

Ćwiczenia z biofizyki z elementami biofizyki błon

Instrukcje do ćwiczeń 2016/2017

Doświadczenie I przeprowadzamy w trzech powtórzeniach.

I. Wyznaczanie CMC (dr Magdalena Zaremba-Czogalla)

Fluorescencja niektórych znaczników fluorescencyjnych jest uzależniona od polarności środowiska, w jakim znajdują się ich cząsteczki. Część stosowanych związków fluorescencyjnych wykazuje intensywną fluorescencję w roztworach polarnych (np. Rodamina 6G), przy zmianie polarności roztworu (np. podczas wbudowywania się cząsteczek związku do powstających powyżej CMC miceli) fluorescencja próby maleje. Inne ze stosowanych znaczników wykazują natomiast wzrost intensywności fluorescencji dopiero podczas zamykania ich cząsteczek w powstających micelach związków amfifilowych (ANS, DPH). Cząsteczki tych związków wykazują wyraźnie amfifilowy lub wręcz hydrofobowy charakter. Mimo podobnych podstaw teoretycznych eksperymentów, obserwuje się jednak różnice w wartościach wyznaczonych doświadczalnie CMC związków amfifilowych przy użyciu sond fluorescencyjnych amfifilowych (ANS) i hydrofobowych (DPH), co wynika ze sposobu ich wbudowywania do wnętrza powstających miceli.

1. W czystych i suchych probówkach eppendorfa umieścić po 1.5 ml 10 μ M wodnego roztworu sondy fluorescencyjnej.

2. Do probówek dodać wzrastające ilości badanego związku amfifilowego, tak aby jego stężenie w próbach zawierało się w zakresie:

Triton X-100	0.1-0.5 mM
oktylo- β -D glukozyd	10-35 mM
decylo- β -D- maltozyd	0.5-2.5 mM
dodecylo-b-D-maltozyd	0.05-0.25 mM
SDS	0.5-10 mM
Tween-20	30-100 μ M
cholan sodowy	5-20 mM
deoksycholan sodowy	1-10 mM.

badany związek inny niż wymienione- stężenie ustalane z prowadzącym ćwiczenie.

Zawartość probówek dokładnie wymieszać.

3. Dokonać pomiaru intensywności fluorescencji prób dla stosując fale wzbudzenia i emisji: ANS (Ex 370 nm i Em 470-490 nm), rodamina 6G (Ex 480 nm i Em 550 nm) i DPH (Ex 360 nm, Em 430 nm) natychmiast po wymieszaniu oraz po 30 minutach (po ustaleniu stanu równowagi dynamicznej monomery- micelle w roztworze). Próba ślepa powinna zawierać wyłącznie barwnik.

4. Wykreślić zależność fluorescencji barwnika fluorescencyjnego od stężenia badanego związku amfifilowego. Z wykresu wyznaczyć graficznie CMC badanego związku amfifilowego.

5. Doświadczenie powtórzyć stosując roztwory sond fluorescencyjnych w 0.5, 1, 1.5 i 2 M NaCl, sacharozie lub moczniku (zakres przeprowadzanych eksperymentów dobiera prowadzący ćwiczenia).

II. Wyznaczanie temperatury głównego przejścia fazowego liposomów z DPPC (mgr Jakub Suchodolski)

Termin „przejście fazowe” jest używany powszechnie jako synonim przejścia fazowego lipidów dwuwarstwy ze stanu uporządkowanego, zwanego żelem (ang. gel) i oznaczanego jako L_{β} , do stanu nieuporządkowanego zwanego stanem ciekłym lub ciekłokrystalicznym (ang. liquid) i oznaczanego L_{α} , bardzo często poprzez fazę pośrednią (ang. ripple), oznaczaną jako P_{β} . Zmianę uporządkowania cząsteczek fosfolipidów obserwuje się poprzez spadek polaryzacji fluorescencji sond fluorescencyjnych. Podczas upłyniania dwuwarstwy fosfolipidowej zmienia się także rozpraszanie światła przez liposomy.

Przygotowanie liposomów:

1. 0,5 ml chloroformowego roztworu DPPC (o stężeniu 10 mg/ml) odparować pod strumieniem azotu.

2. Otrzymane suche filmy lipidowe rozpuścić 1 ml tert-butanolu i zamrozić w ciekłym azocie.

3. Zamrożone r-ry lipidów poddać liofilizacji przez 3h (do odsublimumowania rozpuszczalnika).
4. Otrzymany zliofilizowany film lipidy poddać uwodnieniu buforem reakcyjnym w temp. 50° (powyżej temperatury głównego przejścia fazowego) w celu otrzymania liposomów MLV.

Pomiar:

1. Ustabilizować temperaturę pomiaru na 25°C. Do kuwety pomiarowej przenieść 2 ml buforu reakcyjnego i dodać porcjami zawiesinę liposomów do otrzymania właściwej wartości rozpraszania światła ($\lambda=400$ nm).
2. Dokonać pomiarów rozpraszania światła przez liposomy, zmieniając temperaturę pomiaru o 1°C/2 min w zakresie 25-50°C.
3. Wykreślić zależność rozpraszania światła od temperatury i na otrzymanym wykresie graficznie wyznaczyć temperaturę głównego przejścia fazowego dwuwarstwy liposomowej zbudowanej z DPPC.
4. Doświadczenia przeprowadzić po inkubacji w/w liposomów ze znanym stężeniem Tritonu X-100.

III. Badanie solubilizacji liposomów MLV przez detergent (dr Maria Stasiuk i mgr Jakub Suchodolski)

W wyniku traktowania zawiesiny liposomów roztworem detergentu w stężeniach litycznych, czyli niszczących dwuwarstwę, błona liposomów ulega stopniowej solubilizacji. Wynikiem tego procesu jest powstawanie mieszanych miceli fosfolipidowo-detergentowych, które, jako struktury o podobnej wielkości i zdecydowanie mniejszej średnicy, w mniejszym stopniu rozpraszają światło. Sposobem detekcji zmiany formy uporządkowania lipidów z formy lamellarnej (błona liposomów) w micelną jest obserwacja zmian ekstynkcji przy $\lambda=500-550$ nm w systemie turbidymetrycznym lub nefelometrycznym.

Przygotowanie liposomów:

1. Do kolby okrągłodennej przenieść 5 mg lipidu (mieszaniny lipidów) i dodać 0,5 ml chloroformu.
2. Odparować rozpuszczalnik organiczny w strumieniu ciepłego powietrza.
2. Otrzymany suchy film lipidowy zawiesić w buforze reakcyjnym w temperaturze powyżej temperatury głównego przejścia fazowego w celu otrzymania liposomów MLV. UWAGA! Wszystkie bufony przed użyciem sączy my zgodnie z zaleceniami prowadzącego.

Solubilizacja:

1. W kuwecie pomiarowej umieścić 2 ml odpowiedniego buforu (identycznego jak ten, który został użyty do przygotowania liposomów).
2. Dodawać porcjami zawiesinę liposomów do uzyskania odpowiedniego poziomu rozpraszania światła ($A_{500}\sim 0.2-0.25$).
3. Do próby badanej zawierającej 2 ml buforu i odpowiednią ilość zawiesiny liposomów dodawać porcjami roztwór detergentu(ów) (w każdej dodanej porcji powinno być 5 mol% detergentu względem lipidu w liposomach). Po dodaniu każdej porcji należy dokonując trzykrotnego pomiaru rozpraszania światła.
4. Narysować wykres solubilizacji błony liposomowej (zależność A_{500} od stosunku molowego detergent/lipid w próbce), pamiętając o naniesieniu na wykres odchyleń standardowych dla każdego punktu pomiarowego.

IV. Badanie lizy detergentowej erytrocytów (dr Maria Stasiuk i mgr Jakub Suchodolski)

Detergent dodany do zawiesiny erytrocytów wbudowując się do błony komórkowej powoduje jej stopniową solubilizację, co można obserwować poprzez wzrost absorpcji hemoglobiny uwolnionej z erytrocytów lub spadek rozpraszania światła przez te komórki.

Izolacja czerwonych krwinek:

1. Krew całkowitą w roztworze antykoagulantu wirować 10 min przy 600g.
2. Supernatant zebrać i odrzucić.

3. Erytrocyty przemyć trzykrotnie buforem izotonicznym: pellet zawiesić w równej objętości 0.9 % NaCl w 10 mM buforze Tris-HCl, pH 7.4 i wirować 10 min przy 600g.
4. Otrzymany pellet czerwonych krwinek zawiesić w w/w buforze izotonicznym w proporcji 1:1 (hematokryt 50%).
5. Przechowywać w lodówce. UWAGA! Tak otrzymane erytrocyty należy zużyć do doświadczeń w ciągu 48 godzin. Po tym czasie należy przeprowadzić nową izolację czerwonych krwinek.

Solubilizacja:

1. Przygotować szereg probówek eppendorfa. Do każdej z nich dodać 1 ml 0.9 % NaCl w 10 mM buforze Tris-HCl, pH 7.4 z 0.9% NaCl i 5 μ l zawiesiny erytrocytów, wymieszać.
2. Dodać do probówek wzrastające objętości roztworu badanego związku amfifilowego.
3. Po 30 minutach inkubacji w temp. pokojowej próby wirować przez 10 minut przy 650g.
4. Uwolnioną hemoglobinę oznaczyć spektrofotometrycznie przy 570 nm.
5. Kontrola (100% hemolizy): do 1 ml wody destylowanej dodać 5 μ l zawiesiny erytrocytów. Inkubować w temp. pokojowej. Po 30 min. odwirować j/w.
6. Narysować wykres procentowej zależności uwolnionej hemoglobiny od stężenia molowego detergentu. Wyznaczyć graficznie IC₅₀, c_{sat} i c_{sol}.