



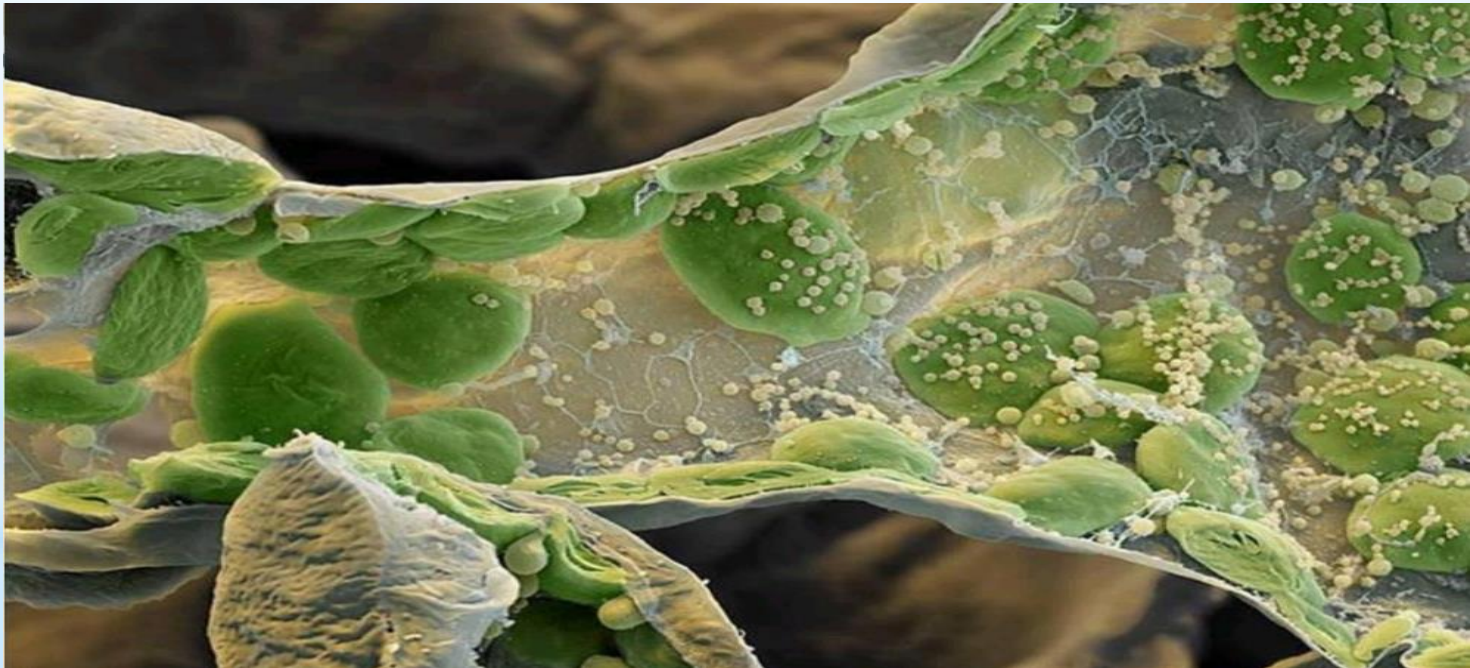
University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

آشنایی با روشها و تکنیکهای جداسازی و جزیبه جز کردن
یاخته ها و اجزا درون یاخته ای

اهداف

✓ استخراج، جداسازی و خالص سازی کلروپلاست از سلول گیاهی
به روش سانتریفیوژ افتراقی
(Differential centrifugation) ✓



دیگراهداف مورد بررسی در این آزمایش عبارتند از:

- ✓ تهیه بافر استخراج مناسب جهت استخراج کلروپلاست
- ✓ آشنایی با روش هموژناسیون مکانیکی یا فیزیکی
- ✓ استفاده از تکنیک سانتریفوژ افتراقی جهت جداسازی اندامک‌های درون سلولی
- ✓ تهیه لام خالص و سالم از کلروپلاست‌های ایزوله شده
- ✓ بررسی غیر مستقیم وجود اندامک پروکسی زوم
- ✓ بررسی فعالیت آنزیم‌های اکسید کننده این اندامک

پس از بدست آمدن اهداف فوق، در ادامه می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مناسب، DNA یا رنگیزه یا آنزیم‌های کلروپلاست را از گیاهان استخراج نمود و با دستکاری ژنتیکی، با استفاده از علوم مهندسی ژنتیک به تولید گیاهان با تأثیرات دارویی بهینه، مبادرت نمود.

مقدمه

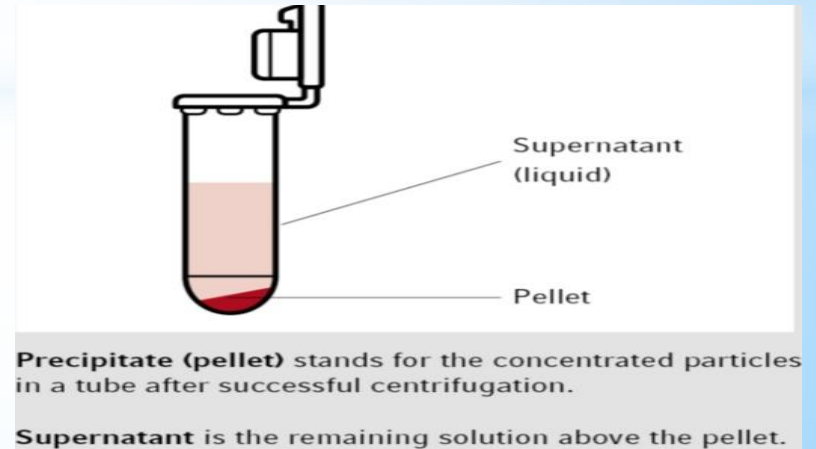
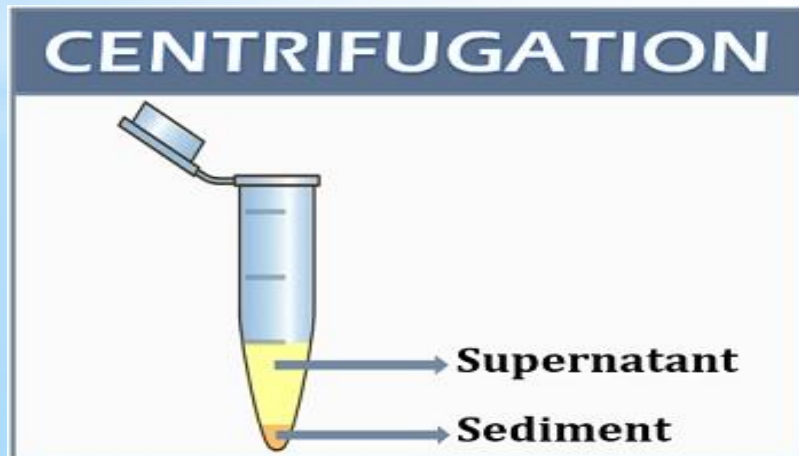
در اکثر گیاهان به خاطر داشتن ارزش دارویی بالا و وجود ترکیبات انتی اکسیدانسی و خاصیت ضد سرطانی، استخراج اندامک‌ها از جمله کلروپلاست از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

از طرف دیگر امروزه یکی از روش‌های دستکاری ژنتیکی سلول‌های گیاهی، انتقال ژن مورد نظر به کلروپلاست گیاه است. از آنجا که کلروپلاست مکان و اندامک مهمی برای متابولیسم مواد می‌باشد، اولین گام در تحقق هدف فوق، استخراج و خالص‌سازی کلروپلاست و سپس دسترسی به ژنوم کلروپلاست می‌باشد، تا بتوان از آن به عنوان مرجع تغییرات بیوشیمیایی مورد انتظار استفاده نمود.

در این آزمایش، جداسازی و خالص‌سازی کلروپلاست، با مناسب‌ترین روش انجام می‌شود بطوریکه نتایج نشان دادند کمیت و کیفیت کلروپلاست استخراج شده در سطح مطلوبی قرار دارد همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز نشان داده که میزان DNA استخراج شده از کلروپلاست‌ها نیز از سطح مطلوبی برخوردار است.

در روش‌های جزء به جزء کردن یاخته‌ها، برای استخراج و جداسازی اندامک‌های درون سلولی بایستی از بافر استخراج (Buffer Extract) مناسب استفاده کرد. در این آزمایش سوسپانسیون حاصل از هموژن کردن بافت، در بافر استخراج حاوی غلظت معینی از سوکروز با سرعت‌های مختلف، مرحله به مرحله سانتریفوژ شده تا اندامک‌های یاخته‌ای بر اساس تفاوت در شکل، اندازه و وزن از هم جدا شوند. در پایان هر مرحله از سانتریفوژ رسوب در ته لوله و سوپرناتانت در قسمت رویی قرار می‌گیرد.

کم‌کم در مراحل بعد سرعت سانتریفوژ کردن افزایش می‌یابد تا خالص سازی نهایی صورت گیرد. در سرعت پایین و زمان کم، کمترین نیرو به عصاره سلولی وارد و بزرگترین و سنگین‌ترین اجزاء سلولی ته‌نشین می‌شوند و اجسام سبکتر در قسمت رویی قرار می‌گیرند. با سانتریفوژ مجدد قسمت رویی یا سوپرناتانت در میدان قوی‌تر به ترتیب اجزاء بیشتری از هم جدا می‌شوند. بنابراین مرحله به مرحله جداسازی انجام می‌شود.



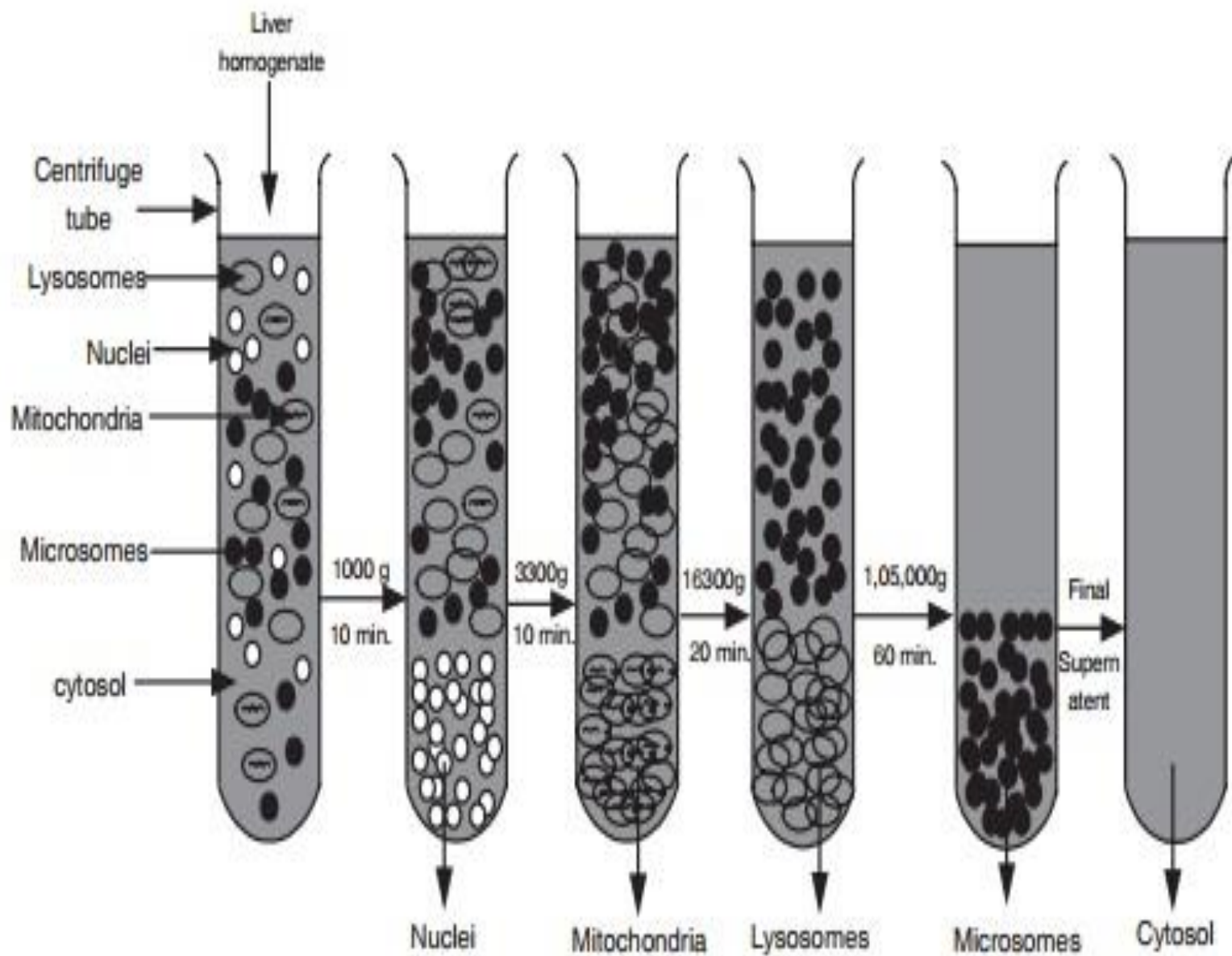


Fig. Differential sedimentation of subcellular organelles

کلروپلاست

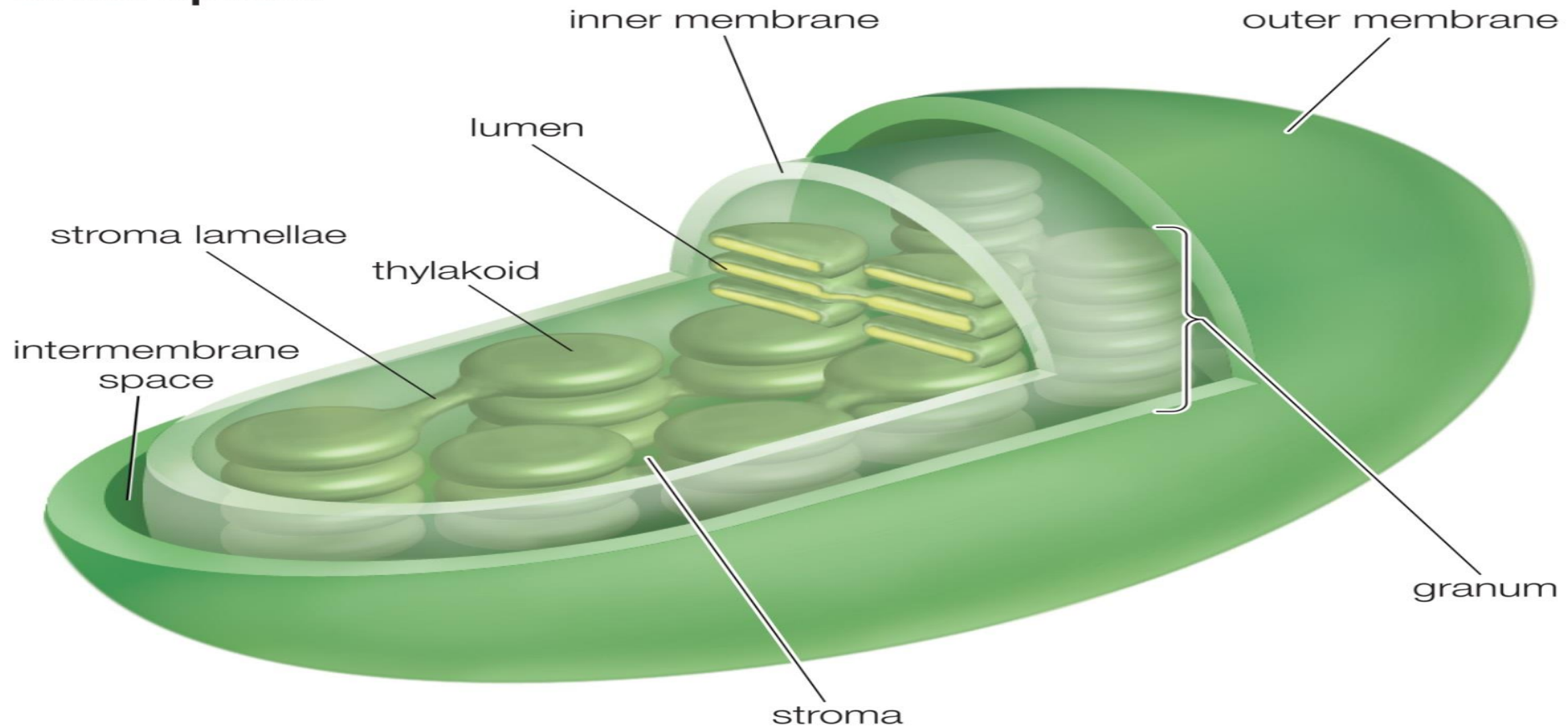
این اندامک در سلول از نظر تعداد و اندازه بسته به شرایط ژنتیک سلول و مرحله رشد و بلوغ آنها متفاوتند. طول آنها از 2 تا 30 میکرون و عرض آنها از 1 تا 3 میکرون و ضخامتی بین 1 تا 2 میکرون دارند قسمت های مختلف کلروپلاست شامل موارد زیر است: غشای خارجی: این غشا به عنوان لایه بیرونی کلروپلاست ها محسوب می شود و از جنس غشا سلولی است که فضای درونی کلروپلاست را از سیتوپلاسم سلول جدا می کند. غشای درونی: این غشا نیز مشابه غشای خارجی است و فضای درون غشای داخلی کلروپلاست را از فضای بین دو غشا جدا می کند.

فضای بین دو غشا: بین دو غشای خارجی و درونی کلروپلاست فضایی وجود دارد که مایعی آن را پر کرده است. این مایع از آب و ترکیبات آلی و نمک های کانی و یون های آنها تشکیل می شود، به این ناحیه، فضای بین غشایی می گویند.

فضای درون غشای داخلی: در قسمت درونی کلروپلاست، غشایی داخلی وجود دارد. این غشا با حضور دیسک های کیسه مانند به نام «تیلاکوئیدها» **Thylacoid** دسته بندی شده اند. تیلاکوئیدها محل انجام واکنش های مرحله نوری فتوسنتز هستند و به شکل دیسک های به هم پیوسته ای به نام «گرانوم» **Granum** قرار گرفته اند که به مجموع آنها گрана **Grana** می گویند و توسط بخش هایی از جنس غشا به نام «لاملاهای استرومایی» **Stromal Lamella** با یک دیگر در ارتباط هستند. درون فضای تیلاکوئیدها «لومن» **Lumen** وجود دارد.

بین تیلکوئیدها و غشای داخلی کلروپلاست از مایعی به نام «استروما» Stroma پر شده است. استروما شامل آنزیم‌های مرحله تاریکی فتوسنتز و آنزیم‌های لازم جهت بیوسنتز پروتئینها، گرانول‌های نشاسته‌ای ریبوزوم‌های آزاد پلی زوم‌ها و نسخه‌هایی از ژنوم کلروپلاست است.

Chloroplast



کلروپلاست در سلول سالم





مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1. بافر استخراج (سوکروز در بافر فسفات)
2. برگ‌های تازه اسفناج
3. لوله آزمایش
4. لوله سانتریفوژ
5. سانتریفوژ یخچال‌دار
6. لام و لامل
7. میکرو پی پت
8. میکروسکوپ نوری
9. سرنگ یا پی پت
10. پارچه صافی
11. بشر
12. ترازو

طرز تهیه بافر فسفات

دی هیدروژن سدیم فسفات	NaH_2PO_4	0/7 گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na_2HPO_4	0/3 گرم
آب مقطر	H_2O	100 میلی لیتر

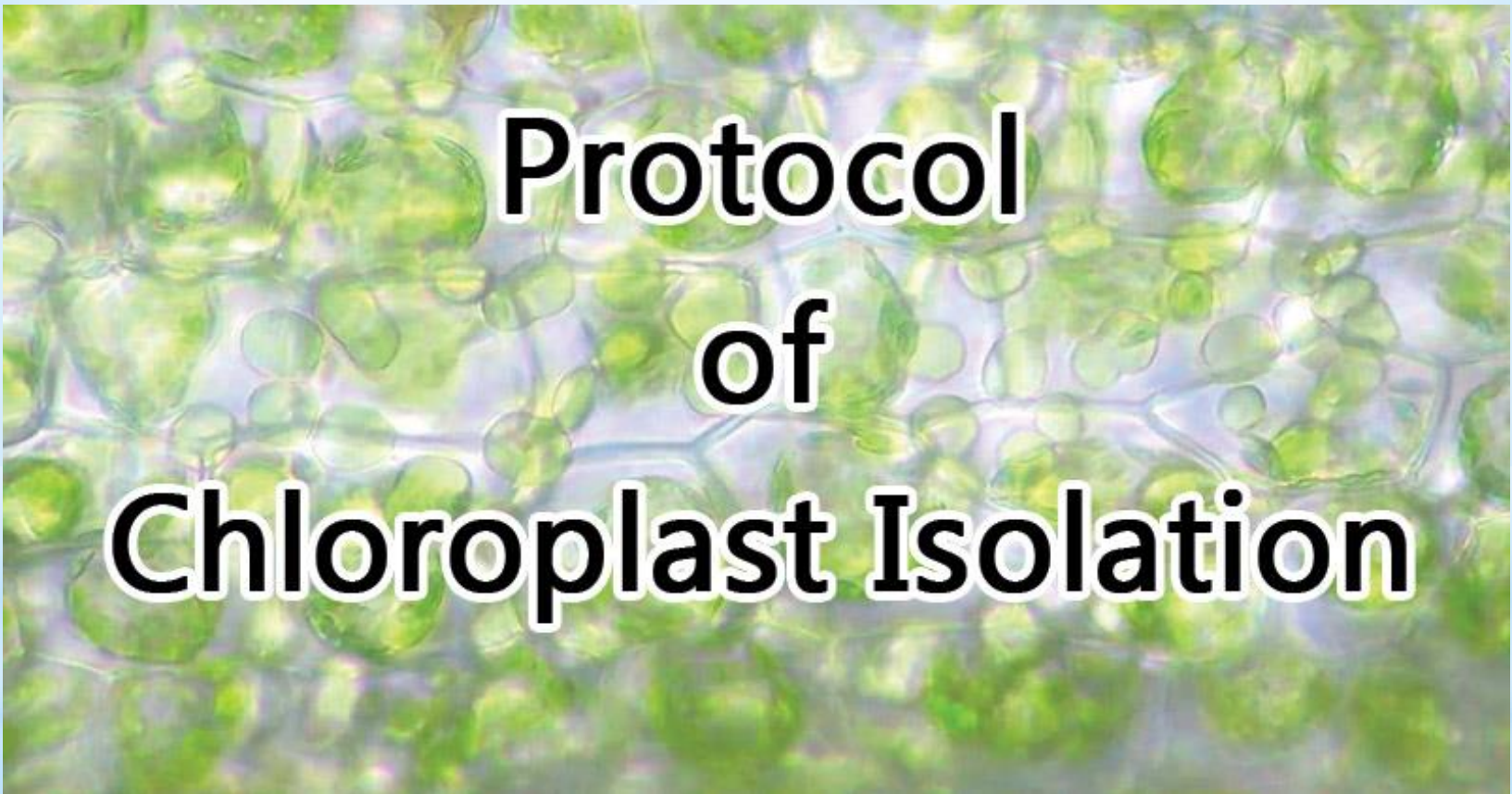
موارد فوق را به نسبت ذکر شده مخلوط کرده و PH را به کمک دستگاه PH متر به 6.5 برسانید. محلول فوق را در ظرفی در بسته در یخچال نگهداری و هنگام مصرف با آب مقطر 6 بار رقیق کنید.

طرز تهیه سوکروز 0/4 مولار

سوکروز	0/4 مولکول گرم	گرم $342 \times 0/4 = 136/8$
آب مقطر	1000 میلی لیتر	

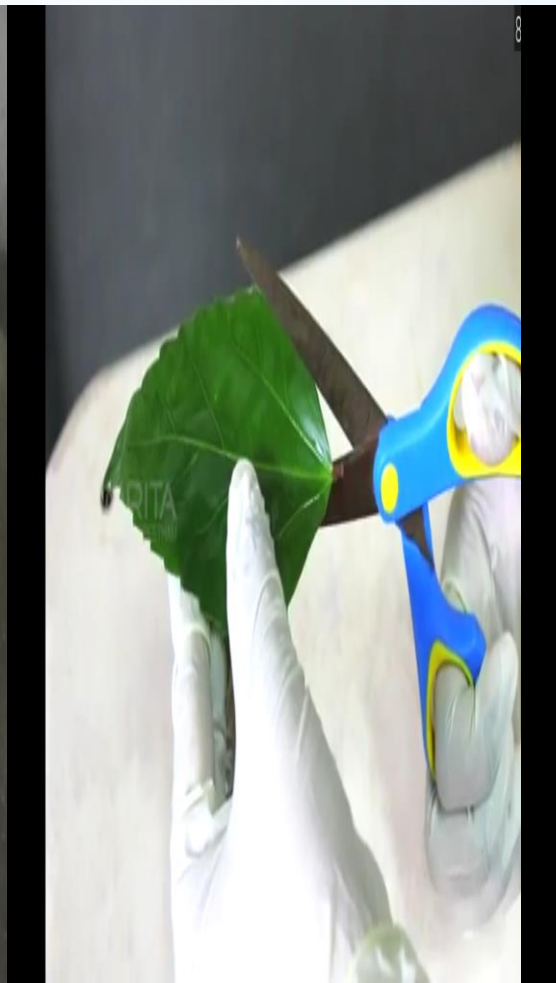
جهت تهیه محلول بافری سوکروز به جای آب مقطر، سوکروز را با بافر فسفات به حجم دلخواه می‌رسانیم.

روش کار

A microscopic image of plant cells, likely from a leaf, showing numerous green, oval-shaped chloroplasts within the cells. The text "Protocol of Chloroplast Isolation" is overlaid in a large, bold, black font with a white outline.

Protocol of Chloroplast Isolation

1. در ابتدا برگ های تازه ی اسفناج را با آب شسته و داخل کیسه فریزر به مدت چند ساعت قبل از آزمایش در یخچال قرار دهید و بقیه مراحل جداسازی را در برودت و در دمای 4- درجه سانتیگراد انجام دهید تا ساختار کلروپلاست به طور کامل حفظ و فعالیت آنزیم ها حداقل شود.
2. رگبرگ های میانی و دمبرگ ها را جدا کرده و برگ ها را وزن کنید.



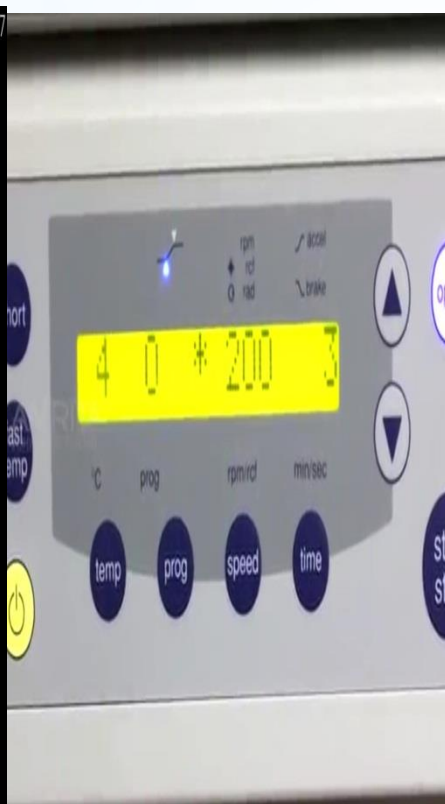
3. به ازاء هر گرم وزن برگ 4 میلی لیتر از محلول بافری (بافر فسفات با $\text{PH}=4$) مولار سوکروز بیفزاید و مخلوط برگ ها و محلول بافری را در هاون چینی خنک بسایید به طوریکه سوسپانسیون نسبتاً هموژنی به دست آید.

4. سوسپانسیون سبز رنگ به دست آمده را از بین پارچه ی صافی چندلایه عبور دهید و بخش ردشده از صافی را به مدت 4-5 دقیقه در 1000 rpm یا 200g سانتریفوژ کنید تا یاخته های شکسته شده، هسته ها و زوائد دیگر برگ رسوب کنند.



5. محلول رویی حاصل از مرحله قبل را جدا کرده و به مدت 10 دقیقه در 3000 rpm یا 1100g سانتریفوژ کنید تا کلروپلاست‌ها ته نشین شوند.

6. در مدت انجام سانتریفوژ فوق یک قطره از رسوب مرحله قبل (مرحله 4) را توسط پاستورپی پت بر روی لام گذاشته، لامل گذاری کنید و در بزرگنمایی 40 مشاهده نمایید. کلیه مواردی را که در میدان دید مشاهده می‌کنید، از قبیل: آوندهای چوبی نوع اول، مارپیچی و حلقوی، آوند آبکش، کرک‌های تک سلولی ساده و غده‌ای، کریستال‌های گیاهی، داربست یا دیواره سلولی پاره شده، سلول‌های نردبانی و اسفنجی پارانشیمی و سلول‌های روزنه و غیره را شناسایی و شکل آن‌ها را در یک میدان دید میکروسکوپ رسم کنید.



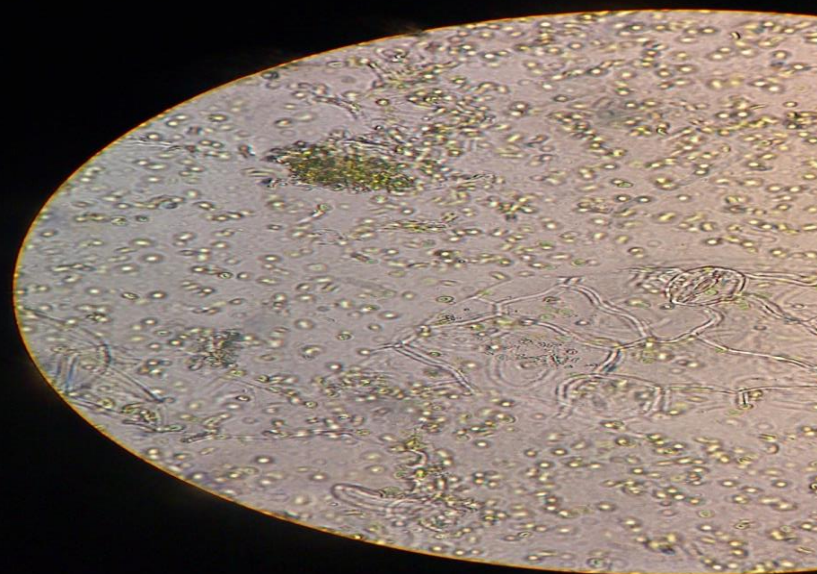
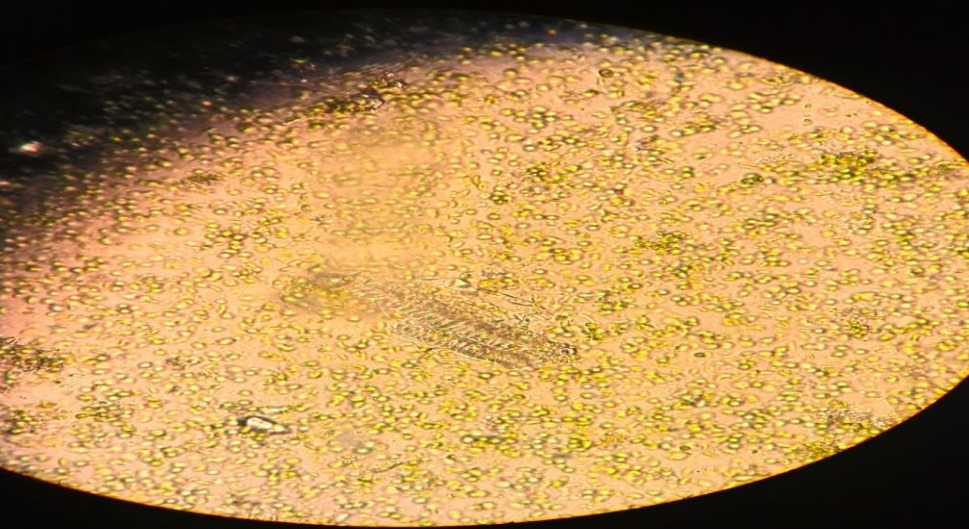
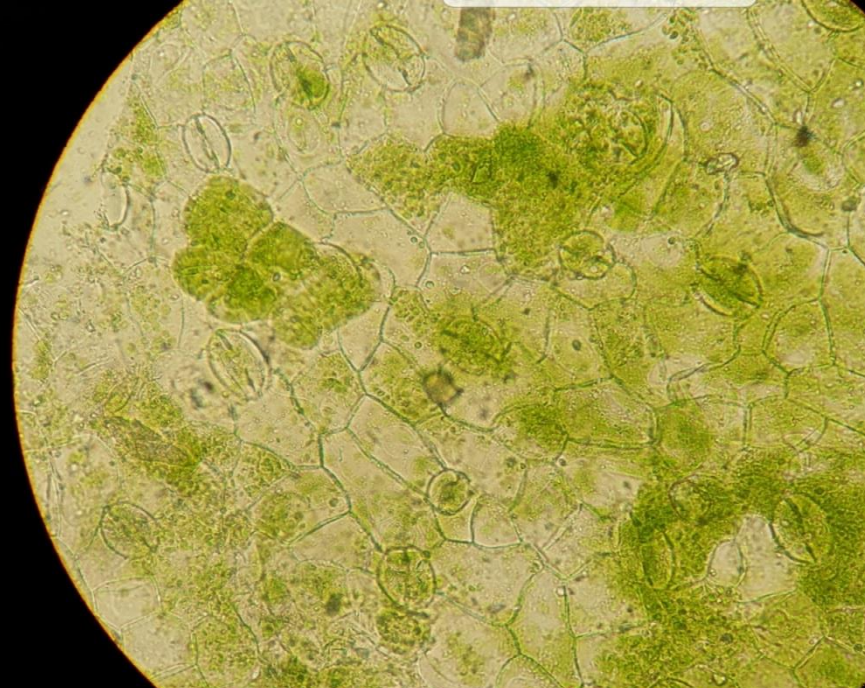
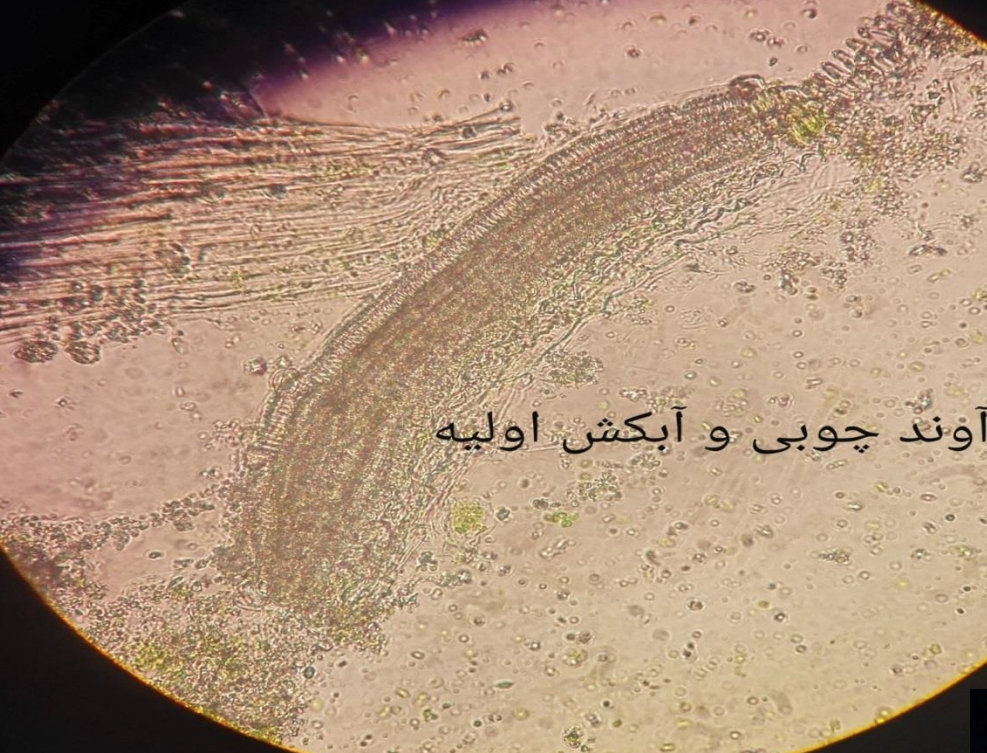


کریستال Drus

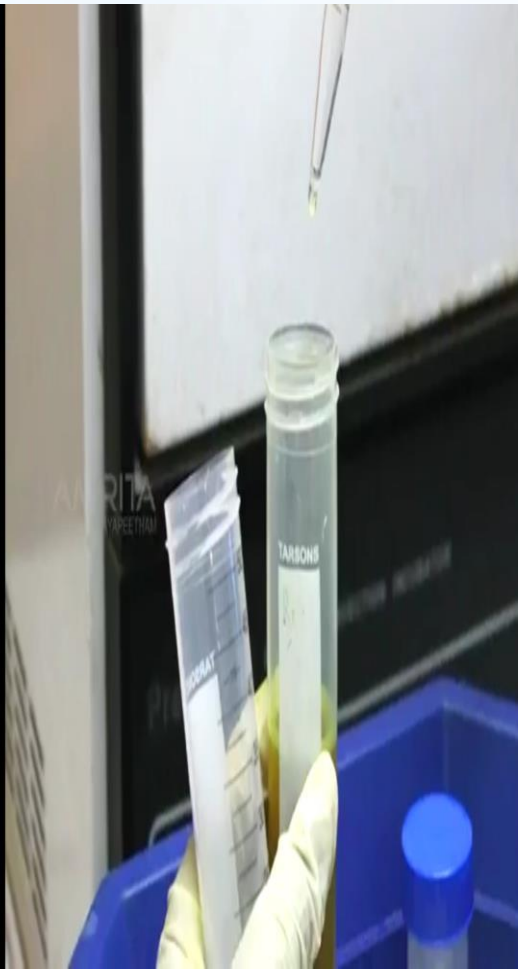


کرک غده ای چند سلولی

مشاهدات سلولی رسوب حاصل از مرحله



7. پس از پایان سانتریفوژ مرحله 5 محلول رویی را در لوله‌ای تمیز ریخته و جهت بررسی وجود یا عدم وجود پروکسی زوم ها نگه دارید و رسوب کلروپلاست را در محلول بافری تازه هموژن کنید. سپس در دور 3000 rpm مجدداً 10 دقیقه سانتریفوژ کنید. این عمل را در صورت لزوم تا خالص سازی کلروپلاست 2-3 بار تکرار کنید.



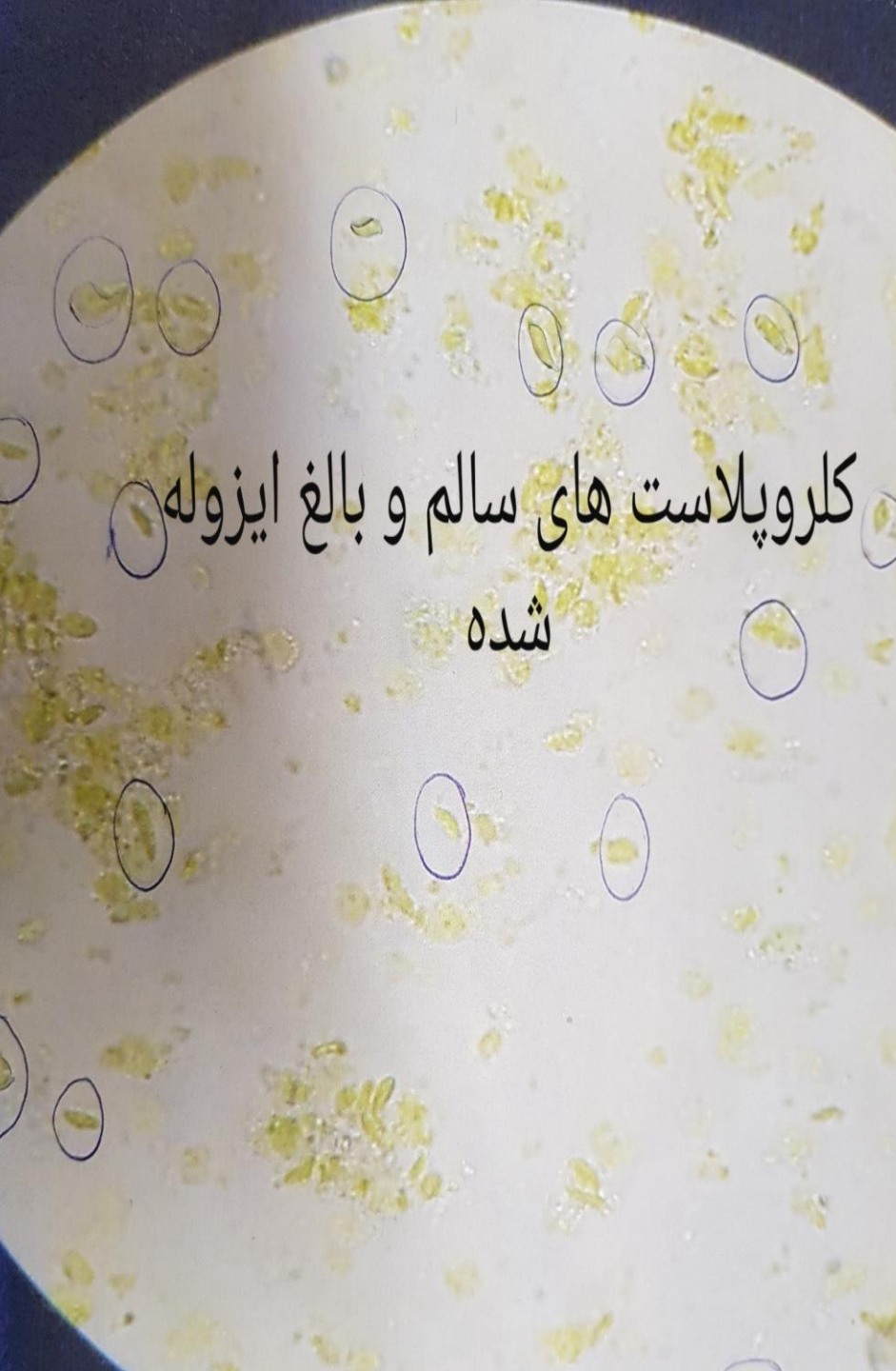
8. در مدت زمان انجام سانتریفیوژ فوق محلول رویی حاصل از مرحله 7 را که حاوی اندامک‌های سبک‌تر از کلروپلاست از جمله پروکسی‌زوم‌ها هستند، با افزودن چند قطره H_2O_2 (آب اکسیژنه) از جهت وجود یا عدم وجود پروکسی‌زوم‌ها چک کنید سپس مشاهدات خود را تفسیر و بررسی نمایید.

9. در آخرین مرحله آزمایش یک قطره از رسوب کلروپلاست را در محلول بافری تازه هموژن کنید و در زیر میکروسکوپ مشاهده نمایید.

سوال

آیا شکل عمومی همه کلروپلاست‌های استخراج شده یکسان است؟ چرا؟
در سلول گیاهی سالم موقعیت کلروپلاست نسبت به سایر اجزاء سلول چگونه است؟ چرا؟



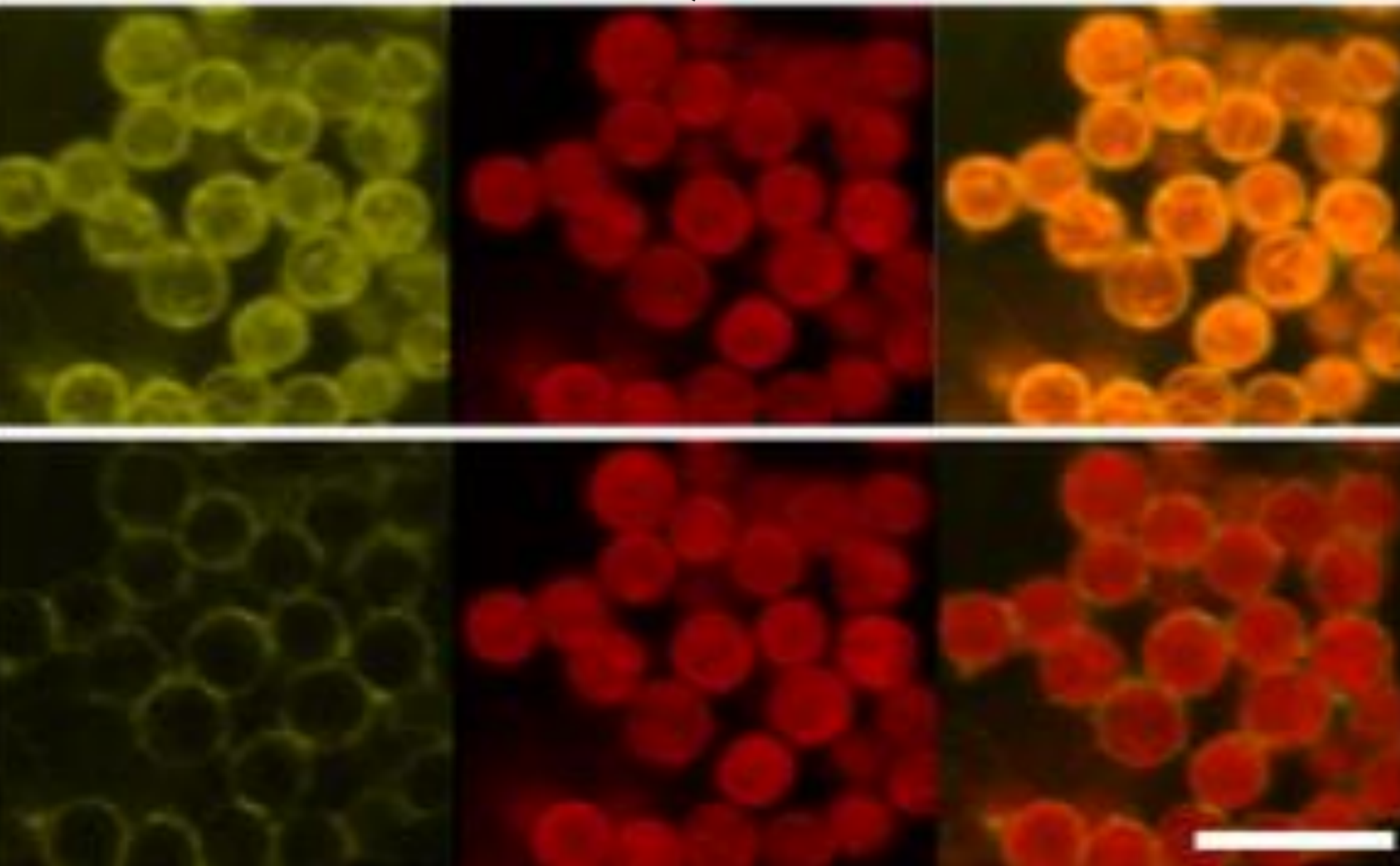


کلروپلاست های سالم و بالغ ایزوله
شده



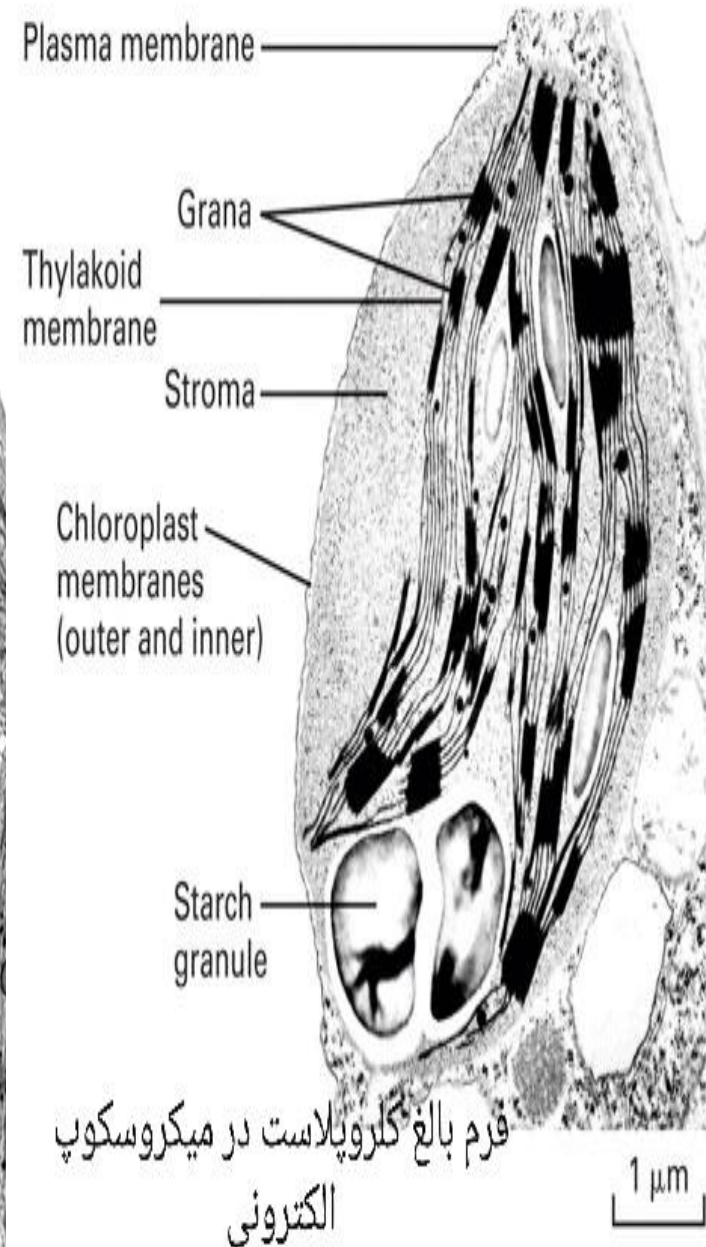
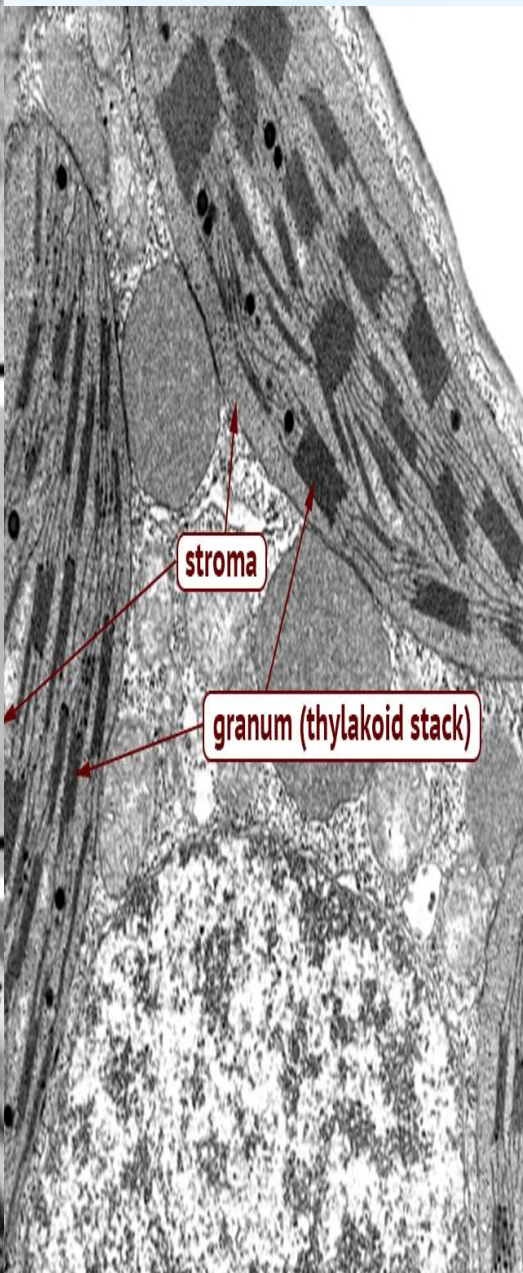
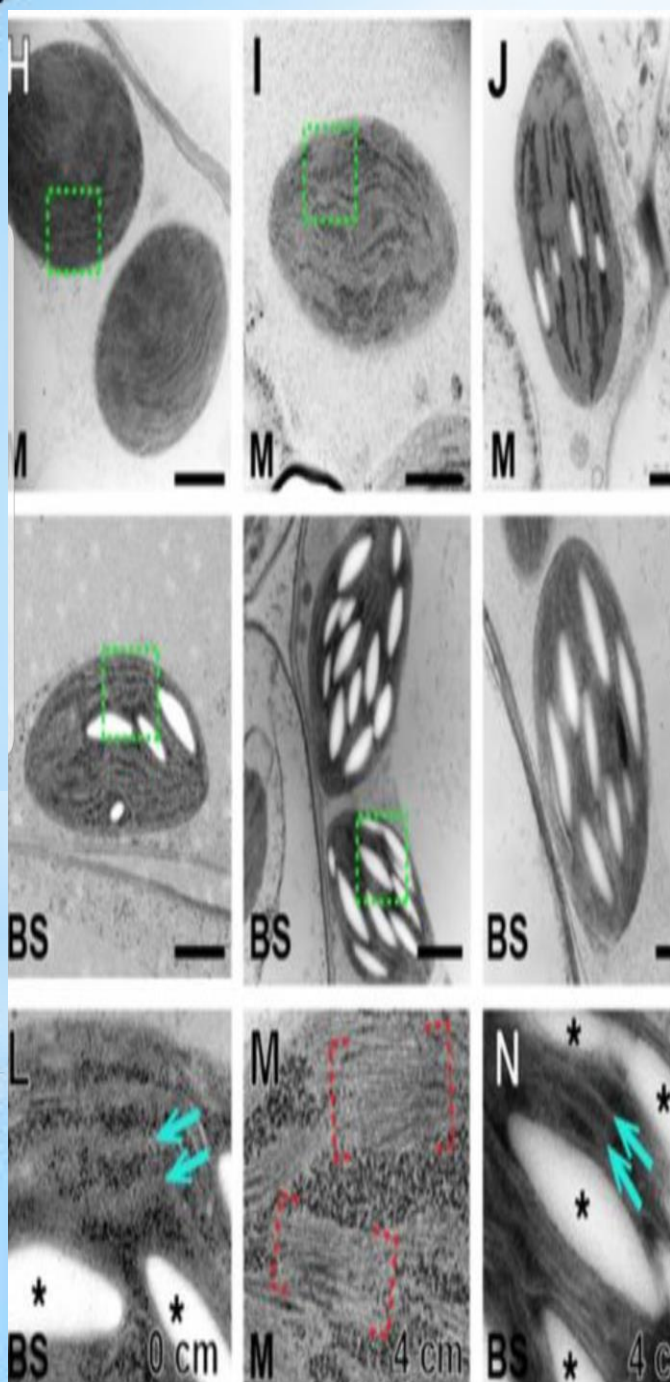
فرم بالغ کلروپلاست در میکروسکوپ
نوری

کلروپلاستهای رنگ شده توسط ردآمین مشاهده در میکروسکوپ فلورسنت

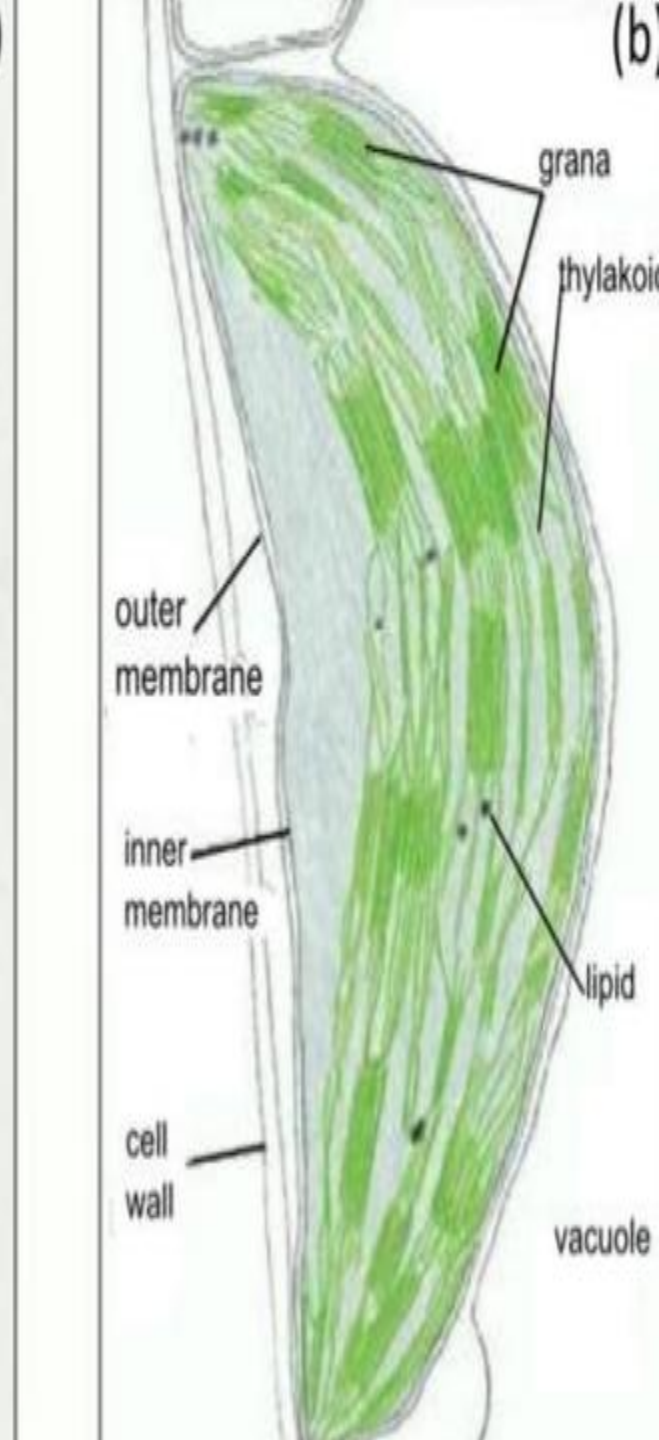
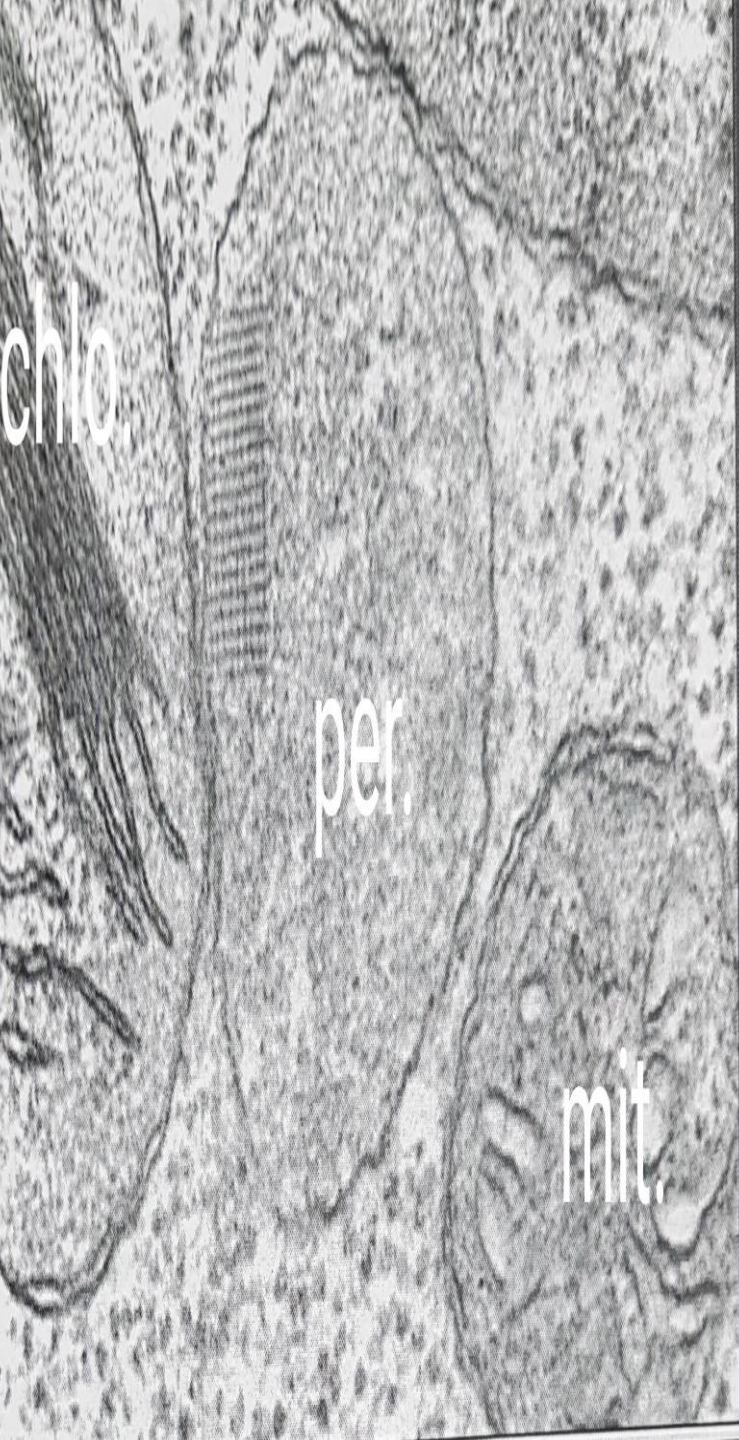


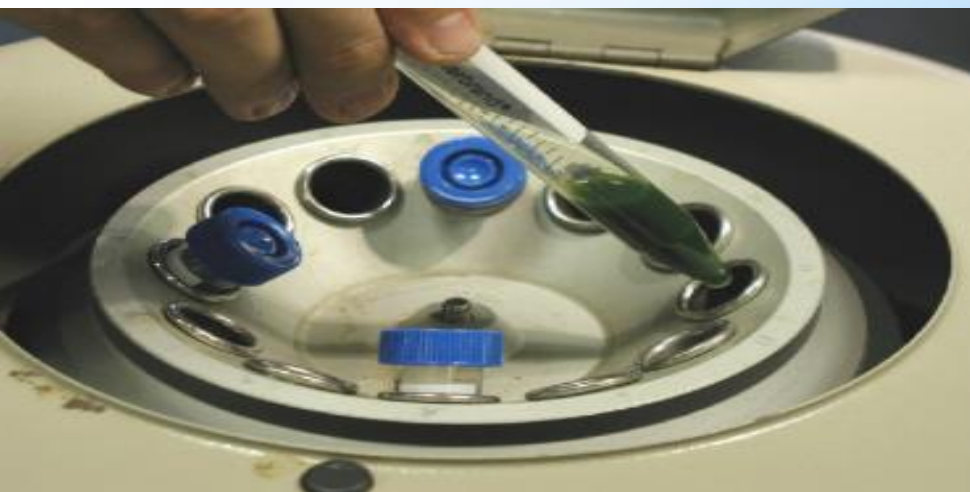
توجه: رنگ ردآمین معرف کلروپلاست است و آن‌ها را به رنگ قرمز در می‌آورد.
آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر

تصاویر کلروپلاست در میکروسکوپ الکترونی

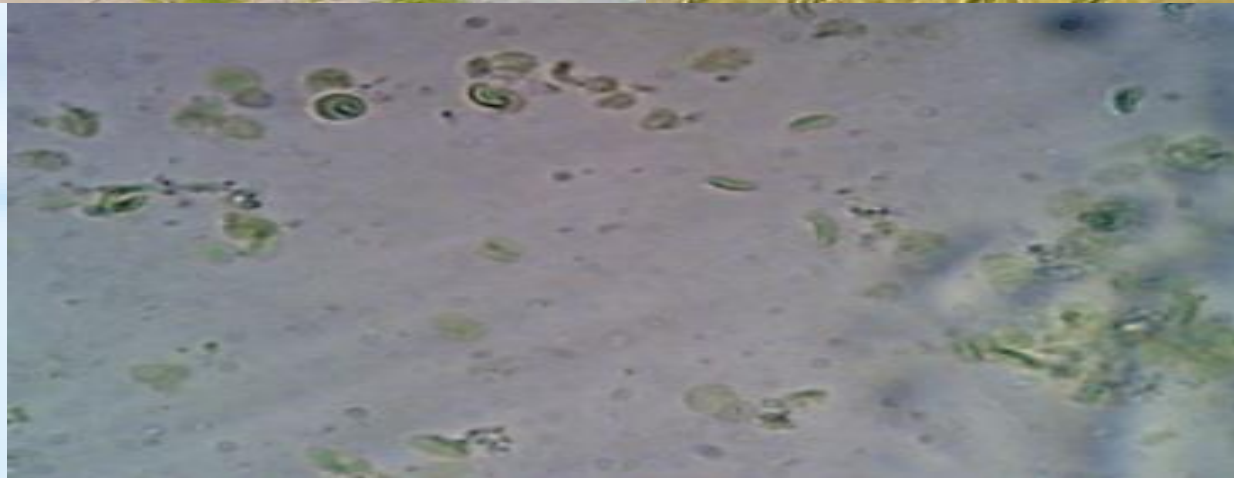
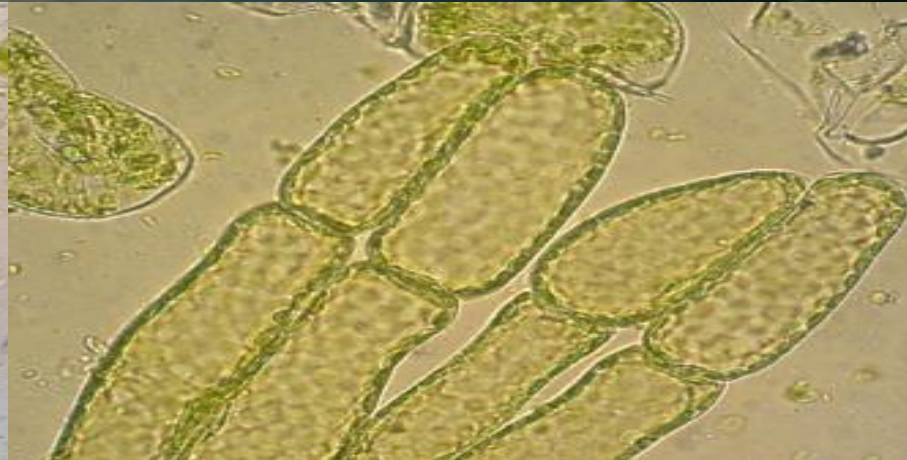
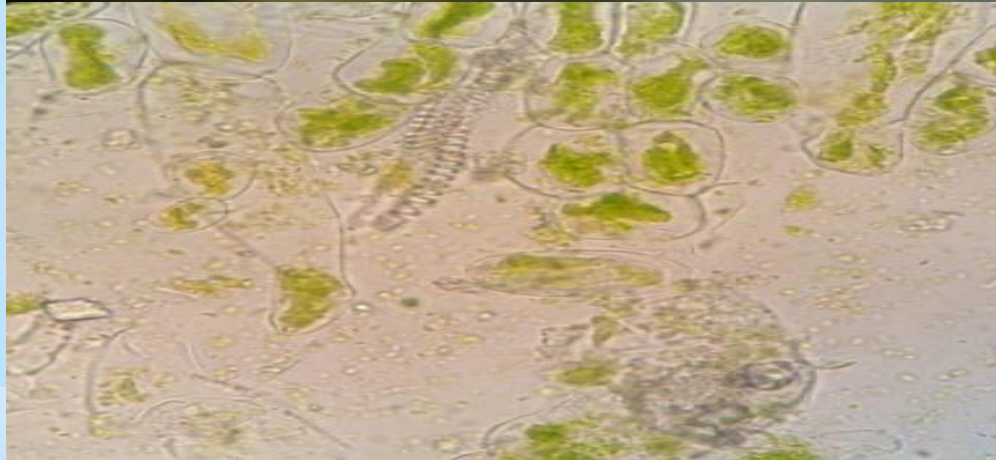


فرم بالغ کلروپلاست در میکروسکوپ الکترونی





مراحل استخراج اندامک کلروپلاست آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر



مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی
آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر

پروکسی زوم

✓ از جوانه زدن SER یا شبکه اندوپلاسمیک صاف به وجود می آیند.

✓ در سلول جانوری و گیاهی وجود دارند .

✓ دارای چند نوع آنزیم است و آنزیم های آن بخصوص کاتالاز توسط ریبوزوم های آزاد سیتوپلاسم ساخته می شوند.

✓ دارای تک غشاء هستند.

✓ قطر پراکسی زوم ها معمولا 0/1-0/2 و گاهی به ندرت به 1-0/5 میکرومتر می رسد. پروکسی زوم ها برای حیات و ادامه آن در سلول ضروری اند.

✓ بیمارانی که با پروکسی زوم های دارای نقص ژنتیکی به دنیا می آیند اغلب طول عمر کوتاهتری نسبت به سایر افراد دارند و دچار سندروم زلوگر Zellweger می باشند.

✓ در گیاهان نیز در انواع زراعی که دانه های روغنی آنها پروکسی زوم های آسیب دیده دارند توانایی جوانه زدن کمتری دارند و در فتوسنتز غیر فعال ترند.

✓ به دلیل کوچکی و شکنندگی غشاء در مقایسه با هسته ، میتوکندری و کلروپلاست تحقیقات کمتری در رابطه با آنها صورت گرفته است.

✓ تمامی سلول های یوکاریوت دارای پروکسی زوم بوده و برای ادامه حیات به این اندامک نیاز دارند.

✓ این اندامک در متابولیسم لیپید ها و در تنفس نوری گیاهان نقش بسیار مهمی دارد.

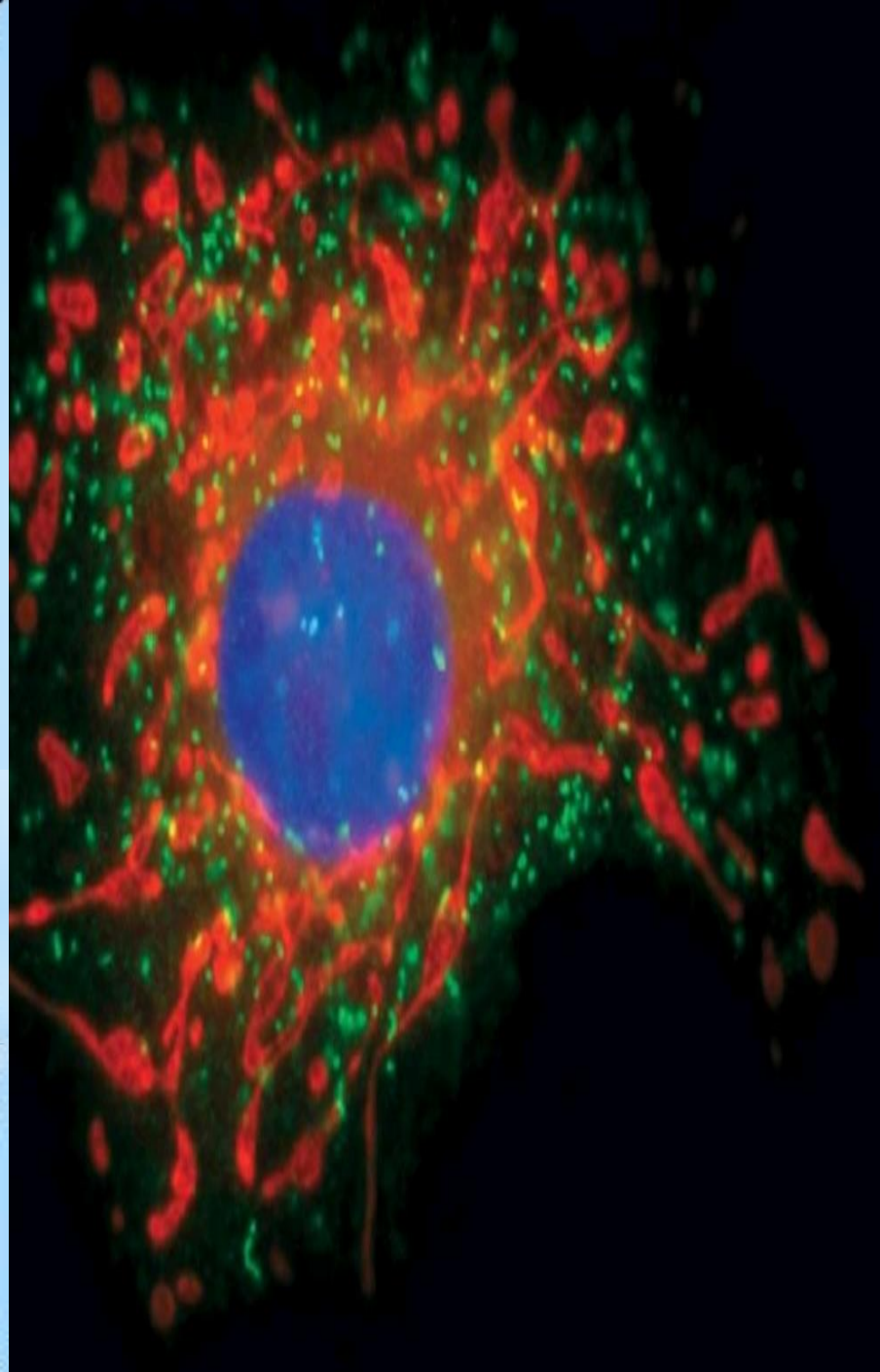
✓ در درون ماتریکس پروکسی زوم به دلیل اکسیداسیون آنزیمی انواع مولکول ها با اکسیژن (O_2)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید می شود و سپس آنزیم کاتالاز تجمع خطرناک این ترکیب را که مخرب و سمی است به سرعت تبدیل به آب و اکسیژن می کند.

✓ بدین ترتیب این اندامک ها در تنظیم فشار اکسیژن سلول نقش مهمی دارند.

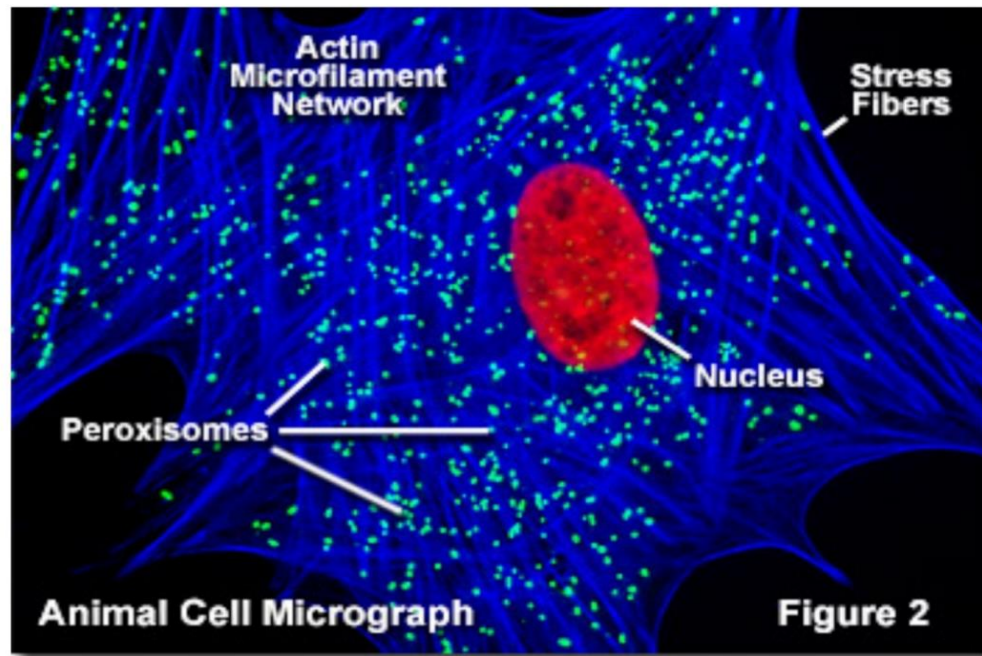
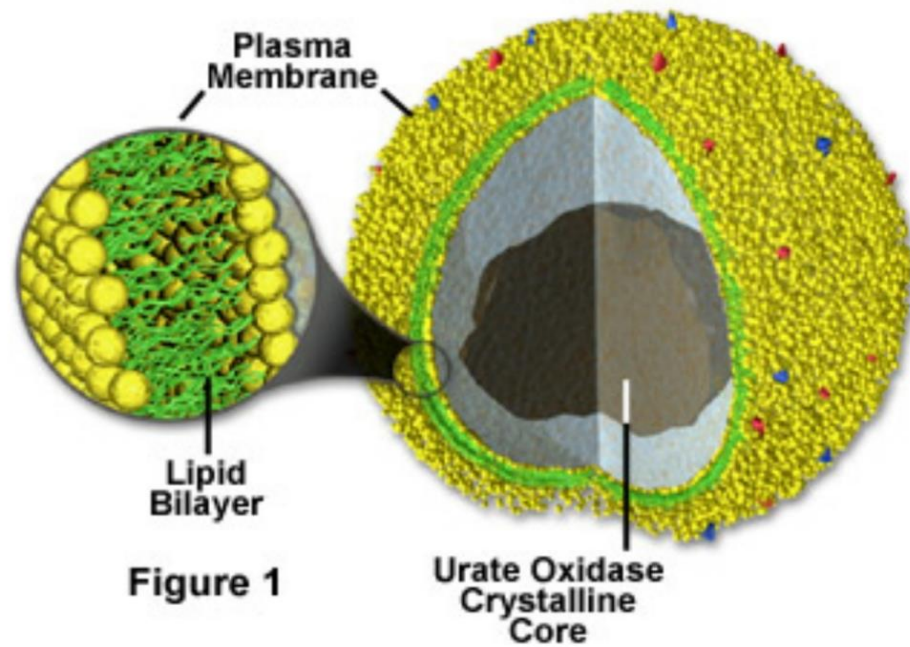
✓ نام این اندامک از نام پراکسید هیدروژن گرفته شده به دلیل نقش مهم آن در تولید و تخریب

آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهرفر

مولکول (H_2O_2)

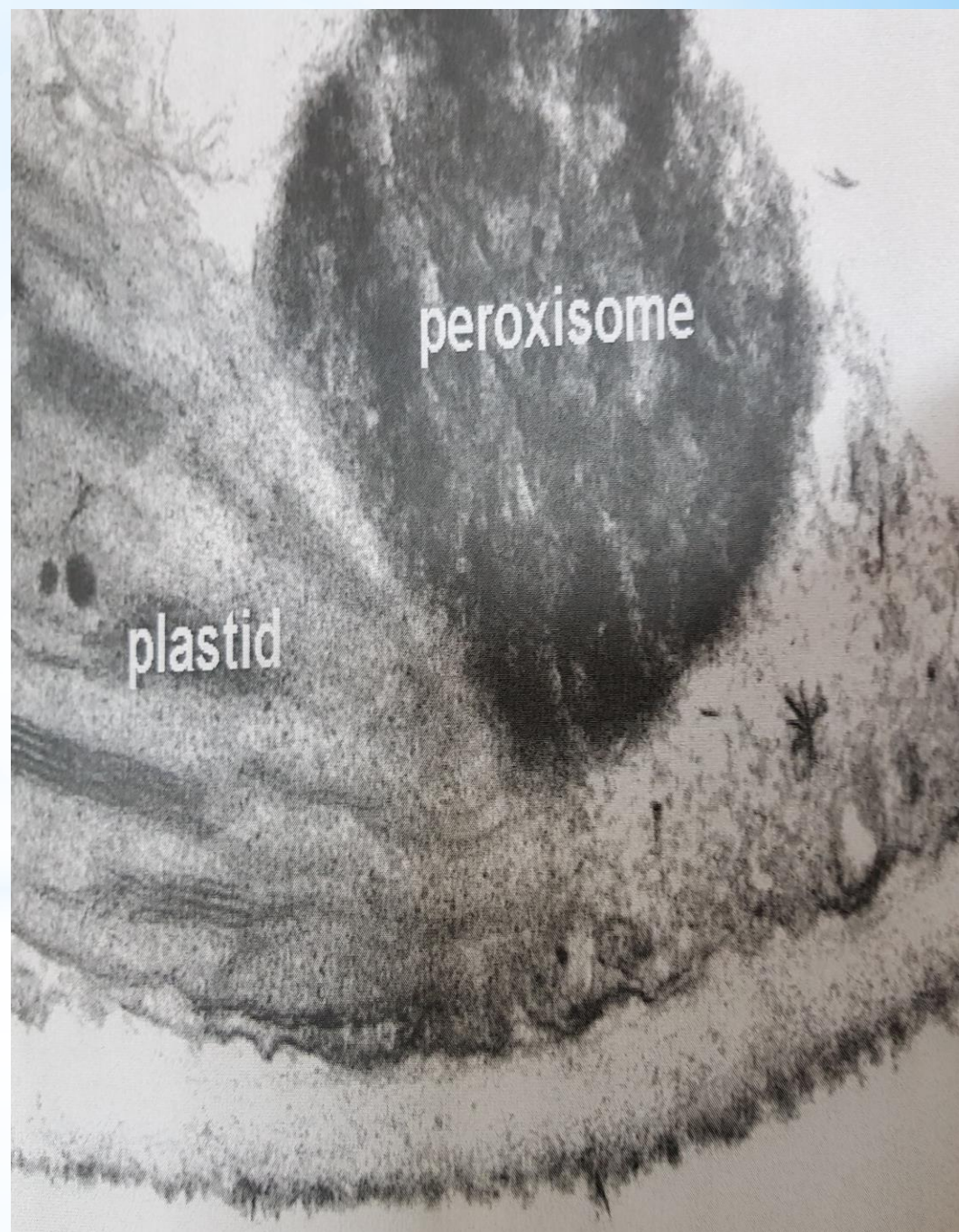
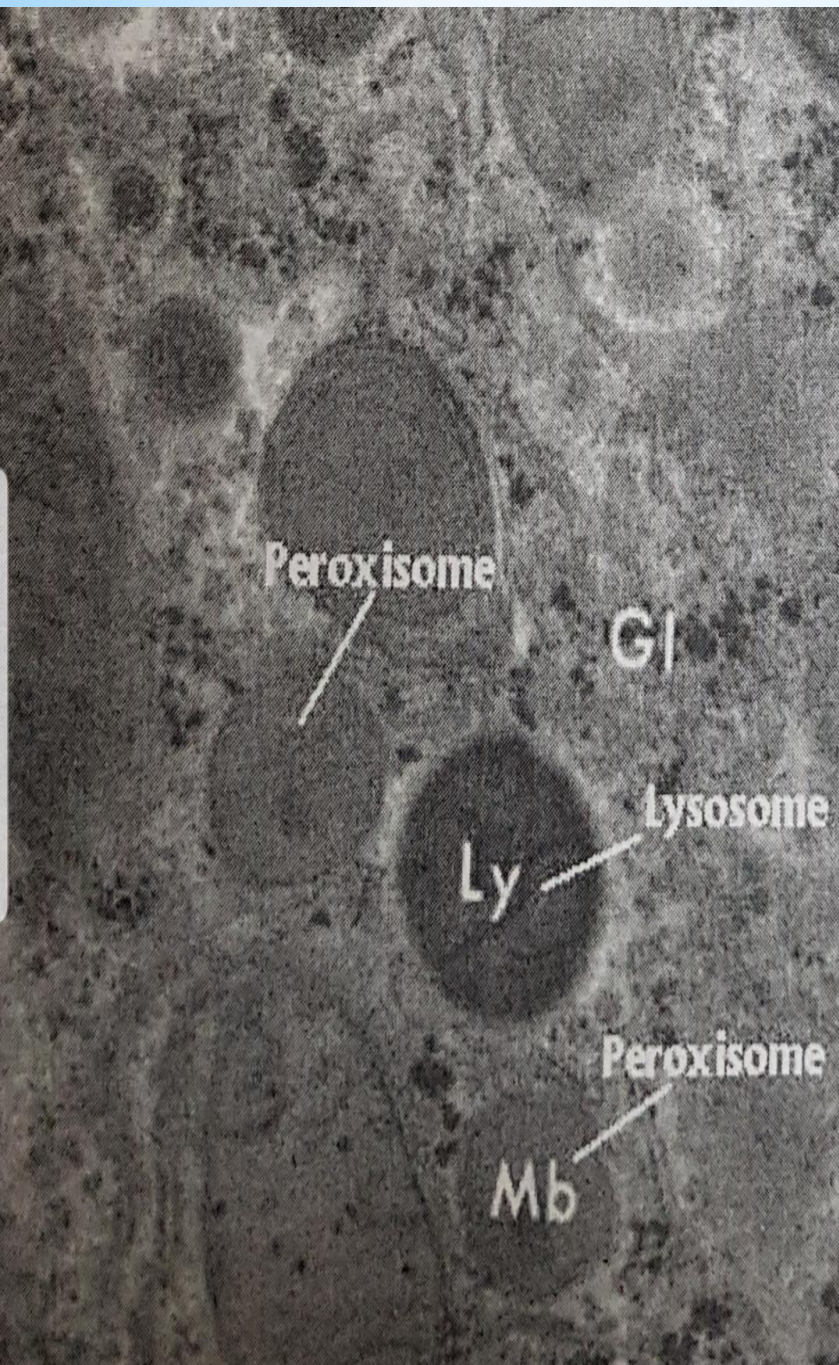


Anatomy of the Peroxisome









آشنایی با سندرم زلوگر (Zellweger)

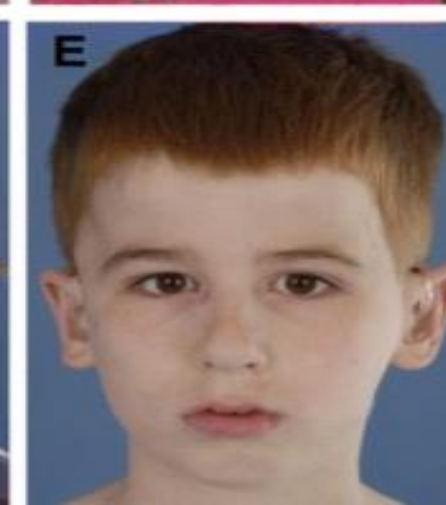


علائم سندرم زلوگر (Zellweger)

علائم و نشانه های سندرم زلوگر از فردی به فرد دیگر بسیار متفاوت است . سندرم زلوگر در شدیدترین حالت ممکن ، اندکی پس از تولد آشکار می شود . نوزادان مبتلا به سندرم زلوگر عوارض تهدید کننده حیات را در سال اول زندگی ، معمولاً تجربه می کنند .

از دست رفتن عملکرد پروکسی زومی و تخریب اسیدهای صفراوی و دیگر محصولات لیپیدی. سطوح بالایی از آهن و مس در ساختار خون و بافتها بزرگ شدن کبد، بدریختی صورت به عنوان مثال: پیشانی بلند ، تغییر شکل گوشها و اختلالات عصبی همانند عقب ماندگی ذهنی و تشنج ممکن است با گلوکوم و انحطاط شبکیه و آب مروارید به دنیا بیایند و بعد شنوایی آنها دچار اختلال شود . یرقان و خونریزی معده نیز ممکن است رخ دهد .

کیستهای کلیوی و آهکی شدن غیر طبیعی در انتهای رشدی غضروفی استخوانهای بلند افزایش مقادیر اسیدهای چرب زنجیره بلند پلاسمایی . در نتیجه در سندرم Zellweger با تجمع اسیدهای چرب طویل الزنجیر در پلاسما و بافتها تشخیص داده می شود.





Photos courtesy of the Global Foundation for Peroxisomal Disorders