

Ultracentrifugation

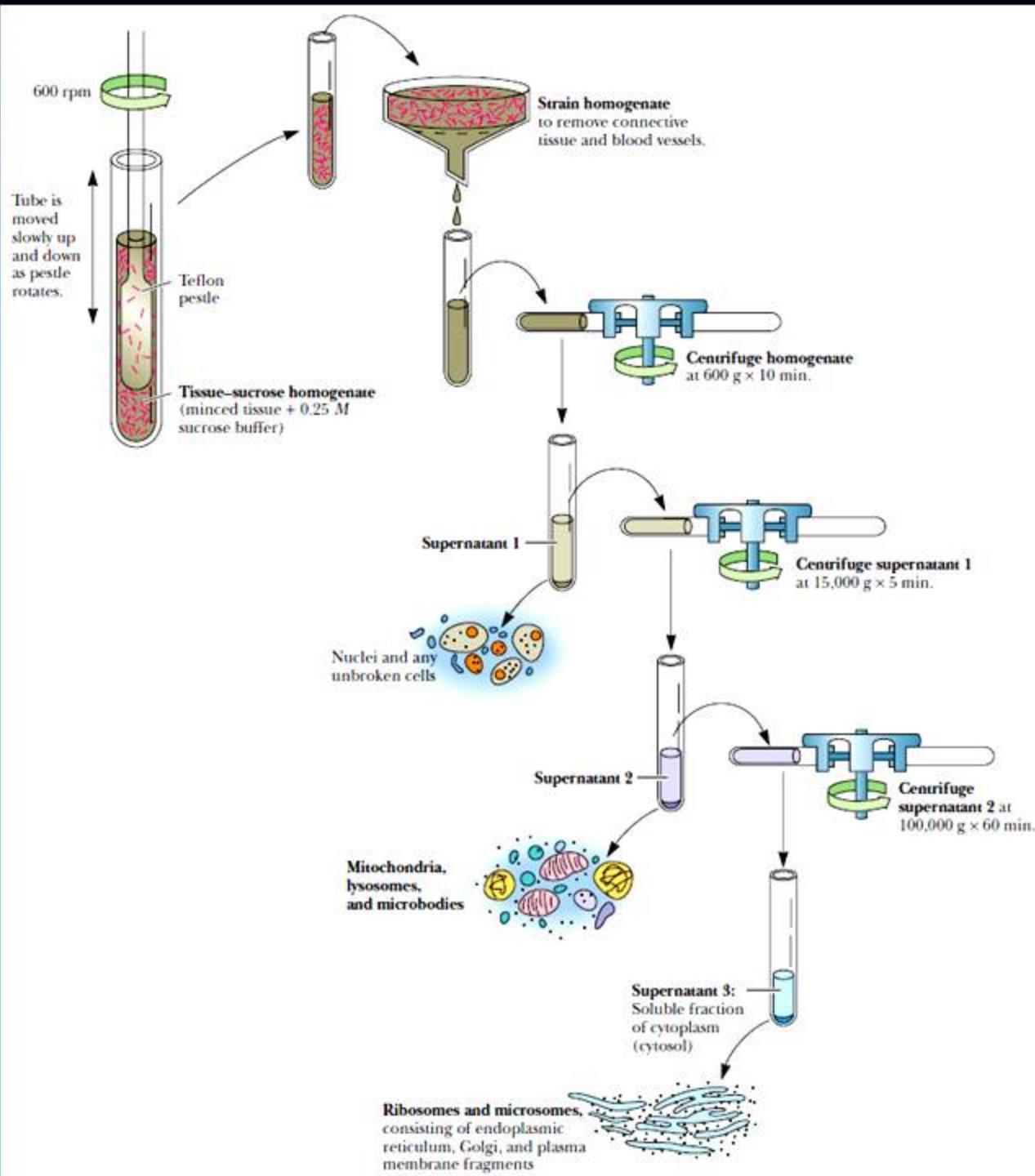
- L'ultracentrifugeuse peut atteindre des vitesses de rotation de l'ordre de 80000 à 100000 rpm qui donnent lieu à des **forces** qui peut dépasser 100000 g.
- Les **ultracentrifugeuses** créent un vacuum dans la **chambre** du **rotor** pour permettre d'obtenir de très **hautes vitesses** de **centrifugation sans** avoir la **friction** de l'**air**, cette **chambre** est **réfrigérée** pour éviter le **réchauffement** des **échantillons** à ces **vitesses**.

1. Ultracentrifugation préparative

Dr Laib

1.1. Différentielle

Elle permet de **séparer** les **particules** de l'**homogénat** (organites, macromolécules, ...) en fonction de leur **taille** et de leur **densité** par une **succession** de **centrifugations** à des **temps** et des **accélérations croissants**.



1.2. Ultracentrifugation en gradient de densité

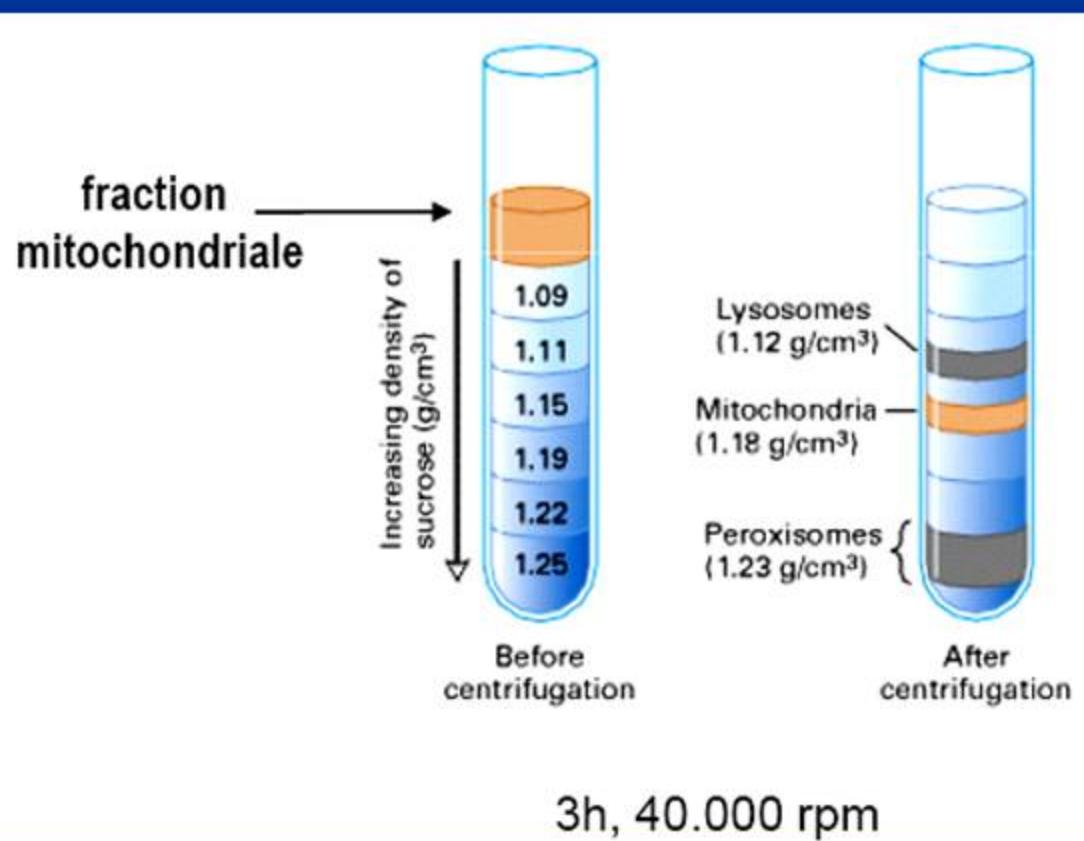
Il convient de distinguer, d'une part la **centrifugation de zone** qui sépare les macromolécules suivant leurs **constantes de sédimentation**, d'autre part la **centrifugation isopycnique** dont le **gradient de densité** constitue le **principe** même de la méthode.

1.2.1. Ultracentrifugation de Zone

Dr Laib

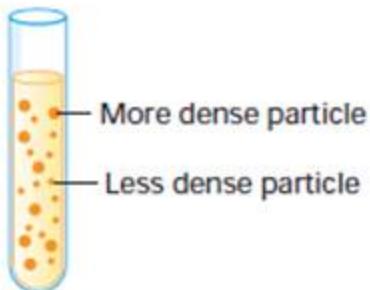
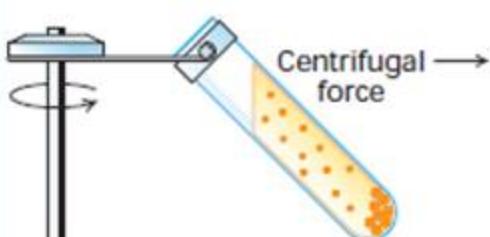
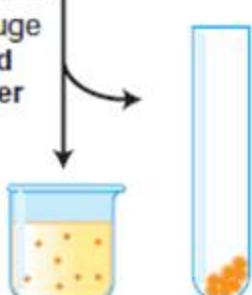
Dans l'**ultracentrifugation zonale**, une suspension protéique est soigneusement déposée au-dessus d'un **gradient de densité de saccharose**. Au cours de la centrifugation, chaque particule traverse le gradient en fonction de son **coefficent de sédimentation** (les molécules se sépareront selon leur densité et non leur masse).

L'ultracentrifugation zonale est utilisée pour des complexes macromoléculaires, des particules et des fractions membranaires.

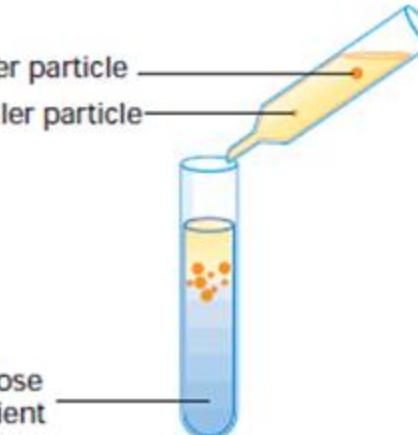
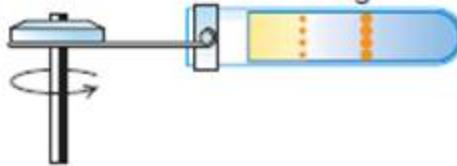
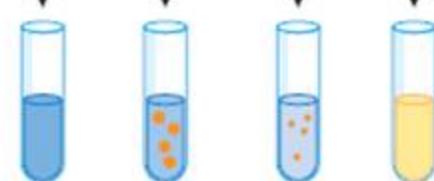


Fractionnement
sur
gradient de saccharose

(a) Differential centrifugation

1 Sample is poured into tube**2** Centrifuge
Particles settle
according to
mass**3** Stop centrifuge
Decant liquid
into container

(b) Rate-zonal centrifugation

1 Sample is layered on top of gradientLarger particle
Smaller particleSucrose
gradient**2** Centrifuge
Particles settle
according to
mass**3** Stop centrifuge
Collect fractions
and do assay

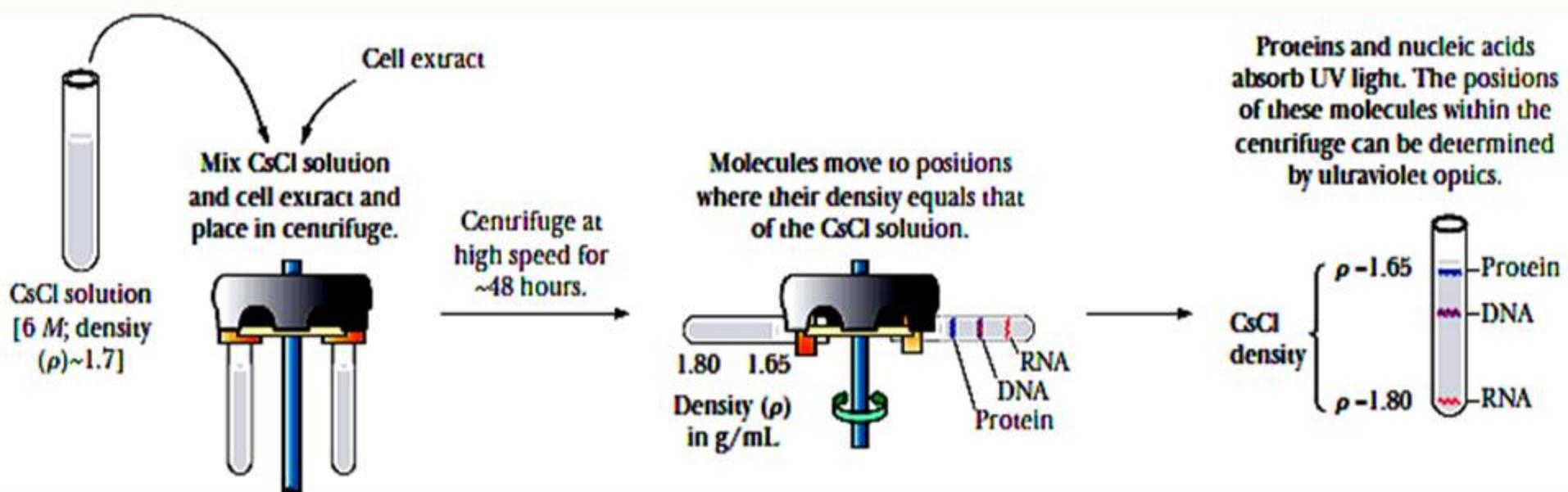
Decreasing mass of particles

1.2.2. Gradient isopycnique

Dr Laib

La centrifugation est **complète** jusqu'à l'**équilibre** (chlorure de césium CsCl, CsSO₄ séparation selon la **densité**).

On réalise un gradient de densité (continu ou discontinu) encadrant la masse volumique de la protéine. Au bout d'un **temps suffisamment long** de centrifugation, **grande vitesse de centrifugation**, la protéine s'arrête au niveau où sa **densité** est **égale** à celle du **solvant**.



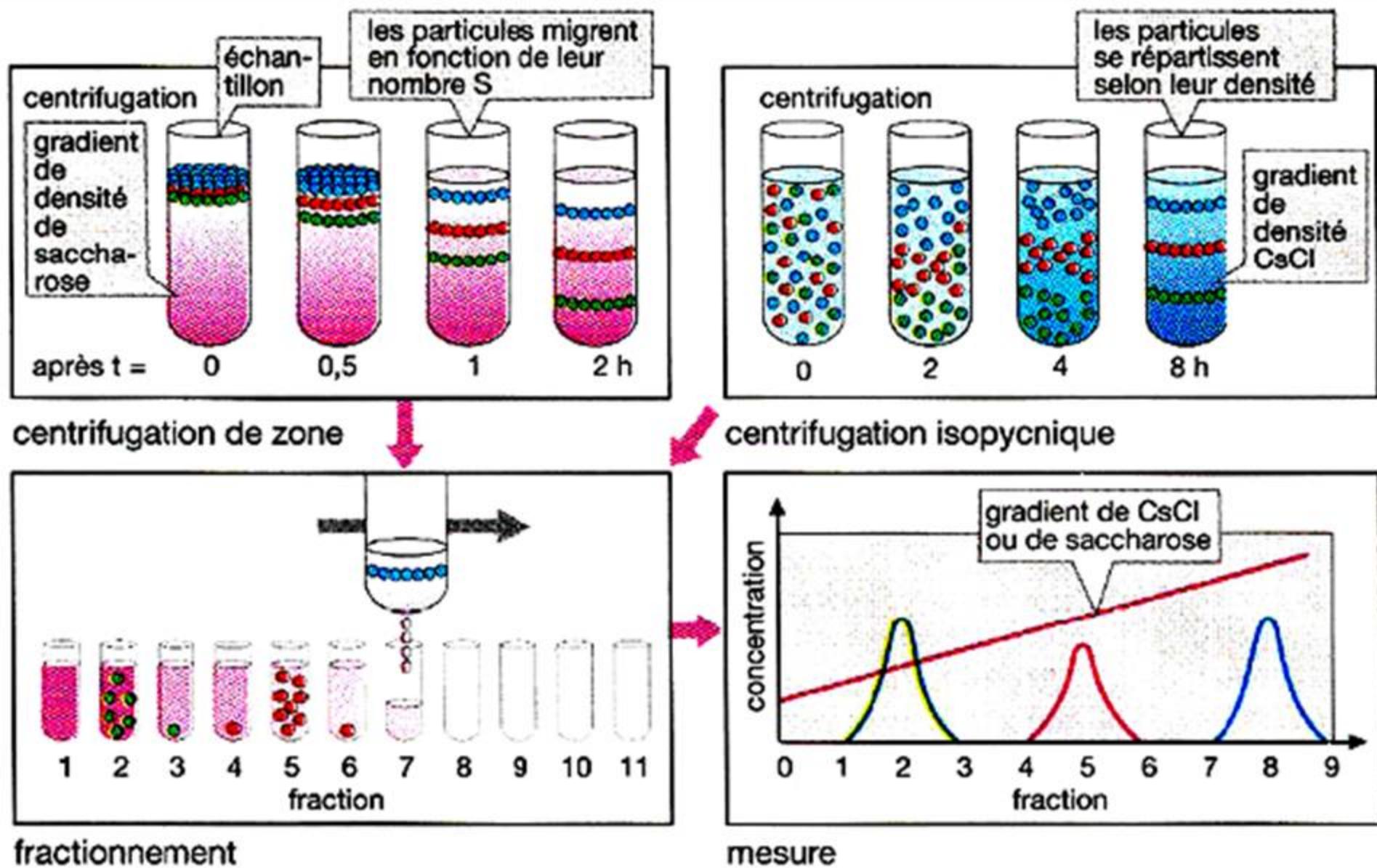
2. Ultracentrifugation analytique

Ultracentrifugation analytique Diffère de l'ultracentrifugation préparative par les résultats attendus ;

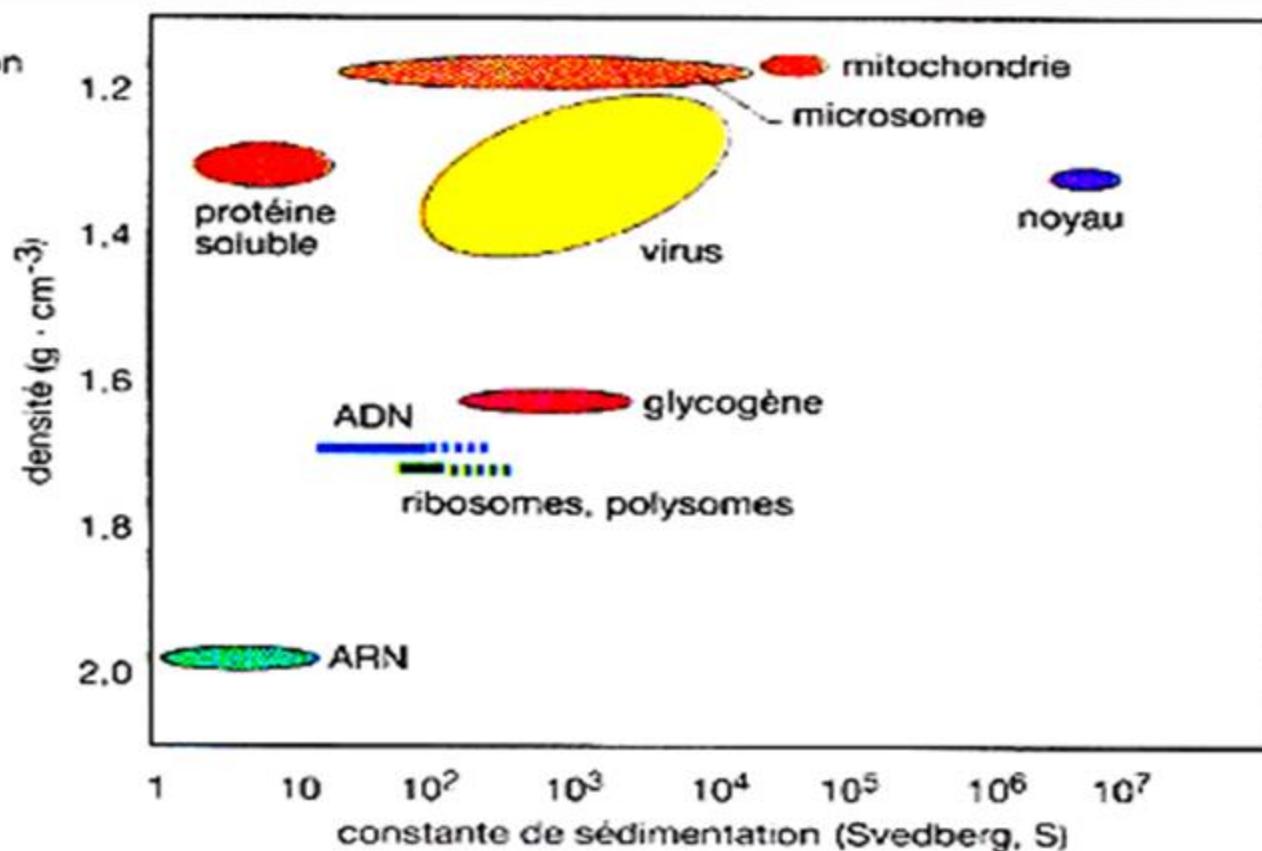
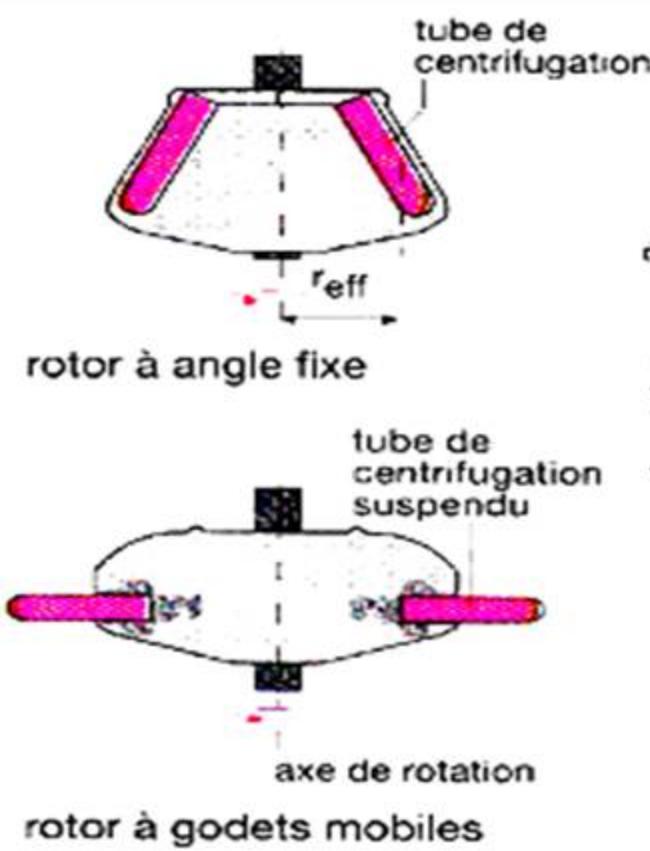
Renseigne sur les caractéristiques physiques des molécules ;

La migration est souvent suivie par stroboscopie → coût.

Ultracentrifugation en zones et isopycnique Dr Laib



Récapitulation (principes de l'ultracentrifugation) Dr Laib



g : accélération

v : vitesse de sédimentation ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

ω : vitesse angulaire ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$)

r_{eff} : rayon effectif (cm)

$$g = \omega^2 \cdot r_{\text{eff}}$$

$$v = \omega^2 \cdot r_{\text{eff}} \cdot s$$

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N \cdot f}$$

s : coefficient de sédimentation

M : masse moléculaire

\bar{v} : volume spécifique partiel de la particule ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)

ρ : densité de la solution ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

f : coefficient de friction