University of Isfahan

Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology

Cellular and Molecular Laboratory

Farzaneh Forouharfar

عنوان

آشنایی با روشها و تکنیکهاي جداسازی و جزبه جز کردن یاخته ها و اجزا درون یاخته اي1

اهداف

- ✓ استخراج و خالص سازی کلروپلاست از سلول گیاهی با استفاده از 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 درون‌سلولی
- ✓ تهیه لام خالص و سالم از کلروپلاست‌های ایزوله شده
- ✓ مشاهده غیر مستقیم اندامک پروکسیزوم و بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز

پس از بدست‌آمدن اهداف فوق، در ادامه می‌توان با استفاده از تکنیک های مناسب، DNA یا رنگیزه ها یا آنزیم های کلروپلاست را از گیاهان استخراج نمود ویا با دستکاری ژنتیکی، با استفاده از علوم مهندسی ژنتیک به تولید گیاهان با تأثیرات داروئی بهینه، مبادرت نمود.

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

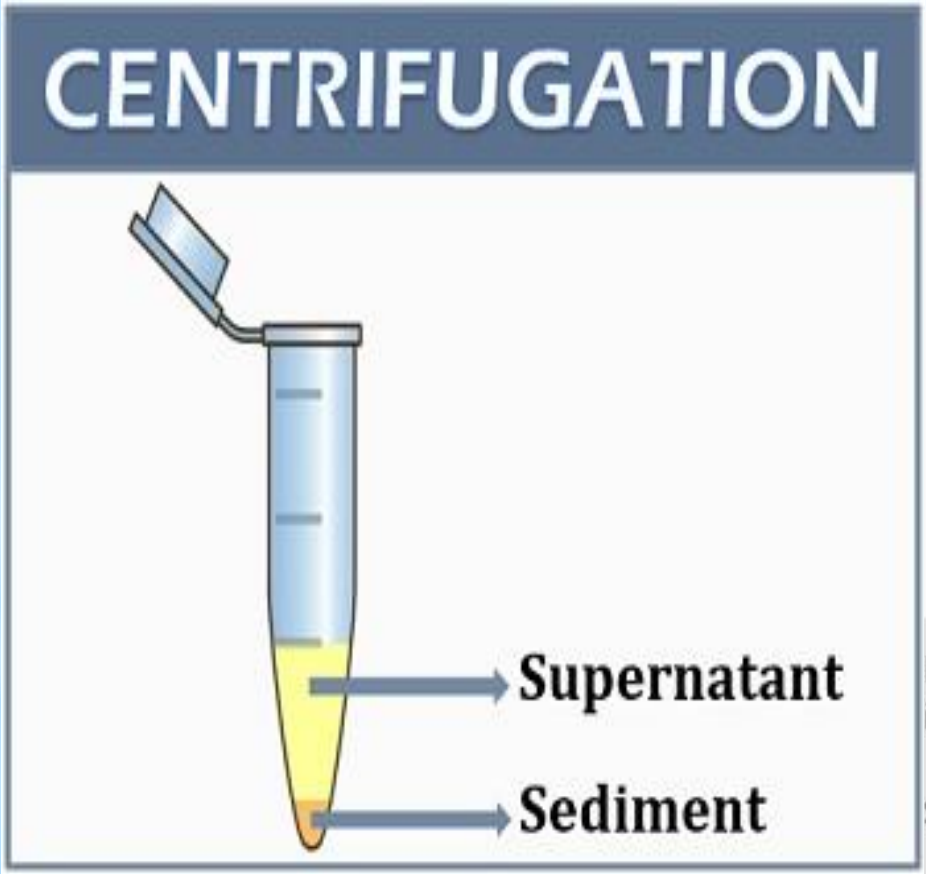
امروزه یکی از روش های دستکاری ژنتیکی سلول های گیاهی، انتقال ژن مورد نظر به کلروپلاست گیاه است. از آنجا که کلروپلاست مکان و اندامک مهمی برای متابولیسم مواد می‌باشد، اولین گام در تحقق هدف فوق، استخراج و خالص‌سازی کلروپلاست و سپس دسترسی به ژنوم کلروپلاست می‌باشد، تا بتوان از آن به عنوان مرجع تغییرات بیوشیمیایی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

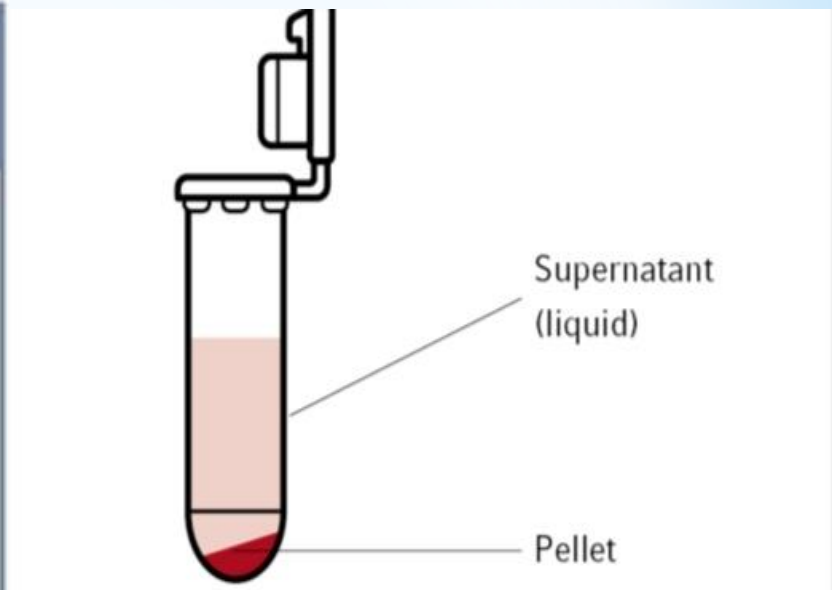
در این آزمایش، جداسازی و خالص‌سازی کلروپلاست، با مناسب‌ترین روش انجام می-شود.نتایج نشان دادند کمیت و کیفیت کلروپلاست استخراج شده در سطح مطلوبي قرار دارد همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز نشان داده که میزان DNA استخراج شده از کلروپلاست‌ها نیز از سطح بالایی برخوردار است.

در روش‌های جزء به جزء کردن یاخته‌ها، برای استخراج و جداسازی اندامک‌های درون‌سلولی بایستی از بافر استخراج(Buffer Extract) مناسب استفاده کرد.

دراین ازمایش سوسپانسیون سلولی حاصل از هموژن کردن بافت، در بافر استخراج حاوي غلظت معيني از سوكروز در بافر فسفات با سرعت‌هاي مختلف، مرحله به مرحله سانتريفوژ شده تا اندامك‌هاي ياخته‌اي بر اساس تفاوت در شكل، اندازه و وزن از هم جدا شوند.

كم‌كم در مراحل بعد سرعت و زمان افزايش مي‌يابد تا خالص سازي نهايي اندامک مورد نظرصورت بگيرد. در سرعت پايين و زمان كم، كمترين نيرو به عصاره سلولي وارد و بزرگترين و سنگين‌ترين اجزاء سلولي ته‌نشين مي‌شوند و اجسام سبكتر در قسمت رويي قرار مي‌گيرند. با سانتريفوژ مجدد قسمت رويي يا سوپرناتانت در سرعت و زمان بالاتر به ترتيب اجزاء سلولی بيشتري از هم جدا مي‌شوند. بنابراين مرحله به مرحله جداسازي انجام مي‌شود.
در این روش سانتریفوژ افتراقی پس از پایان هر مرحله از سانتریفوژ در لوله آزمایش یک رسوب یا پلت خواهیم داشت و یک محلول رویی یا سوپرناتانت.





Precipitate (pellet) stands for the concentrated particles in a tube after successful centrifugation.

Supernatant is the remaining solution above the pellet.

کلروپلاست

این اندامک در سلول از نظر تعداد و اندازه بسته به شرایط ژنتیك سلول و مرحله رشد و بلوغ انها متفاوتند. طول آنها از 2 تا 30 میکرون و عرض انها از 1 تا 3 میکرون و ضخامتي بين 1 تا 2 میکرون دارند قسمت هاي مختلف کلروپلاست,شامل موارد زیر است:

غشای خارجی: این غشا به عنوان لایه بیرونی کلروپلاست‌ها محسوب می‌شود و از جنس غشا سلولی است که فضای درونی کلروپلاست را از سیتوپلاسم سلول جدا می‌کند.

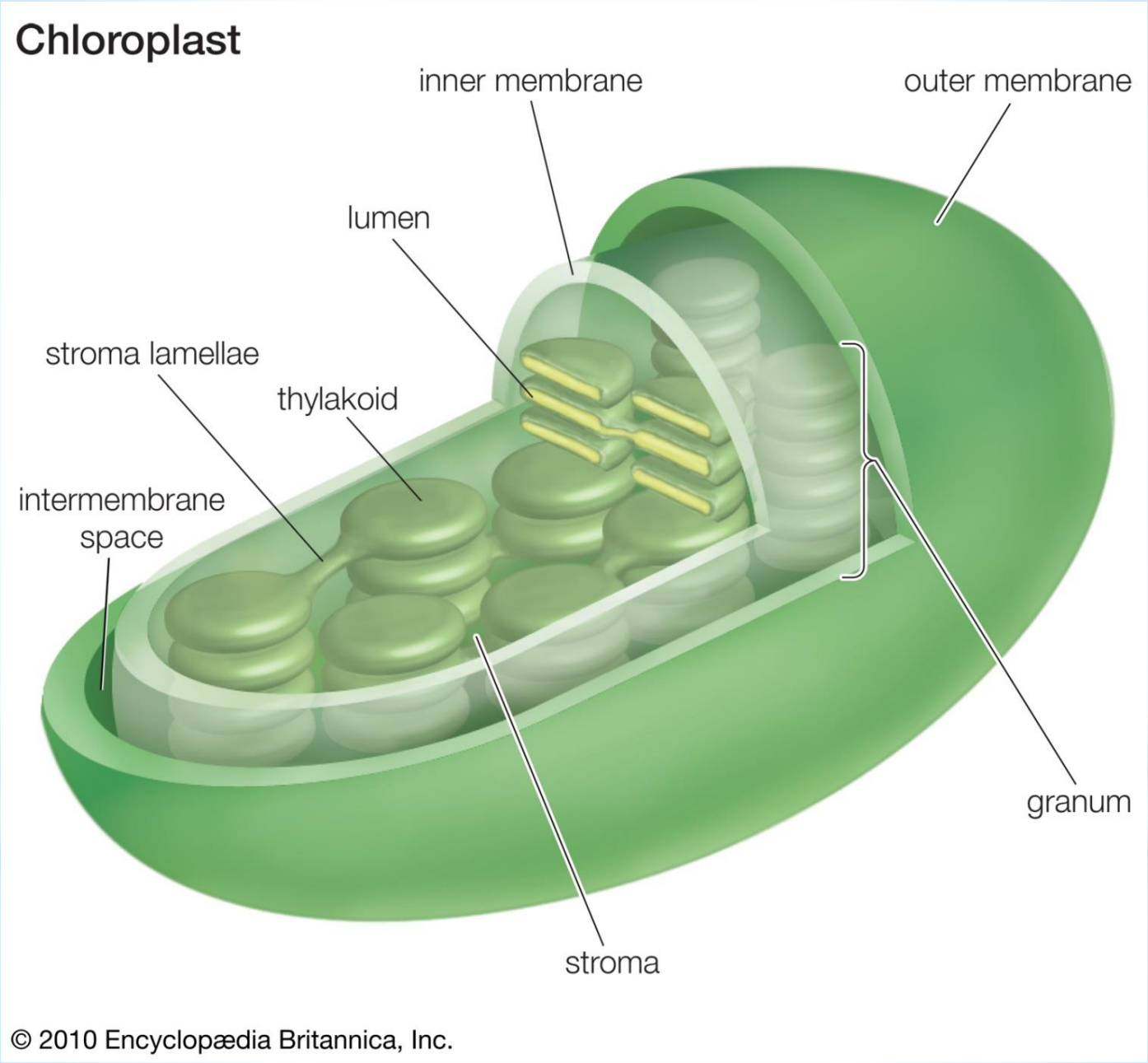
غشای درونی: این غشا نیز مشابه غشای خارجی است و فضای درون غشای داخلی کلروپلاست را از فضای بین دو غشا جدا می‌کند.

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 نمکهاي كاني ویون هاي انها تشکیل می‌شود، به این ناحیه، فضای بین غشایی می‌گویند.

فضای درون غشای داخلی: در قسمت درونی کلروپلاست، غشایی داخلی وجود دارد. این غشا با حضور دیسک‌های کیسه مانندی به نام «تیلاکوئیدها» Thylacoidدسته‌بندی شده‌اند.

تیلاکوئیدها محل انجام واکنشهاي مرحله نوري فتوسنتز هستند وبه شکل دیسک‌های به هم پیوسته‌ای به نام «گرانوم» Granum قرار گرفته اند که به مجموع آنها گرانا Grana مي گویند وتوسط بخش‌هایی از جنس غشا به نام «لاملاهای استرومایی» Stromal Lamella با یک دیگر در ارتباط هستند. درون فضای تیلاکوئیدها «لومن» Lumen وجود دارد.

بین تیلاکوئیدها و غشای داخلی کلروپلاست از مایعی به نام «استروما» Stroma پر شده است. استروما شامل آنزیم‌های مرحله تاریکي فتوسنتز و انزیم هاي لازم جهت بیوسنتز پروتیینها، گرانول‌های نشاسته‌ای و نسخه‌هایی از ژنوم کلروپلاست است .


Chloroplast
inner membrane
outer membrane
lumen
stroma lamellae
thylakoid
intermembrane space
granum
stroma
© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1.بافر استخراج(سوکروز 0.25مولار در بافر فسفات)
2.برگ‌های تازه اسفناج یا نمونه های مختلف گیاهی سبز رنگ
3. لوله آزمایش
4.لوله سانتریفوژ
5.سانتریفوژ یخچال‌دار
6.لام و لامل
7. میکرو پی پت یا سمپلر
8. میکروسکوپ نوری
9. سرنگ یا پاستورپی‌پت
10.پارچه صافی
11. بشر
12. ترازو
13.اب اکسیژنه

طرز تهیه بافر استخراج سوکروز در بافر فسفات

بافر فسفات

دی هیدروژن سدیم فسفات	NaH_2PO_4	۰/۷ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات	Na_2HPO_4	0/3 گرم
آب مقطر	H_2O	۱۰۰ میلی لیتر

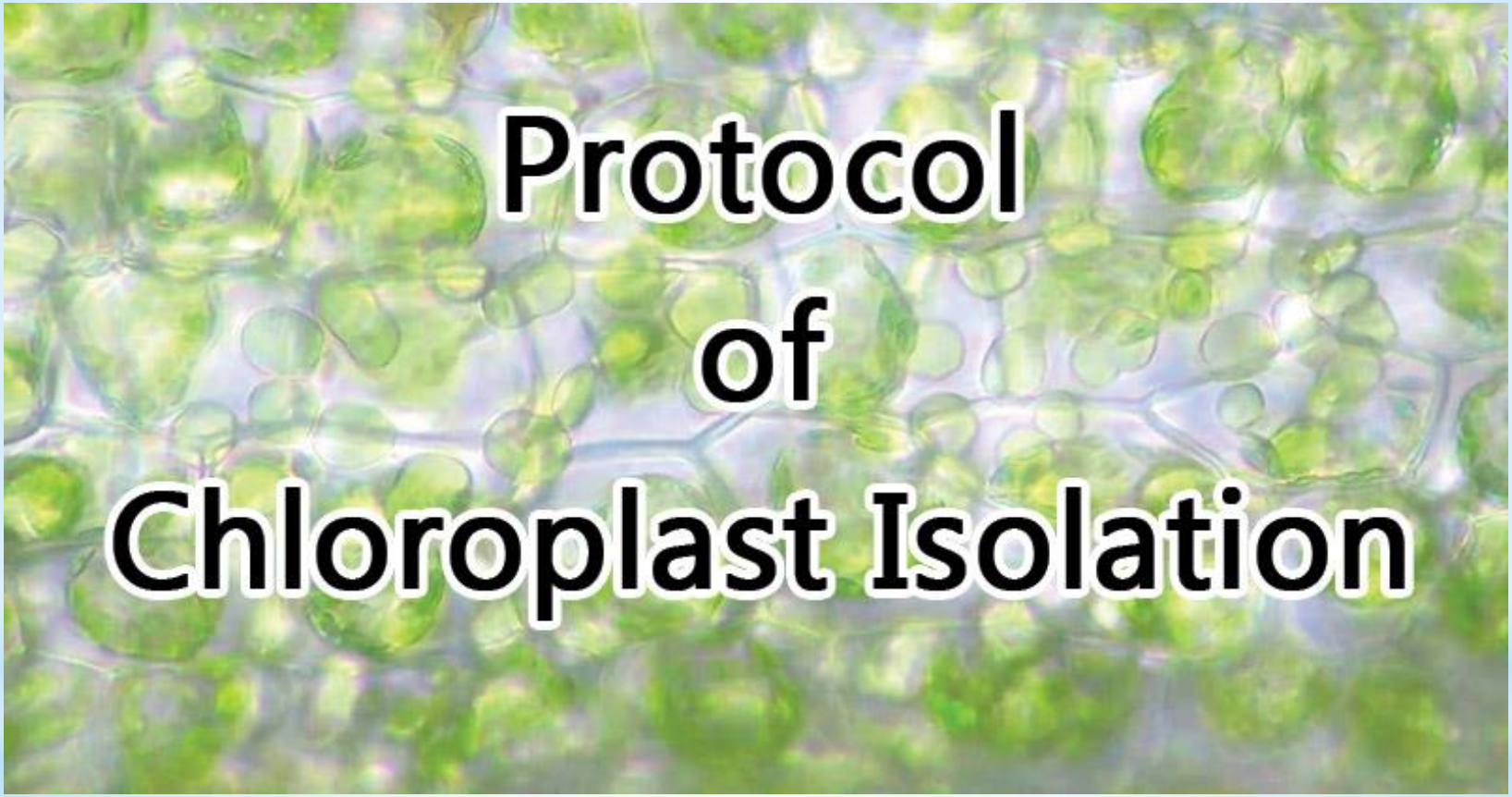
موارد فوق را به نسبت ذکر شده مخلوط کرده و PH را به کمک دستگاه PH متر به ۶/۵ برسانید. محلول فوق را در ظرفی در بسته در یخچال نگهداری و هنگام مصرف با آب مقطر ۶ بار رقیق کنید.

سوکروز 0/4 مولار

سوکروز	0/4 مولکول گرم گرم ۳٤۲×0/4=136/8
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

جهت تهیه محلول بافری فوق، سوکروز را با بافرفسفات به حجم دلخواه می‌رسانیم.

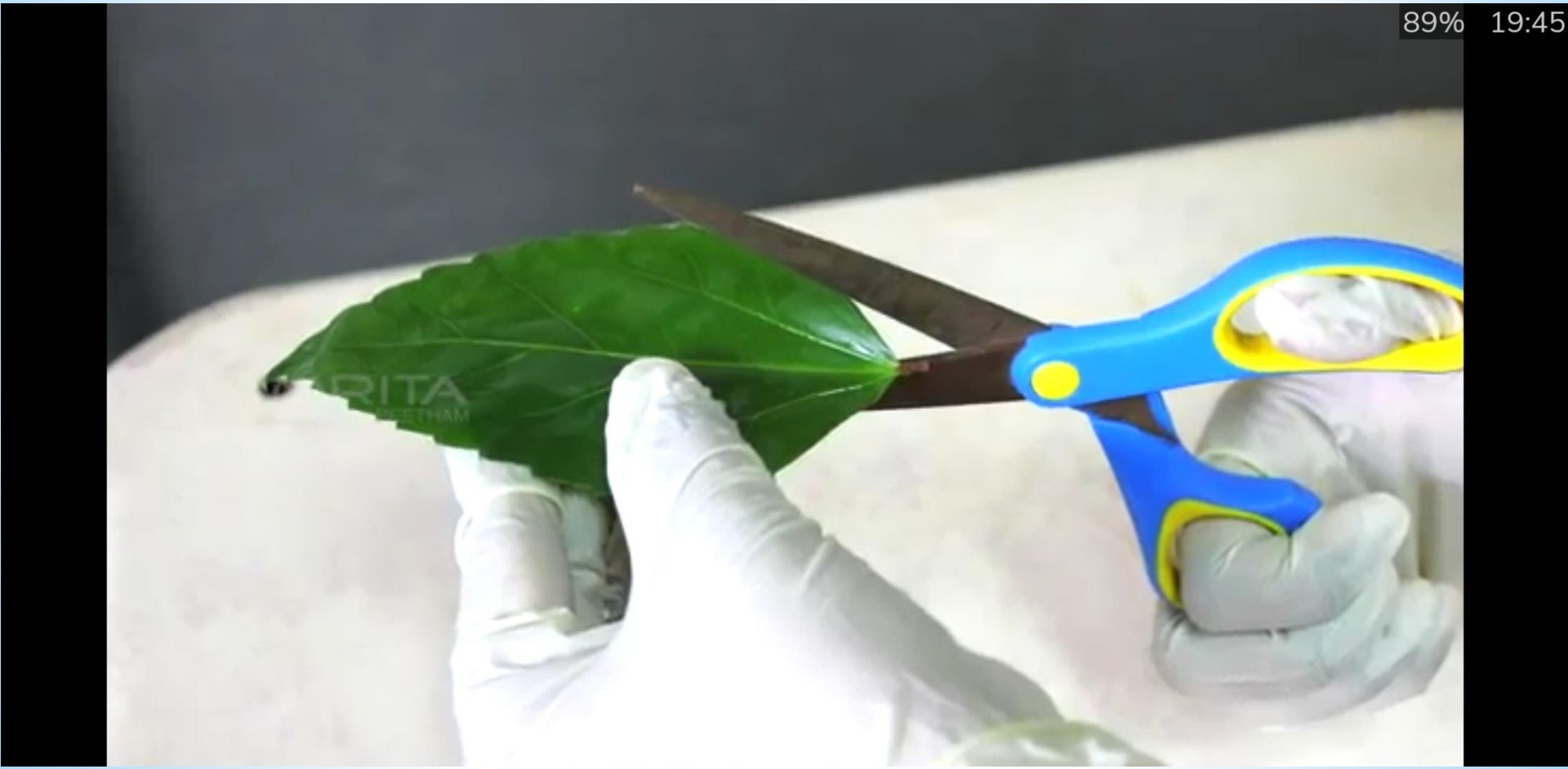
روش کار



1.در ابتدا برگ های تازه ی اسفناج را با آب مقطرشسته خشک کنید 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 آنزیم‌ها حداقل شود.

89%
19:44

2. رگبرگ های میانی و دمبرگ‌ها را جدا کرده و برگ‌ها را وزن کنید.



87%
19:54

3.به ازاء هر گرم وزن برگ 4 میلی لیتر از محلول بافراستخراج (بافر فسفات 0.06 M با PH=6.5) در 0.4 مولار سوکروز بیفزاید و مخلوط برگ ها و محلول بافری را در هاون چینی خنک یا هموژنایزر بسایید به طوریکه سوسپانسیون سلولی نسبتاً هموژنی به دست آید.

88%
19:46

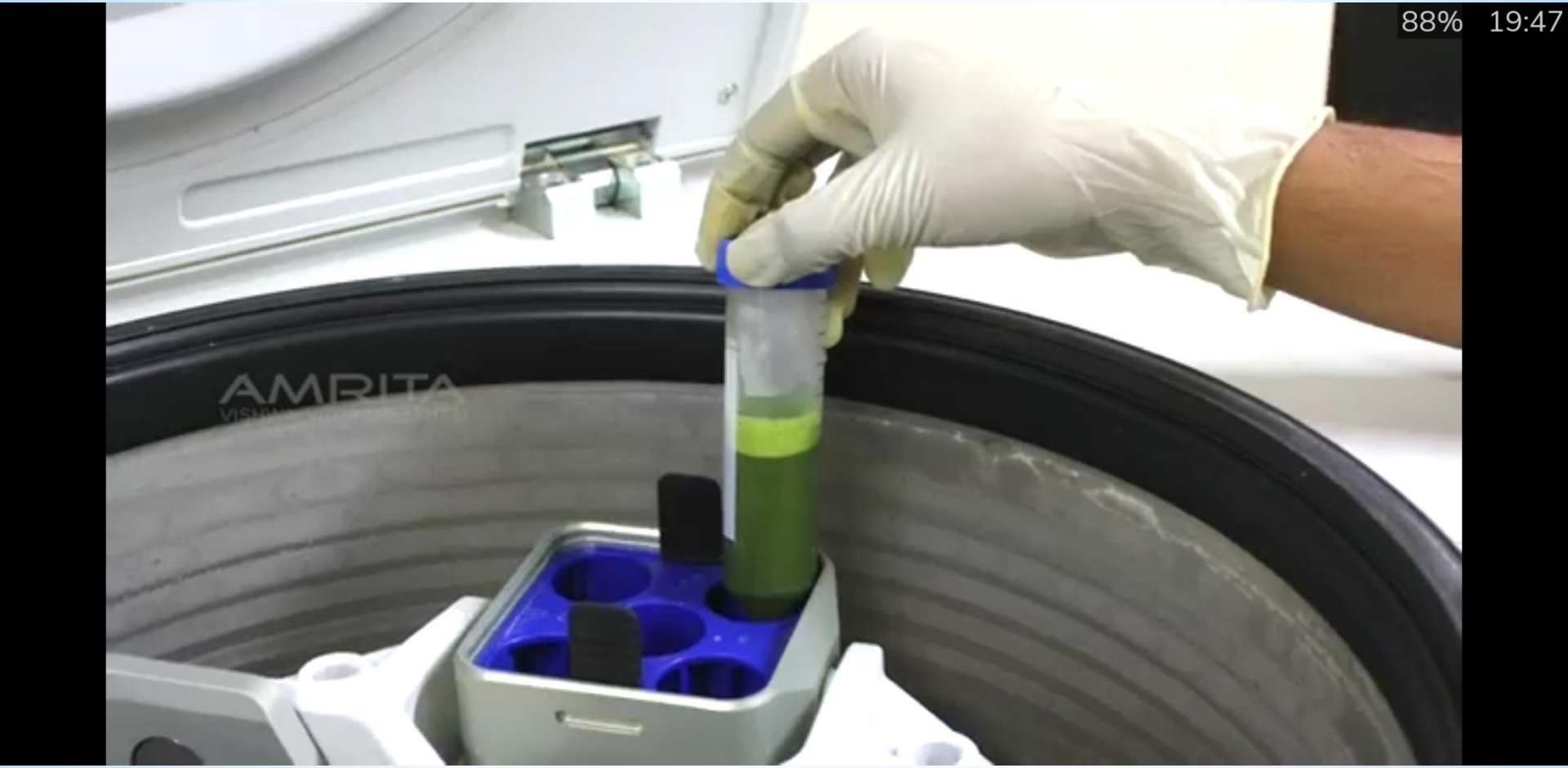
آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

4.سوسپانسیون سبز رنگ به دست آمده را از بین پارچه یا کاغذ صافی چندلایه عبور داده و فیلتر کنید. بخش ردشده از صافی را به مدت 3 دقیقه در1000 rpm یا 200g سانتریفوژ کنید تا یاخته‌های شکسته شده، هسته‌ها و دیواره سلولی و سیتو اسکلتون زوائد دیگر برگ رسوب کنند.

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر



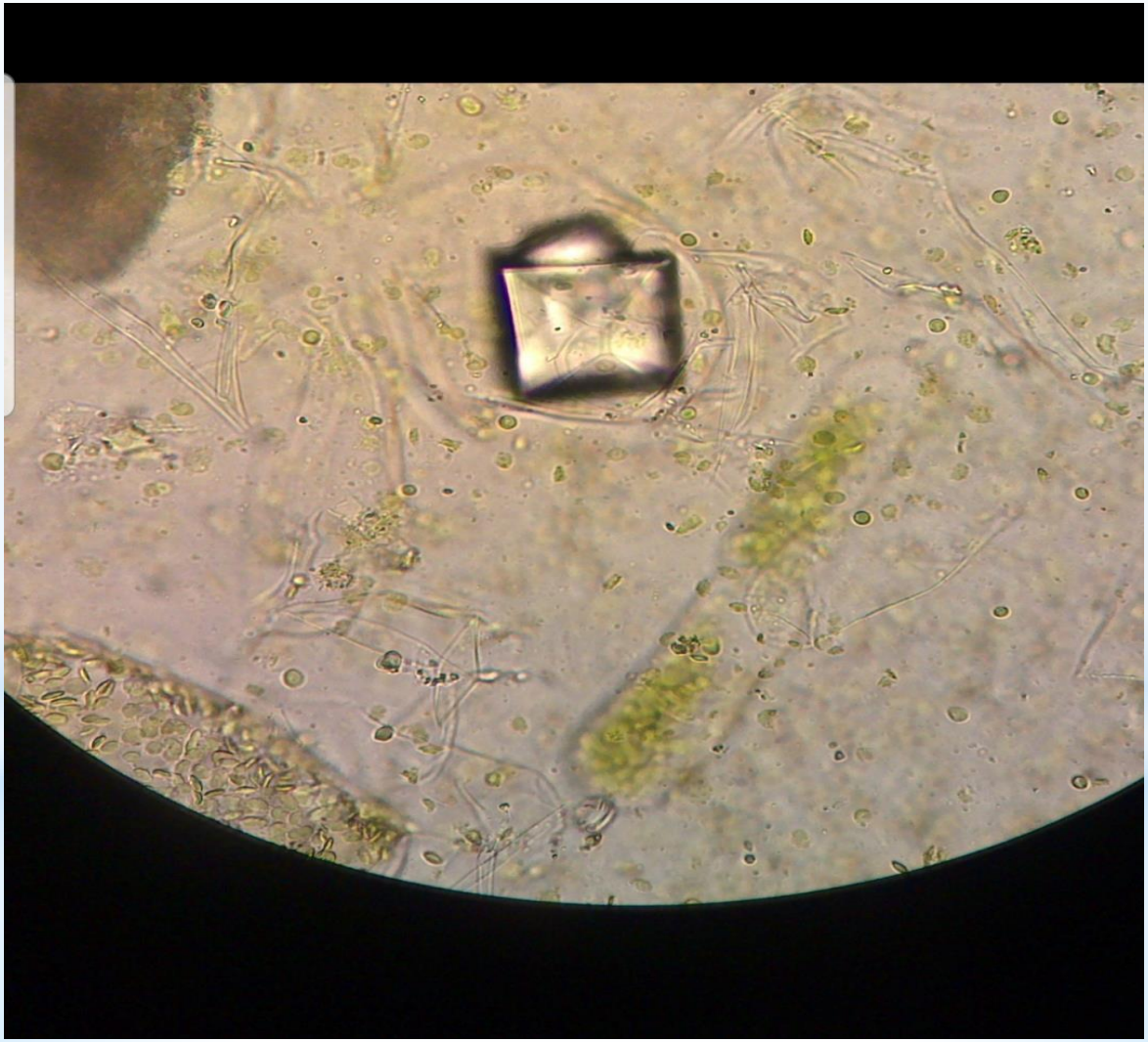
آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

5.محلول رویی حاصل از مرحله قبل را جدا کرده و به مدت 7 دقیقه در3000 rpm یا1000 gسانتریفوژ 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، کرک های تک سلولی ساده و غده‌ای، کریستالهای گیاهی اگزالات کلسیمی از نوع پریسماتیک یا منشوری و دروس، داربست یا دیواره سلولی پاره شده، سلول‌های نردبانی و اسفنجی پارانشیمی و سلول های روزنه و غیره را شناسایی و شکل آن‌ها را در یک میدان دید میکروسکوپ رسم کنید. در صورت استفاده از نمونه گیاهی پتوس به وجود کریستالهای اگزالات کلسیمی سوزنی شکل از نوع استیلوئید در رسوب دقت کنید.

کریستال پریسماتیک یا منشوری

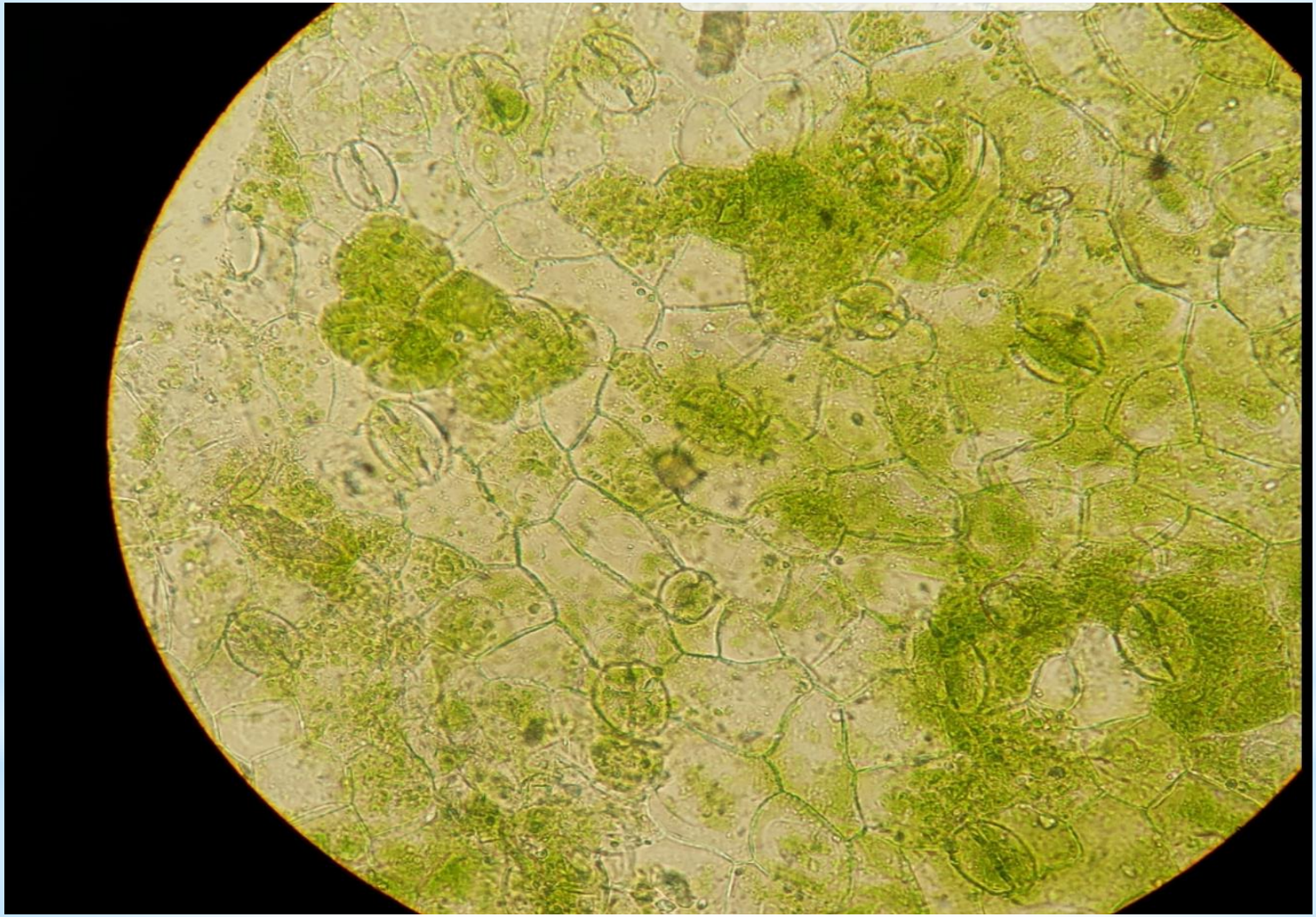


آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

مشاهدات سلولی رسوب حاصل از مرحله
اول سانتریفوژ

آوند چوبی و آبکش اولیه

سلولهای روزنه



7. پس از پایان سانتریفوژ محلول رویی را در لوله‌ای تمیز ریخته و جهت بررسی وجود یا عدم وجود اندامک پروکسی زوم ها نگه دارید. رسوب کلروپلاست را در محلول بافری تازه هموژن کنید. سپس در دور3000 rpm مجدداً 7 دقیقه سانتریفوژ کنید. این عمل را در صورت لزوم تا خالص سازی نهایی کلروپلاست تکرار کنید.

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

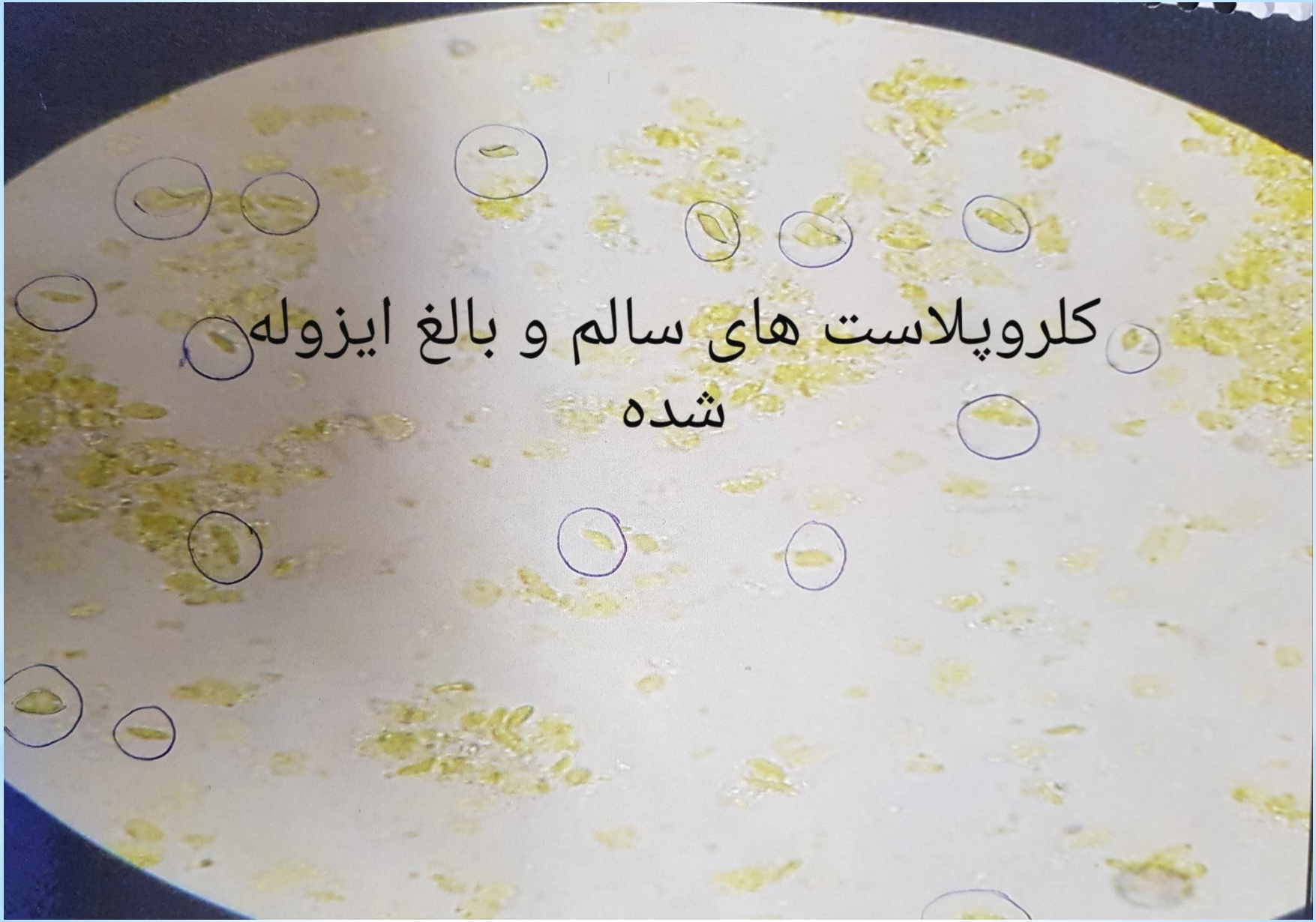
8. در مدت زمان انجام سانتریفوژ فوق محلول رویی حاصل از مرحله 7 را که حاوی اندامک‌های سبک‌تر از کلروپلاست از جمله پروکسی‌زوم ها هستند، با افزودن چند قطره H_2O_2 (آب اکسیژنه) از جهت وجود یا عدم وجود پروکسی‌زوم‌ها چک کنید سپس مشاهدات خود را تفسیر و بررسی نمایید.

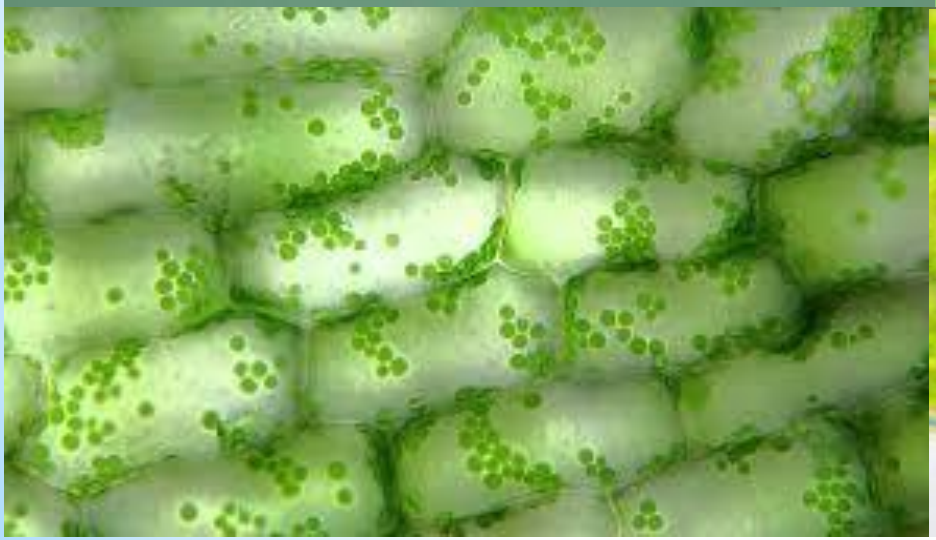
9. پس از انجام اخرین مرحله سانتریفوژ یک قطره از رسوب کلروپلاست خالص شده را در محلول بافری تازه هموژن کنید و در زیر میکروسکوپ فرم های مختلف این اندامک رامشاهده نمایید.

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

توجه: رنگ ردآمین معرف کلروپلاست است و آن‌ها را به رنگ قرمز در می‌آورد.

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

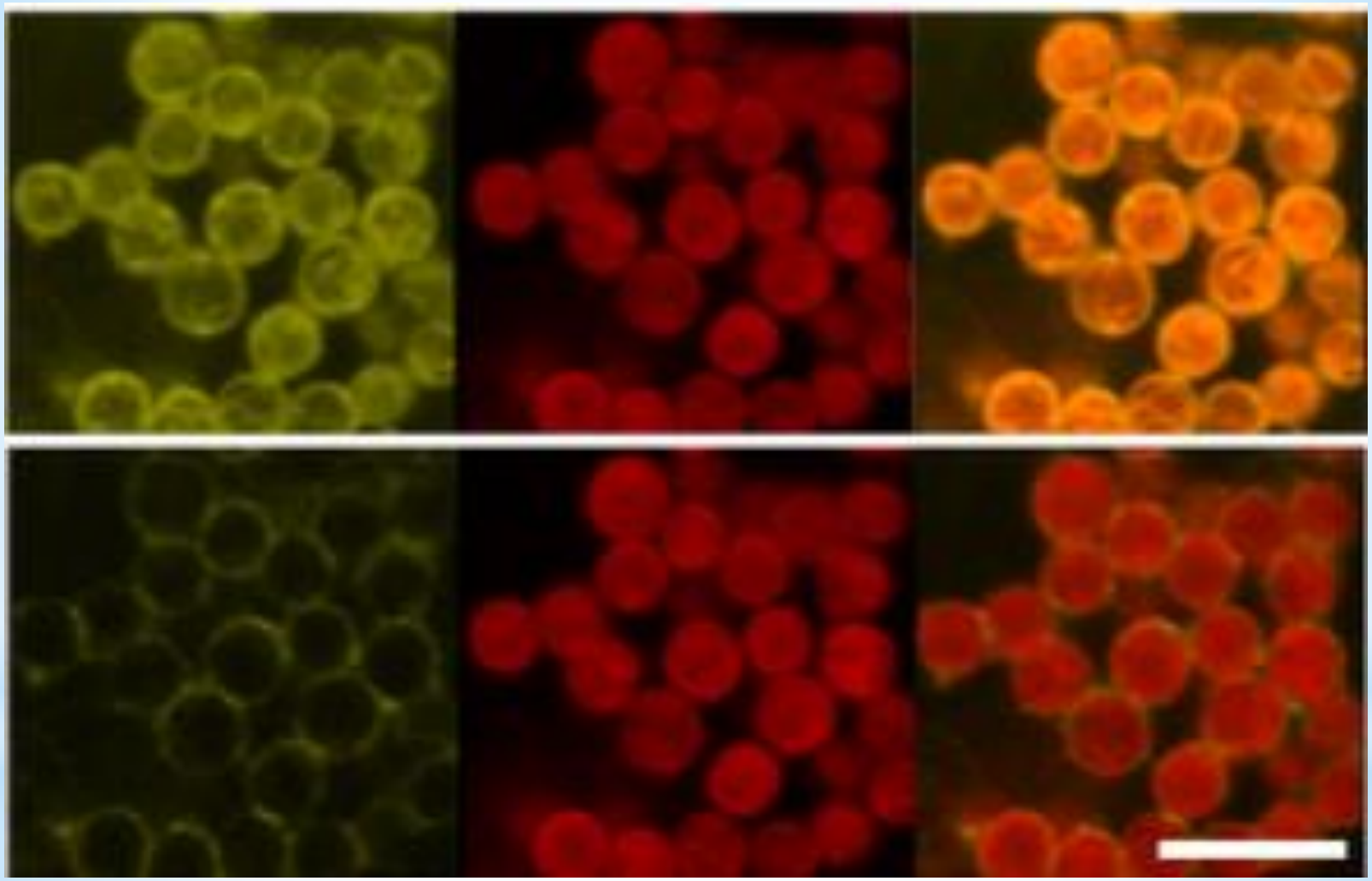

کلروپلاست های سالم و بالغ ایزوله شده



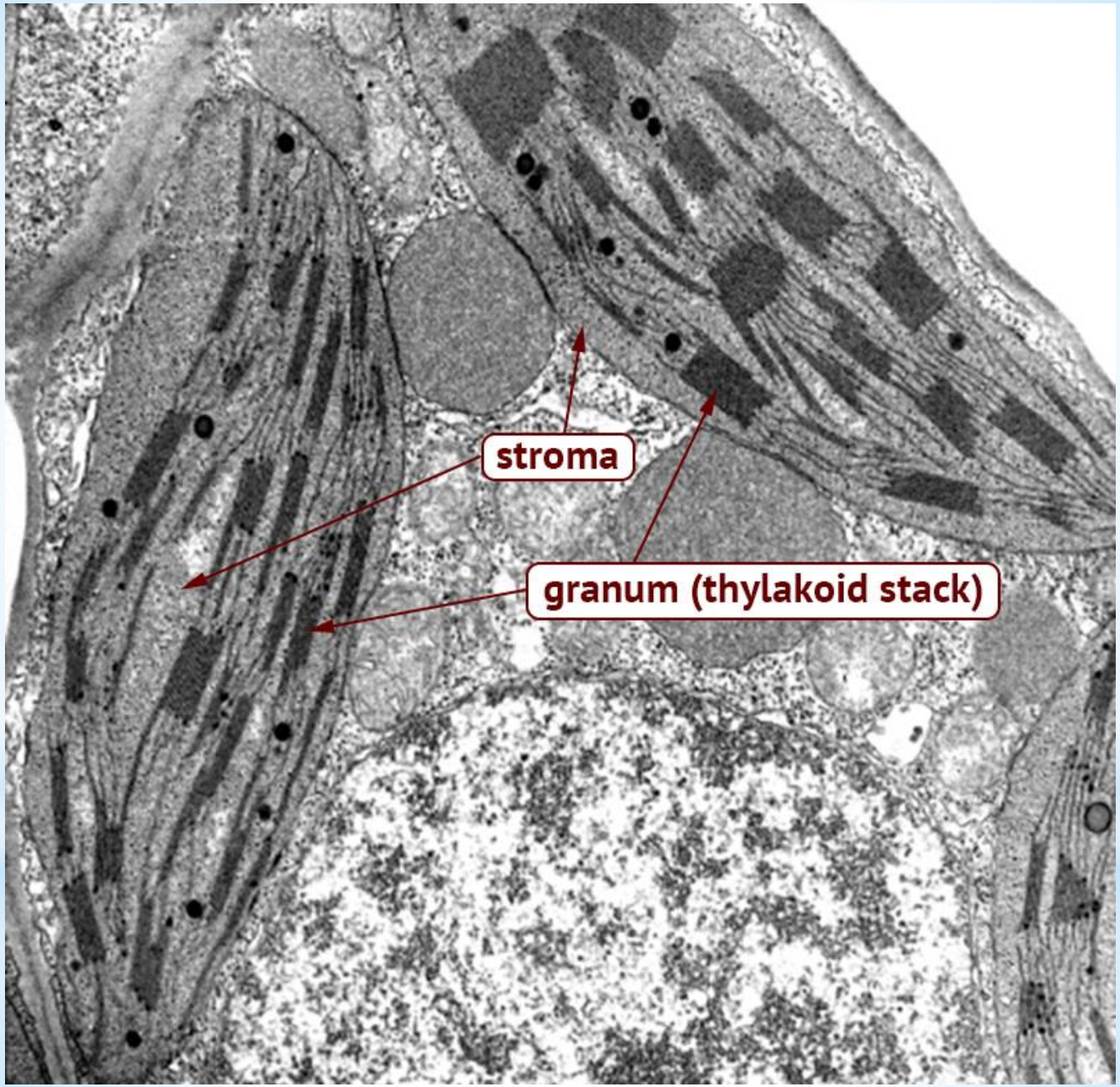
آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

فرم بالغ کلروپلاست در میکروسکوپ
نوری

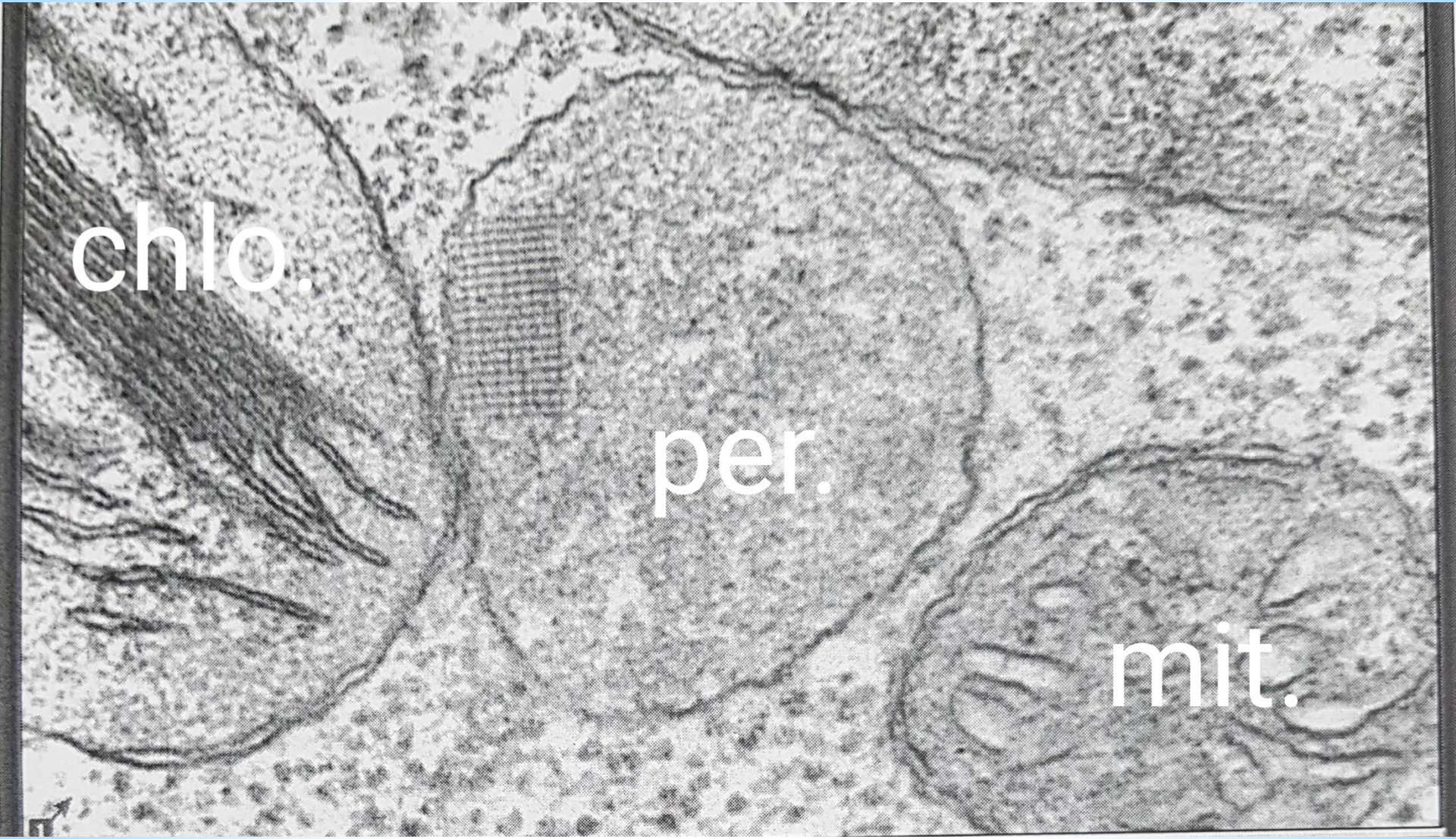
کلروپلاست بدون رنگ آمیزی و رنگ شده توسط رودامین

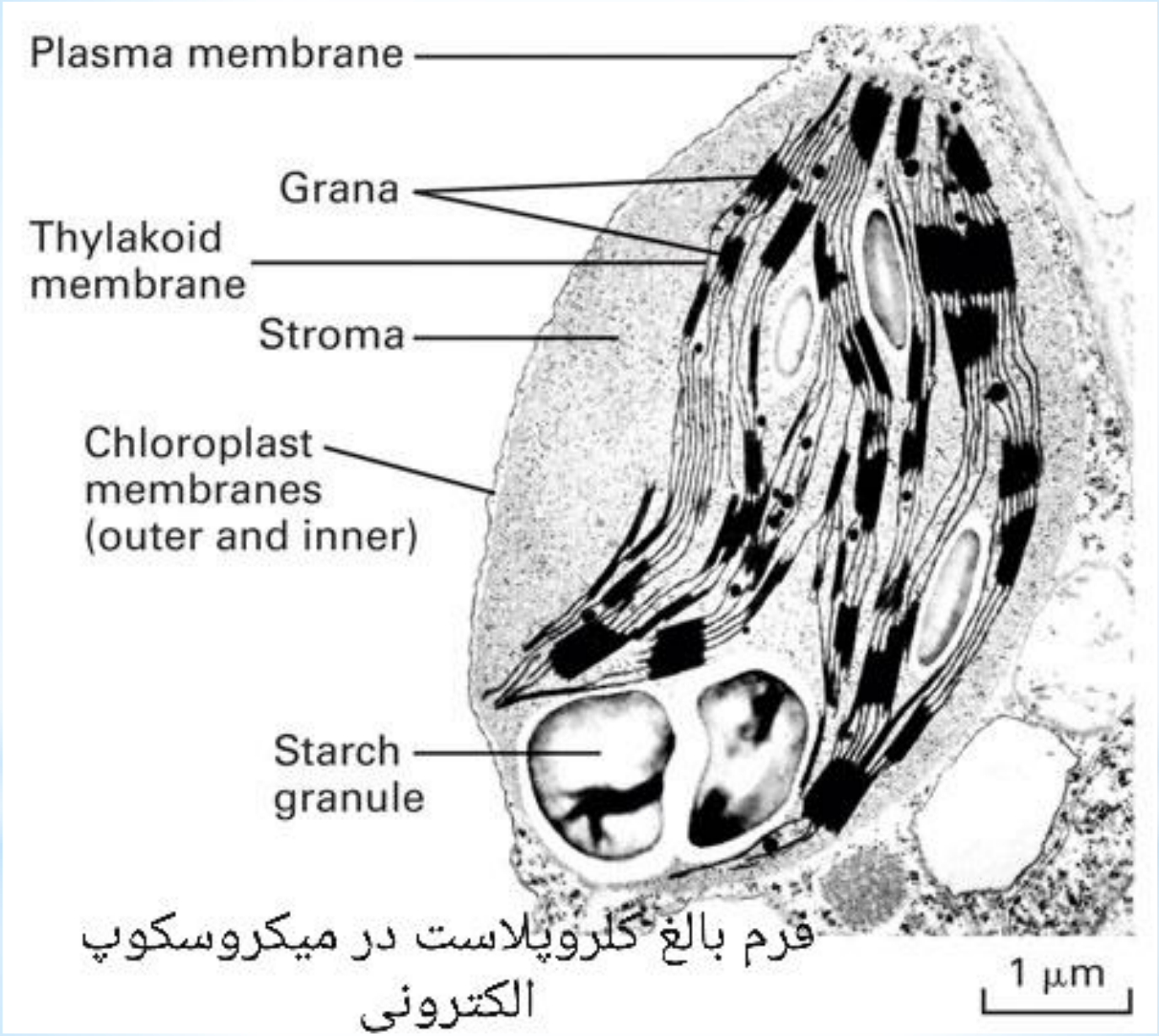


تصاویر کلروپلاست در میکروسکوپ الکترونی TEM و مقایسه ابعاد ان با سایر اندامکها



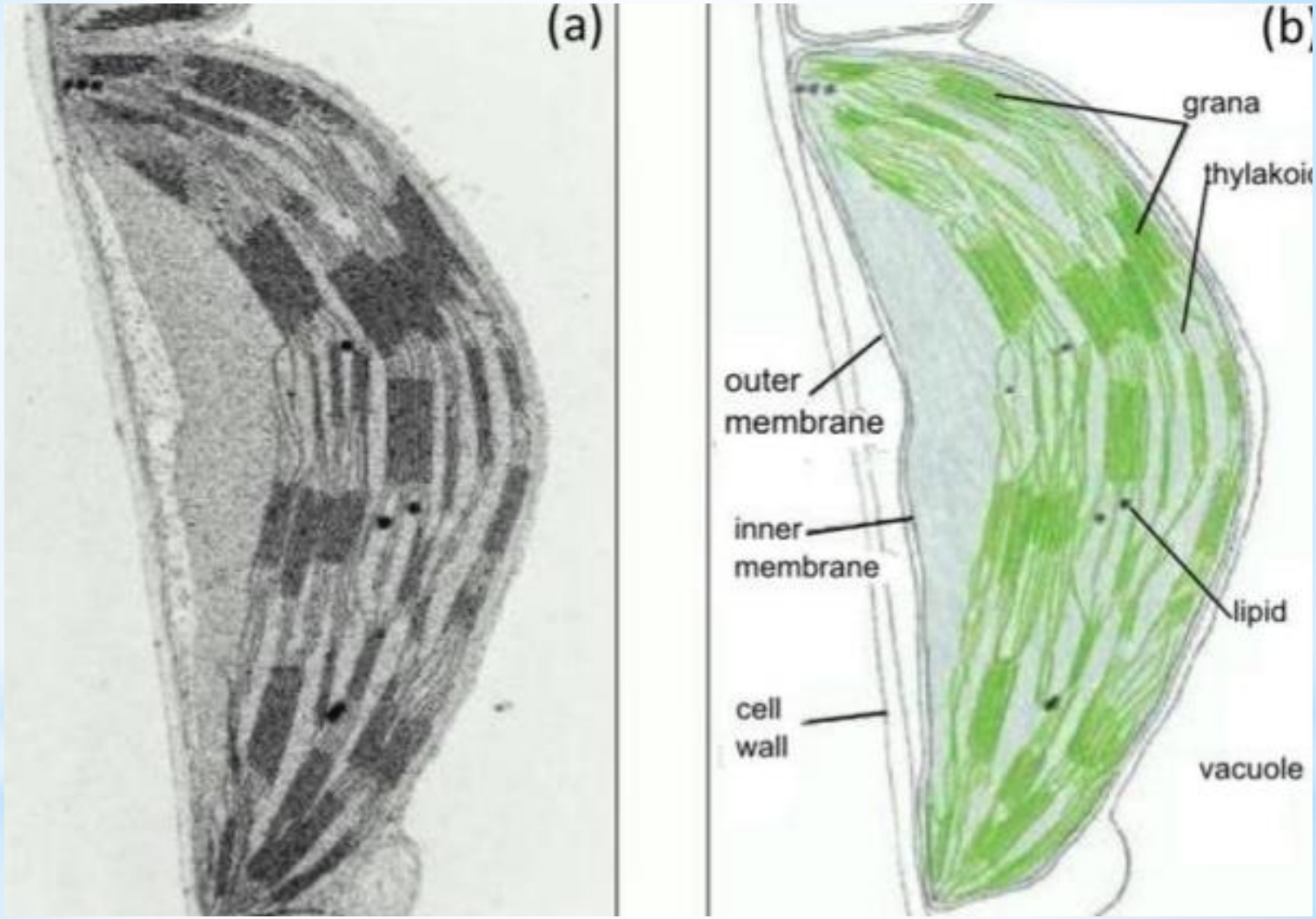
آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

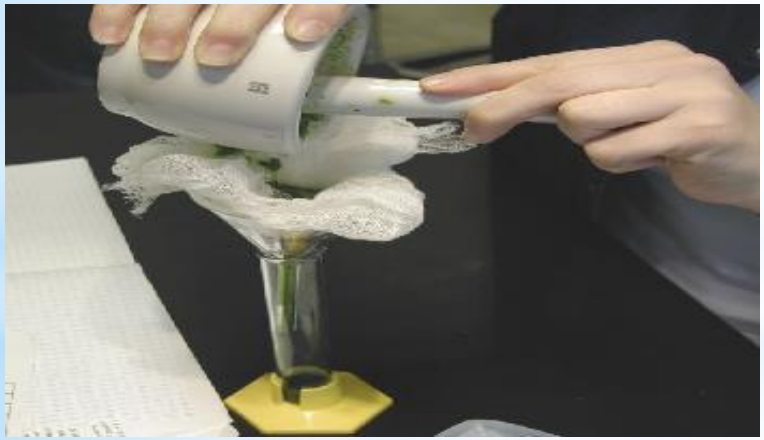
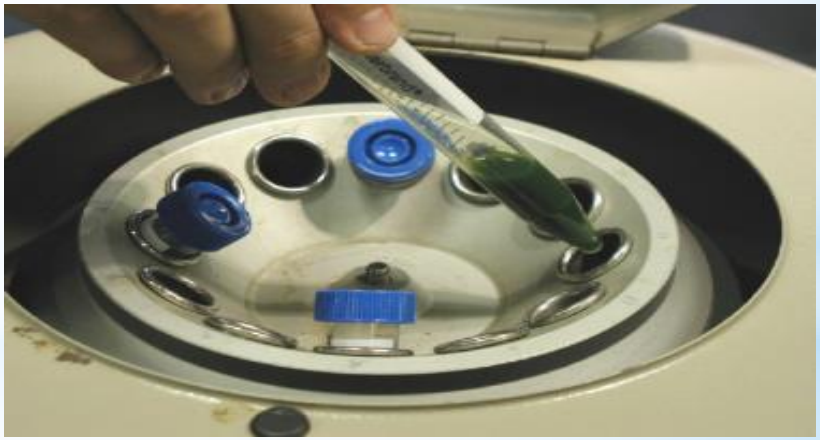

chlo.
per.
mit.



فرم بالغ کلروپلاست در میکروسکوپ الکترونی

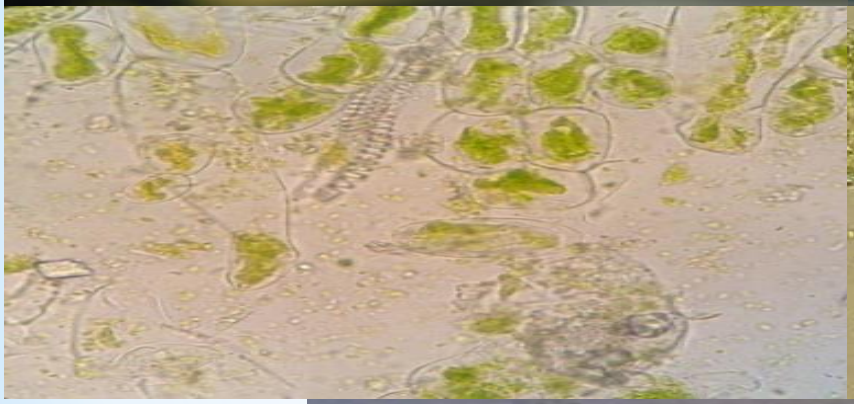
آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

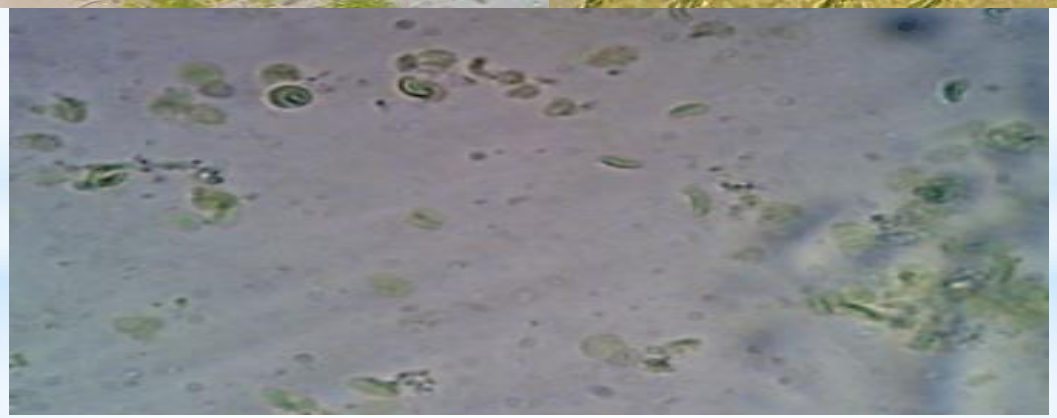

(a)
(b)
grana
thylakoid
outer membrane
inner membrane
lipid
cell wall
vacuole

خلاصه مراحل استخراج اندامک کلروپلاست

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر





مشاهدات میکروسکوپی وماکروسکوپی

جداسازی اندامکهای درون سلولی از بافت جانوری کبد

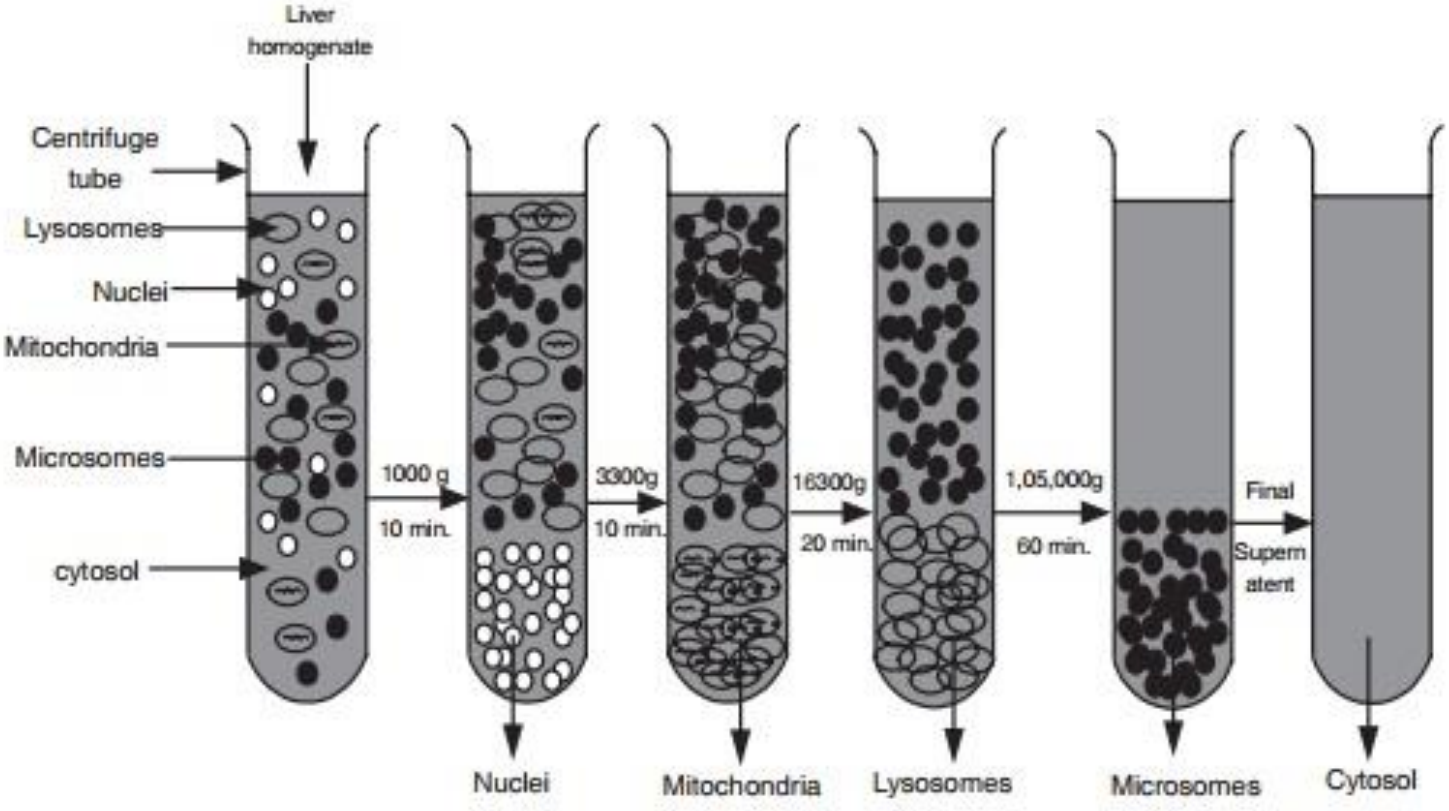


Fig. Differential sedimentation of subcellular organelles

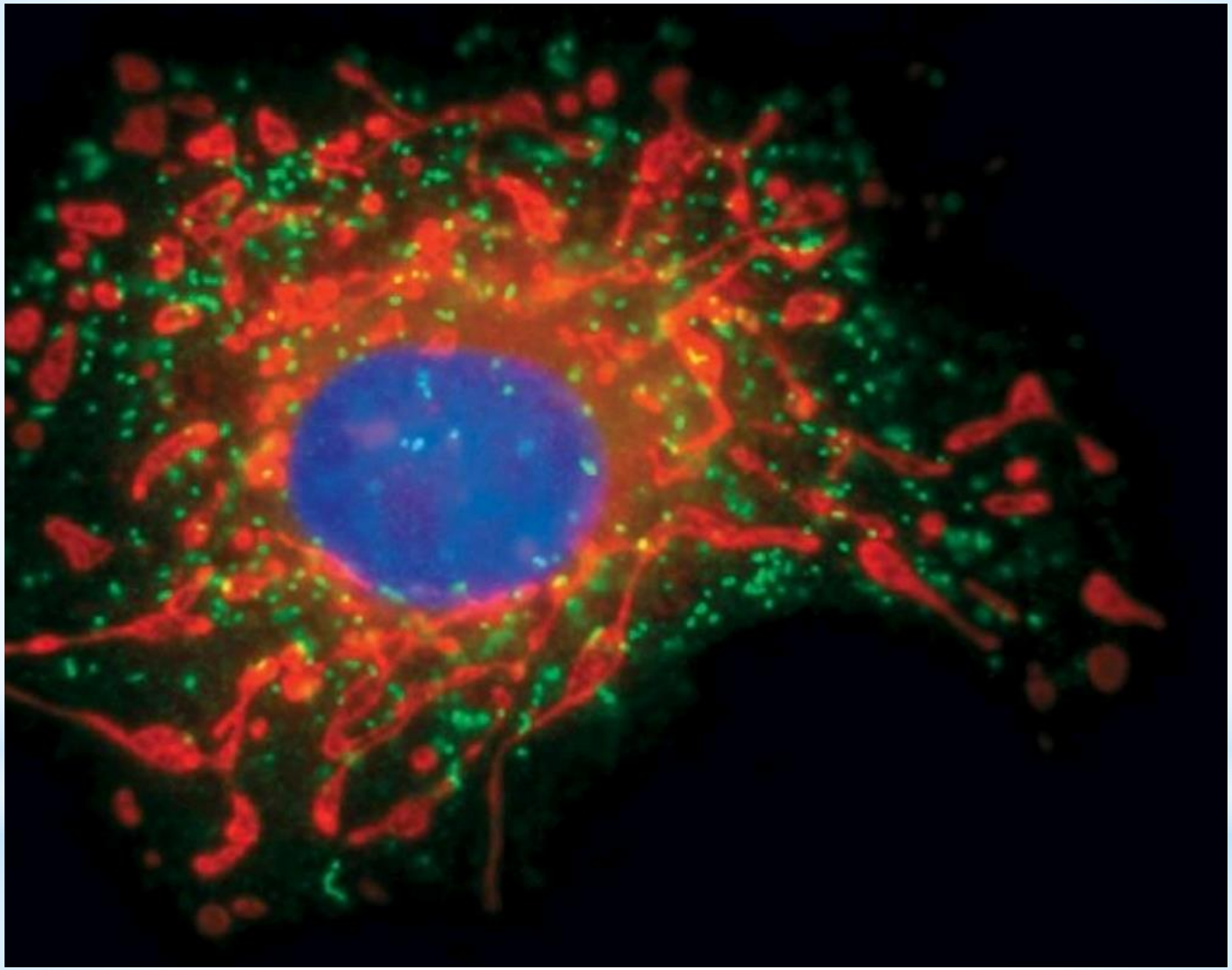
پروکسی زوم

- ✓ از جوانه زدن SER یا شبکه اندوپلاسمیک صاف به وجود می آید و دارای تک غشاء تک لایه است.
- ✓ در سلول هی جانوری و گیاهی وجود دارند .
- ✓ دارای چندین نوع آنزیم ازجمله کاتالاز که یک اکسید کننده قد است می باشد.
- ✓ قطر پراکسی زوم ها معمولا 0/2-0/1 و گاهی به ندرت به1-0/5میکرومتر 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 زلوگرZellweger 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.

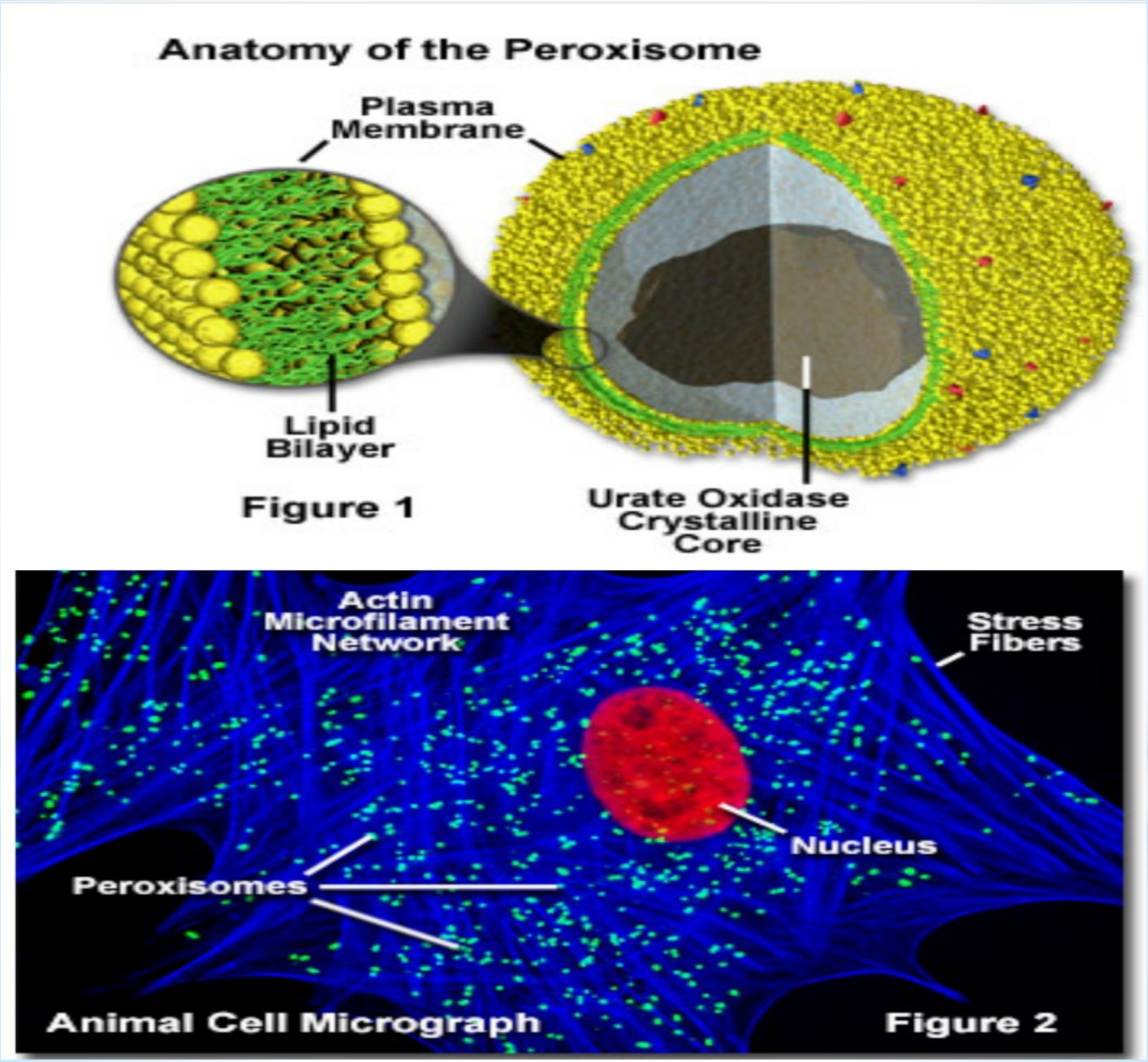
- به دلیل کوچکی و شکنندگی غشاء در مقایسه با هسته ،میتوکندری و کلروپلاست تحقیقات کمتری در رابطه با آنها صورت گرفته است.
- تمامی سلول های یوکاریوت دارای پروکسی زوم بوده و برای ادامه حیات به این اندامک نیاز دارند.
- این اندامک در متابولیسم لیپید ها و در تنفس نوری گیاهان نقش بسیار مهمی دارد.
- در درون ماتریکس 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 به دلیل نقش مهم آن در تولید و تخریب مولکول(H_2O_2) گرفته شده است.

آنزیم کاتالاز

عمدتاً در سیتوپلاسم یا در اندامک پراکسی زوم سلول‌های کبد و کلیه بیشترین فعالیت سم زدایی را دارد در گیاهان نیز باعث محافظت سلول‌های گیاهی از فرایند اکسیداسیون رادیکال های آزاد می شود. این آنزیم، پراکسید هیدروژن یا آب اکسیژنه را که به‌طور طبیعی در بدن در فرآیندهای مختلف تولید می‌شود ویک عامل اکسید کننده و سفیدکننده قوی می‌باشد به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. اگر سطح آنزیم کاتالاز در بدن کاهش یابد تجمع پراکسید هیدروژن در فولیکول‌های مو باعث سفیدی مو و پیری زودرس می‌شود. از آنزیم کاتالاز در بسته‌بندی و نگه‌داری مواد غذایی جهت جلوگیری از اکسیداسیون آن‌ها استفاده می‌شود.



آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر


Anatomy of the Peroxisome
Plasma Membrane
Lipid Bilayer
Figure 1
Urate Oxidase Crystalline Core
Actin Microfilament Network
Stress Fibers
Nucleus
Peroxisomes
Animal Cell Micrograph
Figure 2

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی .فرزانه فروهرفر

آشنایی با سندرم زلوگر (Zellweger)

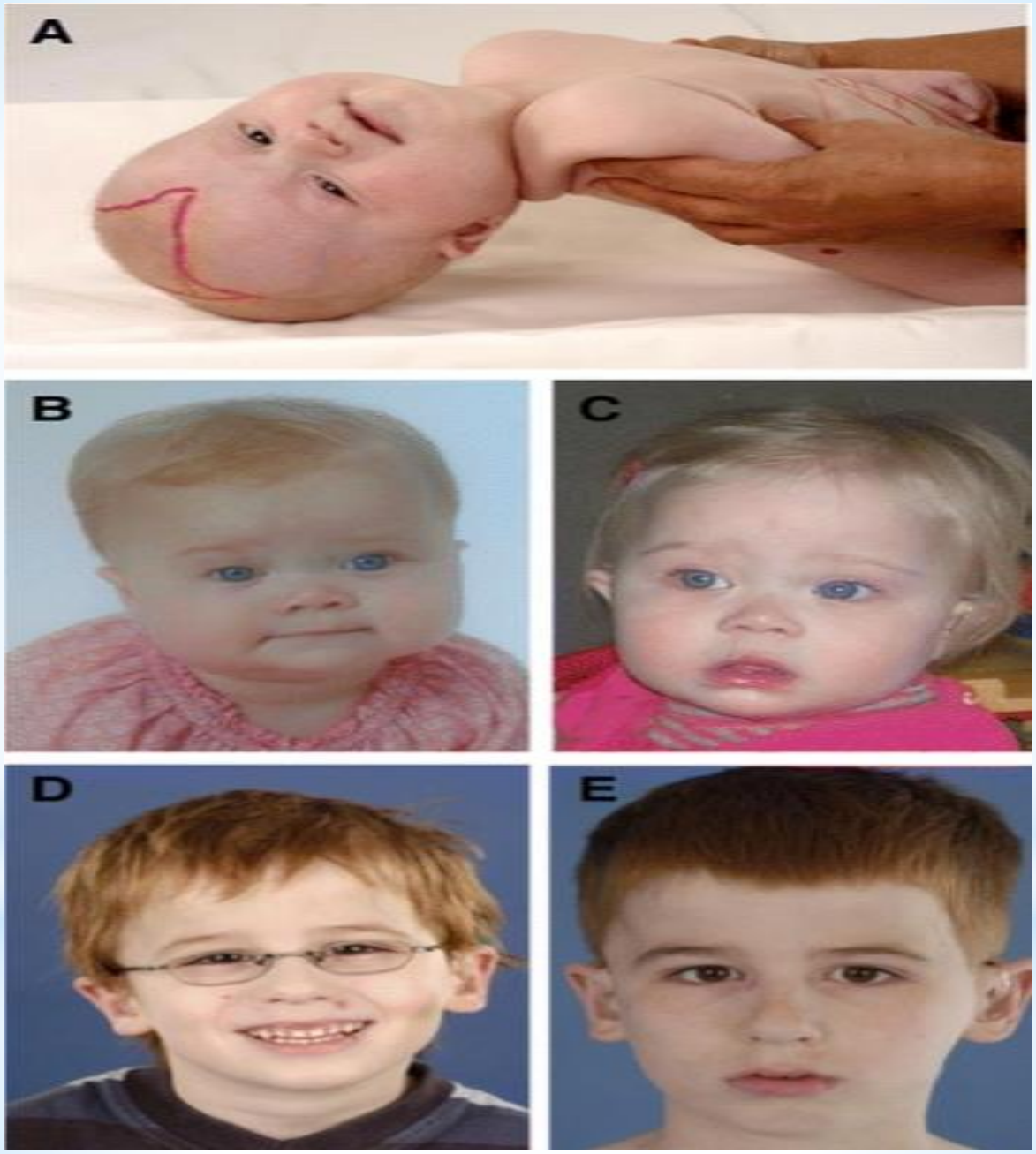
علائم سندرم زلوگر (Zellweger)

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 ، معمولا تجربه می کنند .این علایم عبارتند از:

از دست رفتن عملکرد پروکسی زومی و تخریب اسیدهای صفراوی ودیگرمحصولات لیپیدی. سطوح بالایی از آهن و مس در خون و بافتها. بزرگ شدن کبد.

فرم صورت: پیشانی بلند ، تغییر شکل گوشها و اختلالات عصبی همانند عقب ماندگی ذهنی و تشنج . گلوکوم و انحطاط شبکیه چشم و آب مروارید .اختلال در شنوایی . یرقان و خونریزی معده نیز ممکن است رخ دهد . کیستهای کلیوی .رشد غضروفی و استخوانهای بلند.

B
C


A
B
C
D
E