

BIOLOGIA KOMÓRKI

LABORATORIUM NR 3

PORÓWNANIE SKUTECZNOŚCI METOD DEZINTEGRACJI KOMÓREK *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Wstępną czynnością do uzyskania różnego rodzaju białek (a także podstruktur komórkowych) jest dezintegracja komórek, tkanek czy narządów. Przeprowadza się ją w określonych warunkach i środowiskach, aby rozrywając błonę i/lub ścianę komórkową nie uszkodzić błon organelli wewnątrzkomórkowych, ani nie zdegradować ich składników chemicznych. Różne sposoby dezintegracji komórek i tkanek podane są w Tabeli 1.

Tab. 1. Metody dezintegracji komórek.

	Metody uwalniania komórek	Materiał biologiczny
ŁAGODNA	Liza osmotyczna	Erytrocyty, bakterie
	Liza detergentami	Komórki z hodowli tkankowych
	Liza rozpuszczalnikami organicznymi	Bakterie, drożdże
	Trawienie enzymatyczne	Bakterie, drożdże
	Ręczna homogenizacja	Tkanka wątroby
	Krojenie	Większość tkanek roślinnych i zwierzęcych
	Zamrażanie/rozmarzanie	Większość rodzajów komórek
UMIARKOWANA	Homogenizacja (Dounce'a, Potter-Elvehjem'a)	Tkanka mięśniowa, większość tkanek roślinnych i zwierzęcych
	Rozcieranie	Bakterie, tkanki roślinne
ENERGICZNA	Sonifikacja	Zawiesina komórek
	Prasa Frencha	Bakterie, drożdże, komórki roślinne
	Wytrząsanie z kulkami szklanymi	Zawiesiny komórek

Typowa procedura izolacji białek z komórki składa się z następujących etapów:

- A. przemyć masę komórkową w celu usunięcia pozostałości pożywki lub innych komórek w przypadku tkanek np. krwi;
- B. liza komórek (w celu uwolnienia frakcji cytozolowej komórek); ekstrakt komórkowy otrzymany po lizie komórek nazywamy homogenatem;

- C. oddzielenie frakcji komórkowych od siebie poprzez zastosowanie metod sedymentacyjnych w wirówkach; po oddzieleniu np. składników nierozpuszczalnych przez wirowanie (zwykle od 10 min. przy 15 000 g do 1 godziny przy 100 000 g) otrzymuje się nadsącz (supernatant) i osad (pelet) zawierający frakcję błon komórkowych. Nadsącz może być dalej oczyszczany i zawarte w nim białka rozdzielane np. na kolumnach chromatograficznych w zależności od specyficznych własności białka (ciężar cząsteczkowy, punkt izoelektryczny, wiązanie się z innymi substancjami itp.).

WYBRANE METODY DEZINTEGRACJI KOMÓREK I TKANEK

A. HOMOGENIZACJA

Homogenizacja dezorganizuje wnętrze komórki, uwalniając enzymy hydrolityczne, które mogą uszkadzać organelle komórkowe, a siły tarcia powodują wzrost temperatury substancji homogenizowanej. Z tych względów homogenizację prowadzi się zwykle w temperaturze 0°C oraz w roztworze izotonicznym (najczęściej 0,25M roztwór sacharozy) o stężeniu jonów wodorowych bliskim pH cechującego wnętrze komórki (ok. 7). Postęp procesu można monitorować przez obserwacje mikroskopowe lub przez pomiar uwolnionego białka komórkowego w nadsączu.

B. LIZA DETERGENTAMI

Działanie detergentami prowadzi do solubilizacji błony. Cząsteczki detergentu są amfipatyczne, a więc łatwo wnikają do dwuwarstwy fosfolipidowej i zrywają oddziaływania hydrofobowe, co prowadzi do uszkodzenia błony komórki i uwolnienia do roztworu integralnych białek błonowych. Do łagodnych detergentów zalicza się Tryton X-100 oraz glukozyd oktylu, natomiast silnym detergentem jest SDS (siarczan dodecyłu sodu), który denaturuje białka, niszcząc struktury II-, III-, IV-rzędowe.

C. LIZA ENZYMATYCZNA

Metoda polega na wykorzystaniu enzymów hydrolitycznych, rozkładających konkretne składniki ścian komórkowych badanych komórek. Przykładowo enzym – zymoliaza (glukanaza) trawi glukan będący składnikiem ściany komórkowej drożdży, natomiast lizozym hydrolizuje wiązanie β -1,4-glikozydowe pomiędzy polisacharydami ściany komórkowej bakterii gram dodatnich (np. *Micrococcus lysodeikticus*). Degradacja składników ściany komórkowej prowadzi do otrzymania komórek pozbawionych ściany komórkowej, tzw. protoplastów, które łatwo poddać lizie np. za pomocą lizy osmotycznej.

D. LIZA OSMOTYCZNA

Komórki są wrażliwe na szok osmotyczny, gdy przetrzymywane są w roztworach hypotonicznych (o ciśnieniu osmotycznym mniejszym niż w cytoplazmie). Wtedy to woda z otaczającego roztworu (woda, bufor bez sacharozy) dyfunduje do bardziej stężonego roztworu, jakim jest cytozol, powodując pęcznienie i rozerwanie komórki.

E. ROZCIERANIE

Rozcieranie komórek z substancjami ściernymi jest najczęściej wykorzystywane do rozbijania komórek organizmów jednokomórkowych. Jest to metoda mało kosztowna, wymagająca do użycia prostego sprzętu i tanich odczynników (tj. młóździerza, piasku lub obojętnego tlenku glinu). Dodatkowo metoda pozwala na dezintegrację nawet 30 g na cykl.

F. SONIFIKACJA

Opiera się na zdolności fal ultradźwiękowych o dużej mocy i małej częstotliwości (20-100 kHz) do wywoływania efektu kawitacji, który wpływa na fizykochemiczne oraz biochemiczne właściwości materiału, a w szczególności na dezintegrację struktur komórkowych oraz uwalniania zawartości komórki do środowiska. Zjawisko kawitacji jest wynikiem implozji pęcherzyków gazu spowodowanej gwałtownymi zmianami ciśnienia (do 50 MPa) oraz temperatury (nawet do 5500 °C). Siły mechaniczne, tworzące się wówczas w miejscu zderzenia pęcherzyków kawitacyjnych, oraz fala generowana po ich

implozji są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za uszkodzenie komórek. Jednym z ograniczeń metody jest ilość materiału biologicznego, która nie może przekroczyć ok 1 g na cykl.

G. ZAMRAŻANIE/ROZMRAŻANIE

Wzrost objętości zamarzającej w cytoplazmie wody oraz powstające kryształy lodu powodują uszkodzenie ściany i błony komórkowej oraz organelli komórkowych. Metodę stosuje się podczas izolacji odpornych na denaturację białek, ponieważ zamarzanie powoduje częściową utratę wody hydratacyjnej białek co prowadzi do zmian ich własności (denaturacja). Ograniczeniem jest również konieczność ochrony białek przed działaniem uwolnionych, głównie z lizosomów, enzymów proteolitycznych.

H. WYTRZĄSANIE Z KULKAMI SZKLANYMI

Jest ulepszeniem metody rozcierania. Małe kulki szklane powodują uszkodzenia ściany komórkowej podczas wytrząsania. Najczęściej stosowana jest do organizmów jednokomórkowych. Prowadzi się ją w małych naczyniach laboratoryjnych, takich jak próbówki (dla ok. 1 g masy komórek) lub przy użyciu specjalnej aparatury (do większych objętości).

PODSTAWY SPEKTROFOTOMETRII

Spektrofotometria wykorzystuje zjawisko pochłaniania energii promieniowania elektromagnetycznego przez różne substancje i jest szeroko stosowana w badaniach struktury cząsteczek, a także w jakościowej i ilościowej analizie chemicznej.

Promieniowanie elektromagnetyczne definiowane jest jako postać energii występująca w formie fal, czyli rozchodzących się z prędkością $3 \cdot 10^5$ km/s okresowych zmian pola elektrycznego i magnetycznego. Energia promieniowania elektromagnetycznego z zakresu nadfioletu (UV) oraz światła widzialnego (Vis) powoduje zmiany elektronowe w cząsteczkach, tzw. przejścia elektronowe, powodujące zaabsorbowanie określonej ilości energii. Zdolność pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego o określonej częstotliwości przez daną substancję zależy od jej struktury, a zwłaszcza od występowania i rozmieszczenia wiązań nienasyconych (głównie podwójnych).

W związku z absorpcyjnymi właściwościami niektórych związków sformułowano szereg zależności pomiędzy ilością zaabsorbowanej energii a pewnymi cechami fizycznymi substancji. Są to m.in: prawo Lamberta, prawo Lamberta-Beera oraz prawo addytywności:

A. Prawo Lamberta

Absorbancja jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, jeśli wiązka promieniowania monochromatycznego przechodzi przez jednorodny ośrodek absorbujący.

Wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o grubości b ulega osłabieniu, co ilustruje wzór (1):

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot b} \quad (1)$$

gdzie:

I – natężenie światła po przejściu przez ośrodek [W/m^2],

I_0 – natężenie światła padającego [W/m^2],

b – grubość warstwy absorbującej [cm],

k – współczynnik absorpcji [$1/cm$],

e – podstawa logarytmów naturalnych.

Stąd:

$$\ln \frac{I_0}{I} = k \cdot b \quad (2)$$

Po przekształceniu na logarytm dziesiętny otrzymujemy wzór na **absorbancję**, czyli zdolność pochłaniania promieniowania:

$$\log \frac{I_0}{I} = 0,4343 \cdot k \cdot b = a \cdot b = A \quad (3)$$

Inną wielkością określającą absorpcję promieniowania jest **transmitancja** T (4) i (5):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (5)$$

B. Prawo Lamberta-Beera:

Jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu c i do grubości warstwy absorbującej b , k - współczynnik absorpcji przy określonej długości fali (6):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot c \cdot b \quad (6)$$

Gdy stężenie roztworu wyrażone jest w mol/dm³, a grubość warstwy absorbującej w cm, wówczas współczynnik k nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji (ϵ), a wzór przyjmuje postać (7):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (7)$$

C. Prawo addytywności absorbancji:

Absorbancja roztworu wieloskładnikowego równa się sumie absorbancji poszczególnych składników.

SPEKTROFOTOMETRYCZNA METODA OZNACZANIA BIAŁKA

Większość związków aromatycznych ma zdolność pochłaniania światła nadfioletowego o długości fali 280 nm. W składzie aminokwasowym białek występują trzy aminokwasy aromatyczne: tyrozyna (Tyr) i tryptofan (Trp), które pochłaniają światło głównie przy długości fali 280 nm, oraz fenyloalanina (Phe), która najsilniej absorbuje światło przy 260 nm.

Metoda polega a na spektrofotometrycznym pomiarze absorpcji promieni UV o długości 280 nm oraz 260 nm przechodzących przez badany roztwór białka. Do obliczenia przybliżonego stężenia białka (mg/ml) w analizowanej próbce można użyć równania (8):

$$c_{białka} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad (8)$$

Wadą tej metody jest duża zmienność absorbancji dla różnych rodzajów białek, wynikająca z niejednakowej procentowej zawartości aminokwasów. Inną wadą metody spektrofotometrycznej jest możliwość zawyżenia odczytu przez kwasy nukleinowe obecne w próbce, w szczególności w homogenatach po dezintegracji komórek. Stosując tę metodę można oznaczyć zawartość białka od

10 μg . Zaletą metody jest jej prostota i szybkość pomiaru, co ma szczególne znaczenie w preparatyce enzymatycznej, często wykonuje się pomiar tylko przy jednej długości fali.

WIRÓWKI LABORATORYJNE

Do jednostek charakteryzujących częstotliwość obrotu rotora wirówki, stosowanych głównie do wyrażania prędkości obrotowej należą:

- RPM** (ang. *Revolution Per Minute*) – liczba obrotów na minutę;
- RCF** (ang. *Relative Centrifugal Force*) – względna siła odśrodkowa – wielokrotność g (np. $600 \times g$).

Jednostki te można wzajemnie przeliczać według wzoru (9):

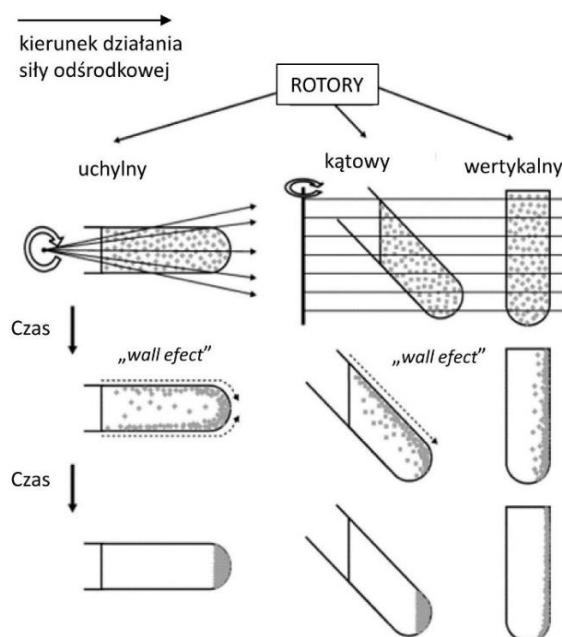
$$RCF = (1,118 \cdot 10^{-5}) \cdot r \cdot (RPM)^2 \quad (9)$$

gdzie:

r – promień (cm), mierzony od centrum wirówki do końca wkładu rotora

$(1,118 \cdot 10^{-5})$ – stała obliczona z prędkości kątowej

Wyróżniamy trzy główne rodzaje rotorów (wirników) stosowanych w wirówkach laboratoryjnych (Ryc. 1):



Ryc. 1. Rodzaje najczęściej stosowanych rotorów w wirówkach laboratoryjnych.

- rotor uchylny** (ang. *swinging-bucket*) – posiada komory, początkowo znajdujące się w pozycji pionowej (w trakcie ładowania probówek wirówkowych oraz na początku wirowania), które podczas przyspieszania rotora zmieniają położenie na prostopadłe do osi wirówki (wraz z roztworem znajdującym się w probówkach) oraz równoległe do pola działania siły odśrodkowej; powolne przyspieszanie i zwalnianie prędkości obrotu rotora ogranicza negatywne efekty związane z konwekcją i mieszaniem się uzyskanych gradientów;

- b. **rotor kątowy** (ang. *fixed angle*) – próbki wirówkowe są umieszczane w komorach o stałym kącie nachylenia w stosunku do osi obrotu wirówki; kąt nachylenia pozostaje niezmienny w trakcie ładowania, wirowania oraz wyładowywania próbek; dla określonej objętości droga, jaką pokonują cząstki homogenatu jest krótsza w porównaniu do rotora uchylnego; rotory kątowe są bardziej wydajne w metodach wymagających uzyskanie jednolitego peletu (osadu); kąt nachylenia tego typu rotorów mieści się w granicy 14° - 40° ;
- c. **rotor wertykalny** (ang. *vertical*) – próbki wirówkowe są umieszczone w płaszczyźnie pionowej w trakcie wirowania; cząsteczki ulegają sedymentacji pod wpływem siły odśrodkowej w poprzek próbki wirówkowej; dla określonej objętości cząsteczki przemieszczają najkrótszą drogę spośród wymienionych typów rotorów; do sedymentacji dochodzi szybciej, ale uzyskany pelet znajduje się na całej długości ścianki wewnętrznej próbki; stanowi to wadę ze względu na możliwość opadania peletu do roztworu i mieszania się z nim pod koniec wirowania.

PORÓWNANIE METOD DEZINTEGRACJI KOMÓREK

Celem ćwiczenia jest porównanie skuteczności metod dezintegracji komórek *Saccharomyces cerevisiae* na podstawie pomiaru stężenia białka uwolnionego w wyniku permeabilizacji ich błony komórkowej.

A. OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA PRZED DEZINTEGRACJĄ – próba kontrolna

WYKONANIE:

1. Do falkonu o objętości 15 ml przenieść 1 g mokrej masy *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Dodać 8 ml PBS.
3. Dokładnie wymieszać do uzyskania jednolitej zawiesiny komórek.
4. Odwirować przy 3000 rpm przez 10 minut.
5. Przenieść 2 ml supernatantu do probówki typu Eppendorf na 2 ml. Zachować do oznaczenia stężenia białka (próba ślepa – PBS).

B. DEZINTEGRACJA METODĄ ROZCIERANIA

WYKONANIE:

1. Przy użyciu naczynka wagowego odważyć 1 g mokrej masy *Saccharomyces cerevisiae*, przenieść do moździerza.
2. Dodać 1 ml PBS i stopniowo 0,5 g tlenku glinu lub piasku rozcierając masę komórek za pomocą tłuczka.
3. Rozcierać komórki przez około 15 minut (do uzyskania jednolitej masy).
4. Dodać 3 ml PBS i dokładnie wymieszać.
5. Zawiesinę przenieść do falkonu o objętości 15 ml.
6. Moździerz przepłukać dokładnie 4 ml PBS i przenieść do probówki (końcowa objętość zawiesiny powinna wynosić 8 ml).
7. Odwirować przy 3000 rpm przez 10 min.
8. Przenieść 2 ml supernatantu do probówki typu Eppendorf na 2 ml. Zachować do oznaczenia stężenia białka (próba ślepa – PBS).

C. DEZINTEGRACJA METODĄ SONIFIKACJI

WYKONANIE:

1. Do kolbki o objętości 25 ml przenieść 1 g mokrej masy *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Dodać 1 ml PBS i przeprowadzić sonifikację przy użyciu łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut.
3. Przenieść całość z kolbki do falkonu o objętości 15 ml przy użyciu 7 ml PBS (końcowa objętość zawiesiny powinna wynosić 8 ml).
4. Odwirować przy 3000 rpm przez 10 minut.
5. Przenieść 2 ml supernatantu do probówki typu Eppendorf na 2 ml. Zachować do oznaczenia stężenia białka (próba ślepa – PBS).

D. DEZINTEGRACJA METODĄ HOMOGENIZACJI

WYKONANIE:

1. Do homogenizatora przenieść 1 g mokrej masy *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Homogenizować przez 15 min.
3. Homogenat przenieść do falkonu o objętości 15 ml przy użyciu 8 ml PBS.
4. Odwirować przy 3000 rpm przez 10 minut.
5. Przenieść 2 ml supernatantu do probówki typu Eppendorf na 2 ml. Zachować do oznaczenia stężenia białka (próba ślepa – PBS).

E. DEZINTEGRACJA METODĄ Z UŻYCIEM DETERGENTÓW

WYKONANIE:

1. Do falkonu o objętości 15 ml przenieść 1 g mokrej masy *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Dodać 8 ml 0,5% SDS w PBS.
3. Zawiesinę komórek pozostawić na 30 min, wytrząsając co 5 min na wytrząsarce typu Vortex.
4. Odwirować przy 3000 rpm przez 10 minut.

5. Przenieść 2 ml supernatantu do probówki typu Eppendorf na 2 ml. Zachować do oznaczenia stężenia białka (próba ślepa – 0,5% SDS w PBS).

SPETROFOTOMETRYCZNY POMIAR STĘŻENIA BIAŁKA

WYKONANIE:

1. Wykonać 5-krotne rozcieńczenie uzyskanych nadsączy. Zmierzyć absorbancję uzyskanych 5 roztworów przy długości fali $\lambda=260$ nm oraz $\lambda=280$ nm w trzech powtórzeniach względem odpowiedniej próby ślepej.
2. Na podstawie odczytanych wartości absorbancji obliczyć średnią wartość absorbancji oraz odchylenie standardowe dla każdego zestawu pomiarów.
3. Obliczyć stężenie białka w każdej próbce oraz dokonać analizy uzyskanych wyników.
4. Odpowiedzieć na pytania:
 - a) Która z poznanych metod dezintegracji jest najskuteczniejsza wobec *S. cerevisiae*?
 - b) Jakie są przyczyny powstałych rozbieżności w trakcie wykonywania ćwiczenia?
 - c) Od czego zależy dobór odpowiedniej metody dezintegracji komórek?

SPRAWOZDANIE

W sprawozdaniu powinny znaleźć się:

1. Strona tytułowa - tytuł ćwiczenia, data, nr grupy, osoby wykonujące ćwiczenie;
2. Wstęp teoretyczny (maksymalnie 1 strona);
3. Wykonanie ćwiczenia;
4. Wyniki pomiarów, obliczeń zebrane w tabelę, przejrzyste;
5. Określić, która próba była kontrolną, a które badanymi;
6. Wnioski – omówić uzyskane wyniki **ORAZ** odpowiedzieć na podane wcześniej pytania.

Sprawozdanie należy przysłać w formacie ***pdf**. Temat maila oraz nazwa pliku powinny brzmieć: **L1 zespół 2 sprawozdanie Biologia komórki (dezintegracja)** (wpisać odpowiednie numery grup).

ODCZYNNIKI:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- tlenek glinu lub piasek
- PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*)
- 0,5% roztwór SDS w PBS

LITERATURA

- Bollag, D.H. and S.J. Edelstein. 1992. Protein Methods. Wiley&Liss, New York.
- Fleicher, S., J.O. McIntyre, and J.C. Vital. 1979. Large scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. *Methods in Enzymology*. 55: 32-39.
- Hames B.D., Hooper N.M. 2006. Krótkie wykłady. BIOCHEMIA. Wydawnictwo Naukowe PWN, Wydanie Drugie, Warszawa, str. 59-61.
- Kapturowska A., Stolarzewicz I., Chmielewska I., Białecka-Florjańczyk E. 2011. Ultradźwięki – narzędzie do inaktywacji komórek drożdży oraz izolacji białek wewnątrzkomórkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(77), str. 160-171.
- Kłuszejko-Stefanowicz L. (red.). 2005. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2005.
- Oyane I., Takeda T., Oda Y., Sakata T., Furuta M., Okitsu K., Maeda Y., Nishimura R. 2009. Comparison between the effects of ultrasound and γ -rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: Analyses of cell membrane permeability and DNA Or RNA synthesis by flow cytometry. *Ultra. Sonochem.*, 16, pp. 532-536.

Rosiński M., Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R. 2005. Przegląd metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(44), str. 5-22.