

FRAZIONAMENTO e CENTRIFUGAZIONE

Frazionamento cellulare e tissutale

Le cellule possono essere separate e rotte in vario modo:

Enzimaticamente (collagenasi, ialuronidasi, papaina, elastasi, cellulasi, lisozima)

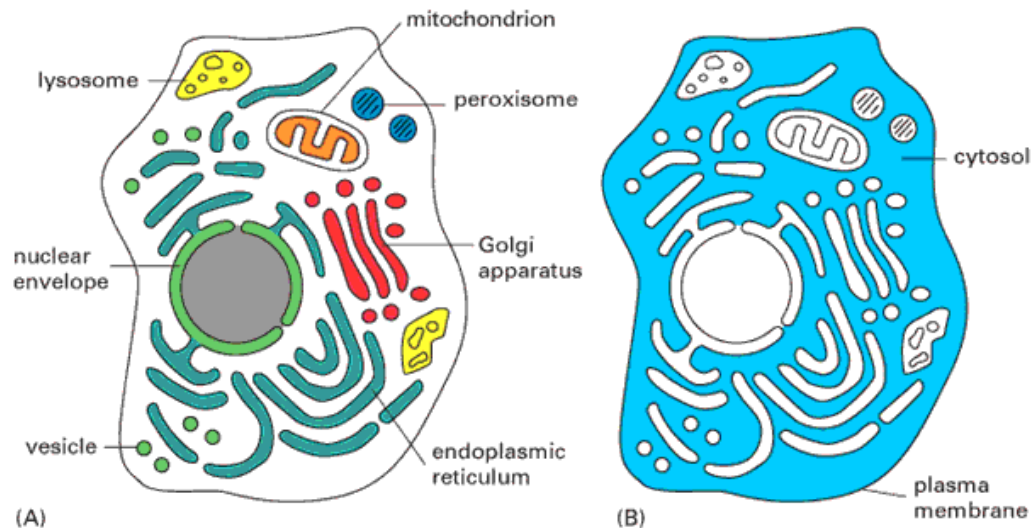
Omogenizzazione meccanica

Ultrasuoni

shock osmotico

uso di detergenti (digitonina, igeal, sodio desossicolato, sds)

Questi procedimenti rompono molte membrane ma lasciano intatti gli organuli che possono essere separati sulla base delle loro dimensioni e densità.



mortaio



macinatore



Potter



French Press



Sonicatori



Omogenizzazione

https://youtu.be/olwyl7_EFNE

sonicazione

<https://youtu.be/ykvS2gldQnw>

La centrifugazione

E' una delle principali **metodologie separative** utilizzate dell'indagine biochimica insieme alla dialisi, alla filtrazione, alla cromatografia o alla elettroforesi

Permette la separazione meccanica in un mezzo liquido di materiali solidi dal liquido e di materiali solidi tra loro sottoponendoli ad una forza centrifuga.

- ➔ cellule
- ➔ organuli subcellulari
- ➔ macromolecole

SCOPO

Applicare un campo gravitazionale artificiale attraverso la rotazione ad alta velocità (Campo centrifugo)

PERCHE'??

le particelle **possono** essere separate poiché sedimentano con velocità diversa a seconda delle diverse caratteristiche di **massa densità , dimensione e forma**

CAMPO CENTRIFUGO

$$G = \omega^2 r \quad \text{velocità angolare } \omega \text{ è espressa in rad sec}^{-1}$$

Ma è possibile esprimerla giri·min⁻¹ o (RPM) dove una rivoluzione del rotore è equivalente a 2π radianti:

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

...e il campo centrifugo viene quindi definito come:

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

Come posso esprimere l'intensità dell'azione della centrifuga?

E' possibile esprimere in termini di $\omega = \text{velocità angolare}$ in $\text{giri} \cdot \text{min}^{-1}$ o **(RPM)** dove una rivoluzione completa del rotore è equivalente a 2π radianti:

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

600 rpm oppure 9000 rpm

Ma in questo caso le rotazioni per minuto dipendono dalla distanza dall'asse di rotazione cioè da R

Oppure

come **forza centrifuga relativo (RCF)** come multiplo della costante gravitazionale ($g = 980 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-2}$):

$$RCF = \frac{F_c}{F_g} = \frac{m\omega^2 r}{mg} = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600 \times 980} \cdot R$$

Che diventa:

$$RCF = 1.11 \times 10^{-5} \cdot (RPM)^2 \cdot R$$

600 xg o 9000 xg

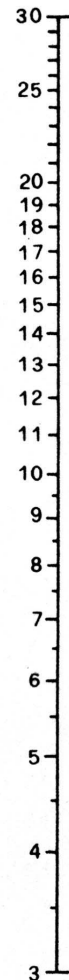
nomogramma

Per descrivere le modalità di centrifugazione in maniera completa bisogna indicare:

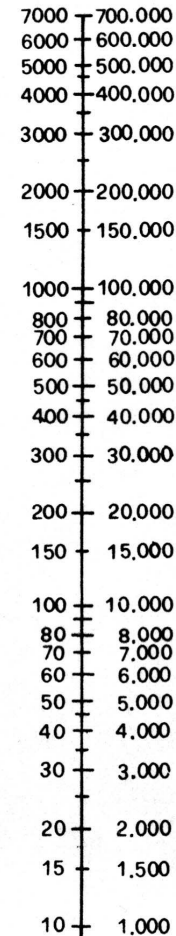
- 1) o la R.C.F (come multiplo della forza di gravità, cioè di g): 13000 xg
- 2) o la **velocità di rotazione (rpm)** + il **raggio del sistema** (r=dipende dal rotore usato): 6000 rpm; rotore A 6.24

Il nomogramma serve per convertire i *rcf* in rpm e viceversa

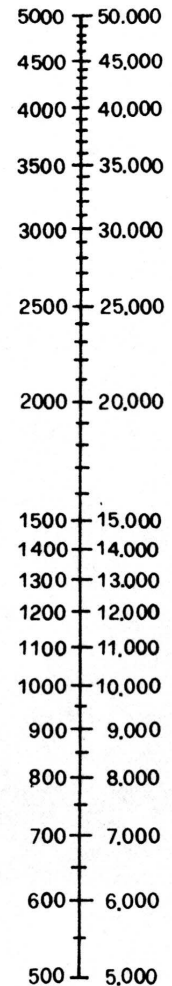
Raggio
(cm)



R.C.F.



R. P. M.



F_G = forza centrifuga = $m_p \omega^2 R$

$\omega^2 R$ = accelerazione angolare

$m = \rho V$ $\rho = m \text{ (kg)} / V \text{ (m}^3\text{)}$

$$V = \frac{4}{3} \pi r_p^3$$

$$\mathbf{F_G = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_p \omega^2 R}$$

dove ρ_p è la densità della particella (kg.m-3)

F_B = forza dovuta al principio di Archimede (spinta idrostatica)

$$\mathbf{F_B = m_m \omega^2 r = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_m \omega^2 R}$$

Nel corso della sedimentazione la particella è sottoposta ad una forza netta verso l'esterno

$$F_G - F_B = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_p \omega^2 R - \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_m \omega^2 R = \frac{4}{3} \pi r_p^3 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 R$$

Se anche il liquido oppone resistenza

Ed inoltre le particelle mentre migrano generano attrito, che assumendo sempre una particella sferica e che si muova con vel. Nota, allora la forza che si oppone al moto della particella è:

$$F_D = \text{forza di attrito} = 6\pi r_p \eta v$$

legge di Stokes

η = coeff. di viscosità
 v = vel di sedimentazione

Una particella in un mezzo a densità costante, **sarà accelerata** in un campo centrifugo **fino** a quando:

$$\frac{4}{3}\pi r_p^3 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 R = 6\pi r_p \eta v$$

Poi sedimenterà a velocità costante

Velocità di sedimentazione

Velocità di sedimentazione della particella

Posso utilizzare la sedimentazione che si ottiene dopo un certo tempo

Raggio della particella

Densità della particella

Densità del mezzo

Costante per una sfera

Viscosità del mezzo

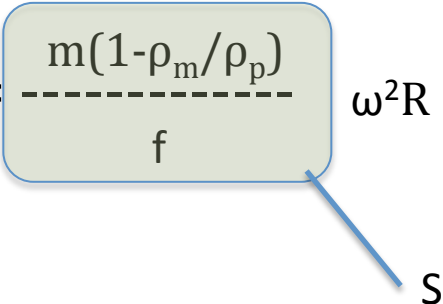
Campo centrifugo applicato

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

se esprimo il volume $V = m/\rho$
 $m/\rho_p (\rho_p - \rho_m) \omega^2 R = 6\pi r_p \eta v$
 $m(1 - \rho_m/\rho_p) \omega^2 R = f v$

se pongo $6\pi r_p \eta = f$

ricavo

$$v = \frac{m(1 - \rho_m/\rho_p)}{f} \omega^2 R$$


A blue arrow points from the fraction $\frac{m(1 - \rho_m/\rho_p)}{f}$ to the letter S , indicating that S is defined as this ratio.

1. Per molecole con uguale dimensione e forma, quella con massa maggiore avrà s maggiore: **sedimenterà per prima**

2. La forma influisce sulla sedimentazione. Il coeff. di attrito (f) è minore quanto più sferica è la particella. Particelle di massa uguale, ma forma diversa, sedimenteranno in modo diverso

3. Maggiore è la densità della particella, minore è il rapporto con la densità del mezzo, più grande sarà il valore di s , più veloce sarà la sedimentazione

4. La densità del mezzo influenza la velocità di sedimentazione:

Se $\rho_m = \rho_p$ allora $v=0$

Se $\rho_m > \rho_p$ allora la particella galleggerà sul mezzo

Se $\rho_m < \rho_p$ allora la particella precipiterà sul fondo

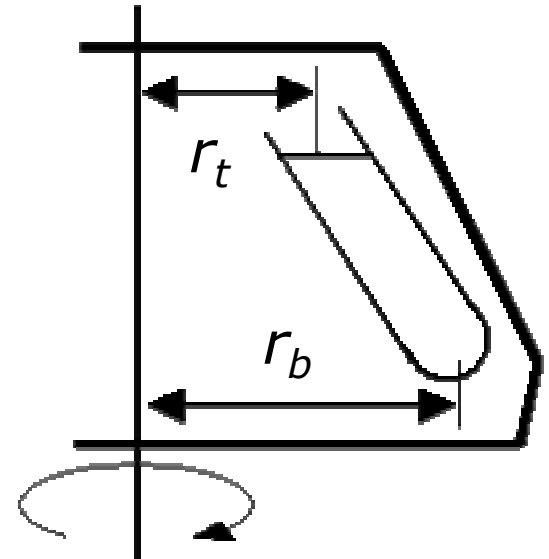
Tempo di sedimentazione

Il tempo di sedimentazione si ottiene attraverso l'integrazione della legge di Stokes tra due raggi:

- r_t = raggio di rotazione alla superficie e
- r_b = raggio di rotazione al fondo

$$t = \frac{9}{2} \cdot \frac{\eta}{\omega^2 \cdot a^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)} \cdot \ln \frac{r_b}{r_t}$$

Posso utilizzare il tempo necessario per la loro completa sedimentazione

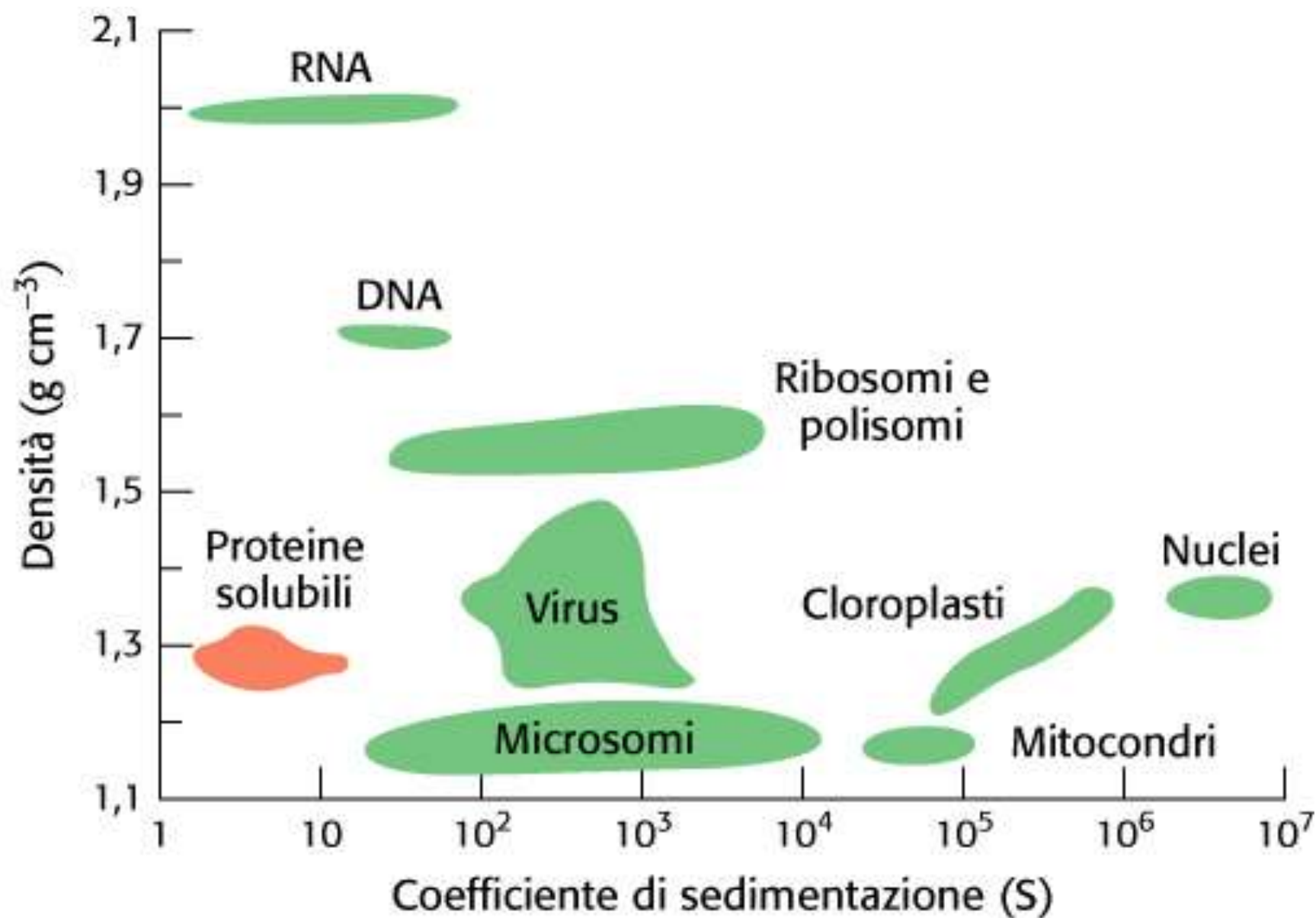


La velocità di sedimentazione può anche essere espressa in termini di velocità di sedimentazione per unità di campo centrifugo applicato, comunemente detta “**coefficiente di sedimentazione**” (**s**).

Se il mezzo ha una composizione definita, la velocità di sedimentazione è proporzionale a $\omega^2 r$, quindi l'equazione si semplifica in:

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

$$s = v / \omega^2 r \quad (\text{coeff. di sedimentazione})$$



enzimi, ormoni peptidici, proteine solubili	2-25 s
Acidi nucleici	3-100 s
Ribosomi e polisomi	20-200 s
Virus	40-4,0 x 10 ³ s
Lisosomi, perossisomi	4,0 x 10 ³ s
Membrane	100-1,0x10 ⁵ s
Mitocondri	2,0x10 ⁴ s-7,0x10 ⁴ s
Nuclei	4,0 x10 ⁶ s-4,0x10 ⁷ s

Il coefficiente di sedimentazione dipende dalla temperatura, dalla densità e dalla viscosità della soluzione, gli studi possono essere effettuati in diversi sistemi soluto-solvente, il valore ottenuto viene spesso corretto nel valore che si otterrebbe in un mezzo la cui viscosità e densità fossero pari a quelle dell' acqua a 20°C

coefficiente di sedimentazione standard o $S_{20,w}$.

S = Svedberg = 10^{-13} sec.

Le tecniche centrifugative si possono suddividere in generale in:

preparative e analitiche

La **centrifugazione preparativa** separazione di componenti cellulari e macromolecole a bassa e alta velocità (da banco o da terra)

La **centrifugazione analitica** alta velocità e volumi inferiori di materiale da analizzare; metodo per la caratterizzazione di soluzioni di macromolecole ed è uno strumento indispensabile per l'analisi quantitativa delle interazioni macromolecolari; necessità di strumenti specifici con sistemi ottici incorporati

Può essere separata secondo due criteri:

- Per **VELOCITA di SEDIMENTAZIONE** detta anche **centrifugazione zonale**

Vantaggi:

bassa velocità e tempi brevi

Limitazioni:

separazione incompleta

- Per **EQUILIBRIO di SEDIMENTAZIONE** detta anche **centrifugazione isopicnica o a densità**

Vantaggi:

buona separazione della frazione di interesse

Limitazioni:

alta velocità, necessaria strumentazione specifica e costosa

Perché separare....

- Lo studio della morfologia, composizione e attività dei componenti
- La separazione di sostanze con caratteristica localizzazione subcellulare (DNA, Enzimi, CoEnzimi ecc)
- L'integrazione delle attività di componenti subcellulari isolati

molto importante...



- La scelta del materiale di partenza (es tessuto, cellule etc)
- L'omogenizzazione (se si parte da tessuti)
- L'uso di opportuni tamponi, per es. isotonici con l'ambiente cellulare in cui la struttura subcellulare si trova (es. una soluzione salina; una soluzione 0,25 M di saccarosio per l'integrità dei mitocondri)

Tipi di centrifugazione

Preparativa:

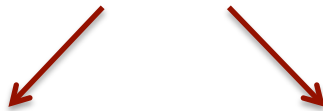
- Differenziale
- Su gradiente di densità: zonale
isopicnica

Centrifugazione differenziale

(Pelleting)

Il materiale da frazionare viene separato in un certo numero di frazioni mediante centrifugazioni successive in cui
aumenta di volta in volta la forza centrifuga applicata

Otengo 2 frazioni



Sedimento o fondello (o pellet o P)

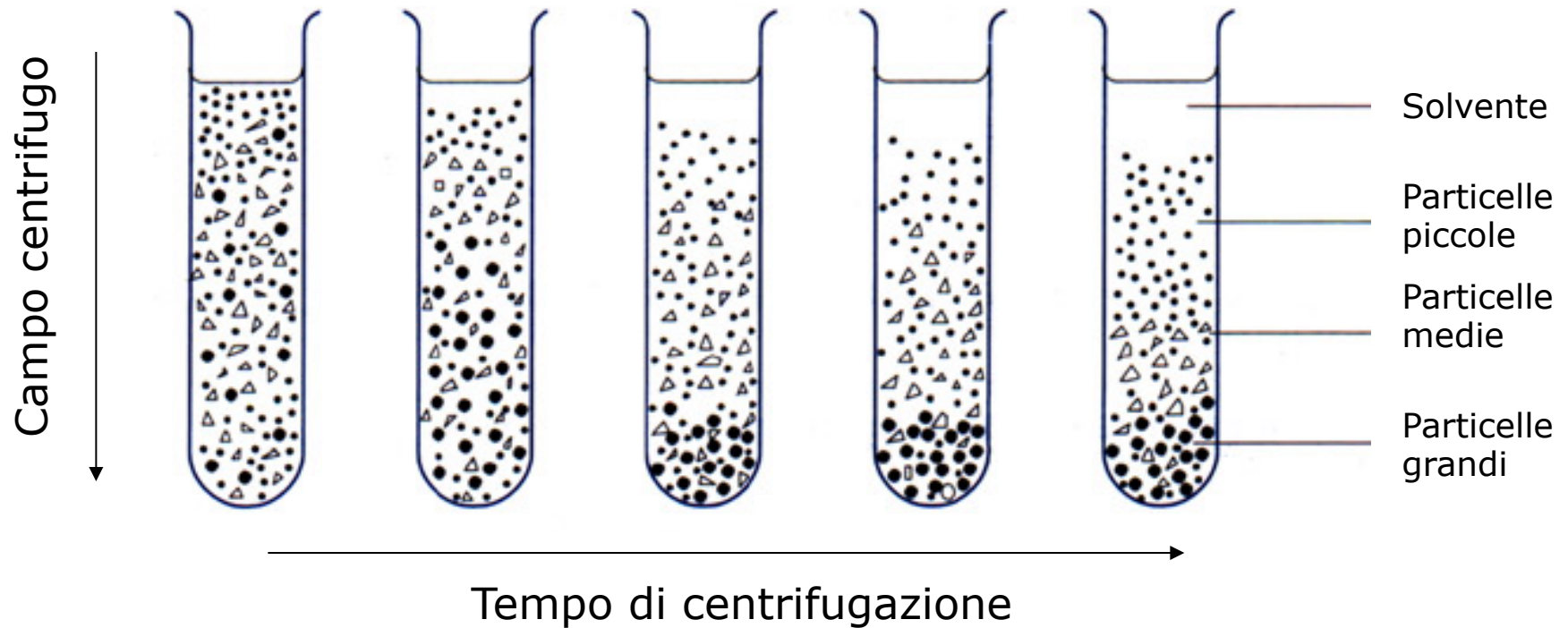
Sovranatante (SN)

La **velocità sedimentazione** dipende dalle dimensioni e dalla densità della particella

L'**efficienza di sedimentazione** dipende dalla forza di gravità applicata (RCF) e dal **tempo** di centrifugazione

Centrifugazione Differenziale

Centrifugazione di una sospensione omogenea: si separano un sedimento (P) e un sovrnatante (SN)



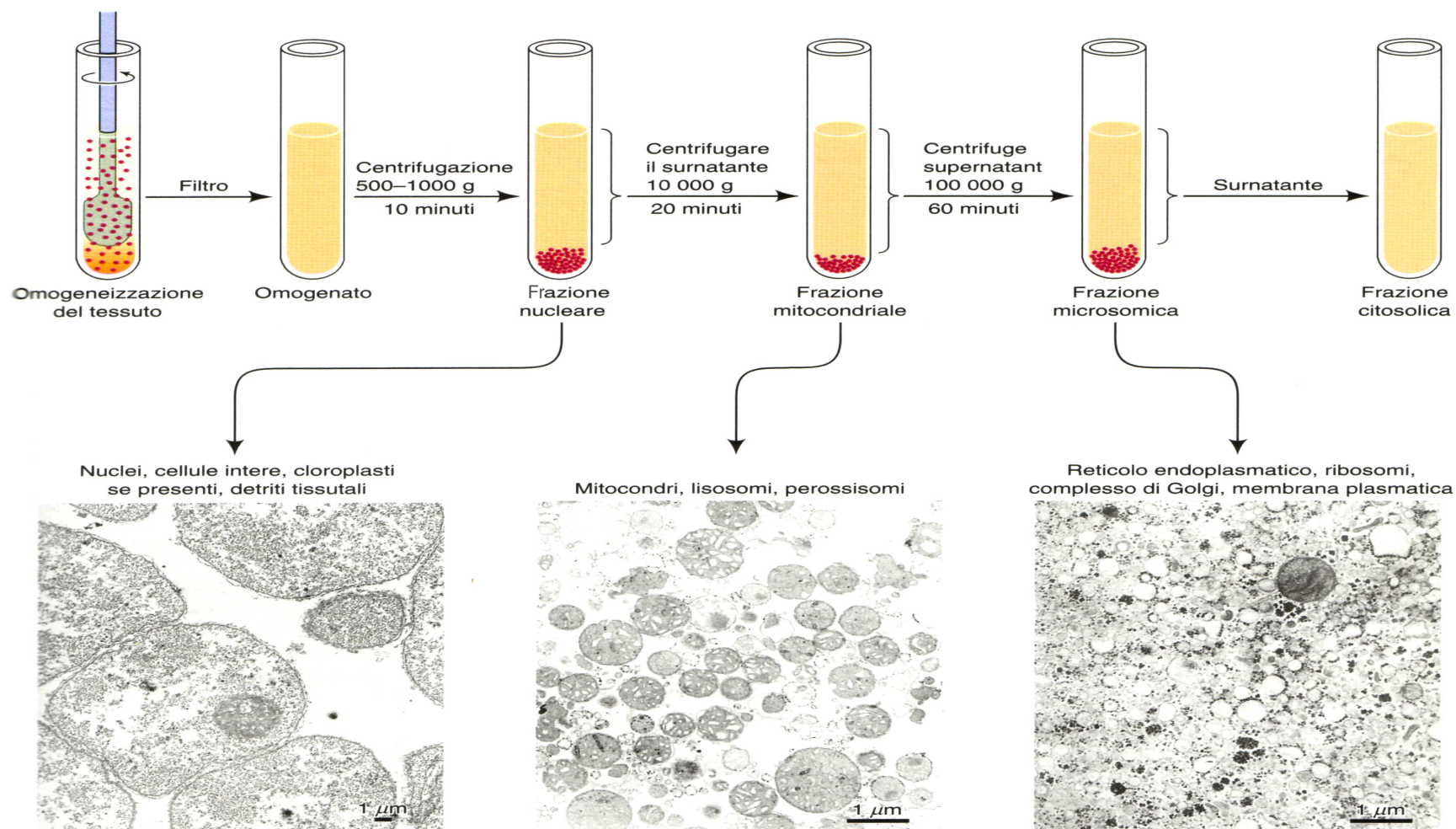


Figura 4-29 Frazionamento subcellulare mediante centrifugazione differenziale Le quattro frazioni che normalmente si ottengono mediante centrifugazione differenziale vengono chiamate frazione nucleare, mitocondriale, microsomica e citosolica. Nonostante queste denominazioni, nessuna delle frazioni che si ottengono mediante centrifugazione differenziale è costituita da un singolo componente purificato. Per questa ragione, le frazioni di una centrifugazione differenziale vengono spesso sottoposte ad altre procedure di centrifugazione per l'ulteriore purificazione. Micrografia concessa da D.J. Morré (a sinistra) e P. Baudhuin (al centro, a destra).

Centrifugazione in gradiente di densità:

Richiede la presenza di una colonna di liquido la cui **densità sia crescente** man mano che si raggiunge il fondo della provetta da centrifuga

Caratteristiche ideali dei materiali per gradienti :

- Ampio intervallo di densità
- Bassa pressione osmotica
- Bassa viscosità
- Nessuna tossicità
- Compatibilità con materiali biologici

Incapacità di penetrare le membrane biologiche

Tabella 2.1 Materiali per gradienti di uso comune e loro applicazioni

Materiale	Forza ionica della soluzione	Densità massima della soluzione acquosa a 20°C (g cm ⁻³)	Assorbimento della luce ultravioletta	Effetti osmotici	Materiale biologico separato
Cloruro di cesio	+++	1,91	+	+++	DNA, virus, nucleoproteine e plasmidi
Solfato di cesio	+++	2,01	+	+++	DNA, RNA e proteoglicani
Bromuro di sodio	+++	1,53	+	+++	Lipoproteine
Ioduro di sodio	+++	1,90	+++	+++	DNA e RNA
Glicerolo	-	1,26	+	+++	Proteine e frammenti di membrane
Saccarosio	-	1,32	+	+++	Particelle subcellulari, virus, acidi nucleici, proteine e membrane
Ficoll (Pharmacia)	-	1,17	+	+(a)	Cellule intere, particelle subcellulari, acidi nucleici
Destrano	-	1,13	+	+(a)	Cellule intere, microsomi
Albumina di siero bovino	-	1,35	+++	+	Cellule intere
Percoll (Pharmacia)	-	1,30	+++	+	Cellule intere e particelle subcellulari
Metrizamide (Nyegaard)	-	1,46	+++	++(b)	Cellule intere, particelle subcellulari, nuclei, ribonucleoproteine e membrane
Nycodenz (Nyegaard)	-	1,42	+++	++(b)	Cellule intere, particelle subcellulari, nucleoproteine, membrane e virus

+++ Elevato; ++ Medio; + Basso; - Non ionico

(a) Basso effetto osmotico per concentrazioni inferiori al 20% (peso/volume); l'effetto cresce quasi in modo esponenziale per concentrazioni superiori al 30% (peso/volume)

(b) L'effetto osmotico cresce in modo quasi lineare rispetto alla concentrazione.

Centrifugazione ZONALE

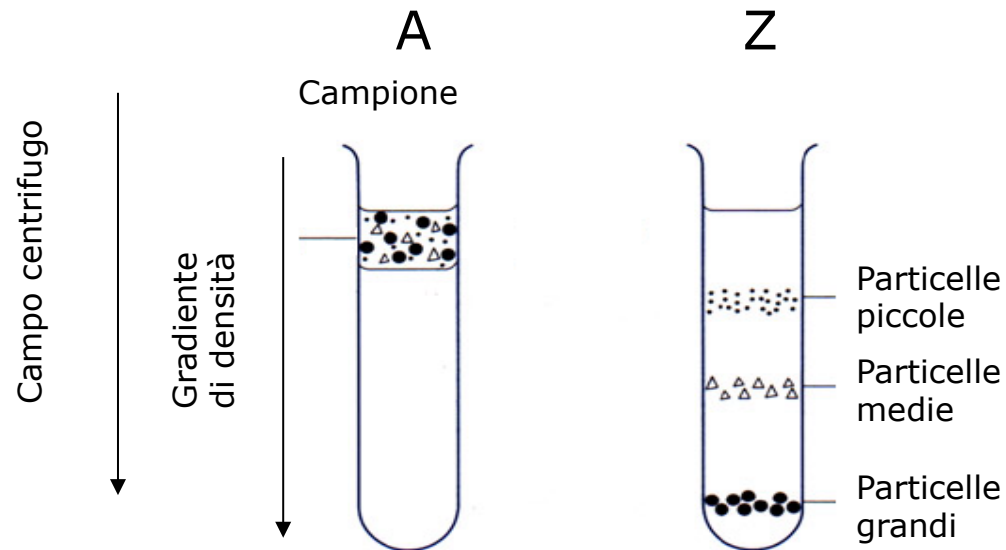
Sfrutta le differenze di dimensione e forma delle particelle

$$\rho_p > \rho_m$$

Tecnica di **velocità**

Dipendente dal tempo

Dipendente da **S** (dimensione, forma e densità)



Centrifugazione ISOPICNICA

$$\rho_p = \rho_m$$

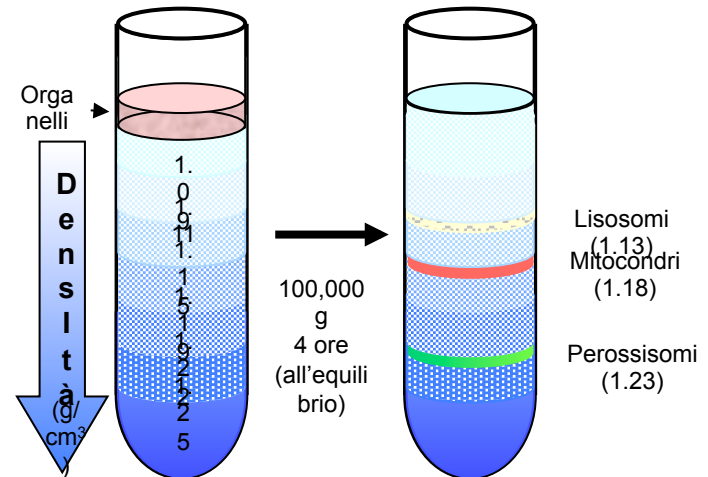
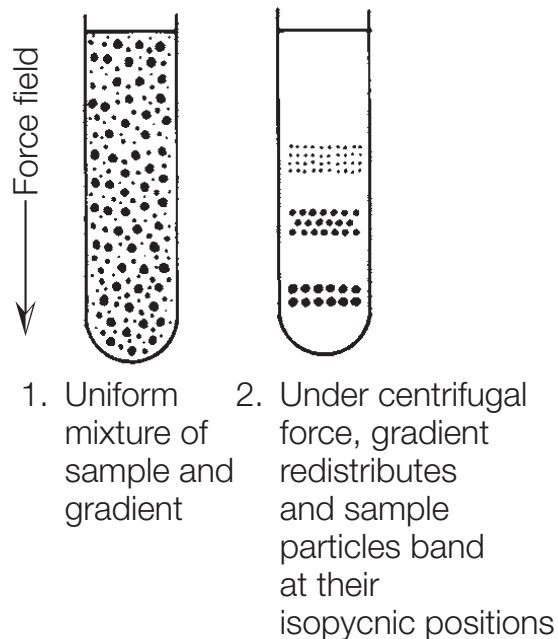
Tecnica di **equilibrio**

Indipendente dal tempo

Dipendente solo dalla densità

Sfrutta la densità delle particelle

A volte il gradiente non è preformato ma si forma per effetto della F.C. sulle molecole del soluto. Gradienti continui e discontinui.



Densità di alcuni materiali biologici

Materiale	Densità (g/cm ³)
Cellule microbiche	1.05 - 1.15
Cellule di mammifero	1.04 - 1.10
Organuli	1.10 - 1.60
Proteine	1.30
DNA	1.70
RNA	2.00

Troverete diverse indicazioni di densità a seconda del materiale utilizzato per il gradiente

Come è possibile valutare il grado di purezza del precipitato dopo centrifugazione differenziale?

Utilizzando dei “marker” subcellulari

Valutazione tramite l'attività specifica

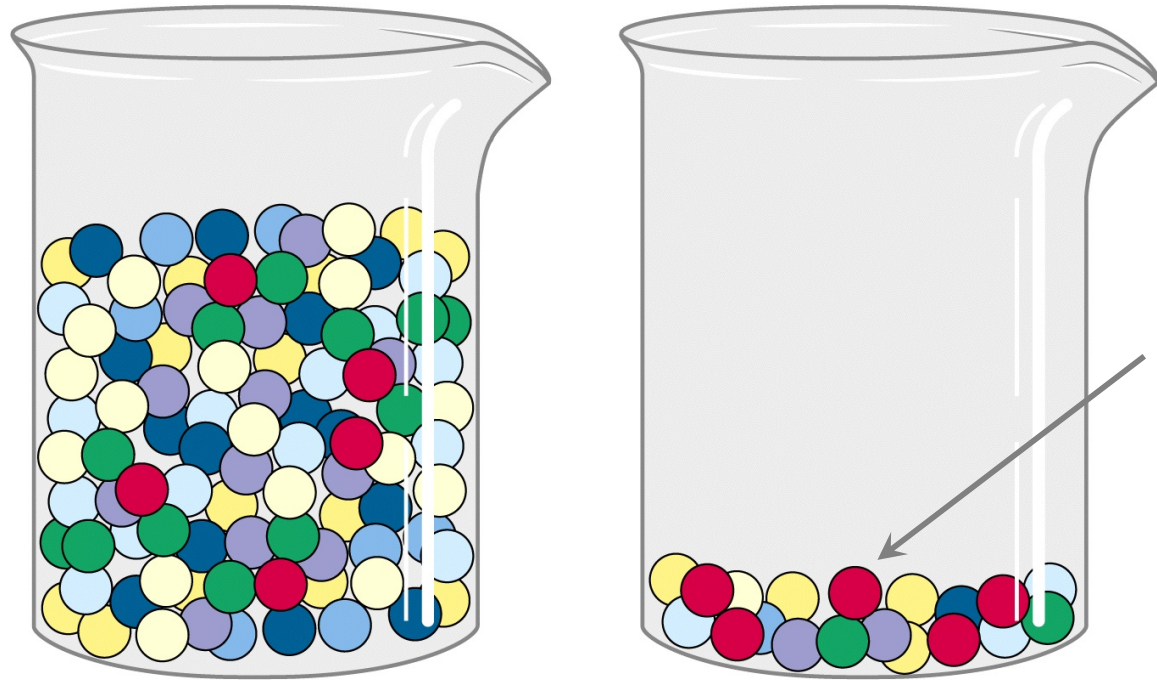
Attività specifica (in U/mg proteine) =
attività enzimatica (in U/ml) / concentrazione tot

Se la centrifugazione è stata efficace l'attività specifica nella frazione purificata è maggiore dell'attività specifica di partenza

Tabella 4-2 Marcatori chimici utilizzati nell'identificazione delle preparazioni di organelli ottenute mediante frazionamento subcellulare

Organulo	Marcatore
Nuclei	DNA, istoni
Mitocondri	Succinico deidrogenasi, citocromo ossidasi, monoammino-ossidasi
Cloroplasti	Ribulosio bifosfato carbossilasi, fotosistemi I e II
Lisosomi	Fosfatasi acida, aril solfatasi, desossiribonucleasi acida
Perossisomi	Catalasi, urico-ossidasi, D-amminoacido ossidasi
Reticolo endoplasmico	Glucosio-6-fosfatasi (fegato), citocromo <i>b</i> ₅ , citocromo P-450
Ribosomi	RNA
Complesso di Golgi	Glicosil transferasi, tiamina pirofosfatasi, nucleoside difosfatasi
Membrana plasmatica	Adenilil ciclasi, Na ⁺ -K ⁺ ATPasi
Citosol	Enzimi della glicolisi (per esempio fosfoglucomutasi)

....attività specifica



Valutazione tramite l'attività specifica

Attività specifica (in U/mg proteine) =

attività enzimatica (in U/ml) / concentrazione totale di proteine (in mg/ ml)

Se la centrifugazione è stata efficace l'attività specifica nella frazione purificata è maggiore dell'attività specifica di partenza

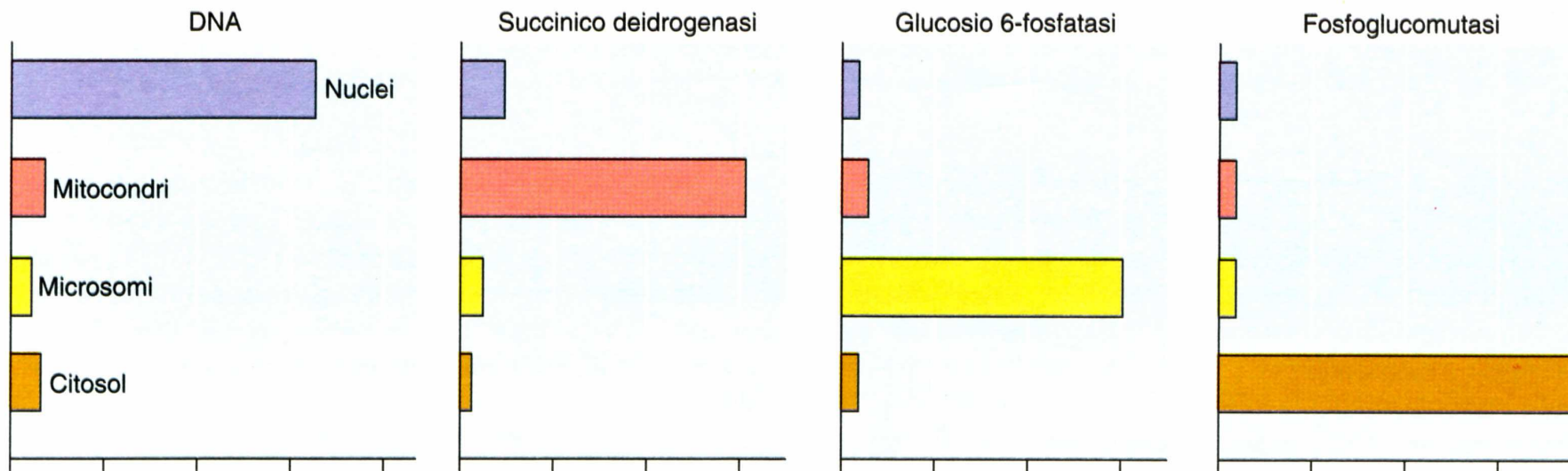
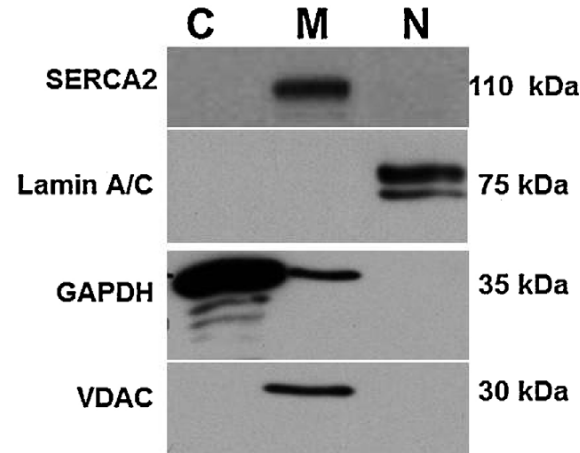


Figura 4-30 Uso di marcatori chimici per l'identificazione delle frazioni subcellulari In questo gruppo di esperimenti, un omogenato di fegato di ratto è stato frazionato mediante centrifugazione differenziale, secondo lo schema riportato nella figura precedente. Le singole frazioni sono quindi state analizzate allo scopo di rivelare la presenza del DNA (per identificare i nuclei), la succinico deidrogenasi (per identificare i mitocondri), la glucosio-6-fosfatasi (per identificare le membrane del reticolo endoplasmico), e la fosfoglucomutasi (per identificare il citosol).

A.



B.

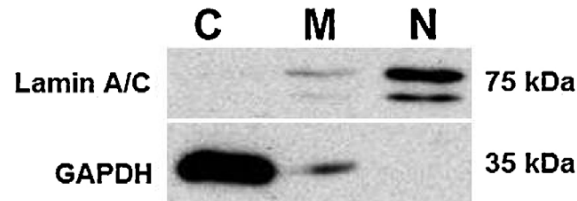


Fig. 2. The purity of subcellular fractions from fresh heart tissue isolated from Sprague-Dawley rats (A) or HT1080 human fibrosarcoma cells (B) were assessed by western blotting against specific markers. The cytosolic, membrane bound organelles and nuclear fractions are denoted by C, M and N, respectively. Cytosolic marker: GAPDH; membrane bound organelles markers: SERCA2, VDAC; nuclear marker: Lamin A/C.

SERCA2: sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

LAMININ A/C: nuclear marker

GAPDH: cytosolic marker

VDAC: voltage-dependent anion channel, mitochondrial marker

Tipi di ultracentrifughe

Centrifughe a bassa, media, alta e ultra velocità

Ultracentrifugazione preparativa: per separare particelle piccole: microsomi, ribosomi, batteri, virus, ac. nucleici e proteine.

Ultracentrifugazione analitica: utilizza un sistema ottico che permette di visualizzare il processo di sedimentazione man mano che si verifica. E' possibile caratterizzare: coef. sedimentazione, coef. diffusione, peso molecolare, densità, misura concentrazione e omogeneità di una soluzione.

Ultracentrifuges



Reach the speeds you need for your separation demands

- 5 models enable a fast array of discovery applications
- Compatible with extensive rotor and labware options
- Ensure maximum separation purity in the shortest possible time

High Speed Centrifuges



Accelerate sample processing with the maximum g-force

- Simple pelleting to rate zonal, elutriation, and continuous flow separations
- Simplified high throughput sample processing
- Overcome shared lab challenges
- Full range of rotors and adaptors

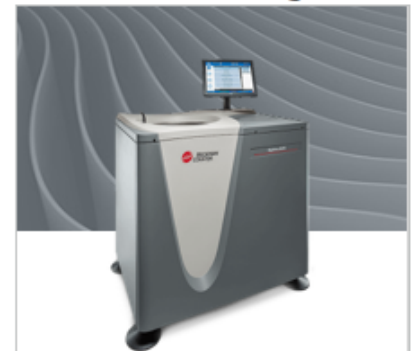
Benchtop Centrifuges



Compact yet powerful and built to last

- Refrigerated and controlled temperature models
- Simple and quick setup and run
- Available biocertified rotors, canisters, and covers

Analytical Ultracentrifuges



Macromolecule characterization in solution

- Enables characterization of samples in their native state
- A specialized ultracentrifuge with unique detection capabilities
- Monitors a wide variety of particles



Optima XPN

- 1,500 mL max rotor capacity
- 100,000 max RPM
- 802,400 x g
- Security and tracking
- Remote monitoring and control
- eXPert simulation software



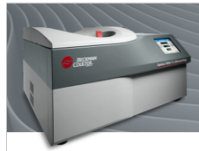
Optima XE

- 1,500 mL max rotor capacity
- 100,000 max RPM
- 802,400 x g



Optima MAX-XP

- 194.4 mL max rotor capacity
- 150,000 max RPM
- 1,019,000 x g
- Security and tracking
- Remote monitoring and control
- On-screen rotor ...



Optima MAX-TL

- 40.8 mL max rotor capacity
- 120,000 max RPM
- 657,000 x g



Avanti J-15

Save space with the Avanti J-15 series high performance benchtop centrifuges

- 3.0 L Max Capacity
- 10,200 RPM
- 11,420 x g



Avanti J-15R

Save time with the Avanti J-15R series high performance refrigerated benchtop centrifuges

- 3.0 L Max Capacity
- 10,200 RPM
- 11,420 x g
- Refrigerated



Avanti JXN-30

Overcome shared lab challenges with the Avanti JXN-30 high-speed centrifuge

- 4.0 L Max Capacity
- 30,000 RPM
- 110,510 x g



Avanti JXN-26

Enhance your workflow with the Avanti JXN-26 high-speed centrifuge system

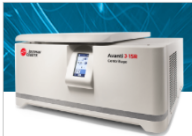
- 6.0 L Max Capacity
- 26,000 RPM
- 81,770 x g



Avanti J-15

Save space with the Avanti J-15 series high performance benchtop centrifuges

- 3.0 L Max Capacity
- 10,200 RPM
- 11,420 x g



Avanti J-15R

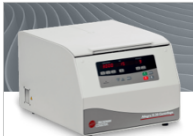
Save time with the Avanti J-15R series high performance refrigerated benchtop centrifuges

- 3.0 L Max Capacity
- 10,200 RPM
- 11,420 x g
- Refrigerated



Allegra 64R

- 64,400 x g
- 30,000 RPM
- Fast acceleration and deceleration times for quicker spins
- Ideal for subcellular fractionation, protein isolation and purification, viruses and phase extractions
- Outstanding high-speed performance



Allegra X-30

- 1.6 L maximum capacity
- 18,000 RPM
- 29,756 x g
- Highest speed and g-force in its class
- Simple and quick run setup
- Flexible with extensive rotor library for multiple applications
- Compact design - only 18" (46

Home > Centrifuges > Analytical Ultracentrifuges

ANALYTICAL ULTRACENTRIFUGES

Macromolecule characterization in solution



Optima AUC

- Enables sample recovery
- Avoids dilution effects
- Analyzes samples in a matrix-free environment
- Has minimal buffer constraints



Proteome Lab XL-A/XL-I

- Equipped with a scanning UV/Vis detection system for low-concentration work and selectivity when detecting maximum sample absorbance
- Generate data for accurate analysis in as little as 3 hours
- Quickly prep runs with unique dual-opening channel design providing easy access for cleaning and rinsing



S6096 Swinging- Bucket Rotor

- Max RPM - 3,000
- Max RCF - 1,109 x *g*
- Rotor Capacity - 576 mL



SW 28.1 Swinging- Bucket Rotor

- Max RPM - 28,000
- Max RCF - 150 000 x *g*
- *k* Factor - 275
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 6 x 17 mL



SW 28 Ti Swinging- Bucket Rotor

- Max RPM - 28,000
- Max RCF - 141,000 x *g*
- *k* Factor - 246
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 6 x 38.5 mL



SW 32.1 Ti Swinging- Bucket Rotor

- Max RPM - 32,000
- Max RCF - 187,000 x *g*
- *k* Factor - 229
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 6 x 17 mL



C0650 Fixed- Angle Rotor

- Max. RPM - 10,000
- Max. RCF - 10,400 x *g*
- *k* Factor - 2,964
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 6 x 50 mL
 - 28.5 x 107 mm
- Max Rotor Capacity - 300mL



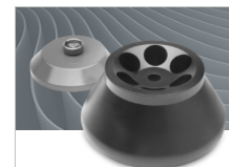
C1015 Fixed- Angle Rotor

- Max RPM - 10,000
- Max RCF - 10,416 x *g*
- *k* Factor - 2,270
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 10 x 15 mL
 - 17 x 120 mm
- Rotor Capacity - 150 mL



F0485 Fixed- Angle Rotor

- Max RPM - 20,000
- Max RCF - 40,700 x *g*
- *k* Factor - 920
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 4 x 85 mL
 - 38 x 104 mm
- Rotor Capacity - 340 mL



F0630 Fixed- Angle Rotor

- Max RPM - 26,200
- Max RCF - 59,860 x *g*
- *k* Factor - 454
- Tube Number / Volume / Size / Dimensions:
 - 6 x 38.5 mL
 - 23.5 x 92 mm
- Rotor Capacity - 231 mL

K rappresenta l'efficienza di sedimentazione relativa:

$$k = \frac{\ln(r_{\max} / r_{\min})}{\omega^2} \frac{10^{13}}{3600}$$

Dipende da:

massima velocità angolare ω (rad/sec) del rotore

Raggio minimo e massimo del rotore

$$k = \frac{2,53 \cdot 10^5 \times \ln(r_{\max} / r_{\min})}{(RPM / 1000)^2}$$

...se la velocità viene espressa in rpm..

$$k_{adj} = k \left(\frac{\text{max velrotore}}{\text{velocità attualerotore}} \right)^2$$

...se non si usa la massima velocità del rotore

$$T = K/S$$

T è il tempo (ore) necessario per sedimentare un campione di cui è noto il coefficiente di sedimentazione (s)

S= coefficiente di sedimentazione in (S)

$$\frac{T_1}{K_1} = \frac{T_2}{K_2} \longrightarrow T_1 = T_2 \left(\frac{K_1}{K_2} \right)$$

TABLE 4.1 Types of Centrifuges and Applications

Characteristic	Type of Centrifuge			
	Low Speed	Microfuge (Medium Speed)	High Speed	Ultracentrifuge
Range of speed (rpm)	1–6000	1000–15,000	1000–25,000	20–150,000
Maximum RCF (<i>g</i>)	6000	12,000	50,000	1,500,000
Refrigeration	Some	Some	Yes	Yes
Applications				
Pelleting of cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Pelleting of nuclei	Yes	Yes	Yes	Yes
Pelleting of organelles	No	No	Yes	Yes
Pelleting of ribosomes	No	No	No	Yes
Pelleting of macromolecules	No	No	No	Yes
Analytical techniques	No	No	No	Yes

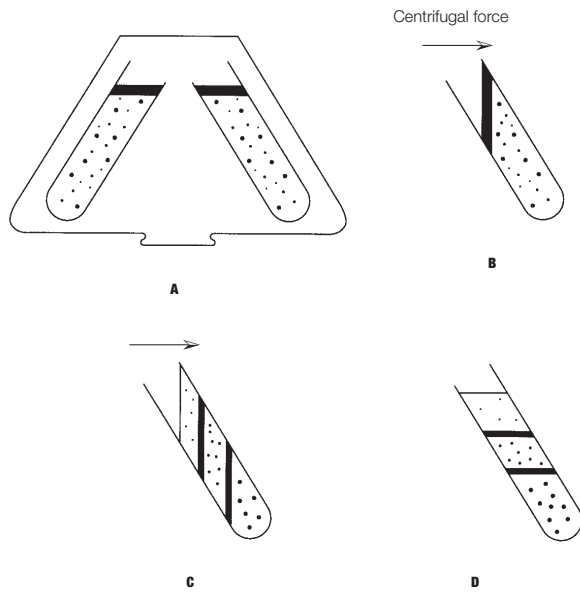


FIGURE 4.6
Operation of a
fixed-angle rotor.
A Loading of
sample. **B** Sample
at start of
centrifugation.
C Bands form as
molecules sediment.
D Rotor at rest
showing separation
of two components.

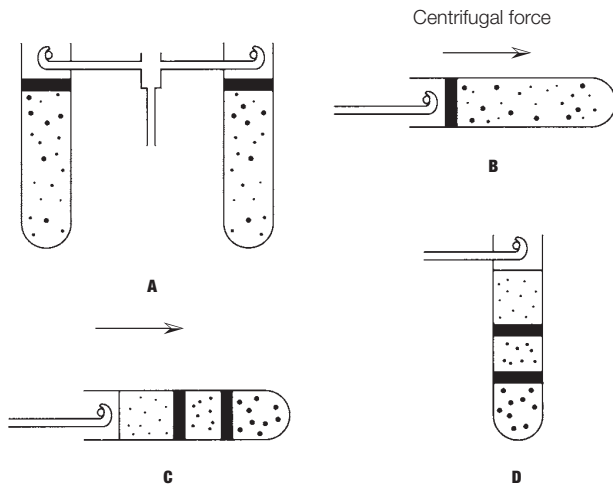


FIGURE 4.7
Operation of a
swinging-bucket
rotor. **A** Loading of
sample. **B** Sample
at start of
centrifugation.
C Sample during
centrifugation
separates into two
components. **D**
Rotor at rest.



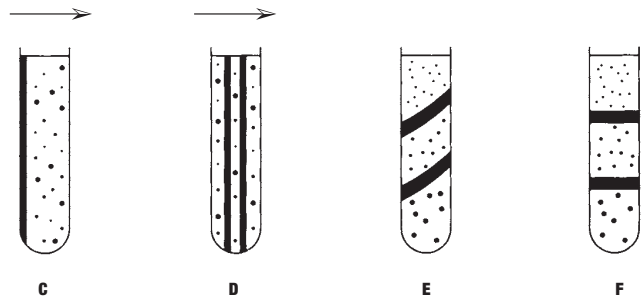
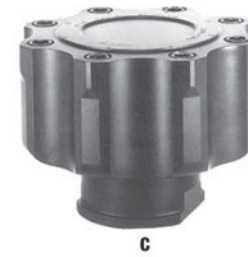
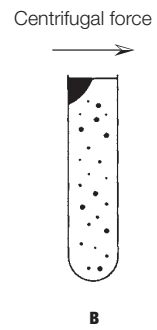
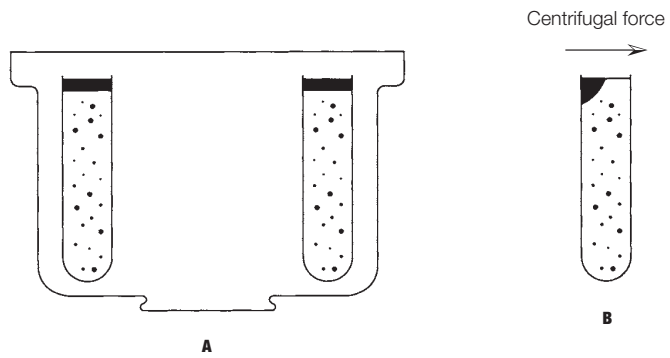


FIGURE 4.8
Operation of a vertical rotor.
A Loading of sample.
B Beginning of centrifugation.
C, D During centrifugation.
E Deceleration of sample. **F** Rotor at rest.

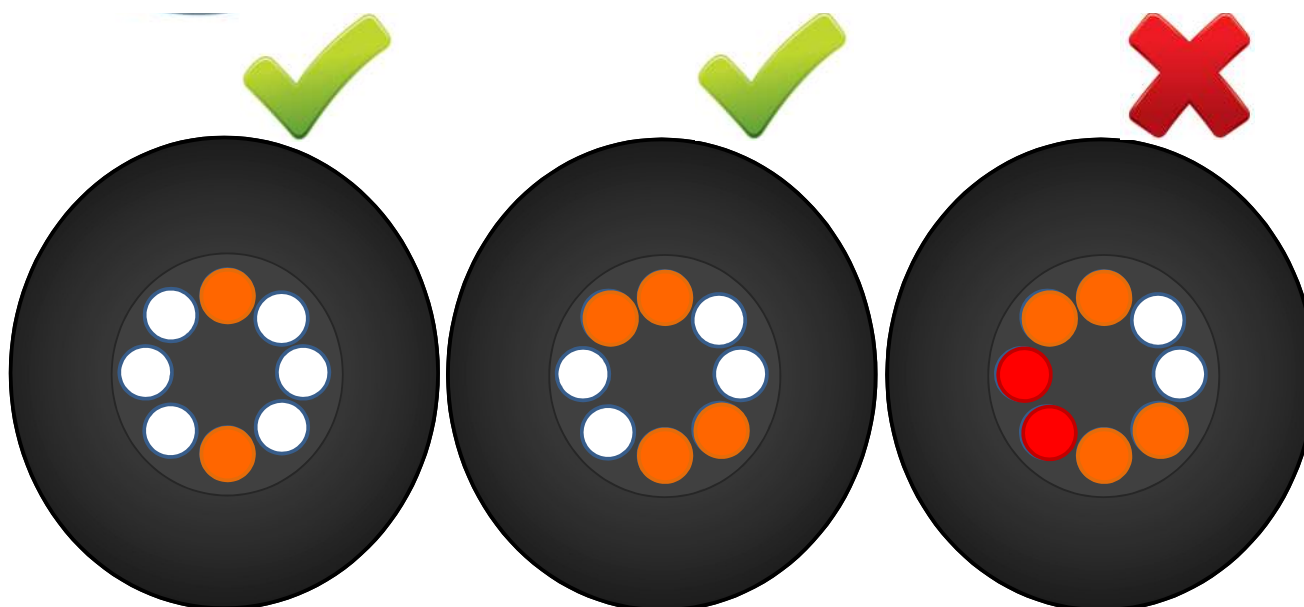
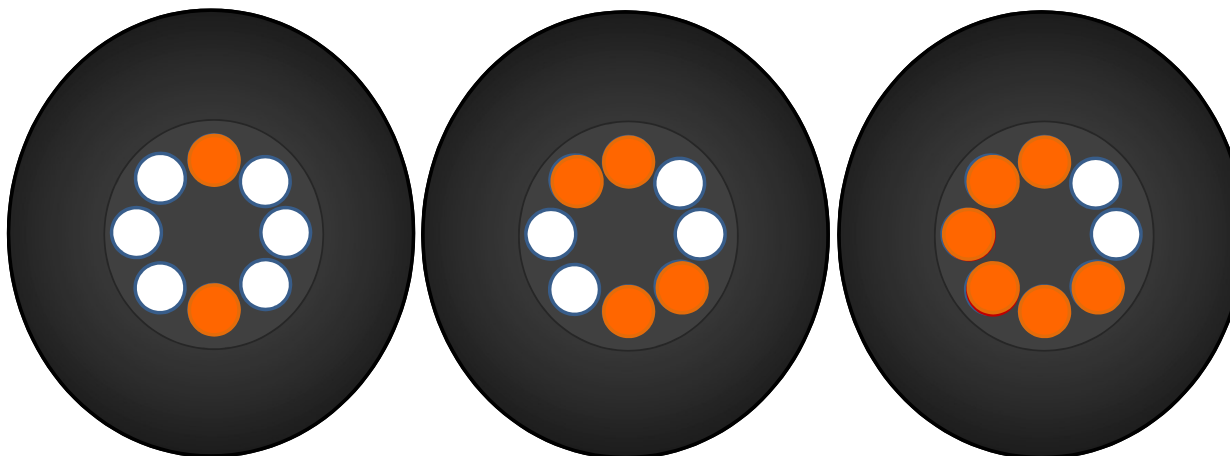
- I rotori ad angolo fisso hanno piccole differenze tra $r_{\max}$ e $r_{\min}$
- Il tempo richiesto per la sedimentazione è minore per rotori ad angolo fisso
- I rotori ad angolo fisso sono più pesanti e necessitano di una maggiore energia per operare
- I rotori a bracci mobili (Swing out) sono da preferire per centrifugare cellule e particelle
- Per sedimentare macromolecole e particelle fini si usano rotori ad angolo fisso
- I rotori a bracci mobili sono da preferire per la centrifugazione su gradiente.

Aspetti pratici

- uso di provette adeguate
- bilanciamento delle provette
- uso di tappi



Come devo caricare se ho 2 o più campioni??



Strumentazione: tubi o provette

Centrifuge Tube Guide



1.5 ml
(11 x 42 mm)



5 ml
(12 x 75 mm)



7 ml
(13 x 100 mm)



10 - 15 ml
(16 x 100 mm)



15 ml conical
(17 x 120 mm)



30 ml high speed
(25.5 x 92 mm)



50 ml high speed
(28.5 x 104mm)



50 ml conical
(29 x 115 mm)



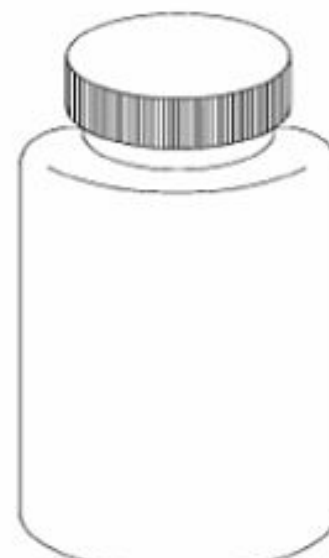
85 ml high speed
(38 x 101 mm)



250 ml
(60 x 124 mm)



500 ml
(80 x 125 mm)



1000 ml
(97 x 170 mm)