

# Homogenizacja

Homogenizacja jako sposób rozdrobnienia próbki stałej pochodzenia roślinnego

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Wyodrębnienie analitów z tkanek próbek biologicznych często stanowi ogromne wyzwanie dla chemików analityków, dlatego tak istotnym jest poznanie i porównanie tradycyjnych i nowych metod ich przygotowania. W celu wyizolowania białka obecnego w materiale biologicznym, 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 próbek, 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 próbkami.

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

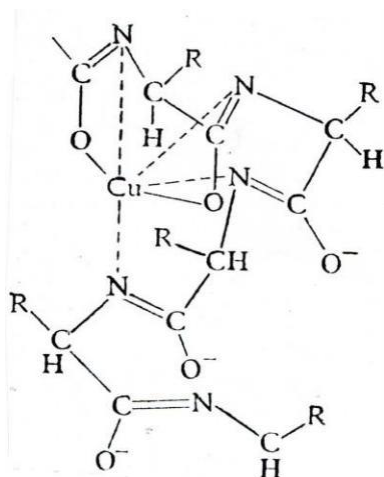
Rys. 3. Homogenizacja tkanek miękkich roślin.

## CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie homogenizacji próbki biologicznej i kolorymetryczne oznaczenie ilości białka w otrzymanym homogenacie cieczy metódą biuretową.

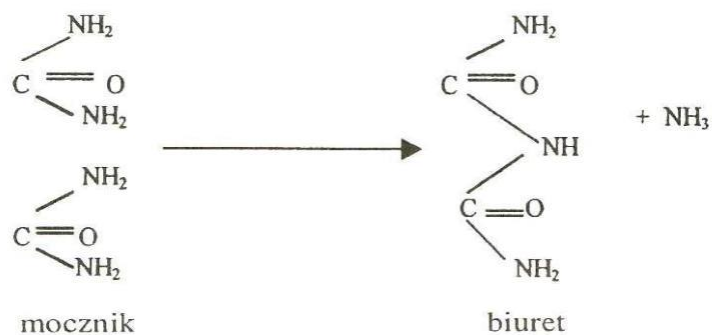
Zasada metody:

Metoda polega na oznaczaniu natężenia barwy powstałej w wyniku wytworzenia związków kompleksowych białek z jonami miedzi (II) w środowisku zasadowym, z maksimum absorbancji przy  $\lambda = 540 \text{ nm}$ . Intensywność barwy w reakcji biuretovej jest proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych. Zależność ta jest wykorzystywana do ilościowego oznaczania białek. Czułość 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 jaja kurzego - 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,
- łypatka 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 ROŚLINNYCH

### 1. Przygotowanie próbki homogenatu ciecierzycy

Odważyć około 4 g ciecierzycy. Naważkę umieścić w zlewce. Dodać taką objętość roztworu 0,9% NaCl, aby otrzymać 10-krotnie rozcieńczony homogenat. Przeprowadzić homogenizację próbki zgodnie ze wskazówkami prowadzącego zajęcia.

### 2. Przygotowanie próbki homogenatu ciecierzycy do oznaczenia białka

Do probówki polipropylenowej o pojemności 3 ml pobrać 0,1 ml otrzymanego homogenatu; 0,4 mL wody dejonizowanej i 2 ml odczynnika biuretowego. Po upływie 20 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 0).

### 3. Przygotowanie krzywej wzorcowej dla roztworu albuminy

Do suchych probówek szklanych odmierzyć pipetą kolejno podane w poniższej tabeli objętości standardowego roztworu albuminy o stężeniu 10 mg/ml, wody i odczynnika biuretowego. Wymieszaj i odstaw na 20 minut. Każdą próbę wykonaj w dwóch powtórzeniach.

Wyniki zapisz w tabeli. Narysuj krzywą wzorcową (zależność wartości absorbancji od stężenia białka w próbce). Na podstawie przygotowanej krzywej oblicz zawartości białka

oblicz stężenie białka w przygotowanym homogenacie. Oblicz wartości SD i RSD otrzymanych wyników.

Tabela 1. Przygotowanie roztworów do krzywej kalibracyjnej.

Nr próby	0	1	2	3	4	5
Stężenie albuminy w mg/próbę	0	1	2	3	4	5
Roztwór standardowy (ml)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Woda destylowana (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0
Odczynnik biuretowy (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
A1						
A540nm						
A2						
Aśr						