

Спецкурс
«Методы физико-
химической биологии»

Кафедра БФК



Лекция 3



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

Последние годы характеризуются сильным прогрессом методов **центрифугирования и ультрацентрифугирования.**

Совершенствуются и усложняются ультрацентрифуги.

1. Растет ассортимент роторов, в особенности максимальной скорости вращения.
2. Возникают новые типы градиентов плотности взамен сахарозного и цезиевого

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Основные понятия теории седиментации.

$$F_{\text{ц}} = M \omega^2 r$$

Учитывая выталкивающую силу, равную

$$M = V (\rho - \rho_c),$$

формула приобретает следующий вид:

$$F_{\text{ц}} = V (\rho - \rho_c) \cdot \omega^2 r$$

Условные обозначения: M – масса частицы (г);

$F_{\text{ц}}$ – центробежная сила; V – объем;

ρ – плотность частицы; ρ_c – плотность среды
(г/см³);

ω – угловая скорость вращения (рад/сек);

r – радиус вращения (см).

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Для сферической частицы с диаметром D
 $V = 1/6 \pi D^3$. Следовательно,

$$F_{ц} = 1/6 \pi D^3 (\rho - \rho_c) \cdot \omega^2 r$$

Частица движется вдоль радиуса со скоростью u (см/сек).

Сила трения ($F_{тр}$) действует в обратном направлении – $F_{тр} = fv$

$$f = 3 \pi \eta_c D,$$

где f – коэффициент трения – зависит от вязкости и размеров частицы.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Скорость частицы под действием $F_{\text{ц}}$ будет нарастать до тех пор, пока $F_{\text{тр}}$ не уравновесит центробежную силу $F_{\text{ц}}$. Отсюда:

$$u = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2 (\rho - \rho_c) \omega^2}{\eta_c}$$

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Можно заменить ω на $2\pi n$.

$$u = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2 (p - p_c) (2\pi n)^2 r}{\eta_c}$$

ПРАВИЛА ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

1. При одинаковых плотностях частицы **большего размера** оседают намного быстрее, чем меньшие.
2. Скорость оседания частицы **пропорциональна ее плотности**.
3. Скорость оседания частиц **пропорциональна квадрату числа оборотов ротора**.

ПРАВИЛА ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

4. Чем больше **вязкость** среды (η), тем медленнее оседают частицы.
5. Скорость оседания пропорциональна **расстоянию частицы** от оси вращения ротора (r).

Это расстояние увеличивается по мере продвижения частицы, следовательно **скорость частицы** будет увеличиваться. Если это нежелательно, нужно повышать **плотность и вязкость** среды в разных направлениях.

ПРАВИЛА ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

Плавучая плотность. Плотность частицы обусловлена не только **химическим составом и пространственной структурой**, но и количеством воды, связанной с ней. Эта вода движется вместе с частицей, значительно уменьшая ее **плотность**. Количество воды может уменьшаться под действием ионов и гидрофильных молекул. Они связывают воду и препятствуют гидратации частиц.

ПРАВИЛА ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

В то же время сами ионы или молекулы могут прочно связываться с частицами, увеличивая их эффективную плотность. Таким образом, эффективная плотность определяется:

- 1) химическим составом;
- 2) структурной организацией (сфера);
- 3) концентрацией веществ, растворенных в среде для центрифугирования;
- 4) зависит от температуры.

ПРАВИЛА ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

Поэтому вводится понятие **«плавучая плотность»** для конкретных частиц в данной среде.

Ее измеряют экспериментально, определив плотность среды, в которой движение частиц прекращается, так как **$\rho - \rho_c = 0$** .

Плавучая плотность ДНК в воде **1,1 г/см³**,

в CsCl₂ – **1,8 г/см³**. Теоретическое значение этого показателя должно быть по химическому составу – **2 г/см³**.

Сколько воды связывается с ДНК?

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ

Классификация центрифуг –
напольные, настольные,
микроцентрифуги,
рефрижераторные и обычные.

Кроме того, выделяют **центрифуги**
и ультрацентрифуги
(аналитические и препаративные).

Фирмы-изготовители: Beckman,
MSE, Dupont Sorvell, Sigma и др.

Настольные центрифуги



Микроцентрифуга



Напольная центрифуга



Ультрацентрифуга



Аналитическая центрифуга



ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ

Роторы должны быть **легкими** и самое главное – **прочными**. Для изготовления используют легкие сплавы или титан.

Угловые роторы используют для сбора осадков при **дифференциальном** центрифугировании и для фракционирования частиц при **изоплотностном** центрифугировании

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ

Центрифужные пробирки должны быть:

- 1) прочными;
- 2) нейтральными;
- 3) обладать низким сцеплением между стенками и раствором.

Материалы: нитроцеллюлоза, полиалломер (сополимер этилена и пропилена), поликарбонат, из нержавеющей стали и др. материалов.

Пробирки для ультрацентрифугирования должны быть с крышками. Важное условие – **одинаковый вес.**

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ

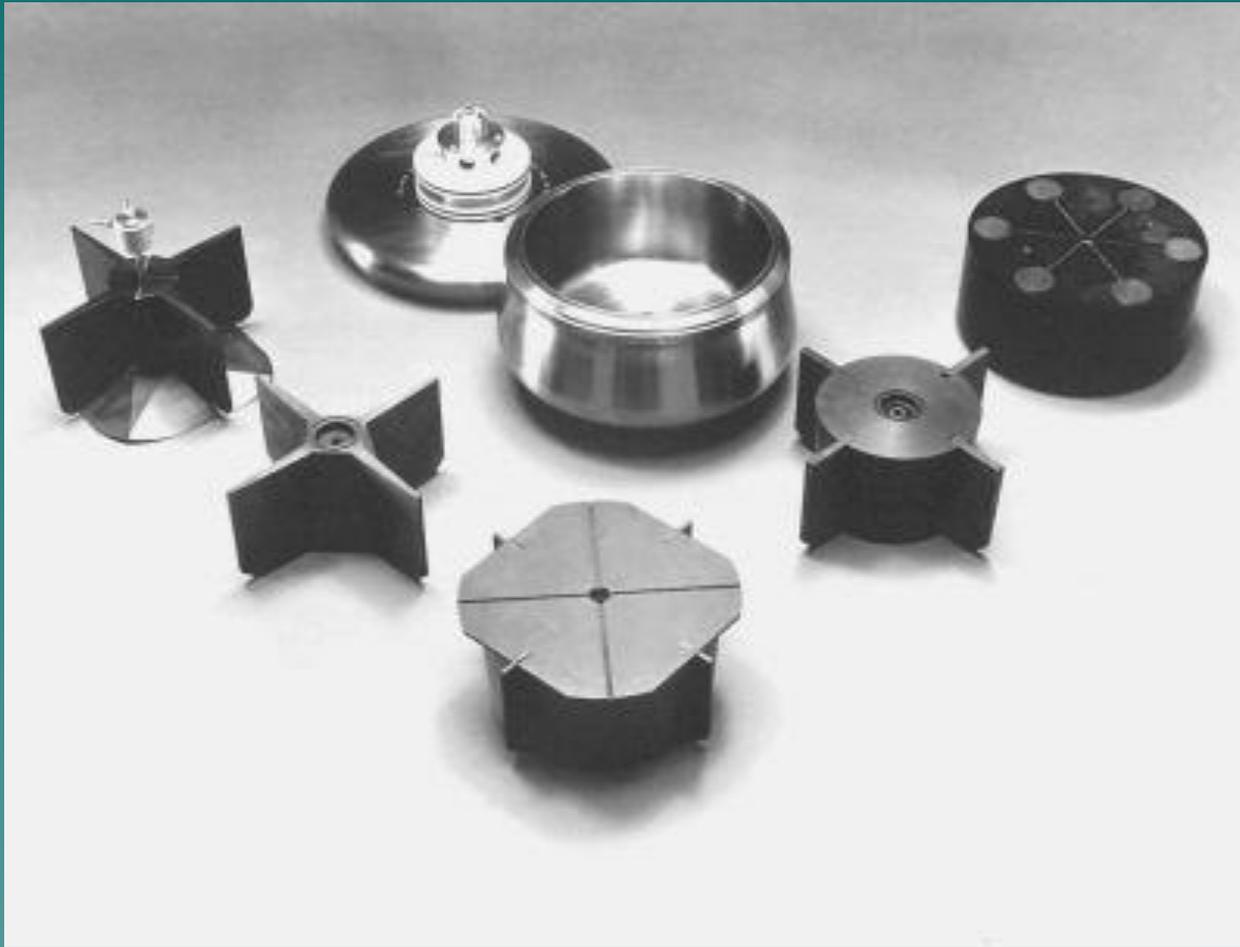
Бакет-роторы – роторы со свободно подвешенными пробирками. Для них характерно 3 или 6 пробирок, которые устанавливают в свободно подвешенные металлические гильзы – **бакеты (ведро)**. Все бакеты одного ротора имеют одинаковый вес, следовательно уравновешивать нужно только пробирки.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ

Зональные роторы. По характеру происходящих процессов имеют сходство с бакет-роторами. Однако роль пробирок выполняют **4 сектора**, образованные вставной крестовиной из **норила** – химически инертного вещества, но довольно мягкого. Крестовина обеспечивает вращение жидкости вместе с ротором.

Переходное устройство обеспечивает заполнение и опорожнение ротора «**на ходу**», т.е. при его вращении на малых

Зональный ротор



ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ

Проточные роторы развивают скорость до 32 тыс. об/мин, используются для сбора **вирусов из лизатов** большого объема. Проточные роторы выпускаются фирмой Beckman (США) и используются в медицинских и микробиологических лабораториях.

Дифференциальное центрифугирование

Принцип метода: разделение частиц примерно одной плотности осуществляется с помощью седиментации по их размерам. Необходимо подобрать **время и скорость вращения** для осуществления ступенчатого (дифференциального) осаждения разделяемых частиц.

Дифференциальное центрифугирование

Схема применения дифференциального
центрифугирования.

Гомогенат

1300g → ↓ → ядро, клеточная стенка

супернатант

3000g → ↓ → осадок (пластиды, вакуоли)

супернатант

10000g → ↓ → митохондрии, микротельца

супернатант

50000g → ↓ → рибосомы

супернатант

Дифференциальное центрифугирование

Для проведения дифференциального центрифугирования необходимо осуществлять следующие операции.

- 1) **Ресуспендирование осадка.** Для этого разбить комочки с помощью гомогенизатора Поттера или стеклянной палочки.
- 2) **Состав среды** – изотоничность обеспечивается использованием плазмолитиков, сахарозы или фикола.

Дифференциальное центрифугирование

3) Идентификация осадка осуществляется с помощью **маркерных ферментов:**

1. Для митохондрий:

сукцинатдегидрогеназа,
фумаратгидратаза, цитохромоксидаза.

2. Для глиоксисом: изоцитратлиаза и малатсинтаза.

3. Для пероксисом: гликолатоксидаза, каталаза, пероксидаза.

4. Для пластид: Rubisco,
глицероальдегидфосфатдегидрогеназа.

Изоплотностное центрифугирование

Принцип метода состоит в создании **такого градиента** по длине пробирки, у которого плотность у **дна** была больше, чем у наиболее **плотных**, а у **мениска** – меньше, чем у **наименее плотных** частиц фракционируемой смеси. При **длительном центрифугировании** частицы **будут двигаться** вдоль градиента, пока не **достигнут**

Изоплотностное центрифугирование

Особенности изоплотностного центрифугирования.

1. Процесс центрифугирования должен быть длительным, т.к. при подходе к положению **равной плотности** частицы будут двигаться замедленно.
2. Вязкость среды вследствие этого является нежелательным фактором.

Изоплотностное центрифугирование

3. Размеры частиц и их масса не скажутся на окончательном распределении. Положение на градиенте определяется только их **плотностью**.
4. Частицы будут двигаться к положению равновесия как из области более низкой плотности градиента, так и из области более высокой плотности. Следовательно, наряду с **седиментацией** может происходить и **флотация**.
5. Частицы будут располагаться в виде полосы, ширина которой определяется соотношением процесса концентрирования за счет

Изоплотностное центрифугирование

1. Создание градиентов: а) ступенчатый; б) плавный (5-25%, 15-30%).
2. Вещества для градиентов (сахароза, глицерин, фикол, перкол, CsCl_2 , CsSO_4 , метризамид – производное бензойной кислоты, NaI , KI и др.).
3. Формирование градиента плотности:
 - а) вручную с помощью пипеток;
 - б) использование специального приспособления для создания линейного градиента.

Изоплотностное центрифугирование

4. Наслоение препарата на градиент.
Осуществляется с помощью пипетки или шприца для создания тонкого слоя.
5. Фракционирование – «раскапывание» градиента.
6. Регистрация и идентификация разделяемых органоидов или молекул:
 - а) ультрафиолет;
 - б) мутность; в) радиоактивность;
 - г) специфические реакции.
7. Схема разделения митохондрий и пероксисом.

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Аналитические центрифуги предназначены для определения физических **характеристик** молекул.

1. Константы седиментации (K_s).
2. Чистоты или гомогенности препаратов.
3. Определение молекулярной массы.

Известны следующие аналитические центрифуги «Спинко», «Фиве»,

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Аналитический **ротор** вращается со скоростью до 65000 об/мин. У всех центрифуг ротор имеет приблизительно одинаковые размеры. Расстояние от оси до середины рабочей ячейки (r) 6,5 см. Роторы имеют **рабочую** и **балансирующую** ячейки.

Центрифужная **ячейка** (пробирка) – полый цилиндр из алюминиевого сплава с $D = 2,5$ см и $L = 4$ см. Внутри цилиндра имеется вставка из кварцевого стекла.

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Для наблюдения за процессом седиментации и регистрацией положения частицы и границы ее оседания применяется специальная **оптическая система**. Принцип ее работы:

1. Степень **абсорбции** (поглощения лучей).
2. Изменение показателя **преломления**.

Для регистрации границ седиментации используется метод скрещенных диафрагм или способ **Филнота-**

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Оптическая система позволяет сразу визуально наблюдать дифференциальные кривые центрифугирования и регистрировать их на фотопластинки.

Интерференционные системы (оптические) удобны для определения молекулярной массы методом седиментационного равновесия

КОНСТАНТА СЕДИМЕНТАЦИИ

K_s – это отношение скорости оседания частицы (u) к скорости вращения ротора ($\omega^2 r$).

$$S = u / \omega^2 r$$

Так как

$$u = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2 (p - p_c) \omega^2 r}{\eta_c},$$

то

$$S = K \cdot \frac{D^2 (p - p_c)}{\eta_c}$$

КОНСТАНТА СЕДИМЕНТАЦИИ

Константа седиментации не зависит от скорости вращения и типа ротора.

Ее величина определяется:

- а) размером центрифугируемой частицы;
- б) плотностью;
- в) плотностью и вязкостью среды центрифугирования.

Определение S необходимо проводить в стационарной среде.

КОНСТАНТА СЕДИМЕНТАЦИИ

В качестве **стандарта** условились брать воду при температуре 20°C.

ρ – плотность и η_c – вязкость воды хорошо известны.

S определяется в стандартной среде.
Константа седиментации данной частицы зависит только от параметров частицы.

Для выражения константы седиментации ввели специальную единицу – **Сведберг (S)**.

1S = 10^{-13} сек. K_s рибосом – 80S, то есть $80 \cdot 10^{-13}$ сек.

16S РНК.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Для расчета молекулярной массы используется **метод Арчибальда**. При установившемся равновесии:

$$M = \frac{RT (d_c/d_x)_m}{(1-V\rho)\omega^2 x_m \cdot c_m}$$

d_c/d_x – градиент концентрации у поверхности и на расстоянии x_m от оси вращения;

c_m – концентрация у мениска; x_m – расстояние до оси вращения; V – парциальный удельный объем;

ρ – плотность растворителя.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧИСТОТЫ ПРЕПАРАТОВ

О чистоте препаратов свидетельствует количество пиков на **седиментационной диаграмме.**

Если имеется несколько пиков, то препарат содержит несколько высокомолекулярных веществ.

Один пик свидетельствует о **гомогенности** центрифугируемого препарата. Необходимым требованием для гомогенного препарата является **симметричность пика.**