

# Homogenizacja

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Wyodrębnienie analitów z tkanek miękkich często stanowi ogromne wyzwanie dla chemików analityków, dlatego tak istotnym jest poznanie i porównanie tradycyjnych i nowych metod przygotowania próbek tkanek. W celu wyizolowania białka obecnego w tkankach, czy 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.

Przygotowanie próbek tkanek jest trudnym i czasochłonnym zadaniem laboratoryjnym, ponieważ już od momentu pobrania próbki eksperymentator powinien zwracać szczególną uwagę na sposób jej przechowywania, ekstrahowania i analizy. Wyłączając niewdzięczną naturę analizy tkanek, na przestrzeni ostatnich lat dokonano znaczącego postępu w rozwoju technik przygotowania próbek pozwalających na lepsze zrozumienie ryzyka i korzyści wynikających z ich stosowania.

Techniki przygotowania próbek tkanek możemy podzielić na trzy kategorie:

- Rozdrabnianie mechaniczne
- Trawienie enzymami
- Ekstrakcja

Najpopularniejszą i najbardziej praktyczną techniką rozdrabniania próbek jest homogenizacja - roztarcie komórek. Wyodrębnienie poszczególnych struktur subkomórkowych rozpoczyna się od rozdrobnienia badanego materiału i homogenizacji w odpowiednim środowisku - roztworze homogenizacyjnym. W pozyskiwaniu nieuszkodzonych organelli używa się roztworu izotonicznego tzn. takiego, którego ciśnienie osmotyczne jest równe ciśnieniu osmotycznemu wewnątrz komórki. W roztworach hipotonicznych organelle wchłaniają wodę i pękają, natomiast w roztworach hipertonicznych kurczą się.

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. W czasie homogenizacji często utrzymuje się obniżoną temperaturę (0 – 4 °C) i niekiedy stosuje się dodatek inhibitorów proteaz komórkowych.

W pierwszym etapie eksperymentator odważa odpowiednią ilość próbki, najczęściej jest to od 10 mg do 1 g tkanki. Do naważki, umieszczonej w probówce dodaje się odpowiednią ilość buforu. pH buforu uzależnione jest od rodzaju oznaczanego analitu. Kolejnym krokiem homogenizacji jest proces rozdrabniania, w trakcie którego mała sonda ze stali nierdzewnej, zbudowanej w stylu blendera, z generatorem i zestawem noży powoduje, energiczne mieszanie i ścinanie próbek w małe kawałki. Otrzymany produkt – homogenat ma postać półpłynną, dlatego też zasadniczo może być traktowany w taki sam sposób jak próbki plazmy. Ekstrakt komórkowy otrzymany po lizie poddawany jest procesom sedymentacyjnym 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 (surowy ekstrakt) i osad zawierający frakcje błon komórkowych. Nadsącz może być dalej oczyszczany i ilość zawartych w nim białek oznaczona wybraną metodą, np. spektrofotometryczną.

W celu uniknięcia zanieczyszczenia próbek, w trakcie ich homogenizacji, należy pamiętać, że sonda homogenizatora powinna być dokładnie i wielokrotnie płukana przed rozpoczęciem obróbki każdej następnej próbki.

Homogenizatory stosowane w laboratoriach są z reguły małe i kompaktowe i wymagają jedynie krótkiego przeszkolenia w zakresie ich użytkowania.



Rys. 1

Rys. 1. Homogenizator



Rys. 2

Rys. 2. Końcówka homogenizatora z nożami ze stali nierdzewnej.



Rys.3

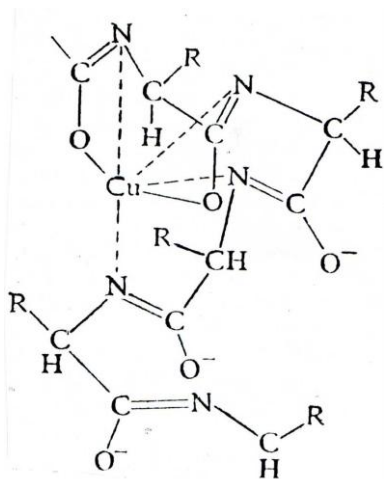
Rys. 3. Homogenizacja tkanek miękkich roślin.

## CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie homogenizacji tkanek miękkich i kolorymetryczne oznaczenie ilości białka w otrzymanych homogenatach wątroby/ serca kurzego metodą biuretową.

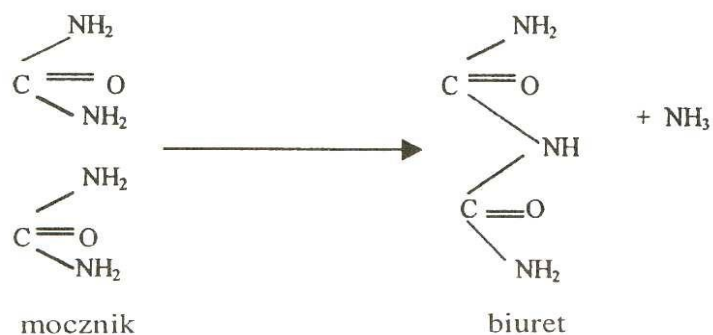
Zasada metody:

Metoda polega na oznaczaniu natężenia barwy powstałej w wyniku wytworzenia związków kompleksowych białek z jonami miedzi (II) w środowisku zasadowym, z maksimum absorbancji przy  $\lambda = 540$  nm. Intensywność barwy w reakcji biuretovej jest proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych. Zależność ta jest wykorzystywana do ilościowego oznaczania białek. Czulość metody - 0,1 mg/ml.



Rys. 4. Związek kompleksowy jonu miedzi (II) z wiązaniami peptydowymi białek.

Nazwa reakcji pochodzi od biuretu - związku powstającego w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek mocznika, zawierającego w swej cząsteczce wiązania amidowe.



Metoda biuretovej nie nadaje się do oznaczania stężenia białek w obecności soli amonowych, gdyż jon amonu daje również barwne kompleksy z jonami miedzi (II). W reakcji przeszkadza także siarczan (VI) magnezu, ponieważ wytrącający się w środowisku nierozpuszczalny wodorotlenek magnezu maskuje właściwy odczyn.

## LITERATURA:

L. Kłyszejko – Stefanowicz (red.), *Ćwiczenia z biochemii*, PWN, Warszawa 1999

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.

JM Berg, JL Tymoczko, L Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2005

## ODCZYNNIKI:

- standardowy roztwór albuminy - 10 mg/ml w 0,9% NaCl,
- 0,9% roztwór NaCl,
- odczynnik biuretowy: 0,75 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i 3,0 g winianu sodu i potasu rozpuścić w 500 ml wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml. Następnie małymi porcjami stale mieszając dodać 150 ml 10% NaOH, dodać 1g KI i uzupełnić objętość wodą destylowaną do 1000 ml. Odczynnik przygotowany, jest stabilny w temperaturze pokojowej.

## Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):
  - Siarczan miedzi - Xn Produkt szkodliwy R22; Xi Produkt drażniący R36/38; N Produkt niebezpieczny dla środowiska R50/53
  - Wodorotlenek sodu - C Produkt żrący R35
  - Jodek potasu - Działa szkodliwie po połknięciu R22. Działa drażniąco na oczy i skórę R36/38.
- ✓ Pierwsza pomoc:
  - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody.
  - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
  - jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze. Jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie. Zasięgnąć porady medycznej.
  - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
    - w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

## APARATURA

- waga analityczna,
- łopatką ze stali nierdzewnej,
- zlewki,
- probówki szklane 5 ml,
- statyw na probówki,
- homogenizator IKA Labortechnik T25,
- pipeta 100 – 1000 ul,
- kolorymetr EPOL - 20,
- kuweta 1 cm.

## WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ I OZNACZENIE STĘŻENIA BIAŁEK W TKANKACH MIĘKKICH.

Do suchych probówek szklanych odmierzyć pipetą kolejno podane w tabeli objętości standardowego roztworu albuminy, wody i odczynnika biuretowego. Wymieszać i odstawić na 30 minut. Każdą próbę wykonać w dwóch powtórzeniach.

Nr próby	1	2	3	4	5	6
Stężenie albuminy w mg/próbie	1	2	3	4	5	0
Roztwór standardowy (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0
Woda destylowana (ml)	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	0,5
Odczynnik biuretowy (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
A1						
A540nm						
A2						
Aśr						
$K = \frac{\text{mg albuminy w próbce}}{A_{540 \text{ nm}}}$						

Odważyć około 2 g tkanki wątroby kurzej. Naważkę umieścić w zlewce. Dodać taką objętość roztworu 0,9% NaCl, aby otrzymać 20-krotnie rozcieńczony homogenat.

Równocześnie oznaczyć zawartość białka w 20-krotnie rozcieńczonym homogenizacji wątroby drobiowej (do oznaczeń pobierz 0,3 ml i 0,1 ml; w obu przypadkach próby uzupełnij

wodą do 0,5 ml). Po upływie 30 min zmierzyć absorbancję przygotowanych prób przy długości fali  $\lambda = 540 \text{ nm}$  w 1 cm kuwetach. Pomiar wykonać względem próby zerowej nie zawierającej białka (próba 6). Zapisz wyniki w tabeli. Oblicz współczynnik kierunkowy K. Narysuj krzywą wzorcową (zależność wartości absorbancji od stężenia białka w próbce). Przy obliczaniu ilości białka w próbce stosuj obliczony współczynnik K. Z oznaczonej w próbce zawartości białka oblicz stężenie białka w przygotowanym homogenizacie.