

## Příprava preformovaného sacharózového gradientu pro ultracentrifugaci

Ultracentrifugace je separační metoda používaná v molekulární biologii k identifikaci, izolaci, purifikaci a charakterizaci biomakromolekul, buněčných organel, virů apod. Na rozdíl od klasické nízkooobrátkové 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. D<sub>2</sub>O, 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

### A-postup:

#### Gradienty sacharózové 5 - 20 % neutrální

Připravte po 100 ml zásobních roztoků sacharózy o koncentraci 5, 8, 12, 16 a 20 %.

Neutrální sacharóza: 0,01M Tris.HCl, pH 7,5  
1 M NaCl  
0,001M EDTA pH 8,0  
5 % (8, 12, 16 nebo 20 %) w/v sacharóza

Sterilizujte 12 min / 121 °C

Pozn.: Obvykle se připraví zásobní 20 % roztok sacharózy a z tohoto roztoku se naředí roztokem pro ředění sacharózy (1 M NaCl, 0,001M EDTA, 0,01M Tris.HCl, pH 7,5) 16 %, 12 %, 8 % a 5 % roztoky. Koncentraci takto připravených roztoků se zkontroluje refraktometricky.

### B-postup:

#### Gradienty sacharózové 5 - 20 % alkalické

Připravte po 100 ml zásobní roztoky sacharózy o koncentraci 5, 8, 12, 16 a 20 %.

Alkalická sacharóza: 0,1M NaOH  
0,9 M NaCl  
0,001M EDTA pH 8,0  
5 % (8, 12, 16 nebo 20 %) w/v sacharóza

### Vlastní vrstvení gradientu:

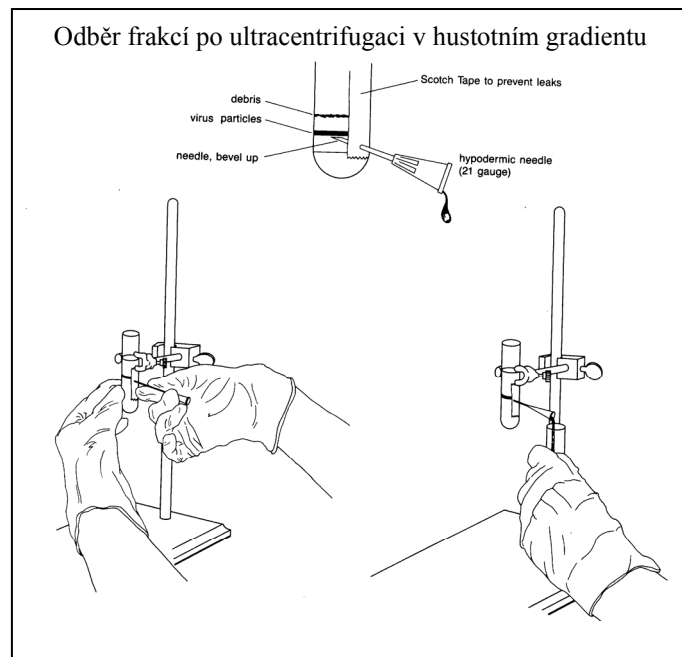
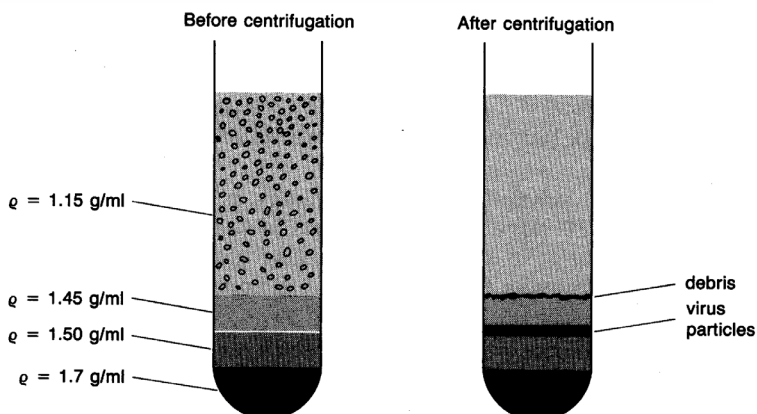
Do 5 ml centrifugační zkumavky naneste 0,8 ml 16% roztoku, který podvrstvěte 0,8 ml 20% roztoku, ostatní roztoky (12 %, 8 % a 5%) navrstvujte po 0,8 ml. Jako další vrstvu naneste 0,2 ml detergentu (SDS nebo Nonidet v EDTA-citrátu) pro usnadnění vstupu vzorku do gradientu. Potom naneste 0,2 ml vzorku smíchaného s roztokem EDTA-citrátu. Vzorek převrstvěte 0,5 ml sterilního parafinového oleje.

## Příprava preformovaného gradientu CsCl

### Příprava roztoků CsCl (100 ml) v pufru SM

Koncentraci je nutno upravit na základě měření indexu lomu

Density ( $\rho$ ) (g/ml)	CsCl (g)	SM (ml)	Refractive index ( $\eta$ )
1.45	60	85	1.3768
1.50	67	82	1.3815
1.70	95	75	1.3990



## Příprava preformovaného sacharózového gradientu

- 1) Připravit zásobní 5, 15, 25, 35 a 45% roztoky sacharózy (w/v)
- 2) Zkontrolovat koncentraci zásobních roztoků refraktometricky, změřit index lomu
- 3) 15 a 35% roztoky obarvit safraninem nebo krystalovou violetí
- 4) Vrstvení gradientů: a) převrstvováním  
b) podvrstvováním

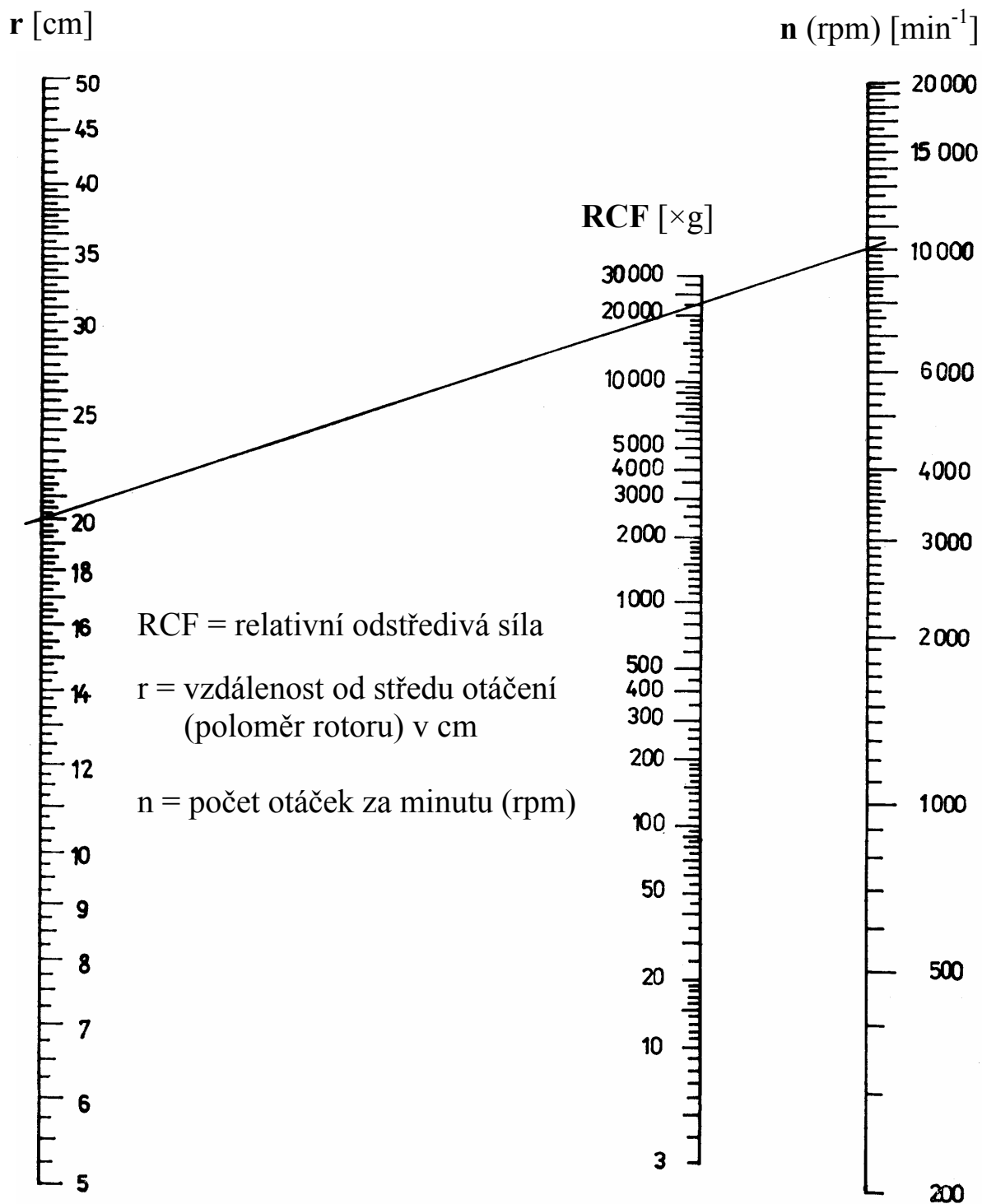
Vzorek	Koncentrace % (w/v)	Koncentrace stanovená na refraktometru % (w/w)	Index lomu $n_D^{25}$	Hustota $\rho_{25}$ (při 25 °C)
1	5			
2	15			
3	25			
4	35			
5	45			

### ÚKOLY

- 1) Do tabulky vyplnit hodnoty koncentrací a indexu lomu zjištěných refraktometricky
- 2) Vypočítat hustotu podle vztahu

$$\rho_{25} = 10,8601 \times n_D^{25} - 13,4974 \text{ [g/cm}^3\text{]}$$

## 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:

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