



**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 414. EVOLIUCIJA IR POPULIACIJŲ GENETIKA**

### **Laboratorinis darbas**

### **Populiaciniai izofermentiniai tyrimai**

#### **Svarbios sąvokos:**

*Izofermentai* – fermento formos, kurios katalizuoja tą pačią reakciją, bet skiriasi savybėmis (struktūra, katalizės inhibitoriais, giminingumu S, lokalizacija).

*Fermentai* – specifinės prigimties baltyminės medžiagos, t.y. makromolekulės, kurių funkcija – cheminių reakcijų katalizė

*Monomorfinis* – tiriamo objekto vienos formos buvimas.

*Polimorfinis* – tiriamo objekto daugelio formų ar atmainų buvimas.

*Imunogeninis* – vienoks ar kitoks poveikis sukiantis imuninės sistemos atsaką.

*Plazma* – kraują sudaranti skysta dalis ir kraujo ląstelės.

*Eritrocitai* – disko pavidalo, abipus įgaubtos ir neturinčios [branduolio](#) ir daugelio kitų [eukariotinėms](#) ląstelėms būdingų organoidų [ląstelės](#).

*Homogeniškas* – vienalytis.

*Supernatantas* – viršnuosėdinis sluoksnis.

#### **Įvadas**

XX a. pabaigoje, įvairių organizmų sistematikoje – identifikuojant rūšis-dvynes, nustatant evoliucinius kelius ir filogenetinius ryšius - pradedami naudoti molekulinės biologijos metodai, kuriais remiantis paskutinį dešimtmetį sprendžiamos ir įvairios ekologinės problemos. Visus juos galima suskirstyti į keletą grupių: 1) morfologinius-biometrinius; 2) imunogenetinius; 3) biocheminio baltymų polimorfizmo tyrimo ir 4) DNR polimorfizmo tyrimo metodus. Visi šie metodai yra plačiai taikomi sprendžiant molekulinės ekologijos problemas ir įvairius genetikos bei selekcijos klausimus

Nors imunogenetiniai metodai plačiai taikomi gyvūnų selekcijoje (kaip genetiniai žymenys), tačiau vien tikrai kraujo grupių tyrimas neduoda pilnos informacijos apie populiacijos kintamumo laipsnį, kadangi monomorfinių lokusų skaičius tokio tyrimo atveju lieka neaiškus. Todėl šiuo metu plačiausiai tiriamas biocheminis baltymų ir DNR polimorfizmas.

Elementarus evoliucijos proceso vienetas – giminingų individų populiacija. Genetiniame lygmenyje populiacijos yra pakankamai stabilios sistemos, kurių pastovumą užtikrina genetinės įvairovės optimumas. Bet koks nuokrypis - įvairovės sumažėjimas ar padidėjimas, sukelia nepalankias biologines pasekmes ir gali baigtis populiacijos degradacija. Įprastinėje aplinkoje optimali genetinė įvairovė palaikoma veikiant populiacinės dinamikos faktoriams – natūraliai atrankai, genų mutacijoms, migracijai. Genetinis *baltymų polimorfizmas* sudaro dalį genetinės įvairovės, stebimos skirtingų rūšių gamtinėse populiacijose. Vykstant neutralioms mutacijoms aleliniuose genuose, formuojasi daugialypės baltymų formos. Kiekvienas individas turi unikalią baltymų sudėtį, todėl individų atsitiktinės imties polimorfizmo tyrimai atspindi genetinio kintamumo procesus, vykstančius visoje populiacijoje

**Izofermentai - genetiniai žymenys.** Bet kuris polipeptidas yra žymuo jį koduojančiam genui, t.y. jei aptinkami kurio nors tipo subvienetai, tai ne tik reiškia, kad yra genas koduojantis juos, bet ir tai, kad tas genas yra aktyviai ekspresuojamas. Populiacinės genetikos tyrimams dažniau pasirenkamos izofermentinės sistemos, o ne izobaltymai, kadangi izofermentus žymiai lengviau aptikti dėl jiems būdingo specifinio katalitinio aktyvumo.

Izofermentų, kaip genetinių žymenų, panaudojimo populiaciniuose tyrimuose privalumai ir trūkumai:

Privalumai	Trūkumai
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tyrimo metodika standartizuota daugelyje pasaulio laboratorijų.</li> <li>▪ Naudojami nedideli medžiagos kiekiai, todėl vienu metu tomis pačiomis sąlygomis galima analizuoti daug mėginių.</li> <li>▪ Tiriamų pavyzdžių analizė nereikalauja daug laiko.</li> <li>▪ Nereikia išskyrinėti DNR.</li> <li>▪ Nereikalingos žymės ir pradmenys.</li> <li>▪ Rezultatai greitai ir lengvai įvertinami.</li> <li>▪ Izofermentinių spektrų analizė nėra sudėtinga, jų interpretacijai naudojami terminai: "lokusas" ir "aleliai".</li> <li>▪ Alelinių genų kodominavimas (heterozigotų atveju vienas alelis nemaskuoja kito).</li> </ul> <p>Galima aptikti nedideles genų mutacijas, nepastebimas vizualiai ir tuo pačiu</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mažas gausumas.</li> <li>▪ Žemas polimorfizmo lygis.</li> <li>▪ Homogenizuojant audinius, gali išsiskirti fiziologiškai aktyvios medžiagos, kurios sukelia ryškius pakitimus tiriamo fermento molekulėje.</li> <li>▪ Izofermentinius pektrus kartais sudėtinga interpretuoti dėl susidarantių kompleksų, kurie atsiranda dėl genų poliploidijos ar duplikacijos, bei intergeninių heterodimerų susiformavimo.</li> <li>▪ Vienodo elektroforezinio judrumo baltymai nebūtinai yra homologiški.</li> <li>▪ Įvairūs artefaktai (-SH grupės nestabilumas, buferio pH apsprendžiami izofermentinio aktyvumo pokyčiai ir t.t.) gali iškreipti galutinį fermentų spektrą.</li> </ul>

**Pagrindiniai izofermentinės analizės etapai:**

- Medžiagos paruošimas.
- Polimorfizmo išskyrimas gel-elektroforezės būdu.
- Polimorfizmo išryškinimas specifiniu fermentiniu dažymu.

## Praktinė dalis ir jos atlikimas

### 1. Medžiagos paruošimas

**Pagrindiniai reikalavimai:**

- ❑ Laboratorinė įranga gel-elektroforezei (elektroforezės aparatas)
- ❑ Pagalbinė įranga palaikanti gelius 2-5°C elektroforezės eigoje (šaldymo sistema).

## 1.1. Medžiagos paruošimas

Pagrindinis medžiagos šaltinis elektroforezinei baltymų analizei yra kiaušinio baltymas (pas paukščius), kraujas (serumas, plazma, eritrocitai), sperma ir įvairūs audiniai (širdies raumuo, kepenys, kasa, inkstai ir pan.). Iš augalų dažniausiai naudojami spygliai, lapai, žiedadulkės, sėklos, paparčio sporos, šakniagumbiai. Mėginių paėmimas, saugojimas, paruošimas elektroforezei – labai svarbūs procesai, kurie gali stipriai paveikti galutinį rezultatą – elektroforegramų aiškumą ir gautų rezultatų interpretaciją. Labai svarbi yra mėginių dokumentacija (individo numeris, rūšis, paėmimo vieta ir laikas).

*Pastaba: bet kuriam darbo etape prarasta informacija apie tiriamą pavyzdį padaro jį bevertį ir netinkamą tolimesnei analizei!*

### 1.1.1. Kraujo mėginių paruošimas

**Darbo tikslas.** Paimti kraują, pasiruošti plazmos, eritrocitų ir serumo mėginius.

**Medžiagos ir įranga.** 1. Laboratorinis gyvūnas (putpelė, pelė, žiurkė). 2. Termostatas. 3. Šaldoma centrifūga. 4. Šaldytuvas su šaldikliu. 5. Švirktas. 6. Skalpelis. 7. Spiritas. 8. Vata. 9. Stikliniai uždaromi mėgintuvėliai. 10. Ependorfiniai mėgintuvėliai. 11. Centrifuginiai mėgintuvėliai. 12. Stiklinė lazdelė. 13. Kapiliaras arba mikropipetė. 14. Antikoaguliantas. 15. Fiziologinis tirpalas.

#### **Darbo eiga.**

1. Kraują paimti švirktu iš: kaklo venos (žinduoliams), pauodegio venos (smulkiesiems žinduoliams), posparnio venos (paukščiams).
2. Plazmos atskyrimas:
  - a) Dalį kraujo tuojau pat po paėmimo reikia patalpinti į stiklinius mėgintuvėlius su antikoaguliantu (trinatrio citratas – 20g, NaCl – 4.2g, dist.H<sub>2</sub>O iki 1l – viena dalis tirpalo 10 dalių kraujo, arba heparinas – 50-100 vnt. 5-10ml kraujo).
  - b) Plazmą nuo forminių elementų atskirti centrifūguojant 10min prie 3000aps./min, užšaldyti ir laikyti –20°C.
3. Eritrocitai ir kt. kraujo forminiai elementai atskyrus plazmą pasilieka mėgintuvėlyje:
  - a) Plazmos likučius pašalinti filtriniu popieriumi.
  - b) Skalpelium atskirti leukocitų sluoksnį (baltas, plokštelės pavidalo).
  - c) Likusią eritrocitų masę praplauti 3-4 kartus naudojamu antikoaguliantu arba fiziologiniu tirpalu (0.9% NaCl), susidariusį skystį pašalinti centrifūguojant 10min prie 3000aps./min, nuosėdas patalpinti į uždaromus mėgintuvėlius, užšaldyti ir laikyti –20°C.
4. Serumo išskyrimas. Likusią kraujo dalį (nesumaišytą su antikoaguliantu) patalpinti į stiklinius uždaromus mėgintuvėlius ir palikti kambario temperatūra kol sukrešės.
  - a) Sukrešėjus kraujui krešulį atsargiai atskirti nuo mėgintuvėlio sienelių stikline lazdele ir mėginius palikti šaltai (+4°C) per naktį. Norint paspartinti krešėjimą, galima kraujo mėginius palaikyti termostate (+37°C), 1-2h.
  - b) Po to kraują centrifūguoti 15min esant 3-5000aps./min, šaldomoje centrifūgoje.
  - c) Atsiskyrusį serumą nusiurbti su kapiliaru ar mikropipete, patalpinti į ependorfinius mėgintuvėlius, užšaldyti ir laikyti –20°C.

*Pastaba: nepamirškite sterilizuoti kraujo paėmimo vietas!*

*Pastaba: analizuojant eritrocitinius baltymus kraują geriau maišyti su 2-3 dalimis antikoagulianto.*

*Pastaba: silpnai hemolizavusio serumo negalima naudoti tiriant serumo ir eritrocitų baltymus!*

### 1.1.2. Hemolizatų paruošimas

**Darbo tikslas.** Paruošti hemolizatų mėginius iš atplautų eritrocitų.

**Medžiagos ir įranga.** 1. Eritrocitai. 2. Šaldoma centrifūga. 3. Šaldytuvas su šaldikliu. 4. Pincetas. 5. Stiklinė lazdelė. 6. Ependorfiniai mėgintuvėliai. 7. Polietileniniai centrifūginiai mėgintuvėliai. 8. Kapiliaras arba mikropipetė. 9. Nejoninis detergentas.

**Darbo eiga.**

I metodas:

1. Atplautus eritrocitus, gautus praeito (1.1.1.) laboratorinio darbo metodu, perkelti į polietileninius centrifūginius mėgintuvėlius.
2. Pridėti  $\text{CCl}_4$  arba kito nejoninio detergento (tritonu X-100) (1/4-1/6 eritrocitų tūrio) ir mišinį trinti stikline lazdele iki vientisos homogeniškos masės.
3. Homogenišką masę centrifuguoti 30min, esant 15000aps./min,  $3^{\circ}$ - $5^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.
4. Supernatantą nusiurbti plonu kapiliaru į ependorfinį mėgintuvėlį, užšaldyti ir laikyti  $-20^{\circ}\text{C}$

II metodas:

Atplautus eritrocitus galima hemolizuoti naudojant užšaldymą-atšildymą:

1. Eritrocitus sumaišyti su 1 dalimi dist. $\text{H}_2\text{O}$ .
2. Kelis kartus mėginius užšaldyti-atšildyti.
3. Hemolizatą atskirti centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis, patalpinti į ependorfinį mėgintuvėlį, užšaldyti ir laikyti  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Pastaba: tuo pačiu principu hemolizatus galima paruošti iš kraujo krešulių.*

### 1.1.3. Audinių ekstraktų paruošimas

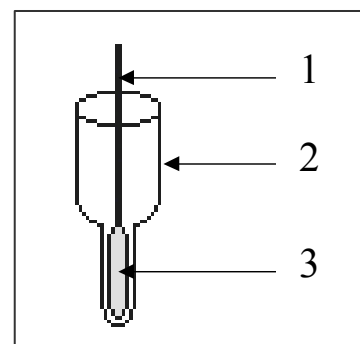
Ląstelių *dezintegracija* (homogenizavimas) – procesas, kurio metu negrįžtamai suardoma ląstelės anatominė struktūra. Tai pradinė stadija išskiriant ir gryninant subląstelines struktūras, kuri nulemia galutinę produktų kokybę.

Pagrindinis uždavinys – tikslingas funkciškai aktyvių biopolimerų bei subląstelių struktūrų išskyrimas.

Šiam procesui būtina sąlyga yra ląstelės apvalkalėlio suardymas, kuris gali būti pasiekiamas veikiant ląsteles įvairiais faktoriais: fiziniais, mechaniniais, cheminiais, fermentiniais ir biologiniais.

Subląstelių struktūrų ir biopolimerų išskyrimą apsunkina tai, kad intensyvi dezintegracija gali iššaukti struktūrinius ir funkcinis artefaktus, kurių didžiąją dalį sudaro subląstelių komponentų praradimas ir fermentų inaktyvacija esant netinkamai temperatūrai, pH, spaudimui ir pan. Taip pat artefaktai gali atsirasti dėl ląstelės proteolitinių fermentų poveikio. Dezintegracijos efektyvumas nurodomas suardytų ląstelių procentu ir tirpaus baltymo kiekiu, tačiau šie rodikliai neduoda informacijos apie gautos medžiagos sudėtį, bei funkcinį skiriamų komponentų aktyvumą. Ši informacija gaunama frakcionuojant turimą medžiagą, bei atliekant jos morfologinę (naudojant šviesos ar elektroninę mikroskopiją), bei fizikocheminę analizę.

Dezintegracija nėra standartizuota, todėl metodas ir trukmė yra pasirenkami empiriškai atsižvelgiant į turimą medžiagą, bei galutinį tikslą. Grubesni metodai, kaip ląstelių trynimasis su abrazyvinėmis medžiagomis (pvz., smėlio, stiklo pudra,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), veikimas aukštu slėgiu naudojant įvairius presus (pvz., Hjužo, Čaikovo ir kt.), taip pat veikimas ultragarsu dažniau taikomi bakterinėms, bei augalinėms ląstelėms. Tai susiję su standesniu šių ląstelių apvalkalėliu lyginant su gyvūninėmis ląstelėmis. Kraujo ląstelių suardymui dažnai naudojamas osmosinis šokas, taip pat atšildymas-užšaldymas. Bakterines ląsteles galima veikti fagais (fagolizė), antibiotikais, bei fermentais - lizocimais ir proteazėmis; šie netinka kuomet yra išskyrinėjami funkciškai aktyvūs fermentai. Gyvūninių ir augalinių ląstelių suardymas baltymų elektroforezinei analizei atliekamas skystoje terpėje, naudojant blenderius arba Daunso tipo homogenizatorius (1 pav.). Ląstelių suardymo greitis priklauso nuo piestelės sukimosi greičio, jos radiuso ir indo sandarumo.



### 1 pav. Daunso tipo

homogenizatorius (1-stiklinis indas,

2-prišlifuto stiklo piestelė, 3-

**Darbo tikslas.** Paruošti audinių ekstraktus iš laboratorinio gyvūno širdies, raumens, kepenų ir inkstų.

**Medžiagos ir įranga.** 1. Laboratorinis gyvūnas (putpelė, pelė, žiurkė). 2. Šaltas kambarys. 3. Šaldoma centrifūga. 4. Šaldytuvas su šaldikliu. 5. Žirklys. 6. Skalpelis. 7. Pincetas. 8. Vonelė. 9. Ligninas. 10. Stikliniai uždarami mėgintuvėliai. 11. Centrifuginiai mėgintuvėliai. 12. Šlifuto stiklo homogenizatorius. 13. Mikropipetė (1000µl). 14. Matavimo cilindrai (50, 100ml). 15. Svarstyklės. 16. Stiklinė kolba (100ml). 17. Petri lėkštelės. 18. 1% Tritonas X-100. 19. β-merkaptioetanolis. 20. MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. 21. 0.2M Tris-HCl buferis, pH-8.0.

### Darbo eiga.

1. Paruošti homogenizavimo terpę, kurios sudėtis:  
1% Tritonas X-100 – 1ml,  
β-merkaptioetanolis – 0.1ml,  
MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0.4g,  
0.2M Tris-HCl buferis, pH-8.0 – iki 100ml.
2. Dekapituluoti laboratorinį gyvūną ir išpreparuoti širdį, kepenis ir inkstus.
3. Atsverti po 1-2g audinio ir kiekvieną jų atskirai homogenizuoti naudojant homogenizavimo terpę (1g audinio imama ~3ml terpės): audinio gabalėlį susmulkinti žirklytėmis Petri lėkštelėje, sudėti į homogenizatorių ir toliau smulkinti iki homogeniškos masės.
4. Homogenatus centrifuguoti du kartus po 30min (+4°C): pirmą kartą esant 3000aps./min, antrą – 15000aps./min sąlygomis
5. Supernatantą nusiurbti mikropipete į stiklinį uždaramą mėgintuvėlį, užšaldyti ir laikyti –20°C.

*Pastaba: prieš naudojimą terpę atšaldyti iki +4°C.*

*Pastaba: audinių homogenatus ruošti šaltame kambaryje (+4°C)!*

*Pastaba: izofermentų išskyrimą iš augalinių ląstelių apsunkina aktyvių fenolinių junginių išsiskyrimas, kurie iššaukia kai kurių fermentų inaktyvaciją, todėl į homogenizavimo terpę dedama polivinilpirolidono (50-500mg priklausomai nuo audinio kiekio ir naudojamo terpės tūrio): ši medžiaga suriša fenolinius junginius ir nuslopina jų poveikį.*

### 1.1.4.

## Medžiagos saugojimas ir veiksniai, veikiantys fermentų aktyvumą

Saugant biologinius pavyzdžius nuolat vyksta natyvos baltymų struktūros pakitimai, dėl:

- denatūracijos (polipeptidinių grandinių struktūriniai pokyčiai);
- agregacijos (kelių molekulių susijungimas);
- dezagregacijos į subvienetus (ketvirtinės struktūros praradimas);
- polipeptidinių grandinių degradacijos (pirminės struktūros pokyčiai dėl proteolitinių fermentų (t.p. ir mikrobinės kilmės) veikimo).

Visi išvardinti procesai nulemia baltymų biologinių savybių praradimą (fermentinį aktyvumą ir kt. funkcijas) ir tuo įtakoja jų elektroforezinį paslankumą (atsiranda artefaktai!). Šiuos procesus greitina: aukštesnė temperatūra, pakartotinas vandeninių baltymų ekstraktų atšildymas-užšaldymas ir kt. veiksniai. Procesai žymiai sulėtėja dirbant žemoje temperatūroje su druskingais baltymų ekstraktais, bei koncentruotais baltyminių tirpalais. Ilgam laikymui naudojamas kriokoncervavimas – užšaldymas prie labai žemų temperatūrų (pvz., laikymas azote). Natyvos baltymų struktūros išsaugojimas taip pat priklauso nuo šaltinio, jo savybių ir saugojimo sąlygų.

Mažiau stabilūs baltymai išskiriami iš biologinių skysčių, ląstelių, bei audinių, kuriuose vyksta

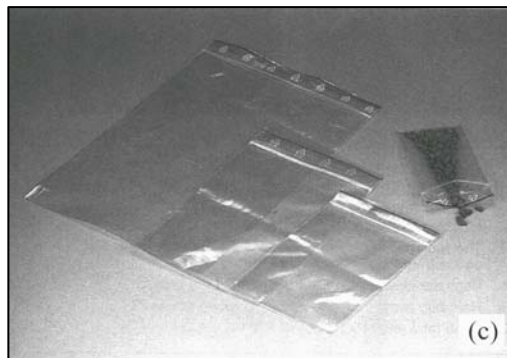
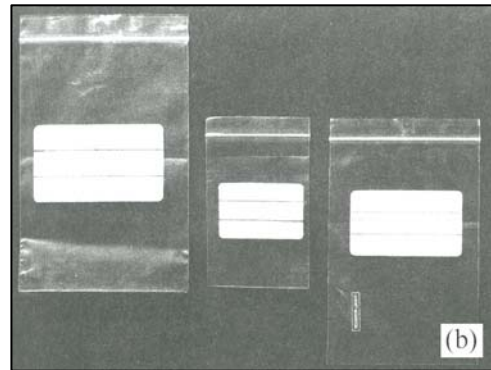
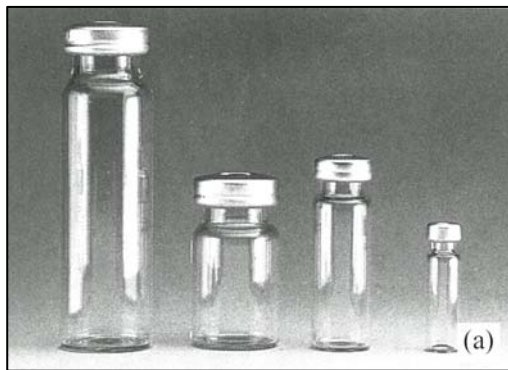
*Pastaba: esant –20°C (-40°C) temperatūrai kiaušinio baltymai, serumo ir spermos albuminai, bei transferinai; laktato dehidrogenazė, malato dehidrogenazė, 6-fosfogliukonato dehidrogenazė gali išsaugoti elektroforezines savybes metus laiko; serumo esterazė-1 – 3-6 mėn., serumo šarminė fosfatazė, kepenų fermentai – kelias savaites. Saugant –5°C (-10°C) baltymų elektroforezinės savybės kinta greičiau.*

intensyvūs metaboliniai procesai ir yra

didelis kiekis proteolitinių fermentų. Be to, ekstraktuose ir hemolizatuose baltymai greičiau praranda aktyvumą, negu natyvioje aplinkoje - audiniuose ir nesuardytose ląstelėse.

Fermentų aktyvumo lygis saugojimo metu taip pat priklauso nuo pradinio aktyvumo, kurį apsprendžia:

- ❑ tiriamo objekto amžius mėginio paėmimo metu (vištų serumo esterazės-1 ir šarminės fosfatazės aktyvumas žymiai sumažėja arba visai išnyksta paukščiams lytiškai subrendus);
- ❑ lyties (gaidžių serumo esterazės-1 aktyvumas didesnis nei pas vištas);
- ❑ fermento tipo (serumo šarminės fosfatazės greitieji variantai labiau aktyvūs už lėtuosius);
- ❑ fermentų individualumo (esterazių spektro nusidažymo įvairovė: nuo labai intensyvaus iki nulinio).



**2 pav. Medžiagos saugojimas: (a) indeliai organizmo skysčių surinkimui ir laikymui; (b,c) sandarūs maišeliai audinių surinkimui ir laikymui.**