

* Tecniche centrifugative

- Le **tecniche centrifugative** si basano sul comportamento delle particelle in soluzione quando esse vengono sottoposte ad un campo centrifugo;
- La **forza centrifuga** è necessaria per separare la maggior parte delle particelle in un minor tempo;
- Per ogni particella, la **velocità alla quale essa sedimenta** è proporzionale alla forza applicata; per cui le particelle sedimentano più rapidamente quando la forza applicata è maggiore di quella di gravità esercitata dalla terra

LO SCOPO DELLE TECNICHE CENTRIFUGATIVE È QUELLO DI ESERCITARE SULLE PARTICELLE UNA FORZA MAGGIORE RISPETTO A QUELLA ESERCITATA DAL CAMPO GRAVITAZIONALE TERRESTRE, IN MODO TALE DA AUMENTARE LA LORO VELOCITÀ DI SEDIMENTAZIONE.

- Le tecniche centrifugative sono utilizzate per la separazione di tutti i tipi di particelle sulla base delle loro proprietà di sedimentazione (**dimensioni, densità e forma delle particelle**);
- Una centrifuga funziona utilizzando il principio della sedimentazione: sotto l'influenza della **forza gravitazionale (forza g)**, le sostanze si separano in base alla loro dimensione, forma, densità, viscosità del mezzo e velocità del rotore.
- Le tecniche centrifugative possono suddividersi in: **preparative e analitiche**:
 1. **La centrifugazione preparativa** permette di separare e purificare cellule intere, organuli subcellulari e macromolecole biologiche, come acidi nucleici o proteine;
 2. **La centrifugazione analitica** permette invece di studiare le caratteristiche di sedimentazione del campione e di determinarne il grado di purezza o la massa molecolare.

PRINCIPI DELLA SEDIMENTAZIONE

La velocità di sedimentazione dipende dal **campo centrifugo** (G) applicato, che è diretto radialmente verso l'esterno; esso è funzione della **velocità angolare del rotore** (ω , in radianti/sec) e della distanza della particella dall'asse di rotazione (r, in cm), in base all'equazione:

$$G = \omega^2 r$$

essendo una rivoluzione del rotore pari a 2π radianti, la velocità angolare del rotore, in radianti al secondo viene espressa in termini di rivoluzioni al minuto (rpm):

$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

quindi

$$G = 4\pi^2 (\text{rpm})^2 r/3600$$

il campo centrifugo viene espresso come multiplo del campo gravitazionale terrestre (981 cm/s^2) cioè come il rapporto tra il peso della particella sottoposta al campo centrifugo ed il peso della stessa in presenza della sola forza di gravita:

Campo Centrifugo Relativo (RCF) (o numero di g):

$$RCF = 4\pi^2 (\text{rpm})^2 \cdot r/3600 \cdot 981$$

$$RCF = (1.118 \cdot 10^{-5}) (\text{rpm})^2 \cdot r$$

Raggio
(cm)

RCF

rpm

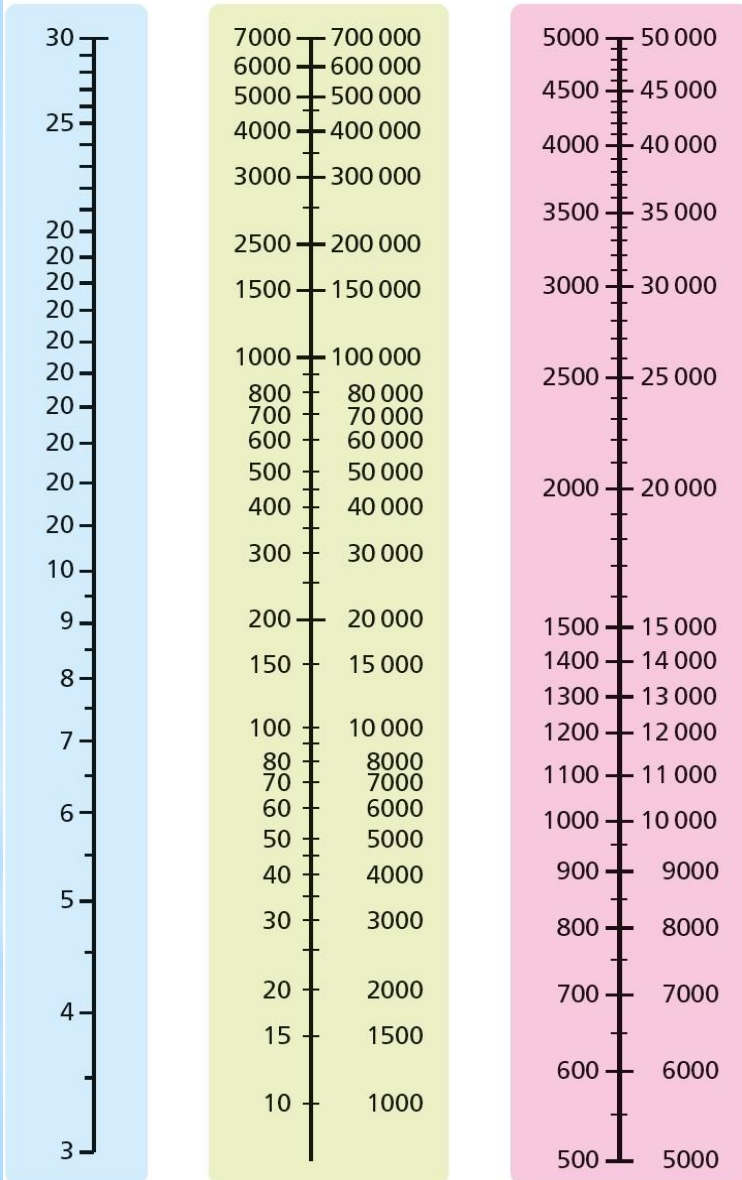


Figura 5.1

Nomogramma. Si noti che unendo con una retta un valore del raggio del rotore con uno degli *rpm*, viene individuato un solo valore di *RCF*.

- ❖ Il campo centrifugo relativo è una misura di quante volte il campo centrifugo è superiore al campo gravitazionale.
- ❖ Maggiore è la forza centrifuga, minore è il tempo di separazione.

Qual è il comportamento delle particelle sotto l'azione del campo centrifugo?

Nel corso della sedimentazione la particella è sottoposta ad una forza netta verso l'esterno, la FORZA CENTRIFUGA (**F**), che è data dall'espressione:

$$F = \frac{4}{3}\pi r_p^3 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 r$$

$\frac{4}{3}\pi r_p^3$ = volume della particella di raggio r_p (supposta sferica)

ρ_p = densità della particella

ρ_m = densità del mezzo

r = distanza della particella dal centro di rotazione

- ❖ le particelle, in base a tale forza, all'interno della soluzione si muovono di moto uniformemente accelerato, tuttavia esse generano **attrito** quando migrano attraverso la soluzione per effetto della **viscosità** del mezzo e della velocità.

- ❖ la sedimentazione delle particelle, con l'assunzione che siano sferiche, può essere spiegata **dall'equazione di Stokes**, che descrive il movimento di una sfera in un campo gravitazionale:

Forza d'attrito

$$F_0 = v f_0$$

v = velocità di sedimentazione;
 f_0 = *coefficiente d'attrito*.

$$f_0 = 6\pi\eta r_p$$

η = coefficiente di viscosità del mezzo
 r_p = raggio della particella sferica

- ❖ La particella sferica accelera fino a quando la forza di sedimentazione diventa uguale alla forza d'attrito che oppone resistenza al movimento del mezzo ($F = F_0$) e, a questo punto, la particella non accelera più, avendo raggiunto la velocità massima che la porta a sedimentare con una velocità costante, e si ha:

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

integrando l'equazione si ottiene il **tempo di sedimentazione** in funzione delle variabili implicate e della lunghezza del percorso compiuto dalla particella nella provetta da centrifuga:

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

r_t = distanza radiale dall'asse di rotazione al menisco del liquido

r_b = distanza radiale dall'asse di rotazione al fondo della provetta

NB: *nel caso in cui la particella non sia sferica occorre considerare il rapporto di attrito (f/f_0), cioè il rapporto tra il coefficiente di attrito f della particella 'reale' ed il coefficiente di attrito per una particella perfettamente sferica e non idratata, f_0*

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

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

$$s = 2r_p^2 (\rho_p - \rho_m) / 9\eta$$

*il valore ottenuto sperimentalmente viene corretto nel valore che si otterrebbe in un mezzo la cui viscosità e densità fossero pari a quelle dell'acqua a 20°C, espresso come “**coefficiente di sedimentazione standard**” ($S_{20, w}$)*

*i coefficienti di sedimentazione della maggior parte delle strutture biologiche assumono valori molto piccoli, per convenzione viene adottata un'unità di misura specifica per le particelle biologiche, lo **Svedberg (S)** che equivale a 10^{-13} secondi.*

- In generale una particella più grande ha una unità Svedberg maggiore e quindi una maggiore velocità di sedimentazione.
- La centrifugazione può essere adoperata per separare molecole con diversi coefficienti di sedimentazione come riportati nella *tabella*

COEFFICIENTI DI SEDIMENTAZIONE DI SVEDBERG (S)

Strutture Biologiche	Svedberg (S)
Enzimi-Ormoni- Proteine solubili	2-25
Acidi nucleici	3-100
Polisomi	20-220
Virus	40-1.000
Lisosomi	4.000
Membrane	100-100.000
Mitocondri	20.000-70.000
Nuclei	4×10^5 - 4×10^7

Le tecniche centrifugative per la separazione di particelle si dividono in:

1. Centrifugazione differenziale

2. Centrifugazione in gradiente di densità

suddivisa in:

Centrifugazione zonale

Centrifugazione isopicnica.

CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE

- Forma più semplice di separazione per centrifugazione, anche denominata ***pellet differenziale***;
- Particelle di diversa densità e/o dimensione in una sospensione sedimentano a velocità diverse: le particelle più grandi e più dense sedimentano più velocemente rispetto alle particelle meno dense e più piccole. La velocità di sedimentazione può essere aumentata applicando una maggiore accelerazione centrifuga;
- Una sospensione di cellule sottoposte a una serie di cicli di forza centrifuga crescenti (centrifugazioni successive) per un tempo determinato produrrà una serie di frazioni cellulari (sedimento o *pellet*) con velocità di sedimentazione decrescente;
- La centrifugazione differenziale viene comunemente utilizzata per la raccolta di cellule o la produzione di frazioni subcellulari grezzi a partire da un omogenato di tessuto.

CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE

SVANTAGGIO: A causa dell'eterogeneità delle particelle biologiche, la centrifugazione differenziale può creare fenomeni di contaminazione e di scarsi recuperi.

La contaminazione da parte di diversi tipi di particelle può essere risolta mediante risospensione del *pellet* e successiva ripetizione delle fasi di centrifugazione (lavaggio del *pellet*).

1. la centrifugazione differenziale produce frazioni arricchite anziché frazioni purificate;
2. la centrifugazione differenziale viene solitamente effettuata in una fase iniziale della purificazione dei componenti subcellulari, spesso prima di un'ulteriore purificazione che prevede l'uso di una centrifugazione a gradiente zonale o, più frequentemente, isopicnica.

CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE

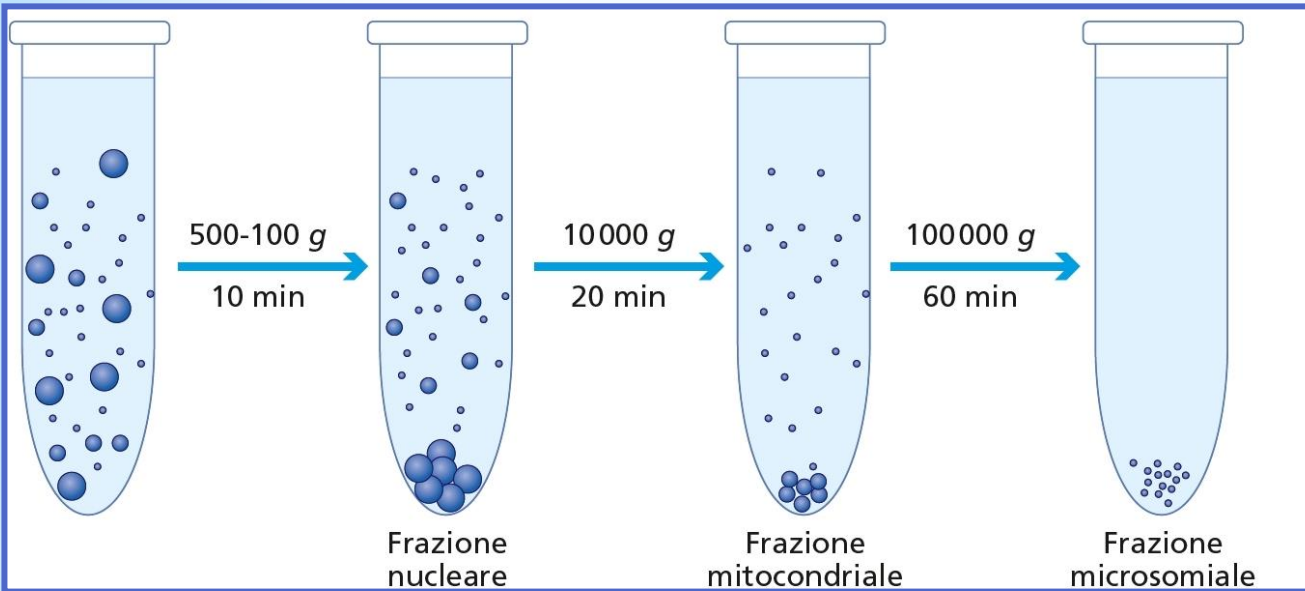
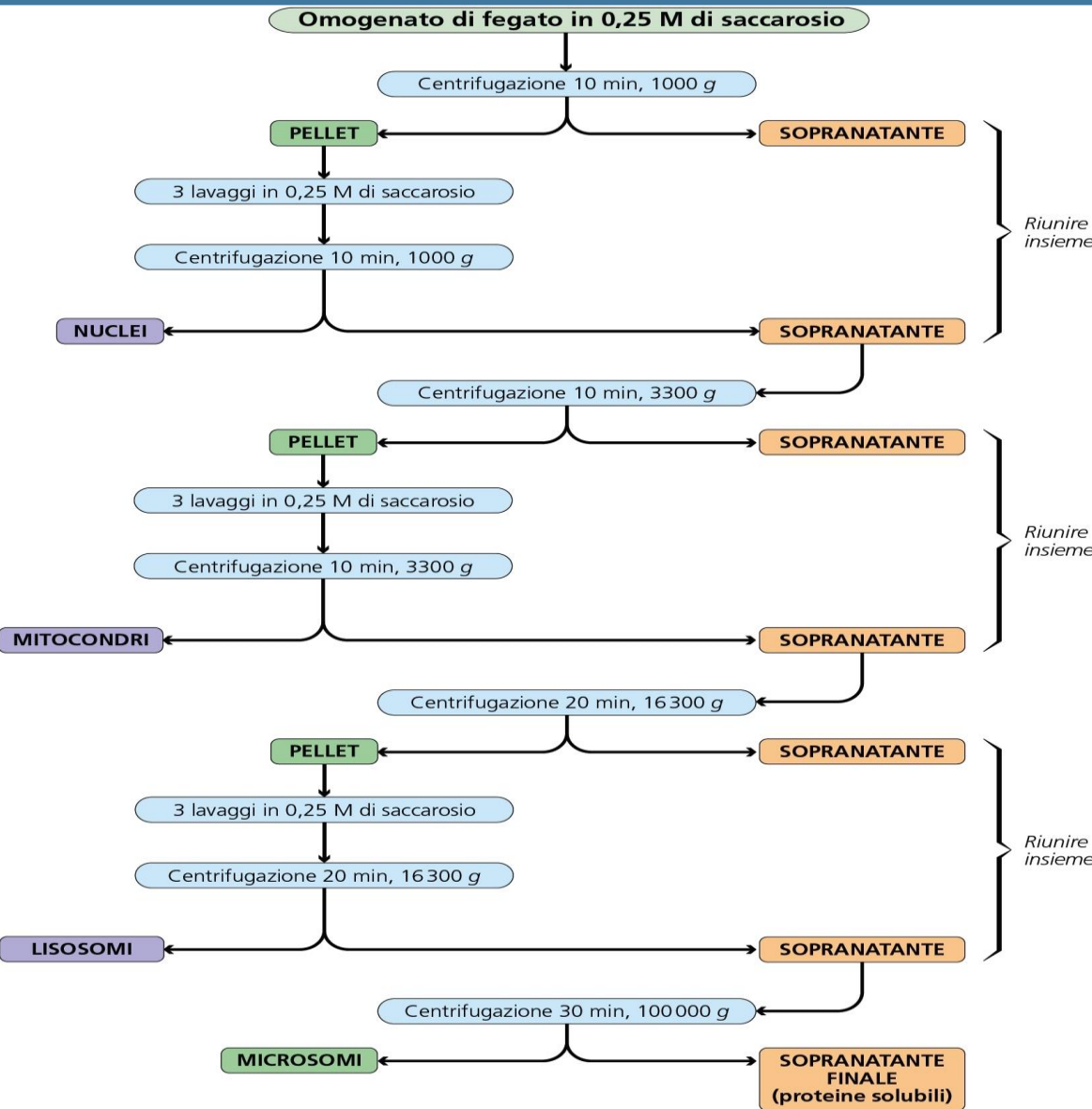


Figura 5.2
Frazionamento subcellulare mediante centrifugazione differenziale.



da MC Bonnaccorsi di Patti, R Contestabile, ML Di Salvo, *Metodologie Biochimiche*, seconda ed.

Figura 5.3
 Frazionamento di un omogenato di fegato nelle diverse frazioni subcellulari mediante centrifugazione differenziale.

CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

- metodo ideale per purificare gli organelli subcellulari e le macromolecole;
- I gradienti di densità possono essere generati posizionando uno strato dopo l'altro di un materiale, come il saccarosio, in un tubo con lo strato più pesante nella parte inferiore e il più leggero nella parte superiore in una modalità discontinua (per esempio dal 20% al 70%);
- La frazione cellulare da separare viene posta sopra lo strato superiore e quindi sottoposta a centrifugazione;
- La separazione in gradiente di densità viene classificata in due categorie: **separazione zonale** (per dimensione) e **separazione isopicnica** (per densità).

CENTRIFUGAZIONE ZONALE

il campione viene stratificato sotto forma di una **banda stretta** sopra un gradiente di densità per evitare il problema della contaminazione di particelle, aventi velocità di sedimentazione diverse.

LIMITE: la zona di carico, normalmente ristretta, limita il volume del campione (tipicamente al 10% del totale) che può essere adattato al gradiente di densità.

MECCANISMO:

1. Sotto l'azione della forza centrifuga, le particelle si muoveranno a velocità diverse a seconda della loro massa;
2. La velocità con cui le particelle si depositeranno dipenderà principalmente dalla loro dimensione e dalla massa invece che dalla densità.

SEPARAZIONE ISOPICNICA

- Denominata anche galleggiamento o separazione all'equilibrio, le particelle sono separate unicamente in base alla loro densità;
- La dimensione delle particelle influisce solo sulla velocità con cui le particelle si muovono fino a quando la loro densità non è uguale a quella del terreno del gradiente circostante;
- La densità del mezzo deve essere maggiore della densità delle particelle da separare. Con questo metodo, le particelle non si depositano mai sul fondo del tubo, indipendentemente dalla durata del tempo di centrifugazione, ma si fermano ne loro **punto isopicnico**.

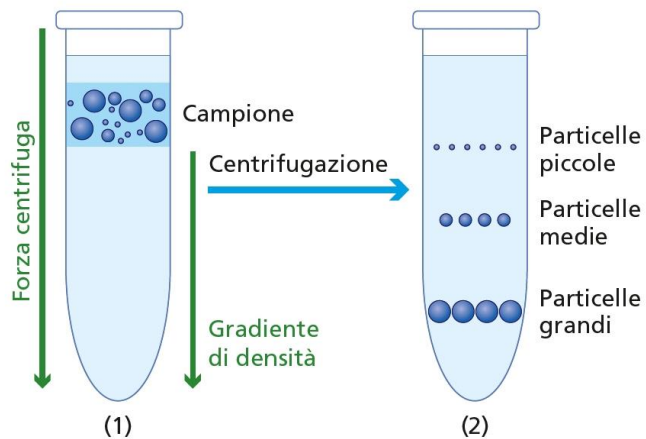
SEPARAZIONE ISOPICNICA

MECCANISMO:

1. Partendo da una miscela uniforme di campione e di gradiente di densità sotto la forza centrifuga, le particelle si muoveranno fino a quando la loro densità sarà uguale a quella del mezzo circostante;
2. Dopo la centrifugazione, le particelle con una densità specifica si depositeranno fino a raggiungere il punto in cui la loro densità è la stessa del mezzo (posizione di equilibrio), il gradiente è cosiddetto **isopicnico** e le particelle sono separate in base alla loro galleggiabilità.

SEPARAZIONE ISOPICNICA

(a) Separazione zonale



(b) Separazione isopicnica

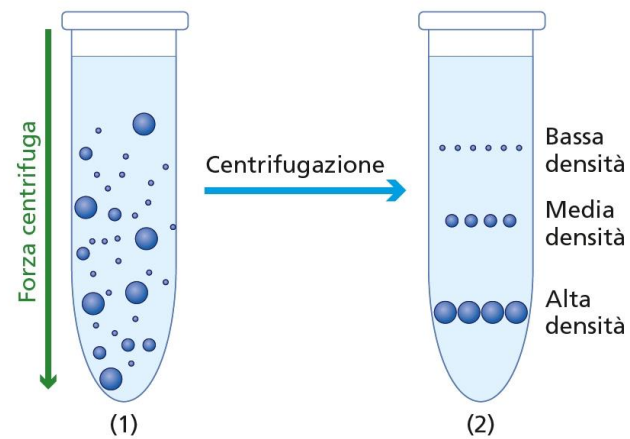


Figura 5.3
Centrifugazione in gradiente di densità con (a) separazione zonale e (b) isopicnica.

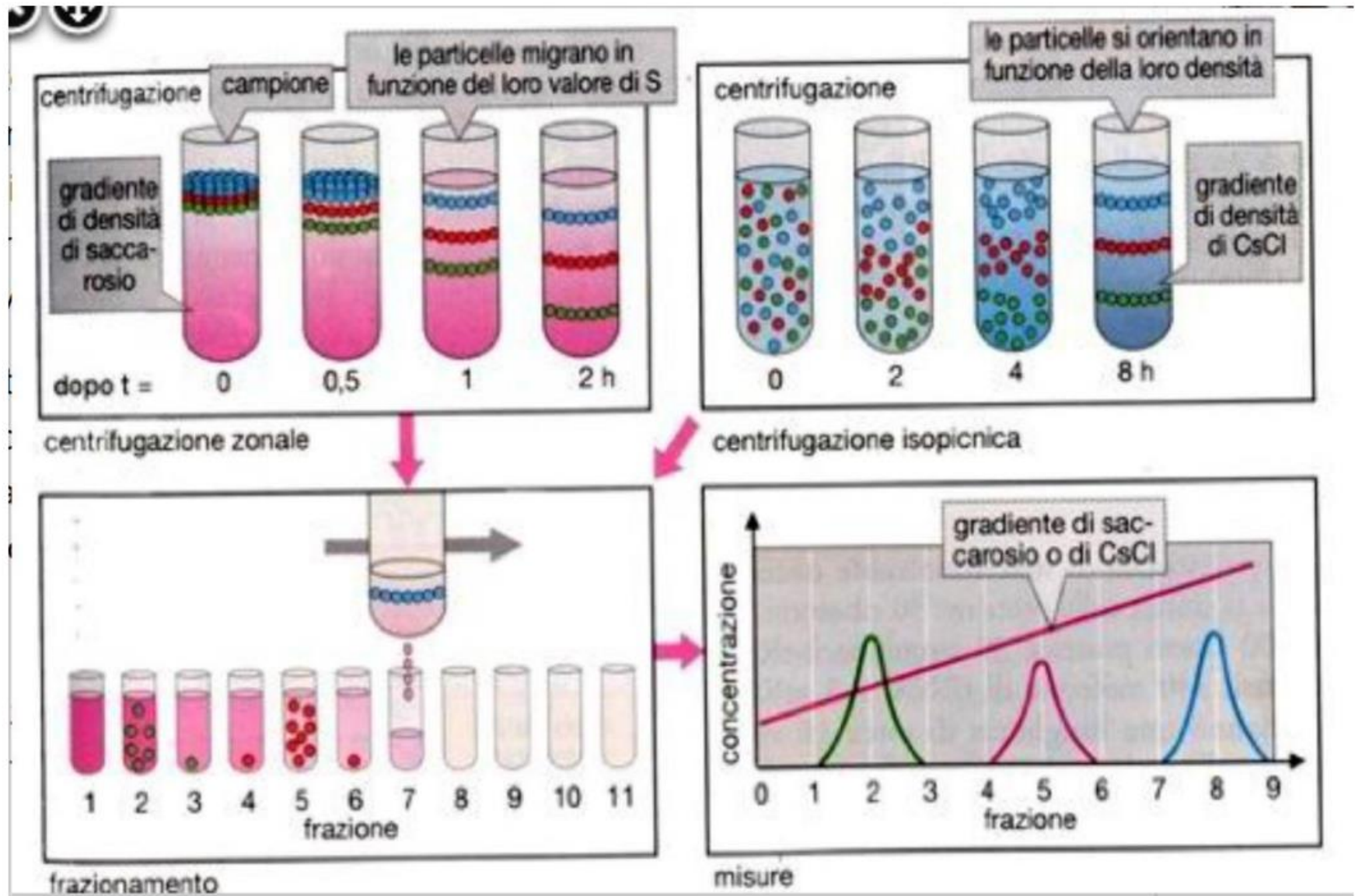
la separazione isopicnica può variare significativamente a seconda del mezzo di gradiente utilizzato

Un **mezzo di gradiente di densità ideale** dovrebbe avere una solubilità sufficiente a produrre l'intervallo di densità richiesto ma non dovrebbe:

- formare una soluzione ad alta viscosità nell'intervallo di densità desiderato;
- essere iperosmotico o ipoosmotico quando le particelle da separare sono osmoticamente sensibili;
- influenzare l'attività biologica del campione;
- essere tossico e metabolizzabile dalle cellule;
- interferire con le procedure di dosaggio o reagire con le provette da centrifuga.

Mezzi di gradiente di densità	Materiale biologico separato
Alcool polivalenti	
<i>Saccarosio</i>	Organelli, frammenti di membrana, virus, proteine, ribosomi, polisomi
<i>Glicerolo</i>	Cellule intere (non frequente), proteine e frammenti di membrana
<i>Sorbitolo</i>	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>	DNA, virus e proteine
<i>Solfato di cesio (Cs₂SO₄)</i>	DNA, RNA
<i>Bromuro di potassio (KBr)</i>	Lipoproteine plasmatiche
Composti Iodati	
<i>Diatrizoato</i>	Componente del mezzo commerciale di isolamento di linfociti
<i>Nycodenz®</i> , <i>Histodenz®</i>	Cellule intere, organelli, frammenti di membrana, virus
<i>Iodixanol</i>	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)

Comparazione tra centrifugazione zonale ed isopicnica



Schematic figure of a density gradient centrifugation

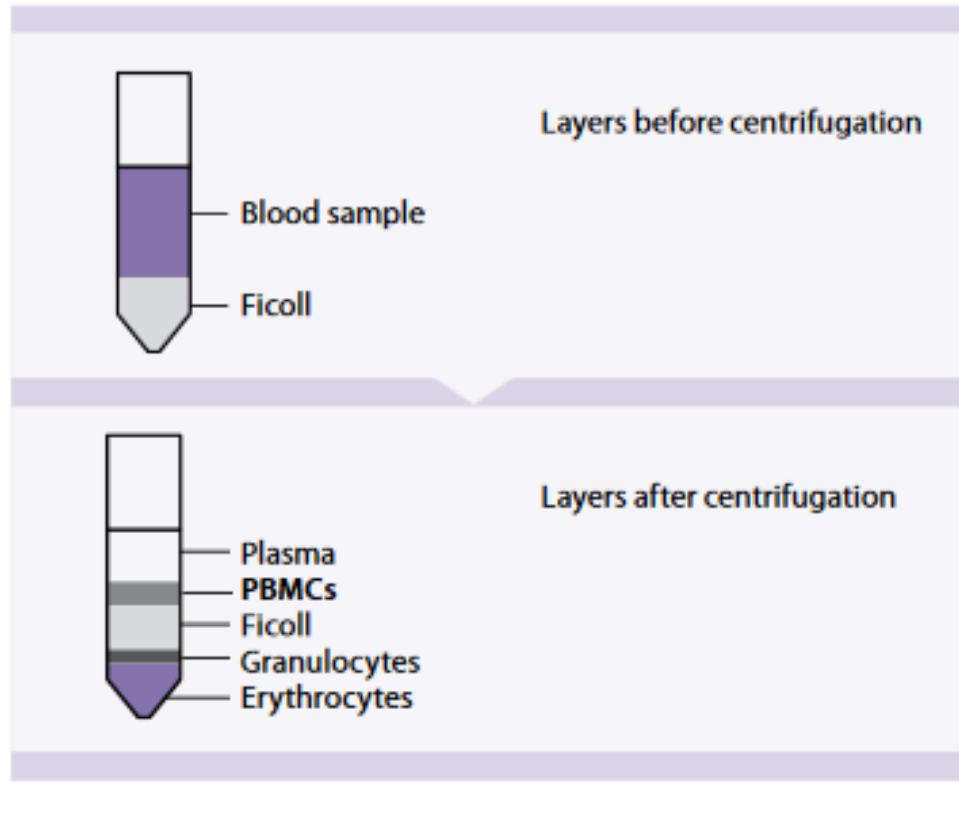


Figure 1 presents the result of separation using the step density Percoll gradient. A step gradient often gives a good separation of the cells: the cells are concentrated at different interfaces as visible bands. One drawback with this variant is that contaminating cells often are trapped at the wrong interfaces and the purity of the desired cell-population (granulocytes in our case) is low. It happens that even if the intention was to use discontinuous gradient, this turns into a continuous one. The reason is: if a large volume of whole blood is layered on top of Percoll and centrifuged, the cells pull serum through the Percoll layers and form a continuous gradient [8].

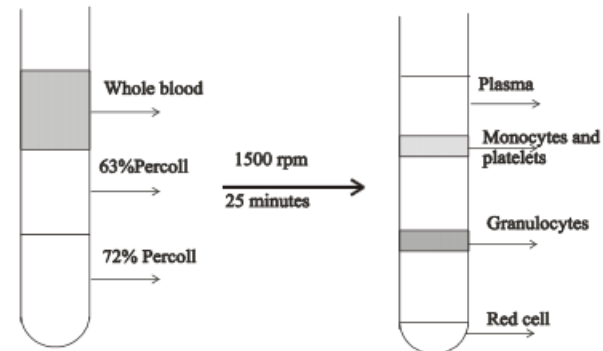


Fig. 1. Step Percoll gradient centrifugation (zonal centrifugation). The granulocytes are separated in a distinct band after centrifugation in a swing-out rotor.

Figure 2 presents the result of separation using pre-formed continuous Percoll gradient. We appreciate this method as being more convenient than the first one (step Percoll gradient centrifugation) because it is much faster and easier. Unfortunately, the method is extremely sensitive. The time and speed to be used to forming the density gradient are determined by the length and volume of the tube, the type of rotor, and the density of the initial Percoll solution [6]. One problem with this method may be a bad separation of the lymphocytes band and granulocytes band. In such case, we have to check the properties of the density gradient, especially osmolality and resolution.

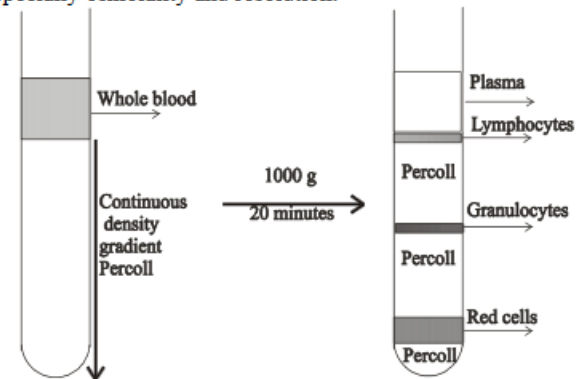


Fig. 2. Continuous Percoll gradient centrifugation (isopycnic centrifugation). The granulocytes are separated in a distinct band after centrifugation in a swing-out rotor.

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	Ribuloso 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)

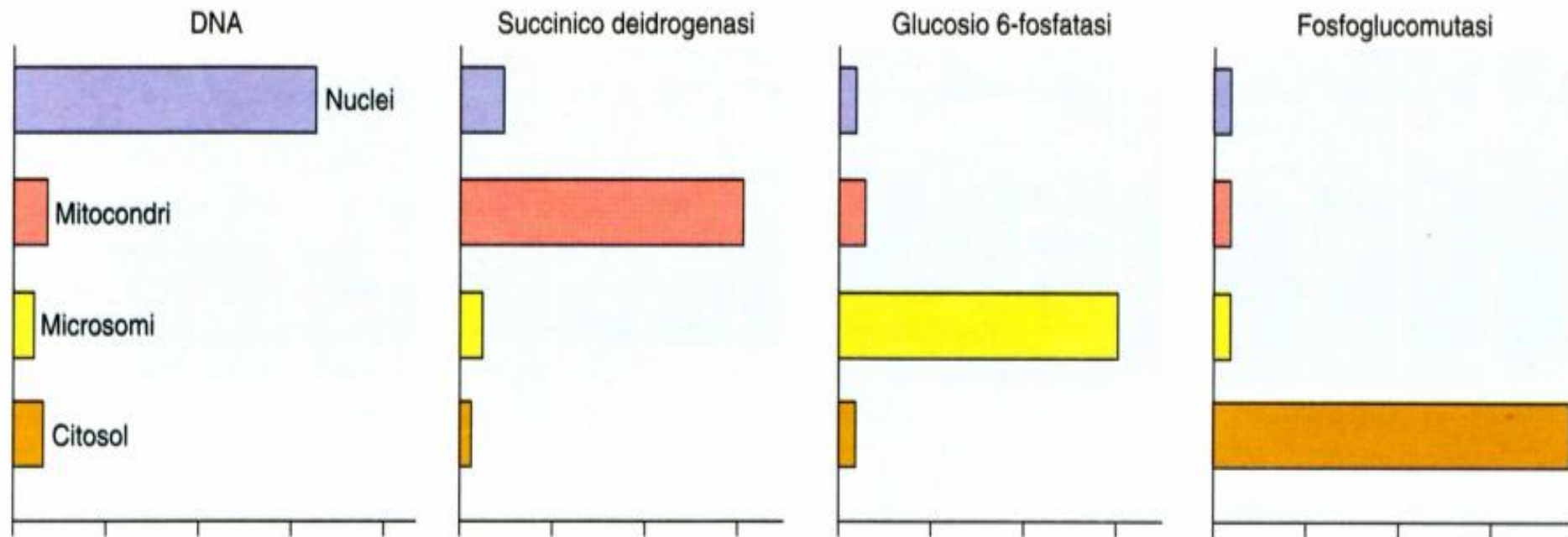


Figura 4-30 Uso di marcatori chimici per l'identificazione delle frazioni subcellulari In questo gruppo di esperimenti, un omogenato di fegato di ratto è stato frazionato mediante centrifugazione differenziale, secondo lo schema riportato nella figura precedente. Le singole frazioni sono quindi state 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).

STRUMENTAZIONE UTILIZZATA NELLE TECNICHE CENTRIFUGATIVE

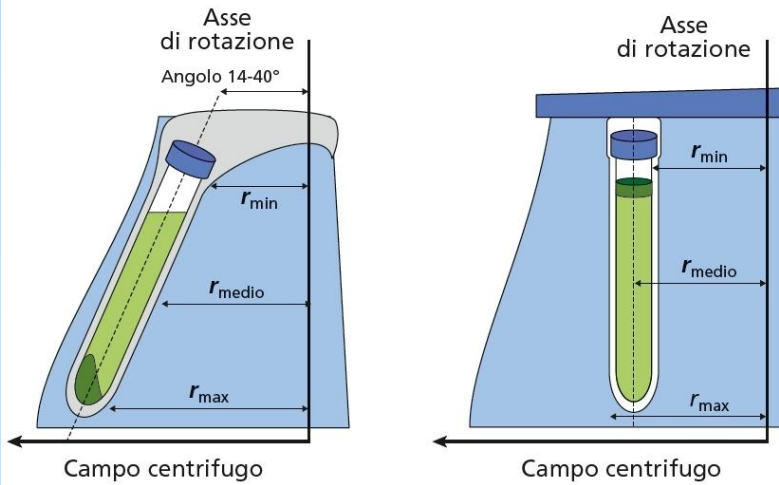
Le centrifughe possono essere classificate in quattro categorie principali:

1. **Piccole centrifughe da banco: MICROCENTRIFUGHE**
(V_{max} 4000/6000 rpm, RCF = 3000-7000 g)
2. **Centrifughe refrigerate a grande capacità**
(100 mL; 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.**

TIPI DI ROTORI

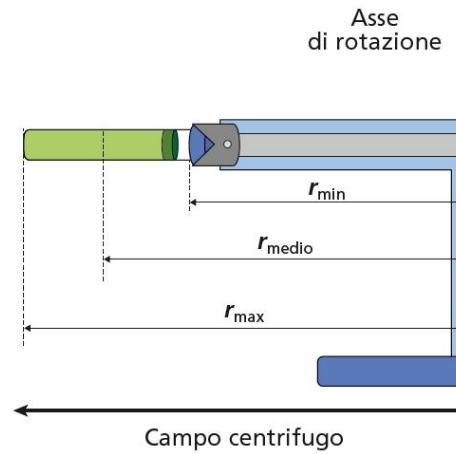
- **Rotori ad angolo fisso:** di uso generale, particolarmente indicati per la separazione di particelle subcellulari. I tubi possono essere posizionati direttamente all'interno di una cavità scavata nel corpo del rotore oppure si usano degli adattatori. Le provette sono mantenute ad un angolo fisso 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;
- **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;
- **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 rotori sono utilizzati per centrifugazioni isopicniche.

ROTORI AD ANGOLO FISSO



Centrifughe da banco con rotore ad angolo fisso

ROTORE A BRACCI OSCILLANTI



Centrifuga refrigerata con rotore a bracci oscillanti

Figura 5.4

Esempi di centrifughe e rotori.
(Disegni: Dott. Daniel Tortolani;
fotografie: Laboratori di Biochimica
e Biologia Molecolare dell'Università
degli Studi di Teramo.)

ULTRACENTRIFUGA ANALITICA

CARATTERISTICHE:

- Per studi di macromolecole purificate o di complessi sovramolecolari isolati;
- Funziona ad una velocità di circa 70-80.000 rpm (500.000 g) ed è costituito da un rotore appositamente progettato in una camera speciale che rimane sotto vuoto, a bassa temperatura e blindata;
- Presenta un dispositivo ottico sofisticato che permette di osservare la variazione della concentrazione del materiale biologico mentre sedimenta;
- Nel rotore sono presenti due speciali celle ottiche: cella analitica (campione da esaminare) e cella di bilanciamento.

ULTRACENTRIFUGA ANALITICA

FUNZIONAMENTO:

- La camera del rotore ha una lente inferiore e una superiore, che è collegata a sua volta a una lente di una fotocamera che emette la luce su una lastra fotografica. La luce proveniente da una determinata fonte di luce passa attraverso il fondo del rotore;
- Il meccanismo di monitoraggio è basato sul principio di assorbimento dell'ultravioletto: se la concentrazione del soluto è uniforme, la luce passa attraverso la soluzione senza alcuna deviazione, se invece la soluzione in esame presenta zone a diversa densità, la luce viene rifratta al confine tra queste zone.
- Misurando l'indice di rifrazione tra il solvente di riferimento e la soluzione in esame, è possibile determinare la concentrazione di soluto in qualsiasi punto.
- In modelli più recenti, il sistema di lastre fotografiche è stato sostituito da un sistema di scansione elettronica che può misurare e tracciare direttamente la concentrazione del campione in tutti i punti della cella analitica.

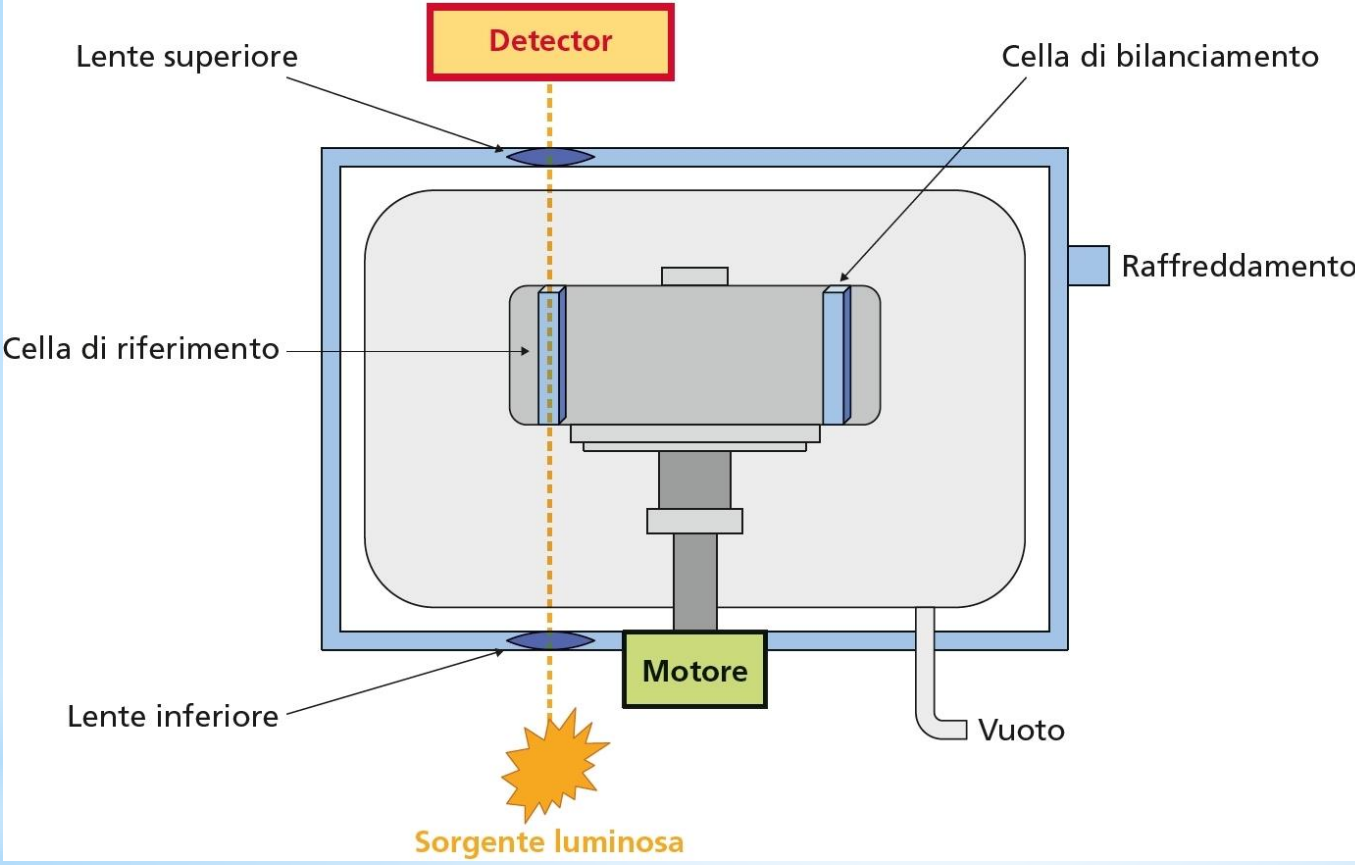


Figura 5.5
 Schema di un sistema di ultracentrifuga analitica.
 (Disegno: Dott. Daniel Tortolani.)

APPLICAZIONI DELLA CENTRIFUGAZIONE NELLE INDUSTRIE FARMACEUTICHE

✓ **Produzione di farmaci sfusi (*bulk drugs*)**

Dopo la cristallizzazione, i farmaci vengono separati dal liquido madre mediante centrifugazione (es. cristalli di aspirina);

✓ **Produzione di materiale biologico**

La maggior parte dei prodotti biologici sono di natura proteica oltre che da altre macromolecole. Durante la produzione rimangono sotto forma di dispersione colloidale in soluzione acquosa (es. le cellule del sangue vengono separate dal plasma mediante un metodo centrifugativo);

✓ **Valutazione di sospensioni ed emulsioni**

Uno dei problemi delle sospensioni è la sedimentazione, così come uno dei problemi delle emulsioni è la scrematura. Per aumentare la velocità di sedimentazione e, quindi, la scrematura, la sospensione o l'emulsione viene sottoposta a centrifugazione a un numero di giri compresi tra 200 e 3000 g;

✓ **Determinazione del peso molecolare dei polimeri**

I pesi molecolari dei polimeri possono essere determinati mediante l'ultracentrifugazione. La misura della velocità di sedimentazione permette di determinare le dimensioni delle molecole di soluto e la loro massa molecolare.