Università degli Studi di Teramo

Corso di Laurea in Biotecnologie

Metodologie Biochimiche – II Anno

ESERCITAZIONE 3 – Centrifugazione isopicnica per isolamento del mitocondrio attraverso gradiente di densità del saccarosio

Data: 03/11/2026

In questa esercitazione utilizzerete la centrifugazione isopicnica — cioè in gradiente di densità — per isolare i mitocondri da materiali biologici di partenza diversi: metà dei gruppi (Gruppo A) lavorerà con tessuto di fegato di topo, l'altra metà (Gruppo B) partirà da un pellet cellulare. Entrambi i gruppi seguiranno poi la stessa procedura di centrifugazione differenziale e di gradiente di densità.

Nell'Esercitazione 1 avete già preparato il tampone TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 + EDTA 1 mM). In questa seduta, il primo passo è preparare il mezzo di isolamento STE aggiungendo saccarosio e BSA al tampone TE che avete portato in laboratorio. Tutta la procedura si svolge a 0–4 °C: mantenete sempre i campioni in ghiaccio.

Richiami Teorici

Domanda

Qual è la differenza tra centrifugazione differenziale e centrifugazione isopicnica (in gradiente di densità)? In entrambi i casi, quale proprietà fisica della particella ne determina la separazione?

Domanda

Perché il mezzo di isolamento deve contenere saccarosio?

Domanda

I mitocondri hanno una densità di equilibrio di circa 1,19–1,21 g/mL. Osservando il gradiente che utilizzerete (strati al 15%, 23%, 31%, 40% e 55% di saccarosio con densità rispettivamente di 1,057 – 1,093 – 1,128 – 1,172 – 1,238 g/mL), in quale interfaccia vi aspettate di trovare la banda mitocondriale? Motivate la risposta.

Materiali e Strumenti

Soluzioni (conservate in ghiaccio):

- Tampone TE preparato nell'Esercitazione 2 (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 + EDTA 1 mM)
- Saccarosio puro (MM = 342,30 g/mol) — da pesare al banco per preparare il mezzo STE
- BSA (albumina sierica bovina) in polvere — per il mezzo STE (0,1% p/V)
- Soluzioni del gradiente (fornite): saccarosio 15%, 23%, 31%, 40%, 55% in tampone TE senza BSA

Campioni:

- Gruppo A: fegato di topo
- Gruppo B: pellet cellulare

Strumentazione:

- Bilancia tecnica
- Ghiaccio
- Pestello
- Pipetta Pasteur di vetro
- Becher
- Falcon da 15 mL, Eppendorf 1.5 mL
- Micropipette e puntali
- Centrifuga da banco refrigerata con rotore basculante
- Microcentrifuga refrigerata (≥ 10 000 × g)

1. Preparazione del mezzo di isolamento STE

Il mezzo STE (Saccarosio + Tris + EDTA + BSA) è il tampone in cui vengono eseguiti l'omogeneizzazione e tutti i lavaggi del pellet mitocondriale. Si prepara aggiungendo saccarosio e BSA al tampone TE che avete già in laboratorio.

Composizione del mezzo STE

Saccarosio 250 mM (MM: 342,30 g/mol): fornisce il supporto osmotico (≈ 290 mOsm) e impedisce che i mitocondri si rigonfino e si rompano.

Tris-HCl 10 mM pH 7,4 + EDTA 1 mM: già presenti nel tampone TE; il Tris tampona l'acidificazione dell'omogenato, l'EDTA chela i metalli bivalenti e inibisce le proteasi calcio-dipendenti.

BSA 0,1% (p/V): lega gli acidi grassi liberi rilasciati dalle membrane danneggiate, che altrimenti disaccoppierebbero la catena respiratoria mitocondriale. La BSA NON va aggiunta alle soluzioni del gradiente.

PER 50 mL DI MEZZO DI ISOLAMENTO STE:

Calcolo della massa di saccarosio e BSA da pesare

m (g) =

m (g) =

- Pesate sulla bilancia tecnica la quantità di saccarosio calcolata: _____ g. Registrate il peso effettivo.
- Trasferite il saccarosio in un becher graduato contenente circa l'80% del volume finale di tampone TE freddo. Mescolate delicatamente fino a completa dissoluzione.
- Pesate la BSA: _____ g. Aggiungetela e mescolate delicatamente fino a dissoluzione completa.
- Portate al volume finale aggiungendo il restante tampone TE freddo. Conservate il mezzo STE in ghiaccio per tutta la durata dell'esercitazione.

2. Preparazione del campione

Gruppo A – Omogeneizzazione del tessuto di fegato

SCOPO: rompere meccanicamente le membrane cellulari per liberare gli organelli senza danneggiarli. Si lavora in ghiaccio, con movimenti lenti per non produrre schiuma.

- Aggiungere inizialmente 1 mL di mezzo STE e 10 µL di inibitore delle proteasi al campione
- Omogenizzare con pestello
- Prendere una falcon da 15 mL e aggiungere 4 mL di mezzo STE e 40 µL di inibitore delle proteasi
- Spipettare

→ *Procedete direttamente alla Sezione 3.*

Gruppo B – Risospensione del pellet cellulare

Risospendere il pellet cellulare in mezzo STE per lisare le cellule prima di procedere con la centrifugazione differenziale.

- Aggiungere inizialmente 1 mL di mezzo STE e 10 µL di inibitore delle proteasi al campione
- Spipetta per risospendere il pellet cellulare
- Trasferire in una falcon da 15 mL e aggiungere 4 mL di mezzo STE e 40 µL di inibitore delle proteasi
- Spipettare

→ *Procedete alla Sezione 3.*

3. Centrifugazione differenziale

Prima di caricare il gradiente è necessario arricchire la frazione mitocondriale e rimuovere nuclei, detriti e citosol tramite centrifugazione differenziale.

Tabella 1. Fasi di centrifugazione (tutte a 4 °C).

Fase	RCF × tempo
C1 – 1ª chiarificazione	750 × g, 5 min
C2 – 2ª chiarificazione	750 × g, 5 min
C3 – raccolta mitocondri	10 000 × g, 6 min

- Eseguire la prima centrifuga a 750 × g, 5 min, 4 °C.
- Prelevare il surnatante e trasferirlo in una nuova falcon.
- Ripetere la centrifuga a 750 × g, 5 min, 4 °C
- Prelevare 1 mL di surnatante e trasferirlo in una eppendorf da 1.5 mL.
- Eseguire la centrifuga a 10 000 x g, 6 min.
- Scartate il surnatante e risospendete il pellet in 1 mL di STE freddo.

4. Gradiente discontinuo di saccarosio (15–55%)

Il gradiente viene costruito in una falcon da 15 mL stratificando **1 mL di ciascuno dei cinque strati**, partendo dal più denso (fondo) al meno denso (cima), e caricando 1 mL di campione in cima: totale 11 mL (vedere schema di stratificazione allegato).

Le tre regole fondamentali di questa corsa

1. Si stratifica sempre dal basso verso l'alto, partendo dalla soluzione più densa: il 55% va sul fondo, il 15% in cima. Un liquido più denso resta spontaneamente sotto a uno meno denso solo se non viene mescolato durante il caricamento.

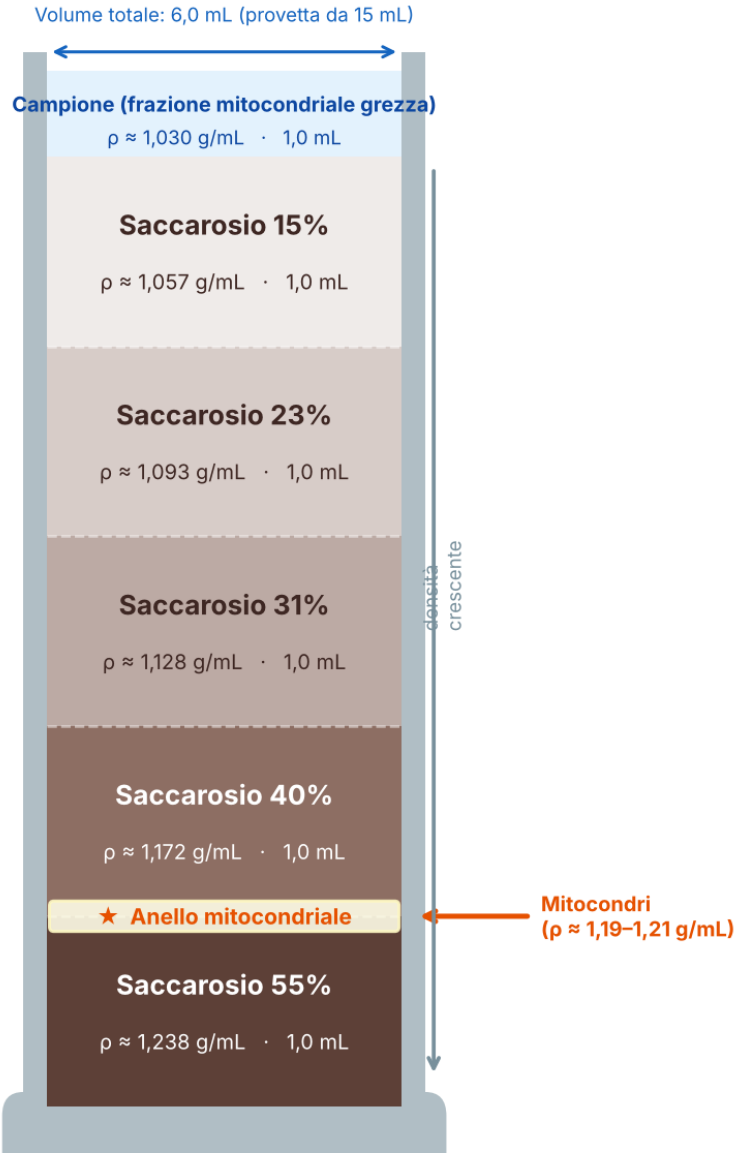
2. Il campione (1 mL di STE con mitocondri grezzi) va depositato sopra lo strato al 15%. La sua densità (STE ≈ 1,030 g/mL) è inferiore allo strato al 15% (ρ ≈ 1,057 g/mL), quindi rimane in superficie finché non inizia la centrifugazione.

3. Il freno (brake) va ESCLUSO e l'accelerazione deve essere sulla rampa più lenta. Una decelerazione brusca rimescola le interfacce e distrugge la separazione: è l'errore più comune in una corsa in gradiente.

- Depositate 1 mL di saccarosio al 55% (ρ ≈ 1,238 g/mL) sul fondo della provetta; questo strato funge da cuscino per il materiale più pesante.
- Stratificate sopra, nell'ordine, 1 mL al 40% (ρ ≈ 1,172 g/mL), poi 1 mL al 31% (ρ ≈ 1,128 g/mL), poi 1 mL al 23% (ρ ≈ 1,093 g/mL) e infine 1 mL al 15% (ρ ≈ 1,057 g/mL).
- Con la massima delicatezza, caricate 1 mL di frazione mitocondriale grezza sopra lo strato al 15%, lasciando scorrere lungo la parete.
- Posizionate le falcon in punti diametralmente opposti nel rotore.
- Centrifugate a 5 000× g per 15 minuti.
- Al termine, attendete che il rotore si fermi completamente prima di aprire. Estraete le provette senza agitarle. Osservatele in controluce.

Dove si trova l'anello dei mitocondri?

I mitocondri (ρ ≈ 1,19–1,21 g/mL) si raccolgono all'interfaccia tra il 40% e il 55%: la **penultima e l'ultima banda** contando dall'alto. Questo anello appare come una banda biancastra, lattiginosa e leggermente opaca. È la banda più ricca.



- Utilizzando una pipetta Pasteur in vetro, raggiungere lo strato corrispondente al 55%, prelevarlo e trasferirlo in una Eppendorf. Il campione così ottenuto sarà successivamente utilizzato per il dosaggio delle proteine mitocondriali.