

1. úloha.

Izolace a purifikace plazmidové DNA (princip metody)

Pro izolaci plazmidové DNA z buněk se používá řada různých metod. Tyto metody vždy zahrnují tři základní kroky: růst bakteriální kultury, izolaci bakterií a jejich lyzi, purifikaci plazmidové DNA.

Růst bakteriální kultury

Plazmidy se nejčastěji izolují z bakteriální kultury (rostoucí v médiu obsahující příslušné antibiotikum), která byla inokulována jednou kolonií odpíchnutou z agarové plotny. Většina plazmidových vektorů používaných v současné době (např. pUC řada) se replikuje jako vícekopiové vektory a je u nich možné dosáhnout vysokého výtěžku při izolaci z kultury, která rostla ve standardním LB médiu do logaritmické fáze růstu.

Izolace a lyze bakterií

Bakterie jsou získány centrifugací a lyzovány jednou z mnoha metod zahrnujících působení detergentů, organických rozpouštědel, alkalického pH nebo tepla. Volba jedné z těchto metod závisí na velikosti plazmidu, bakteriálním kmeni a metodě, která bude následně použita pro purifikaci plazmidové DNA:

1. Velké plazmidy (> 15 kb), které jsou citlivé na poškození, by měly být izolovány metodou minimalizující působení fyzikálních sil (lyze dodecylsulfátem sodným).
2. Pro malé plazmidy je možné použít více metod. Po přidání EDTA a v některých případech lysozymu jsou buňky vystaveny působení detergentu a lyzovány varem nebo alkalicky. To způsobí denaturaci chromozomální DNA, která je obvykle již ve formě lineárních fragmentů. Naproti tomu vlákna plazmidové DNA, tvořená kovalentně uzavřenými molekulami se při denaturaci nerozcházejí, protože jsou vzájemně propletená a mohou na rozdíl od lineárních fragmentů rychle renaturovat.
3. Lyze varem není doporučována při izolaci z kmenů produkujících endonukleázu A. Endonukleáza A není varem kompletně inaktivována a plazmidová DNA může být degradována během následných inkubací za přítomnosti Mg^{2+} . Tomuto problému lze předejít zařazením extrakce s fenol:chloroformem.

Purifikace plazmidové DNA

Proteiny odstraňujeme extrakcí směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a poté chloroform:isoamylalkohol (24:1).

Precipitaci DNA provádíme 96 % ethanolem po přidání 3M octanu sodného.

Odstranění RNA provádíme působením pankreatickou RNázou.

Vysoce čisté kovalentně uzavřené kružnicové DNA je možné získat po centrifugaci v gradientu CsCl-ethidium bromid.

Z dalších metod je možné použít pro purifikaci plazmidové DNA precipitaci polyetylenglykolem, chromatografii a komerční metody.

Izolace DNA plazmidu pUC18 metodou alkalické lyze (protokol).

1. Naočkovat jednu bakteriální kolonii do 2 ml LB media obsahujícího ampicilin (100 µg/ml).
Inkubovat kulturu přes noc při 37°C za intenzivního třepání.
2. Přenést 1,5 ml kultury do mikrocentrifugační zkumavky. Centrifugovat při 12 000 g 5 minut při 4 °C na mikrofuze.
3. Odsát médium pasterkou (nebo slít) tak aby bakteriální pelet zůstal co nejsušší.
4. Resuspendovat bakteriální pelet ve 100 µl roztoku A.
Přidat lysozym do konečné koncentrace 500µg/ml a RNázu do konečné koncentrace 10 µg/ml.
Intenzivně promíchat na vortexu.
5. Přidat 200 µl čerstvě připraveného roztoku B.
Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. Uložit zkumavku na ledu 5 min.
6. Přidat 150 µl roztoku C předem vychlazeného na ledu.
Promíchat několikerým převrácením zkumavky. Uložit zkumavku na ledu 5 -10 min.
7. Centrifugovat při 12 000 g/10 min/4 °C na mikrofuze. Přenést supernatant do čisté zkumavky.
8. Přidat stejné množství fenol:chloroformu, několikrát protřepat a centrifugovat při 12 000 g/5 min/4 °C na mikrofuze. Přenést supernatant do čisté zkumavky. Opakovat extrakci s chloroformem.
9. Přidat 1/10 objemu 3 M octanu sodného pH 5,2, promíchat a vysrážet dsDNA dvěma objemy vychlazeného 96% ethanolu. Nechat směs stát 10 min při -70 °C.
10. Centrifugovat vysráženou DNA při 12 000 g/15 min/4 °C na mikrofuze.
11. Promýt 1 ml 70 % ethanolu (nechat stát 10 min při pokojové teplotě).
12. Odsát supernatant pasterkou, odstranit všechny kapky ze stěn zkumavky a zkumavku nechat vyschnout v obrácené poloze na filtračním papíru při pokojové teplotě.
13. Rozpustit DNA v 50 µl TE pufru pH 8,0. Uchovávat při -20 °C nebo krátkodobě při 4 °C.

Roztok A (TEGLU): 25mM Tris-HCl (pH 8,0) 10mM EDTA 50mM glukóza, (*chlazený*)

Roztok B: 0,2M NaOH, 1% SDS (*čerstvý*)

Roztok C: 3M octan draselný, pH = 5,2 (*chlazený*)

Sevageova směs: chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)

TE-pufr (Tris-EDTA) 10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA

2. úloha

Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Znalost přesné koncentrace DNA je podmínkou úspěšného provedení řady molekulárněbiologických metod, jako transformace, transfekce, enzymové reakce s DNA při štěpení restrikcí endonukleázami a klonování, mapování, sekvencování a pod.

Spektrofotometrické stanovení je založeno na poznatku, že roztoky DNA pohlcují UV záření. Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excitaci jejich chemických vazeb, což má za následek postupnou degradaci DNA. Absorpční maxima jednotlivých nukleotidů se navzájem poněkud liší: dATP ... 259 nm, dCTP ... 271 nm, dGTP ... 253 nm, dTTP ... 267 nm. DNA absorbuje maximálně UV záření o vlnové délce 260 nm.

Množství pohlceného UV záření je přímo úměrné koncentraci DNA v roztoku a vyjadřuje se hodnotami absorbance:

kde I_0 je množství vcházejícího světla a I je množství světla propuštěného. Nejpřesnější je stanovení absorbance v rozmezí od 0,1 do 1,0.

Při stanovení koncentrace DNA platí následující vztahy:

ds DNA	$A_{260} = 1$	odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$
ss DNA	$A_{260} = 1$	odpovídá 33 $\mu\text{g/ml}$
jednořetězcové oligonukleotidy	$A_{260} = 1$	odpovídá 20 $\mu\text{g/ml}$
(ss RNA	$A_{260} = 1$	odpovídá 40 $\mu\text{g/ml}$)

Tyto vztahy platí pro optickou dráhu 1 cm (tj. šířka kyvety). Jako rozpouštědla se při spektrofotometrickém stanovení koncentrace DNA používá obvykle destilovaná voda, TE pufru, SSC pufru nebo fosfátového pufru.

Výhodou spektrofotometrického stanovení je jeho přesnost a současná možnost posoudit čistotu preparátu. Čistotu DNA lze stanovit z poměrů absorbancí při různých vlnových délkách. Pro čistou DNA platí tyto hodnoty:

$$A_{280}/A_{260} = 0,550 \quad A_{260}/A_{280} = 1,80 \text{ až } 1,85$$

$$A_{230}/A_{260} = 0,455 \quad A_{260}/A_{230} = 2,20$$

Pro čistou RNA platí poměr: $A_{260}/A_{280} = 2,0$.

Při kontaminaci preparátu proteiny jsou vypočtené poměry absorbancí výrazně nižší a koncentraci DNA nelze přesně stanovit. Stupeň znečištění DNA lze posoudit rovněž proměřením absorbance vzorku v rozsahu vlnových délek 230 - 300 nm a vyhodnocením získané křivky.

V případě silného znečištění DNA je třeba provést její přečištění. Podle toho čím je DNA znečištěna použije se některý z níže uvedených postupů:

- odstranění fenolu: dialýza, extrakce chloroformem
- odstranění proteinů: opakovaná deproteinace chloroformem. Lze použít rovněž enzymové degradace proteinů pomocí pronázy nebo proteinázy.
- odstranění RNA: enzymová degradace pomocí RNázy nebo specifické precipitační postupy.

3. úloha

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Každý restrikční enzym vyžaduje optimální reakční podmínky, které jsou uváděny výrobcem v katalogu nebo jsou uvedeny v literatuře. Hlavní faktory, které výrazně ovlivňují rychlost a specifčnost štěpení, jsou teplota a složení reakčního pufru. Zatímco požadavky na teplotu jsou většinou dosti vyhraněné, rozdíly ve složení pufrů bývají často malé. Proto lze pro určitou skupinu restrikčních enzymů používat stejného pufru. Podle složení restrikčních pufrů lze enzymy rozdělit do tří základních skupin, a to na enzymy které pracují při nízké, střední a vysoké iontové síle pufru. Složení těchto pufrů je následující:

Obvykle jsou výše uvedené pufrы připravovány jako 10× koncentrované zásobní roztoky, které se skladují při -20 °C.

Provedení vlastního štěpení DNA

Reakce se obvykle provádí s 0,2 - 1 µg DNA v celkovém objemu 20 µl reakční směsi.

Postup:

1. Roztok DNA smíchat ve sterilní Eppendorfově zkumavce se sterilní destilovanou vodou tak, aby množství DNA bylo 0,2 - 1 µg a celkový objem 18 µl.
2. Přidat 2 µl příslušného 10× koncentrovaného restrikčního pufru a dobře promíchat.
3. Přidat jednu jednotku restrikčního enzymu a dobře promíchat.
Jednotka enzymu je obvykle definovaná jako množství enzymu vyžadované pro rozštěpení 1 µg DNA kompletně během jedné hodiny v doporučeném pufru a při doporučené teplotě v 20 µl reakční směsi.
4. Inkubovat po příslušnou dobu za příslušné teploty.
5. Zastavit reakci přidáním 0,5 M EDTA do konečné koncentrace 20 mM. Reakci lze zastavit rovněž zahřátím reakční směsi na 65 °C po dobu 10 min. Pokud má být DNA analyzována přímo na gelu, přidat nanášecí barvivo (5:1) na nanést na gel.

Poznámky k práci s restrikčními enzymy

Restrikční enzymy jsou drahé, proto je třeba dodržovat následující pravidla:

1. Restrikční enzymy jsou stabilní při -20 °C, proto s nimi mimo tuto teplotu manipulujeme co nejkratší dobu a v ledové lázni.
2. Odběr požadovaného množství provádíme vždy novou sterilní špičkou. Kontaminace enzymu vede k jeho degradaci.
3. Často je možné množství enzymu vyžadovaného pro štěpení snížit a prodloužit dobu štěpení.
4. Pokud má být DNA štěpena dvěma nebo více enzymy, lze štěpení provést současně (pokud reakční pufr pro oba enzymy je stejný), nebo následně: nejdříve enzym vyžadující nízkou iontovou sílu, pak koncentraci pufru upravit a provést štěpení dalším enzymem.
5. Jestliže je prováděno štěpení mnoha vzorků DNA, vypočtete celkové potřebné množství enzymu. Odeberte toto množství a smíchejte s příslušným restrikčním pufrem. Rozplňte příslušné díly do jednotlivých reakčních směsí.

4. úloha

Gelová elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza je jednou ze základních metod molekulární biologie. Tato standardní metoda se používá k separaci, identifikaci a purifikaci fragmentů DNA. Jako nosiče se nejčastěji používá agaróza nebo polyakrylamid.

Elektroforéza DNA je používána jak k analytickým účelům (tj. stanovení velikosti nebo konformace), tak k preparativním účelům (separace DNA podle velikosti a následná izolace požadované frakce).

Pohyb DNA během elektroforézy je ovlivněn řadou parametrů, z nichž nejdůležitější jsou:

a) Velikost molekuly DNA: čím větší molekula, tím pomaleji se v gelu pohybuje. Lineární dsDNA se pohybují v gelech rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti (bp).

b) Koncentrace gelu jsou důležité při dělení různých velikostí fragmentů:

Molekuly DNA nad 20 kb nelze standardní elektroforézou navzájem oddělit; v těchto případech se používá pulzní gelová elektroforéza, kterou lze oddělit DNA až do velikosti několika Mb.

c) Rychlost pohybu je závislá na konformaci DNA. Různé formy DNA (ccc, oc a lineární) se pohybují různou rychlostí.

d) Intenzita elektrického pole: při nízkém napětí je rychlost pohybu přímo úměrná napětí. Zvyšování napětí vede k nelineárnímu zvýšení rychlosti pohybu a oblast efektivního rozdělení se snižuje - proto nemá napětí převyšovat hodnotu 5 V/cm.

e) Teplota a zastoupení bází v DNA. Elektroforetické chování DNA v agarózových gelech (na rozdíl od polyakrylamidových gelů) není významně ovlivněno zastoupením bází nebo teplotou, při které probíhá elektroforéza. Nejčastěji se elektroforéza provádí při pokojové teplotě; při použití gelů o nízké koncentraci se teplota udržuje na nižších hodnotách (4 - 10 °C).

Z hlediska experimentálního uspořádání se rozlišuje horizontální elektroforéza, při níž je gel umístěn v elektroforetické vaně ve vodorovné poloze a vertikální elektroforéza, při níž je gel uložen ve svislé poloze.

Elektroforetické pufry

Nejběžněji používané jsou:

- TRIS-acetátový (TAE): 0,04 M Tris-acetát, 0,002 M EDTA, pH 8,2

- TRIS-fosfátový (TPE): 0,08 M Tris-fosfát, 0,008 M EDTA

- TRIS-borátový (TBE): 0,089 M Tris-borát, 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA

Příprava agarózového gelu

V Erlenmayerově baňce připravíme 0,8 % roztok agarózy v TAE pufru:

1. K odměřenému množství pufru (změříme rozměry zařízení na nalévání gelu a vypočteme množství roztoku agarózy potřebného k přípravě gelu o výšce 0,5 cm) přidáme správné množství práškové agarózy.
2. Agarózu necháme v tlakovém hrnci rozvařit 10 - 15 min.
3. Roztok zchladíme na 50 °C a nalejeme do zařízení na tvorbu gelu, které je umístěno na vodorovném podkladu. Zkontrolujeme, zda mezi podložkou a hřebínkem je 0,5 - 1 mm agarózy.
4. Necháme gel zchladnout 30 - 45 min (podle okolní teploty).
5. Po utužení agarózy převrstvíme gel TAE pufrům a opatrně vytáhneme hřebínek.

Nanesení vzorku do agarózového gelu a provedení elektroforézy

1. Vzorek DNA naředíme TE pufrům tak, aby koncentrace DNA byla v rozmezí 0,5 - 1 µg/10 µl. 10 µl vzorku smícháme se 2 µl nanášecího pufru (v Eppendorfově zkumavce nebo na proužku Parafilmu) a pomocí automatické pipety nanese do otvoru v gelu, který jsme předtím převrstvili elektroforetickým pufrům.
2. Přeneseme gel do elektroforetické vany a doplníme elektroforetický pufr tak, aby překrýval gel přibližně 3 mm. Nastavíme hodnoty napětí nebo proudu a necháme probíhat elektroforézu tak dlouho dokud barvivo neurazí vzdálenost alespoň 3/4 délky gelu.
3. Po ukončení elektroforézy přeneseme gel do barvicí lzně (TAE pufr obsahující 1 µg etidiumbromidu/ml) a barvíme 0,5 až 1 hod.
Pozn.: Etidiumbromid se interkaluje mezi báze v dvouřetězcové DNA a po ozáření UV světlem fluoreskuje 80× intenzivněji než samotné barvivo. Tímto způsobem lze detekovat 1 - 5 ng DNA. Etidiumbromid je silný mutagen. Při práci s jeho roztoky je nutné pracovat v rukavicích a dodržovat zásady bezpečnosti!
4. Gel opláchneme vodou a fotografujeme pod UV světlem 302 nm.

5. úloha

Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA

Příprava kompetentních buněk pro transformaci

Vlastní navození kompetence spočívá v pomnožení buněk příslušného kmene *E. coli* v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl₂, v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladovění a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA.

Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku CaCl₂ s přídatkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70 °C a použít později (takto připravené buňky lze uchovávat několik měsíců nebo i déle).

Organizmy: Bakteriální kmen *E. coli* DH5α

Materiál: LB bujon, sterilní roztok 0,05 M CaCl₂, sterilní centrifugační zkumavky, kolorimetr s příslušenstvím, chlazená centrifuga T23.

Postup

1. 20 ml LB bujonu v Erlenmayerově baňce naočkujeme 2 ml bujonové kultury (18 hod/37 °C) a inkubujeme při 37 °C na vodní třepací lázni do hustoty suspenze OD₆₀₀ = 0,3.
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 0 °C v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 ot/min při 4 °C. Od této chvíle nesmí teplota překročit 4 °C!
3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu ledového roztoku CaCl₂ a ponecháme v lednici při 4 °C přes noc.
4. Buňky zcentrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme ve 2 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku CaCl₂.
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu (4 °C!) a suspenze se zmrazí na -70 °C.

Vlastní transformace metodou tepelného šoku

Materiál: DNA plazmidu pUC18, LB bujon, LB agar, ampicilin, sterilní mikrozukavky, chlazená mikrofuga, termostat nebo vodní lázeň.

Postup:

1. Do mikrozukavky se napipetuje 200 µl kompetentních buněk. V případě, že se používají buňky zmrazené na -70 °C, nechají se pozvolna rozmraznout při pokojové teplotě, teplota buněčné suspenze by však neměla přesáhnout 4 °C.
2. Mikrozukavka se umístí do ledové lázně.
3. Přidá se požadované množství DNA (naředěné TE puřrem) v objemu 10 µl. DNA se obvykle přidává v množství 1 ng, 10 ng a 100 ng.
4. Lehce se promíchá a ponechá v ledové lázni 20 minut.
5. Buňky se podrobí tepelnému šoku ponořením zkumavky na 1 min do vodné lázně 42° C, nebo 3 min / 37° C.
6. Zkumavka se přenese do ledové lázně a přidá se 1 ml LB bujonu.
7. Následuje inkubace 45 min při 37 °C na vodní třepací lázni.
8. Buňky se zcentrifugují 1 min při 8000 ot/min.
9. Supernatant se sleje - většinou však zůstane ve zkumavce asi 100 µl supernatantu, ve kterém lze buňky resuspendovat.
10. Suspenze se vyseje pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny (LB agar, obsahující 50 - 100 µg ampicilinu /ml).
11. Plotny se inkubují 24 - 48 hod při 37 °C.

Poznámky:

1. Účinnost transformace kolísá v závislosti na použitém kmeni *E. coli*, na pracovním postupu při přípravě kompetentních buněk a na koncentraci DNA použité k transformaci. Platí, že nejvyšší účinnosti transformace se dosáhne při použití velmi nízkých koncentrací DNA (optimální konc. je pod 1 ng DNA).
2. Je vhodné sledovat nárůst kolonií na plotnách: někdy se stává, že v okolí transformantů se postupně objevují (dorůstají) drobné kolonie, které nejsou transformanty a nejsou tudíž rezistentní k ampicilinu: rostou v okolí rezistentních kolonií, které ampicilin rozkládají.
3. Vyroslé kolonie je vhodné přepasážovat na čisté plotny a založit klony z jednotlivých nově vyrostlých kolonií.

6. úloha

PCR - polymerázová řetězová reakce (princip metody)

PCR umožňuje získat požadovanou sekvenci bez klonování, navíc zcela specifickou. PCR využívá základních rysů replikace DNA:

Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec.

K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.

Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek. Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií), což vede k nesmírně rychlé amplifikaci původní molekuly.

Provedení reakce

Výchozím materiálem pro PCR je DNA obsahující sekvenci určenou k amplifikaci. Tuto sekvenci není nutné izolovat - výběr zajistí primery. Jako vzorek je možné použít i biologický materiál (DNA není nutné purifikovat).

Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 ng genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.

Reakční směs obsahuje:

1. DNA 50 ng - 1 μ g
mikroorganismy, tkáňové kultury, tělní tekutiny, biotické vzorky, stěry, vlasy, atd.
2. Primery. Primery pro PCR mívají velikost 10 - 40 bp s obsahem GC mezi 40% - 70%. 3' konec primeru nesmí být komplementární k žádné části sebe sama (self-complementarity). Primer nesmí obsahovat palindromy a tvořit stabilní sekundární struktury. Oba primery by měly mít přibližně stejný obsah GC a podobnou teplotu annealingu (T_a). K navrhování primerů se používají počítačové programy, z nichž některé jsou volně dostupné.
3. dNTP ve formě Na nebo Li solí, koncentrace v reakci je 0,1 - 0,2 mM.
4. Mg^{+} ionty. Přítomnost Mg iontů v reakci je nezbytná, jejich množství závisí na množství DNA a dNTP v reakci. V jejich nepřítomnosti se netvoří žádný produkt, v nadbytku vznikají nespecifické produkty. Optimální koncentrace se stanovuje experimentálně pro každý pár primerů zvlášť.
5. DNA polymerázu
Taq *Thermus aquaticus*
Tth *Thermus thermophilus*
Tma *Thermotoga maritima*

Princip:

1. denaturace 95 °C (separace řetězců)
2. připojení primerů (30 - 65 °C) teplota určuje specifickou a závisí na sekvenci primeru. $T_a = T_m - 5$ °C
3. polymerační reakce (65 - 75 °C)
4. nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus

Cyklické střídání teplot jednou založené směsi zajišťuje průběh reakce PCR, provádí se v termocyklerech, většinou se provádí 25 - 40 cyklů. Jako polymeráza se používá *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*.

7. ÚLOHA

ULTRACENTRIFUGACE

Příprava preformovaného sacharózového gradientu

Ultracentrifugace je separační metoda používaná v molekulární biologii k identifikaci, izolaci, purifikaci a charakterizaci biomakromolekul, buněčných organel, virů apod. Na rozdíl od klasické nízkoobrátkové centrifugace se ultracentrifugací rozumí odstředování při vysokých otáčkách, tj., při 20 000 - 100 000 ot/min. Vysokému počtu otáček je přizpůsobena konstrukce ultracentrifugy; nutné je intenzivní chlazení a snížení atm. tlaku v rotorovém prostoru. Rotory jsou vyrobeny z ušlechtilých materiálů, centrifugační zkumavky jsou vyrobeny z hmot odolávajících vysokému přetížení a vzorek ve zkumavce je hermeticky uzavřen. Nutné je přesné vyvážení protilehlých centrifugačních zkumavek (přesnost hmotností se pohybuje řádově v jednotkách mg.)

Z hlediska účelu lze centrifugaci rozdělit na:

- a) **preparativní**, kdy cílem je izolace nebo purifikace biomakromolekul.
- b) **analytická**, kdy cílem je identifikace případně charakterizace dané částice (např. stanovení její velikosti (mol. hmotnosti), sedimentačního koeficientu, vznášivé hustoty apod.).

V obou případech je možné podmínky centrifugace zvolit tak, aby dělení částic probíhalo buď v závislosti na jejich velikosti, nebo v závislosti na jejich hustotě.

Pokud mají být navzájem odděleny částice lišící se navzájem svou velikostí (molekulární hmotností), probíhá centrifugace většinou v tzv. sacharózových gradientech, tj. v roztocích sacharózy, jejichž koncentrace u dna centrifugační zkumavky je vyšší než u hladiny.

Nejčastěji se používají lineární gradienty 5 - 20% sacharózy. Vzrůstající hustota roztoku a tím i jeho viskozita eliminují odstředivé zrychlení působící na částice, jehož hodnota se směrem od osy otáčení zvyšuje. Gradient tak zajišťuje konstantní rychlost sedimentace částic, podmiňuje jejich stabilitu a snižuje difúzi usazených částic do okolí. K přípravě gradientů lze použít rovněž dalších látek, např. D₂O, ficoll aj.

Sacharózových gradientů se velmi často používá pro stanovení molekulárních hmotností DNA a proteinů. V případě, že mají být vzájemně odděleny částice na základě své odlišné specifické hustoty, používá se gradientů chloridu cesného. Roztoky CsCl se vyznačují vysokou hustotou a při centrifugaci samovolně vytvářejí koncentrační a tím i hustotní gradient. Gradient je určen počáteční koncentrací CsCl a rychlostí otáčení. K ustálení gradientu dojde během několika hodin.

Biomakromolekuly, které se na počátku centrifugace promíchají s roztokem CsCl, se při centrifugaci usadí ve vrstvě roztoku (gradientu), odpovídající jejich vznášivé hustotě (její hustota je poněkud odlišná od specifické hustoty).

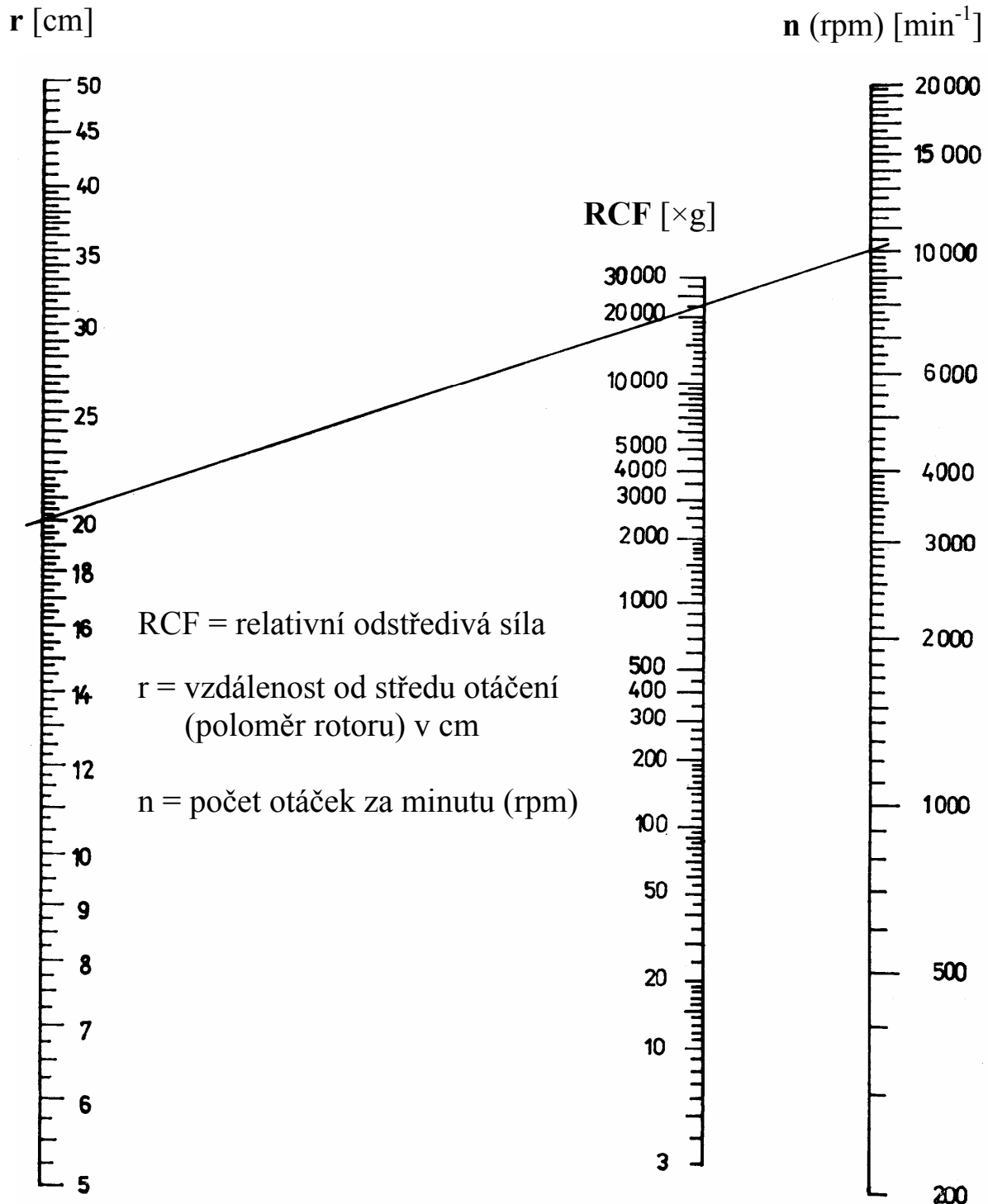
Detekce biomakromolekul po centrifugaci.

V případě preparativní ultracentrifugace lze částice detekovat vizuálně, jako opalescenční pruhy uvnitř zkumavky. tyto lze pak odebrat (např. injekční stříkačkou) a dále zpracovat. V případě analytické centrifugace se obsah zkumavky po centrifugaci rozdělí na jednotlivé frakce (např. vykapáním) a každá frakce se odděleně analyzuje z hlediska fyzikálních vlastností (tj. hustota, absorbance, radioaktivita, index lomu apod.). Číslo frakce udává současně i její vzdálenost od povrchu (dna) zkumavky a tím i od středu otáčení. Srovnání fyzikálních veličin jednotlivých frakcí umožní pak identifikovat polohu částic v gradientu a blíže je charakterizovat.

Příprava preformovaného gradientu sacharózy

- 1) Připravit zásobní 5, 15, 25, 35 a 45% roztoky sacharózy (w/v)
- 2) 15 a 35% roztoky obarvit safraninem nebo krystalovou violetí
- 3) Vrstvení gradientů: a) převrstvováním
b) podvrstvováním

Nomogram pro přepočet relativní odstředivé síly (RCF) a otáček rotoru (rpm)



Relativní odstředivou sílu (tzn. kolikrát je v určité vzdálenosti od osy rotoru při zvolených otáčkách odstředivá síla větší než gravitační síla) dovoluje vypočítat vzorec:

$$RCF = 1,119 \cdot 10^{-5} n^2 r$$