

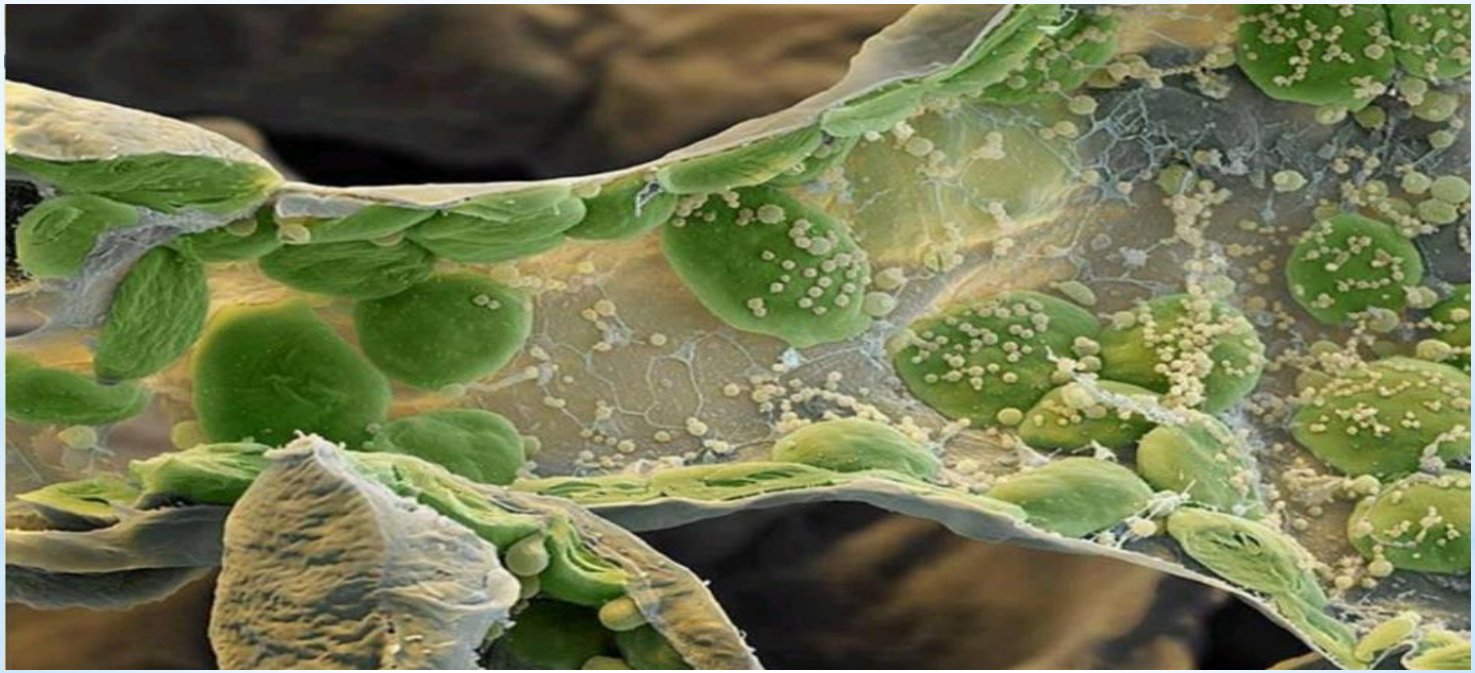
University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

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

اهداف

- ✓ استخراج ،جداسازي 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 درون‌سلولی
- ✓ تهیه لام خالص و سالم از کلروپلاست‌های ایزوله شده
- ✓ بررسي غير مستقيم وجود اندامک پروکسي زوم
- ✓ بررسی فعالییت آنزیم‌های اکسید کننده این اندامک

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

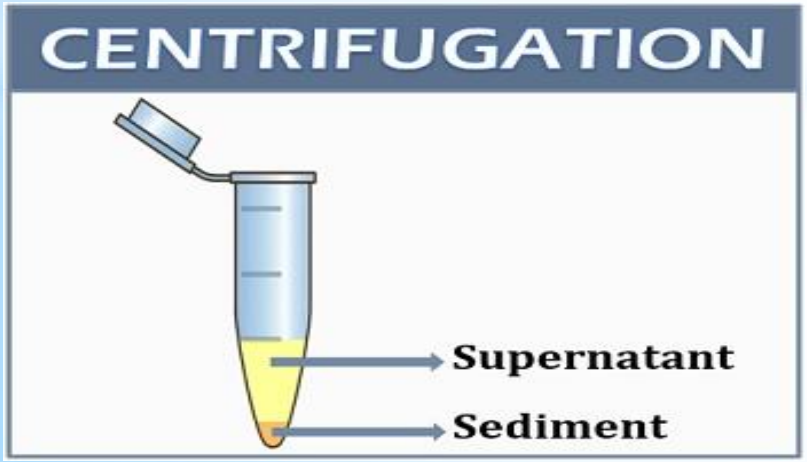
مقدمه

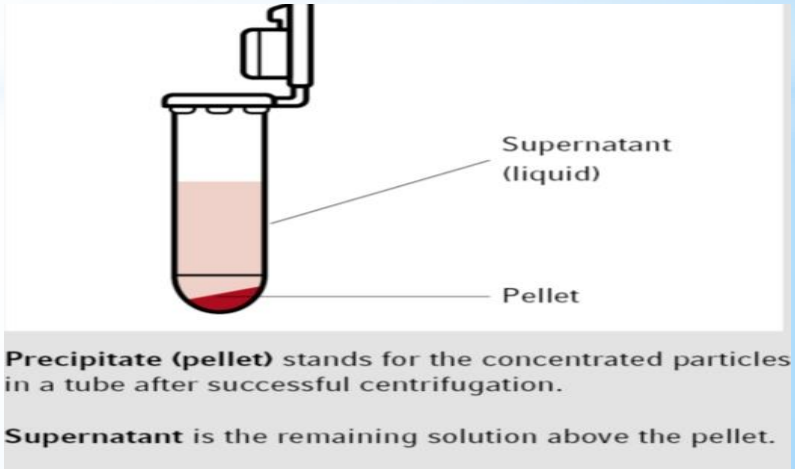
در اکثر گیاهان به خاطر داشتن ارزش دارویی بالا و وجود ترکیبات انتی اکسیدانتی و خاصیت ضد سرطانی، استخراج اندامک‌ها از جمله کلروپلاست از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

از طرف دیگرامروزه 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 می‌شود بطوریکه 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 مطلوبی 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 حاصل از هموژن کردن بافت، در بافر استخراج حاوي غلظت معيني از سوكروز با سرعت‌هاي مختلف، مرحله به مرحله سانتريفوژ شده تا انداماك‌هاي ياخته‌اي بر اساس تفاوت در شكل، اندازه و وزن از هم جدا شوند.
در پايان هر مرحله از سانتريفوژ رسوب در ته لوله و سوپرناتانت در قسمت رويي قرار مي گيرد.
كم‌كم در مراحل بعد سرعت سانتريفوژ كردن افزايش مي‌يابد تا خالص سازي نهايي صورت گيرد. در سرعت پايين و زمان كم، كمترين نيرو به عصاره سلولي وارد و بزرگترين و سنگين‌ترين اجزاءسلولي ته‌نشين مي‌شوند و اجسام سبكتر در قسمت رويي قرار مي‌گيرند. با سانتريفوژ مجدد قسمت رويي يا سوپرناتانت در ميدان قوي‌تر به ترتيب اجزاء بيشتري از هم جدا مي‌شوند. بنابراين مرحله به مرحله جداسازي انجام مي‌شود.





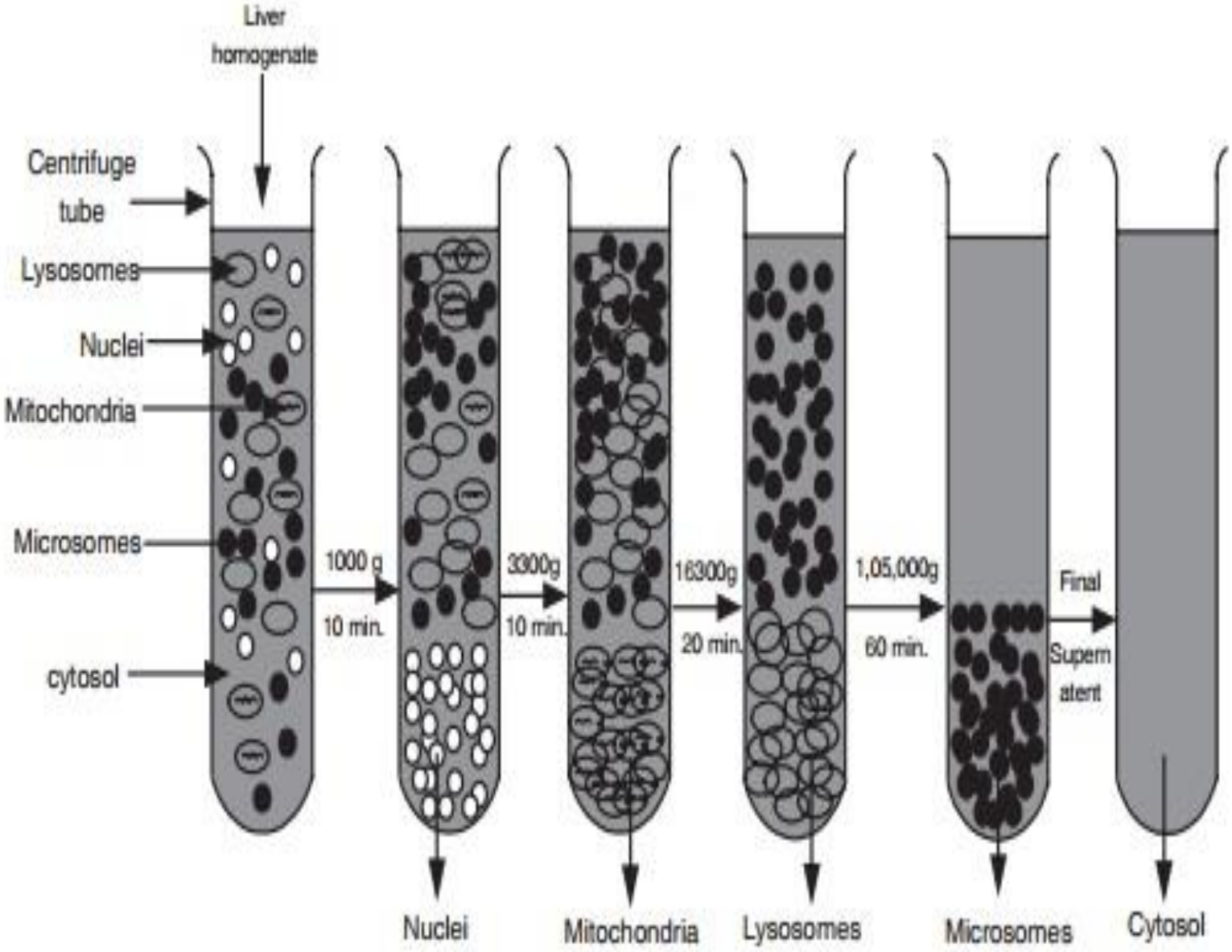


Fig. Differential sedimentation of subcellular organelles

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 بین 1 تا 2 میکرون دارند قسمت هاي مختلف کلروپلاست,شامل موارد زیر است:

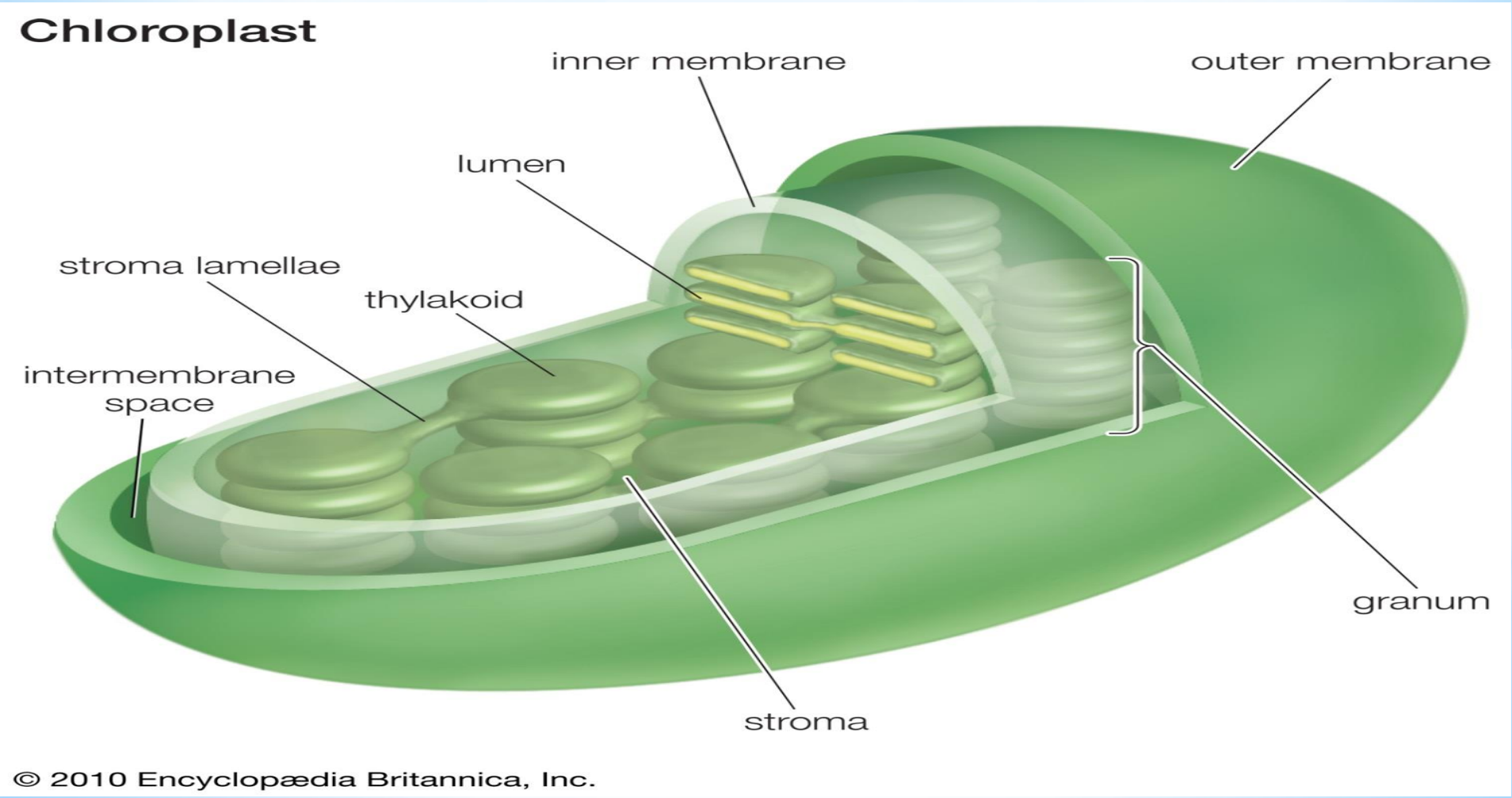
غشای خارجی: این غشا به عنوان لایه بیرونی کلروپلاست‌ها محسوب می‌شود و از جنس غشا سلولی است که فضای درونی کلروپلاست را از سیتوپلاسم سلول جدا می‌کند.

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

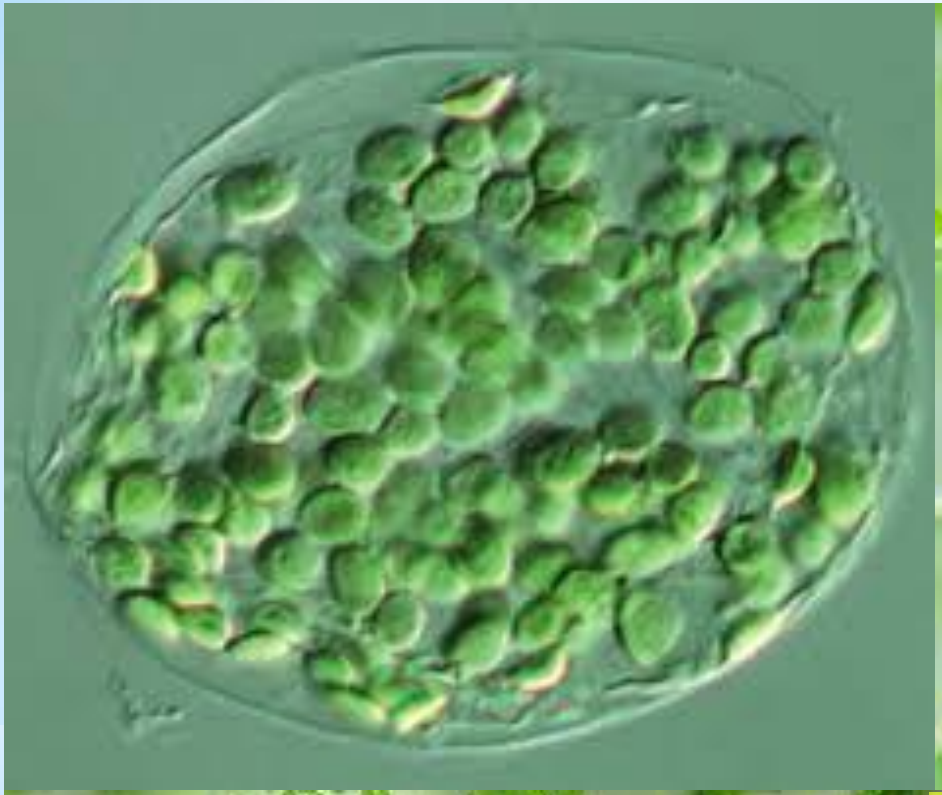
فضای بین دو غشا: بین دو غشای خارجی و درونی کلروپلاست فضایی وجود دارد که مایعی آن را پر کرده است. این مایع از آب و ترکیبات آلی و نمکهاي کاني ویون هاي انها تشکیل می‌شود، به این ناحیه، فضای بین غشایی می‌گویند.

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 ریبوزوم هاي ازاد پلي زوم ها و نسخه‌هایی از ژنوم کلروپلاست است .

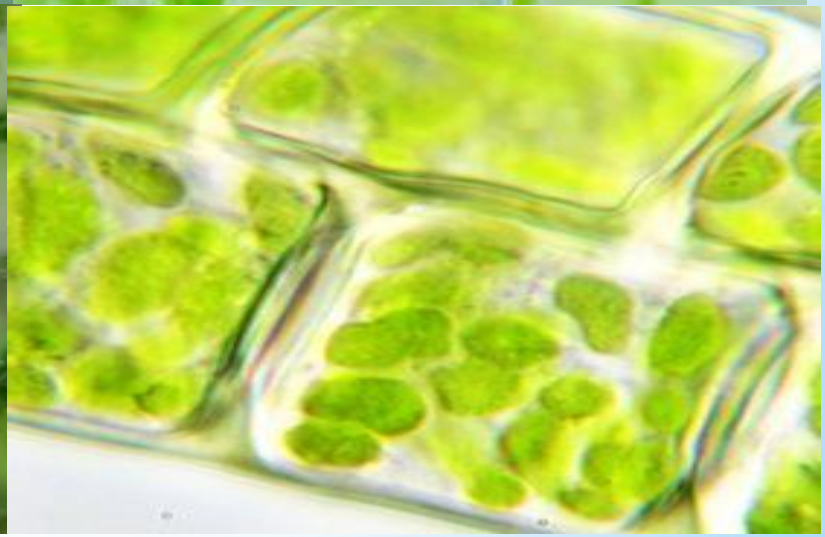


کلروپلاست در سلول سالم









آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر


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 پی‌پت
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

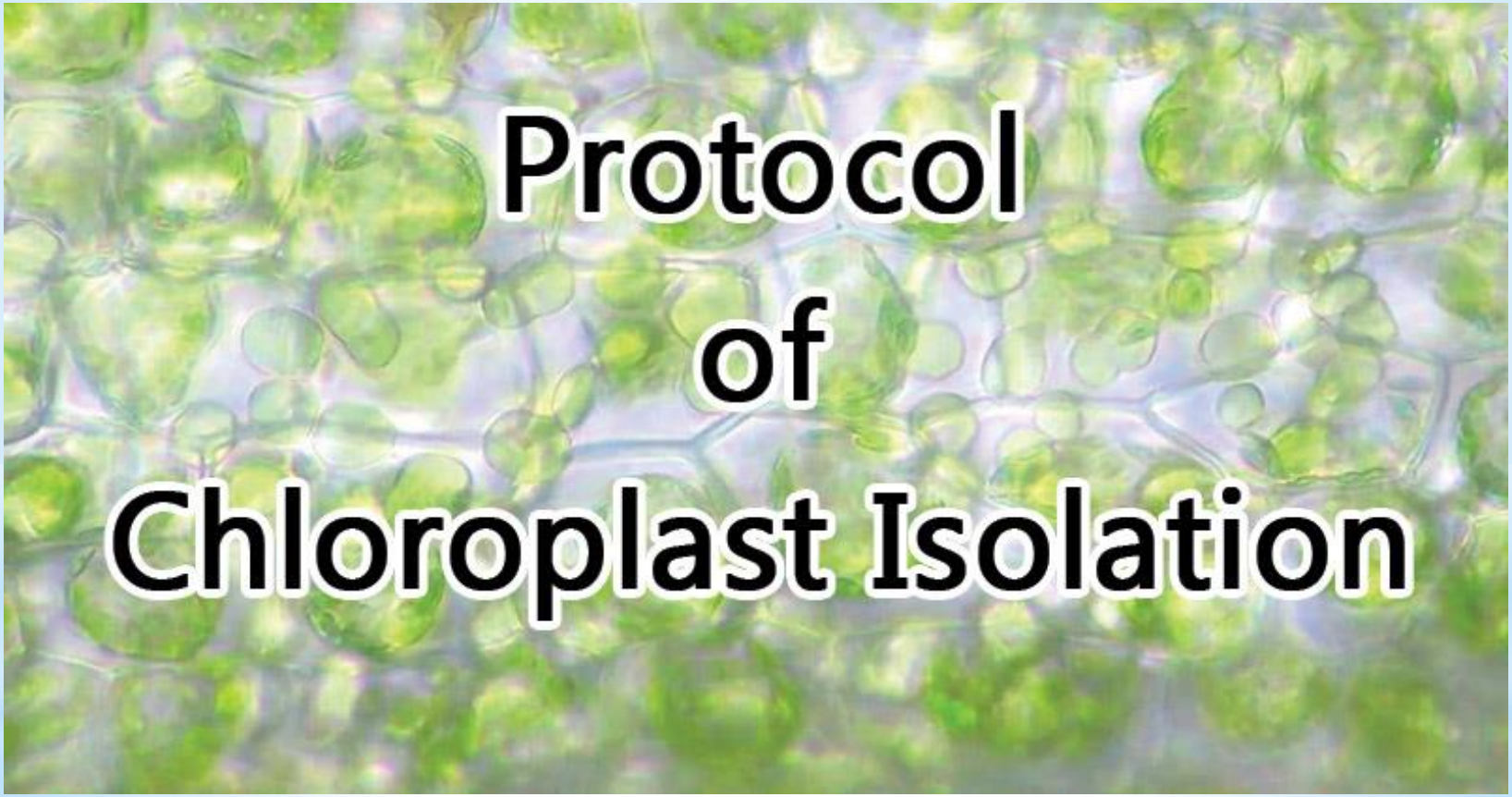
موارد فوق را به نسبت ذکر شده مخلوط کرده و PH را به کمک دستگاه PH متر به 6.5 برسانید. محلول فوق را در ظرفی در بسته در یخچال نگهداری و هنگام مصرف با آب مقطر 6 بار رقیق کنید.

طرز تهیه سوکروز 0/4 مولار

سوکروز	0/4 مولکول گرم	گرم 342×0/4=136/8
آب مقطر	1000 میلی لیتر	

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

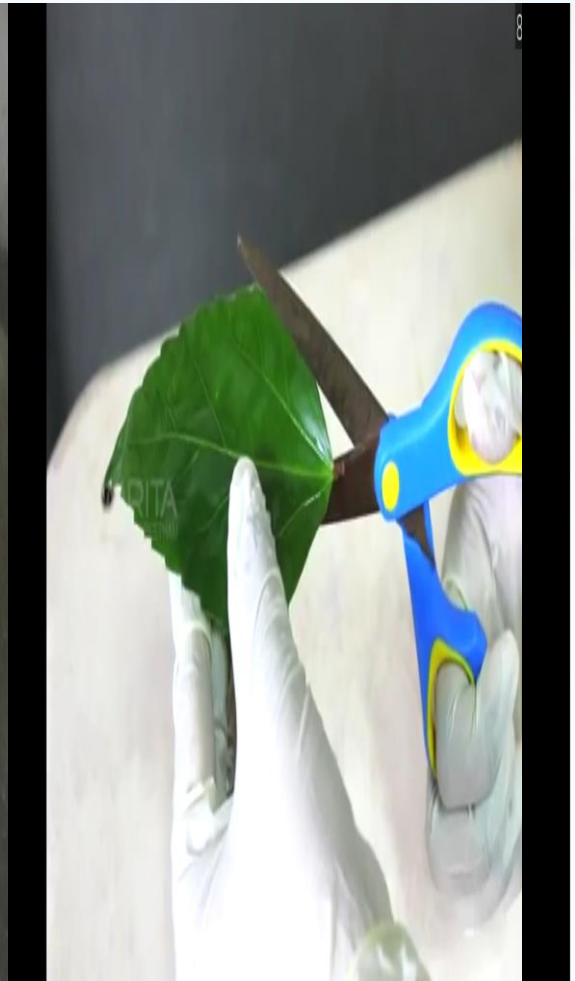
روش کار



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 آنزیم‌ها حداقل شود.

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






3 .به ازاء هر گرم وزن برگ 4 میلی لیتر از محلول بافری (بافر فسفات با PH= 4 .0) 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 5-4 دقیقه در1000 rpm یا 200g سانتریفوژ کنید تا یاخته‌های شکسته شده، هسته‌ها و زوائد دیگر برگ رسوب کنند.



5.محلول رویی حاصل از مرحله قبل را جدا کرده و به مدت 10 دقیقه در3000 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، کرک های تک سلولی ساده و غده‌ای، کریستالهای گیاهی، 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.

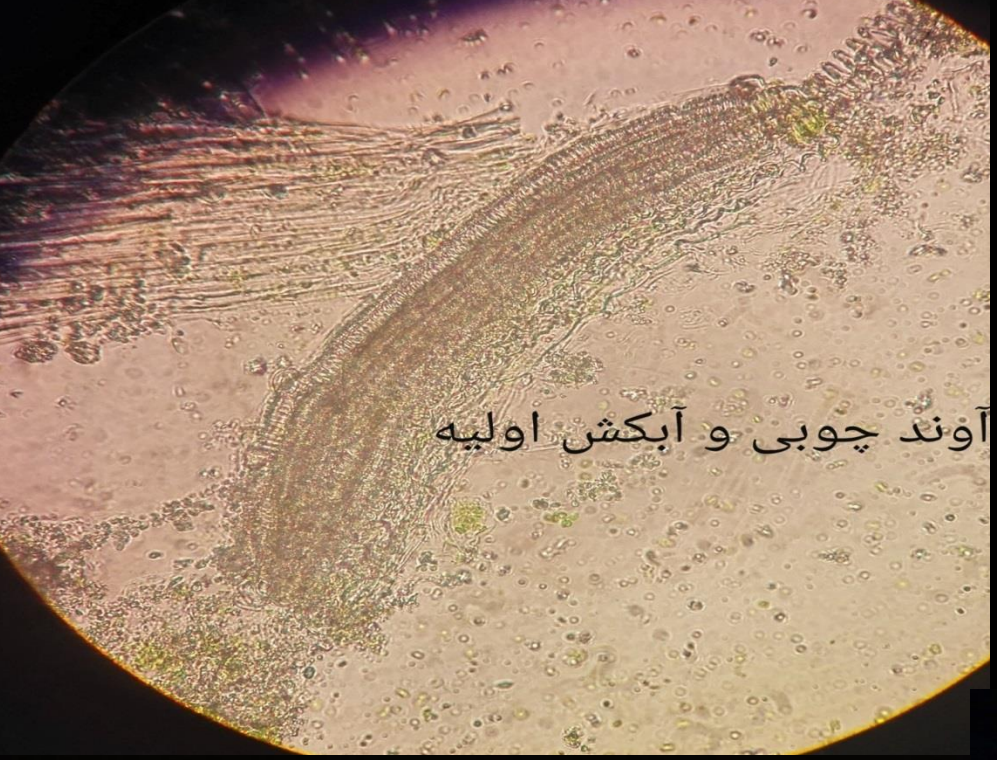


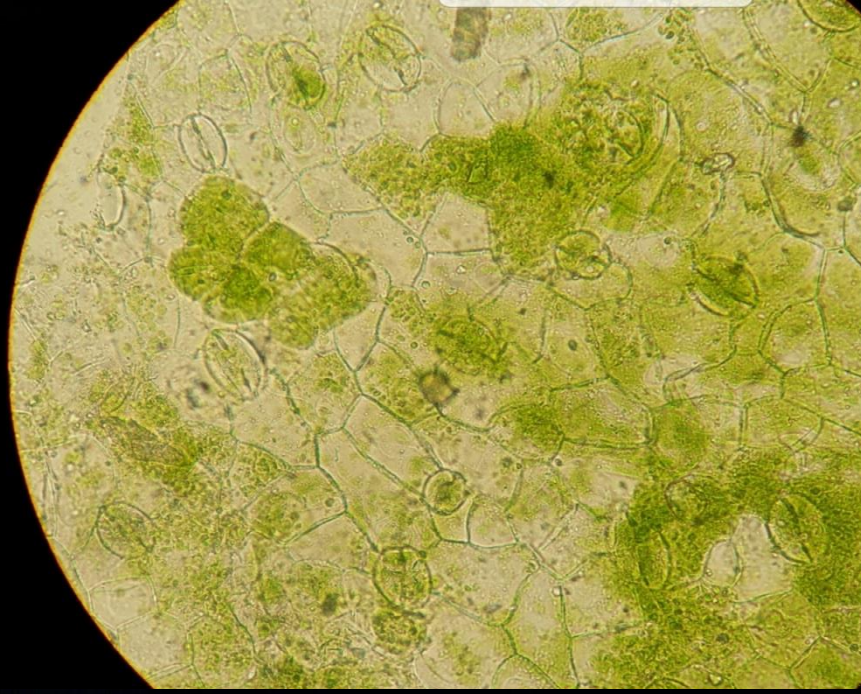

88% 19:48

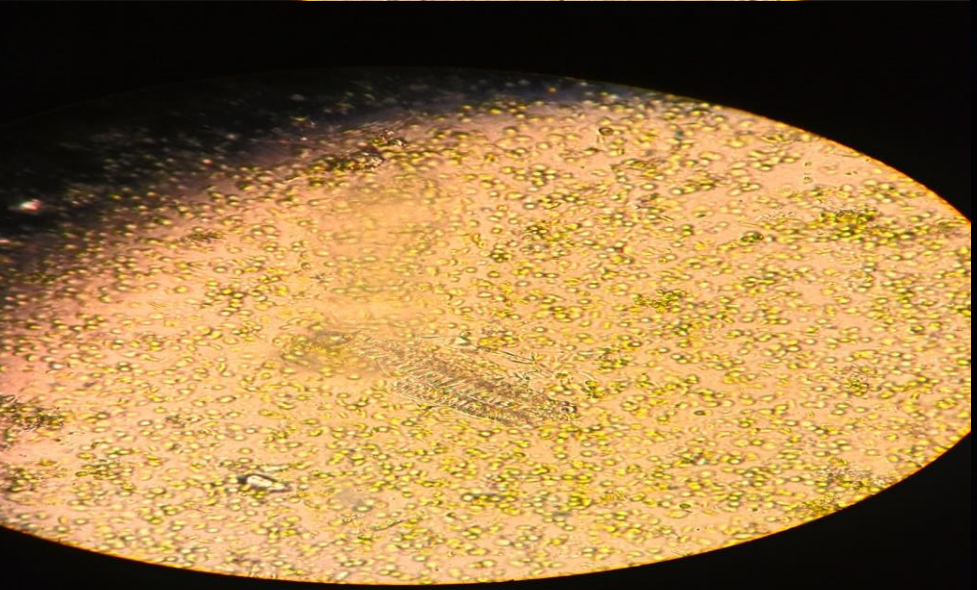


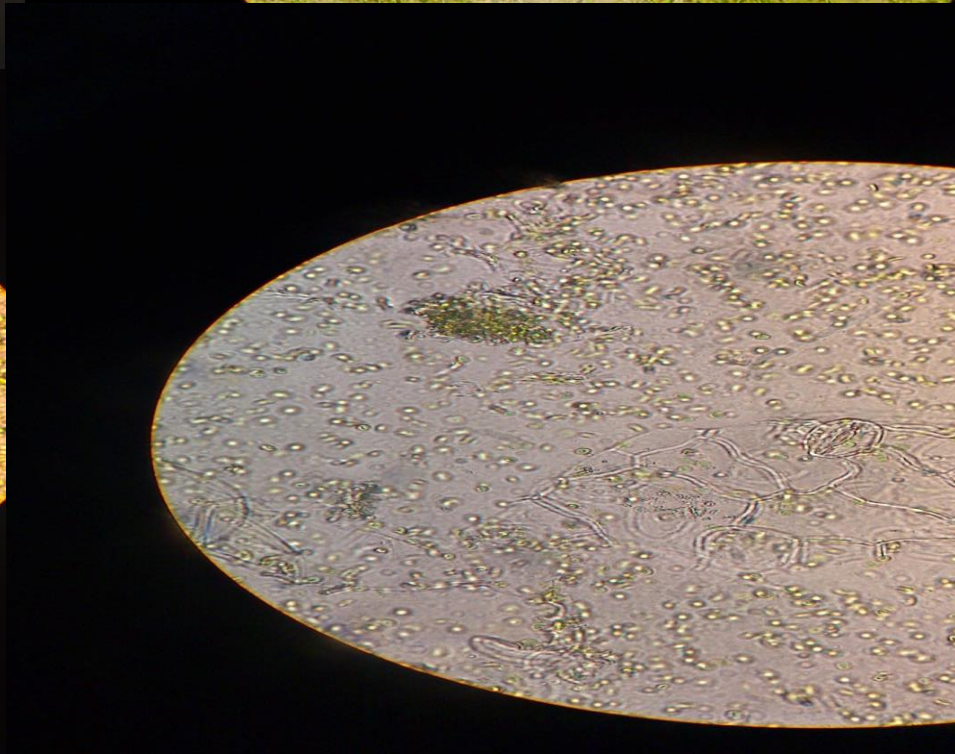

کریستال Drus


کرک غده ای چند سلولی
مشاهدات سلولی رسوب حاصل از مرحله


آوند چوبی و آبکش اولیه







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 دور3000 rpm مجدداً 10 دقیقه سانتریفوژ کنید. این عمل را در صورت لزوم تا خالص سازی کلروپلاست 3-2 بار تکرار کنید.



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

سوال

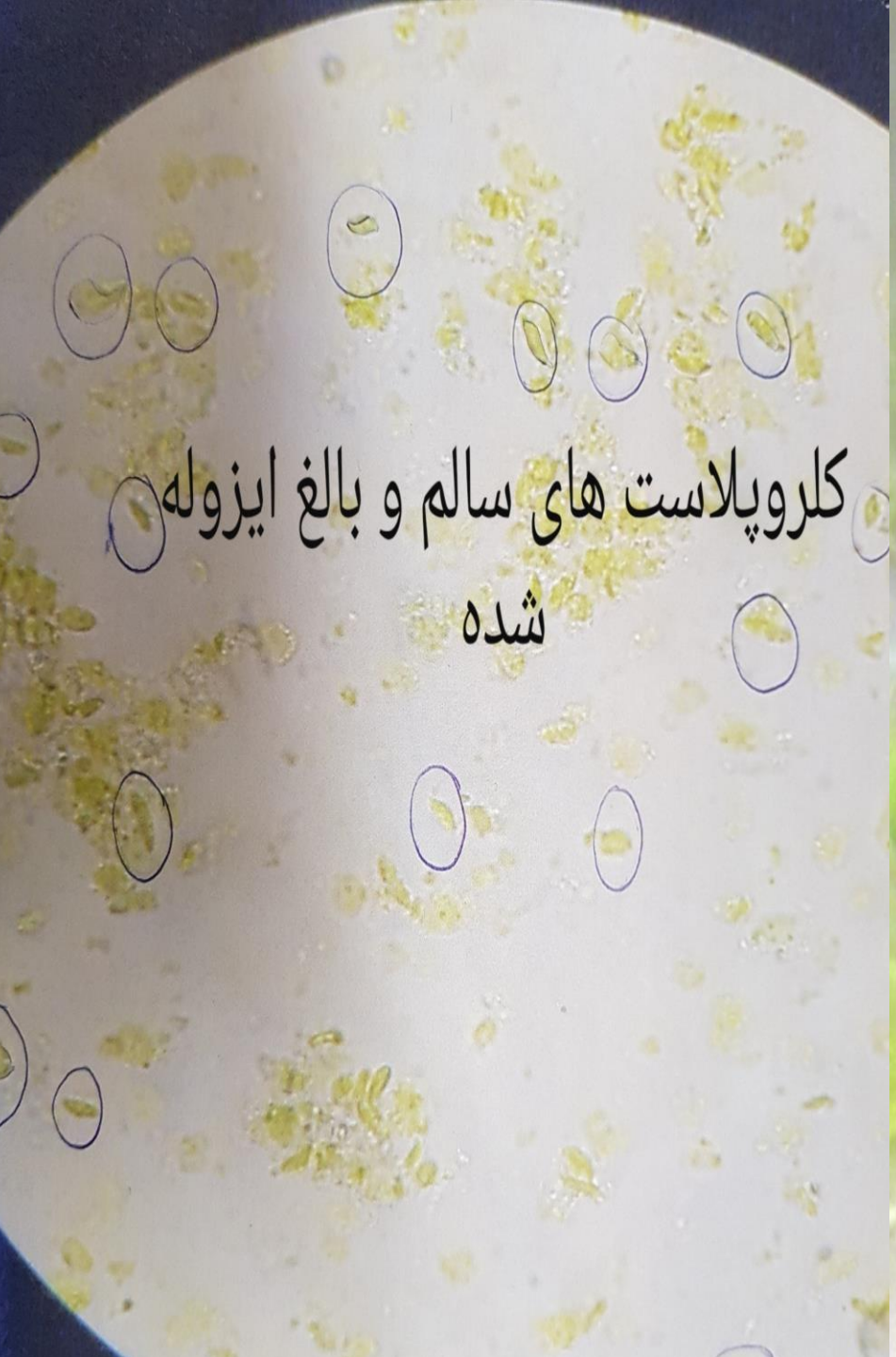
آیا شکل عمومی همه کلروپلاست‌های استخراج شده یکسان است؟چرا؟

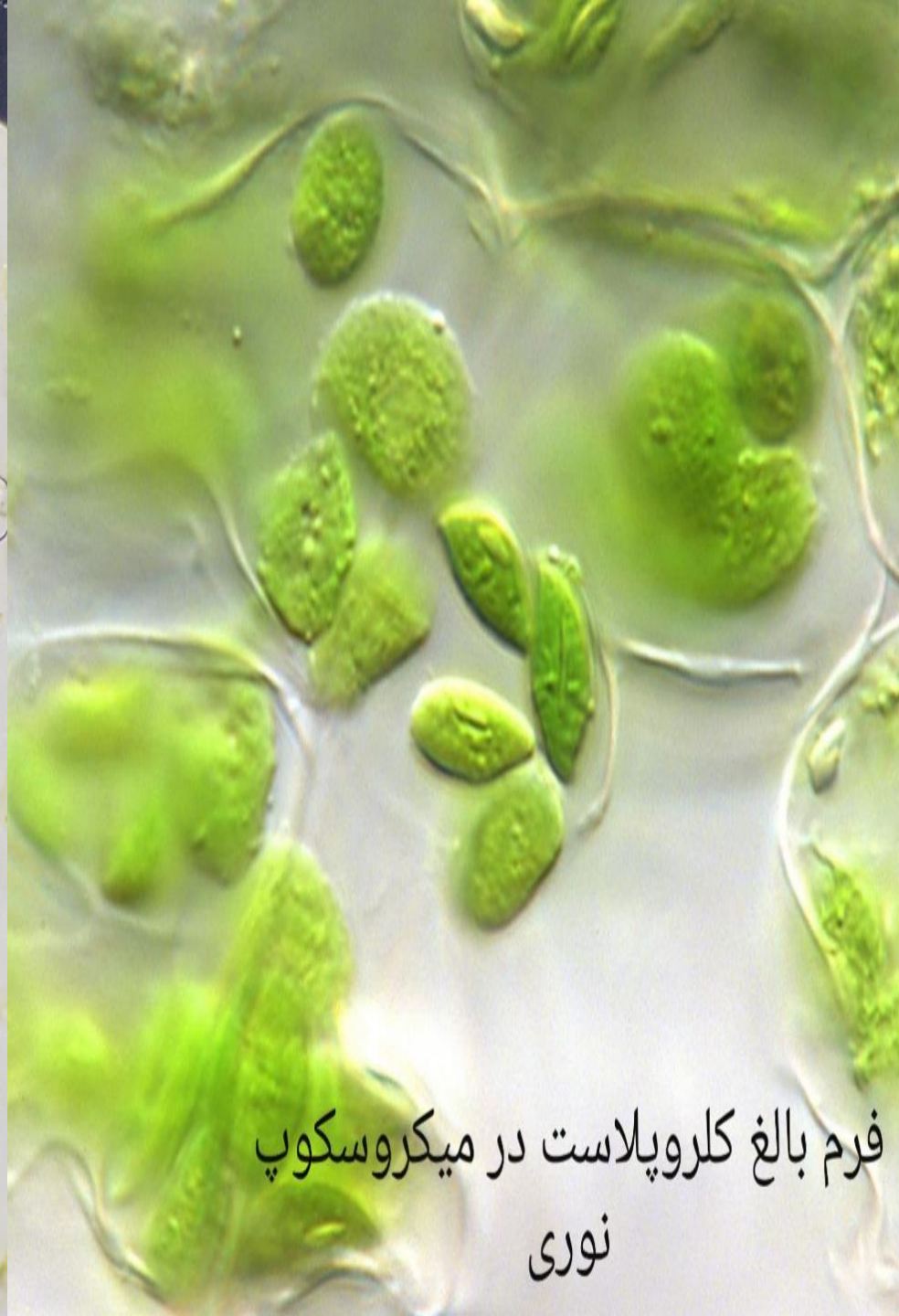
در سلول گیاهی سالم موقعیت کلروپلاست نسبت به سایر اجزاء سلول چگونه است؟ چرا؟



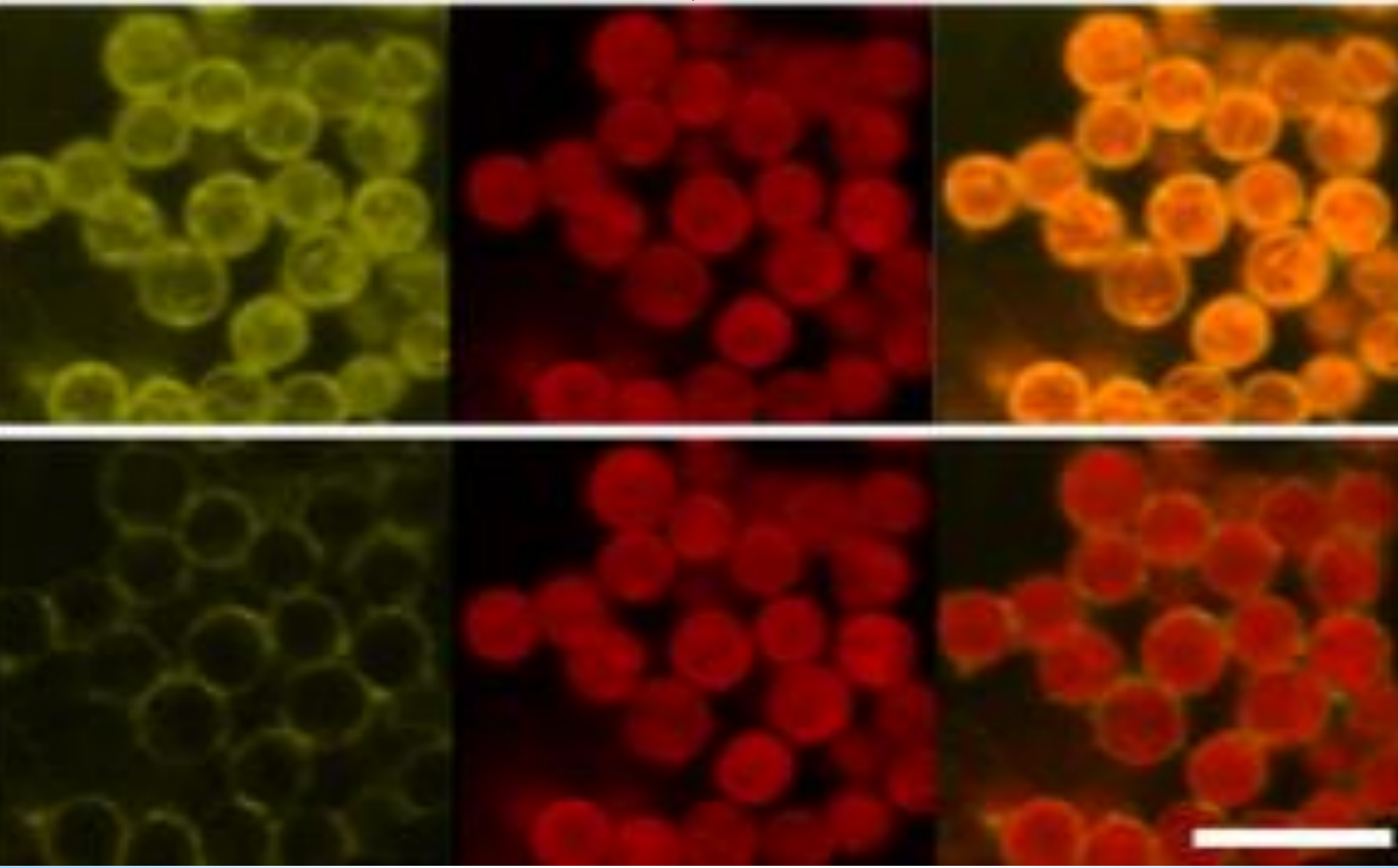





کلروپلاست های سالم و بالغ ایزوله شده


فرم بالغ کلروپلاست در میکروسکوپ نوری

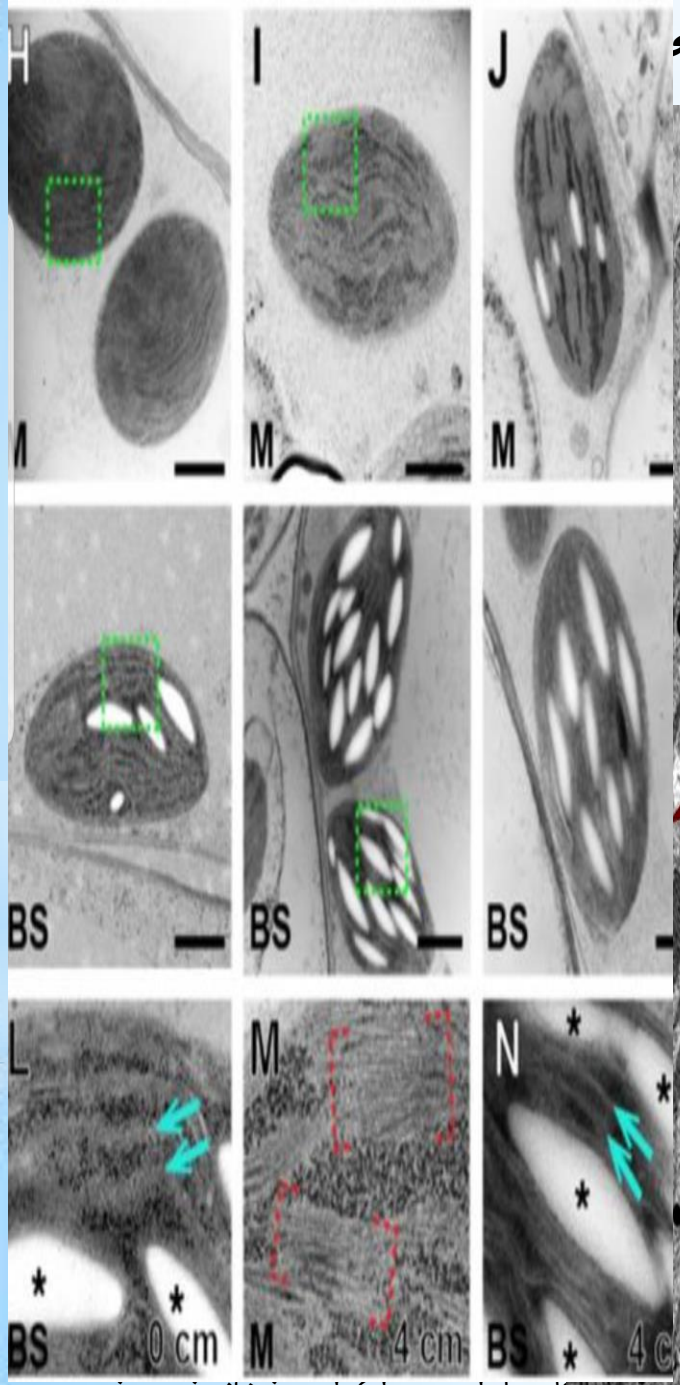
کلروپلاستهاي رنگ شده توسط ردامین مشاهده در میکروسکوپ فلورسنت

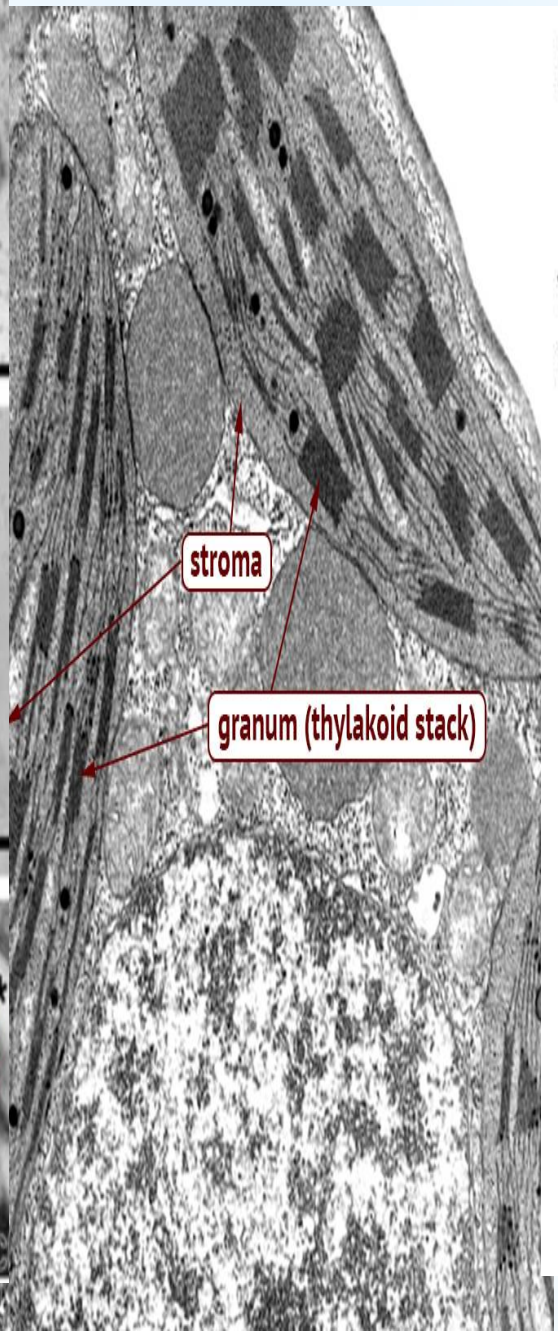


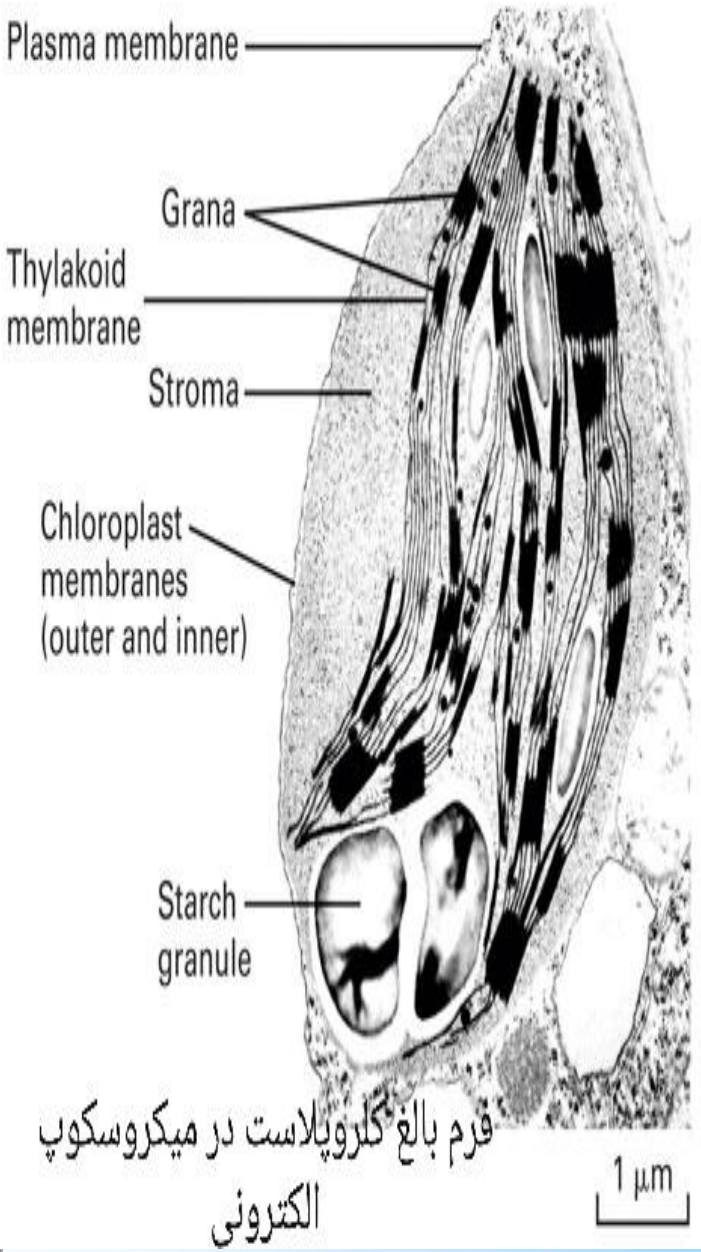
توجه: رنگ ردآمین معرف کلروپلاست است و آن‌ها را به رنگ قرمز در می‌آورد.

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

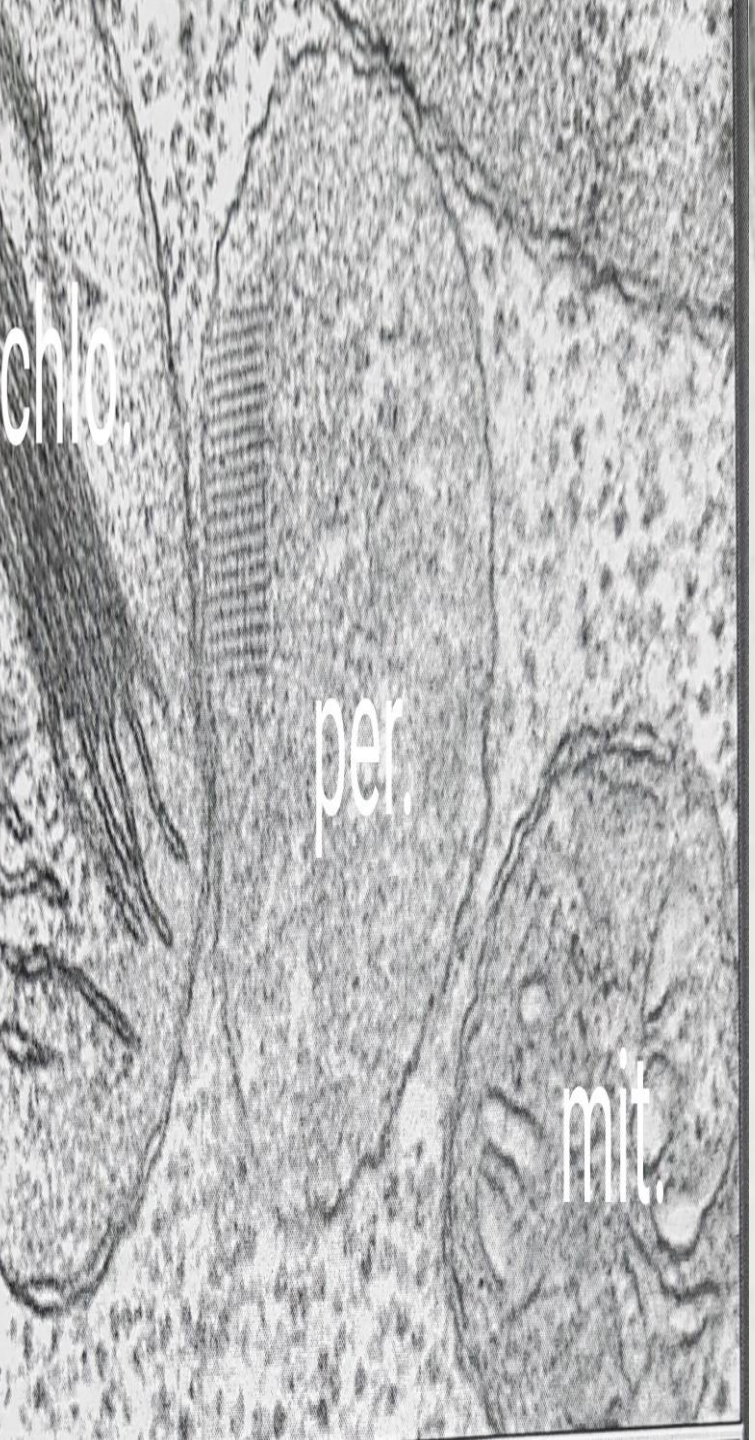
تصاویر کلروپلاست در میکروسکوپ الکترونی

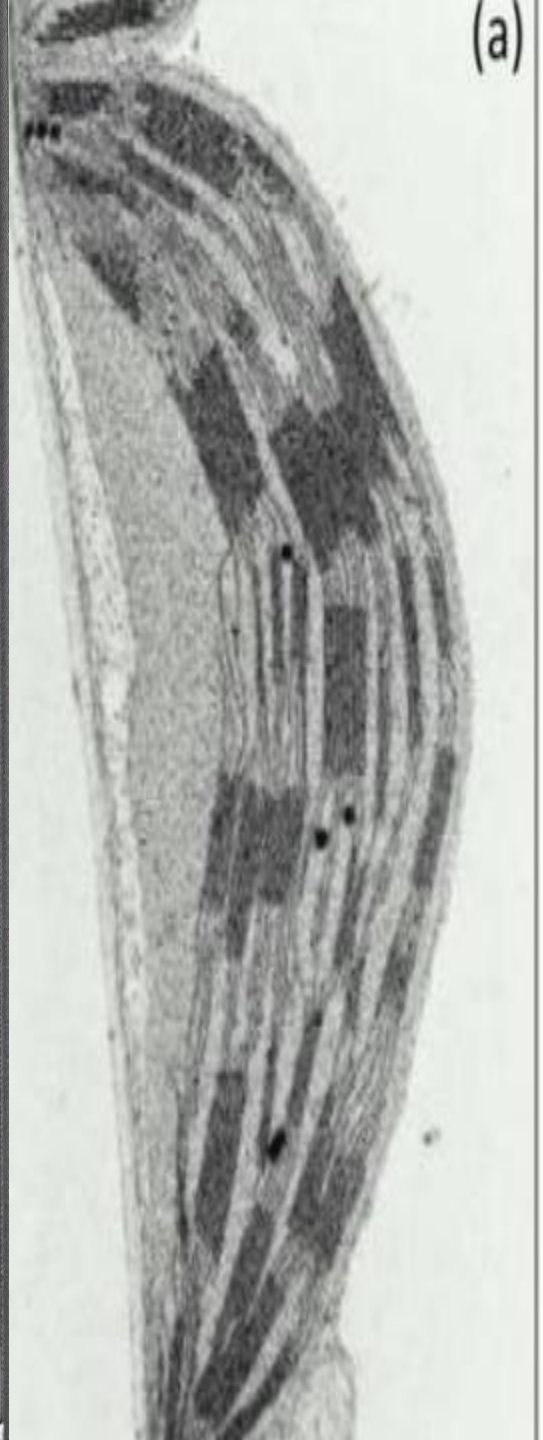


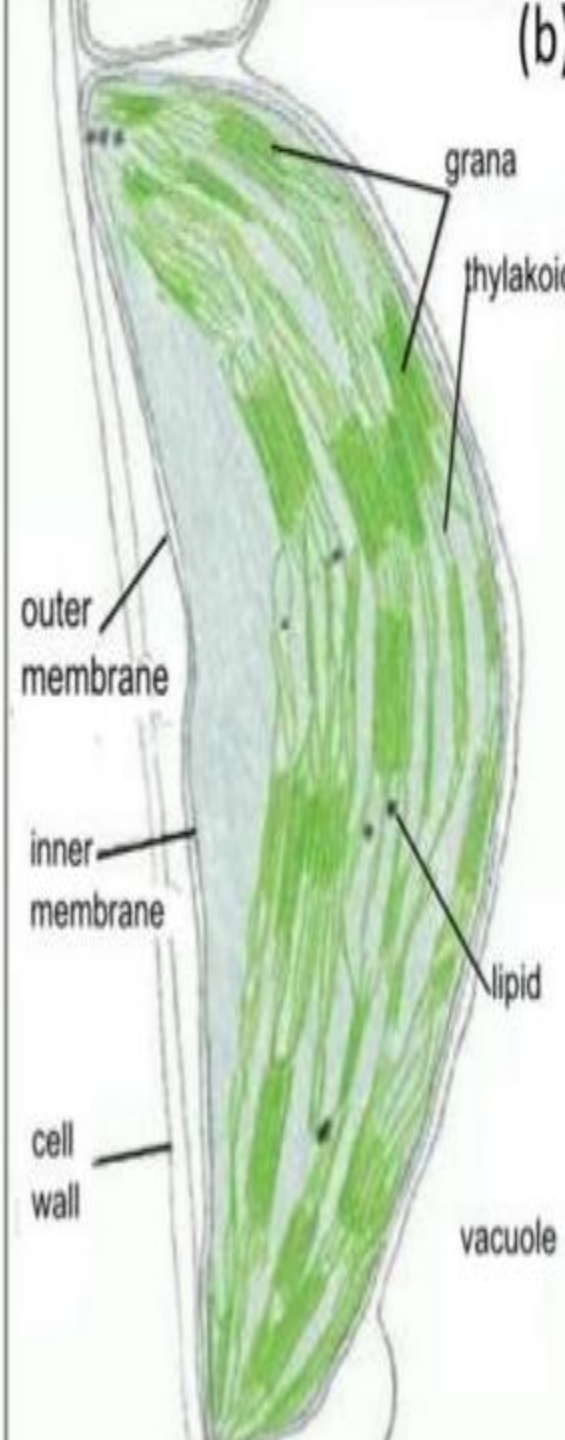




فرم بالغ کلروپلاست در میکروسکوپ الکترونی


chlo.
per.
mit.


(a)


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

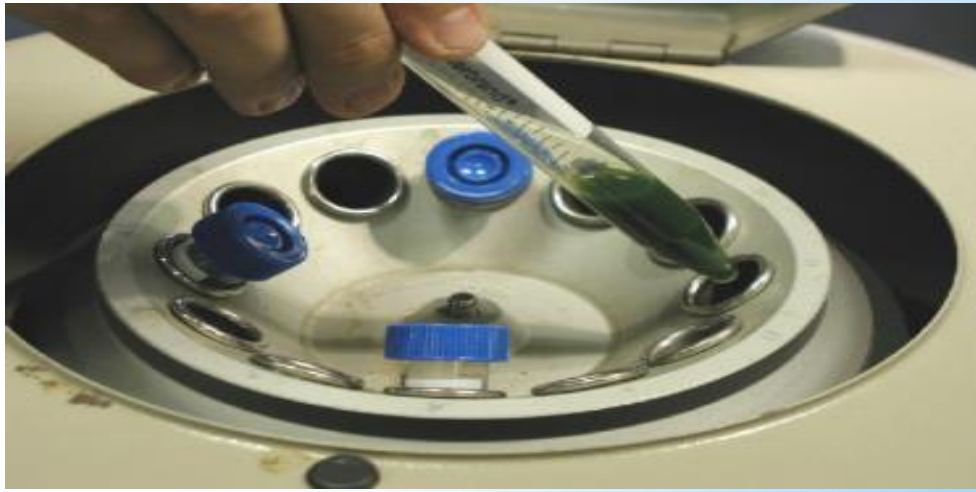








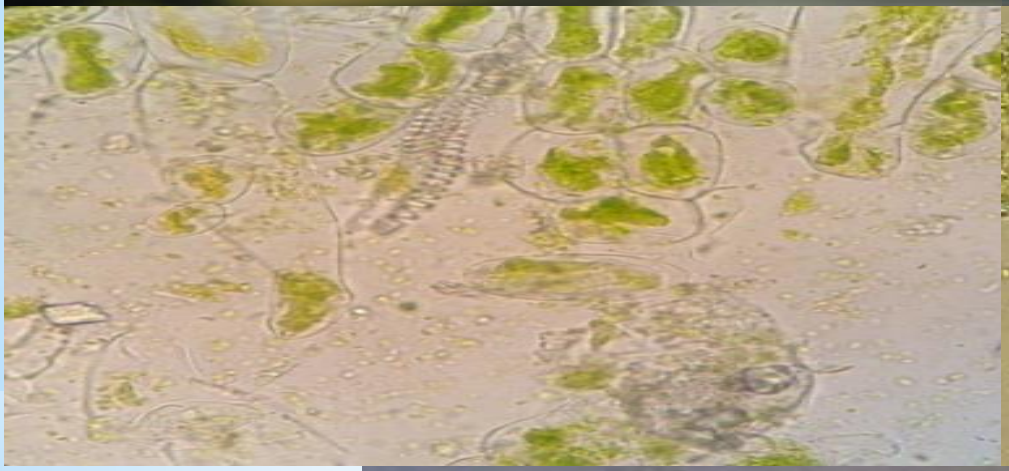


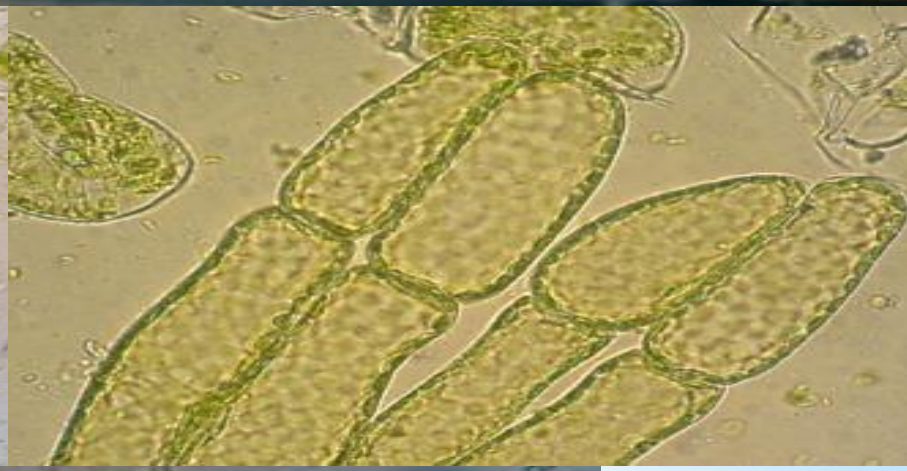


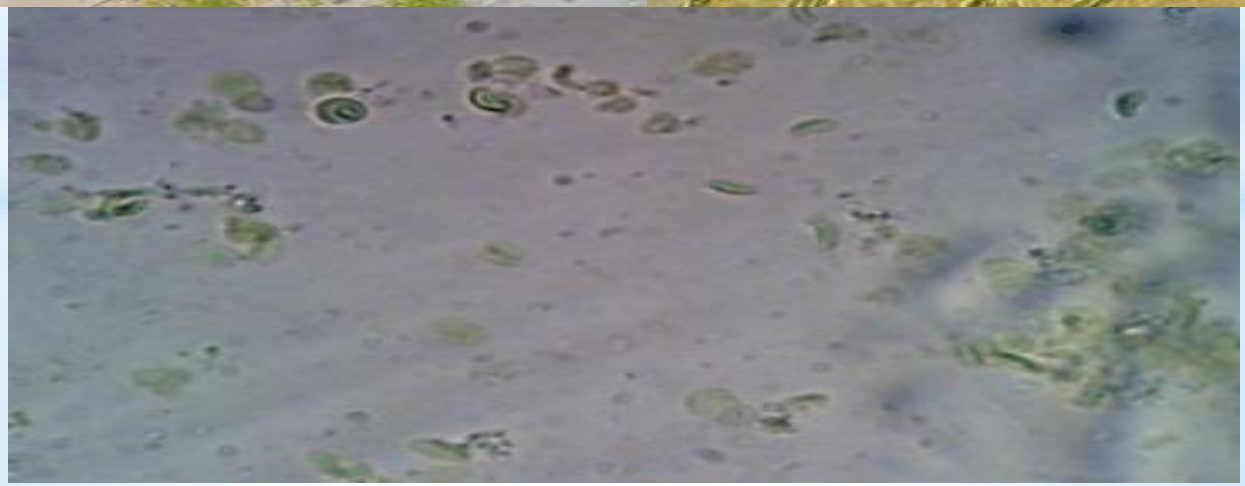
مراحل استخراج اندامک کلروپلاست









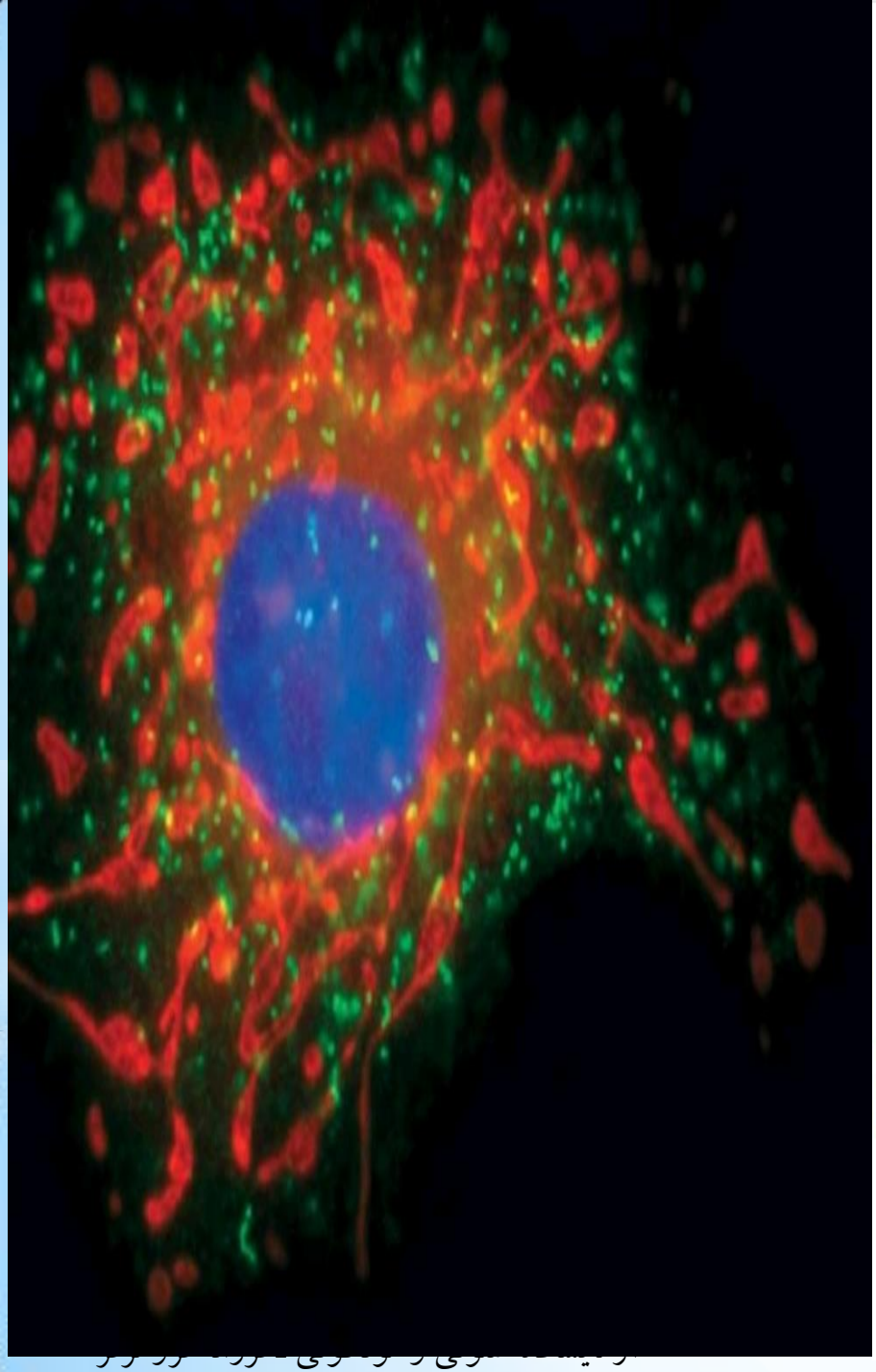


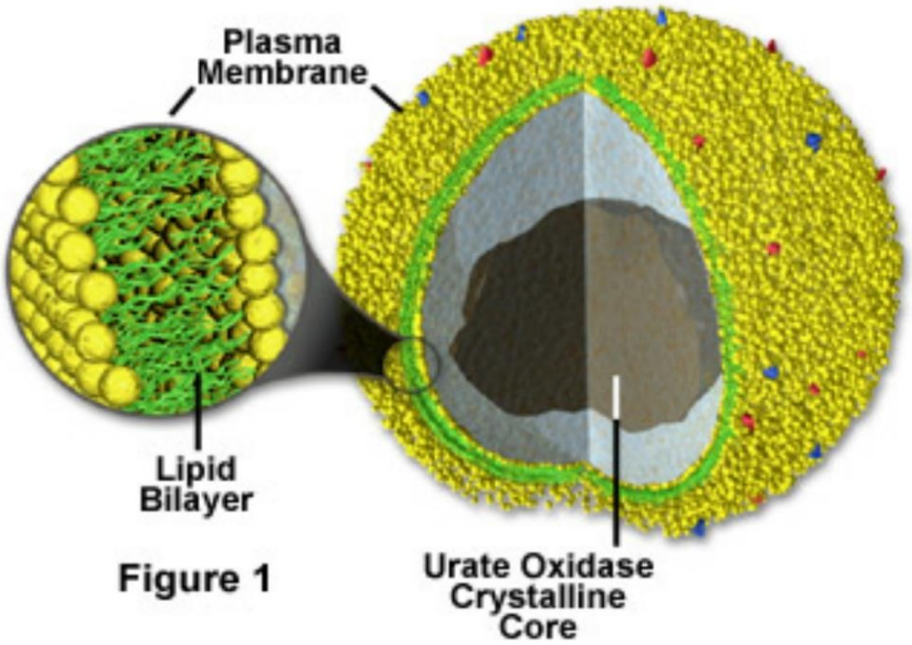
مشاهدات میکروسکوپی وماکروسکوپی

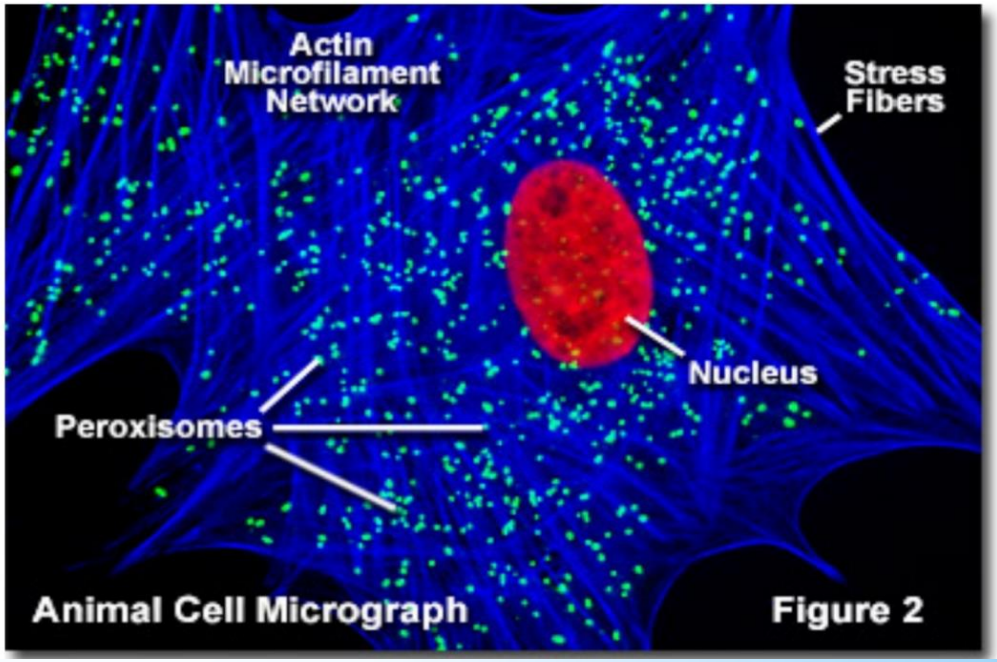
آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

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 وآنزیم های آن بخصوص کاتالاز توسط ریبوزوم های آزاد سیتوپلاسم ساخته می شوند.
- ✓ دارای تک غشاء هستند.
- ✓ 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(O2)،پراکسید هیدروژن(H2O2)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 مولکول(H2O2)




Anatomy of the Peroxisome
Plasma Membrane
Lipid Bilayer
Urate Oxidase Crystalline Core
Figure 1


Actin Microfilament Network
Stress Fibers
Nucleus
Peroxisomes
Animal Cell Micrograph
Figure 2

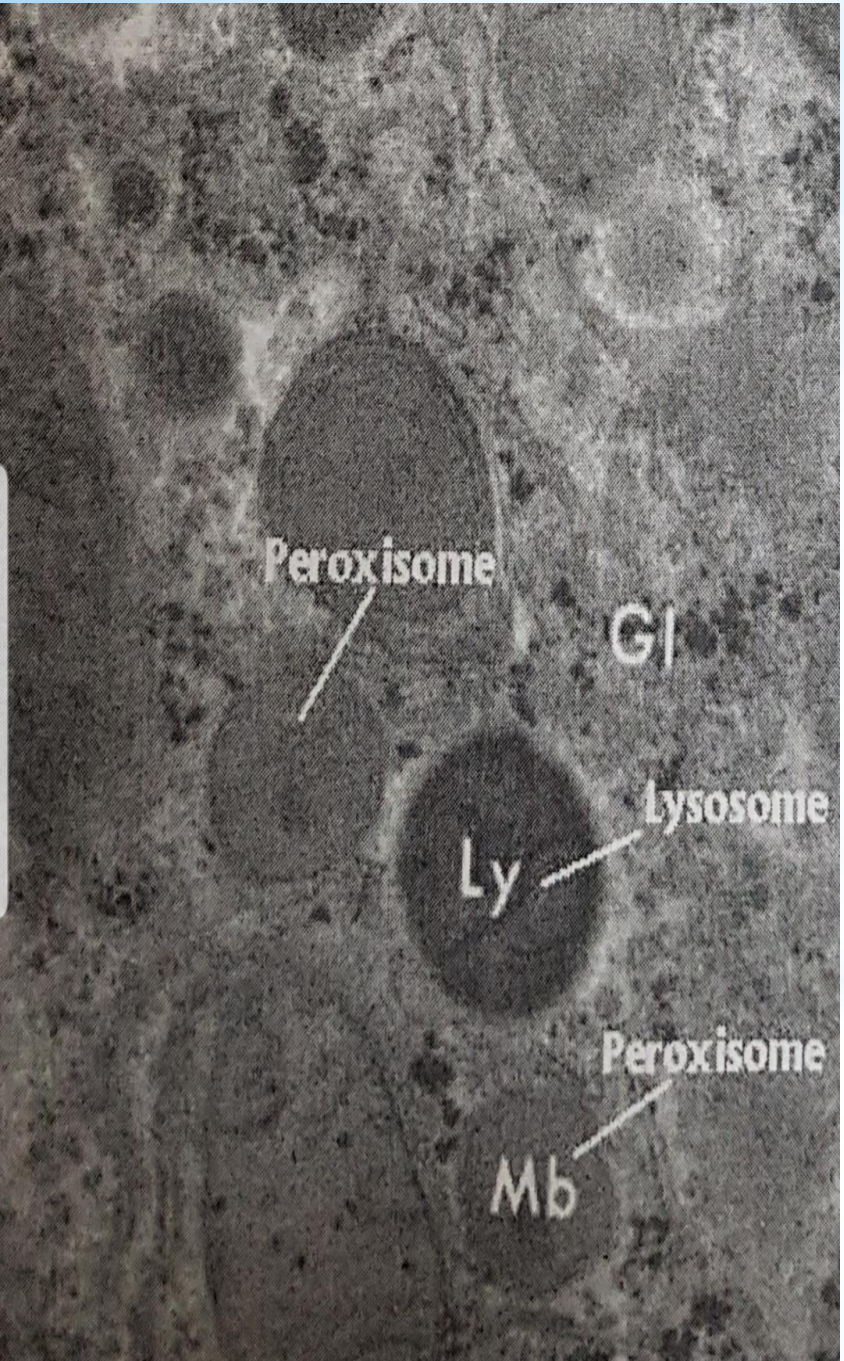


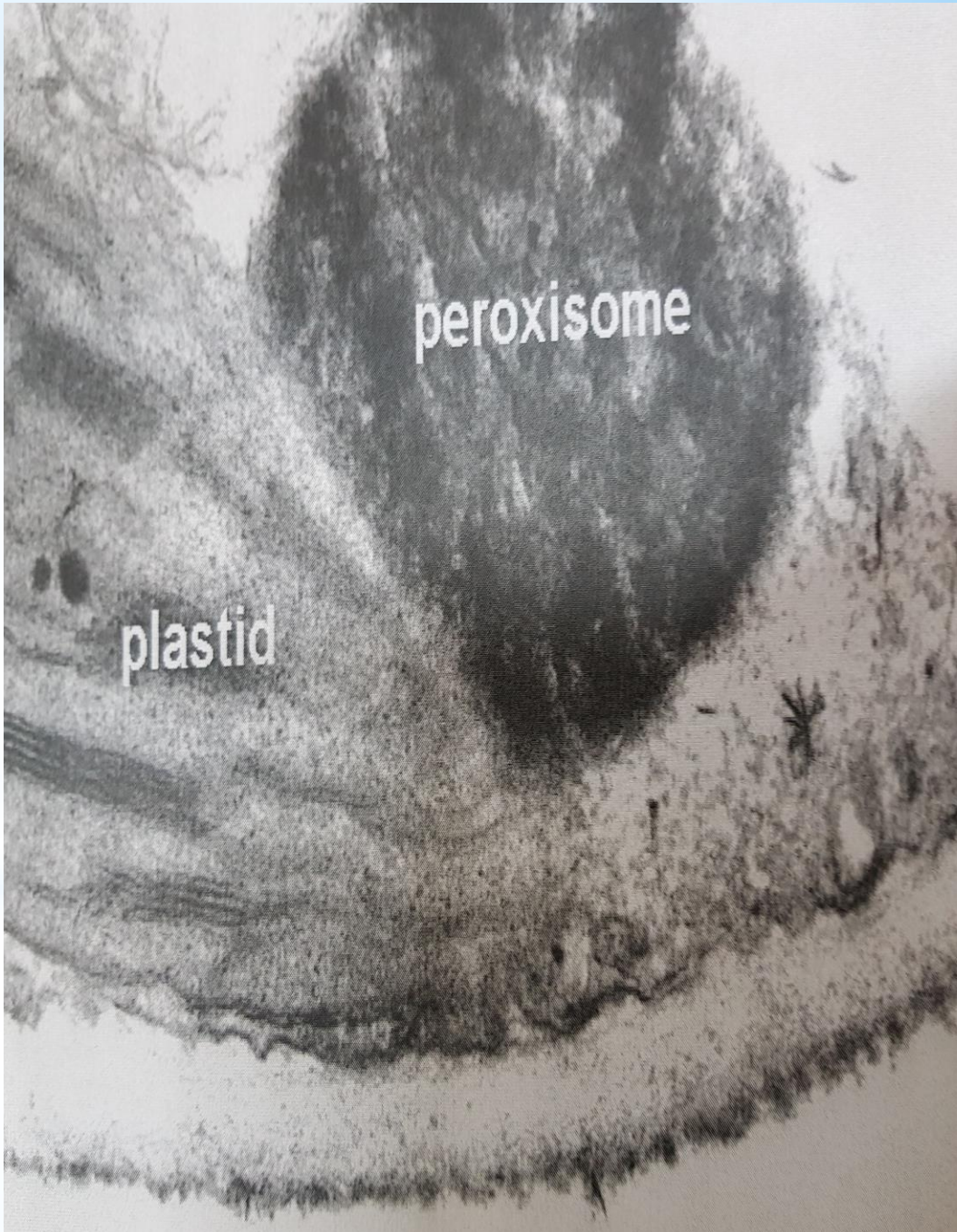






تصاویر پراکسی زوم در میکروسکوپ الکترونی







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 .
از دست رفتن عملکرد پروکسی زومی و تخریب اسیدهای صفراوی ودیگرمحصولات 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 وآهکی شدن غیر طبیعی در انتهای رشدی غضروفی استخوانهای بلند افزایش مقادیر اسیدهای چرب زنجیره بلند پلاسمایی .درنتیجه در سندرم Zellweger با تجمع اسیدهای چرب طویل الزنجیر در پلاسما و بافتها تشخیص داده می شود.




A


B


C


B
C


D


E


Photos courtesy of the Global Foundation for Peroxisomal Disorders