

# axeb

Värt att veta om:



## Centrifugering

Syftet med denna skrift är att ge en introduktion om centrifugering; nomenklatur, typer av centrifuger och rotor, separations tekniker och val av gradienter. Dessutom finns hänvisning till de standards som styr säkerhet och underhållsarbete. Som underlag till denna skrift har ett internt Axeb seminarieprogram och fakta från Heraeus/Sorvall använts.

När man vill studera enskilda partiklar i suspension; som äggviteämnen, fetter, socker, celldelar och celler kan man utnyttja en "förstärkt gravitation" för att göra en separation. Genom att utsätta dem för centrifugalkraft ökar tyngden på partiklarna och via detta kan separation/isolering ske av de olika molekylerna i en suspension.

Centrifugering är en av de viktigaste och mest spridda metoderna inom praktisk forskningsteknik för områden som biokemi, cell -och molekylärbiologi och inom medicin. Dagens forskning och många kliniska applikationer är hänvisade till isoleringen av celler, subcellulära organeller och makromolekyler. En centrifug utnyttjar centrifugalkraften (g-kraften) för att isolera suspenderade partiklar från omgivande medium. Applikationerna är otaliga för centrifugering och kan inkludera sedimentering av celler och virus, separation av subcellulära organeller och isolering av makromolekyler som DNA, RNA, proteiner och/eller lipider.

Till detta kommer koncentrerings av prover, bindningsstudier eller generellt fysikaliska/kemiska studier av substanser.

Man skiljer mellan preparativ och analytisk centrifugeringsteknik.

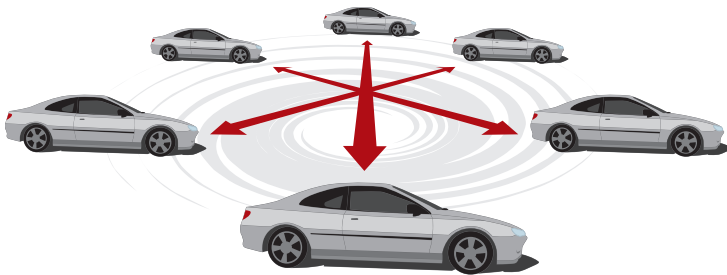
Med preparativ avses att avskilja partiklar för vidare analys utanför centrifugeringen.

Analytisk teknik innebär registrering av sedimenterade partiklars fysikaliska egenskaper under centrifugering.

## Centrifugen ett sätt att öka effekten av gravitationen

Om man väntar tillräckligt länge kommer förr eller senare många partiklar/celler i en suspension att lägga sig på botten av behållaren på grund av gravitationen (1xg).

Vid separation av blodkroppar utan centrifugalkraft, så krävs att blodet står i 48 timmar för en uppdelning i huvudsakliga komponenter. I praktiska sammanhang är denna tid alldeles för lång. Andra partiklar, som är extremt små, kommer inte alls att separera i den suspension de befinner sig , om de inte utsätts för centrifugalkraft. När en lösning roteras i en bestämd hastighet (varv per minut , Revolutions Per Minute RPM), gör centrifugalkraften att partiklarna rör sig radially bort från rotationsaxeln. Den kraft som verkar på partiklarna kallas den relativa centrifugal kraften (Relative Centrifugal Force RCF). Exempel; en RCF av 500xg indikerar att kraften är 500 gånger större än jordens gravitationskraft.



Om ett prov, med en vikt av 10 mg, centrifugeras vid 100.000 x g utvecklas en vikt som motsvarar en liten bil! Belastning på rotor blir 6 bilar !

Och detta enbart beräknat på provet, dessutom tillkommer bägarens och provrörets vikt.

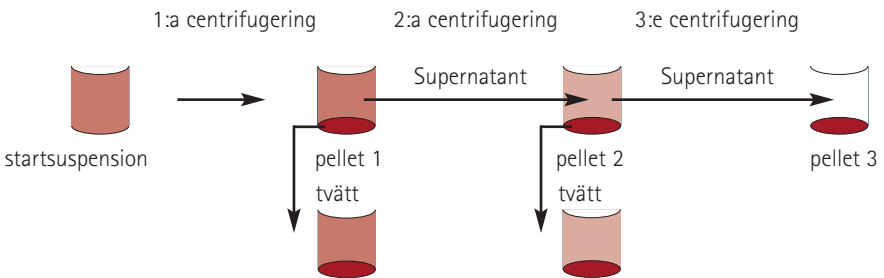
## Centrifugklasser och huvudsakliga användningsområden

|                                    | Centrifugklass |              |                  |
|------------------------------------|----------------|--------------|------------------|
|                                    | Rutin          | Höghastighet | Ultra/mikroultra |
| Hastighet (rpm x 10 <sup>3</sup> ) | 0-15           | 15-30        | 30-150           |
| Ca RCF (10 <sup>3</sup> )          | 7              | 100          | 800/900          |
| Pelleterar                         |                |              |                  |
| Bakterier                          | Ja             | Ja           | (ja)             |
| Animal- och växtceller             | Ja             | ja           | (ja)             |
| Cellkärnor                         | Ja             | Ja           | (ja)             |
| Precipitat                         | Vissa          | De flesta    | (ja)             |
| Membran fraktioner                 | Vissa          | Vissa        | Ja               |
| Ribosomer/polysomer                | -              | -            | Ja               |
| Makromolekyler                     | -              | -            | Ja               |
| Virus                              | -              | De flesta    | Ja               |

()=kan göras men används vanligtvis inte i denna applikation

## Hastighetscentrifugering, separation efter storlek.

Denna typ av separation är vanlig för enkel pelletering och syftet är att få en förhållandevis ren preperation av subcellulära organeller och makromolekyler. För att studera subcellulära organeller sönderdelas vävnad eller celler så att innehållet i cellerna frisättes. Denna suspension kallas för homogenat. I samband med centrifugering av cellhomogenat, sedimenterar större partiklar snabbare än mindre och på så sätt får man en grund för att gå vidare med ytterligare centrifugeringar. Cellhomogenatet kan centrifugeras i serie, med högre och högre g-kraft och/eller längre och längre tider för att producera pellets av renade organeller.



Här är ett exempel; när cellhomogenat är centrifugerat vid  $1000 \times g$  i 10 minuter, pelleterar intakta celler och tunga kärnor i botten av röret. Supernatanten kan fortsätta att centrifugeras vid  $10000 \times g$  i 20 minuter för att pelletera subcellulära organeller; mitokondrie, lysosomer. Några av dessa sedimenterande organeller är delvis rena men är vanligtvis kontaminerade. Upprepad tvätt, genom att suspendera pelleten i isoton lösning, och centrifugering/pelletering igen resulterar i att man kan ta bort kontaminanter. Genom hastighetscentrifugering renas organeller och dessutom tas första steget för ytterligare rening genom andra typer av centrifugeringstekniker.

# Täthetsgradientcentrifugering

Täthetsgradienter erhålls genom att lägga lager på lager av olika media med skilda tätheter i centrifugeringsröret och skicka lagren så att det medium med lägst täthet finns i toppen. Antingen kan skikten göras i kontinuerlig eller icke kontinuerlig följd. Cellfraktionen läggs längst upp i centrifugeringsröret och centrifugeras. Separation av partiklarna sker tack vare partiklars olika form/storlek och olika täthet och föredras för att rena subcellulära organeller och makromolekyler.

Separation efter form/storlek (rate-zonal) utnyttjar skillnaden i partikelform och massa istället för partikeln täthet för att åstadkomma separation. Exempel på vanliga applikationer är separation av cellorganeller som endosomer, eller separation av olika proteiner-antikroppar. Antikroppar har i stort samma densitet, men olika form och massa. Separation baseras på detta faktum.

## Kriterier för en lyckosam form/storleks centrifugering

- Densiteten av suspensionen måste vara lägre än den lägsta densiteten i gradienten
- Densiteten av provets partikel måste vara högre än den högsta densitetsdelen i gradienten
- Vandringslängden för partikel genom gradienten måste vara tillräckligt lång så att separering kan ske
- Tidsfaktorn är viktig, om tiden är för väl tilltagen hamnar allt som en pellet i botten av röret

Täthetsseparation (isopycnic) bygger på principen att en partikel, med en bestämd densitet kommer att sjunka/röra sig tills att en position är nådd där densiteten i partikel är exakt den samma som i lösningen. Då detta "jämviktsläge" har infunnit sig spelar det ingen roll hur lång tid centrifugeringen fortsätter. Ett vanligt exempel för denna metod är separation av nukleinsyra i en CsClgradient.

## Kriterier för lyckosam täthetsseparation

- Densiteten av partikel måste falla inom gränserna för gradientens densitet
- Längd av gradient är oväsentlig
- Tid för körningen måste vara tillräcklig för att partiklarna skall bilda ett band vid sin isopycnic punkt.
- För lång körtid har ingen effekt

## Exempel av media för densitetsgradient

| Gradient media                  | Cells | Viruses | Organelles | Nucleoproteins | Macromolecules |
|---------------------------------|-------|---------|------------|----------------|----------------|
| Sugars (e.g. sucrose)           | +     | +++     | +++        | +              | -              |
| Polysaccharides (e.g. Ficoll)   | ++    | ++      | ++         | -              | -              |
| Colloidal silica (e.g. Percoll) | +++   | +       | +++        | -              | -              |
| Ionated media (e.g. Nycodenz)   | ++++  | ++      | ++++       | +++            | +              |
| Alkali metal salts (e.g. CsCl)  | -     | ++      | -          | ++             | ++++           |

++++ excellent, +++ good, ++ good for some applications, + limited use, - unsatisfactory

Källa: D.Rickwood, T.C. Ford, J.Steensgard (1994) Centrifugation essential data, John Wiley & Sons Ltd. U.K.

## Rotortyper och användningsområde

| Syfte med centrifugering |              |                         |                   |
|--------------------------|--------------|-------------------------|-------------------|
| Rotortyp                 | Pelleting    | Form/storlek separation | Täthet separation |
| Vinkel                   | Mycket bra   | Begränsad               | Varierar*         |
| Swing out                | Otillräcklig | Bra                     | Bra**             |
| Vertikal                 | Inte lämplig | Bra                     | Mycket bra        |

\*Bra för makromolekyler, dålig för celler och organeller

\*\*Bra för celler och organeller, se upp vid användande med CsCl

Dessutom finns sk haematokrit-, zonal-, kontinuerligt flödes- och elutritationsrotor. Observera att varje typ av rotor har sin styrka och begränsning beroende på vilken typ av separation det handlar om.

I en vinkelrotor är provröret fixerat i en kavitet i rotorn i en bestämd vinkel. När rotorn börjar röra sig reorienterar sig lösningen i röret. Denna rotor är vanlig för användning för pelletering. Exempel är pelletering av humanceller, bakterier och jäst. Den är också användbar för täthetsseparation av makromolekyler som nukleinsyra.

I en swing-out rotor, laddas rören i individuella bågare som hänger vertikalt när rotor inte är i rörelse. När rotorn börjar röra sig svänger bågaren ut i horisontalläge. Denna rotor är speciellt lämpad när det gäller att separera prov i densitetsgradienter. Den långa separationslängden tillåter bättre separation av enskilda partiklar i en suspension. Emellertid är denna typ av rotor otillräcklig för pelletering. Dessutom måste försiktighet iakttas så att man undviker punktbelastning som kan orsakas av spinnande av CsCl och andra densitetsgradienter som kan precipitera.

I en vertikal rotor, sitter provrören i vertikal position under rörelse. Denna rotor är inte alls lämplig för pelletering utan är som mest effektiv för täthetsseparationer tack vare sin korta separationssträcka. Applikationsområde är DNA, RNA och lipoproteinseparation.

## Val av centrifugeringsrör

Grundkravet är att skydda mot att provet läcker ut. Andra aspekter är att materialet skall vara kemiskt inert, enkelt att hantera - samla upp prov efter körningar. I samband med val av plaströr kan följande aspekter vara viktiga:

| Rör plast typ               | Klarhet | Kemisk resistens |
|-----------------------------|---------|------------------|
| Polypropylen (PP)           | Grumlig | God              |
| Polyallomer (PA)            | Grumlig | God              |
| Polycarbonat (PC)           | Klar    | Dålig            |
| Polyetylen tereftalat (PET) | Klar    | Dålig            |

### För att förlänga rörets livslängd och att undvika att det går sönder:

- Kontrollera produktspecifikationen för röret (provvolym och maximala hastigheter)
- I vinkelrotor eller vertikalrotor: kör alltid rören fyllda, använd tunnväggiga, slutna rör
- Autoklavera enbart om det är absolut nödvändigt och vid 121°C i 15 min
- Undvik att göra ren rören i diskmaskiner, kan ge en värmeschock
- Oftast rekommenderas att rengöra rören med ett mildt diskmedel, vatten och lufttorka

Rören måste omsorgsfullt matchas med rotor enligt nedan för att undvika förlust av prov och eller misstag

| Rörtyp                | Rotortyp |          |          |
|-----------------------|----------|----------|----------|
|                       | Vinkel   | Swingout | Vertikal |
| Tunn vägg öppen topp  | Nej      | Ja       | Nej      |
| Tjock vägg öppen topp | Ja       | Ja       | Nej      |
| Tunn vägg sluten      | Ja       | Vissa    | Ja       |
| Oak ridge             | Ja       | Nej      | Nej      |



### **Frågor som skall ställas och besvaras då man köper en centrifug:**

- Hur många rör skall köras varje gång
- Hur stor volym per rör i ml
- Vilken storlek på centrifugen.
- Vilket g-tal behövs (RCF)
- Val av rotor; swing out, vertikal eller vinkel rotor
- Om kyla behövs

### **Följande praktiska krav kan ställas på en centrifug:**

- Enkel uppbyggnad och instrumentering
- Konstruktion och den tekniska utrustningen är typgodkänd
- Lätt att öppna och stänga
- Enkel att ladda och rengöra
- Tiden och hastigheten skall vara ställbar
- Temperaturen ställbar, om det är en kylcentrifug
- Broms skall finnas. Som man kan koppla till/från.
- Lucklåsning, centrifugen kan bara startas när lucka är stängd.
- Luckföregling. Luckan kan bara öppnas när rotorn står still
- Handhavandebeskrivning på svenska

### **Kontrollera att centrifug och service uppfyller följande:**

SS-EN ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

SS-EN 60601 Elektrisk utrustning för medicinskt bruk, Säkerhet -Allmänna fordringar

IEC 61010-2-020 Säkerhetskrav för laboratoriecentrifuger.

IEC 61010-1 Generella säkerhetskrav för laboratorieutrustning.

### **Krav på kunskap hos underhållspersonal:**

Det är viktigt att inga reparationer, justeringar eller modifieringar utförs utan kunskap om apparatens konstruktion, funktion och användning. Felaktigt modifierade eller bristfälligt underhållna centrifuger kan orsaka skador på såväl personal som annan utrustning i laboratoriet. Det måste också förutsättas att de tekniker som skall utföra elsäkerhetsmätningarna är väl förtrogna med aktuella mätmetoder enligt SS IEC

Dessutom måste man ha goda kunskaper i mekanik för säkert underhåll, eftersom det finns stora krafter i rörelse när centrifugen är i drift.

## Vanliga centrifugeringstermer och formler

**Pellet:** det hårdpackade koncentratet av partiklar i provröret efter centrifugering

**Supernatant:** den "klara" lösningen ovanför pelleten

**RPM:** Roteringar Per Minut (hastighet)

**R<sub>MAX</sub>** : maximala radien från rotationsaxel i cm

**R<sub>MIN</sub>** : minimala radien från rotationsaxel i cm

**RCF:** Relativa centrifugal kraften  $RCF = 11,17 \times R_{MAX} (RPM/1000)^2$

**K-faktor:** Mått på pelleteringsförmågan av rotor. Ju mindre K-faktor desto bättre pelleteringsförmåga.

$$K = \frac{2,53 \times 10^{11} \ln (R_{MAX} / R_{MIN})}{(RPM)^2}$$

**Rotor omvandlings formel:** Om tiden för att pelletera ett prov i en gammal rotor är känd kan man räkna fram den tid det tar att pelletera samma prov i en annan/ny rotor.

$$\frac{T_1}{K_1} = \frac{T_2}{K_2} \longrightarrow T_1 = T_2 \times \frac{K_1}{K_2}$$

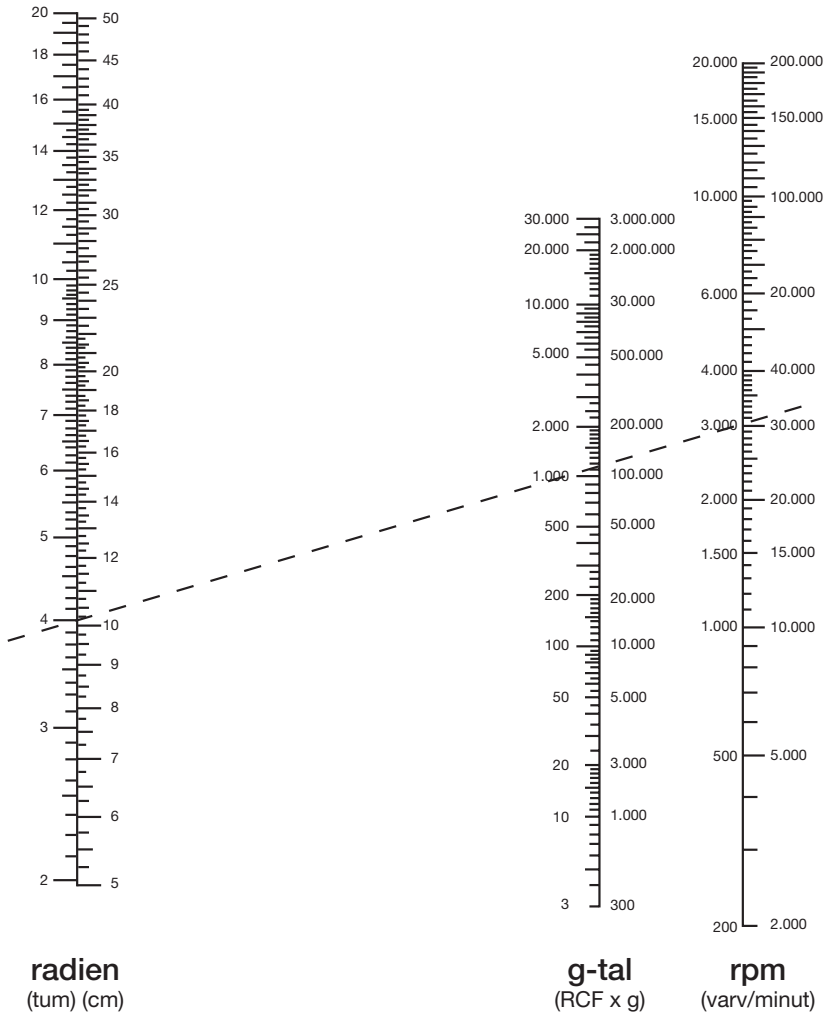
T<sub>1</sub> = tiden för att pelletera i den nya rotorn

T<sub>2</sub> = tiden för att pelletera i den gamla rotorn

K<sub>1</sub> = K-faktor i den nya rotorn

K<sub>2</sub> = K-faktor i den gamla rotorn

# Hjälpmedel att översätta varv till g-tal

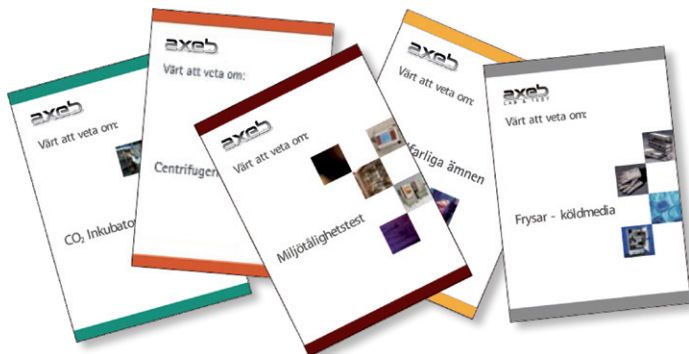


Exempel från diagram.  
 10 cm och 3000 rpm : 1000 x g  
(radie)                      (varv)                      (RCF)

Använd formel för att få  
 exakta relationer

### **Axeb AB levererar med kvalitet.**

Som en del i vår vision har vi producerat en serie skrifter i serien "Vårt att veta om ...". De ämnen som behandlats är • CO<sub>2</sub>-inkubatorer • Centrifuger • Miljötålighetstest • Frysar – köldmedia • Brandfarliga ämnen.



**Intresserad?** Beställ ditt exemplar idag per telefon, fax, eller mejl. Du får det gratis.

Vi förbehåller oss rätten till tekniska ändringar avseende innehållet i denna trycksak. Reproduktion av innehållet får inte ske utan föregående överenskommelse med Axeb AB.

Reviderad 2008, utgiven första gången 2003

# axeb

### **Axeb AB**

Box 43

SE-193 21 Sigtuna

Telefon +46 (0)8 623 10 80

Fax +46 (0)8 623 10 45

Web [www.axeb.se](http://www.axeb.se)

Mail [info@axeb.se](mailto:info@axeb.se)