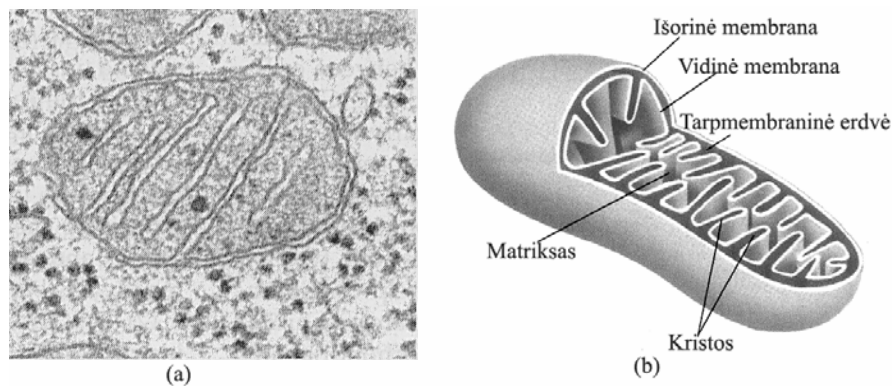


1 LABORATORINIS DARBAS

Kepenų mitochondrijų išskyrimas

Pagrindinė mitochondrijų funkcija ląstelėje yra energijos transformavimas į ATP formą. Didžioji aerobinių ląstelių ATP dalis yra sintetinama oksidacinio fosforilinimo proceso, vykstančio mitochondrijose, metu.

Mitochondrijos – antros pagal dydį (po branduolio) eukariotinės ląstelės organelės. Įprasta žinduolių ląstelės mitochondrija yra 0,5–2 μm dydžio. Mitochondrijų forma, dydis ir išsidėstymas ląstelėje priklauso nuo ląstelės rūšies (1 pav.). Raudonųjų griaučių raumenų ir miokardo ląstelės turi gerokai daugiau mitochondrijų nei kepenų ir baltųjų skeleto raumenų ląstelės, t. y. jų kiekis proporcingas energetiniams audinio poreikiams.



1 pav. Mitochondrijos elektronmikroskopinė nuotrauka (a) ir skersinio pjūvio modelis (b)

Visų rūšių ląstelių mitochondrijų mikroskopinis vaizdas panašus (1 pav.). Šiuos organoidus sudaro dvi membranos, tarp kurių yra siauras (6–8 nm) tarpas.

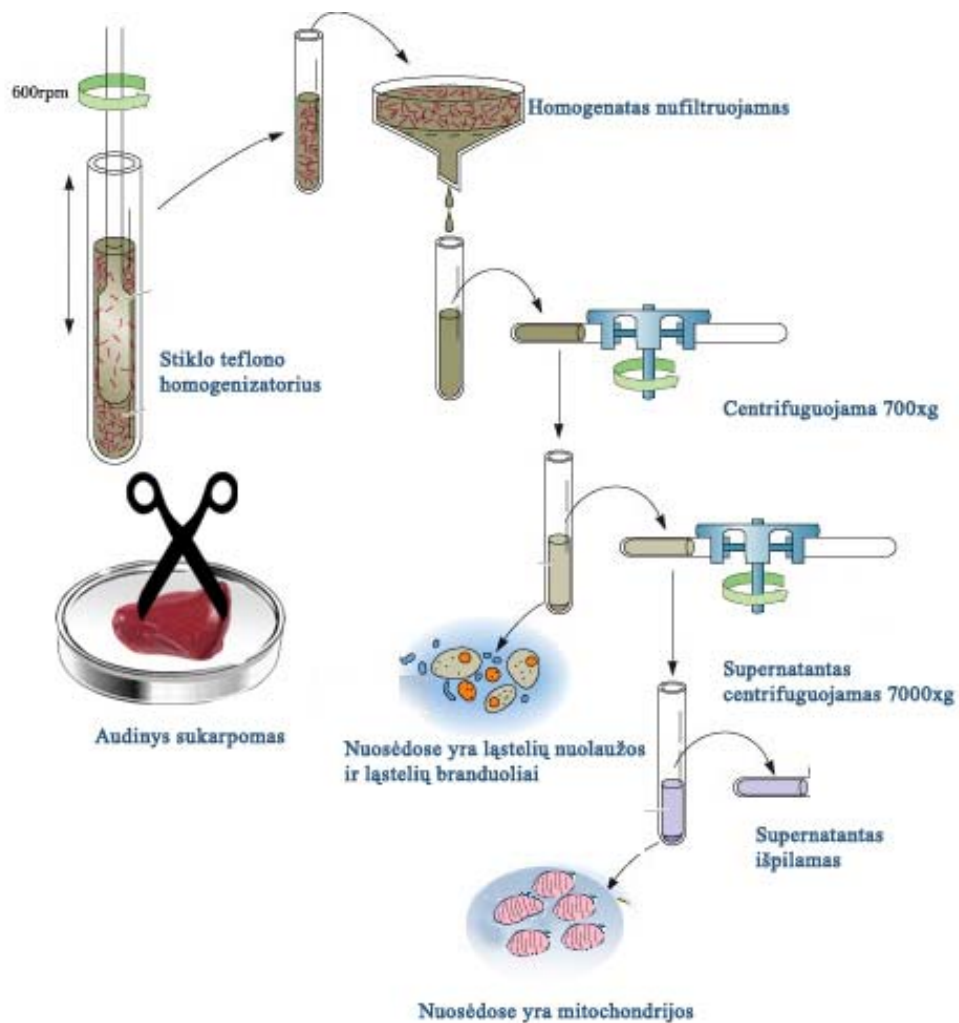
Išorinė mitochondrijų membrana lygi, sudaryta iš 50 % lipidų ir 50 % baltymų. Vidinės membranos cheminė sudėtis skiriasi nuo išorinės – joje baltymai sudaro 80 %, o lipidai – tik 20 %. Vidinės membranos paviršius yra gerokai didesnis už išorinės, todėl joje susidaro klostės, giliai įsiskverbusios į mitochondrijų vidų, vadinamos **kristomis**. Nors abi membranos yra fosfolipidų dvisluoksnis, jų lipidų cheminė sudėtis skiriasi: pavyzdžiui, fosfolipido kardiolipino yra tik vidinėje membranoje. Skirtinga membranų sudėtis ir struktūra lemia skirtingą jų laidumą įvairiems junginiams ir jonams. Išorinė

membrana praleidžia molekules, kurių molekulinė masė yra iki 5.000–10.000 Da, nes joje daug integralaus baltymo porino, sudarančio poras. Išorinėje membranoje fermentų nedaug.

Vidinė membrana nelaidi nei jonams, nei daugeliui junginių. Per ją jonus ir kitus junginius perneša specifiniai nešikliai. Vidinėje membranoje labai daug fermentų. Tai kvėpavimo grandinės kompleksai, sukcinato dehidrogenazė, glicerolio fosfatdehidrogenazė, ATP-sintazė, specifiniai baltymai-nešikliai ir t. t. Vidinės membranos fermentas-žymuo yra citochromoksidazė. Tarpas tarp membranų (tarpmembraninė erdvė) užpildytas vandenine terpe, kurioje yra keli fermentai, susiję su energijos perdavimu – nukleozidų difosfatkinazė (adenilato kinazė) ir kreatino kinazė.

Mitochondrijų vidinė dalis vadinama **mitochondrijų užpildu** (angl. – *matrix*). Jame yra plonų siūlo formos struktūrų ir granulių. Užpilde gausu fermentų, daugiausiai tai medžiagų oksidacijos fermentai – riebalų rūgščių oksidacijos (β -oksidacijos), TKC fermentai, piruvato dehidrogenazė, dalis aminorūgščių oksidacijos fermentų ir kt. Užpildo fermentai-žymės yra malato dehidrogenazė ir glutamato dehidrogenazė.

Mitochondrijų funkcijos tiriamos jas išskyrus iš ląstelių gana nesudėtingu diferencinio centrifugavimo metodu (2 pav.). Išskyrimo metu svarbiausia kuo mažiau pažeisti membranas, nes pažeidimai iškreipia mitochondrijų funkcijas. Todėl naudojami izotoniniai ir tinkamo pH buferiniai tirpalai. Mitochondrijos išskiriamos žemoje temperatūroje, siekiant sumažinti proteolitinių ir kitų fermentų aktyvumą.



2 pav. Kepenų mitochondrijų išskyrimo diferencinio centrifugavimo metodu schema

Reagentai

200 ml 0,9 % KCl tirpalas

Homogenizacijos terpė (HT):

sacharozės 250 mM (8,56 g),
 tris-HCl 10 mM (121,2 mg),
 EGTA 5 mM (101,2 mg),
 2 mg/ml jaučio serumo albumino,
 bidistiliuoto H₂O iki 100 ml,
 pH 7,7 (2 °C temperatūroje).

Suspendavimo terpė (ST):

sacharozės 250 mM (8,56 g),
tris-HCl 5 mM (60,6 mg),
bidistiliuoto H₂O iki 100 ml,
pH 7,3 (2 °C temperatūroje).

Paruošiama 200 ml 0,9 % KCl tirpalo. Atsveriamas 1,8 g KCl, ištirpinamas distiliuotame vandenyje, praskiedžiama iki 200 ml.

Gaminant HT ir ST, atsverti reagentai (išskyrus albuminą) tirpinami maždaug 75 ml H₂O, tirpalas atšaldomas iki +2 °C. Po to į jį lašinamas praskiestas HCl tirpalas tol, kol pH pasieks 7,7 (HT) ir 7,3 (ST), ir visas mišinys praskiedžiamas iki 100 ml. Tirpalai laikomi šaldytuve neigiamoje temperatūroje. Albuminas į HT įdedamas prieš pat panaudojimą.

Mitochondrijos išskiriamos diferencinio centrifugavimo metodu šaltoje patalpoje 0–4 °C temperatūroje.

Darbo eiga

1. Žiurkės kepenys plaunamos mažoje stiklinėlėje 0,9 % KCl tirpale, kelis kartus pamaigant pincetu. Po to organas išimamas, nuo jo nukarpomas jungiamasis audinys, riebalai.
2. Kepenys įdedamos į kitą stiklinėlę, kurioje yra 0 °C 0,9 % KCl tirpalas, ir vėl praplaunama, pamaigant pincetu. Organas išimamas, nusausinamas filtriniu popieriumi ir pasveriamas. Pagal kepenų svorį imamas HT kiekis (1 g audinio imama 10 ml HT).
3. Kepenys susmulkinamos mažoje stiklinėje žirklutėmis, laikant indą ant ledu, ir po to praplaunama 0,9 % KCl tirpalu.
4. Sukarpytas audinys perkeliamas į homogenizatorių ir užpilamas anksčiau apskaičiuotu HT kiekiu. Homogenizuojama 20–30 sekundžių (homogenizatorius turi būti prieš tai praplautas HT tirpalu ir įmerktas į indą su leda).
5. Homogenizatas supilstomas į centrifuginius mėgintuvėlius (mėgintuvėlių skaičius turi būti porinis). Poroje esančių mėgintuvėlių svoriai apytiksliai sulyginami. Centrifuguojama 750× g 5 min. (poroje esantys mėgintuvėliai dedami vienas priešais kitą).

6. Baigus centrifuguoti, supernatantas perkošiamas per dvigubą marlės sluoksnį į kitus centrifuginius mėgintuvėlius, nenupilant nuosėdų, esančių paskutiniuose supernatanto lašuose.
7. Sulyginami poroje esančių mėgintuvėlių svoriai. Jei mėgintuvėlių skaičius nelyginis, likusiam mėgintuvėliui į porą imamas mėgintuvėlis su vandeniu. Į centrifugos rotorių poroje esantys mėgintuvėliai dedami vienas priešais kitą, ir centrifuguojama $7000 \times g$ 10 min.
8. Gautas supernatantas nupilamas, o mitochondrijų nuosėdos suspendatoriumi suspenduojamos ST terpėje (apie 20 ml) ir dar kartą centrifuguojamos $7000 \times g$ 10 min. Tai daroma norint išplauti EDTA liekanas.
9. Gautas supernatantas išpilamas, mėgintuvėliai statomi dugnu į viršų ant filtrinio popieriaus, ir palaukiama 1–2 min.
10. Mitochondrijos suspenduojamos, pasitelkiant suspendatorių. Pirmiausiai pilama po 0,20 ml ST į kiekvieną mėgintuvėlį su mitochondrijų nuosėdomis. Tuomet suspendatoriumi atsargiai suspenduojama, po to iš kiekvieno mėgintuvėlio turinys supilamas į vieną iš jų – surenkama į mėgintuvėlį. Mėgintuvėliuose likęs suspensijos likutis surenkamas pipete ir supilamas į surenkamąjį mėgintuvėlį, kuriame vėl suspenduojama iki vienalytės masės.
11. Mėgintuvėlis su mitochondrijų suspensija uždengiamas dangteliu ir įstatomas į indą su ledais (leduose turi būti truputį vandens, reikalingo geresniam kontaktui). Mėgintuvėlio negalima ištraukti iš ledų visą laboratorinio darbo laiką.

2 LABORATORINIS DARBAS

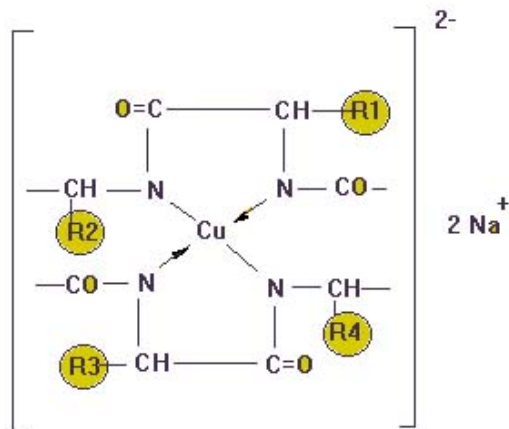
Baltymų koncentracijos nustatymas tirpaluose. Mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas biureto metodu

Baltymai yra termolabilūs linijiniai biopolimerai, sudaryti iš aminorūgščių. Ląstelėje gali būti keletas tūkstančių skirtingų baltymų.

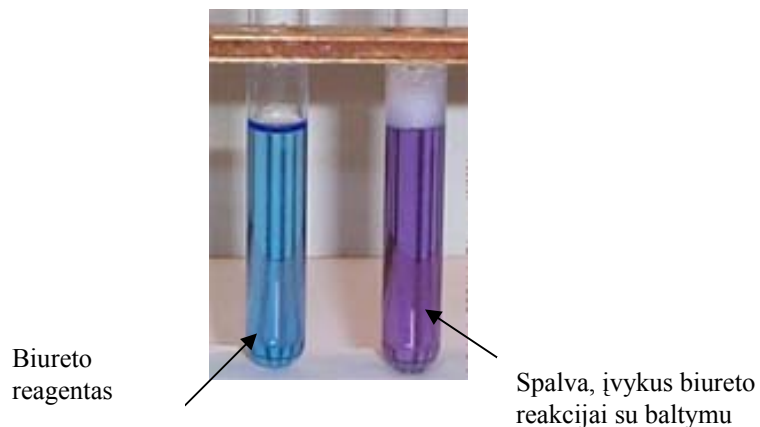
Viena svarbiausių baltymų funkcijų – katalitinė: medžiagų apykaita būtų neįmanoma, jeigu virškinimo sultyse ir organizmo ląstelėse nebūtų specifinių baltymų – fermentų, kurie pagreitina organizme vykstančias chemines reakcijas. Taip pat baltymai atlieka

įvairias funkcijas: pernašos, struktūrinę, apsauginę, energetinę (oksiduojantis baltymuose esančioms aminorūgštims, išsiskyrusi energija gali būti naudojama organizmo energetiniams poreikiams tenkinti), motorinę (raumenys sudaryti iš baltymų aktino ir miozino, kuriais cheminė energija paverčiama mechanine), toksinę, receptorinę (baltymai receptoriai, išsidėstę ant membranų paviršiaus, sąveikauja su įvairiomis medžiagomis (pavyzdžiui, hormonais, neuromediatoriais, šviesa) ir perduoda signalą per membraną), reguliacinę (baltymai gali prisijungti prie nukleorūgščių, kitų baltymų ir keisti jų biologinį aktyvumą).

Viena labiausiai paplitusių ir naudojamų reakcijų peptidams ir baltymams nustatyti yra biureto reakcija. Šiai reakcijai vykti reikia kelių peptidinių ryšių, todėl viena aminorūgštis reakcijoje nedalyvauja. Veikiant peptidus ar baltymus Cu^{2+} šarminėje aplinkoje, susidaro purpurinės spalvos Cu^{2+} - peptido kompleksas.



Kadangi tirpalo spalvos intensyvumas priklauso nuo baltymo kiekio (3 pav.), ši reakcija naudojama baltymo koncentracijai nustatyti, susidariusio kompleks spalvos intensyvumą matuojant spektrofotometriškai.



3 pav. Mitochondrijų baltymo nustatymas biureto metodu

Biureto metodas baltymui nustatyti nėra labai jautrus ir tinka, kai baltymo koncentracija yra 2–10 mg baltymo mėginyje. Nustatyti baltymą trukdo amonio jonai.

Reagentų paruošimas

Reagentai

natrio šarmas (NaOH),
vario sulfatas (CuSO_4),
kalio, natrio tartratas,
natrio deoksicholatas,
liofilizuoto žmogaus serumo albuminas.

Darbo eiga

Biureto reagento gamyba

1. *10 % NaOH tirpalo gamyba iš sotaus NaOH tirpalo.* Sotus NaOH tirpalas gaminamas prieš kelias dienas iš 50 g NaOH ir 50 ml H_2O . Sotus tirpalas gaunamas, kai pridėto šarmo kristalai nebetirpsta ir nusėda dugne. Tirpinimo metu indą reikia užkimšti kamščiu su piltuvėliu, kuriame yra vata ir drėgmę sugeriantis CaCl_2 (paruošia laborantas). Paruoštas tirpalas filtruojamas 2-uoju stiklo filtru. Cilindre paruošiamas 10 % NaOH tirpalas iš 42 ml sotaus NaOH, kuris skiedžiamas bidistiliuotu H_2O iki 300 ml.
2. *1 % vario sulfato (CuSO_4) tirpalas.* 500 ml bidistiliuoto vandens tirpinama 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.
3. Jam ištirpus, pridedama 12 g K, Na-tartrato.
4. Pastarajam ištirpus, pridedama 300 ml 10 % NaOH ir pilama bidistiliuoto vandens iki 1000 ml.

Natrio deoksicholato tirpalo gamyba (DOX)

0,33 g Na deoksicholato ištirpinama 100 ml H_2O .

Albumino tirpalo paruošimas

2 g albumino ištirpinama 10 ml 0,9 % NaCl tirpalo. 1 ml šio tirpalo yra 200 mg baltymo. Reagentas nestabilus. Jam stabilizuoti pridedama 0,05 ml NaN₃ (natrio azido) tirpalo. Toks reagentas, laikomas šaldytuve, tinka vartoti 2 mėnesius.

Gradavimo grafiko paruošimas

1. Pagal lentelę paruošiami baltymo tirpalų praskiedimai:

Gaminamas tirpalas	Skiedimai	Baltymo kiekis 50-yje µl tirpalo
200 mg/ml		10 mg
150 mg/ml	750 µl baltymo tirpalo (200 mg/ml) + 250 µl H ₂ O	7,5 mg
100 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (200 mg/ml) + 500 µl H ₂ O	5 mg
75 mg/ml	750 µl baltymo tirpalo (100 mg/ml) + 250 µl H ₂ O	3,75 mg
50 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (100 mg/ml) + 500 µl H ₂ O	2,5 mg
25 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (50 mg/ml) + 500 µl H ₂ O	1,25 mg
12,5 mg/ml	500 µl baltymo tirpalo (25 mg/ml) + 500 µl H ₂ O	0,625 mg
10 mg/ml	100 µl baltymo tirpalo (100 mg/ml) + 900 µl H ₂ O	0,5 mg
5 mg/ml	100 µl baltymo tirpalo (50 mg/ml) + 900 µl H ₂ O	0,25 mg

2. Baltymui nustatyti imama 50 µl kiekvieno paruošto baltymo tirpalo, 0,95 ml DOX ir 4 ml biureto reagento.
3. Paruošiamas *kontrolinis tirpalas* be baltymo: pridedama 1 ml DOX (vietoje baltymo tirpalo 0,95 ml DOX tirpalo) ir 4 ml biureto reagento.
4. Baltymo tirpalai ir kontrolinis tirpalas inkubuojami 20 min. vandens termostate 37 °C temperatūroje.
5. Matuojamas šviesos sugėrimas spektrofotometru „Helios“ (bangos ilgis – 540 nm). Kaip lyginamasis tirpalas naudojamas *kontrolinis tirpalas*.
6. Braižomas gradavimo grafikas.

