



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 411. Ląstelės biologija

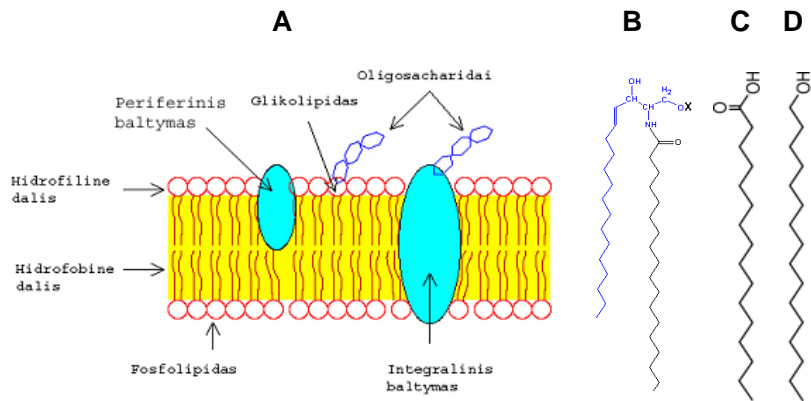
Laboratorinis darbas

Biologinių membranų savybės

Teorija

Biologinės membranos yra sudarytos iš lipidų bisluoksnio kuriame išsidėstę baltymai (Pav. 1). Lipidai yra amfifilinės molekulės sudarytos iš hidrofiliinės dalies kuri būna atsukta į membranos išorę ir hidrofobinės dalies, atsuktos į bisluoksnio vidų (Pav. 1). Hidrofobinė lipido dalis paprastai būna sudaryta iš įvairaus ilgio, paprastai nešakotos, angliavandenilinės grandinės. Į biologinių membranų sudėtį taip pat įeina vienas iš sterolių, t.y. cholesterolis, kuris atlieka ląstelių membranų struktūrizavimo vaidmenį. Steroliai būna sudaryti iš keturių susijungusių anglies atomų žiedų, besiskiriančių vienas nuo kito funkcinėmis grupėmis. Dėl savo hidrofobinės prigimties steroliai lengvai patenka į visas ląsteles ir kai kurie iš jų dalyvauja signalų perdavime (t.y. veikia kaip hormonai).

Yra žinoma, kad alkoholiai didina biologinių membranų pralaidumą. Šis gebėjimas yra tiesiogiai proporcingas alkoholio anglies grandinės ilgiui (t.y. kuo ilgesnė anglies grandinė, tuo pralaidesnė darosi membrana). Alkoholiai sukelia membranų dehidraciją ir dėl to gali suirti membranos vientisumas (susidaro poros). Dėl struktūrinio panašumo su membranos lipidais, ilgos grandinės alkoholiai (palyginti Pav. 1 B, C ir D) gali išsiskverbti tarp membranos fosfolipidų. Padidinus sterolių-lipidų santykį membranoje (pvz. choleste-



Pav. 1 Membranos sandara. *A* Biologinė membrana sudaryta iš lipidų bisluoksnio su jame išsidėsčiusiais baltymais. *B* membranos lipidai. *C* Riebalų rūgštis. *D* Ilgos grandinės alkoholis.

rolio, β -stigmasterolio arba sistosterolio) ji pasidaro mažiau tiki, sukietėja ir pasidaro atsparesnė alkoholių poveikiui. Yra manoma, kad tik plokščios konfigūracijos steroliai (pvz. cholesterolis, β -stigmasterolis, sistosterolis) yra fiziologiškai aktyvūs, kadangi tik jie gali pereiti per membraną. Taip pat fiziologinis sterolių poveikis priklauso nuo krūvio pasiskirstymo molekulėje (pvz. priešingai nei cholesterolis, ergosterolis didina alkoholių sukeltą membranos pralaidumą). Kalcio jonai taip pat stabilizuoja membranas ir gali apsaugoti nuo žalingo alkoholių poveikio.

Vandenilio peroksidas (H_2O_2), kuris gali susidaryti mitochondrijose veikiant elektronų transporto grandinei kai O_2 yra nepilnai redukuojamas iki H_2O , yra gana stiprus oksidatorius ir gali sukelti fosfolipidų peroksidaciją ir taip pažeisti membraną. Priešingai nei alkoholių sukeltos membranos pažaidos, H_2O_2 sukeltos membranos pažaidos yra negrįžtamos, t.y. pažeistas lipidai turi būti pašalintas iš membranos veikiant specialioms fermentams fosfolipazėms ir pakeistas nauju. Dėl šios priežasties nei kalcis nei tokie steroliai kaip cholesterolis, β -stigmasterolis, sistosterolis (nes neturi antioksidacinių savybių) negali apsaugoti membranos nuo žalingo H_2O_2 poveikio. Įdomu tai, kad priešingai nei aukščiau paminėti steroliai α -tokoferolis (vitaminas D), kuris taip pat yra sterolis, pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis.

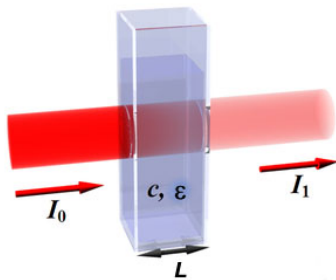
Metodologija

Šiame darbe membranų pažeidimui įvertinti jūs naudosite spektrofotometriją. Spektrofotometrijos pagalba kiekybiškai įvertinama kiek šviesos prie tam tikro bangos ilgio sugeria tiriamasis pavyzdys. Visos medžiagos prie joms būdingo bangos ilgio sugeria šviesos energiją (bangos ilgis gali kisti nuo radijo iki gama bangų). Net medžiagos, kurios mums atrodo visai skaidrios (pvz. vanduo, stiklas) absorbuoja ultravioletinėje ar infraraudonoje srityje (vanduo šiek tiek absorbuoja ir matomą raudoną šviesą, dėl to stori jo sluoksniai atrodo melsvi). Beer-Lambert dėsnis aprašo empirinį sąryšį tarp medžiagos sugertos šviesos (absorbcijos) ir tos medžiagos savybių (Pav. 2):

$$A = \lg \frac{I_0}{I_1} = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

kur A – absorbcija, I_0 – kritusios šviesos intensyvumas, I_1 – mėginį praėjusios šviesos intensyvumas, ε – ekstinkcijos koeficientas (dar vadinamas molinės sugerties koeficientu), L – šviesos kelias (kiuветės plotis), c – medžiagos koncentracija.

Iš formulės matyti, kad absorbcija yra tiesiai proporcinga medžiagos koncentracija, t.y. kuo daugiau medžiagos yra tirpale, tuo daugiau šviesos ji absorbuos. Spektrofotometrija ultravioletinėje (< 400 nm) ir matomos šviesos srityje (400 – 750 nm) dažnai naudojama medžiagų koncentracijai spalvotuose tirpaluose nustatyti. Šviesos absorbcijos matavimas atliekamas prietaisu vadinamu spektrofotometru.



Pav. 2 Beer-Lambert dėsnio iliustracija. Spektrofotometrinėje kiuvetėje, kurios plotis L , esančios tiriamos medžiagos tirpalo savybės (medžiagos koncentracija c ir medžiagos ekstinkcijos koeficientas ε) nulemia kiek ant kiuvetės kritusios šviesos I_0 praeis pro kiuvetę (I_1) ir kiek bus sugerta.

Raudoni burokai yra patogus objektas membranų pažeidimams tirti, kadangi jų ląstelėse yra raudonų pigmentų, kurie išteka iš ląstelės jei jos membrana yra pažeidžiama. Betacianinas yra burokuose (Beta spp.) ir kituose *Chenopodiaceae* aptinkamas raudonas pigmentas kurio sudėtyje yra azoto. Betacianinai kaupiasi vakuolėse kur sudaro

vandenyje tirpius kompleksus su baltymais. Svarbiausi betacianinų atstovai yra amarantinas ir izoamarantinas. Betacianinas yra naudojamas maisto pramonėje kaip natūralus maistinis dažas. Kadangi betacianinas yra spalvotas junginys (absorbcijos maksimumas prie 535 nm) jo koncentraciją tirpale galima nustatyti spektrofotometriškai. Jeigu biologinė membrana yra pažeidžiama, pigmentas patenka į terpę ir todėl stebimas absorbcijos padidėjimas. Jeigu membranos pažeidimas didėja laike, betacianino koncentracija terpėje (taigi ir absorbcija) nuolat didėja.

Praktinė dalis

Įranga ir priemonės:

Raudoni burokai (*Beta vulgaris*), petri lėkštelės, stiklinės pipetės, matavimo cilindrai, spektrofotometras, spektrofotometrines kiuvetės.

Reagentai

100 % metanolis (CH₃OH)

100 % etanolis (C₂H₅OH)

100 % izopropanolis (C₃H₇OH)

100 % n-butanolis (C₄H₉OH)

50 mM CaCl₂

10 M H₂O₂

0.1 mM cholesterolis

Inkubavimo terpė:

0.1 M fosfatinis buferis

0.1 M sacharozė

pH 6.6

Paruošiamasis darbas

Išpjunami 22 vienodi (diametras 8 mm, storis 3 mm) buroko diskai. Diskai plaunami 14-17 val. po tekančiu vandeniu (iš krano). Prieš eksperimentą burokų diskai inkubuojami inkubavimo terpėje 1 val., kambario temperatūroje (~25 °C).

Darbo eiga

1. Paruoškite 22 petri lėkštelių. Į kiekvieną įdėkite po vieną buroko diską ir įpilkite 9 ml inkubavimo terpės. Sunumeruokite petri lėkštelių dangtelius.
2. Pagal lentelėje pateiktą schemą į lėkšteles pridėkite reikiamą kiekį metanolio, etanolio, izopropanolio, n-butanolio, CaCl_2 , H_2O_2 ir cholesterolio, ir gerai išmaišykite:

Petri lėkštelės nr.	Alkoholiai, ml	Kiti priedai	Absorbicija				
			0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	-	-					
2	1 ml metanolio	-					
3	1 ml etanolio	-					
4	1 ml izopropanolio	-					
5	1 ml n-butanolio	-					
6	-	0.1 ml CaCl_2					
7	1 ml metanolio	0.1 ml CaCl_2					
8	1 ml etanolio	0.1 ml CaCl_2					
9	1 ml izopropanolio	0.1 ml CaCl_2					
10	1 ml n-butanolio	0.1 ml CaCl_2					
11	-	10 μl cholesterolio					
12	1 ml metanolio	10 μl cholesterolio					
13	1 ml etanolio	10 μl cholesterolio					
14	1 ml izopropanolio	10 μl cholesterolio					
15	1 ml n-butanolio	10 μl cholesterolio					
16	-	1 ml H_2O_2					
17	1 ml metanolio	1 ml H_2O_2					
18	1 ml etanolio	1 ml H_2O_2					
19	1 ml izopropanolio	1 ml H_2O_2					
20	1 ml n-butanolio	1 ml H_2O_2					
21	1 ml H_2O_2	0.1 ml CaCl_2					
22	1 ml H_2O_2	10 μl cholesterolio					

3. Užfiksuokite eksperimento pradžios laiką. Iš kiekvienos lėkštelės paimkite po 1 ml terpės ir perkelkite į spektrofotometrinę kiuvetę. Paruoškite palyginamąją kiuvetę su 1 ml inkubavimo terpės. Pamatuokite absorbciją prie 535 nm ir reikšmę užrašykite į lentelą (0 min). Darykite matavimus kas 15 min ir absorbcijos reikšmes surašykite lentelėje.
4. Pavaizduokite grafiškai tokias priklausomybes:
 - a. Kiekvienam alkoholiui pavaizduokite absorbcijos priklausomybę nuo laiko.
 - b. Kiekvienam alkoholiui + CaCl_2 pavaizduokite absorbcijos priklausomybę nuo laiko.
 - c. Kiekvienam alkoholiui + cholesterolis pavaizduokite absorbcijos priklausomybę nuo laiko.
 - d. Kiekvienam alkoholiui + H_2O_2 pavaizduokite absorbcijos priklausomybę nuo laiko.
 - e. Stulpelinės diagramos pagalba palyginkite absorbcijos reikšmes tokiom sąlygom: i) be H_2O_2 (kontrolė), ii) + H_2O_2 , iii) H_2O_2 + CaCl_2 , iv) H_2O_2 + cholesterolis.
5. Aptarkite rezultatus. Ar gauti rezultatai atitiko teoriškai numatytus?