Lisi cellulare e tissutale



Selezione del campione

La scelta del tipo di campione si basa sul tipo di studio che vogliamo condurre:

- Generalmente si seleziona un tipo di campione presente in buona quantità per lo studio;

- Il campione deve essere prelevato in modo da preservare il sistema biologico oggetto di studio;

- Usare possibilmente campioni freschi o conservati alla giusta temperatura.



1) Omogeneizzazione di cellule e tessuti

- Esistono diversi metodi per la rottura del tessuto e delle cellule, a seconda della fonte del tessuto, della resistenza e di ciò che si desidera ottenere.

- Per ogni tessuto, organo, frazione cellulare e proteine, oggetto di studio, esistono procedure e protocolli adattati e in parte modificabili al fine di ottenere risultati il più possibile riproducibili.



1) Omogeneizzazione di cellule e tessuti

Condizioni sperimentali ottimali per l'omogeneizzazione di tessuti e cellule:



- Si opera in ghiaccio, a circa 4°C, e si usano inibitori di proteasi.
- A basse temperature si bloccano le attività enzimatiche proteolitiche e digestive che si trovano nei lisosomi e nei perossisomi e che si possono liberare durante la lisi.

1) Omogeneizzazione di cellule e tessuti

Condizioni sperimentali ottimali per l'omogeneizzazione di tessuti e cellule:



- uso di tamponi ipotonici a pH fisiologico (7.4) e di detergenti, per solubilizzare proteine.

1) Omogeneizzazione di cellule e tessuti

Metodi di omogeneizzazione:

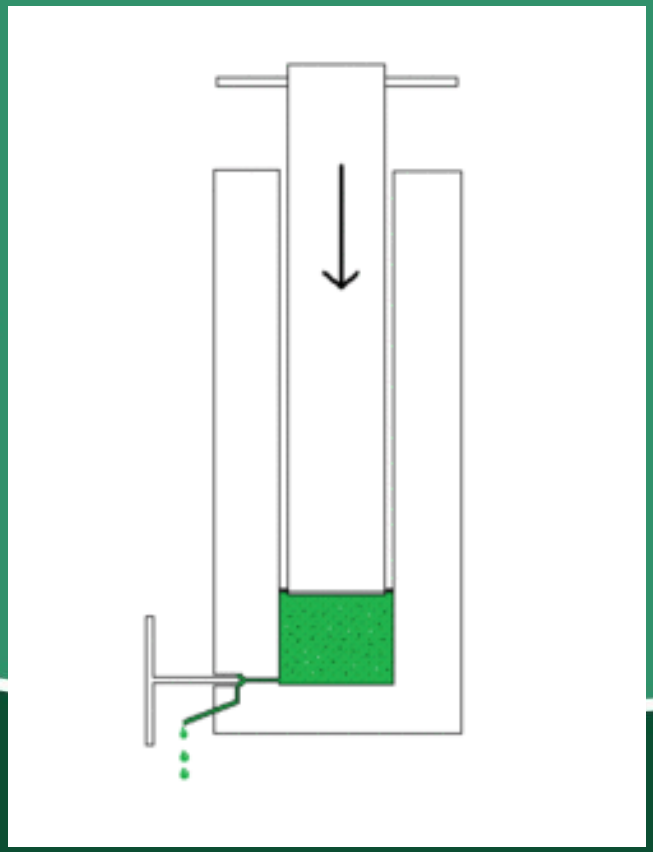


- Meccanici
- Digestione enzimatica
- Cicli di congelamento/scongelamento
- Shock osmotico

Metodi meccanici vigorosi

French press: è una pressa idraulica con una cella di campionamento speciale (per batteri e lieviti). Le cellule sono sotto pressione (20000 psi) e rilasciate attraverso un piccolo orifizio. Ciò provoca un'onda d'urto che provoca la rottura delle cellule.



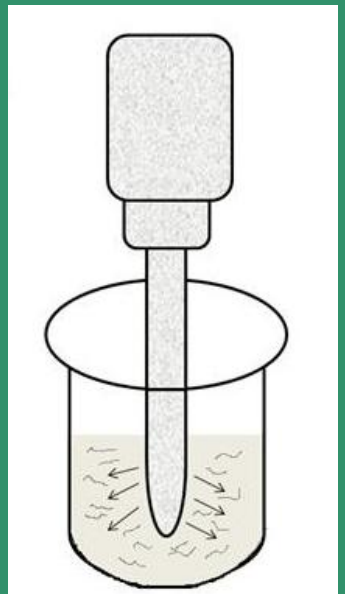




Metodi meccanici vigorosi

Sonicazione: Utilizza lo stesso principio del french press. Invece di una singola onda d'urto, c'è un flusso continuo di onde sonore ad altissima frequenza. Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali indotte da queste onde. Lo svantaggio è il surriscaldamento della sospensione cellulare per cui occorre tenerla in ghiaccio durante la procedura







Metodi meccanici vigorosi

Ultra- turrax: consiste in una lama rotante collegata ad un un albero motore che può essere immersa nella sospensione cellulare o tissutale.
La tecnica utilizza le forze di taglio per distruggere le cellule o il tessuto.





Metodi meccanici vigorosi

Omogeneizzatore 3D: le cellule ed i tessuti posti in speciali provette vengono macinati da biglie. La miscela contenuta nelle provette subisce così un movimento tridimensionale soprattutto in direzione verticale, consentendo una lisi efficace. L'elevata velocità e il movimento specifico consentono di macinare campioni di difficile lavorazione quali ossa, capelli, mais, spore, ecc.





Metodi meccanici moderati



Omogeneizzatori a lama: si tratta di normali frullatori. Il tessuto viene sminuzzato per azione delle lame.

Macinazione abrasiva con mortaio: utile per le cellule vegetali, dotate di parete cellulare, esse possono essere mescolate con sabbia e triturate con un pestello a mano (la rottura delle pareti è data dall'effetto abrasivo della sabbia).

Metodi meccanici blandi

Potter: Le membrane sono lacerate dalle forze frizionali che un pestello in teflon o vetro (generalmente mantenuto in rotazione grazie ad un motore elettrico) esercita contro le pareti di uno spesso cilindro di vetro.









Metodi blandi non meccanici

Shock osmotico: Cellule fragili si lisano se immerse in acqua distillata per la differenza di pressione osmotica tra interno ed esterno, che produce un rigonfiamento delle cellule, un aumento della pressione sulla membrana cellulare ed una lisi della stessa.



Solubilizzazione chimica:
La degradazione delle membrane/pareti è operata da solventi organici (ad es., 0.5% toluene, etile acetato) o detergenti (ad esempio, SDS – sodio dodecil solfato).
Il rilascio di enzimi idrolitici endocellulari completa la degradazione delle membrane.

Tamponi di lisi per estrazione proteica

I metodi di estrazione devono essere progettati in base alla natura delle proteine da studiare (ad es. proteine di membrana, citoplasmatiche) e al tipo di procedura sperimentale da utilizzare (ad es. Western blotting; co-immunoprecipitazione ecc.)



LOCALIZZAZIONE PROTEINE	TAMPONE USATO
• Lisato totale	• NP-40 or RIPA
• Citoplasmatica (solubile)	• Tris-HCl
• Citoplasmatica (citoscheletro)	• Tris-Triton
• Legata a membrane	• NP-40 or RIPA
• Nucleare	• RIPA
• Mitocondriale	• RIPA

fppt.com

Tamponi di lisi per estrazione proteica

Tampone RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay buffer)

- 150 mM cloruro di sodio
- 1.0% NP-40 o Triton X-100
- 50 mM Tris, pH 8.0
- 0.5% sodio deossicolato
- 0.1% SDS (sodio dodecil solfato)



Tampone Nonidet-P40 (NP40)

- 150 mM cloruro di sodio
- 1.0% NP-40 o Triton X-100
- 50 mM Tris, pH 8.0

Tamponi di lisi per estrazione proteica

Tampone Tris-Triton

- 10 mM Tris, pH 7.4
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 1% Triton X-100
- 10% glicerolo
- 0.1% SDS
- 0.5% deossicolato



Tampone Tris-HCl

- 20 mM Tris-HCl, pH 7.5

Al tampone di lisi vanno sempre aggiunti inibitori delle proteasi e delle fosfatasi.

Inibitore	Proteasi Target
PMSF	Serina proteasi
Pepstatina A	Proteasi aspartiliche
Leupeptina	Cisteina, treonina proteasi
Aprotinina	Serina proteasi
EDTA	Metalloproteasi



PASSAGGI SUCCESSIVI

- Dopo l'omogenizzazione, l'omogenato così ottenuto viene chiarificato tramite centrifugazione.
- Detriti cellulari,DNA cromosomiale ed altre impurità vengono eliminate dopo la centrifugazione.
- Il supernatante contenente le proteine viene trasferito in un nuovo tubo.

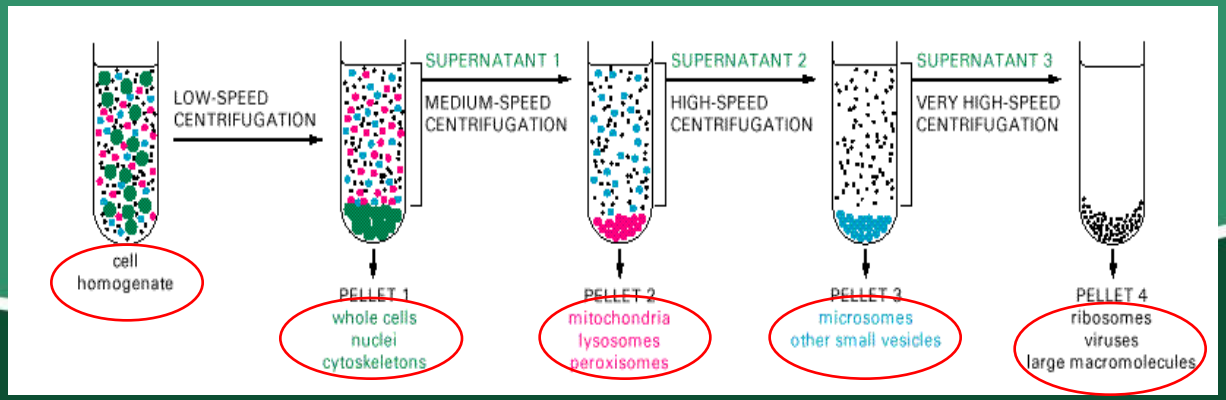


Frazionamento cellulare:

con una serie di centrifugazioni opportune (differenziali) si possono ottenere le principali frazioni sub-cellulari, con le metodiche in gradiente di densità le frazioni possono essere ottenute con un solo passaggio.



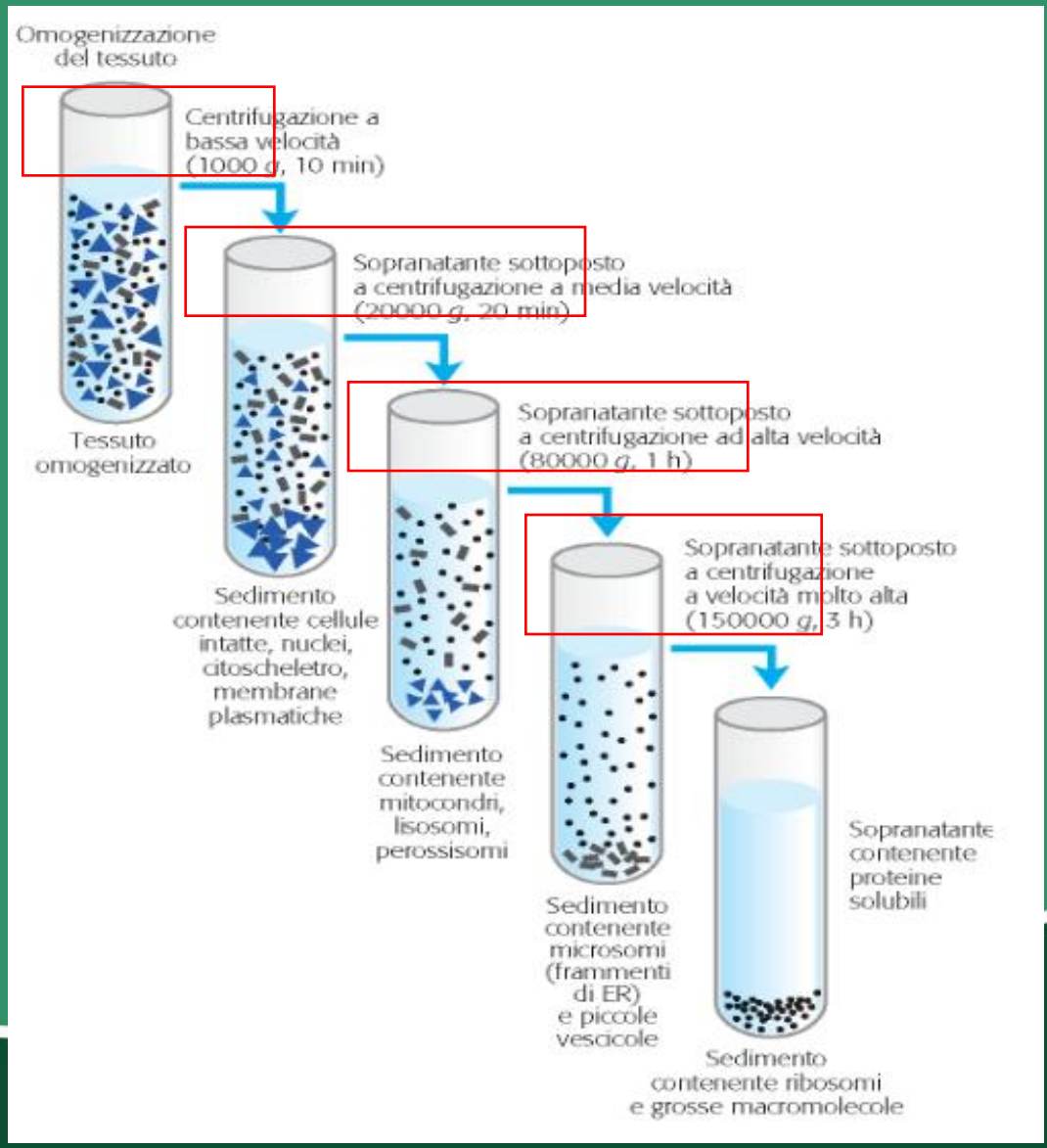
Ad esempio centrifugando un omogenato cellulare per tempi relativamente brevi e a velocità modeste sarà possibile ottenere la sedimentazione dei nuclei.



Frazionamento cellulare

Variano i tempi e la velocità di centrifugazione





Le quantità relativa di proteine totali deve essere poi determinata mediante metodo di quantificazione delle proteine totali come ad esempio il metodo Bradford.



Una volta determinata la concentrazione proteica totale, gli estratti devono essere processati immediatamente o congelati (-20 °C) o mantenuti a -80 ° C per prevenire il possibile degrado delle proteine o il deterioramento delle modificazioni post-traduzionali.