



ESEMPIO
CENTRIFUGAZIONE

Sucrose Density Gradient Centrifugation

<https://www.youtube.com/watch?v=P8jkZAvM2AY>

Isolamento di mitocondri da fegato bovino mediante centrifugazione in gradiente di densità

Materiali

Pinzette d'acciaio e bisturi

Piastra petri da 100 mm

Pipette da 5 e 10 ml

Tubi da centrifuga

6 Falcon da 15 ml

Omogeneizzatore elettrico

Garza chirurgica

Imbuto di vetro

Micropipette e puntali

Pasteur di vetro e di plastica

Reagenti

Saccarosio

TES

EGTA

1M KOH

Percoll 100%

Cocktail inibitori delle proteasi

Soluzioni da preparare il giorno prima dell'esperimento

Buffer PERCOLL (BP) in H₂O bd. (250 ml)

300 mM Saccarosio (PM: 342.3)

10 mM TES (PM: 229.2)

0.2 mM EGTA (PM: 380.35)

Portare a pH 6.8 con KOH 1M

Soluzione 46% (w/v) di Saccarosio in BP (100 ml)

Buffer di Omogeneizzazione (HBM) in H₂O bd (250 ml)

300 mM Saccarosio (PM: 342.3)

5 mM TES (PM: 229.2)

0.2 mM EGTA (PM: 380.35)

Portare a pH 7.2 con KOH 1M

Soluzioni da preparare il giorno prima dell'esperimento

SOLUZIONE A (2.28% Saccarosio)

Soluzione 46% di Saccarosio in BP $\xrightarrow{20X}$ 2.28% (w/v)

10 ml : 500 μ l di Soluz. 46 % Saccarosio in BP

9.5 ml di BP

SOLUZIONE B (4.4% Saccarosio)

Soluzione 46% di Saccarosio in BP $\xrightarrow{10.45X}$ 4.4% (w/v)

10 ml : 957 μ l di Soluz. 46 % Saccarosio in BP

9.043 ml di BP

SOLUZIONE C (15.3 % Saccarosio)

Soluzione 46% di Saccarosio in BP $\xrightarrow{3X}$ 15.3% (w/v)

10 ml : 3.3 ml di Soluz. 46 % Saccarosio in BP

6.7 ml di BP

Il giorno dell'esperimento preparare le seguenti soluzioni:

Soluzione A* (10 ml)

8.2 ml di soluzione A + 1.8 ml di Percoll (100%) 18% (v/v)

Soluzione B* (10 ml)

7 ml di soluzione B + 3 ml di Percoll (100%) 30% (v/v)

Soluzione C* (10 ml)

4 ml di soluzione C + 6 ml di Percoll (100%) 60% (v/v)

Procedura

Controllare che la centrifuga sia accesa e verificare che sia inserito il rotore ad angoli fisso.

Aggiungere il cocktail di inibitori delle proteasi (100X) a 15 ml di HBM

Sminuzzare il fegato in piccoli pezzi nella piastra petri tenuta in ghiaccio

Addizionare i pezzetti di fegato nel potter in cui sono stati aggiunti precedentemente 5 ml di HBM

Omogeneizzare a velocità 7 (circa 20 strokes)

Aggiungere altri 10 ml di HBM

Filtrare l'omogenato attraverso 4 strati di garza da chirurgia con un imbuto di vetro

Dividere l'omogenato in 2 tubi da 15 ml

Centrifugare a 760xg, per 10 min

Recuperare il surnatante e scartare il pellet

Centrifugare a 8740xg, per 10 min

Nel frattempo preparare i tubi con gradiente di Percoll discontinuo: aggiungere con una pasteur prima 4 ml di soluzione C*, poi 4 ml di B* ed infine 4 ml di A*.

Dopo la seconda centrifugata, recuperare il pellet e risospenderlo in 350 μ l di HBM

Caricare il pellet risospeso con HBM nei tubi contenente il gradiente

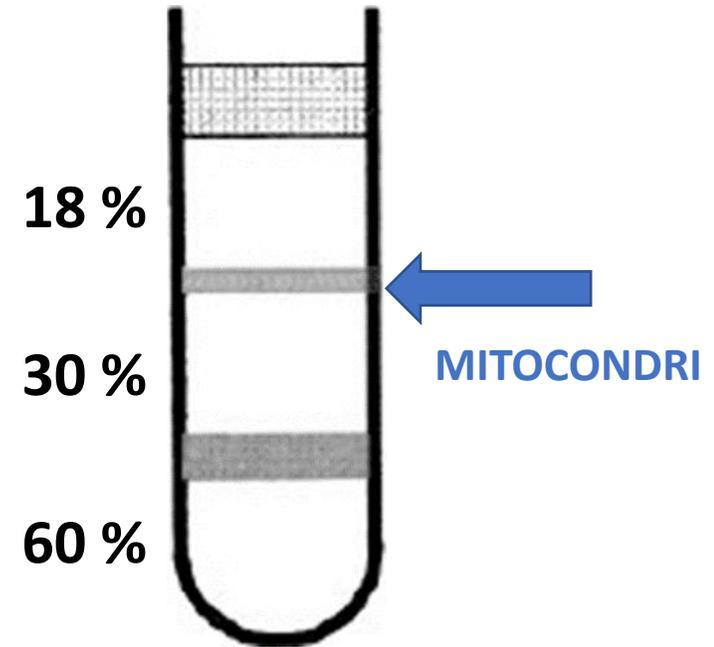
Centrifugare a 8740xg, per 10 min a 4° C

Recuperare i mitocondri nell'interfaccia tra A* e B* con una pasteur di vetro.

Unire i mitocondri recuperati a 10 ml di HBM in ghiaccio

Centrifugare a 6800xg, per 10 min

Risospendere il pellet in 500 μ l di HBM in ghiaccio



I mitocondri estratti potranno essere a questo punto utilizzati per altre indagini sperimentali!

Analisi della purezza delle frazioni

Per ciascuna classe di organuli si valuta un'attività enzimatica caratteristica (*marker subcellulare*)

- Membrane fosfatasi alcalina, saccarasi
- **Mitocondri** succinato deidrogenasi, citocromo c ossidasi
- Lisosomi fosfatasi acida
- Reticolo endopl. glucosio-6-fosfatasi
- Perossisomi catalasi
- Citosol lattato deidrogenasi
- Ribosomi RNA

Se la centrifugazione è stata efficace, l'attività specifica nella frazione purificata è maggiore dell'attività specifica di partenza

Attività specifica (U/mg proteine) = attività enzimatica / massa proteine