

Методы разделения и очистки биомолекул

Ультрацентрифугирование (седиментация)

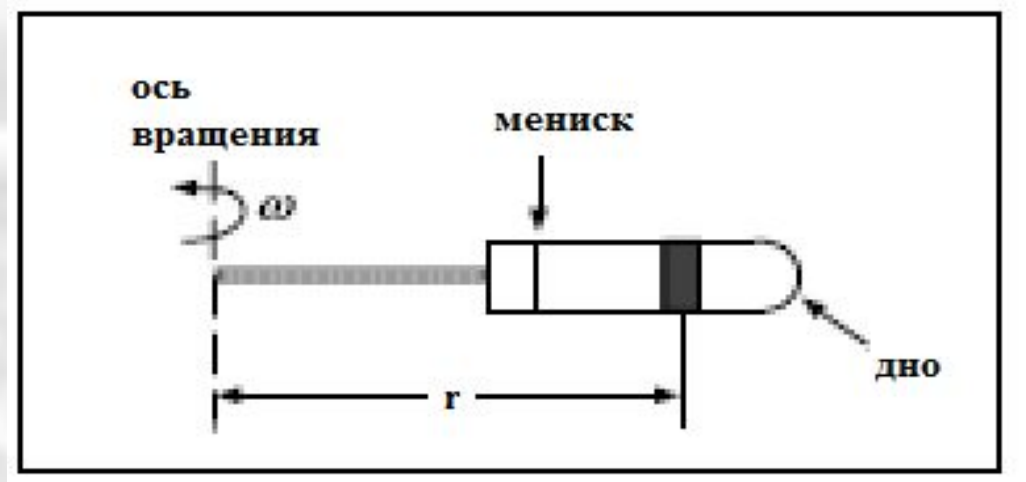
Ультрацентрифугирование

Седиментация – осаждение частиц в жидкости или газе под действием силы тяжести или центробежной силы.

Если седиментация осуществляется с использованием высокоскоростной центрифуги (ультрацентрифуги), используется термин **ультрацентрифугирование**.

Метод позволяет:

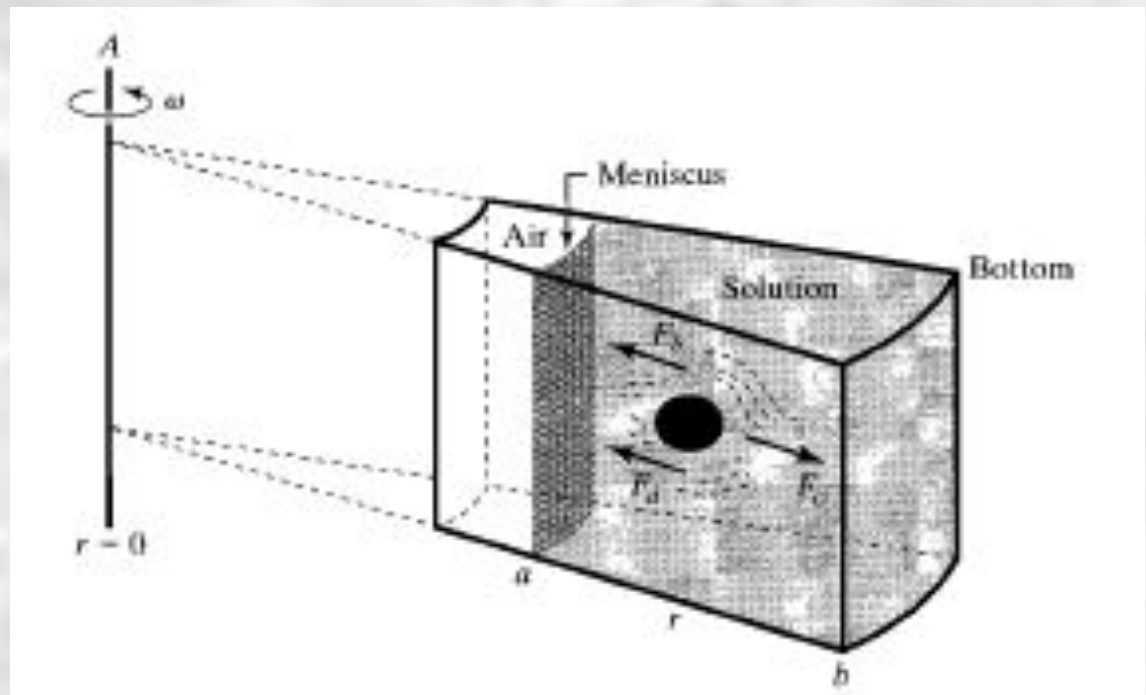
- определить M_r , плотность и форму макромолекул,
- разделить смесь веществ на компоненты для аналитических и препаративных целей



Ультрацентрифугирование

Принцип метода

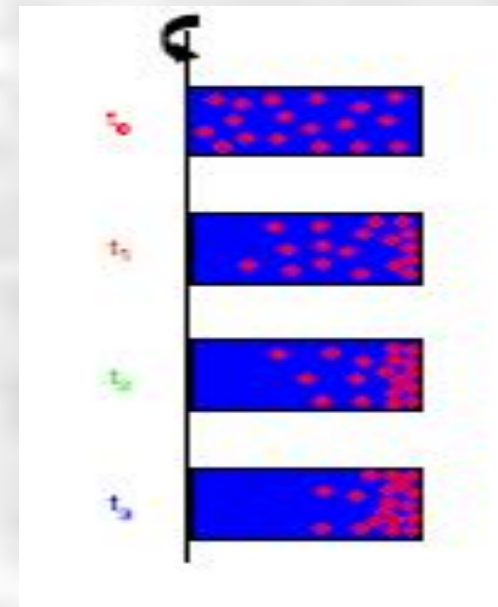
При центрифугировании раствора макромолекул частицы движутся к дну пробирки под действием центробежных сил. Через определенные промежутки времени определяют распределение частиц по длине пробирки.



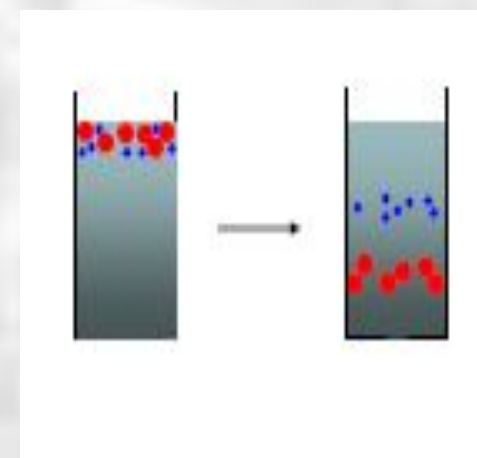
Ультрацентрифугирование

Методы ультрацентрифугирования

Скоростное ультрацентрифугирование – частицы движутся через раствор, оставляя за собой зону чистого растворителя. Исследуют смещение границы между растворителем и раствором.



Зональное ультрацентрифугирование – образец наносится в виде слоя на поверхность более плотного растворителя. Различные компоненты будут разделяться в виде серии зон (полос), которые осаждаются только через растворитель отдельно одна от другой.



Ультрацентрифугирование

Теория ультрацентрифугирования

На молекулу в растворе при центрифугировании действуют следующие силы:

$$F_{ц} = m\omega^2 r, \text{ где } \omega [c^{-1}] = \pi n / 30$$

$$F_{в} = m_{\text{выт. р-ля}} \omega^2 r = m\bar{v}\rho\omega^2 r$$

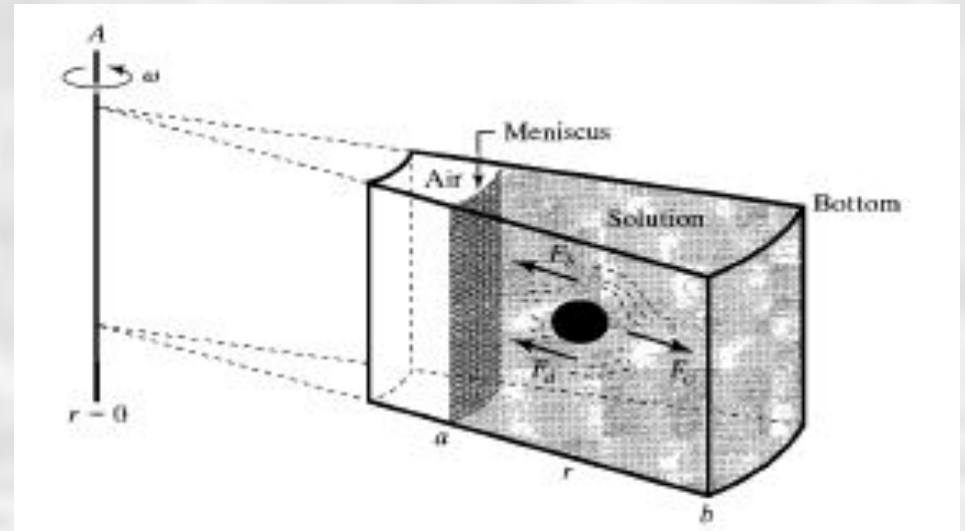
$$F_{т} = fv$$



Ультрацентрифугирование

Теория ультрацентрифугирования

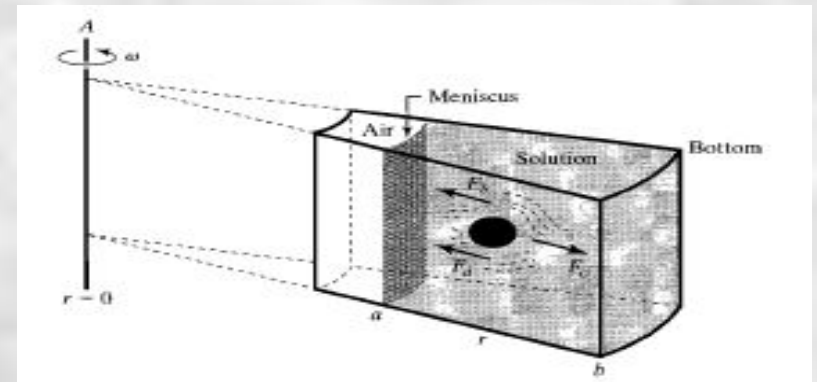
$$v = \frac{\omega^2 r m (1 - \bar{v} \rho)}{f}$$



1. Частица с большей массой будет двигаться быстрее
2. Более плотная частица (с меньшим объемом) будет двигаться быстрее, чем менее плотная
3. Чем больше плотность раствора, тем медленнее движение частиц
4. Чем больше коэффициент трения, тем медленнее движение частиц

Ультрацентрифугирование

Теория ультрацентрифугирования



Коэффициент седиментации

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

параметры
эксперимента

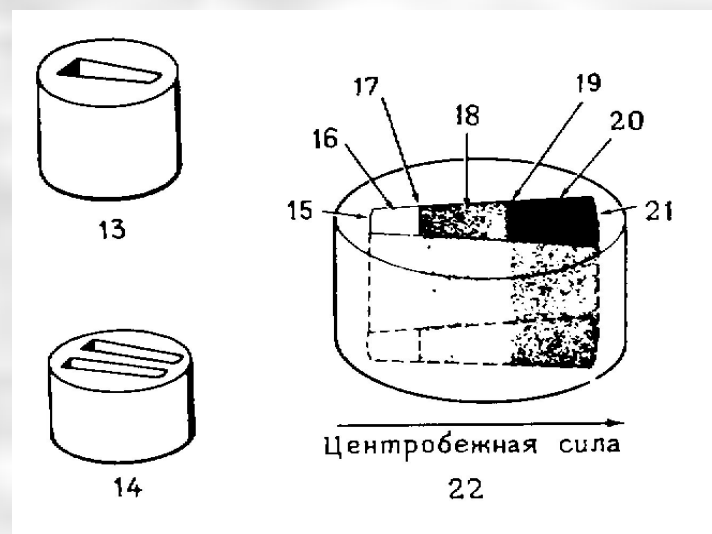
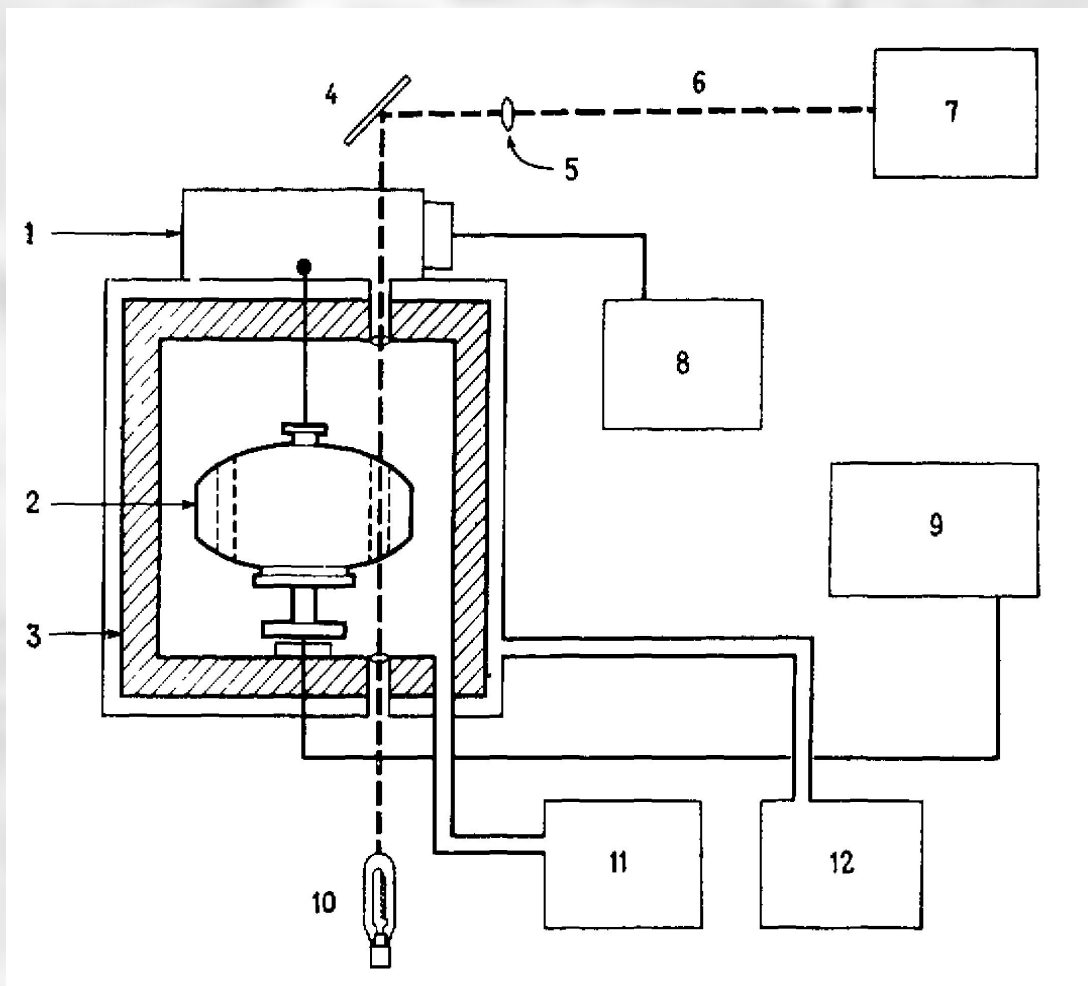
параметры молекулы

$$1 \text{ S (1 Сведберг)} = 10^{-13} \text{ секунды}$$

Ультрацентрифугирование

Оборудование для ультрацентрифугирования

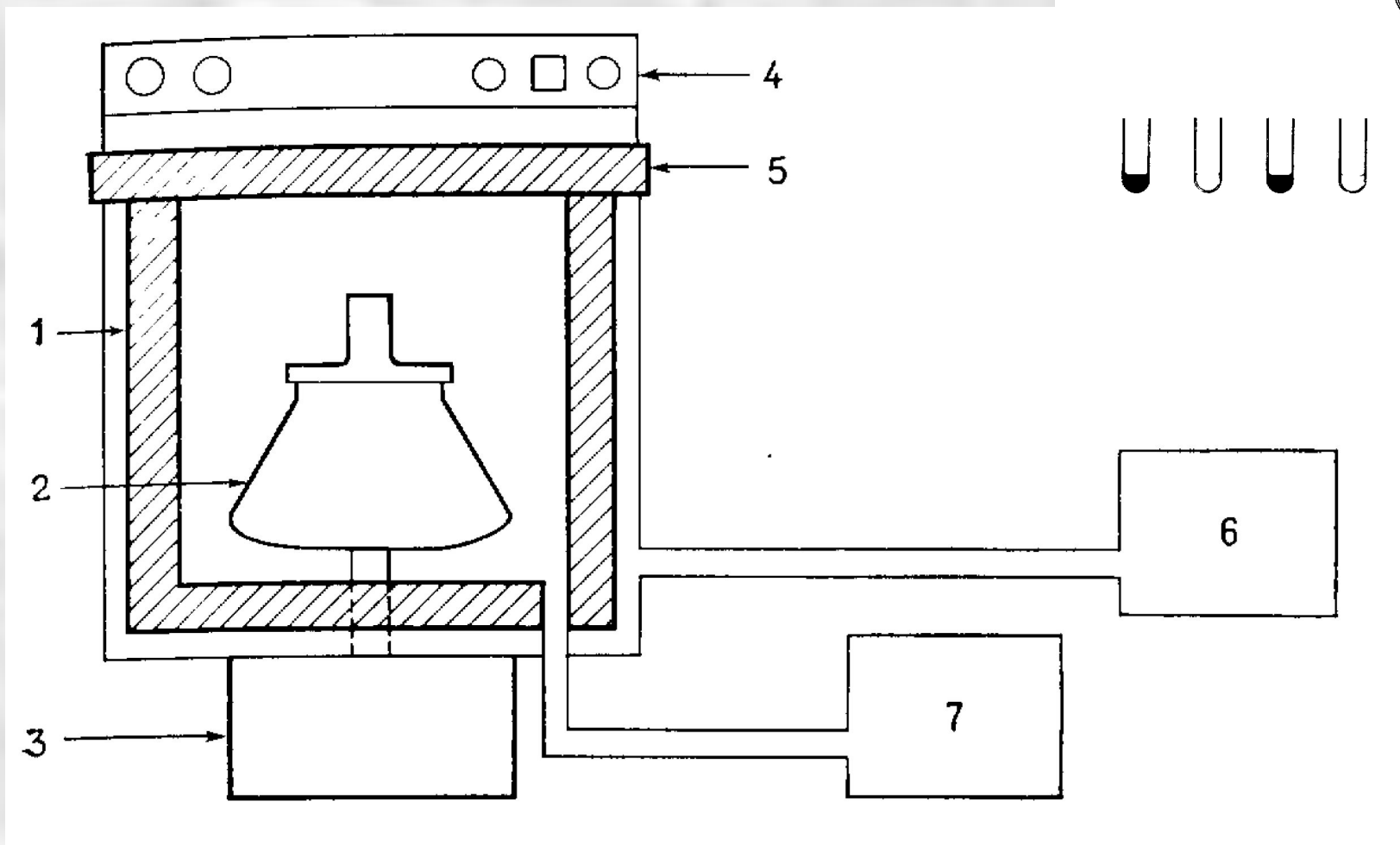
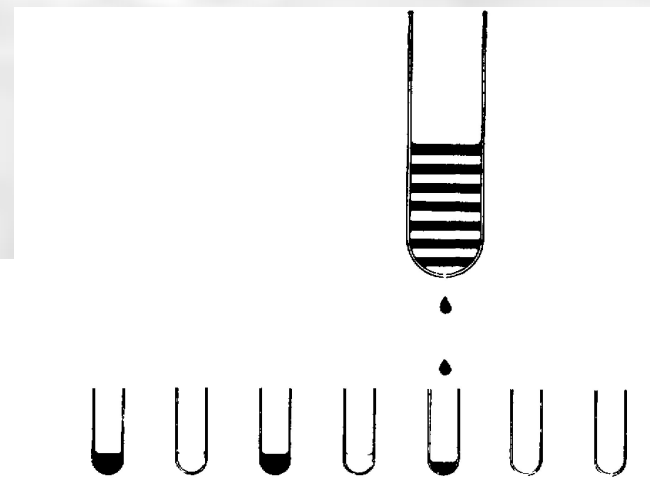
Аналитическая ультрацентрифуга



Ультрацентрифугирование

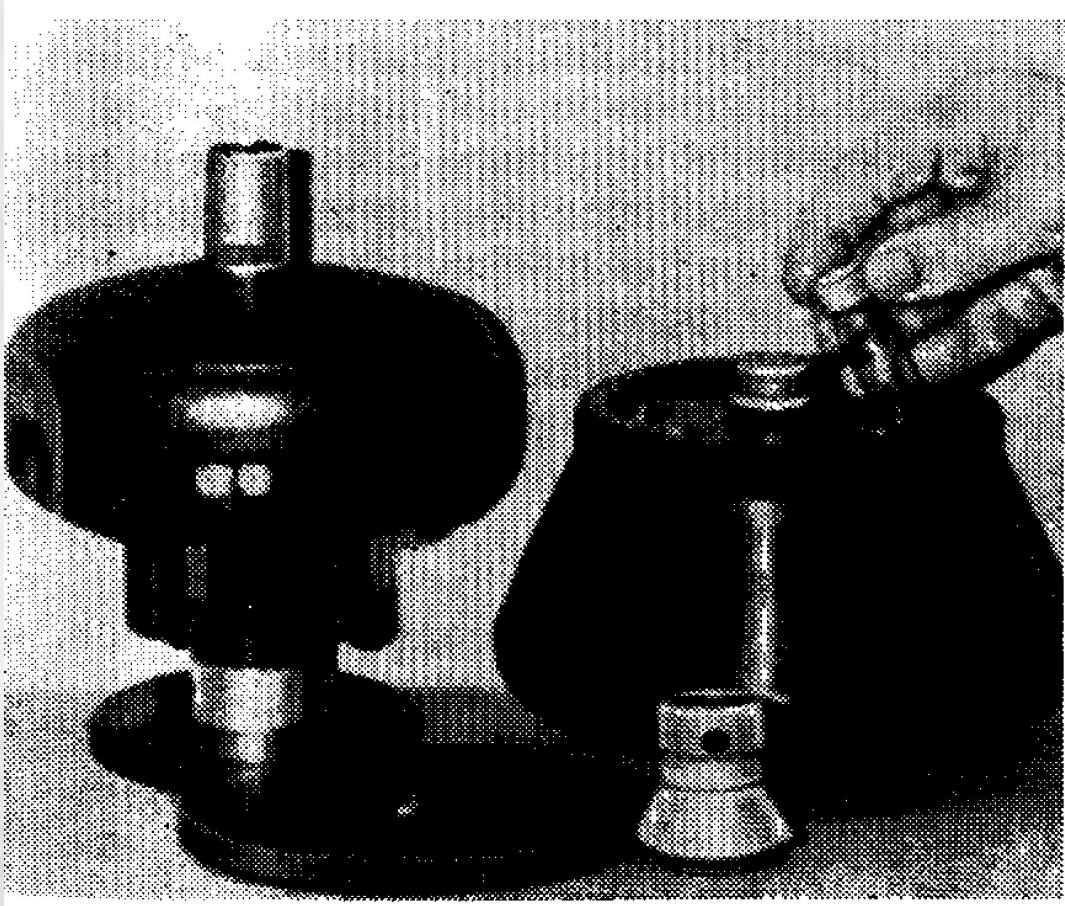
Оборудование для ультрацентрифугирования

Препаративная ультрацентрифуга



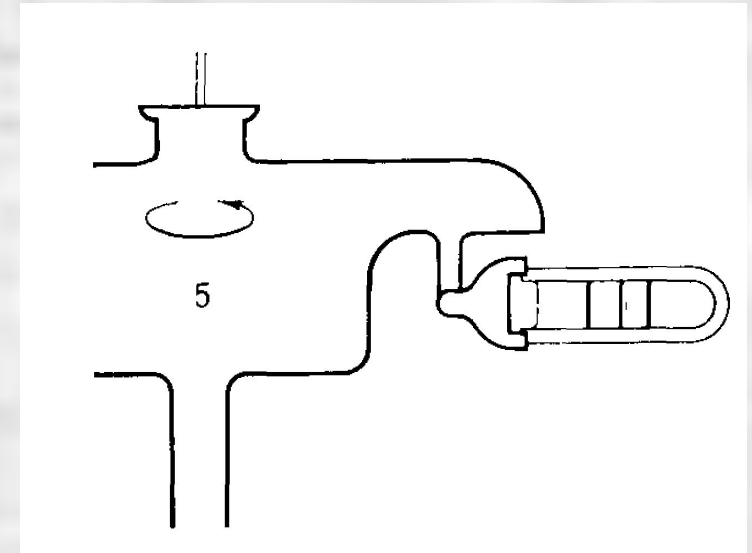
Ультрацентрифугирование

Оборудование для ультрацентрифугирования



Ротор с
подвесными
стаканами

Угловой ротор

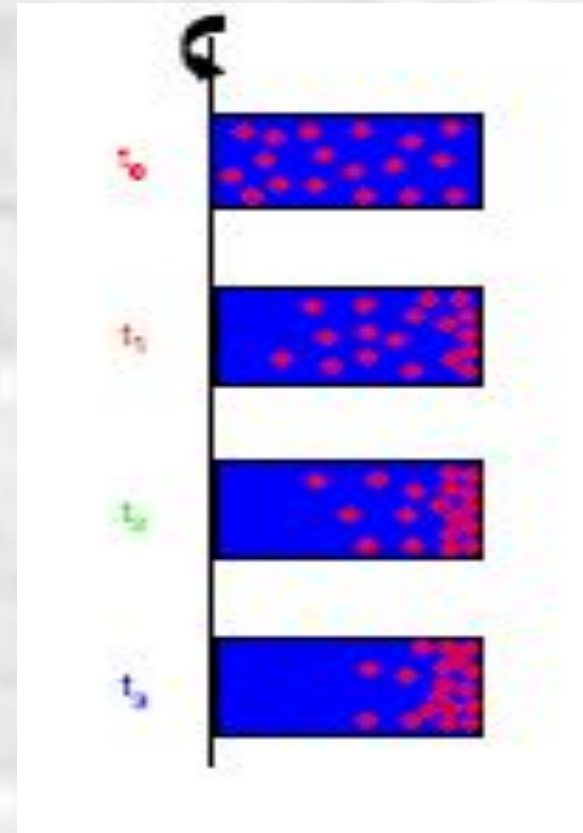


Ротор с
подвесными
стаканами

Ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование – частицы движутся через раствор, оставляя за собой зону чистого растворителя. Исследуют смещение границы между растворителем и раствором.

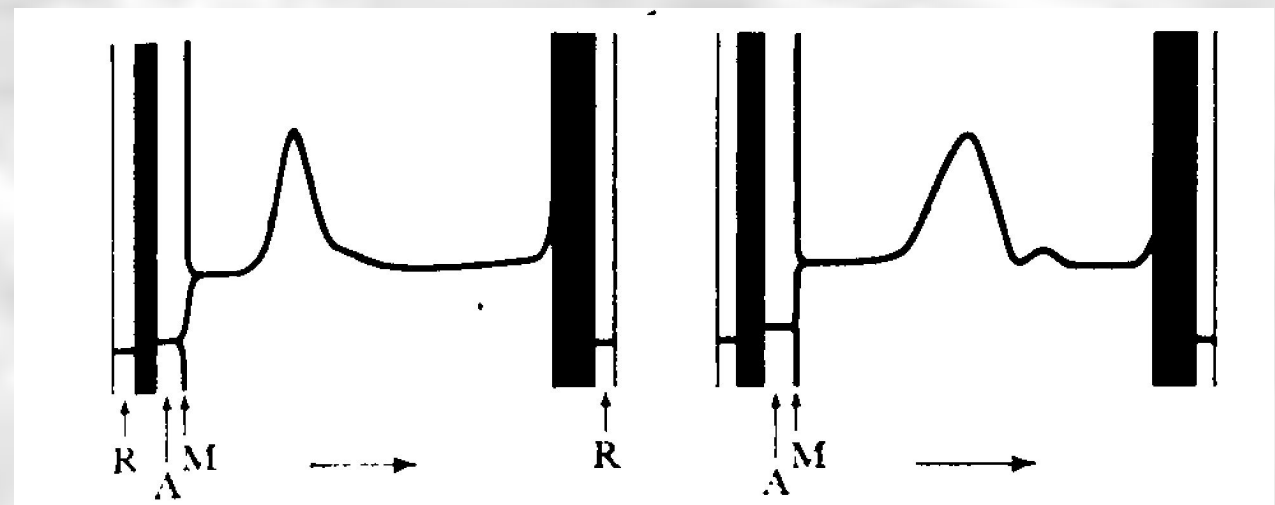
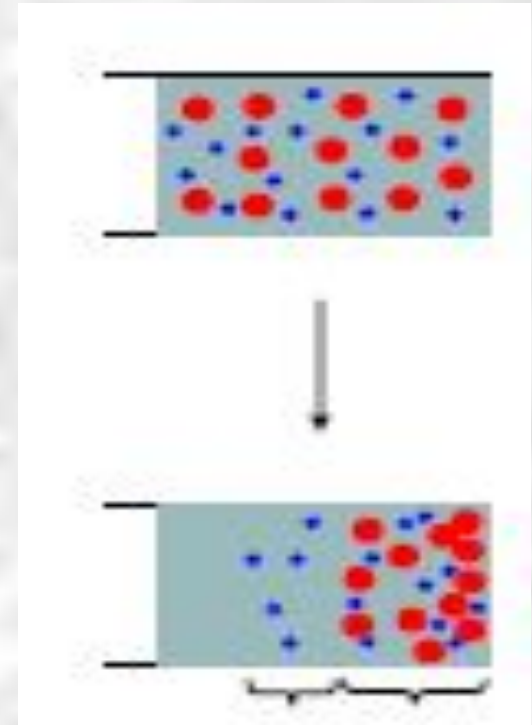


Ультрацентрифугирование

Оптические методы регистрации движения границы раствор – чистый растворитель

Шлиреновская система

основана на том, что луч света не отклоняется при прохождении через область с однородной концентрацией, но отклоняется, проходя через участок с изменяющейся концентрацией, вследствие изменения показателя преломления.

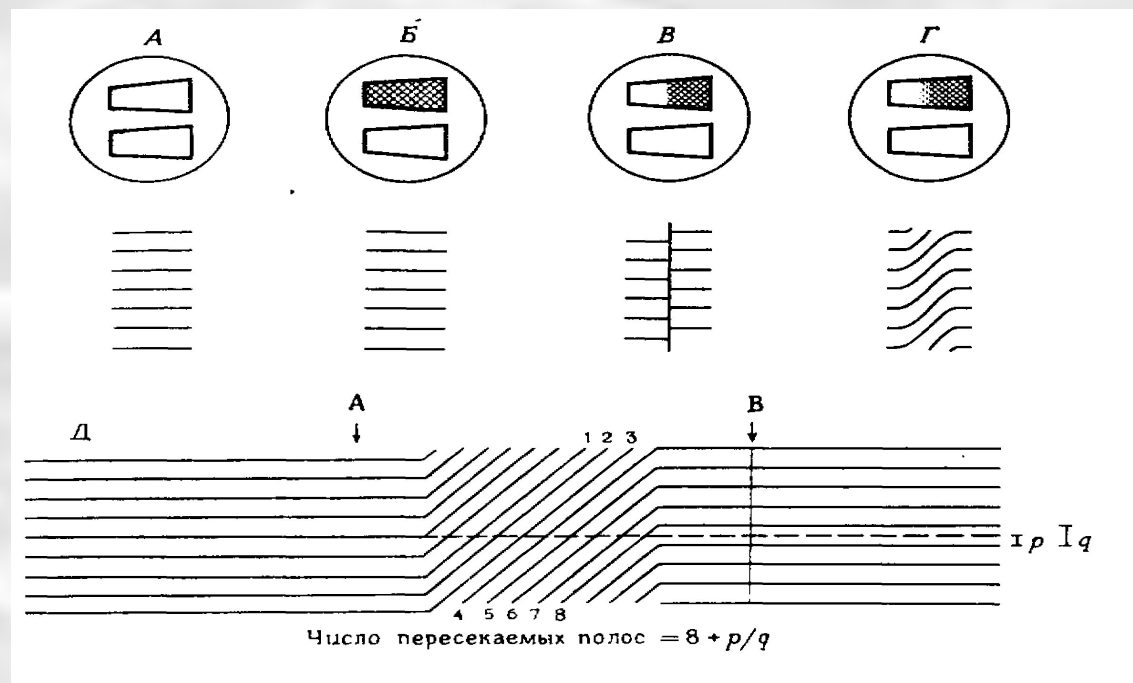
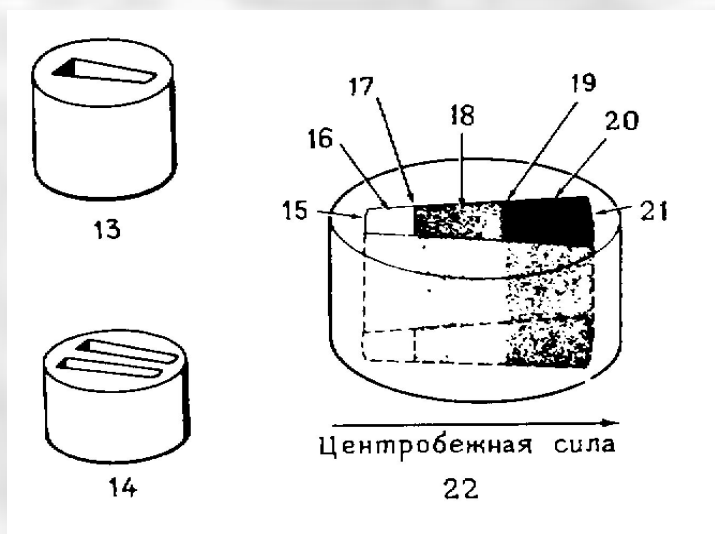
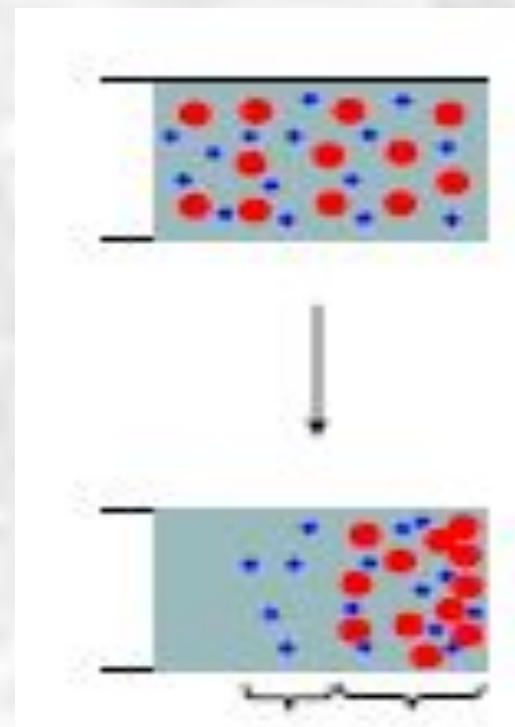


Ультрацентрифугирование

Оптические методы регистрации движения границы раствор – чистый растворитель

Интерференционная система

использует двухсекторную ячейку, один из секторов которой содержит только растворитель, другой – раствор. При прохождении света через оба сектора получается оптическая интерференционная картина.

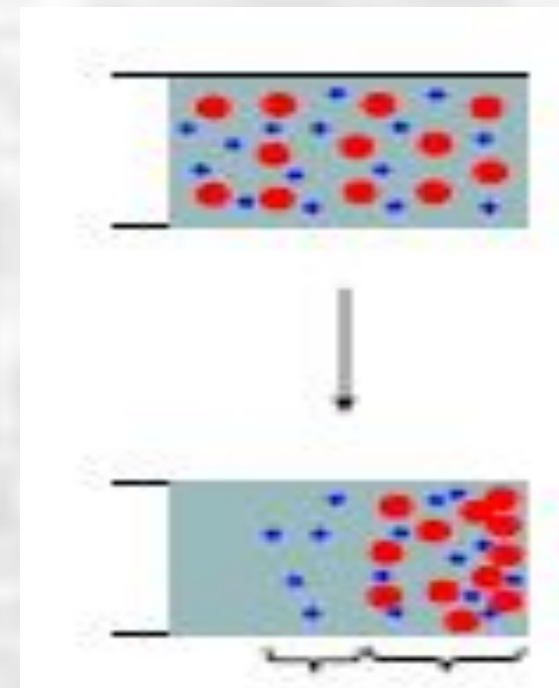
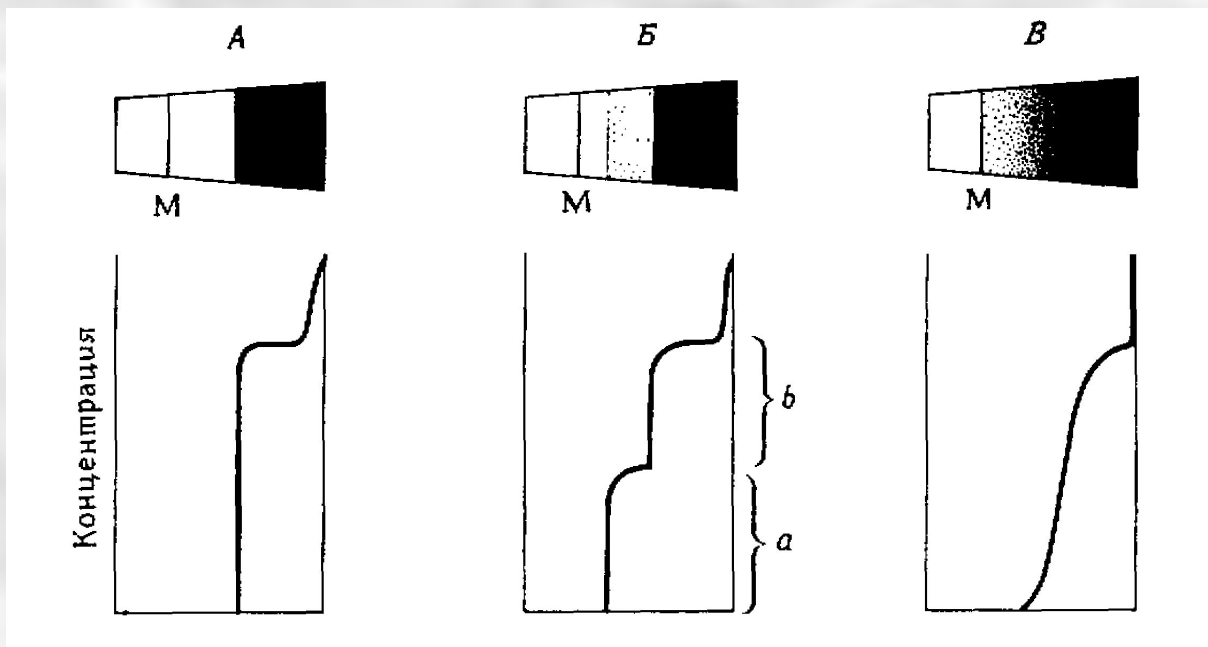
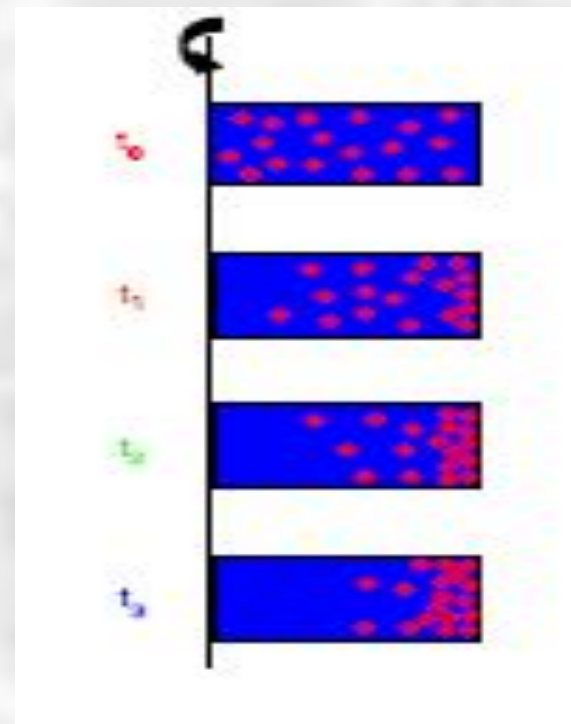


Ультрацентрифугирование

Оптические методы регистрации движения границы раствор – чистый растворитель

Абсорбционная система

регистрирует поглощение света определенной длины волны, соответствующей максимуму поглощения исследуемых биомолекул, по длине ячейки.



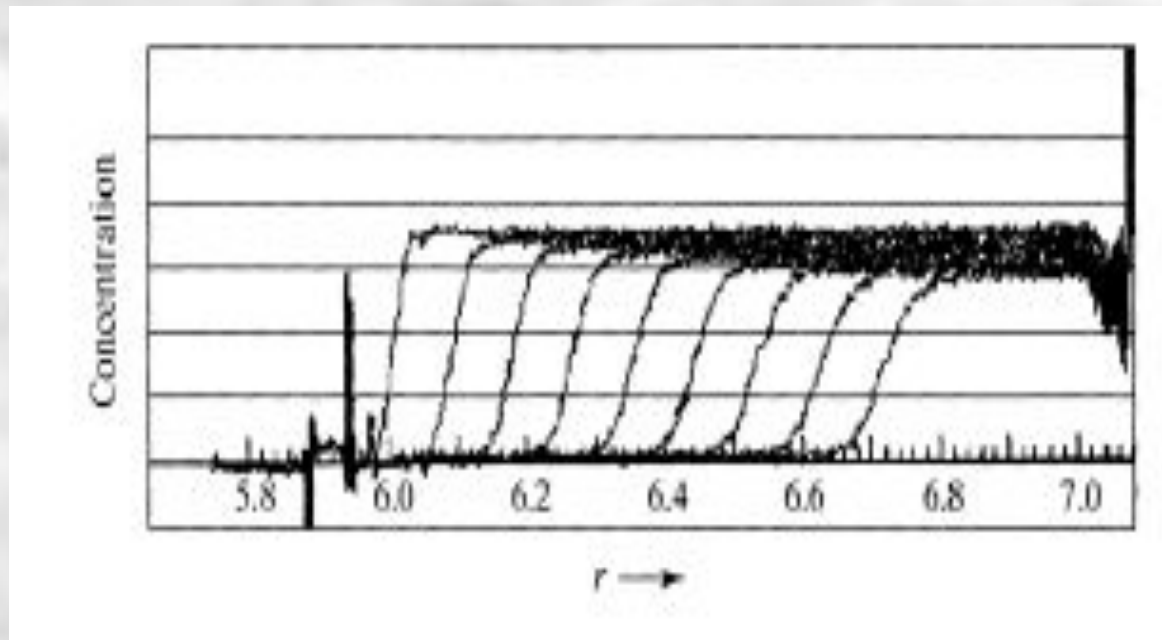
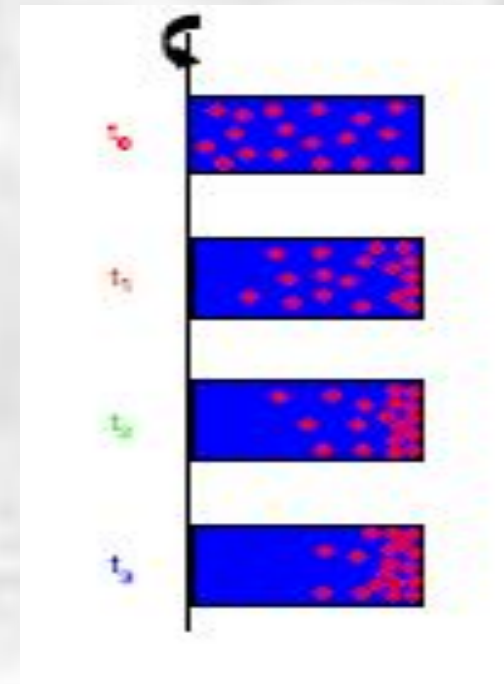
Ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование

Определение
седиментации

коэффициента

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$



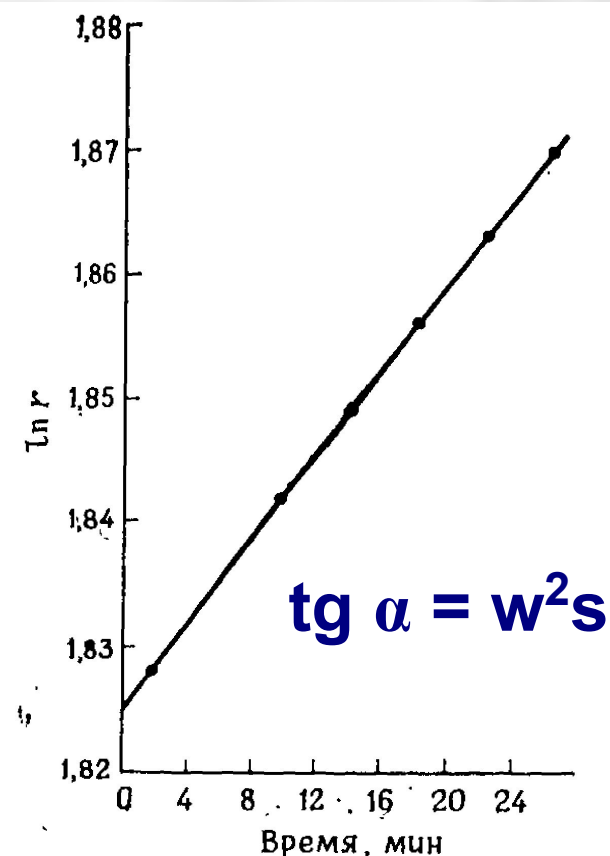
Ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование

Определение
седиментации

коэффициента

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v} \rho)}{f}$$



| Время после достижения 33 000 об/мин | Расстояние от оси вращения, см | $\ln r$ |
|---|-----------------------------------|---------|
| 2 | 6,225 | 1,8284 |
| 10 | 6,310 | 1,8421 |
| 14 | 6,358 | 1,8493 |
| 18 | 6,400 | 1,8561 |
| 22 | 6,445 | 1,8632 |
| 26 | 6,491 | 1,8705 |

$$\text{tg } \alpha = 3,62 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$$

$$W = 2\pi \cdot 33000 / 60 \\ = 3,45 \cdot 10^3 \text{ рад/с}$$

$$W^2 = 1,19 \cdot 10^7$$

$$S = 30,1 \cdot 10^{-13} \text{ с}$$

Ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование

Факторы, влияющие на величину коэффициента седиментации

1. Чем больше концентрация, тем больше S .
2. Чем больше скорость вращения центрифуги, тем больше S .
3. Заряженные частицы имеют меньший S , чем незаряженные.
4. Частицы с вытянутой формой проявляют меньший S .
5. Чем больше M_r , тем больше S .

$$S_{20, \text{в}} = S_{\text{экссп}} \cdot \frac{1 - \bar{v} \rho_{20, \text{в}}}{1 - \bar{v} \rho_T} \cdot \frac{\eta_T}{\eta_{20}} \cdot \frac{\eta_0}{\eta_1},$$

$$m = sRT/D (1 - \bar{v} \rho)$$

Ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование

| Substance | S (S) | D (10^{-7} cm ² /s) | \bar{V} (cm ³ /g) | M (g/mol) |
|--------------------|----------|---|-----------------------------------|--------------|
| Lipase | 1.14 | 14.48 | 0.732 | 6,667 |
| Lysozyme | 1.91 | 11.20 | 0.703 | 14,400 |
| Serum albumin | 4.31 | 5.94 | 0.734 | 66,000 |
| Catalase | 11.3 | 4.10 | 0.730 | 250,000 |
| Fibrinogen | 7.9 | 2.02 | 0.708 | 330,000 |
| Urease | 18.6 | 3.46 | 0.730 | 483,000 |
| Hemocyanin (snail) | 105.8 | 1.04 | 0.727 | 8,950,000 |
| Bushy stunt virus | 132 | 1.15 | 0.740 | 10,700,000 |

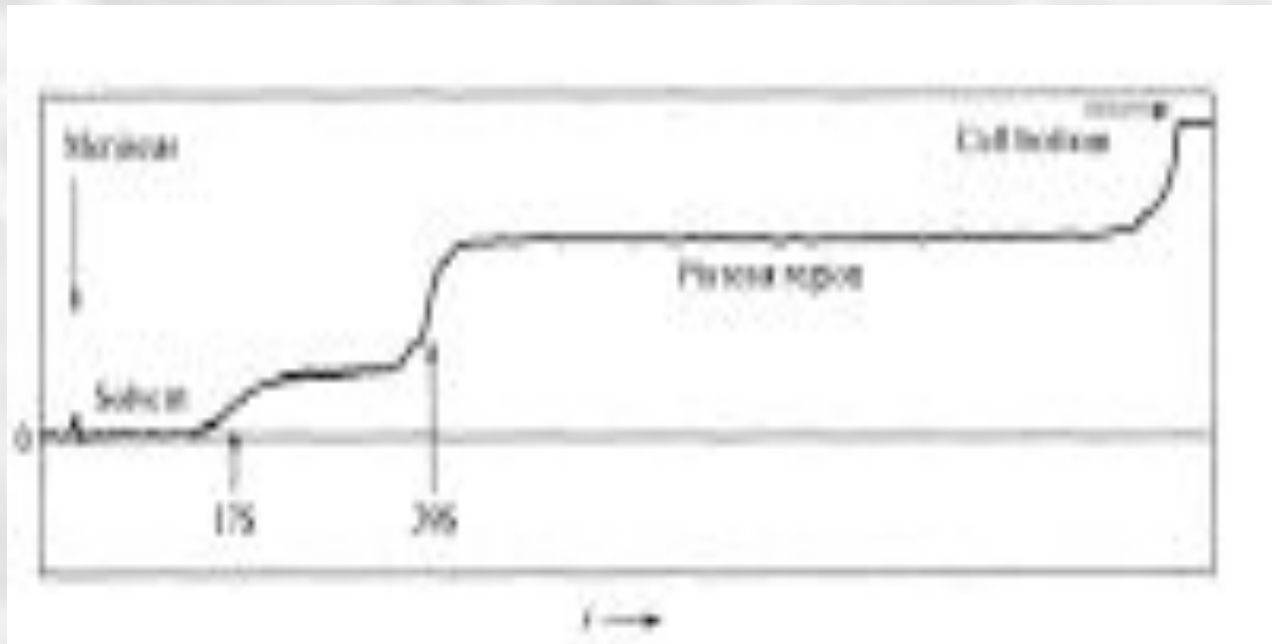
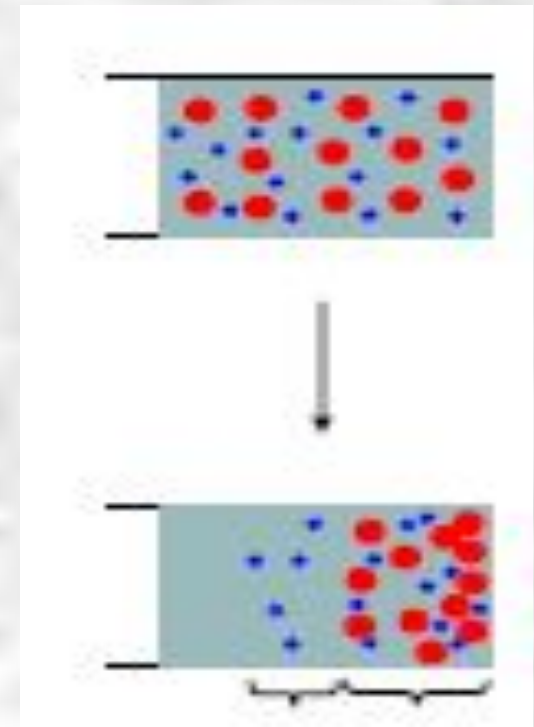
Ультрацентрифугирование

Скоростное ультрацентрифугирование

Определение
седиментации

коэффициента

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$



Ультрацентрифугирование

Зональное ультрацентрифугирование

Проводят в градиенте плотности сахарозы или глицерина 5-20 % (белки), либо в градиенте плотности CsCl (ДНК)

