

## CICLO 2 : Fraccionamiento subcelular

**OBJETIVOS GENERALES:**

- 1) Obtención de preparados enriquecidos en fracciones subcelulares a partir de hígado de vaca.
- 2) Determinación del rendimiento y pureza de cada fracción.

**OBJETIVOS DE APRENDIZAJE:** Acercamiento del estudiante a las siguientes técnicas:

- 1) Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.
- 2) Medida de concentración proteica por métodos espectrofotométricos
- 3) Medida de componentes marcadores de las distintas fracciones subcelulares por espectrofotometría UV-visible.

### DIA 1

#### **Objetivo específico**

Obtención de preparados enriquecidos en fracciones subcelulares por medio de técnicas de centrifugación diferencial.

#### **Introducción**

El conocimiento detallado de los distintos componentes celulares y de sus funciones requiere que dispongamos de fracciones puras de los organelos celulares en cantidades adecuadas. El perfeccionamiento de los métodos de purificación de los distintos organelos celulares ha sido un logro trascendental para la Biología Celular.

En todos los procedimientos de fraccionamiento subcelular la centrifugación juega un rol preponderante. La mayor parte de estos procedimientos hacen uso de dos tipos de centrifugación:

- La centrifugación diferencial en la cual la separación se basa en la distinta velocidad de sedimentación de las partículas, en definitiva de la diferencia de masa y de densidad de las partículas. ⇒ **¿Qué es el coeficiente de sedimentación de una partícula, y cuál es su unidad de medida?**

- La centrifugación isopícnica donde las partículas se separan en virtud de su diferencia de densidad. La migración tiene lugar en el seno de un disolvente que presenta un gradiente continuo de densidad. El desplazamiento de la partícula se detiene cuando ésta encuentra un medio cuya densidad es igual a la propia.

En la obtención de fracciones subcelulares habitualmente se comienza realizando varias etapas sucesivas de centrifugación diferencial. Cada etapa se realiza de manera de que el producto: *fuerza centrífuga relativa x tiempo* sea mayor que en la etapa anterior. De esta manera en cada centrifugación se obtienen fracciones enriquecidas en distintos organelos, separados de acuerdo a su coeficiente de sedimentación. Para esta serie de centrifugaciones

se utilizan centrifugas de baja y alta velocidad para las primeras etapas, y eventualmente ultracentrifugas para las últimas. El refinamiento de la purificación frecuentemente se realiza mediante centrifugación isopícnica, donde partículas de igual coeficiente de sedimentación se separan de acuerdo a su diferencia de densidad. Para ello debe utilizarse una ultracentrifuga.  
**⇨¿Qué es la fuerza centrífuga relativa (RCF) y que relación tiene con la velocidad de centrifugación expresada en revoluciones por minuto (rpm)?**

### **Materiales**

- Hígado congelado
- Solución 1 (Sol. 1): Sacarosa 0,33 M,  $MgCl_2$  3 mM. Buffer Fosfato 10 mM pH 7,4

### **Procedimiento**

- 1) Cortar el hígado (aprox. 2g) en trozos pequeños y resuspenderlos en Sol.1 (10% w/v).
- 2) Homogenizar el tejido con un homogenizador Potter-Elvehjem a 1.100 rpm con 5 incursiones del émbolo, en hielo.
- 3) Filtrar en gasa el homogeneizado (H). Medir el volumen y conservar una muestra (~ 3 mL) a  $-20^{\circ}C$ .
- 4) Centrifugar el filtrado a  $4^{\circ}C$ , durante 10 min a 1.000 g .
- 5) El precipitado (P1) se resuspende con Sol. 1 (~ 3 mL) y se conserva en frío. Medir el volumen del precipitado (P1) resuspendido y del sobrenadante (S1) y conservar una muestra de cada uno a  $-20^{\circ}C$ .
- 6) El sobrenadante (S1) se centrifuga a  $4^{\circ}C$ , 20 min a 10000 g .
- 7) El precipitado (P2) se resuspende en un pequeño volumen de Sol. 1 (~ 3 mL). Se mide el volumen resultante de éste y del sobrenadante (S2) y se conservan a  $-20^{\circ}C$ .

*⇨¿Qué desventajas presenta el partir de una muestra de hígado de vaca, que ha sido previamente congelada?*

*⇨¿En qué condiciones realizamos el fraccionamiento subcelular (pH, temperatura, composición y osmolaridad del medio) y por qué?*

*⇨¿Cuántas son las rpm necesarias para llegar a las RCF propuestas en cada caso de acuerdo a las características del rotor?*

*⇨¿Cuáles podrían ser las fracciones obtenidas en P1 y P2 ?*

*⇨¿Qué procedimiento sencillo seguiría Ud. para aumentar el grado de pureza de los precipitados obtenidos en el fraccionamiento subcelular?*

*⇨¿Qué consecuencias podría traer aumentar a 2 horas la centrifugación del paso 3?*

## DIA 2:

- Objetivos Específicos:**
- 1) Identificación de las fracciones subcelulares aisladas en cada etapa de la centrifugación, mediante el uso de marcadores.
  - 2) Determinación del rendimiento y pureza (factor de purificación y existencia de fracciones contaminantes) de cada fracción.

### **Introducción**

Cuando se realiza el fraccionamiento subcelular de un tejido, se debe tener en cuenta el rendimiento y la pureza de cada fracción. Estos dos puntos se relacionan con el concepto de componentes marcadores. Se considera como marcador a una determinada actividad enzimática o biomolécula que se encuentra localizada únicamente en un compartimento subcelular. Por ejemplo, toda la citocromo oxidasa se localiza en la mitocondria, por tanto es un marcador de esta fracción. Así se han descrito enzimas marcadoras para cada fracción subcelular. Por su parte el ADN se ha utilizado como marcador de fracción nuclear, aunque se sabe que existe ADN en la mitocondria.

En preparaciones impuras como las nuestras, la concentración molar de la enzima no se conoce. La cantidad de enzima se expresa en términos de actividad medida en Unidades de enzima. ⇒ *¿Qué es una Unidad de enzima?*

Entonces la concentración de enzima ([Enz]) se puede expresar como Unidades de enzima por mL.

$$[\text{Enz}] = \text{Unidades} / \text{Volumen (U / mL)}$$

A medida que purificamos una fracción la concentración del componente marcador debe ir aumentando con respecto a la concentración total de proteínas. Por esto medimos la actividad específica (Ae).

$$\text{Ae} = \text{Actividad} / \text{mg proteína (U / mg)}$$

Es deseable que cada paso de la purificación tenga un rendimiento alto, es decir que se recupere una alta cantidad, del total, del componente en cuestión en cada paso. Cuando se calcula el rendimiento (R) de una fracción subcelular, se compara la actividad total (unidades totales) de una enzima marcadora recuperada en la fracción, con respecto a la actividad total de la misma en el homogeneizado. En teoría, la suma de una actividad particular en todas las fracciones subcelulares, debería ser igual a la actividad total de la enzima en el homogeneizado.

$$R = (\text{Unidades totales de la fracción} / \text{Unidades totales del homogeneizado}) \times 100$$

La pureza de una fracción subcelular se estima, en parte, tomando en cuenta la cantidad de marcador contaminante presente en la fracción. Por ejemplo la actividad citocromo oxidasa debería estar presente sólo en la fracción mitocondrial, y estar ausente en las fracciones microsomal o nuclear. Si aparece actividad citocromo oxidasa en estas últimas se considera

que es debido a contaminación mitocondrial.

Por otra parte el concepto de pureza se relaciona también con el enriquecimiento en actividad específica. La relación entre la actividad específica en la fracción mitocondrial y en el homogeneizado, se denomina factor de enriquecimiento o de purificación (FP).

$$FP = A_e \text{ en la fracción} / A_e \text{ en el homogeneizado}$$

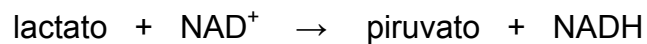
### **Materiales**

- Buffer fosfato 100 mM, pH 7,4
- Lactato 200 mM
- Dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) 10 mM
- Cianuro de potasio (KCN) 20 mM
- Diclorofenolindofenol (DCPIP) 0,25 mM
- Succinato 150 mM

### **Procedimiento**

#### a) Medida de Lactato Deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica que cataliza la siguiente reacción:



Buffer fosfato 100 mM, pH 7,4..... c.s.p. 1 mL  
Lactato 200 mM.....0.10 mL  
NAD<sup>+</sup> 10 mM.....0.10 mL

Se desencadena el ensayo, en la cuba del espectrofotómetro, con el agregado de..... $\mu$ L de la fracción en estudio y se determina la absorbancia a 340 nm cada 10-20 segundos ( $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Con los datos obtenidos se completa la tabla.

- ⇒ *¿De qué otra forma podríamos medir la actividad LDH?*
- ⇒ *¿Qué fracción esperamos que esté enriquecida en LDH?*
- ⇒ *Completar la tabla correspondiente en la pág. 7.*

#### b) Medida de Succinato Deshidrogenasa

La succinato deshidrogenasa (SDH) se encuentra ubicada en la membrana interna mitocondrial. Esta enzima cataliza la oxidación del succinato a fumarato con la consiguiente reducción del dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y este último cede sus electrones a la cadena respiratoria. La actividad enzimática se mide acoplado un aceptor de electrones que cambia de color (de azul a incoloro) al reducirse: el diclorofenolindofenol (DCPIP).

Buffer fosfato 100 mM, pH 7,4.....c.s.p. 1mL  
KCN 20 mM.....0.10 mL  
DCPIP 0.25 mM.....0.10 mL  
Succinato 150 mM.....0.10 mL

Se desencadena la reacción, en la cuba del espectrofotómetro, con el agregado de.....  $\mu$ L de la fracción en estudio y se determina la absorbancia a 600 nm cada 10 – 20 segundos ( $\epsilon_{600} = 20.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Con los datos obtenidos se completa la tabla.

- ⇒ *¿Porqué se agrega KCN?*
- ⇒ *¿De qué otra forma podríamos medir actividad SDH?*
- ⇒ *Completar la tabla correspondiente en la pág. 10*

### **DIA 3**

**Objetivo Específico:** Medida de la concentración proteica de las distintas fracciones obtenidas por centrifugación (H, P1, S1, P2, S2), utilizando reactivo de Biuret.

#### **Materiales**

- Reactivo de biuret
- Agua destilada
- Solución de proteína (BSA) de concentración conocida (estándar 10 mg/mL)
- Fracciones en estudio (H, P1, S1, P1, S2)

#### **Procedimiento**

- 1) Preparar una serie de tubos que contengan:
  - a) Un tubo con 0.5 mL de agua (blanco)
  - b) Tubos con 0.5 mL de una solución que contenga de 1 a 10 mg/mL de BSA (preparar duplicados de tubos con 7 concentraciones diferentes).
  - c) Tubos con 0.5 mL de cada fracción a ensayar en 3 diluciones distintas (1/2, 1/5, 1/10, cada una por duplicado).
- 2) Agregar 2 mL de reactivo de biuret a cada tubo, mezclar y dejar reposar 30 min a temperatura ambiente (o 10 min a 37° C).
- 3) Leer a 550 nm contra blanco (2 mL de reactivo de biuret y 0.5 mL de agua).
- 4) Graficar los datos de absorbancia a 550 nm vs concentración de proteína.
- 5) Determinar a partir de la gráfica el coeficiente de extinción, la sensibilidad del método y la concentración de cada una de las fracciones.

⇒ *¿Qué composición tiene el reactivo de biuret y cuál es la base del ensayo?*

⇒ *¿Qué ventajas y desventajas tiene el método de biuret?*

⇒ *¿Existen otros métodos espectrofotométricos para determinar concentración proteica?, ¿cuáles son y en qué se basan? ¿qué sensibilidad tienen? ¿qué interferencias presentan?*

**Tabla**

| Tubo | H <sub>2</sub> O (mL) | BSA (mL) | Biuret (mL) | [BSA] <sub>f</sub><br>(mg/mL) | Absorbancia |
|------|-----------------------|----------|-------------|-------------------------------|-------------|
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |
|      |                       |          |             |                               |             |

## **DIA 4**

**Objetivo Específico:** 1) Medida de la concentración de ácido desoxi-ribonucleico (ADN) en las distintas fracciones  
2) Determinación del rendimiento y pureza (factor de purificación y existencia de fracciones contaminantes) de cada fracción

### **Materiales**

- Acido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0.5 M
- Estándar de ADN 800  $\mu\text{g/mL}$
- Solución de difenilamina (DFA) 1% (w/v): 1g de DFA en 100 mL de ácido acético glacial + 2,75 mL de ácido sulfúrico.

### **Introducción**

La desoxi-ribosa en soluciones fuertemente ácidas se deshidrata dando aldehído 5-hidroxilevulínico. Este aldehído se condensa con la difenilamina (DFA) dando un compuesto de color azul que absorbe a 595 nm. Esta reacción puede ser usada para cuantificar la cantidad de ADN presente en cada fracción, para ésto debemos construir una curva de calibración midiendo la absorbancia de cantidades conocidas de ADN.

Debido a que tanto la sacarosa, presente en el medio de purificación (Sol.1), como las proteínas interfieren con este ensayo, se precipitan el ADN y las proteínas con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) . El precipitado se resuspende en  $\text{HClO}_4$  y se calienta de manera de hidrolizar el ADN. Se centrifuga y al sobrenadante se le agrega DFA.

### **Procedimiento**

1) Tratamiento de las muestras

Fracción (P1 y P2).....0.1 mL  
Fracción (H, S1 y S2).....0.3 mL  
 $\text{HClO}_4$  0.5 M.....1.0 mL

Colocar en tubos y centrifugar durante 5 min a 5.000 rpm. Descartar el sobrenadante.

⇒ ¿Qué encuentro en el sobrenadante y qué en el precipitado?

Resuspender el precipitado en 0.6 mL de  $\text{HClO}_4$  . Incubar 20 min en baño a 70°C. Centrifugar 5 min a 10000 rpm. Conservar el sobrenadante. ⇒ ¿Qué encuentro en el sobrenadante y qué en el precipitado?

2) Curva de Calibración

A partir de la solución de ADN estándar, previamente tratada con  $\text{HClO}_4$  (800 $\mu\text{g/mL}$ ) se prepara una serie de tubos con la siguiente composición:



|                       |     |      |     |      |      |      |
|-----------------------|-----|------|-----|------|------|------|
| ADN (mL)              | 0   | 0.05 | 0.1 | 0.20 | 0.30 | 0.40 |
| H <sub>2</sub> O (mL) | 0.5 | 0.45 | 0.4 | 0.30 | 0.20 | 0.10 |
| DFA (mL)              | 0.8 | 0.8  | 0.8 | 0.8  | 0.8  | 0.8  |
| [ADN] (µg/mL)         |     |      |     |      |      |      |

### 3) Medida de absorbancia

Para las fracciones se preparan tubos que contengan 0.5 mL del sobrenadante y 0.8 mL de DFA, mezclar bien.

Incubar todos los tubos (fracciones y curva de calibración) 10 min a 100°C. Enfriar hasta temperatura ambiente y leer a 595 nm.

Utilizando la curva de calibración determinar la concentración de ADN (mg/mL) en cada fracción y completar la tabla.

## Tablas

### a) Lactato Deshidrogenasa

| Fracción | [Enz]<br>(U/mL) | [prot.]<br>(mg/mL) | Ae<br>(U/mg) | Vol.<br>(mL) | A <sub>T</sub><br>(U) | R | FP |
|----------|-----------------|--------------------|--------------|--------------|-----------------------|---|----|
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |

### b) Succinato Deshidrogenasa

| Fracción | [Enz]<br>(U/mL) | [prot.]<br>(mg/mL) | Ae<br>(U/mg) | Vol.<br>(mL) | A <sub>T</sub><br>(U) | R | FP |
|----------|-----------------|--------------------|--------------|--------------|-----------------------|---|----|
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |
|          |                 |                    |              |              |                       |   |    |

### c) ADN

| Fracción | [ADN]<br>(mg/mL) | [prot.]<br>(mg/mL) | mg de ADN/<br>mg de prot. | Vol.<br>(mL) | mg <sub>T</sub> de<br>ADN | R | FP |
|----------|------------------|--------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|---|----|
|          |                  |                    |                           |              |                           |   |    |
|          |                  |                    |                           |              |                           |   |    |
|          |                  |                    |                           |              |                           |   |    |
|          |                  |                    |                           |              |                           |   |    |
|          |                  |                    |                           |              |                           |   |    |