

KUPNÍ SMLOUVA

podle § 2079 a násl. zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, v platném znění (dále jen „OZ“)

1 SMLUVNÍ STRANY

KUPUJÍCÍ:

Masarykova univerzita

Vysokoškolský ústav CEITEC – Středoevropský technologický institut

se sídlem: Kamenice 753/5, 625 00 Brno

IČ: 00216224

DIČ: CZ00216224

zastoupená prof. RNDr. Jaroslavem Kočou, DrSc., ředitelem ústavu

kontaktní osoba (technické záležitosti): doc. Mgr. Štěpánka Vaňáčková, Ph.D.,

tel: 549 49 50 42

PRODÁVAJÍCÍ:

Biologicals s.r.o.

IČ 27575837, DIČ CZ27575837

se sídlem Šrámkova 315, Říčany – Radošovice, 251 01

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném Městským soudem v Praze

v oddílu C, vložce 114592

zástupce: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

kontaktní osoba: Martin Pospíšek, email: info@biologicals.cz, tel: 274776731

bankovní spojení: 434096329/0800

2 UVODNÍ USTANOVENÍ

- 2.1 Kupující je řešitelem projektu s názvem „*CEITEC – středoevropský technologický institut*“ (dále jen „Projekt“) a příjemcem podpory na uvedený projekt z Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace (dále jen „OP VaVpl“). Účelem uvedeného projektu je vybudování evropského centra excelence v oblasti věd o živé přírodě a pokročilých materiálů a technologií.
- 2.2 Prodávající je dodavatel vybraný Kupujícím v rámci výběrového řízení s názvem „*Frakcionátor centrifugačních gradientů pro CEITEC MU*“ konaného podle § 18 odst. 5 zákona č. 137/2006 Sb., o veřejných zakázkách (dále jen „ZVZ“) mimo režim tohoto zákona.
- 2.3 Účelem této Smlouvy (dále jen „Smlouva“) je zabezpečení nezbytného přístrojového vybavení požizovaného v rámci Projektu. Smluvní strany berou na vědomí, že jakékoli, byť jen částečné, neplnění povinností vyplývajících z této Smlouvy, ať už na straně Prodávajícího či Kupujícího, může ohrozit čerpání dotačních prostředků poskytnutých na realizaci předmětu Smlouvy, příp. může vést k udělení sankcí Kupujícímu ze strany

orgánů oprávněných k výkonu kontroly Projektu, v jejichž rámci jsou dotační prostředky poskytovány. Škoda, která může Kupujícímu neplněním povinností vyplývajících z této Smlouvy vzniknout, tak může i přesáhnout sjednanou kupní cenu.

- 2.4 Smluvní strany se zavazují činit veškerá právní jednání mající dopad na závazky vyplývající z této Smlouvy pouze prostřednictvím výše uvedených kontaktních osob. Jednání učiněná prostřednictvím jiných osob jsou právně účinná toliko po oznámení jiných či dalších kontaktních osob druhé straně osobami výše uvedenými.

3 PŘEDMĚT SMLOUVY

- 3.1 Prodávající se zavazuje, že Kupujícímu dodá a odevzdá věc či věci, které jsou předmětem koupě, umožní mu nabýt vlastnické právo k těmto věcem, a že splní další s tím související závazky uvedené ve Smlouvě. Kupující se zavazuje, že věci převezme a zaplatí Prodávajícímu kupní cenu.

- 3.2 Věci se pro účely této Smlouvy rozumí níže uvedená zařízení dodávaná jako celek:

Pol. č.	Název	Typové/výrobní označení	Počet kusů
1.	Frakcionátor centrifugačních gradientů	Gradient station 153 -2 s příslušenstvím	1

- 3.3 Množství, jakost a provedení, jakož i další specifikace a vlastnosti zařízení jsou ujednány v příloze č. 1 Smlouvy.

- 3.4 Závazek Prodávajícího odevzdat věci zahrnuje také

- a) dopravu zařízení na určené místo;
- b) instalaci zařízení v prostorách určených Kupujícím, přičemž instalaci se rozumí usazení zařízení v místě plnění, případně jeho sestavení či propojení a dále napojení zařízení na zdroje, zejména připojení k elektrickým rozvodům, k slaboproudým a optickým rozvodům, rozvodu vody, demineralizované vody, plynu, technických plynů, tepla, chladu či vzduchotechniky, jsou-li taková napojení pro řádnou funkčnost zařízení nezbytná;
- c) uskutečnění zkušebního provozu za podmínek ujednaných v této Smlouvě;
- d) předání dokladů,
 - které jsou nutné k užívání zařízení, zejména technické dokumentace zařízení, instrukcí a návodů k obsluze i údržbě zařízení (manuálů) v českém nebo anglickém jazyce,
 - které se k zařízení jinak vztahují (prohlášení o shodě dodaného zařízení se schválenými standardy, protokoly o revizích atp.)
- e) zaškolení a seznámení osob určených Kupujícím k obsluze zařízení tak, aby byli schopni zařízení náležitě užívat pro plánované účely;
- f) odvoz a likvidace obalů a dalších materiálů použitých při plnění dodávky, v souladu s ustanoveními zákona 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, a příslušnou vyhláškou Města Brna;

- 3.5 Prodávající prohlašuje, že

- a) je výlučným vlastníkem zařízení,

- b) dodávané zařízení je nové, tzn. nikoli dříve použité;
- c) dodávané věci odpovídají této Smlouvě, tzn. že mají vlastnosti, které si strany ujednaly, a chybí-li ujednání, takové vlastnosti, které Prodávající nebo výrobce popsal nebo které Kupující očekával s ohledem na povahu věcí a na základě obchodní prezentace jimi prováděné, že se hodí k účelu vyplývajícímu z této Smlouvy, že jsou v odpovídajícím množství, že vyhovují požadavkům právních předpisů a že jsou bez jakýchkoliv jiných vad, a to i právních, zejména na něm neváznou zástavy ani žádná jiná práva třetích osob.
- d) Prodávající bude při plnění této Smlouvy postupovat s náležitou odbornou péčí, v souladu s platnými právními předpisy, touto Smlouvou, jakož i příslušnými technickými normami.
- 3.6 Prodávající odpovídá za to, že dodané zařízení, služby a práce budou provedeny s odbornou péčí a v souladu se všemi platnými právními předpisy, touto Smlouvou i příslušnými přílohami k této Smlouvě a s relevantními technickými a kvalitativními normami.
- 3.7 Kupující předem vylučuje možnost přijetí nabídky (návrhu smlouvy) s dodatky nebo odchylkami ve smyslu § 1740 odst. 3 OZ.

4 KUPNÍ CENA

- 4.1 Kupní cena za splnění závazků Prodávajícího dle této Smlouvy je stanovena na základě nabídky Prodávajícího předložené v rámci předemného výběrového řízení jako cena maximální a nepřekročitelná a činí:

Pol. č.	Název položky	Kupní cena v CZK bez DPH	Výše DPH v CZK	Kupní cena v CZK vč. DPH
1.	Frakcionátor centrifugačních gradientů	825152,89	173282,11	998435,00

- 4.2 Podrobný rozpis kupní ceny resp. jednotlivých položek je uveden v příloze č. 2 Smlouvy ve formě položkového rozpočtu vycházejícího z podrobné technické specifikace a dalších ujednání této Smlouvy.
- 4.3 Kupní cena je cenou nejvýše přípustnou, kterou není možné překročit. Prodávající prohlašuje, že kupní cena obsahuje jeho veškeré nutné náklady na dodávky a služby nezbytné pro řádné a včasné splnění předmětu smlouvy včetně všech nákladů souvisejících, tj. zejména náklady na pořízení věcí včetně nákladů na jejich výrobu, náklady na dopravu věcí do místa jejich odevzdání, daně, clo a poplatky vč. recyklačních poplatků, náklady na doklady vztahující se k věcem, náklady na likvidaci odpadů vzniklých v souvislosti s odevzdáním věcí při zohlednění veškerých rizik a vlivů, o nichž lze během plnění předmětu smlouvy uvažovat. Prodávající dále prohlašuje, že kupní cena je stanovena i s přihlédnutím k vývoji cen v daném oboru včetně vývoje kurzu české měny k zahraničním měnám až do doby splnění předmětu smlouvy.
- 4.4 Prodávající přebírá nebezpečí změny okolností ve smyslu § 1765 odst. 2 OZ.

- 4.5 Není-li výslovně uvedeno jinak, veškeré ceny v této Smlouvě uvedené se rozumí bez daně z přidané hodnoty (dále také DPH), která bude Prodávajícím účtována dle předpisů platných ke dni uskutečnění zdanitelného plnění.
- 4.6 Kupní cena je doložena položkovým rozpočtem, který je Přílohou č. 2 této Smlouvy. Prodávající ručí za to, že položkový rozpočet je v úplném souladu s obchodními a technickými podmínkami dodávky sjednanými ve Smlouvě. Jednotkové ceny uvedené v položkovém rozpočtu slouží k prokazování finančního objemu dodaného a instalovaného zařízení. Jednotkové ceny uvedené v položkovém rozpočtu jsou ceny nejvýše přípustné po celou dobu realizace dodávky. Prodávající nemá právo domáhat se zvýšení sjednané kupní ceny z důvodů chyb nebo nedostatků v položkovém rozpočtu.
- 4.7 Sjednaná cena dodávky je cenou nejvýše přípustnou. Změna výše ceny je možná pouze v případě, že po uzavření Smlouvy a před termínem předání a převzetí dodávky dojde ke změnám sazeb DPH (je možná výhradně změna výše DPH).

5 PLATEBNÍ PODMÍNKY

- 5.1 Kupující neposkytne Prodávajícímu žádné zálohy.
- 5.2 Kupní cena bude uhrazena po předání a převzetí dodávky, a to na základě daňových dokladů (dále jen faktur) vystavených Prodávajícím. **Fakturačně musí být jednoznačně, na dvou samostatných fakturách, oddělena výše plnění investičního charakteru, včetně k němu se vztahujícímu příslušenství, a výše plnění neinvestičního charakteru nemajícího povahu příslušenství.**
- 5.3 Pokud bude dodávka Prodávajícím předána a Kupujícím převzata bez vad a nedodělků, uhradí Kupující ve lhůtě splatnosti dle bodu 5.4 Smlouvy celou Kupní cenu včetně DPH. Pokud Kupující převezme dodávku, na níž se vyskytují vady či nedodělky, uhradí Kupující ve lhůtě splatnosti dle bodu 5.4 pouze 85 % Kupní ceny a DPH v plné výši, zadržné ve výši 15 % Kupní ceny uhradí Kupující až po odstranění poslední vady a posledního nedodělku uvedeného v protokolu o předání a převzetí, a to ve lhůtě splatnosti dle bodu 5.4 Smlouvy počítané ode dne odstranění poslední vady či nedodělku.
- 5.4 Lhůta splatnosti faktury Prodávajícího je 30 dnů ode dne následujícího po dni doručení faktury do sídla Kupujícího. Lhůta splatnosti zadržného, bude-li Kupujícím v souladu se Smlouvou uplatněno, činí nejvýše 30 dnů ode dne podpisu protokolu o odstranění poslední vady či posledního nedodělku uvedeného v protokolu o předání a převzetí dodávky.
- 5.5 Za doručení faktury se považuje den doručení faktury poštou nebo kurýrní službou do sídla Kupujícího nebo den osobního předání faktury do poštovní evidence Kupujícího. Prodávající zašle neprodleně kopii faktury v elektronické podobě kontaktní osobě Kupujícího emailem.
- 5.6 Faktura Prodávajícího musí mít náležitosti daňového a účetního dokladu, formou a obsahem odpovídat zákonu č. 563/1991 Sb., v platném znění, a zákonu č. 235/2004 Sb., v platném znění. Faktura musí obsahovat zejména:
- a) označení účetního dokladu a jeho pořadové číslo

- b) identifikační údaje Kupujícího včetně DIČ
- c) identifikační údaje Prodávajícího včetně DIČ
- d) náležitosti obchodní listiny
- e) popis obsahu účetního dokladu
- f) informaci o financování z Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace v rámci projektu „CEITEC – středoevropský technologický institut“, reg. číslo projektu CZ.1.05/1.1.00/02.0068
- g) datum vystavení
- h) datum uskutečnění zdanitelného plnění
- i) výši ceny bez daně celkem
- j) sazbu daně
- k) výši daně celkem zaokrouhlenou dle příslušných předpisů
- l) cenu celkem včetně daně
- m) podpis odpovědné osoby Prodávajícího
- n) přílohu - kopii protokolu o předání a převzetí dodávky s podpisem osoby, která za Kupujícího dodávku převzala.

V případě, že faktura nebude obsahovat výše uvedené náležitosti, bude Kupujícím vrácena k opravení bez proplacení. V takovém případě lhůta splatnosti počíná běžet znovu ode dne doručení opravené či nově vyhotovené faktury.

Prodávající je povinen kupujícímu zaslat na emailovou adresu kontaktní osoby Kupujícího – zuzana.lancaricova@ceitec.muni.cz, **elektronickou verzí faktury ve formátu pdf** a následně zaslat originál faktury poštou na adresu CEITEC MU, pavilon A35 Univerzitního kampusu Bohunice, Kamenice 5, 625 00 Brno.

- 5.7 Peněžité závazek (dluh) Kupujícího se považuje za splněný v den, kdy je dlužná částka odepsána z účtu Kupujícího.
- 5.8 V případě, že číslo bankovního účtu Prodávajícího uvedené v této Smlouvě nebo na Prodávajícím vystavených fakturách nebude uveřejněno způsobem umožňujícím dálkový přístup ve smyslu ustanovení § 109 odst. 2 písm. c) zákona č. 235/2004 Sb., o dani z přidané hodnoty, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „ZDPH“), je Kupující oprávněn uhradit Prodávajícímu pouze tu část peněžitého závazku vyplývajícího z faktury, jež odpovídá výši základu daně, a zbylou část pak ve smyslu ust. § 109a ZDPH uhradit přímo správci daně. Stane-li se Prodávající nespolehlivým plátcem ve smyslu ust. § 106a ZDPH, použije se tohoto odstavce obdobně.

6 LHŮTA A MÍSTO PLNĚNÍ

- 6.1 Prodávající se zavazuje splnit svůj závazek dodat a odevzdat věci dle této Smlouvy Kupujícímu **nejpozději do 5 týdnů** od uzavření Smlouvy („Lhůta plnění“).
- 6.2 Prodlení Prodávajícího s lhůtou plnění se považuje za podstatné porušení Smlouvy.

6.3 Prodávající není v prodlení

- a) jestliže dojde k přerušení prací Prodávajícího na základě písemného pokynu Kupujícího, nebo
- b) jestliže dojde k přerušení prací Prodávajícího způsobeného vyšší mocí; o této skutečnosti je Prodávající povinen Kupujícího neprodleně informovat. Smluvní strany jsou povinny se vzájemně informovat o vzniku takové okolnosti a dohodnout způsob jejího řešení, jinak se vyšší mocí nemohou dovolávat.

6.4 Místem plnění jsou místnosti určené Kupujícím v prostorách pavilonu A35 Univerzitního kampusu Bohunice, Kamenice 5, 625 00 Brno.

7 INSTALACE, ZKUŠEBNÍ PROVOZ, PŘEVZETÍ DODÁVKY

Instalace

7.1 Nebude-li dohodnuto jinak, je Kupující povinen nejpozději do tří pracovních dnů po obdržení písemné výzvy Prodávajícího umožnit mu zahájení instalace zařízení předáním vymezeného prostoru k provedení instalace (dále jen Stanoviště), nebude-li mezi Kupujícím a Prodávajícím dohodnut jiný termín. Při předání Stanoviště seznámí Kupující Prodávajícího s následujícími informacemi:

- a) přípustné přístupové cesty pro dopravu zařízení do místa plnění,
- b) body pro napojení zařízení na rozvody elektřiny, tepla, demineralizované vody, vody, vzduchotechniky či jiných médií, jsou-li tyto energie či média k provozu zařízení potřebné, s uvedením maximálně přípustných odběrů v jednotlivých odběrových místech
- c) provozní řád prostor instalace

Prodávající může o tyto informace požádat před předáním Stanoviště – učiní-li tak, sdělí mu je Kupující do tří pracovních dnů po obdržení jeho žádosti.

7.2 Vyžaduje-li to povaha dodávky, bude Prodávající v průběhu přípravy dodávky konzultovat navrhovaná napojení zařízení na technické instalace s Kupujícím. Navržené řešení předloží Prodávající Kupujícímu ke schválení v dostatečném předstihu. Prodávající nesmí zahájit práce na Stanovišti před schválením navrženého řešení Kupujícím, k čemuž si Kupující vyhrazuje lhůtu 3 pracovních dnů.

7.3 Nebude-li dohodnuto jinak, platí, že Prodávající je oprávněn provádět instalaci zařízení v místě plnění každý pracovní den v době od 9.00 hod do 17.00 hodin. Kupující je oprávněn v případě změny svých provozních podmínek tuto dobu omezit nebo změnit písemným pokynem Prodávajícímu.

Zkušební provoz

7.4 Nebude-li dohodnuto jinak, je Prodávající povinen písemně oznámit Kupujícímu nejpozději 3 pracovní dny předem, že dodávka bude v daném termínu připravena

k zahájení zkušebního provozu v délce nejméně 2 hodin za účelem ověření funkčnosti zařízení a naplnění všech požadavků Kupujícího na předmět dodávky.

- 7.5 Zjevné vady či nedostatky zjištěné v průběhu zkušebního provozu je Prodávající povinen neprodleně odstranit. Po odstranění vady či nedostatku je zkušební provoz zahajován znovu od počátku. To neplatí v případě drobných vad či nedodělků zásadně nebránících řádnému užívání věci; v takovém případě může Kupující přistoupit k převzetí dodávky i s takovými vadami či nedodělkami.

Převzetí dodávky

- 7.6 Řádně nainstalované a odzkoušené zařízení může být Prodávajícím odevzdáno Kupujícímu k převzetí. Pro tyto účely předá Prodávající Kupujícímu Protokol o předání a převzetí, jehož vzor je přílohou č. 3 této Smlouvy. Současně Prodávající Kupujícímu předá doklady nutné k užívání zařízení a doklady, které se k zařízení jinak vztahují.

Protokol o předání a převzetí dodávky musí povinně obsahovat zejména:

- a) identifikační údaje o Prodávajícím, Kupujícím, případně subdodavatelích
- b) popis dodávky, která je předmětem předání a převzetí
- c) termín, od kterého počíná běžet záruční lhůta
- d) prohlášení Kupujícího, zda dodávku přijímá nebo nepřijímá
- e) datum podpisu protokolu o předání a převzetí věci (toto datum je současně datem uskutečnění zdanitelného plnění ve smyslu zákona o dani z přidané hodnoty)

- 7.7 Kupující je povinen zahájit převzetí dodávky bez zbytečných odkladů a dokončit jej nejpozději do 10 pracovních dnů. Tuto skutečnost osvědčí podepsáním Protokolu o předání a převzetí.
- 7.8 Teprve převzetím dodávky stvrzeným podpisem Kupujícího na předávacím protokolu, přechází na Kupujícího vlastnické právo a nebezpečí vzniku škody na předané dodávce, přičemž tato skutečnost nezavazuje Prodávajícího odpovědnosti za škody vzniklé v důsledku vad dodávky. Do doby předání a převzetí dodávky nese nebezpečí vzniku škody na dodávce Prodávající.
- 7.9 Kupující není povinen převzít dodávku, která vykazuje vady a nedodělky, byť by samy o sobě ani ve spojení s jinými nebránily řádnému užívání dodávky. Nevyužije-li Kupující svého práva nepřevzít dodávku vykazující vady a nedodělky, uvedou Kupující a Prodávající v protokolu o předání a převzetí soupis těchto vad a nedodělků včetně způsobu a termínu jejich odstranění. Nedojde-li v protokolu k dohodě Kupujícího a Prodávajícího o termínu odstranění, musí být vady a nedodělky odstraněny do deseti pracovních dnů ode dne předání a převzetí dodávky.

8 DALŠÍ DODACÍ PODMÍNKY

Pokyny Kupujícího

- 8.1 Při plnění předmětu Smlouvy postupuje Prodávající samostatně. Prodávající se však zavazuje respektovat veškeré pokyny Kupujícího, týkající se plnění předmětu smlouvy a upozorňující na možné porušování smluvních povinností Prodávajícího.

- 8.2 Prodávající je povinen upozornit Kupujícího bezodkladně na nevhodnou povahu věcí převzatých od Kupujícího nebo pokynů daných mu Kupujícím k provedení předmětu smlouvy, jestliže Prodávající mohl tuto nevhodnost zjistit při vynaložení odborné péče.

Použité materiály a výrobky

- 8.3 Věci, které jsou potřebné k provedení dodávky, je povinen opatřit Prodávající, pokud v této Smlouvě není výslovně uvedeno, že je opatří Kupující.
- 8.4 Prodávající se zavazuje, že k realizaci dodávky použije výhradně nové (nikoli již dříve použité, byť i repasované) součásti a materiály. Prodávající se zavazuje a ručí za to, že při realizaci dodávky nepoužije žádný materiál, o kterém je v době jeho užití známo, že je škodlivý nebo nespĺňuje hygienické či ekologické parametry. Stejně tak se Prodávající zavazuje, že k realizaci dodávky nepoužije materiály a dodávky, které nemají požadovanou certifikaci, je-li pro jejich použití certifikace nezbytná podle příslušných předpisů. Pokud Prodávající uvedené závazky nedodrží, je povinen na písemné vyzvání Kupujícího provést okamžitě nápravu a veškeré náklady s tím spojené nese Prodávající.

Kontrola provádění předmětu smlouvy

- 8.5 Kupující je oprávněn kontrolovat provádění předmětu smlouvy. Provádění v rozporu s povinnostmi Prodávajícího dle této Smlouvy bude považováno za podstatné porušení Smlouvy. Zjistí-li Kupující, že Prodávající provádí předmět smlouvy v rozporu se svými povinnostmi, je Kupující oprávněn dožadovat se toho, aby Prodávající odstranil vady vzniklé z takového postupu a předmět smlouvy prováděl dále řádným způsobem nebo je oprávněn z téhož důvodu od Smlouvy odstoupit.

Bezpečnost a ochrana zdraví při práci

- 8.6 Prodávající je povinen zajistit při provádění dodávky dodržení veškerých bezpečnostních, hygienických a ekologických opatření a opatření vedoucích k požární ochraně prováděné dodávky a objektů, v nichž je dodávka plněna, a to v rozsahu a způsobem stanoveným příslušnými předpisy.
- 8.7 Prodávající je povinen provést pro všechny své zaměstnance pracující na instalaci a zkouškách dodávky na místě plnění vstupní školení o bezpečnosti a ochraně zdraví při práci a o požární ochraně. Prodávající je rovněž povinen průběžně znalosti svých zaměstnanců o bezpečnosti a ochraně zdraví při práci a o požární ochraně obnovovat a kontrolovat.
- 8.8 Prodávající je povinen zabezpečit provedení vstupního školení o bezpečnosti a ochraně zdraví při práci a o požární ochraně i u svých subdodavatelů.
- 8.9 Prodávající v plné míře zodpovídá za bezpečnost a ochranu zdraví všech osob, které se s jeho vědomím zdržují na Stanovišti, a je povinen zabezpečit jejich vybavení ochrannými pracovními pomůckami.
- 8.10 Prodávající je povinen provádět v průběhu provádění dodávky vlastní dozor a soustavnou kontrolu nad bezpečností práce a požární ochranou.
- 8.11 Dojde-li k jakémukoliv úrazu při provádění dodávky na místě plnění nebo při činnostech souvisejících s prováděním dodávky na místě plnění, je Prodávající

povinen zabezpečit vyšetření úrazu a sepsání příslušného záznamu. Kupující je povinen poskytnout Prodávajícímu nezbytnou součinnost.

Škody

- 8.12 Pokud činností Prodávajícího dojde ke způsobení škody Kupujícímu nebo třetím osobám z titulu opomenutí, nedbalosti nebo neplněním podmínek vyplývajících z právních předpisů, technických nebo jiných norem vyplývajících z této Smlouvy, je Prodávající povinen bezodkladně tuto škodu odstranit a není-li možné, tak nahradit v penězích. Veškeré náklady s tím spojené nese Prodávající.
- 8.13 Prodávající odpovídá i za škodu způsobenou činností těch, kteří pro něj dodávku provádějí.

Možnost pověřit realizací části dodávky jinou osobu

- 8.14 Prodávající je oprávněn pověřit provedením části dodávky třetí osobu (subdodavatele) pouze s předchozím souhlasem Kupujícího. V tomto případě však Prodávající odpovídá za činnost subdodavatele tak, jako by dodávku prováděl sám.
- 8.15 Prodávající je povinen zabezpečit ve svých subdodavatelských smlouvách splnění všech povinností vyplývajících Prodávajícímu ze Smlouvy.

9 ZÁRUKA ZA JAKOST

- 9.1 Prodávající odpovídá za vady zjištěné v záruční době, která činí **24 měsíců**.
- 9.2 Prodávající je odpovědný za to, že po celou Záruční dobu bude mít zařízení vlastnosti sjednané touto Smlouvou, zejména vlastnosti vymíněné v příloze č. 1 Smlouvy.
- 9.3 Záruční doba začíná běžet dnem podpisu protokolu o předání a převzetí dodávky Kupujícím. Je-li dodávka Kupujícím převzata s alespoň jednou drobnou vadou či nedodělkem, počíná záruční doba běžet až dnem odstranění poslední vady či nedodělku.
- 9.4 V případě rozporu mezi záruční dobou stanovenou v této Smlouvě a záruční dobou uvedenou v samostatných záručních listech či prohlášeních o záruce vztahujících se k dílčím částem dodávané věci, platí vždy záruční doba delší.
- 9.5 Prodávající je povinen v průběhu záruční doby provádět bezplatně veškeré servisní úkony, jejichž provedením podmiňuje platnost záruky. Prodávající je dále povinen v průběhu záruční doby uskutečnit na základě písemné výzvy Kupujícího nejméně jednou ročně bezplatnou servisní prohlídku všech dodaných zařízení, při níž provede základní servisní úkony, zejména seřízení zařízení.
- 9.6 Požadavek na odstranění vad dodávky, které se projeví v záruční době, Kupující uplatní u Prodávajícího bezodkladně po jejich zjištění, nejpozději poslední den záruční doby, a to písemným oznámením doručeným k rukám odpovědného zástupce Prodávajícího (reklamací). I reklamace odeslaná Kupujícím poslední den záruční doby se považuje za včas uplatněnou. V písemné reklamaci Kupující uvede popis vady nebo informaci o tom, jak se vada projevuje, a způsob, jakým ji požaduje odstranit.
- 9.7 Kupující je oprávněn požadovat
- a) odstranění vady opravou, je-li vada tímto způsobem odstranitelná,

- b) odstranění vady dodáním nového plnění, není-li vada opravou odstranitelná,
- c) přiměřenou slevu ze sjednané ceny,
- d) odstoupením od Smlouvy.

9.8 Kupující je oprávněn vybrat si ten způsob odstranění vady, který mu nejlépe vyhovuje. V případě, že stejná vada vznikne v průběhu záruční doby nejméně potřetí či vznikne-li na dodávce v průběhu záruční doby více než pět vad, má Kupující právo požadovat odstranění vady dodáním nového plnění nebo odstoupit od Smlouvy, i když je poslední vzniklá vada odstranitelná opravou.

9.9 Prodávající se zavazuje reklamované vady dodávky bezplatně odstranit.

9.10 Prodávající se dále zavazuje vyslat svého servisního technika k odstranění vady tak, aby se k zařízení **dostavil nejpozději do 7 pracovních dnů** od doručení reklamace. Prodávající je v této souvislosti povinen mít k dispozici nejméně dva kvalifikované servisní techniky oprávněné k provádění oprav všech dodaných přístrojů. Neodstraní-li servisní technik Prodávajícího reklamovanou vadu při této návštěvě, zavazuje se Prodávající prověřit reklamaci, oznámit Kupujícímu do 2 pracovních dnů, zda reklamaci uznává a dohodnout termín odstranění závady (termín pro odstranění vady bude vždy dohodnut písemně). Pokud tak Prodávající v uvedené lhůtě neučiní, má se zato, že reklamaci uznává a odstraní ji nejpozději ve lhůtě uvedené v bodě 9.11 Smlouvy.

I v případech, kdy Prodávající reklamaci neuzná, je Prodávající povinen vadu odstranit - v takovém případě Prodávající písemně Kupujícího upozorní, že vzhledem k neuznání reklamace se bude domáhat úhrady nákladů na odstranění vady od Kupujícího. V případě, že Prodávající reklamaci neuzná, bude oprávněnost reklamace ověřena znaleckým posudkem, který obstará Kupující. V případě, že reklamace bude tímto znaleckým posudkem označena jako oprávněná, ponese Prodávající i náklady na vyhotovení znaleckého posudku. Právo Kupujícího na bezplatné odstranění vady i v tomto případě vzniká dnem doručení reklamace Prodávajícímu. Prokáže-li se, že Kupující reklamoval neoprávněně, je Kupující povinen uhradit Prodávajícímu prokazatelně a účelně vynaložené náklady na odstranění vady.

9.11 Maximální termín pro odstranění vady je **20 pracovních dnů** ode dne doručení reklamace, nebylo-li mezi Prodávajícím a Kupujícím dohodnuto jinak. O odstranění reklamované vady sepíše Prodávající a Kupující protokol, ve kterém potvrdí odstranění vady. O dobu, která uplynula mezi uplatněním reklamace a odstraněním vady, se záruční doba prodlužuje.

9.12 Byly-li použity podle Smlouvy při výrobě zařízení věci předané Kupujícím, neodpovídá Prodávající za vady zařízení, které byly způsobeny použitím těchto věcí, jestliže Prodávající při vynaložení odborné péče nemohl odhalit nevhodnost těchto věcí pro výrobu zařízení nebo na ni Kupujícího upozornil, avšak Kupující písemně trval na jejich použití.

9.13 Poskytnuté záruky se dále nevztahují na vady způsobené neodborným zacházením, nesprávnou nebo nevhodnou údržbou, nebo nedodržením předpisů výrobců pro provoz a údržbu zařízení, které Kupující od Prodávajícího převzal při převímce (např. záruční listy) nebo o kterých Prodávající Kupujícího písemně poučil. Záruka se rovněž nevztahuje na vady způsobené hrubou nedbalostí, nebo úmyslným jednáním.

- 9.14 V případě, že Prodávající neodstraní vadu ve sjednané lhůtě nebo – nebyla-li tato lhůta sjednána – ve lhůtě dle bodu 9.11 Smlouvy nebo pokud Prodávající odmítne vadu odstranit, je Kupující oprávněn vadu odstranit na své náklady a Prodávající je povinen Kupujícímu uhradit náklady vynaložené na odstranění vady, a to do 21 dnů ode dne jejich písemného uplatnění u Prodávajícího. V případě, že Prodávající náklady vynaložené na odstranění v uvedeném termínu Kupujícímu neuhradí, je Kupující oprávněn použít k zhojení svého nároku zádržné dle této Smlouvy. V případech, kdy ze záručních podmínek vyplývá, že záruční opravy může provádět pouze autorizovaná osoba, nebo kdy neautorizovaný zásah je spojen se ztrátou práv ze záruky, smí Kupující vadu odstranit pouze využitím služeb autorizované osoby.

10 POJIŠTĚNÍ

Prodávající se zavazuje obstarat si nejpozději do převzetí Stanoviště pojištění odpovědnosti za škodu způsobenou při výkonu své podnikatelské činnosti, kryjící případné škody způsobené při provádění dodávky Kupujícímu či třetím osobám po celou dobu provádění dodávky. Prodávající se zavazuje udržovat zmíněné pojištění v platnosti po celou dobu provádění dodávky. Nesplnění tohoto závazku je podstatným porušením Smlouvy.

11 POZÁRUČNÍ SERVIS

- 11.1 Prodávající je povinen minimálně po dobu 5 let ode dne uplynutí posledního dne záruční lhůty zabezpečit na výzvu Kupujícího za úplatu pozáruční servis. Ujednání čl. 9 této Smlouvy o odstraňování vad a odpovědnosti za jejich neodstranění se pro účely pozáručního servisu použijí obdobně.
- 11.2 Prodávající se zavazuje, že hodinová sazba za návštěvu servisního technika odstraňujícího závadu zařízení v rámci pozáručního servisu nepřekročí částku 1 300,- Kč bez DPH za hodinu upravenou v závislosti na meziroční změně míry inflace dle údajů Českého statistického ústavu. Jiné náklady za poskytování pozáručního servisu (doprava, ubytování, stravné atp.) nebudou účtovány; to se netýká ceny náhradních dílů.
- 11.3 Prodávající se zavazuje, v rámci pozáručního servisu zajistí Kupujícímu za úplatu náhradní díly pořízovaného zařízení. V případě porušení tohoto závazku se Prodávající zavazuje na své náklady zajistit pro Kupujícího jiné funkční zařízení.

12 SMLUVNÍ POKUTY A NÁHRADA ŠKODY

- 12.1 Pokud bude Prodávající v prodlení proti sjednané lhůtě k plnění, je Kupující oprávněn účtovat Prodávajícímu smluvní pokutu ve výši 0,05% z Kupní ceny (včetně DPH) za každý i započatý den prodlení.
- 12.2 Pokud prodlení Prodávajícího přesáhne čtrnáct dnů, je Kupující oprávněn Prodávajícímu účtovat ještě další smluvní pokutu ve výši 0,1% z Kupní ceny (včetně DPH) za patnáctý a každý další i započatý den prodlení.

- 12.3 Pokud Prodávající neodstraní vadu či nedodělek uvedený v Protokolu o předání a převzetí dodávky ve sjednaném termínu nebo do pěti kalendářních dnů od převzetí dodávky, není-li termín odstranění vady či nedodělku v protokolu uveden, je Kupujícím oprávněn Prodávajícímu účtovat smluvní pokutu ve výši 0,01 % z Kupní ceny za každou vadu či nedodělek, u nichž je v prodlení za každý den prodlení.
- 12.4 Pokud Prodávající neodstraní reklamovanou vadu ve sjednané lhůtě nebo – nebyla-li tato lhůta sjednána – ve lhůtě dle bodu 9.11 Smlouvy, je Kupujícím oprávněn účtovat Prodávajícímu smluvní pokutu ve výši 0,01 % z kupní ceny za každou reklamovanou vadu, u níž je Prodávající v prodlení, za každý den prodlení.
- 12.5 Pokud Prodávající odmítne za úplatu odstranit poruchu zařízení, která vznikne během pěti let po uplynutí záruční lhůty, ve sjednaném termínu a nebo do deseti pracovních dnů ode dne obdržení požadavku na odstranění poruchy, nebyl-li pro odstranění vady mezi Kupujícím a Prodávajícím termín dohodnut, je Kupujícím oprávněn účtovat Prodávajícímu smluvní pokutu ve výši 0,01 % z Kupní ceny za každou poruchu, s jejímž odstraněním je Prodávající v prodlení, a to za každý den prodlení.
- 12.6 Pokud bude Kupujícím v prodlení s úhradou faktury proti sjednanému termínu a neprokáže, že toto prodlení bylo způsobeno opožděným uvolněním prostředků státního rozpočtu, je Prodávající oprávněn účtovat Kupujícím úrok z prodlení ve výši 0,05% z dlužné částky za každý i započatý den prodlení.
- 12.7 V případě, že Prodávající poruší závažným způsobem předpisy BOZP nebo provozní řád a jiné instrukce Kupujícího, je Kupujícím oprávněn účtovat Prodávajícímu smluvní pokutu ve výši:
- a) 5.000,- Kč pokud bylo nutno zastavit práce z důvodu přímého ohrožení životů pracovníků (např. závady na zdvihacích zařízeních, životu nebezpečné elektrické instalace apod.) nebo pokud Prodávající poškozuje zařízení sloužící k zajištění bezpečnosti (odstranění zábradlí, krytů otvorů apod.);
 - b) 2.000,- Kč pokud je možno závadu odstranit bez zastavení prací ihned nebo ve stanoveném termínu;
 - c) 500,- Kč za každé jednotlivé porušení předpisů BOZP nebo provozního řádu pracovníkem Prodávajícího (např. nepoužívání předepsaných osobních ochranných prostředků apod.);
 - d) 2.000,- Kč za každý započatý den prodlení s odstraněním závady ohrožující bezpečnost práce počínaje dnem upozornění na závadu až do jejího odstranění.
- 12.8 Smluvní pokuty se stávají splatnými dnem následujícím po dni, ve kterém na ně vznikl nárok.
- 12.9 Strana povinná je povinna uhradit vyúčtované pokuty nejpozději do 14 dnů od dne obdržení příslušného vyúčtování. Stejná lhůta se vztahuje i na úhradu úroků z prodlení.
- 12.10 Zaplacením sankce (smluvní pokuty) není dotčen nárok Kupujícího na náhradu škody způsobené mu porušením povinnosti Prodávajícího, na niž se sankce vztahuje.

13 UKONČENÍ SMLUVNÍHO VZTAHU

- 13.1 Smluvní vztah založený touto Smlouvou může být ukončen splněním, dohodou Smluvních stran nebo odstoupením.
- 13.2 Kupující je kromě zákonných důvodů oprávněn od Smlouvy odstoupit také v případě
- že proti majetku Prodávajícího bude vedeno insolvenční řízení,
 - že dojde k nepodstatnému porušení povinností uložených Prodávajícímu Smlouvou, které Prodávající v dodatečně poskytnuté lhůtě neodstraní,
 - že Prodávající nebude opakovaně, tzn. minimálně dvakrát, respektovat pokyny Kupujícího,
 - že bude pozastaveno nebo ukončeno poskytování finančních prostředků určených ke krytí výdajů plynoucích z realizace Projektu, případně tyto výdaje budou poskytovatelem dotace označeny za nezpůsobilé,
 - že Prodávající uvedl v nabídce informace nebo doklady, které neodpovídají skutečnosti a měly nebo mohly mít vliv na výsledek zadávacího řízení.
- 13.3 V případě částečného odstoupení od této Smlouvy se závazky od počátku zrušují pouze v rozsahu, který odpovídá částečnému plnění, k němuž se odstoupení od Smlouvy vztahuje. Ve zbývajícím rozsahu nejsou závazky smluvních stran částečným odstoupením od Smlouvy dotčeny.
- 13.4 Účinnost odstoupení od Smlouvy nastává doručením písemného oznámení o odstoupení druhé smluvní straně.

14 ZMĚNY SMLOUVY

- 14.1 Tuto Smlouvu lze měnit nebo doplnit pouze písemnými průběžně číslovanými smluvními dodatky, jež musí být jako takové označeny a platně signovány oběma smluvními stranami.
- 14.2 Předloží-li některá ze smluvních stran návrh dodatku ke Smlouvě, je druhá smluvní strana povinna se k návrhu vyjádřit do patnácti dnů ode dne následujícího po doručení návrhu dodatku.
- 14.3 Prodávající je oprávněn převést svoje práva a povinnosti z této Smlouvy na jinou osobu pouze s předchozím písemným souhlasem Kupujícího.
- 14.4 Pouze to, co se uvozuje nebo k čemu se dodává „nebude-li mezi Prodávajícím a Kupujícím dohodnuto jinak“, může být smluvními stranami dohodnuto i ústně. To platí, jen pokud Kupující nebude pro takovou dohodu vyžadovat písemnou formu. Má se za to, že osobami oprávněnými k takové dohodě za smluvní strany jsou i jejich kontaktní osoby.

15 ZÁVĚREČNÁ UJEDNÁNÍ

- 15.1 Prodávající se za podmínek stanovených touto Smlouvou, v souladu s pokyny Kupujícího a při vynaložení veškeré potřebné odborné péče, zavazuje:

- a) archivovat veškeré písemnosti zhotovené pro plnění zakázky podle této Smlouvy a kdykoli po tuto dobu Kupujícímu umožnit přístup k těmto archivovaným písemnostem, a to do 31. 12. 2025. Kupující je oprávněn po uplynutí deseti let od ukončení plnění podle této Smlouvy od Prodávajícího výše uvedené dokumenty bezplatně převzít;
- b) jako osoba povinná dle § 2 písm. e) zákona č. 320/2001 Sb., o finanční kontrole ve veřejné správě, ve znění pozdějších předpisů, spolupůsobit při výkonu finanční kontroly, mj. umožnit řídicímu orgánu operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace přístup i k těm částem nabídek, smluv a souvisejících dokumentů, které podléhají ochraně podle zvláštních právních předpisů (např. obchodní tajemství, utajované skutečnosti), a to za předpokladu, že budou splněny požadavky kladené právními předpisy (např. zákonem č. 255/2012 Sb., o kontrole (kontrolní řád), ve znění pozdějších předpisů).
- c) ve smlouvách se svými subdodavateli umožnit řídicímu orgánu operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace kontrolu subdodavatelů Prodávajícího v rozsahu dle předchozího bodu.
- d) strpět uveřejnění této Smlouvy včetně případných dodatků Kupujícím.

Prodávající prohlašuje, že obdobně smluvně zaváže také své případné subdodavatele, kteří se na plnění této Smlouvy budou podílet.

- 15.2 Smluvní strany tímto prohlašují, že je jim známa povinnost dodržet požadavky na publicitu v rámci programů strukturálních fondů stanovené v čl. 9 nařízení Komise (ES) č. 1828/2006 a Pravidel pro publicitu v rámci OP VaVpl a to ve všech relevantních dokumentech týkajících se předmětu plnění této Smlouvy.
- 15.3 Prodávající je oprávněn převést svoje práva a povinnosti z této Smlouvy na třetí osobu pouze s předchozím písemným souhlasem Kupujícího; § 1879 OZ se nepoužije.
- 15.4 Kupující je oprávněn převést svoje práva a povinnosti z této Smlouvy na třetí osobu.
- 15.5 Smluvní strany se dohodly, že právní vztahy založené touto Smlouvou se řídí českým právem s výjimkou použití Vídeňské úmluvy o smlouvách o mezinárodní koupi zboží.
- 15.6 Případné rozpory se smluvní strany zavazují řešit dohodou. Teprve nebude-li dosažení dohody mezi nimi možné, bude věc řešena u věcně příslušného soudu dle zákona č. 99/1963 Sb., občanský soudní řád, ve znění pozdějších předpisů, a to u místně příslušného soudu, v jehož obvodu má sídlo Kupující.
- 15.7 Pokud se stane některé ustanovení Smlouvy neplatné nebo neúčinné, nedotýká se to ostatních ustanovení této Smlouvy, která zůstávají platná a účinná. Smluvní strany se v takovém případě zavazují nahradit dohodou ustanovení neplatné nebo neúčinné ustanovením platným a účinným, které nejlépe odpovídá původně zamýšlenému účelu ustanovení neplatného nebo neúčinného.
- 15.8 Nedílnou součástí Smlouvy jsou její přílohy, a to
 - příloha č. 1 - podrobná technická specifikace,
 - příloha č. 2 - položkový rozpočet,
 - příloha č. 3 – Vzor Protokolu o předání a převzetí,

- příloha č. 4 - smlouva dle § 51 odst. 6 Zákona (v případě sdružení více osob na straně Prodávajícího)

- 15.9 V případě jakýchkoli nesrovnalostí či kontradikcí mezi zněním Smlouvy a jednotlivými přílohami Smlouvy je rozhodující znění Smlouvy. V případě jakýchkoli nesrovnalostí či kontradikcí mezi zněním jednotlivých příloh Smlouvy je rozhodující znění té přílohy, která je uvedena v tomto článku výše; to se netýká přílohy č. 4.
- 15.10 Tato Smlouva je vyhotovena ve čtyřech stejnopisech, z nichž každý má platnost originálu, každá smluvní strana obdrží po dvou z nich.
- 15.11 Smluvní strany potvrzují, že si tuto Smlouvu před jejím podpisem přečetly a s jejím obsahem souhlasí, že Smlouva představuje úplnou dohodu mezi smluvními stranami a že Smlouva nebyla uzavřena v tísní za nápadně nevýhodných podmínek. Na důkaz toho připojují své podpisy.

Datum: 8.12.2014

Kupující:

Masarykova univerzita

Středoevropský technologický institut

Jméno a příjmení, funkce:

prof. RNDr. Jaroslav Koča, DrSc.

ředitel CEITEC MU

Podpis:



MASARYKOVA UNIVERZITA
Středoevropský technologický institut
Kamionka 753/5, 625 00 Brno

14

Datum: 29.11.2015

Prodávající:


Biologicals s.r.o.

Jméno a příjmení, funkce:

Martin Pospíšek

jednatel

Podpis:



Biologicals s.r.o.
Štávkova 315/9, 201 00 Říčany
IČO: 252 22 00
Zapsáný v obchodním rejstříku

PROTOKOL O PŘEDÁNÍ A PŘEVZETÍ DODÁVKY

sepsaný na základě Kupní smlouvy uzavřené dne mezi smluvními stranami

Kupujícím:

Masarykova univerzita

Vysokoškolský ústav: CEITEC – Středoevropský technologický institut

se sídlem Kamenice 735/5, 625 00

IČ: 00216224

DIČ: CZ00216224

zástupce: prof. RNDr. Jaroslav Koča, DrSc., ředitel ústavu

kontaktní osoba ve věcech technických: doc. Mgr. Štěpánka Vaňáčková, Ph.D.

tel: 549495042

Prodávajícím:

Biologicals s.r.o.

IČ 27575837, DIČ CZ27575837

se sídlem Šrámkova 315, Říčany – Radošovice, 251 01

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném Městským soudem v Praze

v oddílu C, vložce 114592

zástupce: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

kontaktní osoba: Martin Pospíšek, email: info@biologicals.cz, tel: 274776731

bankovní spojení: CS a.s., 434096329/0800

I.

Předmětem předání a převzetí je zařízení/soubor zařízení:

II.

1. Prodávající tímto potvrzuje, že níže uvedeného dne, měsíce a roku odevzdal shora uvedené zařízení Kupujícímu.
2. Prodávající a Kupující potvrzují, že zařízení bylo řádně nainstalováno a že byl uskutečněn zkušební provoz za podmínek stanovených smlouvou s následujícím závěrem:
 - a) Zařízení **nevykazuje zjevné vady či nedodělky**
 - b) Zařízení **vykazuje následující drobné vady a nedodělky zásadně nebránící řádnému užívání:**
 -
 -
3. Prodávající a Kupující se dohodli na odstranění uvedených drobných vad a nedodělků do:
4. Kupující potvrzuje, že mu byly předány následující doklady nutné k užívání zařízení a doklady, které se k zařízení jinak vztahují:
 - prohlášení o shodě všech dodaných zařízení se schválenými standardy,

- návody k obsluze a údržbě, podmínky pro údržbu a ochranu zařízení v českém a anglickém jazyce,
-

III.

Kupující tímto prohlašuje, že odevzdané zařízení **p ř e v z a l**

IV.

Podpisem tohoto protokolu Kupujícím na něj přechází vlastnické právo k odevzdanému zařízení, jakož i nebezpečí vzniku škody na něm.

V.

Tento protokol je vyhotoven ve dvou vyhotoveních, kdy každá strana obdrží po jednom vyhotovení.

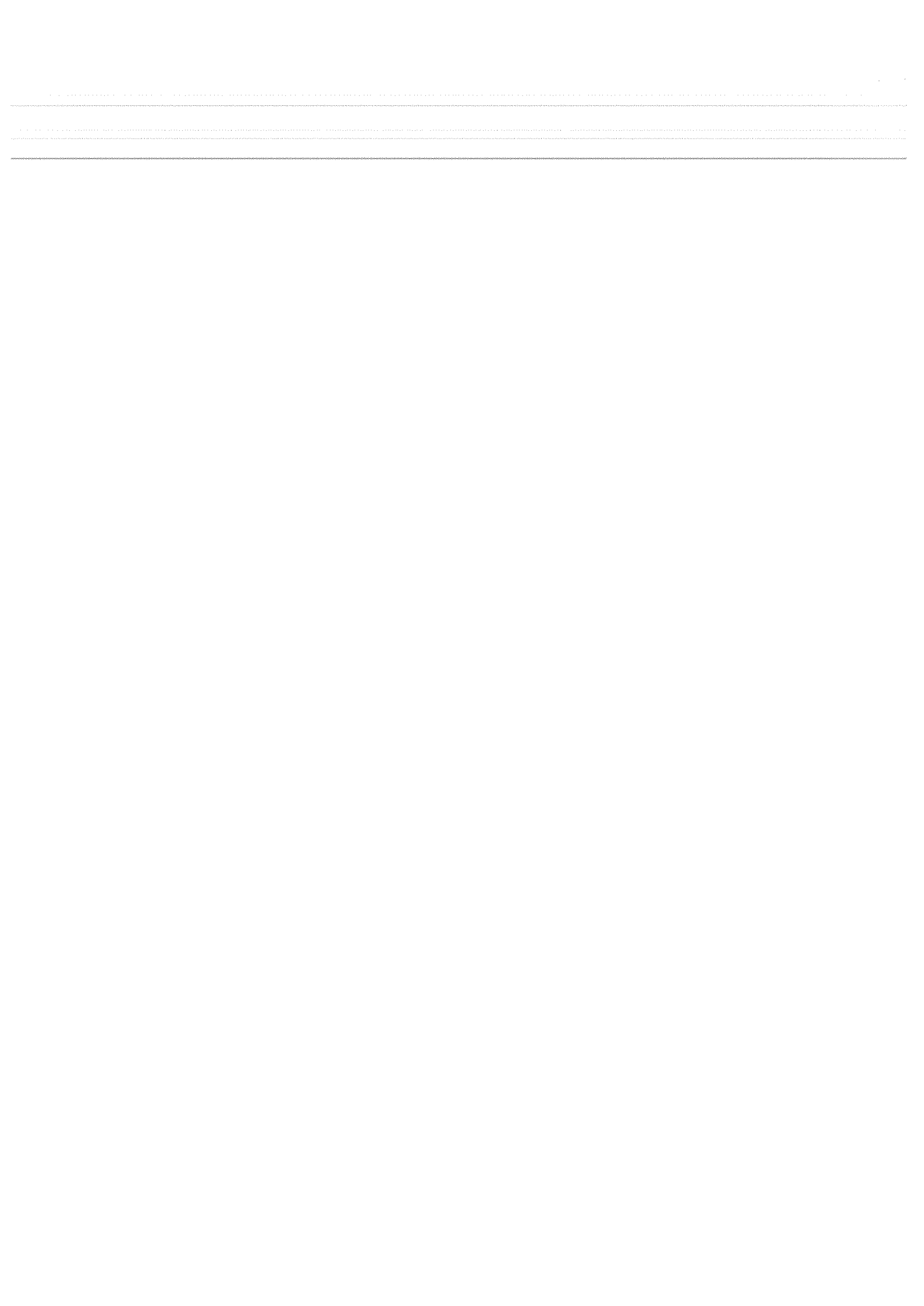
V Brně dne

.....

Za Prodávajícího

.....

Za Kupujícího



Příloha č. 1 - Technické podmínky

Frakcionátor gradientů

Typové označení přístroje

Gradient Station BioComp 153-2 s příslušenstvím

Základní požadavky zadavatele

Požadované technické a funkční vlastnosti <i>(nabídky uchazečů musí splňovat všechny níže uvedené parametry. U hodnocených parametrů musí nabídka vyhovět alespoň stanovené požadované úrovni)</i>	Požadovaná hodnota	Nabídka uchazeče <i>(Pokud je zadavatelem u daného parametru požadován číselný údaj, je ho uchazeč povinen uvést, v opačném případě bude zadavatel vycházet z jím minimální stanovené hodnoty - viz. sloupec Požadovaná hodnota, uchazeči uvedou splnění požadovaného parametru ověřitelným způsobem, např. konkrétním odkazem na technické listy, výkresy apod.)</i>
Typ vzorků Pístový frakcionátor gradientů využívající tzv. "Trumpet tip"	různé biomolekuly rozdělené pomocí hustotního gradientu v ultracentrifugačních zkumavkách	Ano. Gradient Station BioComp kat.č. 153-2 s příslušenstvím. Zařízení je určeno pro analýzu biomolekul rozdělených metodou centrifugace v hustotních gradientech. Detailní technická specifikace, vlastnosti a výhody přístroje jsou uvedeny v přiložené dokumentaci.
Umožňuje analýzu naměřených hodnot absorbance vůči vzdálenosti vzorku od menisku (přesná fyzická lokalizace vzorku v gradientu)	ano	ANO
Příslušenství pístového frakcionátoru pro ultracentrifugační zkumavky		ANO
SW 28 ultracentrifugační zkumavky: držák zkumavky, hrot pístu, příslušenství pro uchycení, náhradní hrot pístu	vše pro rozměr zkumavky 1" x 3 1/2" (25x89 mm)	Ano, kat. č. 151-125, sestava pro analýzu gradientů ve zkumavkách SW28 včetně náhradního hrotu a těsnění - viz položkový rozpočet
balení 50ks zkumavek pro SW 28 kompatibilních s frakcionátorem	ano	ANO, balení 50 centrifugačních zkumavek PolyClear
SW 40 a SW 41 ultracentrifugační zkumavky: držák zkumavky, hrot pístu, příslušenství pro uchycení, náhradní hrot pístu	vše pro rozměr zkumavek 9/16" x 3 3/4" (14x95 mm, SW 40) a 9/16" x 3 1/2" (14x89 mm, SW 41)	ANO, kat. č. 151-114A+B, sestava pro analýzu gradientů ve zkumavkách SW40 a SW 41 včetně náhradních hrotů a těsnění - viz položkový rozpočet
balení 50ks zkumavek pro oba rotory (SW 40 a SW 41) kompatibilních s frakcionátorem	ano	Ano, balení 50 centrifugačních zkumavek PolyClear pro každý otvor
SW 55 ultracentrifugační zkumavky: držák zkumavky, hrot pístu, příslušenství pro uchycení, náhradní hrot pístu	vše pro rozměr zkumavky 1/2" x 2" (13x51 mm)	ANO, kat. č. 151-113, sestava pro analýzu gradientů ve zkumavkách SW55 včetně náhradních hrotů a těsnění - viz položkový rozpočet
balení 50ks zkumavek kompatibilních s frakcionátorem pro SW 55	ano	ANO, balení 50 centrifugačních zkumavek PolyClear
Příslušenství pístového frakcionátoru pro odečet a sběr dat		ANO
UV monitor	napojení 220-240V	ANO, 230 V, BioRad EM-1
vlnové délky	254 a 280 nm	ANO, 254 a 280 nm
kabely, konektory a ostatní příslušenství pro napojení na frakcionátor a pro sběr dat	ano	Ano přístroj ke dodáván kompletně vybaven k používání
Sběrač frakcí	napojení 220-240V, programovatelný s LCD monitorem, kabely pro zapojení	Ano sběrač frakcí Gilson Fraction Collector FC-203B s trojcestným ventilem
umožňuje manuální mód sběru frakcí (s možností start, advance a drain)	ano	ANO

sběr frakcí	programovatelný minimálně podle času (0.01-99.99 min.) a počtu kapek	Ano, 0,01-99,99min/frakci; s přesností 0,01 min, další možnosti programování - píky, kapky, manual, kombinace, externí ovládní
3-cestný ventil	ano	ANO
stojan na zkumavky pro sběr frakcí	stojan pro minimálně 50ks mikrozkuavek velikosti 1.5 ml	Ano, stojan Gilson P/N 2704342 pro 60 zkumavek
stojan na zkumavky pro sběr frakcí	stojan pro 96-well mikrotitrační deštičku kompatibilní také s deep- well formátem	Ano, stojan Gilson P/N 170415 pro deštičky s 96 jamkami
sběr digitálních dat včetně vyhodnocovacího softwaru	převodník a software kompatibilní s daným přístrojem, umožňující export dat do formátu vhodného pro Excel, s kabely pro připojení	ANO, A/D převodníks USB připojením + software BioComp Gradient profiler 251, kat. č. 151-252-2, kormě jiného umožňuje analýzu křivek a export do XLS formátu
umožňuje zobrazení dat v reálném čase	ano	ANO
laptop	ano	ANO, PC laptop 64 bit
Přístroj pro nalévání gradientů a příslušenství	součást frakcionátoru	Ano, přístroj je součástí frakcionátoru
přístroj pro tvorbu gradientů	napojení 220-240V, programovatelný pro automatickou tvorbu lineárních gradientů ve všech typech požadovaných zkumavek	Ano, 220-240 V, pro souběžnou automatickou tvorbu šesti gradientů s adaptéry pro SW28, SW40, SW41 a SW55 zkumavky- Přístroj obsahuje předprogramované nejběžnější gradienty- Umožňuje tvorbu vlastních variant gradientů- Zároveň existuje možnost objednání optimalizace tvorby gradientů na zakázku
příslušenství	všechno příslušenství potřebné pro přípravu gradientů ve všech typech požadovaných zkumavek (pro rotory SW 28, SW 40, SW 41 a SW 55), vhodné jak pro zonální tak pro izopyknickou ultracentrifugaci	Ano, součást dodávky jsou držáky MagnaBase™ a uzávěry pro isopyknické a zonální centrifugace ve všech typech zde požadovacých rotorů.
Instalace a základní školení	ano	Ano, součástí dodávky je instalace, zprovoznění přístroje a krátká instruktáž používání přístroje

Prodávající prohlašuje, že dodávka bude vyhovovat všem výše uvedeným požadavkům Kupujícího. Pokud by se v průběhu přípravy a realizace dodávky ukázalo, že ke splnění požadavků Kupujícího dle této přílohy je nezbytné dodání dalších zařízení, součástí či příslušenství nebo provedení dalších služeb či prací, zavazuje se Prodávající dodat tato zařízení a provést tyto práce či služby jako součást plnění dodávky dle smlouvy bez zvýšení Kupní ceny (zmiňené dodávky, práce či služby nebudou mít charakter vícedodávek či víceprací).

Podpis Prodávajícího:

Biologické s.r.o.
Šrámkova 312/9, 251 01 Říčany
Česká republika
IČ: 252 20 12 12, DIČ: CZ 252 20 12 12

Nabídka - položkový rozpočet

číslo

103101/2014

Dodavatel: **Biologicals s.r.o.****molekulární biologie a genetiká**
výzkum, vývoj, výroba, poradenství, prodej
Šrámkova 315/9

251 01 Říčany - Radošovice

IČ: 27575837

DIČ: CZ27575837

zapsána v OR vedeném Městským soudem v Praze,

oddíl C, vložka 114592

č.ú. 434096329 / 0800 Česká spořitelna, a.s.

tel. +420-603979916, fax. +420-323601119

<http://www.biologicals.cz/>

Odběratel: IČ: 00216224

DIČ: CZ00216224

Jméno: Masarykova Univerzita

Adresa: CEITEC - Středoevropský technologický institut

Kamenice 753/5

625 00 Brno

tel.: 549495042

vyřizuje: doc. Mgr. Štěpánka Vaňáčková, Ph.D.

Datum vystavení:

31.10.2014

Datum platnosti:

15.2.2015

Č. výrobku	Výrobek - název	Cena bez DPH za jednotku	Počet jednotek	DPH	Zákl. DPH	Celkem vč. DPH
	GRADIENT STATION					
153-2	Gradient Station Base Unit (100-240V) with user manual, 4" plate. Combines the Piston Gradient Fractionator and the Gradient Master in a single instrument.	399 552 Kč	1	21%	399 551,76	483 457,63
	FRACTIONATOR TUBE HOLDERS					
151-125	Tube holder and piston tip for 1" (25mm) x 3 1/2" centrifuge tubes (SW28/SW32) With a box of 50 1" x 3 1/2" PolyClear™ open top SW28 Ultracentrifuge tubes, retainer cap and cursor, spare piston tip and seal.	51 224 Kč	1	21%	51 224,04	61 981,09
151-114A+B	A complete set of parts for fractionating gradients for the SW40 and SW41 rotors. Includes the tube holder, cap and cursor, 4 piston tips with seals and a box of 50 tubes for each rotor.	53 936 Kč	1	21%	53 935,92	65 262,46
151-113	Tube holder and piston tip for 1/2" (13mm) x 2" centrifuge tubes (SW50.1, etc.) With a box of 50 1/2" x 2" PolyClear™ open top SW50.1 Ultracentrifuge tubes, retainer cap and cursor, 3 spare piston tips and seals.	51 224 Kč	1	21%	51 224,04	61 981,09
	FRACTIONATOR ACCESSORIES & SPARES					
151-252-2	Model 251 Gradient Profiler: USB-based A-D converter and gradient plotting software developed by BioComp. Allows real-time data capture and import in Excel format. Digitizes EM-1 0-1.0V signal and reads out in OD. Requires a PC (not mac). Supplied with a Lenovo 64-bit, Win7 laptop PC (T-400) with the GP software preinstalled	28 837 Kč	1	21%	28 837,08	34 892,87
151-EM1-2	EM-1 Econo UV Monitor, 100-240V V, includes control module, optics module, filters for 254 and 280 nm wavelengths, systém cable 4, fittings kit.	141 689 Kč	1	21%	141 689,16	171 443,88
151-EM1BC	Aluminum bracket to attach the BioRad EM-1 to the fractionator and Luer connectors to join fractionator and flow cell tubing.	7 749 Kč	1	21%	7 748,64	9 375,85
151-203-2	Gilson Fraction FC-203B collector catalog # 171011 100-240V compatible with 3-way diverter valve. SPECIFY VOLTAGE.	133 434 Kč	1	21%	133 433,64	161 454,70
151-203-1.5E	Gilson Fraction FC-203B rack, code 29LE 60 x 1.5 ml eppendorf tubes; Gilson P/N 2704342 (OPTIONAL).	8 856 Kč	1	21%	8 855,64	10 715,32
151-203-96	Gilson Fraction FC-203B rack, code 15 , one 96-well microplate; Gilson P/N 170415 (OPTIONAL).	2 451 Kč	1	21%	2 451,24	2 966,00
	GRADIENT FORMING ATTACHMENTS					
105-925-IR	1" (25mm) MagnaBase™ holder, marker block, 6 Isopycnic caps and 6 rate zonal caps for SW28/SW32 rotors.	12 038 Kč	1	21%	12 038,04	14 566,03
105-914A+B-IR	A complete set of parts for making gradients for both the SW40 and SW41 rotors. Includes tube holder and long and short caps, and two marker blocks.	14 418 Kč	1	21%	14 418,00	17 445,78
105-913-IR	1/2" (13mm) MagnaBase™ holder, marker block, 6 Isopycnic caps and 6 rate zonal caps for SW50.1, SW55 rotors.	11 429 Kč	1	21%	11 429,28	13 829,43
	FREE INSTALLATION & INITIAL TRAINING	0 Kč	1	21%	0,00	0,00
	Sleva 10 %	-91 684 Kč	1	21%	-91 684,00	-110 937,64

Celkem k úhradě
Celkem k úhradě po zaokrouhlení

998 434,50 Kč

998 435,00 Kč

Počet jednotek 15

Rekapitulace

Sazba DPH	Základ	DPH	Celkem
21%	825 152,89 Kč	173 282,11 Kč	998 435,00 Kč

Poznámky

Cena zahrnuje dopravu od výrobce k odběrateli, náklady na celní řízení, clo a další poplatky.

Cena dále zahrnuje sestavení, instalaci a úvodní zaškolení obsluhy a originální dokumentaci.

V ceně elektrozařízení je zahrnut recyklační poplatek REMA Systému (www.remasystem.cz).

V ceně je zahrnut poplatek Systému EKO-KOM pro třídění, recyklaci a využití obalového materiálu.



Digitálně podepsal RNDr
Martin Pospíšek, Ph.D.

DN: c=CZ, o=Biologicals
s.r.o. [IČ 27575837],

ou=1, cn=RNDr Martin
Pospíšek, Ph.D.,

serialNumber=P457871

Datum: 2014.11.01

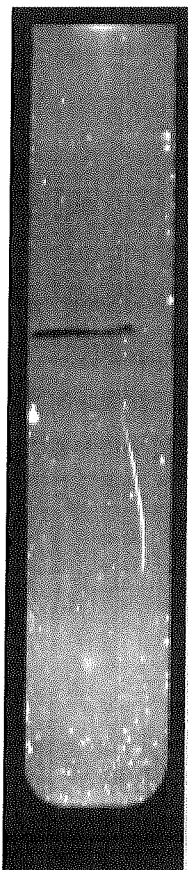
20:03:19 +01'00'

Firma je plátcem DPH

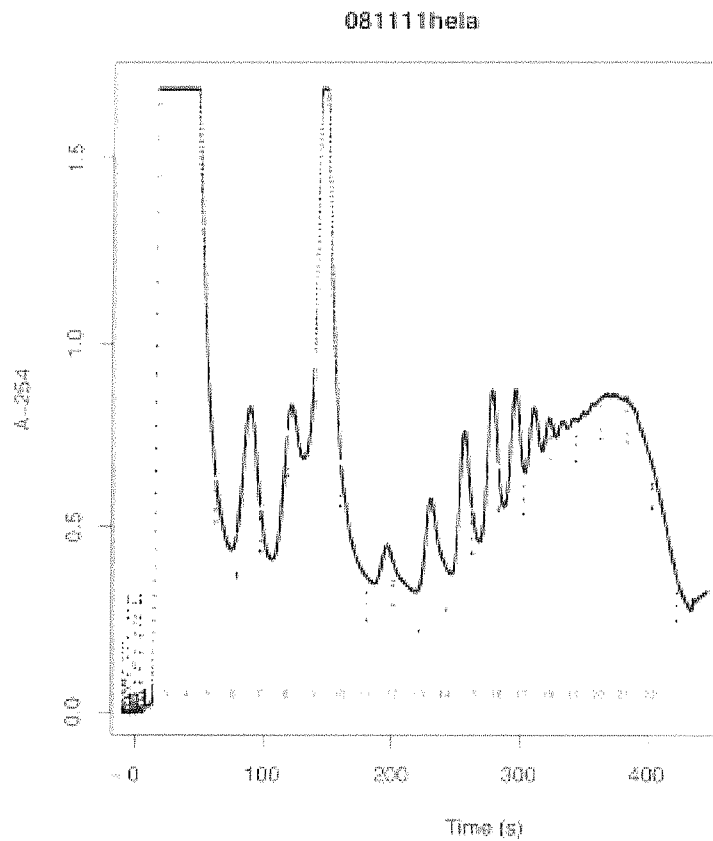
Vystavila: Ing. Klára Pánková

THE BIOCOMP GRADIENT PRIMER

v2.3



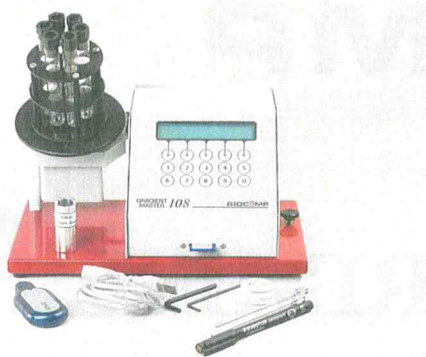
POLYSOME
GRADIENT
→
POLYSOME
PROFILE



by David Coombs, Ph.D.
BioComp Instruments Inc.

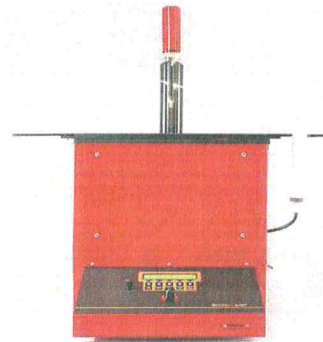
©2010

Gradient Forming



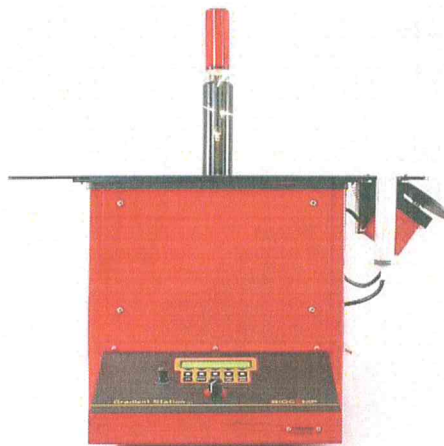
- méně než 2 minuty
- 6 identických gradientů
- pro různé použití - sacharózu, glycerol, Optiprep®, Nycodenz®, Ficoll®, Percoll®, metrizamid, Renografin®, NaCl, CsCl, NaAc nebo KCl

Fractionator



- vyvinut vědci, kteří běžně dělali 6 - 30 gradientů za den
- 6 typů

The Gradient Station



Kombinace Fractionation & Gradient Forming (2 stroje v jednom!)

Detekce UV, vlastní software a gradient list

E-mail: info@biologicals.cz, klara.pankova@biologicals.cz

Tel: +420-274 776 731

Fax: +420-274 773 997

Density Gradient Primer

Contents:

Section 1. Gradient Theory.

- 1.0 The stable liquid column
- 1.1 The choice of solute; density, viscosity, osmolarity
- 1.2 Rate zonal (velocity) vs. Isopycnic (equilibrium) centrifugation

Section 2. Forming density gradients

- 2.0 Step gradients
- 2.1 Non-linear gradients; exponential/isokinetic
- 2.2 Linear gradients (two chambers, freeze thaw, lay it flat)
- 2.3 Tilted tube rotation
- 2.4 Cushions and shelves
- 2.5 Temperature

Section 3. Layering and handling gradients.

- 3.0 Sample preparation
- 3.1 Sample layering for velocity runs
 - 3.1.a. Gradient preparation
 - 3.1.b. The layering device
 - 3.1.c. Sample preparation
 - 3.1.d. Sample layering
- 3.2 Gradient buffers
- 3.3 Sample size, layering and band compression
 - 3.3.a The value of a steep gradient.
- 3.4 Loading the tubes in the rotor, running, unloading

Section 4. Fractionating gradients

- 4.0 The essential problem: Laminar capillary flow
- 4.1 Needles; straight and side hole:
- 4.2 Cones
- 4.3 The Trumpet Tip™
- 4.4 A Comparison of different tip designs
- 4.5 The Piston Fractionator
- 4.6 The highest resolution fractionation ever achieved.
 - 4.6.a. High resolution and reproducibility
 - 4.6.b. Teasing out new species
 - 4.6.c. Resolving small protein complexes
 - 4.6.d. Resolving carbon nanotubes
- 4.7 The band visualization system and manual fractionation
- 4.8 First drop/Reset; synchronizing gradient profiles.
- 4.9 Fraction size
- 4.10 Sampling the bottom of the tube
- 4.11 U.V. fractionation
- 4.12 The rinse/air valve system

Section 5. Post-gradient sample manipulations

- 5.1 TCA/SDS-PAGE
- 5.2 Native gels
- 5.3 Scintillation counting
- 5.4 UV detection

Section 1. Gradient Theory.

1.0 The stable liquid column

Density gradients are marvellous creatures with unlimited potential for separation of biomolecules. They can be of any composition and volume and centrifuged in a variety of modes that can influence the separation. This primer is a modest attempt to explain the use of this time-honored technique at a time when its use has declined in the face of "higher tech" solutions. We will attempt to highlight its continued utility and the multiple advantages it has over other separation techniques.

The most important part of a density gradient is its density gradient. This may sound obvious and trite, but it is widely overlooked. The density gradient is the source of the gradient's stability as well as its capacity for separation. The top of the gradient must be dense enough to support the sample and the column must have enough of a density gradient to remain stable during the centrifugation and fractionation of the tube. Thus, a 15-20% sucrose gradient will be much less stable than a 5-45% gradient.

You can appreciate the need for stability by thinking of the contents of the tube as centrifugation begins and ends. There is a period at both ends of a run when the tube is rotating in a vertical position with centrifugal force applied to its side, and two other periods when this force is gradually transferred to or from the vertical axis of the tube as the bucket begins to swing out at the beginning of the run or down at the end of the run. These are difficult times for the gradient and the only thing that prevents vertical mixing is the steepness of the gradient. Moral: the greater the change in % between the top and bottom of a gradient, the more stable it is. As a general rule, the $\Delta\%$ should be $\geq 20\%$ and as high as 40%.

1.1 The choice of solute; density, viscosity, osmolarity

The choice of solute is dictated by the type of separation desired. Density gradients have been constructed from many solutes in the past 40 years so it might be useful to list some of the more common ones and describe their uses and limitations:

Sucrose: By far and away the most common solute. It is cheap, very soluble, chemically inert and does not absorb in the UV. It has very high osmolarity, so it tends to be unkind to living cells, and at its maximum density is incapable of supporting biomolecules other than lipids, so its use is limited to rate zonal gradients for the most part.

Glycerol: A substitute for sucrose, sharing most of its properties. Used in cases where sucrose is harmful or insoluble in the downstream treatment of fractions.

CsCl (NaCl, KCl, KBr, LiCl): These salt gradients are useful when nucleic acids are banded, since the high solubility and density of some of these solutes can float these dense biomolecules. These gradients lack the viscosity of sucrose gradients and are less stable as a result (handle with care). The denser of these solutes (CsCl and LiCl) will form gradients on their own under centrifugal force, so it is possible to simply mix the salt directly in the sample and let the gradient form during an overnight run. The steepness of the gradient depends on the speed of the rotor (the \times Gs applied to the tube).

K Acetate: Used in velocity banding of DNA/RNA fragments which are recovered from the fractions by adding isopropanol and precipitating the nucleic acid.

Percoll™: Pharmacia introduced Percoll many years ago as a low osmolarity solute suitable for whole cell purification. It is widely used in cell biology. It has one unusual property that has limited its use: It is actually a suspension of tiny silica particles coated with

polyvinylpyrrolidone (PVP) that can not be removed by dialysis. It self-forms gradients under centrifugation.

Nycodenz™: Originally developed as a radio-opaque dye for blood work, this Nycomed (now Axis-Shield) product has seen many years of use in cell purification. It has low osmolarity, is dialysable and its gradients are self-forming.

Optiprep™ (iodixanol): A recent upgrade from Nycomed developed as a radio-opaque dye but currently enjoying robust gradient use, it shares many of Nycodenz's properties and is less toxic in some applications.

Renografin™ (tri-iodinated benzoic acid, also called Angiografin, Hypaque, Renografin, Uroografin, Urovison): An early radio-opaque dye used for density gradients, it is no longer seeing much use, since it had some serious health issues and is difficult to source.

Metrizamide (Amipaque): The earliest radio-opaque dye. Same as Renografin, but with a slightly different chemical structure.

Ficoll™: A high molecular weight sucrose polymer used in some cell separations.

Dextran: A high molecular weight polymer of glucose. See Ficoll.

With so many choices, it is difficult to choose the right medium for the job. Your best bet is to use PubMed and search with the words "gradient" AND "your particle of interest" and see what others have done, i.e. "gradient AND polysomes".

If you are intent on striking out on your own, choose the solute that best matches your needs. If purifying a proteinaceous particle, sucrose or glycerol are usually the solutes of choice. If you want to separate membrane fractions, you can sometimes still use these two solutes, but if the membranes contain more proteins than these solutes can support, then a denser medium is needed and the iodinated compounds are used. Whole cell preparations require the higher density, low osmolarity solutes.

1.2 Rate zonal (velocity) vs. Isopycnic (equilibrium) centrifugation

The kind of gradient you should use depends on the particle of interest and the other particles it is being separated from.

Velocity or **rate zonal** runs separate things on the basis of their mass and to a lesser extent on their density and shape. With these gradients, there is no point in the gradient capable of supporting the density of the particle of interest. Consequently, the particle will continue to sediment through the gradient as long as centrifugal force is applied. Separation is based on a particle's S value (Svedberg units). This type of gradient is used when the particle has a unique S value. Ribosomes (30S, 50S, 70S), phage and virus particles and sub assemblies (15S - 1200S) are typical examples. The separation is exquisitely sensitive to subtle changes in mass, density and shape and can reveal much in the way of a particle's composition, conformation and assembly.

The % sucrose or glycerol used can have a large impact on the separation. For separations of particles with similar S values, a relatively shallow gradient is used (i.e. 5-30%), whereas if the particles have very different S values (120S and 1200S), a steeper gradient is used (i.e. 5-45%). The viscosity of sucrose and glycerol solutions increase exponentially at high concentrations (they become syrupy), and this greatly increases the drag on the faster particles as they enter the bottom half of the gradient, allowing the lower S value particles to continue to separate from the cellular debris in the top half.

Often overlooked is the need for the top of the gradient to support the sample as it is layered on before the run. 5% solute is usually dense enough, but in cases of very concentrated extracts, 10% solute might be needed. Given that steeper gradients are usually better than shallow ones, the lowest % top solute needed will give a higher slope. More on this in the layering section below.

The name “**rate zonal**” derives from the fact that the particles are applied to the top of the gradient as a thin “zone” and migrate through the gradient as distinct zones. Sample size obviously matters here if the zone is to be thin in the first place, hence we have designed the **Short cap (-R)** which leaves 4 mm or room for the sample when it is removed (see below). We have shown that samples less than 3 mm in height as they sit on top of the gradient give essentially the same bands and that steep gradients can actually compress bands as they migrate through the tube (see the data below).

A little known fact about rate zonal gradients is the observation that sample losses become serious as the particles sediment to the bottom of the tube. The source of these losses is unknown, but may involve the collision of the particles with the wall and their subsequent loss from the band. The rule of thumb is to use the top 2/3 of the tube whenever possible for your best separation.

Equilibrium or **isopycnic** runs are a completely different from rate zonal ones. As their name implies, the particles of interest come to rest at their “isopycnic point”, the point in the density gradient that matches their density. No matter how long they are centrifuged after that, they remain in the same position.

Consequently, sample size is irrelevant so long as the gradient contains the isodense (isopycnic) zone capable of floating the particle. Since sample volumes are generally much greater than in rate zonal runs, we have designed a **Long cap (-I, 10 mm)** for our gradient forming system (see below).

Samples can be applied to the top of the gradient or the bottom (in a suitable dense solution) from whence they “float” to their position. They can also be mixed with the solute in the case of self-forming gradients like CsCl and placed in the tube without a gradient being preformed. The speed of the rotor is very important here for it influences the rate at which the particles are driven to their isopycnic point and also because it can also impact on the shape of the gradient.

As noted above, most of the equilibrium density media like CsCl or Optiprep are self-forming, so that if you centrifuge 12-16 hr, a gradient will form at equilibrium with a shape that is dependent on the speed of the rotor: higher speeds yield steeper gradients. Pre-forming density gradients for isopycnic runs drastically reduces the run time, since particles begin to move immediately rather than waiting for the gradient to be established.

Section 2. Forming density gradients

2.0 Step gradients

Step gradients are of very special but limited utility. The goal is to create a series of steps in density that will separate the particle of interest from its undesirable neighbors in a quick and dirty way. For example, if the particle density is 1.12 g/cc, the steps of 1.09 and 1.15 g/cc would trap these particles at the interface between the two steps in the very thin zone where this density exists. The downside is that these gradients are often used to separate membrane fractions when no real classes exist: they take a smear and make it look deceptively good by concentrating into a series of steps.

When layering these gradients, start with the lightest step and underlay the next heavier step to avoid disturbing the step above. Withdraw the needle as you layer, keeping just below the

interface of the two steps.

2.1 Non-linear gradients; exponential/isokinetic

In the 1960's and 70's, there was some interest in these unusual gradients because they matched the increasing rate of sedimentation at higher radii with an exponential increase in solute and viscosity, giving a dead heat: particles sedimented at the same rate over the entire length of the tube. The gradient forming part was very tricky, with the mixing chamber of the two chamber device (see below) sealed off to give a constant volume that the other solution diluted exponentially rather than linearly. The fad seems to have passed.

2.2 Linear gradients (two chambers, freeze thaw, lay it flat)

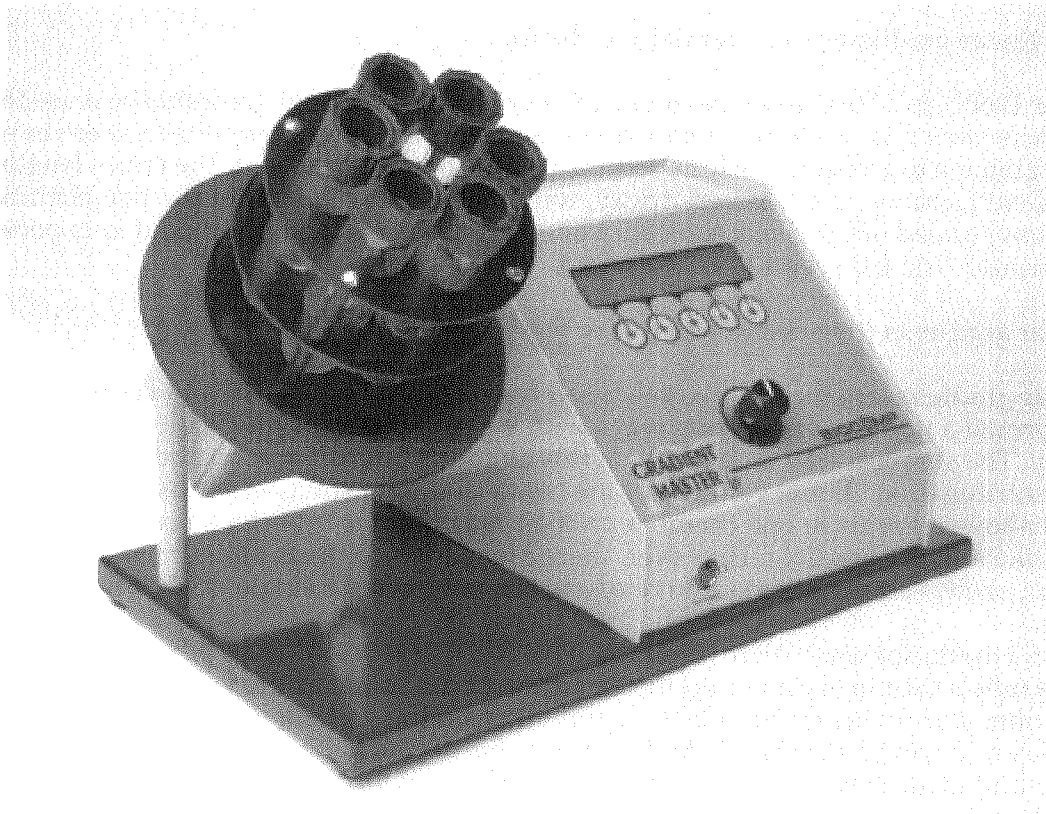
Linear gradients are the most widely used type, both for rate zonal and equilibrium runs. They can be formed a number of different ways with varying degrees of difficulty and reproducibility. The simplest way to make them is with the standard **two-chamber device** in use since the dawn of centrifugation. Equal volumes of the heavy and light solution are placed in adjacent chambers and allowed to mix in one chamber on their way into the tube. Done carefully, this is the best way to make a linear gradient. However, there are many problems with this method: the chambers don't always empty at the same rate, one can only make a single gradient at a time.

A while back, someone discovered that you could **freeze and thaw** a homogeneous solution of sucrose in a tube a couple of times and the exclusion of the solute as the water froze into ice would lead to pure water and concentrated solute, eventually forming a gradient. Before you head off to your local freezer, however, beware of the technique that seems to be too good to be true. It is! The gradients are non-linear, they take days to cycle through the multiple freeze-thaws and most importantly, they are a gradient of everything, not just sucrose. All solutes are excluded from the ice and all end up forming a gradient, so you end up with a buffer gradient, a salt gradient and perhaps a bit of a pH gradient as well. The top of these gradients is essentially pure water, which is incapable of supporting a sample layered on top. Do not use these gradients!

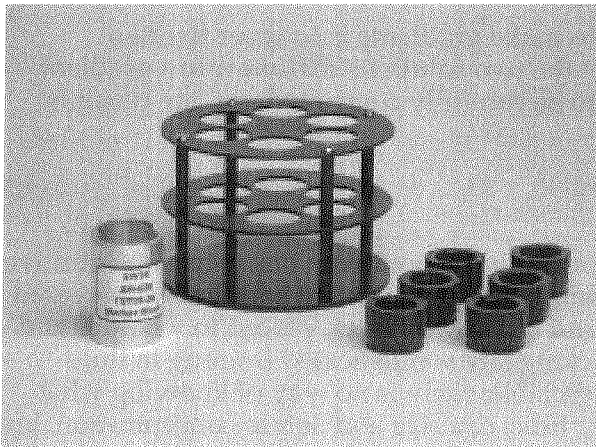
Finally, the other way that has been proposed to make gradients is to layer the two solutions in the tube and cap it and lay it on its side and let the two solutions **diffuse** into a gradient. Needless to say, the timing of the diffusion would need to be carefully controlled and the result is decidedly non-linear.

2.3 Tilted tube rotation

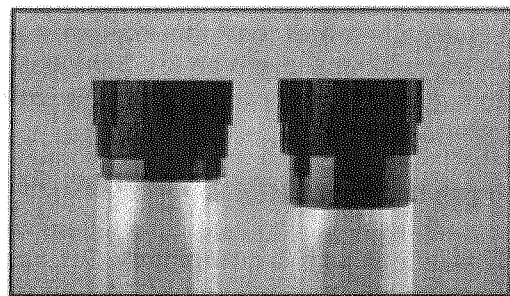
This brings us to a completely different way to form linear gradients that is as non-intuitive as it is fast and reproducible. We call it **tilted tube rotation**. The two end point solutions are layered into the tube, the tube is capped to lock in the solutions and out any bubbles, placed in a holder and rotated at a high tilt angle for a fixed time and speed. Lacking any sophisticated training in fluid dynamics, the process is essentially empirical and unpredictable; there is no way of knowing what time/angle/speed combination will work for a particular tube, cap size and solute concentration, but once it is determined it is known forever.



The Gradient Master



Marker block, MagnaBase Tube Holder, Caps

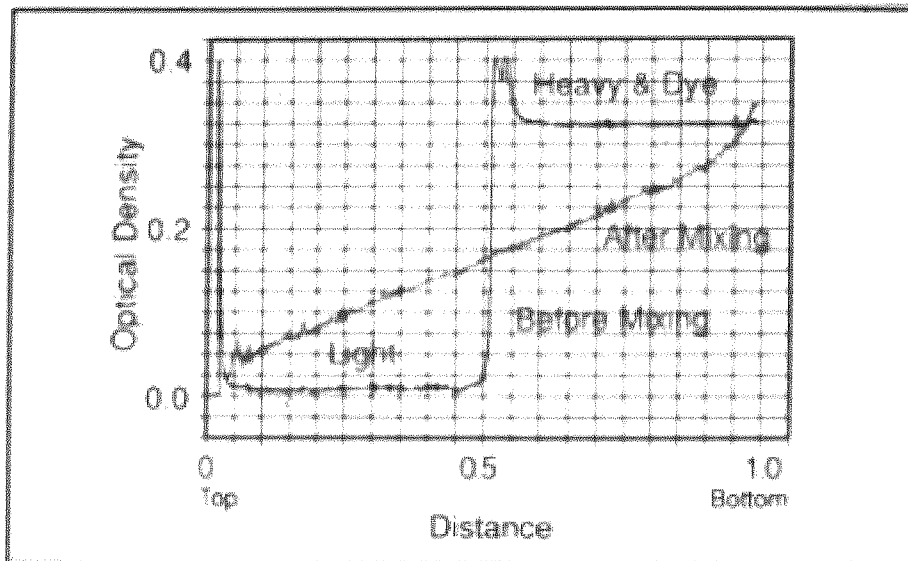


25 mm rate zonal (left) and isopycnic (right) caps.

Short (-R) & Long (-I) Caps

The marker block is used to mark the half-full point on the tube for layering. The caps (short or long) retain the gradient during tilted rotation. **Short caps** are used for rate zonal runs where a small sample is needed, and **long caps** are used in isopycnic or equilibrium runs where sample size is less important.

A before and after scan of a gradient showing how tilted tube rotation can quickly, accurately and reproducibly produce a linear gradient from the two endpoint solutions layered in the tube.



This is a profile from the gradient catalog: an SW41 5-20% sucrose gradient, with run parameters of time, 1 min., 57 sec.; angle, 81.5 degrees; and speed, 17RPM.

2.4 Cushions and shelves

Cushions are often applied to the bottom of gradients to trap particles that might otherwise pellet to the bottom. The best way of doing this is to remove the cushion's volume from the bottom of a finished gradient and layer the cushion solution under the gradient. Its volume and density are determined by the type of particles to be trapped.

2.5 Temperature

Temperature is an important part of gradient use, since some particles are very thermolabile. There are two ways to make gradients that will be used at non-ambient temperatures: Make them in the cold room with cold solutions and keep them cold until use or make them warm and then chill them before use. While the "all cold" method is theoretically the best, it requires unreasonable temperature rigor to reproduce, since temperature has such a drastic effect on the density and viscosity of density media. The chilling of room temperature gradients will lead to some convective mixing, but experience has shown that it is minimal. Since virtually all the run parameters for gradient forming were developed at room temperature, chilling the room temperature gradients is the way to go.

Section 3. Layering and handling gradients.

3.0 Sample preparation

Whatever type of fractionation you plan to use, it is a good idea to apply a sample that is devoid of cell debris to the gradient. Give the sample a good 30 sec spin in a microfuge to clean it and be careful not to disturb the pellet as you harvest the sample before layering. Note that the % solute on the top of the gradient must be able to float your sample. 5% solute is usually enough, but beware of extracts derived from large numbers of cells; they can exceed the 5% density and fall through the tube until they find their own density, destroying your resolution in the process. To test this, start with a 5% sucrose solution in a small beaker and hold it up to the light as you gently layer some sample into the center of the liquid. Watch for the sample to rise (OK) or sink (not OK).

3.1 Sample layering for velocity runs

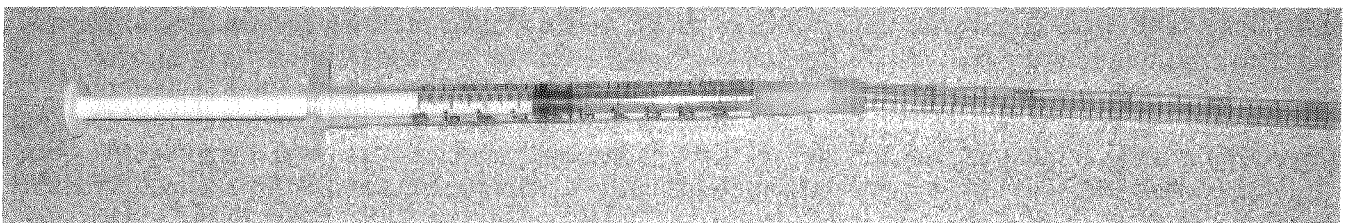
If you want the highest possible resolution in your velocity (rate zonal) runs, you need to start with the thinnest possible sample on the top of the gradient. If your sample is smeared or overloaded, the bands overlap and the resolution drops precipitously. Illustrated below is a simple layering device that outperforms automatic pipettors and pasteur pipettes, is inexpensive and reusable if needed.

3.1.a. Gradient preparation: First, make your gradients with the **short caps** and remove 0.1 ml less than the sample you plan to apply. If you are going to layer 0.3 ml samples, remove ~0.2 ml from one of the gradients you have just formed. Drop this tube into a beaker with a Kimwipe pushed into it with your finger to support the tube upright and TARE them on a balance. Bring all the other tubes to within 0.05 g of the tared weight. This will allow you to load a constant volume of sample on the gradients and avoid having to rebalance the tubes before the run.

When removing the top of the gradient, use the same technique illustrated below to avoid disturbing or creating a discontinuity in the gradient: pull the interface up the wall with the device shown and then suck off the required amount.

If your gradients will be run at 4°C, now is the time to put them well spaced and exposed in a refrigerator for 30-45 min to equilibrate at this temperature.

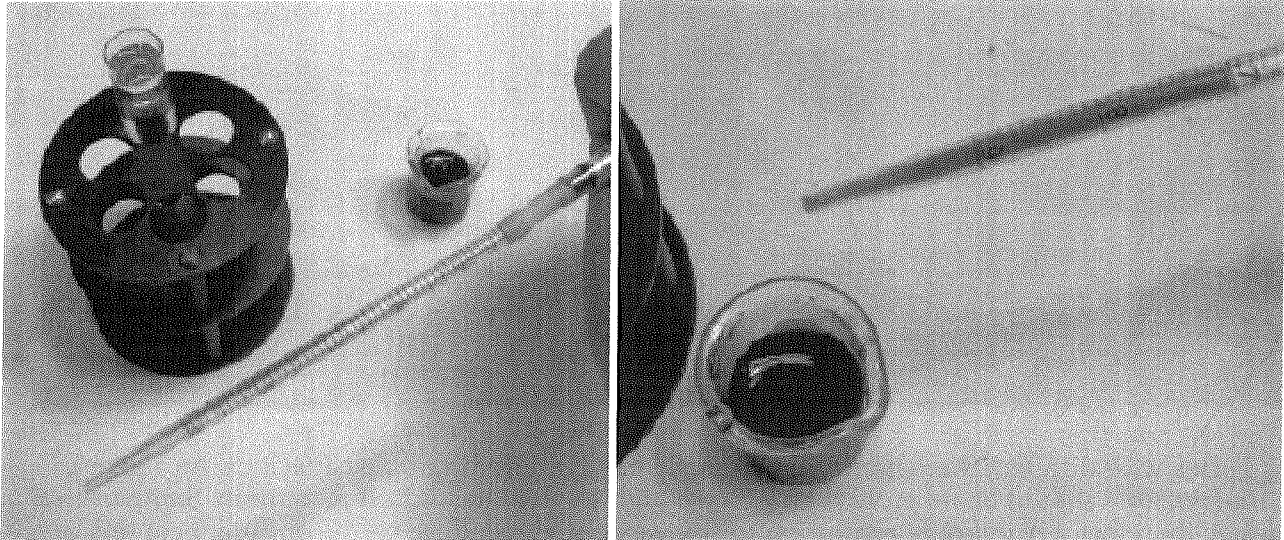
3.1.b. The layering device: Take a sterile 1 cc pipette and roll a razor blade over the 0.4 ml line to etch it, then snap the pipette in half at this line. Connect it to a 1 cc syringe with a short piece of flexible tubing (silicone is best) as shown below. Make as many of these as you have different samples to layer.



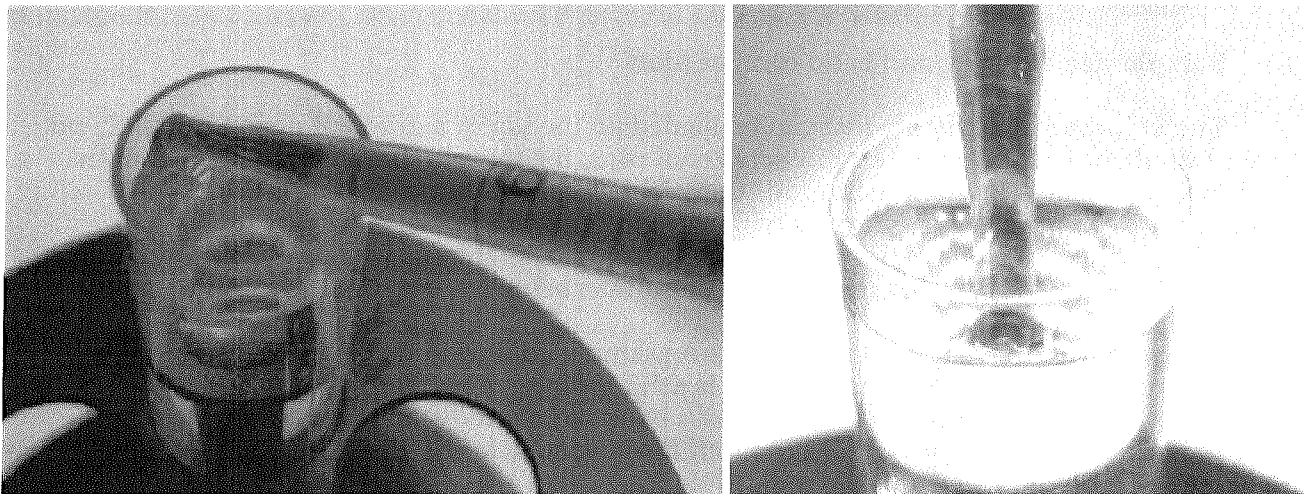
3.1.c. Sample preparation: Always resuspend your sample in slightly more buffer than you plan to layer so you'll be sure to have enough of every sample. If you want to layer 0.3 ml, resuspend your sample pellet in 0.4 or 0.45 ml. When the cells are thoroughly resuspended and lysed, give them a 30-60 sec spin in microfuge tubes at 14,000 rpm to pellet the large debris.

3.1.d. Sample layering: Start by pulling 0.05 ml of air into the syringe to allow you to expel the

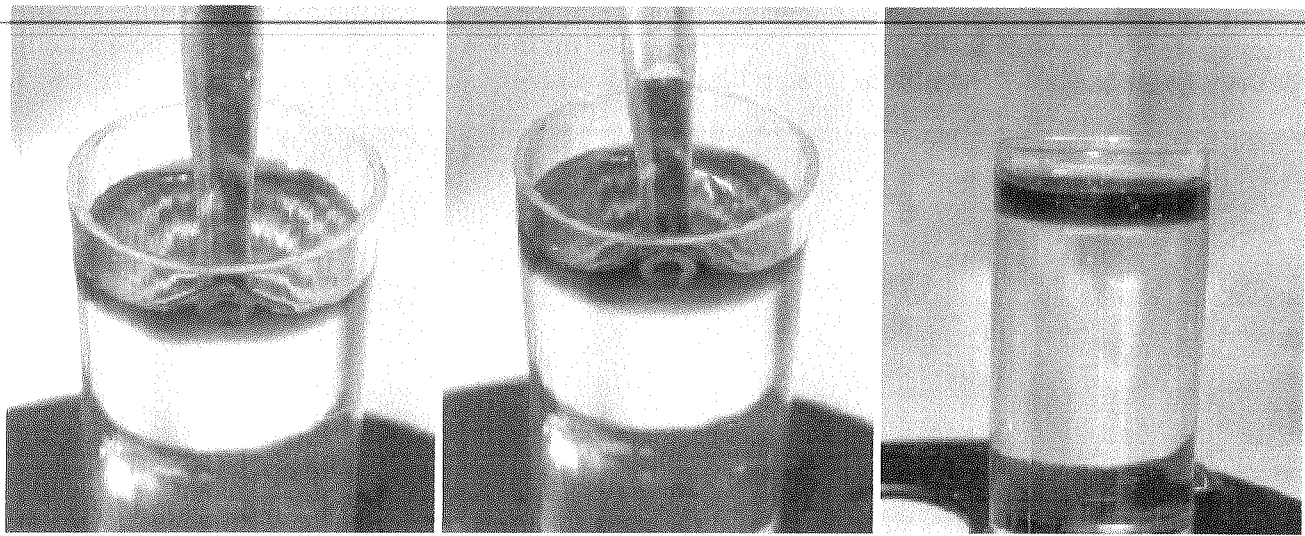
last bit of sample when layering. Now, with the pellet on the high side of the microfuge tube, suck off the supernatant to the desired volume on the pipette (0.3 ml in the photos below). Leave no air in the tip of the pipette as shown: sample is flush with the end.



This is the critical part: with the pipette nearly horizontal, insert the tip into the top of the gradient on the far wall and tilt the pipette to pull the meniscus up the wall.



Start layering. Keep raising the tip up the wall to keep it above the level of the sample in the tube. When you are done and the last bit of sample has been expelled from the pipette, you are finished.



Tubes with different diameters will obviously have different sample capacities. As a general rule, your sample should be no more than 2.5 mm high to give the highest resolution. Samples that are higher than this will degrade resolution to some extent, depending on the endpoints of the gradient: Note that higher bottom endpoints (45%) preserve resolution.

3.2 Gradient buffers

Be creative here (or not). The buffer in the gradient can selectively preserve or disrupt the particle of interest. Be aware of the effects of divalent cations, ionic strength, pH and detergents.

3.3 Sample size, layering and band compression

The volume of the sample that can be loaded on the top of a gradient depends greatly on the type of gradient you are running. For rate zonal runs, the sample should lie on the top of the gradient in a layer that is 1-3 mm thick. Oddly, smaller samples volumes than this do not yield sharper bands. However, thicker samples will degrade band sharpness. Steep gradients will compress the leading edge of bands and allow larger sample heights, as well as preventing sample loss to the wall during the run. See the detailed discussion below.

Isopycnic runs have no real restrictions on sample volume and can be loaded on the top, bottom or mixed with the solute if the gradient is self forming. The only thing that really matters is that the area of the gradient where the particle will band has a steady, and fairly steep density gradient to it. Remember that, given 12-16 hr, self forming solutes will come to their own gradient profile depending on the speed and the rotor .

3.3.a The value of a steep gradient.

One of the most widely used density gradients is the 5-20% (w/v) sucrose gradient. While it may perform adequately for some applications, as we show below, it has many faults compared to its 5-45% cousin.

Performance of 5-20% Gradients

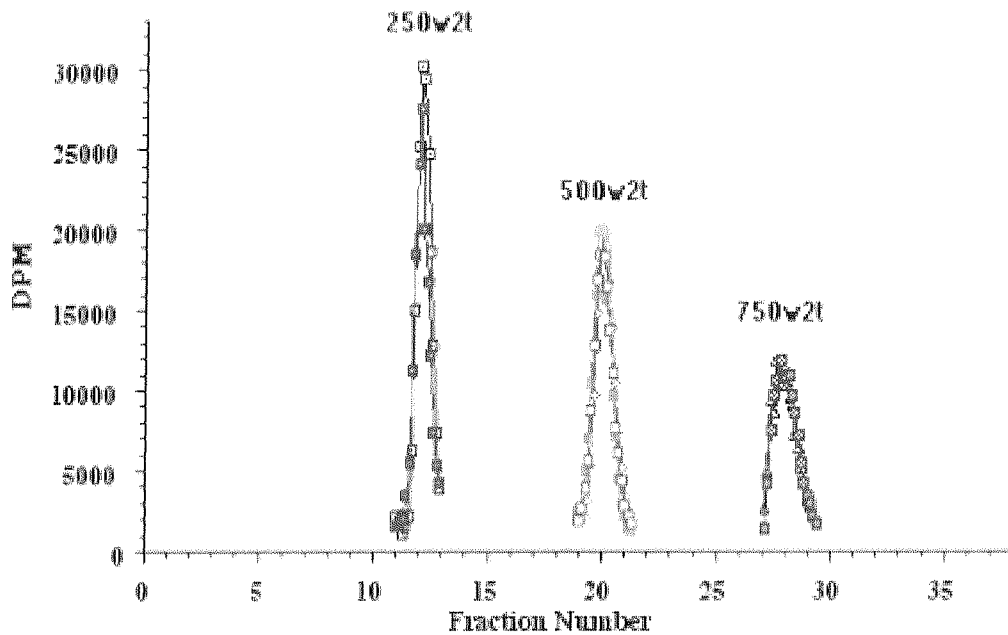


Figure 1. Performance of 5-20% sucrose gradients. ³⁵S-labeled T4 phage were centrifuged on the L5-75 ultracentrifuge using the integrator preset at the indicated w²t values. Two 250 w²t gradients were run and 3 each of the 500 and 750 w²t samples were run together. The sample volume was 0.1 ml and the tube was run in the SW41 rotor. The horizontal axis is calibrated in old "crank" units, where one turn of the crank handle or fraction = 1.90mm.

The figure demonstrates three important points. First is the loss of peak height the further down the tube the band sediments. The reduction arise from two sources; sample loss and band spreading. Of the 100% of counts loaded on the top of the gradient, 63% are present in the 250 w²t sample, 53% in the 500 w²t sample and only 38% in the 750 w²t sample. The most likely source of the loss of counts is sample adsorption to the wall of the tube. Any particle that diffuses laterally into the wall will either adsorb to it or sediment to the bottom of the tube and be lost from the band. The band spreading evident in the lower bands arises from top to bottom band diffusion.

It has been known for some time that 5-20% sucrose gradients in a variety of rotors are isokinetic; that is, the sedimentation distance of a particle is directly proportional to sedimentation time at any given speed. This is born out in a plot of the peak positions in Figure 1 vs the total w²t they experienced, including acceleration and braking.

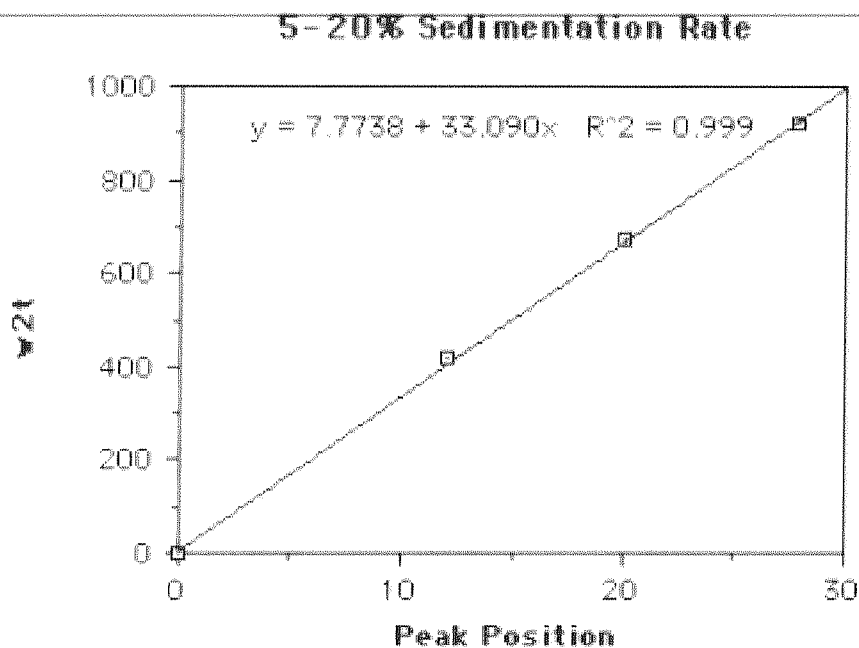


Figure 2. Peak position vs. total sedimentation. This type of plot can be useful in two ways. If you know how far a particle sediments at a given speed or time of centrifugation, you can easily calculate how far it will travel if you change a run parameter. Distance will be directly proportional to w^2t or approximately to the run time at a given speed, and inversely proportional to the square of the rotor speed. If you increase rpms from 33,000 to 41,000, run time will be $(33^2)/(41^2) = 0.648$ x the original run time at 33K rpm.

Another consequence of the isokinetic property of a 5-20% gradient is that particle S values are directly proportional to distance travelled, so the S value of an unknown can be calculated by determining the relative sedimentation rate of a known particle in the same gradient. Thus if a 70S particle sediments 47 mm into a gradient, a particle banding at 22 mm has an S value of $(22/47)*70 = 33S$.

Figure 1 also illustrates the high level of reproducibility of the Total System. Using our "First Drop" method of aligning the top of each gradient, we have achieved ± 0.5 mm reproducibility between tubes in the same run. Thus, only when ultra-fine fractions (0.2-0.4 mm) are being taken is it necessary to include a marker in each tube to align the gradient profiles.

The loading capacity of the 5-20% gradient is illustrated in Figure 3. An identical amount of labelled phage was diluted to the indicated volumes (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 ml) and loaded on 5-20% gradients. All 4 gradients were run together and the peaks aligned on the spread sheet to illustrate the band spreading evident in larger samples.

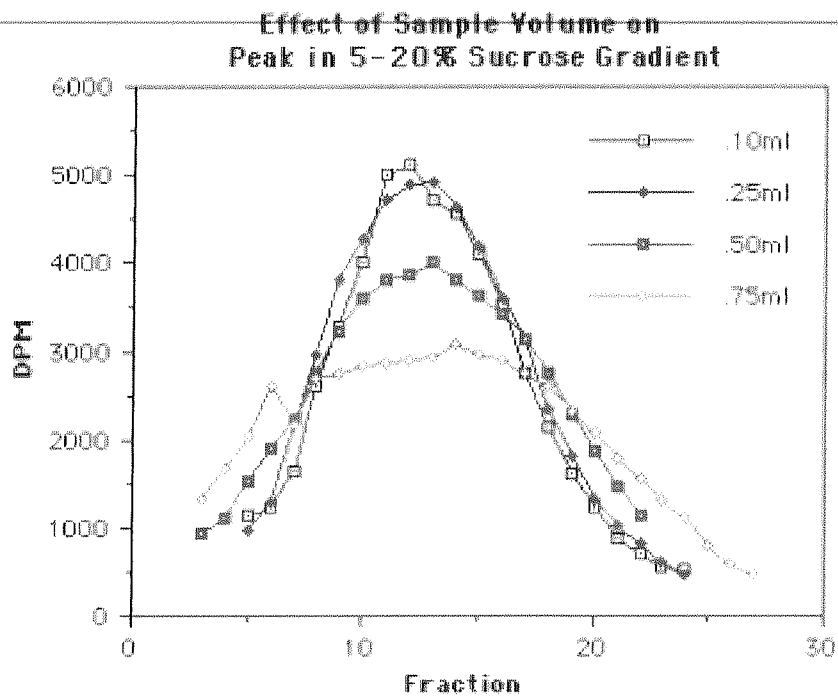


Figure 3. Loading volume influences band width; 5-20% gradient. While the 0.1 and 0.25 ml samples gave identical peak shapes, the 0.5 and 0.75 ml sample volumes clearly lead to a broadening of the band and the resultant loss of resolution. Thus, for the SW41 rotor tubes, sample volumes in 5-20% gradients must be limited to 0.25 ml and fairly short runs if high resolution is required. These gradients were fractionated using the hand crank (pre-motorized).

A final limitation of these gradients will become evident when examining the 5-45% profiles below. The range of S values that can be separated on a given gradient is limited here because the low viscosity and density of the 20% end point does not retard the sedimentation of large particles. In Figure 1, for example, particles with an S value of 250-750S would have been separated adequately but 1000S particles would have pelleted in this run.

Steep Gradients Offer Many Advantages

We have used 5-45% (w/v) sucrose gradients for many years and find their resolving capabilities far superior to 5-20% gradients. The advantages stem from two main properties. The increased steepness of the gradients makes them inherently more stable during sample layering, handling and centrifugation. The increased viscosity and density of the 45% endpoint reduces diffusion, causes band compression and increases the range of sizes that can be separated on a single gradient.

Figure 4 demonstrates several of these points. T4 phage samples (0.1 ml) were layered on identical 5-45% sucrose gradients and run to the indicated preset integrator values as before.

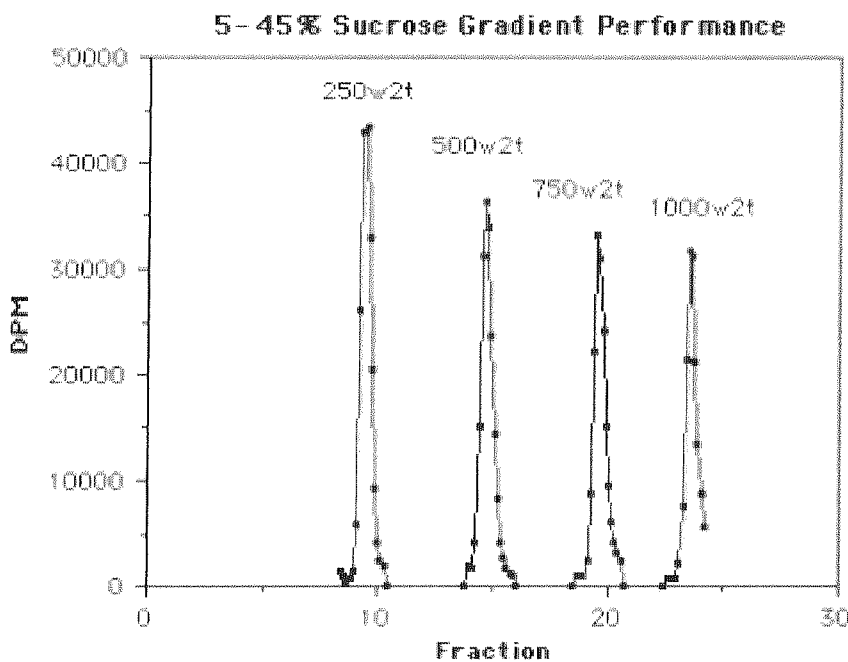


Figure 4. Performance of 5-45% sucrose gradients. Of 100% of the counts loaded on the top of each gradient, the amount remaining in the band is 77% in the 250 w2t sample; 66%, 59% and 48% in the 500, 750 and 1000 w2t bands, respectively. Thus sample recovery is significantly better here, perhaps because the increased viscosity in the bottom half of the tube decreases the diffusion and loss of sample from particles colliding with the wall.

Also notice that rather than increasing in volume as the bands sediment further into the gradient, there is actually a small band compression evident here.

The range of sizes separated is also greater, so, for example, particles from 250S to 1000S would all be well resolved on the same gradient, and increase of 30% in range over 5-20% gradients. Of course, this increase range comes with a slight degradation of the isokinetic property as illustrated below.

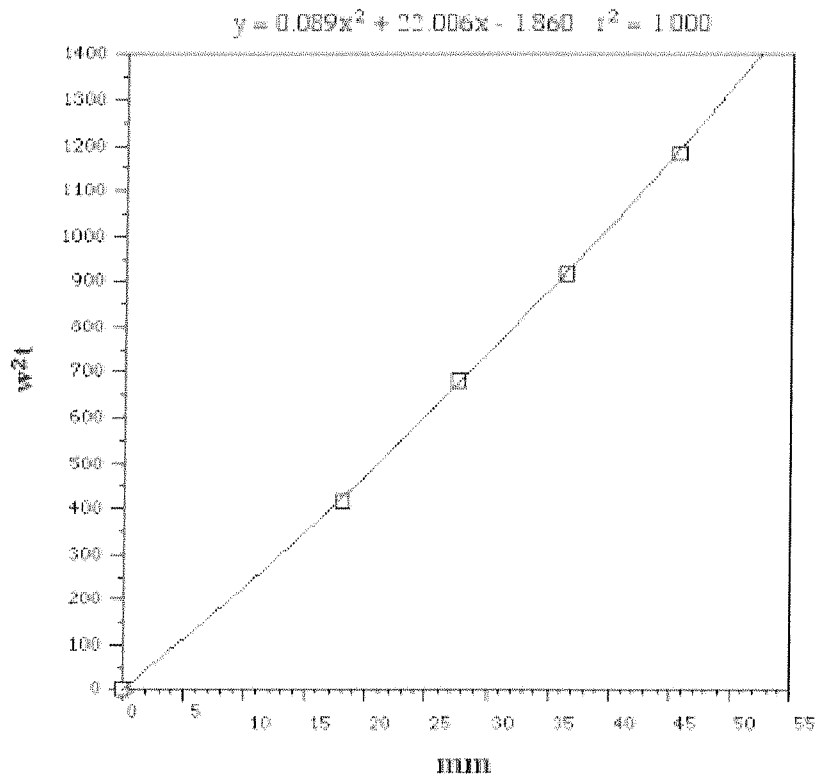


Figure 5. Peak position vs. total sedimentation; 5-45% gradient. Here we have plotted the position of the T4 phage peaks at various w^2t . The function above the figure is a perfect fit for the data points and reveals the slightly non-isokinetic behavior of this steeper gradient. However, it is still possible to determine the S value of a particle relative to a known S marker. Suppose that our marker, a 950S particle (T4 phage), sediments to position 39.2 mm at 1000 w^2t . A particle sedimenting to position 15.7 in the same gradient has reached the position of our phage marker sedimented for 365 w^2t (solve the equation for $x = 15.7$). The unknown therefore has an S value $365/1000 \times$ our marker (950S) = 347S. Using this logic, the graph can be converted into an S value graph by fixing the w^2t value (say at 1000) and converting the Y axis to S value. Thus the 1000 w^2t position becomes 950S, the 365 w^2t position becomes 347S and so on. The present technique has the inherent advantage of being empirically determined under your actual run conditions. Of course, the availability of an S value marker is required.

Effect of Sample Volume in 5-45% Gradients

The sample capacity of 5-45% is quite remarkable. As illustrated in Figure 6 below, when volumes ranging from 0.1 to 0.5 ml are layered on top, the bands are indistinguishable. Even at 0.75 ml, while the peak height is slightly reduced, the band volume is about the same; 0.3 ml. Thus the compression is a real advantage since large samples can be loaded with little or no loss of resolution.

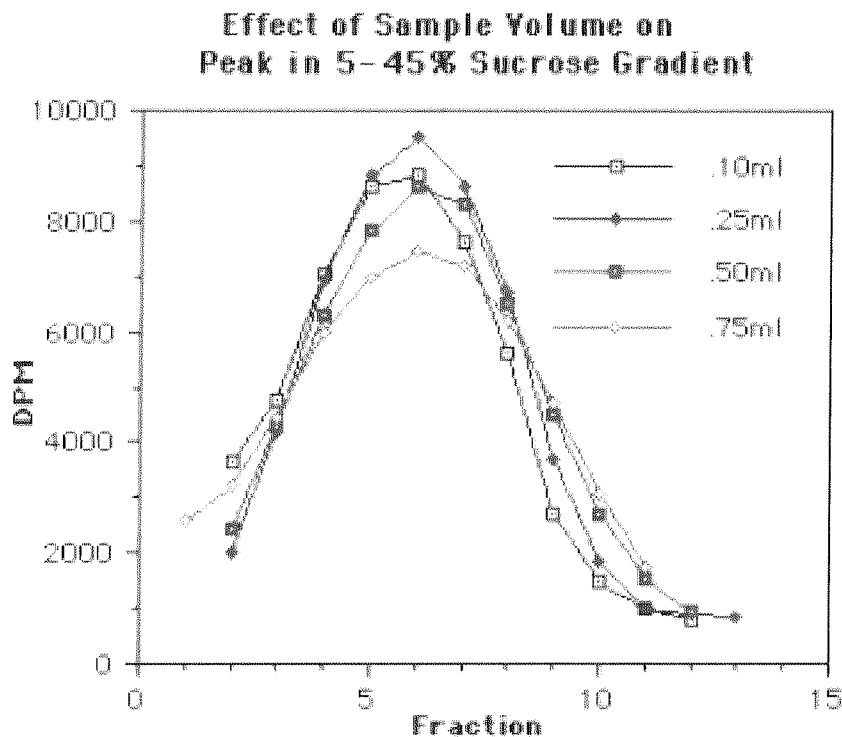


Figure 6. Effect of sample volume on peak width in 5-45% gradients. The band spreading evident in the 5-20% gradients is almost completely absent here. In fact, bands loaded in >0.5 ml samples volumes are recovered in less volume than the sample. This is the result of the compression of the leading edge of the band as it continually enters zones of significantly increased viscosity and density in the steep gradient.

Thus, resolution, sample recovery, band compression and S value range of a 5-45% gradient are all improved over the 5-20% gradient. The price one pays for the isokinetic property of a 5-20% gradient is clearly not worth the modest gain in mathematical ease it offers.

The graphs and tips shown here illustrate the value of reproducible gradient forming and fractionation. The full potential of gradients to separate and analyze macromolecular structures cannot be realized until these processes are completely standardized.

3.4 Loading the tubes in the rotor, running, unloading

Once the sample has been loaded, the gradients must be handled with great care to avoid mixing the sample with the upper layers, especially in rate zonal runs. The same is true with gradients that have been run and are awaiting fractionation. It is a good idea to keep the fractionator close to the centrifuge to avoid long and dangerous trips down crowded hallways. The sensitivity of the sample to acceleration and braking will depend on the centrifuge and the gradient. A steep, viscous gradient will be fairly resistant to disruption, while a shallow one may not be. A good idea is

to establish the sharpness of your bands with gentle acceleration and braking and then seeing if faster starts and stops hurt the resolution.

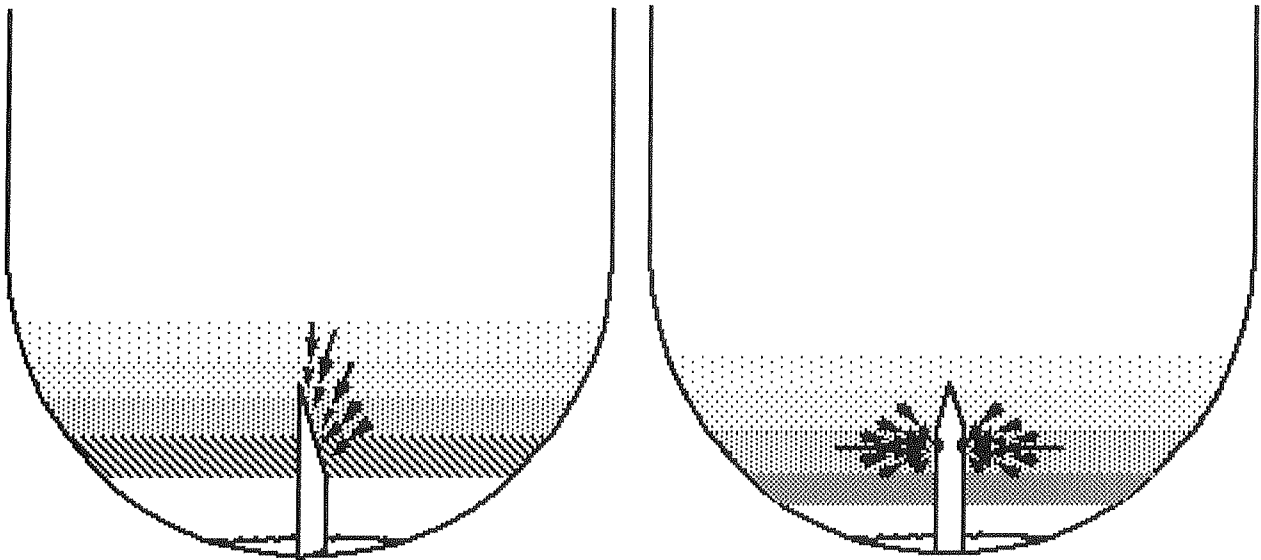
Section 4. Fractionating gradients

4.0 The essential problem: Laminar capillary flow; getting a flat band into a thin column.

There is a round hole/square peg problem that has plagued gradient work from its inception: the bands are thin horizontal discs and the devices used to retrieve them are invariably thin tubes at some point. Thus the problem is one of conversion between the two geometries. In addition to this, the tubing exhibits laminar capillary flow, where the central lamina has the highest velocity and the zero boundary adhered to the wall is stationary. This makes the conversion even more difficult than it already is and is a little-appreciated part of gradient fractionation because the high velocity central lamina tends to pull gradient solution from directly in front of itself, reaching far beyond the zone that is supposed to be entering the tubing system. This degrades resolution because different layers are being sampled at the same time.

4.1 Needles; straight and side hole:

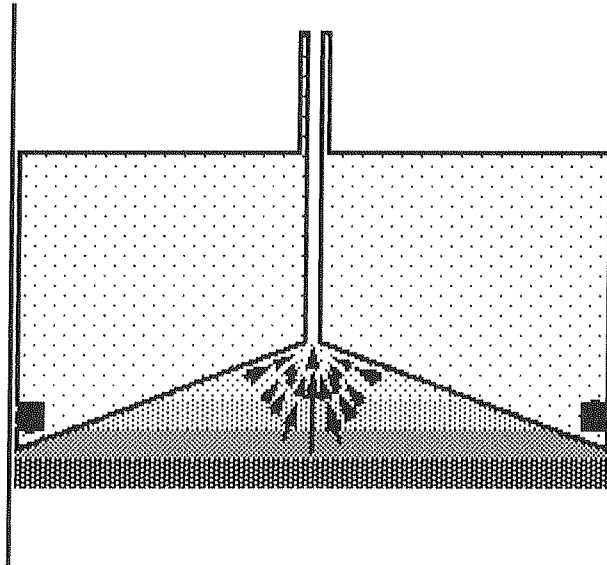
As shown by the figures, these are the poorest ways to fractionate a gradient. The central lamina is offered unfettered access to layers far beyond the one next to the tip of the needle and the resultant loss of resolution is severe.



The Straight Needle

The Side Hole Needle

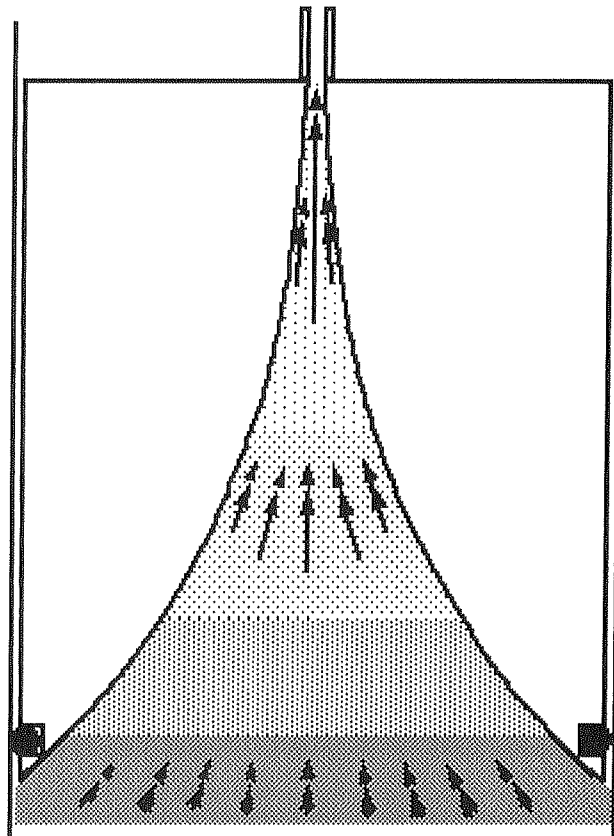
4.2 **Cones:** Cones used in many fractionation devices are a first attempt to deal with the central lamina problem. Unfortunately, at anything but the slowest speeds, they smear out your fractions, albeit to a lesser extent than the needles.



The Inverted Cone

4.3 **The Trumpet Tip™**

The trumpet shape of the tip restricts the flow into the tubing to the central lamina. The gradual taper is designed to take advantage of the gradual spread of the fastest flowing lamina to ever wider zones as the distance from the narrowest diameter increases. The cost here is that the trumpet has its own zero boundary layer over this larger wetted area, but the resulting increase in resolution is far superior to the cone.



The Trumpet Tip

4.4 A Comparison of different tip designs

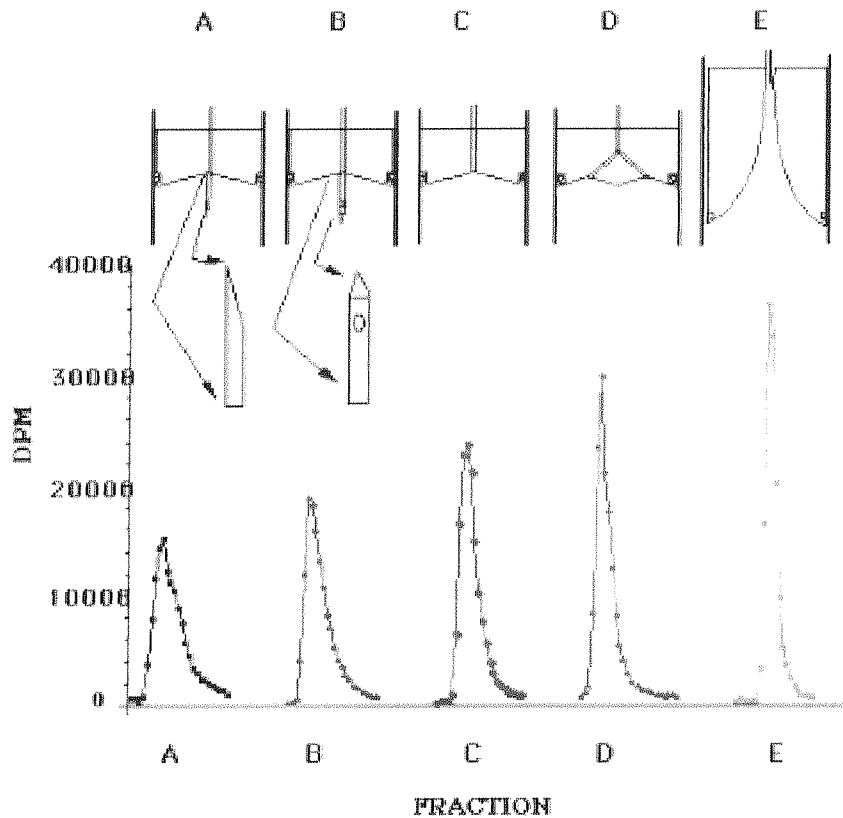


Fig 2. The Evolution of the Fractionator.

These are five identical gradients containing a T4 phage peak fractionated with different tip configurations at the same speed with a motorized fractionator. Peak fractions are displayed at the same scale in this composite view. Above each peak is a diagram of the fractionation tip used to harvest the gradient. As the tip is pressed down into the tube, the gradient is displaced into collection tubing connected to the outlet needle at the top of the tip.

Tip A is the standard beveled needle frequently used to puncture the bottom of the tube. In this case it has been inserted into the center of the single hole cone tip to provide a direct comparison to the other tips.

Tip B is the side hole needle often used in simple puncture fraction collectors. It also has been inserted into the cone tip.

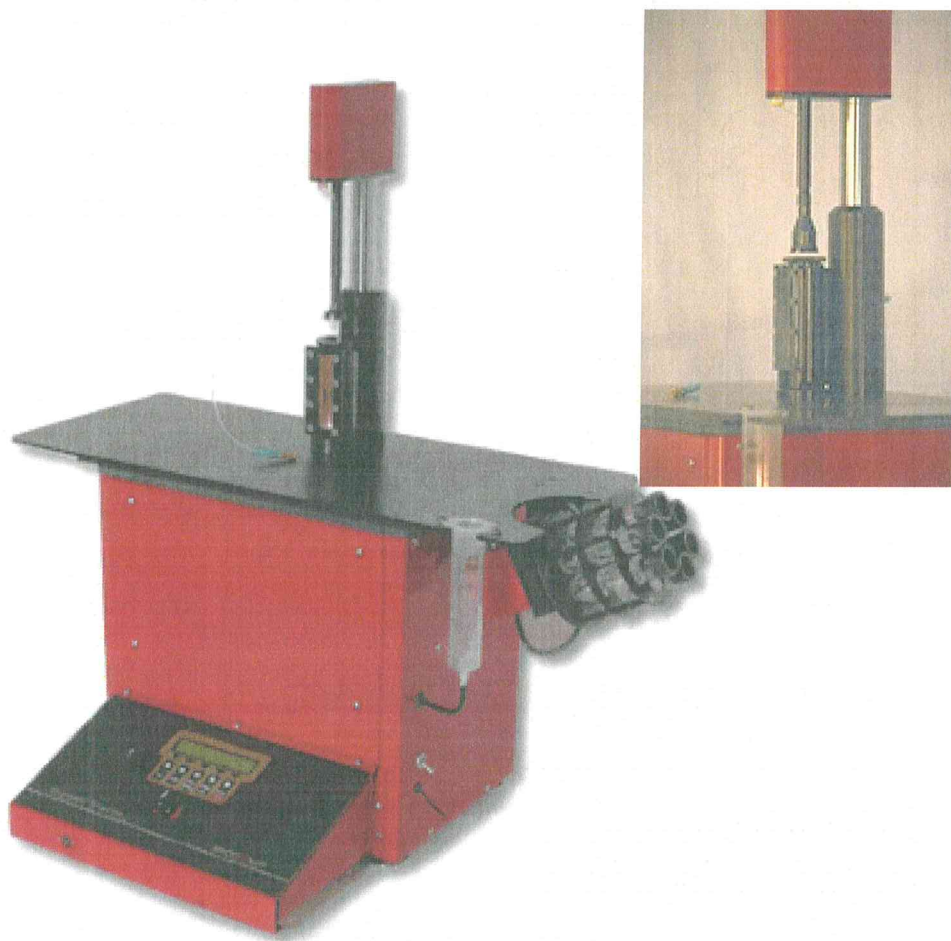
Tip C is the basic cone design with a single collection hole in the center.

Tip D is the multi-hole tip first developed and patented in 1976.

Tip E is the patent-pending Trumpet Tip™ recently developed by BioComp.

4.5 The Piston Fractionator

The basic design of the Piston Fractionator is to force a piston tipped with a trumpet tip/seal down into the tube to displace the gradient layer by layer from top to bottom. The piston is driven by a high resolution stepper motor coupled to an acme screw and offers 10 micron resolution with 99.9% accuracy.



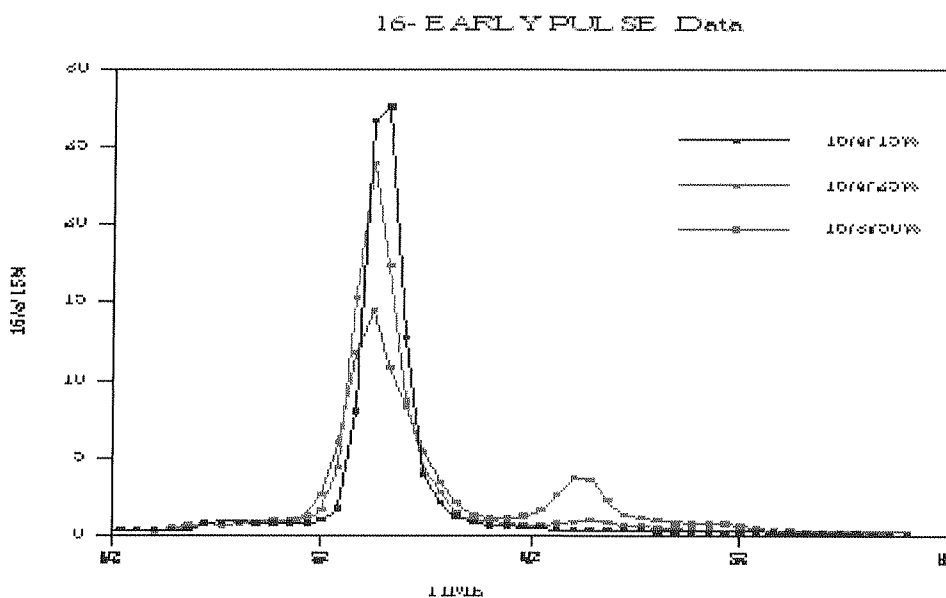
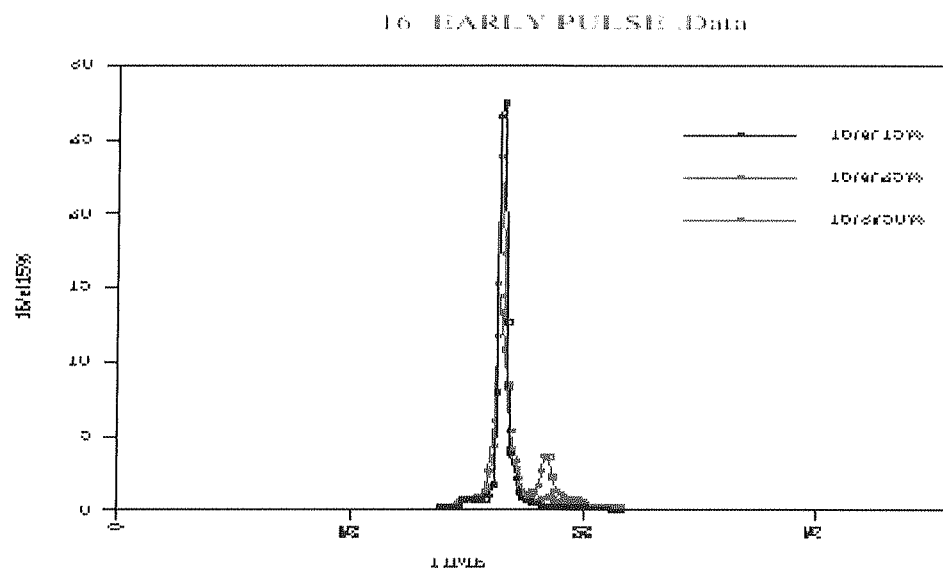
The Gradient Station
Forms and Fractionates Gradients

4.6 The highest resolution fractionation ever achieved.

This is not an idle boast. Never before has gradient fractionation been able to offer resolution comparable to HPLC. Using the Trumpet Tip™ described above to nearly eliminate smearing of peaks, and the unique rinse/air cleaning system described below, you can now routinely achieve ultrahigh resolution profiles of your gradients.

4.6.a. High resolution and reproducibility:

Examine the three gradients superimposed below. The top version shows how the gradients look at 1X, where the X-axis represents the length of the tube. The bottom version shows the same data plotted to include just the area that was sampled. This illustrates another important advantage of this system: you can concentrate your analysis on one or more areas of the gradient with high resolution while ignoring unimportant areas.



4.6.b. Teasing out new species:

Here is another example (Jardine & Coombs, 1998) of a series of gradients used to identify the elusive, but critically important phage T4 head packaging intermediate, the ISP (initiated small particle) following a pulse-chase of infected cells. The transient shoulder on the right side of the graph labelled 48 mm is the peak in question. This experiment follows the same protocol used by Laemmli & Favre (1973), but their analysis obtained by dripping from the bottom and showed only two large peaks. Just imagine what this kind of resolution could do for your experiments.

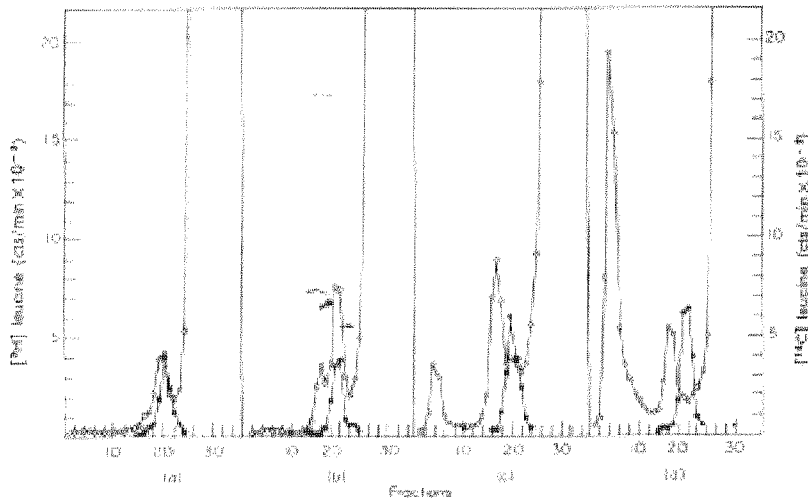


FIG. 1. Flow of the labeled proteins from 140 to 500 to 1100 S particles in wild-type infected cells.

Cells infected with the double mutant phage T4 (am B255) T4 (am E18) were exposed to ^3H leucine at a level of $1 \mu\text{Ci/ml}$ for 1 min from 13 to 14 min following the first infection. Incorporation of radioactive leucine was stopped by the addition of a 300-fold excess of cold L-leucine. One-ml samples were prepared at zero, 1, 3 and 11 min post-chase [(a), (b), (c) and (d), respectively] and lysates were prepared in the presence of polyethylene glycol and high salt, as described in Materials and Methods (method II(a)). ^{14}C -labeled 49⁺ particles, isolated as described by Luftig et al. (1971) were added to each sample before fractionation on a linear 10% to 20% sucrose gradient. Centrifugation was run in a SW501 rotor at 22,000 rev/min for 45 min. —○—○—, ^3H leucine pulse-labeled lysate; —●—●—, ^{14}C -labeled marker 49⁺ particles.

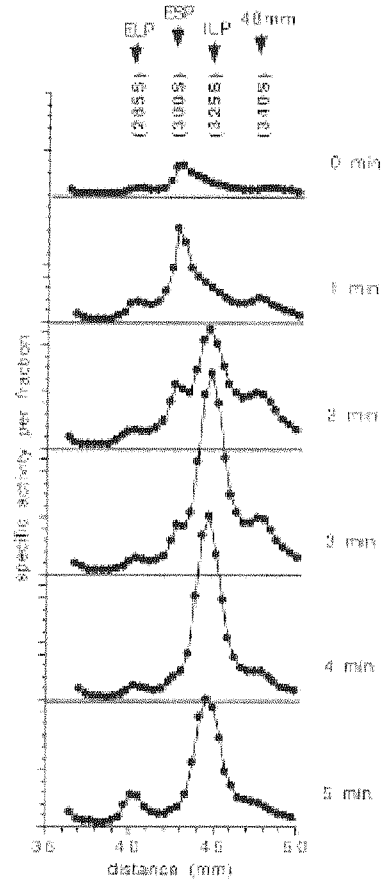


Figure 2. ^3H gradient profiles of mM-ssT7 infectors at 32°C which were pulsed at 19 minutes for one minute and then chased. Samples were taken at 0, 1, 2, 3, 4 and 5 minutes respectively. All gradients are scaled and aligned as in Figure 1.

Laemmli & Favre (1973: JMB 80:575)

Jardine & Coombs (JMB: 1998, 284:661)

4.6.c. Resolving small protein complexes:

The figure below from Peter Sorger's lab, then at MIT, shows the purification of a small protein complex (210 kD heterodecamer; 7.4S) on glycerol gradients using the Gradient Master and Piston Fractionator. This rate zonal gradient clearly outperformed columns in the purification, both in peak width and r^2 values for the marker proteins on two separate runs. (Miranda J.J., De Wulf, P., Sorger, P.K., Harrison, S.C. 2005. **The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules** Nat Struct Mol Biol. Feb;12(2):138-43.)

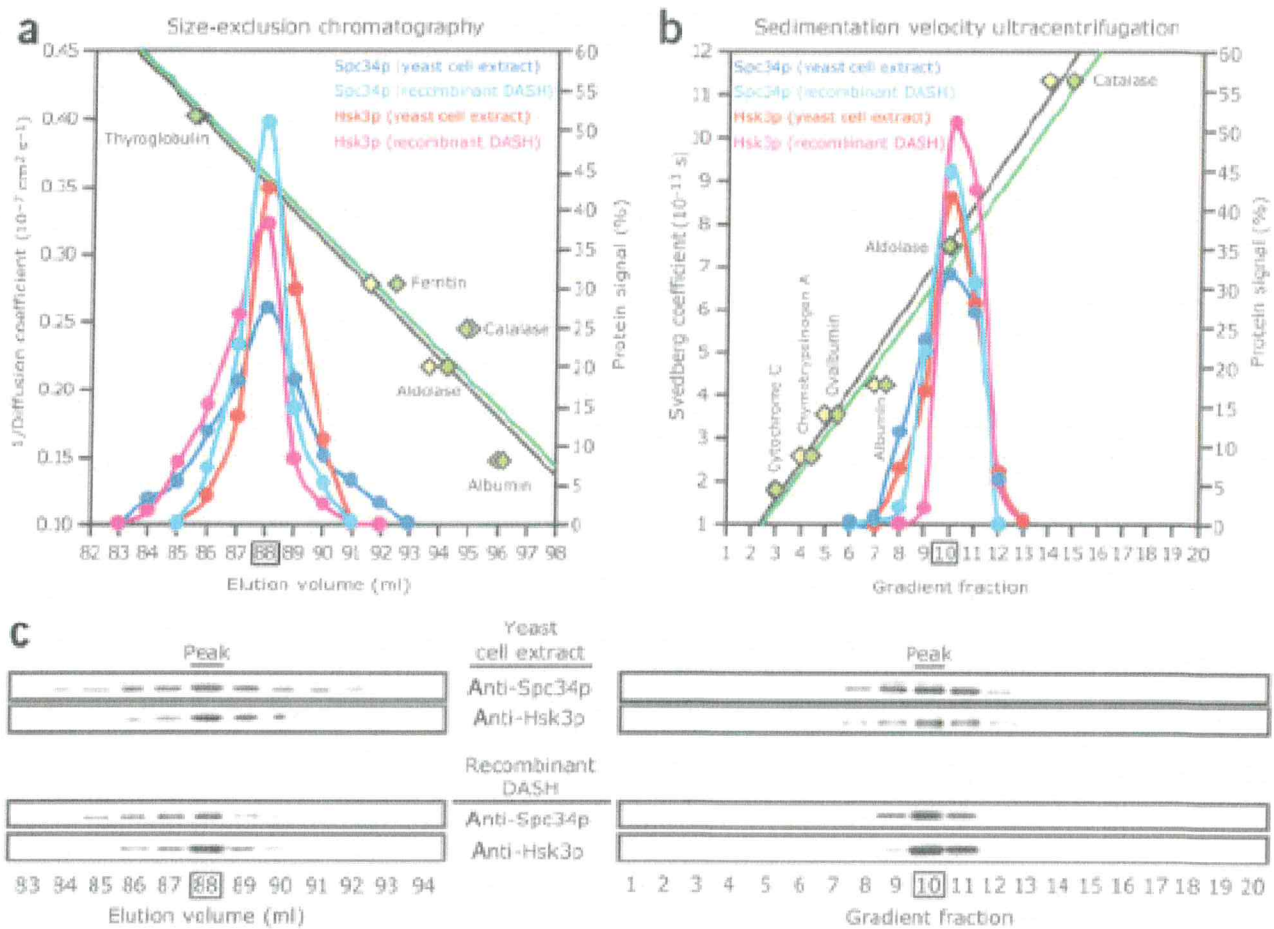
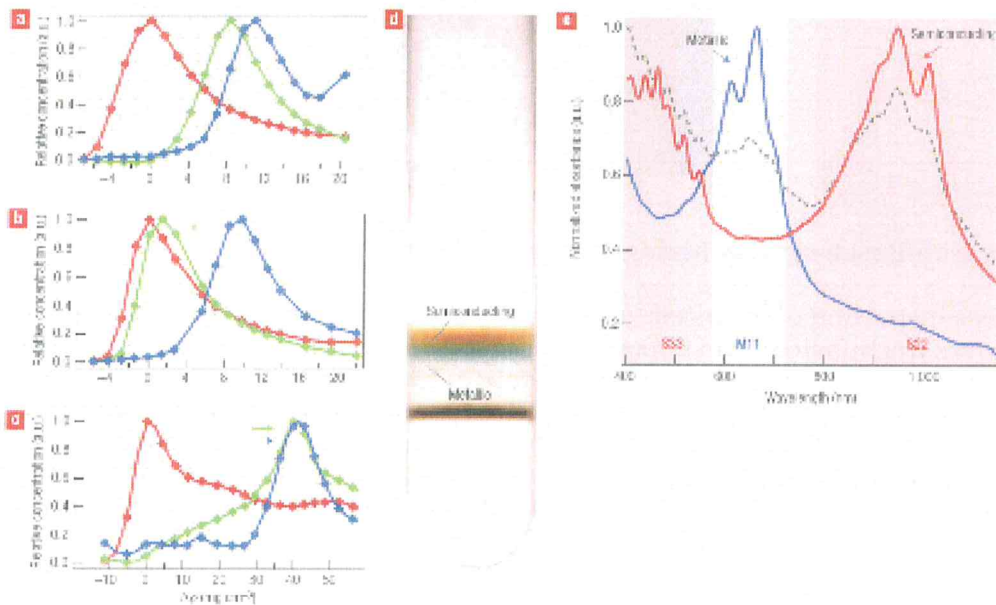
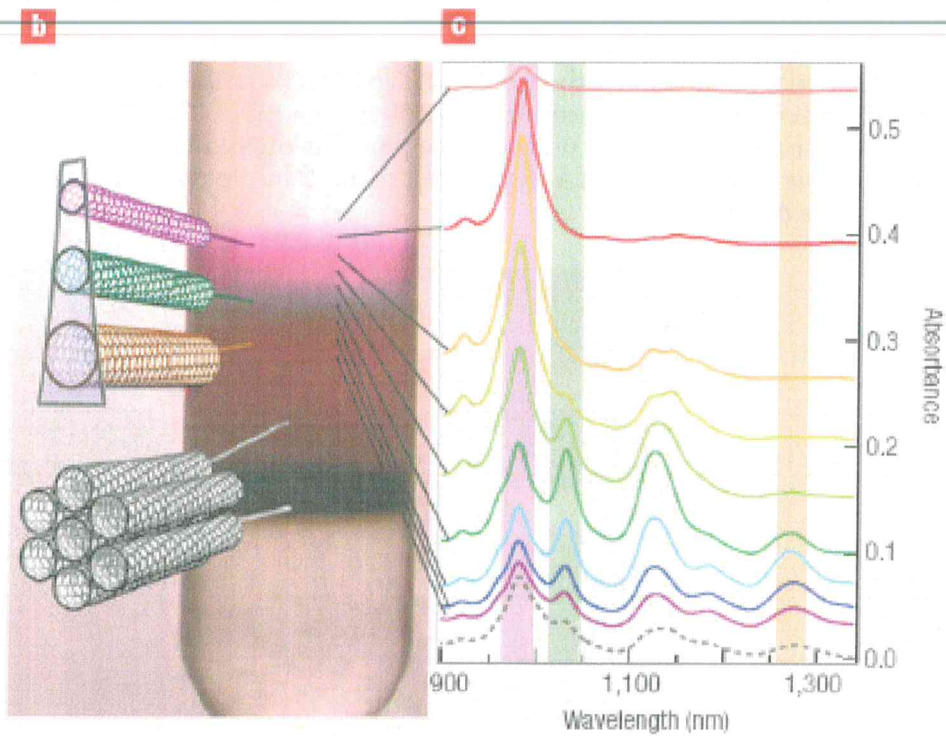


Figure 1 Hydrodynamic analysis of recombinant and native DASH. (a) Elution profiles from size-exclusion chromatography. Yellow and green diamonds, elution positions of five standard proteins as obtained from two independent experiments. Black and green regression lines ($r^2 = 0.91$ and 0.92 , respectively) yield the diffusion coefficient of a protein from its elution volume. (b) Sedimentation profiles from sedimentation velocity ultracentrifugation. Yellow and green diamonds, sedimentation positions of six standard proteins as obtained from two independent experiments. Black and green regression lines ($r^2 = 0.98$, and 0.99 , respectively) yield the Svedberg coefficient of a protein from its position in the glycerol gradient. (c) Western blots of column and gradient fractions obtained with polyclonal antibodies raised against Spc34p and Hsk3p. Quantitation of the band intensity is plotted in a and b.

4.6.d . Resolving carbon nanotubes

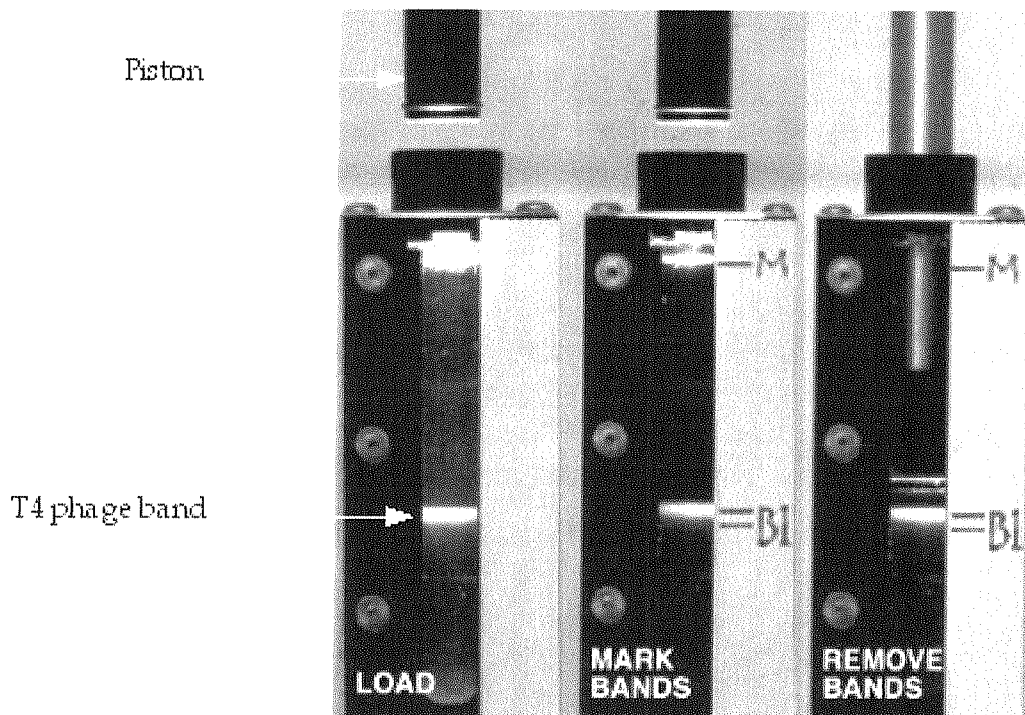
A recent development in the field of physics is the use of gradients to purify the various morphs of carbon nanotubes. The work was pioneered by Dr. Mike Arnold during his PhD work in Mark Hersam's lab at Northwestern (Arnold et al, 2006, Nature Nanotechnology. 1:60). Mike used a clever coating technique and isopycnic Optiprep (iodixanol) gradients to sort the various diameter nanotubes, and was able to test their very different properties. This spawned a whole new field as many labs adopted this technique to purify nanotubes. Mike used the Piston Fractionator to achieve the resolution he needed:



4.7 The band visualization system and manual fractionation

Particles larger than ribosomes in sufficient concentrations scatter visible light to such an extent that they can be viewed with the unaided eye. The piston fractionator makes three significant improvements in this area. First, the tube holder surrounds the tube in black to offer the best background for viewing. Second, the holder is designed to permit the tube to be immersed in water to eliminate light scattering on the surface of the tube. This feature greatly increases the sensitivity of the light scattering bands. The third improvement is the elimination of the lens effect that the bottom of the tube has on the illumination from below. The entire length of the tube is illuminated.

The fractionator kit includes a small T-square to allow the user to mark the position of the bands on a piece of tape placed alongside the gradient. The marks at the top and bottom of each band guide the manual recovery of any number of bands from a tube. The piston tip is lowered to the top line, the tubing is rinsed and dried with air, the piston is moved to the bottom line and the sample still in the tubing is recovered with a short burst of air. Sample recovery is complete since the piston displaces the entire band.



4.8 First drop/Reset; synchronizing gradient profiles.

A close inspection of balanced tubes reveals some variation in the height of the meniscus. If all gradients were fractionated from a fixed vertical spot, this variation would offset the resulting profiles. To counter this effect, we eliminate any offset by lowering the piston into the tube manually, slowing down as the piston approaches the meniscus and then proceeding on down until the first drop appears at the end of the sample tubing. At this point, the display is reset to 0.00 mm and fractionation proceeds, with all gradients reasonably well synchronized. There is still some variation between profiles (± 0.5 mm), and if needed, this can be eliminated by the introduction of a sedimentation or density marker.

4.9 Fraction size

The question often arises as to what the most advantageous sample size is, given that the 10 micron resolution is obviously overkill. In our experience the smallest sample worth taking is 0.3 mm/fraction. Since the amount of protein, nucleic acid or dpm declines with the sample volume, there is a point where these become limiting. A good rule of thumb from the HPLC folks is to ensure that each peak has about 10 data points to describe it. practice will reveal the sample size that gives that resolution.

Another factor to consider is the reason for doing the gradient. If the purpose is to survey the entire gradient in X number of samples, measure the distance from the bottom of the piston tip at

reset (see above) to the bottom of the cylindrical part of the tube and divide this distance by X . On the other hand, most gradients have large areas of little or no interest. In this case, set up a multistep run where a few large fractions are taken (and discarded) and fine fractionation begins where the important particles are.

4.10 Sampling the bottom of the tube

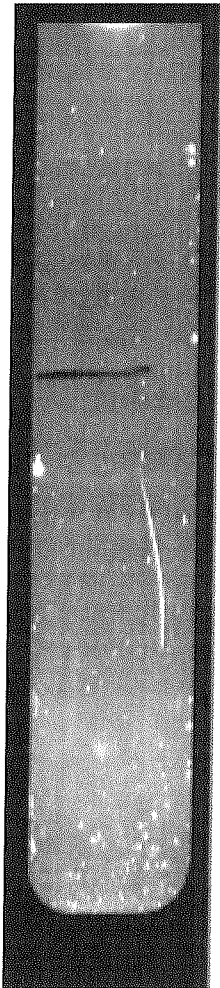
A word on the inaccessible round bottom of the tube. Some users want to fractionate right to the last drop in the tube but the piston is not able to penetrate into the round end. It may take some convincing, but particles that have entered this round zone are not worth fractionating since they have encountered the wall pinching in from the sides and are no longer representative of the same forces that the rest of the gradient has experienced. There is also the danger of damaging the piston tip seal as it is compressed in the round end.

4.11 U.V. Fractionation

Large numbers of users are interested in viewing the gradient profile by UV. The fractionator accommodates this role effortlessly, since it is programmable to take the entire contents in one large fraction at a single fixed speed. We have been recommending the BioRad EM-1 Econo UV Monitor, with its flow cell attached to the moving piston head so that the tubing connection, with its unavoidable smearing, is kept to an absolute minimum. The output from the EM-1 is an analog 1 V signal that we convert to digital with 1:10⁶ resolution for importing into an Excel spreadsheet. This way, no runs are lost because the strip chart was set wrong and the profile can be formatted for publication. Here is a photo of the EM-1 attached to the fractionator's moving head.

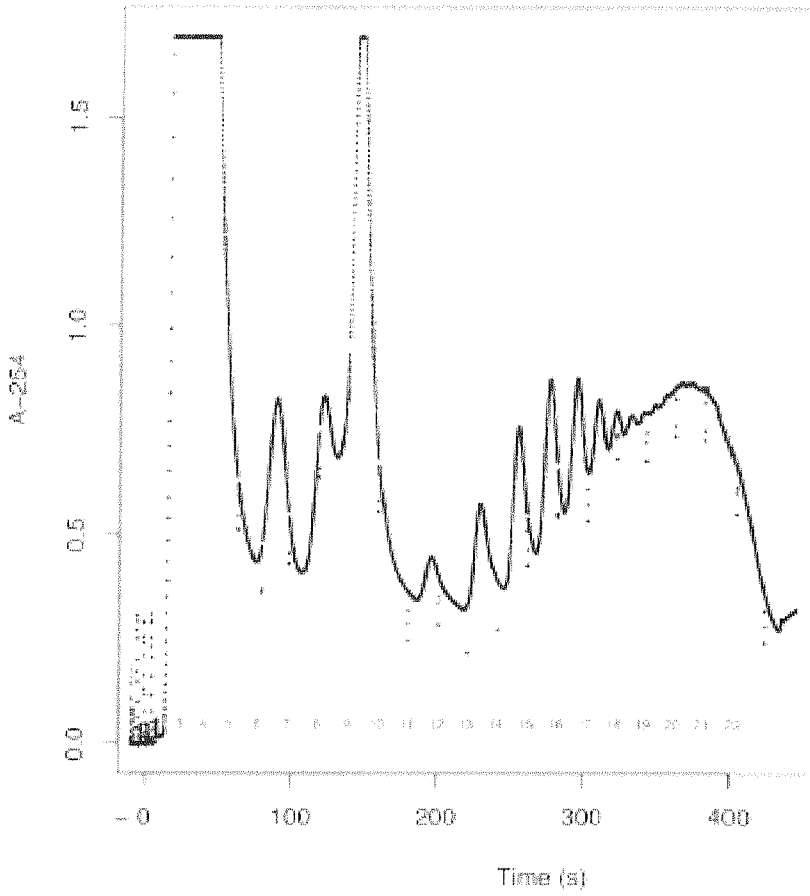


Incredibly, even polysomes are visible to the naked eye with the visible light scattering system. The same gradient gave the profile shown to the right.



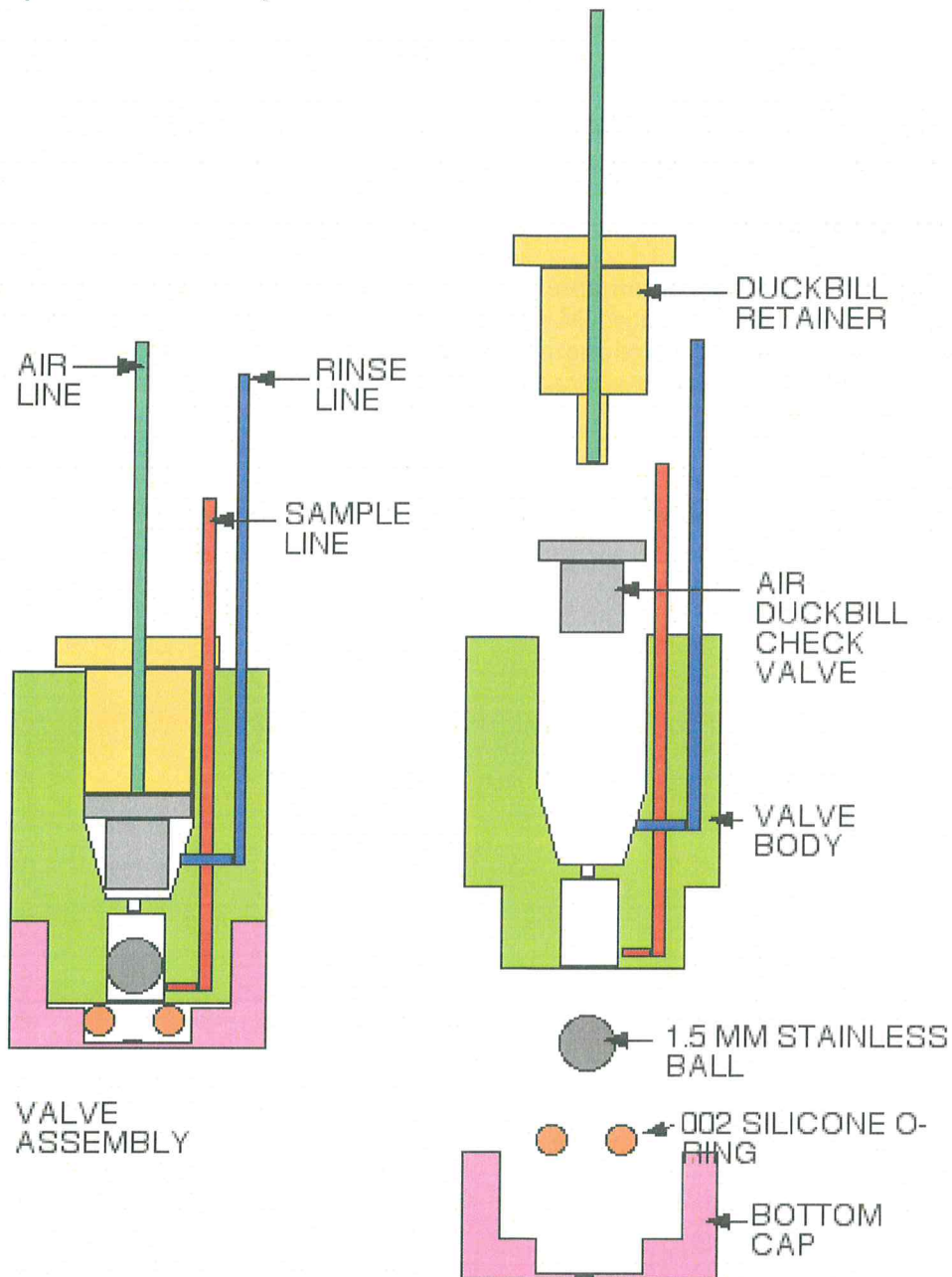
POLYSOME
GRADIENT
→
POLYSOME
PROFILE

081111hela



4.12 The rinse/air valve system.

The piston fractionator offers something no other fractionator ever has: the ability to rinse and dry the tubing between fractions from the point of gradient capture to then end of the tubing. The result is even sharper resolution with little or no smearing of bands. The key here is to tailor the automatic rinse protocol to match your needs.



How the valve works: Liquid is forced up through the bottom O-ring, lifting the ball off the O-ring as the piston moves down into the gradient. The liquid then passes out through the red SAMPLE line to the collector. Between fractions, AIR is pumped down through the duckbill and into the ball chamber, forcing it onto the O-ring and sealing off the gradient below. Air then passes out through the red sample line. RINSE is pumped into the air's duckbill chamber, down into the ball chamber and out the red sample line. Since water is not compressible, the check valve for the rinse line is inside the main unit where it prevents back flow into the rinse system.

Section 5. Post-gradient sample manipulations

5.1 TCA/SDS-PAGE

Add 1/10 vol of 100% w/v TCA, ice the sample for 30 min, spin for 5 min, rinse with 10% TCA, Acetone-Tris, dry and you have samples ready for SDS PAGE.

5.2 Native gels

native gels are a little trickier because the samples may need to be concentrated without resorting to TCA. The best solution we have found is the Centricon-type centrifugal filter.

5.3 Scintillation counting

The most perfect profiles obtainable come from counting the whole sample with a small volume rinse included with each fraction. Most scintillation cocktails can tolerate the rinse with no quenching. Alternatively, you can fractionate and then sample the fractions with a pipetteman so that you can analyze the contents of peak fractions by PAGE.

5.4 UV detection

Take undiluted fractions to the spectrophotometer for UV profiles when the need arises in the absence of a flow cell.



BioComp Instruments, Inc.

DEALER AUTHORIZATION

CZECH REPUBLIC

SLOVAK REPUBLIC

POLAND

HUNGARY

SLOVENIA

I, David Coombs, President of BioComp Instruments, 650 Churchill Row, Fredericton NB, Canada E3B1P6, confirm that,

Biologicals s.r.o.

Sramkova 315

Ricany

251 01

Czech Republic

is our distributor and has the exclusive authority to sell and promote in the above mentioned countries our entire product line of GRADIENT FORMERS and GRADIENT FRACTIONATORS and BLOTTING EQUIPMENT manufactured by BioComp Instruments, Inc.

Nov. 12, 2013

A handwritten signature in black ink that reads "David H. Coombs". The signature is written in a cursive style.

David Coombs
President
BioComp Instruments

David Coombs, President
BioComp Instruments, Inc.
650 Churchill Row
Fredericton, NB E3B1P6
Canada

Web: www.biocompinstruments.com
Email: dhc@nbnet.nb.ca
Fax: 506-455-6157
Phone: 506-454-6410
Toll free: 800-561-4221

