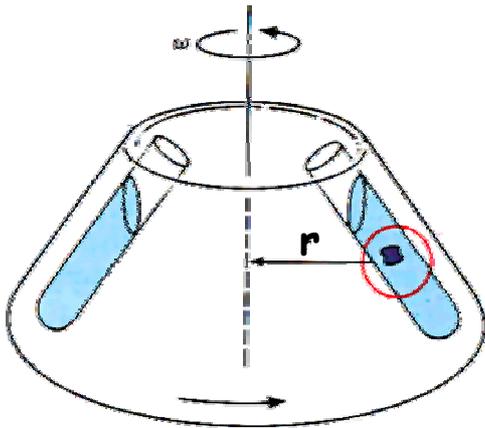


# Centrifugación



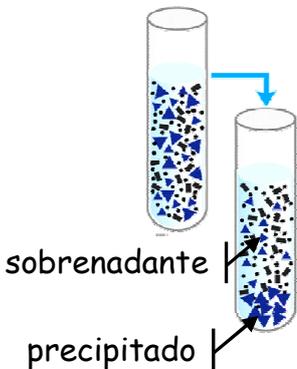
$$\omega = \frac{2\pi}{60} \cdot \text{rpm} \quad (\text{rad/s})$$

## Sedimentación en un campo de alta aceleración

- Tamaño (masa)
  - Forma
  - Densidad
- } Coeficiente de sedimentación **S**

### Centrifugación diferencial

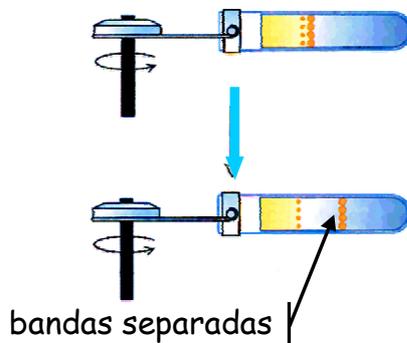
- Muestra homogénea
- Separación sobrenadante/precipitado



Separación por tamaño

### Centrifugación zonal

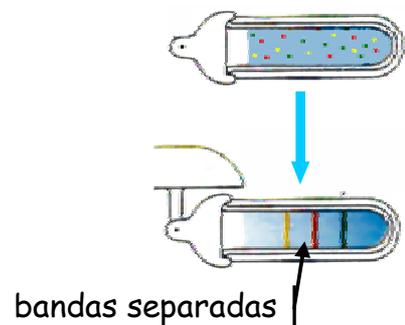
- gradiente de densidad preformado
- Muestra encima
- Separación en bandas



Separación por S

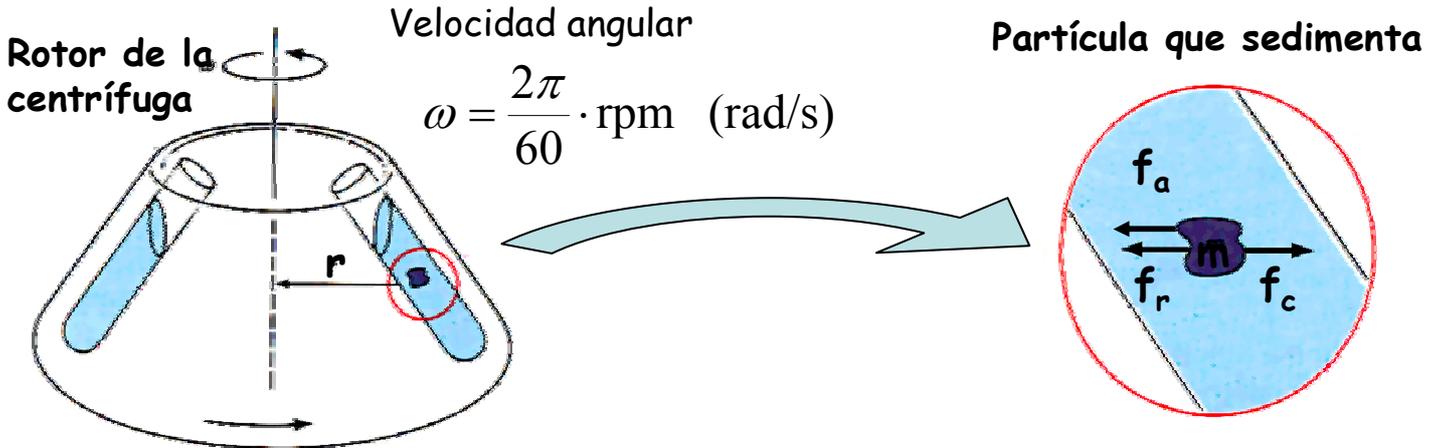
### Centrifugación isopícnica

- gradiente de densidad autogenerado
- Muestra homogénea
- Separación en bandas



Separación por densidad

# Centrifugación: fundamentos



fuerza centrífuga  
principio de Arquímedes

Masa de la partícula

Aceleración centrífuga (intensidad del campo)

$$f_c = m \cdot a = m \cdot \omega^2 r$$

Masa del solvente desplazado

$$f_a = m_s \cdot \omega^2 r = m \bar{v} \rho \cdot \omega^2 r$$

Densidad del medio

volumen específico parcial de la partícula

$$f_s = f_c - f_a = m \cdot (1 - \rho \bar{v}) \cdot \omega^2 r$$

$m_s = \rho \cdot v_s$   
 $v = m / \rho_p = m \cdot \bar{v}, \quad \bar{v} = \frac{1}{\rho_p}$

Resistencia al avance (fricción)

Coefficiente de fricción

$$f_r = f \cdot v$$

$\bar{v}$  es difícil de medir  
 $\bar{v}$  es aditivo

## Ley de Stokes

$$f_r = f_s, \quad f \cdot v = m \cdot (1 - \rho \bar{v}) \cdot \omega^2 r$$

Velocidad terminal

$$v = \frac{m \cdot (1 - \rho \bar{v})}{f} \cdot \omega^2 r$$

Coefficiente de sedimentación

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m \cdot (1 - \rho \bar{v})}{f}$$

Ecuación de Svedberg

Velocidad / intensidad del campo

# Coeficiente de Sedimentación

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m \cdot (1 - \rho V)}{f}$$

$$10^{-13} \text{ s} = 1 \text{ Svedberg}$$

## ➤ Tamaño:

- m : más grande, mayor S
- f : más grande, mayor f

$$\text{aprox. } \frac{m_1}{m_2} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$\left( \frac{m_1^2}{m_2^2} = \frac{S^3}{S^3} \right)$$

$$f = 6\pi\eta \cdot a$$

↙ radio de Stokes  
↘ viscosidad

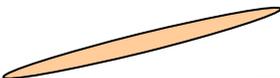
Ley de Stokes

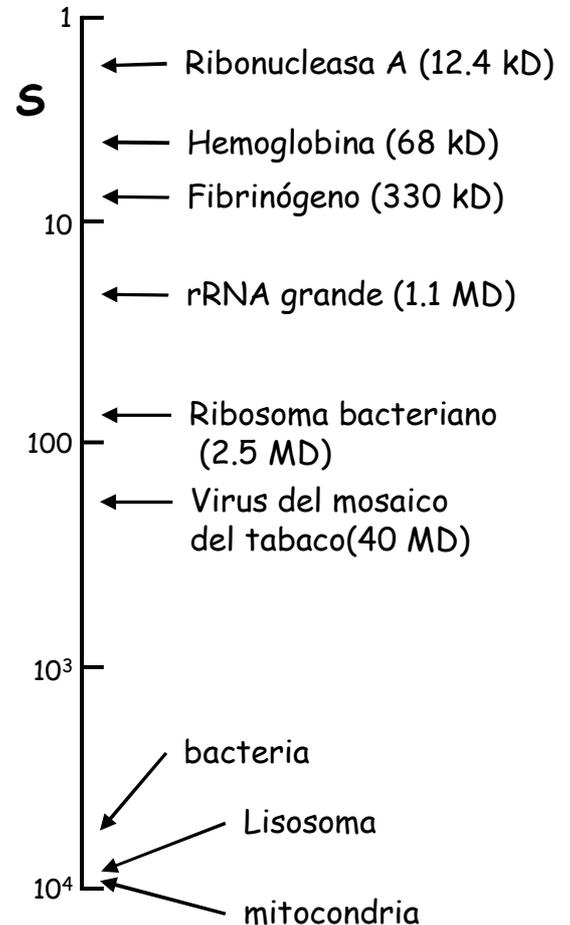
## ➤ Forma:

- f (a): más extendido menor S

## ➤ Densidad:

- : más denso, menos flotación

	S	a	M <sub>r</sub>
 miosina	6.43 S	194.6	530 kD
 citocromo A	18.6 S	69.2	530 kD



# Usos de las técnicas de centrifugación

## ➤ Sedimentación de precipitados

Tipo de  
centrífuga

Centrífuga preparativa  
velocidad fija

## ➤ Preparación de células y orgánulos subcelulares

Centrifugación diferencial

Rotor angular

Separación en gradientes (sacarosa,  
Ficoll etc)

Rotor basculante

## ➤ Separación por tamaños (S) Purificación de DNA, proteínas

Purificación de DNA, proteínas

Ultracentrífuga  
preparativa.

Sedimentación en gradiente (sacarosa etc)

Rotor basculante

## ➤ Determinación de S

Sedimentación en gradiente de sacarosa

Ultracentrífuga  
analítica

## ➤ Determinación de $M_r$

Sedimentación en gradiente de sacarosa  
Equilibrio de sedimentación

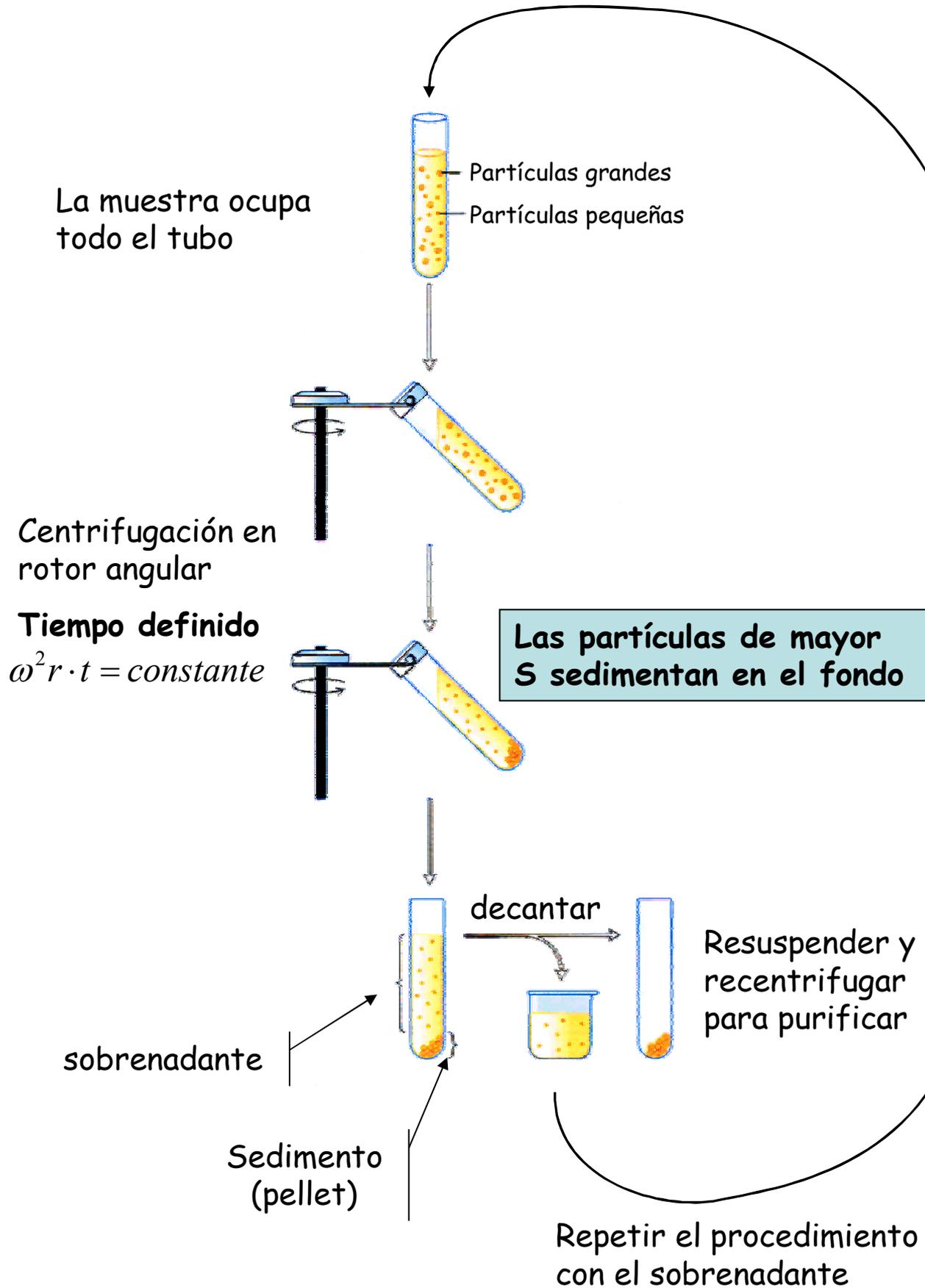
Ultracentrífuga  
analítica

## ➤ Determinación de densidades / separación por densidades

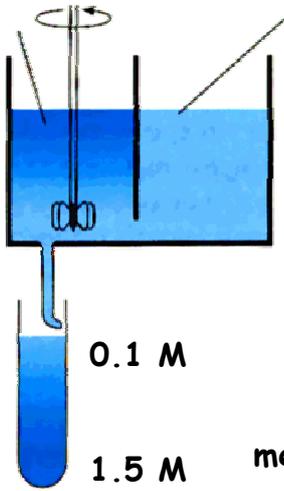
Centrifugación isopícnica

Ultracentrífuga  
analítica ?????

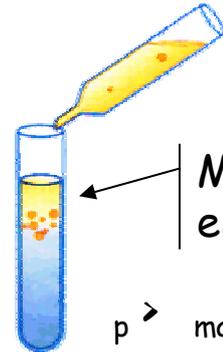
# Centrifugación diferencial



# Centrifugación zonal o en bandas (velocidad de sedimentación)



Gradiente de sacarosa,  
Ficoll, Percoll,, etc  
**preformado**

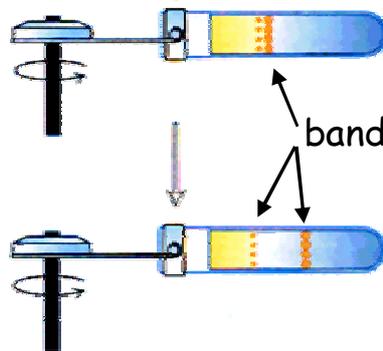


Muestra depositada encima del gradiente **Banda inicial**

menos denso  
↓  
más denso

$\rho > \rho_{max}$  No hay flotación

centrifugación a muy alta velocidad



bandas

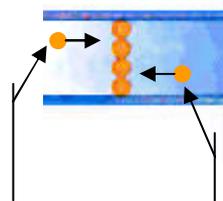
**Separación en función de S**

$M_r, f(a)$ ,  
(gradiente "enfoca" las bandas)

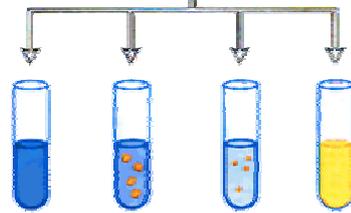
Parar centrifugación antes de que se alcance el fondo

↓ mayor flotación, se adelanta

↑ mayor flotación, se retrasa



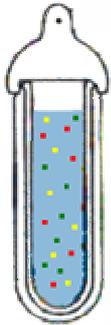
Recoger las fracciones



S grande

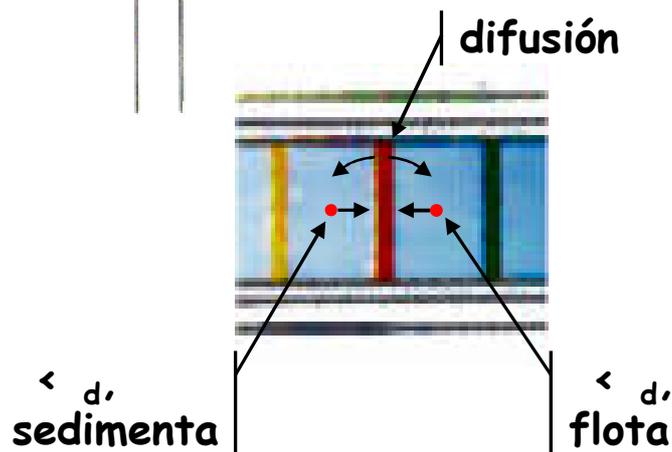
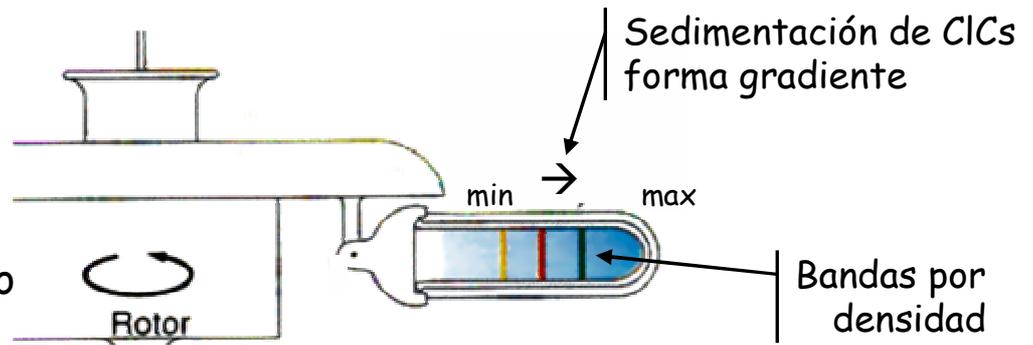
S pequeño

# Centrifugación isopícnica



Muestra disuelta en CLCs  
(2-6M),  $\sim 1.7$  g/ml

Centrifugación a  
alta velocidad,  
hasta el equilibrio  
( $\sim 48$  h)



$$d \propto \frac{k}{\sqrt{M_r}}$$

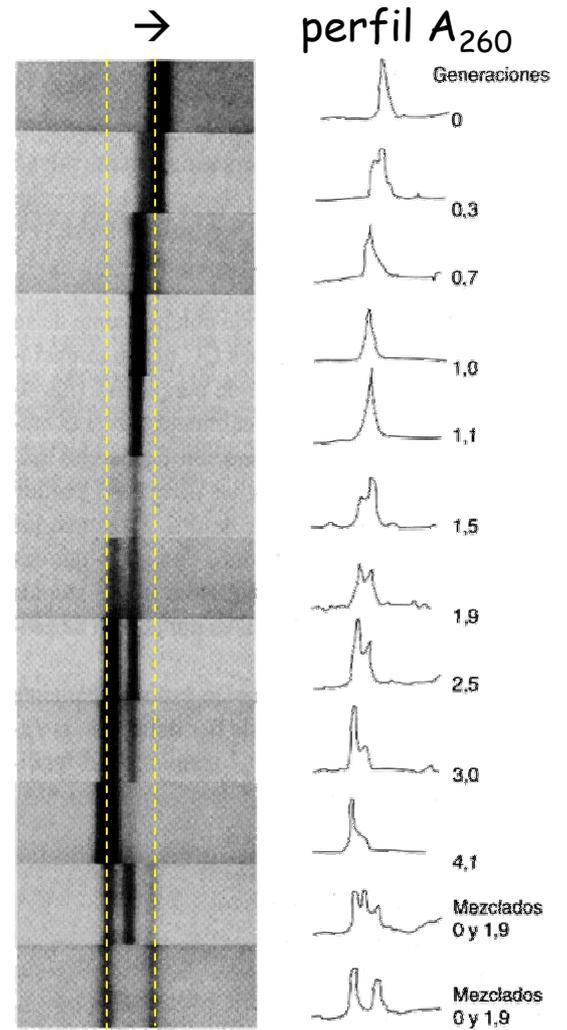
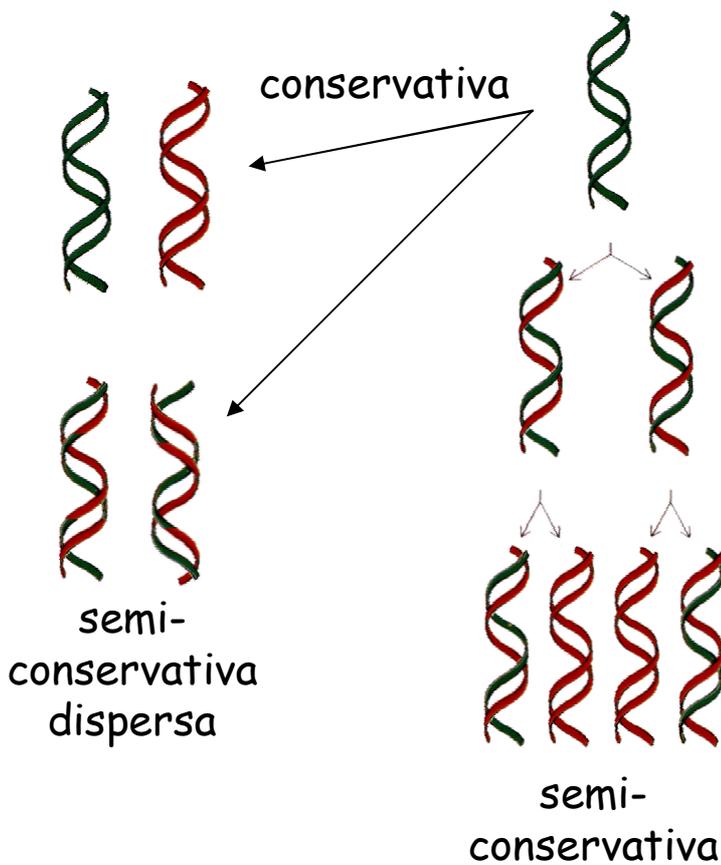
Macromoléculas  
quedan muy  
"enfocadas"

## Separación por densidades

- Experimento de Meselson y Stahl
- Separación de DNA dúplex, monohebra y RNA
- Separación de tomoisómeros
- Separación de DNA satélite

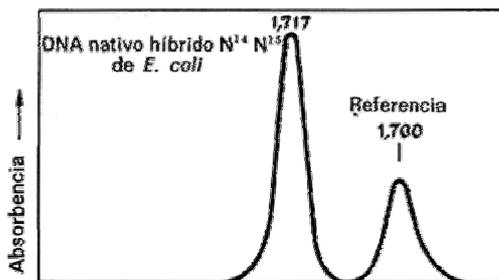
# Experimento de Meselson y Stahl: replicación semiconservativa

- Marcaje con  $^{15}\text{N}$
- Cultivos bacterianos sincronizados
- Extracción de DNA
- Centrifugación en gradiente  $\text{CsCl}$

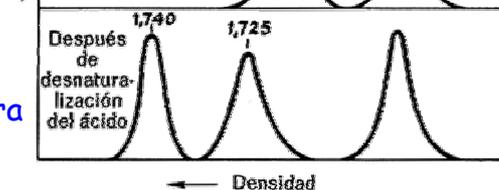


Replicación dispersa: análisis de DNA de hebra simple

pH 7  
dúplex



pH 12  
monohebra

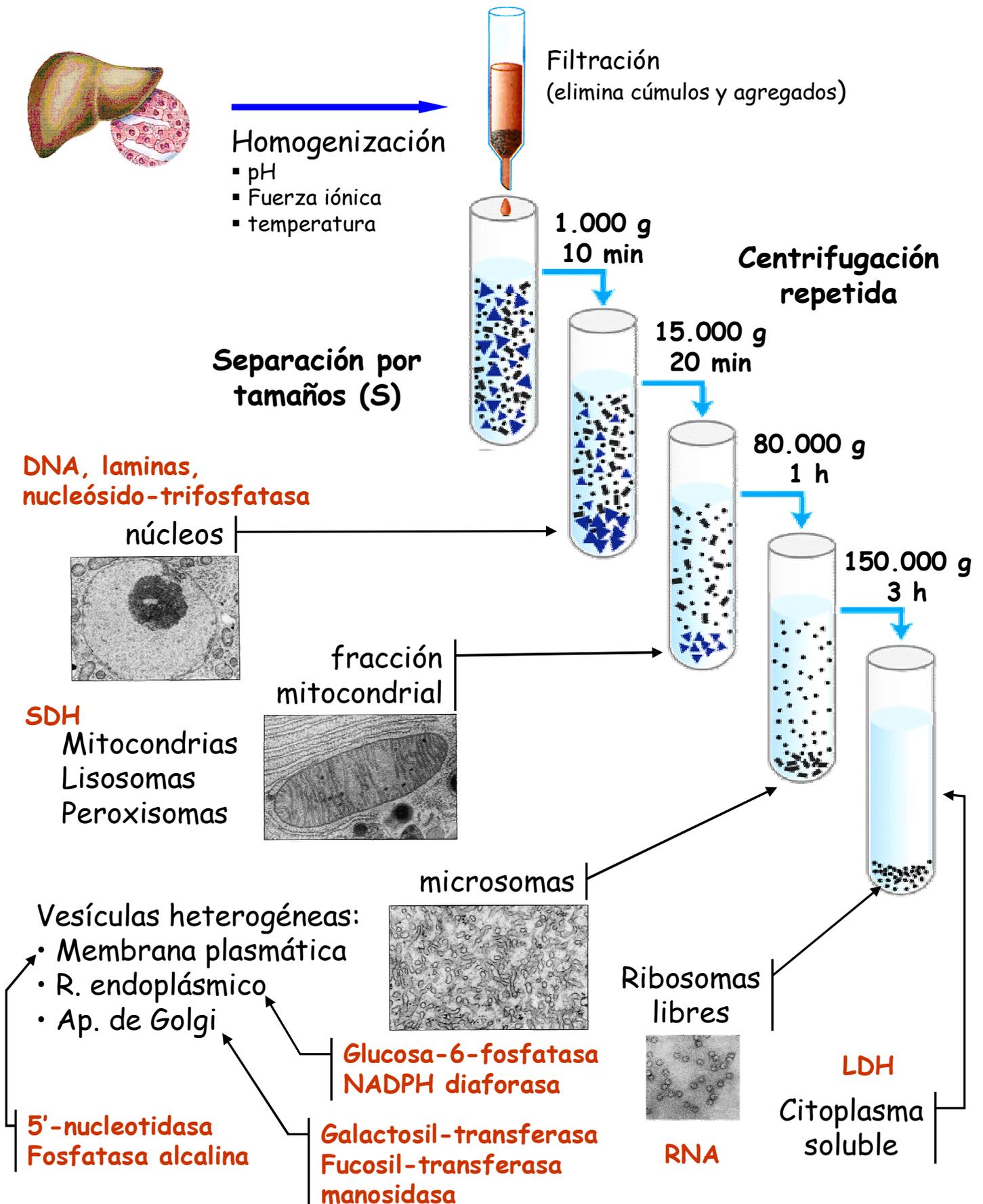


$^{14}\text{N}$ -DNA  
1.710 g/ml

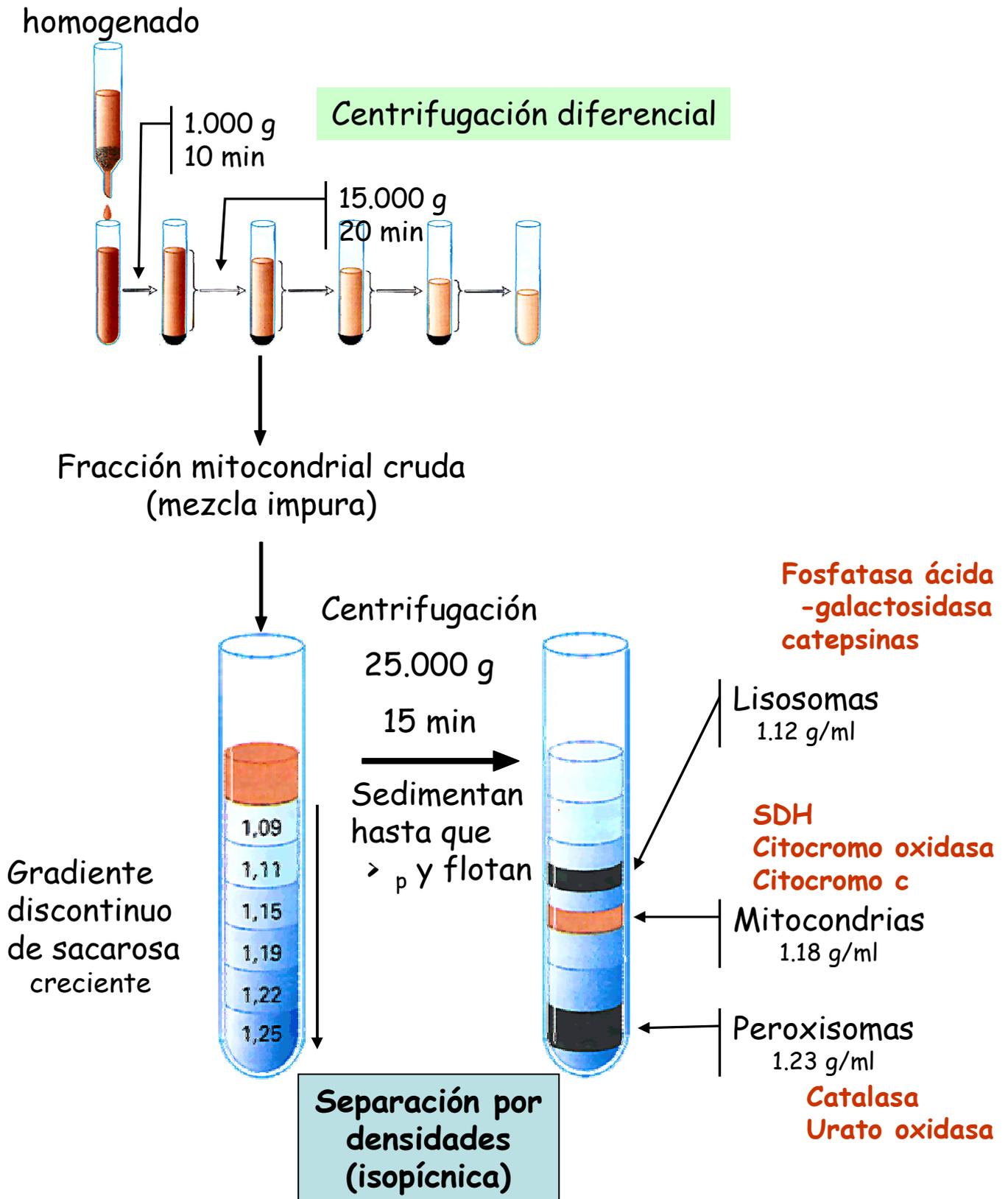
$^{15}\text{N}$ -DNA  
1.724 g/ml

Experimentos de Matthew Meselson  
y Franklin Stahl  
Proc Natl Acad Sci 44: 671 (1958)

# Separación de orgánulos subcelulares por centrifugación diferencial

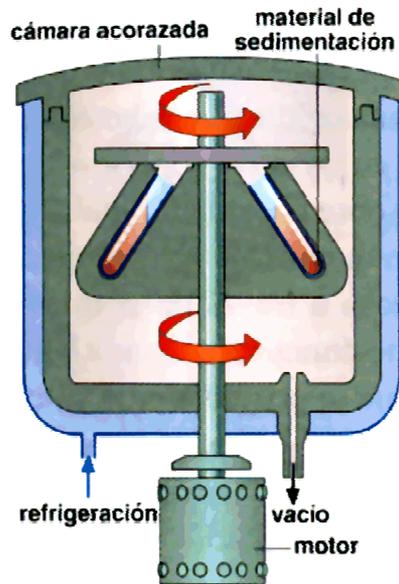
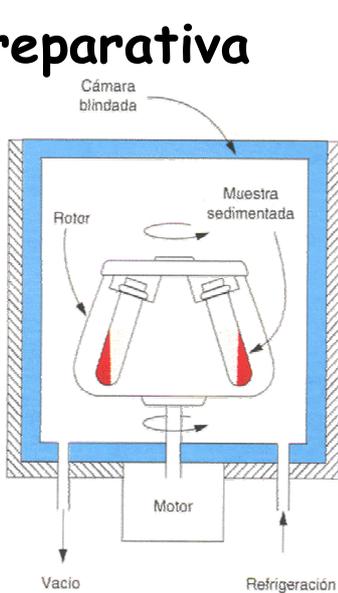


# Separación de orgánulos subcelulares por centrifugación en gradiente



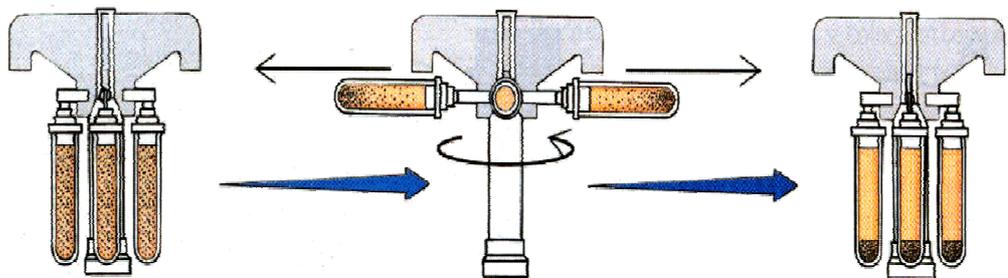
# Tipos de centrífugas

## Preparativa



Rotor angular  
Altas G  
multipropósito

Rotor basculante (swing-out).  
Para gradientes de densidad



De células

Muy bajas g 1-1000

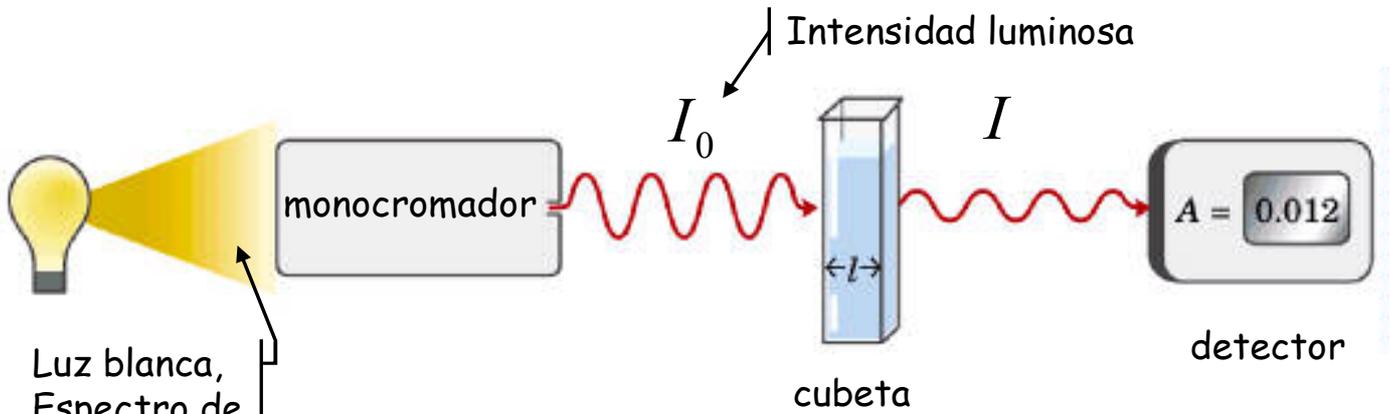
Bajas g

Ultracentrífuga  
analítica

Mantiene mejor gradientes

Velocidad de sedimentación  
Equilibrio de sedimentación  
Centrifugación isopícnica (???)  
Aquí o arriba???)

# Ley de Lambert-Beer

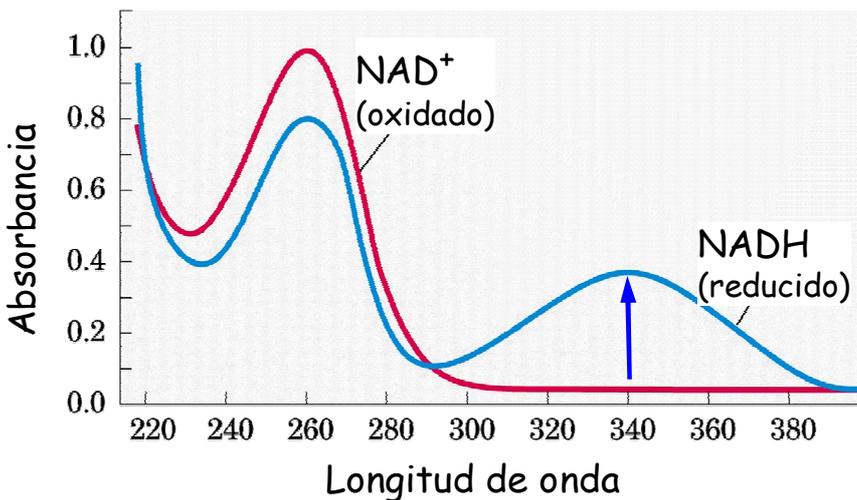
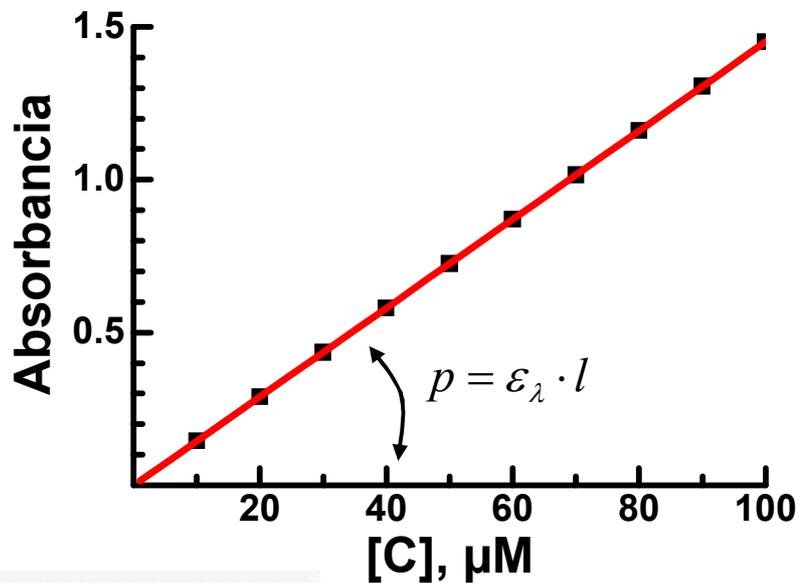


Luz blanca,  
Espectro de  
longitudes  
de onda

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon_{\lambda} \cdot [C] \cdot l$$

Coeficiente de extinción molar  
(absortividad molar)

La absorbancia es  
proporcional a la  
concentración



El coeficiente de  
extinción depende  
del estado de la  
molécula y de la  
longitud de onda

# Medida de la Actividad enzimática

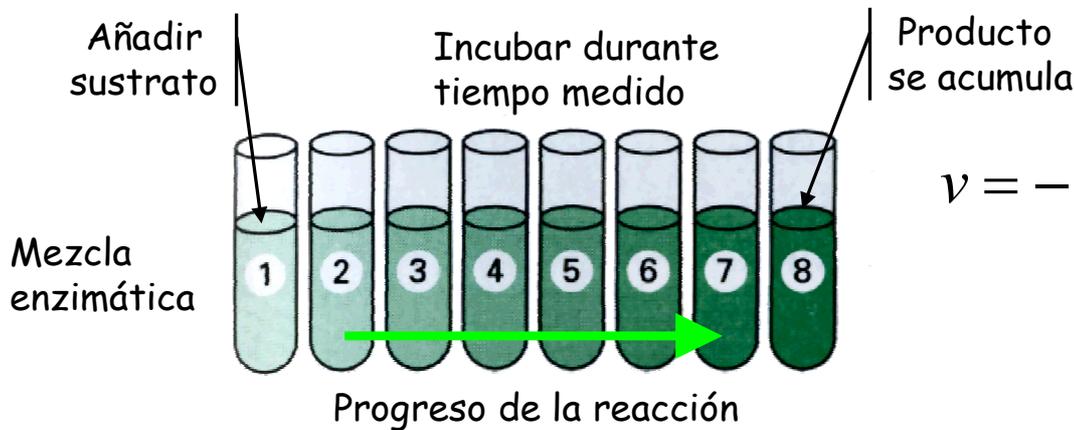
Las enzimas son catalizadores:  
Aumentan la velocidad de reacción  $v$



$$v = k_3 \cdot [E]$$

Michaelis-Menten

Medir  $v$  es una medida de  $E$



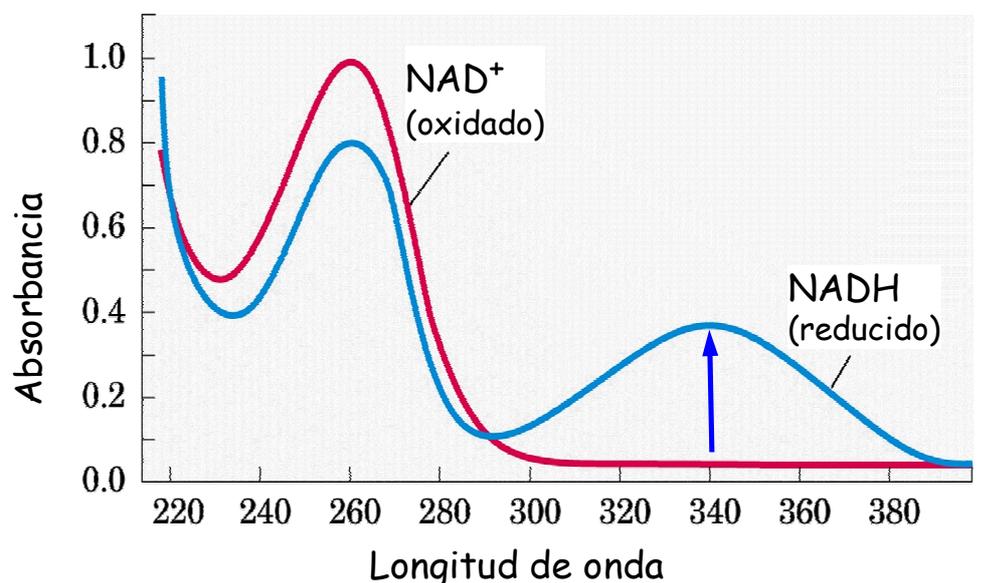
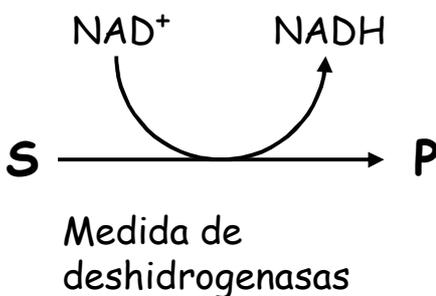
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

$$v \cong \frac{[P]}{t}$$

Medida de  $[P]$ :

- Absorbancia (color)
- Fluorescencia
- Radioactividad

Sustratos artificiales  
Reacciones acopladas

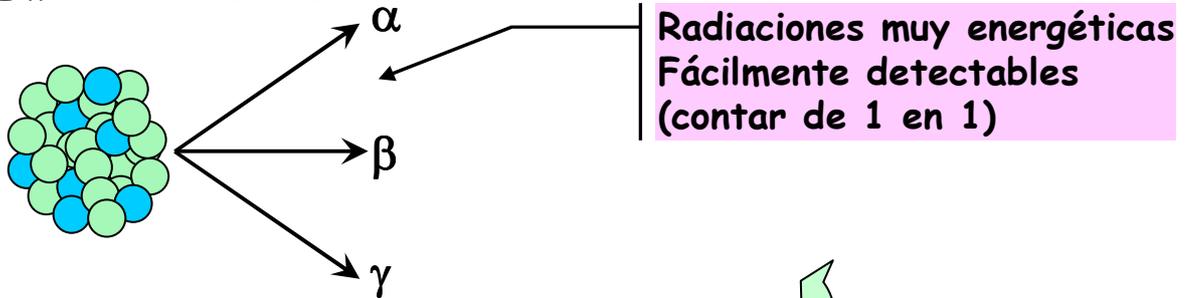


# Isótopos en biología

El mismo elemento, distintos átomos:  
distinguir átomos entre si

## Isótopos radioactivos:

- Núcleo inestable
- Desintegración espontánea
- Emisión de radiación



**Usos y aplicaciones:**

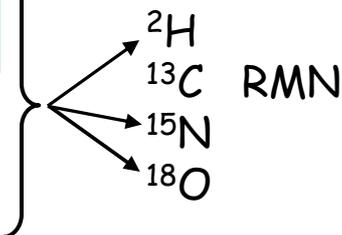
- Marcas moleculares
- Trazadores metabólicos
- Análisis cuantitativo



## Isótopos estables:

↑ densidad  
(separaciones)

Δ Velocidad  
de reacción

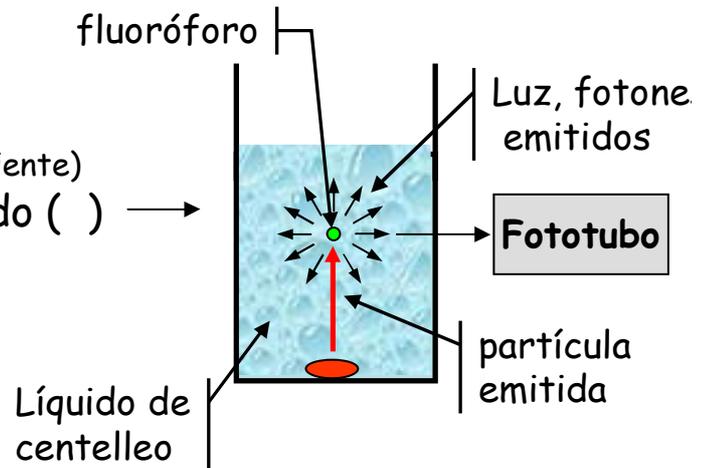


Cuando no hay radioactivos  
(detectados por MS)

# Detección de la radioactividad: contaje

## Medida cuantitativa (contaje)

- Contador Geiger ( , , ) (ineficiente)
- Contadores de centelleo líquido ( )
- Contadores



$$\text{cpm} = \text{ef} \cdot \text{dpm}$$

Eficiencia del contador

Curio

$$1 \text{ Ci} = 1 \text{ g } ^{226}\text{Ra} = 2.22 \cdot 10^{12} \text{ dpm}$$

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \cdot 10^{10} \text{ dps} = 3.7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$$

Becquerelio

**Máxima sensibilidad para análisis**

$$ae = a \text{ (dpm)/m (mol)}$$

$$A = \frac{dN}{dt} = -k \cdot N$$

$$N = N_0 \cdot e^{-k \cdot t} = N_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

$$\tau = \frac{1}{k}, \quad t_{1/2} = \tau \cdot \ln 2 = \frac{\ln 2}{k}$$

Constante de tiempo

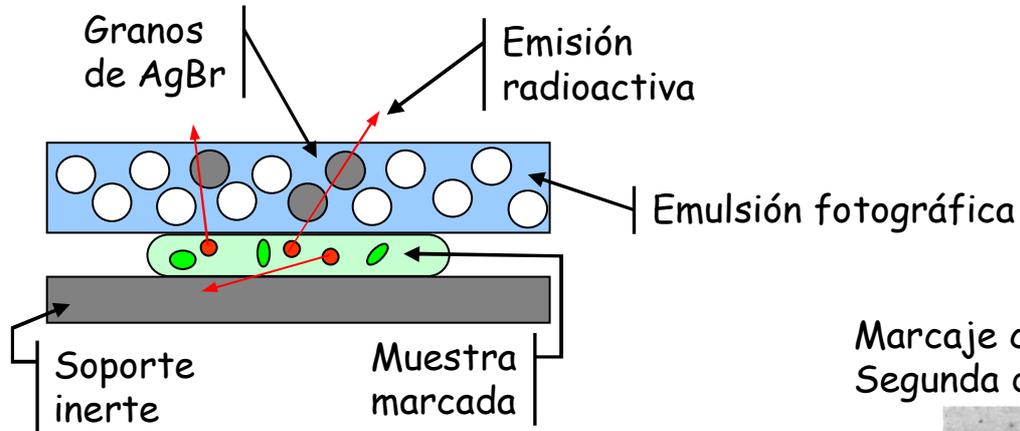
Vida media (semivida)

**La actividad es una medida del n° de átomos**

Isótopo	Emisión	Semivida	$E_{\text{max}}$ (MeV)
$^3\text{H}$	$\beta$	12.1 años	0.018
$^{14}\text{C}$	$\beta$	5 586 años	0.155
$^{24}\text{Na}$	$\beta, \gamma$	15 h	1.39
$^{32}\text{P}$	$\beta$	14.2 días	1.71
$^{35}\text{S}$	$\beta$	87 días	0.167
$^{45}\text{Ca}$	$\beta$	165 días	0.254
$^{59}\text{Fe}$	$\beta, \gamma$	45 días	0.46, 0.27

Es posible distinguir dos isótopos y contarlos por separado

# Detección de la radioactividad: Autoradiografía



Marcaje con  $^3\text{H}$ -timidina  
Segunda división posterior



Recombinación entre  
cromátidas hermanas

## Cualitativa: localización

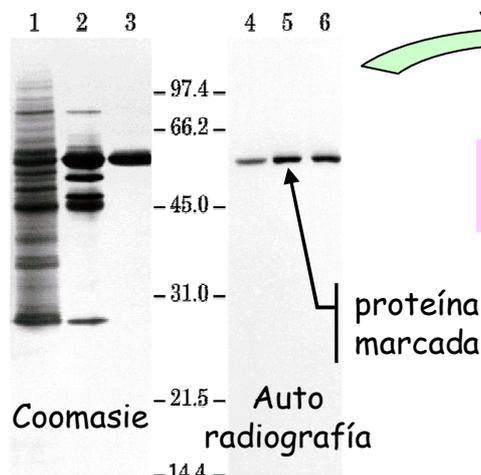
Marcaje con  $^3\text{H}$  timidina  
(cromosoma de E. Coli)



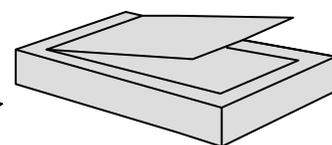
La síntesis de DNA ocurre en las horquillas

## Cuantitativa: densitometría

Revelado de  
electroforesis,  
cromatografías  
etc



Escáner



Cantidad de  
proteína marcada

Intensidad, OD

