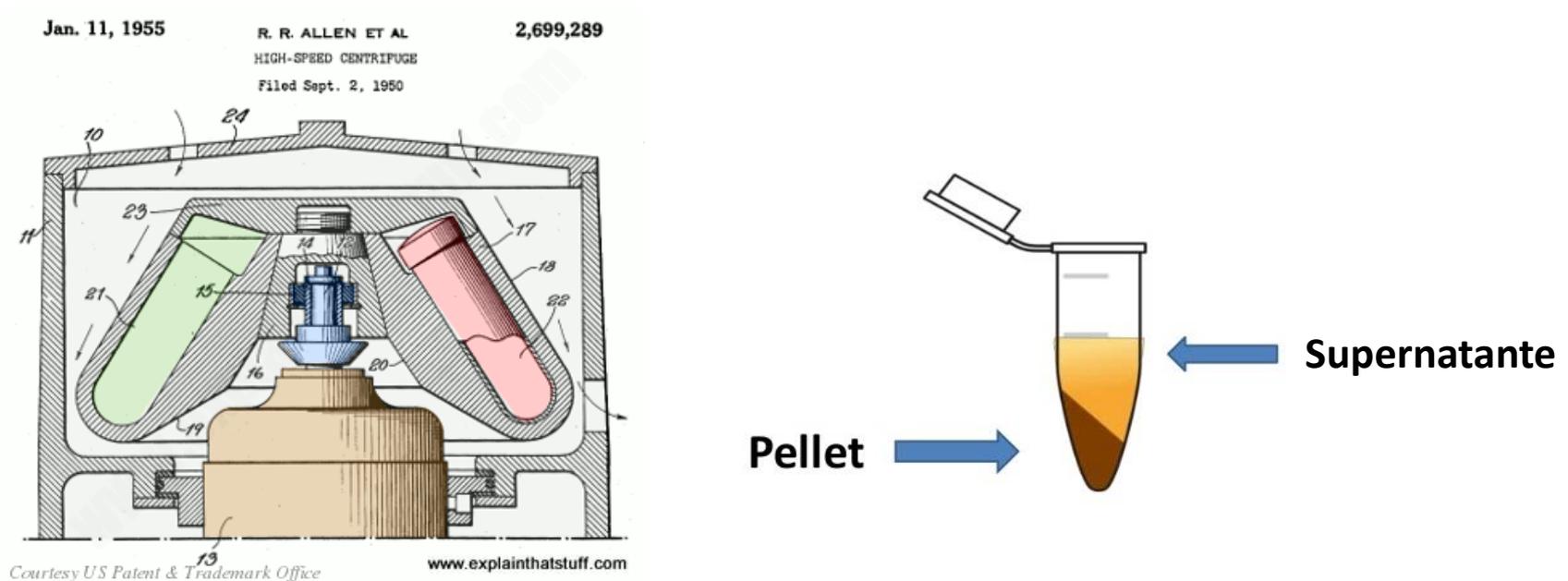


# Centrifugazione



Tecniche di separazione delle particelle presenti in un campione, che sfruttano il loro diverso comportamento all'interno di un campo centrifugo artificiale.



Le particelle si separeranno **CON UNA DIVERSA VELOCITA'** in base a:

- Forza del campo centrifugo;
- Dimensione della particella;
- Densità (della particella e del mezzo);
- Forma della particella
- Viscosità del mezzo.

# Campo Centrifugo

L'equazione fondamentale che descrive la velocità di sedimentazione di una particella è...

$$\mathbf{G} = \omega^2 \mathbf{r}$$

Campo centrifugo

Velocità Angolare (rad/s)

Distanza radiale della particella (in cm)

La velocità angolare spesso si esprime in giri/min. Ricordando che  $360^\circ = 2\pi\dots$

$$\omega = \frac{2\pi \text{ RPM}}{60}$$

Il campo centrifugo (velocità in RPM) diventa quindi...

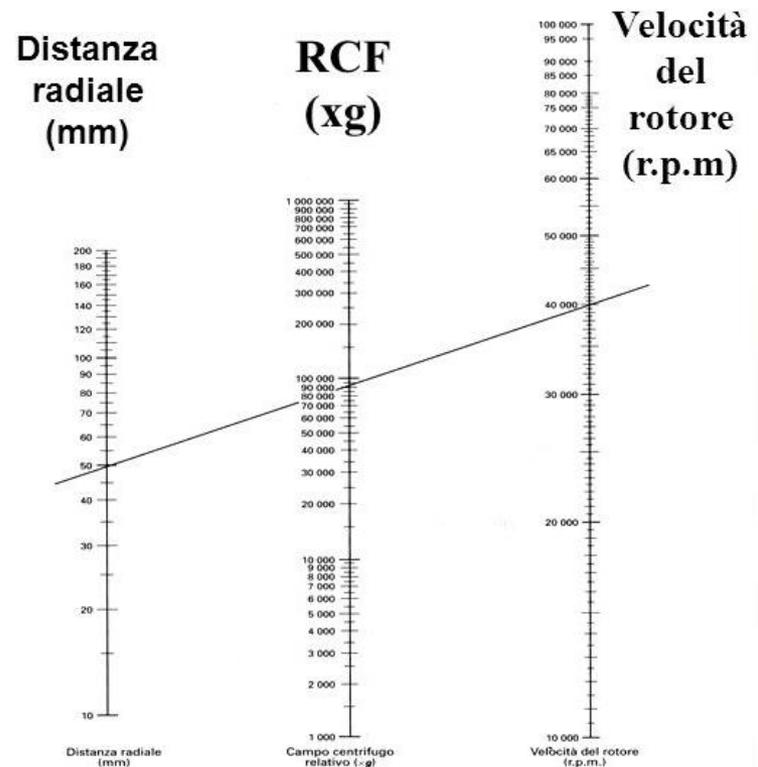
$$G = \frac{4\pi^2 \cdot (\text{RPM})^2}{3600} \cdot r$$

Oltre che in RPM, il campo centrifugo può essere espresso come multiplo del campo gravitazionale terrestre ( $g=980 \text{ cm/s}^2$ ) → **campo centrifugo relativo (RCF)**

$$RCF = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600 \times 980} \cdot r \quad \rightarrow \quad RCF = 1.11 \times 10^{-5} \cdot (RPM)^2 \cdot r$$

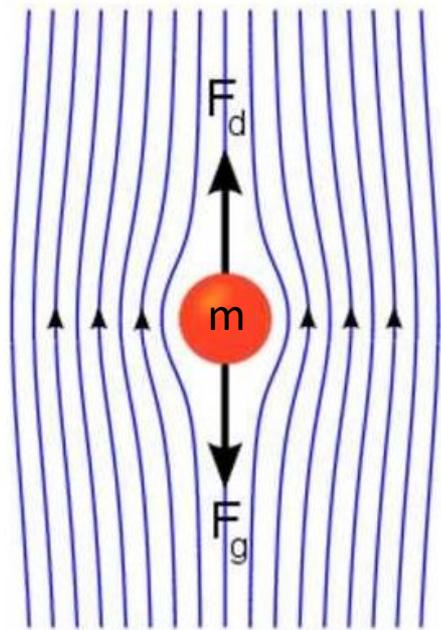
Es.  $r=10 \text{ cm}$ ,  $v=12000 \text{ rpm}$

$RCF = 16100g!!!$



# Velocità di Sedimentazione

Dipende dal campo centrifugo applicato, ma anche dalle caratteristiche del solvente e della particella...

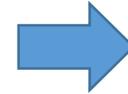


Source: [www.answers.com/topic/stokes-law](http://www.answers.com/topic/stokes-law)

## Forza di gravità

$$F_g = m g$$

massa



$$F_g = \rho_p V_p g$$

Campo gravitazionale

Densità particella

Volume parziale particella

## Spinta di Archimede

$$F_a = -\rho_f V_p g$$

Densità fluido

Volume parziale particella

## Forza di attrito

$$F_d = f v = 6\pi \eta r_p v$$

Forza di attrito

Coefficiente di attrito

velocità

# Legge di Stokes

The diagram shows the Stokes' Law equation for the sedimentation velocity of a spherical particle in a centrifugal field. The equation is  $v = \frac{2}{9} \frac{r_p^2 (\rho_p - \rho_m) G}{\eta}$ . Blue arrows point from text labels to the corresponding variables in the equation: 'Raggio particella' points to  $r_p$ , 'Densità particella' points to  $\rho_p$ , 'Densità del mezzo' points to  $\rho_m$ , 'Campo centrifugo' points to  $G$ , 'Viscosità del mezzo' points to  $\eta$ , and 'Costante per forma sferica' points to the fraction  $\frac{2}{9}$ . A red box highlights the constant  $\frac{2}{9}$ . On the left, 'Velocità sedimentazione particella sferica' points to the variable  $v$ .

$$v = \frac{2}{9} \frac{r_p^2 (\rho_p - \rho_m) G}{\eta}$$

Labels and their corresponding variables in the equation:

- Raggio particella:  $r_p$
- Densità particella:  $\rho_p$
- Densità del mezzo:  $\rho_m$
- Campo centrifugo:  $G$
- Viscosità del mezzo:  $\eta$
- Costante per forma sferica:  $\frac{2}{9}$
- Velocità sedimentazione particella sferica:  $v$

Quando  $\rho_p = \rho_m$  la particella non sedimenta ( $v = 0$ ).

Particelle allungate sedimentano più lentamente.

La velocità di sedimentazione può essere espressa in multipli di campo centrifugo applicato, generando il ***coefficiente di sedimentazione, s*** (espresso in secondi).

$$s = \frac{v}{\omega^2 r}$$

Il coefficiente di sedimentazione dipende dalla temperatura, dalla densità, dalla viscosità della soluzione e dalla forma e massa della particella.

Per questo motivo, viene corretto per le condizioni standard (acqua a 20°C) → coefficiente di sedimentazione standard ( $s_{20,w}$ ).

Unità di misura: Svedberg (S) =  $10^{-13}$  secondi.

Proteine	2-25 S
Acidi nucleici	3-100 S
Virus	40-1000 S
Lisosomi	4000 S
Mitocondri	$20 \cdot 10^3 - 70 \cdot 10^3$ S
Membrane	$100 \cdot 10^3$ S
Nuclei	$4000 \cdot 10^3 - 40\,000 \cdot 10^3$ S

# Tipi di Centrifugazione

## Preparativa



Permette di separare e raccogliere cellule, organelli, macromolecole (es. acidi nucleici e proteine).

- Differenziale
- Gradiente di densità
- Elutriativa

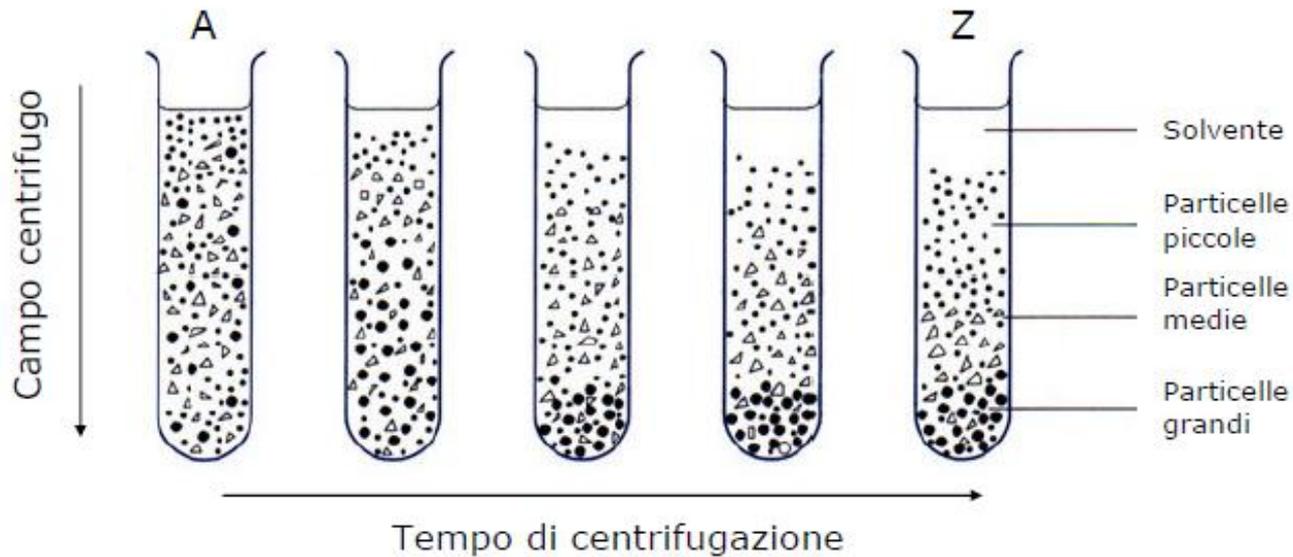
## Analitica



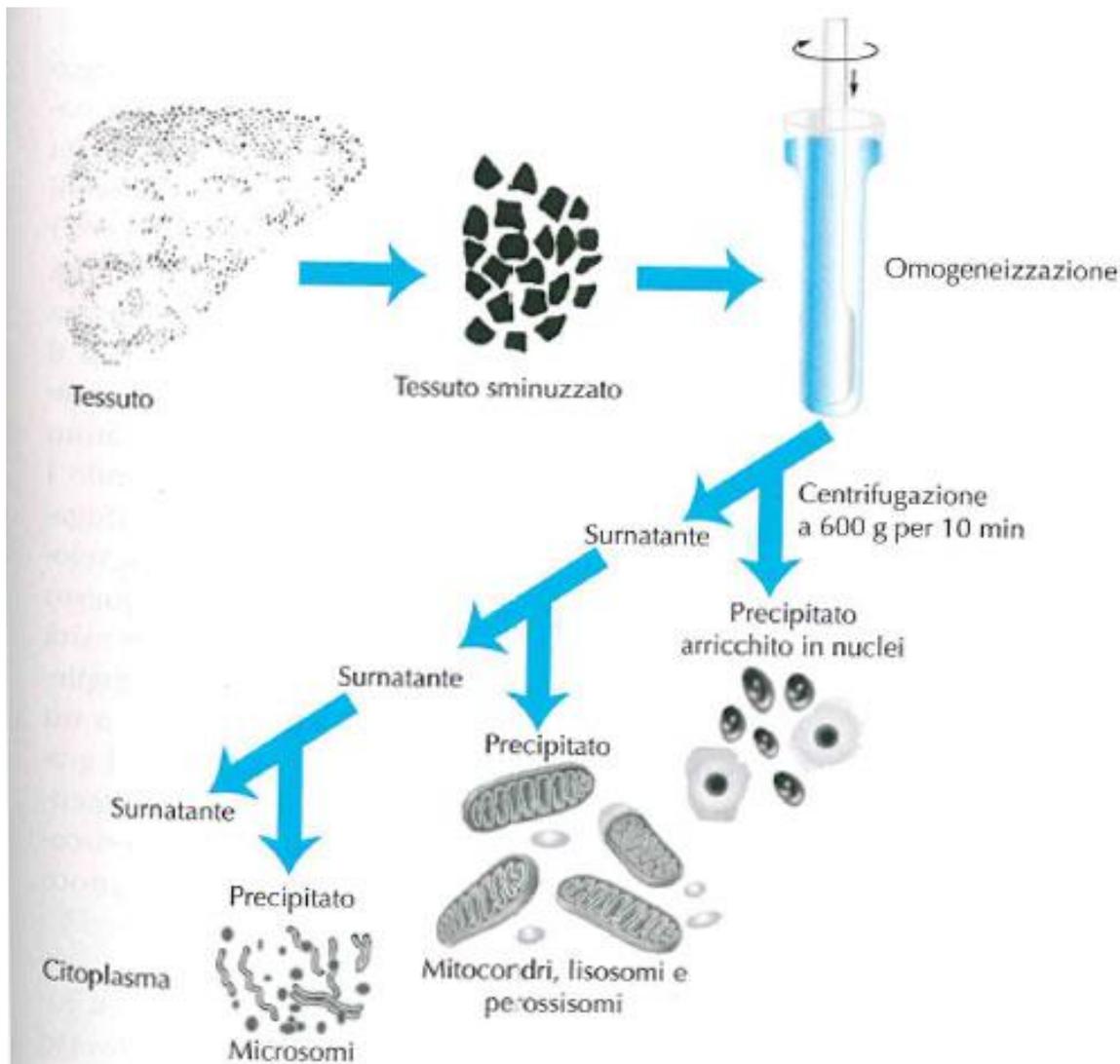
Permette di studiare la purezza di un campione, la sedimentazione e la massa.

# Centrifugazione differenziale

Permette la separazione di molecole/strutture in base alla loro dimensione e densità.



In genere, vengono fatti diversi passaggi con crescente campo centrifugo e tempo per sedimentare molecole via via più piccole.



Si possono testare le varie frazioni per la purezza e l'identità (es. succinato deidrogenasi per mitocondri; fosfatasi acida per lisosomi; catalasi per perossisomi; glucosio 6-fosfatasi per microsomi; DNA/RNA per nuclei)

Tratta da Biochimica Applicata, Edises

# Centrifugazione gradiente di densità

Le molecole sedimentano in un mezzo con densità crescente verso il basso.



Concentrazione di saccarosio minore (minor densità)

Gradiente di saccarosio

Concentrazione di saccarosio maggiore (maggiore densità)

Mezzi comunemente usati:

- saccarosio;
- Glicerolo;
- Cloruro di cesio.

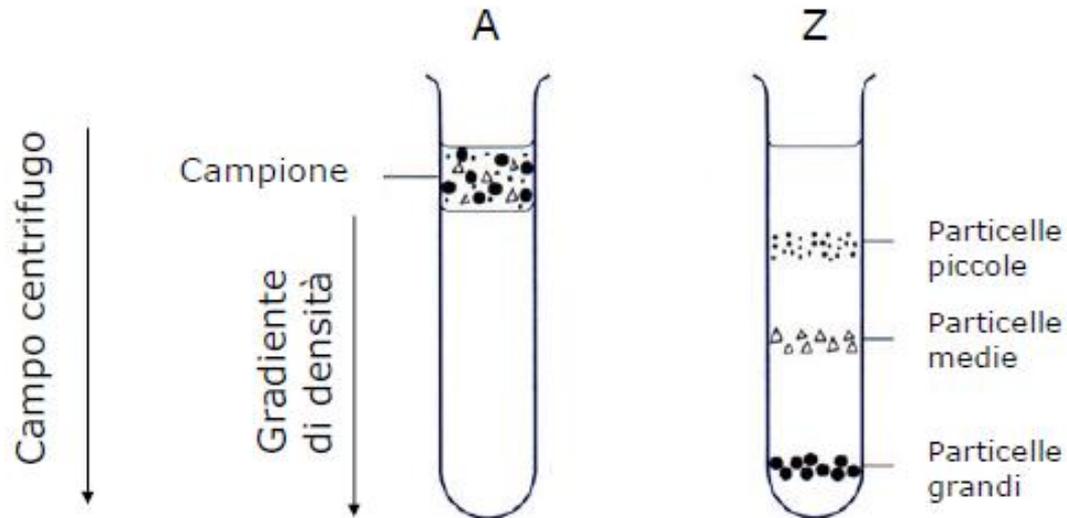
Il gradiente può essere ***discontinuo*** o ***continuo***.

La centrifugazione può essere **zonale** o **isopicnica**.

# Centrifugazione zonale

Sfrutta la diversa velocità con cui le particelle si muovono all'interno di un gradiente di densità.

- 1) Costruire il gradiente in provetta (in basso densità maggiore ed in alto densità minore)
- 2) Caricare il campione in alto
- 3) Centrifugare: al termine le particelle si separano in zone (o bande) che rispecchiano la loro dimensione e densità in base al coefficiente di sedimentazione.

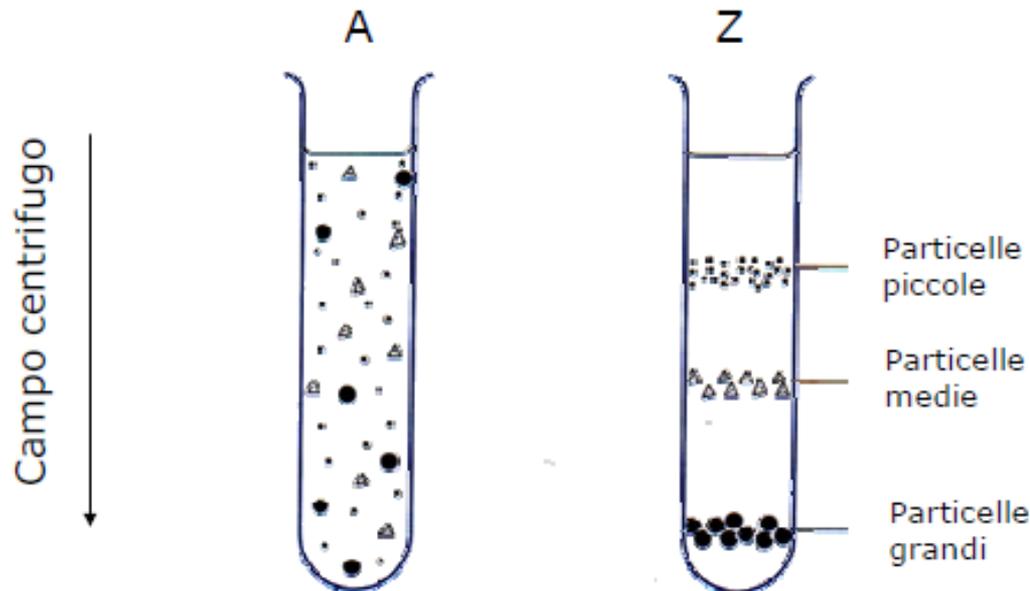


**Si possono separare particelle con densità simile ma di massa diversa!**

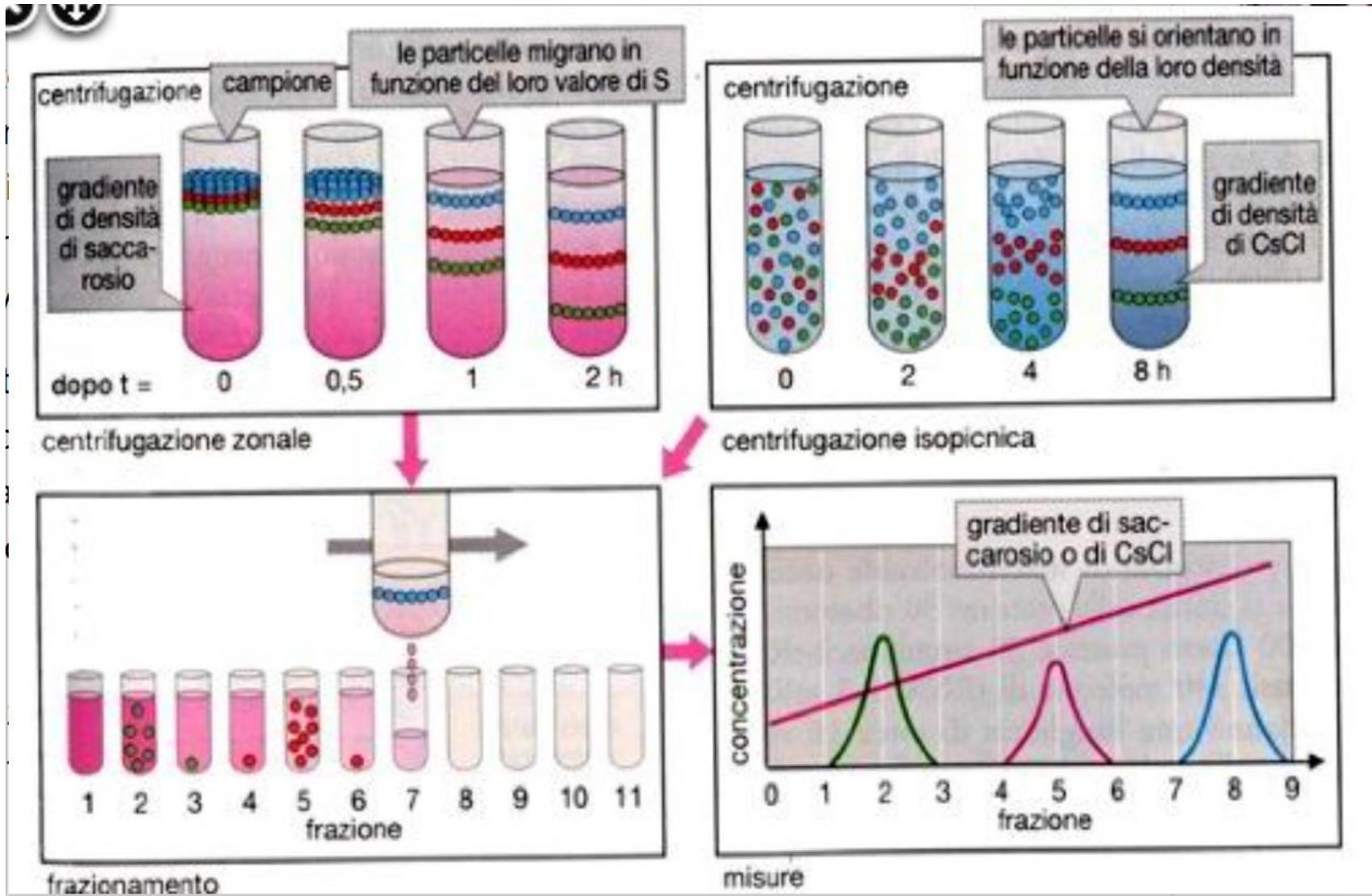
# Centrifugazione isopicnica

Centrifugazione in **gradiente di densità all'equilibrio**: le particelle si vengono a posizionare nella zona uguale alla loro densità (il gradiente si forma durante la centrifugazione). **Una volta raggiunto l'equilibrio, non viene alterato dal tempo di centrifugazione!**

- 1) Miscelare il campione con la soluzione di cloruro di cesio (la cui densità massima deve essere superiore a quella di tutte le particelle da separare).
- 2) Centrifugare.
- 3) Le componenti si separano SOLO in base alla loro densità in frazioni a diversa altezza.



# Comparazione tra centrifugazione zonale ed isopicnica



# Tipi di Centrifughe

**Centrifughe da banco:** per piccoli volumi e basse velocità (4000-5000 rpm fino a 10000-16000 rpm); refrigerate o no.



**Centrifughe ad alta velocità (refrigerate):** per grossi volumi (10-50-100 ml o più) e velocità medio-alte (8000-20000 rpm; 10000-50000g).



**Ultracentrifughe:** 2 tipi, *preparative ed analitiche*.

Preparative: fino a 70000 rpm e 200000g. Bassa capacità, da pochi ml fino a 20 ml. Necessitano del vuoto e refrigerazione nella camera di centrifugazione. **BILANCIARE ACCURATAMENTE LE PROVETTE:** una variazione di 50 mg corrisponde ad una differenza di 5 kg a 100000g!



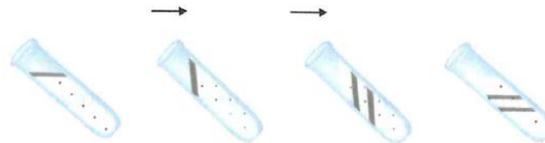
Analitiche: velocità fino a 70000-10000 rpm, o 500000-600000g. Per valutare il coefficiente di sedimentazione del materiale biologico e quindi la massa, struttura quaternaria e stati di aggregazione.

# Tipi di Rotori

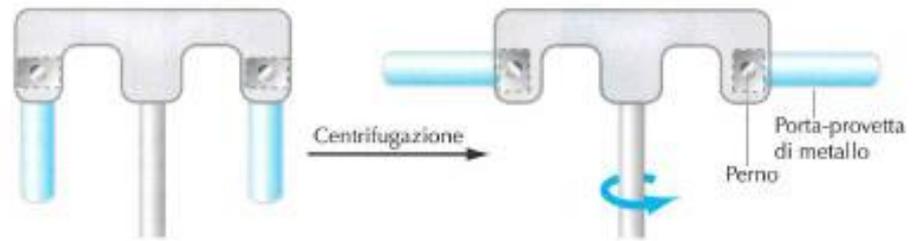
## Rotore ad angolo fisso



Campo centrifugo



## Rotore a bracci oscillanti (swing-out)



Provetta a riposo

Provetta durante la centrifugazione

Campo centrifugo

