

# Frakcionace buněk

Frakcionace buňky je metoda pro **získání částí buňky schopných samostatné funkce**. Používá se pro oddělení organel a makromolekul pro následnou analýzu jejich složení a funkcí. Jednotlivé makromolekuly mohou být poté dále izolovány a analyzovány, např. pro určení proteinové poruchy. Postup frakcionizace se skládá ze dvou částí: **homogenizace buňky** a **purifikace složek**.

## Homogenizace buněk

Homogenizace buněk je proces při kterém dojde k **rozrušení membrány buňky** a **uvolnění buněčných součástí** do roztoku. Můžeme jí dosáhnout několika metodami. Orientačně se rozdělují mezi **hrubé** a **jemné metody**. Jemné metody jsou používány například pro buněčné kultury. Oproti tomu hrubé metody jsou používány pro pevnější struktury, které vyžadují určitou míru mechanického poškození, jako například pojivová nebo kožní tkáň.

### Hrubé metody

#### Kuličková homogenizace

Při této metodě využíváme drobné kovové nebo skleněné kuličky, které se v určitém poměru smísí s buňkami. Následným mícháním nebo třepáním dojde nárazy kuliček k rozdrčení membrán. Metoda je velice jemná, ale bohužel časově náročná.

#### Ultrazvuk

Opakovanými ultrazvukovými rázy dochází k rozdrčení membrán. Nevýhodou této metody je, že generuje vysoké množství tepla, které může poškodit funkci součástí buňky a tím celý postup znehodnotit. Pro izolaci proteinů se proto využívá zmrazený preparát.

#### Vysoký tlak

Při této metodě jsou buňky drceny vysokým tlakem. Příkladem pro to může být protlačování buněk úzkým otvorem při průchodu kterým buňky prasknou. Využít k tomu můžeme například French press ([https://en.wikipedia.org/wiki/French\\_pressure\\_cell\\_press](https://en.wikipedia.org/wiki/French_pressure_cell_press)).

#### Jemné rozmixování

Zmrzlá tkáňová kultura může být rozmixována jemným mixérem, přičemž dojde k mechanickému rozbití buněčné stěny a membrány. Případně můžeme zmrzlý vzorek mechanicky rozemlít.

### Jemné metody

#### Opakované zmrazování a tání

Metoda efektivní zejména pro živočišné buňky. Buňky se opakovaně zmrazují (např. tekutým dusíkem) a nechávají roztát. Jelikož led má větší objem než voda, prorazí při zmrazení krystalky ledu buněčné membrány a uvolní jejich obsah.

#### Enzymatické rozrušení

S použitím enzymů specifických pro každou buněčnou kulturu dojde k natrávení složek buněčné membrány, případně stěny. Často se využívá v kombinaci s jinými metodami. Většinou využívána pro bakterie, kvasinky, *fungi*, *algae* i živočišné buňky.

#### Detergent

S pomocí detergentu dojde k rozpuštění buněčné membrány. Opět se často využívá ve spojení s jinými metodami, aby se dosáhlo požadovaného účinku. Vhodné pro živočišné buňky.

#### Osmotická lýza

V prostředí hypotonického roztoku buňka nasaje vodu, nabobtná a eventuálně dojde k jejímu prasknutí, čím se uvolní její obsah do okolí. Opět vhodná metoda pro živočišné buňky, které nemají buněčnou stěnu.

## Purifikace složek

Hrubou filtrací (např. přes gázu) můžeme oddělit nehomogenizované buňky od zbytku. Pro postupné oddělení složek se používá převážně centrifugace a ultracentrifugace. Na základě **odlišné velikosti a objemu** jednotlivých organel a makromolekul probíhá sedimentace v centrifugách **odlišnou rychlostí**. Díky extrémnímu gravitačnímu přetížení sedimentují i jednotlivé makromolekuly.

**Nejprve sedimentují velké složky** jako třeba buněčná jádra. Při vyšších rychlostech mitochondrie, poté zlomky endoplasmatického retikula. Při vyšších rychlostech a delším čase centrifugace se usadí malé váčky, poté ribozomy a menší částčky. Všechny tyto frakce **nejsou nejprve čisté**, ale oddělením usazeniny, jejím **resuspendováním a opětovnou centrifugací je možné je purifikovat**. Většinou je však nutné celý proces opakovat několikrát.



Buněčný homogenizér Emulsiflex

# Odkazy

## Související články

- Centrifugace

## Externí odkazy

- French press ([https://en.wikipedia.org/wiki/French\\_pressure\\_cell\\_press](https://en.wikipedia.org/wiki/French_pressure_cell_press))

## Použitá literatura

- NINFA, Alexander, David BALLOU a Marilee BENORE. *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*. - vydání. John Wiley & Sons, 2009. 480 s. ISBN 9780470087664.
- ALBERTS, Bruce. *Molecular Biology of the Cell*. - vydání. Garland, 2004. ISBN 9780815332183.
- Geno Technology, Inc. *Cell Disruption Techniques* [online]. [cit. 2020-09-28]. <<https://info.gbiosciences.com/blog/cell-disruption-techniques-sonication-dounce-homogenizer-more>>.