**TP 3 : SEPARATION DES ORGANITES CELLULAIRE PAR CENTRIFUGATION**

**Le but de TP**

1. Réalisation d’un gradient discontinu de saccharose ;
2. Séparation d’organites cellulaire par centrifugation.

**Principe**

La centrifugation est une technique basée sur la séparation des fractions cellulaires des liquides non miscibles de différentes densités. Lors de la centrifugation en gradient discontinu les composés les plus denses vents descendre au fond de tube et les plus légère se déplacent au dessus. Donc, les organites se trouve ainsi séparer en plusieurs fractions.

**Matériel et produits chimiques**

1. Echantillon : Salade, racine de carotte et tomate
2. Matériel : Centrifugeuse

Tubes à centrifugées

Mortier

Agitateurs

Papier filtre

Pipetes 1ml et 2ml

1. Produit chimique : Saccharose et eau distillée

**Mode opératoire**

1. **Réalisation d’un gradient de densité discontinu de saccharose**

On prépare 3 solutions de saccharose dont les concentrations sont différentes (70%, 30% et 5%). Le gradient discontinu est formé par des dépôts successifs de solution de saccharose de densité décroissante. Dans un tube, mettre 2ml de saccharose 70% verticalement, ensuite 2ml de saccharose 30% position de tube oblique. Enfin, 2ml de saccharose 5% position de tube oblique.

1. **Préparation de l’échantillon**

On fait broyer les 3 échantillons dans une solution de saccharose 3% de façon séparé, puis on fait la filtration, pour obtenir des solutions dépourvues de débris cellulaires

1. **Centrifugation préparatoire**

On met 3ml de chaque échantillon dans les tubes de centrifugeuse à une vitesse de 4000 tours par minute pendant 10 mn. Chaque tube contient : culot et surnageant.

1. **Centrifugation analytique**

On prélève 0.5ml de chaque échantillon et on l’incube goutte à goutte dans le gradient discontinu de saccharose. On met les tubes dans une centrifugeuse à une vitesse de 4000 tours par mn pendant 20mn.