

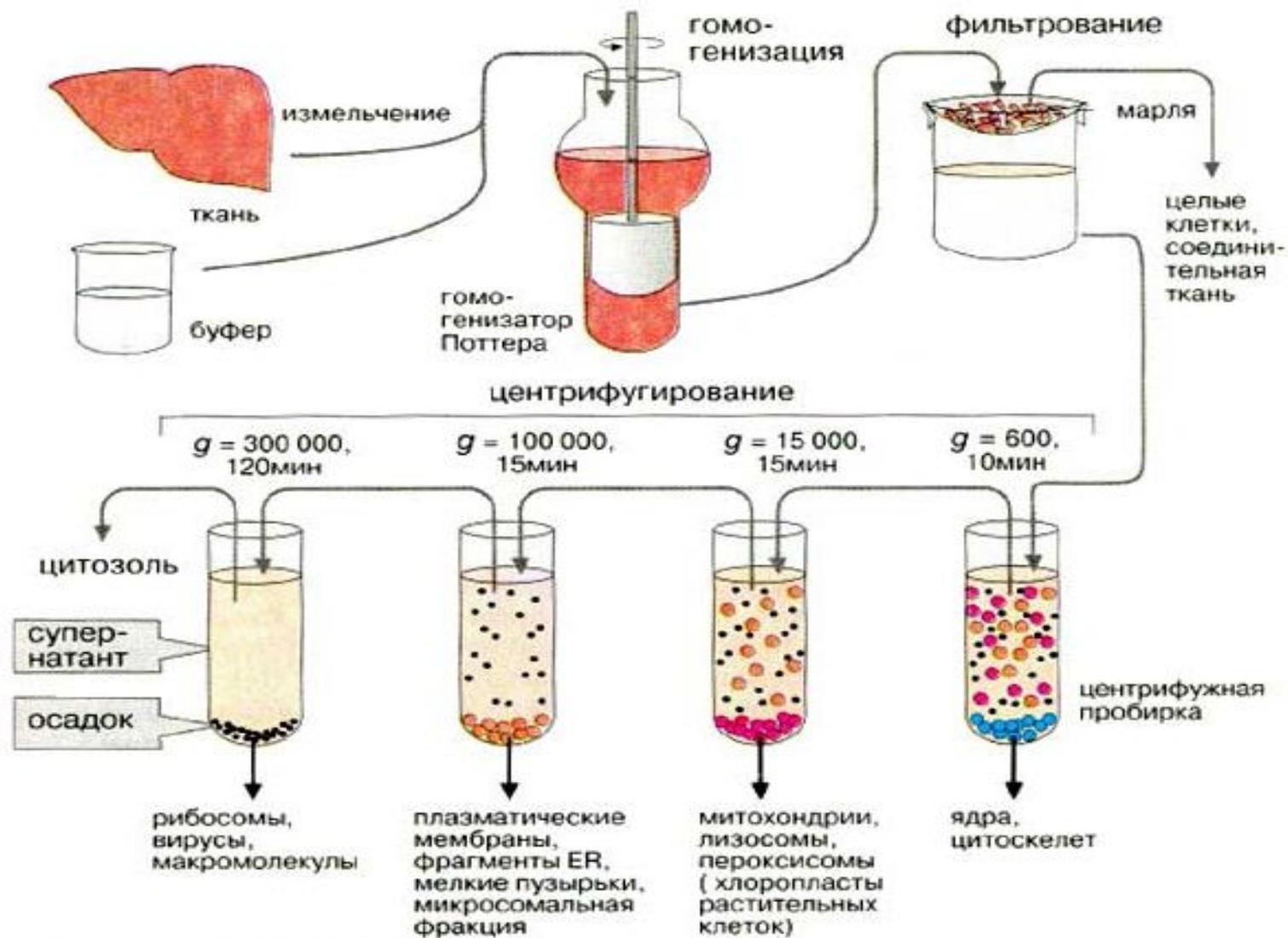
Методы выделения, очистки, идентификации и изучения мембранных структур

Рассматриваемые вопросы:

- Методы выделения органелл и мембран из тканей, клетки.
- Этапы субклеточного фракционирования: экстракция, гомогенизация и центрифугирование, их особенности.
- Методы разделения и очистки субклеточных компонентов.
- Выделение мембранных частиц.
- Идентификация мембранных фракций, критерии их очистки.
- Контроль наличия примесей с помощью световой и электронной микроскопии, анализа липидного состава или определении активности маркерных ферментов.
- Определение белкового состава в выделяемых мембранных фракциях. Определение активности маркерных ферментов определенного типа выделенной мембранной фракции.

- Получение отдельных клеточных компонентов дает возможность изучать их биохимию и функциональные особенности. Например, можно создать бесклеточную систему для рибосом, которые будут синтезировать белок по заданной экспериментатором информационной РНК. Выделенные митохондрии в подобранных условиях могут осуществлять синтез АТФ, на выделенном хроматине при участии соответствующих ферментов может происходить синтез **РНК** и т.д.
- В последнее время применяются **бесклеточные системы** для воссоздания клеточных надмолекулярных структур. Так, используя очищенные от гранул желтка экстракты цитоплазмы яиц земноводных или яиц морских ежей, можно получить ядра с ядерной оболочкой из введенной в эту бесклеточную систему чужеродной ДНК (например, ДНК бактериофага). Такая ДНК связывается с белками-гастонами, которые есть в избытке в таком экстракте, образуется хроматин (дезоксирибонуклеопротеид), который покрывается двойной мембранной оболочкой, несущей даже ядерные поры. Такие **модельные системы** помогают изучать тонкие, интимные процессы, например транспорт макромолекул из цитоплазмы в ядро, и наоборот. В цитоплазматических экстрактах яиц земноводных и иглокожих такие ядра могут периодически делиться путем митоза. Эти модели внесли огромный вклад в расшифровку природы регуляции клеточного цикла.

Для того чтобы выделить клеточные органеллы, исследуемый образец измельчают и затем **гомогенизируют** в забуференной среде с использованием гомогенизатора Поттера-Элведжема (тефлоновый пестик, вращающийся в стеклянном цилиндре). Это сравнительно мягкий метод, который особенно предпочтителен для выделения лабильных молекул и ультраструктур. Другие методики разрушения клеток включают ферментативный лизис, разрушающий клеточные стенки, или механическое разрушение замороженных тканей (размолотом или с помощью вращающихся ножей; под большим давлением; осмотическим шоком; многократным чередованием замораживания и оттаивания).



- Для выделения интактных органелл важно, чтобы среда, в которой проводится гомогенизация, была изотонической, т.е. осмотическое давление буфера должно соответствовать давлению внутри клетки. Если раствор гипотоничен, органеллы будут «впитывать» дополнительную воду и лопнут, а в гипертонических растворах они, напротив, сморщиваются.
- Вслед за гомогенизацией следует фильтрование для удаления интактных клеток и соединительных тканей. Собственно фракционирование клеточных органелл проводится с помощью дифференциального центрифугирования, т.е. центрифугирования при различных скоростях вращения ротора. При этом ступенчатое увеличение центробежной силы (которую принято выражать величиной, кратной нормальному ускорению свободного падения $g = 9,81 \text{ м/с}^2$) приводит к последовательному осаждению различных органелл, т.е. их разделению в соответствии с плотностью и размером.

Одним из основных способов выделения клеточных структур является **дифференциальное (разделительное) центрифугирование**. Принцип его применения в том, что время осаждения частиц в гомогенате зависит от их размера и плотности: чем больше частица или чем она тяжелее, тем быстрее она осядет на дно пробирки. Для ускорения процесса оседания варьируют ускорения, создаваемые центрифугой.

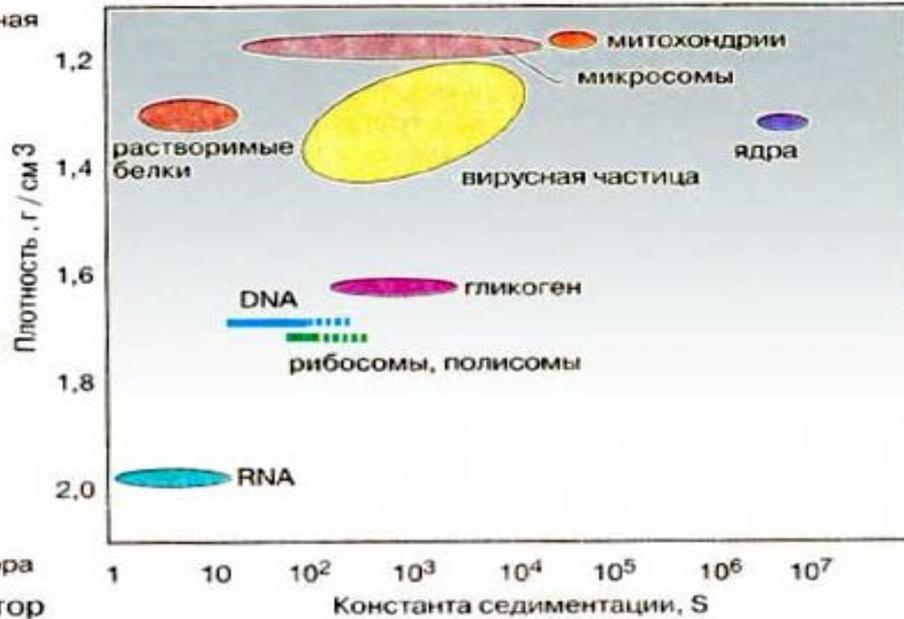
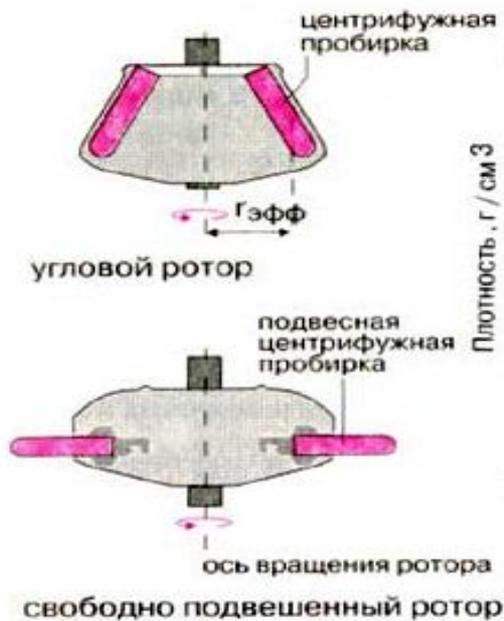
При центрифугировании раньше всего и при небольших ускорениях осядут ядра и неразрушенные клетки, при 15-30 тыс. g осядут крупные частицы, макросомы, состоящие из митохондрий, мелких пластид, пероксисом, лизосом и др., при 50 тыс. g осядут микросомы, фрагменты вакуолярной системы клетки.

При повторном дробном центрифугировании этих смешанных подфракций можно получить чистые фракции. Так, при разделении макросомной подфракции получают отдельно митохондрии, лизосомы, пероксисомы. При разделении микросом можно получить фракцию мембран аппарата Гольджи, фрагментов плазматической мембраны, вакуолей, гранулярного ретикулума. В случаях более тонкого разделения фракций используют центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, что позволяет хорошо разделить компоненты, даже незначительно отличающиеся друг от друга по удельной массе.

- Выделение клеточных органелл обычно проводят при низких температурах (0-5°C) для того, чтобы уменьшить степень деградации материала за счет реакций, катализируемых ферментами; последние высвобождаются в процессе разрушения ткани. Добавление тиолов и хелатирующих агентов необходимо для защиты функциональных SH-групп от окисления.
- Прежде чем выделенные фракции анализировать биохимическими способами, необходимо проверить их на чистоту с помощью электронного микроскопа.
- Получение отдельных клеточных компонентов дает возможность изучать их биохимию и функциональные особенности. Так можно создать бесклеточную систему для рибосом, которые будут синтезировать белок по заданной экспериментатором информационной РНК. Выделенные митохондрии в подобранных условиях могут осуществлять синтез АТФ, на выделенном хроматине при участии соответствующих ферментов может происходить синтез **РНК** и т.д.

Основы метода центрифугирования

- Частицы в растворе осаждаются (седиментация), когда их плотность выше плотности раствора, или всплывают (флотация), когда их плотность ниже плотности раствора. Чем больше разница в плотности, тем быстрее идет распределение частиц. Когда плотности частиц и раствора одинаковые (изопикнические условия), частицы остаются неподвижными. При малой разнице в плотности частицы можно разделить только в центрифуге, которая создает центробежную силу, во много раз превышающую силу земного притяжения.



g : ускорение свободного падения
 v : скорость седиментации, см/с
 ω : угловая скорость, рад/с
 $r_{эфф}$: эффективный радиус, см

$$g = \omega^2 r_{эфф}$$

$$v = \omega^2 r_{эфф} S$$

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \rho)}{f}$$

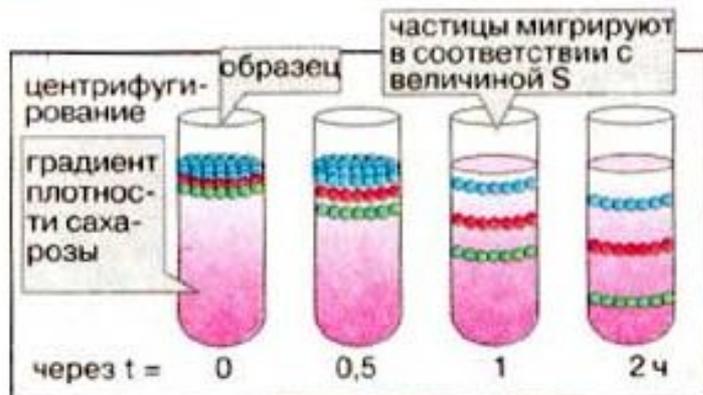
s : коэффициент седиментации ($S = 10^{-13} \text{ с}$)
 M : молекулярная масса
 \bar{v} : парциальный объем частицы, см³/г
 ρ : плотность раствора, г/см³
 f : коэффициент трения

соотношение между плотностью и коэффициентом седиментации для различных частиц в растворе хлорида цезия (CsCl).

- Скорость седиментации частицы (v) зависит от угловой скорости (ω), эффективного радиуса ротора $r_{\text{эфф}}$ (расстояние от оси вращения) и седиментационных свойств частиц.
- Седиментационные свойства частицы характеризуются коэффициентом седиментации S и выражаются в единицах Сведберга ($1S = 10^{-13}c$).
- Величина S может колебаться в широких пределах. Для сравнения коэффициентов седиментации в различных средах их обычно корректируют по плотности и вязкости воды при $20^\circ C$ (S_{20w}).
- Коэффициент седиментации зависит от молекулярной массы (M) частицы, ее формы (коэффициент трения f), парциального удельного объема \bar{v} (величина, обратная плотности

Центрифугирование в градиенте плотности

- Макромолекулы или органеллы, незначительно различающиеся по размеру или по плотности, можно разделить центрифугированием в градиенте плотности. Для этих целей используются два метода.
- При **зональном центрифугировании** анализируемая проба (например, белки или клетки) наслаивается тонким слоем поверх буферного раствора. В процессе центрифугирования частицы проходят через раствор, так как их плотность выше плотности раствора. Скорость движения зависит от массы и формы частиц (см. формулы на схемеА). Центрифугирование прекращают прежде, чем частицы достигнут дна центрифужной пробирки. Затем дно прокалывают и собирают ряд фракций, содержащих различные частицы. Стабильность градиента плотности в процессе центрифугирования достигается применением растворов углеводов или коллоидного силикагеля, концентрация которых возрастает от поверхности к дну пробирки. Градиент плотности препятствует образованию конвекционных потоков, снижающих качество разделения.
- При **изопикническом центрифугировании** пробу (например ДНК, РНК или вирусы) равномерно распределяют во всем объеме раствора (обычно CsCl). В этом случае разделение продолжается значительно дольше, чем при зональном центрифугировании. Градиент плотности создается в процессе центрифугирования за счет седиментации и диффузии. Со временем каждая частица попадает в область, соответствующую ее собственной плавучей плотности. Центрифугирование прекращают, когда устанавливается равновесие. Полученные фракции анализируют, используя подходящую измерительную технику.



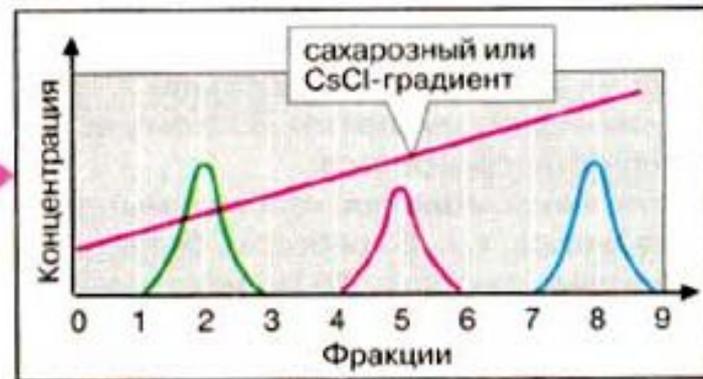
Зональное центрифугирование



Изопикническое центрифугирование



Фракционирование



Измерение

Б. Центрифугирование в градиенте плотности

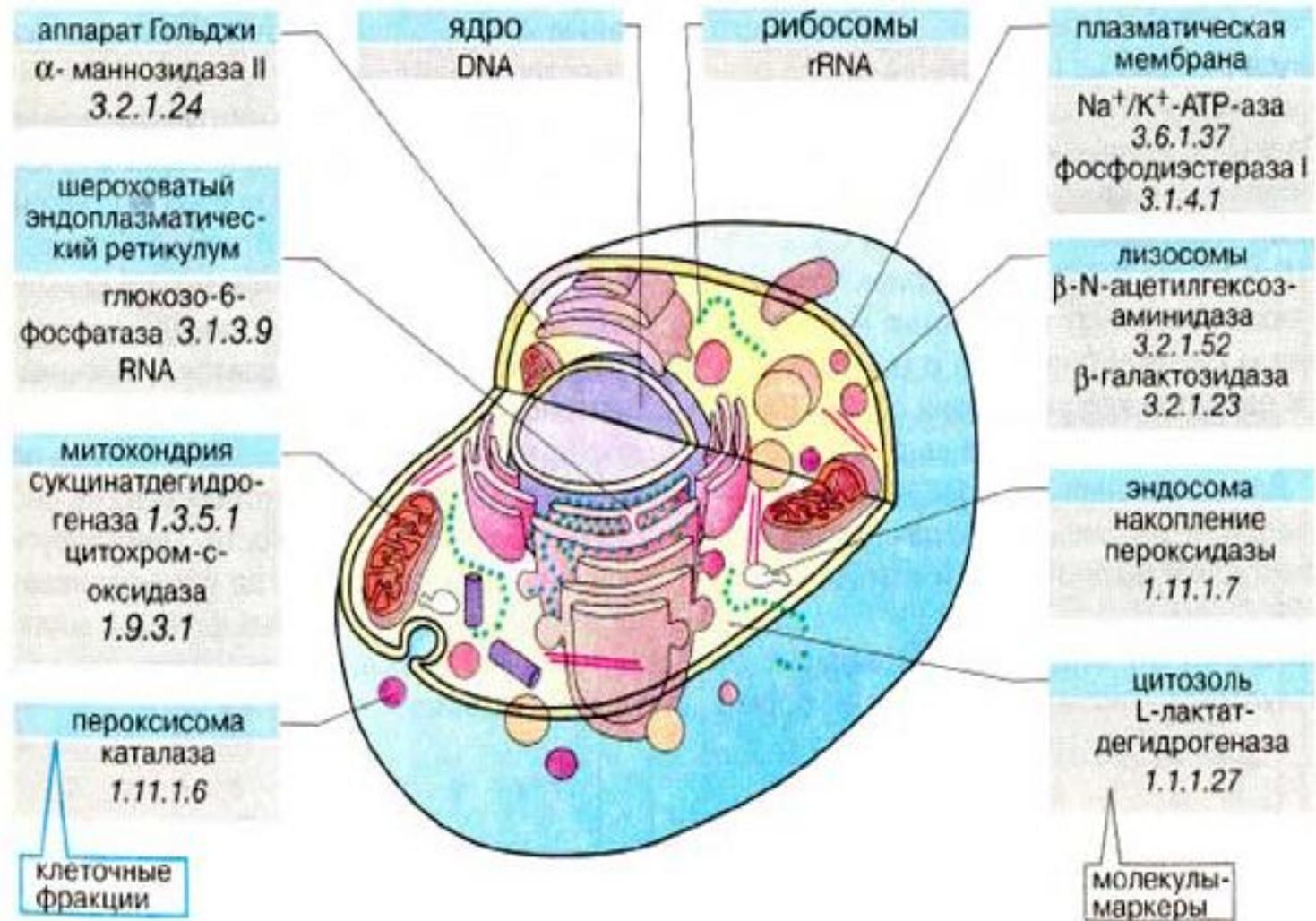
Молекулы-маркеры

В процессе фракционирования важно контролировать чистоту фракций.

Присутствие в определенной фракции той или иной органеллы и наличие других компонентов определяют с помощью **молекул-маркеров**. Обычно это органеллоспецифичные

ферменты (**ферменты-маркеры**).

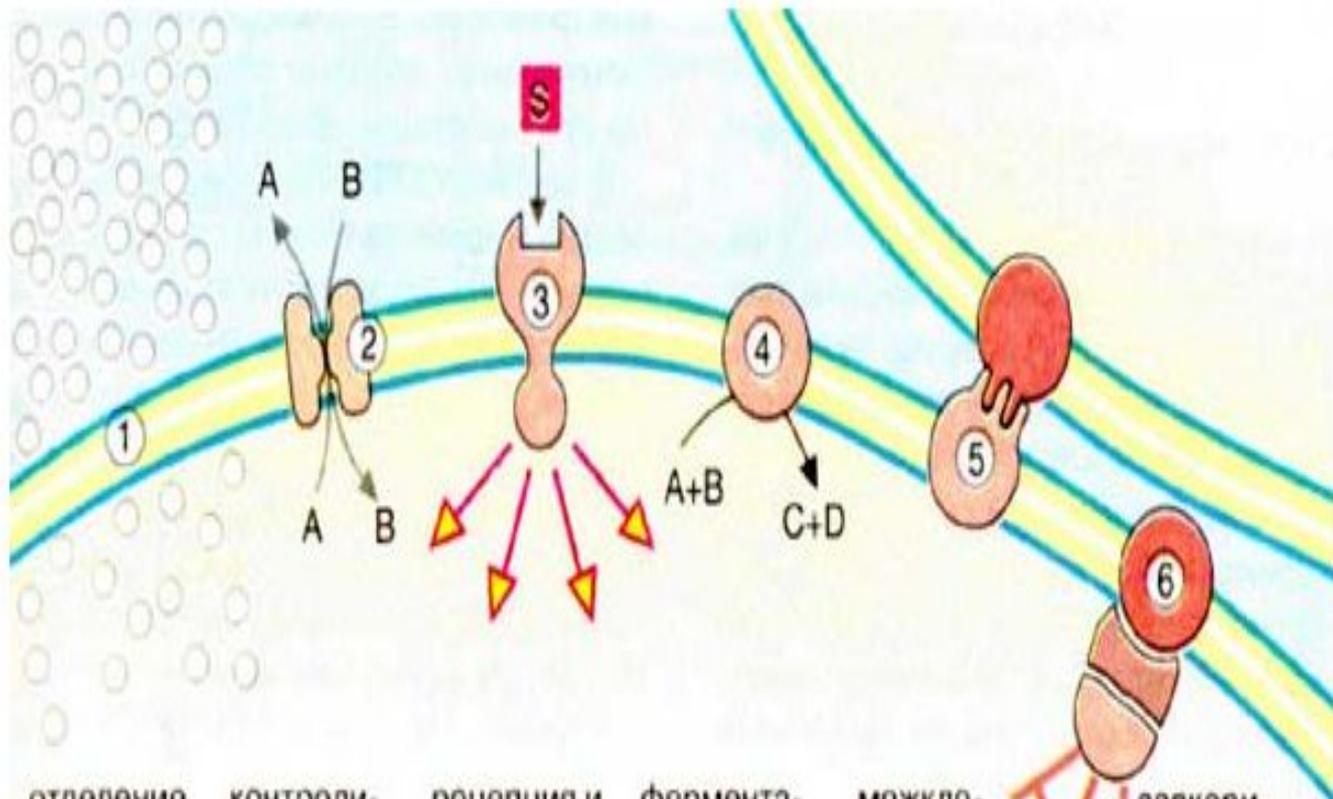
Распределение ферментов-маркеров в клетке отражает локализацию в ней соответствующих каталитических реакций.



Б. Молекулы-маркеры

Функции и состав биомембран

- Наиболее важными мембранами в животных клетках являются плазматическая мембрана, внутренняя и внешняя ядерные мембраны, мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, внутренние и внешние митохондриальные мембраны. Лизосомы, пероксисомы, различные везикулы также отделены от цитоплазматическими мембранами. Клетки растений содержат дополнительно мембраны хлоропластов, лейкопластов и вакуолей. Все мембраны полярны, т.е. существует различие в составах внутреннего и внешнего по



отделение
клетки от
внешней
среды

контроли-
руемый
транспорт

рецепция и
передача
сигналов

фермента-
тивная
реакция

межкле-
точные
контакты

заякори-
вание
цитоскелета

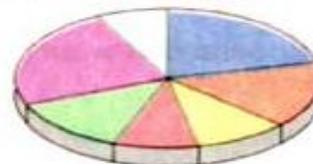
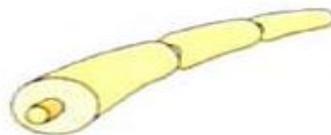
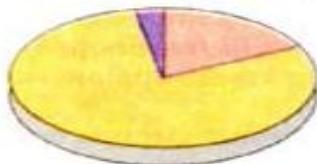
А. Функции мембран

Биомембраны и их составляющие выполняют следующие функции:

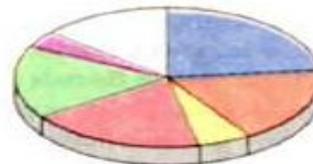
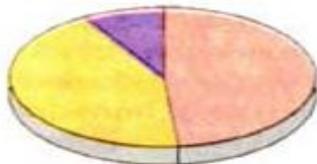
1. Ограничение и обособление клеток и органелл. Обособление клеток от межклеточной среды обеспечивается плазматической мембраной, защищающей клетки от механического и химического воздействий. Плазматическая мембрана обеспечивает также сохранение разности концентраций метаболитов и неорганических ионов между внутриклеточной и внешней средой.
2. Контролируемый транспорт метаболитов и ионов определяет внутреннюю среду, что существенно для гомеостаза, т.е. поддержания постоянной концентрации метаболитов и неорганических ионов, и других физиологических параметров. Регулируемый и избирательный транспорт метаболитов и неорганических ионов через поры и посредством переносчиков становится возможным благодаря обособлению клеток и органелл с помощью мембранных систем.
3. Восприятие внеклеточных сигналов и их передача внутрь клетки, а также инициация сигналов.
4. Ферментативный катализ. В мембранах на границе между липидной и водной фазами локализованы ферменты. Именно здесь происходят реакции с неполярными субстратами. Примерами служат биосинтез липидов и метаболизм неполярных ксенобиотиков. В мембранах локализованы наиболее важные реакции энергетического обмена, такие, как окислительное фосфорилирование (дыхательная цепь) и фотосинтез.
5. Контактное взаимодействие с межклеточным матриксом и взаимодействие с другими клетками при слиянии клетки образовании тканей.
6. Заякоривание цитоскелета, обеспечивающее поддержание формы клеток и органелл и клеточной подвижности.

компоненты мембран

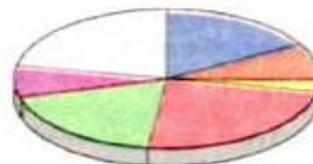
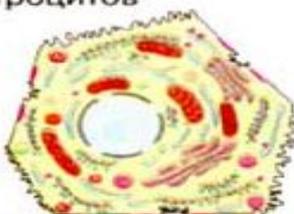
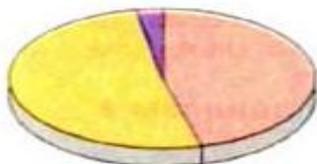
соотношение различных липидов



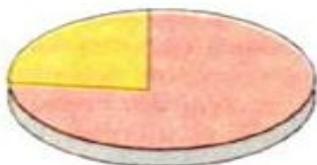
плазматическая мембрана
нервной клетки



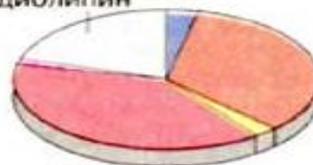
плазматическая мембрана
эритроцитов



плазматическая мембрана
гепатоцитов



кардиолипин



митохондрия

обе мембраны
(внешняя + внутренняя)

- липиды
- углеводы
- белки

фосфолипиды

- Фосфатидил-холин
- Фосфатидил-серин
- Фосфатидил-этаноламин
- сфингомиелин
- гликолипиды
- холестерин
- прочие липиды

Б. Состав мембран

После гомогенизации образца, центрифугирования гомогената с разной скоростью получают отдельные фракции, содержащие клеточные ядра, митохондрии и другие органеллы, а также надосадочную жидкость, в которой находятся растворимые белки цитозоля клетки.

Экстракция белков, связанных с мембранами, и разрушение олигомерных белков на протомеры

Если искомый белок прочно связан с какими-либо структурами клетки, его необходимо перевести в раствор.

Для разрушения гидрофобных взаимодействий между белками и липидами мембран в раствор добавляют детергенты: Чаще всего используют тритон X-100 или додецилсульфат натрия.

При действии детергентов обычно разрушаются и гидрофобные взаимодействия между протомерами в олигомерных белках

Удаление из раствора небелковых веществ

Нуклеиновые кислоты, липиды и Другие небелковые вещества можно удалить из раствора, используя их особенные физико-химические свойства. Так, липиды легко удаляются из раствора добавлением органических растворителей, например ацетона. Однако воздействие должно быть кратковременным. так как ацетон вызывает денатурацию некоторых белков. Нуклеиновые кислоты осаждают добавлением в раствор стрептомицина.

Выделение липидов мембран осуществляют сразу после получения мембранной фракции, которую необходимо защищать от действия протео- и липолитических ферментов, автоокисления.

Обычно все процедуры проводят при низкой температуре, поддерживая определенные значения pH и ионной силы. Для экстракции липидов используют смесь хлороформ—метанол. Для одновременной экстракции белков и липидов из теней эритроцитов их экстрагируют смесью бутанол—вода. При этом большая часть белков переходит в водный, а липида в бутанольный слой.

Количественный анализ сложных смесей фосфолипидов проводят хроматографическими методами. Для препаративных целей в основном используют хроматографию на колонках. Для микроаналитических исследований успешно применяют тонкослойную хроматографию, с помощью которой можно разделить практически все классы липидов, локализовать и идентифицировать их при использовании специальных реактивов.

По элюирующей способности растворители располагаются в следующем возрастающем порядке петролейный эфир, цикло-гексан, четыреххлористый углерод, толуол, бензол, хлороформ, диэтиловый эфир, этилацетат, ацетон, н-пропанол, этанол, метанол, вода. После пропускания растворителей пластинку высушивают на воздухе и идентифицируют липиды с помощью окрашивания специфическими реагентами. Для количественного определения фосфолипидов, разделенных тонкослойной хроматографией, используют спектрофотометрические методы.

- Исследования мембран в значительной мере базируются на двух основных методических приемах: это разборка нативной (то есть природной) мембраны на составляющие ее элементы и последующая полная или частичная сборка искусственной мембраны с использованием всех или части компонентов исходной мембраны. Применительно к мембранам эти приемы получили название "солюбилизация" и "реконструкция».

- Для солюбилизации лучше использовать детергенты с низкой ККМ, так как такие детергенты легче встраиваются в мембрану и быстрее вызывают ее распад до смешанных мицелл. В этом качестве наиболее эффективны ионные детергенты.
- В качестве параметров, характеризующих способность детергентов к мицеллообразованию, обычно используют критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) и число агрегации. ККМ – это та концентрация, при которой детергент начинает образовывать мицеллы. До этого он находится в воде в мономерной форме в состоянии истинного раствора. Число агрегации показывает, сколько молекул детергента приходится на одну мицеллу.

Чаще всего используются четыре основных способа удаления детергента: диализ, гель-фильтрация, сильное разбавление солюбилизата и адсорбция детергента на гидрофобных полимерах. Более быстрый способ основан на удалении детергента с помощью гель-фильтрации, когда солюбилизат пропускают через инертный гель, размер пор которого достаточно велик, чтобы удержать молекулы детергента, но мал по сравнению с образующимися мембранными частицами, которые свободно проходят между гранулами геля.

С максимальной полнотой детергент может быть удален из мембраны путем его адсорбции на гидрофобных полимерах. Этот способ особенно хорош для удаления остаточных количеств детергента из уже сформировавшихся мембранных частиц. Однако для удаления детергента из исходного солюбилизата он малопригоден, так как на начальных стадиях реконструкции удаление детергента может сопровождаться адсорбцией значительных количеств белка и липида на полимере. Поэтому обычно этот метод используют в комбинации с другими способами на конечной стадии улавливания детергента.