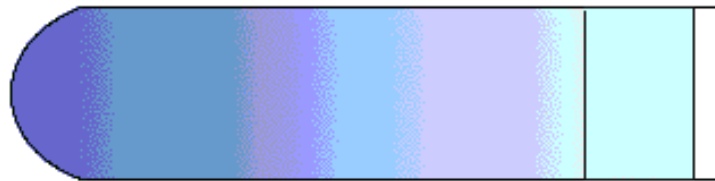


Fraccionamiento Subcelular

$$s = \frac{V}{C} = \frac{2/9 r^2 (d-d_0)}{\eta}$$



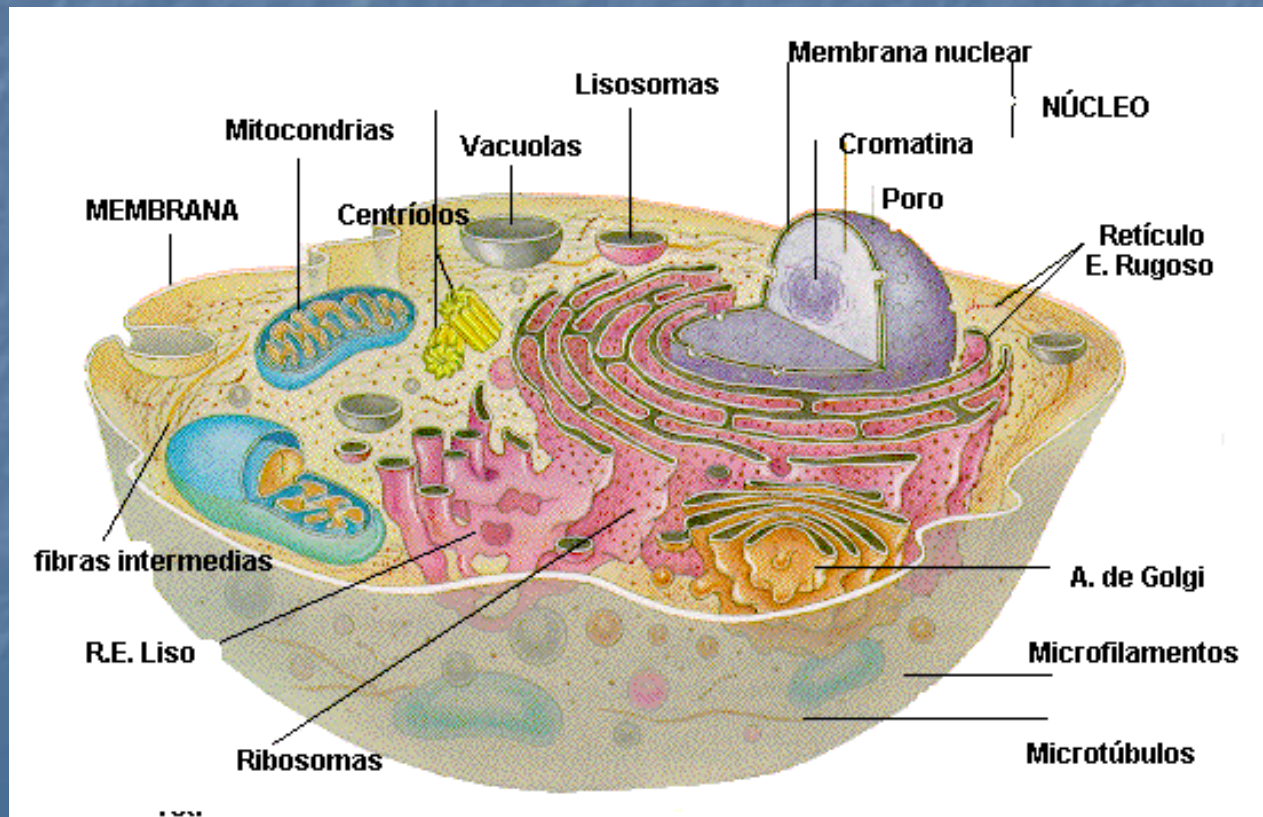
5 to 30 % Sucrose gradients

Protein sample

Molecules sediment according to their size, shape and density.

Todo proceso de fraccionamiento subcelular tiene dos etapas:

- ruptura de las células o tejidos(homogenización del tejido)
- separación de la fracción deseada por centrifugación



Técnicas de HOMOGENIZACIÓN

■ Métodos mecánicos:

- Sonicación
- Pasar las células por orificios provocando su ruptura.
- Homogenizadores(mortero, juguera, homogenizador de pistón)

■ Métodos químicos:

- Detergentes

Homogeneización

Objetivo: romper la membrana plásmica liberando los organelos en suspensión con un mínimo daño funcional y estructural

Medios mecánicos:

Morteros con y sin abrasivos (*tej. Vegetales*)

Homogenizadores tipo Potter (*tej. Animales*)

Homogenizadores tipo Dounce

Homogenizadores de alta velocidad

Tratamientos enzimáticos previos en algunos casos (aorta, músculo, algunos tumores)

Elastasa

Colagenasa

Hialuronidasa



Medio de suspensión

Baja viscosidad

Protección osmótica

Preservación de la membrana

Prevención de aglutinación

Prevención de adsorciones

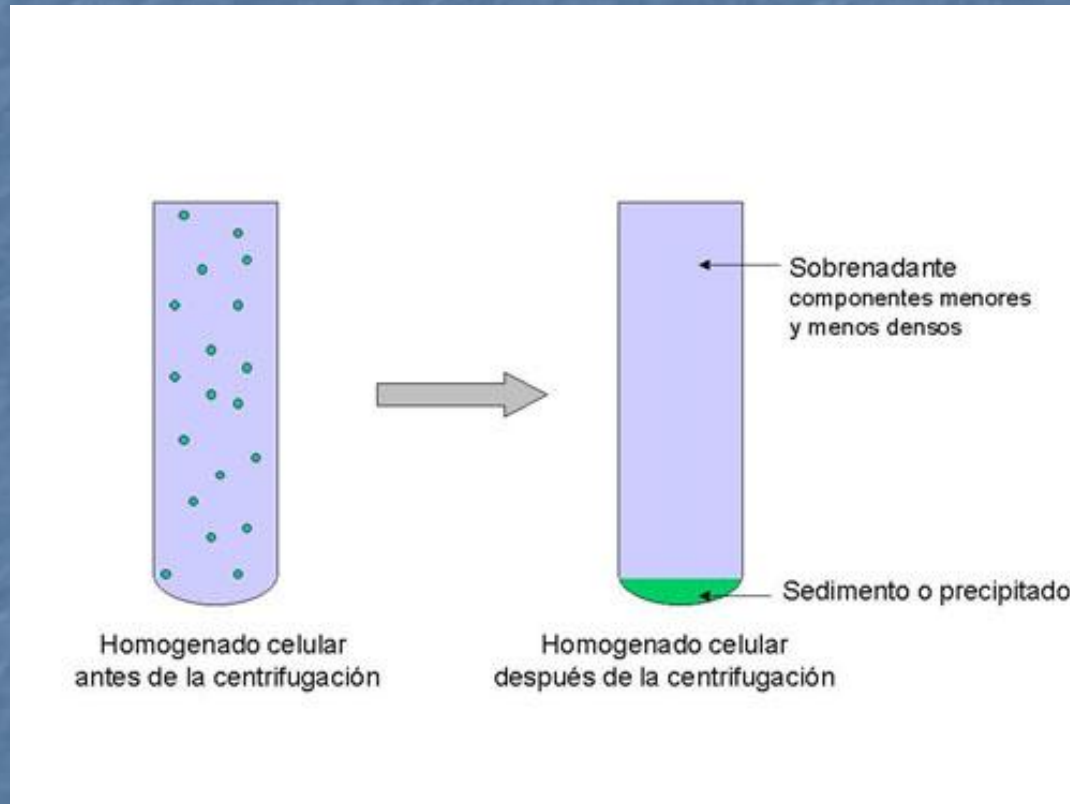
Sacarosa

Glucosa

Manitol

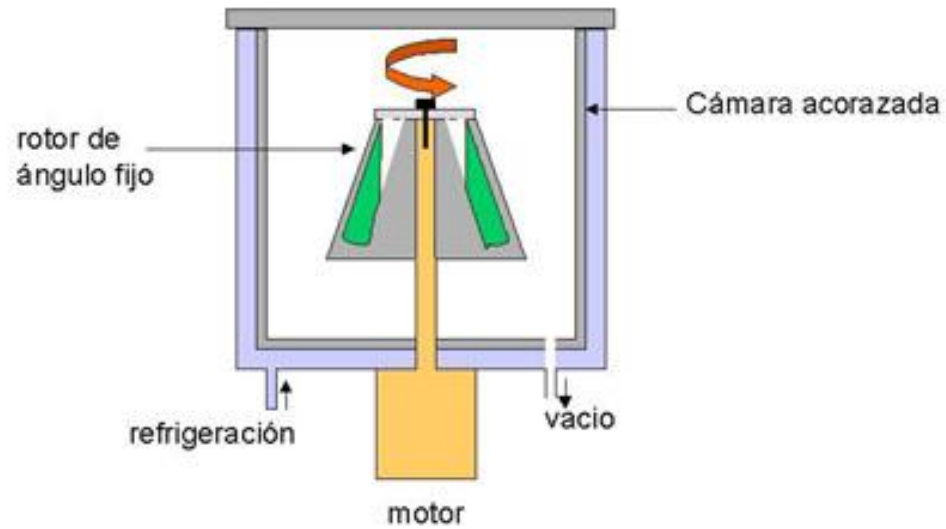
polialcoholes

Centrifugación



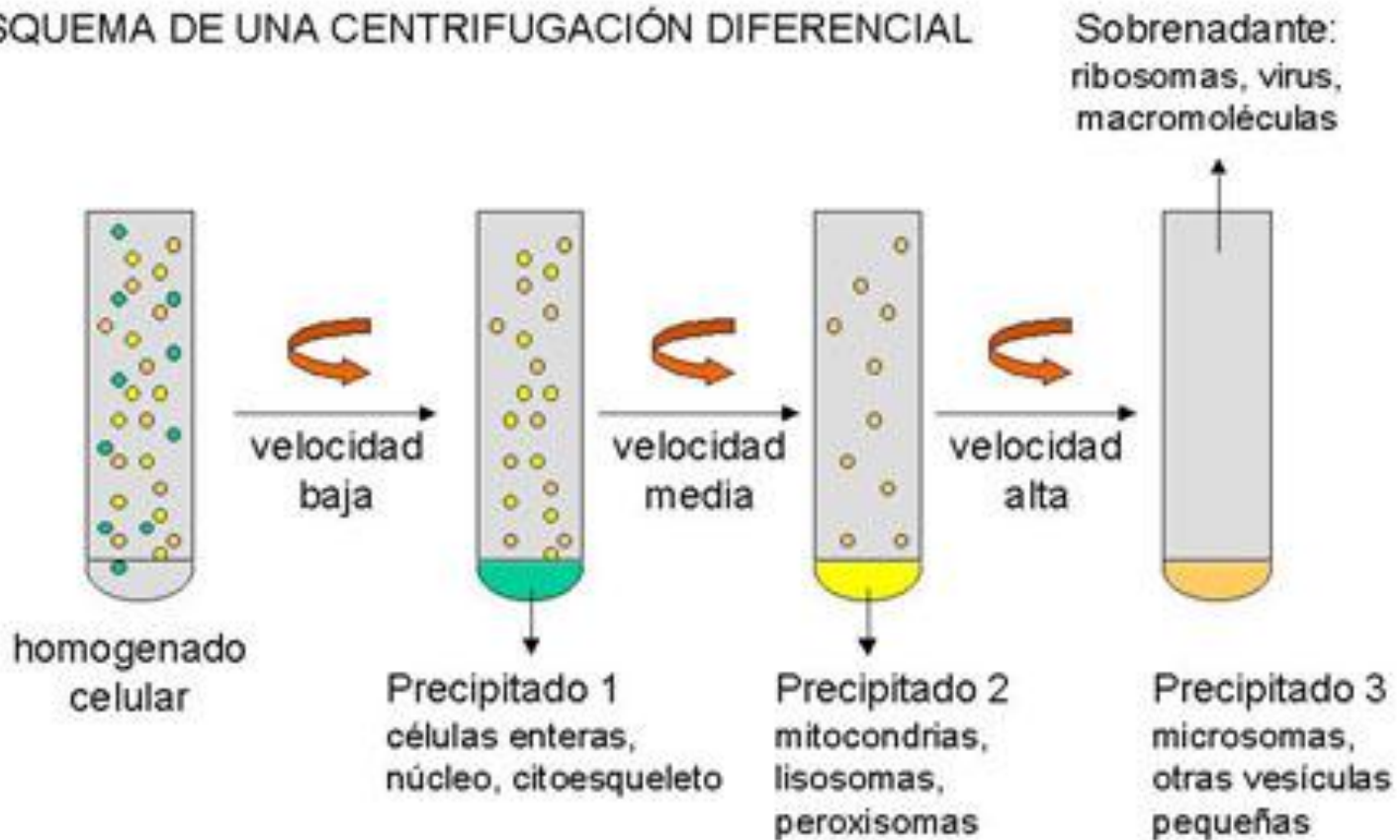
Esquema de una Ultracentrífuga

ESQUEMA BÁSICO DE UNA ULTRACENTRÍFUGA

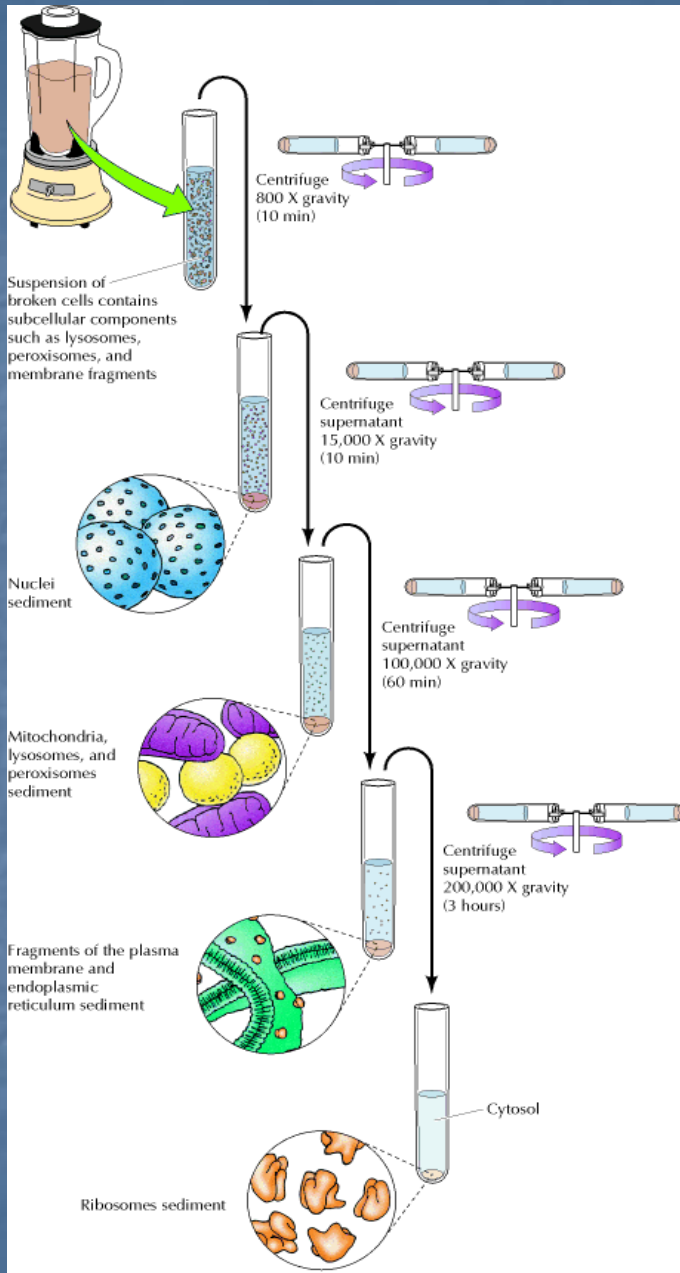


Centrifugación Diferencial

ESQUEMA DE UNA CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL



CENTRIFUGACION DIFERENCIAL



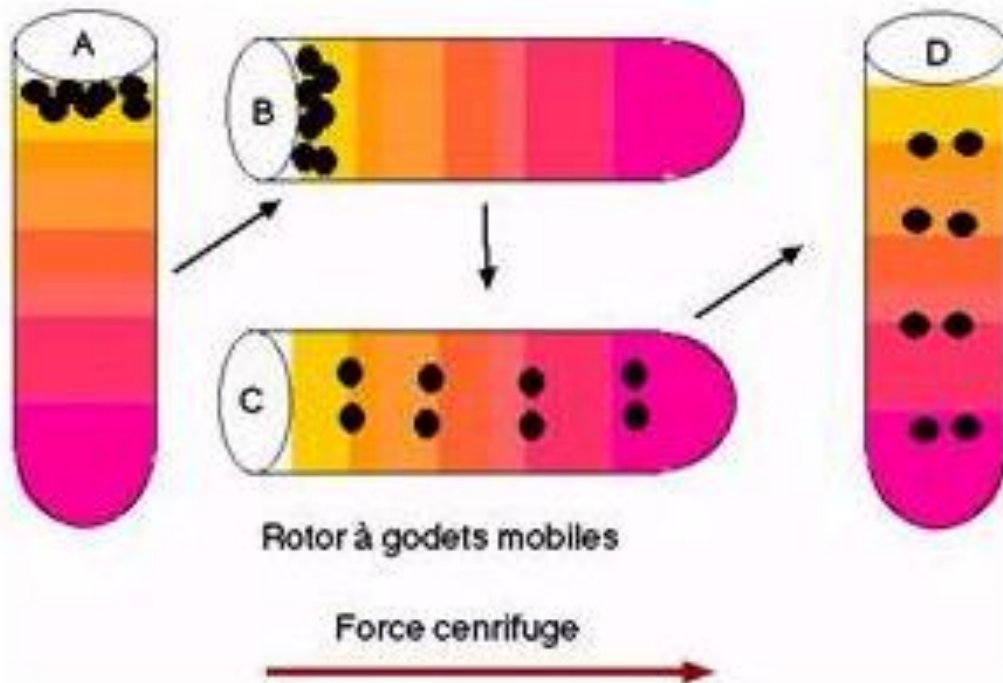
Fracciones	Contenido	g*min
N	núcleos	600*10min
M	mitocondrias	3000*10min
L	lisosomas	25000*10min
P	microsomas y membrana	100000*30min
S	fracción soluble	

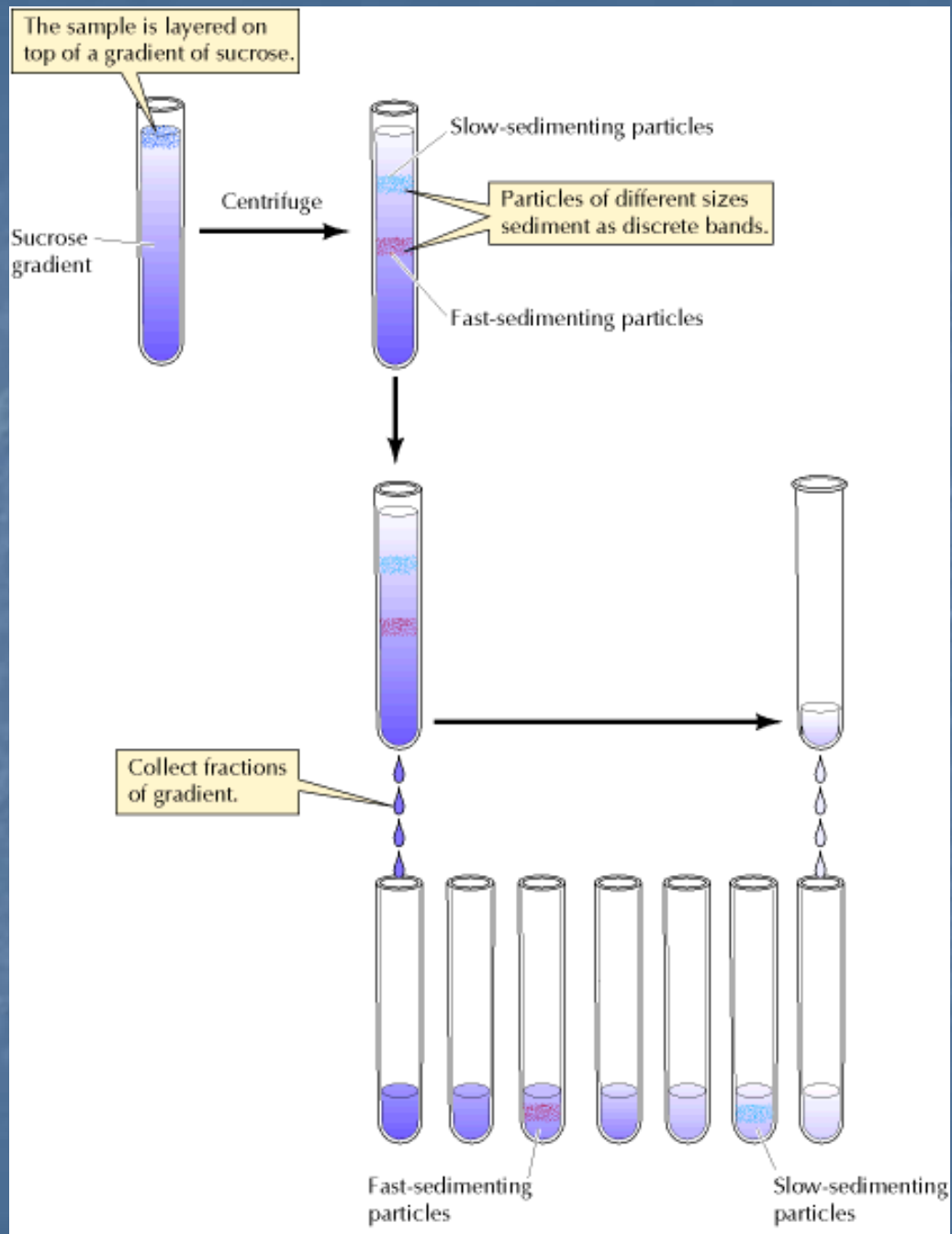
Centrifugación en Gradiente de Densidad (ISOPÍCNICA)

Permite la separación de la gran mayoría de los componentes celulares.

Densidad mayor en el fondo del tubo.

Los más utilizados:
Sacarosa
Percoll
Metrizamida
CsCl (muy corrosivo, rotor de titanio)



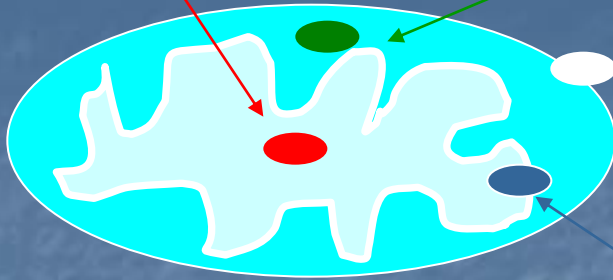


Uso de marcadores específicos.

- Se utilizan para evaluar la separación por fraccionamiento subcelular.
- Se basa en el uso de substratos para las enzimas características de cada organelo.

Malato dehidrogenasa

Sulfito citocromo c reductasa



Monoamino oxidasa

Citocromo c oxidasa



Lisosomas

N-acetil β -glucosaminidase
Fosfatasa ácida



Peroxisomas

Catalasa
Acyl-CoA oxidasa



RE - microsomas

NADPH citocromo c reductasa
Glucosa 6 fosfatasa

Aplicaciones en Biología celular.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en biología celular, por tanto, posee variadas aplicaciones:

- ↖ Identificación y caracterización de organelos.
- ↖ Entrega información acerca de la organización estructural y funcional de la célula.
- ↖ Reconocimiento de proteínas.
- ↖ Localización de actividades enzimáticas.
- ↖ Permite entender funcionamiento de la célula gracias al estudio de sus partes.