

FRAZIONAMENTO e CENTRIFUGAZIONE

Frazionamento cellulare e tissutale

Le cellule possono essere separate e rotte in vario modo:

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

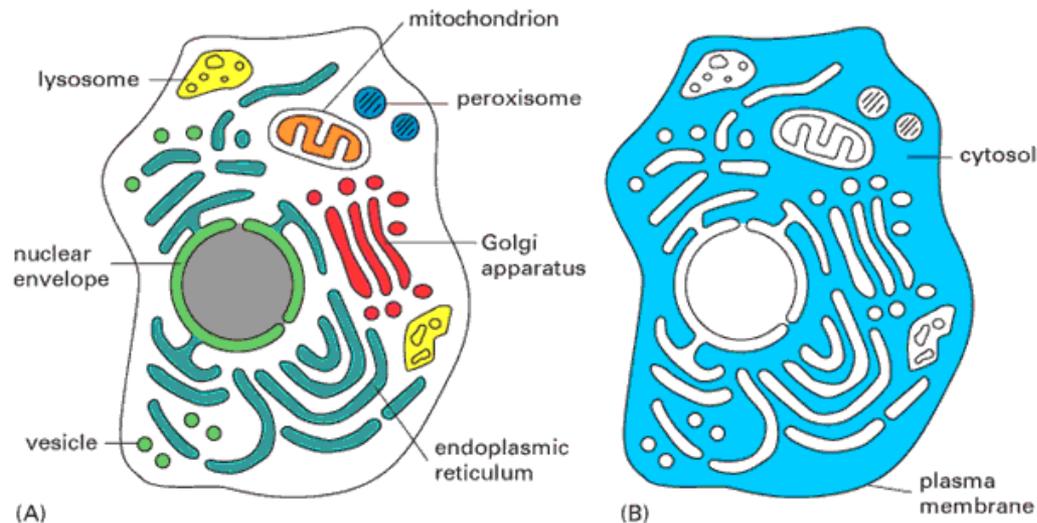
Omogenizzazione meccanica

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.



mortaiò



macinatore



Potter



French Press



Sonicatori



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

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

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:

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

IL CAMPO CENTRIFUGO è espresso come MULTIPLO DEL CAMPO GRAVITAZIONALE TERRESTRE ($g = 980 \text{ cm s}^{-2}$)

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

RCF = relative centrifugal field oppure numeri di g

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

Es. calcolare il valore di rcf con rotore da 10 o 7 cm e vel di 10000 rpm

Per esempio:

se centrifugo una particella a **10.000 rpm** in un rotore di **raggio = 10 cm**
sottopongo la particella a un campo centrifugo di 11.200 volte
la forze di gravità e si scrive **11.200g**

*Se centrifugo una particella sempre a 10000 rpm con un rotore di
dimensione diversa?*

nomogramma

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

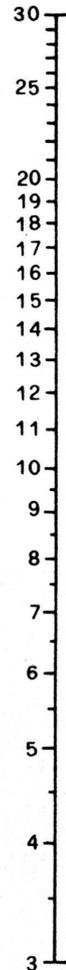
1) o la R.C.F (come multiplo della forza di gravità, cioè di g):
13000 *xg*

2) o la **velocità di rotazione (rpm)**
+ il **raggio del sistema** (r=dipende dal rotore usato): 6000 rpm;
rotore A 6.24

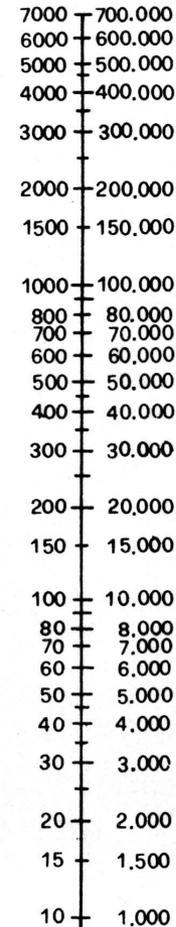
Durata

Il nomogramma serve per convertire i rcf in rpm e viceversa

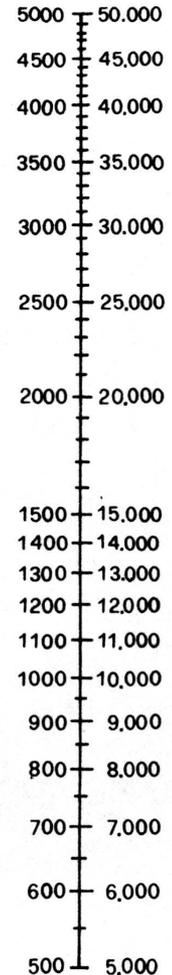
Raggio
(cm)



R.C.F.



R. P. M.



Quali forze agiscono su una particella immersa in un liquido??

$$F_G = \text{forza centrifuga} = m_p \omega^2 R$$

$\omega^2 R =$ accelerazione angolare

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

$$V = 4/3 \pi r_p^3$$

$$F_G = 4/3 \pi r_p^3 \rho_p \omega^2 R$$

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

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

$$F_B = m_m \omega^2 r = 4/3 \pi r_p^3 \rho_m \omega^2 R$$

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

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

Se anche il liquido oppone resistenza

$$F_D = \text{forza di attrito} = v f = v 6\pi r_p \eta \quad \text{legge di Stokes} \quad \eta = \text{coeff. di viscosità}$$

$v = \text{vel di sedimentazione}$

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

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

The diagram shows the equation for sedimentation velocity v in a centrifuge. The equation is enclosed in a yellow rounded rectangle. Labels with arrows point to each part of the equation: v is labeled 'Velocità di sedimentazione della particella'; the fraction $\frac{2}{9}$ is labeled 'Costante per una sfera'; r^2 is labeled 'Raggio della particella'; $(\rho_p - \rho_m)$ is labeled 'Densità della particella' and 'Densità del mezzo'; η is labeled 'Viscosità del mezzo'; and $\omega^2 R$ is labeled 'Campo centrifugo applicato'. A red note on the left says 'Posso utilizzare la sedimentazione che si ottiene dopo un certo tempo' with an arrow pointing to the velocity variable v .

se esprimo

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

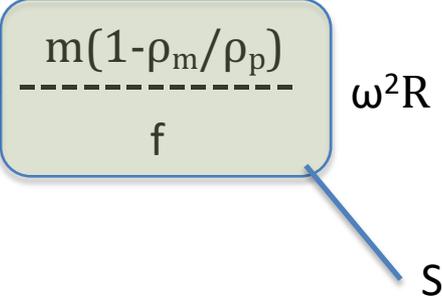
Con il volume $V = m/\rho$

$$m/\rho_p (\rho_p - \rho_m) \omega^2 R = 6\pi r_p \eta v$$

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

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

ricavo

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


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

2. La forma influisce sulla sedimentazione.

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

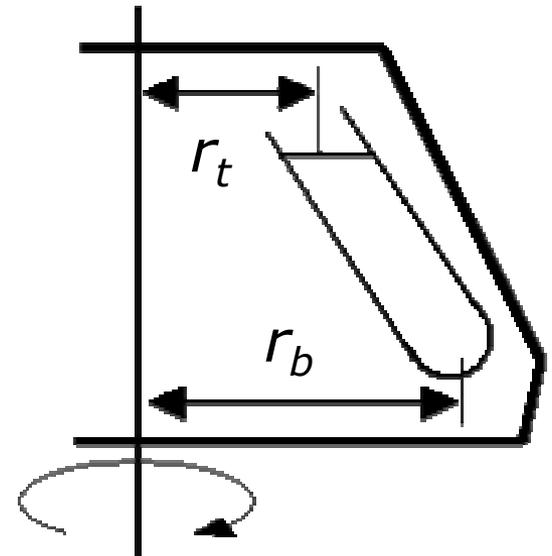
Tempo di sedimentazione

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

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

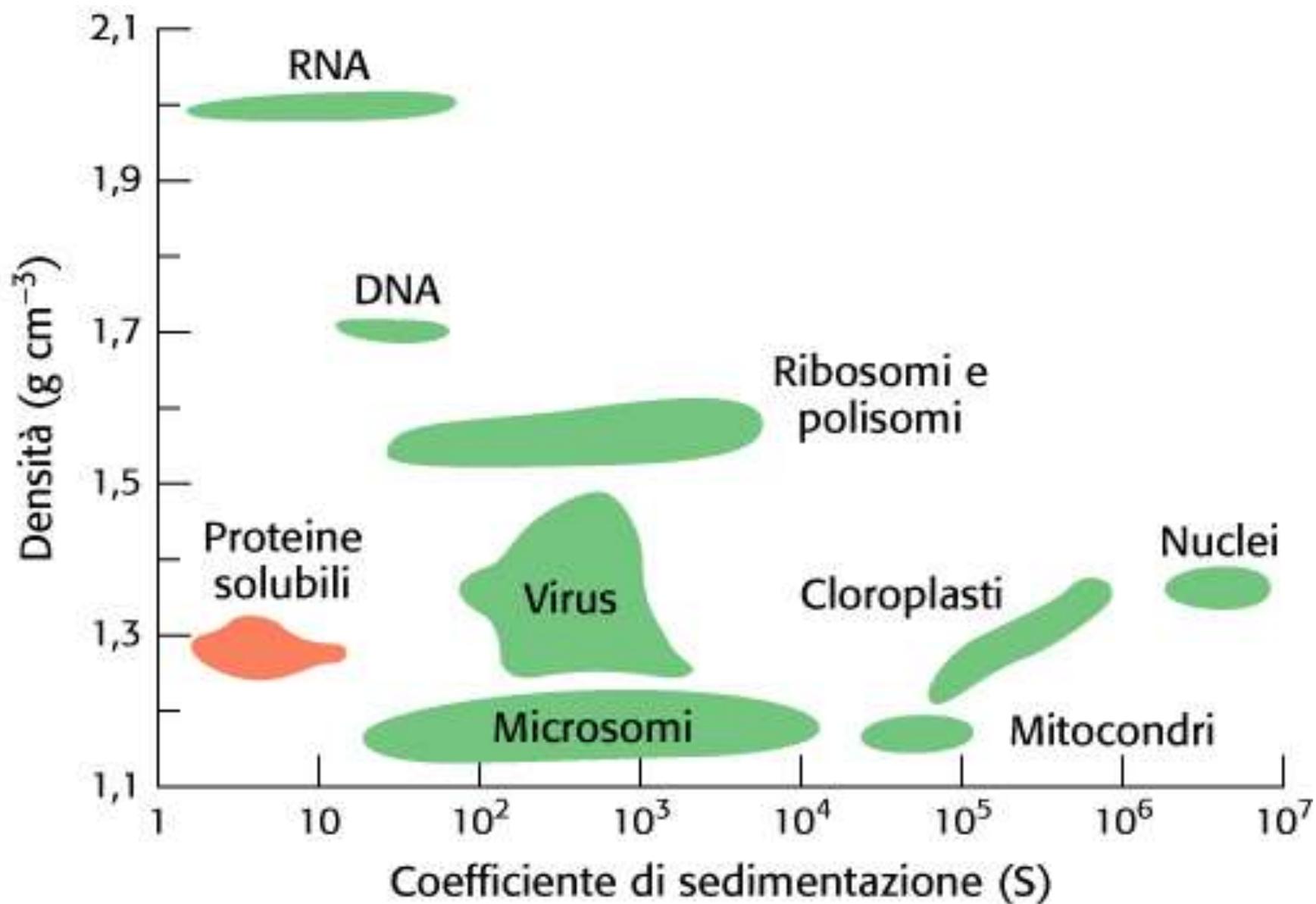
Posso utilizzare il tempo necessario per la loro completa sedimentazione



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)

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



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

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 viscosita' e densita' 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

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)

Può essere separata secondo due criteri:

- Per **VELOCITÀ 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 iso-densità**

Vantaggi:

buona separazione della frazione di interesse

Limitazioni:

alta velocità, necessaria strumentazione specifica e costosa

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

Ottingo 2 frazioni



Sedimento o fondello (o pellet o P)

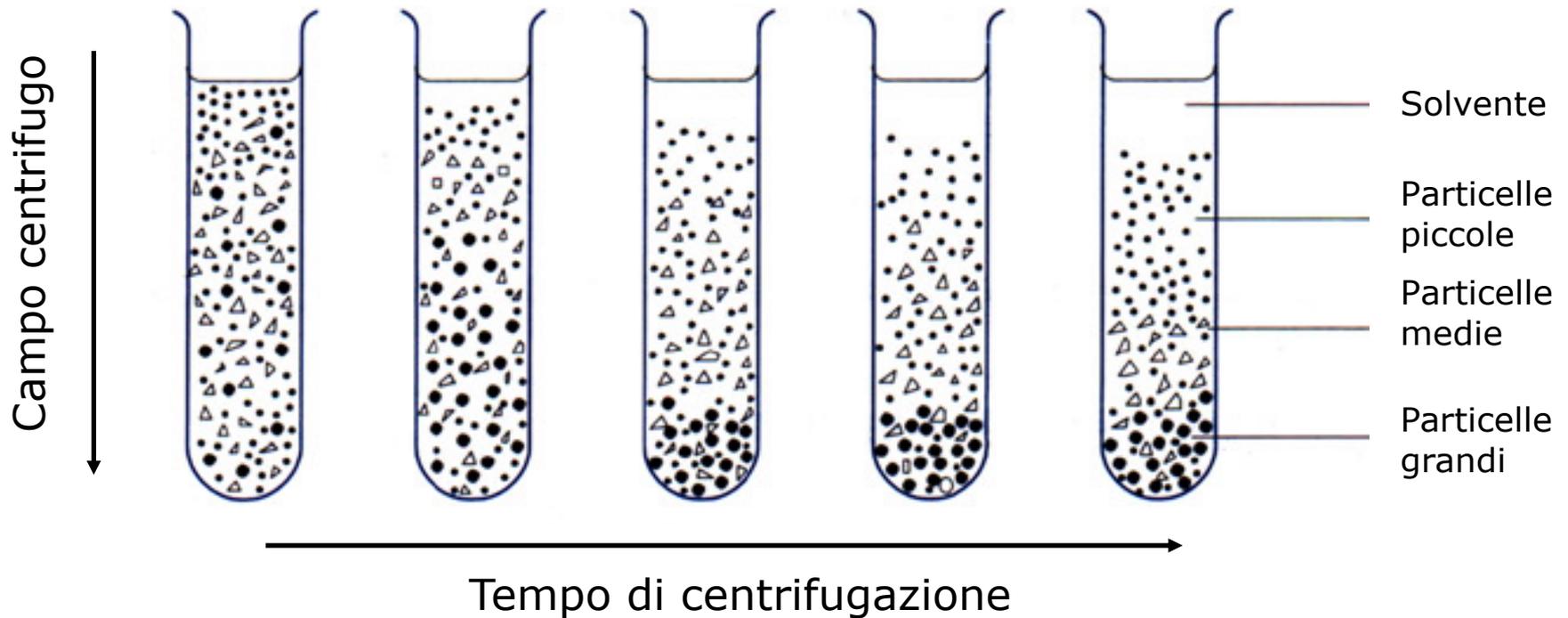
Sovranatante (SN)

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)



Grandezza, forma e densità

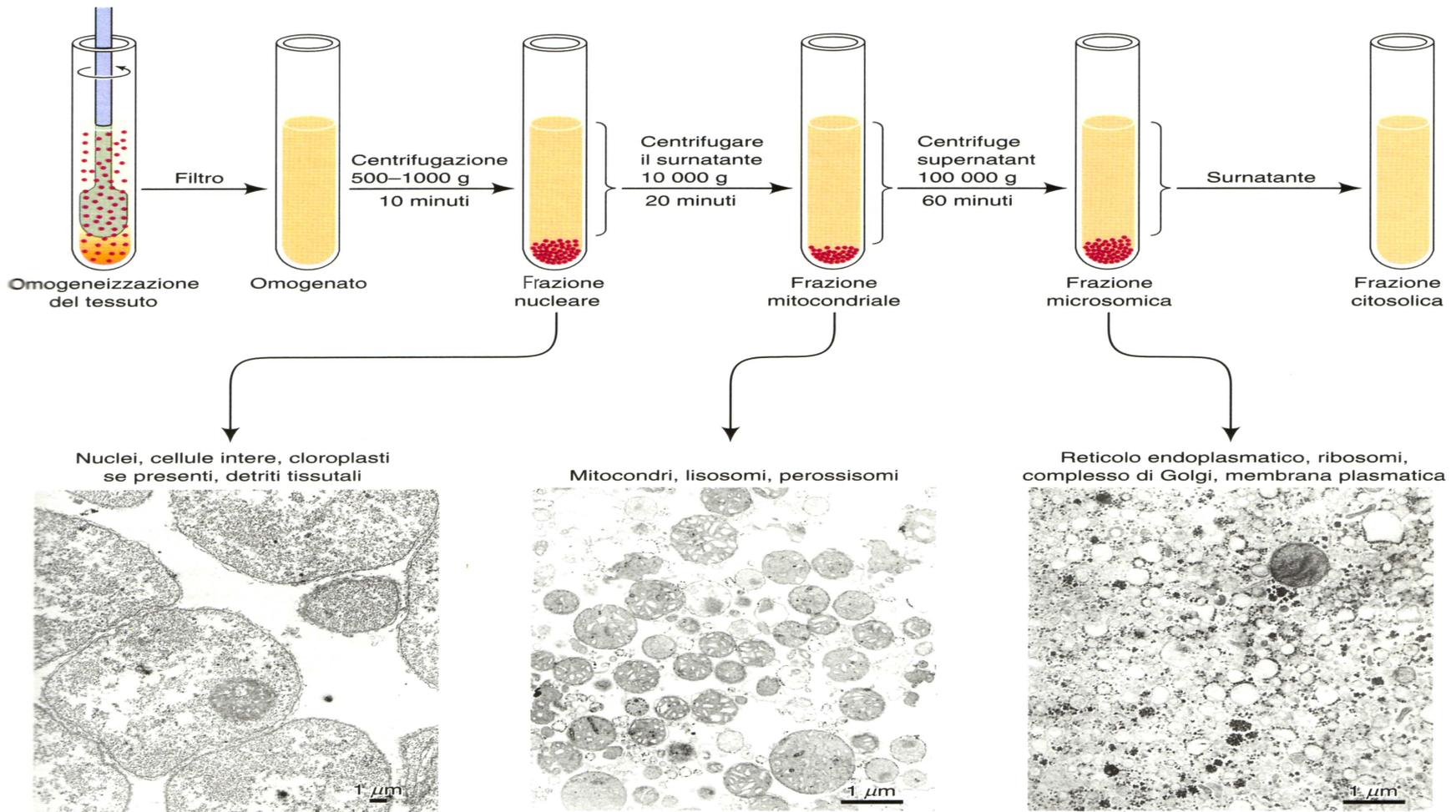


Figura 4-29 Frazionamento subcellulare mediante centrifugazione differenziale Le quattro frazioni che normalmente si ottengono mediante centrifugazione differenziale vengono chiamate frazione nucleare, mitocondriale, microsomica e citosolica. Nonostante queste denominazioni, nessuna delle frazioni che 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

Mezzi di gradiente di densità	Materiale biologico separato
Alcool polivalenti	
<i>Saccarosio</i> <i>Glicerolo</i> <i>Sorbitolo</i>	Organelli, frammenti di membrana, virus, proteine, ribosomi, polisomi Cellule intere (non frequente), proteine e frammenti di membrana Particelle subcellulari
Polisaccaridi	
<i>Ficoll®</i> , <i>Polisaccaridi e destrano</i>	Cellule intere, particelle subcellulari (non frequente)
Sali inorganici	
<i>Cloruro di cesio (CsCl)</i> <i>Solfato di cesio (Cs₂SO₄)</i> <i>Bromuro di potassio (KBr)</i>	DNA, virus e proteine DNA, RNA Lipoproteine plasmatiche
Composti Iodati	
<i>Diatrizoato</i> <i>Nycodenz®</i> , <i>Histodenz®</i> <i>Iodixanol</i>	Componente del mezzo commerciale di isolamento di linfociti Cellule intere, organelli, frammenti di membrana, virus Cellule intere, organelli, frammenti di membrana, virus, lipoproteine plasmatiche, proteine e DNA
Silice colloidale	
<i>Percoll®</i>	Cellule intere, organelli, frammenti di membrana (non frequente)

Centrifugazione ZONALE

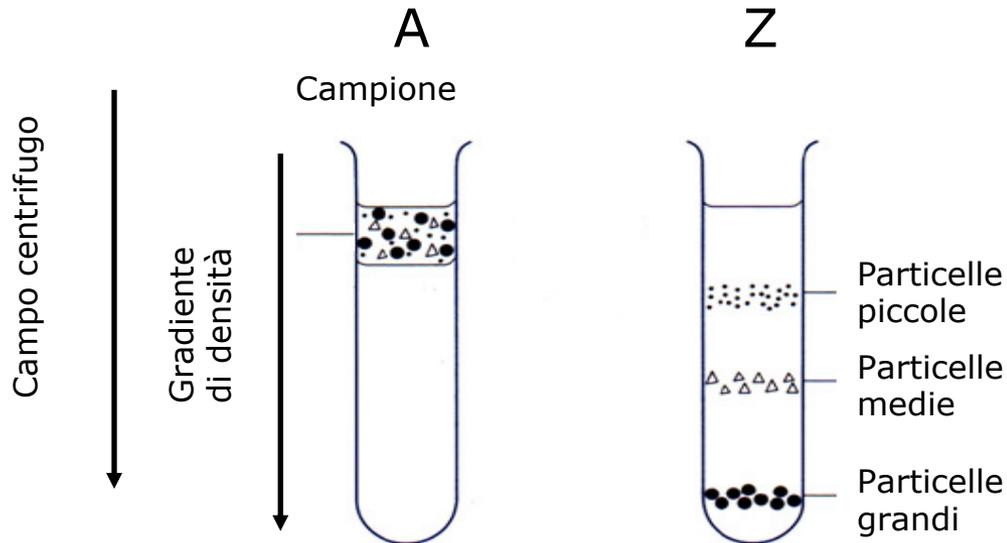
Sfrutta le differenze di dimensione e forma delle particelle

Tecnica di **velocità**

Dipendente dal tempo

Dipendente da **S** (La velocità con cui le particelle si depositeranno dipenderà principalmente dalla loro **dimensione** e dalla **massa** invece che dalla densità)

$$\rho_p > \rho_m$$



Centrifugazione ISOPICNICA

Tecnica di **equilibrio**

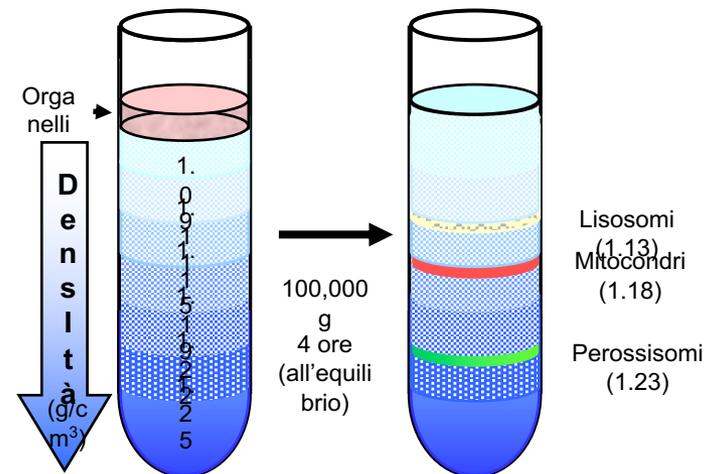
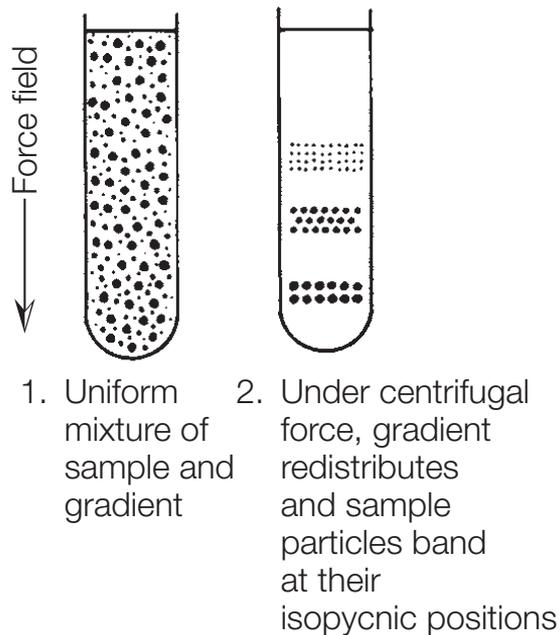
Sfrutta la densità delle particelle

Indipendente dal tempo

Dipendente solo dalla densità

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

$$\rho_p = \rho_m$$



Densità di alcuni materiali biologici

Materiale	Densità (g/cm³)
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

CENTRIFUGHE

Le centrifughe possono essere classificate in quattro categorie principali:

1. Piccole centrifughe da banco: **MICROCENTRIFUGHE**
(V_{\max} 4000/6000 rpm, RCF = 3000-7000 g)
2. **Centrifughe refrigerate a grande capacità**
(V_{\max} 6000 rpm, 6500 g)
3. **Centrifughe refrigerate ad alta velocità**
(V_{\max} 25000 rpm, RCF= 60000 g)
4. **Ultracentrifughe**: ultracentrifughe preparative (in condizioni sottovuoto e refrigerate, V_{\max} 80000 rpm, 600000 g) e ultracentrifughe analitiche.

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

I ROTORI

➤ **Rotori ad angolo fisso:** di uso generale, particolarmente *indicati per la separazione di particelle subcellulari*. I tubi possono essere posizionati direttamente all'interno di una cavità scavata nel corpo del rotore oppure si usano degli adattatori. Le provette sono mantenute ad un angolo fisso tra 14° e 40° rispetto all'asse di rotazione verticale. Sotto l'influenza del campo centrifugo le particelle si muovono radialmente verso l'esterno e sono proiettate contro le pareti, scivolando verso il fondo con la formazione del pellet;

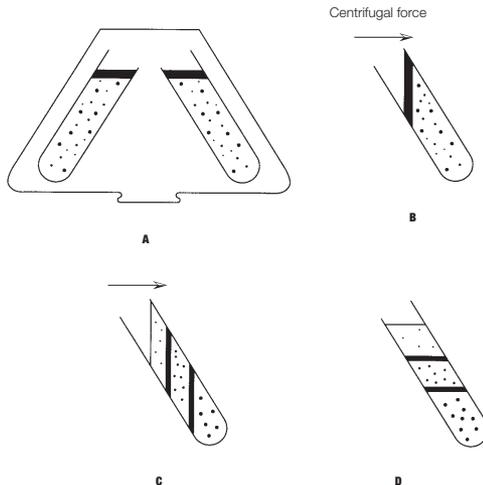


FIGURE 4.6
Operation of a fixed-angle rotor.
A Loading of sample. B Sample at start of centrifugation. C Bands form as molecules sediment. D Rotor at rest showing separation of two components.



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

➤ **Rotori a bracci oscillanti:** ideali per le separazioni zonali e isopicniche consentendo la formazione di bande di sedimento ben differenziate e di pellet più uniformi, però più delicati Sono costituiti da bracci che in condizioni statiche sono in posizione verticale mentre durante l'accelerazione del rotore si portano in posizione orizzontale, in modo tale che la provetta sia perpendicolare all'asse di rotazione e parallela al campo centrifugo applicato;

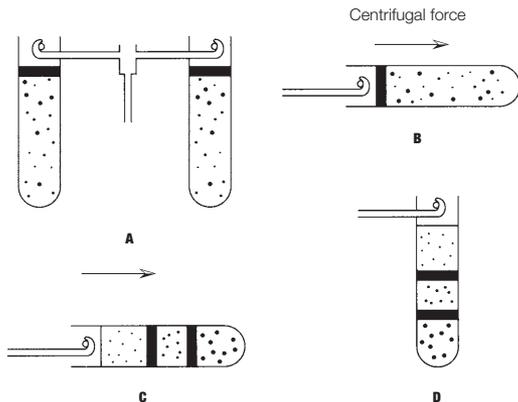


FIGURE 4.7
Operation of a swinging-bucket rotor. **A** Loading of sample. **B** Sample at start of centrifugation. **C** Sample during centrifugation separates into two components. **D** Rotor at rest.



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

➤ **Rotori per tubi ad alloggiamento verticale:** costituiti da un rotore con angolo fisso nullo in cui le provette sono allineate sempre verticalmente rispetto al corpo del rotore (sedimentazioni in tempi più rapidi). Questi rotor sono utilizzati *per centrifugazioni isopicniche*.

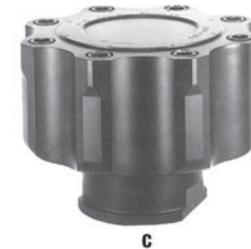
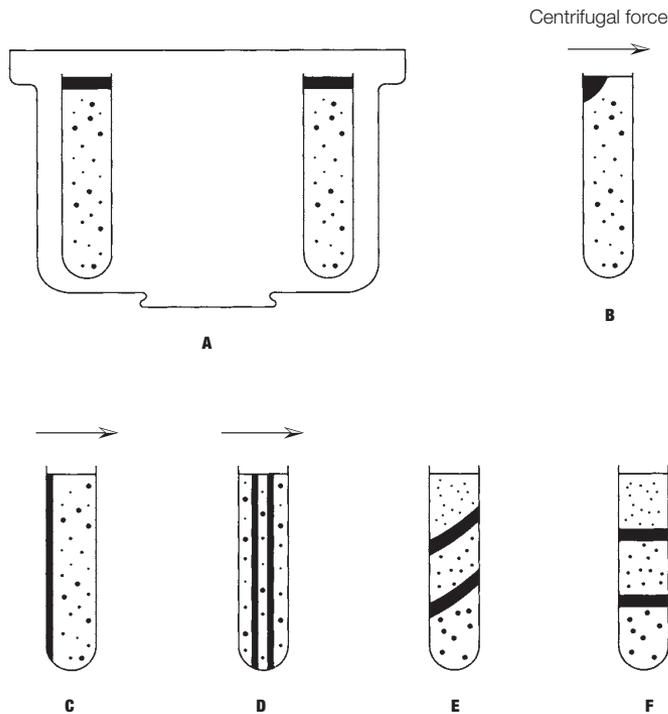


FIGURE 4.8
Operation of a vertical rotor.
A Loading of sample.
B Beginning of centrifugation.
C, D During centrifugation.
E Deceleration of sample. F Rotor at rest.

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..

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

...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

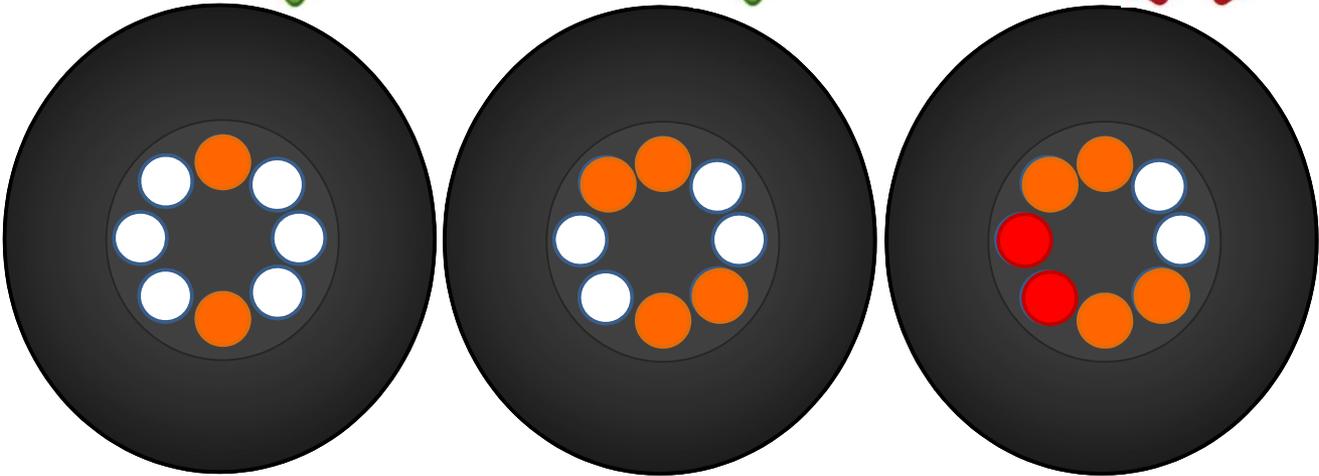
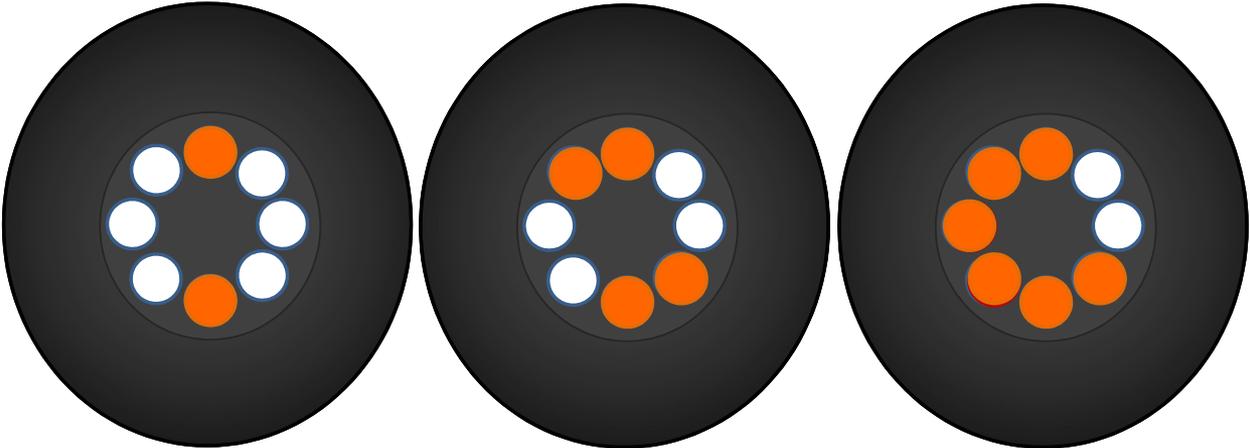
- I rotori ad angolo fisso hanno piccole differenze tra r_{\max} e r_{\min}
- Il tempo richiesto per la sedimentazione è minore per rotori ad angolo fisso
- I rotori ad angolo fisso sono più pesanti e necessitano di una maggiore energia per operare
- I rotori a braccia mobili (Swinging) sono da preferire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

Aspetti pratici

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

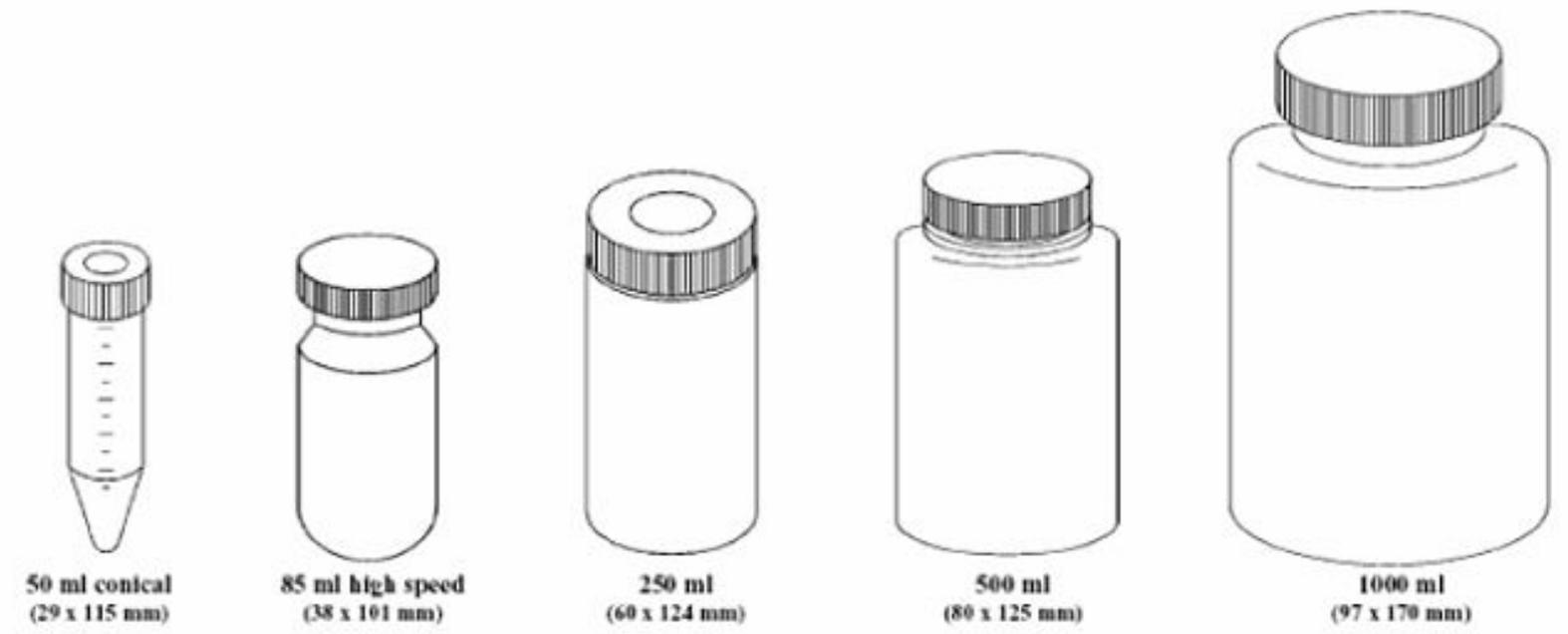
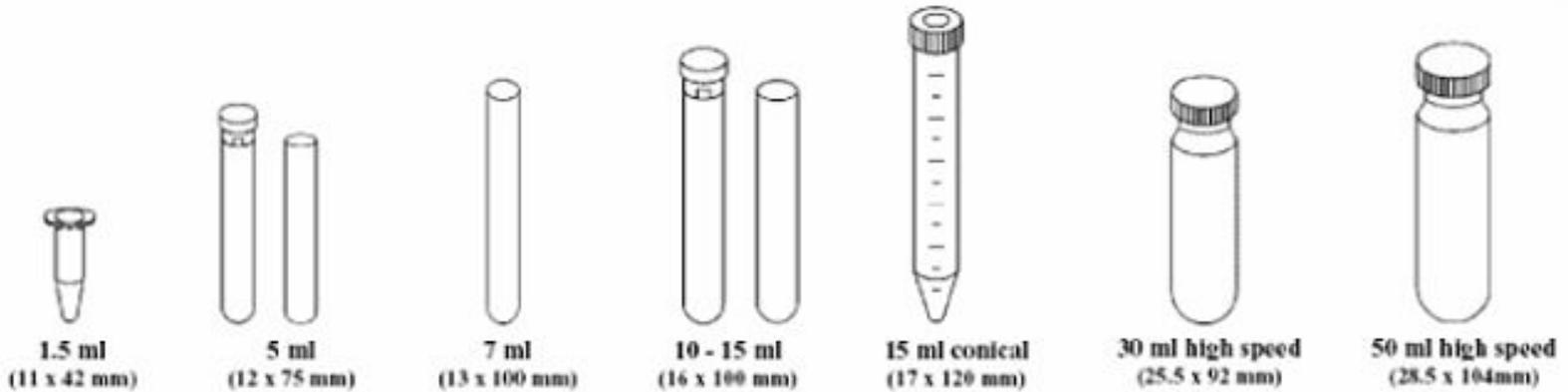


Come devo caricare se ho 2 o più campioni??



Strumentazione: tubi o provette

Centrifuge Tube Guide



Un'ultracentrifuga sta operando ad una velocità di 58000 rev min⁻¹

Calcolate:

1. La velocità angolare ($\omega = \text{rad sec}^{-1}$) e il campo centrifugo ad una distanza di 6,2 cm dall'asse di rotazione
2. A quante volte xg è equivalente (RCF) ?

Risposta:

1. La velocità angolare può essere calcolata dall'eq.

$$\omega = \frac{2\pi}{60} \text{RPM} = \frac{2 \times 3,14 \times 58000}{60} = 6070,7 \text{rad s}^{-1}$$

$$G = \omega^2 r = (6070,7)^2 \times 6,2 = 2,285 \times 10^8 \text{ cm s}^{-2}$$

2. Campo gravitazionale terrestre è 980 cm s⁻²

$$\text{RCF} = G/980 = 2,285 \times 10^8 / 980 = 233,163 \text{ } xg$$

Stai seguendo un protocollo che descrive una metodica per la sedimentazione di particelle utilizzando un rotore ad angolo fisso (rotore A) che ha un fattore k di 225 per 4h alla max velocità. Volete accelerare la preparazione utilizzando un altro rotore (rotore B) con un fattore $k = 63$.

Calcolate per quanto tempo dovete centrifugare il materiale alla max velocità del rotore per sedimentare il medesimo materiale.

Risposta:

$$t_1 = t_2 (k_1/k_2)$$

t_1 = tempo di sedimentaz. con rotore B

t_2 = tempo di sedimentaz. con rotore A

k_1 = fattore k di B

k_2 = fattore k di A

$$t_1 = 4 (63/225) = 1,12h = 1h 7 \text{ min approx}$$