

Dichtegradientenzentrifugation

Klassisches biochemisches
Trennverfahren

Ultrazentrifuge

Die **Ultrazentrifuge** ist eine für hohe Geschwindigkeiten optimierte **Zentrifuge**, die Beschleunigungskräfte von bis zu 10^6 g erzeugen kann. Ultrazentrifugen rotieren ihren Inhalt sehr schnell - bis zu 100.000 mal in der Minute. Deswegen bewegt sich der **Rotor** idealerweise in einem künstlichen **Vakuum**, so dass keine Luftreibung auftritt. Die Ultrazentrifuge wurde von **Theodor Svedberg** entwickelt, der damit die Sedimentationsgeschwindigkeiten von **Makromolekülen** und damit ihr ungefähres **Molekulargewicht** bestimmte

Theodor Svedberg

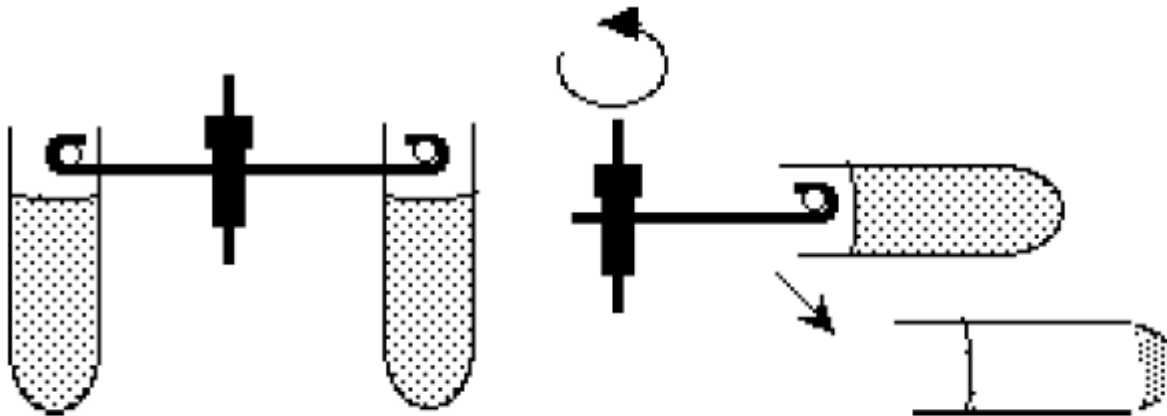


Erfinder der Ultrazentrifuge

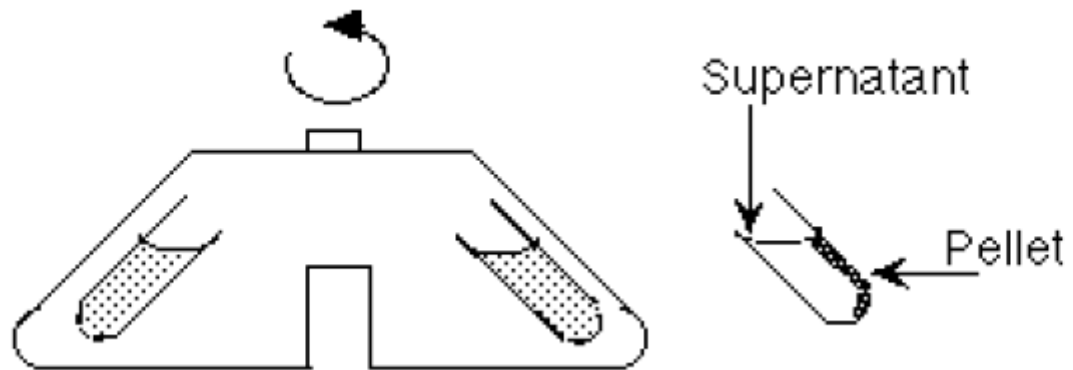
1926 Nobelpreis für Chemie.

* 30. 8. 1884,
† 26. 2. 1971;

Schwenkbecherrotor



Festwinkelrotor



Vertikalrotor



Winkelrotor



Zonalrotor mit „continous flow loading/unloading“



Zwei Arten von Ultrazentrifugation:

1. Sedimentationszentrifugation
2. Schwebdichte- oder
Gleichgewichtszentrifugation

Svedberg-Gleichung

$$\frac{1}{\omega^2} \left(\frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{v}{r \omega^2} = \frac{m(1 - \bar{v} \rho_0)}{f} = s \quad [2] \text{ Svedberg-Gleichung}$$

s = Sedimentationskoeffizient

v = Sedimentationsgeschwindigkeit

r = Radius von der Rotorachse

ω = Winkelgeschwindigkeit (Upm)

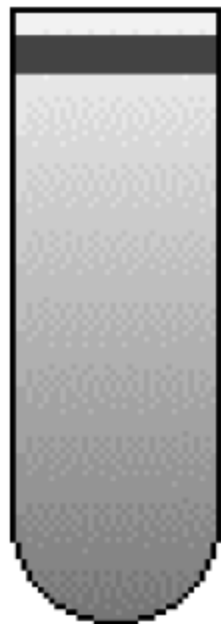
f = Reibungskoeffizient

m = Masse

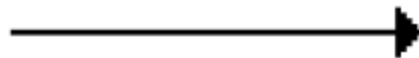
ρ = Dichte

Zonenzentrifugation

initial



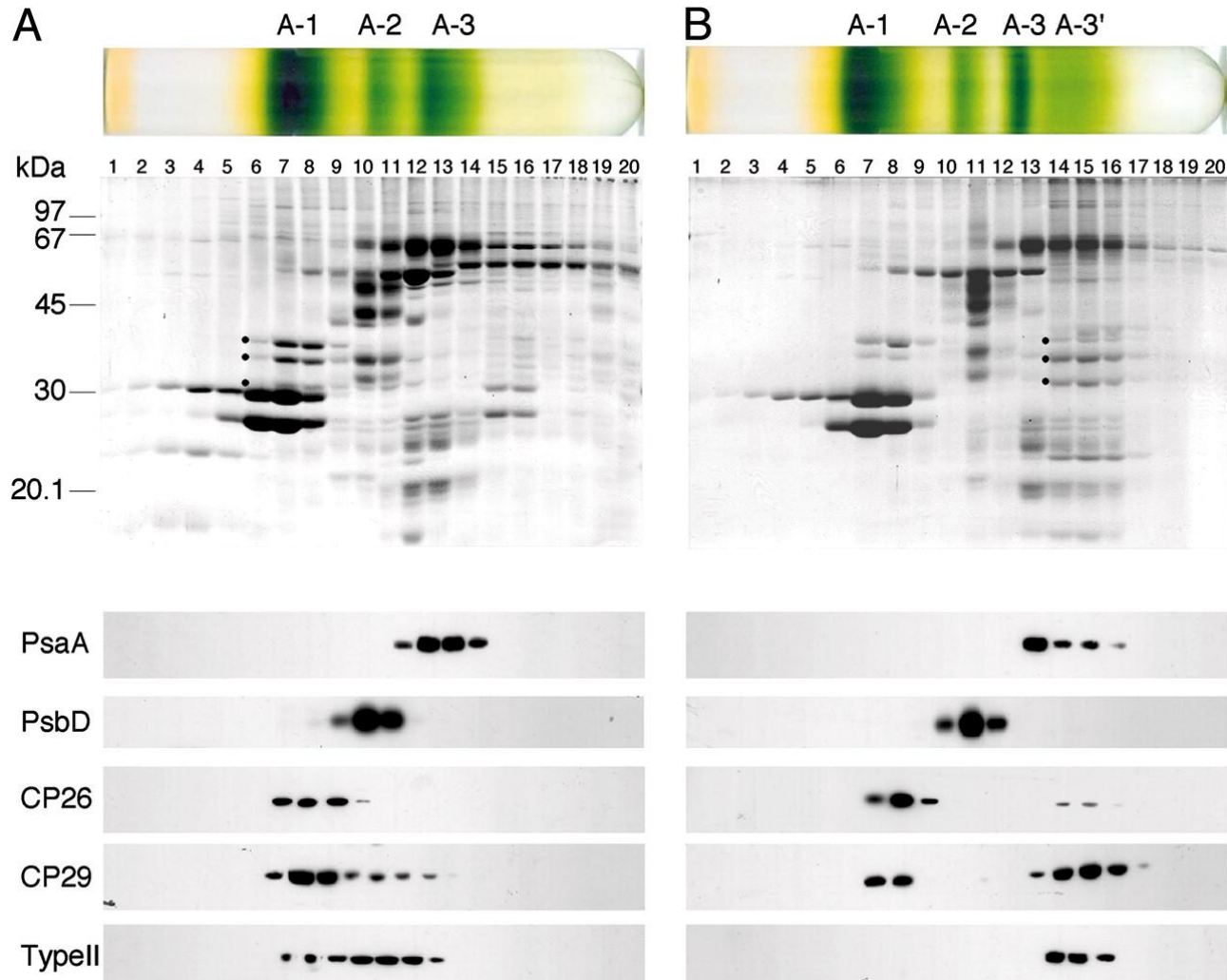
centrifugal
force



final

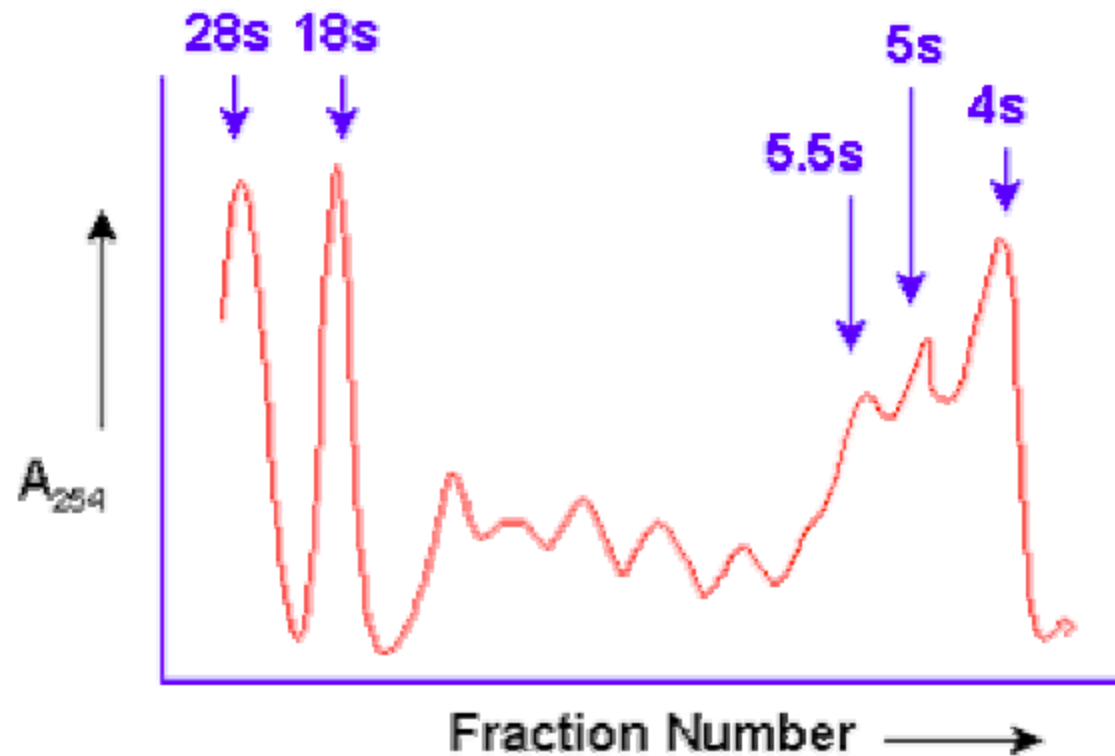


Chlorophyll-protein complexes separated on sucrose density gradients

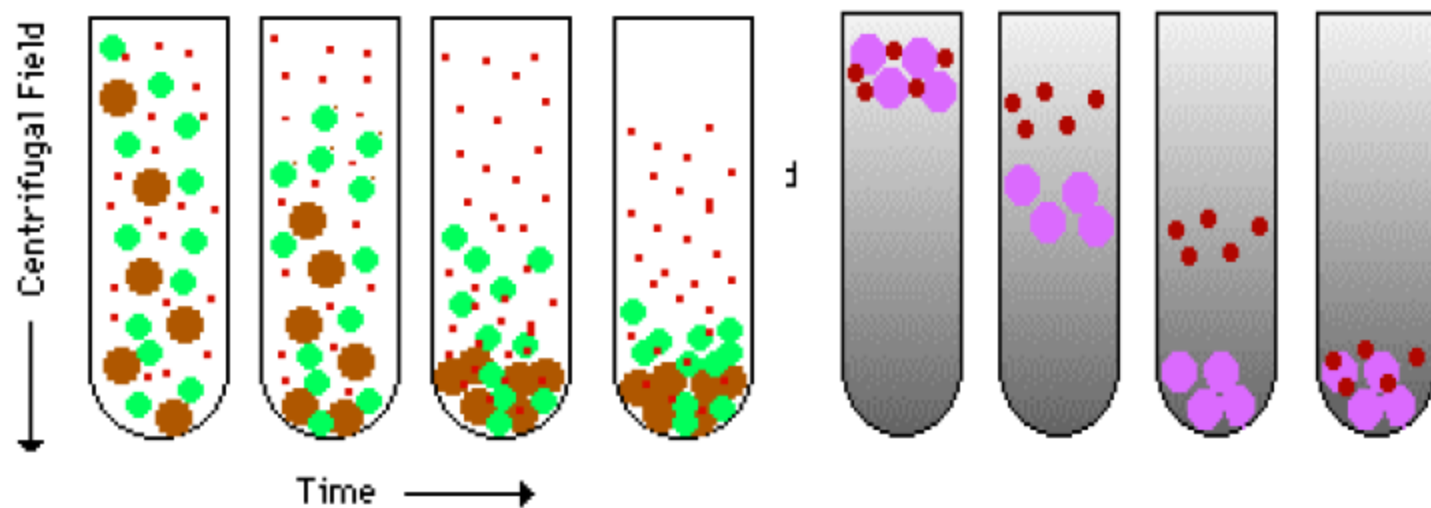


Takahashi H et al. PNAS 2006;103:477-482

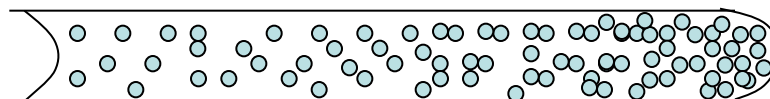
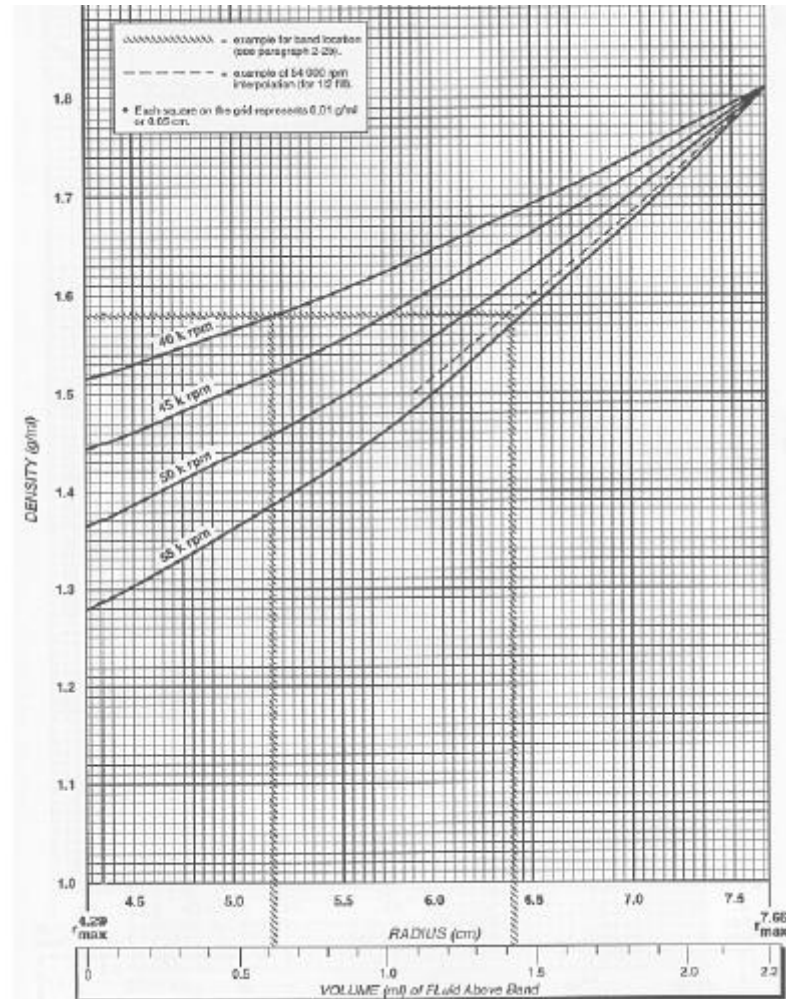
RNA aus Eukaryoten



Differenzial vs Zonenzentrifugation



In Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit bildet
sich ein „selbstformender“ Dichtgradient heraus.
Alternativ können vorgeformte Dichtegradienten eingesetzt werden



Isopyknische (Gleichgewichts-) Zentrifugation

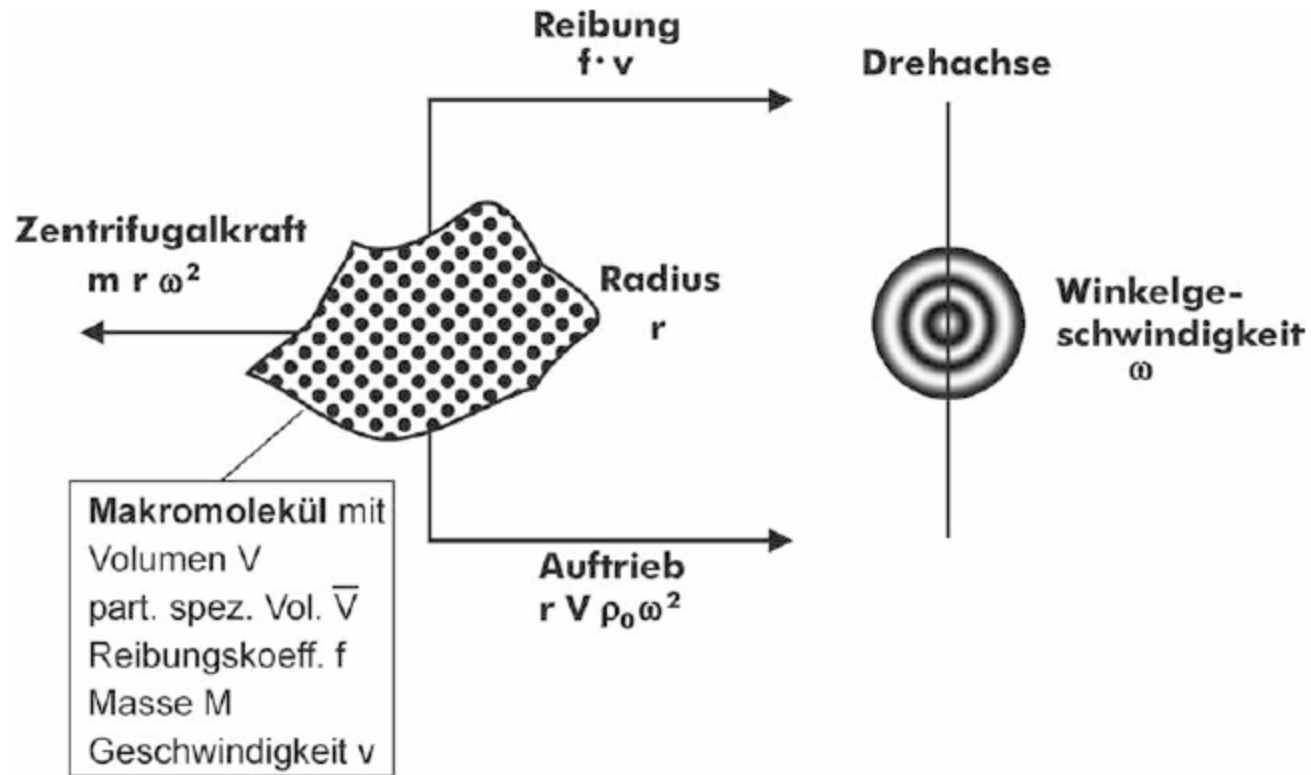
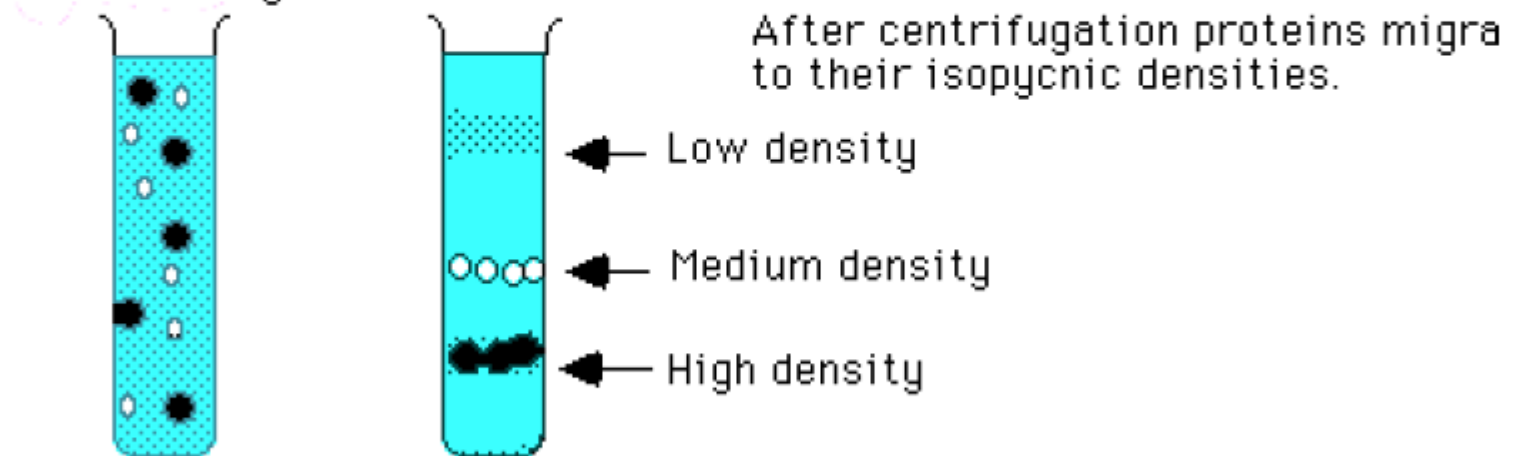


Abb. 2: Die auf ein Makromolekül im Schwerfeld wirkenden Kräfte

$$\text{RZF} = 11.8 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$$

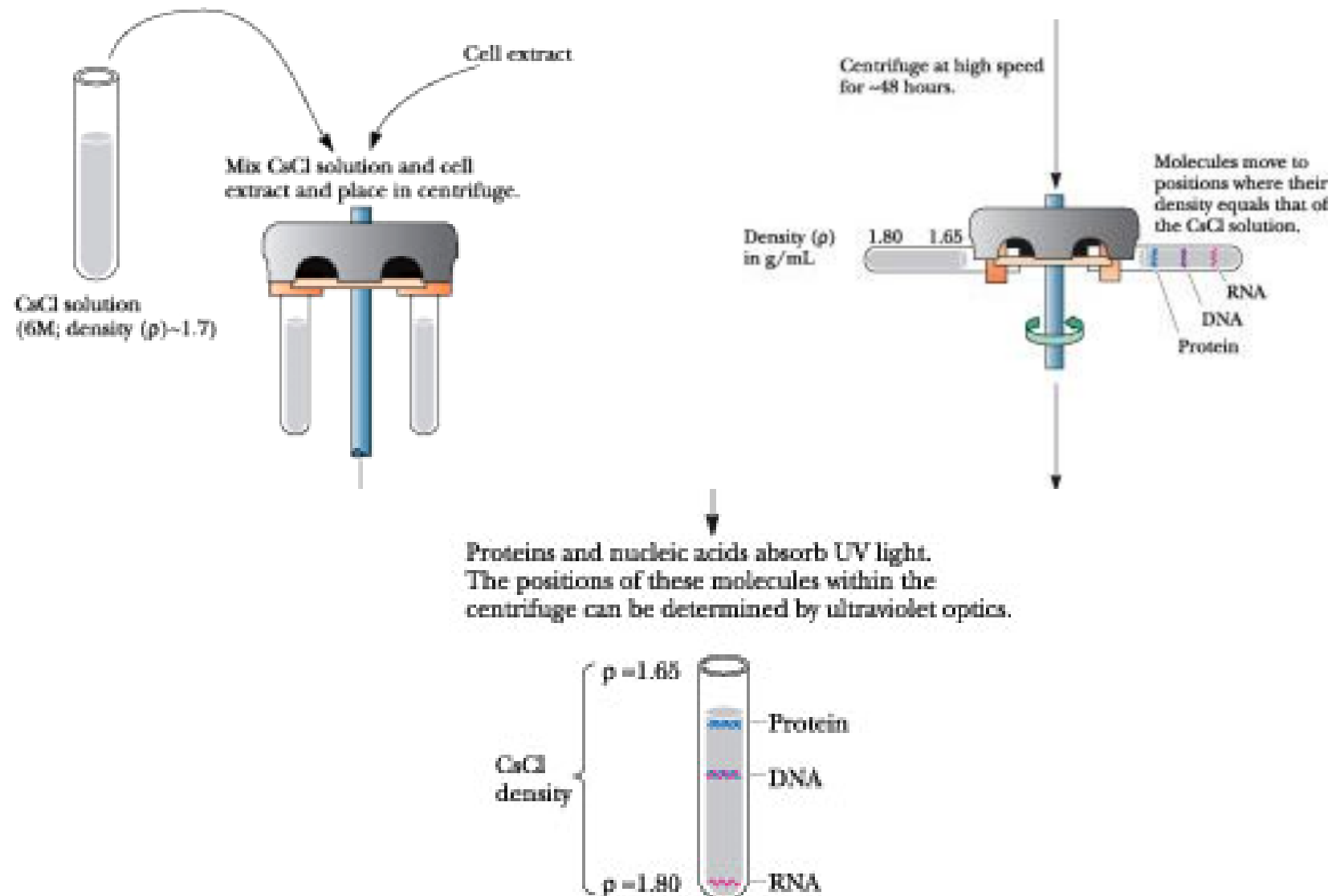
RZF = RCF = relative centrifugal force

Figure 4: Isopycnic separation with a self-generating gradient



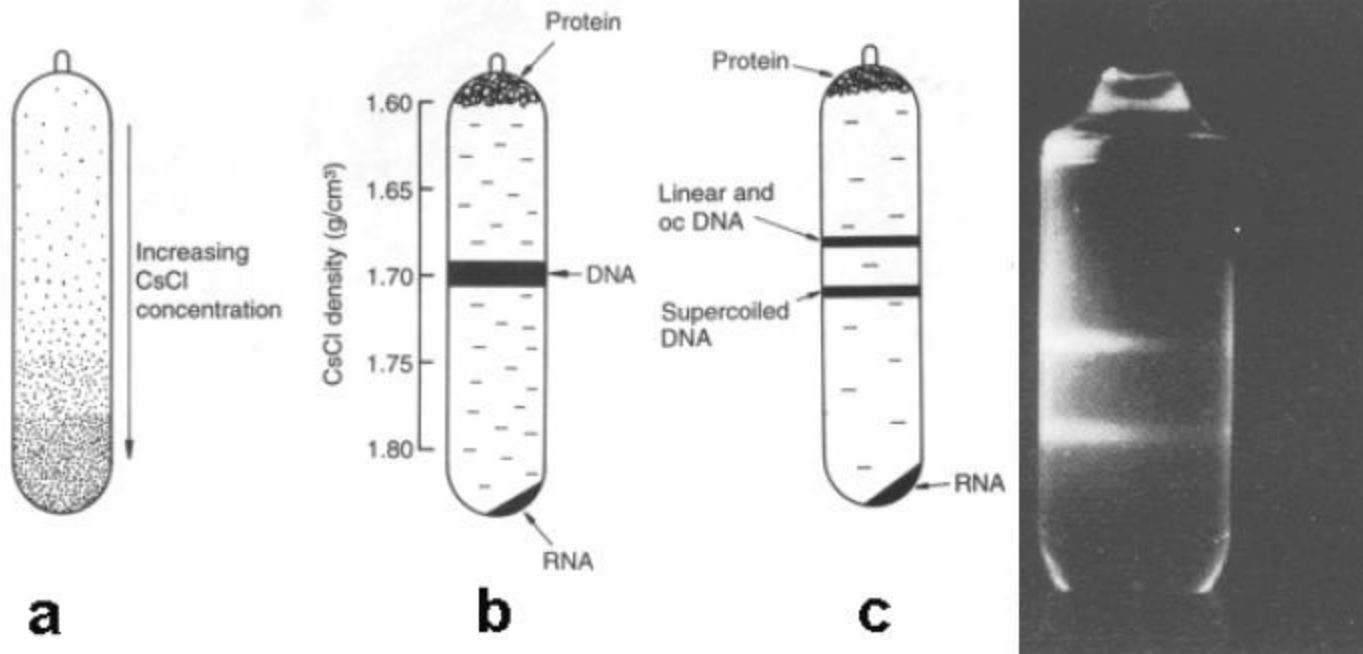
The sample is evenly distributed throughout the centrifuge tube before centrifugation.

Trennung verschiedener Stoffklassen durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation



CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Die DNA konzentriert sich im Dichtgradienten an der Position, die ihrer Schwebdichte entspricht



E. coli DNA

Plasmid-DNA

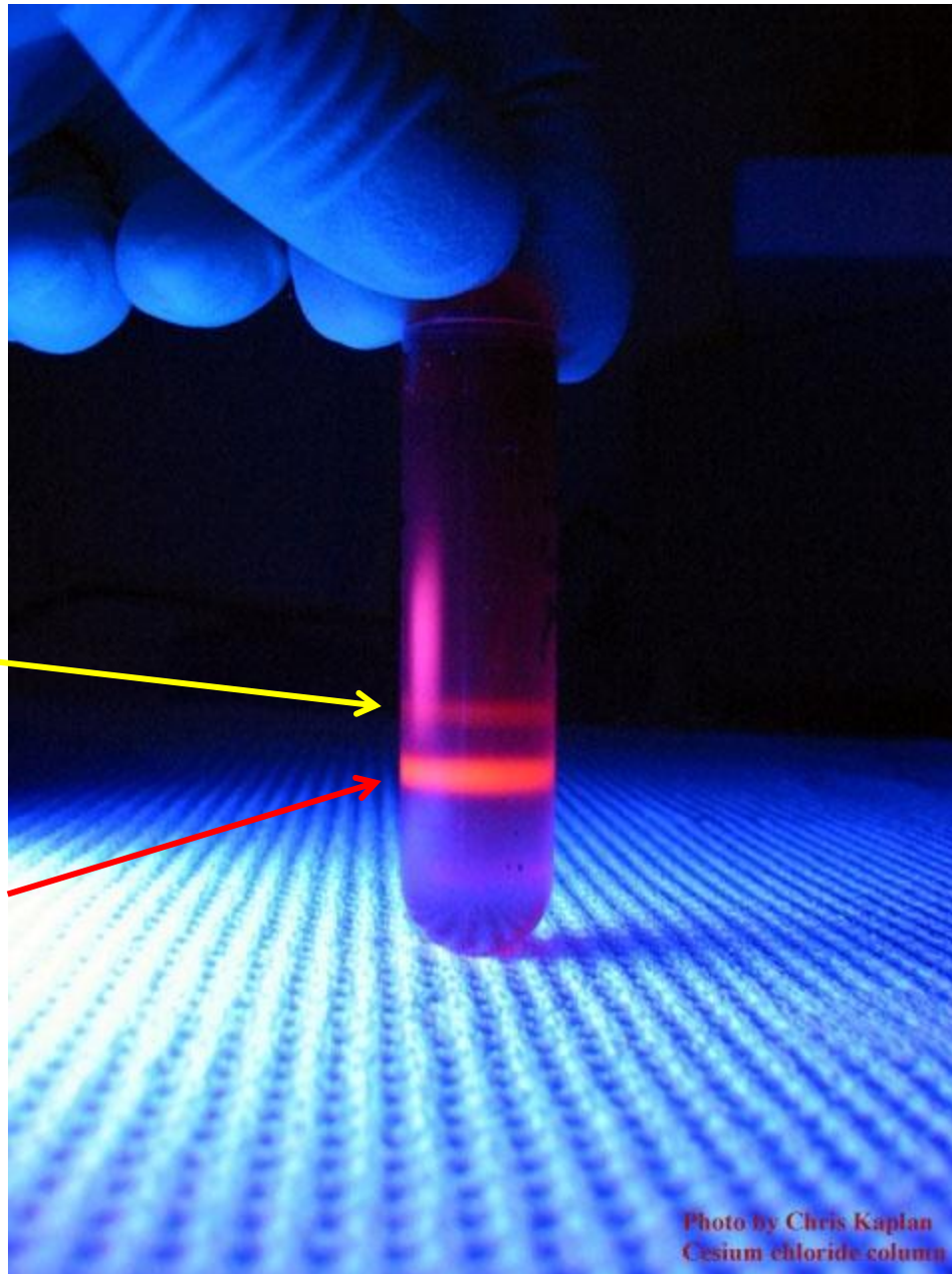
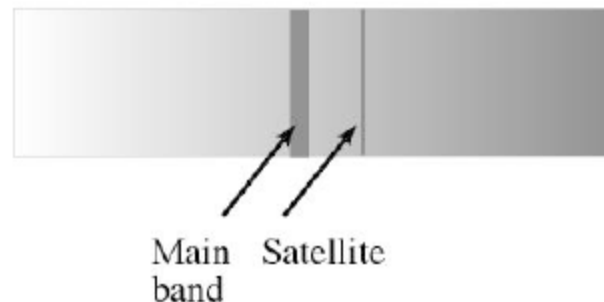


Photo by Chris Kaplan
Cesium chloride column

Die Schwebdichte einer DNA ist
abhängig von ihrer
Basenzusammensetzung und z. T.
von ihrer Konformation (ss od. ds)

Je höher der GC-Gehalt
umso höher ist die Schwebdichte

Satelliten DNA ist ursprünglich dadurch definiert, dass sie sich durch CsCl-Dichtgradientenzentrifugation von der Masse der DNA abtrennbar ist



Die meisten Eukaryoten haben Satelliten-DNAs

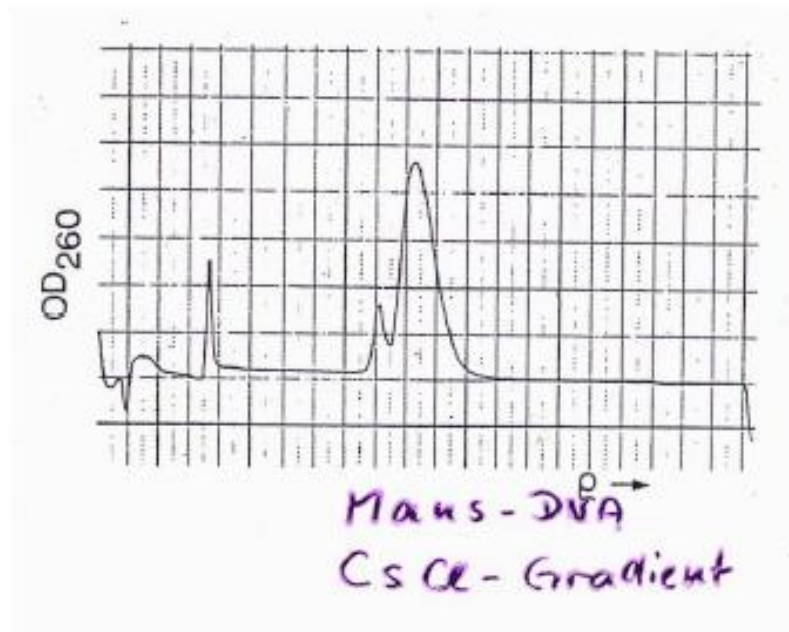
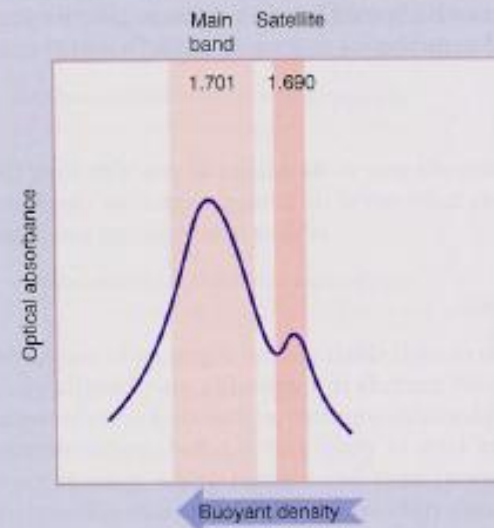
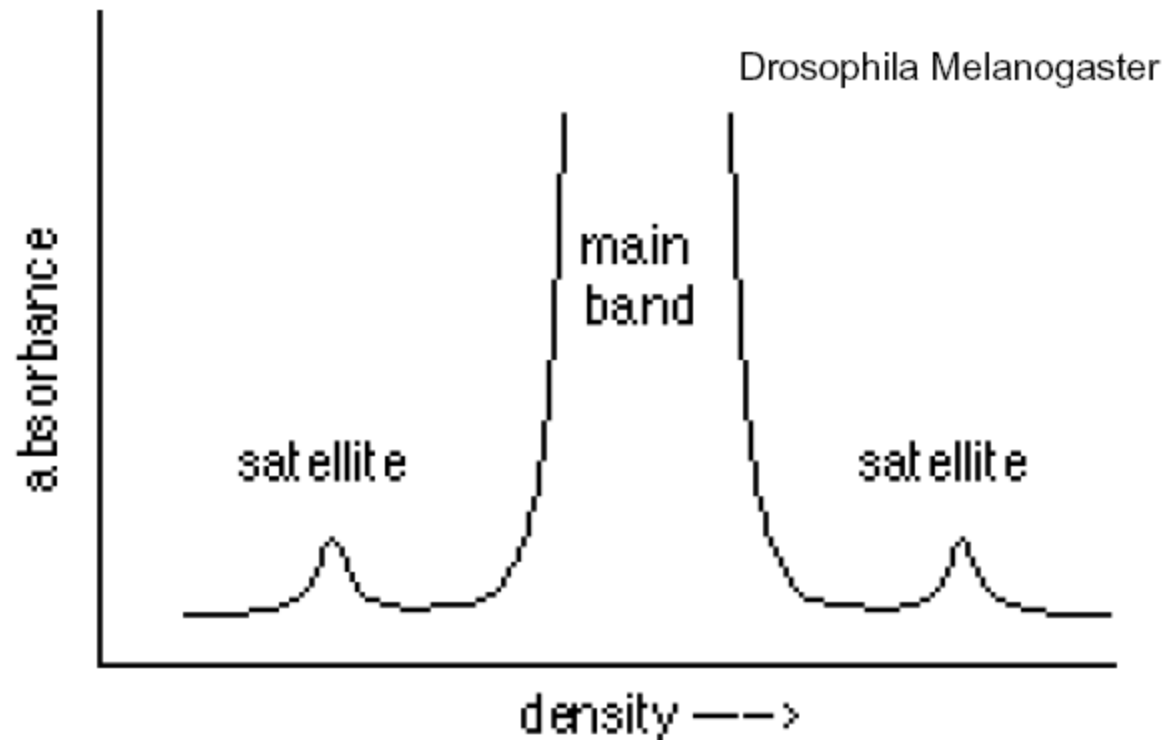


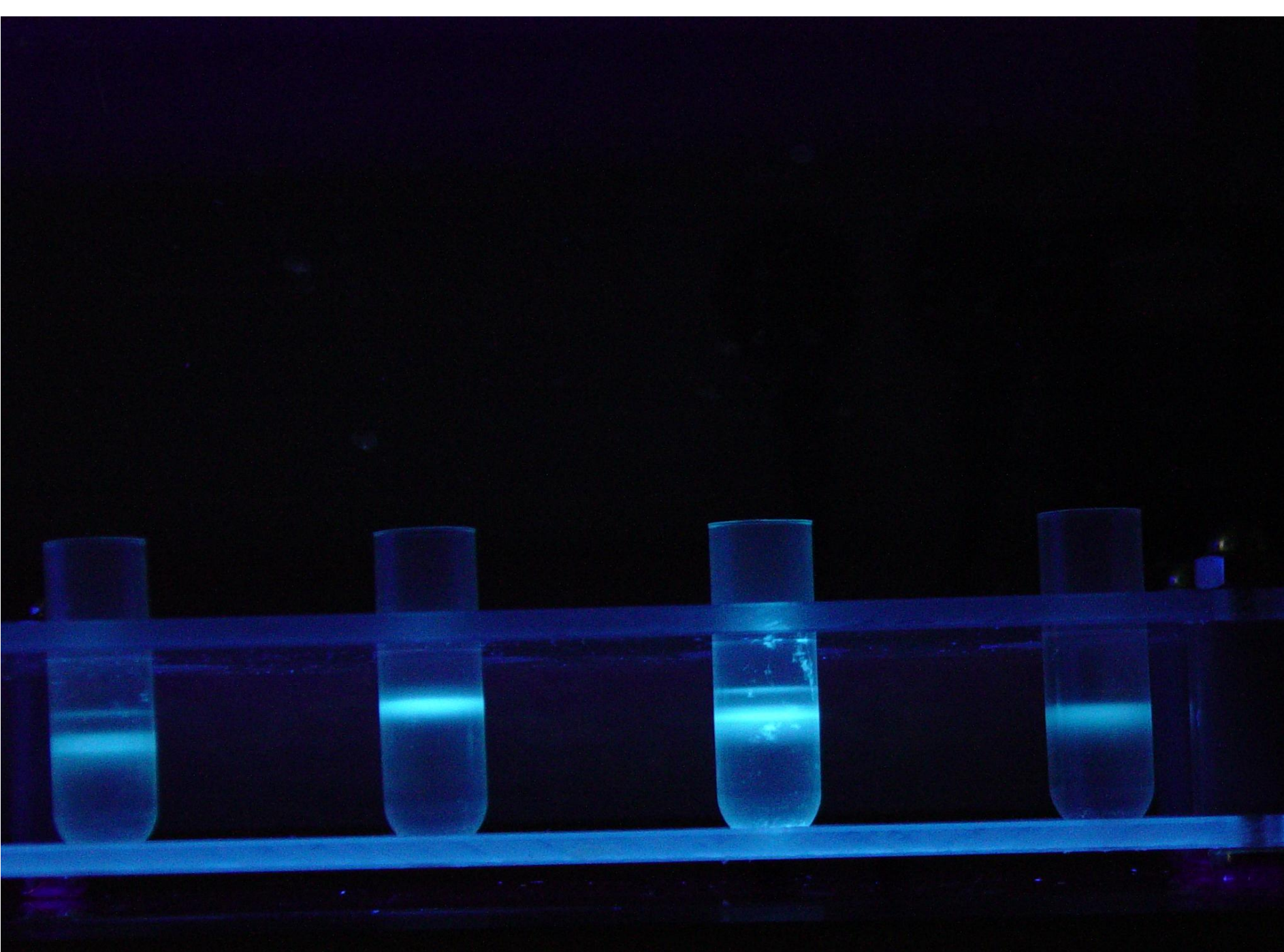
Figure 4.14 Mouse DNA is separated into a main band and a satellite by centrifugation through a density gradient of CsCl.

from Lewis, Genes VII



Manche Organismen besitzen viele verschiedene Satelliten-DNAs





Dichtebestimmung durch Messung des Brechungsindex („Brechzahl“,)



Abbé-Refraktometer

%CsCl	ρ in g/ml	$n_D 20$
10	1,079	1,3405
20	1,174	1,3607
40	1,420	1,3735
50	1,482	1,3885
60	1,785	1,4072
gesättigt	1,91	1,4185

Separation von lebenden Zellen durch Zonenzentrifugation

