

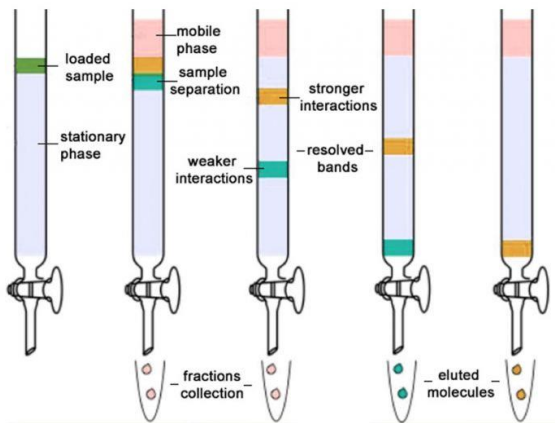
Centrifugační metody separace biomakromolekul

Metody molekulární biologie

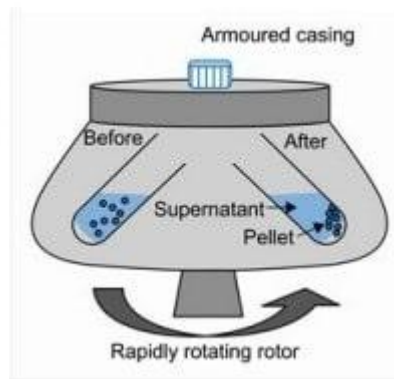
26.9.2019

Metody separace biomakromolekul

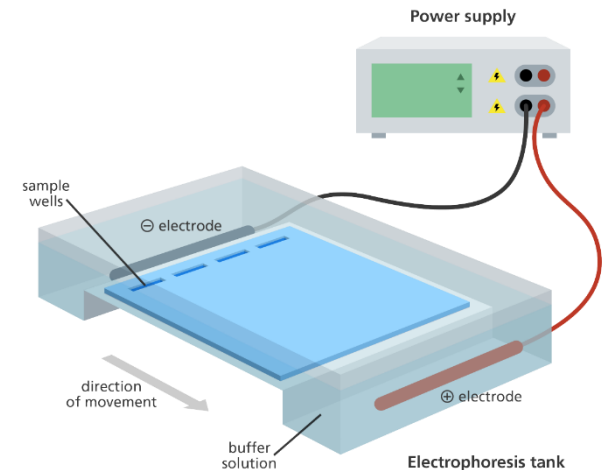
1. chromatografické



2. centrifugační



3. elektromigrační



rozdělení molekul podle velikosti, tvaru, hustoty, náboje

Centrifugační metody

- Principem separace je pohyb částic v kapalném prostředí pod vlivem odstředivé síly, která vzniká při otáčení rotoru centrifugy
- Urychlení sedimentace - izolace, purifikace a charakterizace částí buněk a biomakromolekul
- Různé objemy vzorků, rychlosti rotorů



Typy centrifugačních metod

1. Diferenciální centrifugace

směs heterogenních částic v homogenním roztoku

2. Zonální centrifugace

směs částic s podobnými vlastnostmi v gradientním roztoku

- Izokinetická centrifugace – sedimentační koeficient S
- Izopyknická (hustotní) centrifugace – vznášivá hustota ρ



Základní vztahy

$$G = \omega^2 r$$

$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

$$G = 4\pi^2 \text{ rpm}^2 r/3600$$

$$\text{RCF} = 4\pi^2 \text{ rpm}^2 r/3600 \times 981$$

$$\text{RCF} = (1.118 \times 10^{-5}) \text{ rpm}^2 r$$

**RCF vs. rpm – je třeba znát
poloměr rotoru centrifugy**

Centrifugační zrychlení

Úhlová rychlost (**rpm – otáčky za minutu**)

RCF - relativní centrifugační síla

$$g = 981 \text{ cm.s}^{-2}$$

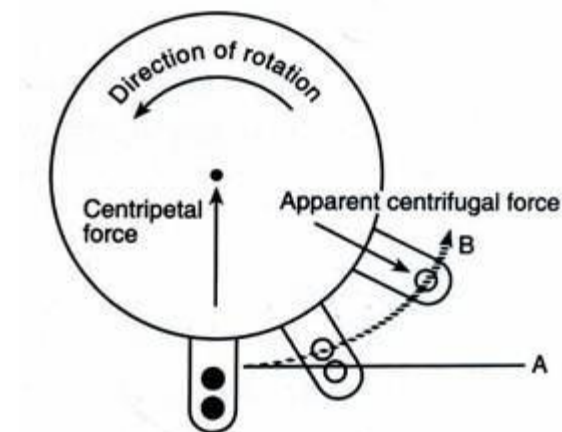
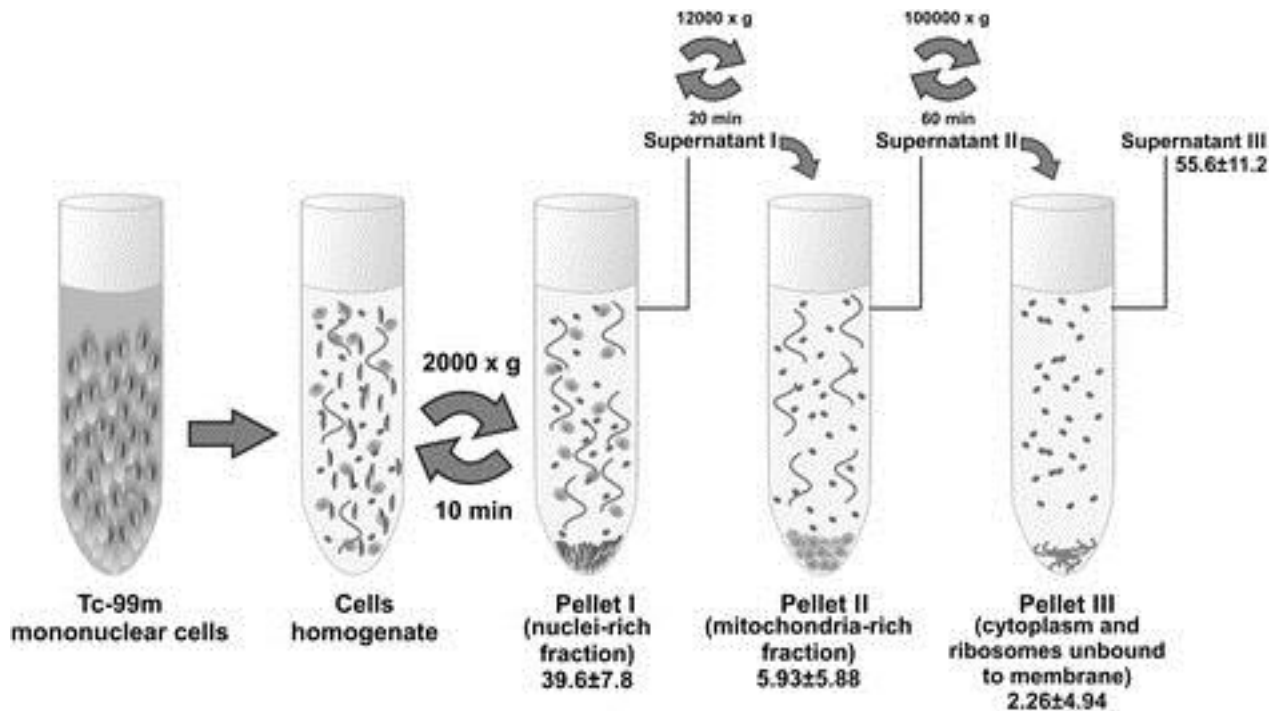


Fig. 5.2: Different forces during centrifugation

Diferenciální centrifugace

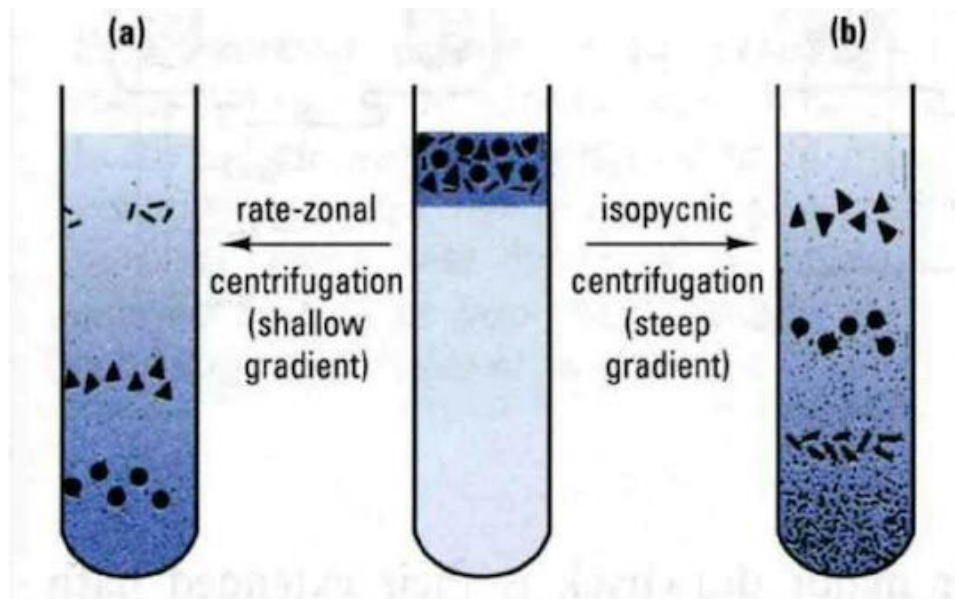
Separace částic s významně odlišnými vlastnostmi v **homogenním roztoku** – sedimentace částic různou rychlostí – více opakování



Suhett et al. (2015). ^{99m}Tc -Technetium binding site in bone marrow mononuclear cells. Stem Cell Research & Therapy. 6. 10.1186/s13287-015-0107-0.

Zonální centrifugace

- Homogenní roztok je nahrazen **gradientním roztokem** – zvyšující se koncentrace v centrifugační zkumavce od hladiny ke dnu
- Jednotlivé složky směsi vytváří v gradientním roztoku oddělené zóny
- Gradientní roztoky – např. sacharóza, glycerol, CsCl, Percoll
- Separace podle velikosti - např. nukleové kyseliny, ribozomální podjednotky



Zonální centrifugace

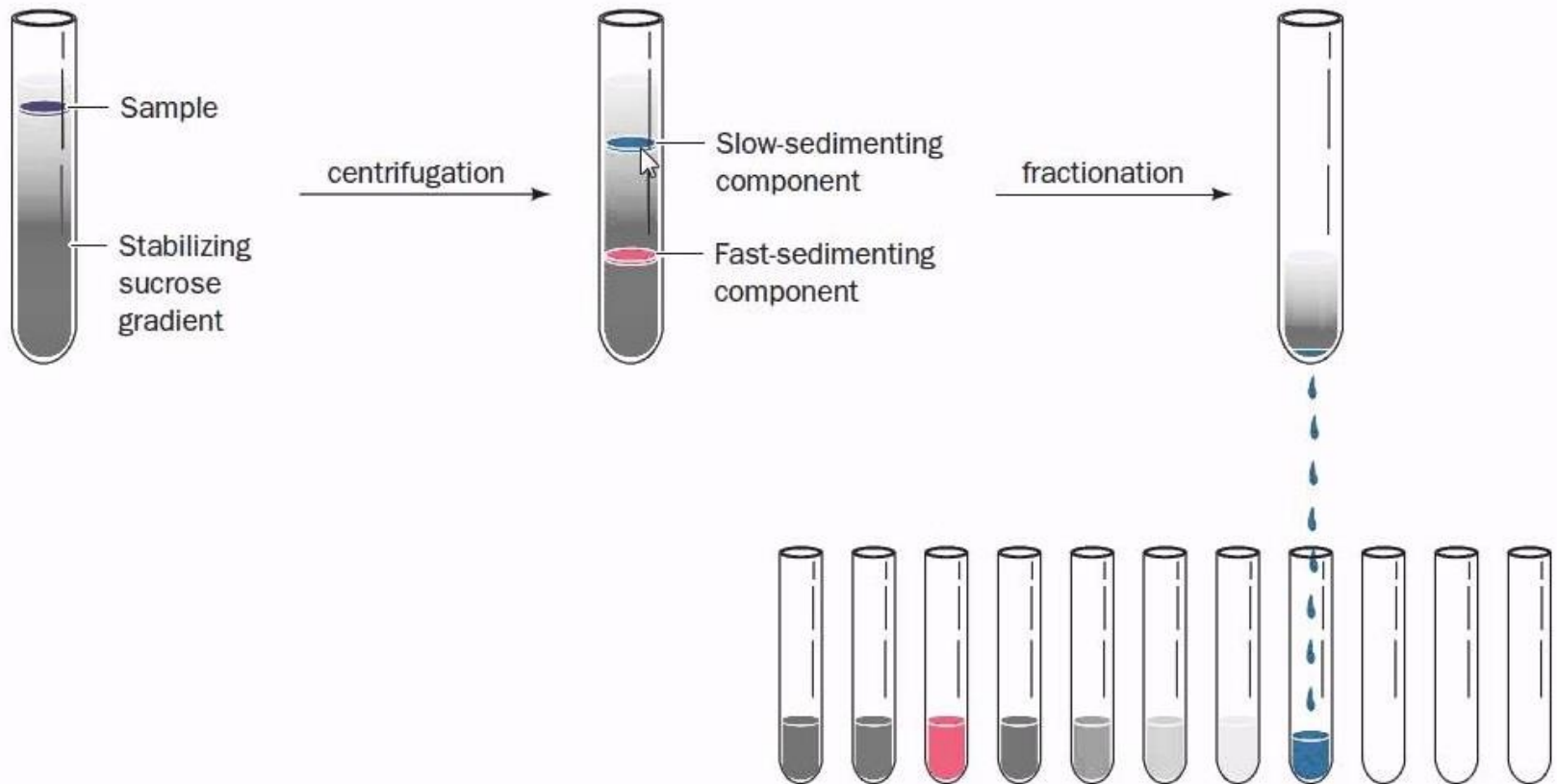


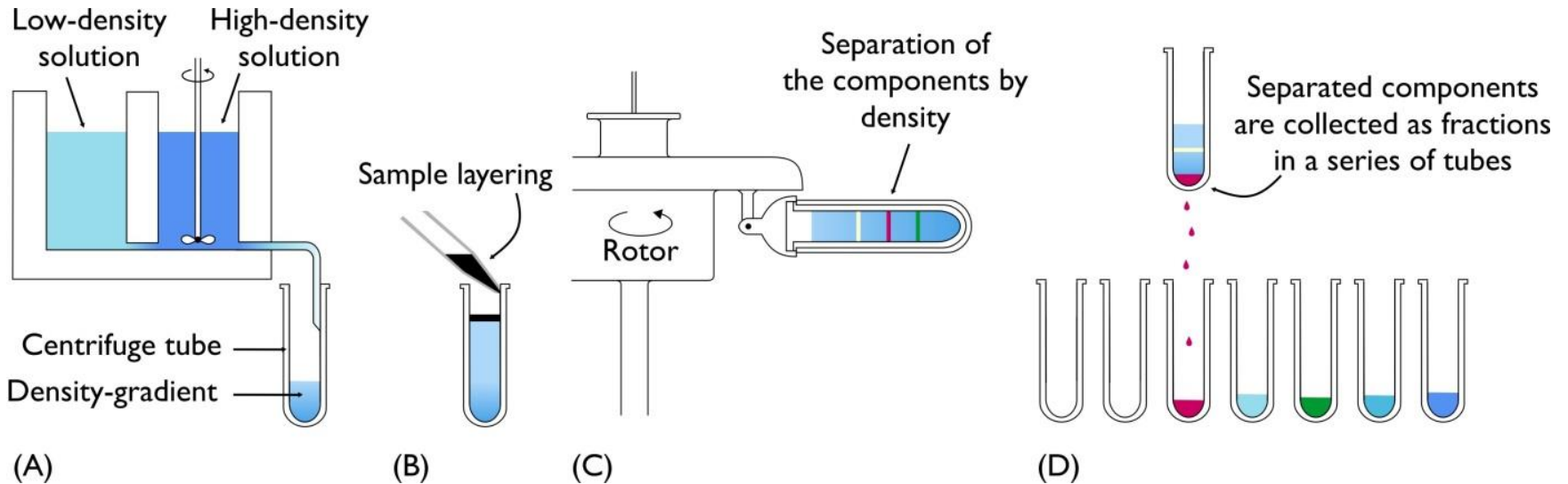
Figure 6-30 Zonal ultracentrifugation. The sample is layered onto a sucrose gradient (*left*). During centrifugation (*middle*), each particle sediments at a rate that depends largely on its mass.

After the end of the run, the centrifugation tube is punctured and the separated particles (zones) are collected (*right*).

Hustotní gradient

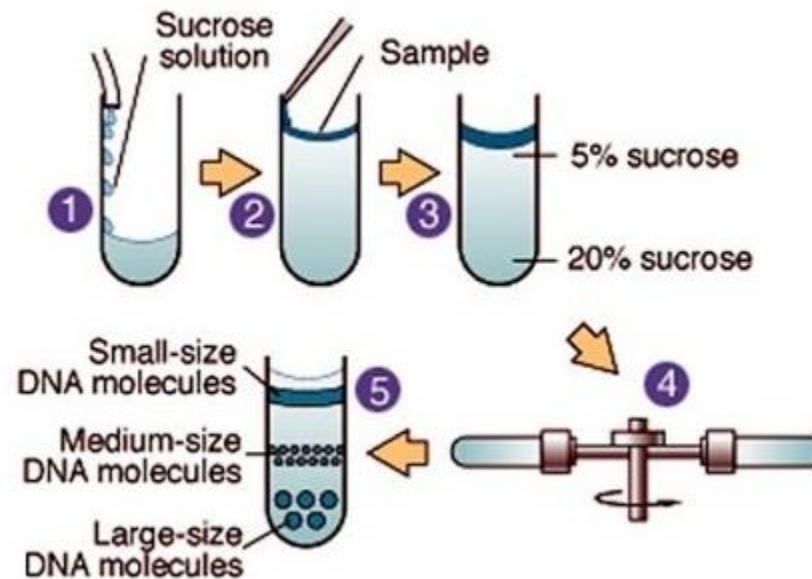
Sacharóza: 1,0 - 1,3 g/ml

CsCl: 1,0 - 1,9 g/ml



Izokinetická centrifugace

- Rychlost sedimentace částice je během centrifugace konstantní (stoupající hustota roztoku) – závisí především na hmotnosti částice
- Separace nukleových kyselin: 5 – 20 % sacharóзовý gradient



Sedimentační koeficient

- Je třeba znát ω a polohy částic x_1 a x_2 ve zkumavce v časech t_1 a t_2
- Rozmezí sedimentačních koeficientů biomakromolekul se pohybuje mezi 10^{-11} a 10^{-13} s
- Svedbergova jednotka - 1 S (Svedberg) = 10^{-13} s

$$s \, (dt) = \frac{1}{\omega^2} (dx/x) \quad (12-14)$$

Integrating between the limits set above, we obtain

$$s \int_{t_1}^{t_2} dt = \frac{1}{\omega^2} \int_{x_1}^{x_2} dx/x \quad (12-15)$$

and

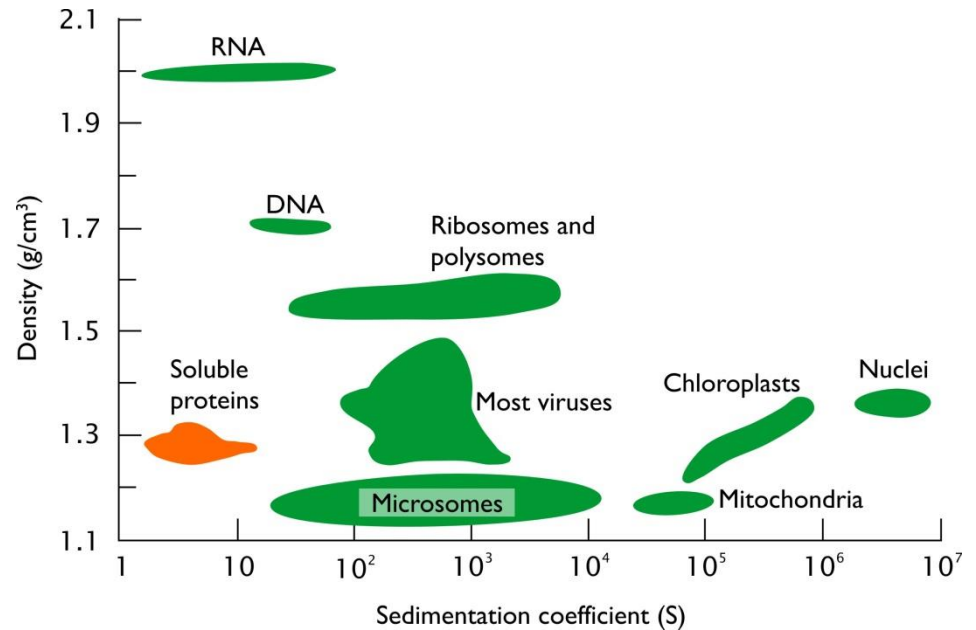
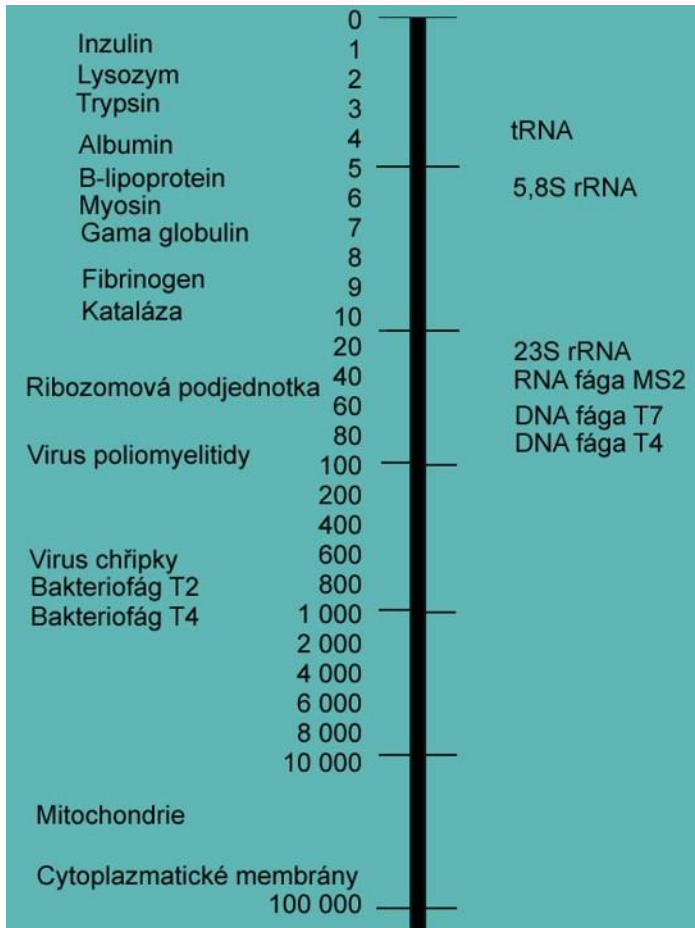
$$s (t_2 - t_1) = \frac{1}{\omega^2} (\ln x_2 - \ln x_1) = \frac{1}{\omega^2} \left(\ln \frac{x_2}{x_1} \right) \quad (12-16)$$

Therefore,

$$s = \frac{1}{\omega^2 (t_2 - t_1)} \ln \frac{x_2}{x_1} \quad (12-17)$$

<http://www.biologydiscussion.com/cell-biology/centrifugation-theory-sedimentation-rate-coefficient-and-other-details>

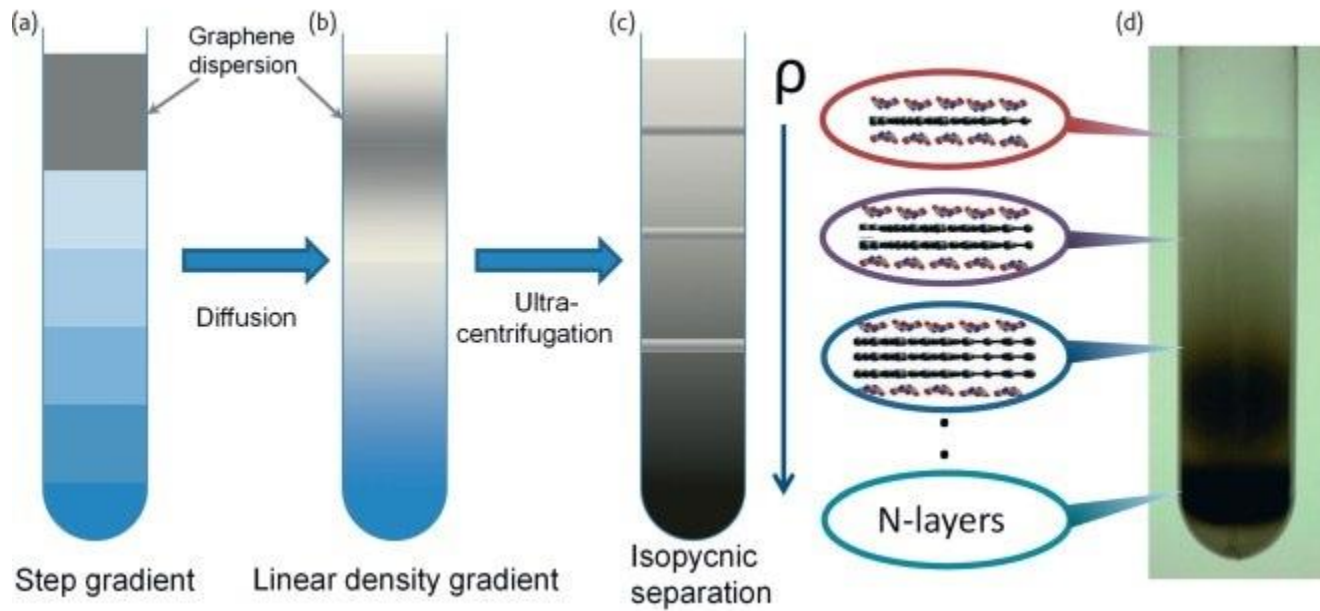
Sedimentační koeficient



https://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0073_introduction_practical_biochemistry/ch05s03.html

Izopyknická centrifugace

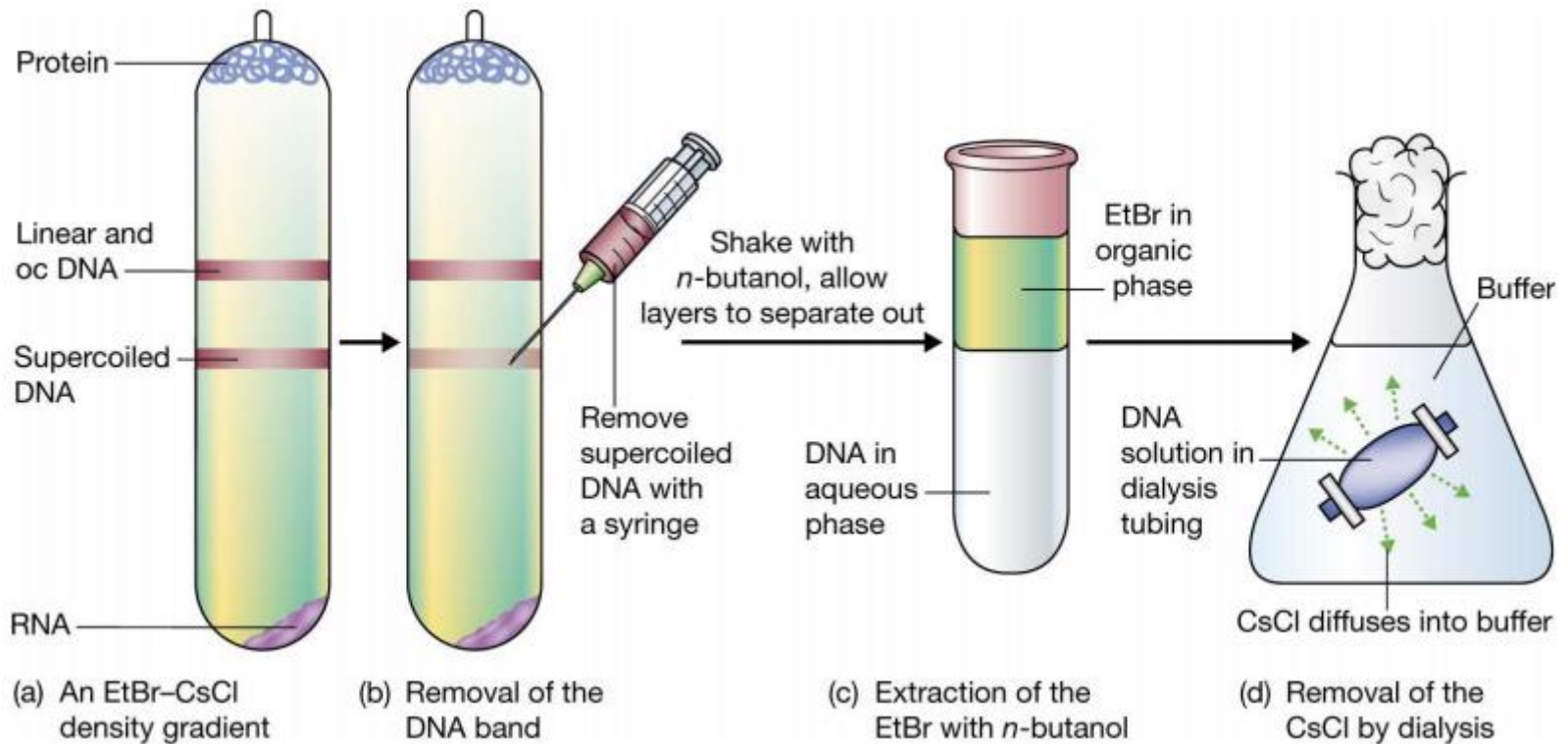
- Částice se dělí podle hustoty (také hustotní centrifugace)
- Vytvoření **hustotního gradientu** v centrifugační zkumavce
- Analyzované částice se pohybují v roztoku do místa o stejné hustotě



<https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-rate-zonal-and-isopycnic-centrifugation>

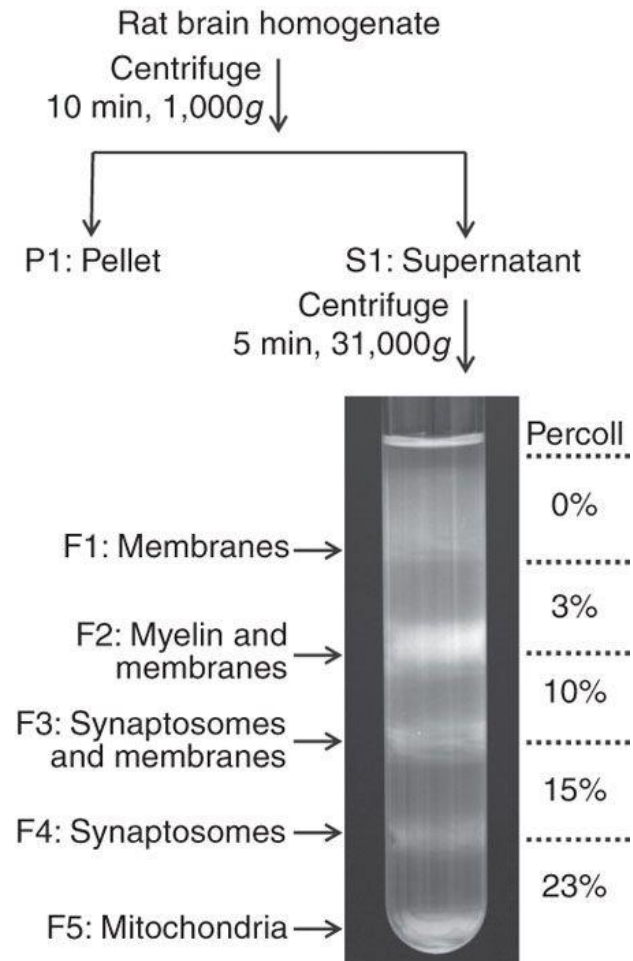
Separate superhelikální DNA

Gradient CsCl/EtBr



Separace organel pro izolaci DNA

- Gradient roztoku Percollu – separace buněčných částí
- Izolace např. mitochondriální nebo chloroplastové DNA



Dunkley, Peter et al. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols* volume 3, pages 1718–1728 (2008)

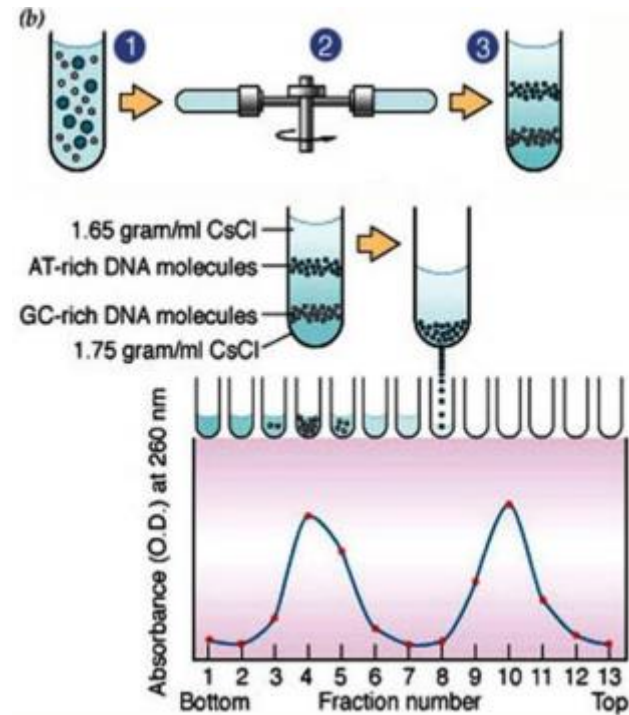
Výpočet % G+C v DNA

Gradient CsCl

ρ – vznášivá hustota (buoyant density)

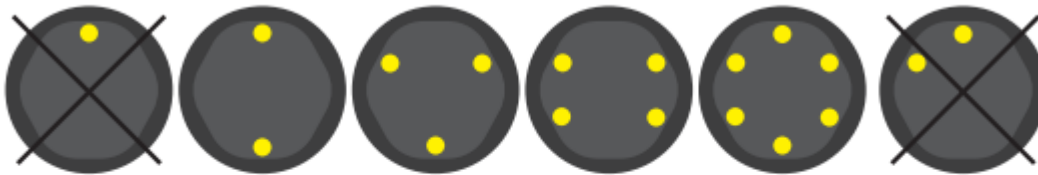
vliv zastoupení bazí v DNA

$$\% \text{ G+C} = (\rho - 1,66) / 0,098 * 100$$



Vyvažování zkumavek v centrifuze

6 Tube Centrifuges



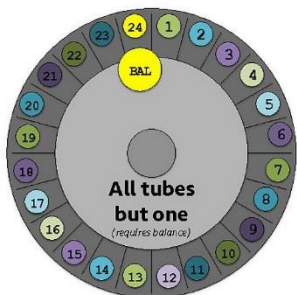
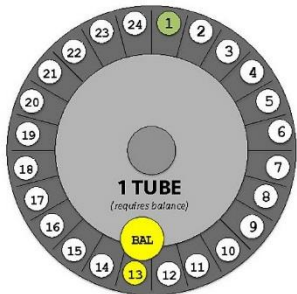
12 Tube Centrifuges



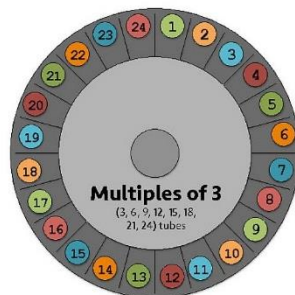
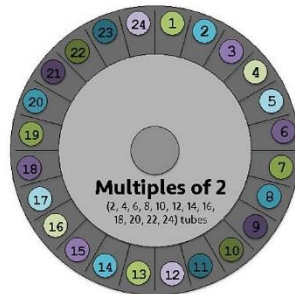
<https://druckerdiagnostics.com/knowledge/a-guide-to-balanced-centrifuge-loads/>

Vyvažování zkumavek v centrifuze

Configurations
Requiring a
Balance Tube



Easily Distributed
Configurations
(multiples of 2, 3)



**Any other grouping of tubes can be balanced
by combining configurations containing
multiples of 2 and 3 tubes.**

