



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

Ląstelių frakcionavimas & fermentai žymenys

I. Ląstelių komponentų frakcionavimas naudojant diferencinį centrifugavimą

Teorija

Visos eukariotinės ląstelės turi vidines membranomis atskirtas struktūras (organeles) atliekančias specializuotą funkciją, turinčias joms būdingą morfologinę sandarą, biocheminę sudėtį ir fizines savybes. Norint tirti kiekvieną iš jų atskirai, jos gali būti izoliuotos diferencinio centrifugavimo būdu.

Audinio pasirinkimas. Izoluoiant ląstelės komponentus idealu jei įmanoma tai atlikti naudojant homogenišką ląstelių populiaciją, kadangi skirtinguose ląstelių tipuose tiriamo ląstelės komponento kiekis ir metabolinis aktyvumas gali būti skirtingi. Dėl šios priežasties būtų idealu naudoti ląstelių kultūras (visos ląstelės yra vienodos). Tačiau naudojant ląstelių kultūras izoliuojamas tik nedidelis tiriamo komponento kiekis. Kai kurie žinduolių organai yra histologiškai homogeniški ir todėl dažnai naudojami tokio tipo eksperimentuose (pvz. kepenys, inkstai, smegenys, širdies raumuo). Taip pat, priklausomai nuo to kurį ląstelės komponentą norima izoliuoti, pasirenkamas audinio tipas – kepenys dažnai naudojamos

mitochondrijų izoliavimui, tuo tarpu užkrūčio liauka (lotyniškai *Thymus*) dažnai naudojama branduolių izoliavimui.

Ląstelės suardymas. Labai svarbu, kad izoliuojant nepakistų ląstelės komponentų morfologinė sandara ir jie išliktų biologiškai aktyvūs. Todėl svarbu teisingai pasirinkti ląstelės suardymo būdą. Priklausomai nuo audinio ir ląstelių tipo gali būti naudojami homogenizatoriai (tefloninis grūstuvus ir stiklinis indas), trynimasis su smėliu, suardymas ultragarsu.

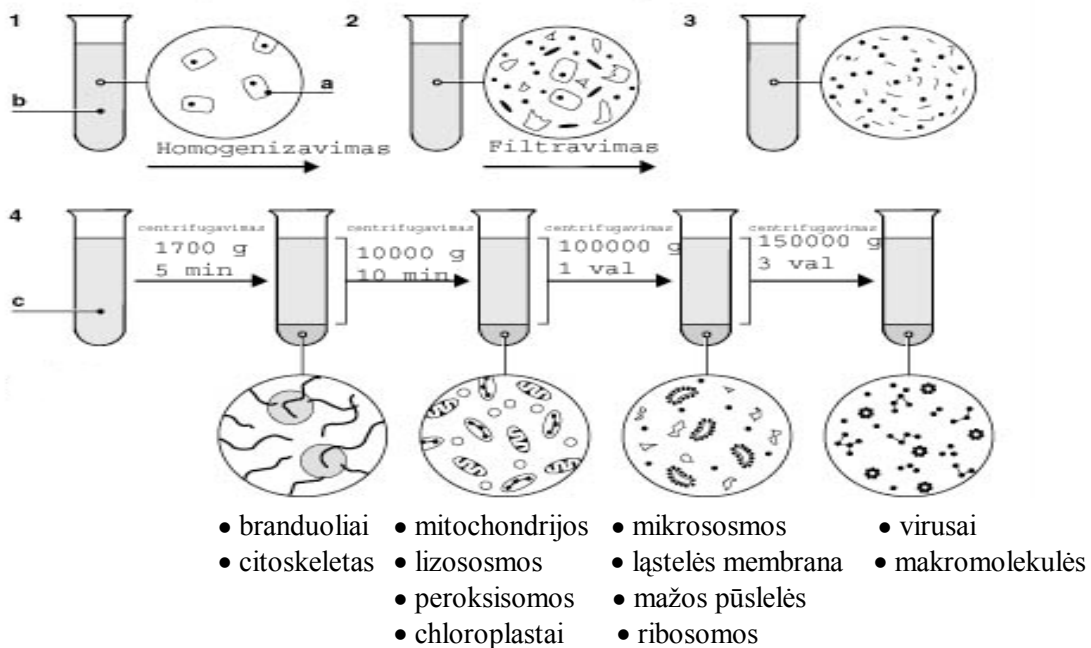
Izoliavimo ir suspendavimo terpės. Izoliuotų ląstelės komponentų kokybę taip pat lemia teisingai pasirinkta izoliavimo ir suspendavimo terpė. Paprastai jų pasirinkimą lemia norimų izoliuoti ląstelės komponentų savybės, pvz. kadangi mitochondrijos sudaro agregatus elektrolitiniuose tirpaluose, jų izoliavimui naudojami neelektrolitiniai tirpalai (pvz. sacharozės), tuo tarpu izoliuojamų branduolių stabilizavimui pridedama šiek tiek elektrolitų (pvz. CaCl_2).

Diferencinis centrifugavimas. Centrifuguojama dalelė yra veikiamą trijų tipų jėgų: centrifuginės, trinities ir keliamosios (Archimedo), kurios ir nulemia dalelės greitį v . Šios jėgos priklauso nuo dalelės masės, tankio, trinities savybių ir suspendavimo terpės tankio. Naudojantis šiuo metodu ląstelės komponentai yra išskirstomi pagal jų masę ir tankį (Pav. 1). Kitas dažnai naudojamas centrifugavimo būdas yra centrifugavimas tankio gradientu (sudaromas suspendavimo terpės gradientas ir dalelės išskirstomos pagal jų tankį). Šis būdas paprastai naudojamas ląstelių frakcijos išgryninimui.

Centrifūgų tipai. Skirtingose frakcionavimo stadijose naudojamos skirtingos centrifūgos. Yra trys pagrindiniai centrifūgų tipai: a) mažo greičio (iki ~ 5000 aps/min), b) didelio greičio (iki ~ 20000 aps/min) ir c) ultracentrifūgos (greitis didesnis nei 20000 aps/min). Pagrindinis skirtumas tarp centrifūgų yra tai, koku greičiu galima centrifuguoti. Tai pasiekama keičiant rotorius ir kitų centrifūgos dalių konstrukciją, tokiu būdu sumažinamos pasipriešinimo jėgos.

Ląstelių frakcijos grynumo nustatymas. Gautos ląstelių frakcijos grynumas gali būti nustatomas išmatavus žyminių fermentų (tai fermentai kurie aptinkami tik vienoje specifinėje ląstelės organelėje) aktyvumą. Pvz. NAD sintezės fermentai aptinkami branduolyje, tuo tarpu oksidacinio fosforilavimo fermentai yra tik mitochondrijose. Taip pat kokybiniam frakcijos identifikavimui gali būti naudojami histocheminiai dažai:

1. Feugleno reakcija nustatyti DNR (reakcijos metu ji nudažoma rožine spalva).
2. Reakcijos su metilo žaliuoju – pironinu. (metilo žaliasis nudažo DNR raudonai tuo tarpu pironinas nudažo RNR raudonai).
3. Reakcija su Janus žaliuoju naudojama ląstelės organoidų kuriuose vyksta oksidacijos – redukcijos reakcijos atpažinimui (pvz. mitochondrijos, chloroplastai).
4. Reakcija su neotetrazoliumu naudojama sukcinato dehidrogenazės (mitochondrijų žyminis fermentas) nustatymui. Įvykus reakcijai susidaro juodos nuosėdos.
5. Reakcija su 2,6-dichlorofenoliu indofenoliu (DCPIP) naudojama sukcinato dehidrogenazės (mitochondrijų žyminis fermentas) nustatymui. Įvykus reakcijai mėlyna tirpalo spalva pasikeičia į bespalvę.



Pav. 1 Ląstelės komponentų frakcionavimas diferencinio centrifugavimo metodu.

II. Fermentai žymenys: sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymas

Teorija

Sukcinato dehidrogenazė (SDH) yra tik mitochondrijose aptinkamas fermentas. SDH yra ir kvėpavimo (elektronų transporto) grandinės ir Krebso ciklo fermentas. Kadangi tai vidinės membranos baltymas, net pažeistose mitochondrijose stebimas jo aktyvumas. SDH

katalizuoja sukcinato oksidaciją susidarant fumaratui. Reakcijos metu pirmiausiai redukuojama fermento FAD grupė, tada ne heminė geležis. Galutinis elektronų akceptorius žinduolių ląstelėse yra ko-fermentas Q (ubichinonas), mobilus elektronų nešiklis esantis mitochondrijų vidinėje membranoje (kvėpavimo grandinės komponentas). Perdavus elektronus ko-fermentui Q, SDH prostetinės grupės grįžta į oksiduotą formą.

Jei kvėpavimo grandinė užblokuojama pvz. kalio cianidu (KCN), SDH aktyvumą galima nustatyti naudojant dirbtinį elektronų akceptorių 2,6-dichlorofenolį indofenolį (DCPIP), kurio oksiduota forma absorbuoja šviesą prie 600 nm tuo tarpu redukuota forma šviesos neabsorbuoja (t.y. yra bespalvė). Į inkubacijos terpę pridėjus SDH substrato sukcinato jis bus oksiduojamas ir elektronai bus perduodami ne ko-fermentui Q, o DCPIP. Stebint reakciją spektrofotometriškai matysime, kad tirpalo absorbcija prie 600 nm mažėja (oksiduotas DCPIP verčiamas į bespalvį redukuotą). Absorbcijos greičio mažėjimas yra proporcingas DCPIP redukcijos greičiui, kuris savo ruožtu proporcingas SDH aktyvumui.

Praktinė dalis I: Bulvių ląstelių frakcionavimas

Įranga ir priemonės:

225 g bulvių, pH-metras, homogenizatorius (pvz. sulčiaspaudė), centrifūgos, rotoriai, centrifūginiai mėgintuvėliai (pastaruosius tris prieš naudojimą atšaldyti (~4°C)).

Reagentai:

Homogenizavimo terpė (Paruošti 125 ml):

350 mM Manitolis

100 mM HEPES

Prieš pradėdant eksperimentą pridėti:

4 mM EDTA

8 mM Cisteino

1 mg/ml Jaučio serumo albumino

pH 7.5

Suspendavimo terpė (Paruošti 50 ml):

350 mM Manitolis

20 mM HEPES

1 mg/ml Jaučio serumo albumino

pH 6.8

Darbo eiga:

1. Ekspeimentui nuskusti bulves 225 g.
2. Atšaldytas 500 ml talpos stiklinis indas uždengiamas filtravimui naudojamu audiniu ir padedamas po sulčiaspaude.
3. Įjungus sulčiaspaudę ypilama šiek tiek homogenizavimo terpės ir įdedami keli gabaliukai bulvių, vėl ypilama terpės ir įdedama bulvių ir t.t. kol sunaudojamos visos bulvės ir visa terpė.
4. Perfiltruotos bulvių sultys išpilstomos į atšaldytus centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama prie $1700 \times g$ (~2500 aps/min), 5 min. Mėgintuveliai prieš kiekvieną centrifugavimą taruojami (pasveriami ir sulyginamas visų svoris).
5. Po centrifugavimo 0.5 ml supernatanto perkelkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu vėliasiui sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymui. Likusį supernatantą perpilkite į švarius atšaldytus centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguokite prie $10000 \times g$ (~6500 aps/min), 10 min. Po pirmo centrifugavimo likusios nuosėdos yra sudarytos iš nesuardytų ląstelių, jų nuolaužų ir branduolių. 0.5 ml šios frakcijos perkelkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu vėliasiui sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymui.
6. Po centrifugavimo 0.5 ml supernatanto (jame yra ląstelės citoplazma ir legvesnės organelės, membranos, ribosomos) perkelkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu vėliasiui sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymui. Likusį supernatantą išpilkite į kriauklę. Ant dugno likusios nuosėdos yra mitochondrijos, šiek tiek peroksisomų ir lizosomų. Šias nuosėdas suspenduokite stikline lazdele ir 0.5 ml šios suspensijos perkelkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu vėliasiui sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymui.
7. Ant likusios nuosėdų suspensijos užpilkite suspendavimo terpės ir gerai sumaišykite stikline lazdele. Centrifuguokite prie $10000 \times g$ (~6500 aps/min), 10 min.

8. Po centrifugavimo 0.5 ml supernatanto perkelkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledų vėliasiui sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymui. Likusį supernatantą ir nuosėdas išpilkite į kriauklę.

Praktinė dalis II. Fermentai žymenys: sukcinato dehidrogenazės aktyvumo nustatymas

Įranga ir priemonės:

Spektrofotometras, spektrofotometrinės kiuvetės.

Reagentai:

Tiriamieji pavyzdžiai:

1. Supernatantas po pirmo centrifugavimo atskiestas 2 kartus homogenizavimo terpe.
2. Branduolių frakcija (nuosėdos po pirmo centrifugavimo) atskiesta 2 kartus homogenizavimo terpe.
3. Supernatantas po antro centrifugavimo atskiestas 2 kartus homogenizavimo terpe.
4. Mitochondrijų frakcija (nuosėdos po antro centrifugavimo) atskiesta 2 kartus homogenizavimo terpe.
5. Supernatantas po trečio centrifugavimo atskiestas 2 kartus homogenizavimo terpe.

Inkubavimo terpė:

0.05 mg/ml DCPIP (2,6-dichlorofenolis indofenolis)

5 mM sukcinato (substratas)

2 mM KCN (kvėpavimo grandinės inhibitorius)

110 mM KCl

20 mM Tris

5 mM KH_2PO_4

2.3 mM MgCl_2

pH 7.3

Darbo eiga:

1. Paruošiamos 6 spektrofotometrinės kiuvetės:

Nr.	Inkubavimo terpė, ml	Tiriamas pavyzdys, ml	Absorbicija prie 600 nm		v, absorbcijos vienetai/min/1 ml pavyzdžio
			A_0 , $t = 0 \text{ min}$	A_{15} , $t = 15 \text{ min}$	
1.	1	-			
2.	0.9	0.1 (1)			
3.	0.9	0.1 (2)			
4.	0.9	0.1 (3)			
5.	0.9	0.1 (4)			
6.	0.9	0.1 (5)			

- Spektrofotometrinės kiuvetės sudedamos į spektrofotometrą ir matuojama absorbcija prie 600 nm. Atliekami du matavimai: $t_0 = 0 \text{ min}$ ir $t_{15} = 15 \text{ min}$.
- Kiekvienam tiriamam pavyzdžiui paskaičiuokite reakcijos greitį v (absorbcijos vienetai/min) pagal formulę:

$$v = \frac{A_0 - A_{15}}{15}$$

- Perskaičiuokite sukcinato dehidrogenazės reakcijos greitį neatskiestuose tiriamuose pavyzdžiuose ir surašykite į lentelę. Paaiškinkite gautus rezultatus. Kurioje frakcijoje stebimas didžiausias sukcinato dehidrogenazės aktyvumas? Kodėl?