

I. ZELULAK APURTZEKO METODOAK

SARRERA

Zeluletako osagai ezberdinen egitura eta metabolismoa ezagutzea oso interesgarria da organismoaren norakoak ongi ulertzeko. Hala ere, edozein konpartimenturen azterketa burutu ahal izateko ezinbestekoa da lehenik hau zelulako gainerako elementuetatik isolatzea. Horretarako, zelula inguratzen duen mintz plasmaticoak hautsi behar da, hala, organuluak eskuratu eta bereizketa metodo egokiak erabiliz (kromatografia, zentrifugazioa...) posible da intereseko organulu edo makromolekula purifikatzea. Noski, prozesuan zehar erabilitako apurketa eta bereizketa metodoak interesatzen zaigun elementuaren ezaugarriak kontuan izanik aurkeratu behar dira, aztergaiaren jatorrizko nolakotasunak mantendu eta emaitza zehatzak lortzeko.

Zelula gehien kasuan metodo fisikoak nahikoa izaten dira zelula apurtzeko (talka osmotikoa, homogeneizazioa, ultrasoinuak...). Mintz plasmaticoaz gain zelula pareta duten landare edo bakterio zelulen kasuan ordea, metodo entzimatoak (lisozima) erabiltzen dira, N-azetil glukosaminaren eta N-azetilmuramiko azidoaren arteko lotura glikosidikoak hautsiz horma hidrolizatu eta hala, mintza erraz apurtu ahal izateko.

Nolanahi ere, gure kasuan, zaldi odoleko eritrozitoekin lan egin dugu. Zelula hauen ezaugarriak kontuan izanik apurketa metodo ezberdinen eraginkortasuna zenbatetsi dugu mediora askatutako proteinak kuantifikatuz. Eritrozitoek zelula paretik ez dutenez, lisozimaren gehikuntzak proteina kontzentrazioan eraginik ez zuela izango pentsatu dugu, eta beraz, lortutako proteina kontzentrazioa soilik talka osmotikoaren menpekua izango zela.

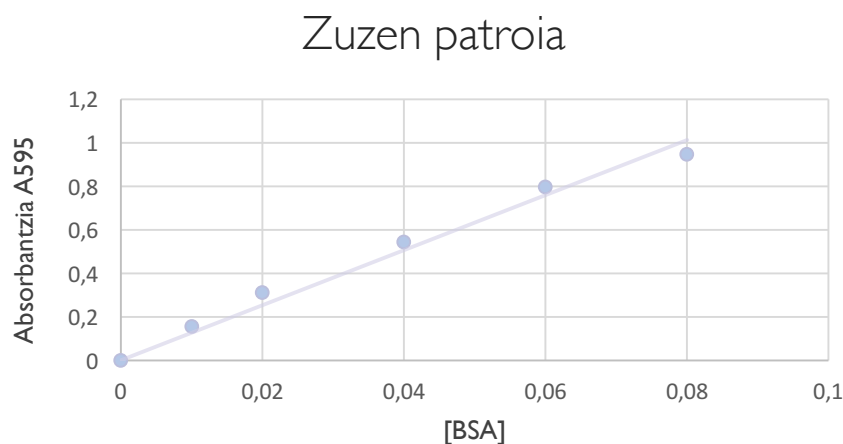
Erabili ditugun apurketa metodoen eraginkortasuna neurtzeko lehenik gure zelula suspentsioa zentrifugan garbitu dugu, medioko gainerako proteinek gure kalkuluetan izan dezaketen eragina saihesteko. Ondoren, jalkina berresegi eta eta bi saio-hoditan banatu dugu, bietako bati lisozima gehitu eta inkubatuz. Ondoren, saio-hodi bakoitza bitan banatu dugu berriro, bata A medioan (talkarik ez) berresegiz eta bestea B medioan (talka). Guztiei Bradforda gehitu diegu, hala, espektrofotometroa erabiliz lagin bakoitzaren absorbantzia 595nm-tan kalkulatu ahal izateko.

Modu honetan, hasierako zelula medio horren lau lagin ezberdin lortu ditugu, eta guztiei tratamendu ezberdina egin diegunez, bakoitzean askatu den proteina kontzentrazioa ikusita konbinaketa eraginkorrena zein den erabaki ahal izan dugu, horretarako laginen absorbantziak eta zuzen-patroia erabilia.

LAGINAK	ABSORBANTZIA 595nm
Lisozima + A indargetzailea (-talka)	0,096
Lisozima + B indargetzailea (+talka)	0,170
Lisozimarik ez + A indargetzailea (-talka)	0,045
Lisozimarik ez + B indargetzailea (+talka)	0,170

ZUZEN PATROIA

Lagin batean askatutako proteinen kontzentrazioak kalkulatzeko ezinezkoa da hauen xurgapen eta kontzentrazioen arteko erlazioa ezartzen duen zuzen edo funtzio bat izan ezean. Horregatik, proteina kontzentrazio ezaguneko laginen xurgapenak kalkulatu ditugu espektrofotometroan eta bi ezaugarriak lotzen dituen funtzio bat eraiki dugu, honako irudian ikus daitekeen moduan.



[BSA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A595
0	0
0,01	0,155
0,02	0,312
0,04	0,544
0,06	0,797
0,08	0,946

Funtzioa	R ²
$y = 12,649x$	0,98312

KALKULUAK

Zaldi-odoleko eritrozitoen apurketetan erabilitako metodoen eraginkortasuna ezagutzeko saio bakoitzean askatu den proteina kantitatea kuantifikatu dugu, jakina baita orduan eta zelula gehiago apurtu, mediora askatutako proteina zitosolikoen kontzentrazioa altuagoa dela. Kalkuluak egiteko aurreko puntuan adierazitako zuzen-patroiaren ekuazioa erabili dugu, laginen absorbantziak ordezkatu eta x-en (kontzentrazioa) balioa isolatuz.

Prozesuan zehar gure lagina hainbatetan diluitu behar izan dugu balio maneigarriagoak izateko. Gure laginaren 20 μl 180 μl ur dislutatutan diluitu ditugu. Bertatik 10 μl hartu eta 190 μl uretan diluitu ditugu, eta azkenik beste 20 μl 180 μl uretan diluitu ditugu. Beraz egindako diluzioak 1/20, 1/10 eta 1/20 izan dira. Hori dela eta jatorrizko lagineko kontzentrazioa kalkulatzeko gure balioak 4000-z bidertu ditugu.

LAGINAK	A595	[BSA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	DILUZIOA	[BSA] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
L+T-	0,096	0,007589533	1/4000	30,35813108
L+T+	0,170	0,013439798	1/4000	53,75919045
L-T-	0,045	0,003557593	1/4000	14,23037394
L-T+	0,170	0,013439798	1/4000	53,75919045

EMAITZEN INTERPRETAZIOA

Gure laginen proteina kontzentrazioak kalkulatu ondoren, esperimuntuan zehar egindako akatsek espero genituen emaitzak aldatu dituztela garbi ikusi dugu. Zaldi-odoleko eritrozitoen ezaugarri morfologiko eta estrukturalak ezagututa, eta zelula hauek mintz plasmatikoz soilik inguratuta daudenez, liozimizatutako eta tratatu gabeko laginen artean ezberdintasunik ez zela egongo pentsatu dugu. Izan ere, pareta zelularrik ez dutenez, liozizima gehitu ala ez, mediora askatzen den proteina kontzentrazioa talka osmotikoa gertatzearen edo ez gertatzearen menpekoa soilik izango zela uste izan dugu.

Aipatu dugun bezala, L+ nahiz L- laginak bitan banandu ditugu eta indargetzaile ezberdinean berresegi ditugu talka osmotikoaren eragina neurtzeko. A soluzioa, Tris-HCl 20 mM eta NaCl 150mM-*ez osatua*, medio isotonikoa da, beraz, hau gehitu dugun laginetan ez genuen apurketarik espero, teorikoki, baldintza isotonikoetan ez baita talka osmotikorik gertatzen. Hala ere, A soluzioan berresegitako laginen absorbantziek ez dute berdina adierazi, liozimizatutako laginaren kasuan 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ inguruko kontzentrazioa jaso baitugu eta liozizimarekin ez zuenean aldiz 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ingurukoa.

Emaitza hauetatik arritzen gaituena ez da proteinen presentzia, bi laginen arteko ezberdintasuna baizik. Espektrofotometroak proteinak aurkitu eta kuantifikatu izana ez da arritzekoa, izan ere, gure laginak hainbat aldiz zentrifugatu ditugu eta eritrozitoak zelula nahiko delikatuak direnez posible da batzuk apurtu izana. Bestalde, lagin baten proteina kontzentrazioa bestearen bikoitza izatea zerk eragin duen ez dugu oso argi. Bi laginak baldintza berdinetan zentrifugatu ditugu eta makina berdina erabili ditugu absorbantzien kalkulurako, beraz, hiru arrazoi posible bururatzen zaizkigu. Alde batetik, liozizimarekin tratatu den laginak nolabait apurketa bortitzagoa jasan duela ikusten da, beraz, posible da jarduera entzimatikoa zelulen mintzarengan eraginen bat izan eta ondorioz proteina gehiago askatu izana. Bigarrenik, posible da pipeta oker erabili izana eta beraz bi laginetan genuen eritrozito bolumena ezberdina izatea. Modu honetan, hasieratik baldintza ezberdinak izango genituzke eta bolumen txikieneko laginak proteina kontzentrazio baxuagoa erakutsiko luke. Azkenik, espektrofotometroa erabiltzerakoan balio baxuena eman digun lagina kubeta zikin batean isuri dugula pentsa genezake, izan ere, kubetaren hormak erabat gardenak ez badira makinak jasotzen duen xurgapen balioa okerra izan daiteke.

B soluzioa gehitu dugun laginek aldiz talka osmotikoa jasan dutela baieztatu dugu. Izan ere, Tris-HCl 10 mM-*ez osatutako soluzio* hau hipotonikoa da eta beraz, eritrozitoekin alderatuta kontzentrazio baxua duenez oreka mantentzeko ura zeluletan sartzen da, kasu batzuetan zelula izugarri puztuz eta plasmolisi izenez ezagutzen den lehertze fenomenoaren pairatuz. Kalkuluen atalean ikus daitekeen bezala, soluzio hau gehitu diegun laginek proteina kontzentrazio berdina ematen digute, eta beste bi laginez alderatuz, altuagoa. Hori dela eta, kasu honetan, gure usteak egia direla esan dezakegu, hau da, liozizimek eritrozitoengan eraginik ez dutela, baita bi laginetan genuen eritrozito bolumena berdina dela eta soluzioaren eragina bi kasuetan parekoa izan dela ere. Hau egitearekin batera beharrezkoa da beste laginen arteko aldea zuzitzeko proposatu dugun lehen arrazoa alboratzea, esan bezala, liozizimarekin mintz plasmatikokoetan ez baitu inongo eraginik.

Azkenik, aipatzekoa da, lortu ditugun emaitzek erabat okerrak ez diruditen arren, prozesuan zehar arazoak izan ditugula eta beraz hauen egiazkotasuna zalantzan jar daitekeela. Hasierako bi laginak (+L eta -L) 14.000 rpm-tan zentrifugatu behar direla adierazten du protokoloak A eta B soluzioak gehitu aurretik, guk ordea laginak zentrifugatu gabe berresegi ditugu soluzio horietan. Beraz, posible da apurketa metodo hauen eraginkortasuna guk ondorioztatu dugunetik urrun egotea eta beste taldeekin alderatuz balio ezberdinak lortu izana.

3. MALATO DESHIDROGENASAREN AKTIBITATEAREN NEURKETA

SARRERA

Aurreko praktikan aipatu dugun bezala, zelulako osagai ezberdinen egitura eta metabolismoa ezagutzea oso interesgarria da organismoaren norakoak ongi ulertzeko. Praktika honetan, patata homogenatu batetik isolatu ditugun mitokondrien matrizean ageri den malato deshidrogenasa entzimaren aktibitatea neurtu dugu. Horretarako, mitokondrien ezaugarriak kontuan izan eta medio ezberdinetan eseki ditugu, hala, kasu bakoitzean jasandako apurketa mailaren arabera entzimaren aktibitatea ezberdina izan dela ikusi dugu.



Malato deshidrogenasa entzimak azido zitrikoaren zikloan parte hartzen du eta malatetik oxalazetatorako oxidazio erreakzioa katalizatzen du elektroio hartzaile gisa NAD^+ erabiliz. Erreakzio hau modu espontaneoan ezkererantz gertatzen den arren, organismo funtzionaletan, energia beharizanen ondorioz, $\text{NADH} + \text{H}^+$ sortu bezain laster erabiltzen da elektroioen garraio katean eta beraz, erreakzioak aurkako noranzkoa hartu ohi du.

Edonola ere, gure kasuan mitokondrioak isolatuta izan ditugunez erreakzioak malato eta NAD^+ alderanzko oreka izan du eta beraz malato deshidrogenasaren aktibitatea oxalazetatoaren bidezko NADH -aren oxidazioa neurtuz kalkulatu dugu. Horretarako kasuetariko bakoitzean NADH a azken momentuan gehitu dugu eta espektrofotometroa erabiliz bere A_{340} -ren aldakuntza neurtu dugu. Hala, honen kontsumizioa neurtu dugu eta malato deshidrogenasaren aktibitate entzimatikoa kalkulatu ahal izan dugu.

Esan bezala, espektrofotometroan hiru lagin ezberdin neurtu ditugu, kasu bakoitzean mitokondrioengan eragin jakina duen saio-soluzio ezberdin bat erabiliz. Horrez gain, laginetariko bakoitzarekin batera erreferentzia bat sartu dugu espektrofotometroan gertatzen diren fenomeno optikoen ondoriozko galera posibleak konpentsatzeko.

SAIO SOLUZIOAK

- 1 0.3 M Manitoia, 20 mM MOPS pH 7.4
- 2 20 mM MOPS pH 7.4
- 3 0.3 M Manitoia, 20 mM MOPS pH 7.4 , 0.1 % Triton X-100

KALKULUAK

LAGINA	DENBORA	ABSORBANTZIA 340 nm
1 saio-soluzioa	7 segundu	0.4621
1 saio-soluzioa	30 segundu	0.3791
2 saio-soluzioa	7 segundu	0.4621
2 saio-soluzioa	30 segundu	0.2138
3 saio-soluzioa	7 segundu	0.4621
3 saio-soluzioa	30 segundu	0.0481

I.SOLUZIOA

- Eraitza denbora-unitateko eman ahal izateko eta gure denbora tartea 23 s dela kontuan hartuta:

$$\Delta \text{Abs} = (0.4621) - (0.3791) = 0.083 \quad \frac{0.083}{23 \text{ s}} \cdot \frac{60 \text{ s}}{\text{min}} = \mathbf{0,2165 \Delta \text{abs} / \text{min}}$$

- Lambeert-Beer ekuazioa aplikatuz:

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (0.2165) = (6.22 \cdot 10^3) \cdot C \cdot l$$

$$C = \mathbf{3,48 \cdot 10^{-5} \text{ M} / \text{min}}$$

- Balio hori litroko dago, gure bolumen totala ordea $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ da, beraz:

$$(3,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{min}) \cdot (3,2 \cdot 10^{-3} \text{ L}) = \mathbf{1,114 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{min}}$$

- Hala ere, balio 0,05 ml mitokondrioni dagokiona da eta gure eraitza mililitrotan nahi dugu, beraz:

$$\frac{1,114 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{min}}{0,05 \text{ ml mitokondrio}} = \mathbf{2,23 \cdot 10^{-6} \text{ mol} / \text{min} \cdot \text{ml}}$$

- Mitokondrio frakzioa lagina prestatu aurretik 5 aldiz diluitu dugunez aktibitate erreala bost bider handiagoa da, hau da:

$$\mathbf{1,114 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{min} \cdot \text{mL mitokondrio}}$$

2.SOLUZIOA

- Emaizta denbora-unitateko eman ahal izateko eta gure denbora tartea 23 s denez:

$$\Delta\text{Abs} = (0.4621) - (0.2138) = 0.2483 \quad \frac{0.2483 \cdot 60 \text{ s}}{23 \text{ s}} = \mathbf{0,6477 \Delta\text{abs} / \text{min}}$$

- Lambeert-Beer ekuazioa aplikatuz:

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (0.6477) = (6.22 \cdot 10^3) \cdot C \cdot l \quad C = \mathbf{1,04 \cdot 10^{-4} \text{ M} / \text{min}}$$

- Balio hori litroko dago, gure bolumen totala ordea $3,2 \cdot 10^{-3}$ L da, beraz:

$$(1,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol} / \text{min}) \cdot (3,2 \cdot 10^{-3} \text{ L}) = \mathbf{3,33 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{min}}$$

- Hala ere, balio 0,05 ml mitokondriori dagokiona da eta gure emaitza mililitrotan nahi dugu, beraz:

$$\frac{3,33 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{min}}{0,05 \text{ ml mitokondrio}} = \mathbf{6,66 \cdot 10^{-6} \text{ mol} / \text{min} \cdot \text{ml}}$$

- Mitokondrio frakzioa lagina prestatu aurretik 5 aldiz diluitu dugunez aktibitate erreala bost bider handiagoa da, hau da:

$$\mathbf{3,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{min} \cdot \text{mL mitokondrio}}$$

3.SOLUZIOA

- Emaizta denbora-unitateko eman ahal izateko eta gure denbora tartea 23 s denez

$$\Delta\text{Abs} = (0.4621) - (0.0481) = 0,414 \quad \frac{0,414 \cdot 60 \text{ s}}{23 \text{ s}} = \mathbf{1,08 \Delta\text{abs} / \text{min}}$$

- Lambeert-Beer ekuazioa aplikatuz:

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1.08) = (6.22 \cdot 10^3) \cdot C \cdot l \quad C = \mathbf{1,73 \cdot 10^{-4} \text{ M} / \text{min}}$$

- Balio hori litroko dago, gure bolumen totala ordea $3,2 \cdot 10^{-3}$ L da, beraz:

$$(1,73 \cdot 10^{-4} \text{ mol} / \text{min}) \cdot (3,2 \cdot 10^{-3} \text{ L}) = \mathbf{5,55 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{min}}$$

- Hala ere, balio 0,05 ml mitokondriori dagokiona da eta gure emaitza mililitrotan nahi dugu, beraz:

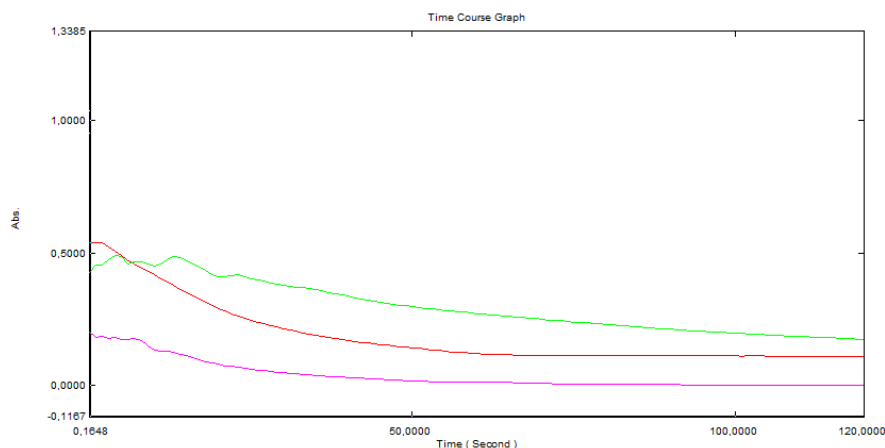
$$\frac{5,55 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{min}}{0,05 \text{ ml mitokondrio}} = \mathbf{1,11 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{min} \cdot \text{ml}}$$

- Mitokondrio frakzioa lagina prestatu aurretik 5 aldiz diluitu dugunez aktibitate erreala bost bider handiagoa da, hau da:

$$\mathbf{5,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{min} \cdot \text{mL mitokondrio}}$$

EMAITZEN INTERPRETAZIOA

Aurreko atalean lortu ditugun emaitzetan ikus daitekeen bezala, osaera ezberdineko saio-soluzioak erabilia malato deshidrogenasaren aktibitate ezberdinak lortu ditugu. Kasu bakoitzean apurtu den mitokondrio kantitatea ezberdina izan da eta ondorioz absorbantziaren jaitsiera ere bai, malato deshidrogenasaren presentziaren arabera izan baita NADH-aren kontsumizioa. Hala ikus daiteke espektrofotometroaren errepresentazio grafiko honetan:



Lehen laginaren (lerro berdea) kasuan, absorbantziaren jaitsiera bat egon dela ikusten dugu baina ez da oso nabarmena izan eta puntu batetik aurrera balioa ia konstante mantendu da. Teorikoki, lehen saio-soluzio hau manitol eta MOPS indagetzailearen nahaste isotoniko bat denez, NADH-rik ez da oxidatzen, mitokondrioek ez baitute apurketarik jasaten eta beraz malato deshidrogenasarik ez baita kanpo mediora askatzen. Hala ere, homogeneizazioa prozesu bortitza denez gero mitokondrioetariko batzuk apurtu izana erabat normala da. Beraz, lagina prestatu aurretik ere mitokondrio frakzioan malato deshidrogenasa batzuk aske egon direla pentsa dezakegu, eta NADH_a oxidatu izana horren ondorioa dela. Grafikoko hasiera aldakorra denez 7 eta 30 segunduen arteko balioak kontuan izanda lortu dugu malato deshidrogenasaren aktibitate entzimatiakoaren balioa, $1,114 \cdot 10^{-5} \text{ mol / min} \cdot \text{mL}$.

Bigarren laginari dagokionez (lerro gorria), NADHaren oxidazioa aurreko kasuan baina nabariagoa izan dela ikusi dugu. Kasu honetan gehitutako saio-soluzioak soilik MOPS indargetzailea zuenez, mitokondrioen barnealdean eta kanpo medioan kontzentrazio ezberdinak egotearen ondorioz mitokondrietara ura sartu dela pentsa daiteke. Mitokondrioak bi mintz dituenez, NADHaren galera ez da bapatekoa izan, guk neurtu dugun denbora tartean mitokondrioetariko askok kanpo mintza bakarrik galdu dute eta. Absorbantziaren jaitsiera denbora gehiagoan behatu bagenu ziurrenik momenturen batean zero balioa hartuko lukeela ikusiko genuke, jada mitokondrio gehiago apurtzean gehitutako NADH guztia oxidatuko bailitzateke. Saio-soluzio hau erabilia lortu dugun malato deshidrogenasa entzimaren aktibitate entzimatiakoaren balioa $3,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol/min} \cdot \text{mL}$ da, lehen laginaren hirukoitza

Hirugarren laginean (lerro arrosa) aldiz, neurtzen hasi eta oso denbora gutxira NADH guztia oxidatu da. Saio-soluzio honek manitola eta MOPSa izateaz gain Triton X-100 konposatua du eta honek, detergente bat denez, mitokondrioen kanpo nahiz barne mintzak berehala apurtu ditu. Hala ere konposatu hau oso kontzentrazio oso baxuan gehitzen da (0,1 %) lagina ez kutsatzeko eta emaitzetan alterazioak saihesteko. Saio-soluzio hau erabilia lortu dugun malato deshidrogenasa entzimaren aktibitate entzimatiakoaren balioa $5,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol/min} \cdot \text{mL}$ da, lehen laginarena baina bost aldiz handiagoa.

Grafikan ikus daitekeen bezala, lehen segunduetako absorbantzien balioak ez daude oso argi eta lagin guztietan NADH bolumen berdina (0,05 ml) gehitu izan arren, lagin bakoitzak balio ezberdinean du hasiera puntua. Arrazoi asko egon daitezke honen atzean, hala ere, gure usteen arabera logikoenak espektrofotometroaren erabilerari dagozkionak dira. NADHa gehitu eta neurgailua itxi orduko NADH kantitate bat oxidatu izana zentzuzkoa da, izan ere, hirugarren kasuan gehienbat, mitokondrioen apurketa berehalakoa izan da. Gainera, NADHa gehitzean, neurketa ahalik eta bizkorren abian jartzeko presak medio, posible da lagina behar bezala ez nahastu izana eta beraz lehen segunduetan nahastearen gune ezberdinetan kontzentrazio ezberdinak egon izana.

Edonola ere, aurrez genuen ustea, oinarri teorikoa, lortutako grafikoa eta analitikoki kalkulatu ditugun aktibitate entzimatikokoaren balioak bat datoz, beraz neurri handi batean praktika behar bezala burutu dugula dirudi.