



Analytische Ultrazentrifugation

von Dieter Schubert

1 Motivation

Analytische Ultrazentrifugation ist eine der klassischen Techniken der Makromolekülforschung. Zur modernen Biologie hat sie historische Beiträge geliefert: Die Demonstration der Einheitlichkeit und die Bestimmung der Molmassen vieler Proteine, Nucleinsäuren und supramolekularer Aggregate stellen Marksteine in der Entwicklung der Molekularbiologie dar.

Der Versuch soll Sie mit der Technik der Analytischen Ultrazentrifugation bekanntmachen.

Die folgende Darstellung der Grundlagen stellt nur eine kurze Zusammenfassung dar. Es wird vorausgesetzt, daß Sie den Stoff des Analytischen Ultrazentrifugations-Kapitels aus der Vorlesung "Biophysik II: Experimentelle Methoden der Molekularbiophysik" beherrschen.

2 Grundlagen

Analytische Ultrazentrifugation untersucht die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen unter dem Einfluß starker Zentrifugalkräfte. Die Zentrifuge muß dazu mit einem optischen System ausgestattet sein, das es erlaubt, während der Zentrifugation Messungen der lokalen Makromolekül-Konzentration (oder damit zusammenhängender Größen) in der Probe durchzuführen. Das modernste der verfügbaren optischen Systeme ist der sog. "photo- elektrische Scanner", der Proben- und Referenzzelle wie mit einem Zweistrahlphotometer abtastet. Meßgröße ist die Absorption der gelösten Makromoleküle und damit eine der Molekülkonzentration proportionale Größe.

2.1 Wichtigste Typen von Analytische Ultrazentrifugation-Experimenten

2.1.1 Sedimentationsgeschwindigkeits-Läufe

In diesen Experimenten wird die Geschwindigkeit u bestimmt, mit der sich Makromoleküle einer Spezies unter dem Einfluß von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegen. u ist identisch mit der Wanderungsgeschwindigkeit des makroskopisch meßbaren Konzentrations- bzw. -gradienten, der dieser Makromolekülspezies zugeordnet ist (Abb. 1). Statt u wird im allgemeinen der sog. "Sedimentationskoeffizient" s benutzt:

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} \quad (1)$$

(ω : Winkelgeschwindigkeit des Rotors; r : Abstand des Maximums des Konzentrationsgradienten vom Rotorzentrum). Die Angabe von s erfolgt in "Svedberg-Einheiten" S:

$$1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ sec} \quad (2)$$

s hängt, außer von Moleküleigenschaften, von der Dichte und der Viskosität des Lösungsmittels und damit auch von dessen Temperatur ab. Oft erfolgt eine (formale) Umrechnung auf Dichte und Viskosität des Wassers bei 20°C; der zugehörige s -Wert wird mit " $s_{20,w}$ " bezeichnet [1,2].

s -Wert, Reibungskoeffizient f , Diffusionskoeffizient D und Molmasse M des Makromoleküls sind (zumindest für "ideale" Lösungen) durch die "Svedberg-Gleichung" miteinander verknüpft:

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A \cdot f} \quad (3a)$$

$$D = kT/f \quad (3b)$$

(N_A : Avogadro-Zahl; \bar{v} : "partialspezifisches Volumen" des Makromoleküls, in sehr guter Näherung seine reziproke Dichte; ρ : Dichte des Lösungsmittels; k : Boltzmannkonstante; T : Temperatur). Gl. (3a) ist eine klassische Gleichung zur Bestimmung der Molmasse einheitlicher Makromoleküle. s -Läufe dienen daneben zur Untersuchung der Homogenität einer Probe.

2.1.2 Sedimentationsgleichgewichts-Läufe

Hier wird - bei niedrigeren Drehzahlen als in den Sedimentationsgeschwindigkeits-Läufen - die Gleichgewichtsverteilung der Makromoleküle untersucht, die sich durch das Gegeneinander von Sedimentation und Diffusion einstellt. Für ideale Lösungen einheitlicher Makromoleküle erhält man eine Boltzmann-Verteilung:

$$c(r) = c(r_0) \exp \frac{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 (r^2 - r_0^2)}{2RT} \quad (4)$$

($c(r)$ bzw. $c(r_0)$: Makromolekül-Konzentration an der Position r bzw. der festen Position r_0 ; R : Gaskonstante). Mischungen von Makromolekülen liefern die Summe der Boltzmannverteilungen der einzelnen Spezies i :

$$c_{ges}(r) = \sum c_i(r) \quad (5)$$

Die Analyse gemessener Konzentrationsverteilungen durch Least Squares-Anpassungen gemäß Gl. (5) stellt eine hervorragende Methode zur Untersuchung komplexer Assoziationen zwischen Makromolekülen - dem wichtigsten Anwendungsgebiet von Analytischer Ultrazentrifugation - dar [2,3]. Gl. (4) bildet die Basis zur Molmassenbestimmung in Lösungen einheitlicher Makromoleküle; diese Methode ist der Bestimmung nach Gl. (3) hinsichtlich Genauigkeit und Breite des Anwendungsbereiches überlegen (sie erlaubt z.B. auch die Bestimmung der Molmasse von Membranproteinen in Detergenzlösung [3]).

2.2 Aufbau einer analytischen Ultrazentrifuge

Die verfügbare analytische Ultrazentrifuge - das Modell Optima XL-A der Fa. Beckman - ist ein computergesteuertes Gerät (Markteinführung 1991), das sich folgendermaßen zusammensetzt:

(a) Grundgerät ist eine "präparative" Ultrazentrifuge (Optima XL) mit extrem vibrationsarmem Antrieb (ganz wichtig für Sedimentationsgleichgewichts-Läufe!) und guter Temperaturregelung. Maximale Drehzahl: 70.000 rpm (Umdrehungen pro Minute).

(b) Anstelle der "präparativen" Rotoren wird ein "analytischer" Rotor (max. Drehzahl: 60.000 rpm; Material: Titan) benutzt. Er besitzt 4 bzw. 8 zylindrische Bohrungen parallel zur Rotorachse. Eine davon nimmt eine Vorrichtung zur Abstandskalibrierung ("Counterbalance") auf. Die übrigen drei werden mit sog. "Doppelsektorzellen" bestückt. Diese bestehen aus einem "Mittelstück", das zwei sektorförmige Hohlräume zur Aufnahme der Probe bzw. des Lösungsmittels ("Referenz") enthält und oben und unten durch Quarzfenster verschlossen wird. Mittelstück und Fenster werden in einem Zellgehäuse fest aneinandergepreßt. Die Füllung mit Proben- bzw. Referenzlösung erfolgt durch verschließbare Bohrungen an der Innenseite von Mittelstück bzw. Zellgehäuse (Abb. 2).

(c) Die Zelle wird mit monochromatischem Licht (Wellenlängenbereich: 190 - 800 nm) aus einer Stroboskoplampe mit nachgeschaltetem Gittermonochromator durchstrahlt. Dabei wird das Bild der Zelle nahe der Oberfläche eines Photomultipliers abgebildet (Abb. 3). Dort wird mit Hilfe eines Spalts das Bild streifenweise abgetastet und die Intensität des durch Proben- und Referenzsektor gelangten Lichts (J , J_0) einzeln gemessen. Aus den Meßwerten wird die radiale Absorptionsverteilung $A(r) = \log J_0(r)/J(r)$ der gelösten Makromoleküle berechnet. $A(r)$ ist nach dem Lambert- Beerschen Gesetz proportional zu $c(r)$.

3 Literatur

- [1] Schachmann, H.K.: Ultracentrifugation in Biochemistry. Academic Press, New York (1959)
- [2] Fujita, H.: Foundations of Ultracentrifugal Analysis. Wiley, New York (1975)
- [3] Schubert, D. und Schuck, P.: Analytical ultracentrifugation as a tool for studying membrane proteins. Progr. Colloid Polym. Sci. 86, 12-22 (1991)
- [4] Cantor and Schimmel: Biophysical Chemistry, Part II. W.H. Freeman and Company, New York (1980)

4 Vorbereitung

•

5 Versuchsdurchführung und Auswertung

Vorbemerkung: Ziel des Versuchs ist es, Sie mit einer wichtigen, aber etwas in Vergessenheit geratenen Technik der Molekularbiophysik und Physikalischen Biochemie bekanntzumachen. Um selbständig analytische Ultrazentrifugations-Messungen durchführen zu können, braucht man allerdings eine Einarbeitungszeit von einigen Tagen. Bei diesem Praktikumsversuch benötigen Sie also eine intensive Betreuung - nicht zuletzt zum Schutz der sehr teuren Ultrazentrifuge und der ebenfalls teuren Zellen.

Sedimentationsgleichgewichtsläufe - die wichtigste Art von Analytische Ultrazentrifugation Experimenten - sind zeitaufwendig: selbst bei kleinem Probenvolumen (ca. 0,12 ml) ist die Probe

erst nach ca. 20 h im Gleichgewicht. Deshalb soll von Ihnen ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf durchgeführt und ausgewertet werden, bei dem die Laufdauer nur ca. 3 h beträgt. Untersuchungsobjekt ist das glykolytische Enzym Aldolase, ein wasserlösliches Protein, das als stabiles Tetramer vorliegt. Die Proteinlösung enthält DTT zur Unterdrückung der Quervernetzung zwischen den Aldolase-Tetrameren, außerdem EDTA, um Metalloproteasen zu hemmen.

5.1 Vorbereitung und Start des Zentrifugenlaufes

- (a) Bauen Sie entsprechend Abb.2 drei Doppelsektorzellen zusammen. Füllen Sie den Referenzsektor mit 0,40 ml entionisiertem Wasser, und den Probensektor mit ca. 0,37 ml Aldolaselösung. Wählen Sie, ausgehend von einer Aldolase-Stammlösung mit $c = 2 \text{ mg/ml}$, die Proteinkonzentrationen $c = 2 \text{ mg/ml}$ (Zelle 1), 1 mg/ml (Zelle 2), $0,5 \text{ mg/ml}$ (Zelle 3).
- (b) Wiegen Sie die Zellen und das "Counterbalance" und installieren Sie alle 4 Objekte (ggf. nach Gewichtsausgleich) im Rotor.
- (c) Setzen Sie Rotor und Monochromator (nur unter Anleitung !) in die Ultrazentrifuge ein. Starten Sie die Vakuumpumpe der UZ und die Temperaturregelung ($T = 20^\circ\text{C}$).
- (d) Lassen Sie sich in die Bedienung der Software einweisen.
- (e) Starten Sie den Lauf. Drehzahl: 30.000 Upm. Beobachtungswellenlänge: 280 nm.

5.2 Messung der Zeitabhängigkeit der A(r)-Profile

- (a) Messen Sie sofort nach Erreichen der Solldrehzahl der Zentrifuge das A(r)-Profil jeder Zelle (Prüfung auf evtl. Undichtigkeit der Zellen!).
- (b) Messen Sie im Abstand von 20 min wiederum die A(r)-Profile und beenden Sie nach der 10. Messung den Lauf (starten Sie eine geeignete "Methode"). Zerlegen und reinigen Sie die Zellen.

5.3 Auswertung: Bestimmung von $s_{20,w}(c)$

Werten Sie - unter Benutzung eines der vorhandenen Auswerteprogramme - die Daten aller Zellen aus. Bestimmen Sie die Lage des Maximums des Konzentrationsgradienten (Darstellung dA/dr) bzw. die Position der Mitte der A(r)-"Bande" und aus diesen Werten nach Gl. (1) die s-Werte. Falls eine zweite Bande auftreten sollte (woher könnte sie stammen?), so bestimmen Sie auch deren s-Wert und ihren Anteil am gesamten Material. Überprüfen Sie, ob $s_{20,w}$ konzentrationsabhängig ist.

Lassen Sie sich - falls noch Zeit übrig ist - in die Auswertung von Gleichgewichtsläufen einführen.

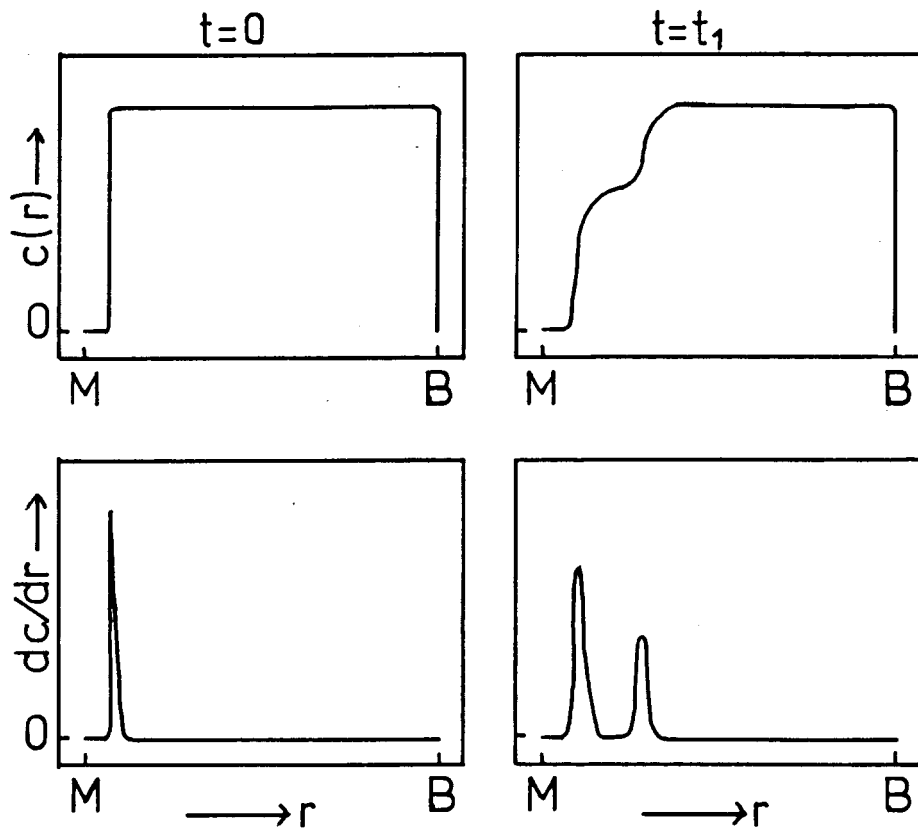


Abb.1: Zeitlicher Verlauf der Makromolekül-Konzentration $c(r)$ bzw. des Konzentrationsgradienten dc/dr in einer Lösung, die zwei Arten von Makromolekülen enthält, während eines Sedimentationsgeschwindigkeits-Laufs. M, B: Position von Meniskus bzw. Zellboden. Die Wanderungsgeschwindigkeit jeder Konzentrationsstufe bzw. jedes Maximums von dc/dr entspricht der Wanderungsgeschwindigkeit der zugehörigen Makromolekülspezies an der Position der Stufe bzw. des Peaks.

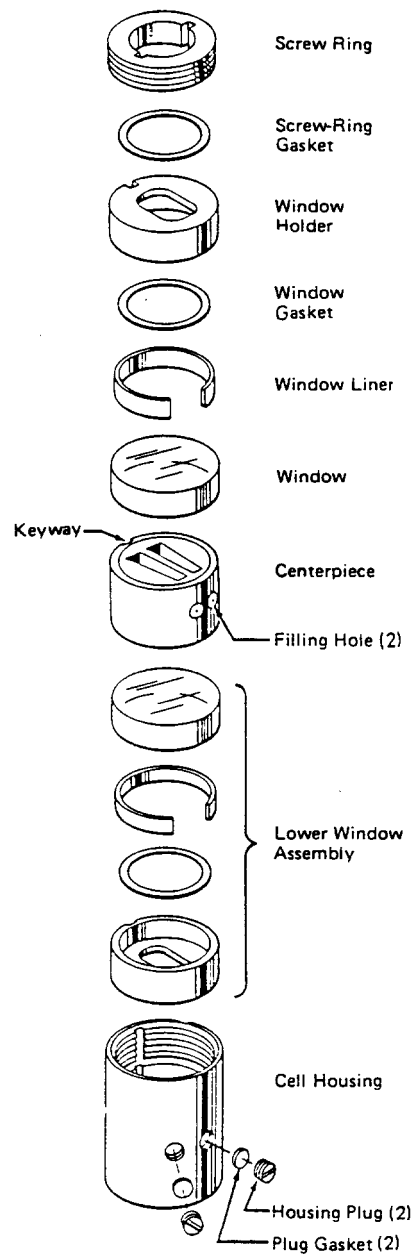


Abb.2: Aufbau einer Doppelsektor-Zelle

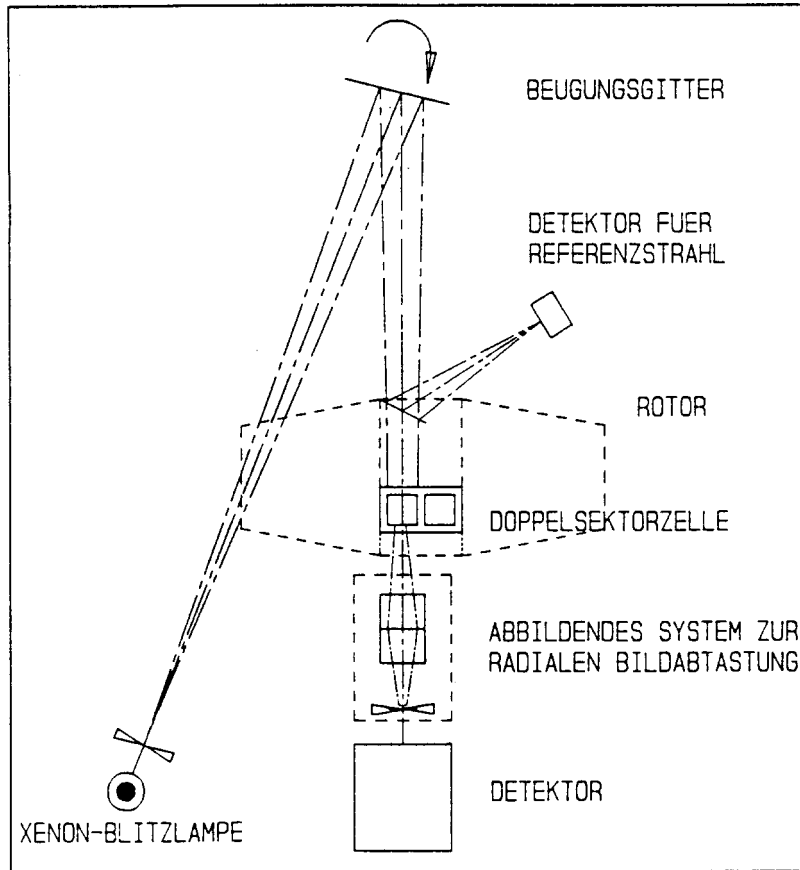


Abb.3: Der photoelektrische Scanner der Optima XL-A