

Tema 2: Centrifugación

Hay **material adicional** en la página web de la asignatura (se accede desde la página del Departamento: <http://www.uah.es/otrosweb/bioquimica>)

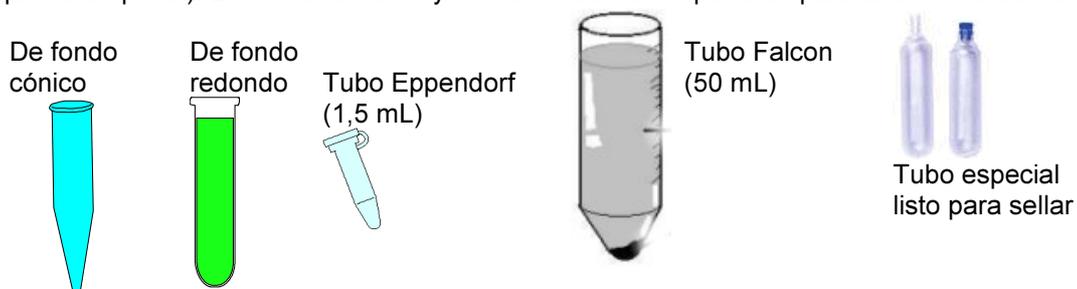
La centrifugación es una técnica de sedimentación, acelerada gracias al uso de fuerza centrífuga. Se aplica al análisis o a la separación de mezclas de **partículas, células, orgánulos o moléculas**.

Teoría de la centrifugación y aspectos cuantitativos: véase Luque, p.123 o Freifelder, p.298.

Instrumental

1. Tubos

De vidrio o plástico. Resistentes químicamente (disolventes, reactivos) y físicamente (tensión a las velocidades elevadas que se emplean). Diversos tamaños y formas. Plásticos especiales para altas velocidades.

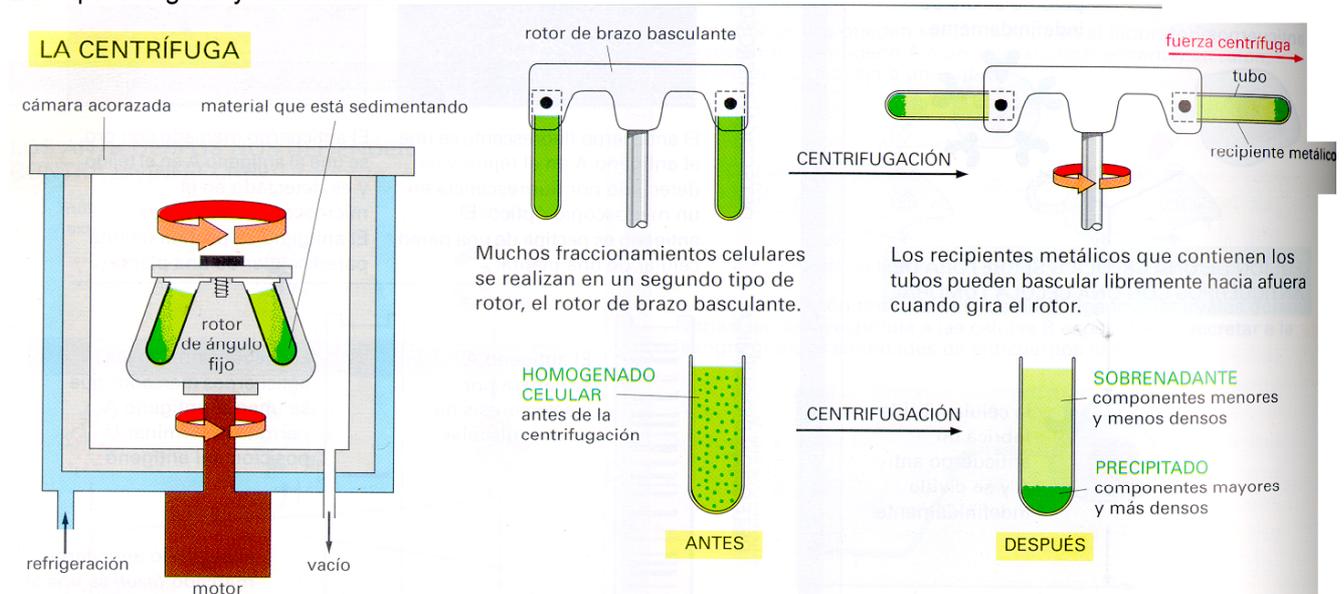


2. Centrifugas

Se puede regular velocidad, tiempo, temperatura. Elevadas velocidades (10^2 - 10^5 rpm).

3. Rotores

Dos tipos: angular y basculante



Modalidades

Según la velocidad:

	Criterio aproximado:
Centrifugación a baja velocidad	menos de 10.000 rpm
Centrifugación a alta velocidad	entre 10.000 y 20.000 rpm
Ultracentrifugación	más de 20.000 rpm

Según el propósito:

1. Centrifugación analítica

Objetivo: medir las propiedades físicas de las partículas que sedimentan, tales como su coeficiente de sedimentación o su masa molecular. Especialmente en la variante **ultracentrifugación** analítica. Las moléculas se observan mediante un sistema óptico **durante** la centrifugación. Los tubos de centrifuga deben ser de cuarzo para dejar pasar la luz visible y ultravioleta. Rotor basculante, observación en vertical.

2. Centrifugación preparativa

De uso más común. **Objetivo:** aislar partículas, células o moléculas para su análisis o utilización posterior. En general, se emplea mayor cantidad de muestra que en la analítica.

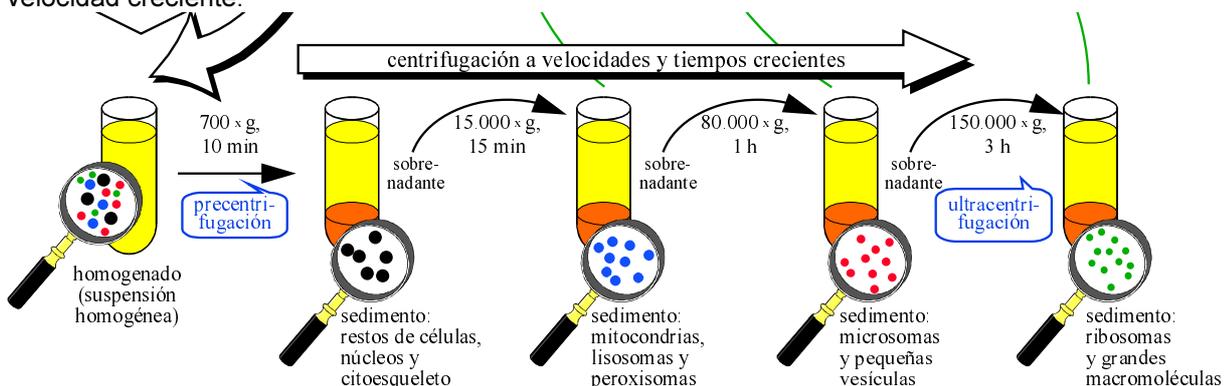
Según el medio en el que se centrifuga y la forma como se aplica la muestra:

1. Centrifugación diferencial

(También llamada de frontera móvil). El tubo se llena con muestra y se centrifuga. El comportamiento de cada componente de la muestra **depende de su forma, tamaño, densidad** y, lógicamente, de las condiciones de centrifugación. Se obtienen sólo 2 fracciones: sedimento y sobrenadante.

[Nota: la palabra *precipitado* es más adecuada para algo insoluble, que precipita por centrifugación o por otros mecanismos (por ej., una reacción química); *sedimento* es más correcto para lo que se ha forzado a ir al fondo pero seguiría siendo soluble; *pellet* es una palabra inglesa para lo que queda compactado en el fondo como consecuencia de la centrifugación]

Una aplicación típica es el **fraccionamiento subcelular** (separación de los distintos componentes de una célula, principalmente de los orgánulos) (véase Luque o Alberts) empleando sucesivas centrifugaciones a velocidad creciente.

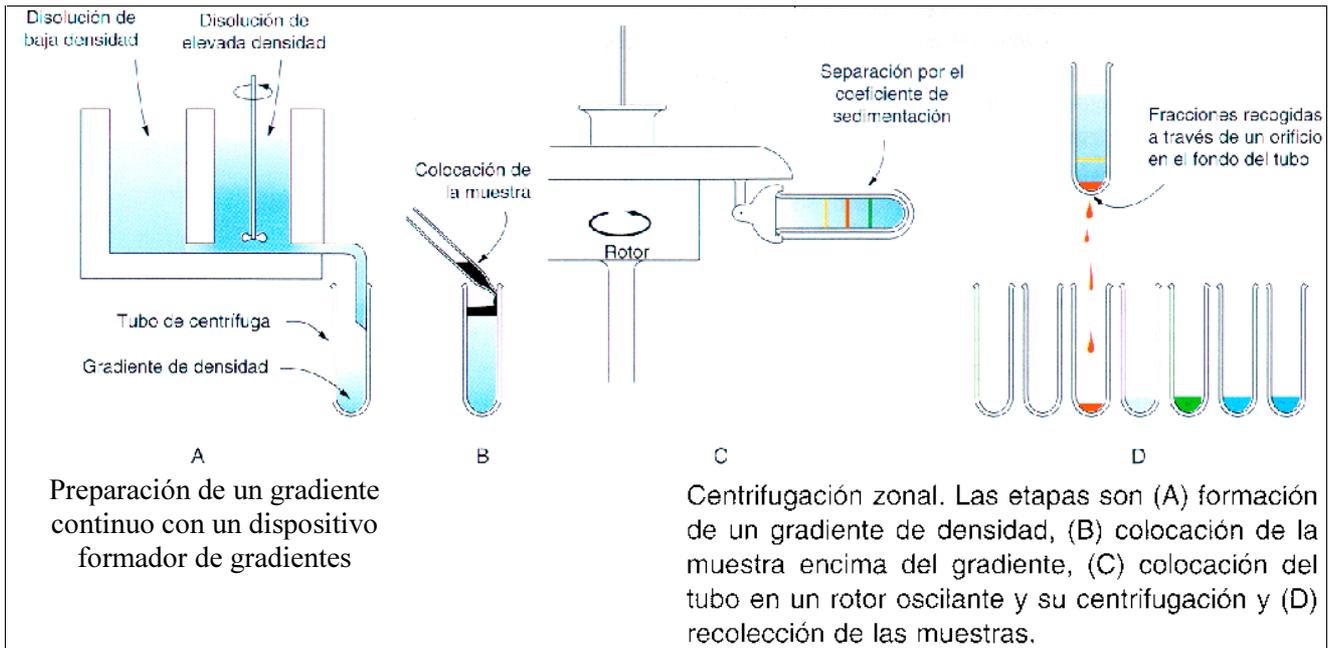


2. Centrifugación zonal o de velocidad de sedimentación

La muestra se aplica en una capa delgada sobre el medio de centrifugación, que es un **gradiente de densidad**. Bajo la fuerza centrífuga, las partículas sedimentan a través del gradiente concentrándose en zonas o bandas discretas. Su velocidad de avance (y, por tanto, el mecanismo de la separación) **depende de su tamaño, forma y densidad**; todos estos parámetros se combinan en el coeficiente de sedimentación

$$\text{Coeficiente de sedimentación} = s = \frac{\text{velocidad de sedimentación}}{\text{aceleración centrífuga}}$$

que se mide en unidades Svedberg ($1 \text{ S} = 10^{-13}$ segundos).

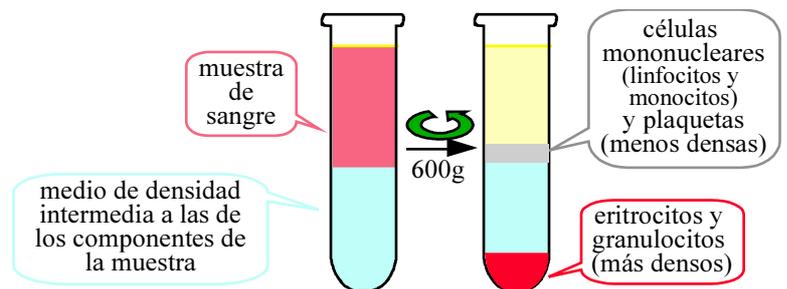


Comparación e información adicional:

Centrifugación diferencial	Centrifugación zonal o de velocidad de sedimentación	Centrifugación isopícnica o de equilibrio de sedimentación
<p>(en gradiente preformado, continuo o discontinuo)</p> <p>fuerza centrifuga ↓</p> <p>componente más lento</p> <p>componente más rápido</p>	<p>(generalmente en gradiente preformado o auto-formado, continuo)</p> <p>muestra</p> <p>componente más lento</p> <p>componente más rápido</p>	<p>componente menos denso</p> <p>componente más denso</p>
<p><u>Rotor</u> angular, generalmente</p> <p><u>Separación</u> en función principalmente del tamaño, pero también del coeficiente de sedimentación s, que depende de la masa (tamaño \times densidad) y de la forma. (medido en Svedbergs, $1S = 10^{-13}$ segundos)</p> <p><u>Aplicación:</u> separación de tipos celulares, fraccionamiento subcelular (separación de orgánulos), separación de asociaciones macromoleculares, etc.</p>	<p><u>Rotor</u> basculante.</p> <p><u>Separación</u> en función del coeficiente de sedimentación s, que depende de masa y forma. El gradiente evita la mezcla por convección/difusión: bandas bien separadas. Se detiene la centrifugación antes de alcanzar el equilibrio. Densidad máxima del gradiente $<$ densidad de los componentes de la muestra.</p> <p><u>Aplicación:</u> separación de macromoléculas, de orgánulos similares, etc.</p>	<p><u>Rotor</u> basculante.</p> <p><u>Separación</u> en función de la densidad. El gradiente evita la mezcla por convección/difusión: bandas bien separadas. El tiempo de centrifugación es lo suficientemente largo como para que se alcance el equilibrio. Densidad máxima del gradiente $>$ densidad de los componentes de la muestra.</p> <p><u>Aplicación:</u> separación de moléculas de ácido nucleico, purificación de ácidos nucleicos, etc.</p>

4. Métodos de barrera

Método rápido, típico por ejemplo en la obtención de leucocitos de sangre circulante libres del resto de células sanguíneas. Se trata de una centrifugación a través de un medio de densidad constante (se podría considerar como un gradiente escalonado de una sola etapa). La densidad de este lecho debe ser intermedia entre la de los tipos celulares que se quieren separar. Se emplean para ello medios comerciales como Ficoll-Paque, Lymphoprep y otros muchos, formados generalmente por mezclas de Ficoll (un polisacárido sintético) y metrizamida (un compuesto sintético yodado). Se dispone de varios medios con densidades adecuadas



para la separación de tipos celulares concretos; por ej., Nycoprep-1.077 para células mononucleares, Nycoprep-1.068 para monocitos, Polymorphoprep para células polimorfonucleares, o Nycoprep-1.063 para plaquetas.

Cálculos

Conversión de velocidad de giro (revoluciones por minuto, rpm) a aceleración centrífuga (fuerza centrífuga relativa, FCR, sin unidades):

Se conseguirá una misma separación en 2 centrifugas distintas cuando sea igual FCR, no si es igual la velocidad de giro (rpm). Es importante, por ello, dar las condiciones de centrifugación en FCR, no en rpm. La FCR es lo que coloquialmente se llama "número de g", porque se mide empleando como unidad la aceleración de la gravedad, **g**. Se expresa así, por ej., "una centrifugación de 15 min a 20.000 g" (o "a 20.000 x g").

La relación entre ambas depende del radio del rotor (medido desde el eje de giro hasta la posición de la muestra en el tubo) así:

La separación por centrifugación depende de la masa celular (**m**), del radio de giro del tubo, o radio del rotor, donde se coloca la muestra (**r**) y de la velocidad alcanzada por la centrifuga (ω o v):

$$F_c = m \cdot a = \frac{m \cdot v^2}{r} = \frac{m \cdot e^2}{r \cdot t^2} = \frac{m \cdot \varphi^2 \cdot r^2}{r \cdot t^2} = \frac{m \cdot \varphi^2 \cdot r}{t^2} = m \cdot \omega^2 \cdot r = m \cdot (2\pi)^2 \cdot v^2 \cdot r = 39,48 \cdot m \cdot v^2 \cdot r$$

Siendo:

F_c = fuerza centrífuga

m = masa de la célula

a = v^2/r = aceleración; si es a gravedad unidad, **a** = **g** = 9,8 m/s² = 980 cm/s²

v = e/t = velocidad lineal de la muestra en el tubo (cm/min)

r = radio de giro, medido entre el punto medio del tubo de centrifuga y el eje de rotación (cm)

e = espacio lineal recorrido, si el movimiento fuese lineal (cm)

t = tiempo de sedimentación empleado al centrifugar (min)

φ = ángulo recorrido en el movimiento de rotación (radianes = ángulo cuyo arco es igual a r); ($\varphi = e/r$)

$\omega = \varphi/t$ = velocidad angular, pues el movimiento es de rotación (radianes/min = min⁻¹)

v = velocidad de giro (revoluciones por segundo = rps, o revoluciones por minuto = rpm); ($\omega = 2\pi v$)

$$FCR = \frac{F_c}{F_g} = \frac{a}{g} = \frac{39,48 \cdot m \cdot v^2 \cdot r}{m \cdot 980 \text{ cm/s}^2} = 0,0403 \cdot v^2 \cdot r \text{ cm}^{-1} \cdot \text{s}^2$$

$$v = \left(\frac{v}{\text{rpm}} \right) \cdot \text{rpm} = \left(\frac{v}{\text{rpm}} \right) \cdot \frac{1}{\text{min}} = \left(\frac{v}{\text{rpm}} \right) \cdot \frac{1}{60\text{s}} \quad r = \left(\frac{r}{\text{cm}} \right) \cdot \text{cm}$$

$$FCR = 0,0403 \cdot \left[\left(\frac{v}{\text{rpm}} \right)^2 \cdot \frac{1}{3600\text{s}^2} \right] \cdot \left[\left(\frac{r}{\text{cm}} \right) \cdot \text{cm} \right] \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^2 = 11,19 \cdot 10^{-6} \cdot \left(\frac{v}{\text{rpm}} \right)^2 \cdot \left(\frac{r}{\text{cm}} \right)$$

$$(\text{Habitualmente escrito como } FCR = 11,19 \cdot 10^{-6} \cdot v^2 \cdot r = \frac{v^2 \cdot r}{89365})$$

Ejercicio resuelto: El n^o de **g** alcanzado en un rotor de centrifuga, de 5 cm de radio, que gira a una velocidad de 10.000 rpm es: **FCR** = $(10.000)^2 \cdot 5 / 89.365 = \mathbf{5.600g}$

Conviene saber manejar esta conversión.

✦ Cálculo de FCR a partir de rpm, y viceversa, para distintos radios de giro del rotor.

Bibliografía específica

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D. (1996). Biología molecular de la célula, 3ª ed. Omega. Biblioteca: 576.3ALB p.172-4
- Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, S.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P. (1999). Introducción a la biología celular, Omega. Biblioteca: 576.3ALB p.162-3
- Freifelder, D. (1991). Técnicas de bioquímica y biología molecular. Reverté. Biblioteca: 577.1FRE Cap. 11. (*excesivamente teórico y técnico*)
- **** Luque, J. y Herráez, A. (2001) Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Harcourt. Biblioteca: 576.3LUQ pp.122-5, 133, 136-7
- Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. (1998). Bioquímica, 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Biblioteca: 577.1MAT p.165-6
- Stryer, L. (1995). Bioquímica, 4ª ed. Reverté. Biblioteca: 577.1STR Vol.1, p.51-2.
-