

PRÁCTICA 2: FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

FUNDAMENTO TEÓRICO

El **fraccionamiento subcelular** es un conjunto de técnicas que permiten separar determinados orgánulos o macromoléculas del resto de los componentes celulares. Es un paso previo necesario para estudiar su estructura y/o función.

La primera fase del fraccionamiento subcelular consiste en romper la membrana plasmática. Este proceso se denomina **homogeneización** y la disolución resultante es un **homogenado celular** o **extracto crudo**. A continuación, combinando diversas **técnicas de separación** como la centrifugación y la cromatografía, se puede purificar el orgánulo o la macromolécula deseada para utilizarlos en posteriores experimentos.

Durante todo el proceso hay que poner mucho cuidado para **que la muestra biológica mantenga intactas su estructura y su actividad**. De no ser así, estaremos perdiendo tiempo y desperdiciando los recursos del laboratorio. Para ello hay que tomar una serie de precauciones elementales como, por ejemplo, **utilizar siempre medios tamponados** (para evitar bruscas alteraciones del pH) y **trabajar siempre a 4 °C** (para minimizar la actividad de las proteasas).

El objetivo de esta siguiente práctica consiste en obtener cloroplastos de espinaca. La homogeneización se realizará por métodos mecánicos y los cloroplastos se aislarán mediante una centrifugación diferencial y una centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa.

Materiales y de reactivos (para 8 puestos de trabajo)

Dos tubos de centrífuga (para el rotor AM50.14)
Un tubo Falcon (con tapa de rosca) de 50 ml y 7 tubos Falcon de 15 ml
Un tubo Eppendorf de 2 ml
Pipeta automática de 100 a 1000 µl, puntas azules
Pipetas Pasteur de plástico
Vaso de precipitados, gradilla, embudo, gasa, tijeras
Balanza, homogeneizador (Ultra-turrax), centrifugadora refrigerada
Tampón Tris-HCl 0,02 M, 0,35 M NaCl, pH 7,5 (tampón Tris)
Sacarosa al 60% en el tampón Tris
Cubeta con hielo picado

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1.- Formación del gradiente de densidad de sacarosa (discontinuo)

Mientras se centrifuga la muestra empezamos a fabricar un **gradiente de densidad de sacarosa**. En este caso se va a crear un gradiente **discontinuo** superponiendo disoluciones de sacarosa cada vez menos concentradas. Las concentraciones de sacarosa que se van a utilizar para preparar el gradiente son: 20% (peso/volumen), 30%, 40%, 50% y 60%. Todas ellas se van a preparar a partir de una disolución de sacarosa al 60%

(la más concentrada) disuelta en tampón Tris siguiendo las indicaciones recogidas en la siguiente tabla:

Concentración final de sacarosa (p/v)	ml de sacarosa al 60% en tampón	ml de tampón Tris-HCl	Volumen final (ml)
60%	10	0	10
50%	5	1	6
40%	4	2	6
30%	3	3	6
20%	2	4	6

Todas las disoluciones se van a conservar en hielo para mantenerlas frías. De este modo será más fácil crear el gradiente discontinuo porque tendrán menos tendencia a mezclarse entre sí.

En un tubo de centrifuga de 50 ml se añaden los siguientes volúmenes de sacarosa:

- 8 ml de sacarosa al 60% (peso/volumen) en tampón Tris-HCl 0,02 M, 0,35 M NaCl, pH 7,5
- 6 ml de sacarosa al 50% (peso/volumen) en tampón Tris-HCl 0,02 M, 0,35 M NaCl, pH 7,5
- 6 ml de sacarosa al 40% (peso/volumen) en tampón Tris-HCl 0,02 M, 0,35 M NaCl, pH 7,5
- 6 ml de sacarosa al 30% (peso/volumen) en tampón Tris-HCl 0,02 M, 0,35 M NaCl, pH 7,5
- 6 ml de sacarosa al 20% (peso/volumen) en tampón Tris-HCl 0,02 M, 0,35 M NaCl, pH 7,5

Para que el gradiente salga bien hay que tomar las siguientes precauciones:

- Las disoluciones deben de estar bien frías (para ello, se mantienen en hielo)
- Con cada disolución se utiliza una pipeta Pasteur de plástico diferente
- Cada capa debe depositarse muy lentamente sobre la anterior, para evitar que se mezclen las disoluciones
- La sacarosa se añade sobre la pared del tubo, no sobre la capa líquida inferior
- Sobre la última capa se deposita la muestra biológica que consiste en 4 ml del sobrenadante de la centrifugación anterior

2.- Homogeneización

El material de partida son hojas de espinacas. Se pesan 5 gramos de hojas de espinacas. Se trocean con las tijeras, se introducen en un tubo Falcon de 50 ml y se añaden 20-25 ml de Tampón Tris-HCl. Para la homogeneización se utiliza la ultra-turrax hasta obtener una suspensión con un color verde intenso (1-2 minutos). Se filtra el homogenado utilizando una doble capa de gasa, recogiendo en uno de los tubos de la centrifugadora. De este modo eliminamos la mayor parte de los tejidos intactos y de los residuos de las paredes celulares.

3.- Centrifugación diferencial

Los tubos de centrifugadora con el homogenado que hemos filtrado (~ 20 ml) se equilibran con la balanza y se someten a una centrifugación diferencial (10 minutos a 2.000 rpm y a 4 °C) para que sedimenten las células enteras, núcleos y restos de la pared celular. Una vez terminada la centrifugación, se recogen ~ 8 ml del sobrenadante en un tubo Falcon de 15 ml (con tapa de rosca) y se descarta el *pellet*. Este sobrenadante se mantiene en hielo hasta que se tenga que utilizar en el siguiente paso.

Sabiendo que el radio del rotor AM50.14 es de 97 mm, calcula el campo centrífugo que se genera al centrifugar en estas condiciones.

4.- Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa

Se añaden con cuidado 4 ml del sobrenadante de la centrifugación anterior sobre el gradiente de densidad. Para ello se utilizará la pipeta automática. Se equilibran los tubos que contienen el gradiente utilizando una balanza. Cada pareja de tubos equilibrados se coloca en el rotor de ángulo fijo (AM50.14), uno frente al otro. El rotor debe de estar previamente refrigerado a 4 °C. Se centrifugan las muestras 30 minutos a 14.000 rpm y a 4 °C.

Tras la centrifugación se habrán formado diversas bandas. La que contiene cloroplastos se reconoce fácilmente por su color verde. Hay que tener en cuenta que esta separación no es completa, ya que normalmente duraría varias horas. Se extraen los cloroplastos con una pipeta Pasteur de plástico procurando que no se mezclen con otras bandas del gradiente y se guardan en un tubo Eppendorf de 2 ml.

Durante la centrifugación se hará una demostración práctica de cómo se genera un gradiente continuo de densidad y los distintos tipos de perfiles del gradiente que se pueden conseguir.

Cálculo de la densidad relativa de los cloroplastos

Se pesan 6 veces 100 µl de agua destilada. Se calcula la media y se utiliza ese dato para calcular la densidad del agua. Después, se pesan 6 fracciones de 100 µl de los cloroplastos extraídos del gradiente. Se calcula la media y se utiliza ese dato para calcular la densidad de los cloroplastos. Para calcular la densidad relativa de los cloroplastos se divide su densidad entre la del agua.