

## Moderne Methoden der Stofftrennung 3

Fachtagung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 2. Schweizerischen Treffen für Chemie  
12. und 13. September 1968, in Basel

### Trennung biologischer Partikel durch Zentrifugation im Dichtegradienten\*

Von W. EICHENBERGER

Institut für organische Chemie der Universität Bern

#### Summary

Density gradient centrifugation is a very effective procedure for both analytical and preparative separation of particles and macromolecules.

The principle is quite simple. The mixture of particles is suspended in a medium of light specific weight and layered on top of a preformed density gradient. Since the components form discrete zones, when centrifuged, the procedure is also called zonal centrifugation. Separation is primarily obtained according to the sedimentation rate (rate zonal separation), which depends predominantly on the particle size.

If a density gradient is used, which covers the complete density range of all fractions, particles reach level of equal density (buoyant density) after a sufficient period of time (isopycnic zonal separation).

In ultracentrifuges at sufficiently high speeds the density gradient does not need to be preformed, but is formed by the centrifugal field itself.

Unlike differential centrifugation, zonal methods allow the quantitative recovery of the separated constituents. Zonal separations in centrifuge tubes with swinging-bucket and fixed-angle rotors and in sector cells have been used for the determination of physical characteristics, such as molecular weight, sedimentation coefficients, density and heterogeneity. Because of the low capacity, however, such experiments have more analytical than preparative significance. For preparative work zonal rotors, consisting of a bowl-shaped vessel, are applied. With these rotors, which combine a large capacity with the freedom from mechanical disturbances and wall effects, a great number of biological particles and macromolecules have been isolated, such as nuclei, mitochondria, polysomes, ribosomes, viruses and macroglobulines. Zonal rotors for continuous flow operations allow the collection and purification of particles from very large quantities of medium.

#### 1. Einleitung

Unter den Verfahren der Stofftrennung nimmt die Zentrifugation eine sehr wichtige Stellung ein. Ihre Bedeutung ist eine doppelte. Einerseits hat sich das Ver-

fahren zu einem wichtigen analytischen Hilfsmittel entwickelt und erlaubt, mit geringen Substanzmengen wichtige Stoffgrößen von Partikeln und Makromolekülen zu bestimmen. Andererseits ist es möglich, durch Zentrifugation große Mengen von Partikelgemischen zu zerlegen und die einzelnen Komponenten in präparativem Maßstabe anzureichern oder rein dazustellen.

Eine ganz besondere Bedeutung hat die Zentrifugation für die biologischen Arbeitsgebiete erlangt. Sie stellt nämlich den einfachsten und schonendsten Weg dar, um die Untereinheiten des lebenden Organismus, die Zellen, Zellorganellen und Enzyme, unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität zu gewinnen. Da der Wert solcher Präparationen in erster Linie an ihrer Menge und Reinheit gemessen wird, sind fortwährend Anstrengungen unternommen worden, um Trennwirkung und Kapazität der Zentrifugationsmethoden zu verbessern. Die Verwendung von Dichtegradienten hat in dieser Richtung sehr große Fortschritte gebracht, welche vor allem durch Biologie und Biochemie ausgenutzt worden sind.

Um die grundsätzlichen Unterschiede des Dichtegradientenverfahrens gegenüber den herkömmlichen Varianten zu verdeutlichen, sollen zuerst die allgemeinen Grundlagen der Zentrifugation kurz gestreift werden.

#### 2. Grundlagen

Wie in Abb. 1 dargestellt ist, greifen an einem Teilchen vom Volumen  $V$  und der Dichte  $\rho'$  (= Masse pro Volumen) in einem gegebenen Zentrifugalfeld drei Kräfte an, nämlich die Zentrifugalkraft  $K_1$ , der Auftrieb  $K_2$  und die Reibung  $K_3$ .

$$\begin{aligned} \text{Es sind} \quad K_1 &= \omega^2 r V \rho', \\ K_2 &= \omega^2 r V \rho, \\ K_3 &= S f. \end{aligned}$$

\* Nach einem Vortrag, gehalten am 13. September 1968 anlässlich des 2. Schweizerischen Treffens für Chemie in Basel. Die Arbeit steht in Zusammenhang mit einem durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützten Projekt.

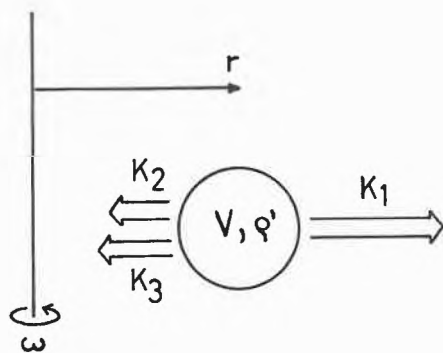


Abb. 1. Kräfte im Zentrifugalfeld

Darin bedeuten  $r$  Abstand vom Rotationszentrum,  
 $\omega$  Winkelgeschwindigkeit des Rotors,  
 $\rho$  Dichte des Mediums,  
 $f$  Reibungsfaktor,  
 $S$  Sedimentationsgeschwindigkeit.

Im Kräftegleichgewicht gilt die Beziehung

$$K_2 + K_3 = K_1$$

oder

$$K_3 = K_1 - K_2$$

und

$$Sf = \omega^2 r V \rho' - \omega^2 r V \rho.$$

Daraus erhält man für die Sedimentationsgeschwindigkeit

$$S = \omega^2 r \frac{V(\rho' - \rho)}{f}. \quad (1)$$

Wird  $\rho' < \rho$ , so wird die Sedimentationsgeschwindigkeit negativ, und man erhält anstelle der Sedimentation eine Flotation.

Wenn  $\omega$ ,  $r$  und  $\rho$  gegeben sind, ist die Sedimentationsgeschwindigkeit nur noch abhängig von den Eigenschaften des Teilchens, nämlich von seinem Volumen (d. h. der Teilchengröße), seiner Dichte und seiner Form, welche im Reibungsfaktor enthalten ist.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit, bezogen auf die Zentrifugalbeschleunigung<sup>1</sup>, wird nach SVEDBERG und PEDERSEN<sup>2</sup> als Sedimentationskonstante  $s$  bezeichnet.

$$s = \frac{S}{\omega^2 r} = \frac{V(\rho' - \rho)}{f}. \quad (2)$$

Die Sedimentationskonstante stellt eine vom Zentrifugalfeld unabhängige, charakteristische Größe dar, welche die Gesamtheit der Teilcheneigenschaften einschließt. Sie wird in Svedberg-Einheiten (S) von  $10^{-13}$  sec gemessen und kann zum Vergleich von Sedimentationsgeschwindigkeiten verwendet werden. Partikel besitzen um so höhere Sedimentationskonstanten, je schneller sie unter gegebenen Verhältnissen sedimentieren.

Zum Vergleich von Sedimentationskonstanten, die in verschiedenen Lösungsmitteln gemessen worden sind, kann man die gemessenen Werte auf Wasser bei  $20^\circ\text{C}$  als Medium beziehen.

Bei kleinen Partikeln im molekularen Größenbereich interessiert in erster Linie das Molekulargewicht. Statt der Dichte verwendet man in diesem Falle das partielle spezifische Volumen  $\bar{v}$ , welches die reziproke Dichte in Lösung ausdrückt und abhängig ist vom Lösungsmittel und der Konzentration.

Ferner kann man nach dem Gesetz von EINSTEIN (Gleichung 3) den Reibungsfaktor  $f$  ersetzen. Dieser läßt sich nämlich anhand der Diffusion bestimmen, da ein Teilchen bei der Diffusion dieselbe Reibung erfährt wie bei der Sedimentation.

$$f = \frac{RT}{DN}. \quad (3)$$

Darin bedeuten  $R$  Gaskonstante,  
 $T$  Temperatur,  
 $D$  Diffusionskonstante,  
 $N$  Avogadro'sche Zahl.

Man erhält dann für die Sedimentationskonstante

$$s = \frac{MD(1 - \bar{v}\rho)}{RT}. \quad (4)$$

Wie dieser Ausdruck zeigt, lassen sich aus der Sedimentationskonstanten wichtige molekulare Größen berechnen.

### 3. Arten der Trennung

Wie aus Gleichung (1) hervorgeht, werden Sedimentationsgeschwindigkeit und -konstante in erster Linie durch das Teilchenvolumen bestimmt. Eine Trennung nach Sedimentationsgeschwindigkeit kommt daher im wesentlichen der Zerlegung eines Gemisches nach Teilchengröße gleich.

Gemische biologischer Partikel lassen sich grundsätzlich nach diesem Gesichtspunkte trennen, da sich ihre Größen, wie Tabelle 1 zeigt, über mehrere Zehnerpotenzen erstrecken.

Tabelle 1. Größe biologischer Partikel

	nm
Zellkerne	10000
Chloroplasten	6000
Mitochondrien	1000
Viren	300 bis 10
Phagen	100 bis 50
Ribosomen	15
Hämoglobin	5
Saccharose	0,5

Die Trennung nach Sedimentationsgeschwindigkeit kann grundsätzlich auf zwei Arten durchgeführt werden:

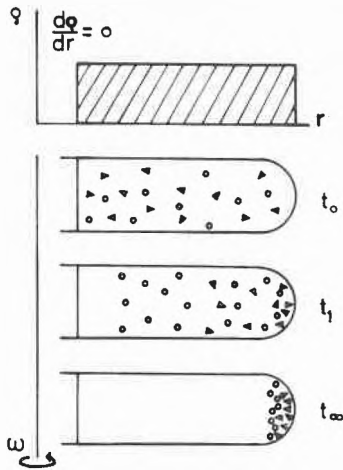


Abb. 2. Differentialzentrifugation

Bei der *Differentialzentrifugation*, welche in Abb. 2 schematisch dargestellt ist, wird das zu trennende Gemisch in einem homogenen Medium suspendiert, dessen Dichte überall die gleiche ist. Während der Zentrifugation setzen sich die verschiedenen Teilchen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Eine gute Trennung wird jedoch nur dann erhalten, wenn die Teilchengrößen der einzelnen Komponenten um etwa eine Größenordnung auseinanderliegen. Wie Tabelle 1 zeigt, ist dies etwa der Fall für Kerne, Mitochondrien und Ribosomen. Häufig ist diese Voraussetzung jedoch nicht erfüllt, was zur Folge hat, daß auf diesem Wege nur eine Grobfraktionierung erreicht werden kann. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß alle Komponenten gleichzeitig zu sedimentieren beginnen und damit Anteile der langsameren Komponente ins Sediment der schnelleren gelangen. Eine quantitative Rückgewinnung der langsamen Komponente ist daher grundsätzlich nicht möglich.

Beim zweiten Verfahren, das in Abb. 3 dargestellt ist, wird das Partikelgemisch in einem spezifisch leichten Medium suspendiert und in dünner Schicht oben auf eine Säule dichteren Mediums geschichtet. Während der Zentrifugation sedimentieren dann die einzelnen Kom-

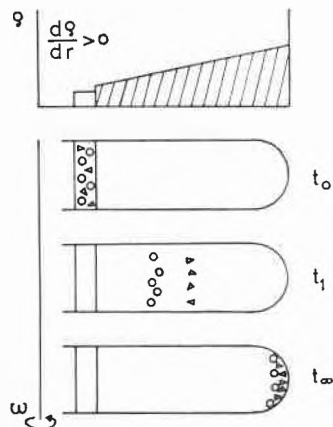


Abb. 3. Zonen-zentrifugation (rate zonal separation)

ponenten, ausgehend von derselben Startlinie, in der Form diskreter Zonen. Nach diesen ist das Verfahren als *Zonen-zentrifugation* bezeichnet worden.

Im Unterschied zur Differentialzentrifugation wird hier ein Medium verwendet, dessen Dichte von oben nach unten zunimmt und das infolgedessen einen *Dichtegradienten*  $d\rho/dr$  aufweist. Dieser bewirkt, daß in der Flüssigkeitssäule unter jede Schicht eine solche höherer Dichte zu liegen kommt, und stabilisiert dadurch die Partikelzonen und die Flüssigkeitssäule während der Zentrifugation. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wird eine solche Trennung nach Sedimentationsgeschwindigkeit (rate zonal separation) zum Zeitpunkt  $t_1$ , d.h. wenn die Zonen die gewünschte Lage erreicht haben, unterbrochen. Die einzelnen Zonen können darauf quantitativ zurückgewonnen werden. Für dieses Verfahren wird in der Regel ein flacher Dichtegradient mit einem engen Dichtebereich gewählt.

Ein wesentlicher Vorteil der Zonen-zentrifugation liegt nun aber in der Möglichkeit, ein Partikelgemisch nach einem weiteren Gesichtspunkt, nämlich nach der Dichte, zu zerlegen. Wird der Dichtebereich der Gradientenlösung so gewählt, daß er die Dichte der sedimentierenden Teilchen einschließt, dann wandern diese während der Zentrifugation nur so weit, bis sie in den Bereich gleicher Dichte gelangen. Bei dieser *isopyknischen Zonen-zentrifugation* (isopycnic zonal separation), die in Abb. 4 dargestellt ist, erfolgt eine Auftrennung des Partikelgemisches, unabhängig von den übrigen Teilcheneigenschaften, ausschließlich nach deren Dichte. Für diese Variante wird im allgemeinen ein Dichtegradient mit großem Dichtebereich und eine längere Zentrifugationszeit benötigt.

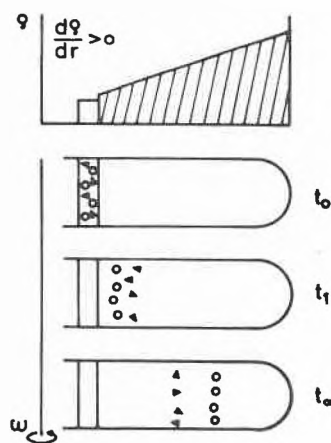


Abb. 4. Isopyknische Zonen-zentrifugation (isopycnic zonal separation)

#### 4. Herstellung von Dichtegradienten

Dichtegradienten können auf verschiedene Weise dargestellt werden. Eine einfache Methode, die u.a. von KREUTZ und MENKE<sup>3</sup> verwendet wurde, besteht darin, daß Lösungen verschiedener Dichte im Zentrifugenglas

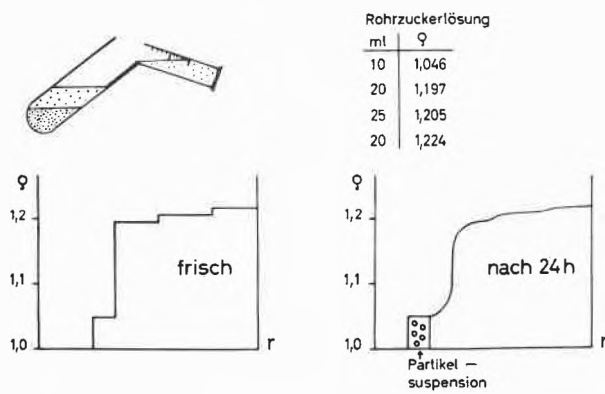


Abb. 5. Herstellung von Rohrzucker-Dichtegradienten durch Übersichten

sorgfältig übereinandergeschichtet werden, wie dies in Abb. 5 dargestellt ist.

Beim Stehen während 12 bis 24 Stunden glättet sich der anfänglich stufenförmige Gradient durch Diffusion. Soll der Dichteverlauf kontinuierlich sein oder eine bestimmte Form aufweisen, werden mit Vorteil andere Einrichtungen verwendet. Sehr nützlich ist eine Anordnung, wie sie schematisch in Abb. 6 dargestellt ist und die im Prinzip aus zwei kommunizierenden Gefäßen besteht, welche eine schwerere und eine leichtere Lösung enthalten. Die ausfließende schwerere Lösung wird dabei kontinuierlich mit der noch vorhandenen leichteren vermischt, wodurch die Dichte des ausfließenden Gemisches eine Funktion des ausgeflossenen Volumens wird. Sie wird durch eine Gleichung dargestellt, in der das Verhältnis der beiden Gefäßquerschnitte als Exponent vorkommt. Bei Gleichheit der Querschnitte entsteht ein linearer, bei Ungleichheit ein konvexer oder konkaver

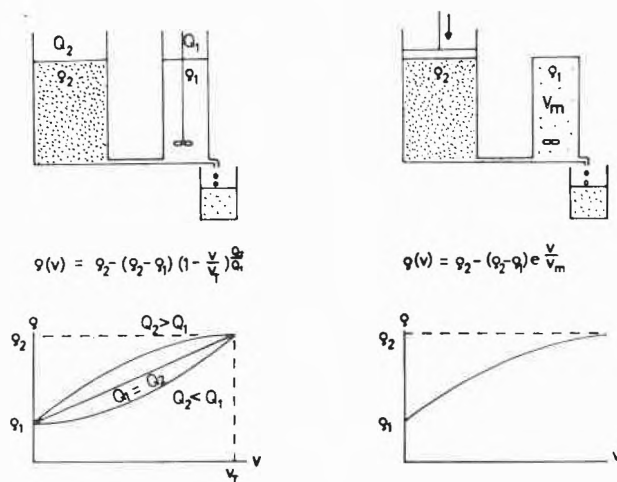


Abb. 6. Herstellung kontinuierlicher Dichtegradienten

- $\rho_1, \rho_2$  Dichte der Ausgangslösungen
- $\rho$  Dichte der Mischung
- $Q_1, Q_2$  Querschnitt der Gefäße
- $V$  Volumen der Mischung
- $V_T$  Totalvolumen der Ausgangslösungen
- $V_m$  Volumen des Mischgefäßes

Dichteverlauf. Wird das Volumen des Mischgefäßes konstant gehalten, so entsteht ein exponentieller Gradient. Solche Einrichtungen lassen sich mit den üblichen Glasgeräten improvisieren. Ferner gibt es im Handel eine Reihe von Geräten, die darauf beruhen, daß die beiden Lösungen gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, aus zwei Pipetten ausgepreßt und in einem Mischelement gemischt werden. Im allgemeinen haben sich Dichtegradienten mit konvexem Dichteverlauf bewährt.

Für die Gradientenlösung wird eine geeignete Beimischung verwendet, die im Idealfall spezifisch schwer, sehr gut löslich, nicht toxisch, nicht viskös und osmotisch wenig wirksam sein sollte. Eine Auswahl häufig gebrauchter Stoffe ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Zur Herstellung von Dichtegradienten häufig verwendete Stoffe

	Dichtebereich	Osmotische Aktivität	Viskosität
Rohrzucker	1,0 bis 1,3	hoch	hoch
Glycerin	1,0 bis 1,26	hoch	hoch
Ficoll	1,0 bis 1,17	niedrig	hoch
Polyvinylpyrrolidon		niedrig	
Diodon	1,0 bis 1,36		niedrig
Urografin	1,0 bis 1,35		niedrig
D <sub>2</sub> O	1,0 bis 1,1		niedrig
CsCl	1,0 bis 1,9	hoch	niedrig
Cs-Formiat	1,0 bis 2,3	hoch	niedrig
CCl <sub>4</sub> -Hexan	0,66 bis 1,59	-	niedrig

Weitaus am häufigsten wird Rohrzucker verwendet, welcher gegenüber biologischen Strukturen keine nachteilige Wirkung zeigt. Häufig werden auch osmotisch weniger aktive Polysaccharide verwendet, die aber den Nachteil hoher Viskosität haben. Rb- und Cs-Salze finden vor allem in der Ultrazentrifuge Verwendung, weil sich mit diesen besonders hohe Dichten erreichen lassen. Neben wässrigen Gradientenlösungen werden auch solche aus organischen Lösungsmitteln, z. B. Tetrachlorkohlenstoff und Hexan, verwendet. Unabhängig voneinander haben BEHRENS und THALACKER<sup>4</sup>, HEBER<sup>5</sup> und STOCKING<sup>6</sup> auf diesem Wege verschiedene Organellen aus lyophilisiertem Pflanzenmaterial isoliert. Diese Medien bringen den Vorteil, daß die wasserlöslichen Bestandteile in den Strukturen verbleiben und nicht wie bei der wässrigen Isolierung ausgewaschen werden. Allerdings treten dafür Verluste an Lipiden ein, und die unphysiologischen Bedingungen führen zur Inaktivierung gewisser Enzymsysteme.

### 5. Zentrifugation mit herkömmlichen Zentrifugen

Solange die Partikel groß genug und die zu ihrer Bewegung nötigen Beschleunigungen gering sind, können solche Trennungen auf niedertourigen Zentrifugen durchgeführt werden. KREUTZ und MENKE<sup>3</sup> haben nach

diesem Verfahren in präparativem Maßstab Chloroplasten aus höheren Pflanzen dargestellt. Der Dichtegradient wurde durch Übereinanderschichten von Rohrzuckerlösungen verschiedener Dichte hergestellt. Die durch Differentialzentrifugation angereicherten Chloroplasten wurden in halbmolarer Zuckerlösung suspendiert und oben auf die Gradientensäule geschichtet. Bei einer Beschleunigung von 3500 g erreichten die Partikel, wie in Abb. 7 dargestellt ist, nach 1 bis 2 Stunden die Gleichgewichtslage und konnten anschließend abpipettiert werden.

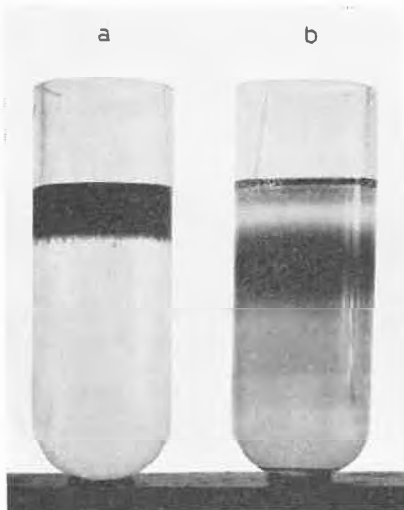


Abb. 7. Zentrifugation von Chloroplasten im Rohrzucker-Dichtegradienten, a) vor und b) nach der Zentrifugation

Neben Trennungen nach Dichte dieser Art wurden auf ähnlichem Weg Trennungen nach Sedimentationsgeschwindigkeit durchgeführt. BRAKKE<sup>7</sup> hat diese Methode zur präparativen Darstellung pflanzlicher Viren verwendet. Wegen der Kleinheit der Partikel können solche Experimente nur in Ultrazentrifugen bei hohen Beschleunigungen durchgeführt werden. Zur Rückgewinnung der getrennten Zonen sind verschiedene Verfahren gebräuchlich. Kunststoffröhrchen können mit einer Injektionsspritze seitlich oder am Boden angestochen und der Inhalt auf diese Weise konvektionsfrei abgezogen oder durch leichten Überdruck ausgepreßt werden. Im ausfließenden Medium können die Komponenten photometrisch bestimmt werden. Wird der Leerungsvorgang vorher genau geeicht, so kann aus der Lage einer Substanz innerhalb der aufgefängenen Fraktionen und der Geometrie des Zentrifugenrohres die Verschiebung der Zonen berechnet werden, die während der Zentrifugation stattgefunden hat. Aus diesem Sedimentationsweg während eines bestimmten Zeitintervalls können Sedimentationskonstanten berechnet werden. MARTIN und AMES<sup>8</sup> haben diesen Wert durch Vergleich mit einer im System mitzentrifugierten Substanz mit bekannter Sedimentationskonstante erhalten. ABELSON und THOMAS<sup>9</sup> dagegen

haben aus dem Sedimentationsweg die Sedimentationsgeschwindigkeit berechnet und diese in Gleichung (2) eingesetzt.

Zur bloßen Lokalisierung von Zonen wurde von COLE und BROOKS<sup>10</sup> ein Verfahren beschrieben, nach welchem dem Medium Acrylamid beigemischt wird, welches nach der Zentrifugation durch Belichtung zur Polymerisation gebracht wird. Dadurch verfestigt sich der Inhalt des Rohres zu einem Gel und kann nach dem Herausnehmen, ähnlich wie bei der Gelelektrophorese, in Lösungen spezifischer Farbstoffe eingelegt werden.

Die Verwendung von Ultrazentrifugen bringt zwar einerseits technischen Mehraufwand, andererseits aber methodische Vorteile mit sich. Bei Anwendung genügend hoher Beschleunigungen kann auf die vorgängige Herstellung eines Dichtegradienten verzichtet werden. Ein solcher bildet sich unter dem Einfluß des Zentrifugalfeldes in einer Salzlösung von selber aus. Infolge der Rückdiffusion entsteht nach einiger Zeit ein Sedimentationsgleichgewicht. HEARST, IFFT und VINOGRAD<sup>11</sup> haben berechnet, daß der Dichteverlauf sich in guter Näherung durch den folgenden Ausdruck beschreiben läßt:

$$\frac{d\rho}{dr} = \frac{\omega^2 r}{\beta_0} + \omega^2 r \kappa. \quad (7)$$

Dabei bedeuten  $\rho$  Dichte,  
 $r$  Abstand vom Rotationszentrum,  
 $\omega$  Winkelgeschwindigkeit,  
 $\beta_0$  Konstante,  
 $\kappa$  Kompressibilität.

Bei Vernachlässigung des zweiten Gliedes, das den durch die Kompression entstandenen Anteil enthält und das nur etwa 10% des Gesamten ausmacht, ist der Gradient proportional zum Abstand vom Rotationszentrum.

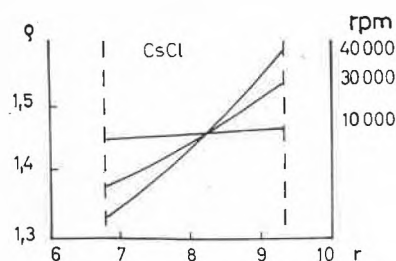


Abb. 8. Ausbildung des Dichtegradienten in CsCl-Lösungen in der Ultrazentrifuge bei verschiedenen Umdrehungszahlen (nach IFFT, VOET und VINOGRAD<sup>24</sup>)

Dies bedeutet, daß die Dichte mit dem Radiusquadrat zunimmt. Bei genügendem Abstand vom Rotationszentrum ist diese Kurve, wie Abb. 8 zeigt, nur wenig von einer Geraden verschieden. Ihre Steilheit hängt jedoch sehr stark von der Umdrehungszahl ab.

Das zu trennende Gemisch kann der homogenen Salzlösung von Anfang an beigemischt werden. Wie Abb. 9

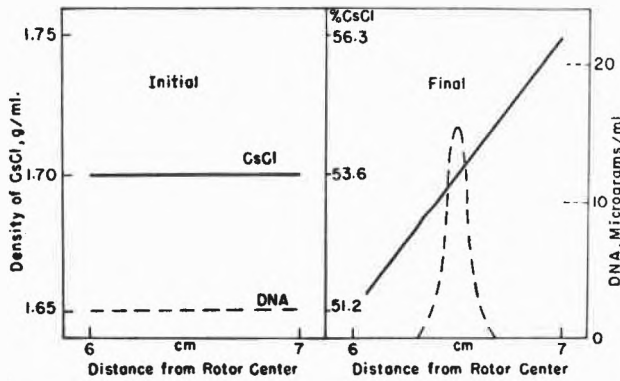


Abb. 9. Konzentrationsverteilung von CsCl und DNA vor und nach der Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei etwa 45 000 rpm (nach VINOGRAD und HEARST<sup>14</sup>)

zeigt, suchen die suspendierten Teilchen gleichzeitig mit der Ausbildung des Dichtegradients den ihrer Dichte entsprechenden Bereich auf und sammeln sich da in einer Bande. Auf diese Weise können wertvolle Aufschlüsse über die Zusammensetzung eines Gemisches erhalten werden.

MESELSON und STAHL<sup>12</sup> haben auf diese Weise DNA-Gemische getrennt und damit die DNA-Replikation in Bakterien sehr schön veranschaulichen können. Einem Stamm von *E. coli* wurde längere Zeit Stickstoff ausschließlich in der Form des (schweren) <sup>15</sup>N-Isotops angeboten und damit erreicht, daß die DNA dieser Kultur nur <sup>15</sup>N enthält. Zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde dann das Nährmilieu gegen ein solches mit normalem (leichtem) <sup>14</sup>N vertauscht und die Kultur veranlaßt, von da an nur DNA mit leichtem Stickstoff zu synthetisieren. Da die DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen vereinigt werden, ergeben sich insgesamt drei mögliche Formen von doppelsträngiger DNA. Zwei davon bestehen aus je zwei schweren oder leichten Einzelsträngen, während die dritte, eine hybride Form, einen leichten und einen schweren Einzelstrang enthält. Diese drei Formen unterscheiden sich in ihrer Dichte um etwa 0,5% und können in einem CsCl-Dichtegradienten voneinander getrennt und im UV-Licht fotografiert werden. Wie Abb. 10 zeigt, entstehen dabei die drei erwarteten Banden. Die periodischen Analysen, angefangen im Zeitpunkt des Milieuwechsels, zeigen sehr anschaulich, wie die ursprünglich schwere DNA im Verlaufe der semikonservativen Replikation nach und nach durch die hybride und schließlich durch die normale Form ersetzt wird.

Gute Ergebnisse können auch mit präparativen Ultrazentrifugen erhalten werden. Eine bessere Trennung und gleichzeitig eine merkliche Steigerung der Kapazität haben FLAMM, BOND und BURR<sup>13</sup> erzielt, indem sie statt eines Schwenkbecherrotors einen Winkelrotor verwendeten. Wie in Abb. 11 skizziert ist, verringert sich im schräg stehenden Zentrifugenrohr die Höhe der Flüssigkeitssäule in Richtung des Zentrifugalfeldes, wodurch die für die Einstellung der Gleichgewichte nötigen Lauf-

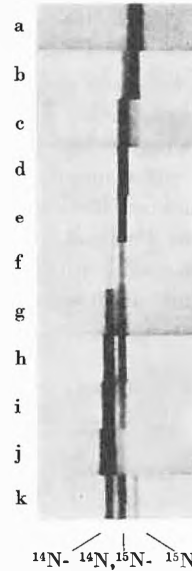


Abb. 10. Zentrifugation von Bakterien-DNS im CsCl-Dichtegradienten. Die auf einem ausschließlich <sup>15</sup>N enthaltenden Nährmilieu gezogene Kultur bildet anfänglich reine <sup>15</sup>N-DNA (a). Diese wird nach Vertauschung des Nährmilieus gegen ein solches mit normalem Stickstoff (<sup>14</sup>N) nach und nach durch die hybride Form (b-e) und schließlich durch <sup>14</sup>N-DNA ersetzt (f-j). Probe k stellt ein Gemisch von a) und g) dar und enthält alle drei Komponenten (nach MESELSON und STAHL<sup>12</sup>)

zeiten verkürzt werden. Der größere Säulenquerschnitt erlaubt gleichzeitig eine stärkere Beladung. Da sich die Flüssigkeitssäule in Ruhestellung wieder in Richtung des Zentrifugenrohres dreht, werden die Zonen auseinandergezogen und können daher leichter isoliert werden. Auf diese Weise ließen sich in einem Winkelrotor ungefähr fünfmal mehr DNA als im gleichen Flüssigkeitsvolumen mit einem Schwenkbecherrotor gewinnen.

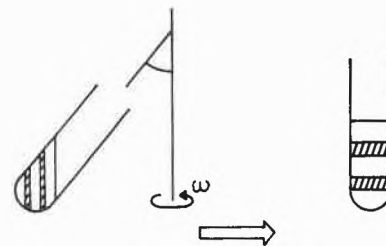


Abb. 11. Dichtegradientenzentrifugation im Winkelrotor

Zentrifugation	Isolation
geringe Säulenhöhe	flacher Gradient
kürzere Laufzeit	geringer Querschnitt
großer Säulenquerschnitt	größerer Abstand der Zonen
größere Beladung	größere Zonenbreite

Einen Überblick über die Dichtegradientenzentrifugation mit herkömmlichen Ultrazentrifugen gibt eine Arbeit von VINOGRAD und HEARST<sup>14</sup>.

Infolge der beschränkten Volumenkapazität sind die herkömmlichen Rotoren für viele präparative Zwecke ungeeignet, besonders, wenn es sich um die Isolierung von Stoffen aus großen Flüssigkeitsmengen im Liter- oder Zehnliterbereich handelt.

## 6. Zentrifugation in Zonalrotoren

In den fünfziger Jahren wurden am Oak Ridge National Laboratory in Tennessee von ANDERSON und Mitarbeitern ein neuer Rotortyp entwickelt, der speziell für die Zonenzentrifugation konzipiert und daher als Zonalrotor (zonal rotor) bezeichnet wurde. Wie Abb. 12 zeigt, besteht dieser aus einem zerlegbaren Gefäß mit zylindrischem Hohlraum, welcher durch vier Flügel in vier miteinander in Verbindung stehende Sektoren unterteilt ist. Ein typischer Arbeitsgang ist in Abb. 13 skizziert.



Abb. 12. A-XII-Zonalrotor (nach Measuring & Scientific Equipment, Ltd. [MSE], London)

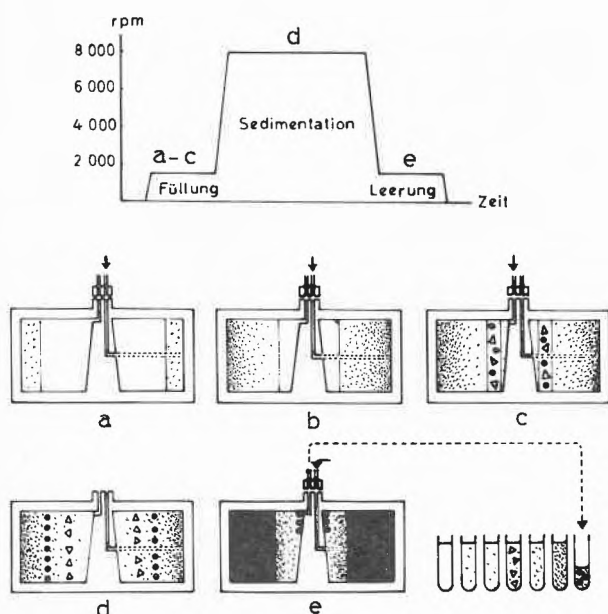


Abb. 13. Funktionsweise des Zonalrotors

Zuerst wird die Gradientenlösung mit dem leichten Ende voran durch eine im Zentrum eingeführte und durch die Flügel bis zuäusserst führende Zuleitung in den mit niedriger Umdrehungszahl laufenden Rotor eingefüllt (Abb. 13 a-b). Die nachfließende schwerere Lösung verdrängt dabei die leichtere in Richtung auf die Rotorachse zu. In diesem rotierenden und durch die Zentrifugalkraft stabilisierten Flüssigkeitszylinder nimmt die Dichte, wie im Zentrifugenrohr, von innen nach außen zu.

Zuletzt wird durch eine zweite Zuleitung, die direkt an der Achse in den noch frei gebliebenen Raum mündet, das Partikelgemisch eingeführt und mit einer spezifisch leichteren Lösung als Kissen überdeckt (c). Für die Trennung wird die Umdrehungszahl gesteigert, wobei die Partikelzonen in Form konzentrischer Kreise nach außen wandern (d). Nachdem diese die gewünschte Lage erreicht haben, wird der Rotor wiederum verlangsamt. Zur Leerung wird eine spezifisch schwere Verdrängungsflüssigkeit eingepumpt, die den Rotorinhalt von außen her durch die axiale Zuleitung nach außen drückt, wo er in Fraktionen aufgefangen werden kann (e). Die konische Gestalt der achsseitigen Wand des Rotors erlaubt dabei eine sehr scharfe Trennung der Zonen.

Der Zonalrotor bietet gegenüber den herkömmlichen Systemen ganz entscheidende Vorteile:

1. Die große Volumenkapazität, welche erlaubt, mit Flüssigkeitsmengen bis zu 1,6 Liter pro Lauf zu arbeiten.
2. Die Möglichkeit, den Aufbau des Gradienten, die eigentliche Zentrifugation und die Leerung unter steter Wirkung des Zentrifugalfeldes und damit unter Ausschluß mechanischer Störungen durchzuführen.
3. Die ungestörte Sedimentation, die hier, im Gegensatz zum Zentrifugenbecher, für jedes Teilchen gewährleistet ist.
4. Die Möglichkeit, je nach Wahl des Dichtebereiches der Gradientenlösung eine Trennung nach Teilchengröße oder nach Teilchendichte durchzuführen.

Für die verschiedenen Erfordernisse sind entsprechende Typen von Zonalrotoren entwickelt worden, welche von mehreren Firmen hergestellt und in den Handel gebracht werden. In Tabelle 3 sind die Daten einiger üblicher Vertreter aufgeführt.

Tabelle 3. Daten von Zonalrotoren (nach Measuring & Scientific Equipment Ltd. [MSE], London)

Rotor	Material	Radius cm	Volumen ml	Maximale Umdrehungs- zahl rpm	Maximale Beschleunigung g
A-XII	Al Plexiglas	17,2	1300	6000	7000
B-XIV	Al	6,6	650	30000	67100
	Ti	6,6	650	37000	102000
B-XV	Al	8,8	1670	21000	43800
	Ti	8,8	1670	26000	67200

Die A-Rotoren sind für niedrige Umdrehungszahlen bestimmt und können infolge der geringen mechanischen Beanspruchung teilweise aus durchsichtigem Material konstruiert werden. Diese Bauweise erlaubt, den Trennprozeß sichtbar zu verfolgen, zu photographieren oder zu messen.



Die B-Rotoren sind für hohe Beschleunigungen und daher aus Al oder Ti konstruiert.

Zonalrotoren sind in den letzten Jahren sehr vielseitig angewendet worden. Sie eignen sich hervorragend dazu, Trennungen nach Teilchengröße und nach Teilchendichte in wechselseitiger Ergänzung durchzuführen. Diese Kombination ist sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke von großem Vorteil.

PRICE und HIRVONEN<sup>15</sup> haben A-Rotoren dazu benutzt, um Sedimentationskonstanten und Dichten von Plastiden zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde, wie in Abb.14 schematisch dargestellt ist, über dem durchsichtigen Rotor ein Binokular mit Mikrometer montiert, mit welchem die Verschiebung der Zonen während der Zentrifugation direkt gemessen werden konnte. Aus diesen Werten und aus der Entfernung vom Rotationszentrum, bei der die Messung durchgeführt wurde, konnte nach Gleichung (2) die Sedimentationskonstante berechnet werden. In einem zweiten Experiment mit demselben Rotor wurde auf einem entsprechenden Dichtegradienten bis zur Gleichgewichtslage zentrifugiert und dadurch die Dichte der Plastiden ermittelt.

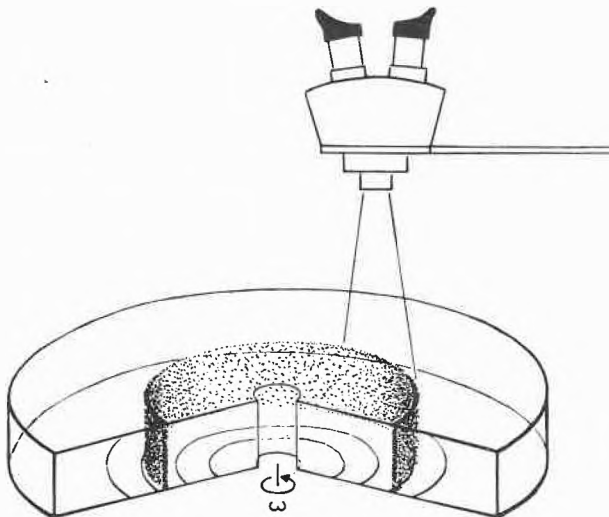


Abb.14. Messung der Sedimentation in A-Rotoren (nach PRICE und HIRVONEN<sup>15</sup>)

Sedimentationskonstante und Dichte ergeben ein Wertepaar, welches für die betreffende Partikelsorte charakteristisch ist. In einem Diagramm, auf dessen Ordinate die Dichte und auf dessen Abszisse die Sedimentationskonstante dargestellt ist, kommt diesem Wertepaar die Bedeutung von Koordinaten zu. Man bezeichnet diese als  $s-\rho$ -Koordinaten und den zugehörigen Raum als  $s-\rho$ - oder Anderson-Space.

Die  $s-\rho$ -Koordinaten sind von einer Reihe von subzellulären Partikeln bestimmt worden. Wie aus Abb.15 ersichtlich ist, findet man die verschiedenen Gruppen in ganz bestimmten Bereichen des Diagrammes.

Die  $s-\rho$ -Koordinaten lassen sich weiter dazu benutzen, um den physiologischen Zustand von Organellen zu

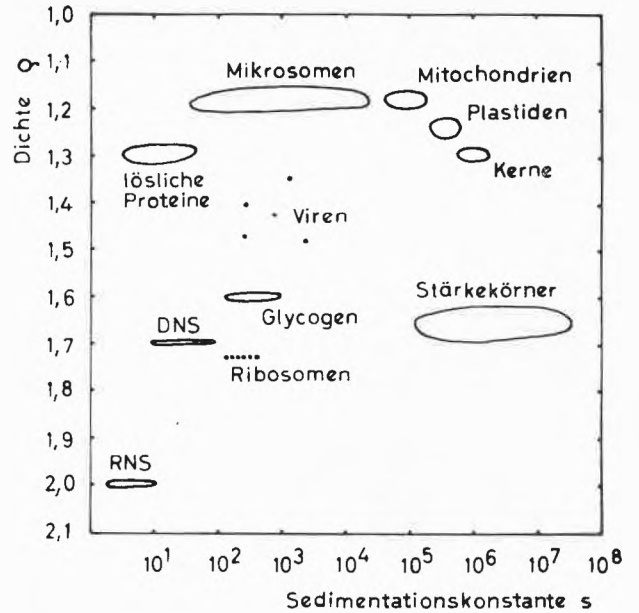


Abb.15.  $s-\rho$ -Werte biologischer Partikel (nach PRICE und HIRVONEN<sup>15</sup>)

charakterisieren. KNIGHT und PRICE<sup>16</sup> haben auf diesem Weg die lichtinduzierte Entwicklung der Plastiden in *Euglena* verfolgt. Diese Alge bildet, wenn im Dunkeln gezüchtet, nur pigmentfreie und zur Photosynthese nicht befähigte Plastiden aus. Unter zunehmender Belichtung entwickeln sich diese jedoch zu vollwertigen Chloroplasten. Wie Abb.16 zeigt, nehmen dabei die  $s-\rho$ -Werte allgemein zu, was mit der Volumenvergrößerung der Plastiden und der Bildung von spezifisch schweren Assimilationsprodukten zusammenhängt.

Die Serie der B-Rotoren wird vor allem für kleinere Partikel im Größenbereich der Viren, Ribosomen und Proteine angewandt.

Mit Hilfe eines B-IV-Rotors haben REIMER<sup>17</sup> et al. Influenza-Viren vom Molekulargewicht von etwa  $3 \cdot 10^8$  und einer Sedimentationskonstante von 722 S isoliert.

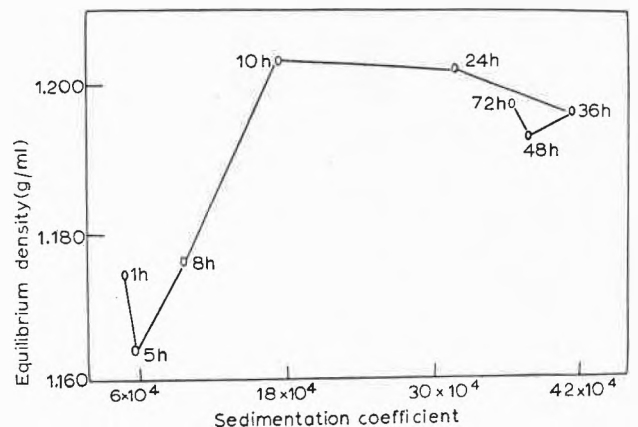


Abb.16.  $s-\rho$ -Werte von Plastiden aus *Euglena* während der lichtinduzierten Entwicklung (nach KNIGHT und PRICE<sup>16</sup>)



Das auf Hühnerembryonen gezüchtete und zuerst durch Differentialzentrifugation angereicherte Virus wurde zunächst auf einem Rohruckergradienten niedriger Dichte (12 bis 34%) nach Teilchengröße und anschließend auf einem solchen höherer Dichte (34 bis 50%) nach Dichte zentrifugiert. Auf diesem Wege wurde eine reine Virusfraktion erhalten, die im Unterschied zur Ausgangsfraktion keine pyrogenen Verunreinigungen mehr enthielt.

KLUCIS und GOULD<sup>18</sup> haben auf demselben Rotortyp die beiden Untereinheiten (30 S und 19 S) aus Retikulozyten-Ribosomen isolieren können. In einem Lauf konnten 300 mg reines Material gewonnen werden, gegenüber 2 mg im Schwenkbecherrotor, was deutlich die Überlegenheit des Zonalrotors hinsichtlich Kapazität demonstriert.

Dem hohen und schlanken B-IV-Rotor wird heute meist die gedrungene Bauweise der B-XIV- und B-XV-Rotoren vorgezogen. Mit diesem Typ hat CORBETT<sup>19</sup> aus Rattenleber-Homogenaten Ribosomen, Lysosomen, Mitochondrien und Kerne isoliert.

Um noch größere Flüssigkeitsmengen zu verarbeiten, haben CLINE, NUNLEY und ANDERSON<sup>20</sup> Rotoren verwendet, welche kontinuierlich beschickt und damit im Durchlaufverfahren benutzt werden können. Wie Abb. 17 am Beispiel des B-XVI-Rotors schematisch zeigt,

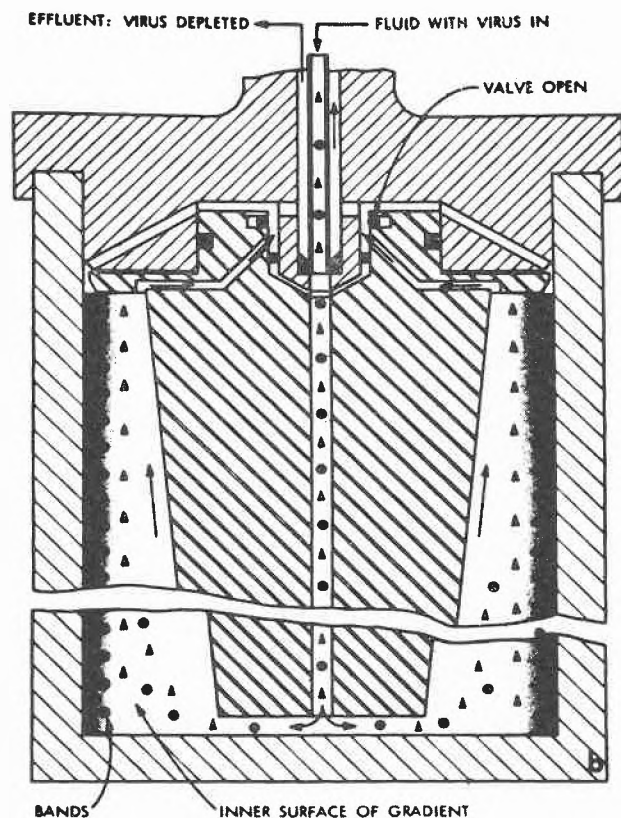


Abb.17. Zonalrotor (B-XVI) für kontinuierlichen Betrieb (nach CLINE, NUNLEY und ANDERSON<sup>20</sup>)

wird die Partikelsuspension durch eine bis auf den Boden des Rotors führende Zuleitung eingeführt. Sie strömt dann einem vorher eingefüllten und «eingeschlossenen» Dichtegradienten entlang, wobei die Partikel in die Gradientenlösung hineinsedimentieren, und verläßt oben den Rotor. Auf diese Weise sind mit einem CsCl-Dichtegradienten in einem Lauf aus 8 Litern Suspension T3-Bakteriophagen isoliert worden.

Die gegenwärtigen und künftigen Anwendungsmöglichkeiten von Zonalrotoren sind in zusammenfassenden Arbeiten von ANDERSON<sup>21, 22</sup> und CHARLWOOD<sup>23</sup> beschrieben worden.

## 7. Schlußbetrachtungen

Wie aus den wenigen Anwendungsbeispielen hervorgeht, hat die Dichtegradientenzentrifugation wesentliche Fortschritte in der biologischen Arbeitsmethodik gebracht. Einerseits ist es möglich geworden, die Zusammensetzung kleinster Mengen von Partikelgemischen zu untersuchen und gleichzeitig die einzelnen Komponenten durch Messung wichtiger physikalischer Eigenschaften zu charakterisieren. Andererseits können nach demselben Prinzip auch Trennungen im großen Maßstab durchgeführt werden. Infolge der feineren Fraktionierung sind die erhaltenen Produkte allgemein reiner als die durch Differentialzentrifugation hergestellten. Die große Variabilität der Bedingungen macht es möglich, das Verfahren in einzelnen der Natur und dem Verwendungszweck des isolierten Materials anzupassen. Dadurch können Teilchen aus allen Größenbereichen isoliert werden, während ihre biologischen Eigenschaften weitgehend erhalten bleiben.

Die Einführung der Zonalrotoren hat der modernen Biologie ganz neue Möglichkeiten eröffnet. Mit diesen können im  $s-\rho$ -Verfahren grundsätzlich beliebige Partikelgemische in ihre einzelnen Komponenten zerlegt werden, sofern sich diese in ihrer Teilchengröße oder ihrer Dichte unterscheiden. Auf Grund der heutigen Entwicklung darf damit gerechnet werden, daß kontinuierliche Verfahren entwickelt werden, welche die Isolierung von Substanzen in hoher Verdünnung aus großen Flüssigkeitsmengen möglich machen.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die biologischen Wissenschaften in dieser Methode ein Mittel besitzen, mit dem sie einem ihrer wesentlichen Ziele, nämlich der Isolierung und Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Bausteine des lebenden Organismus, näher rücken werden.

## Literatur

1. Die Zentrifugalbeschleunigung wird normalerweise als Vielfaches der Erdbeschleunigung  $g$  ausgedrückt.
2. T. SVEDBERG und K. O. PEDERSEN, *The Ultracentrifuge*, Verlag Steinkopff, Dresden/Leipzig 1940.
3. W. KREUTZ und W. MENKE, *Z. Naturforsch.* 15b (1960) 402.

4. M. BEHRENS und R. THALACKER, *Naturwiss.* 44 (1957) 621.
5. U. HEBER, *Ber. deutsch. bot. Ges.* 70 (1957) 371.
6. C. R. STOCKING, *Plant Physiol.* 34 (1959) 56.
7. M. K. BRAKKE, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1847.
8. R. G. MARTIN und B. N. AMES, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1372.
9. J. ABELSON und C. A. THOMAS, *J. Mol. Biol.* 18 (1966) 282.
10. T. A. COLE und T. W. BROOKS jr., *Science* 161 (1968) 386.
11. J. E. HEARST, J. B. IFFT und J. VINOGRAD, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47 (1961) 1015.
12. M. MESELSON und F. W. STAHL, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1968) 671.
13. W. G. FLAMM, H. E. BOND und H. E. BURR, *Biochem. Biophys. Acta* 129 (1966) 310.
14. J. VINOGRAD und J. E. HEARST, *Fortschr. chem. org. Naturstoffe* 20 (1962) 372.
15. C. A. PRICE und A. P. HIRVONEN, *Biochim. Biophys. Acta* 138 (1967) 531.
16. G. J. KNIGHT und C. A. PRICE, *Biochim. Biophys. Acta* 158 (1968) 283.
17. C. B. REIMER, R. S. BAKER, T. E. NEWLIN und M. L. HAVENS, *Science* 152 (1966) 1379.
18. E. S. KLUCIS und H. J. GOULD, *Science* 152 (1966) 378.
19. J. R. CORBETT, *Fed. Proc.* 25 (1966) 759.
20. G. B. CLINE, C. E. NUNLEY und N. G. ANDERSON, *Nature* 212 (1966) 487.
21. N. G. ANDERSON, *Science* 154 (1966) 103.
22. N. G. ANDERSON, *J. Nat. Cancer Inst. Monograph* Nr. 21 (1966).
23. P. A. CHARLWOOD, *Brit. Med. Bull.* 22 (1966) 121.
24. J. B. IFFT, D. H. VOET und J. VINOGRAD, *J. Physic. Chem.* 65 (1961) 1138.