

## Úloha: Purifikace fágových částic v gradientu CsCl

Ultracentrifugace je separační metoda používaná v molekulární biologii k identifikaci, izolaci, purifikaci a charakterizaci biomakromolekul, buněčných organel, virů apod. Na rozdíl od klasické nízkoodrátkové centrifugace se ultracentrifugací rozumí odstřeďování 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 (**Obr. 1**). 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.

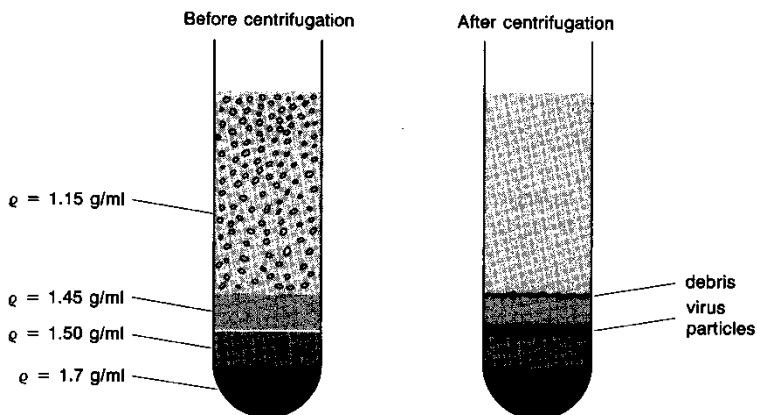
### Materiál:

- Zakoncentrované fágové částice druhu *Staphylococcus aureus* rozpuštěné přes noc ve fágovém pufru (cca 10 ml).
- Polykarbonátové zkumavky o objemu 5 ml, sterilní injekční jehly, pipety, špičky.
- Připravené roztoky CsCl v SM pufru.
- Předchlazený rotor: SW 55 Ti, ultracentrifuga Beckman.

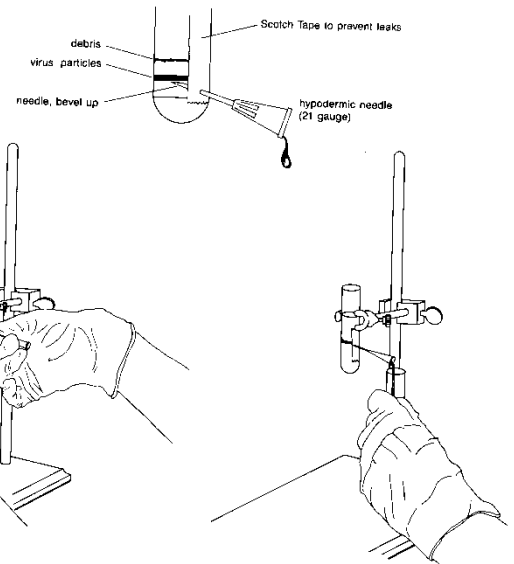
## Obr. 1: Příprava preformovaného gradientu CsCl

A: Příprava roztoků CsCl (100 ml) v pufru SM

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



B: Odběr frakcí po ultracentrifugaci v hustotním gradientu:



### Postup

1. Proteiny a zbytky bakteriální DNA a RNA lze odstranit ultracentrifugací v diskontinuálním gradientu CsCl. Gradient připravíme opatrným podvrstvením roztoků CsCl v SM médiu o hustotě 1,45 g/ml (1 ml), 1,5 g/ml (1 ml), 1,7 g/ml (1 ml). Příprava roztoků a SM média viz tabulka. Začíná se nejřidším roztokem a špička s roztokem s vyšší hustotou se umístí na dno zkumavky a opatrně se podvrství.

Pro gradient CsCl používáme 5 ml polykarbonátové zkumavky bez šroubovatelného uzávěru.

### SM médium na 1l (složení):

5,8 g NaCl

2,0 g MgCl<sub>2</sub>

50 ml 1 M Tris-Cl pH 7,5

2. Na gradient nanese cca 1 ml vzorku obsahujícího fágové částice, centrifugujeme při 12°C, 2,5 - 4 hodiny, 40 000 otáček (Ultracentrifuga Beckman, Rotor: SW 55 Ti). Před vlastní centrifugací je nutné vyvážit zkumavky v kyvetkách s přesností na 0,01g a umístit kyvety označené čísli do příslušných pozic v rotoru.

3. Vrstvu fágů (**Obr. 2**) odebereme pomocí injekční jehly, frakci obsahující fágové částice zachytíme do připravené mikrozkušavky. Pracujeme v rukavicích.

**Obr. 2: Purifikované fágové částice v gradientu CsCl**



*Pozn.: Pro další zpracování fágových částic je nutné odstranit CsCl dialýzou proti fágovému pufru. Pufr několikrát vyměníme, aby došlo k úplnému odstranění CsCl.*