

Ćwiczenia z biofizyki z elementami biofizyki błon

Instrukcje do ćwiczeń 2015/2016

Wszystkie doświadczenia (poza p. II i III) przeprowadzamy w trzech powtórzeniach.

I. Wyznaczanie CMC

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 ANS.
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 Ex 370 nm i Em 470-490 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.

II. Wyznaczanie temperatury głównego przejścia fazowego liposomów z DPPC.

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 upłynięcia 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

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 sączyć 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 odchyłeń standardowych dla każdego punktu pomiarowego.

V. Badanie lizy detergentowej erytrocytów

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}.

VI. Badanie oporności osmotycznej czerwonych krwinek

Erytrocyt znajdując się w środowisku hipotonicznym zwiększa swoją objętość na skutek przenikania wody do wnętrza krwinki, a dwuwarstwa fosfolipidowa, stanowiąca barierę zawartości komórki dla elektrolitów, może ulec fragmentacji, jeżeli różnica osmolarności pomiędzy wnętrzem komórki i środowiskiem zewnętrznym jest duża. Obserwacja zmian ekstynkcji przy $\lambda = 570$ nm (maksimum absorpcji uwalnianej hemoglobiny) pozwala na określenie zmian wywołanych w zawieszynie czerwonych krwinek przez obniżenie osmolarności środowiska.

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 burze 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.

Liza osmotyczna erytrocytów:

1. Do szeregu probówek eppendorfa przenieść po 1 ml 10 mM buforu TRIS-HCl, pH 7.4 z wzrastającymi ilościami NaCl (od 0,2 do 1% co 0.5%).
2. Dodać po 5 μ l zawiesiny erytrocytów, wymieszać.
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 NaCl. Wyznaczyć graficznie IC₅₀.

Badanie wpływu związków amfifilowych na oporność osmotyczną erytrocytów:

Niektóre związki amfifilowe w stężeniach sublitycznych wykazują zdolność ochrony RBC przed hemolizą; wbudowując się błonę komórkową mogą zwiększyć jej wytrzymałość, co jest widoczne jako spadek uwalniania hemoglobiny przez krwinki w środowisku hypoosmotycznym.

1. Do szeregu eppendorfek przenieść 100 μ l zawiesiny RBC zawieszanej w 400 μ l buforu (10 mM Tris-HCl o pH 7.4 z 0.9% NaCl).

2. Inkubować przez 30 minut w temperaturze 37°C z wzrastającymi stężeniami wybranego związku amfifilowego.
3. Po tym czasie obniżyć osmolarność środowiska przez przeniesienie 100 µl próby do 2 ml buforu hypotonicznego (10mM Tris-HCl, pH 7.4 z zawartością NaCl równą wartości IC50) i inkubować przez 10 minut w temp. pokojowej.
4. Próby wirować przez 10 minut przy 650g.
5. Uwolnioną hemoglobinę oznaczyć spektrofotometrycznie przy 570 nm.
6. Narysować wykres procentowe zależności uwolnionej hemoglobiny od stężenia związku amfifilowego w próbie. Co będzie w tym doświadczeniu kontrolą pozytywną (100% hemolizy w warunkach testu)?