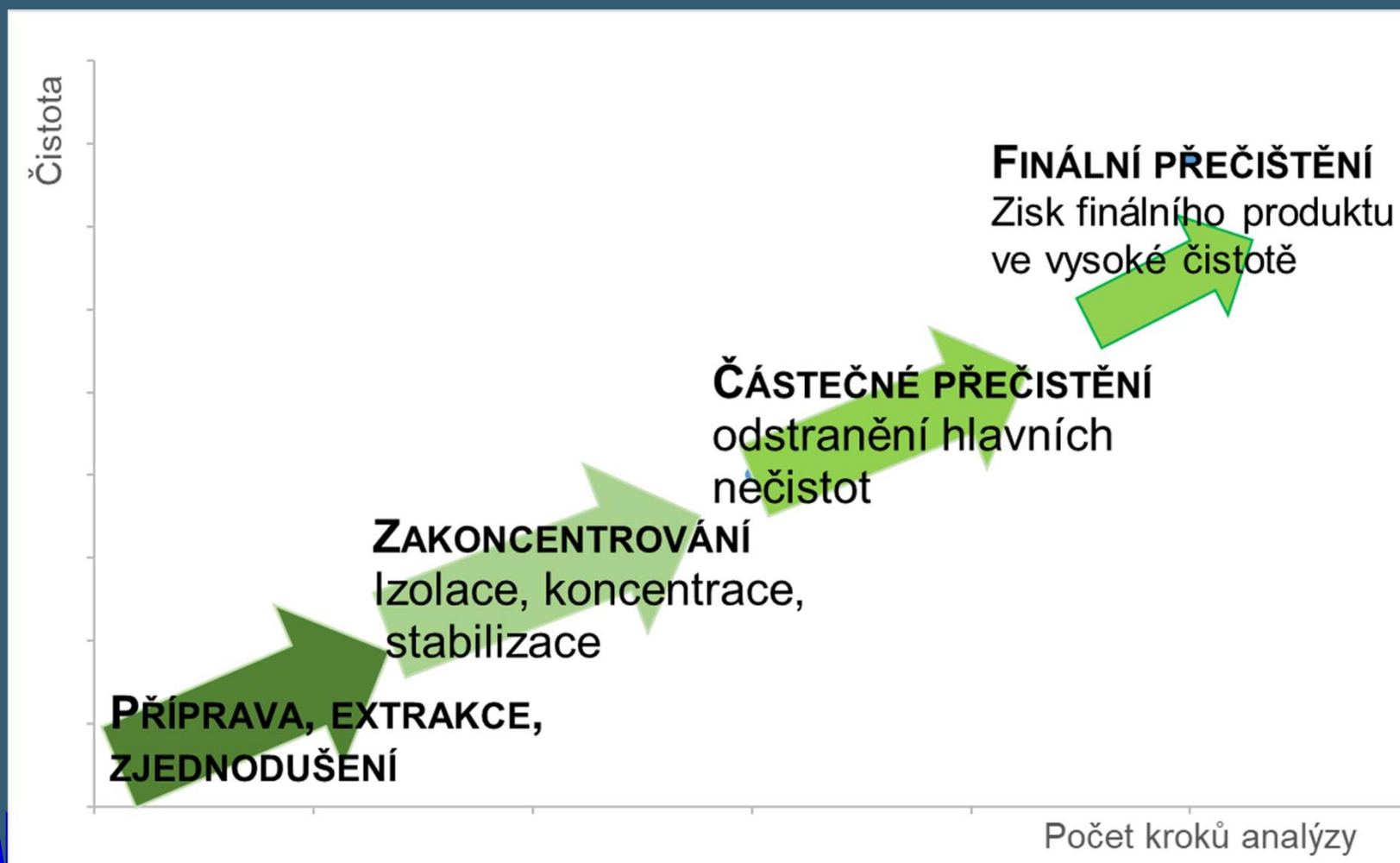
# CENTRIFUGACE

# LITERATURA



MUNI  
SCI

# PURIFIKAČNÍ STRATEGIE



# SEPARAČNÍ METODY

- A Separace založené na velikosti molekul  
Dialýza a ultrafiltrace, centrifugace v hustotním gradientu, gelová permeační chromatografie, SDS-PAGE
- B Separace založené na rozdílech v rozpustnosti  
Izoelektrická precipitace, vysolování neutrálními solemi, frakcionace organickými rozpouštědly
- C Separace založené na základě povrchového náboje  
Elektroforetické metody, iontově výměnná chromatografie, afinitní chromatografie

# CENTRIFUGACE

**Urychlit sedimentaci pevných částic v kapalném prostředí.**

**Na sedimentaci má vliv**

1. vlastnost látky: velikost, tvar, hustota
2. vlastnost prostředí (rozpouštědla):  
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



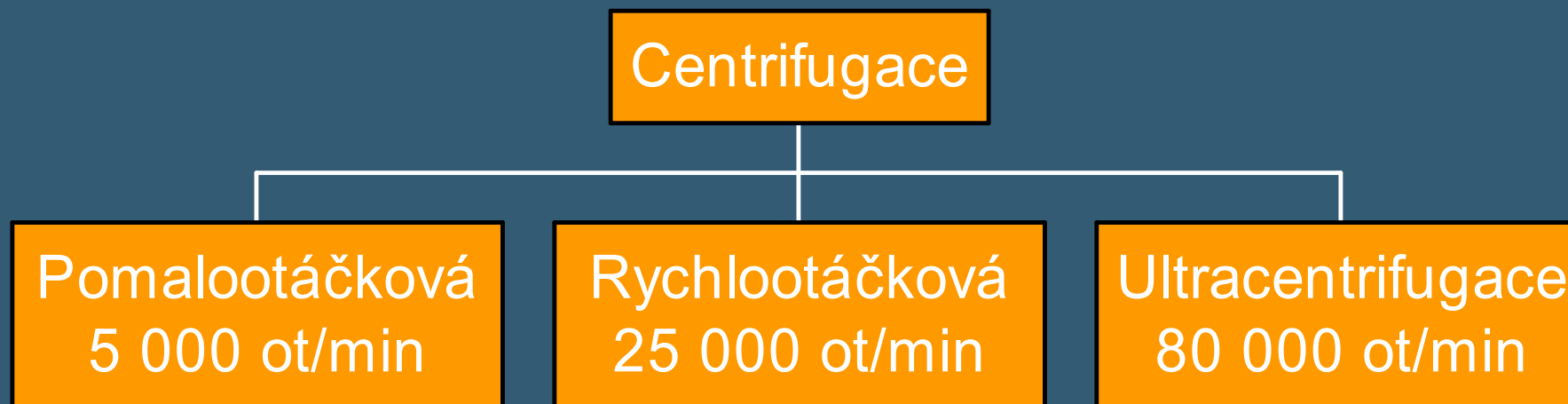
# CENTRIFUGACE - POUŽITÍ

## PREPARATIVNÍ

## ANALYTICKÉ

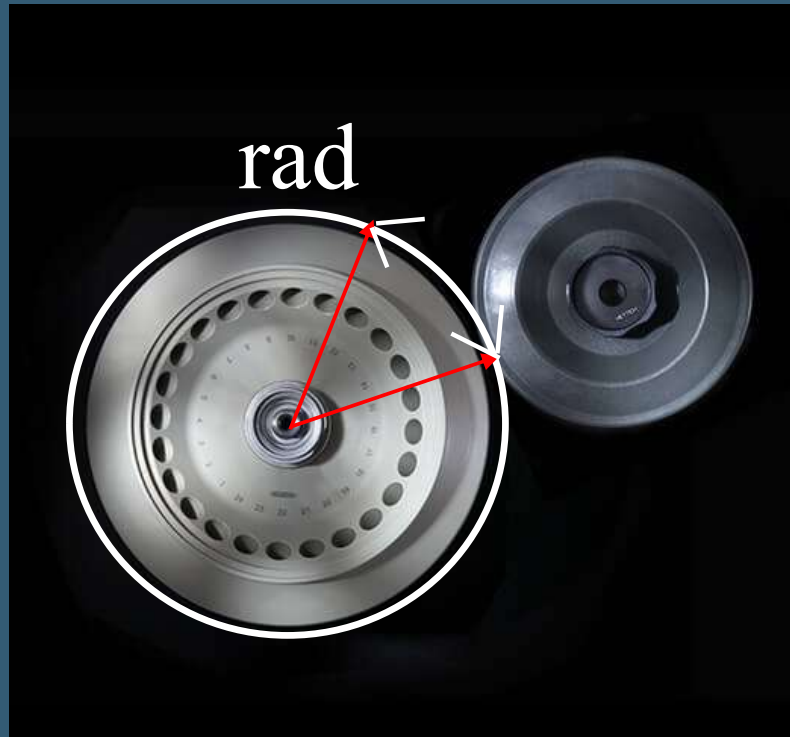
- Odstranění hrubých částic z roztoku  
Sediment (pelet) X supernatant
- Izolace organel nebo biomakromolekul
- Stanovení základních parametrů – MW, hustota, sedimentační koeficient

# ROZDĚLENÍ CENTRIFUG





# OTÁČKY → G



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

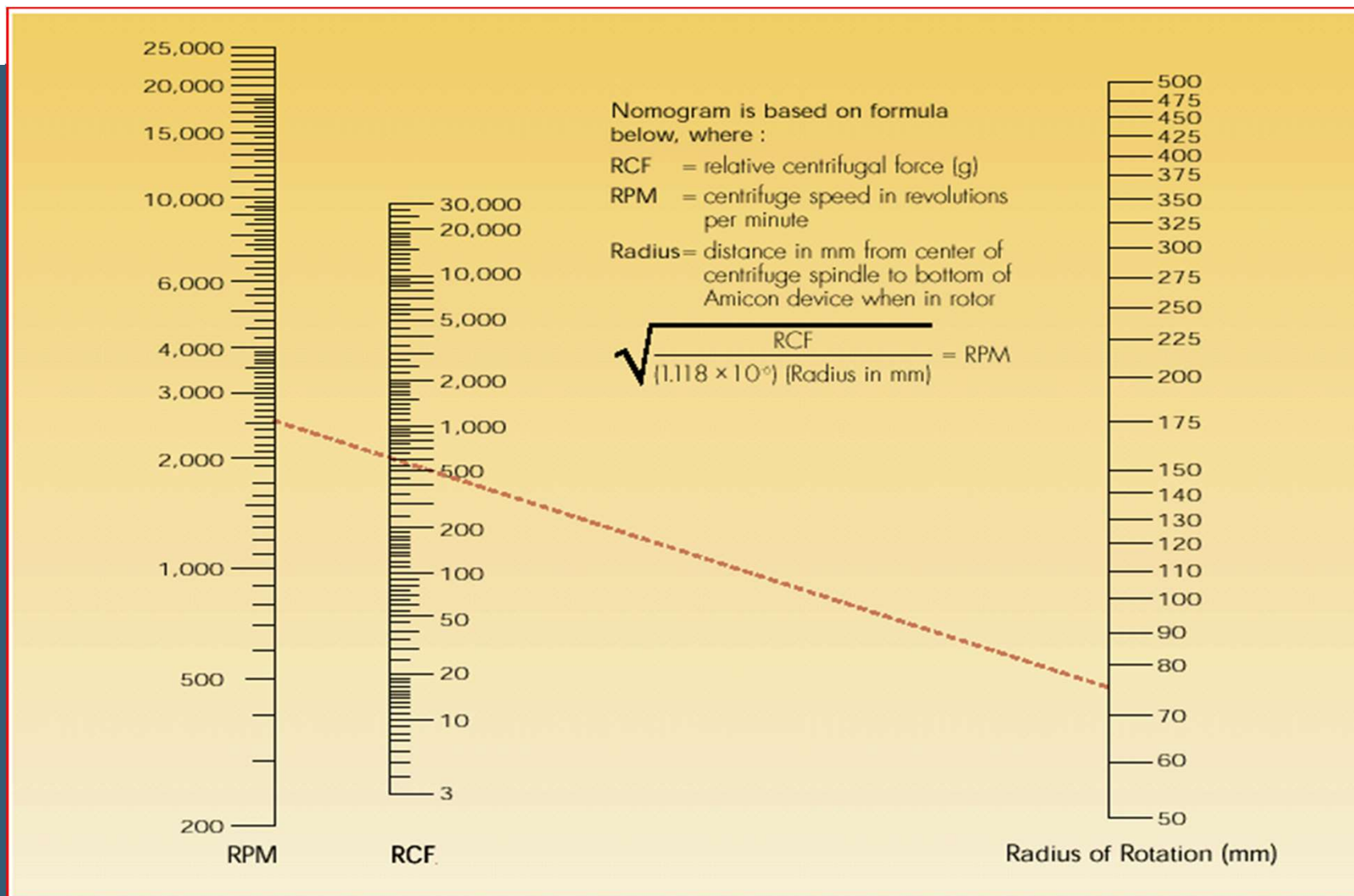
$\omega$  - úhlová rychlost  
(rad/s)

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

$f$  – otáčky/min

# OTÁČKY → G

## NOMOGRAM PRO PŘEPOČET RPM NA RCF



# PREPARATIVNÍ CENTRIFUGACE

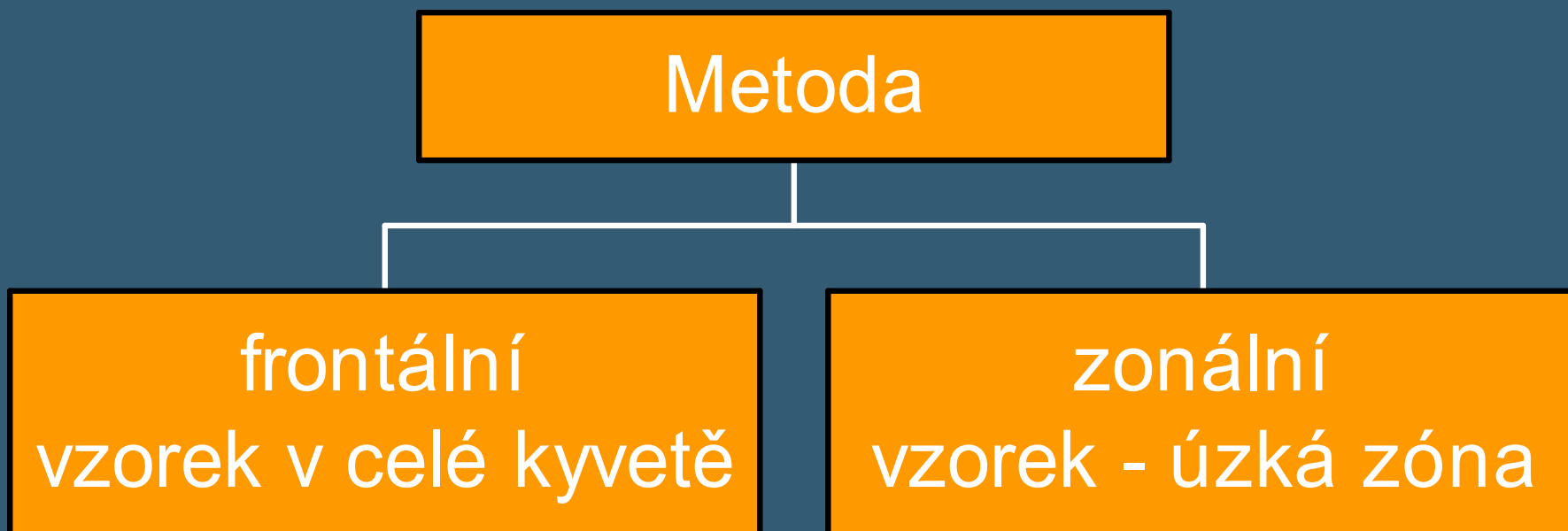
TYP  
centrifugace

```
graph TD; A[TYP centrifugace] --> B[DIFERENCIÁLNÍ  
- dvě fáze  
(sediment/supernatant)]; A --> C[ZONÁLNÍ  
- tvorba zón v  
hustotním gradientu]
```

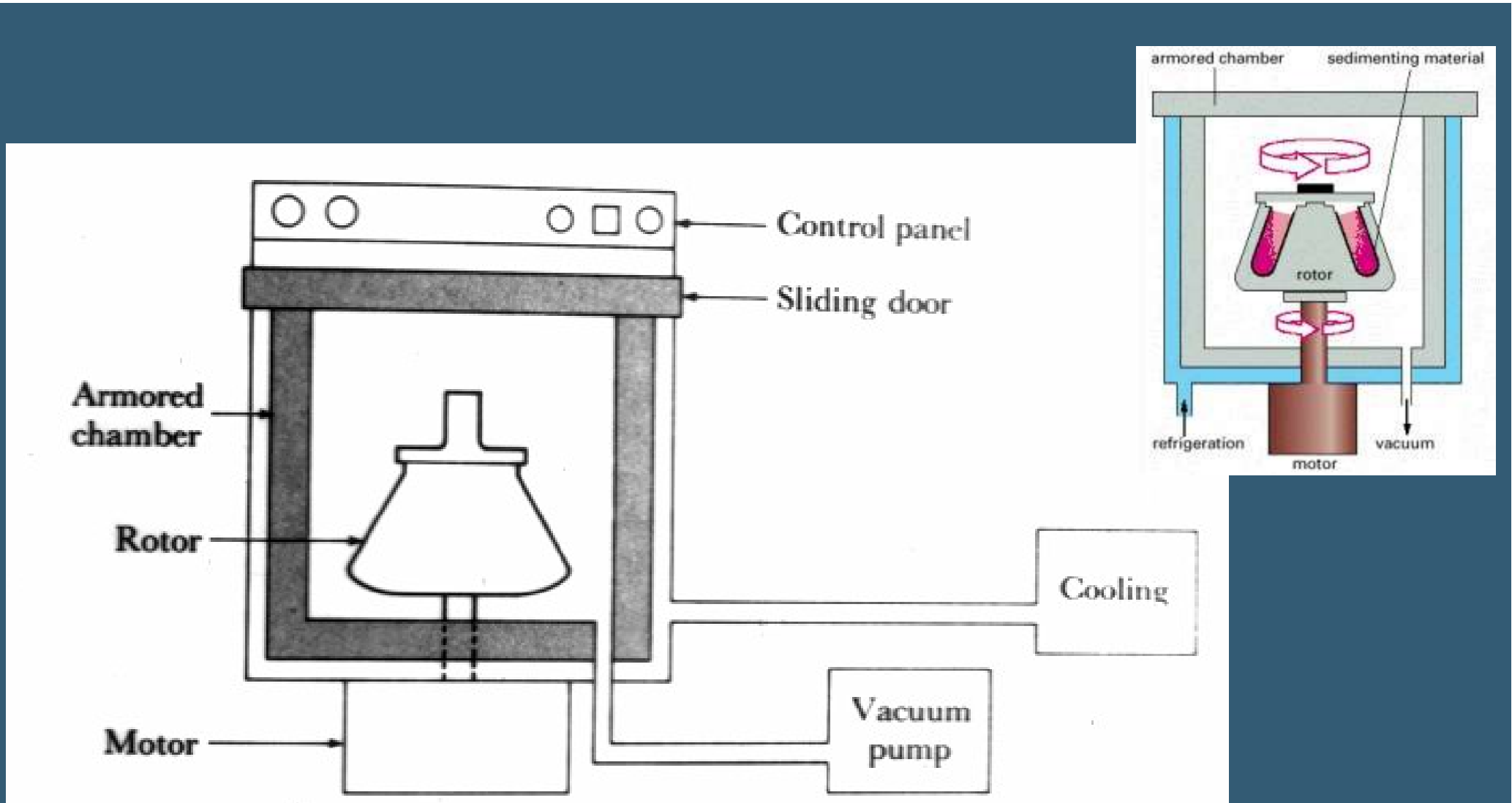
DIFERENCIÁLNÍ  
- dvě fáze  
(sediment/supernatant)

ZONÁLNÍ  
- tvorba zón v  
hustotním gradientu

# METODY NANÁŠENÍ VZORKU



# PREPARATIVNÍ CENTRIFUGA



# PREPARATIVNÍ CENTRIFUGA



# PREPARATIVNÍ ULTRACENTRIFUGA

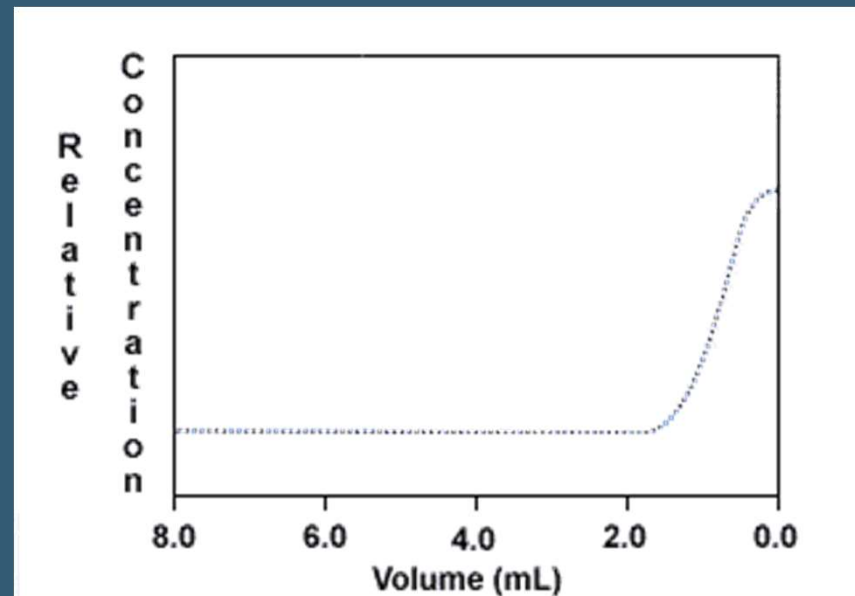
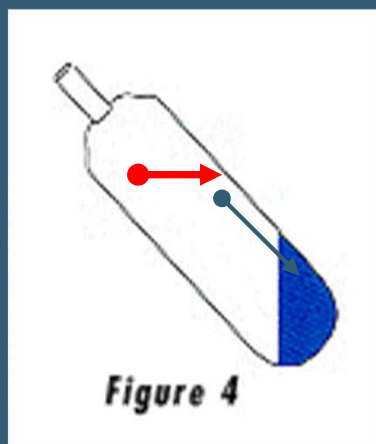


# ROTORY

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



# ÚHLOVÝ ROTOR



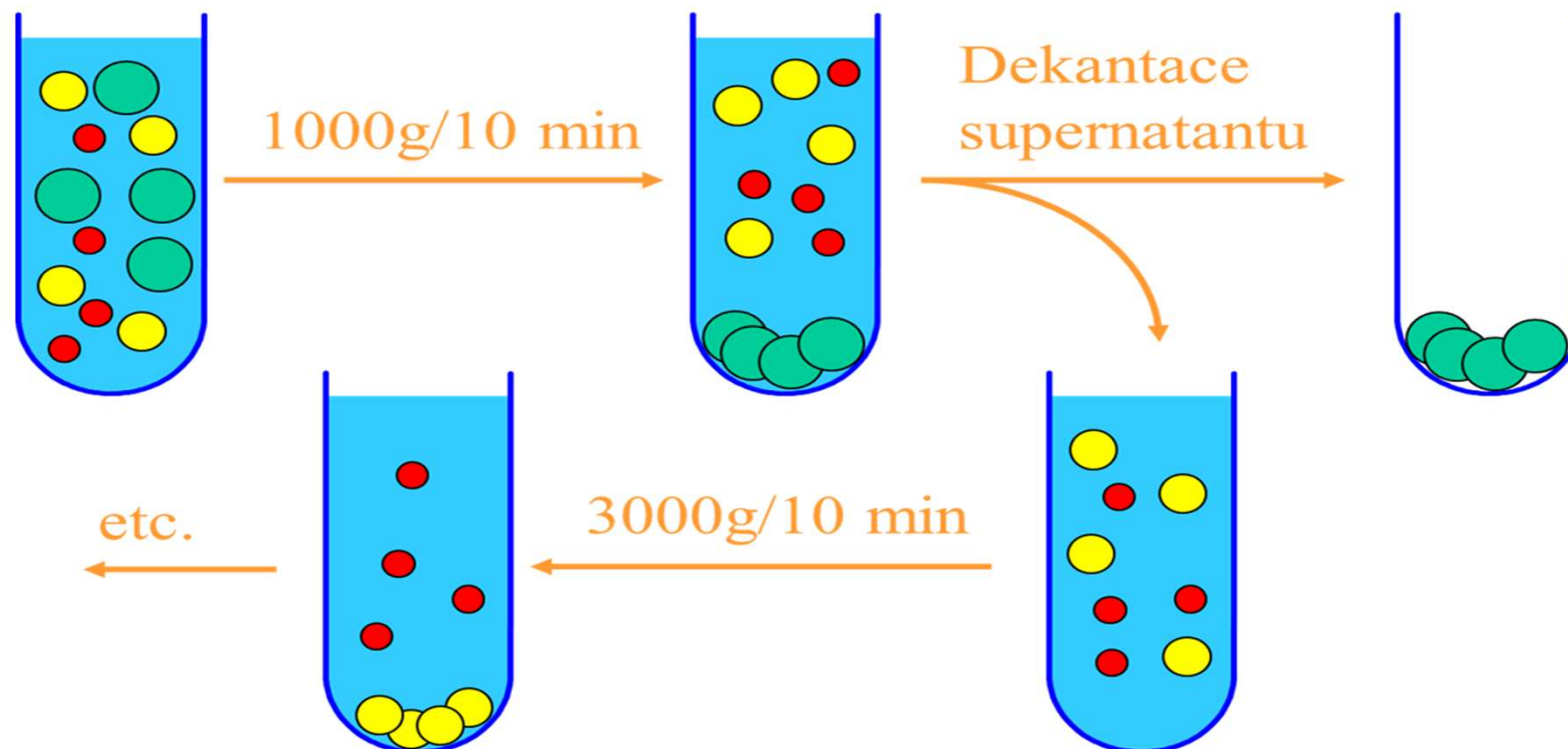
# DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE

Centrifugace

diferenciální  
dvě fáze  
(sediment  
supernatant)

zonální  
zóny  
(gradient)

- opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček = gravitací



# VÝKYVNÝ ROTOR

Centrifugace

diferenciální  
dvě fáze  
(sediment  
supernatant)

zonální  
zóny  
(gradient)

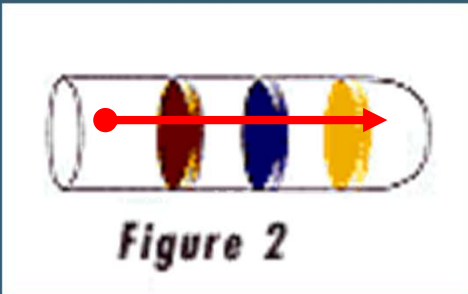
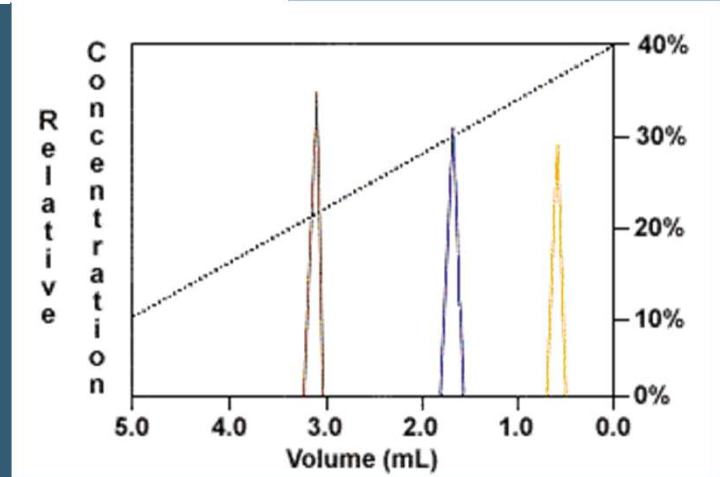
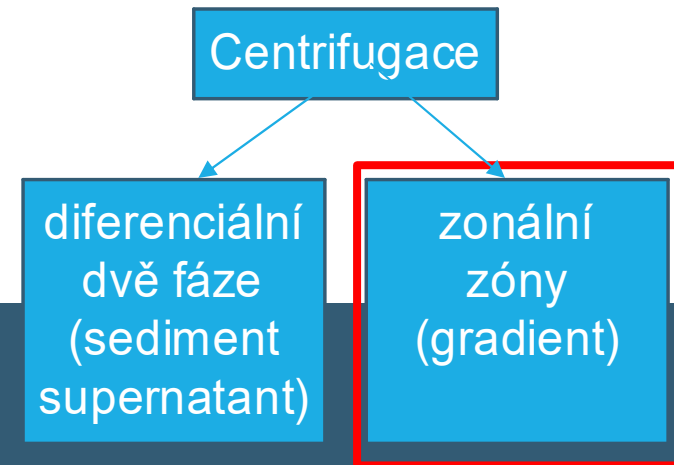


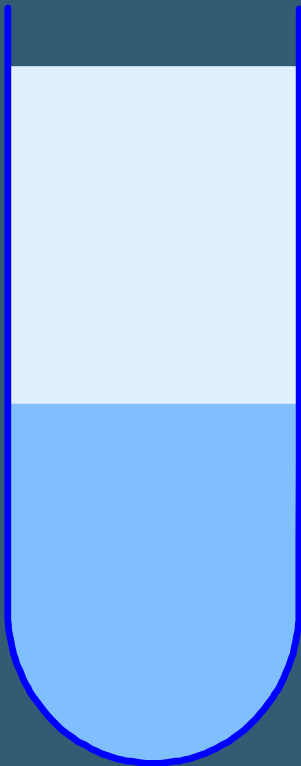
Figure 2



# GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



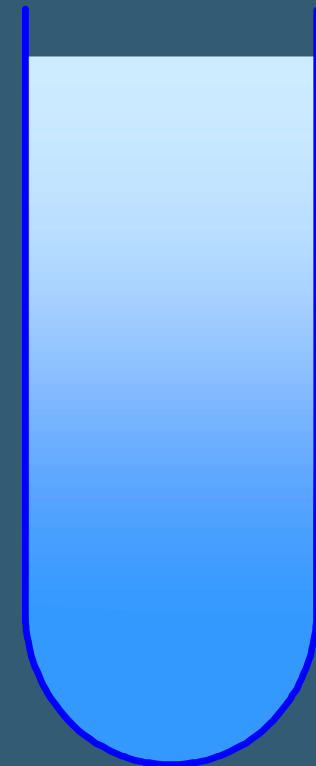
Hustotní bariera



Diskontinuální

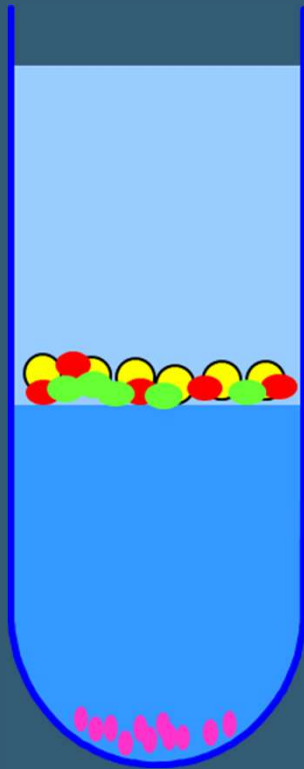


Kontinuální

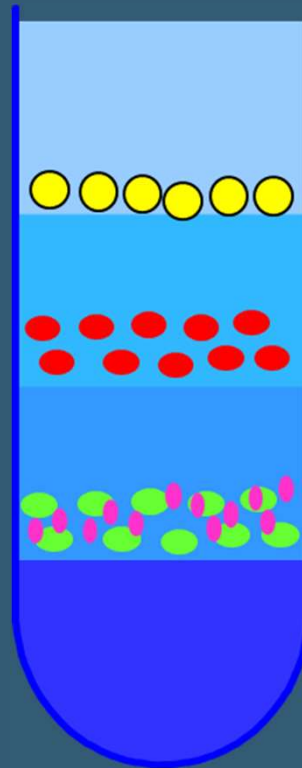


# GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

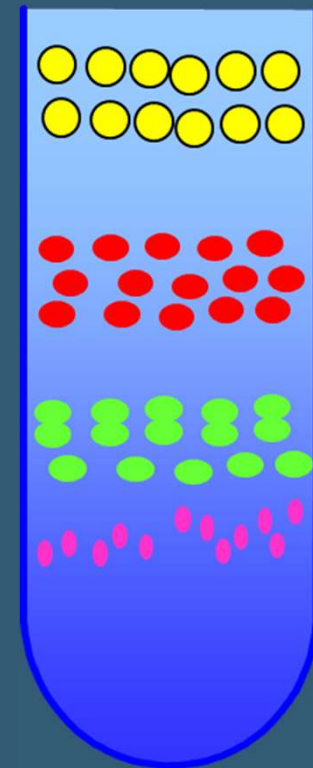
Hustotní bariéra



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 – SiO<sub>2</sub>

Hypertonické prostředí

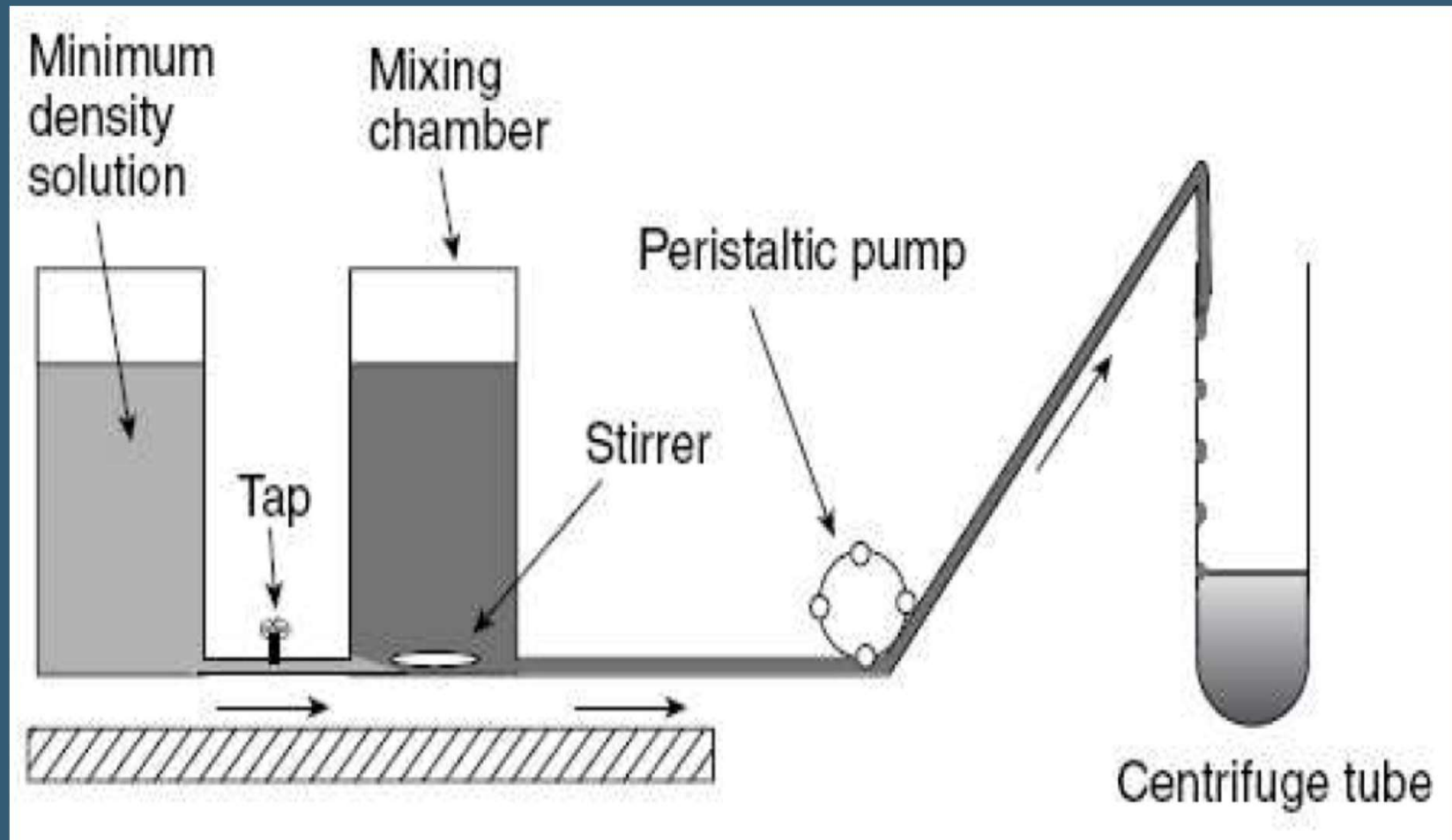
Nutno připravit gradient

- CsCl

- Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

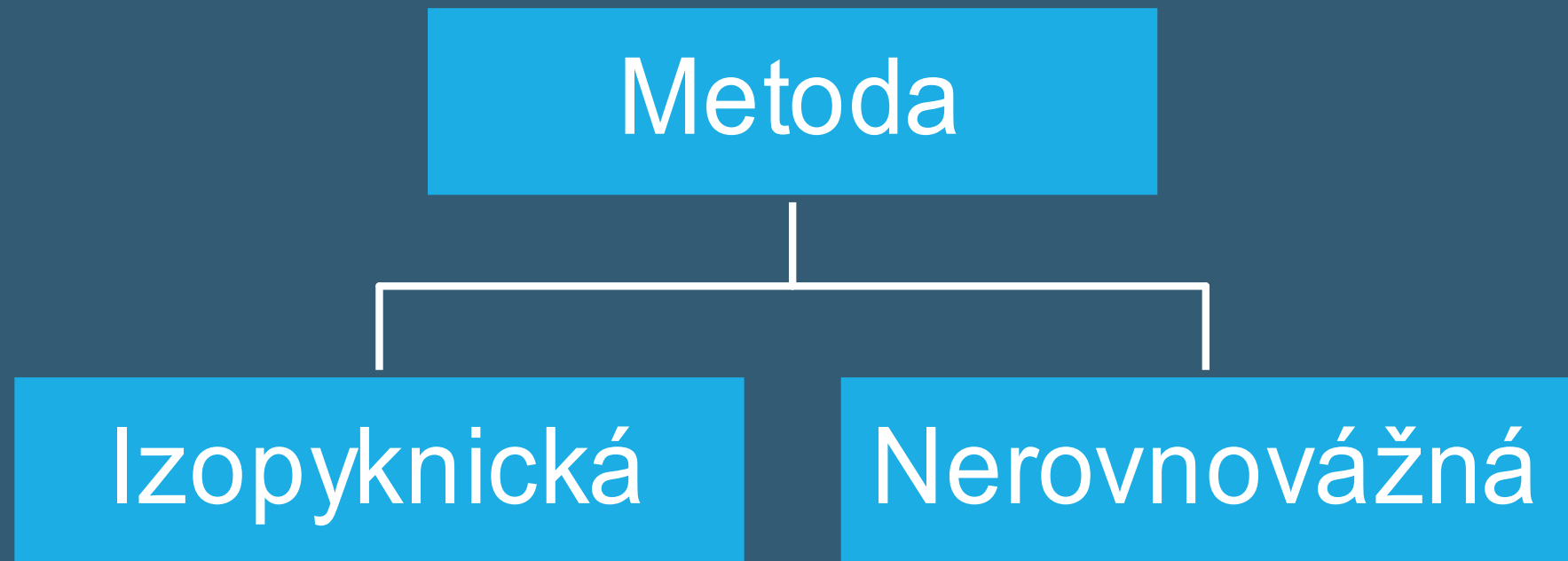
Gradient vzniká během centrifugace

# GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



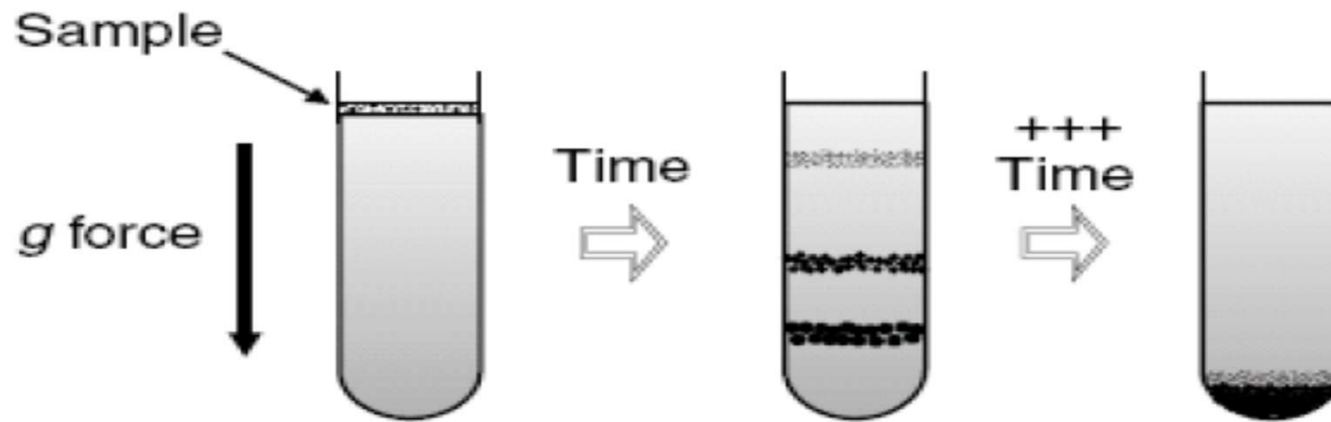


# GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

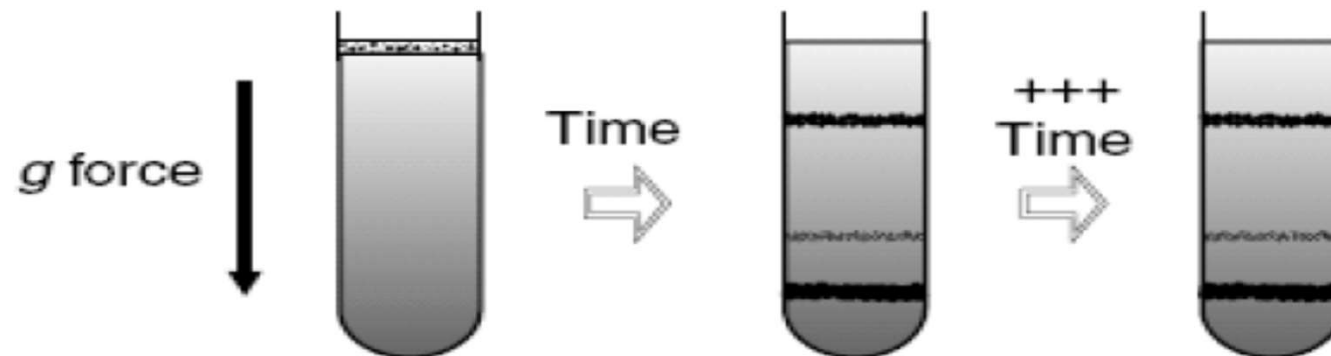


# GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

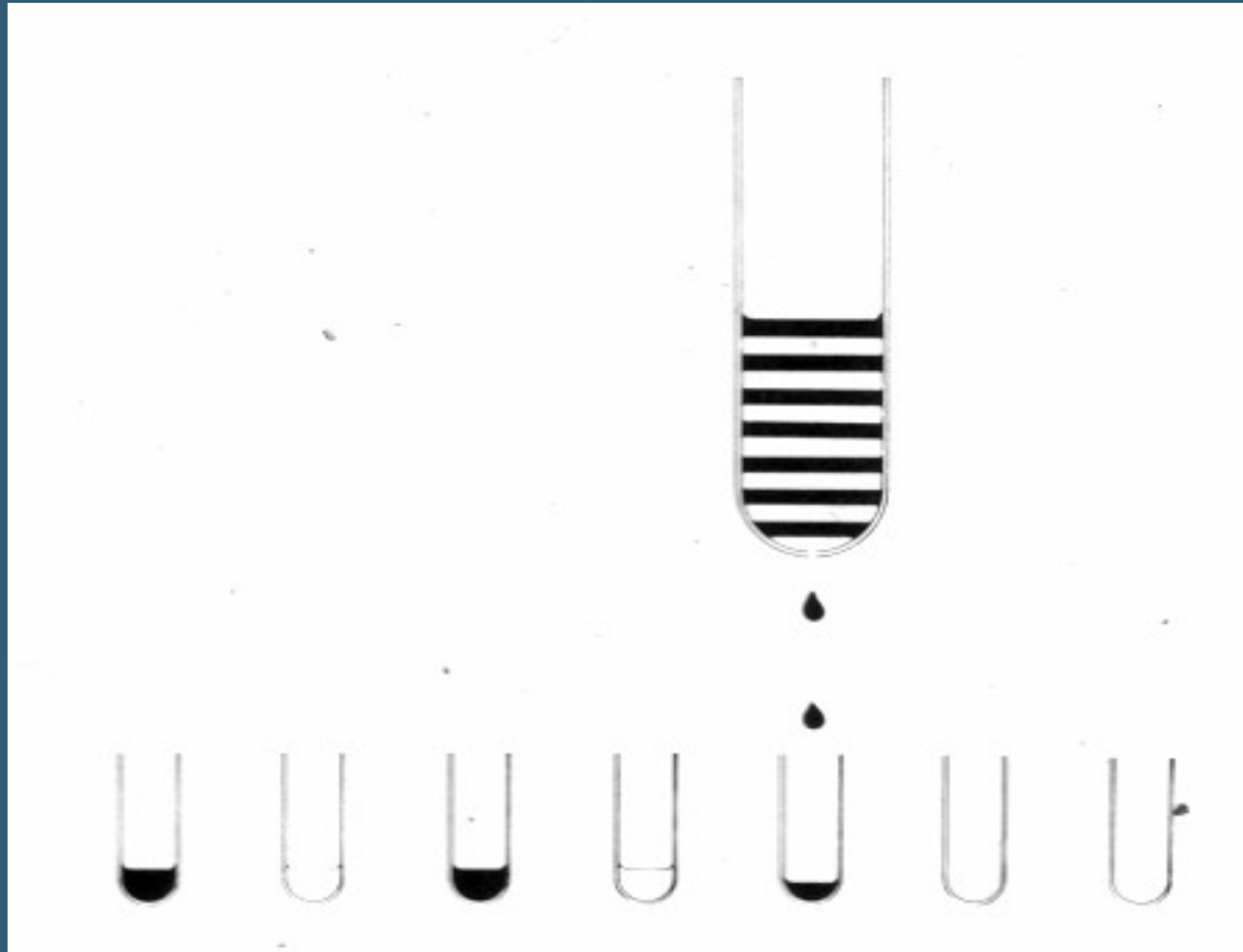
Rate-zonal centrifugation



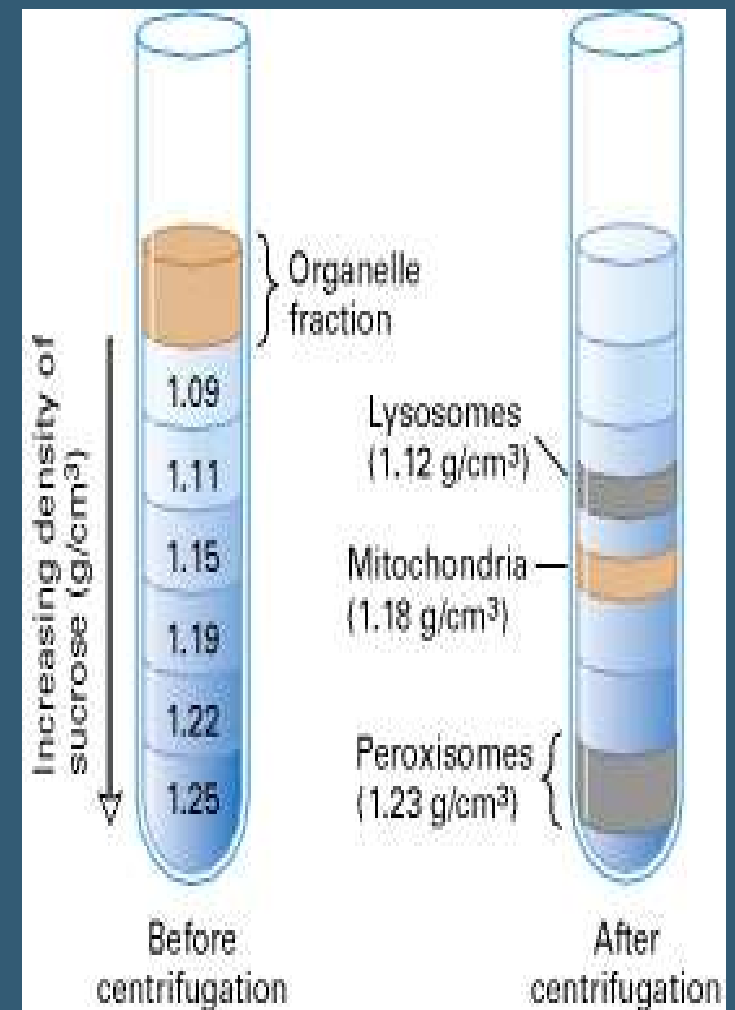
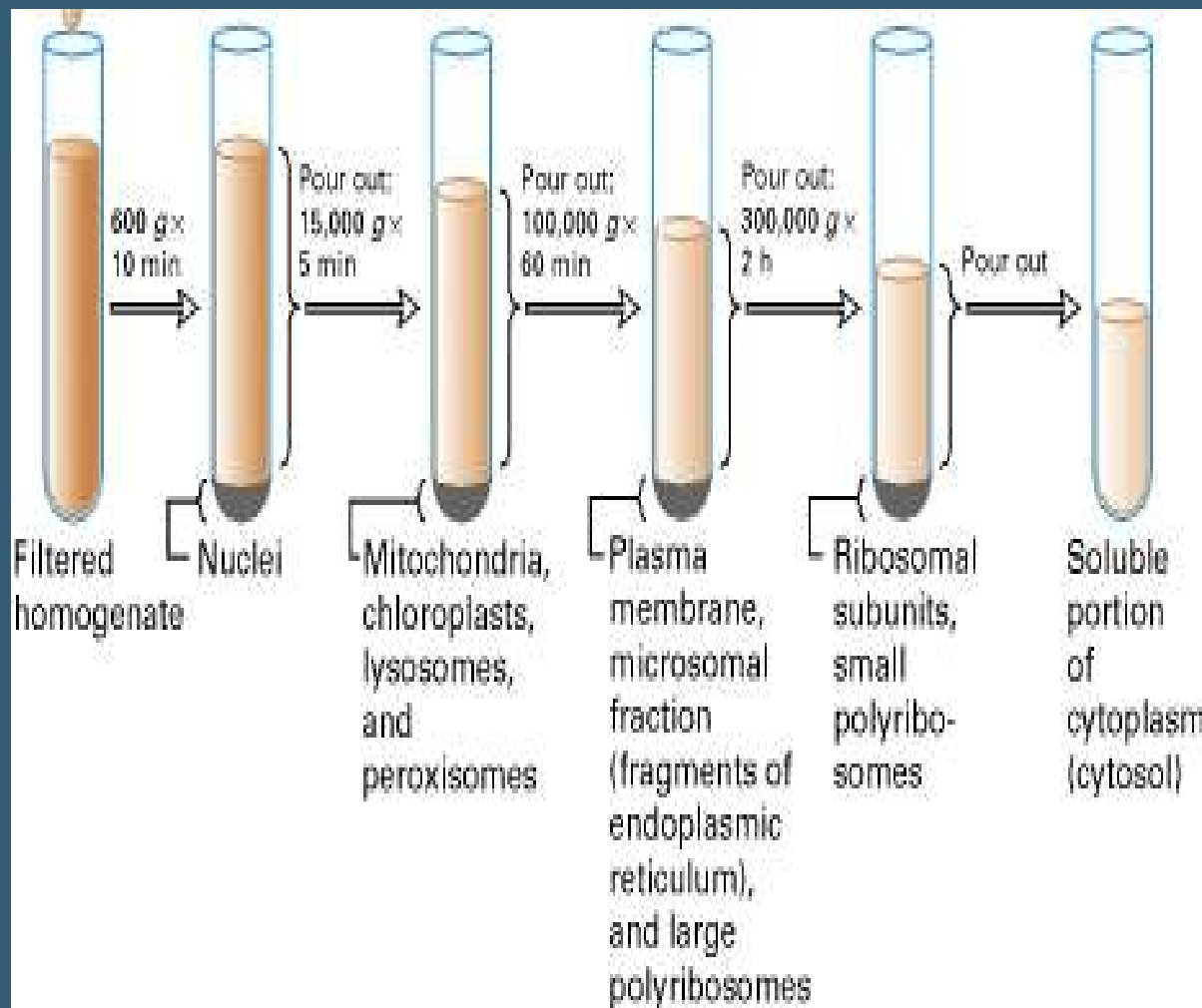
Isopycnic centrifugation



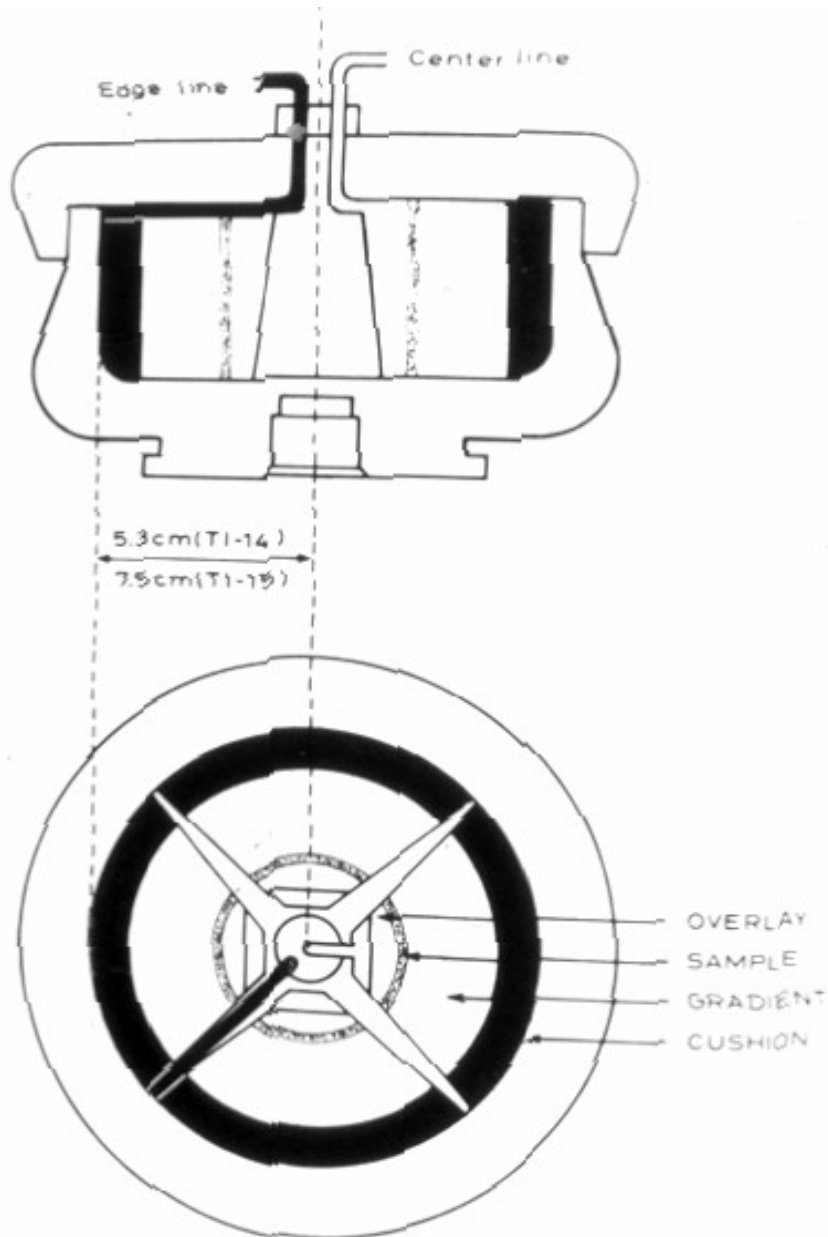
# GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



# DIFERENCIÁLNÍ VERSUS GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

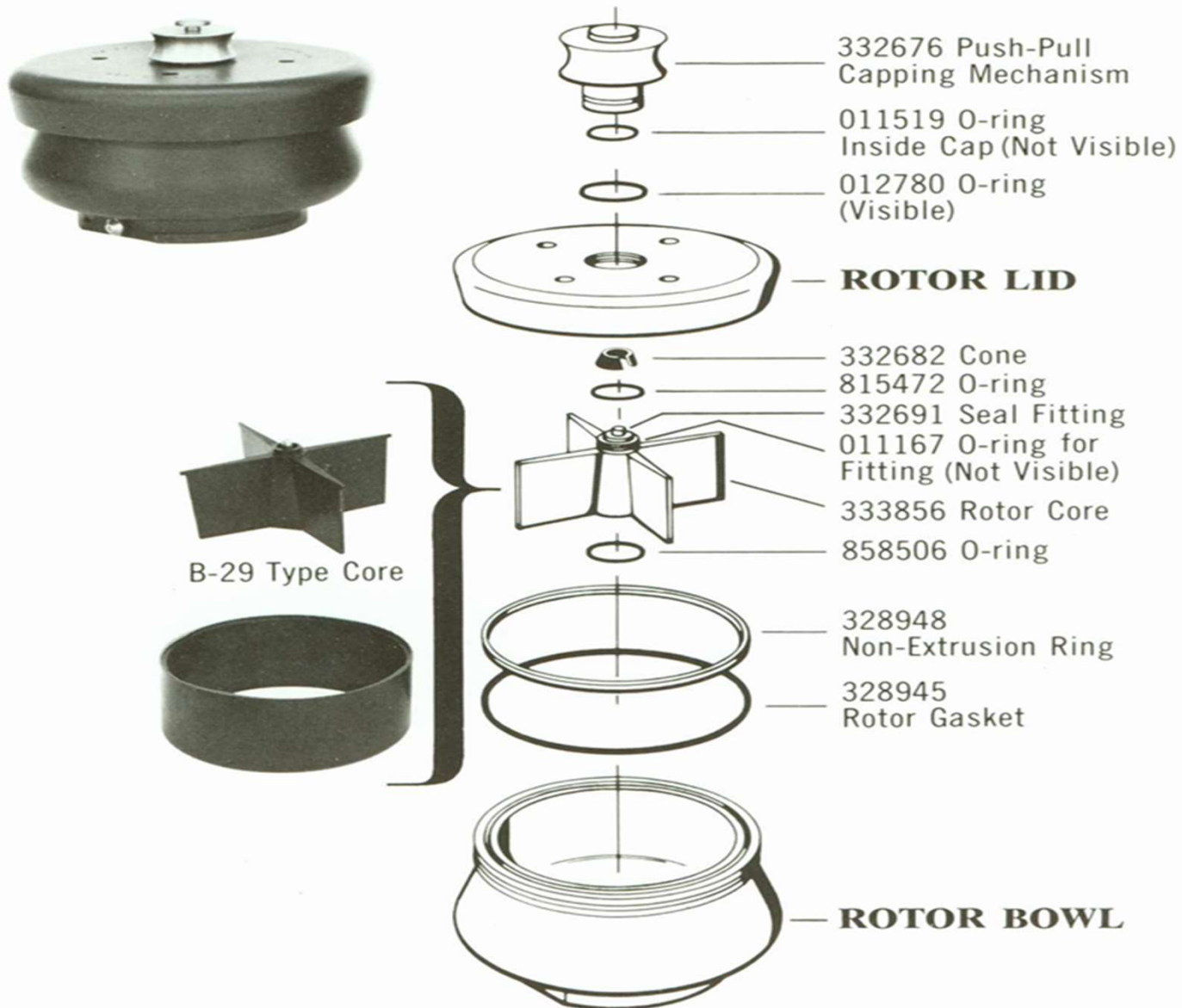


# ZONÁLNÍ ROTOR

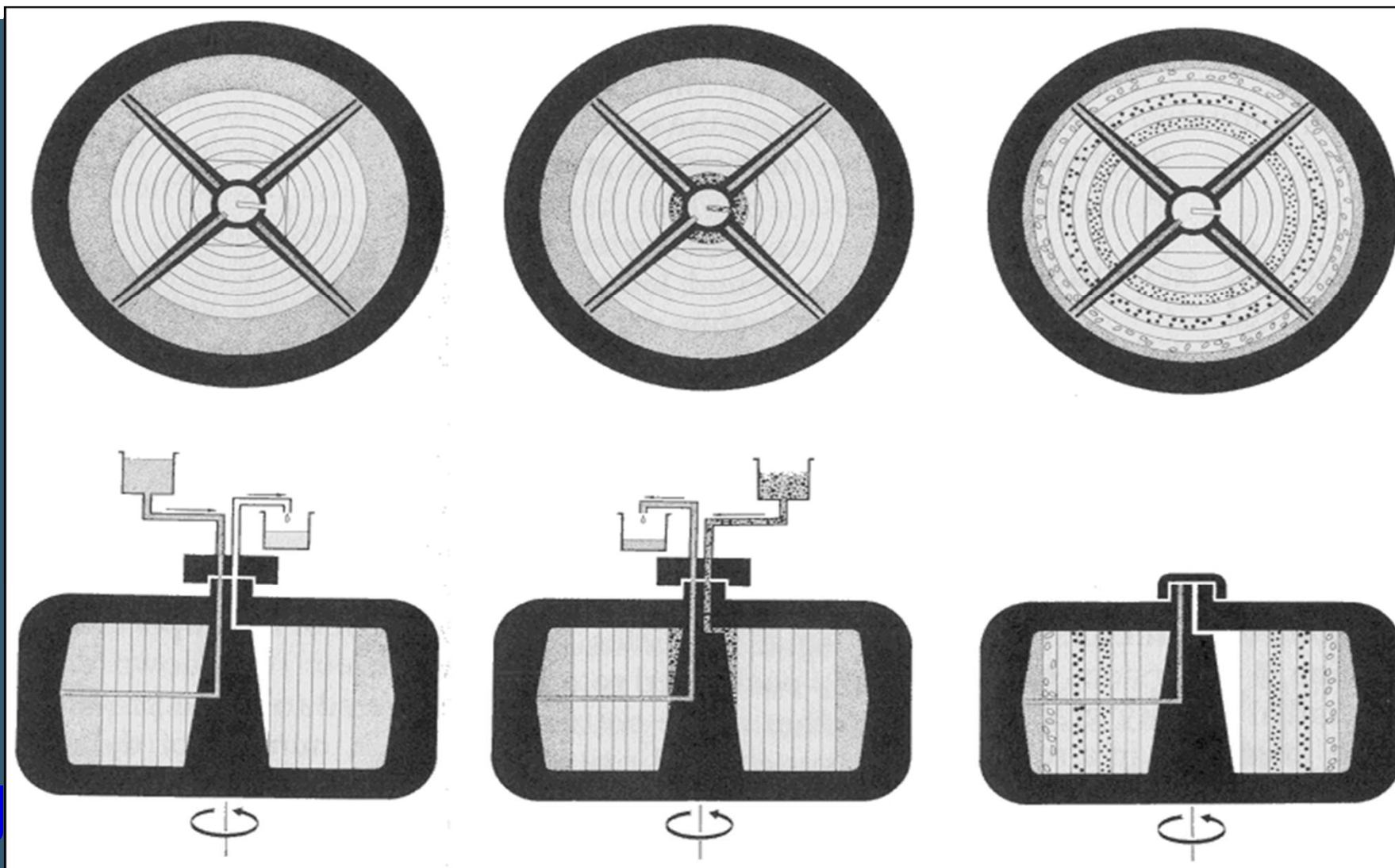


Umožňuje centrifugaci velkých  
objemů vzorků

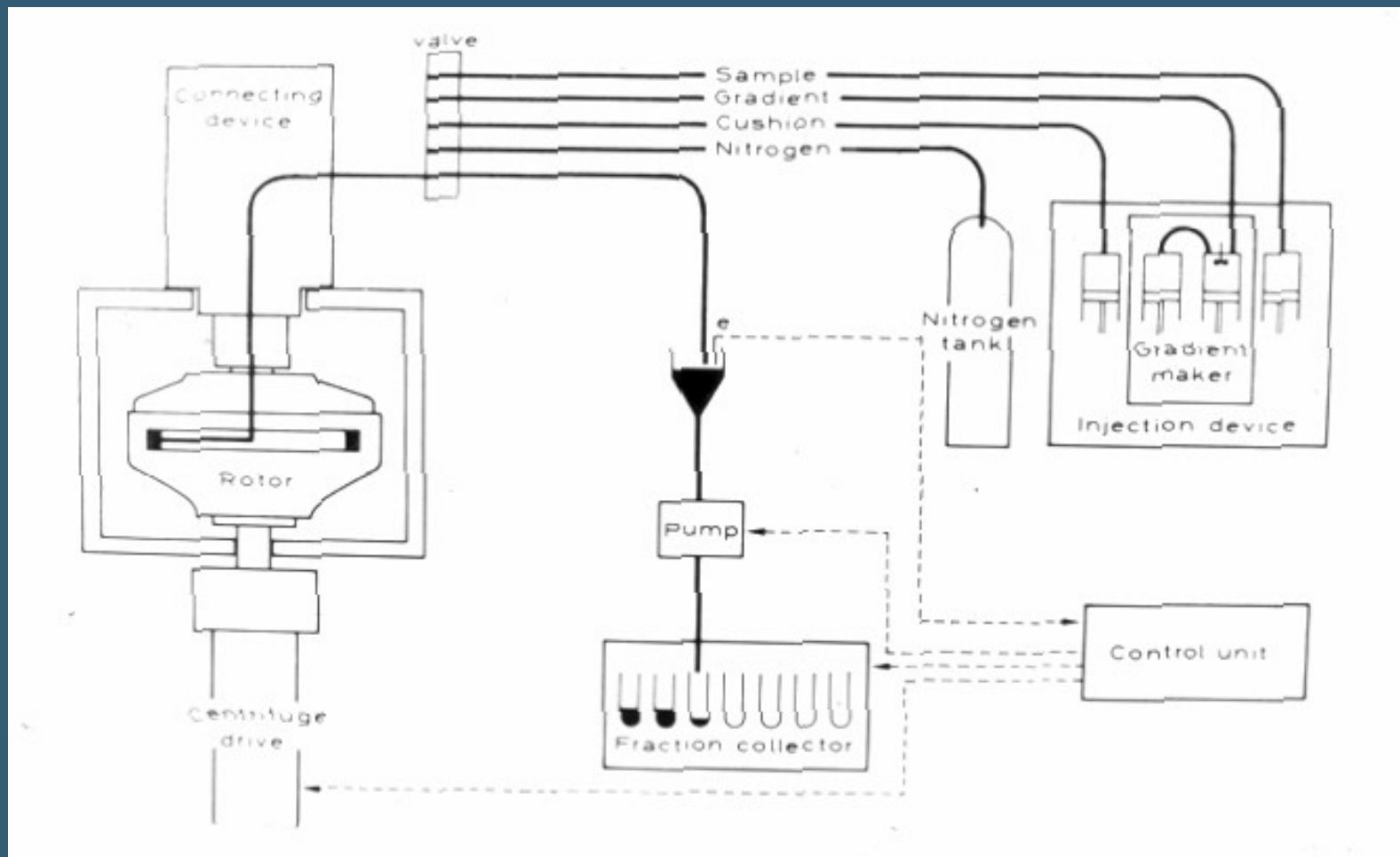
# ZONÁLNÍ ROTOR



# CENTRIFUGACE SE ZONÁLNÍM ROTOREM



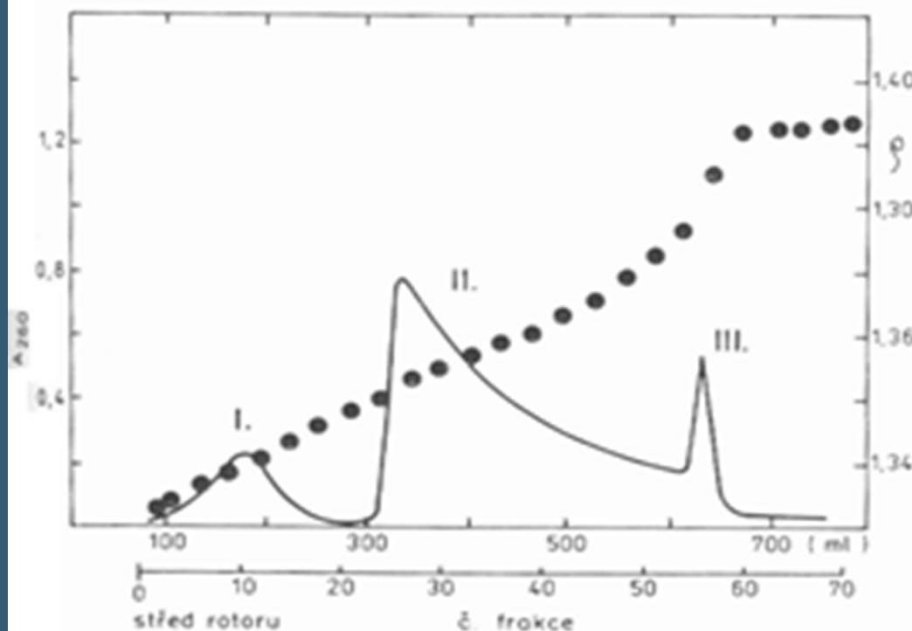
# CENTRIFUGACE SE ZONÁLNÍM ROTOREM





# CENTRIFUGACE SE ZONÁLNÍM ROTOREM

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



Bílkoviny + RNA  
2,5 S

DNA  
26 -35 S

agregáty DNA

27 mg surové DNA/15 ml

Gradient sacharosy 5-30%

Citrátový pufr pH 7,0

Cushion – 50 ml 42% sach.

Overlay – 100 ml pufru

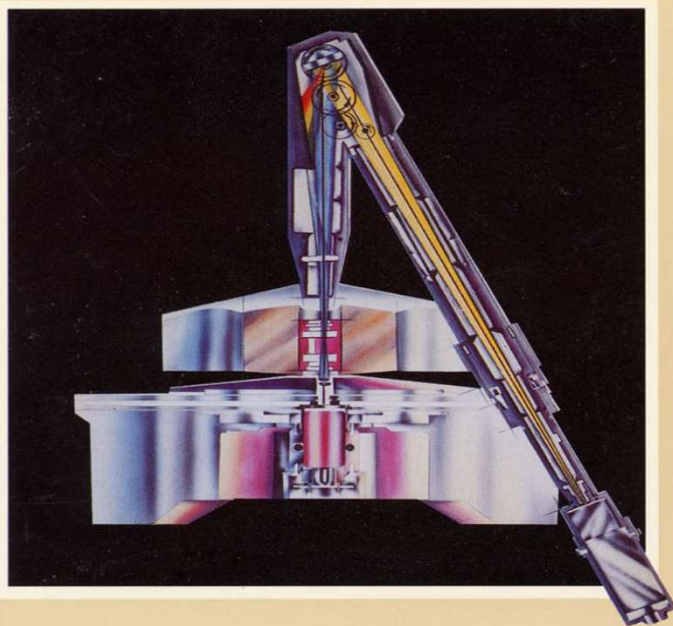
Plnění - 2 000 ot/min

Dělení – 40 000 ot/min 7 hod

Jímané frakce 10 ml

# ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

## Introduction to Analytical Ultracentrifugation



**BECKMAN**

Chem. Listy 104, 1155–1162 (2010)

Referát

## ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA A JEJÍ VYUŽITÍ V BIOCHEMICKÉ LABORATOŘI

ONDŘEJ VANĚK<sup>a,b</sup> a KAREL BEZOUŠKA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, <sup>b</sup> 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 výčtu 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 mnoha metod, které umožňují určit molekulovou hmotnost přímo, bez nutnosti kalibrace či interakce s matricí, 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 PFF, <http://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/sluzby>.

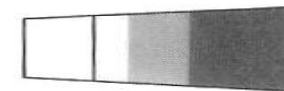
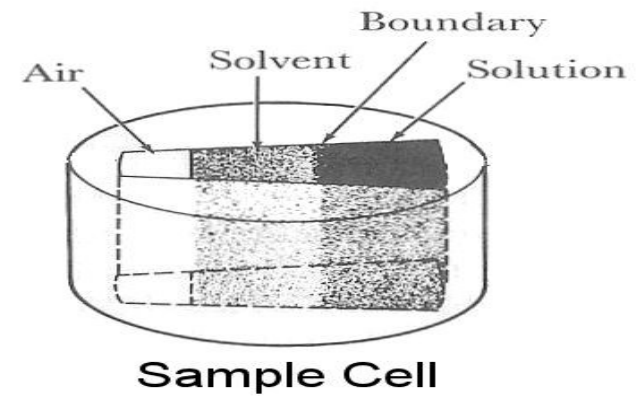
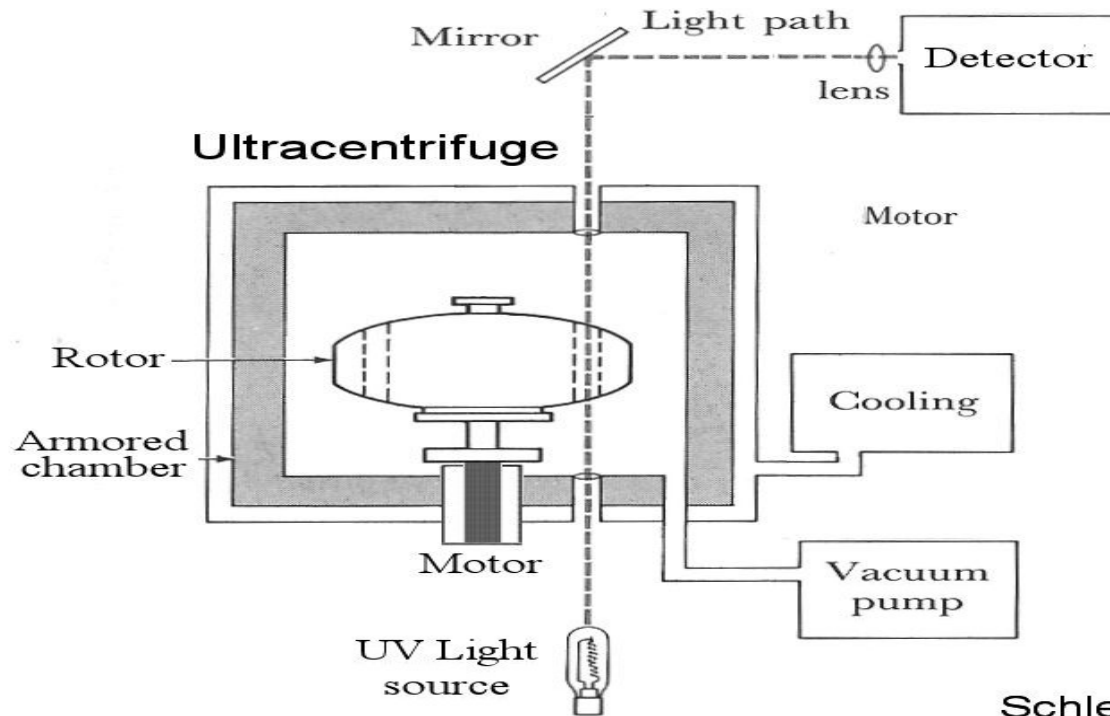
### 2. Historie analytické ultracentrifugy

Historii analytické ultracentrifugy započal její konstruktér a objevitel metody sedimentační analýzy Theodor Svedberg (1884–1971)<sup>1</sup>. Rodák ze švédského Flerång, 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 četnými spolupracovníky studoval fyzikální vlastnosti koloidů, zejména jejich difuzi, 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 vývoj a výroba 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 tříhového pole v rozmezí přibližně 60 až 300 000 × g (min. rychlost 1000 ot min<sup>-1</sup>, max. rychlost 60 000 ot min<sup>-1</sup>). 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 šterbiny a fotonásobiče. V klasickém uspořádání je vzorek umístěn do květy 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



Schleirin Optics  
(schematic)



Centrifugal force →

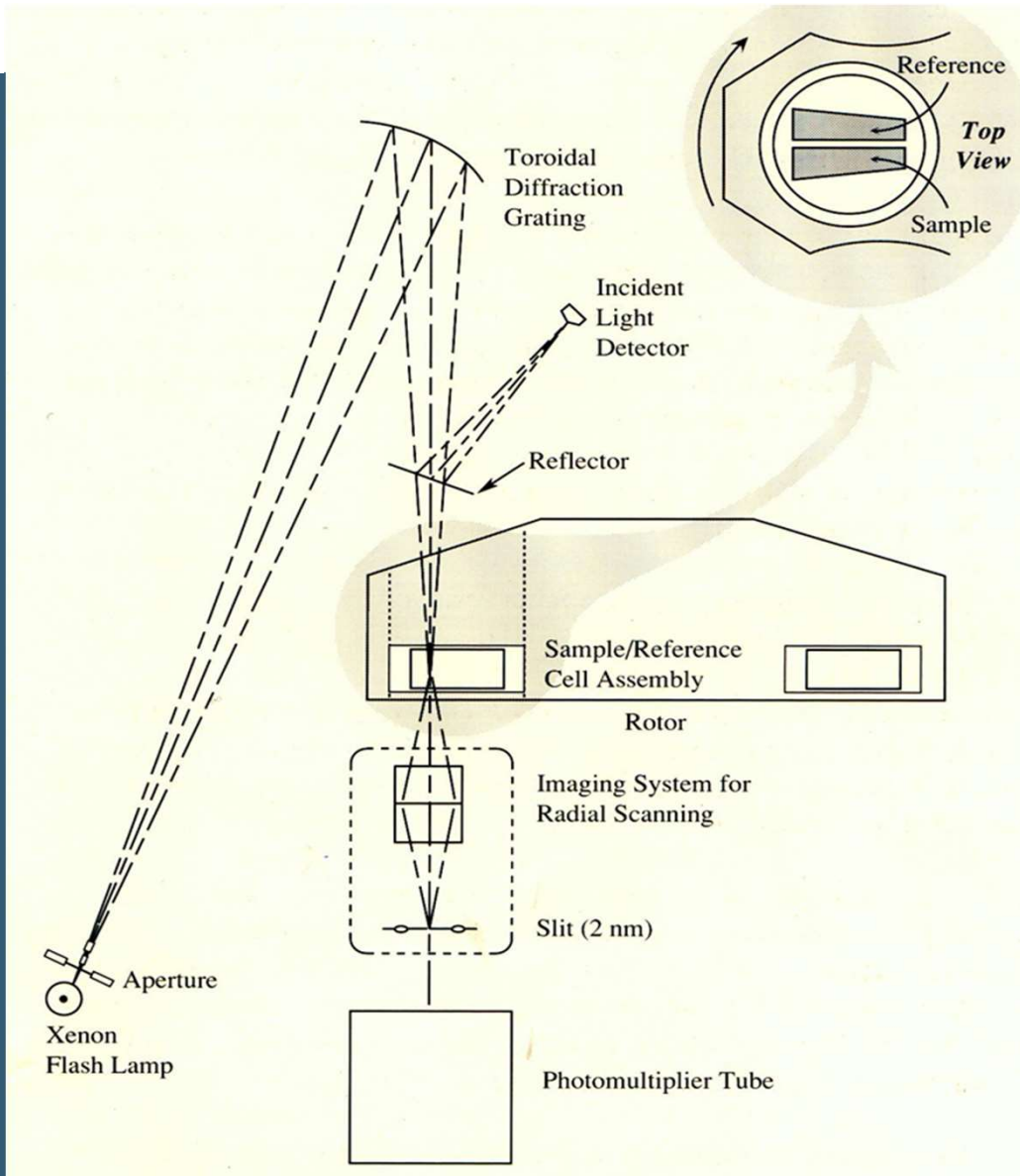


# ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA

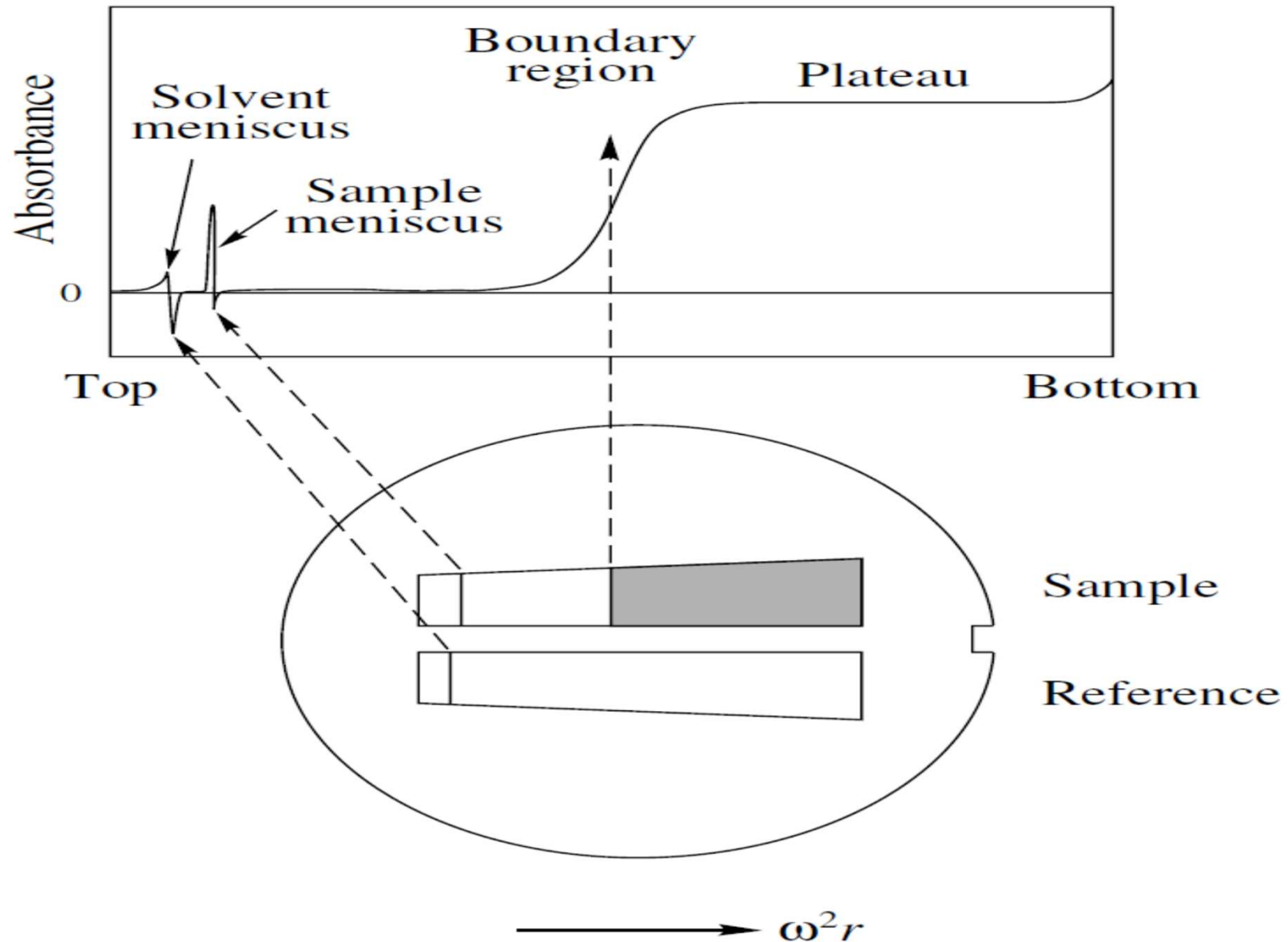




# OPTICKÝ SYSTÉM



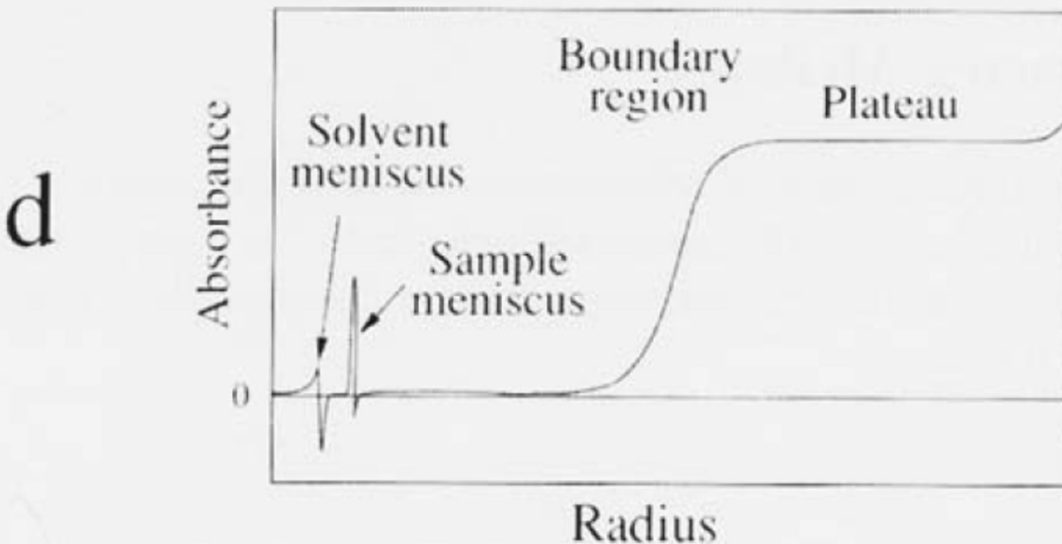
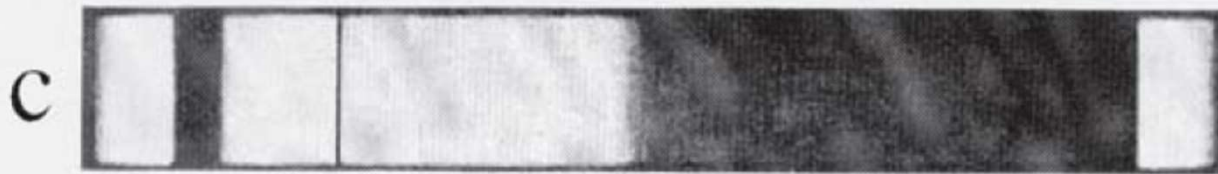
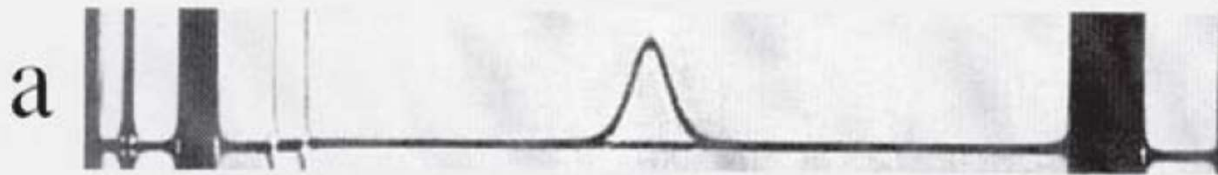
# OPTICKÝ SYSTÉM



# 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

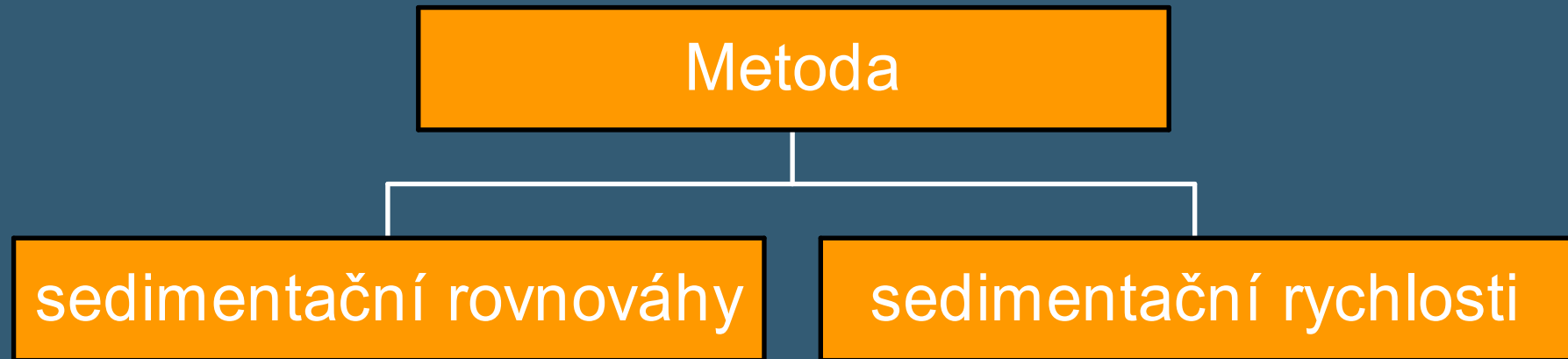
Interferenční optika

Fotografický systém

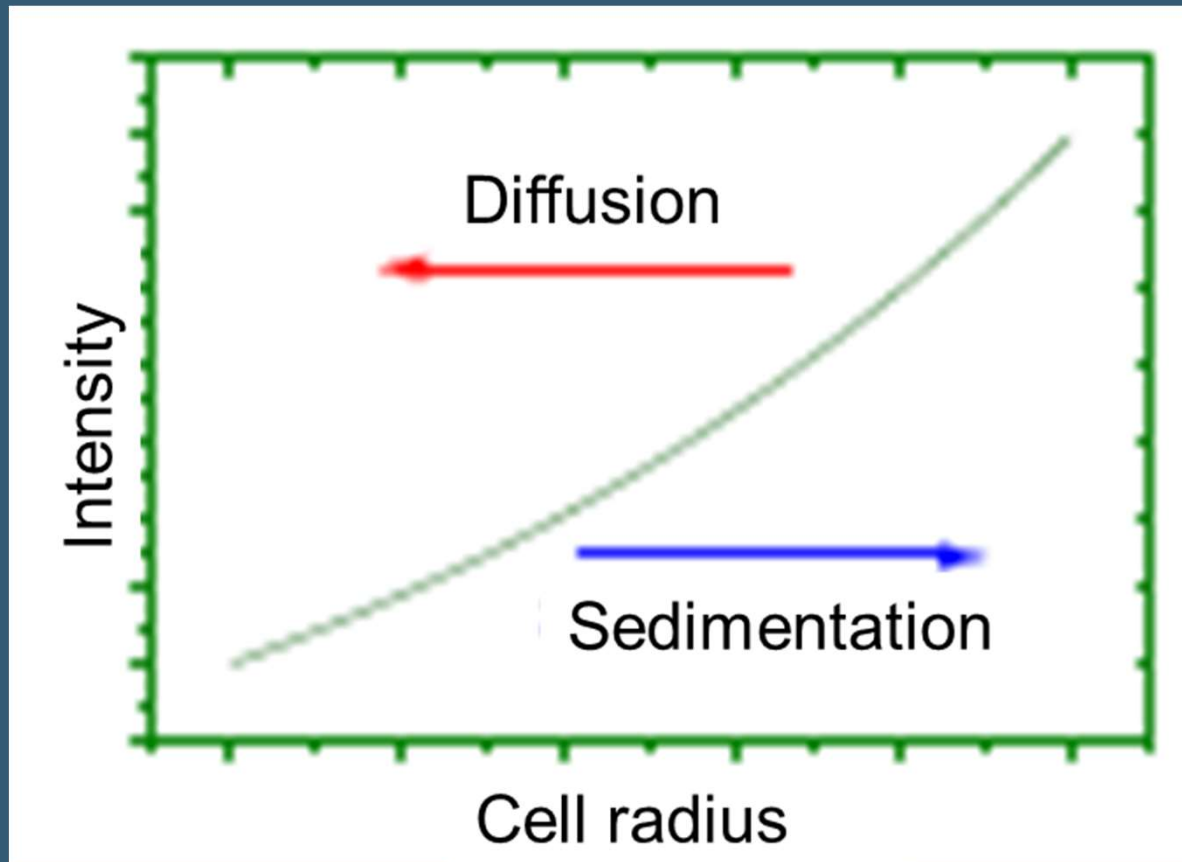
Absorbční systém



# ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

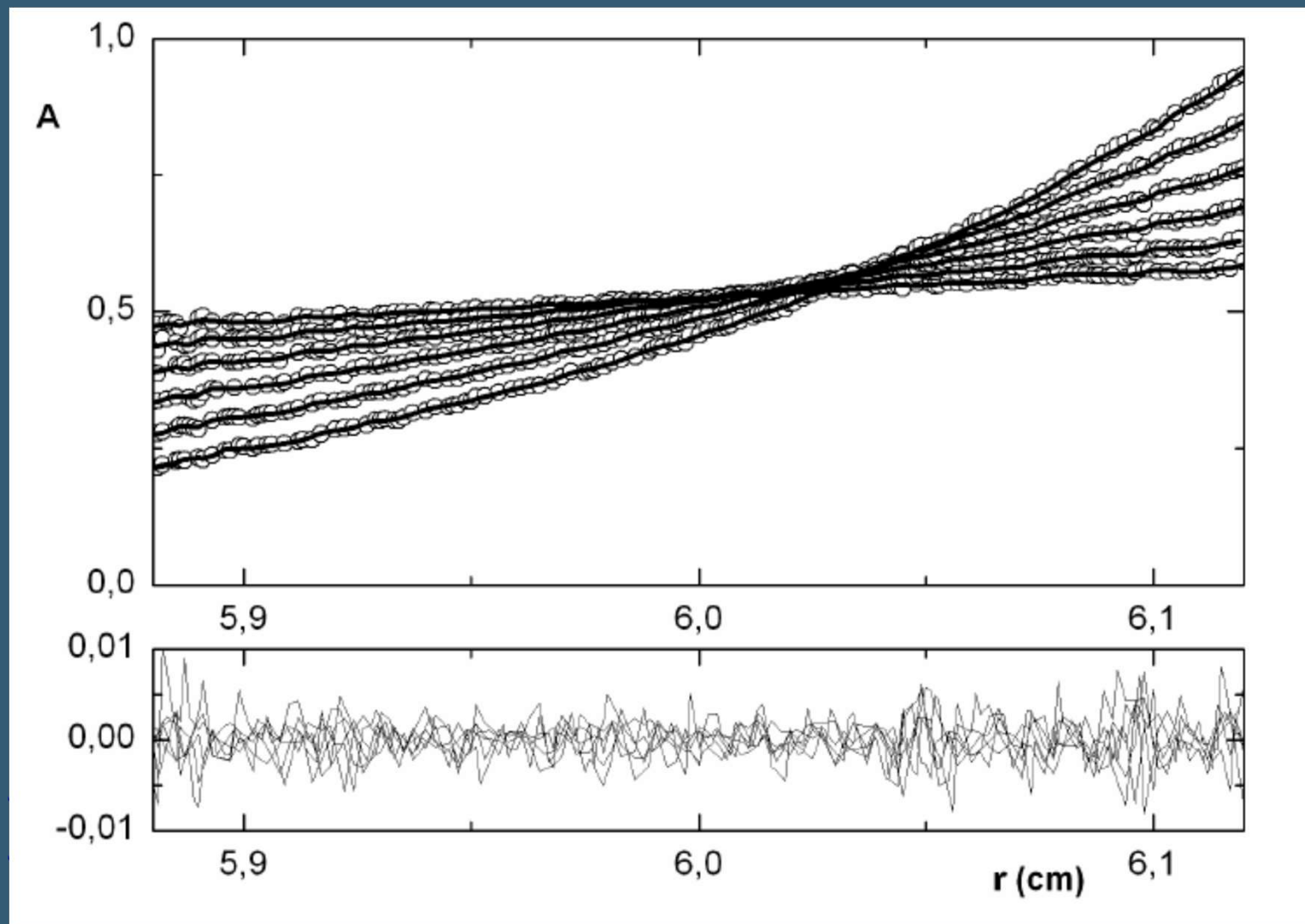


# METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY



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

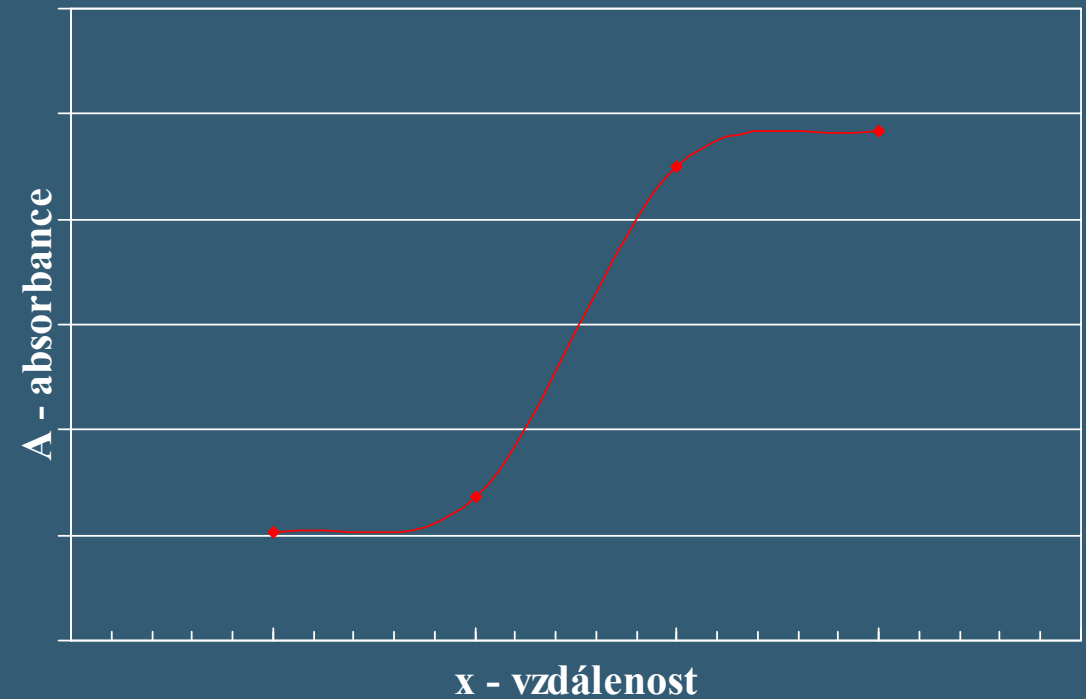
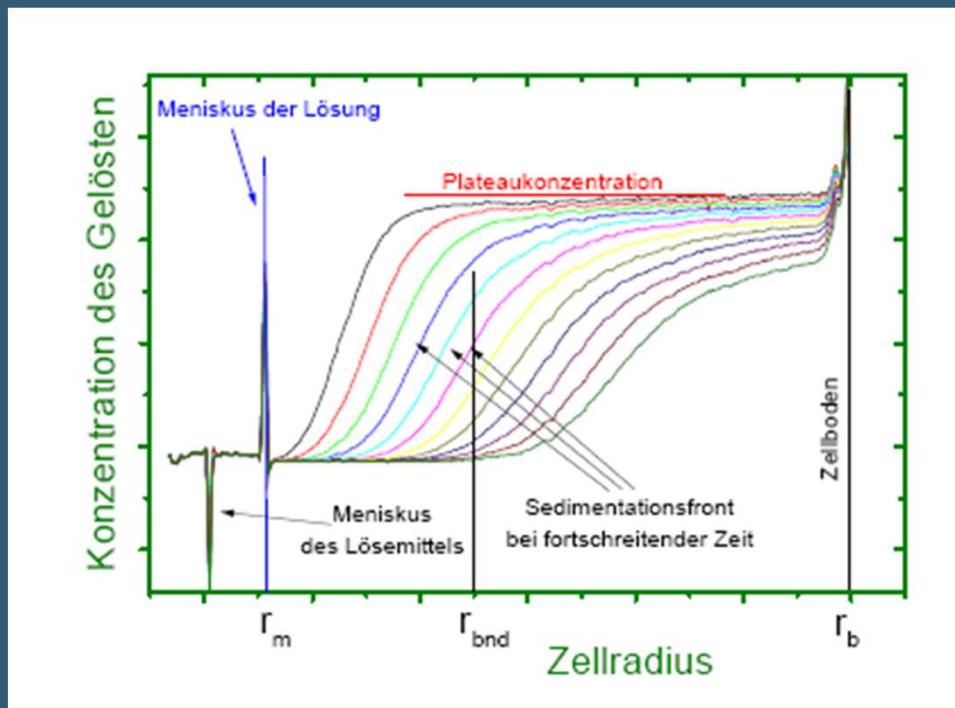
# METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY



# METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY

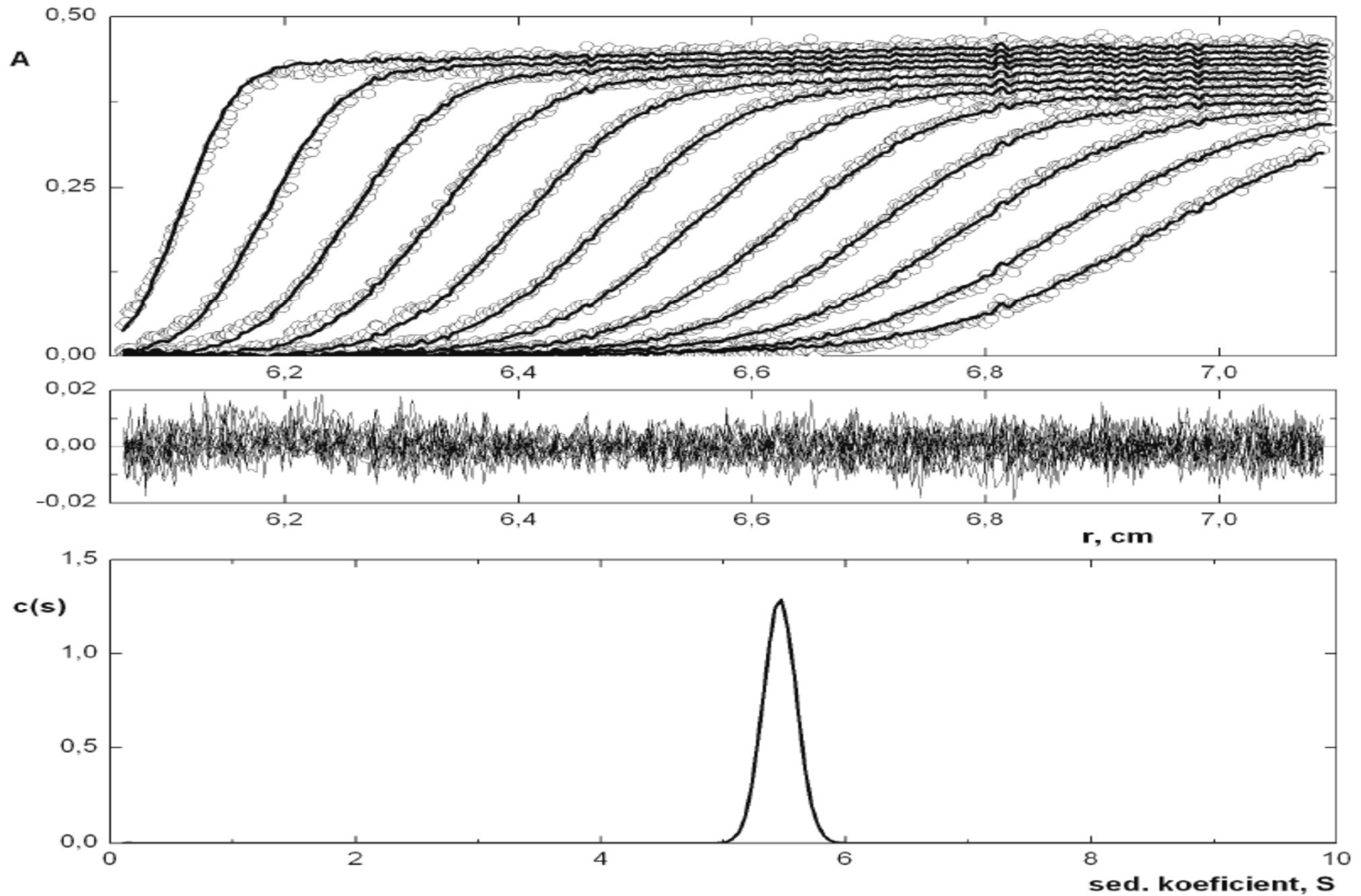
- ◆ **Termodynamické informace** (závisí na  $M_r$ )
- ◆ Experimentálně lze stanovit :
  - **Relativní molekulovou hmotnost** – sacharosa  $M_r$  ( $M_r = 360$ ) až po viry ( $M_r =$  mnoho milionů)
  - **Stav molekul v roztoku** - asociace
  - **Rovnovážné konstanty v roztoku**,  $K$ 
    - výpočet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

# METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI



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

# 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