

# Die Trennung von Partikeln im Zonalrotor, Aufbau der Apparatur und praktische Hinweise

Von

REINHARD BACHOFEN

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich

Wie vorausgehend dargelegt (EICHENBERGER 1971), lassen sich bei der Gradientenzentrifugation Partikel oder Makromoleküle entweder nach Sedimentationsgeschwindigkeit oder Partikeldichte separieren. In beiden Fällen wird die Probe auf einen vorgeformten Gradienten steigender Dichte gegeben und während einer bestimmten Zeit dem Schwerfeld unterworfen. Im ersten Falle trennen sich die einzelnen Komponenten des Gemisches in Zonen auf Grund ihres Sedimentationswertes, im zweiten Falle umfasst der Gradient den gesamten Dichtebereich der zu trennenden Partikel, und die Teilchen wandern im Gradienten bis die Dichte des Gradienten ihrer Dichte entspricht. Die Proben bewegen sich in konzentrischen Banden oder Zonen, es handelt sich also um eine Zonen-zentrifugation. Solche Zonen-zentrifugationen wurden bislang in Röhrchen, sowohl in Ausschwing-, wie in Winkelrotoren, durchgeführt, die aber dafür nicht in jeder Hinsicht ideal sind. Da die Wände des Zentrifugenröhrchens nicht wie bei der Zelle einer analytischen Ultrazentrifuge radial angeordnet sind, können Turbulenzen und Konvektionsströmungen entstehen (BOWEN 1970, p. 122). In einem Ausschwingrotor mit den üblichen Massen kollidieren ca. 25% aller Teilchen mit der Wand, wodurch Verklumpungen entstehen können und Material dadurch rascher sedimentiert oder an den Wänden kleben bleibt. Ein grosser methodischer Fortschritt lag daher in der Entwicklung des sogenannten Anderson-Rotors (ANDERSON 1966, 1967), der heute, meist als Zonalrotor bezeichnet, von fast allen Zentrifugenfabrikanten in verschiedenen Typen angeboten wird. ANDERSON konstruierte seinen Rotor im Sinne der analytischen Zelle. Der zylindrische Inhalt ist durch einen Einsatz in vier Sektoren eingeteilt (vgl. Fig. 12–14 bei EICHENBERGER 1971). Da der Gradient im Gefäss von innen nach aussen ansteigt, die Dichte also in radialer Richtung zunimmt, kann der Gradient im Normalfall (ausgenommen in die neuen, selbstorientierenden Rotoren) nicht in den stehenden Rotor eingepumpt werden. Kanäle stehen mit der Peripherie und dem Zentrum der vier Kompartimente über ein abgedichtetes Einfülllager in Verbindung, so dass der Rotor im drehenden Zustand und damit unter Einwirkung der Schwerkraft gefüllt werden kann. Da dadurch eine Stabilisierung des Gradienten erreicht wird, kann das Einfüllen mit relativ grosser

Pumpgeschwindigkeit erfolgen (10–20 ml pro min). Diese Konstruktion ergibt gegenüber der herkömmlichen Zonalzentrifugation in Röhrchen die folgenden Vorteile:

- Durch die sektorförmige Anordnung der Zellen fallen die störenden Wandeffekte weg.
- Das Füllen und Leeren des Rotors im Schwerfeld oberhalb der kritischen Tourenzahl des Rotors stabilisiert den Gradienten.
- Das nutzbare Volumen der Zonalrotoren ist wesentlich grösser als dasjenige der Ausschwingrotoren (vgl. Tab. 2 bei EICHENBERGER 1971).

Allerdings müssen auch gewisse Nachteile erwähnt werden. Bei der Wanderung im Gradienten wird die Probe wegen der idealen Form der Zellsektoren durch die konzentrierte Gradientenlösung stark verdünnt, wesentlich stärker, als dies in zylindrischen Röhrchen der Fall ist. Dies macht z. B. bei Arbeiten mit radioaktiven Isotopen in vielen Fällen eine relativ starke Markierung notwendig.

Zonalrotoren sind dank des geschilderten Aufbaus nicht nur geeignet, einzelne Komponenten, Partikel oder Makromoleküle, eines Gemisches zu trennen, sondern sie können auch erfolgreich zur Anreicherung von Partikeln aus verdünnten Lösungen, z. B. Viren (Fox et al. 1968) angewendet werden. In einem solchen Fall ist der grösste Teil des Rotorinhaltes von der Probe ausgefüllt, welche nach aussen durch

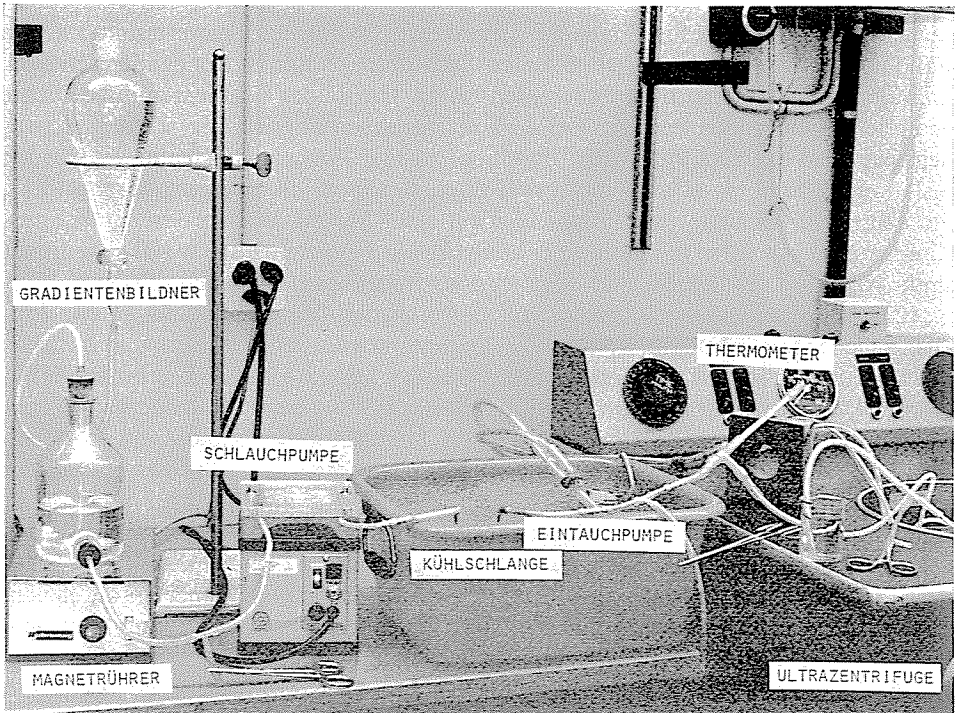


Abb. 1. Aufbau der Einrichtung zum Einfüllen von Gradienten in Zonalrotoren.

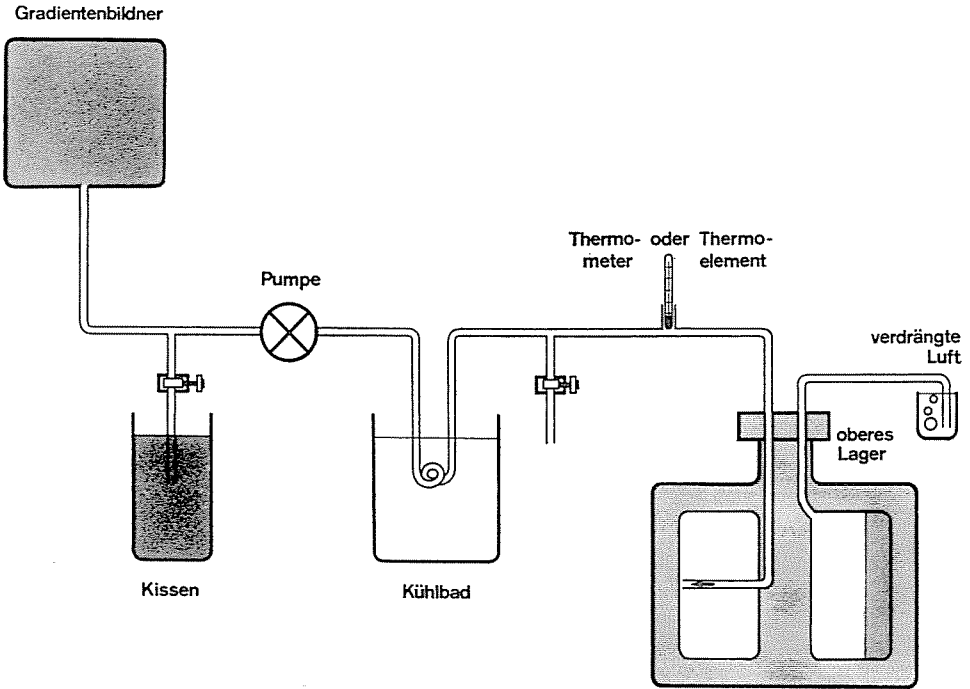


Abb. 2. Schematische Darstellung der in Abb. 1 dargestellten Einrichtung.

einen sehr steilen Gradienten vom Kissen und der äusseren Rotorwandung getrennt ist. Die in der Probe vorhandenen Teilchen sammeln sich unter geeigneten Bedingungen isopyknisch in einer dünnen Zone des Gradienten und können so in einem Bruchteil ihres ursprünglichen Volumens wieder gewonnen werden.

Die Herstellung des Gradienten ist bei EICHENBERGER (1971) allgemein diskutiert worden. Wegen der Geometrie des Innenraumes des Zonalrotors – Zunahme des Volumens gleichdicker Zonen von innen nach aussen – eignet sich der lineare Gradient weniger für den Zonalrotor. Ein linear eingeführter Gradient würde sich im Innern als konkaver Dichteanstieg auswirken. Neben dem Einsatz relativ teurer Gradientenformer (Spinco, MSE, Isco u. a.) kann durch Verwendung eines konstanten Volumens im Mischgefäss (Abb. 1, links; Abb. 2) ein konvexer Gradient erreicht

$D_t$  = Dichte zur Zeit  $t$

$D_A$  = Dichte der Lösung **A**

$D_B$  = Dichte der Lösung **B**

$V_A$  = Volumen der Lösung **A**

$V_t$  = Volumen, ausgeflossen zur Zeit  $t$

$$D_t = D_A \cdot (D_B - D_A) \left(1 - e^{-\frac{V_t}{V_A}}\right)$$

Abb. 3. Formel zur Berechnung von logarithmischen Gradienten bei Verwendung der in Abb. 1 verwendeten Versuchsanordnung.

werden, der durch die Geometrie des Rotors etwas abgeflacht wird. Die Berechnung des Gradienten ergibt sich aus der Formel in Abb. 3.

Die Form des Gradienten wird damit durch die Anfangs- und Endkonzentration der Gradientenlösungen und im besonderen durch die Grösse  $V_M$ , dem Volumen des Mischgefässes bestimmt. Ist letzteres klein, wird ein steiler Gradient ausgebildet. Die gleiche einfache Apparatur lässt sich auch für kompliziertere Gradienten, z. B. einen zweiteiligen, logarithmischen Gradienten einsetzen (HINTON et al. 1970). Der Inhalt des Mischgefässes wird anschliessend über eine Pumpe in den Rotor gepumpt (ca. 15 ml/min); gut dafür geeignet sind Schlauchpumpen (z. B. Perpex Vario). Beim Einsatz von Kolbenpumpen müssen mittels eines Ausgleichsgefässes mit Luftkissen zwischen Pumpe und Zonalrotor die Pumpenstösse gedämpft werden, da Druckstösse zu Leckerscheinungen im Lager führen können. Da die Zentrifugation biologischer Materialien in der Regel bei erniedrigter Temperatur durchgeführt wird, ist es zweckmässig, die Gradientenlösungen vorzukühlen und ausserdem durch eine zwischen Pumpe und Rotor geschaltete Kühlschlange zu leiten, welche in ein Kühlbad eingetaucht wird. Letzteres liefert im weiteren die Kühlflüssigkeit für die Lager-

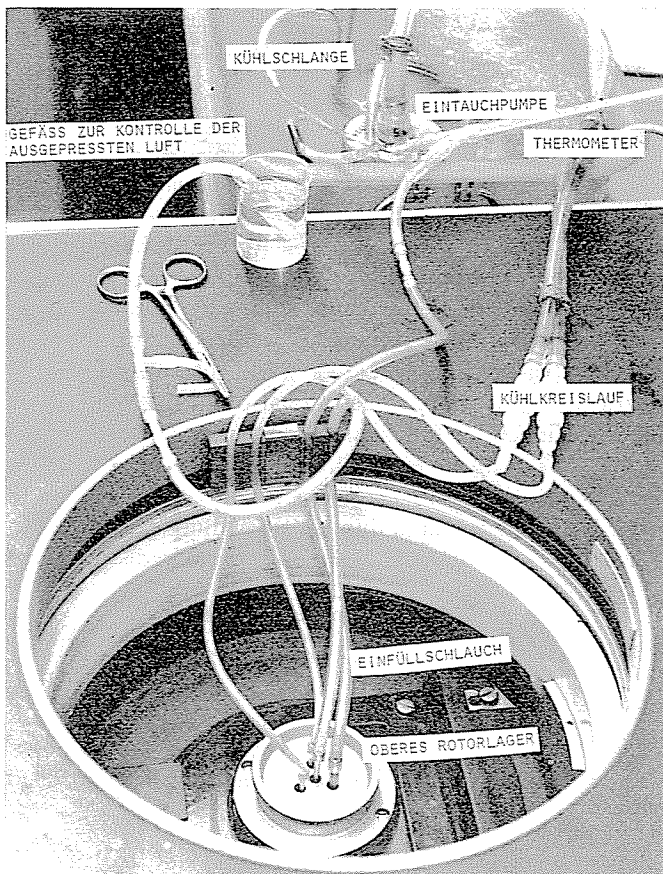


Abb. 4. Detailaufnahme der Versuchsapparatur mit oberem Rotorlager in Zonalrotor.

kühlung. Der Kühlwasserkreislauf kann am einfachsten durch eine Eintauchpumpe (z. B. Thiele, Wien) getrieben werden (Abb. 4, auch Abb. 1). Mittels eines in den Zulauf eingebauten Thermometers oder des Fühlers einer elektrischen Temperaturmessereinrichtung (z. B. Yellow Springs YSI 93) kann die Temperatur der einfließenden Gradientenlösung kontrolliert und eventuell registriert werden. Bei Verwendung des geschilderten Aufbaus und der vorgekühlten Lösungen ist es möglich, eine konstante Einfließtemperatur aufrechtzuerhalten.

Nachdem der Gradient eingefüllt ist – in einem B-14-Rotor benötigt man dazu ca. 500 ml Flüssigkeit – wird dieser durch Zupumpen des sogenannten Kissens, einer sehr dichten und konzentrierten Lösung (z. B. 2 m Saccharose) soweit nach innen verdrängt, bis der spezifisch leichte Anfang anstelle der verdrängten Luft (Abb. 1, Becherglas rechts aussen, Abb. 4) am axialen Ausgang des Rotors erscheint.

Durch diese innere Zuführung wird anschliessend die Probe auf den Gradienten aufgeschichtet. Es ist darauf zu achten, dass die Dichte der Probe geringer ist als die darunter liegende Schicht des Gradienten. Die Probenzugabe geschieht am einfachsten mittels einer medizinischen Spritze. Wird das Material, welches normalerweise ein Volumen von 5–30 ml haben kann, von Hand eingespritzt, muss beachtet werden, dass der Kolben der Spritze langsam und ruckfrei vorgeschoben wird. Eine bessere Auflösung bei der anschliessenden Trennung kann mittels einer Motorspritze (Perfusor Braun) erreicht werden, als Geschwindigkeit sind dabei 1–5 ml/min empfohlen worden. Weiter von Bedeutung für gute Resultate sind kurze und dünne Zuleitungen. Anschliessend wird die Probe mit einer hypotonischen Lösung (Overlay) überschichtet. Diese Schicht ist für die Trennung wichtig. Sie sorgt einerseits dafür, dass die Probe von der inneren Wand entfernt wird, andererseits dass in der Probe durch Diffusion von Gradientenmaterial keine höheren Dichten entstehen können als am Anfang des Gradienten. In solchen Fällen würde es durch Ausbildung instabiler Zonen zur sogenannten Tropfenbildung kommen. Beim Wechsel der verschiedenen Lösungen (Gradient – Kissen – Probe – Overlay) muss die Bildung von Blasen vermieden werden, da diese im Lager zu Querlecken führen.

Nun wird das obere Lager mit den Zuführungsleitungen vom sich drehenden Rotor getrennt, die Rotoröffnung und die Zentrifuge verschlossen und der Rotor im Vakuum auf die gewünschte Umdrehungszahl gebracht. Die Laufzeit richtet sich wie bei der Zentrifugation in Röhrchen nach Partikelmasse und Partikeldichte; zweckmässigerweise werden Vorversuche mit kleineren Probenmengen im herkömmlichen Sinn durchgeführt, um daraus die für die Festlegung des Gradienten, der Zentrifugationszeit und der  $g$ -Zahl notwendigen Unterlagen gewinnen zu können. Es ist in jedem Falle darauf zu achten, dass keine Teilchen durch das Kissen hindurch bis auf die Aussenwandungen des Zonalrotors sedimentieren können, wo, durch Verstopfen der äusseren Öffnungen, das Abpumpen im Anschluss an den Trennvorgang in den vier Sektoren ungleichmässig erfolgen könnte.

Nach vollendetem Lauf wird der Rotor auf die Lade-Entlade-Umdrehungsgeschwindigkeit gebracht – bei rasch laufenden Rotoren wie B-14 oder B-15 liegt diese um 3000 Upm –, das obere Lager wieder aufgesetzt und Lösung grosser Dichte (in der Regel die gleiche Lösung wie das Kissen) von der Peripherie her in den Rotor gepumpt. Dadurch wird der Gradient mit den darin aufgetrennten Banden durch

das Zentrum verdrängt. Bei Arbeiten mit relativ teuren Gradientenmaterialien wie etwa Cäsiumsalzen ist es günstiger, den Gradienten von aussen her direkt abzusaugen, entsprechende Rotoren oder Rotoreinsätze sind im Handel erhältlich. Zu Aufnahme des Absorptions- oder Lichtstreuungsprofils kann die abgepumpte Lösung anschliessend durch ein Photometer mit Durchflussküvette geleitet werden und dann mittels eines Fraktionenkollektors in passende Fraktionen aufgetrennt, gesammelt und nachher analytisch weiter verarbeitet werden (Abb. 5).

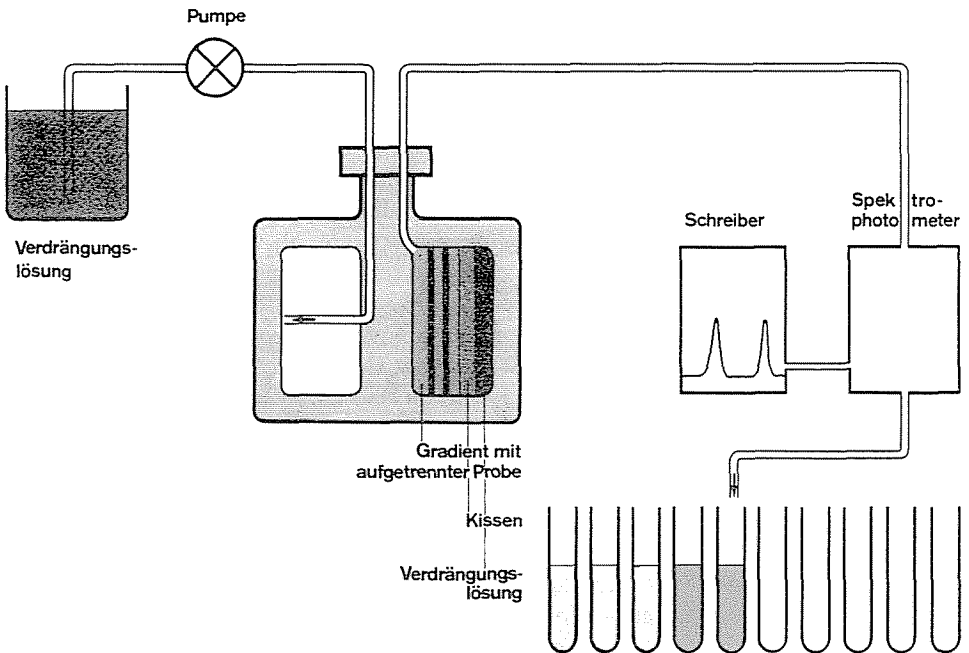


Abb. 5. Schematische Darstellung des Entleerungsvorganges mit Messung von Trübung oder optischer Dichte und Fraktionierung des Eluates.

Es ist zweckmässig, die folgenden physikalischen Grössen nach erfolgter Trennung im Ausgang zu bestimmen:

a) Temperatur: Da die Dichte und die Viskosität verschiedener Gradientenmaterialien stark mit der Temperatur variiert, soll letztere möglichst konstant gehalten werden und bekannt sein (vgl. DE DUVE et al. 1959). Sie wird zweckmässigerweise beim Einfüllen und als Kontrolle beim Leeren kontinuierlich bestimmt.

b) Dichte des Gradientenmaterials: Sie ist sowohl für Trennung nach der Sedimentationsgeschwindigkeit wie auch nach der Partikeldichte eine Grösse, deren Kenntnis wichtige Hinweise auf das Verhalten der Probe im Gradienten geben kann. Momentan sind keine Messgeräte im Handel erhältlich, mit denen sich die Dichte der Lösung im Durchfluss registrieren liesse. Bei Verwendung von Gradientenmaterialien von hohem Brechungsindex, wie z. B. Saccharose, kann die Dichte des Gradienten mittels refraktometrischen Messungen der einzelnen Fraktionen nach

der Trennung rekonstruiert werden. Ein registrierendes Refraktometer für die kontinuierliche Messung des Brechungsindex im Durchfluss wird von Waters Ass. Framingham (Mass.) und Winopal, Isernhagen BRD, hergestellt.

c) Absorption oder Lichtstreuung: Die Messung dieser Grössen im Ausfluss gibt wertvolle Hinweise über den vollzogenen Trennungseffekt. Falls als Ausgangsmaterial eine Rohprobe dient, z. B. ein Rohextrakt eines tierischen oder pflanzlichen Gewebes oder falls der Zonalrotor zur Anreicherung gewisser Partikel aus verdünnten Lösungen eingesetzt wird, kann die Absorption ausserordentlich stark, z. B. zwischen 0 und 20 Absorptionseinheiten variieren. Auch beim Einsatz von teuersten Spektrophotometern ist deshalb bei der Durchflussmessung nur eine grobe quantitative Auswertung möglich. Bei Trennläufen, bei welchen von relativ reinen Fraktionen ausgegangen wird, z. B. einem Polysomengemisch, erlaubt die Absorptionsmessung dagegen exakte Auswertungen.

Weitere Probleme ergeben sich beim Sammeln der Fraktionen im Fraktionenkollektor: Da sich im Ausfluss sowohl die Dichte wie die Viskosität der Lösung ändern, sind Fraktionenkollektoren mit Probevolumenfixierung auf Gewichtsbasis oder mit Tropfenzähler problematisch. Bei konstanter Pumprate kann die Probengrösse mittels Zeitschaltung oder volumetrisch fixiert werden. Bei Volumetern, welche durch Photozellen gesteuert werden, kann es bei stark absorbierenden Fraktionen zu Schaltstörungen kommen.

Die hier angegebenen praktischen Hinweise mögen dem Anfänger die erste Arbeit am Zonalrotor erleichtern und ihm zusammen mit der Literaturübersicht ein rasches Einarbeiten in diese Technik ermöglichen. Neueste zusammenfassende, methodische Übersichten finden sich auch bei PRICE (1971) und DOBROTA (1971).

### Literaturverzeichnis

- ANDERSON, N. G. (ed.), Natl. Cancer Inst. Monogr. 21, 1966.  
 ANDERSON, N. G., in GLICK, D. (ed.), *Methods of Biochemical analysis*, Vol. 15, p. 271–310. Wiley, New York 1967.  
 BOWEN, T. J., *An Introduction to Ultracentrifugation*, Wiley, London 1970.  
 DE DUVE, C., J. BERTHET, H. BEAUFAY, *Progr. Biophys. Chem.* 9, 325–369, 1959.  
 DOBROTA, M., in REID, E. (ed.), *Separations with Zonal rotors*, p. Z-2.1–2.6, Wolfson Bioanalytical Centre of the University of Surrey, Guildford U. K. 1971.  
 EICHENBERGER, W., *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich*, 116, 319–332, 1971.  
 FOX, S. M., G. D. BIRNIE, D. R. HARVEY, E. M. MARTIN, J. A. SONNABEND, *J. Gen. Virol* 2, 455–459, 1968.  
 HINTON, R. H., J. T. R. FITZSIMONS, M. DOBROTA, E. REID, *Europ. J. Biochem.* 12, 349–361, 1970.  
 PRICE, C. A., in UMBREIT, W. W. et al. (eds.), *Manometric Techniques*, Ed. 5. Burgess Publishing Co., Minneapolis. 1971, in press.