

LIZA KOMÓRKOWA

JAKO JEDEN Z ETAPÓW PRZYGOTOWANIA PRÓBKII DO ANALIZY

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Zakres obowiązującego materiału - wymagania wstępne:

Spektrofotometria UV-Vis:

- prawa absorpcji;
- budowa aparatury, w tym spektrofotometru jedno- i dwuwiązkowego;
- analiza jakościowa w spektrofotometrii UV-Vis;
- zastosowanie spektrofotometrii w analizie ilościowej;
- znajomość zasad pomiaru z wykorzystaniem spektrofotometru jedno- i dwuwiązkowego.

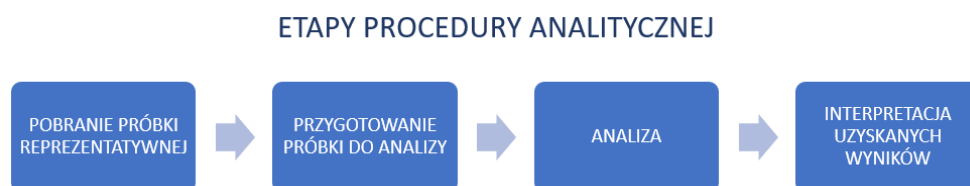
CZĘŚĆ LITERATUROWA

I. Wprowadzenie

Próbki biologiczne stanowią zróżnicowany pod kątem składu matrycy materiał zawierający dużą liczbę składników o różnych właściwościach fizykochemicznych. Bardzo często, znaczna złożoność próbki, obecność substancji przeszkadzających oraz niska zawartości analitu generuje znaczne trudności w czasie analizy. Ponadto, wykorzystywane w końcowym etapie analizy techniki analityczne nie są na tyle uniwersalne, aby umożliwiły określenie składu próbki i zawartości poszczególnych jej składników bez konieczności poddania materiału wstępnej obróbce – etapowi przygotowania próbki do analizy.

Przygotowanie próbki do analizy stanowi jeden z najważniejszych i zarazem najtrudniejszych etapów procedury analitycznej (Rysunek 1). Uzyskanie miarodajnego wyniku analizy w znacznym stopniu uzależnione jest bowiem od prawidłowego pobrania i przygotowania materiału do badań. Ponadto, powszechnie uważa się, że jest to najbardziej czasochłonny i pracochłonny, lecz niezbędny, etap postępowania analitycznego. W głównej mierze jego nadrzędnym celem jest poddanie analizowanego materiału takim procesom, aby finalnie spełniał on wymagania wykorzystywanej na etapie analizy końcowej techniki pomiarowej.

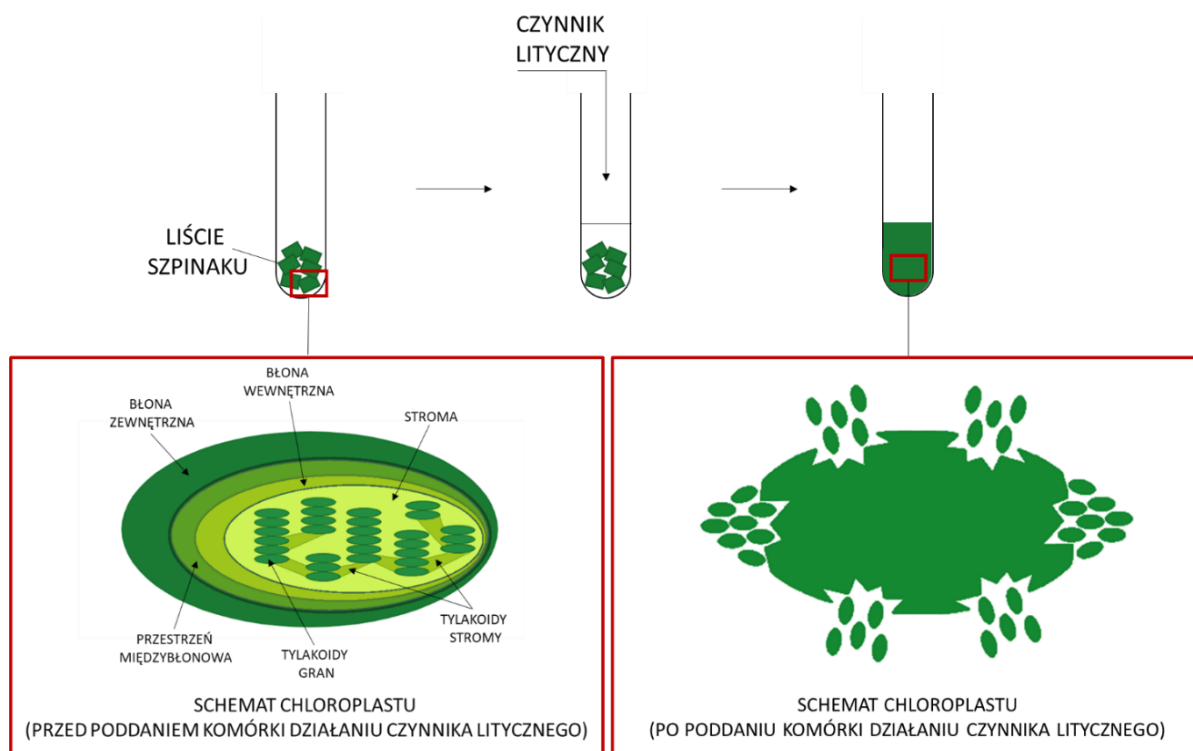
Częstym problem dla analityka w czasie przygotowania próbki do analizy jest konieczność zwiększenia dostępności analitów. Wybór metody, techniki czy procedury dezintegracji komórek, wykorzystywanej na etapie przygotowania materiału do badań, w znacznej mierze uzależniony jest od celu prowadzonych oznaczeń oraz wymagań, jakie stawiane są próbkom poddawanych analizie z wykorzystaniem konkretnych technik pomiarowych.



Rysunek 1. Schemat obrazujący etapy procedury analitycznej.

II. Liza komórkowa

Liza komórkowa jest procesem, umożliwiającym dezintegrację próbek stałych, który skutkuje wydźwinięciem analitu oraz zapewnieniem jego dostępności. Niewątpliwie z tego względu może stanowić istotny etap procesu analitycznego. Liza polega na rozpadzie komórki roślinnej bądź zwierzęcej pod wpływem działania różnorodnych czynników określanych mianem czynników litycznych [1]. Czynniki te uszkodzają ścianę oraz błonę komórkową w komórce roślinnej lub jedynie błonę komórkową w komórce zwierzęcej. W konsekwencji dochodzi do uwolnienia zawartości cytoplazmy do środowiska, w którym ta komórka znajduje się, czemu towarzyszy zwiększenie dostępności analitu. Istotę lizy komórkowej przedstawiono schematycznie na przykładzie dezintegracji próbek liści szpinaku (Rysunek 2). Bardzo ważnym aspektem w kontekście przygotowania próbki do analizy z wykorzystaniem lizy komórkowej jako jednego z etapów procesu analitycznego jest wydajność i efektywność tego procesu, na którą składają się zarówno rodzaj czynnika litycznego jak i dobór odpowiednich warunków mających wpływ na jego działanie. Czynniki prowadzące do lizy komórkowej dzieli się na trzy grupy, tj. czynniki fizyczne, chemiczne oraz mechaniczne (Rysunek 3).



Rysunek 2. Istota lizy komórkowej. Opracowanie własne na podstawie [1,2].

Do czynników fizycznych zaliczamy ultradźwięki, mikrofały, podwyższone ciśnienie oraz temperaturę, jak również poddanie próbki procesowi wielokrotnego zamrażania i rozmrażania. Czynniki chemiczne wywołujące lizę komórki są rozpuszczalniki organiczne, substancje zaliczane do grupy środków powierzchniowo - czynnych (detergenty), stężone kwasy i zasady nieorganiczne oraz sole metali ciężkich. W obrębie rozpuszczalników organicznych największą popularnością i zarazem efektywnością działania cieszą się aceton oraz etanol, natomiast wśród środków powierzchniowo - czynnych sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego (SDS) i Triton X - 100. Należy jednak zaznaczyć, że poddanie materiału biologicznego działaniu innych rozpuszczalników organicznych (np. 2-propanolu, metanolu, chloroformu, eteru dietylowego, acetonitrylu, octanu etylu), kwasów (np. kwasu solnego, kwasu siarkowego(VI)) i zasad nieorganicznych (np. wodorotlenku sodu), detergentów (np. NP-40, tj. eteru nonylofenylowego glikolu polietylenowego, siarczanu(VI) sarkozyłu), czy soli metali ciężkich (np. siarczanu(VI) rtęci(II) i octanu ołowiu(II)) może w mniejszym bądź większym stopniu prowadzić do rozpadu komórki [3-6]. Do czynników chemicznych zaliczamy również proces trawienia enzymatycznego [7] oraz indukowany szok osmotyczny [1]. Liza komórek może także nastąpić w wyniku działania czynnika mechanicznego. Do ich rozpadu dochodzi wówczas na skutek wytrząsania z kulkami szklanymi bądź na drodze rozcierania badanego materiału z wykorzystaniem homogenizatora lub móżdżerza [3-6].

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA LIZĘ KOMÓRKI



Rysunek 3. Klasyfikacja czynników wywołujących lizę komórki. Opracowanie własne na podstawie [3-7].

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu wybranych czynników litycznych na efektywność procesu rozpadu komórek w liściach szpinaku przy wykorzystaniu techniki spektrofotometrii UV-Vis.

I. 1. Aparatura

- spektrofotometr UV-Vis (analityczna długość fali 672 nm),
- kuweta kwarcowa 1 cm, 2 sztuki,
- waga analityczna,
- homogenizator,
- wirówka laboratoryjna,
- pipeta automatyczna o pojemności 1 ml,
- termostat blokowy.

I. 2. Odczynniki

- aceton (około 10 ml),
- 1% SDS (około 10 ml),
- woda dejonizowana (około 50 ml).

I. 3. Materiały

- skalpel / nóż,
- deska do krojenia / płytki szklana,
- pęseta,
- probówki typu Eppendorf o pojemności 3 ml, 18 sztuk,
- zlewki o pojemności 100 ml, 3 sztuki,
- liście świeżego szpinaku (około 50 g),
- folia aluminiowa,
- lignina / ręcznik papierowy,
- końcówki do pipety automatycznej (100 - 1000 μ l),
- flamaster,
- pojemnik na odpady,
- statyw na probówki.

II. Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia Student powinien nosić odzież ochronną (okulary ochronne, rękawiczki, fartuch laboratoryjny) oraz bezwzględnie przestrzegać zasad bezpieczeństwa i higieny pracy oraz regulaminu pracowni.
- Student powinien nie dopuszczać do wdychania oparów cieczy, oraz pipetowania roztworów ustami.
- Na każdym etapie wykonywania ćwiczenia Student powinien postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego zajęcia.
- Identyfikacja zagrożeń:
 - ✓ **aceton** - wysoce łatwopalna ciecz i pary. Działa drażniąco na oczy. Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy. Powtarzające się narażenie może powodować wysuszenie lub pęknięcie skóry.



- ✓ **SDS** - substancja stała, łatwopalna. Działa szkodliwie po połknięciu. Działa drażniąco na skórę. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa szkodliwie w następstwie wdychania. Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.



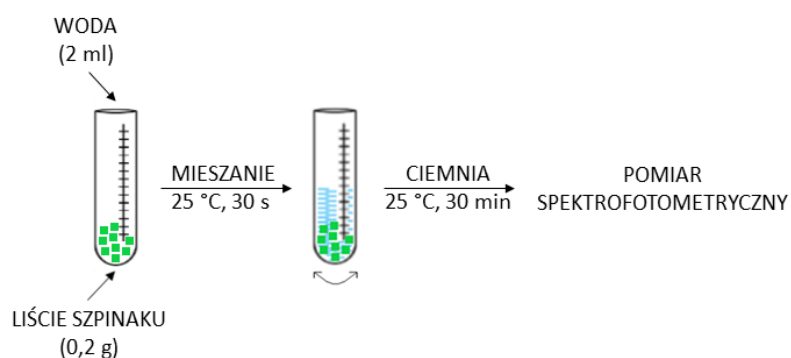
III. Wykonanie ćwiczenia

Przygotowanie próbek do analizy

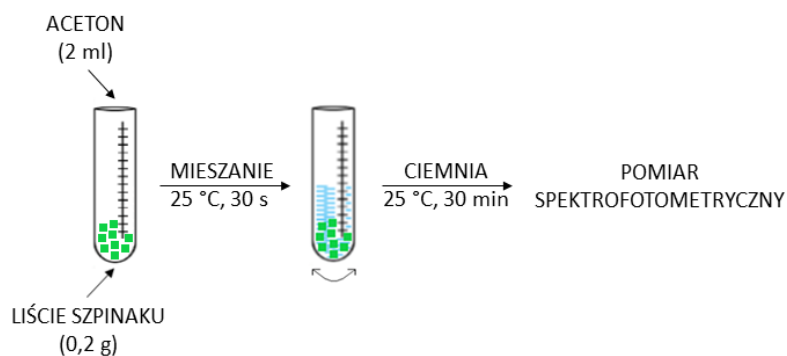
Liście świeżego szpinaku należy umyć, osuszyć i pokroić na małe kawałki tej samej wielkości z pominięciem widocznych na powierzchni materiału biologicznego nerwów. Nerwy należy usunąć przed przystąpieniem do wycinania. Następnie przygotować odważki o masie 0,2 g i przenieść ilościowo do probówek za pomocą pęsety. W dalszych etapach wykonywania ćwiczenia postępować zgodnie z procedurą zobrazowaną schematycznie na Rysunku 4. Zawartość probówki należy mieszać bardzo powoli i ostrożnie,

aby nie doprowadzić do mechanicznego uszkodzenia pokrojonych fragmentów materiału biologicznego. W każdym przypadku, podczas badania wpływu poszczególnych czynników litycznych na efektywność procesu dezintegracji komórek roślinnych należy przygotować próbki w 3 powtórzeniach oraz postępować zgodnie z zaproponowanymi procedurami. Wyłącznie takie podejście umożliwi uzyskanie miarodajnych (precyzyjnych i dokładnych) wyników pomiarów. Przygotowane próbki należy bezwzględnie chronić przed działaniem światła ze względu na ograniczoną trwałość chlorofilu a stanowiącego analit. Stąd też zalecane jest przechowywanie próbek w ciemnym miejscu, bądź opcjonalnie owinięcie probówek, w których je przygotowano folią aluminiową. Dodatkowo wykonując poszczególne czynności należy zwrócić uwagę, aby w trakcie mieszania, rozcierania itp. nie dopuścić do utraty części próbki poprzez jej rozlanie czy rozprysnięcie się. Próby przygotowywać w odstępach 15 - 20 minutowych w celu usprawnienia prac badawczych.

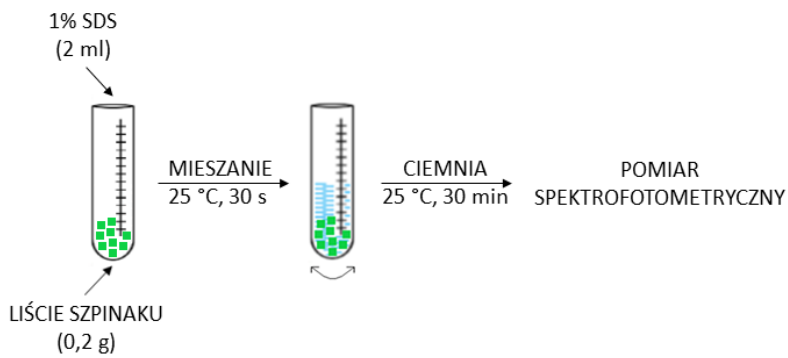
1. Próba kontrolna



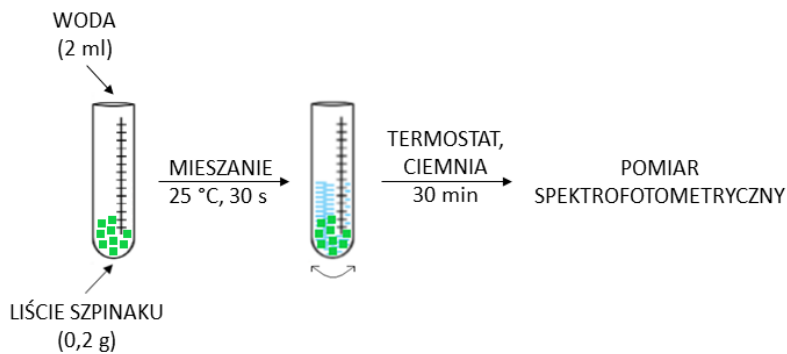
2. Próba badana – poddanie próby działaniu rozpuszczalnika organicznego



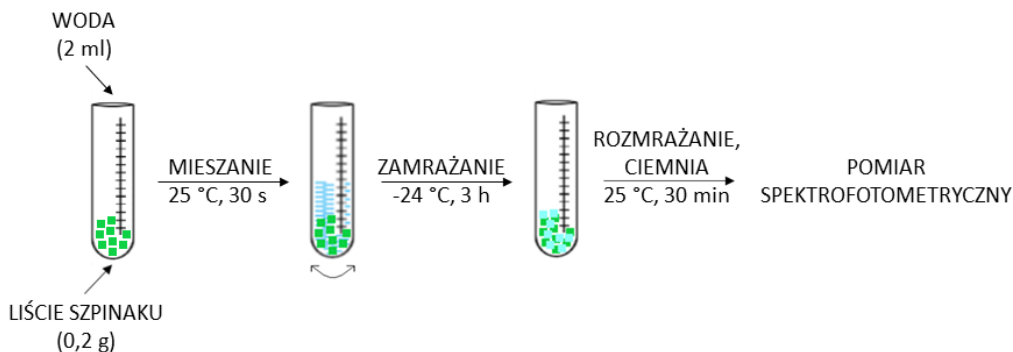
3. Próbkę badana – poddanie próby działaniu środka powierzchniowo - czynnego



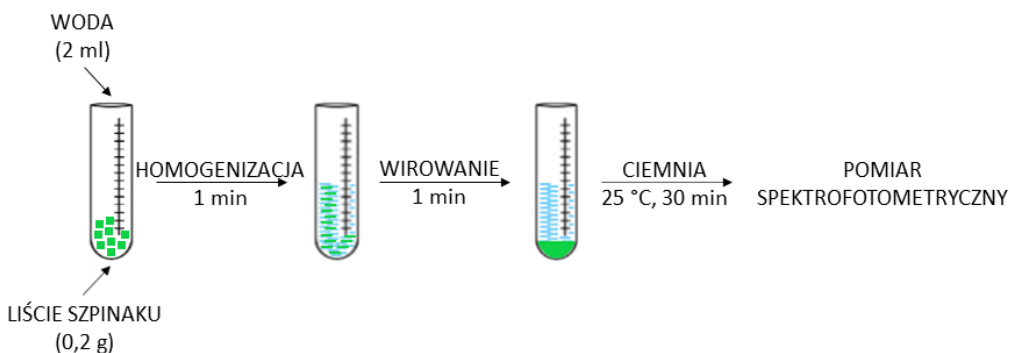
4. Próbkę badana – poddanie próby działaniu podwyższonej temperatury 50 °C



5. Próba badana – poddanie próby jednokrotnemu zamrożeniu i rozmrożeniu



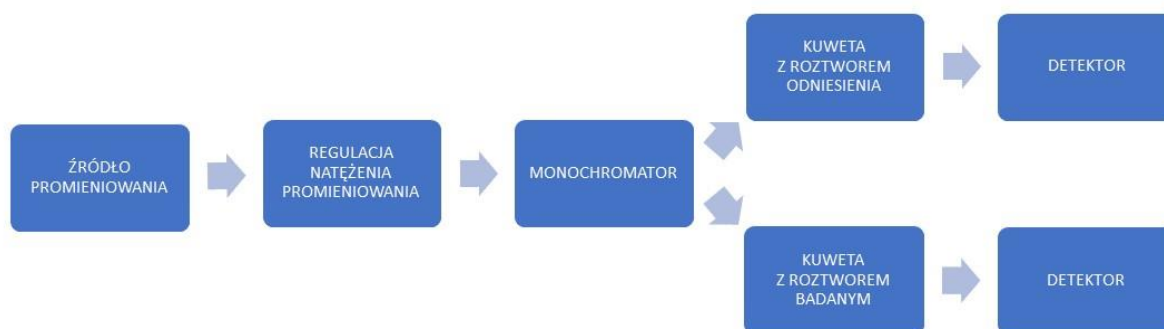
6. Próba badana – poddanie próby homogenizacji



Rysunek 4. Procedura przygotowania próbki do analizy w celu zbadania wpływu wybranych czynników litycznych na wydajność procesu lizy komórkowej. Materiały własne.

Po upływie 30 min, próbki należy ostrożnie wyjąć z ciemni, tak aby nie doprowadzić do wymieszania się ich zawartości. Klarowny roztwór nad osadu (tzw. *supernatant*) przenieść do czystej i suchej kuwety za pomocą pipety automatycznej (około 1 ml). Kuwetę z próbką badaną i próbką odniesienia umieścić w przeznaczonych miejscach układu pomiarowego, pamiętając, że próbkę odniesienia każdorazowo stanowi sam rozpuszczalnik, który został dodany do liści szpinaku. Następnie dokonać pomiaru absorbancji dla każdej z przygotowanych prób. Odnotować obserwacje oraz otrzymane wyniki.

Na etapie analizy końcowej zostanie wykorzystana technika spektrofotometrii UV-Vis. Jest to rodzaj spektrofotometrii, w którym do pomiarów wykorzystuje się promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego oraz nadfioletu (200 - 780 nm). Urządzeniem umożliwiającym wykonywanie pomiarów jest spektrofotometr UV-Vis, a wielkością mierzoną jest absorbancja. W trakcie pomiarów spektrofotometrycznych zostanie wykorzystany spektrofotometr UV-Vis dwuwiązkowy. W aparacie dwuwiązkowym, wiązka promieniowania elektromagnetycznego zostaje rozdzielona na dwie jednakowe, równoległe wiązki. Pierwsza z nich zostaje przepuszczona przez roztwór odniesienia, druga zaś przez roztwór badany. Każda z tych wiązek pada na oddzielny detektor. Zaletą tego rodzaju detekcji jest to, że na powtarzalność wyników nie wpływają zmiany napięcia związane z zasilaniem źródła światła. Poniżej przedstawiono schematycznie budowę spektrofotometru dwuwiązkowego (Rysunek 5) [8,9]. W miejscu przeznaczonym na próbkę odniesienia należy umieścić kuwetę z rozpuszczalnikiem, który został dodany do liści szpinaku (próba badana).



Rysunek 5. Schemat blokowy spektrofotometru dwuwiązkowego. Opracowanie własne na podstawie [8,9].

IV. Opracowanie i dyskusja wyników

1. Zinterpretować otrzymane wyniki przeprowadzając analizę jakościową zarejestrowanych sygnałów analitycznych. Wyniki należy zestawić w tabeli, której wzór zamieszczono poniżej. Uwzględnić wartości odchylenia standardowego (SD) oraz współczynnika zmienności (CV).

Zestawienie uzyskanych wyników

Lp.	Rodzaj próbki	Czynnik lityczny	Absorbancja [AU]	SD [AU]	CV [%]
1.	Próbka kontrolna	Woda			
2.	Próbka badana	Aceton			
3.		1% SDS			
4.		Temperatura 50 °C			
5.		Zamrażanie i rozmrażanie (jednokrotne)			
6.	Homogenizacja				

2. Wykreślić zależność absorbancji analizowanych roztworów w funkcji rodzaju zastosowanego czynnika chemicznego / fizycznego / mechanicznego.
3. Zinterpretować uzyskane wyniki i odpowiedzieć na następujące pytania:
 - Który/-e spośród rozpatrywanych czynników można zaliczyć do czynników litycznych?

- Który ze wskazanych czynników litycznych wykazuje największy / najmniejszy wpływ na wydajność procesu lizy komórkowej? Co o tym świadczy?
- Czy wykorzystanie techniki spektrofotometrii UV-Vis na etapie analizy końcowej umożliwia realizację zamierzonego celu ćwiczenia?
- Czy pomiary zostały przeprowadzone precyzyjnie? Co o tym świadczy? Jako kryterium akceptacji należy przyjąć wartości wyznaczonego parametru, charakteryzującego precyzję pomiarów, nie przekraczające 15%.

Poprawnie przygotowane sprawozdanie powinno zawierać opis obserwacji, tabelę w której zestawione zostaną zgromadzone wyniki, wykres (zależności) wykreślony na podstawie uzyskanych wyników z wykonanego doświadczenia, interpretację uzyskanych wyników oraz wnioski.

Literatura

- [1] L. Kłyszajko-Stefanowicz, Ćwiczenia z biochemii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2013)
- [2] <https://pl.wikipedia.org/wiki/Tylakoid> (dostęp dnia 02.06.2021 r.)
- [3] J. Bailey, D. Ollis Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw-Hill, New York 1987
- [4] S. Sasidharan, Y. Chen, D. Saravanan, K. Sundram, L. Yoga Latha, Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 8 (2011) 1-10
- [5] M. Manaargadoo-Catin, A. Ali-Cherif, J. Pougna, C. Perrin, Hemolysis by surfactants - A review, Advances in Colloid and Interface Science 228 (2016) 1-16
- [6] E. Ergun, B. Demirata, G. Gumus, R. Apak, Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry 379 (2004) 803-811
- [7] K. Lang, P. Lang, C. Bauer, C. Durant, T. Wieder, S. Huber, F. Lang, Mechanisms of suicidal erythrocyte death, Cellular Physiology and Biochemistry 15 (2005) 195-202
- [8] A. Cygański, Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2009
- [9] J. Badecka-Jędrzejewska, Wybrane zagadnienia z analizy instrumentalnej, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 1992