

# SEDIMENTAZIONE E CENTRIFUGAZIONE

**Centrifuga:** motore centrale in grado di imprimere una rotazione ad un **rotore** contenente i campioni.



L'uso di una centrifuga è ottimale per la separazione di particelle con un diverso **coefficiente di sedimentazione (S)**.

A valori di **S** > corrispondono velocità di sedimentazione >.

Ogni particella sedimenta con una velocità direttamente proporzionale al **campo centrifugo**.

## **1. Centrifugazione preparativa**

Centrifugazione preparativa permette di separare i vari elementi di un omogenato cellulare

## **2. Ultracentrifugazione analitica**

Centrifugazione analitica è utilizzata principalmente per gli studi di macromolecole purificate o di complessi sovramolecolari isolati

# Centrifughe

## Centrifughe preparative



Centrifuga tipo  
sorvall



## Centrifughe da tavolo

- Massimo volume di carico: 24 microprovette da ml 1,5/2.0
- Massima velocità (RPM): 13300
- Massima accelerazione centrifuga

## Ultracentrifuga analitica



***Puo' operare a velocita' di 700.000 rpm (500.000g)***

Il rotore e' contenuto in una camera blindata,  
refrigerata e sottovuoto.

Il rotore è fatto in un materiale particolarmente resistente  
Es. TITANIO

La sedimentazione è controllata da un sistema ottico per  
consentire l'osservazione del materiale che va sedimentandosi

**Ultracentrifugazione analitica viene utilizzata per determinare:**

**-il grado di purezza di una macromolecola**

**-la massa molecolare relativa di soluti nel loro stato nativo**

**-le costanti di affinità tra ligandi e proteine**

**-esaminare i cambiamenti di massa molecolare relativa di complessi sovramolecolari**

**studiare i**

**- cambiamenti conformazionali**

# CENTRIFUGHE

Da banco



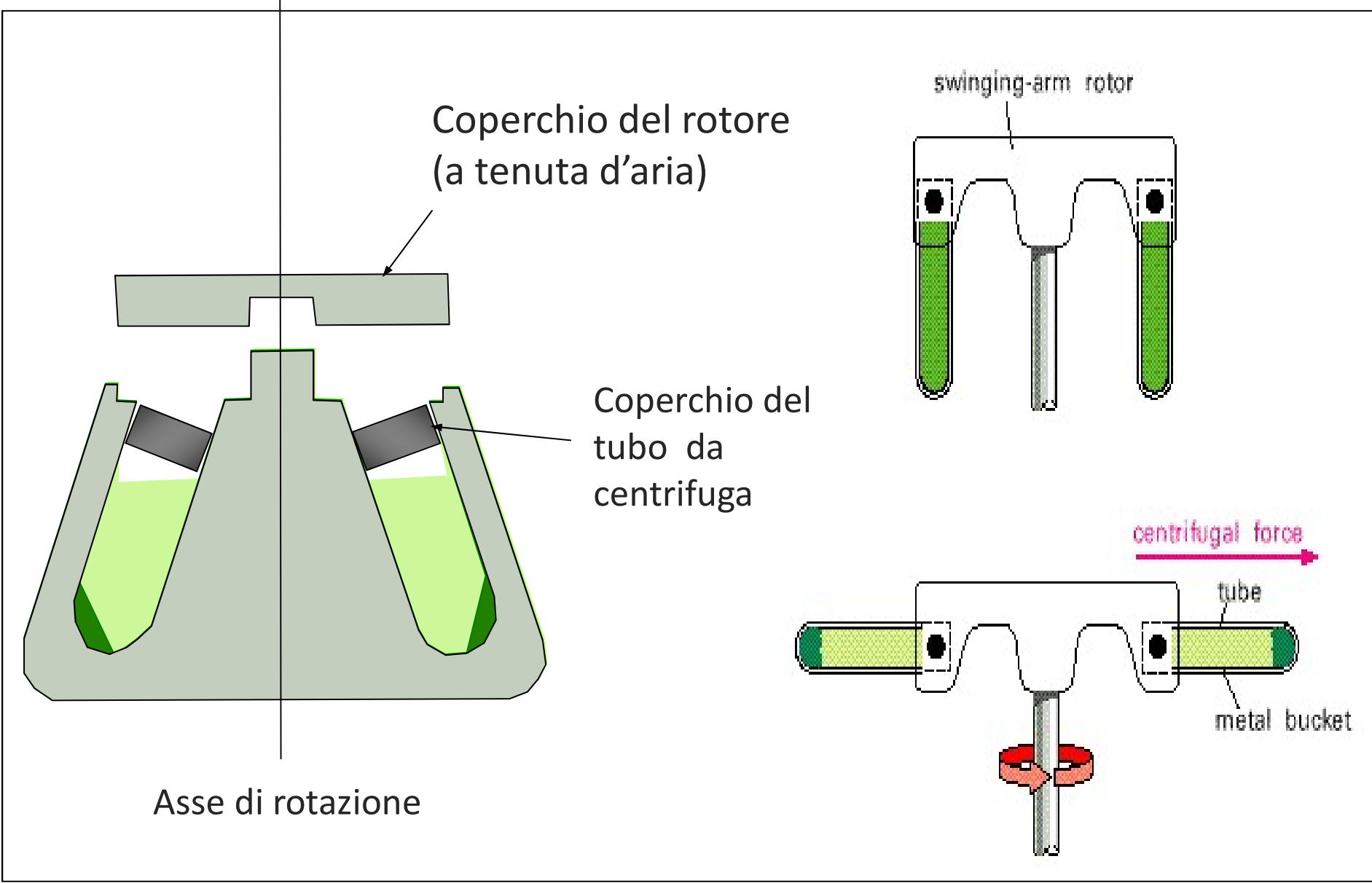
Si distinguono per **velocità** di rotazione e **n°** e **volume** dei campioni.



Da pavimento



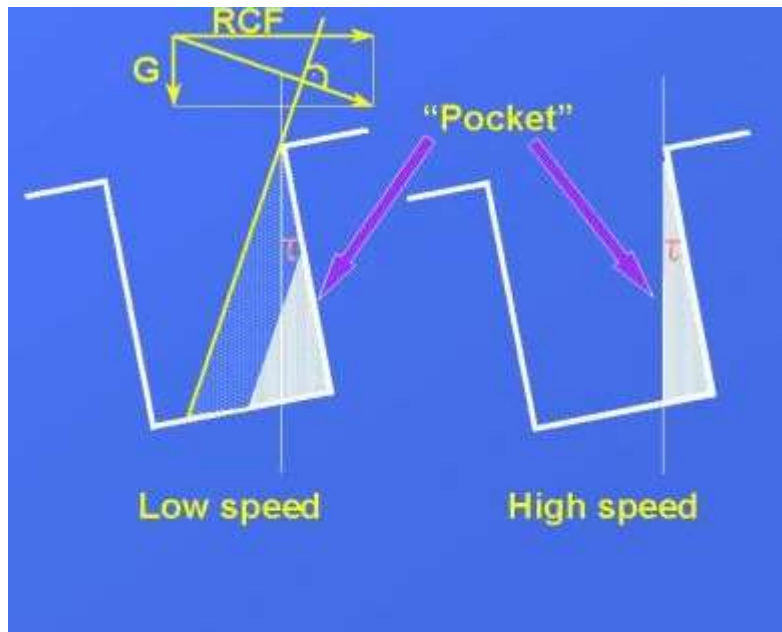
# ROTORI



Rotore ad angolo **fisso**

Rotore ad angolo **variabile**

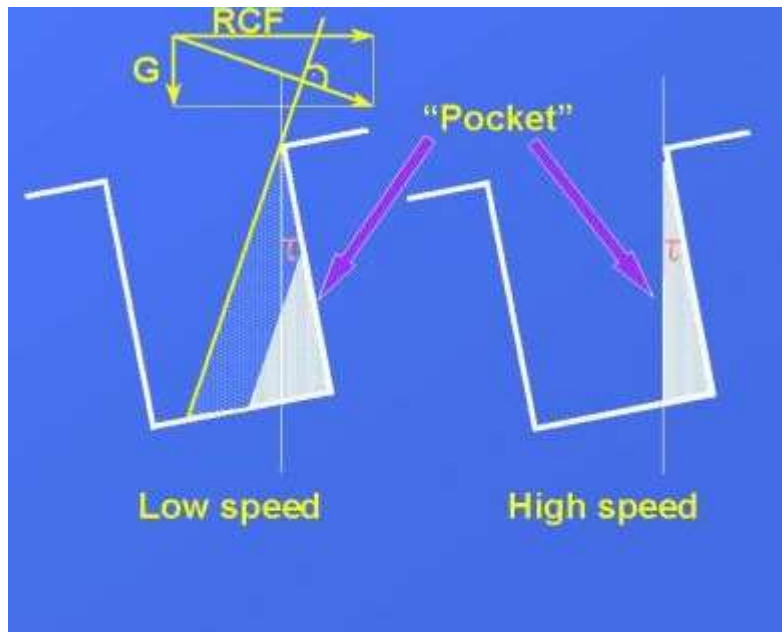
# SEDIMENTO



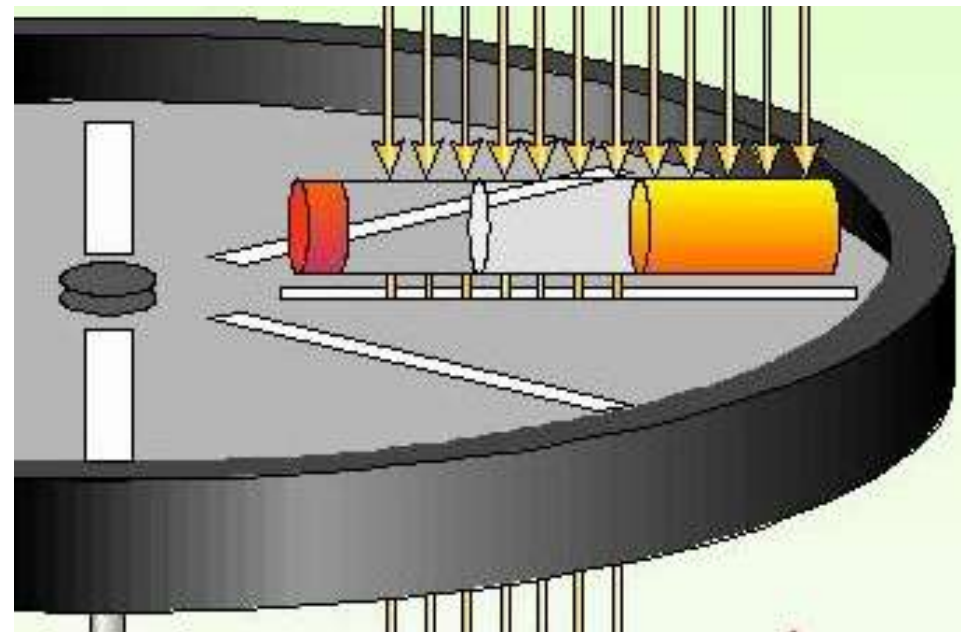
Rotore ad angolo **fisso**



# SEDIMENTO

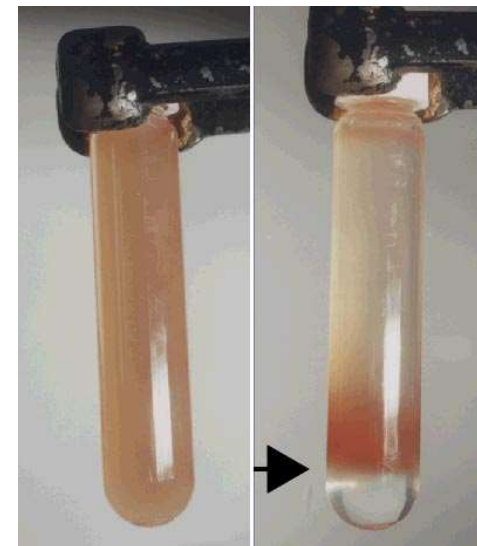


Rotore ad angolo **fisso**



Rotore ad angolo **variabile**

Come si depositerà il sedimento dipende anche dalla **velocità** impostata.



## RIEMPIMENTO DEI ROTORI



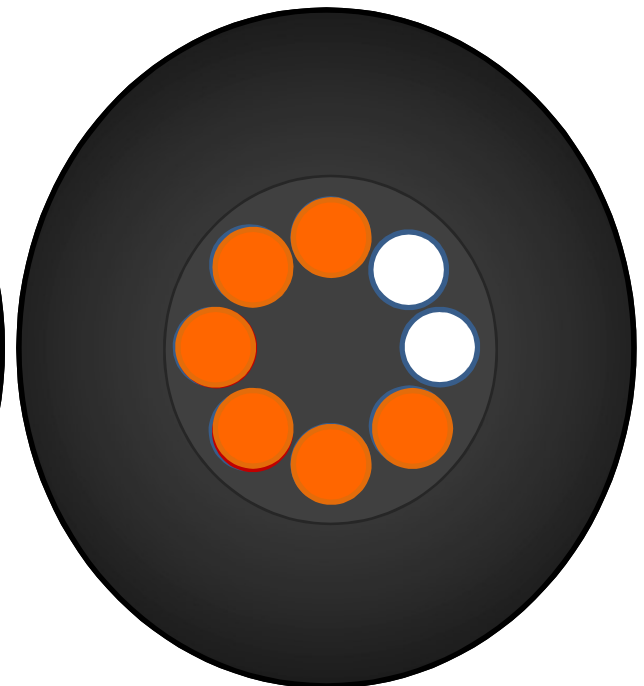
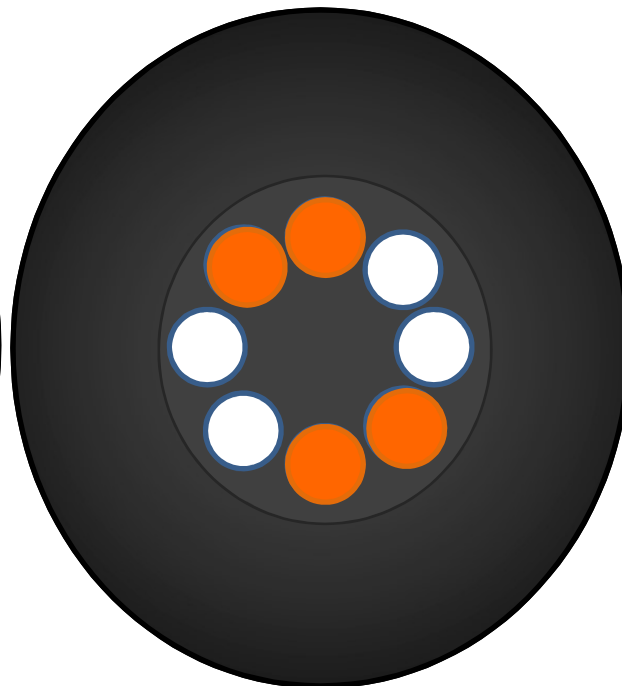
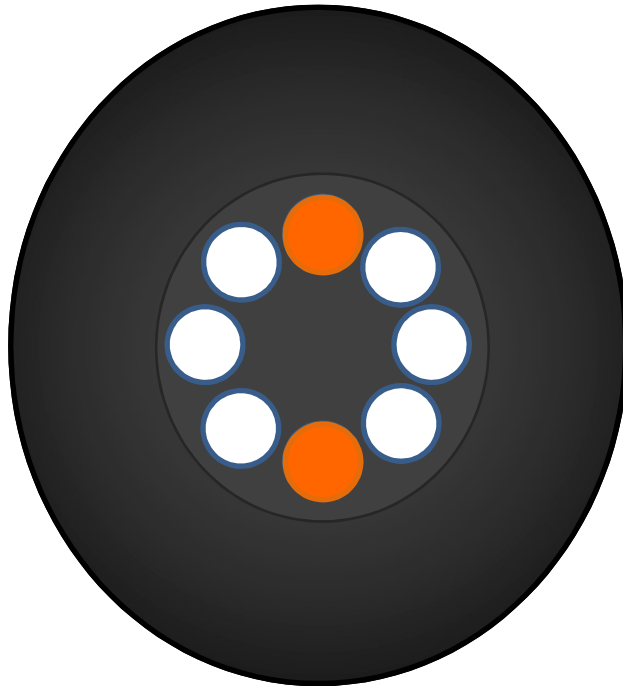
Se devo caricare 2 o più campioni?



## RIEMPIMENTO DEI ROTORI



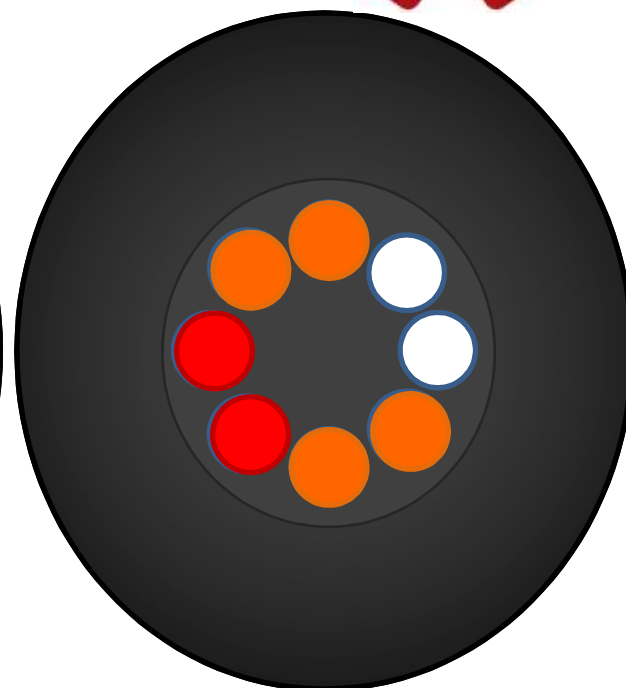
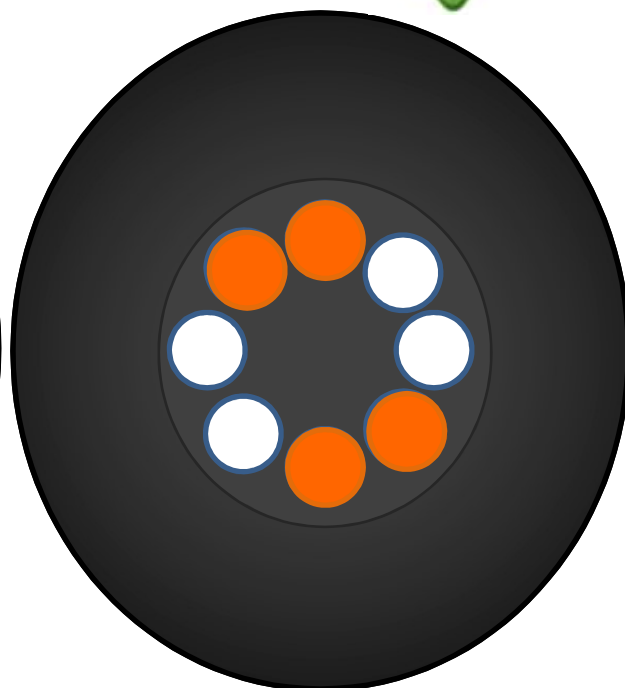
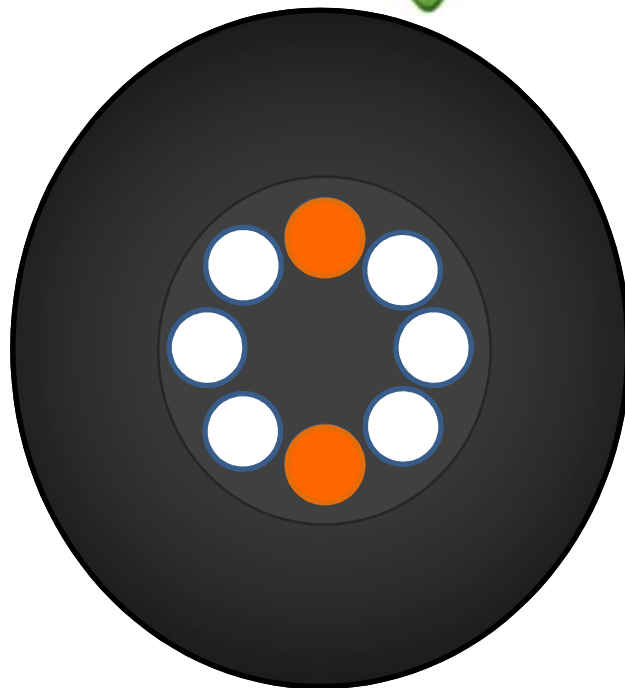
Se devo caricare 2 o più campioni?



# RIEMPIMENTO DEI ROTORI



Se devo caricare 2 o più campioni?



**Che cosa è il campo centrifugo?**

## CAMPO CENTRIFUGO:

**Una qualsiasi particella che viene fatta ruotare all'interno  
di un rotore da centrifuga**

avrà una velocità di sedimentazione che sarà pari al  
**campo centrifugo G applicato**

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

$\omega$  = velocità angolare del rotore  
espressa come  $2\pi$  rad

$\mathbf{r}$  = distanza radiale (cm)  
della particella dall'asse di  
rotazione

# ***Campo centrifugo relativo (RCF)***

*si esprime in  $g$*

*= il rapporto tra campo centrifugo  $G$ , a uno specifico raggio,  
e la velocità di accelerazione normale  $g$*

*campo gravitazionale terrestre  $g = 981 \text{ cm s}^{-2}$*

**RCF** = rapporto tra **il peso** della particella sottoposta  
al campo centrifugo  
e **il peso** della particella in presenza della sola forza di gravita'

la *velocità angolare* ( $\omega$ ) del rotore

si può esprimere come

*velocità del rotore in giri al min* = **rev min<sup>-1</sup>** =

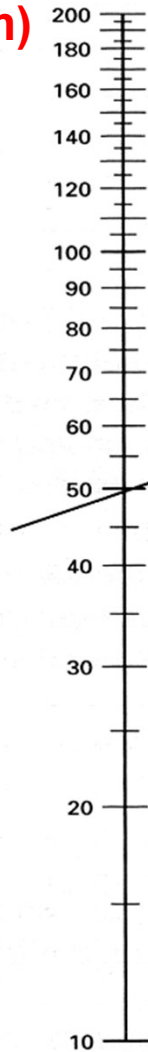
**r.p.m.**



Le centrifughe sono provviste di **NOMOGRAMMA**  
che permettono di trasformare *r.p.m* in *g*

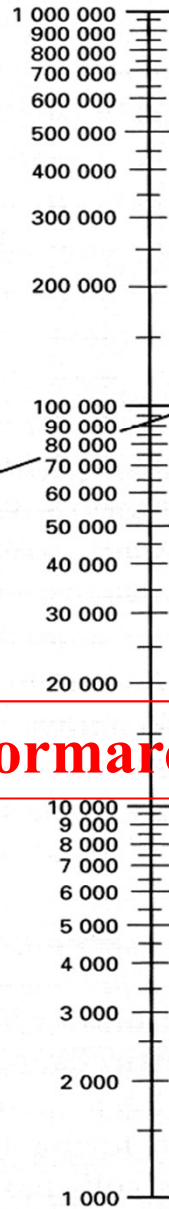
**NOMOGRAMMA**

**Distanza  
radiale  
(mm)**



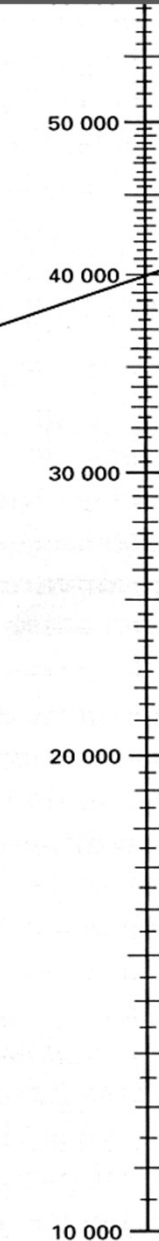
Distanza radiale  
(mm)

**RCF  
(xg)**



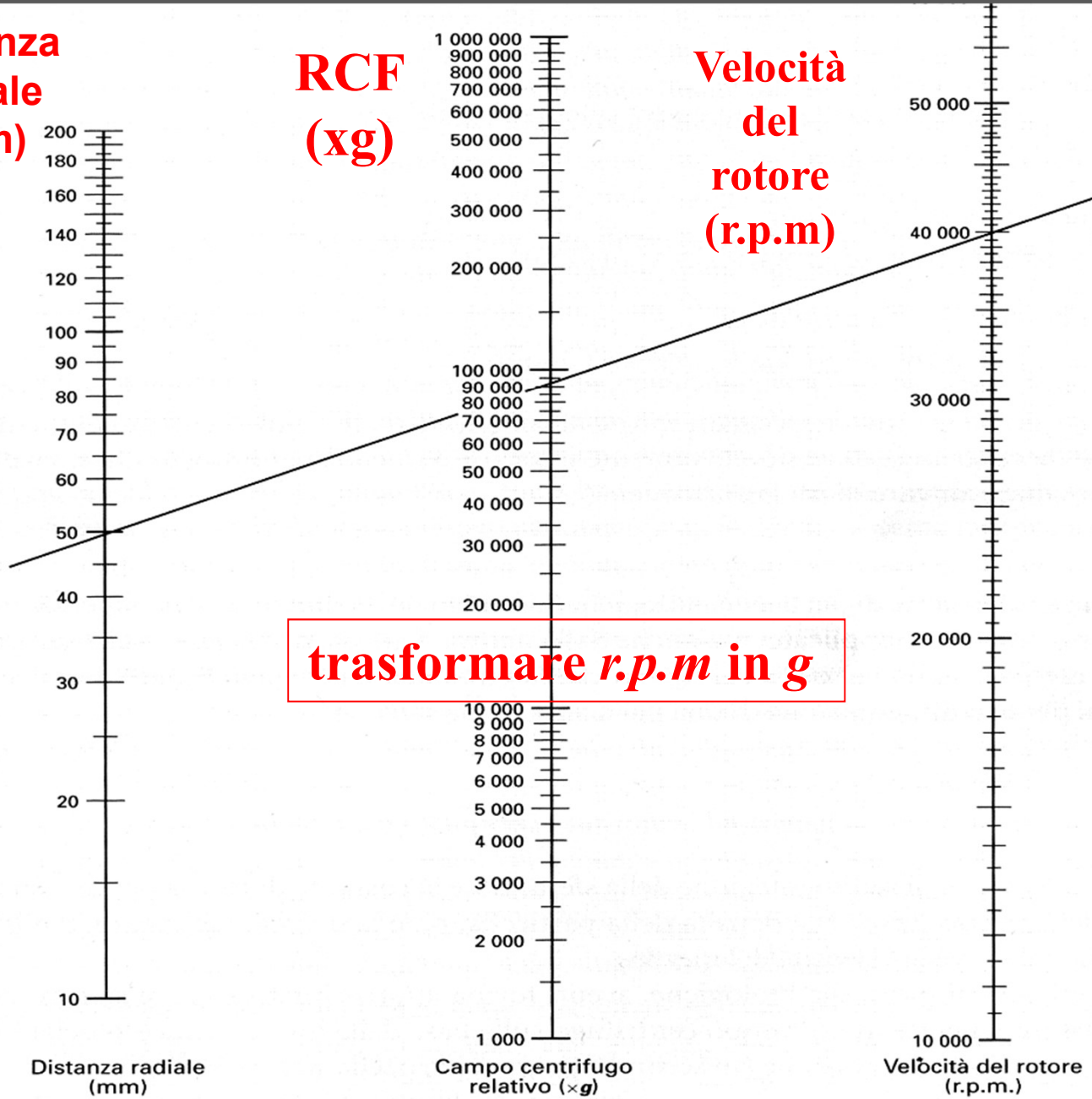
Campo centrifugo  
relativo (xg)

**Velocità  
del  
rotore  
(r.p.m.)**



Velocità del rotore  
(r.p.m.)

**trasformare r.p.m in g**



Una volta stabilito che cosa è il **campo centrifugo**

Ci interesserà sapere quali leggi governano la **sedimentazione**

di una particella in quel determinato campo centrifugo relativo

# Una miscela di particelle eterogenee, approssimativamente sferiche

*può essere separata mediante **centrifugazione**,  
in base alla :*

- 1. densità (particella e mezzo)**
- 2. dimensione e forma delle particelle,**
- 3. tempo di sedimentazione**

**Velocita' di sedimentazione**  $v$  *di una particella*

Dipende:

dal campo centrifugo applicato

dalla differenza tra le densita' di particella e mezzo

Dimensione e forma della particella

*una particella allungata offre maggior attrito rispetto ad una con la stessa massa ma di forma globulare quindi le particelle allungate sedimentano piu' lentamente*

## **velocita' di sedimentazione** $v$

### Legge di STOKES

$$v = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m)\omega^2 r}{9\eta} \quad = \text{campo centrifugo applicato}$$

$\eta$  = coef. di viscosita' del mezzo

$\rho_p$  = densita' della particella

$r_p$  = raggio della

$\rho_m$  = densita' del mezzo

particella

# CENTRIFUGAZIONE

## Legge di Stokes

$$v = \frac{2}{9} \frac{r^2 (d_p - d_m)}{\eta} g$$

$v$  = velocità di sedimentazione;

$r$  = raggio della particella;

$d_p$  = densità della particella;

$d_m$  = densità del mezzo;

$g$  = accelerazione di gravità;

$\eta$  = viscosità del mezzo;

$2/9$  = costante di forma per una sfera.

## ***In sommario:***

***La velocità di sedimentazione*** di una particella disciolta in una soluzione dipenderà non solo dal campo centrifugo applicato ma anche dalla:

***1. massa della particella***

***2. Densità e viscosità*** del solvente in cui avviene la sedimentazione e

***3. dalla sua forma*** (sferica o allungata)

Quando si riportano le condizioni di separazione bisogna specificare:

***1) la velocità del rotore,***

***2) dimensioni del raggio (o tipo di rotore)***

***3) tempo di centrifugazione***

***4) Temperatura***



## CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE

### Coefficienti di sedimentazione

**S** (unità Svedberg,  $10^{-13}$  s) dipende da caratteristiche della **particella** e della **soluzione**

- **densità**
- **PM**
- **forma**
- **densità soluzione**
- **viscosità soluzione**

## Coefficienti di sedimentazione

*Il coefficiente di sedimentazione **S***

*È dato dalla velocità di sedimentazione **v** su  
campo centrifugo **G** applicato*

# Coefficienti di sedimentazione

*Il coefficiente di sedimentazione **S***

*È dato dalla velocità di sedimentazione **v** su campo centrifugo **G** applicato*

$$\mathbf{S} = v / G = v / \omega^2 r$$

**E' espresso in secondi**

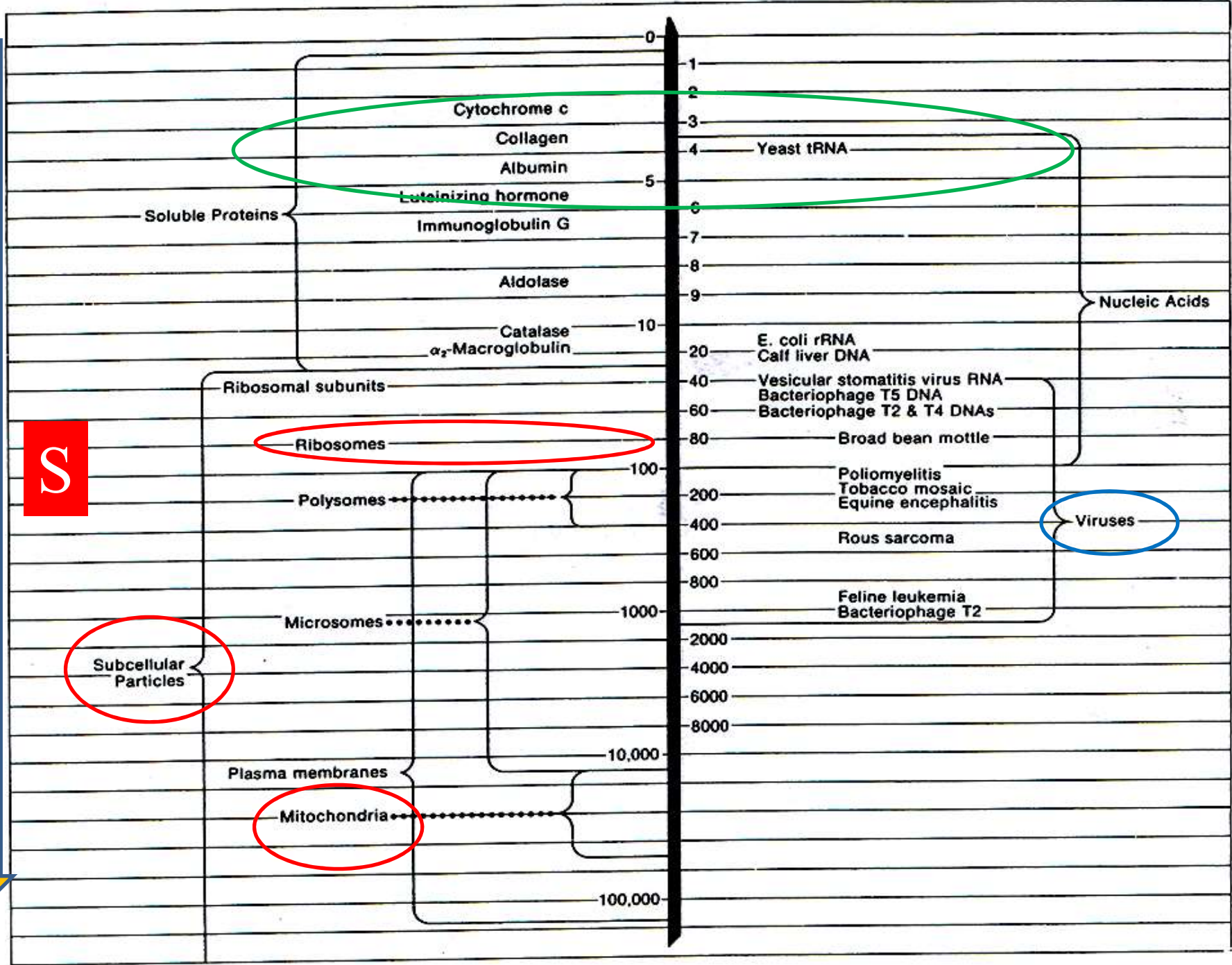
# Coefficienti di sedimentazione

*Il coefficiente di sedimentazione **S***

*È dato dalla velocità di sedimentazione **v** su campo centrifugo **G** applicato*

$$\mathbf{S} = v / G = v / \omega^2 r$$

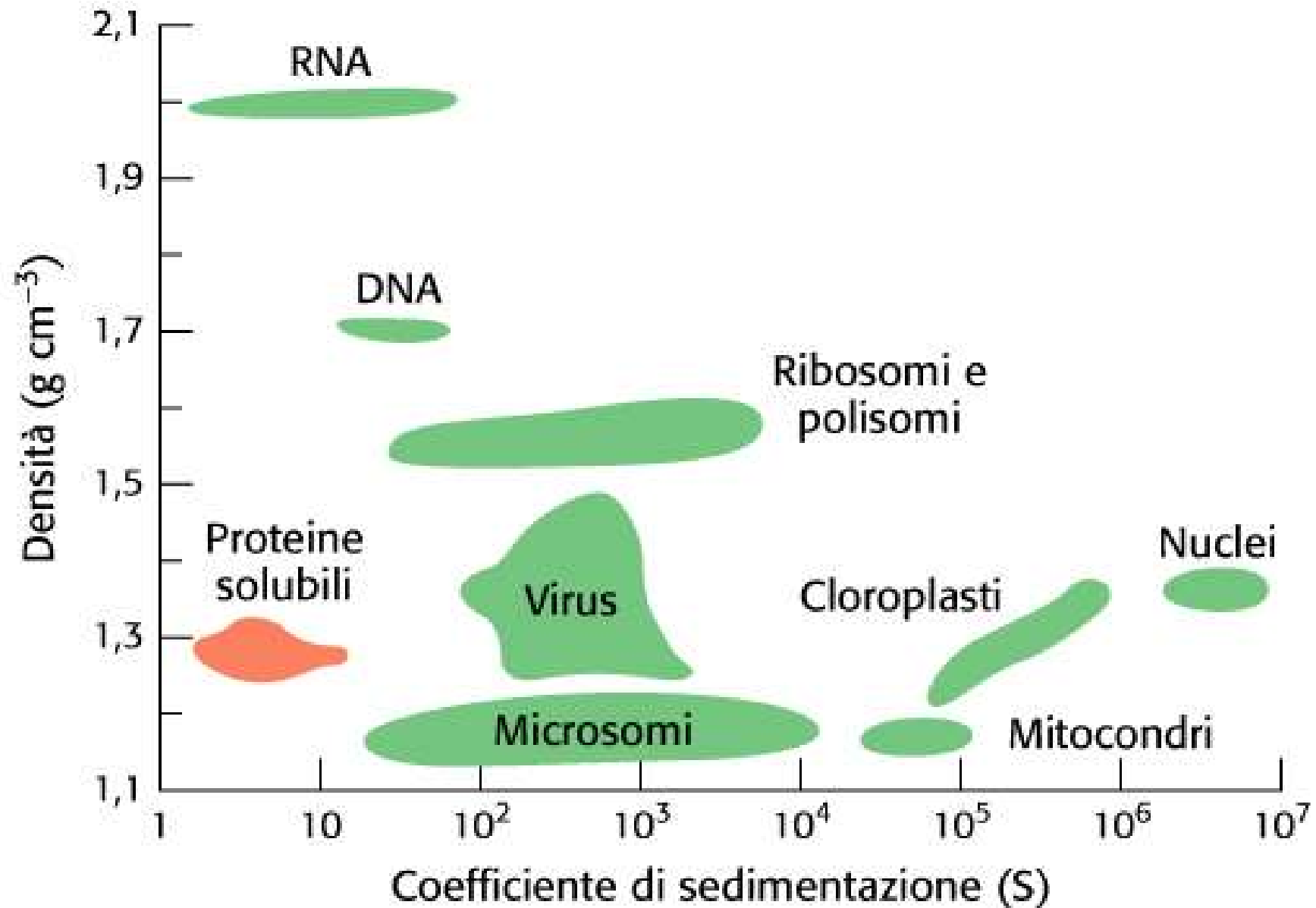
**Per convenzione si usa esprimere il coefficiente di sedimentazione trovato sperimentalmente in quel valore che si otterrebbe in un mezzo la cui viscosità e densità fosse pari all' acqua a 20°C**  
unità Svedberg  $10^{-13}$  s



S



## CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE



## CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE

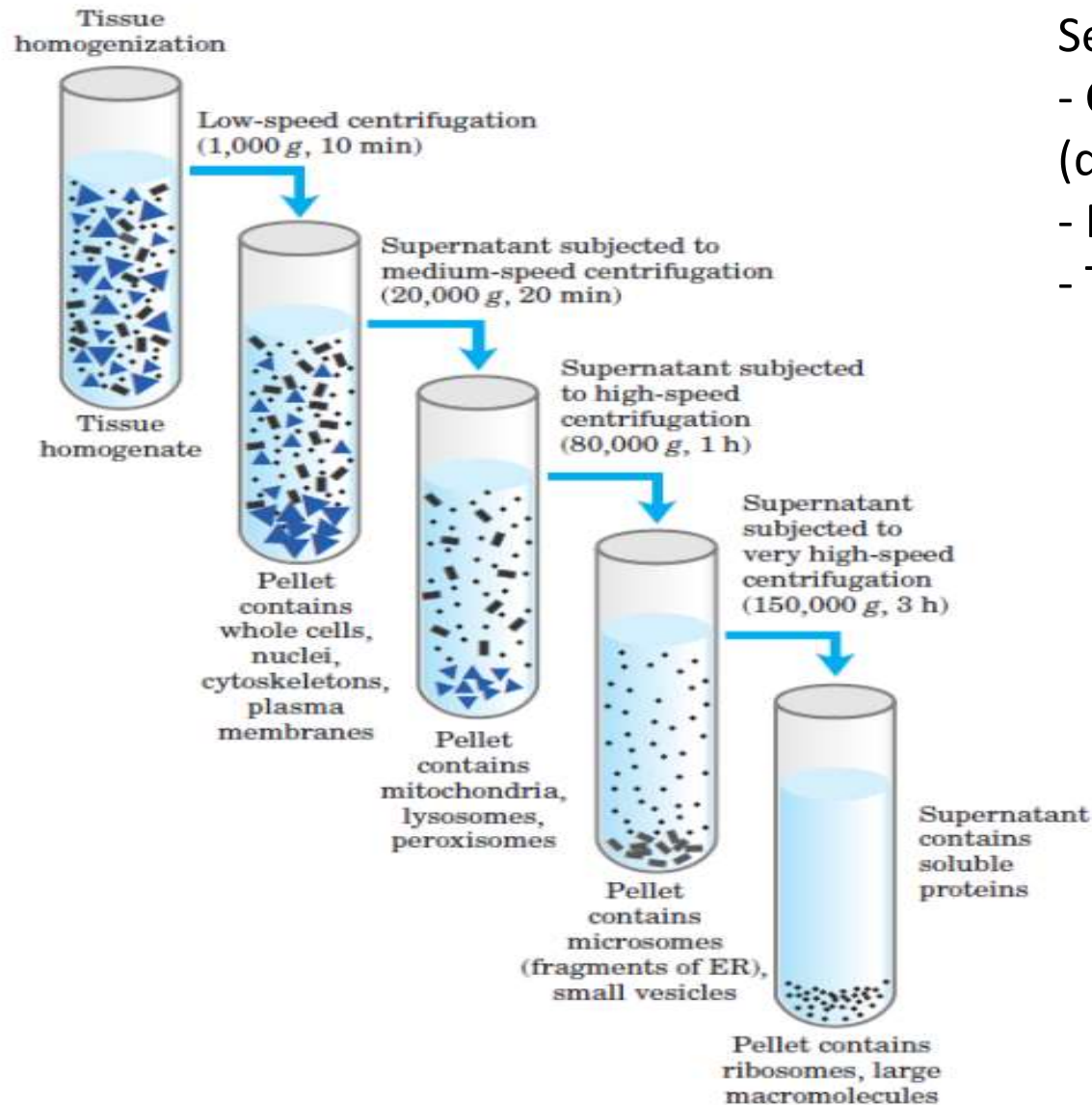
Protein	Molecular Weight (kDa)	Sedimentation Constant (S)*	Density (g/cm <sup>3</sup> )	pI	Concentration in Plasma (mg/mL)
Immunoglobulin M	1000	18–20	1.38	5.1–7.8	0.8–0.9
α <sub>2</sub> -Macroglobulin	820	19.6	1.36	5.4	2.65 (men) 3.35 (women)
High-density lipoprotein	435	5.5	0.91	—	0.37–1.17
Immunoglobulin G	153	6.6–7.2	1.35	5.8–7.3	12–18
Transferrin	76	4.9	1.38	5.2	2–4
Serum albumin	69	4.6	1.36	4.9	35–45
Retinol-binding <u>protein</u>	21	2.3	1.39	4.4–4.8	0.04–0.06
Lysozyme	15	2.19	1.39	10.5	0.005

Le proteine variano molto in PM ma **non** molto in densità.

A meno di proteine complessate a lipidi (es. proteine di membrana) la densità non varia più del 15%.

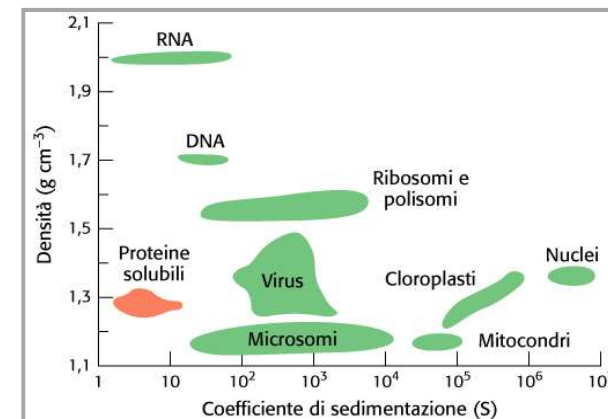
# CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE

Il movimento delle particelle dipende da **densità**, **forma** e **dimensione**



Sedimentazione in base a:

- Caratteristiche delle particelle (dimensioni e densità)
- Forza del campo centrifugo
- Tempo di centrifugazione



Variano  
**tempi** e  
**velocità**.



# Centrifugazione in gradiente di densita':

## *Tecnica zonale di velocita' e isopicnica*

### **1. Nella tecnica zonale di velocita'**

*le particelle si separano principalmente per **differenza di dimensioni**, perchè particelle biologiche di tipo simile sono spesso simili in forma e la loro densita' rientra in una gamma ristretta.*

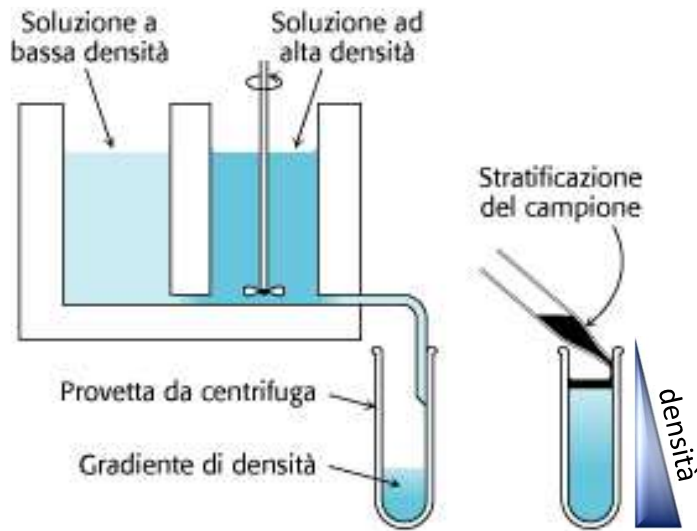
**2. Nella tecnica isopicnica:** *la separazione **dipende dalla densita'** idrostatica delle particelle e non dalla forma ne' dalla dimensione ed e' indipendente dal tempo:*

*Questa tecnica viene utilizzata **per separare particelle di dimensioni simili ma di diversa densita'***

# CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

Campioni separati in base alla **densità**: centrifugazione all'equilibrio

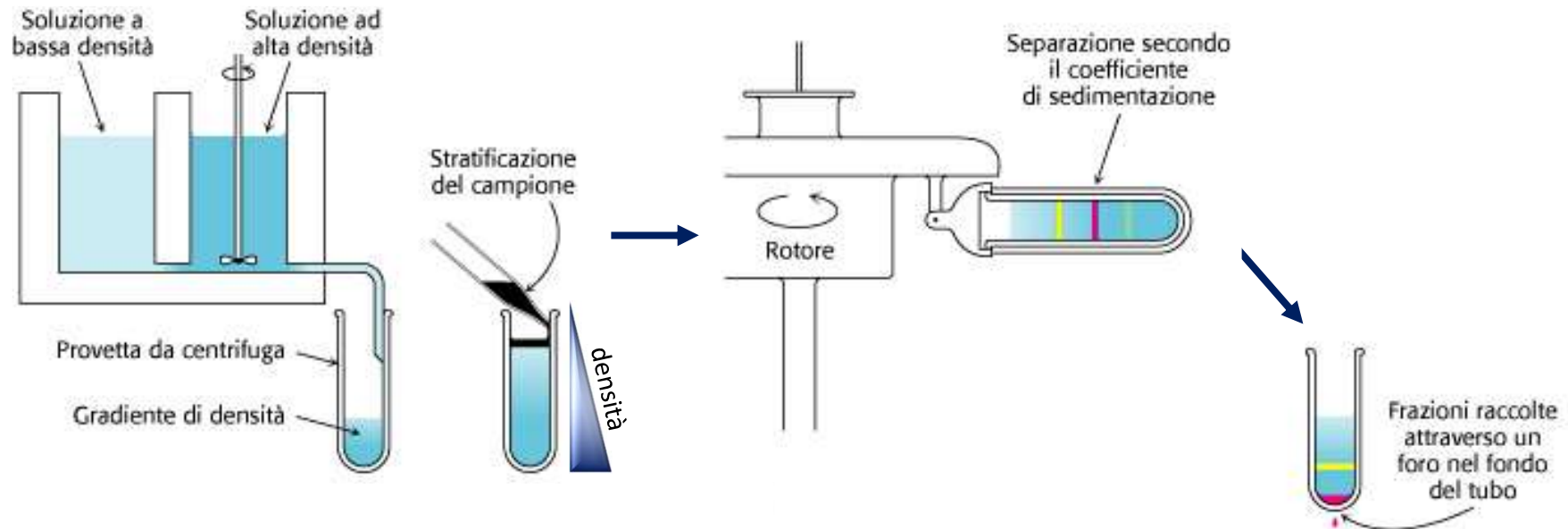
Centrifugazione di una miscela in un **gradiente di densità** di  $\text{CsCl}_2$  o saccarosio.



# CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

Campioni separati in base alla **densità**: centrifugazione all'equilibrio

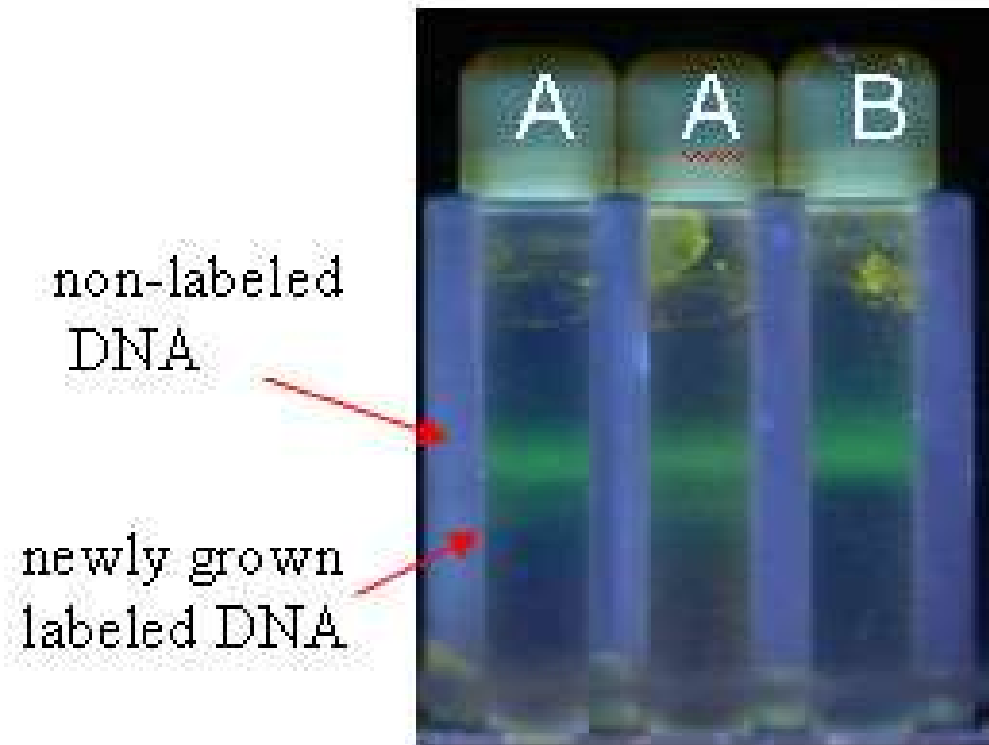
Centrifugazione di una miscela in un **gradiente di densità** di  $\text{CsCl}_2$  o saccarosio.



Una **particella** si **ferma** quando arriva ad un punto in cui la **densità** del **mezzo** risulta **uguale** alla propria (**separazione isopicnica**)

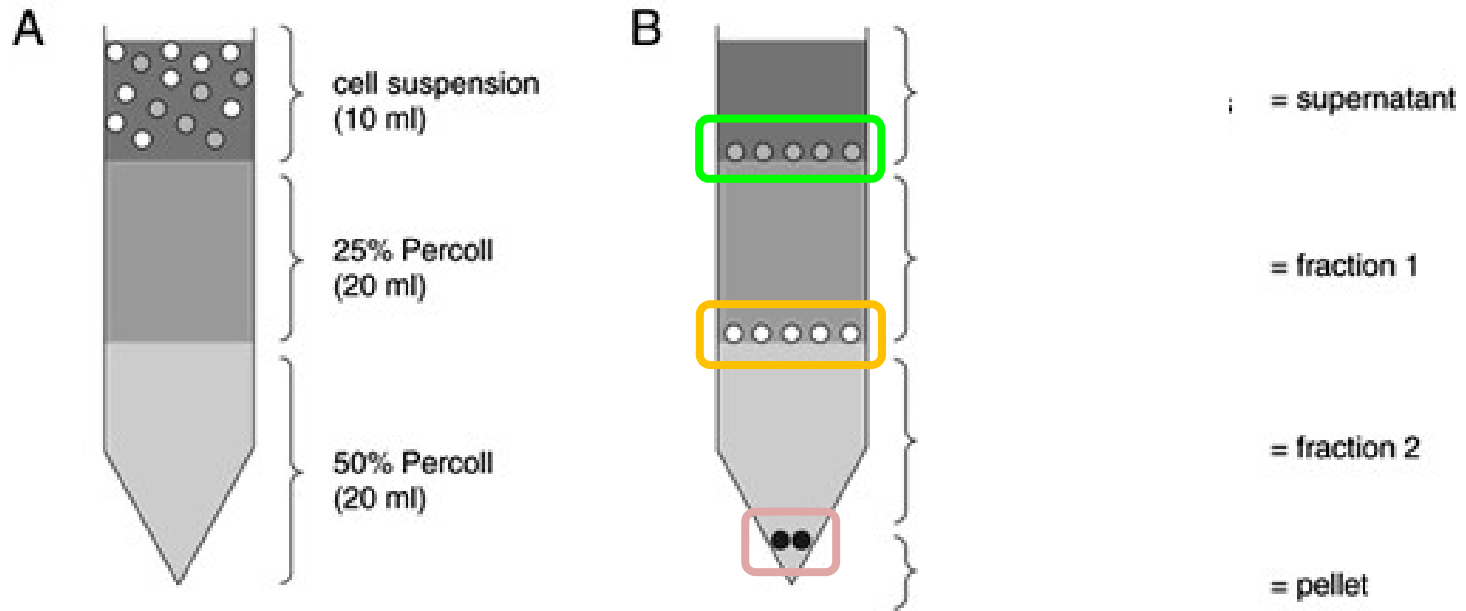


# CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITA'



Isopycnic centrifugation of DNA extracted from mixed conifer soil incubated with  $H_2^{18}O$  (tubes A) or  $H_2^{16}O$  (tube B) for 10 days.

# CENTRIFUGAZIONE su “CUSCINI DI DENSITA’



**Tabella 5.1 Materiali per gradienti maggiormente**

<b>Materiale</b>	<b>Forza ionica della soluzione</b>	<b>Densità massima della soluzione acquosa a 20 °C (g cm<sup>-3</sup>)</b>
Cloruro di cesio	+++	1.91
Solfato di cesio	+++	2.01
Bromuro di sodio	+++	1.53
Ioduro di sodio	+++	1.90
Glicerolo	–	1.26
Saccarosio	–	1.32
Ficoll (Pharmacia)	–	1.17
Destrano	–	1.13
Albumina di siero bovino	–	1.35
Percoll (Pharmacia)	–	1.30
Metrizamide (Nyegaard)	–	1.46
Nycodenz (Nyegaard)	–	1.42

+++ , alta; ++ , media; + , bassa; – non-ionica. (\*) L'effetto osmotico a 20% (w/v); aumento quasi esponenzialmente sopra una concentrazione

**Tabella 5.1 Materiali per gradienti maggiormente usati e loro applicazioni**

<b>Materiale</b>	<b>Forza ionica della soluzione</b>	<b>Densità massima della soluzione acquosa a 20 °C (g cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Assorbanza nell'ultravioletto</b>	<b>Effetto osmotico</b>
Cloruro di cesio	+++	1.91	+	+++
Solfato di cesio	+++	2.01	+	+++
Bromuro di sodio	+++	1.53	+	+++
Ioduro di sodio	+++	1.90	+++	+++
Glicerolo	-	1.26	+	+++
Saccarosio	-	1.32	+	+++
Ficoll (Pharmacia)	-	1.17	+	+()
Destrano	-	1.13	+	+()
Albumina di siero bovino	-	1.35	+++	+
Percoll (Pharmacia)	-	1.30	+++	+
Metrizamide (Nyegaard)	-	1.46	+++	++(*)
Nycodenz (Nyegaard)	-	1.42	+++	++(*)

+++ , alta; ++ , media; + , bassa; - non-ionica. (\*) L'effetto osmotico aumenta quasi linearmente con la concentrazione 20% (w/v); aumento quasi esponenzialmente sopra una concentrazione del 30% (w/v).

Tabella 5.1 Materiali per gradienti maggiormente

Materiali	Forza ionica della soluzione	Densità massima della soluzione acquosa a 20 °C (g cm <sup>-3</sup> )	Utilizzo comune
Cloruro di cesio	+++	1.91	Separazione di DNA, nucleoproteine, virus e isolati di plasmidi
Solfato di cesio	+++	2.01	Separazione di DNA e RNA, purificazione di proteoglicani
Bromuro di sodio	+++	1.53	Frazionamento di lipoproteine
Ioduro di sodio	+++	1.90	Separazione di DNA e RNA
Glicerolo	-	1.26	Separazione di frammenti di membrana, separazione di proteine
Saccarosio	-	1.32	Separazione di particelle subcellulari, proteine, virus e membrane
Ficoll (Pharmacia)	-	1.17	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari,
Destrano	-	1.13	Separazione di cellule intere, bande di microsomi
Albumina di siero bovino	-	1.35	Separazione di cellule intere
Percoll (Pharmacia)	-	1.30	Separazione di cellule intere e particelle subcellulari
Metrizamide (Nyegaard)	-	1.46	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, e particelle ribonucleoproteiche, membrane
Nycodenz (Nyegaard)	-	1.42	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, e particelle ribonucleoproteiche, membrane, virus

+++ , alta; ++ , media; + , bassa; - non-ionica. (\*) L'effetto osmotico aumento. (.) Effetto osmotico molto basso a una concentrazione inferiore al 20% (w/v); aumento quasi esponenzialmente sopra una concentrazione



## La scelta del soluto dipende dalla natura delle particelle

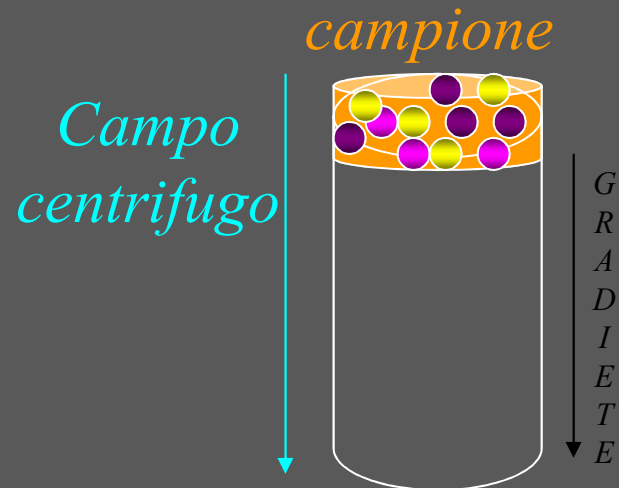
Tabella 5.1 Materiali per gradienti maggiormente usati e loro applicazioni

Materiale	Forza ionica della soluzione	Densità massima della soluzione acquosa a 20 °C (g cm <sup>-3</sup> )	Assorbanza nell'ultravioletto	Effetto osmotico	Utilizzo comune
Cloruro di cesio	+++	1.91	+	+++	Separazione di DNA, nucleoproteine, virus e isolamento di plasmidi
Solfato di cesio	+++	2.01	+	+++	Separazione di DNA e RNA, purificazione di proteoglicani
Bromuro di sodio	+++	1.53	+	+++	Frazionamento di lipoproteine
Ioduro di sodio	+++	1.90	+++	+++	Separazione di DNA e RNA
Glicerolo	-	1.26	+	+++	Separazione di frammenti di membrana, separazione di proteine
Saccarosio	-	1.32	+	+++	Separazione di particelle subcellulari, proteine, virus e membrane
Ficoll (Pharmacia)	-	1.17	+	+(.)	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, virus
Dextrano	-	1.13	+	+(.)	Separazione di cellule intere, bande di microsomi
Albumina di siero bovino	-	1.35	+++	+	Separazione di cellule intere
Percoll (Pharmacia)	-	1.30	+++	+	Separazione di cellule intere e particelle subcellulari
Metrizamide (Nyegaard)	-	1.46	+++	++(*)	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, nuclei, particelle ribonucleoproteiche, membrane
Nycodenz (Nyegaard)	-	1.42	+++	++(*)	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, nuclei, particelle ribonucleoproteiche, membrane, virus

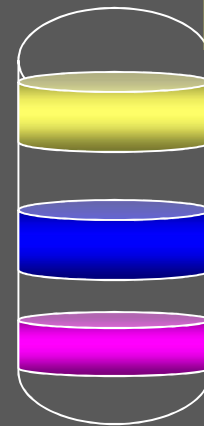
+++ , alta; ++ , media; + , bassa; - non-ionica. (\*) L'effetto osmotico aumenta quasi linearmente con la concentrazione. (.) Effetto osmotico molto basso a una concentrazione inferiore del 20% (w/v); aumento quasi esponenzialmente sopra una concentrazione del 30% (w/v).

# Separazione di velocità su gradiente di densità

*Il campione viene fatto stratificare su un gradiente pre-formato*



*Nota: Gli organelli subcellulari che hanno densità differenti ma dimensioni simili non sono ben separati con questo metodo*

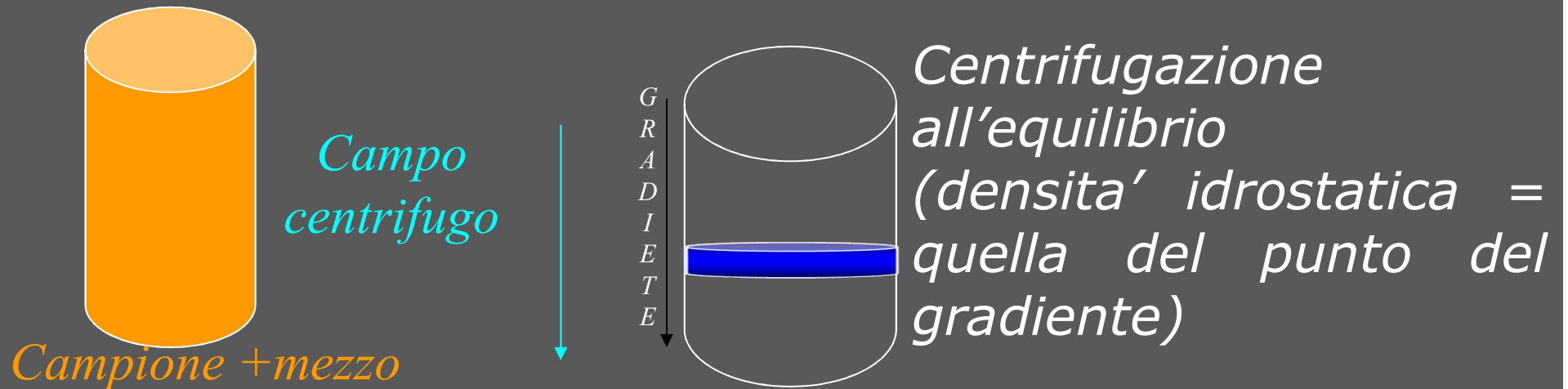


*Particelle a bassa densità*



*Particelle ad alta densità*

## Centrifugazione isopicnica con metodo dell'isodensita' all'equilibrio



*Il campione viene mescolato con il mezzo del gradiente*

**Il gradiente si forma durante la centrifugazione**

# Centrifugazione isopicnica all'equilibrio

**Gli organelli subcellulari che hanno densità differenti ma dimensioni simili sono separati con questo metodo**