



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto
„Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų
plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios
technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 321. BIOCHEMIJA

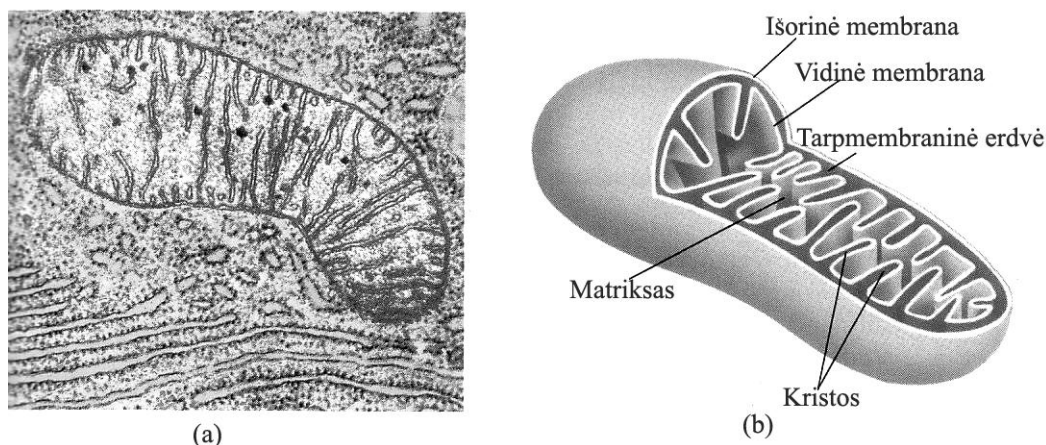
Laboratorinis darbas

Kepenų mitochondrijų išskyrimas

MEDŽIAGŲ APYKAITA. OKSIDACINIS FOSFORILINIMAS OKSIDACINIS FOSFORILINIMAS

Oksidacinis fosforilimas yra pagrindinė mitochondrijų funkcija aerobinėse ląstelėse. Mitochondrijos po branduolio yra antri pagal dydį eukariotinių ląstelių organoidai. Tipinė žinduolių ląstelės mitochondrija yra 0.5 - 2 μm dydžio. Mitochondrijų forma, dydis ir išsidėstymas ląstelėje priklauso nuo ląstelės rūšies. Kepenų ląstelėse jos apvalios, širdies ląstelėse - pailgos formos. Raudonųjų skeleto raumenų ir miokardo ląstelės turi žymiai daugiau mitochondrijų nei kepenų ir baltųjų skeleto raumenų ląstelės, t.y, jų kiekis proporcingas energetiniams audinio poreikiams.

Visų rūšių ląstelių mitochondrijų mikroskopinis vaizdas panašus (1 pav.). Šiuos organoidus sudaro dvi membranos, tarp kurių yra siauras (6-8 nm) tarpas.



Pav. Mitochondrijos elektronmikroskopinė nuotrauka (a) ir skersinio pjūvio modelis (b)
(Garret ir Grisham, 1995).

Išorinė mitochondrijų membrana lygi, sudaryta iš 50% lipidų ir 50% baltymų. Vidinės membranos cheminė sudėtis skiriasi nuo išorinės - joje baltymai sudaro 80%, o lipidai - tik 20%. Vidinės membranos paviršius yra žymiai didesnis už išorinės, todėl joje susidaro klostės, giliai įsiterpusios į mitochondrijų vidų, vadinamos **kristomis**. Nors abi membranos yra fosfolipidų dvisluoksnis, jų lipidų cheminė sudėtis skiriasi, pavyzdžiui, fosfolipido kardiolipino yra tik vidinėje membranoje. Skirtinga membranų sudėtis ir struktūra nulemia jų skirtingą laidumą įvairiems junginiams ir jonams. Išorinė membrana pralaidi molekulėms, kurių molekulinė masė iki 5-10.000 Da, nes joje daug integralinio baltymo porino, sudarančio poras. Išorinėje membranoje nedaug fermentų.

Vidinė membrana nelaidi nei jonams, nei kitiems junginiams. Čia jonų ir kitų junginių pernaša vyksta dalyvaujant specifiniams nešikliams. Vidinėje membranoje labai daug fermentų. Tai kvėpavimo grandinės kompleksai, sukcinato dehidrogenazė, glicerolio fosfatdehidrogenazė, ATP-sintazė, specifiški baltymai-nešikliai ir t.t. Vidinės membranos fermentu-žyme yra citochromoksidazė. Tarpas tarp membranų (tarpmembraninė erdvė) užpildytas vandenine terpe, kurioje yra keli fermentai, susiję su energijos perdavimu: nukleozidų difosfatkinazė (adenilato kinazė) ir kreatino kinazė.

Mitochondrijų vidinė dalis vadinama **mitochondrijų užpildu** (angl. k - matrix). Jame yra plonų siūlo formos struktūrų ir granulijų. Užpilde yra gausu fermentų, daugumoje tai medžiagų oksidacijos fermentai - riebalų rūgščių oksidacijos (β -oksidacijos), Kребso ciklo fermentai, piruvato dehidrogenazė, dalis aminorūgščių

oksidacijos fermentų ir kiti. Užpildo fermentai-žymės yra malato dehidrogenazė ir glutamato dehidrogenazė.

Mitochondrijų funkcijos tiriamos, išskyrus jas iš ląstelių gana nesudėtingu diferencinio centrifugavimo metodu. Išskyrimo metu svarbiausiai kuo mažiau pažeisti membranas, nes tai iškreipia mitochondrijų funkcijas. Todėl vartojami izotoniniai ir tinkamo pH buferiniai tirpalai. Išskyrimas atliekamas žemoje temperatūroje, kad sumažėtų proteolitinių ir kitų fermentų aktyvumas.

Reagentai: 200 ml 0,9% KCl tirpalas

Homogenizacijos terpė (HT):

Sacharozės 250 mM (8,56 g);

Tris-HCl 10 mM (121,2 mg);

EGTA 5 mM (101,2 mg);

2 mg/ml jaučio serumo albumino;

Bidistiliuoto H₂O iki 100 ml;

pH 7,7 (+2 °C temperatūroje).

Suspendavimo terpė (ST):

Sacharozės 250 mM (8,56 g);

Tris-HCl 5 mM (60,6 mg);

Bidistiliuoto H₂O iki 100 ml;

pH 7,3 (+2 °C temperatūroje).

Paruošiama 200 ml 0,9% KCl tirpalo. Atsveriamas 1,8 g KCl ištirpinamas distiliuotame vandenyje, praskiedžiama iki 200 ml.

Gaminant HT ir ST, atsverti reagentai (išskyrus albuminą) tirpinami maždaug 75 ml H₂O, tirpalai atšaldomi iki +2°C. Po to į jį lašinamas praskiestas HCl tirpalas tol, kol pH pasiekia 7,7 (HT) ir 7,3 (ST) ir visas mišinys praskiedžiamas iki 100 ml. Tirpalai laikomi šaldytuve minusinėje temperatūroje. Albuminas į HT pridedamas prieš darbą.

Mitochondrijos išskiriamos diferencinio centrifugavimo metodu šaltoje patalpoje 0 - 4 °C temperatūroje.

Darbo eiga:

1. Žiurkės kepenys plaunamos mažoje stiklinėlėje 0,9% KCl tirpale kelis kartus pamaigant pincetu. Po to organas išimamas, nuo jo nukarpomas jungiamasis audinys, riebalai.

2. Širdis įdedama į kitą stiklinėlę, kurioje yra 0°C 0,9% KCl tirpalas ir vėl praplaunama pamaigant pincetu. Organas išimamas, nusauginamas filtriniu popieriumi ir pasveriamas. Pagal kepenų svorį imamas HT kiekis (1g audinio imama 10ml HT).

3. Kepenys susmulkinamos mažoje stiklinėje žirkutėmis, laikant indą ant ledu, ir po to praplaunama 0,9% KCl tirpalu.

4. Sukarpytas audinys perkeliamas į homogenizatorių ir užpilamas anksčiau apskaičiuotu HT kiekiu. Homogenizuojama 20-30 sekundžių (homogenizatorius turi būti prieš tai praplautas HT tirpalu ir įmerktas į indą su ledais).

5. Homogenizatas supilstomas centrifuginius mėgintuvėlius (mėgintuvėlių skaičius turi būti porinis). Poroje esančių mėgintuvėlių svoriai apytiksliai sulyginami. Centrifuguojama 750 × g greičiu 5 min (poroje esantys mėgintuvėliai dedami vienas prieš kitą).

6. Baigus centrifugavimą, supernatantas perkošiamas per dvigubą marlės sluoksnį į kitus centrifuginius mėgintuvėlius, nenupilant nuosėdų, esančių paskutiniuose supernatanto lašuose.

7. Mėgintuvėliai nutaruojami (sulyginami poroje esančių mėgintuvėlių svoriai). Jei mėgintuvėlių skaičius nelyginis, likęs mėgintuvėlis nutaruojamas imant į porą mėgintuvėlių su vandeniu. Į centrifugos rotorių poroje esantys mėgintuvėliai dedami vienas prieš kitą ir centrifuguojama 7000 × g greičiu 10 min.

8. Gautas supernatantas nupilamas, o mitochondrijų nuosėdos suspendatoriaus pagalba suspenduojamos ST terpėje (apie 20 ml), ir dar kartą centrifuguojamos 7000 × g greičiu 10 min. Tai daroma norint praplauti likusias mėgintuvėlyje EDTA liekanas.

9. Gautas supernatantas išpilamas, mėgintuvėliai statomi dugnu į viršų ant filtrinio popieriaus ir palaukiama 1 – 2 min.

10. Mitochondrijos suspenduojamos suspendatoriaus pagalba. Pirmiausiai pilama po 0,20 ml ST į kiekvieną mėgintuvėlį su mitochondrijų nuosėdomis. Tuomet suspendatoriumi atsargiai suspenduojama, o po to iš kiekvieno mėgintuvėlio turinys supilamas į vieną iš jų - surenkama į mėgintuvėlį. Likęs mėgintuvėliuose suspensijos likutis surenkamas pipetės pagalba ir supilamas į surenkamąjį mėgintuvėlį, kuriame vėl suspenduojama iki vienalytės masės.

10. Mėgintuvėlis su mitochondrijų suspensija uždengiamas dangteliu ir įstatomas į indą su ledais (leduose turi būti truputis vandens geresniam kontaktui). Mėgintuvėlio negalima iškelti iš ledų visą darbo laiką.