

# Dělicí techniky nukleových kyselin



- **Metody**

- Elektromigrační
- Centrifugační

- **Vlastnosti využívané pro dělení biomakromolekul**

- Molekulová hmotnost
- Konformace a tvar
- Náboj
- Hustota



# 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
  - a) **Izokinetická centrifugace** – separace podle rychlosti sedimentace částic
    - Stanovení sedimentačního koeficientu  $S$
  - b) **Izopyknická centrifugace** – separace podle hustoty částic
    - Stanovení vznášivé hustoty  $\rho$

## Typy centrifugace podle účelu

- Preparativní centrifugace
- Analytická centrifugace



# Centrifugační metody



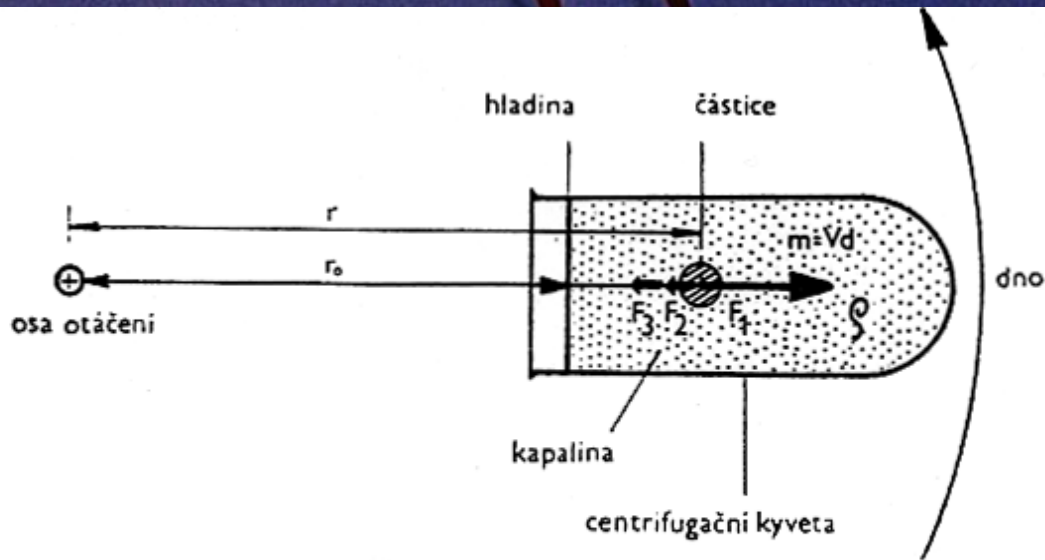
- Centrifugace patří k separačním metodám, které se v molekulární biologii používají k
  - Izolaci
  - Purifikaci
  - Charakterizaci informačních makromolekul a nadmolekulárních struktur
- Základním principem separace založené na centrifugačních technikách je pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy
- Chování částic při centrifugaci je dáno jejich fyzikálními vlastnostmi a povahou prostředí, v němž centrifugace probíhá.



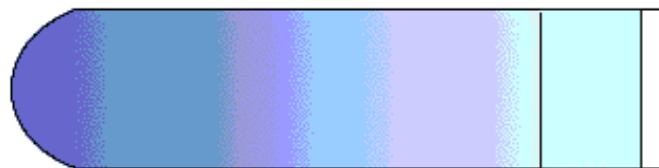
# Typy centrifug



# Teoretické principy centrifugace



Síly  $F_1, F_2, F_3$  působící při centrifugaci na pohybující se částice;  $r_0$  = vzdálenost od středu otáčení v čase  $t = 0$ ,  $r$  = vzdálenost částice od osy otáčení v čase  $t > 0$ ,  $V$  = objem,  $d$  = hustota částice,  $\rho$  = hustota kapaliny



5 to 30 % Sucrose gradients

Protein sample

Molecules sediment according to their size, shape and density.



# Výpočet relativní odstředivé síly

$$RCF = \frac{m\omega^2 r}{mg} = \frac{\omega^2 r}{g} = \frac{4\pi^2 n^2 r}{g} = \frac{4\pi^2}{60^2} (rpm)^2 r$$

$$RCF = 1,12 r \left( \frac{rpm}{1000} \right)^2$$

$$rpm = 1000 \times \sqrt{\frac{RCF}{1,12 r}}$$

*RCF* – relativní odstředivá síla (relative centrifugal force)

*rpm* – počet obrátek za minutu

*r* – vzdálenost od středu otáčení, poloměr rotoru [mm]

- 1000×g, 5 min      bakteriální buňky
- 3000×g, 10 min      chloroplasty, jádra
- 10 000×g, 10 min      mitochondrie, inkluzní tělíska
- 40 000×g, 30 min      membrány, mikrozómy, peroxizómy aj.
- 200 000×g, 16 hr      velké proteinové komplexy (ribozómy)
- 400 000×g, 24 hr      proteiny 50 kDa

# Typy rotorů

úhlové



výkyvné



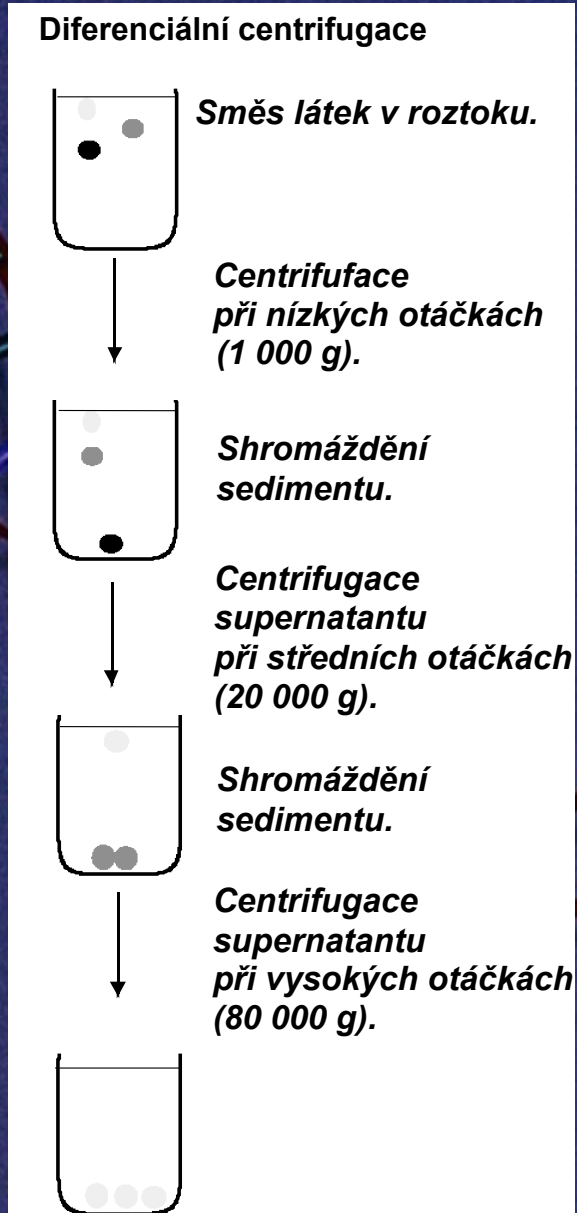
destičkové





# Diferenciální centrifugace

- Jestliže se centrifugaci v homogenním roztoku podrobí směs částic lišících se podstatně svou velikostí, hmotností nebo hustotou, budou jednotlivé složky směsi sedimentovat různou rychlostí.
- *Opakovanou centrifugací lze z původní směsi při postupném zvyšování otáček získat jednotlivé složky nebo frakce ve formě sedimentu.*
- Výchozí krok pro hrubou separaci a izolaci složek z lyzátů buněk nebo homogenátů tkání, např.
  - buněčných jader
  - buněčných membrán
  - ribozomů
  - nukleových kyselin
  - mitochondrií
  - proteinů





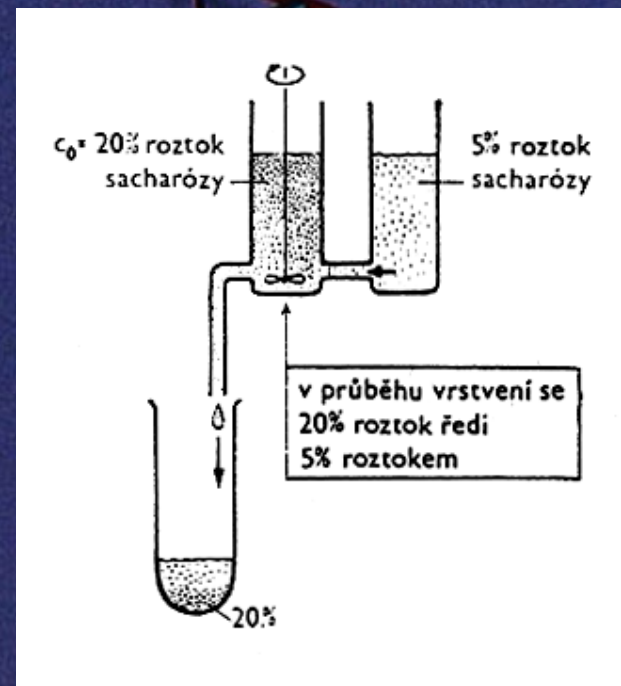
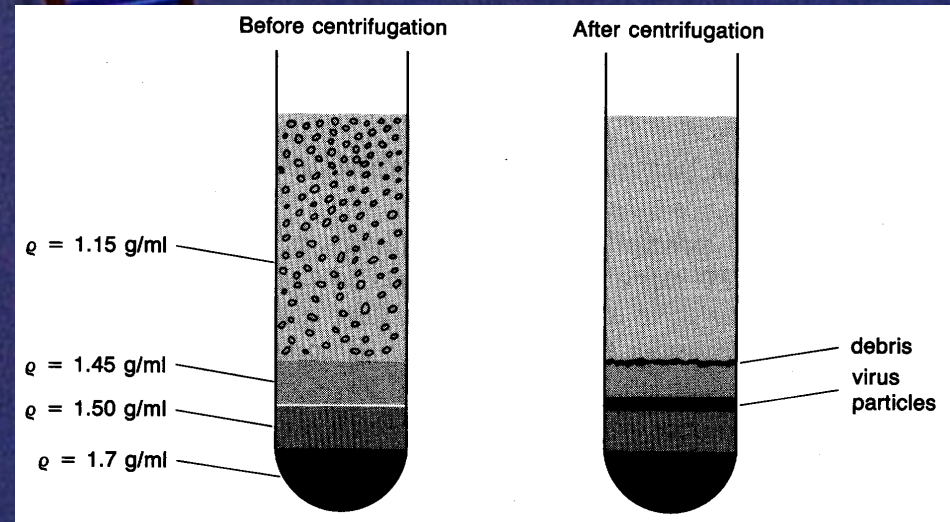
# Zonální centrifugace

- Rychlost sedimentace jednotlivých komponent přítomných ve výchozí směsi není vždy odlišná natolik, aby je bylo možné diferenciální centrifugací oddělit, např.:
  - různé typy nukleových kyselin
  - ribozomální podjednotky
  - jiné částice, vykazující podobné vlastnosti
- Pro oddělování neboli separaci těchto látek se využívá zonální centrifugace, *při níž je homogenní roztok v centrifugační zkumavce nahrazen roztokem, jehož koncentrace od povrchu ke dnu zkumavky narůstá.*
- Takový roztok se označuje jako **gradientní roztok**.
- K jeho přípravě se používají dobře rozpustné a vůči analyzovaným částicím inertní látky
  - Sacharóza
  - Roztok chloridu cesného
- Vzrůstající hustota a viskozita gradientního roztoku eliminují vliv zvyšujícího se odstředivého zrychlení směrem od osy otáčení, čímž brání nárůstu rychlosti sedimentace částic v průběhu centrifugace.



# Zonální centrifugace

- Před zahájením centrifugace se vzorek obsahující směs částic nanese v tenké vrstvě na povrch gradientního roztoku v centrifugační zkumavce.
- Jednotlivé složky výchozí směsi budou v závislosti na své velikosti, tvaru a hustotě sedimentovat gradientním roztokem různou rychlostí a vytvářet dobře oddělené zóny.
- Gradient roztoku zároveň zabraňuje proudění uvnitř zkumavky, udržuje stabilitu a ostrost vytvořených zón a umožňuje jejich odebrání.





# Hustotní gradienty

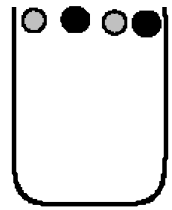


- Gradienty mohou být podle toho, zda se koncentrace roztoku mění plynule nebo stupňovitě.
  - Kontinuální
  - Diskontinuální
- Diskontinuální gradient je předem připravený gradient v centrifugační zkumavce *postupným navrstvováním roztoků o různé koncentraci*. Vzorek je pak nanesen na jeho povrch.
- V obou případech jsou po ukončení centrifugace částice příslušného druhu zkoncentrovány do úzkých pruhů, které lze detegovat a izolovat stejným způsobem jako při zonální centrifugaci.
- K přípravě hustotních gradientů se používají látky, které se vyznačují vysokou rozpustností:
  - **chlorid cesný**
  - **Sacharóza**
  - **Dextran**
  - **Ficol**
- Rozdíly v hustotách se pohybují v rozmezí 1,0-1,3 g/ml u sacharózy a 1,0-1,9 g/ml u CsCl, což umožňuje oddělit a izolovat např. buněčná jádra, mitochondrie, nukleové kyseliny atp.
- Čistota získaných preparátů je vysoká.



# 2 typy zonální centrifugace

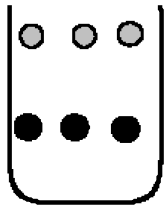
## Izokinetická centrifugace



*Vzorek nanesený  
na povrch 5 - 20 %  
sacharóзовého  
gradientu.*



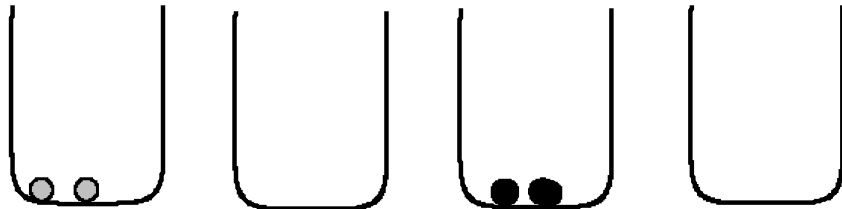
*Centrifugace.*



*Pomaleji sedimentující  
částice.  
Rychleji sedimentující  
částice.*

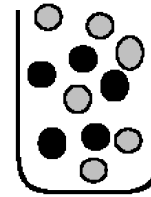


*Frakcionace obsahu zkumavky.*

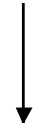


*Sběr frakcí.*

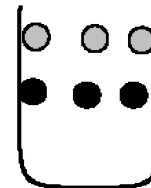
## Izopyknická centrifugace



*Roztok CsCl  
obsahující  
směs částic.*



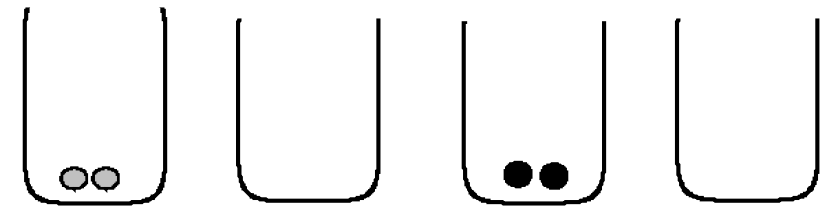
*Centrifugace.*



*Částice s nižší hustotou.  
Částice s vyšší hustotou.*



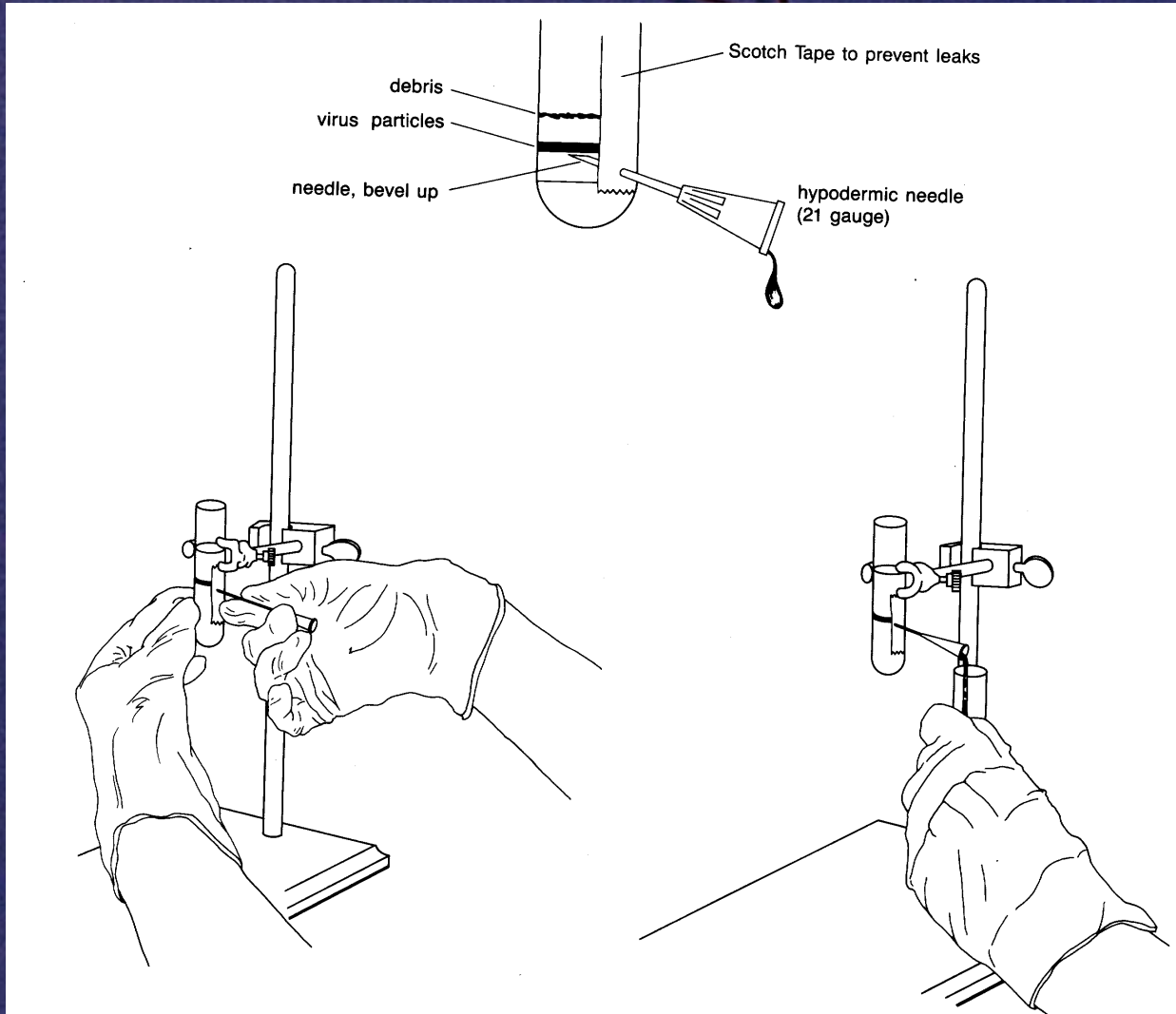
*Frakcionace obsahu zkumavky.*



*Sběr frakcí.*



# Odběr frakcí po ultracentrifugaci v hustotním gradientu





# Sběr frakcí vykapáním

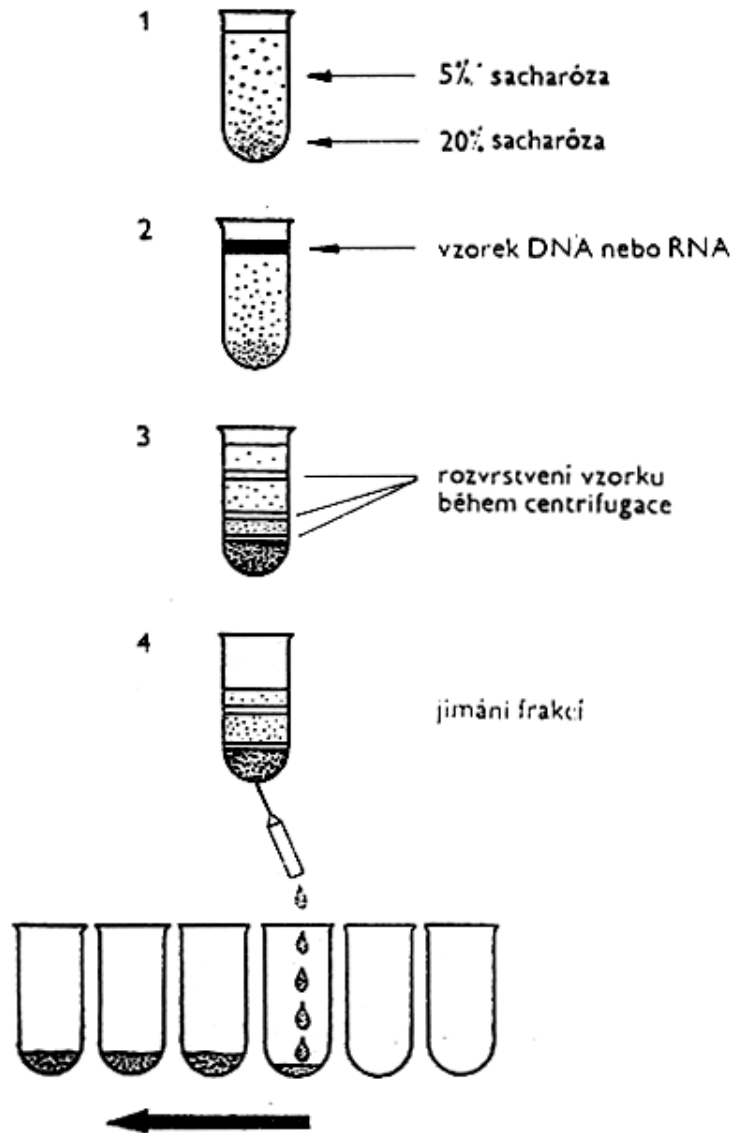


Schéma ultracentrifugace  
v sacharózovém gradientu



# Odběr frakcí pomocí frakcionátoru





# Sedimentační koeficient

- Veličina, kterou lze rychlost pohybu částice při izokinetické centrifugaci charakterizovat, se označuje jako *sedimentační koeficient* nebo též *hodnota S*. Rychlost sedimentace částice při centrifugaci lze vyjádřit obecným vztahem:

$$dr/dt = S \cdot a = s \cdot \omega^2 r,$$

kde  $r$  je vzdálenost částice od osy otáčení,

$t$  je doba centrifugace,

$a$  je odstředivé zrychlení,

$S$  je sedimentační koeficient,

$\omega$  je úhlová rychlost rotoru při otáčení.

- Po integraci uvedeného vztahu získáme rovnici pro sedimentační koeficient

$$S = d(\ln r) / \omega^2 dt = \ln r^2 / r_1 / \omega^2 (t_2 - t_1),$$

z níž lze vypočítat hodnotu sedimentačního koeficientu analyzované částice, jestliže známe její polohy  $r_1$  a  $r_2$  v centrifugační zkumavce v příslušných časových intervalech  $t_1$  a  $t_2$  a rychlost otáčení.

- Abychom mohli srovnat hodnoty  $S$  stanovené při různých podmínkách centrifugace, jsou získané hodnoty přepočítány na **standardní sedimentační koeficient**  $S_{20,w}^0$ , které charakterizují rychlost sedimentace částic o koncentraci blízké nule ve vodě při 20°C.

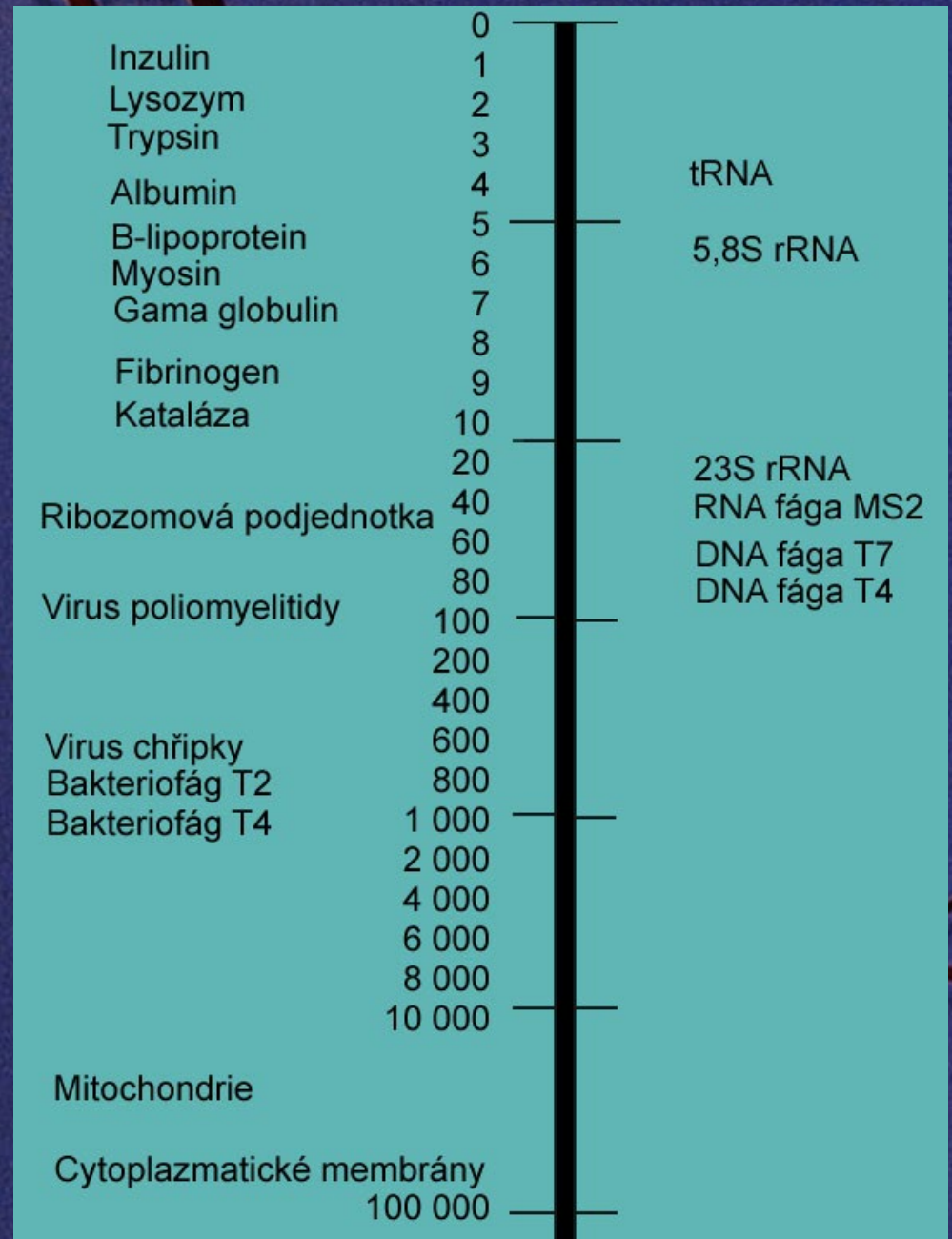


# Sedimentační koeficient

- Hodnoty sedimentačních koeficientů se pro většinu informačních makromolekul a molekulárních komplexů pohybují v rozmezí řádů  $10^{-11}$  až  $10^{-13}$  sekund.
- Vyjadřují se proto ve **Svedbergových jednotkách (S)**, kde  
**1 S (Svedberg) =  $10^{-13}$  sekundy.**
- Hodnot sedimentačních koeficientů se využívá k popisu a charakterizaci informačních makromolekul, buněčných organel a jejich struktur.
- Příkladem je označování jednotlivých druhů
  - ribozomových RNA
    - 23S-rRNA
    - 16S-rRNA
  - ribozomových podjednotek
    - 30S
    - 50S
- Pro jednotlivé typy informačních makromolekul lze *pomocí empirických vztahů z hodnot sedimentačních koeficientů vypočítat rovněž jejich molekulové hmotnosti.*

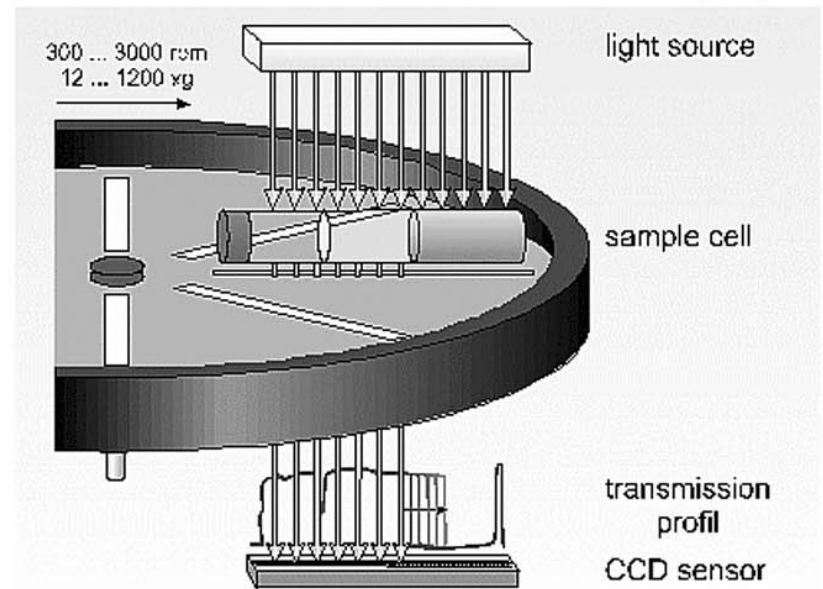
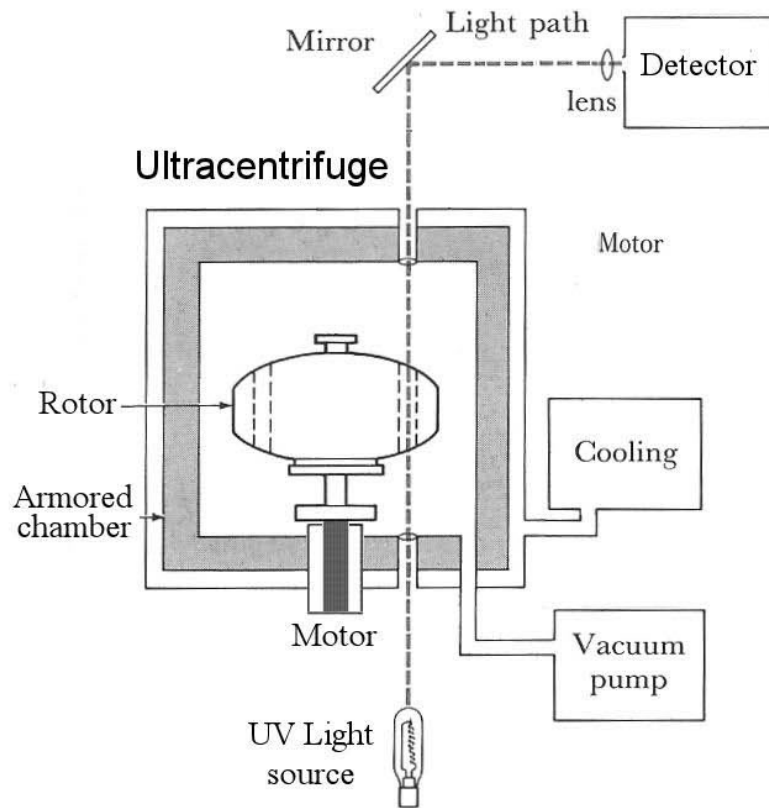


**Příklady hodnot  
standardních  
sedimentačních  
koeficientů  $S^{\circ}_{20,w}$**





# Uspořádání analytické centrifugy





# Výpočet molekulové hmotnosti DNA z hodnoty $S$

$$S_{20,w}^0 = a \cdot M^K$$

$M$  = molární hmotnost nukleové kyseliny

$a, K$  = empirické konstanty

## Výpočet srovnáním s vnitřním standardem

$$\frac{L_x}{L_{ST}} = \left( \frac{M_x}{M_{ST}} \right)^K$$

$L$  = vzdálenost od hladiny

$M$  = molární hmotnost

$K$  = empirická konstanta



# Stanovení vznášivé hustoty izopyknickou centrifugací

$$\rho^{25\text{ }^{\circ}\text{C}} = 10,8601 \times n^{\text{D}}_{25\text{ }^{\circ}\text{C}} - 13,4974$$

$n^{\text{D}}_{25\text{ }^{\circ}\text{C}}$  = index lomu roztoku CsCl



# Separace různých forem DNA



- Speciálním případem využití izopyknické centrifugace je rozdělení odlišných strukturních typů DNA v gradientech CsCl za přítomnosti etidium-bromidu.
- Po navázání etidiumbromidu na DNA se její vznášivá hustota významně snižuje, přičemž množství navázaného etidiumbromidu a tím i pokles hustoty DNA závisí na jejím strukturním typu.
- To umožňuje vzájemně separovat a izolovat různé formy DNA, např. kovalentně uzavřené kružnice plazmidových DNA od otevřených a lineárních molekul plazmidové a chromozomové DNA.



# Výpočet % (G+C)

- Separace částic na základě jejich odlišné hustoty se používá k jejich izolaci a charakterizaci.
- Je známo, že na vznášivou hustotu dvouřetězcové DNA má vliv zastoupení jednotlivých typů párů bází, čehož se využívá ke stanovení podílu GC-párů ve vzorcích DNA.
- Platí, vztah

$$\% (G+C) = (\rho - 1,660/0,098) \cdot 100$$

kde  $\rho$  = vznášivá hustota vzorku dvouřetězcové DNA.