

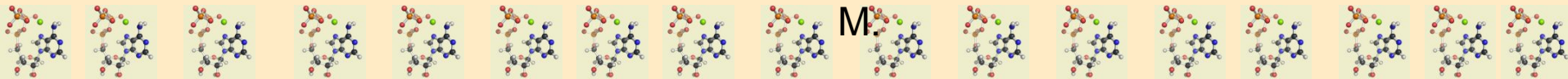


Презентационные материалы по курсу ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИОХИМИИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

кафедра биохимии и микробиологии ЮФУ

Составитель: к.б.н. Вечканов Е.

М.



Принцип метода

1

- ✓ Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в центробежном поле. Суспензию частиц, помещенную в пробирку, загружают в ротор, установленный на валу привода центрифуги.
- ✓ В центробежном поле частицы, имеющие разную плотность, форму или размеры, осаждаются с разной скоростью.
- ✓ Скорость седиментации зависит от центробежного ускорения (G), прямо пропорционального угловой скорости ротора (ω , в рад*с⁻¹) и расстоянию между частицей и осью вращения (r , в см):

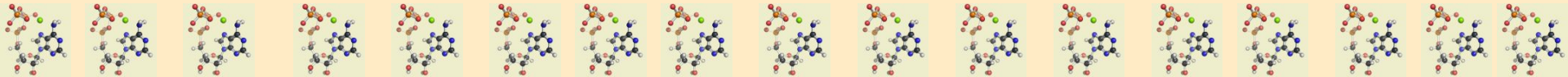
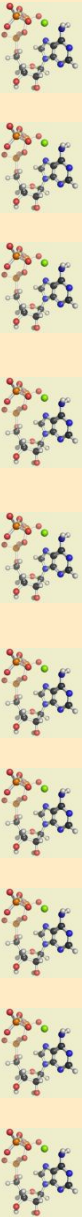
$$G = \omega^2 r$$

- ✓ Поскольку один оборот ротора составляет 2π радиан, угловую скорость ротора в оборотах в минуту можно записать так:

$$\omega = 2 \pi (\text{об} * \text{мин}^{-1}) / 60$$

- ✓ Центробежное ускорение тогда будет равно:

$$\omega = 4 \pi^2 (\text{об} * \text{мин}^{-1})^2 r / 3600$$



Принцип метода

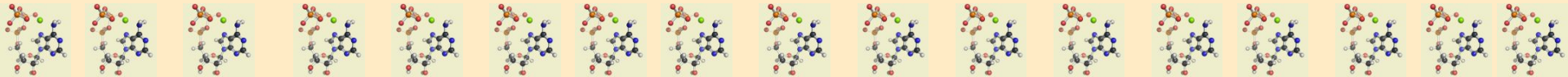
2

- ✓ Центробежное ускорение обычно выражается в единицах g и называется относительное центробежное ускорение.

$$\text{ОЦУ} = 4 \pi^2 (\text{об} * \text{мин}^{-1})^2 r / 3600 *$$

- ✓ Скорость седиментации сферических частиц **980** зависит не только от центробежного ускорения, но и от плотности и радиуса самих частиц и от вязкости среды суспендирования. Время, необходимое для осаждения сферической частицы в жидкой среде от мениска жидкости до дна центрифужной пробирки, обратно пропорционально скорости седиментации и определяется следующим уравнением:

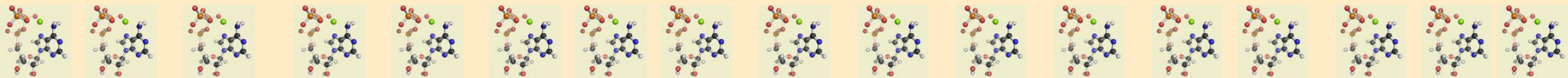
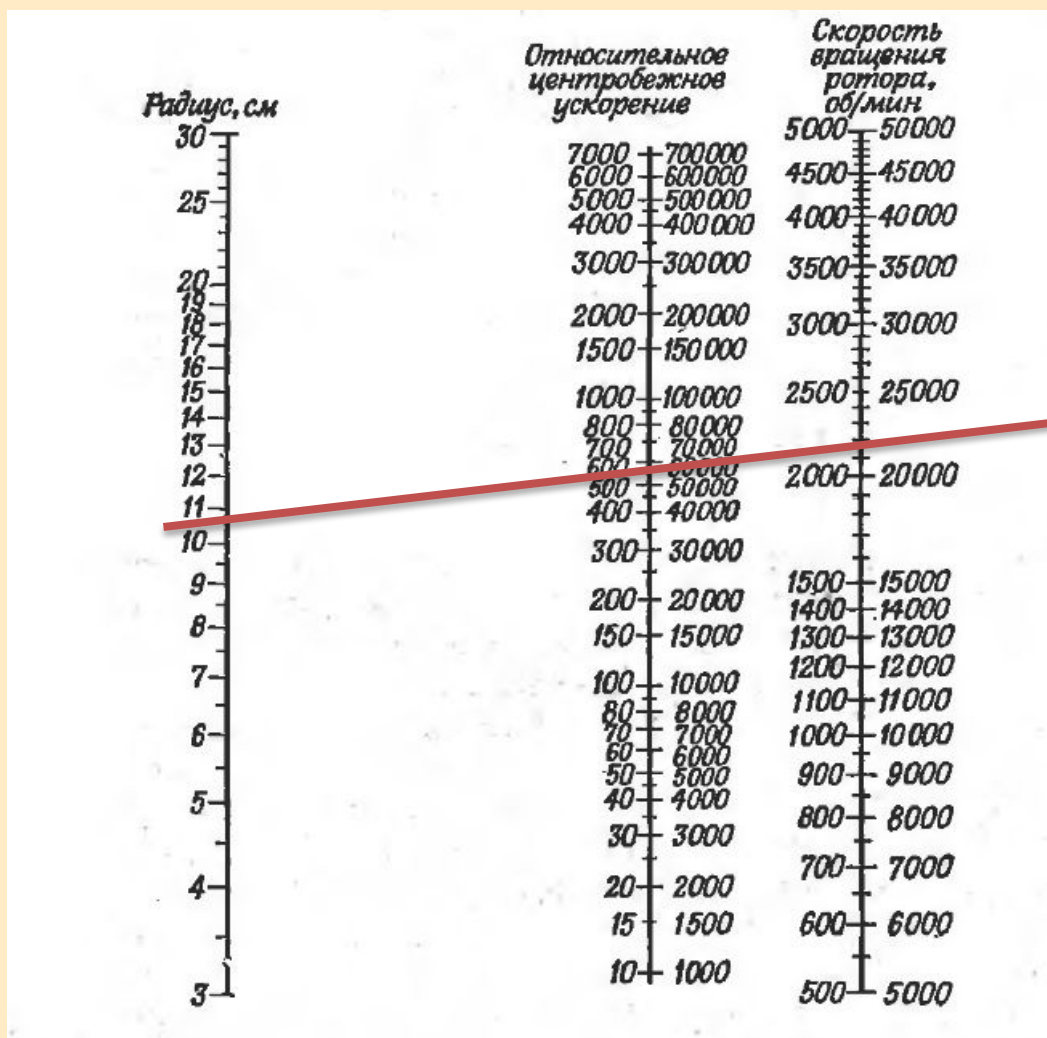
$$t = 9/2 \eta / 2 \omega^2 r^2 (p_x - p) \ln r_d / r_m$$

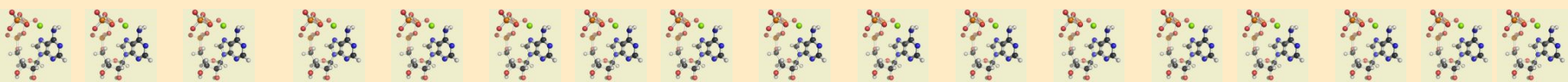
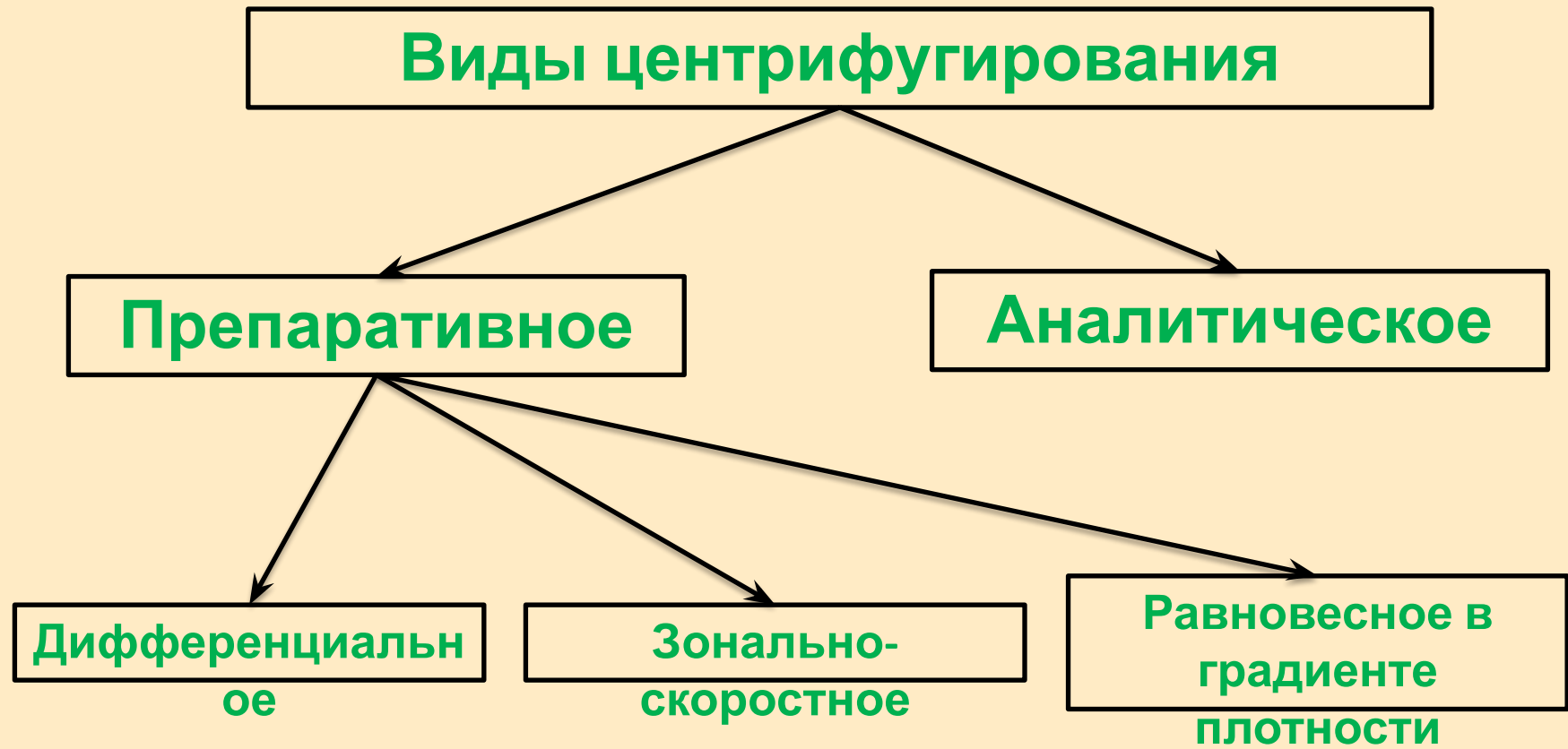


Нормограмма для расчёта центробежного ускорения Доула и Котциаса

✓ Для определения G соединяют прямой линией значения радиуса и скорости вращения ротора на крайних шкалах; точка пересечения этой прямой со средней шкалой даёт искомую величину центробежного ускорения.

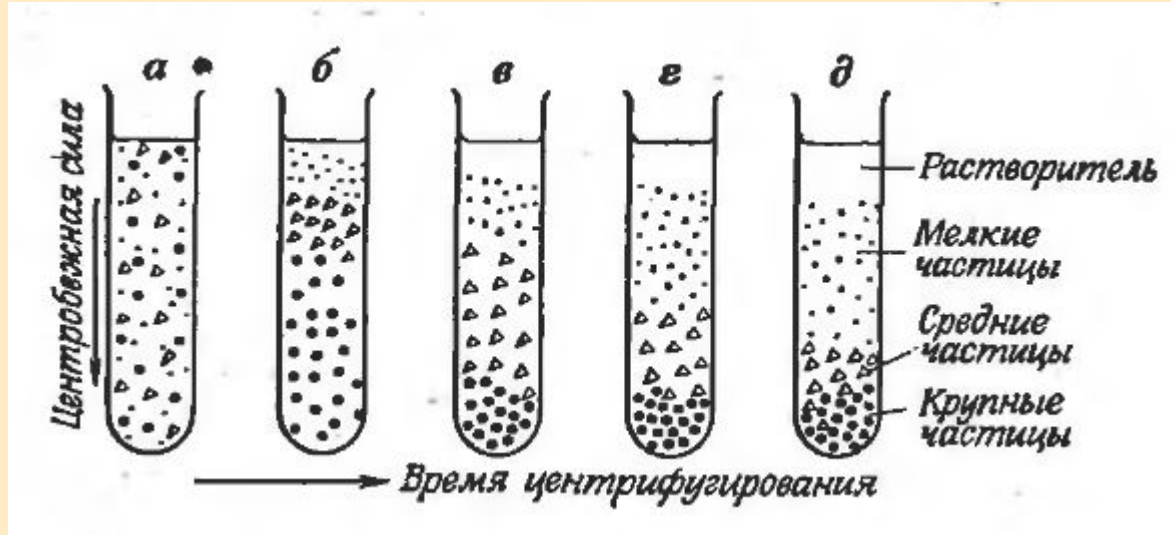
✓ Следует иметь в виду, что правая колонка цифр шкалы G соответствует правой колонке цифр шкалы скорости вращения ротора; левая — левой.



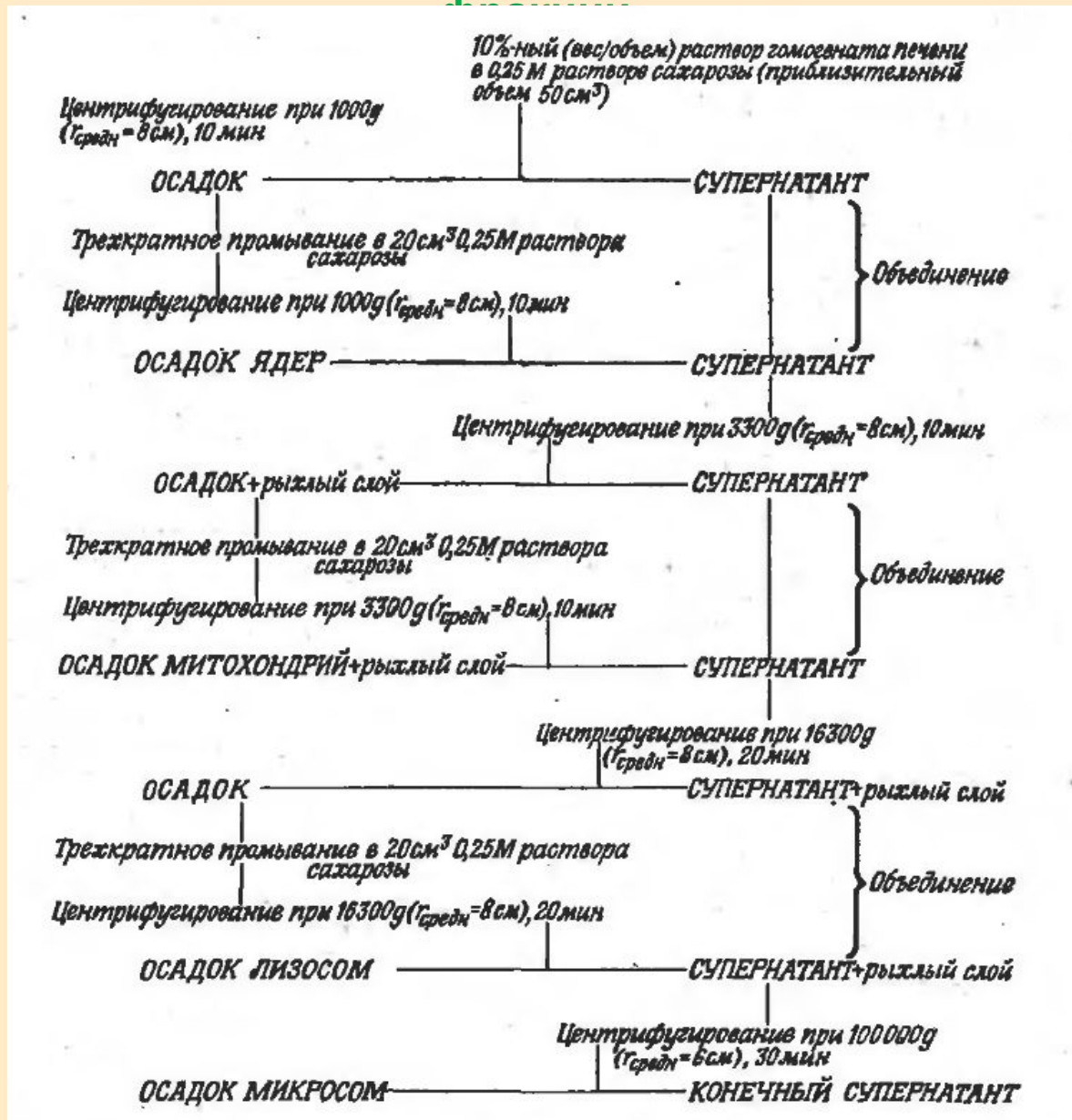


Дифференциальное центрифугирование

Метод разделения субклеточных частиц, основанный на различиях их коэффициентов седиментации, которые приблизительно пропорциональны размеру. Клеточные экстракты последовательно центрифугируют с возрастающей скоростью. Большие частицы, такие как ядро и митохондрии, осаждаются при относительно низких скоростях; для осаждения мелких частиц, таких как рибосомы, требуются более мощные центробежные силы.



Сначала частицы распределены по всему объему центрифужной пробирки равномерно (а); в ходе центрифугирования частицы седиментируют в соответствии с их размерами и формой (б — д).



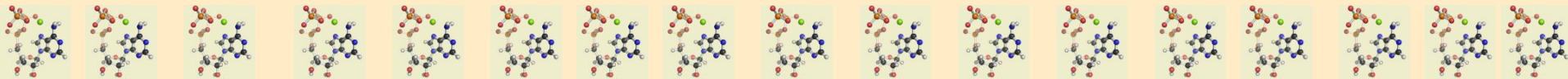
Зонально-скоростное центрифугирование

7

Особенности этого типа центрифугирования отражены в самом его названии: «скоростное» — потому что частицы разделяются по скорости их оседания, причем плотность их значительно больше, чем плотность среды; «зональное» — так как частицы различных размеров оседают более или менее тонкими слоями — «зонами». Осадков не образуется. Центрифугирование ведут в бакет-роторах. После того, как зоны достигнут оптимального распределения по длине пробирки, центрифугирование прекращают, и зоны частиц описанным ниже способом извлекают одну за другой.



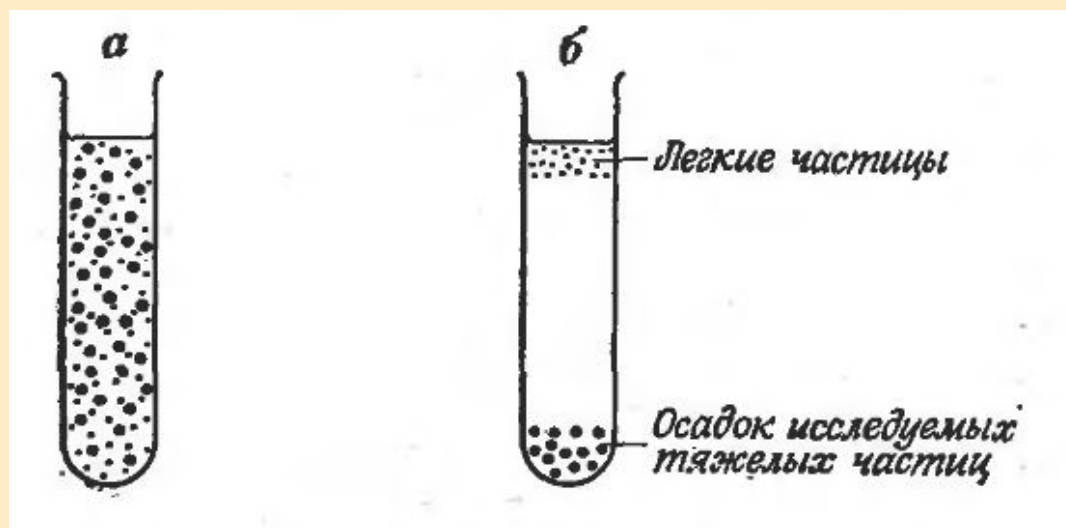
Перед началом центрифугирования суспензию частиц наслаивают поверх градиента плотности жидкости (а). При скоростном центрифугировании частицы не достигают изопнкнической точки», а при изопикническом разделении центрифугирование продолжают до тех пор, пока исследуемые частицы не достигнут зоны с соответствующей плотностью (б).



Изопикническое центрифугирование

8

Изопикническое центрифугирование проводят как в градиенте плотности, так и обычным путем. Если центрифугирование проводится не в градиенте плотности, препарат сначала центрифугируют так, чтобы осели частицы, молекулярный вес которых больше, чем у исследуемых частиц. Эти тяжелые частицы отбрасывают, и образец суспендируют в среде, плотность которой такая же, как и у фракции, которую хотят выделить.



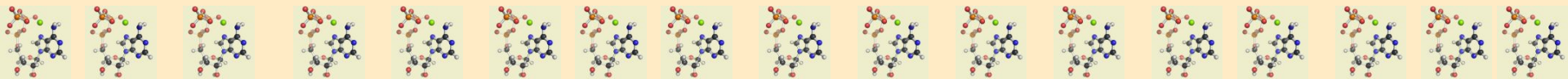
Перед центрифугированием частицы распределены по объему центрифужной пробирки равномерно (а). После центрифугирования более легкие частицы всплывают наверх, в то время как тяжелые оседают на дно пробирки (б).

Градиент сахарозы

9

Для того, чтобы зоны оставались узкими, необходимо противодействовать конвекции жидкости, в которой движутся частицы. Эффективный способ подавления конвекции — увеличение плотности этой жидкости вдоль радиуса вращения в направлении от мениска ко дну пробирки. Например, можно заполнять пробирку бакет-ротора водным раствором сахарозы, концентрация которой нарастает по направлению ко дну пробирки. А затем уже на этот «градиент сахарозы» (как его для краткости называют) наслаивать препарат — смесь подлежащих разделению частиц.

Концентрация раствора сахарозы в воде (вес. %)						
Параметр	5	10	15	20	25	30
ρ	1,020	1,041	1,062	1,084	1,107	1,131
η	1,753	2,073	2,513	3,135	4,042	5,422



Усредненные значения плавучей плотности основных биологических объектов в растворах сахарозы (в г/см³).

РНК — 1,49

Хлоропласты — 1,21

ДНК — 1,42

Лизосомы — 1,21

Рибосомы — 1,41

Митохондрии — 1,19

Белки — 1,24-1,32

Мембраны — 1,13-1,18



Равновесное центрифугирование в градиенте

ПЛОТНОСТИ

- ✓ Для создания градиента плотности используют соли тяжелых металлов, например рубидия или цезия, а также растворы сахарозы.
- ✓ Образец, например, ДНК, смешивают с концентрированным раствором хлористого цезия. И растворенное вещество (ДНК), и растворитель сначала распределяются по всему объему равномерно. В ходе центрифугирования устанавливается равновесное распределение концентрации, а следовательно, и плотности CsCl, так как ионы цезия обладают большой массой.
- ✓ Под действием центробежного ускорения молекулы ДНК перераспределяются, собираясь в виде отдельной зоны в части пробирки с соответствующей им плотностью.

Метод применяется главным образом в аналитическом центрифугировании и

Ультрацентрифугирование

12

✓ Ультрацентрифугирование - метод разделения и исследования высокомолекулярных соединений, вирусов и субклеточных частиц с помощью ультрацентрифуги.

✓ Идея Ультрацентрифугирование было предложено А. В. Думанским в 1913, однако разработка современной теории седиментационного анализа стала возможной только после того, как Т. Сведберг в 1926 сконструировал высокоскоростную ультрацентрифугу, обеспечивавшую ускорение $10^5 g$. 10-20 лет тому назад скоростные ультрацентрифуги составляли едва ли не главную часть приборного оснащения любой биохимической лаборатории.

✓ Сейчас, когда молекулярная биология перешла на работу с микроколичествами исходных материалов, эти дорогие и капризные машины заняли куда более



Ультрацентрифуга

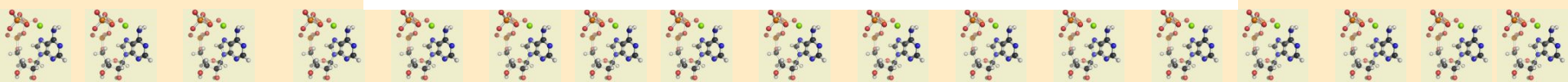
13

✓ Этим термином принято называть центрифуги, позволяющие достигать скорости вращения своих роторов вплоть до 80 тысяч оборотов в минуту. На радиусе ротора в 6 см это создает в радиальном направлении ускорение в 700 тысяч раз превышающее ускорение земного притяжения («700 000 g»).

✓ Вращение с такой скоростью невозможно осуществить в нормальной атмосфере из-за катастрофического разогрева ротора. Поэтому главным элементом конструкции ультрацентрифуги

является вакуумная камера диффузионного разрежения в 10 в -

ое подключение к ается достигнуть



Виды центрифуг

Центрифуги
общего назначения

$V_{\max} = 6000$ об/мин
 $G = 6000$ g



Скоростные
центрифуги

$V_{\max} = 25000$ об/мин
 $G = 89000$ g

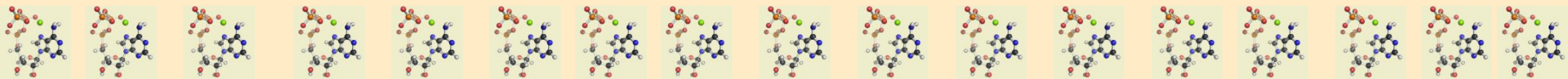


Препаративные
ультрацентрифуги

$V_{\max} = 75000$ об/мин
 $G = 510000$ g



Аналитические
ультрацентрифуги

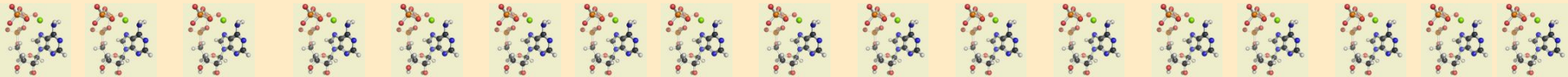


Виды роторов для центрифуг

Угловые роторы



Роторы с подвесными стаканами



Анализ субклеточных фракций

16

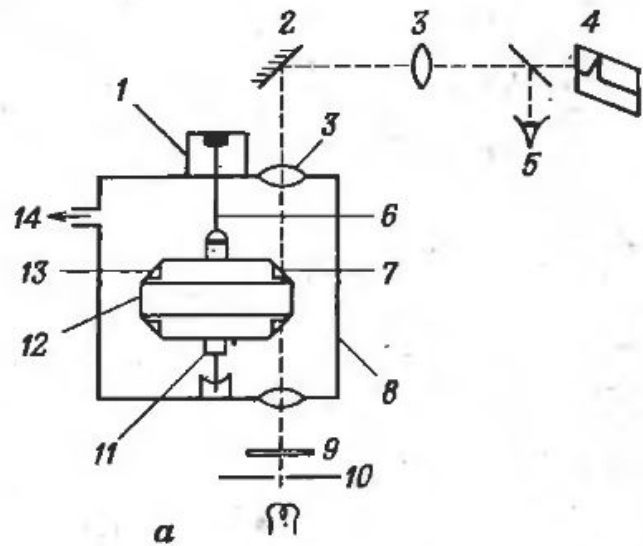
✓ Свойства полученного при фракционировании препарата субклеточных частиц можно отнести к свойствам самих частиц только в том случае, если препарат не содержит примесей. Следовательно, всегда необходимо оценивать чистоту получаемых препаратов.

✓ Эффективность гомогенизации и наличие в препарате примесей можно определить с помощью микроскопического исследования. Однако отсутствие видимых примесей еще не является достоверным доказательством чистоты препарата. Для количественной оценки чистоты полученный препарат подвергают химическому анализу, который позволяет установить содержание в нем белков или ДНК, определить его ферментативную активность, если

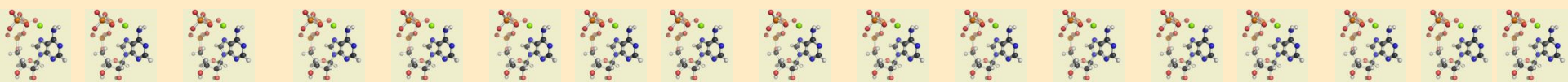
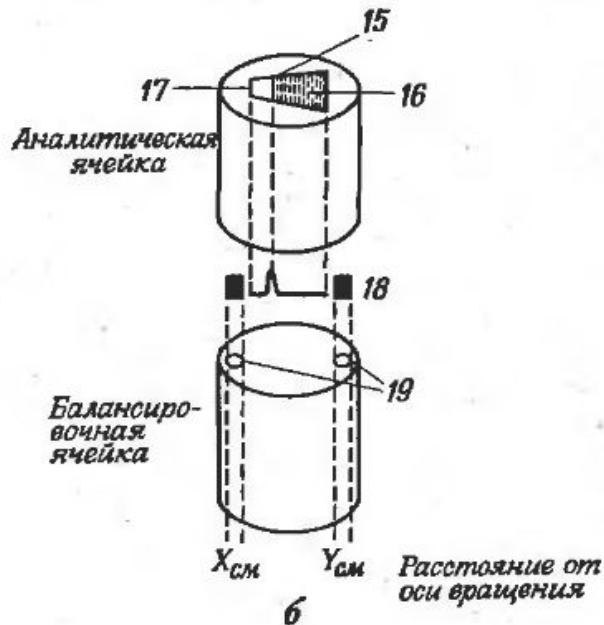
возможно, и иммунологические свойства.



дифугирование



1 — мотор; 2 — зеркало; 3 — линза; 4 — фотопластинка; 5 — окуляр; 6 — гибкий вал; 7 — положение аналитической ячейки; 8 — камера ротора; 9 — светофильтр; 10 — источник света; 11 — термистор; 12 — ротор; 13 — положение балансирующей ячейки; 14 — к насосу; 15 — граница; 16 — раствор; 17 — растворитель; 18 — шпирен-диаграмма; 19 — индексные отверстия.

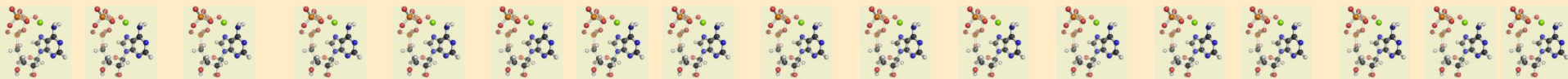


Применение аналитического ультрацентрифугирования

Определение
молекулярных весов

Оценка чистоты
препаратов

Исследование
конформационных
изменений в
макромолекулах



В литературе можно встретить величину, характеризующую собственные качества частицы (ее размер и плотность) в процессе седиментации, исключив скорость вращения и положение частицы, относительно оси вращения.

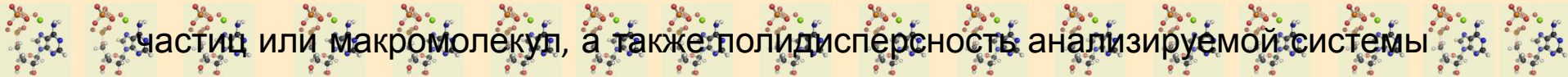
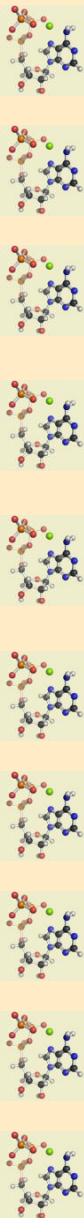
✓ Характеристикой частиц дисперсной фазы или молекул растворённого полимера может служить **константа седиментации** — **отношение скорости седиментации к ускорению поля центробежных сил.**

✓ За единицу измерения константы седиментации принят **1 сведберг = 10⁻¹³ сек.**

✓ Эта константа зависит от массы и формы частицы (макромолекулы) и для белков изменяется в пределах от 1 до 200 сведбергов.

✓ Скорость седиментации или установление седиментационного равновесия в ультрацентрифуге, константы седиментации, массы и размеры коллоидных

частиц или макромолекул, а также полидисперсность анализируемой системы



Список использованных

20

ИСТОЧНИКОВ

1. Lehninger - David L. Nelson., Michael M. Cox. Principles of biochemistry. 2004
2. Методы практической биохимии/ Б. Уильямс., К. Уилсон. М: МИР, 1978

