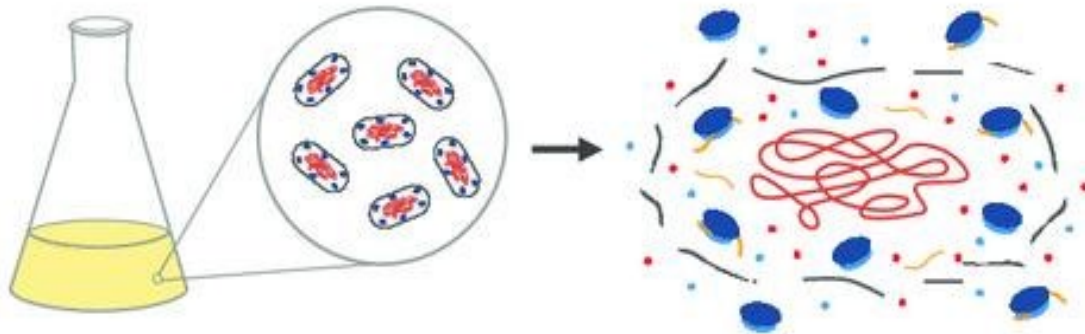


Extract Preparation

Cell Lysis



CENTRIFUGACE

CENTRIFUGACE

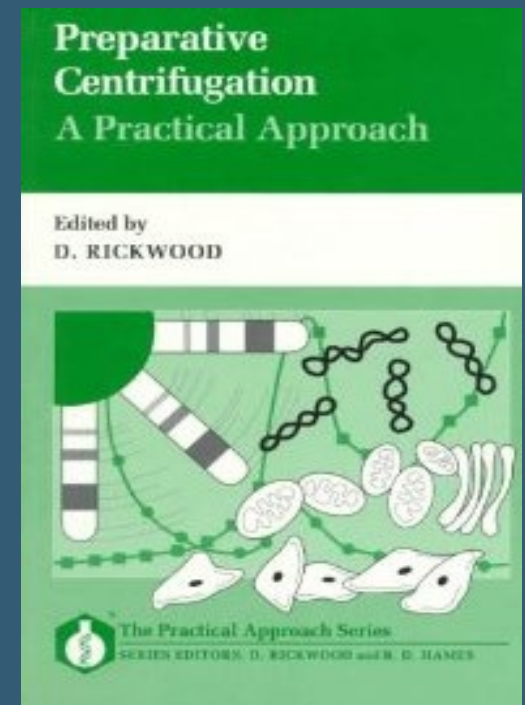
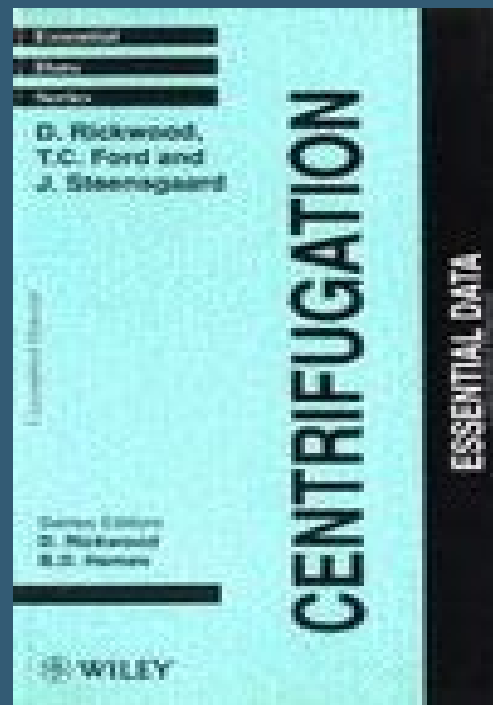
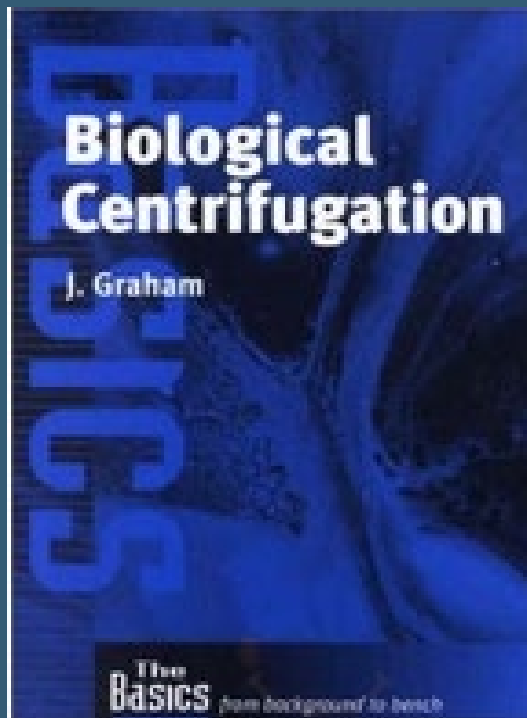
Důvodem použití centrifug je nutnost urychlit sedimentaci pevných částic či molekul v kapalném prostředí.

CENTRIFUGACE

Na sedimentaci má vliv

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

LITERATURA



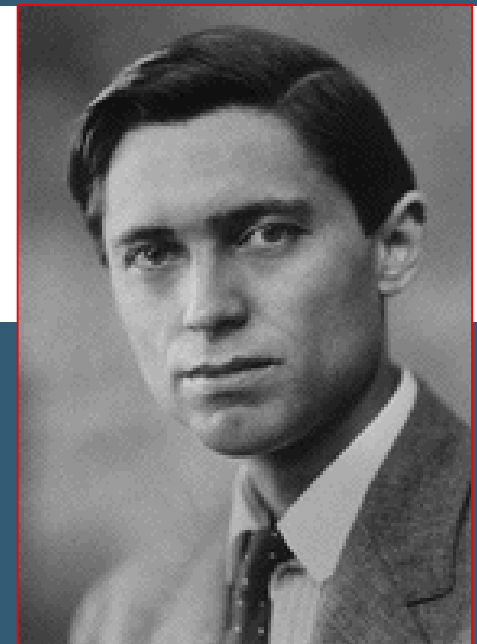
CENTRIFUGACE

- 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)



UPPSALA
UNIVERSITET



Nobelova cena za chemii 1926
pojmenována po něm

Svedbergova jednotka pro vyjádření
sedimentačního koeficientu

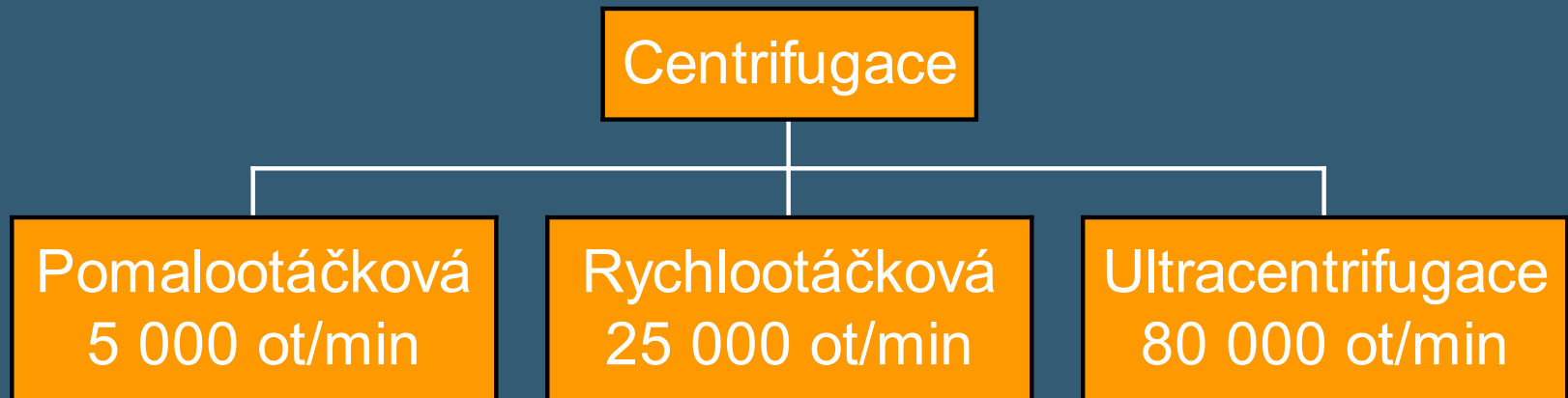
CENTRIFUGACE - POUŽITÍ

PREPARATIVNÍ

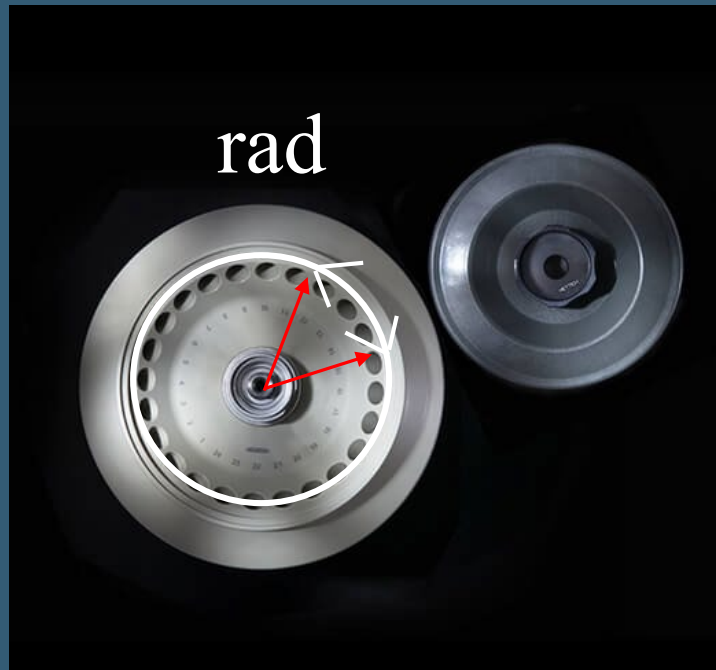
ANALYTICKÉ

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

ROZDĚLENÍ CENTRIFUG



!!!! OTÁČKY → g !!!!



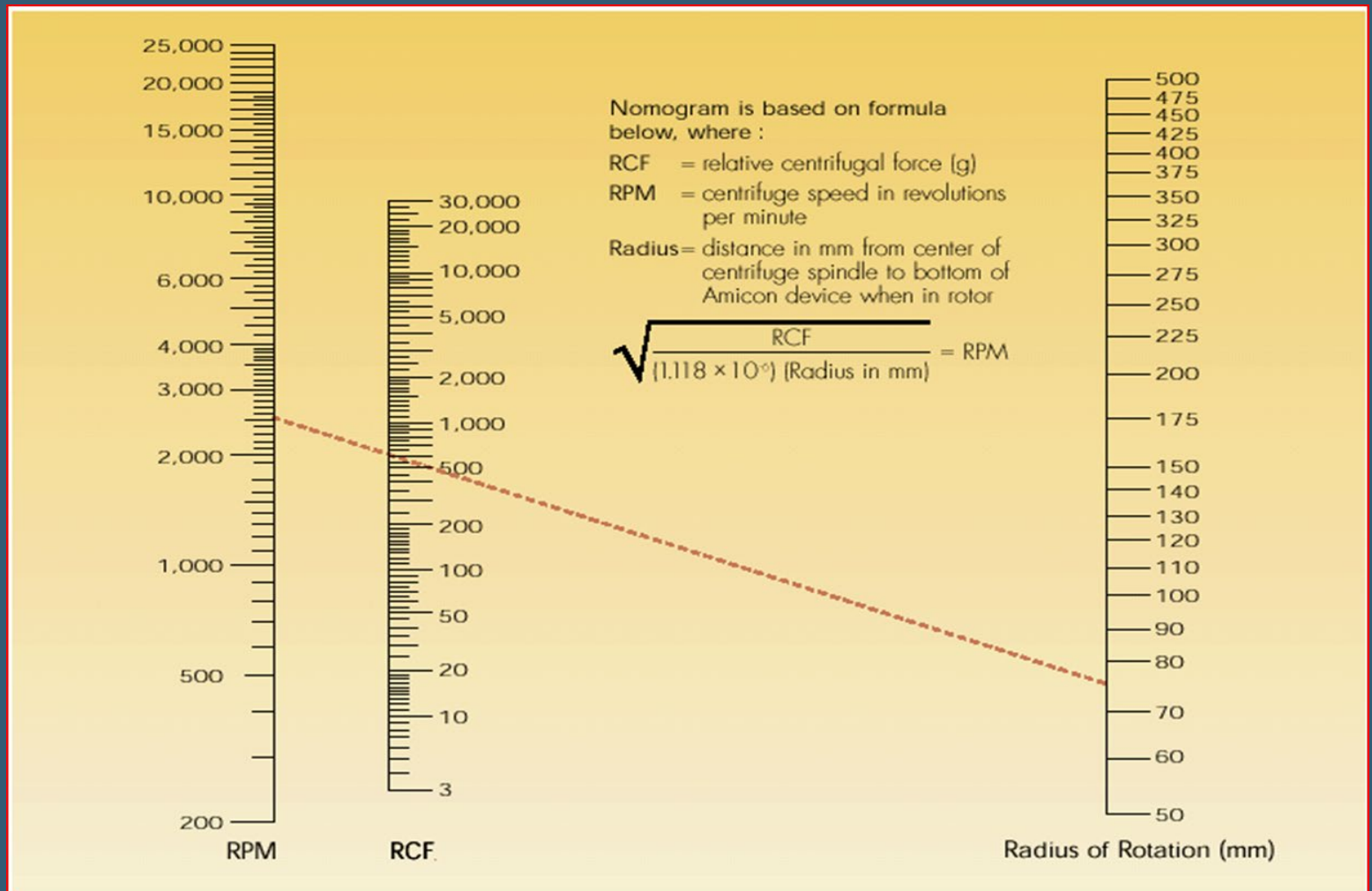
$$g = \omega^2 \cdot r$$

ω - úhlová rychlost
(rad/s)

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

f – otáčky/min

OTÁČKY → G



PREPARATIVNÍ CENTRIFUGACE

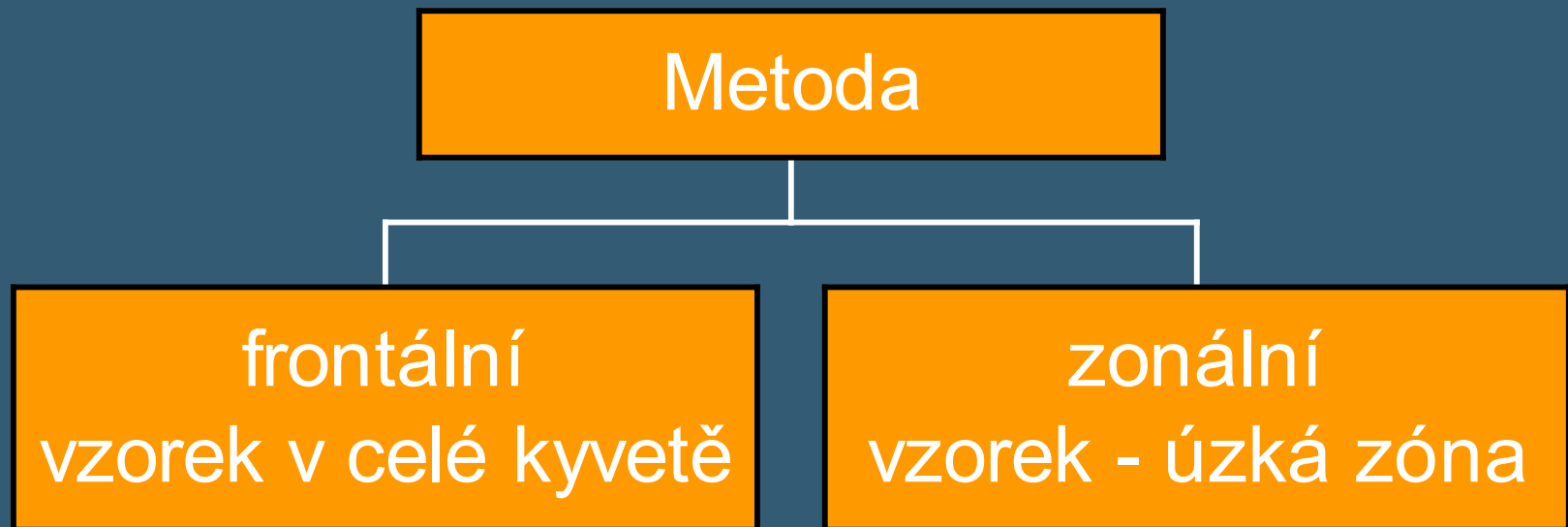
TYP centrifugace

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

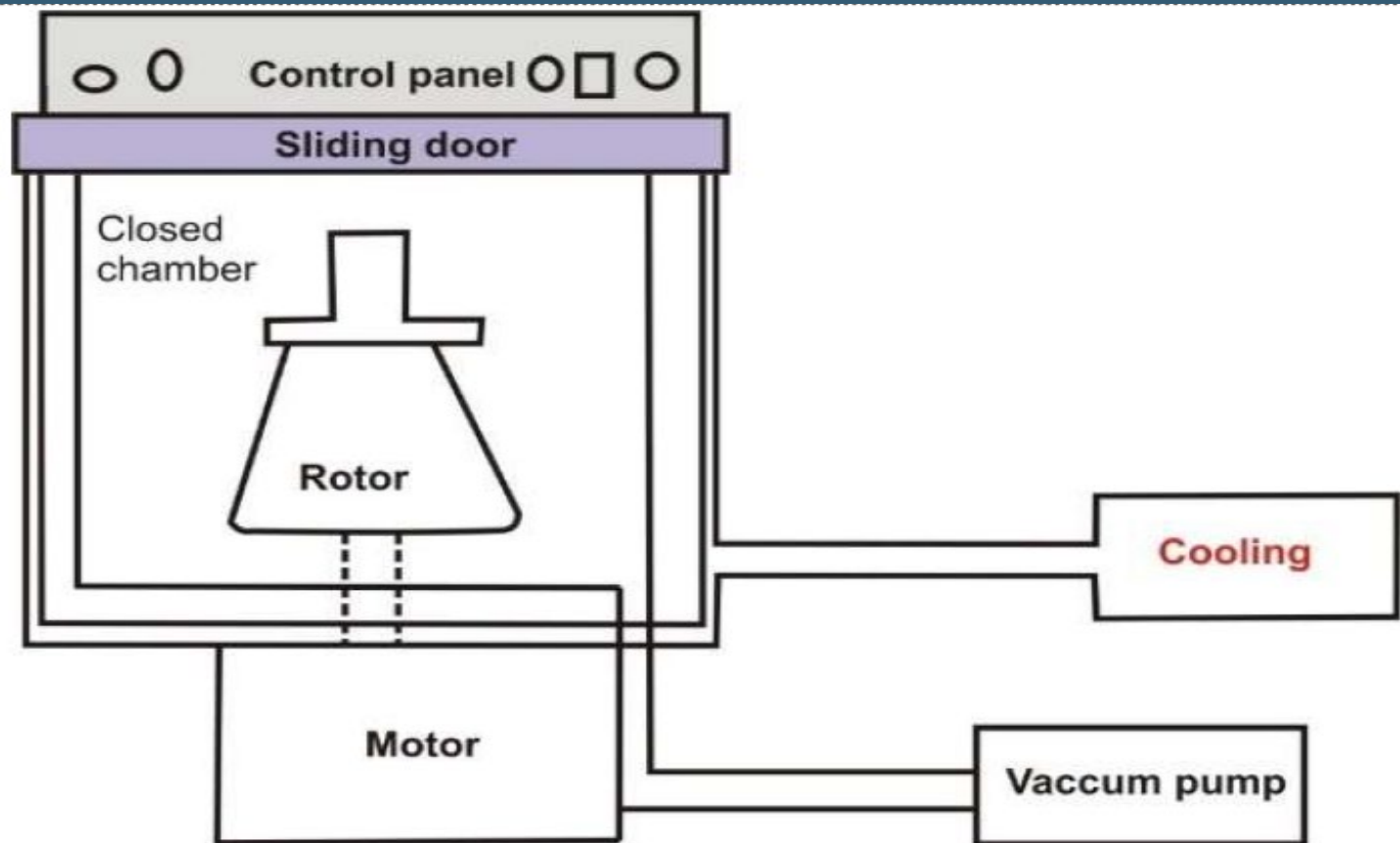
DIFERENCIÁLNÍ
- dvě fáze
(sediment/supernatant)

ZONÁLNÍ
- tvorba zón v
hustotním gradientu

METODY NANÁŠENÍ VZORKU



PREPARATIVNÍ CENTRIFUGA



PREPARATIVNÍ CENTRIFUGA



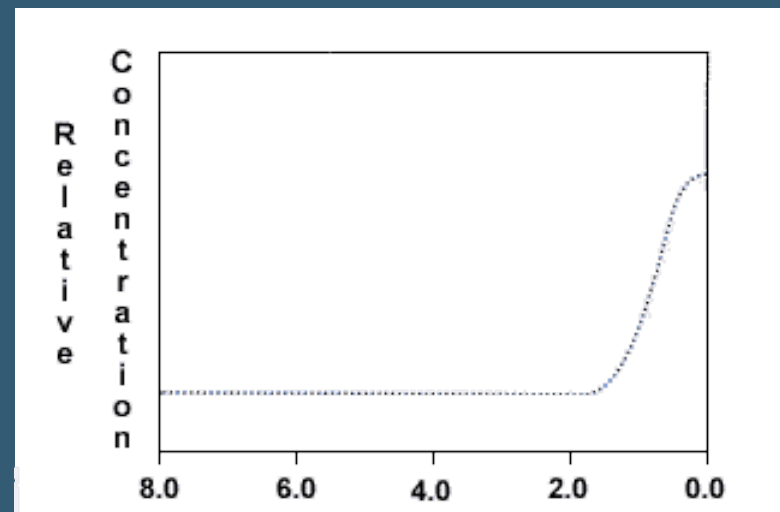
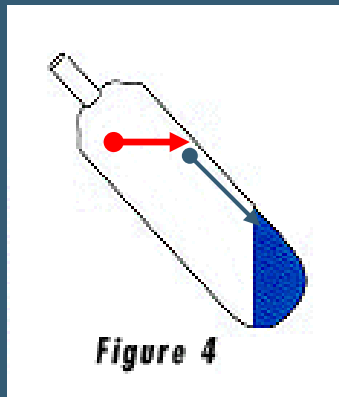
PREPARATIVNÍ ULTRACENTRIFUGA



ROTORY

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

ÚHLOVÝ ROTOR



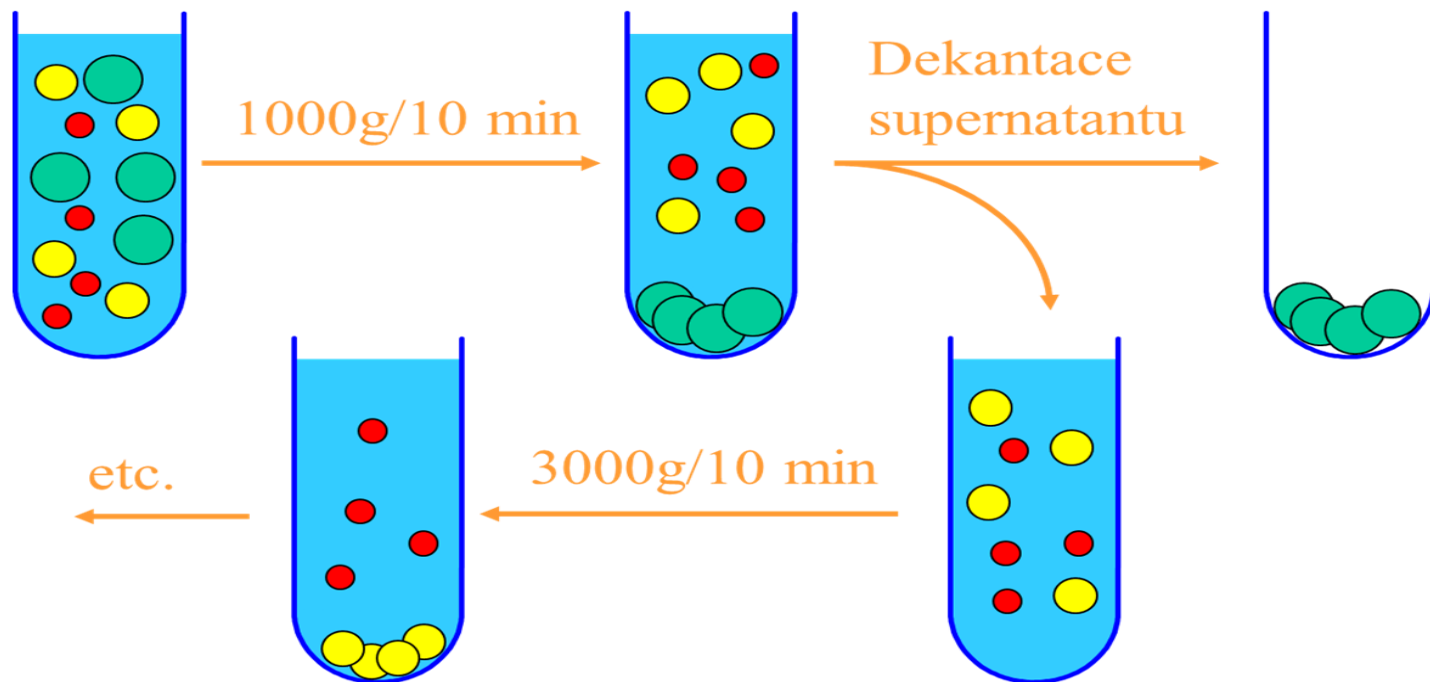
DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE

Centrifugace

diferenciální
dvě fáze
(sediment
supernatant)

zonální
zóny
(gradient)

- opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček = gravitací

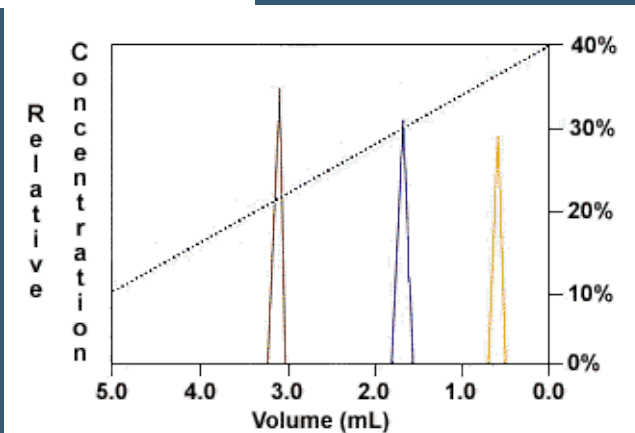
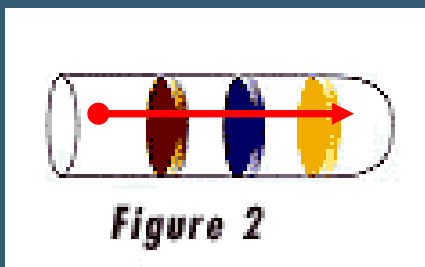


VÝKYVNÝ ROTOR

Centrifugace

diferenciální
dvě fáze
(sediment
supernatant)

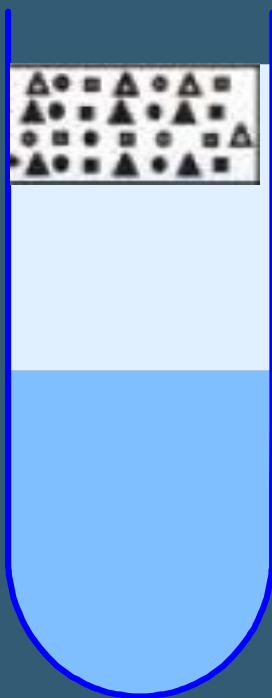
zonální
zóny
(gradient)



GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

t_0

Hustotní bariera



Diskontinuální



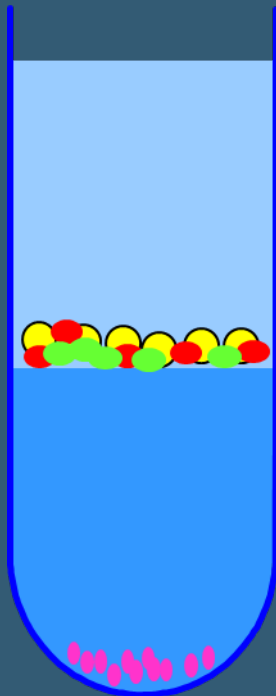
Kontinuální



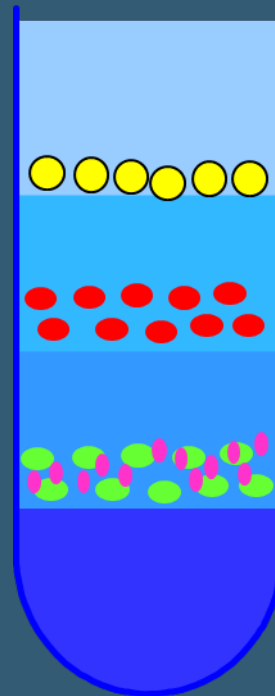
GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

t_{end}

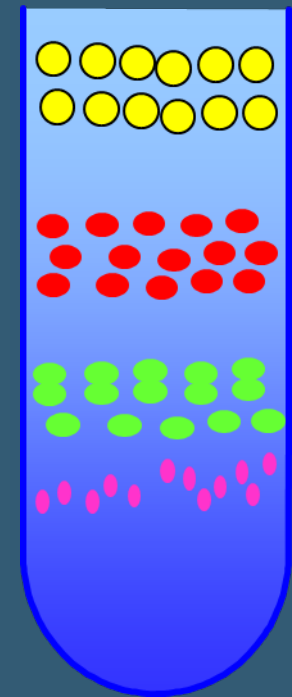
Hustotní bariéra



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 – SiO₂

Hypertonické prostředí

Nutno připravit gradient

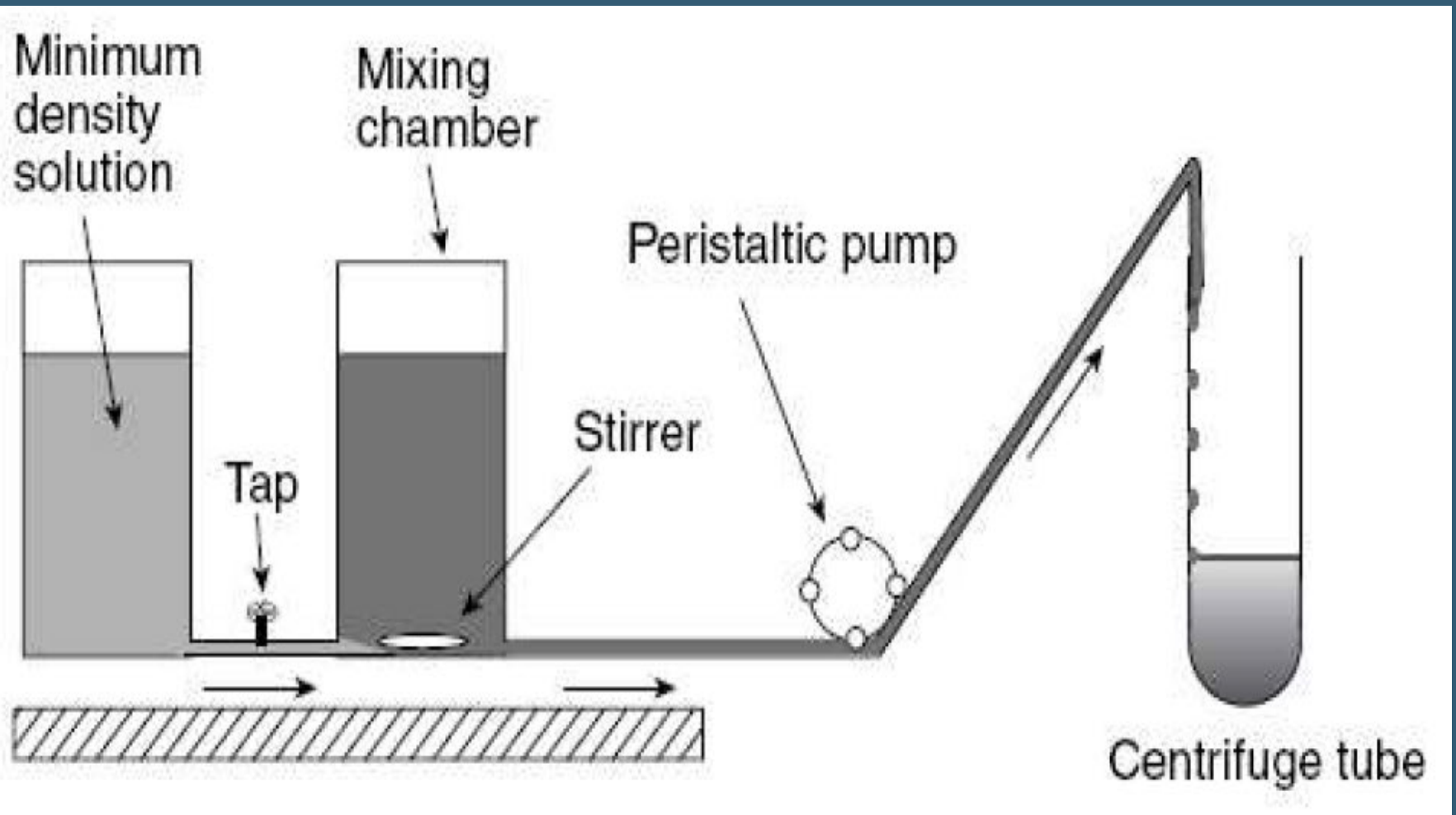
- CsCl

- Cs₂SO₄

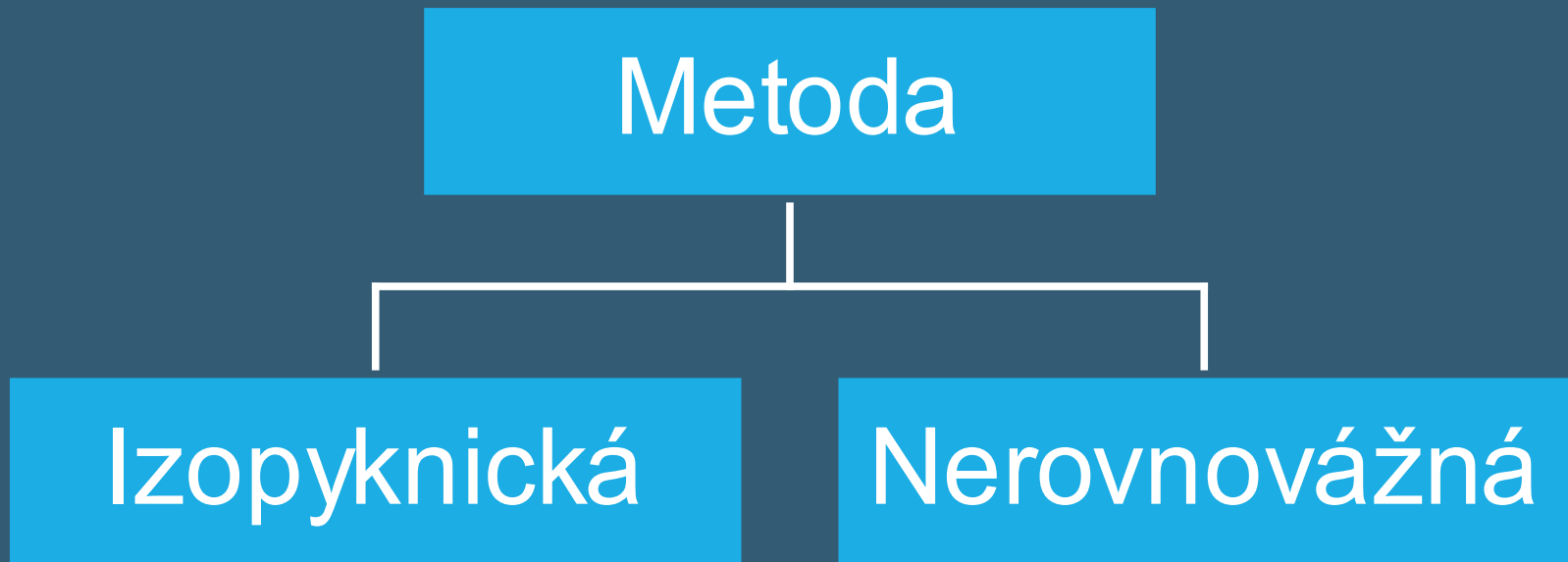
Gradient vzniká během centrifugace

GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

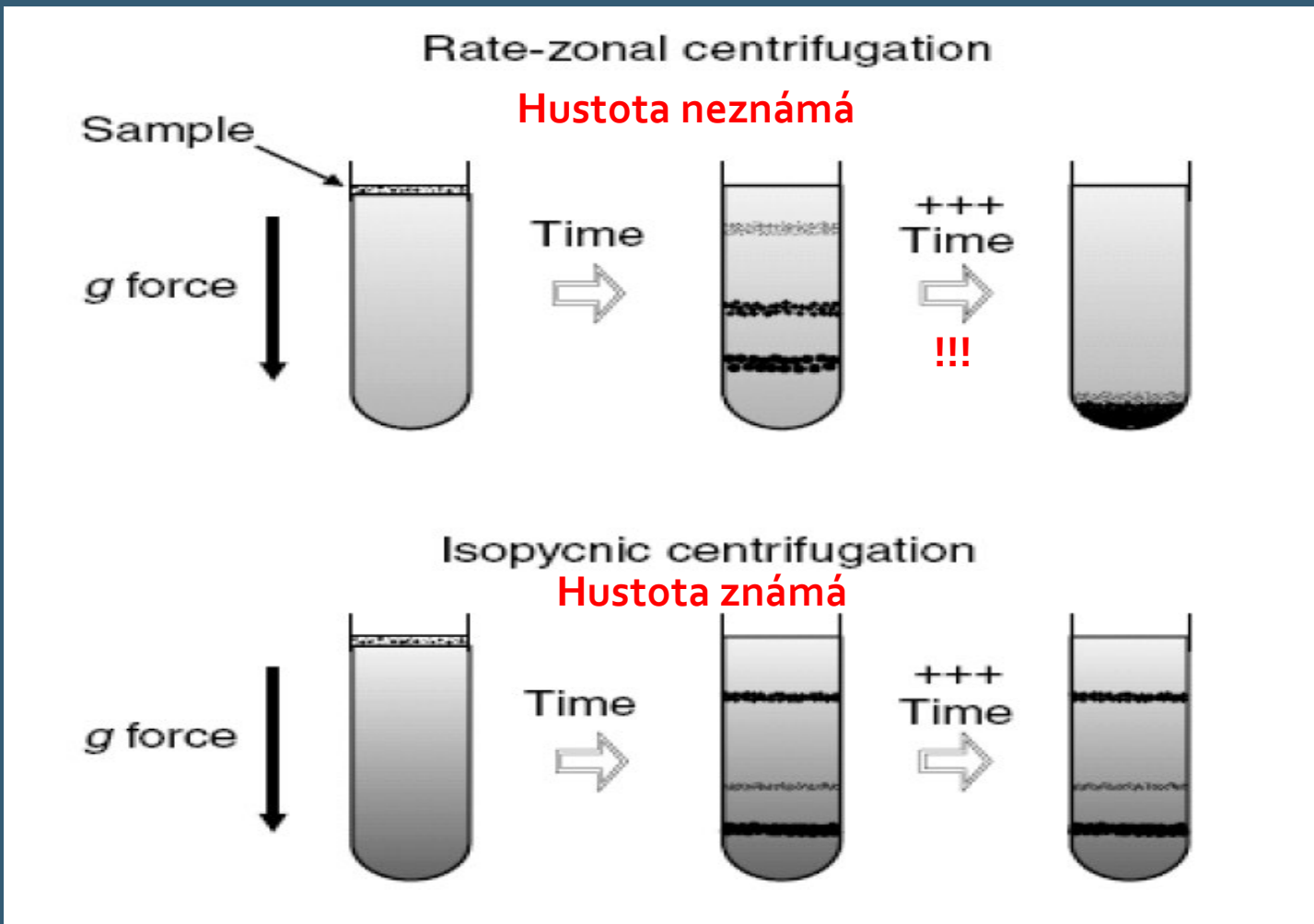
PŘÍPRAVA GRADIENTU



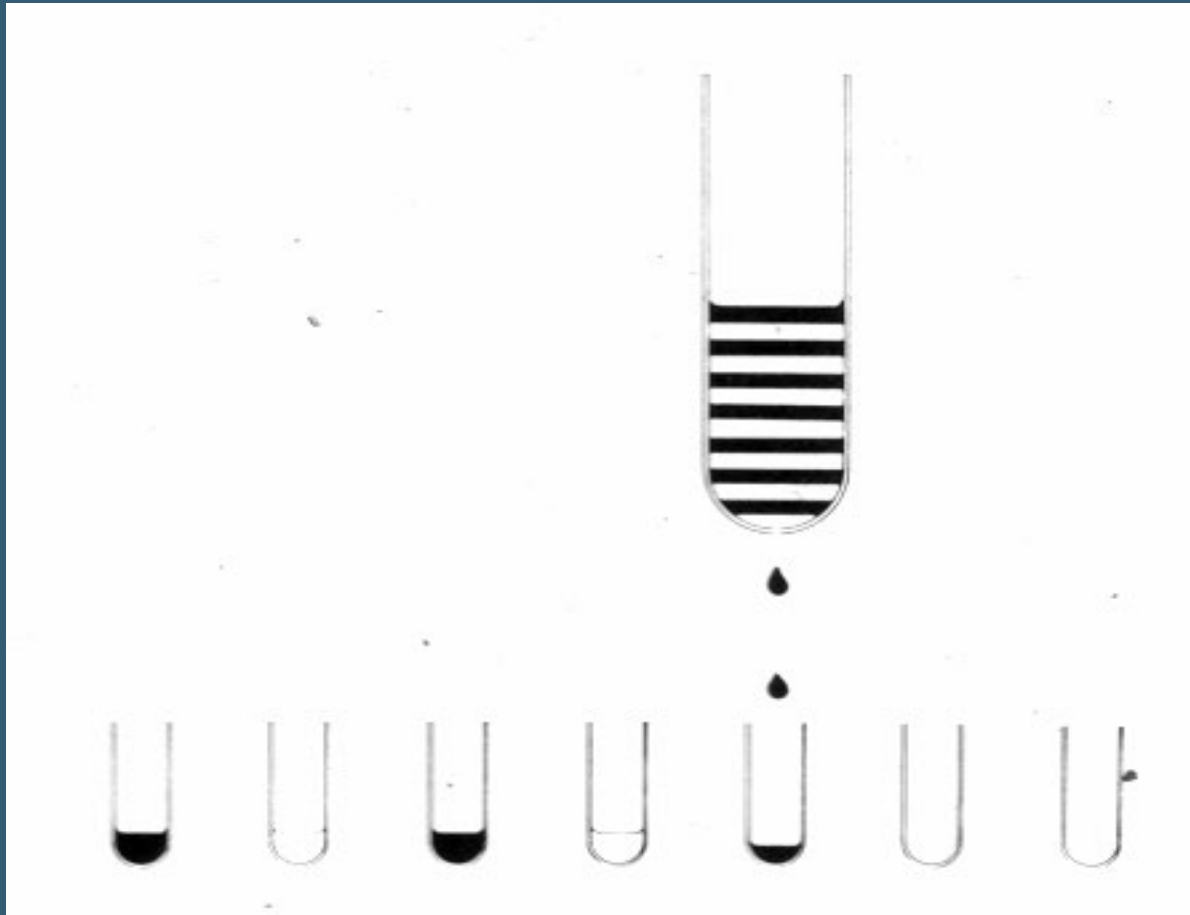
GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



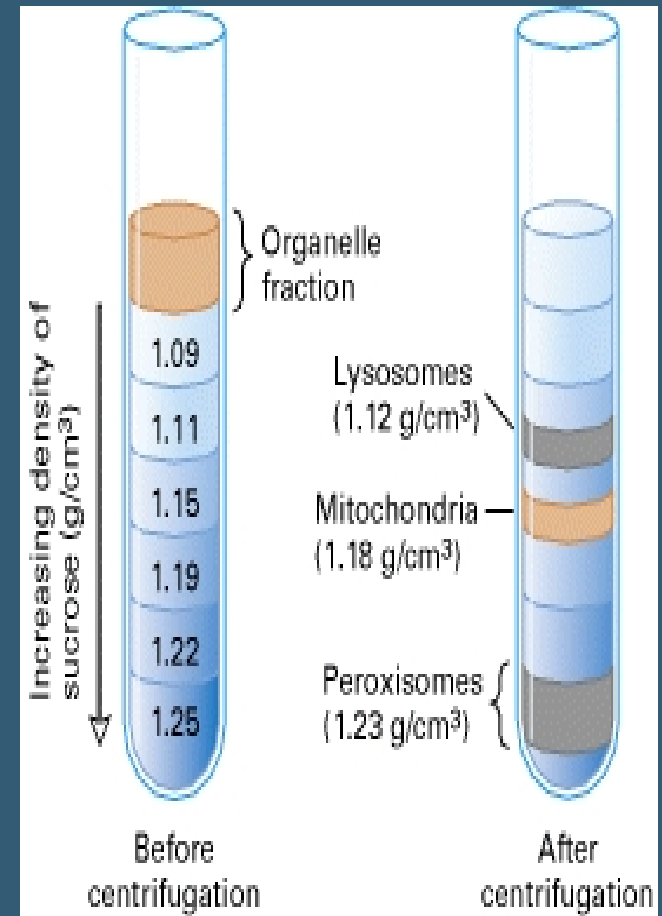
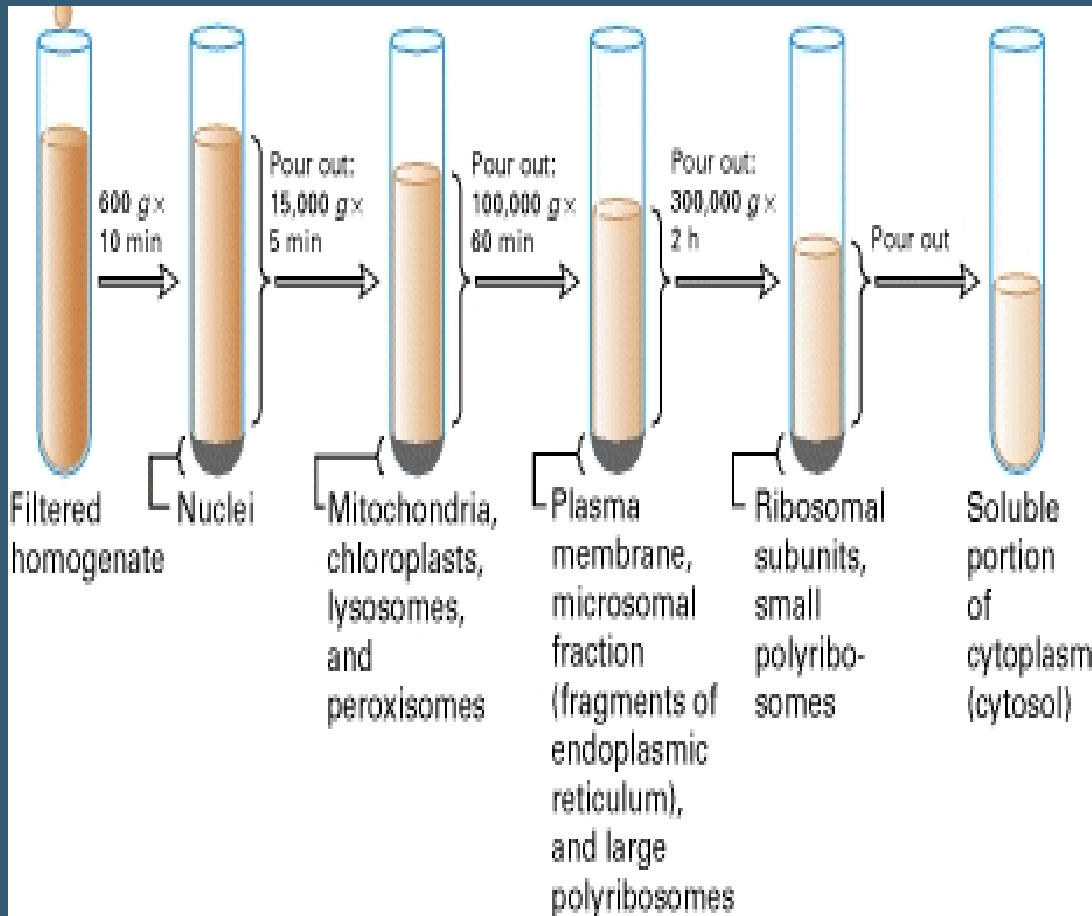
GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



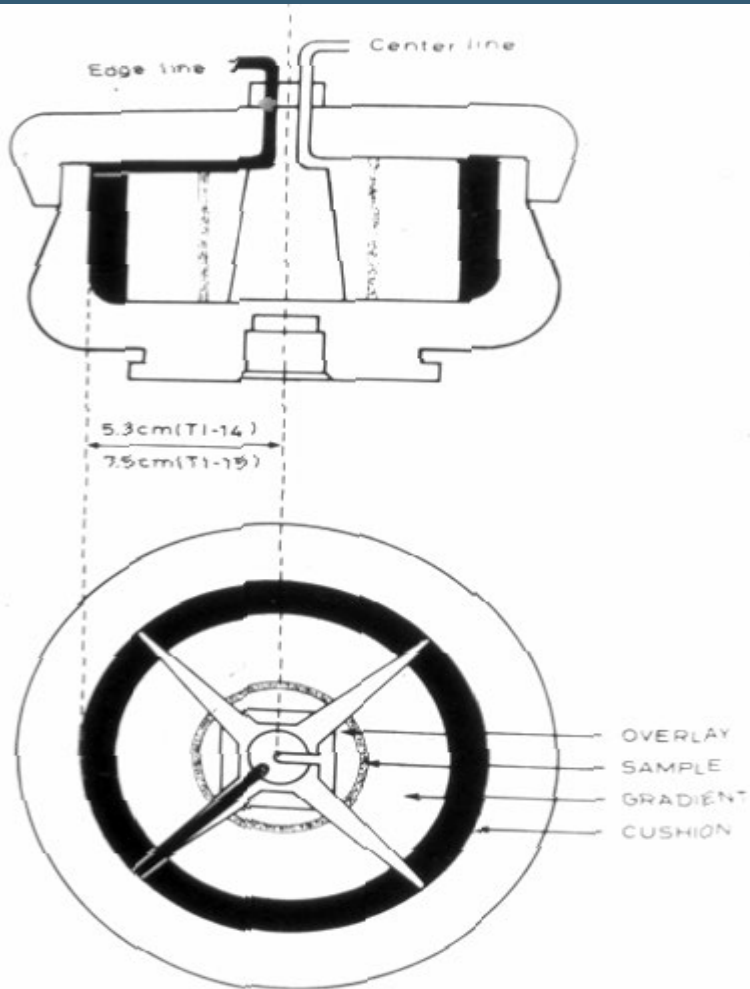
GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



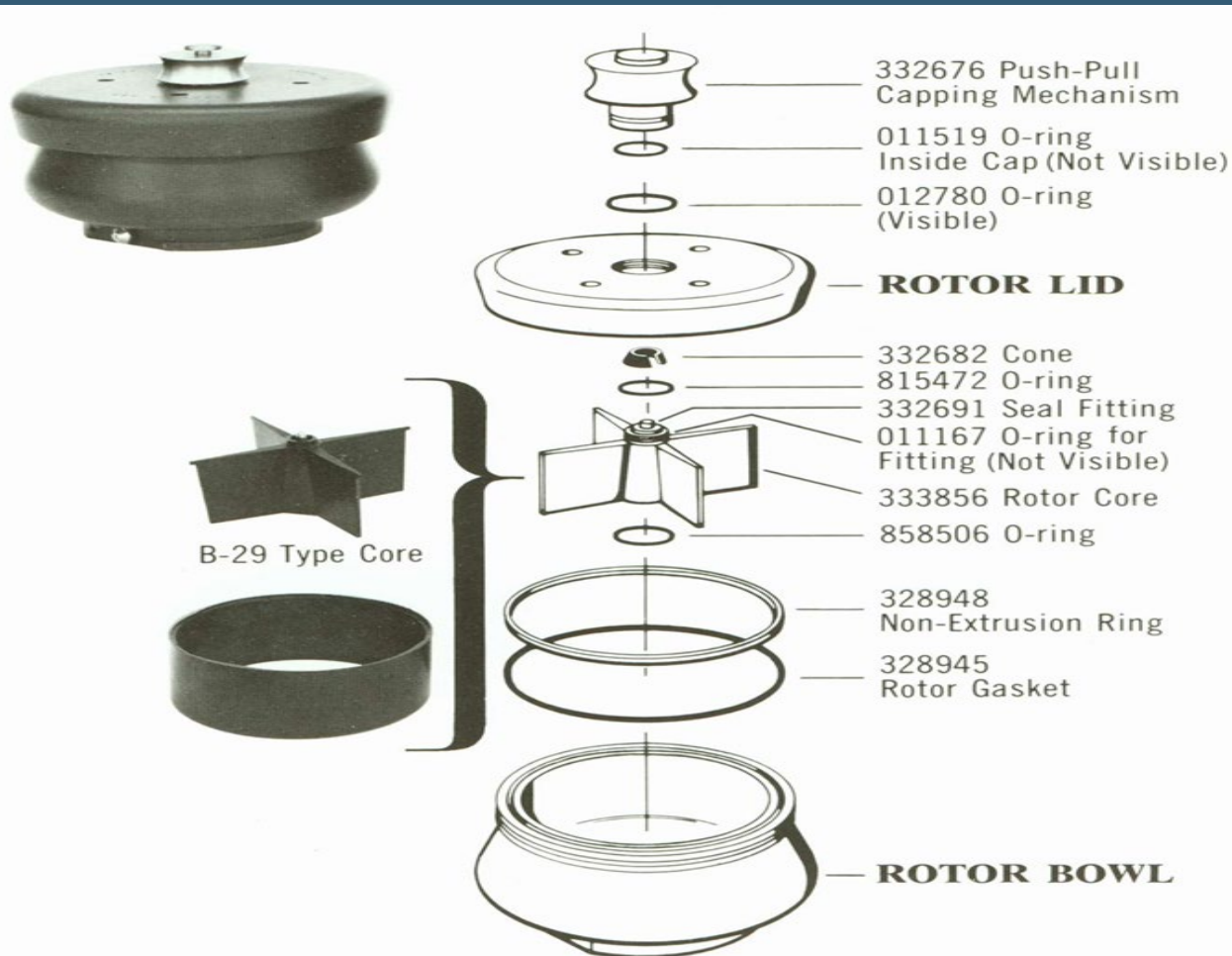
DIFERENCIÁLNÍ VERSUS GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



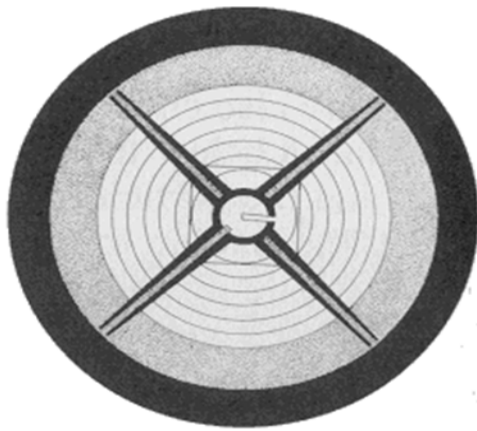
ZONÁLNÍ ROTOR



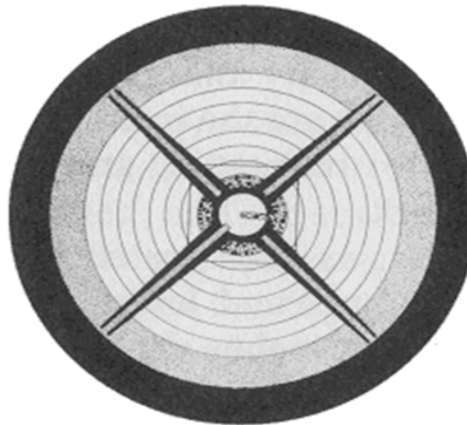
ZONÁLNÍ ROTOR



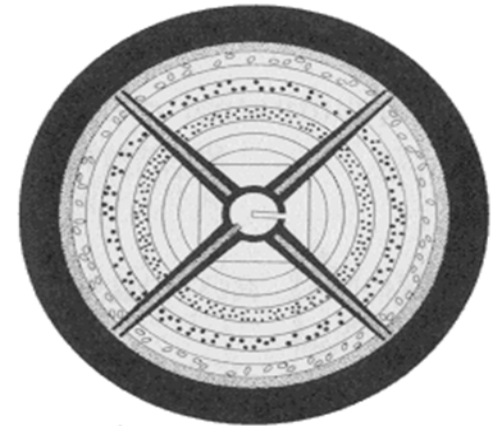
CENTRIFUGACE SE ZONÁLNÍM ROTOREM



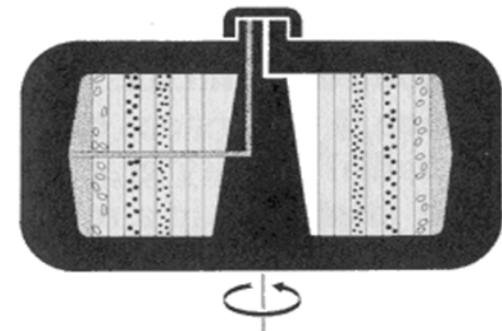
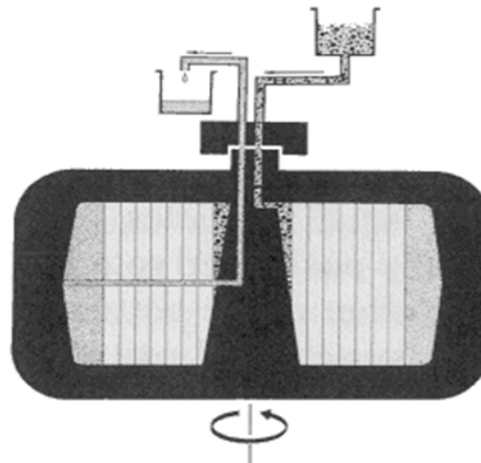
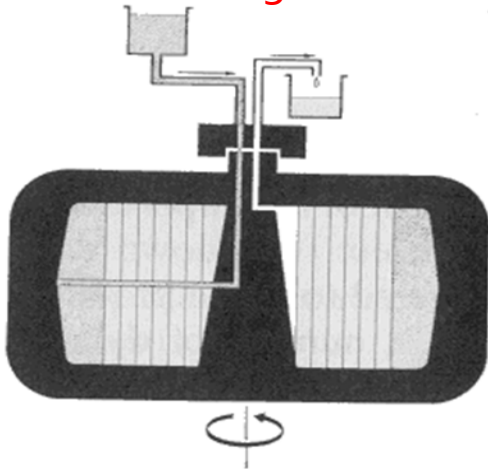
Tvorba gradientu



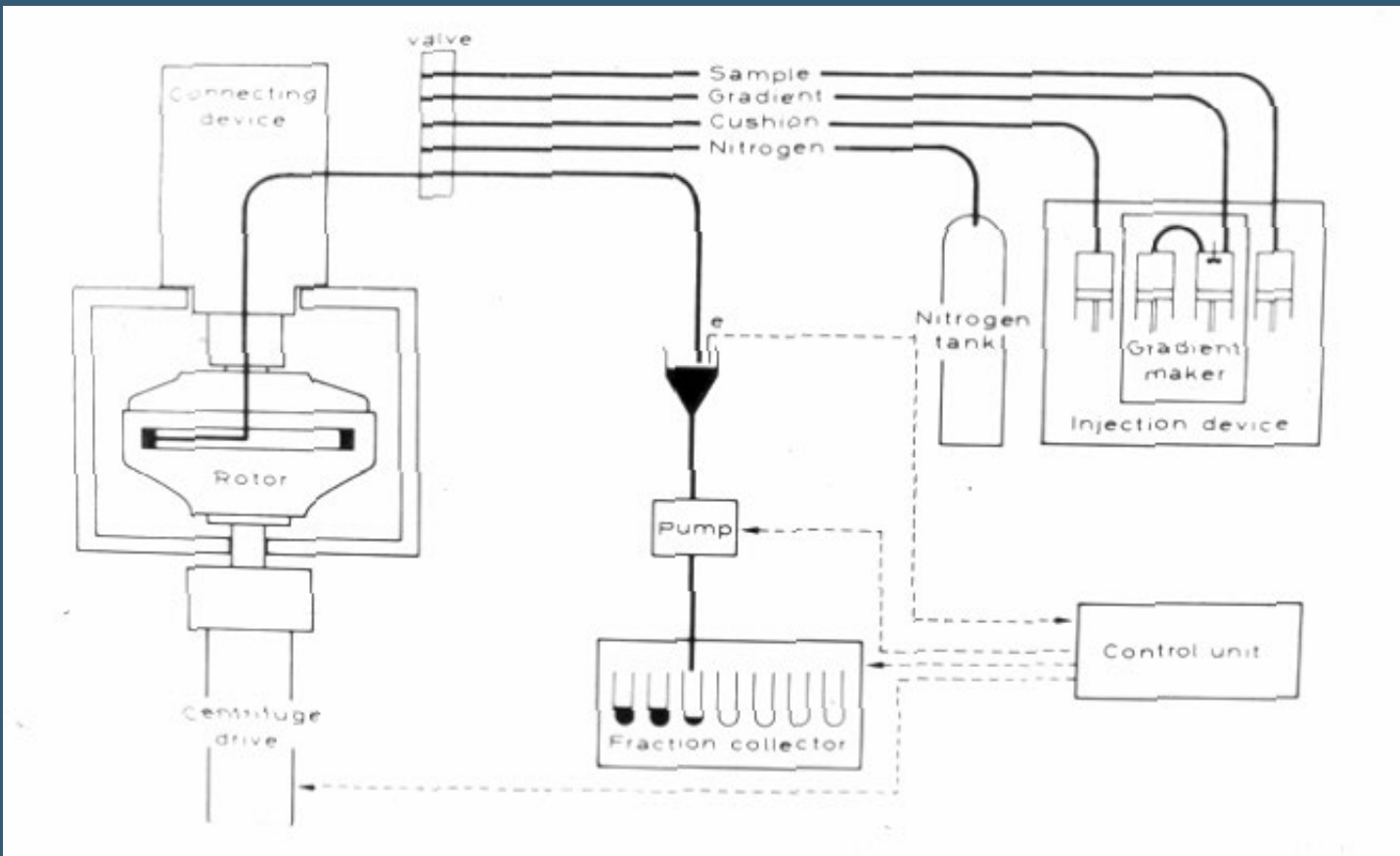
Nanášení vzorku



Centrifugace

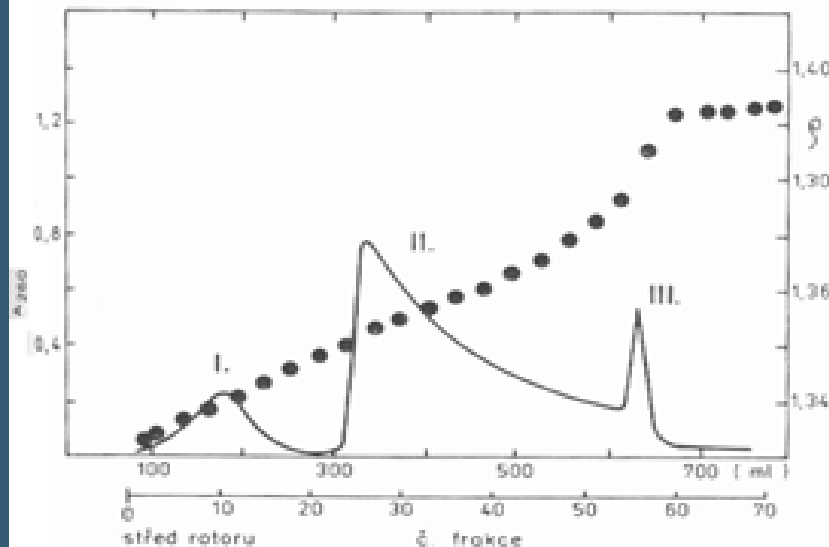


CENTRIFUGACE SE ZONÁLNÍM ROTOREM



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

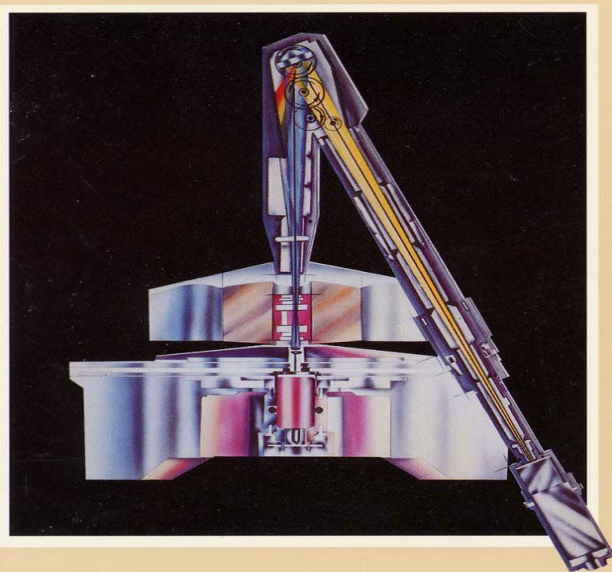
Dělení – 40 000 ot/min 7 hod

Jímané frakce 10 ml

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

1 000 000 g (approx. $9\ 800\ \text{km/s}^2$)

Introduction to Analytical Ultracentrifugation



BECKMAN

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., Vídeňská 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 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 PFF, <http://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/sluzby>.

2. Historie analytické ultracentrifugy

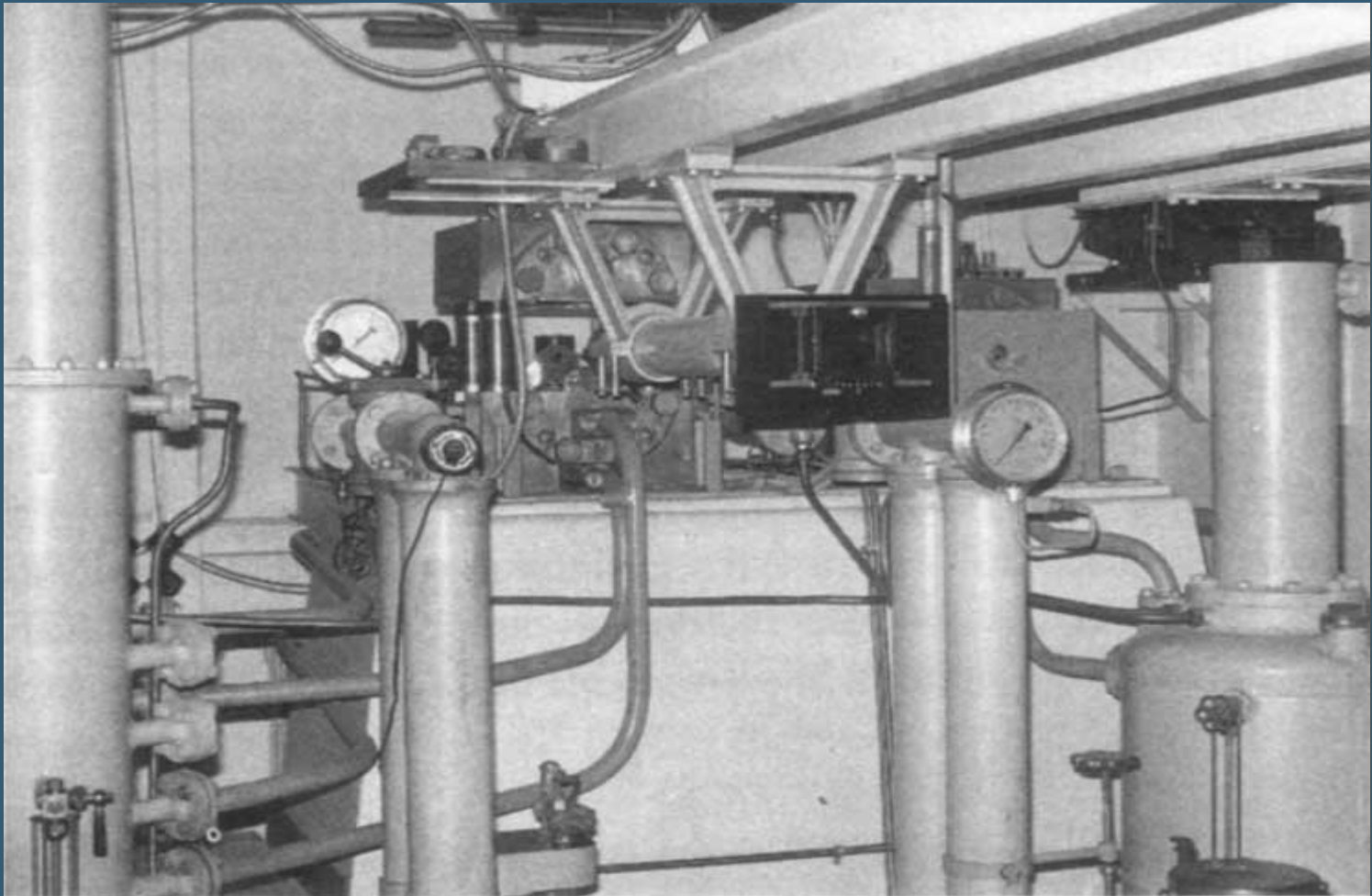
Historii analytické ultracentrifugy započal její konstruktér a objevitel metody sedimentační analýzy Theodor Svedberg (1884–1971)¹. Rodák ze švédského Fleräng, okres Gävleborg, se stal v roce 1904 studentem univerzity v Uppsale, která už také zůstala jeho hlavním celoživotním působištěm. V letech 1912–1949 zastával na této univerzitě funkci profesora fyzikální chemie. Svedbergova práce se týkala převážně koloidů a makromolekulárních látek. Spolu s 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

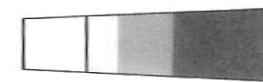
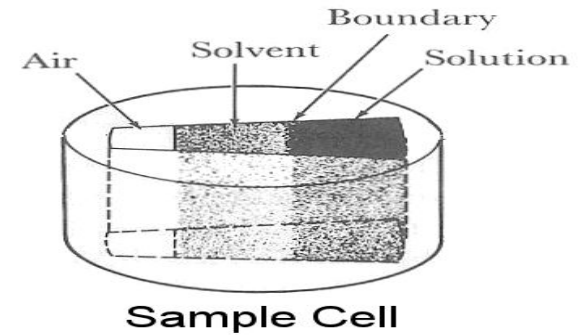
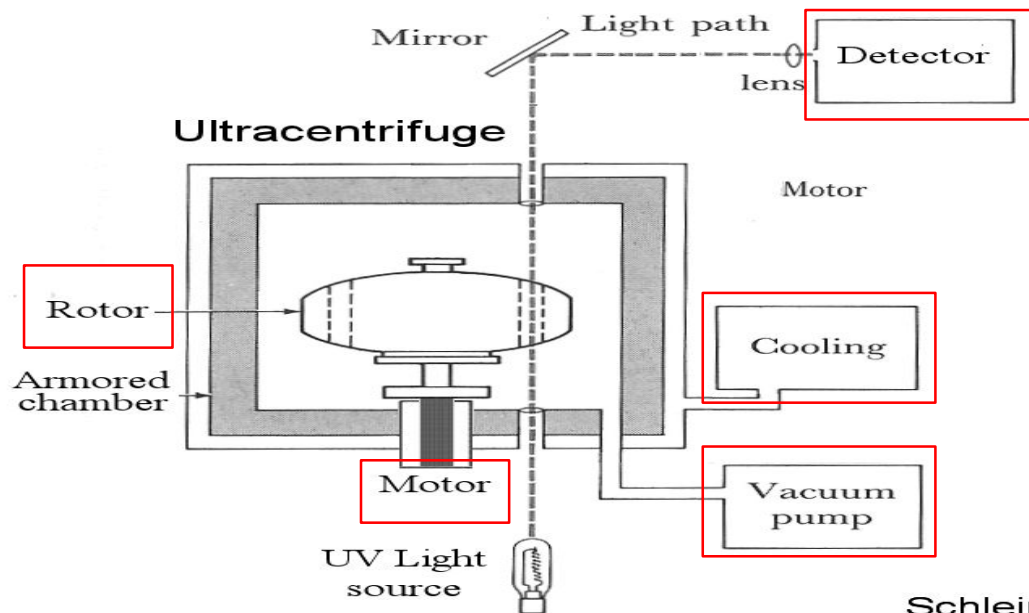
Vzhledem k tomu, že již přes padesát let se vývoji a výrobě analytické ultracentrifugy věnuje zejména firma Beckman Coulter, výčet technologických možností metody je omezen na popis současného typu analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-A/XL-I tohoto výrobce. Z hlediska odstředivé síly lze dosahovat tíhového pole v rozmezí přibližně 60 až 300 000 $\times g$ (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 šterbiny a fotonasobice. V klasickém uspořádání je vzorek umístěn do kvarty 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 ULTRACENTRIFUGA

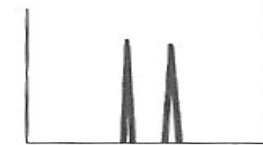
THEODOR SVEDBERG



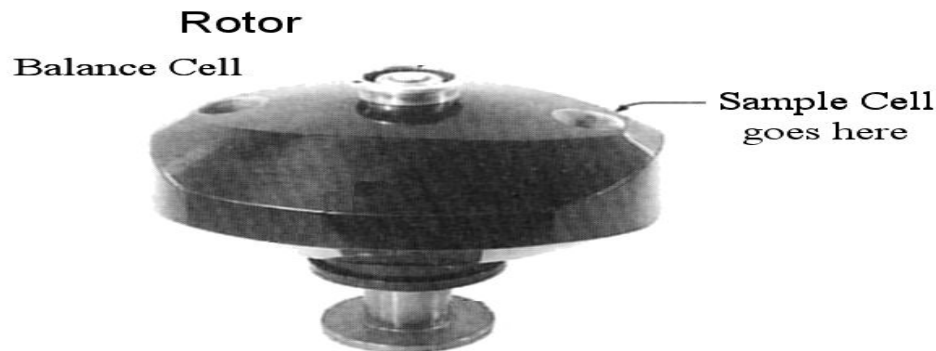
ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE



Schleirin Optics (schematic)

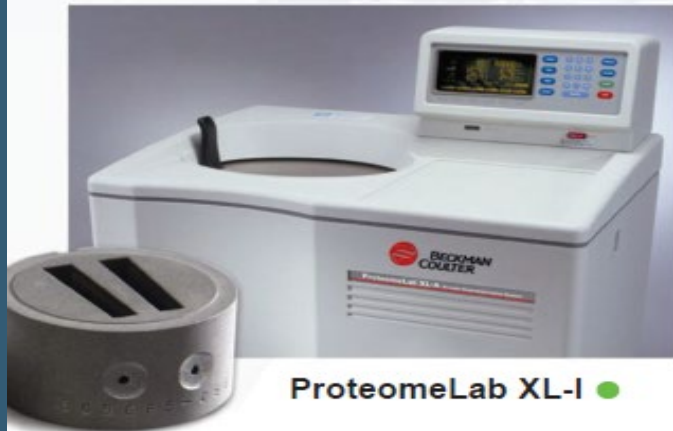


Centrifugal force



ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA

Instrumentace

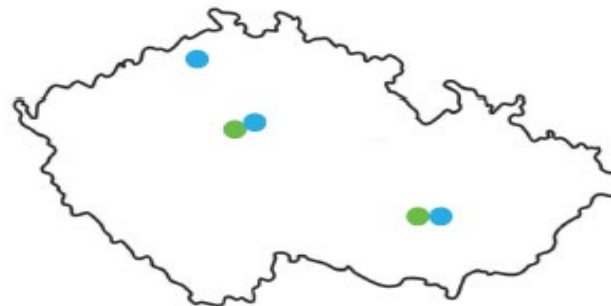


ProteomeLab XL-I ●



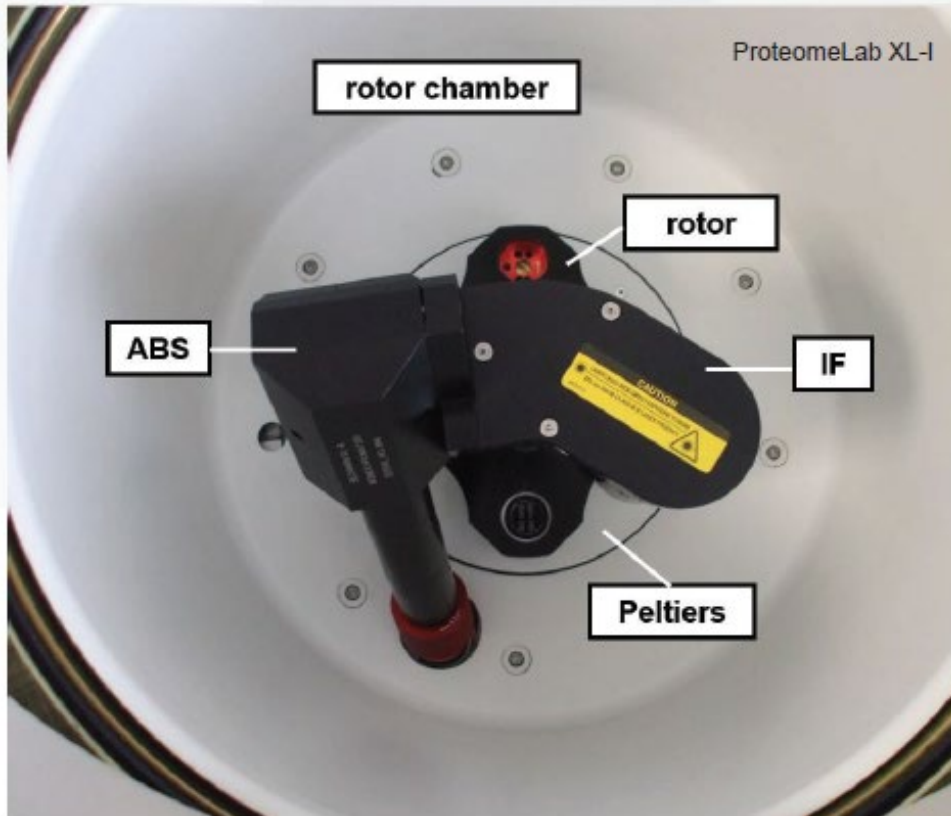
Optima AUC ●

- maximální rychlost 60 000 rpm
- temperature range 0° to 40° C
- **absorbanční optika**
- vlnové délky 190 až 800 nm
- **Rayleighova interferenční optika**
- vlnová délka laseru 660 nm



ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA

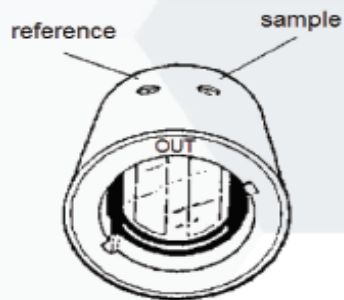
Analytická ultracentrifuga



counterbalance

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA

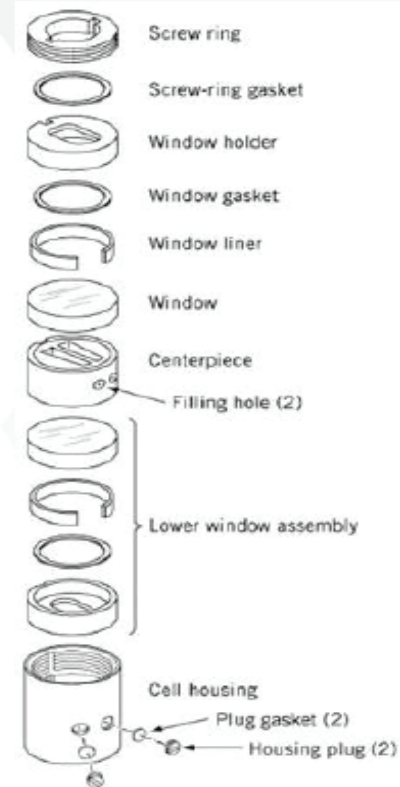
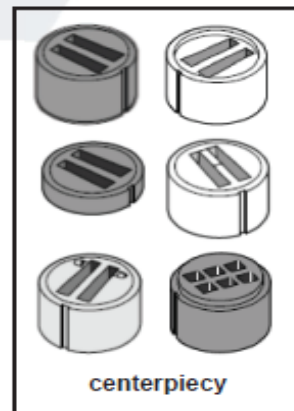
Analytická ultracentrifuga



sestavená dvousektorová
AUC cela



komponenty AUC cely

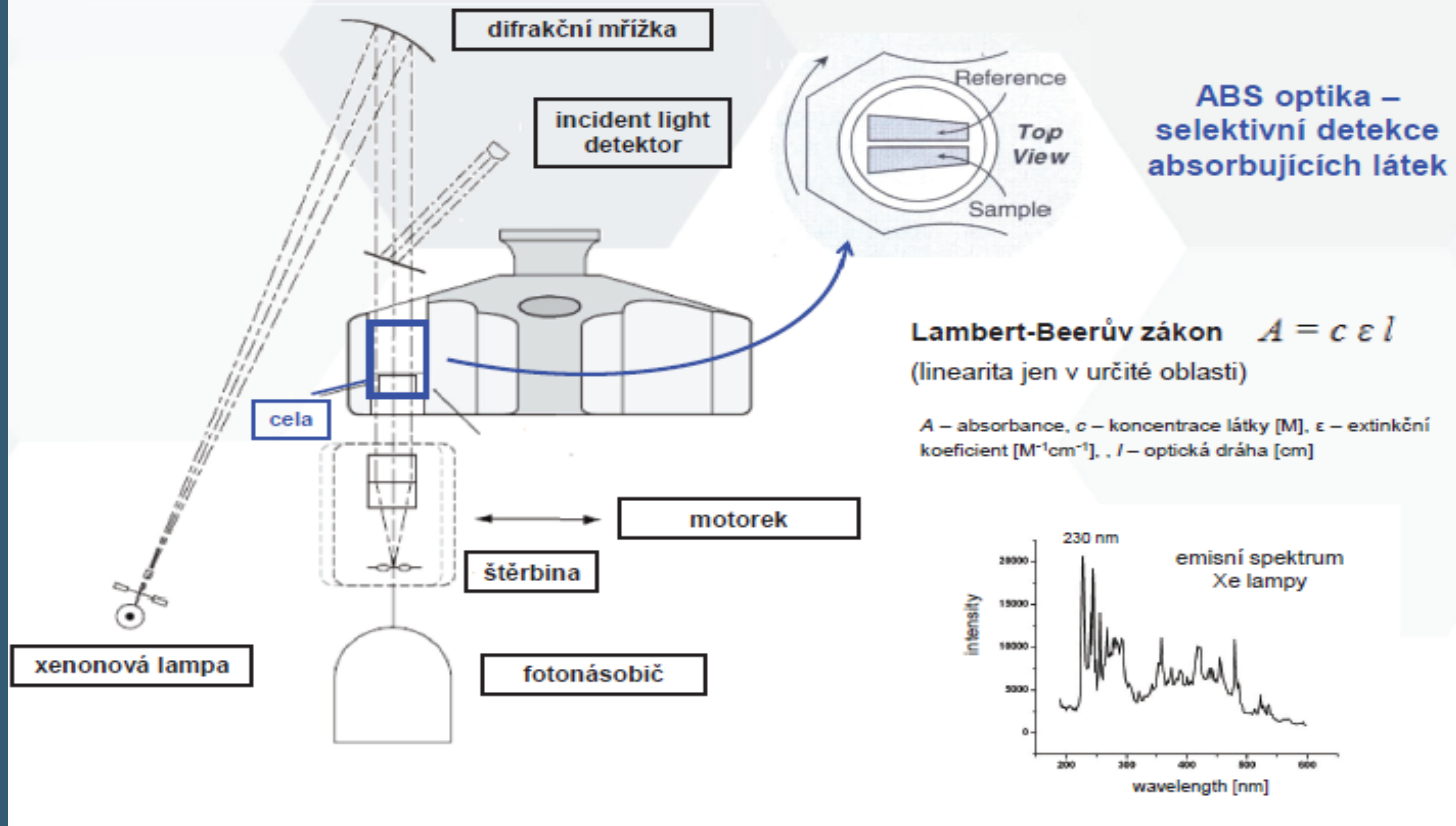


OPTICKÝ SYSTÉM

- 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)

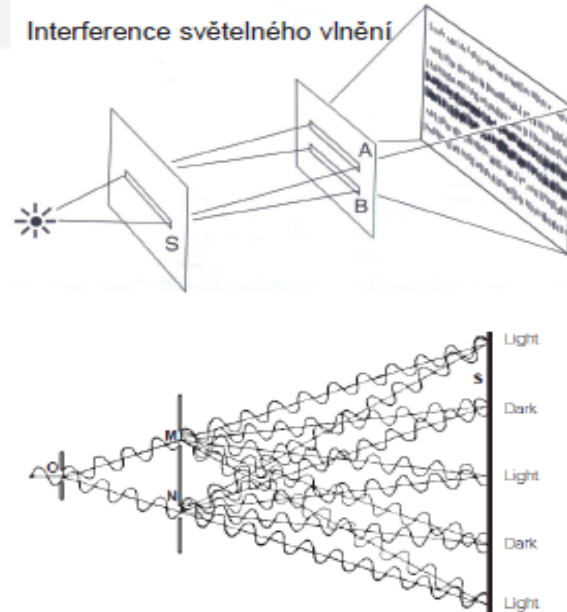
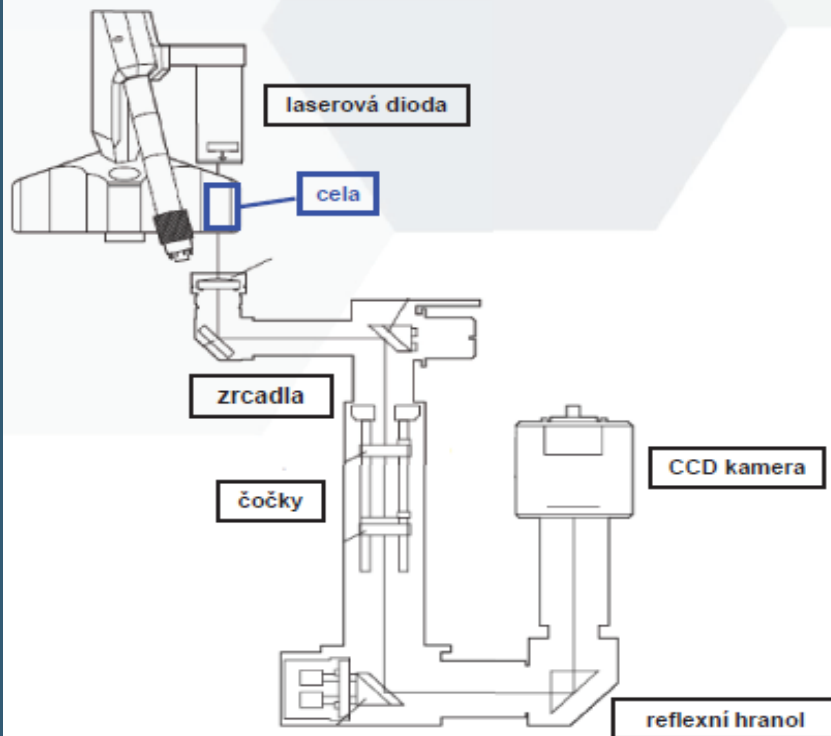
OPTICKÝ SYSTÉM

Absorbanční optika



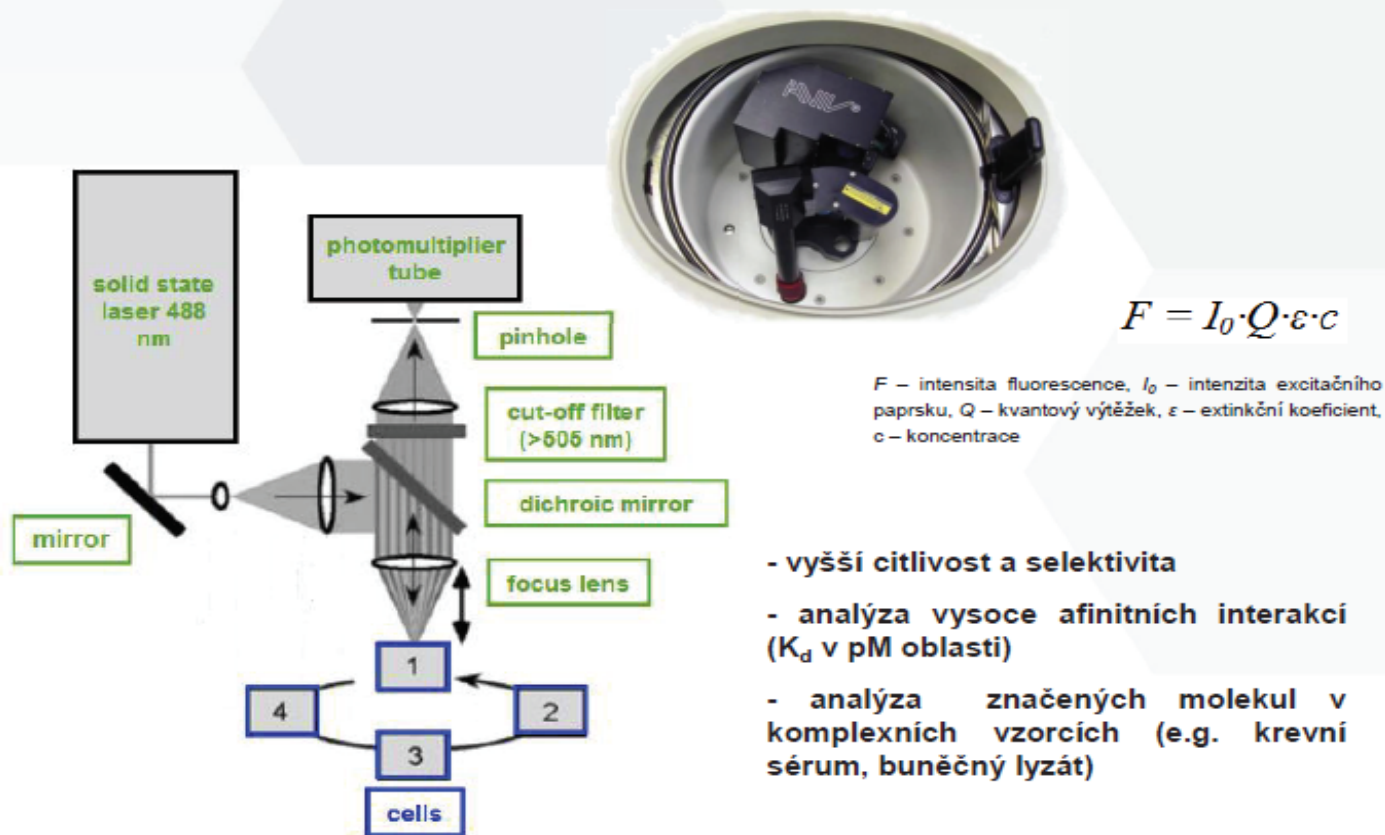
OPTICKÝ SYSTÉM

Interferenční optika

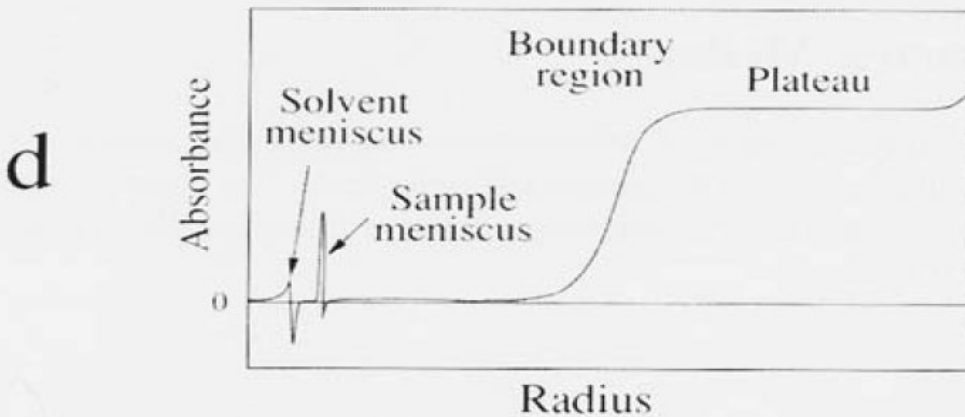
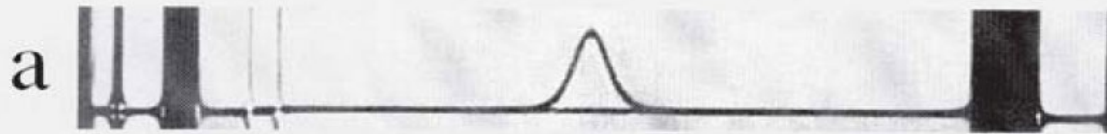


OPTICKÝ SYSTÉM

Fluorescenční detekční systém (FDS)



OPTICKÝ SYSTÉM



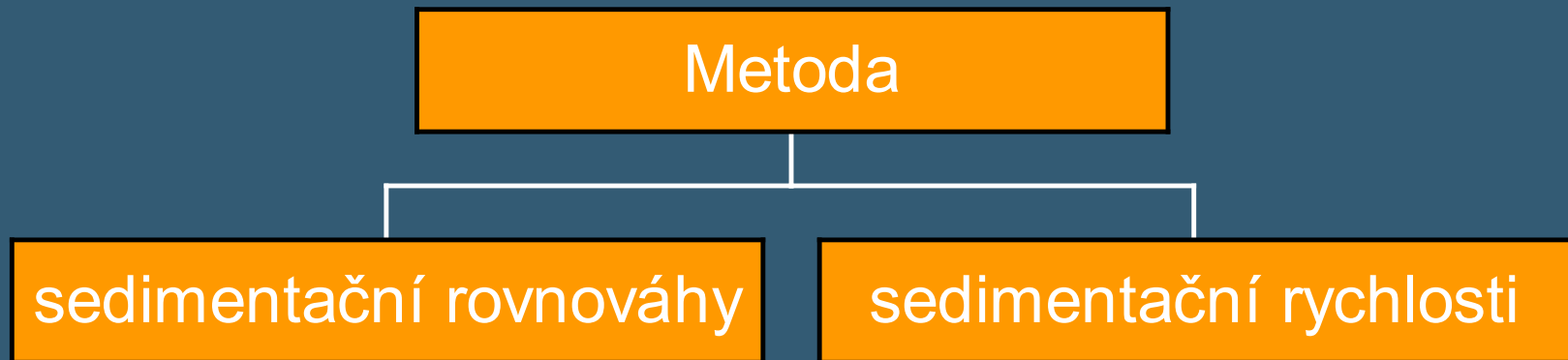
Zkřížená optika

Interferenční optika

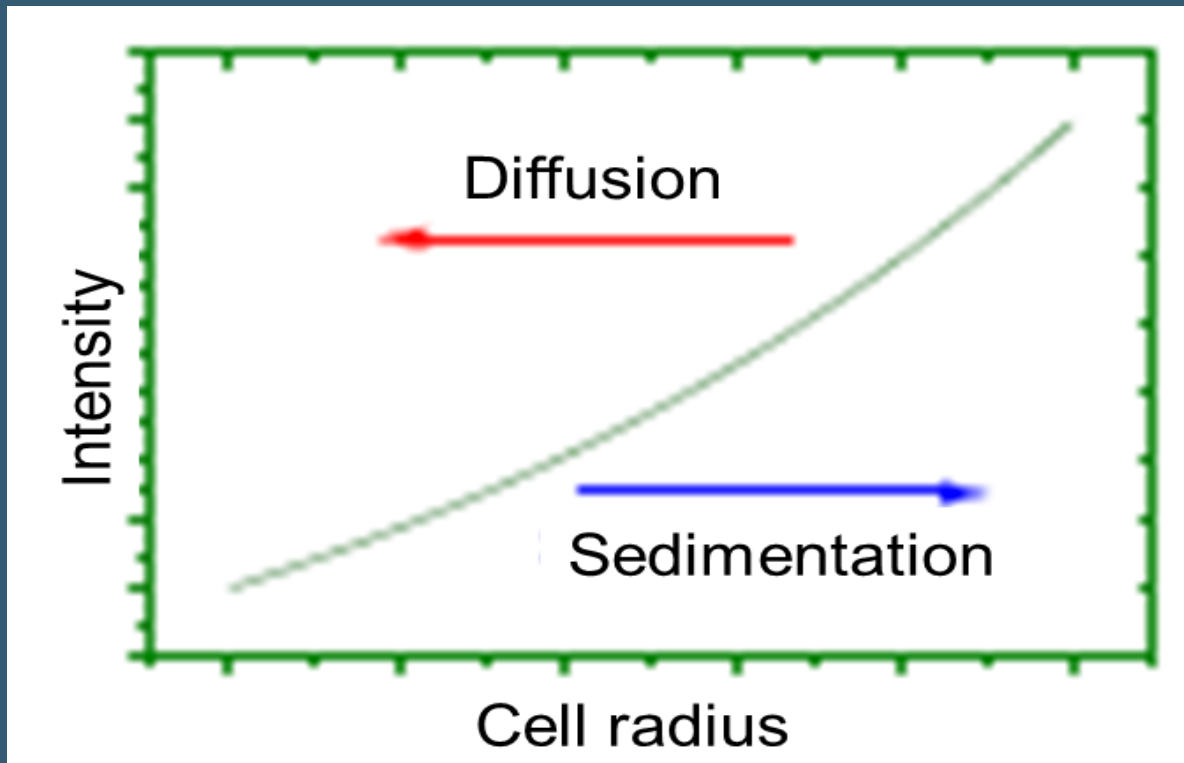
Fotografický systém

Absorbční systém

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

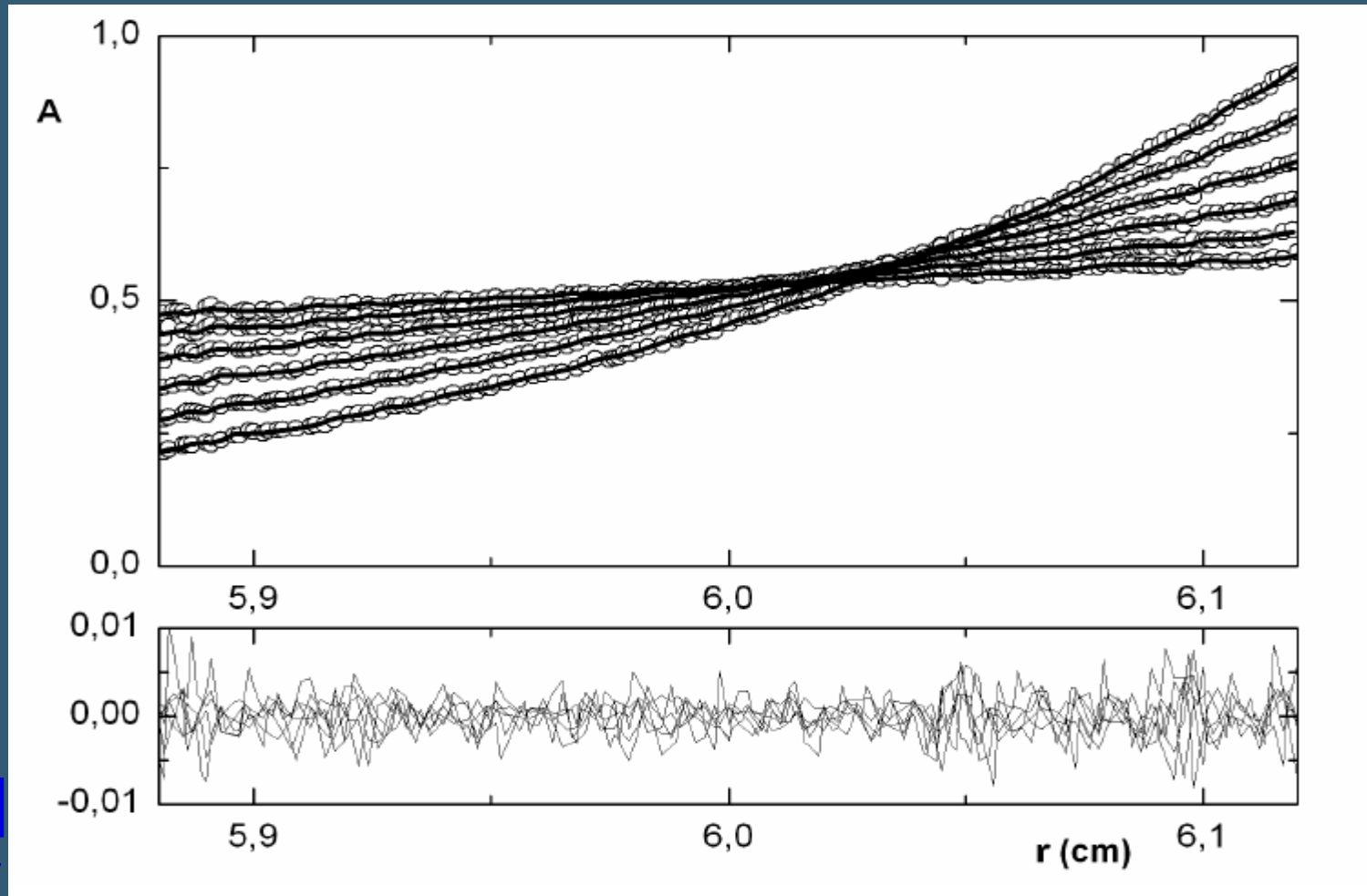


METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY



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

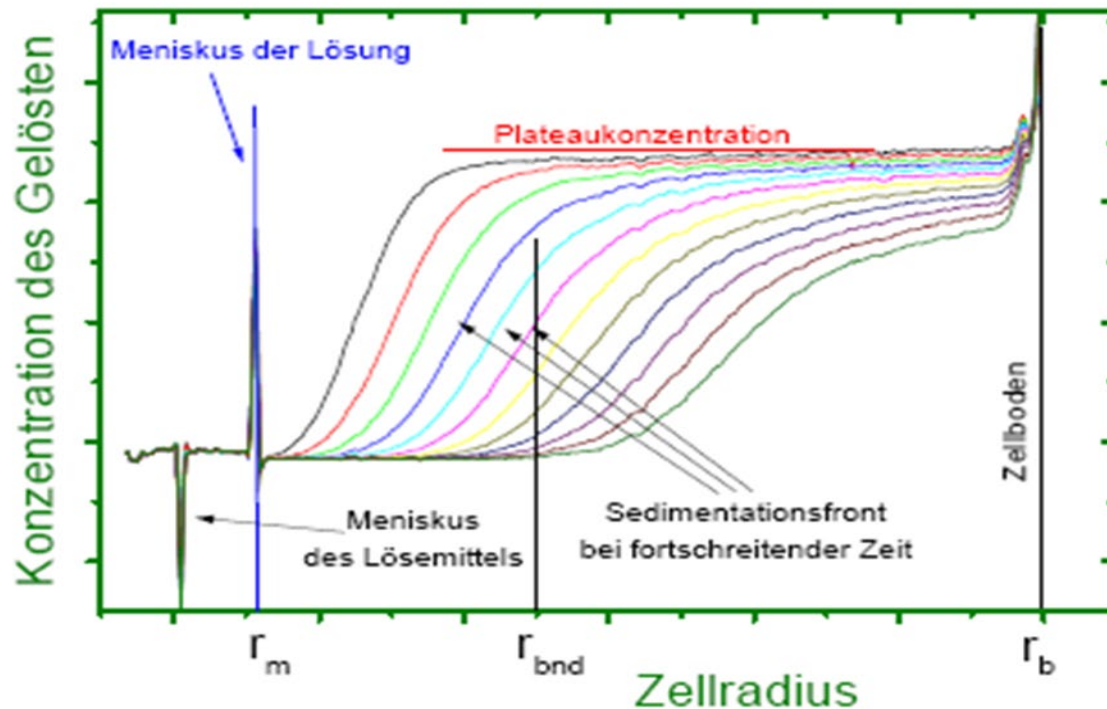
METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY



METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY

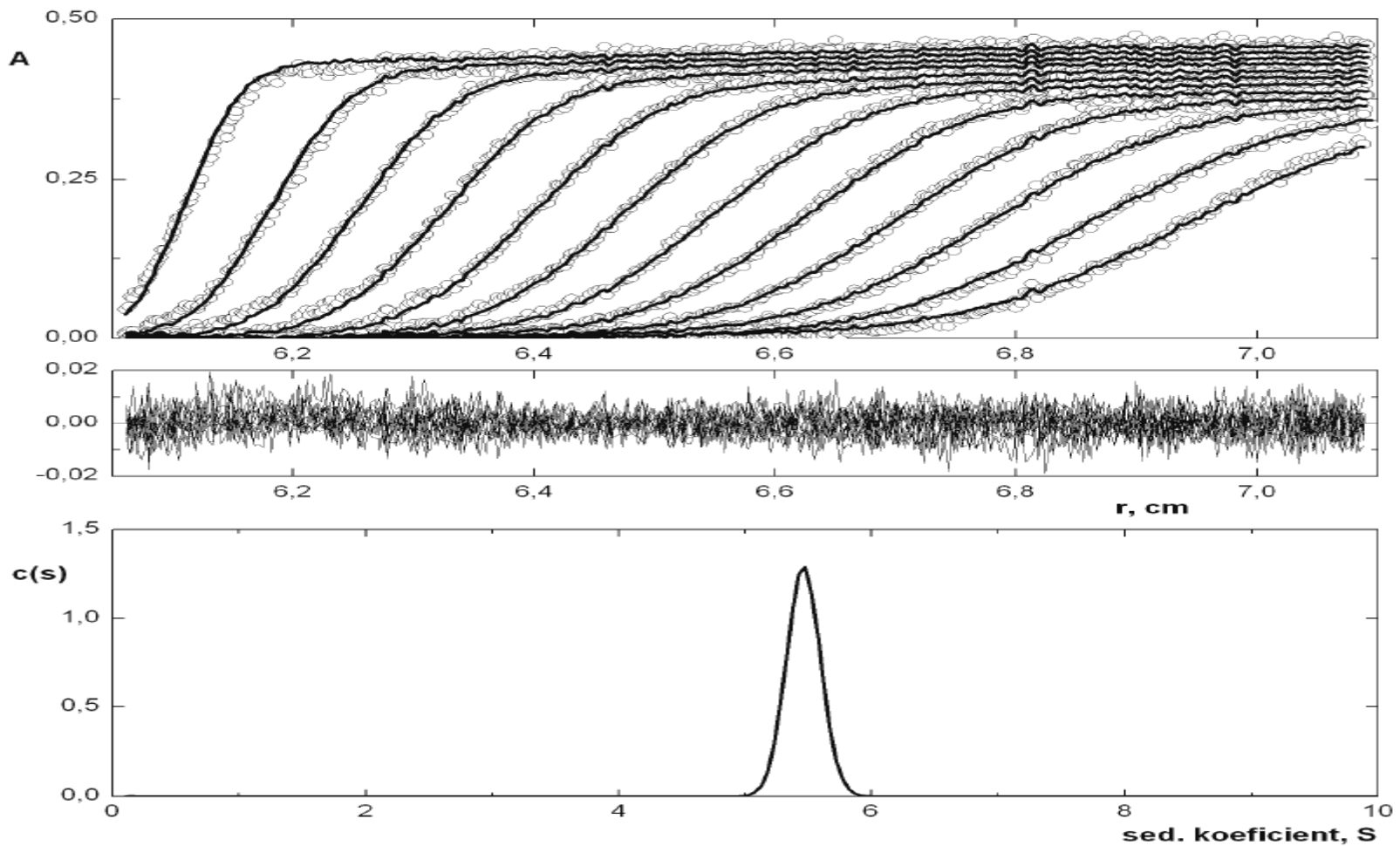
- ◆ **Termodynamické informace** (závisí na M_r)
- ◆ Experimentálně lze stanovit :
 - **Relativní molekulovou hmotnost** – sacharosa M_r ($M_r = 360$) až po viry ($M_r =$ mnoho milionů)
 - **Stav molekul v roztoku** - asociace
 - **Rovnovážné konstanty v roztoku**, K
→ výpočet volné energie asociačních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

METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI



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

METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI



METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI

◆ Hydrodynamické parametry

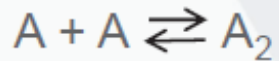
(závisí na M_r a tvaru molekuly)

◆ Experimentálně lze stanovit :

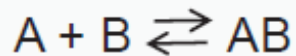
- Sedimentační koeficient s
- Difuzní konstantu D nebo frikční faktor f
- Relativní molekulovou hmotnost M_r
- Tvar molekuly v roztoku

STIDIUM BIOMOLEKULÁRNÍCH INTERAKCÍ

Self-asociace (oligomerizace proteinů)



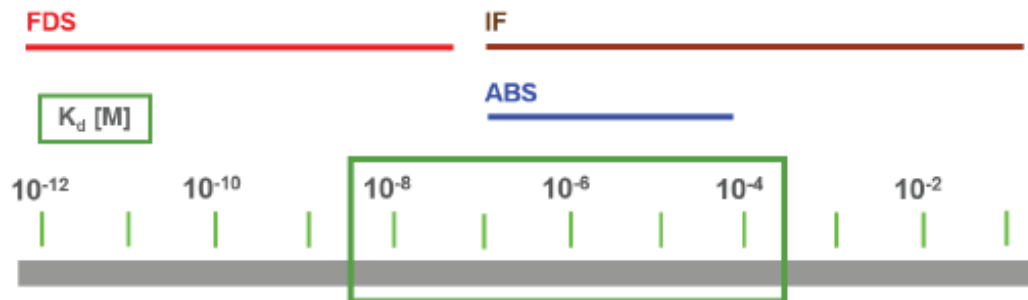
Hetero-asociace (protein-NK, protein-polysacharid, ~~protein-nízkomolekulární látka~~)



Co se dá určit?

- stechiometrie (reakční schéma)
- afinita (síla vazby) – K_d (nebo K_a)

Použitelná SV i SE metoda



STUDIUM BIOMOLEKULÁRNÍCH INTERAKCÍ

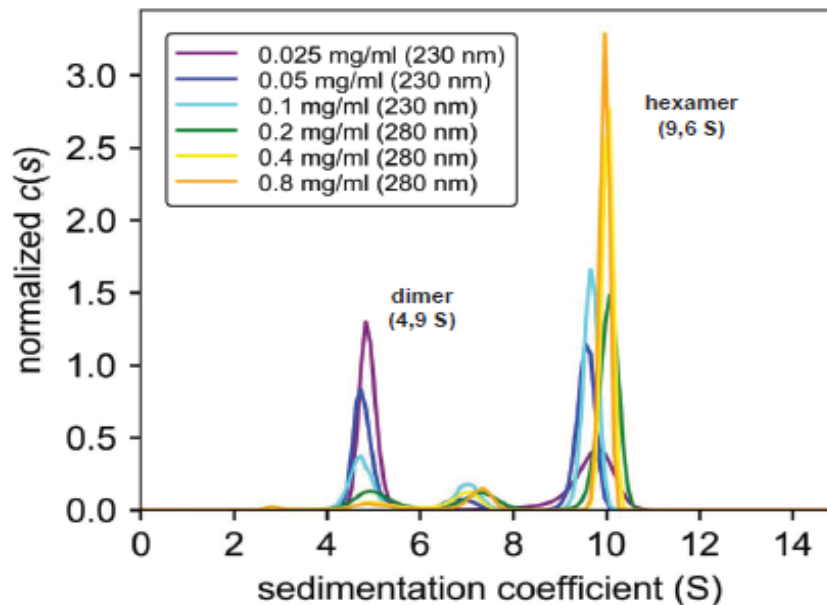
Self-asociace – γ -conglutin

Sedimentační rychlost

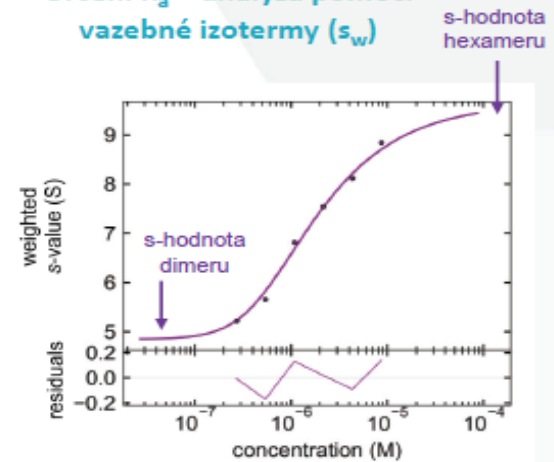
40000 rpm, 20 °C, ABS detekce (230 a 280 nm)

20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5

Reverzibilní systém **dimer-hexamer**



Určení K_a – analýza pomocí vazebné izotermy (s_w)



$$K_{a(26)} = 4,5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-2}$$

(populace dimeru a hexameru stejné při koncentraci 1,49 μM)

Czubinski (2024), *Food Hydrocoll*