

DEZINTEGRACJA ULTRADŹWIĘKOWA

Ćwiczenie nr 4 Dezintegracja ultradźwiękowa

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu ultradźwięków na komórki bakterii *Bacillus subtilis*

Wstęp

Metody dezintegracji drobnoustrojów.

Dezintegracja- rozkład lub dekompozycja jednolitej nierozłącznej struktury;

Dezintegracja komórek-proces powodujący utratę lub osłabienie integralności komórek;

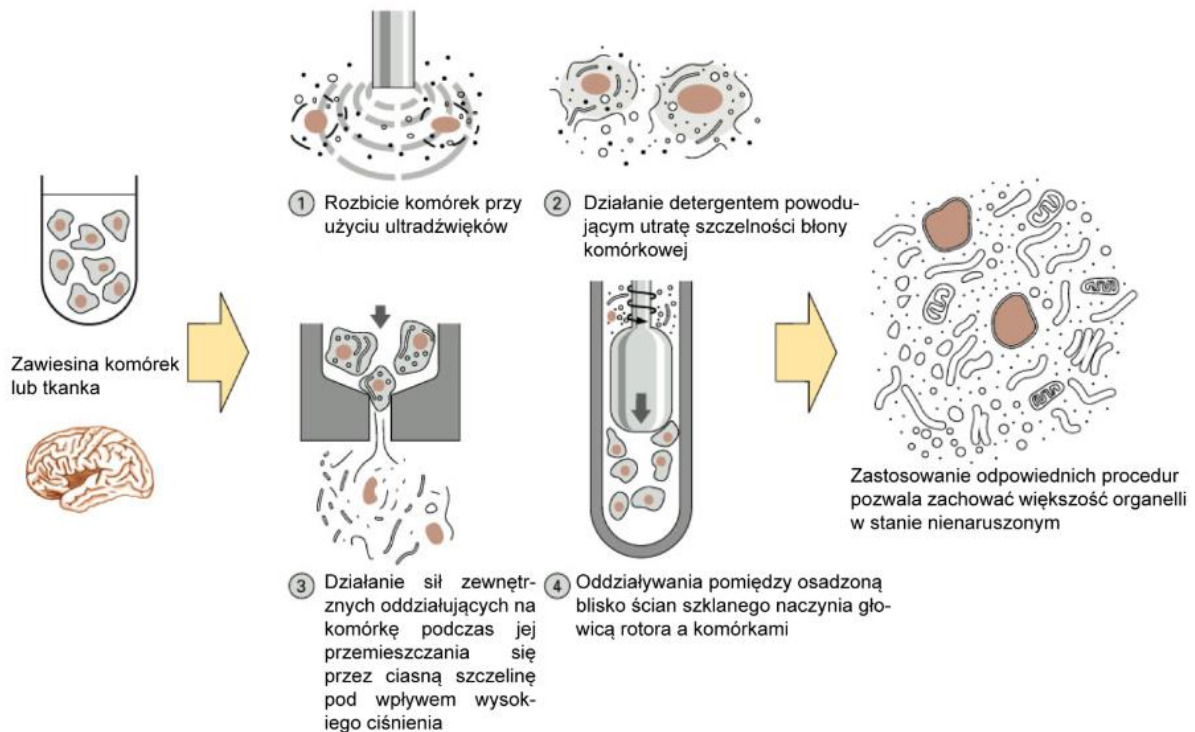
Utrata albo osłabienie spójności ściany komórkowej lub błony komórkowej, oddzielającej komórki od środowiska zewnętrznego, powoduje uwolnienie ich zawartości. Dezintegracja komórek służy pozyskaniu z komórek pożądanego materiału (Rysunek 1.). Pożądanym materiałem mogą być organella komórkowe enzymy czy też inne związki chemiczne.

Wybór metody (techniki oraz procedury) dezintegracji komórek zależy od dalszego wykorzystania wyizolowanego z komórki materiału. Niekiedy krytyczną właściwością decydującą o przydatności wyizolowanego z komórki materiału jest zachowanie przez niego aktywności enzymatycznej(natywnej struktury). Wydajność i efektywność procesu dezintegracji zależy zaś od wykorzystanego urządzenia, doboru parametrów jego działania, akcesoriów a także kontroli środowiska reakcji.

Pierwszym etapem większości procedur jest dobór metody służącej dezintegracji tkanek lub komórek w warunkach kontrolowanych

Przy pomocy odpowiednich procedur mechanicznych, nazywanych homogenizacją, błony komórkowe mogą być zniszczone, a zawartość komórki uwolniona. Cztery najczęściej stosowanych metod zostały zaprezentowane poniżej:

Powstająca zawiesina zawiera m.i.: organella komórkowe, białka błonowe, składniki cytozolu, enzymy, rybosomy, metabolity



Rysunek 1. Schemat przedstawiający najpopularniejsze metody dezintegracji. Na podstawie grafiki Garland Publishing, 1996.

1. Wpływ ultradźwięków na organizmy żywe

Wpływ ultradźwięków na organizmy żywe jest różny w zależności od ich natężenia - wiązka o małym natężeniu pobudza rozmnażanie komórek i wzrost, przy dużym natężeniu fali ultradźwiękowej

organizmu obumierają (mają na to wpływ zarówno kawitacja ja i depolimeryzacja łańcuchów białkowych). Odpowiednio określone natężenie wiązki pozwala zniszczyć drobnoustroje chorobotwórcze np. pałeczki duru brzuszego, streptokoki, enterokoki. Wiązka ultradźwiękowa o odpowiedniej długości fali i częstotliwości potrafi również likwidować nasiona grzybków pleśni i drożdży.

2) Izolacja białek z komórki

Aby wyizolować białka otrzymane np. w systemach nadekspresji w komórkach drobnoustrojów potrzebne są odpowiednie metody, które pozwolą na uzyskanie tego białka i jednocześnie zachowaniu jego własności np. aktywności enzymatycznej, struktury itp. Ściana komórkowa, którą posiadają pleśnie, drożdże, jak i komórki roślinne jest odporna na lizę komórkową, co utrudnia izolację białek i innych składników komórkowych. Izolacja białek z komórki składa się z następujących etapów:

- ✓ przemywania masy komórkowej (np. z pozostałości pożywki)
- ✓ liza komórek (w celu uwolnienia frakcji cytozolowej)
- ✓ oddzielenie frakcji komórkowych od siebie.

Do rozdziału tych frakcji używa się najczęściej metod sedymentacyjnych. Ekstrakt komórkowy otrzymany po lizie nazywamy homogenatem. Po oddzieleniu składników nierozpuszczalnych otrzymuje się nadsącz (surowy ekstrakt) i osad zawierający frakcję błon. Nadsącz może być dalej oczyszczany a zawarte w nim białka rozdzielane np. na kolumnach chromatograficznych czy kolumnach powinowactwa. Wyróżniamy następujące sposoby dezintegracji różnych rodzajów komórek i tkanek:

1) Sonifikacja

Jest to metoda używana do dezintegracji komórek bakteryjnych np. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i inne. W metodzie tej wykorzystuje się fale kawitacji (wibracje) wywoływane w roztworze przez ultradźwięki, które mechanicznie uszkodzają ścianę komórkową. Poziom wibracji musi być taki 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. Metoda ta wymaga spełnienia określonych warunków, po pierwsze ilość komórek, która podlega sonifikacji nie może przekroczyć ok 1g na cykl. Drugi z nich to temperatura: w czasie sonifikacji konieczne jest chłodzenie zawiesiny komórek np. przez zanurzenie naczynia w mieszaninie woda-lód.

2) Prasa French'a (French Pressure Celi)

Metoda ta polega na poddaniu zawiesiny komórek wysokiemu ciśnieniu, po czym gwałtownym uwolnieniu do ciśnienia atmosferycznego w specjalnym typie prasy. Zmiana ciśnienia doprowadza do rozpadu komórek. Metoda ta pozwala na dezintegrację z wysoką wydajnością zawiesin komórek o objętości do 30 ml, ale staje się technicznie trudna dla mniejszych objętości i zbyt czasochłonna dla objętości większych.

3) Rozcieranie

Ucieranie hodowli bakteryjnych z substancjami ściernymi używane jest do rozbijania komórek organizmów jednokomórkowych. Używane materiały i sprzęt to: moździerz, piasek lub obojętny tlenek glinu. Metoda pozwala na dezintegrację masy komórek do ok. 30 g na cykl.

4) Wytrząsanie z kulkami szklanymi

Jest to ulepszona metoda ucierania. Mechaniczne uszkodzenie ściany komórkowej powodują małe kulki szklane, które wytrząsane są w zawieszynie komórek. Metoda ta używana jest głównie w przypadku drożdży. Prowadzi się ją w naczyniach laboratoryjnych, w małej skali (ok. 1 g masy komórek) np. probówkach, przy dużych objętościach zawiesiny komórek wymaga użycia specjalnej aparatury.

5) Trawienie enzymatyczne.

Polega na degradacji składników ściany komórkowej i otrzymaniu komórek pozbawionych ściany komórkowej, które łatwo poddać lizie np. przez szok osmotyczny. W przypadku bakterii używa się lizozymu trawiącego bakteryjne peptydoglikany.

6) Liza detergentami.

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

7) Liza rozpuszczalnikami organicznymi

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

8) Zamrażanie/rozmróżanie

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. Ograniczeniem jest konieczność ochrony białek przed działaniem uwolnionych, głównie z lizosomów, enzymów proteolitycznych

9) Szok osmotyczny

Komórki są wrażliwe na szok osmotyczny gdy przetrzymywane są w roztworach hipotonicznych (o ciśnieniu osmotycznym mniejszym niż w cytoplazmie). Metoda ta ma zastosowanie do lizy czerwonych komórek krwi i komórek pozbawionych ściany komórkowej np. protoplastów bakterii.

DEZINTEGRACJA ULTRADŹWIĘKOWA

Wykonanie ćwiczenia:

Materialy:

zawiesina bakterii

roztwór C

odczynnik Folina-Ciocalteu'a rozcieńczony 1:1

Sprzęt:

dezintegrator ultradźwiękowy

spektrofotometr

wirówka

waga

pipety, probówki

probówki wirówkowe

zlewki

statyw do probówek

Dezintegracja materiału biologicznego

1. Ustawić 6 probówek wirówkowych na statywie
2. Dodać po 5ml zawiesiny bakteryjnej do każdej
3. Jedną probówkę zostawić na statywie (bez ultradźwięków), będzie to próbka kontrolna- ilość białka w zerowym czasie dezintegracji
4. Pozostałe 5 probówek poddawać działaniu ultradźwięków przez czas 5, 10, 20, 30, 60min.
5. Po dezintegracji, próbki należy zwirować przy 3000RPM przez czas 5 min (probówki przed wirowaniem należy zrównoważyć)
6. Po zwirowaniu przenieść supernatant do zlewek, oznaczonych odpowiednio 1-6 plastikową pipetą pasterowską
7. Do oznaczenia białka należy pobrać po 2ml każdego supernatantu ze zlewki do probówek szklanych (6 probówek szklanych z supernatantem + jedna w wodą destylowaną do kontroli odczynnikowej)
8. Dodać 5ml roztworu C
9. Probki inkubować przez czas 10 min w temperaturze pokojowej
10. Następnie dodać 0,5ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a i zworteksować
11. Pozostawić na 30 min w temperaturze pokojowej od czasu do czasu mieszając
12. Po tym czasie zmierzyć absorbancję przy długości fali 750nm wobec próby kontrolnej
13. Z krzywej wzorcowej, otrzymanej na zajęciach, odczytać zawartość białka

Sprawozdanie

Na podstawie uzyskanych wyników doświadczenia wykonać wykres zmian ilości białka w zależności od czasu dezintegracji materiału biologicznego oraz opisać wpływ ultradźwięków na komórki.

