



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

Ląstelės cheminė sudėtis

Teorija

Ląstelės cheminė sudėtis ir struktūrinė organizacija priklauso nuo ląstelės tipo ir jos funkcijos. Makromolekulės nulemia struktūrinius, organizacinius ir elgsenos ypatumus, tuo tarpu mažos molekulės dalyvauja signalo perdavime ir tarnauja kaip makromolekulių sudėtiniai komponentai. Vykstant gyvybiniam procesui ląstelėje šios dvi molekulių grupės nuolat sąveikauja.

Yra trys pagrindinės makromolekulių grupės: polisacharidai (sudėtingos sandaros angliavandeniai), nukleorūgštys ir baltymai (Lentelė 1). Makromolekulės yra sudarytos iš riboto skaičiaus pasikartojančių subvienetų sujungtų pašalinus H₂O tarp kiekvienos poros, tokiu būdu formuojant ilgas polimerines grandines. Polisacharidai yra sudaryti iš monosacharidų, nukleorūgštys iš nukleotidų, o baltymai iš amino rūgščių.

Polisacharidai yra paprasčiausios gamotje aptinkamos makromolekulės. Ląstelės kaupia polisacharidus (pvz. augalų ląstelės – krakmolą, gyvūnų ląstelės – glikogeną), kad galėtų juos vėliau panaudoti kaip energijos šaltinį arba kaip anglies skeletus biosintezės procesuose. Tuo tarpu kai kurie augaluose aptinkami polisacharidai (pvz. celiuliozė) yra santykinai chemiškai inertiški ir dažniausiai aptinkami ląstelės sienelėje kur jie atlieka grynai struktūrinę funkciją. Visi paminėti polisacharidai (krakmolai, glikogenai, celiuliozė)

yra sudaryti iš vienintelio pasikartojančio monosacharido – gliukozės. Skirtumas tarp šių polisacharidų yra nulemtas jungties tipo tarp monomerų ir grandinės šakotumo laipsnio.

Kaip jau minėta, nukleorūgštys yra sudarytos iš nukleotidų kurie būna sujungti į ilgas nešakotas grandines. Kadangi ląstelėje aptinkami keturi skirtingi nukleotidų tipai, vien keičiant jų eiliškumą grandinėje įmanoma susinetinti didelį skaičių skirtingų nukleorūgščių. Nukleorūgštys yra genų, nulemenčių ląstelės paveldimumą, funkciniai komponentai.

Baltymai yra sudaryti iš amino rūgščių sujungtų peptidine jungtimi. Baltymas gali būti sudarytas iš šimtų ir tūkstančių amino rūgščių. Kadangi ląstelėje yra 20 skirtingų amino rūgščių, iš jų sudaromų baltymų įvairovė yra labai didelė. Baltymai sudaro didžiąją dalį viduląstelinių struktūrų ir visi žinomi fermentai yra baltymai.

Kita svarbi junginių klasė yra lipidai. Priešingai nei polisacharidai, nukleorūgštys ir baltymai lipidai nėra polimerai. Be baltymų, ląstelės membranos didžiąją dalimi yra sudarytos iš lipidų.

Lentelė 1 *Escherichia coli* ląstelės cheminė sudėtis. Skaičiuojant buvo laikoma, kad ląstelės išmatavimai yra $1 \times 1 \times 3 \mu\text{m}$, o tūris $2.25 \cdot 10^{-12} \text{ L}$ ($2.25 \mu^3$).

<i>Cheminis komponentas</i>	<i>% sauso svorio</i>	<i>Apytikslė molinė masė</i>	<i>Molekulių skaičius ląstelėje</i>	<i>Moliai/ląstelėje</i>	<i>Molinė koncentracija</i>
DNR	5	2000000000	4	6.6×10^{-24}	2.9 nM
RNR	10	1000000	15000	2.5×10^{-20}	11 μM
Baltymai	70	60000	1700000	2.8×10^{-18}	1.25 mM
Lipidai	10	1000	15000000	2.5×10^{-17}	11 mM
Polisacharidai	5	200000	39000	6.5×10^{-20}	28 μM

Praktinė dalis I: DNR išskyrimas iš svogūno

Įranga ir priemonės:

100 g svogūnų, pH-metras, homogenizatorius, stiklinis indas (500 ml), užlenktos pastero pipetės, dideli stikliniai (centrifuginiai) mėgintuvėliai, medžiaginis filtras, spektrofotometras, kvarcinės spektrofotometrinės kiuvetės.

Medžiagos:

0.05 M EDTA

5M NaCl

1M TRIS pH7.5-8.0

10% natrio dodecilsulfatas (SDS)

mėsos suminkštintojas (proteazė, 3 g/50 ml)

15 ml atšaldyto etanolio (–20 °C)

distiliuotas H₂O

Paiškinimai:

EDTA naudojama surišti metalų jonus, tokiu būdu inaktyvuojami DNR ardantys fermentai kurių aktyvumui šie jonai yra būtini.

NaCl naudojams neutralizuoti neigiamą DNR fosfatų krūvį. Dėl šio krūvio atskiros DNR molekulės stumia viena kitą. Pridėjus NaCl, teigiamai įkrauti Na⁺ jonai neutralizuoja DNR fosfatus ir atskiros DNR molekulės gali agreguoti sudarydamos akimis matomus siūlinius darinius.

SDS yra detergentas kuris suardo visas lipidines struktūras (visos ląstelės membranos). Suardžius membranas, SDS sudaro kompleksus su lipidais ir baltymais, tokiu būdu jie iškrenta į nuosėdas.

Darbo eiga:*Ląstelių lizavimas (suardymas)*

1. Paruošiama 200ml lizavimo buferio:
 - 10 ml 1M Tris
 - 10 ml 0.05 M EDTA
 - 12 ml 5M NaCl
 - 168 ml distiliuoto H₂O
2. Nulupamas ir supjaustomas svogūnas (100–150g).
3. Svogūnas sumaišomas su 200ml lizavimo buferio.

4. Homogenizuojama 45 sek.
5. Homogenatas perfiltruojamas į švarų stiklinį indą.

DNR precipitavimas

6. 10 ml perfiltruoto svogūno homogenato perkeliama į didelį stiklinį mėgintuvėlį.
7. Pridedama 1ml 10% SDS.
8. Pridedama 4ml of mėsos minkštintojo (proteazės).
9. Paliekama ant ledo 5 min.
10. Iš lėto (kad nesusimaišytų sluoksniai) užpilama 15 ml šalto etanolio (prieš eksperimentą laikyto $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Susidaro skaidrus viršutinis etanolio sluoksnis. Kadangi DNR netirpsta šaltame etanolyje, pridėjus etanolio visi tirpalo komponentai lieka tirpale tuo tarpu DNR precipituoja etanolyje.
11. Mėgintuvėlis paliekamas 30 min ant ledu. DNR precipituojant etanolyje pasidaro matomi balti siūlai ir etanolis iš skaidraus pasidaro balkšvai drumstas. (Norint pilnai precipituoti DNR, rekomenduojama palaikyti per naktį $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje).
12. Susidarę DNR siūlai paskalaujami sulenkta stikline pastero pipete.
13. DNR perkeliama į švarų mėgintuvėlį su 5 ml H_2O .

DNR preparato grynumo nustatymas

Nukleinino rūgštys (DNR ir RNR) sugeria šviesą prie 260 nm, tuo tarpu baltymai prie 280 nm. Absorbcijų santykis 260nm/280nm lygus 1.8-1.9 rodo, kad mėginyje yra gryna DNR. Absorbcijų santykis 260nm/280nm lygus 1.9-2.0 rodo, kad mėginyje yra gryna RNR. Jūsų išskirtas mėginys yra DNR, RNR ir baltymų mišinys. A_{260}/A_{280} bus mažas, jei mėginyje yra daug baltymų kurie absorbuoja prie 280nm.

Darbo eiga:

1. DNR ištirpinama 5 ml distiliuoto H_2O . Kvarcinė kiuvetė pripildoma DNR tirpalo ir pamatuojama absorbcija prie 260 nm ir 280 nm.
2. Paskaičiuokite absorbcijų santykį (A_{260}/A_{280}).

Praktinė dalis II: Angliavandenių koncentracijos nustatymas audinyje

Teorija

Šio eksperimento metu, naudodamiesi spektrofotometrijos metodu, jūs nustatysite angliavandenių koncentraciją tiriamame pavyzdyje. Angliavandeniams redukuojant 3,5-dinitrosalicilinę rūgštį (DNSR) susidaro spalvotas junginys – 3-amino-5-nitrosalicilinė rūgštis, kurios koncentracija gali būti nustatyta spektrofotometriškai. Sacharozė ir kiti sudėtingos sandaros angliavandeniai neturi redukcinių savybių, todėl pirmiausiai turi būti sukaidyti iki monosacharidų (pvz. gliukozės). Tai pasiekama virinant pavyzdį su HCl. Pašarminus terpės pH monosacharidai tampa gerais reduktoriais ir gali reaguoti su DNSR.

Įranga ir priemonės:

Homogenizatorius arba trintuvė, mėgintuvėliai, stiklinės matavimo pipetės, verdančio H₂O vonia, spektrofotometrinės kiuvetės, spektrofotometras.

Medžiagos:

Raumens homogenatas, 0.2 g audinio/ml

Kepenų homogenatas, 0.2 g audinio/ml

6 M HCl

2.5 M NaOH

0.05 M 3,5-dinitrosalicilinė rūgštis

50 mg/ml standartinis gliukozės tirpalas

Distiliuotas H₂O

Darbo eiga:

1. Pagal žemiau pateiktą lentelę paruoškite standartinio gliukozės tirpalo praskiedimus kalibracinės kreivės sudarymui:

Mėgintuvėlio Nr.	H ₂ O, ml	Standartinis gliukozės tirpalas, ml
1	5	0
2	4.75	0.25
3	4.5	0.5
4	4.25	0.75
5	4	1

2. Paruoškite tris mėgintuvėlius su trim skirtingais raumens homogenato praskiedimais – 2 kartus, 10 kartų ir 20 kartų. Tam į pirmą mėgintuvėlį įpilkite 5 ml homogenato ir 5 ml H₂O, į antrą mėgintuvėlį - 1 ml homogenato ir 9 ml H₂O, o į trečią - 0.5 ml homogenato ir 9.5 ml H₂O.
3. Paruoškite tris mėgintuvėlius su trim skirtingais kepenų homogenato praskiedimais – 2 kartus, 10 kartų ir 20 kartų. Tam į pirmą mėgintuvėlį įpilkite 5 ml homogenato ir 5 ml H₂O, į antrą mėgintuvėlį - 1 ml homogenato ir 9 ml H₂O, o į trečią - 0.5 ml homogenato ir 9.5 ml H₂O.
4. Pasiruoškite tirpalus pagal žemiau pateiktą lentelę:

Mėgintuvėlio Nr.	Tiriamas tirpalas, ml	6 M HCl, ml
1	1 (mėgintuvėlis #1)	1
2	1 (mėgintuvėlis #2)	1
3	1 (mėgintuvėlis #3)	1
4	1 (mėgintuvėlis #4)	1
5	1 (mėgintuvėlis #5)	1
6	1 (raumuo 2×)	1
7	1 (raumuo 10×)	1
8	1 (raumuo 20×)	1
9	1 (kepenys 2×)	1
10	1 (kepenys 10×)	1
11	1 (kepenys 20×)	1

5. Visus mėgintuvėlius perkelti į verdančio vandens vonią ir virinkite 10 min.
6. Išimkite mėgintuvėlius iš vonios ir į kiekvieną atsargiai pridėkite 4 ml 2.5 M NaOH ir 1 ml 0.050 M 3,5-dinitrosalicilinės rūgšties, mėgintuvėlį uždenkite Parafilmu (arba aliuminio folija), gerai išmaišykite ir perkelti į verdančio vandens vonią. Virinkite 5 min.
7. Perkelti visus mėgintuvėlius į ledo/H₂O vonią ir palaikykite 10 min.

8. Pasiruoškite spektrofotometrines kiuvetes ir į jas perkelkite ~1 ml mėgintuvėlių turinio. Dešimtą kiuvetę, kurią naudosite kaip palyginamąją, pripildykite H₂O. Pamatuokite absorbciją prie 540 nm. Duomenis surašykite į lentelę:

Mėgintuvėlio Nr.	Absorbcija
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

9. Nubraižykite gliukozės kalibracinę kreivę atidedami absorbcijos priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos mėgintuvėliuose #1-5 (ordinačių (Y) ašyje – absorbcija, abscisių (X) ašyje – gliukozės koncentracija).
10. Kadangi HCl hidrolizuoja glikogeną iki gliukozės, šio eksperimento metu jūs nustatote gliukozės kiekį. Naudodamiesi kalibracine kreive ir atsižvelgdami į preskiedimo laipsnį ruošiant tirpalus paskaičiuokite gliukozės kiekį grame audinio (raumenyje ir kepenyse). Rezultatus padauginę iš 0.9 (tokiu būdu bus atsižvelgta į vandens hidrolizę eksperimento metu) gausite koks glikogeno kiekis buvo pradiniam homogenate. Paskaičiuokite kiek glikogeno buvo grame audinio.

Praktinė dalis III: Baltymo koncentracijos audinyje nustatymas

Įranga ir priemonės:

Mėgintuvėliai, stiklinės matavimo pipetės, spektrofotometrinės kiuvetės, spektrofotometras.

Medžiagos:

Raumens homogenatas, 0.2 g audinio/ml

Kepenų homogenatas, 0.2 g audinio/ml

Jaučio serumo albumino standartas, 10 mg/ml

Biureto reagentas

30% KOH

1 % Na dezoksicholatas

Distiliuotas H₂O

Darbo eiga:

Mėginių paruošimas baltymo nustatymui:

1. Mėgintuvėlyje sumaišome 0.5 ml pirmo homogenato (raumens) ir 1 ml 1 % Na dezoksicholato (joninis detergentas kuris suardo visas ląstelės membranas ir išlaisvina baltymus). Tirpalas gerai sumaišomas.
2. Į tą patį mėgintuvėlį pridedame 6 ml 30% KOH. Pamaišome.
3. Tą patį pakartojame su antru homogenatu (kepenų).

Kalibracinės kreivės sudarymas:

4. Kalibracinei kreivei sudaryti paruošiami 4 mėgintuvėliai (mėgintuvėlių turinys gerai sumaišomas):

Mėgintuvėlio Nr.	Albumino tirpalas, ml	H ₂ O, ml	Biureto reagentas, ml	Absorbicija
1	0	2.0	4.0	
2	0.4	1.6	4.0	
3	1.0	1.0	4.0	
4	1.6	0.4	4.0	

5. Koncentracijai pirmame tiriamame tirpale nustatyti paruošiami 3 mėgintuvėliai (mėgintuvėlių turinys gerai sumaišomas):

Mėgintuvėlio Nr.	Albumino tirpalas, ml	Tiriamas tirpalas, ml	H ₂ O, ml	Biureto reagentas, ml	Absorbicija
5	0	0.4	1.6	4.0	
6	0	1.0	1.0	4.0	
7	0	2.0	0	4.0	

6. Koncentracijai antrame tiriamame tirpale nustatyti paruošiami 3 mėgintuvėliai (mėgintuvėlių turinys gerai sumaišomas):

Mėgintuvėlio Nr.	Albumino tirpalas, ml	Tiriamas tirpalas, ml	H ₂ O, ml	Biureto reagentas, ml	Absorbicija
8	0	0.4	1.6	4.0	
9	0	1.0	1.0	4.0	
10	0	2.0	0	4.0	

7. Mėgintuvėliai paliekami 20 min kambario temperatūroje.
8. Spektrofotometru pamatuojama tirpalų absorbicija prie 550 nm. 2 ml pirmo mėgintuvėlio turinio naudojami kaip palyginamasis tirpalas. Rezultatai surašomi lentelėje.
9. Nubraižoma kalibracinė kreivė ir iš jos nustatoma baltymo koncentracija mėgintuvėlyje (nepamiršti atsižvelgti į skiedimus). Toliau paskaičiuojama baltymo koncentracija biologiniame audinyje išreikšta mg baltymo/g audinio atsižvelgiant į tai, kad homogenate buvo 0.2 g audinio/ml (nepamiršti atsižvelgti į skiedimus).