

## Biologia Komórki - laboratorium

### **PORÓWNANIE METOD DEZINTEGRACJI KOMÓREK**

#### **WSTĘP**

Aby wyizolować białka otrzymane np. w systemach nadekspresji w komórkach drobnoustrojów potrzebne są odpowiednie metody, które pozwalają na uwolnienie danego białka z komórki z dużą wydajnością przy jednoczesnym zachowaniu jego własności np. aktywności enzymatycznej, struktury itp. Szczególnie pleśnie i drożdże ale również komórki roślinne posiadają odporną na lizę ścianę komórkową, która utrudnia izolację białek i innych składników komórkowych.

Typowa procedura izolacji białek z komórki składa się z następujących etapów: przemycia masy komórkowej (z pozostałości pożywki lub innych komórek w przypadku tkanek np. krwi), liza komórek (w celu uwolnienia frakcji cytozolowej komórek) i oddzielenie frakcji komórkowych od siebie (rozdzielenie frakcji błon komórkowych, rozpuszczalnych białek i frakcji nierozpuszczalnej). Do rozdzielenia tych frakcji używa się metod sedymentacyjnych w wirówkach. Ekstrakt komórkowy otrzymany po lizie komórek nazywamy **homogenatem**. 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 (**surowy ekstrakt**) i osad zawierający frakcję błon komórkowych. Nadsącz może być dalej oczyszczany i zawarte w nim białka rozdzielane np. na kolumnach chromatograficznych w zależności od specyficznych własności interesującego nas białka (ciężar cząsteczkowy, punkt izoelektryczny, wiązanie się z innymi substancjami itp.)

Najważniejszym z punktu widzenia wydajności procesu izolacji białek jest etap dezintegracji komórek. Różne sposoby lizy różnych rodzajów komórek i tkanek podane są w Tabeli 1.

#### Homogenizacja.

Jest to jedna z najczęściej używanych metod do dezintegracji miękkich tkanek zwierzęcych. W zależności od rodzaju tkanki używa się różnych typów homogenizatorów: Potter-Elvehjema (tkanki wątroby, serca, mózgu, mięśni gładkich), Dounce'a (tkanka mózgu, komórki z hodowli tkankowych), homogenizatora-miksera (Rys. 1). W czasie homogenizacji utrzymuje się obniżoną temperaturę (0-4°C) i dodatek inhibitorów proteaz komórkowych. Postęp procesu można monitorować przez obserwacje mikroskopowe lub przez pomiar uwolnionego białka komórkowego w nadsączu.

#### Sonifikacja.

Metoda używana do dezintegracji bakterii np. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i komórek zwierzęcych np. mózgu. W metodzie tej wykorzystuje się wibracje tzw. fale kawitacji wywoływane w roztworze przez ultradźwięki, które mechanicznie uszkadzają ścianę komórkową. Wielkość wibracji musi być utrzymywana na takim poziomie aby nie powodować tworzenia się piany ponieważ wywołuje to

natlenienie roztworu co z kolei może prowadzić do denaturacji białek. Sonifikator składa się z sondy i układu elektronicznego kontrolującego poziom ultradźwięków (patrz Rys. 2). Jednym z ograniczeń metody jest ilość komórek, która nie może przekroczyć ok 1 g na cykl. W czasie sonifikacji konieczne jest również chłodzenie zawiesiny komórek przez np. zanurzenie naczynia w mieszaninie woda-lód.

Tabela 1. Metody dezintegracji komórek (tkanek).

<b>metoda</b>	<b>rodzaj komórek (tkanki)</b>
krojenie	większość tkanek roślinnych i zwierzęcych
homogenizacja (Dounce'a, Potter-Elvehjem'a)	miękkie tkanki zwierzęce
sonifikacja (ultradźwięki)	zawiesiny komórek
Prasa French'a	bakterie, drożdże, komórki roślinne
rozcieranie	bakterie, tkanki roślinne
wytrząsanie z kulkami szklanymi	zawiesiny komórek
trawienie enzymatyczne	bakterie, drożdże
liza detergentami	komórki z hodowli tkankowej
liza rozpuszczalnikami organicznymi	bakterie, drożdże
szok osmotyczny	krwinki (erytrocyty), bakterie
zamrażanie/rozmarzanie	większość rodzajów komórek

#### Prasa French'a (French Pressure Cell).

Metoda polega na poddaniu zawiesiny komórek wysokiemu ciśnieniu i gwałtownym uwolnieniu do ciśnienia atmosferycznego w specjalnym typie prasy (Rys. 3). Zmiana ciśnienia powoduje rozpad komórek. Metoda pozwala na dezintegrację z wysoką wydajnością zawiesin komórek o objętości ok. 10-30 ml ale staje się technicznie trudna dla mniejszych objętości i zbyt czasochłonna dla objętości większych. Używana jest najczęściej do dezintegracji komórek bakteryjnych i drożdżowych.

#### Rozcieranie.

Tak jak dezintegracja w Prasie Francuskiej ucieranie z substancjami ściernymi używane jest do rozbijania komórek organizmów jednokomórkowych. Używane materiały i sprzęt są niekosztowne (moździerz, piasek lub obojętny tlenek glinu) a metoda pozwala na dezintegrację masy komórek do ok. 30 g na cykl.

#### Wytrząsanie z kulkami szklanymi.

Jest ulepszeniem metody ucierania. Mechaniczne uszkodzenie ściany komórkowej powodują małe kulki szklane wytrząsane w zawieszynie komórek. Metoda ta używana jest również w stosunku do organizmów jednokomórkowych, najczęściej drożdży. W małej skali (ok. 1 g masy komórek) prowadzi się ją w naczyniach laboratoryjnych np. probówkach, przy dużych objętościach zawiesziny komórek wymaga użycia specjalnej aparatury (patrz np. aparat przedstawiony na Rys. 4).

#### Trawienie enzymatyczne.

Polega na degradacji składników ściany komórkowej i otrzymaniu komórek pozbawionych ściany komórkowej tzw. protoplastów, które łatwo poddać lizie przez np. szok osmotyczny. W przypadku bakterii używa się lizozymu trawiącego bakteryjne peptydoglikany, u drożdży używana jest zymoliza (glukanaza), enzym trawiący glukan będący głównym składnikiem ściany komórkowej drożdży.

#### Liza detergentami.

Metoda ta jest często używana do dezintegracji komórek utrzymywanych w hodowli tkankowej. Jest bardzo zachowawcza jeśli chodzi o własności izolowanych białek jeśli tylko stężenie detergentu potrzebnego do lizy komórek jest niewysokie. Najczęściej używane detergenty to: Triton X-100, NP-40, dodecylan sodowy, siarczan sarkozyli, deoksycholan sodowy i inne.

#### Liza rozpuszczalnikami organicznymi.

Metoda używana do rozbijania komórek bakterii choć ograniczona głównie do lizy komórek na sączkach, które mają być następnie inkubowane z przeciwciałami lub sondami DNA.

#### Szok osmotyczny.

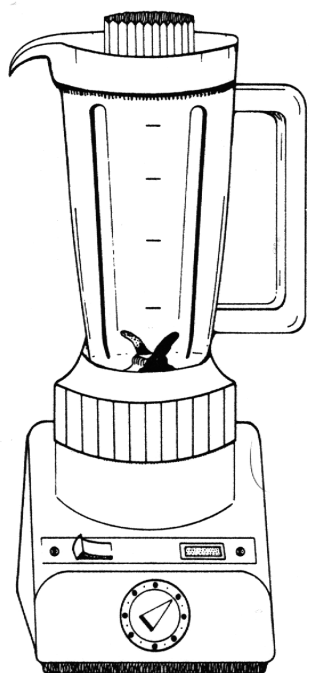
Komórki są wrażliwe na szok osmotyczny gdy przetrzymywane są w roztworach hypotonicznych (o ciśnieniu osmotycznym mniejszym niż w cytoplazmie). Metodę stosuje się do lizy czerwonych komórek krwi (erytrocytów) i komórek pozbawionych ściany komórkowej np. protoplastów bakterii czy drożdży.

#### Zamrażanie/rozmarzanie.

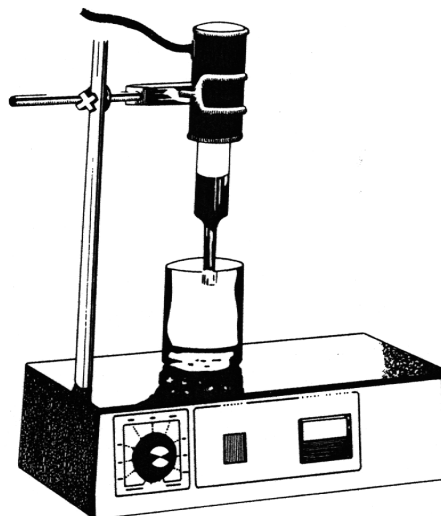
Wzrost objętości zamarzającej w cytoplazmie wody oraz powstające kryształy lodu powodują uszkodzenie ściany i błony komórkowej oraz organelli komórkowych. Metodę stosuje się podczas izolacji odpornych na denaturację białek ponieważ zamarzanie powoduje częściową utratę wody hydratacyjnej białek co prowadzi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

### **LITERATURA**

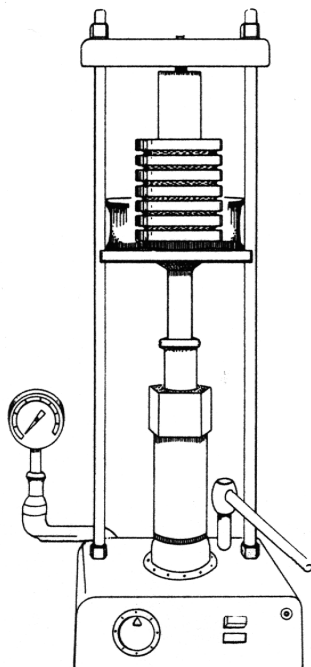
- Fleicher, S., J.O. McIntyre, and J.C. Vital. 1979. Methods in Enzymology. 55: 32-39. Large scale preparation of rat liver mitochondria in high yield.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Bollag, D.H. and S.J. Edelman. 1992. Protein Methods. Wiley&Liss, New York.



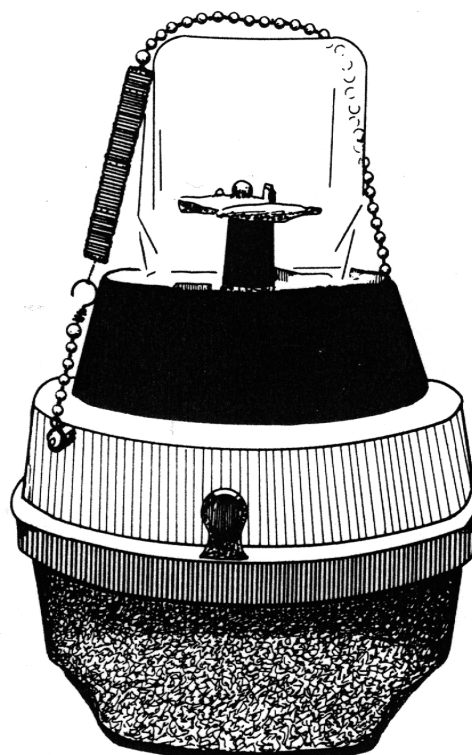
Rys. 1. Homogenizator



Rys. 2. Sonifikator ultradźwiękowy



Rys. 3. Prasa French'a



Rys. 4. Wyrząsarka z kulkami szklanymi do dużych objętości

## **WYKONANIE ĆWICZENIA - Porównanie metod dezintegracji komórek**

### **Materialy:**

- Drożdże piekarnicze (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Izotoniczny roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami (PBS)
- Odczynniki do oznaczania białka metodą Bradford
- Standardowy roztwór albuminy wołowej (BSA) o stężeniu 10 mg/ml
- 0.5% roztwór SDS (dodecylosiarczan sodu) w PBS

### **Sprzęt:**

- Probówki 15 ml oraz 50 ml z polipropylenu typu FALCON, statywy
- Probówki 1.5 ml typu Eppendorf
- Pipety automatyczne 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 5000  $\mu$ l, końcówki do pipet
- Tryskawka z etanolem i wodą destylowaną
- Zlewki, lignina
  
- Wyrząsarka laboratoryjna (vortex)
- Spektrofotometr, kuwety
- Prasa French'a
- Kulki szklane o średnicy 1-2 mm
- Moździerz, obojętny tlenek glinu

### **Metoda z rozcieraniem:**

Odważyć 1 g mokrej masy drożdży, przenieść do moździerza, dodać 1 ml roztworu PBS i dodawać stopniowo 2 g obojętnego tlenku glinu rozcierając masę komórek. Rozcierać masę do uzyskania jednolitej kleistej masy (przez ok 15-20 min.), dodać 4 ml PBSu i dokładnie wymieszać. Przenieść zawiesinę do 15 ml probówki, przepłukać dokładnie moździerz 5 ml PBSu i przenieść do probówki (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 10 ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 3000 rpm przez 10 min. Klarowny nadsącz zachować do oznaczenia stężenia białka.

### **Metoda z użyciem szklanych kulek:**

Odważyć 1 g mokrej masy drożdży, przenieść do 50 ml probówki zawierającej 8 g szklanych kulek o średnicy 2 mm. Dodać do probówki 10 ml PBS, wytrząsać na wyrząsarce (vortex) przez 20-30 min przy maksymalnych obrotach. Po dezintegracji, zawiesinę komórek przenieść pipetą do 15 ml probówki (pozostawiając szklane kulki w probówce 50 ml), odwirować przy 3000 rpm przez 10 min. Klarowny nadsącz zachować do oznaczenia stężenia białka.

### **Metoda z użyciem Prasy French'a:**

Odważyć 1 g mokrej masy drożdży, przenieść do 15 ml probówki i dodać 10 ml PBS. Dokładnie wymieszać do uzyskania jednolitej zawiesiny komórek. Przenieść zawiesinę do Prasy French'a i rozbić komórki. Po dezintegracji, zawiesinę komórek przenieść do 15 ml probówki, odwirować przy 3000 rpm przez 10 min. Klarowny nadsącz zachować do oznaczenia stężenia białka.

### **Metoda z użyciem detergentów:**

Odważyć 1 g mokrej masy drożdży, przenieść do 15 ml probówki i dodać 10 ml 0.5% roztworu SDS w PBS. Zawiesinę komórek pozostawić na ok. 30 min od czasu do czasu wytrząsając na wytrząsarce (średnio, co 5 min.). Komórki odwirować przy 3000 rpm przez 10 min. Klarowny nadsącz zachować do oznaczenia stężenia białka. Jako odnośnik przy oznaczaniu białka użyć 0.5% roztworu SDS.

### **Oznaczanie stężenia białka przed dezintegracją:**

Odważyć 1 g mokrej masy drożdży, przenieść do 15 ml probówki i dodać 10 ml PBS. Dokładnie wymieszać do uzyskania jednolitej zawiesiny komórek, odwirować przy 3000 rpm przez 10 min. Nadsącz zachować do oznaczenia stężenia białka.

### **Przygotowanie krzywej wzorcowej i pomiar stężenia uwolnionego białka komórkowego w procesie dezintegracji:**

Przygotować w probówkach roztwory do wyznaczenia krzywej wzorcowej dla standardu białka BSA (końcowa objętość 1 ml) o następujących stężeniach:

0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 mg/ml

Z przygotowanych roztworów pobrać 100  $\mu$ l pipetą automatyczną i przenieść do 5 ml odczynnika Bradford. Całość wymieszać na wytrząsarce i pozostawić na 5 min. Stężenie białka oznaczać przy długości fali 595 nm. Wykreślić krzywą wzorcową zależności absorpcja - stężenie białka BSA:  $A = f(c)$ .

Z otrzymanych nadsączów pobrać po 100  $\mu$ l supernatantu, zmieszać z 5 ml odczynnika Bradford, wymieszać na wytrząsarce i pozostawić na 5 min. Stężenie białka oznaczać przy długości fali 595 nm, na podstawie krzywej wzorcowej obliczyć stężenie białka w nadsączach.

### **Sprawozdanie**

- Narysować wykres stężenia białka wzorcowego (albuminy) w funkcji absorpcji – krzywa wzorcowa  $A = f(c_{BSA})$ .
- Przedstawić wyniki w postaci histogramu przedstawiając wzrost stężenia białka w nadsączu zawiesiny komórek po procesie rozbijania w stosunku do zawiesiny komórek nie poddanych dezintegracji.
- Przedstawić w postaci histogramu wydajność procesu rozbijania komórek poszczególnymi metodami.
- Opisać, jaka z używanych metod jest najbardziej odpowiednia do rozbijania komórek drożdży.
- Opisać przyczyny powstałych rozbieżności podczas wykonywania ćwiczenia
- We wstępie teoretycznym, proszę podać jaki jest cel stosowania dezintegracji komórek oraz proszę dokładnie opisać tylko jedną metodę dezintegracji komórek (proszę podać literaturę, z której się korzystało podczas opisywania metody)