

CENTRIFUGAZIONE

INTRODUZIONE

Una centrifuga è uno strumento progettato per produrre una forza centrifuga superiore alla forza di gravità terrestre.

Le particelle in soluzione se lasciate in condizioni di quiete tenderanno a sedimentare per effetto della gravità.

Per ogni particella la velocità alla quale essa sedimenta è proporzionale alla forza applicata, conseguentemente macromolecole in soluzione sedimentano più velocemente quando la forza applicata è maggiore di quella di gravità esercitata dalla terra.

Scopo delle tecniche di separazione per centrifugazione

Esercitare una forza maggiore del campo gravitazionale terrestre aumentando la velocità di sedimentazione delle macromolecole, col fine di separare macromolecole che differiscono per densità, forma e dimensioni e quindi sedimentano con velocità diversa sotto l'influenza di un campo centrifugo applicato.

La centrifugazione consente la separazione di molecole e particelle sulla base del loro differente comportamento in un campo gravitazionale.

centrifugazione preparativa

utilizzata per estrarre da una sospensione componenti da sottoporre ad analisi successive

è tipicamente usata per separare cellule, frazioni subcellulari, organelli, virus, membrane o macromolecole,

centrifugazione analitica

per conoscere le componenti e le caratteristiche di molecole o particelle.

è tipicamente utilizzata per lo studio di caratteristiche di sedimentazione di molecole purificate

In generale, i metodi preparativi possono essere utilizzati su scala diversa, adattandosi a quantità molto grandi o molto piccole di materiale di partenza, mentre quelli analitici utilizzano quantità piuttosto limitate.

Forza centrifuga relativa

In una centrifuga da laboratorio, un rotore, che contiene i campioni, viene fatto girare ad alta velocità intorno al suo asse generando un campo gravitazionale. La **forza centrifuga (F_c)** che agisce sul campione dipende dalla sua **massa (m)**, dalla **velocità angolare (ω)** dalla **distanza (r)** dall'asse di rotazione, secondo l'equazione:

$$F_c = m\omega^2 r$$

Poichè la forza di gravità (F_g) che agisce su un corpo è uguale al prodotto della massa per l'accelerazione di gravità (g), definiamo la **Forza Centrifuga Relativa (RCF)**, cioè il rapporto tra la forza agente su una particella posta in rotazione e il peso della stessa, come:

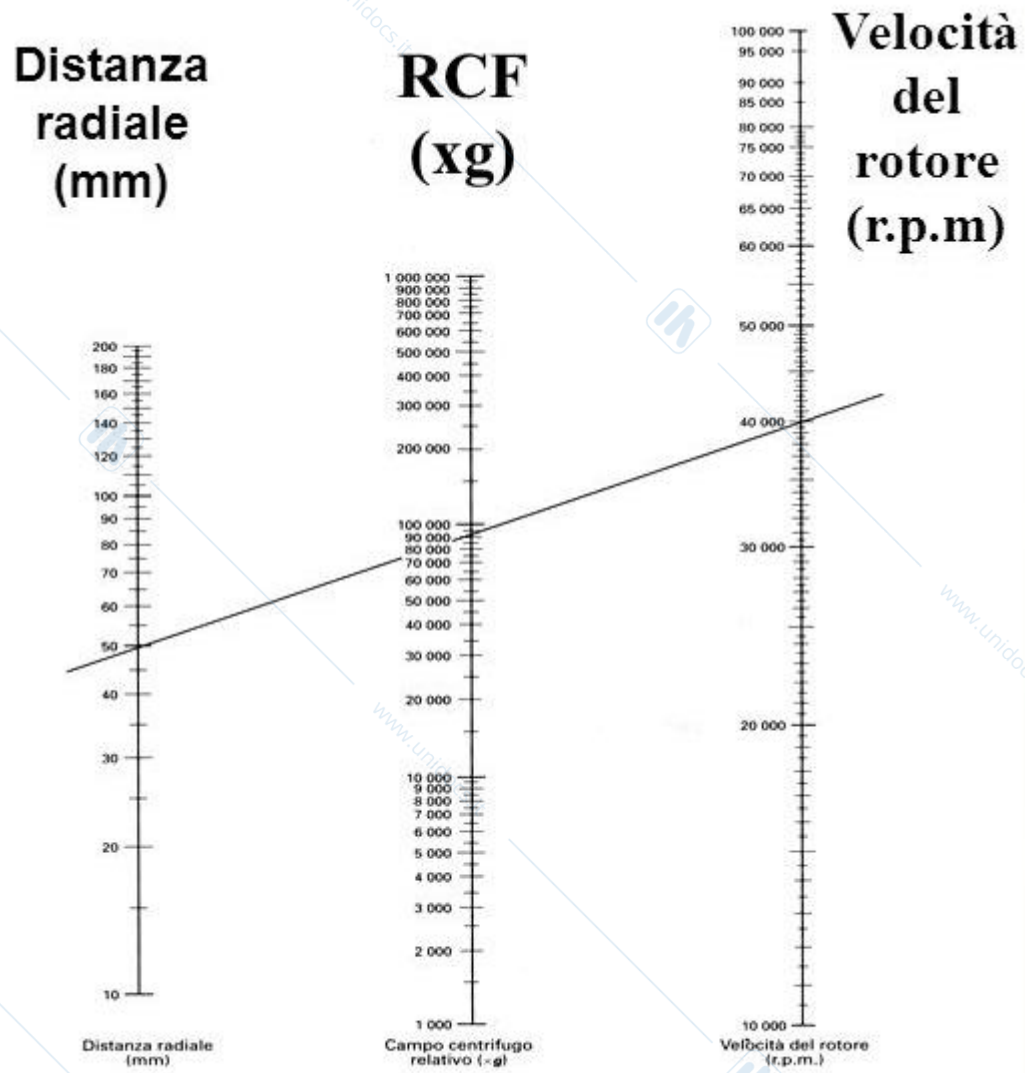
$$\text{RCF} = F_c/F_g$$

$$F_c/F_g = m\omega^2 r/mg = \omega^2 r/g$$

Esprimendo la velocità angolare in giri al minuto (rpm) e sostituendo a g il suo valore che, sulla superficie terrestre, è pari a 980 cm/sec^2 , risulta che:

$$\text{RCF} = (2\pi r \text{rpm}/60)^2 r/3600 = 1.118 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$$

nomogramma per valutare quali velocità e quali raggi sono necessari per ottenere una RCF



Wilson and Wolker Biochimica e biologia molecolare Ed. Raffaello cortina

Sedimentazione

Particelle con **massa diversa** sottoposte allo stesso campo centrifugo, **sedimentano a velocità diversa**. La velocità di sedimentazione di una particella in sospensione, in un campo centrifugo, dipende da:

- campo centrifugo applicato
- distanza tra la particella e l'asse di rotazione
- densità e viscosità del mezzo
- densità della particella
- dimensioni e forma della particella

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{a^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)}{\eta} \cdot \omega^2 r$$

← S
coefficiente di sedimentazione

a = raggio particella

ρ_p = densità particella

ρ_m = densità mezzo

η = viscosità mezzo

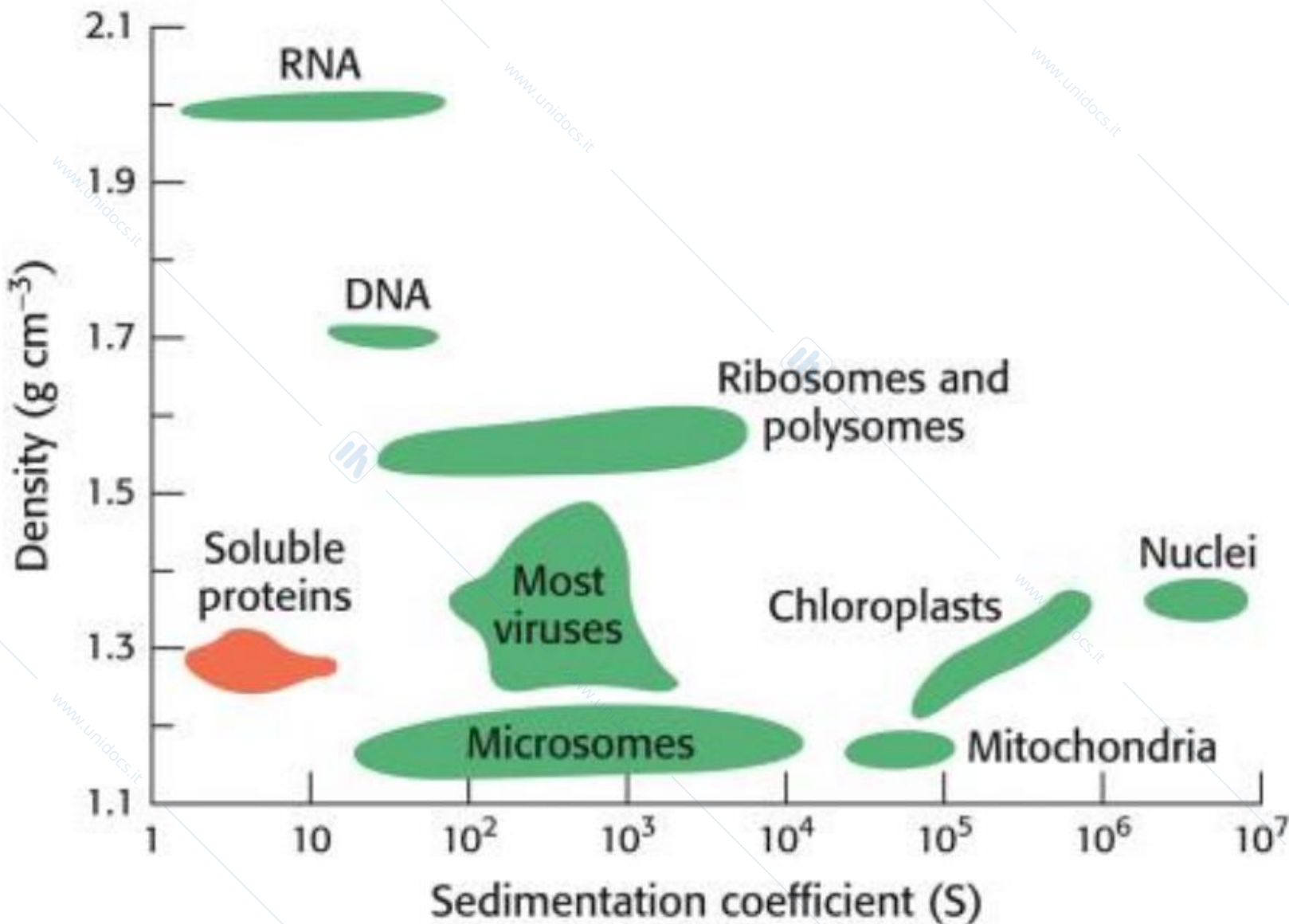
$$v = s \omega^2 r$$

Coefficiente di sedimentazione

L'analisi della velocità di sedimentazione di una particella in sospensione può essere utilizzata per studiarne le proprietà. La velocità di sedimentazione (v) di una particella può essere anche espressa in termini di velocità di sedimentazione per unità di campo centrifugo applicato, più comunemente chiamato coefficiente di sedimentazione, s .

il coefficiente di sedimentazione (S) ha le dimensioni di un tempo e si misura in Svedberg.

$$1 S = 10^{-13} \text{ sec}$$



In laboratorio si distinguono:

centrifughe da banco, utilizzate generalmente per isolare rapidamente materiali che sedimentano velocemente (cellule, nuclei, ac.nucleici o proteine, etc.).
possono essere refrigerate od operare a temperatura ambiente
sono utili per centrifugare volumi relativamente piccoli (fino a 50 ml)
hanno velocità da 4000 a 15000 rpm (RCF fino a 10000 x g)
possono alloggiare sia rotori ad angolo fisso che a braccio oscillante.

centrifughe di grande capacità, utilizzate per la sedimentazione di cellule, batteri, frazioni subcellulari di grandi dimensioni, acidi nucleici e proteine precipitati
hanno capacità da pochi ml a oltre a 2 litri
usano diversi rotori, ad angolo fisso o a braccio oscillante
raggiungono velocità fino a 25000 rpm

ultracentrifughe, refrigerate, con camera del rotore sigillata e sotto vuoto, per raggiungere velocità molto elevate. Vengono utilizzate per la sedimentazione di acidi nucleici, proteine, piccoli organelli (es: ribosomi)
raggiungono velocità max 80000 rpm (RCF fino a 600000 g)
mantengono uno stretto controllo di temperatura, velocità e del bilanciamento
trattano volumi piccoli ma possono arrivare fino a 200-300 ml

Rotori

ad angolo fisso

Le particelle, muovendosi in senso radiale sotto l'influenza del campo centrifugo, incontrano la parete della provetta e scivolano su di essa fino al fondo formando un sedimento piccolo e compatto. I tubi sono ospitati in alloggiamenti inclinati secondo un angolo fisso, da 15 a 40°. Il cammino percorso dalle particelle è breve e la sedimentazione rapida.

a braccio oscillante

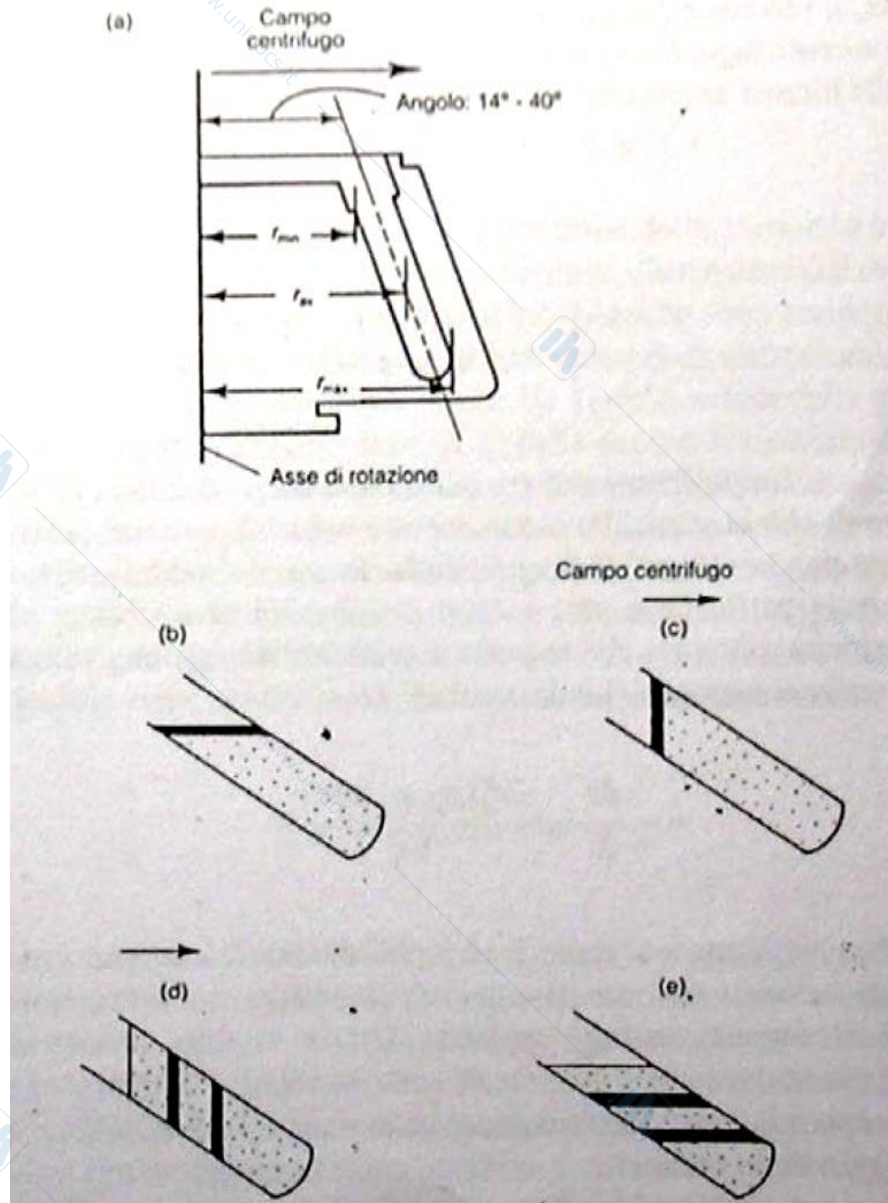
il tubo contenente il campione, che a riposo è in posizione verticale, durante la centrifugazione, sottoposto alla forza centrifuga, si dispone in posizione orizzontale, perpendicolare all'asse di rotazione. Durante la decelerazione, il tubo ritorna nella posizione originaria.

Verticali

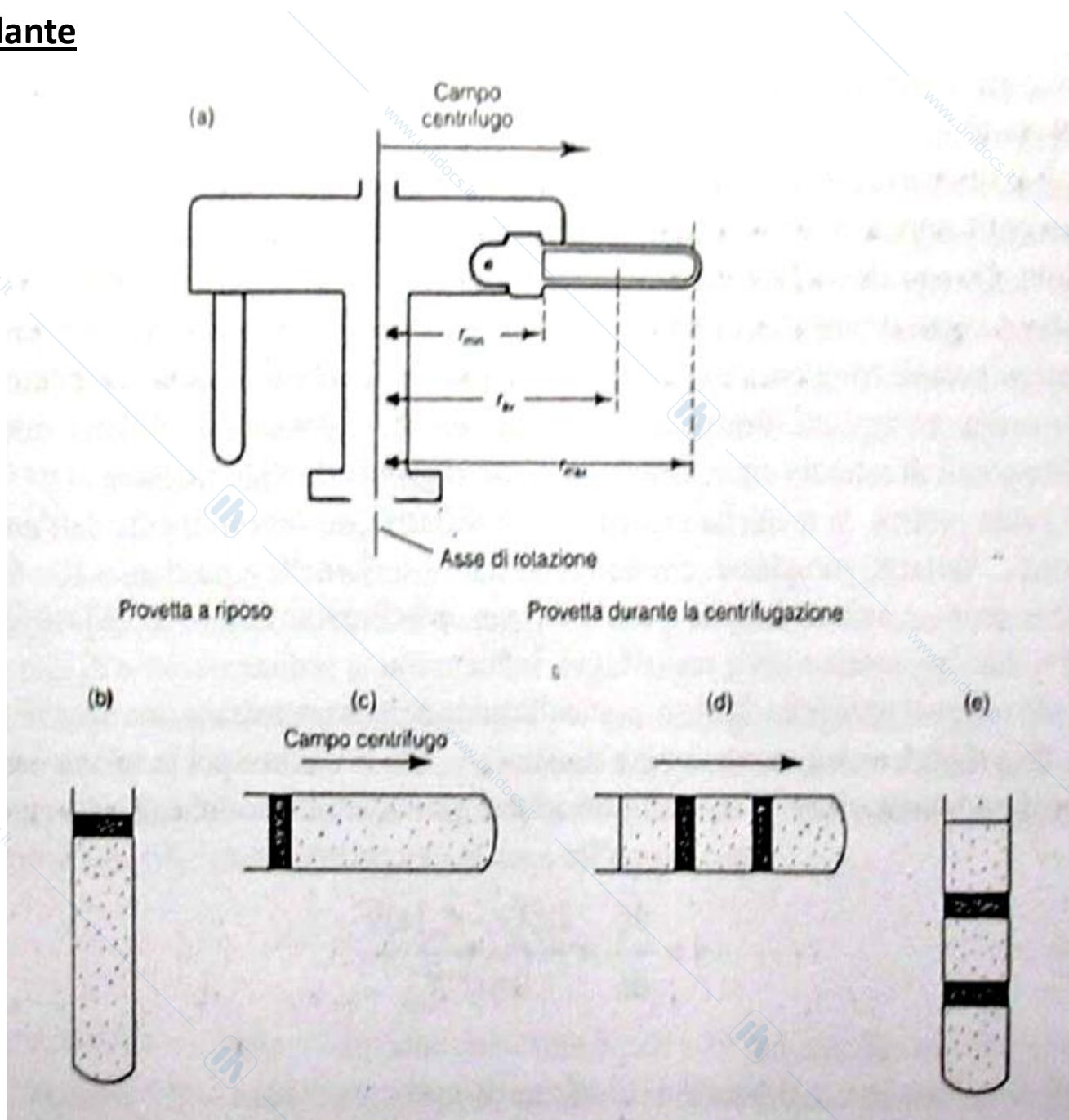
il tubo contenente il campione rimane permanentemente in posizione verticale. In questi rotorii il cammino da percorrere è molto breve e i tempi di sedimentazione si accorciano in maniera significativa, tuttavia un eventuale sedimento si trova normalmente attaccato sulla parete laterale del tubo. Questi rotorii sono usati principalmente per la centrifugazione in gradiente.

Tipi di rotore

Rotore ad angolo fisso



Rotore basculante



centrifughe da banco



centrifughe di grande capacità



ultracentrifughe





Rotor Calculator

[Quote →](#)



Fixed Angle Centrifuge Rotors

- Pathlength: Medium
- Run time: Fast
- Resolution: Excellent

[Quote →](#)



Swinging-Bucket Rotors

- Pathlength: Full
- Run time: Slow
- Resolution: Excellent

[Quote →](#)



Near-Vertical Rotors

- Pathlength: Short
- Run time: Fast
- Resolution: Excellent

[Quote →](#)



Vertical Angle Rotors

- Pathlength: Shortest
- Run time: Fastest
- Resolution: Highest



Continuous Flow Rotors

- Short pathlengths reduce overall pelleting time
- Large volumes that can be continuously run



Zonal Rotors

- Higher volume
- 3 L at a time
- Large-scale gradient separations



Airfuge Rotors

- Pressurized air impinges on the rotor bottom, which lifts and turns the rotor
- Pelleting of small particles in a short amount of time

Centrifugazione differenziale

Una miscela di particelle eterogenee e approssimativamente sferiche ma di densità e dimensioni diverse, può quindi essere separata mediante centrifugazione. Nell'ambito di un lisato cellulare, ad esempio, densità, dimensione e forma delle varie componenti determinano la velocità di sedimentazione: particelle più grandi e dense avranno tempi di sedimentazione più brevi.

La centrifugazione differenziale sfrutta la **differente velocità di sedimentazione** di particelle di diverse dimensioni e densità. Le diverse componenti vengono separate mediante **tappe di centrifugazione successive**, aumentando gradualmente il campo centrifugo applicato (RCF). In questo modo, ad ogni tappa, si ottiene un sedimento contenente uno specifico tipo di particelle, ed un soprnatante contenente quelle non ancora sedimentate. In questo modo vengono separate le varie componenti cellulari. Ad esempio: pochi minuti a 1000 g sono sufficienti a far sedimentare cellule intere, mentre valori di RCF progressivamente più elevati sono necessari per far sedimentare nuclei, membrane e organelli, vescicole. RCF molto più elevati sono necessari per la sedimentazione di ribosomi e altri componenti multimolecolari.

Centrifugazione in gradiente di densità

La centrifugazione in gradiente di densità sfrutta differenze di dimensioni, forma e densità delle particelle da separare.

Il gradiente di densità viene preparato a partire da diversi tipi di soluti, caratterizzati da buona solubilità, non tossicità e purezza; comunemente usati sono:

- Sali di minerali pesanti, come il CsCl
- Piccole molecole organiche come il saccarosio
- Polimeri sintetici come il ficoll
- Silice colloidale come il percoll

La formazione del gradiente di densità all'interno del tubo da centrifuga può avvenire durante la centrifugazione (gradiente autoformato), o prima (gradiente preformato). In questo caso, il gradiente può essere di tipo continuo, se la densità del soluto cresce in maniera graduale lungo il tubo da centrifuga, o di tipo discontinuo, se la densità cresce in modo discontinuo per effetto della stratificazione di soluzioni di densità crescente; due diversi dispositivi sono utilizzati per la preparazione del gradiente continuo e discontinuo.

Centrifugazione zonale

La centrifugazione zonale consiste nella sedimentazione delle particelle in ZONE discrete. E' usata per la separazione di particelle di densità simile ma di massa diversa come organelli, subunità ribosomali, ibridi RNA –DNA, proteine. Trattandosi di un metodo dinamico, la durata della centrifugazione deve essere sufficiente a determinare la separazione delle componenti, ma inferiore al tempo necessario alla completa sedimentazione al fondo della provetta.

si procede attraverso:

- Formazione di un gradiente continuo di densità (ad esempio di saccarosio)
- Stratificazione del campione sul gradiente
- Raccolta di frazioni per l'analisi

Centrifugazione isopicnica

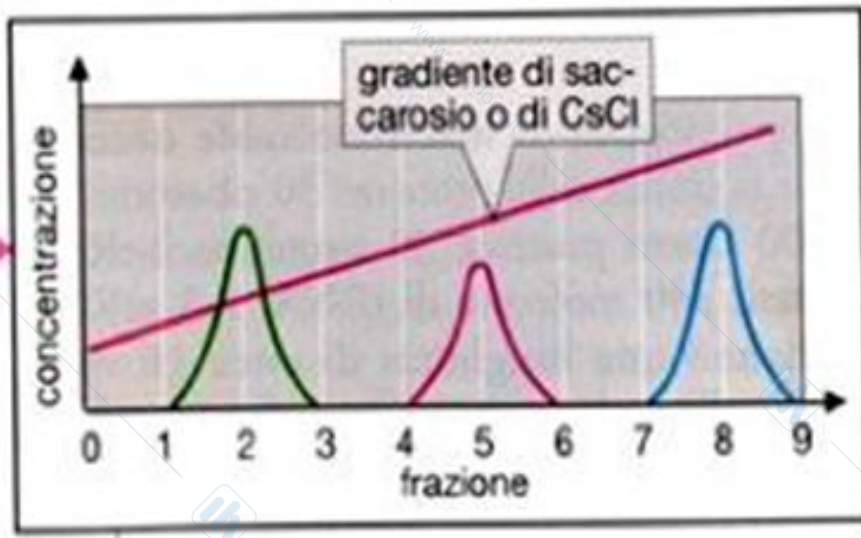
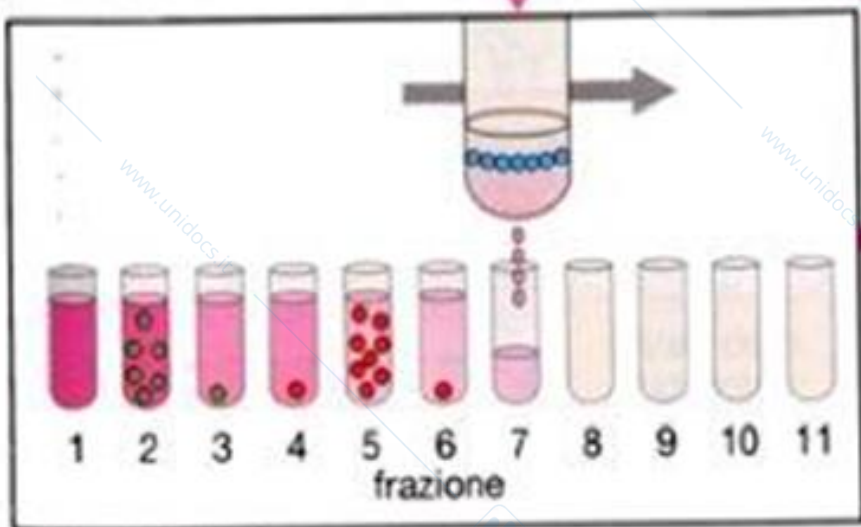
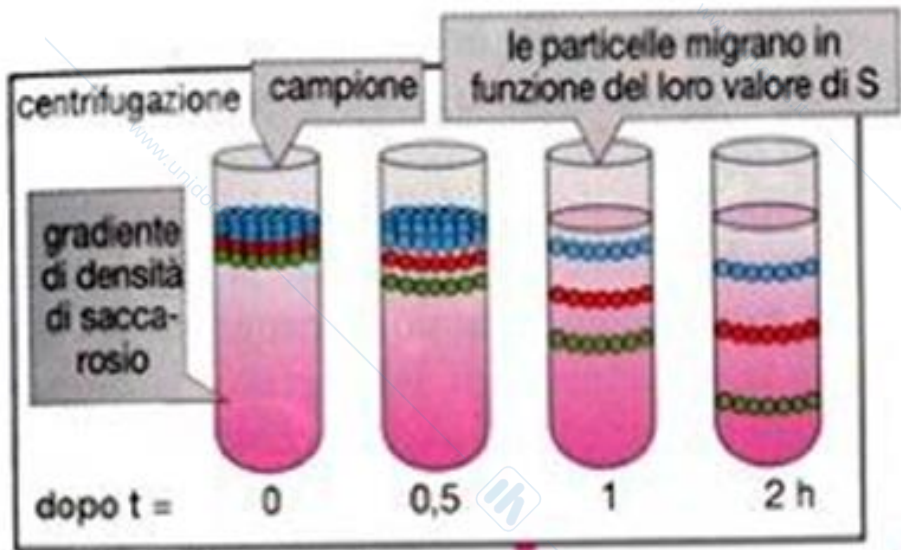
A differenza della centrifugazione zonale, in cui si sfrutta la diversa velocità con cui le particelle si muovono all'interno di un gradiente, la centrifugazione isopicnica è una centrifugazione all'equilibrio, che consiste nel portare ogni componente della miscela ad un livello corrispondente alla propria densità (figura A). Si tratta quindi di una tecnica che separa le particelle di una miscela esclusivamente in base alla densità, e non in base alla forma ed alle dimensioni. Una volta raggiunto l'equilibrio, questo non viene alterato dal tempo di centrifugazione.

il gradiente viene allestito utilizzando una soluzione la cui densità massima deve essere superiore a quella di tutte le particelle da separare

il campione viene miscelato alla soluzione

dopo la centrifugazione, frazioni corrispondenti ai diversi livelli di densità vengono raccolte e analizzate

Questa tecnica è tipicamente utilizzata per la separazione di acidi nucleici in gradienti di CsCl (un tipico tubo da centrifuga contenente bande di acidi nucleici è riportato in figura B).



Selezione delle bottiglie e/o provette

La scelta del tipo di provetta o bottiglia più adatta alla centrifugazione dovrà tener conto dei seguenti fattori:

- adattabilità agli alloggiamenti dell'equipaggiamento rotante
- resistenza meccanica (rottura delle provette)
- resistenza chimica
- resistenza alla temperatura
- trasparenza
- autoclavabilità
- facilità di pulizia
- sterilizzazione
- economicità

La resistenza meccanica delle provette in plastica è influenzata da diversi fattori: limiti fisici dei materiali costruttivi, interazione di tali limiti con agenti chimici, presenza o meno di tappi di chiusura, lavaggi, processi di sterilizzazione, tempo e durata della centrifugazione.

I prodotti chimici influenzano le caratteristiche meccaniche, la flessibilità e le proprietà fisiche delle provette.

I materiali per provette più utilizzati sono:

Polipropilene copolimero (PA) Copolimero lineare con aggiunta di etilene e propilene; disponibile con parete sottile e spessa, normalmente elencato come PA (Poliallomero). Ha buone proprietà chimiche e di media trasparenza; adatto per pelleting e separazione in gradiente di densità. Eccellente per essere tagliato (sliceable) o perforato (pierceable) e ideale per centrifugazioni a bassa temperatura. Sia a temperatura ambiente che a bassa temperatura di centrifugazione, ha buona resistenza meccanica a basse e medie velocità.

Policarbonato (PC) Trasparente e rigido, buona resistenza agli acidi con ottima compatibilità verso le soluzioni di acido diluito. Disponibile con parete spessa e sottile, in tubi o bottiglie. Autoclavabile e riutilizzabile. Sia a temperatura ambiente che a basse temperature di centrifugazione, mantiene la propria rigidità e resistenza meccanica anche ad alte velocità.

Polipropilene (PP) Traslucido. Buone proprietà chimiche. Richiesto quando è necessario ottenere una netta interfaccia tra separazioni di particelle con diverso coefficiente di densità (layer). A temperatura ambiente mantiene la propria forma originale e la propria resistenza meccanica anche ad alte velocità. A basse temperature di centrifugazione non è consigliabile, dato che aumenta la propria fragilità.

Polietilene (CPE) Polimero opaco, ideale per acido acetico o idrofluorico.

Adatto per taglio e foratura, nelle centrifugazioni in gradiente.

Utilizzato quando necessitano basse temperature di centrifugazione.

Polistirene (PS) Rigido e non tossico; trasparente e compatibile con la maggior parte delle soluzioni acquose. Normalmente utilizzato per pelleting.

Polisulfone (Phenylene-Isopropylidene) (PSF) Di colore giallo trasparente. Resistente agli acidi, basi, alcool e idrocarburi. Ottima resistenza alla temperatura.

Teflon (FEP) Traslucido, flessibile e ad alta densità. Resiste a temperature di esercizio molto basse. Eccellente con Acetone e altri solventi. Autoclavabile e sterilizzabile. Riduce le proprie qualità quando utilizzato ad alta forza di gravità con temperature >20 °C.

Vetro (VJ) Duran 50

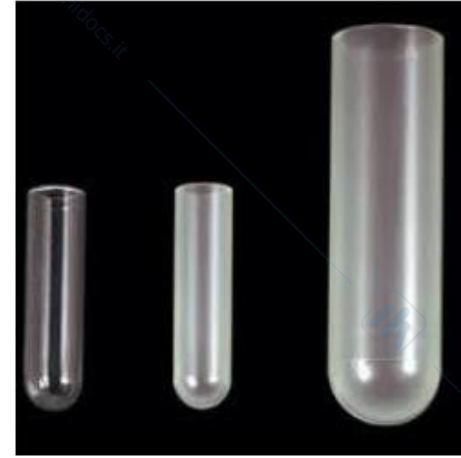
Vetro (VS) Vetro soffiato

Corex (C) Per centrifugazioni a basse e medie velocità. Cinque volte più resistente del vetro convenzionale. Buono per alte temperature.

La vita media delle **provette in vetro** è in funzione della frequenza d'uso, della accelerazione centrifuga relativa, dei lavaggi, abrasioni, cura del trattamento. Gli sforzi sviluppati in questi processi si accumulano nei vetri VJ e VS, i quali peraltro hanno un'eccellente resistenza chimica e possono sopportare velocità moderate se usati con gli opportuni riduttori/adattatori.

Con gli appositi riduttori/adattatori le provette in Corex possono essere usate a velocità medio-alte.

Diversi tipi di provette



Bisogna sempre “bilanciare le provette”, cioè il peso di due campioni in posizione diametralmente opposta devono essere identici.



E' fondamentale "bilanciare le provette" !!!



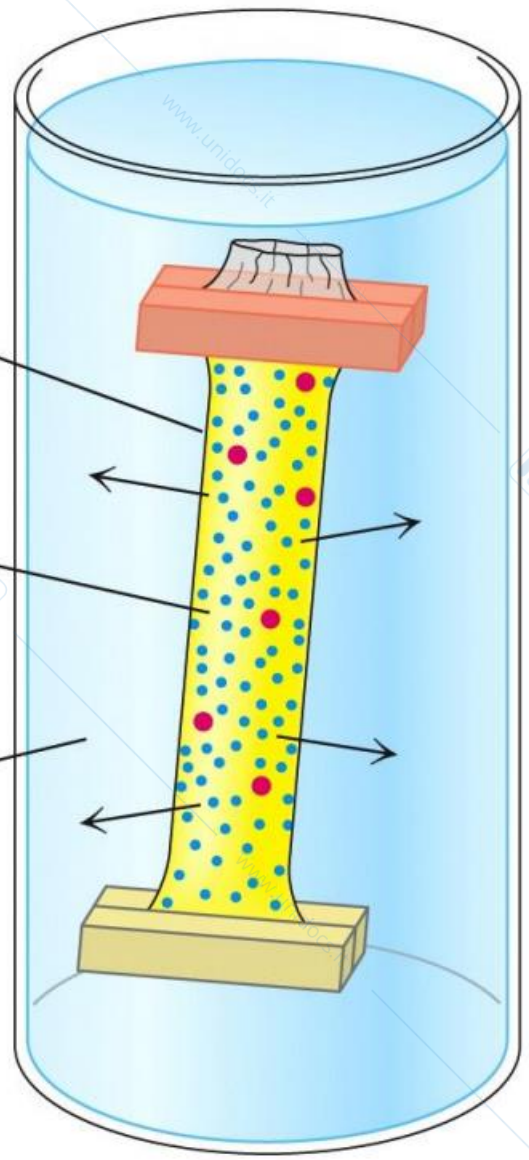
Applicazioni della centrifugazione: 1_DIALISI

La **dialisi** è un procedimento fisico con cui si separano una o più sostanze disciolte in un liquido, utilizzando una **membrana semipermeabile** che permette il passaggio di tali sostanze in una sola direzione. Il moto delle sostanze è dovuto essenzialmente alla **differenza di concentrazione** (*gradiente*) di tale sostanza tra i soluti nei due comparti di diffusione e cessa una volta giunti all'equilibrio.

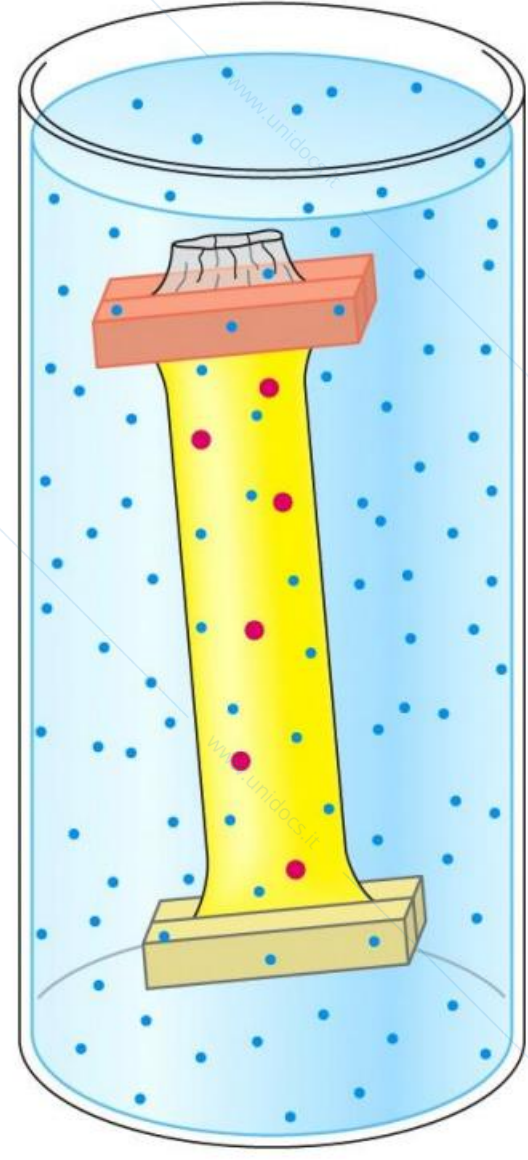
Dialysis bag

Concentrated solution

Buffer



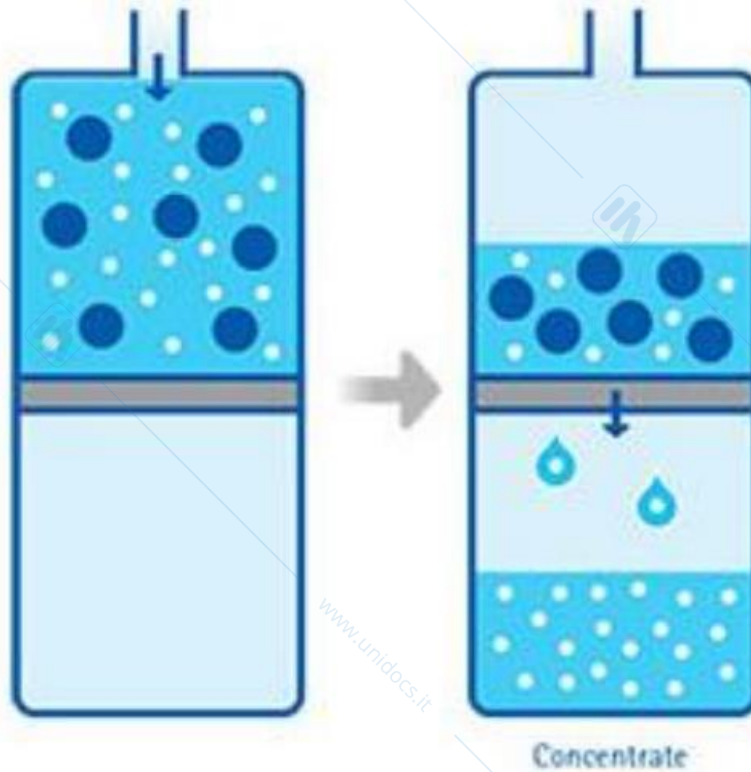
At start of dialysis



At equilibrium

Il principio della dialisi si può applicare anche mediante centrifugazione → tecniche di ultrafiltrazione

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

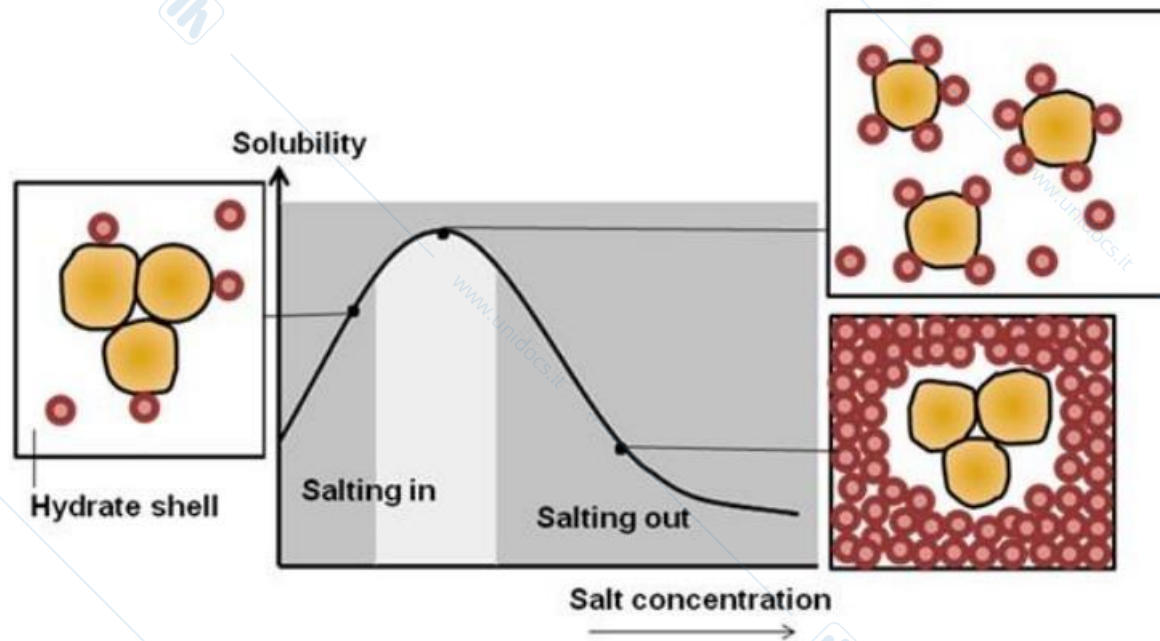


www.unidocs.it

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

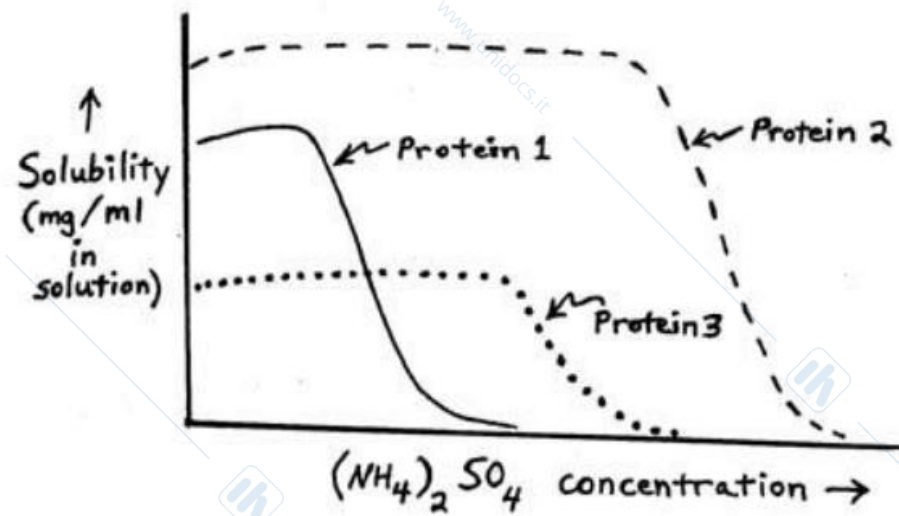
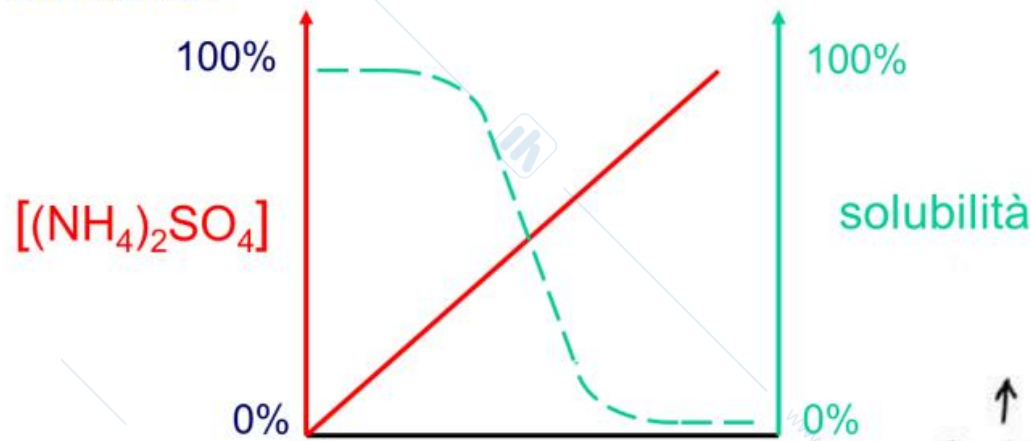
Applicazioni della centrifugazione: 2_Frazionamento di proteine per “**SALTING OUT**”

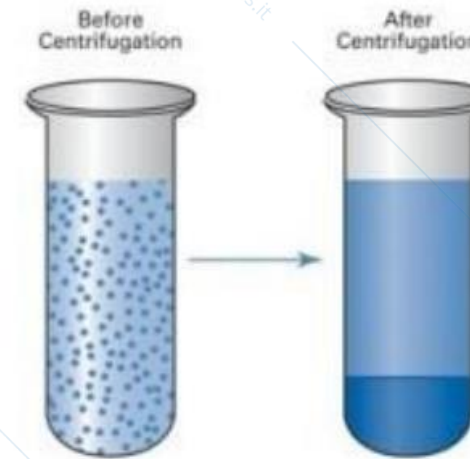
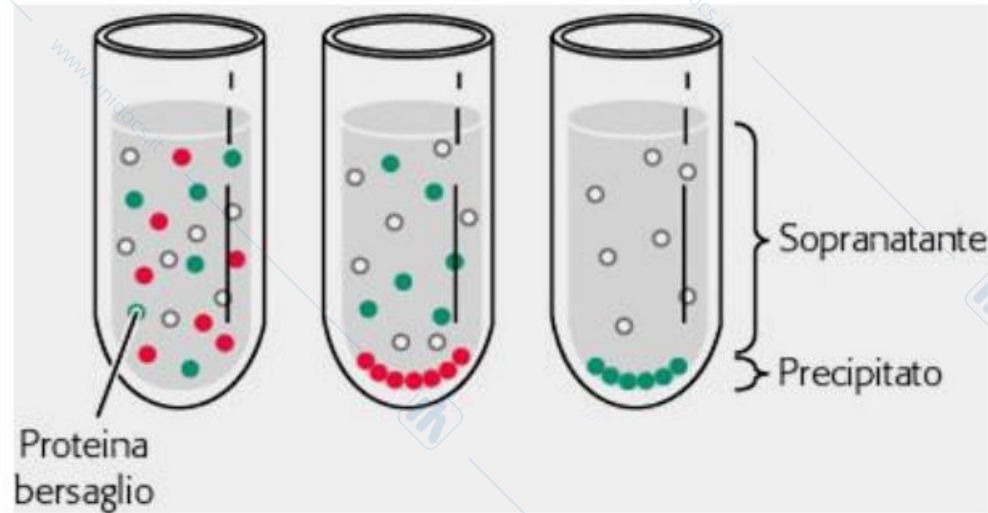
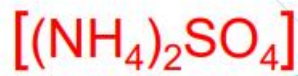
Ogni proteina, in dipendenza dalle sue caratteristiche strutturali, possiede una solubilità dipendente dal **solvente** utilizzato (acqua, solventi organici), dal **pH** e dalle condizioni di **forza ionica**.



Principio del salting out :

1. Gli ioni di sale aggiunto competono con gli ioni presenti nella soluzione per le molecole di solvente, facilitando l'aggregazione proteica;
2. Proteine diverse precipitano a diverse concentrazioni di sale.





Ammonio solfato è il reagente comunemente usato per il salting out perchè :

- ha **elevata solubilità** in acqua, permettendo di ottenere soluzioni ad alta forza ionica;
- il **pH della soluzione può essere variato**, portandolo vicino al pI della proteina da purificare.

