ТАҚЫРЫБЫ: ҰЛПАЛАРДЫ ТАЛҚАНДАУ ӘДІСТЕРІ

Гомогенизация, гомератор құрылысы

Жоспар

1. Гомогенизация түсінік
2.Гомератор құрылысы
3.Ұлпаларды талқандау әдістері

Терминдер

- **Буфер** - деп оған қышқыл немесе негізді қосқан кезде сутегі иондарының концентрациясының өзгеруіне жол бермейтін ерітінідіні айтамыз. Ерітіндінің осындай әсерін буферлік деп атайды. Буферлік әсердің деңгейі буферлік сиымдылықпен (β) сипатталады.
- **Гомогенизация** дегеніміз - буфердің ішіндегі клеткалар мен ұлпаларды талқандап, біртекті қоймалжың сұйыққа айналдыру.
- **Ауыр металдар** – тығыздығы темірдің тығыздығынан (7,874 г/см3) артық болатын түсті металдар тобы. Оларға мырыш, қорғасын, қалайы, марганец, висмут, мыс, сынап, сүрме, никель, кадмий жатады.
- **Индикатор деген** – қышқылдар мен сілтілерде түсін өзгертетін зат. Химияның ерте кезеңдерінде лакмус секілді өсімдік түстері (қынаның бір түрінен жасалады) индикатор ретінде қолданылған. Лакмус қышқылдарда қызыл, ал сілтілерде көк түсті.
- **Суспензия** (лат. suspensum, лат. suspendere-өлшеу, ілу) — сұйық суда, глицеринде, сұйық майда және т. б. суспендирленген бір немесе бірнеше қатты дәрілік заттар бар дисперсиялық жүйе болып табылатын сұйық дәрілік түрі.
- **Фарфор** (тур. farfur, fağfur, перс. faghfur) - су және газ өткізбейтін керамика түрі. Жұқа қабатта жарық болады. Ағаш таяқшамен жеңіл соққы кезінде тән жоғары таза дыбыс шығарады. Бұйымның пішіні мен қалыңдығына байланысты, түсі әртүрлі болуы мүмкін.

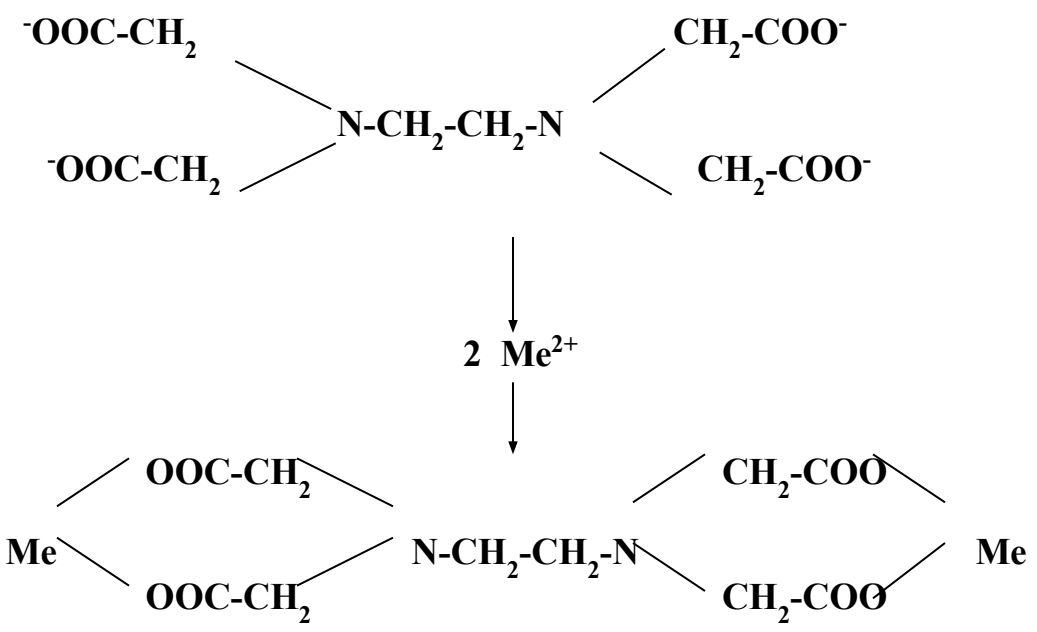
Гомогенизация түсінік

- **Гомогенизация (homogenization) homogenes-біртекті]-**қандай да бір затты өз пішінін жоғалтқанша ұсақтау, мысалы. оны ұнтақтау және араластыру жолымен. Г. ағзалар мен тіндердің құрамында әртүрлі заттардың болуын анықтау, оларда қандай да бір ферментті немесе қосылысты немесе оларды кейіннен оқшаулауды анықтау үшін жүзеге асырылады.
- **Гомогенизация** дегеніміз - буфердің ішіндегі клеткалар мен ұлпаларды талқандап, біртекті қоймалжың сұйыққа айналдыру.
- - гомогенизацияның нәтижесінде берілген ұлпаға тән морфологиялық және биохимиялық қасиеттер жоғалады.
- -егер гомогенизация белгілі бір химиялық қосылысты бөліп алу үшін алдын-ала жасалған әрекет болса – ұлпаның жоғарыда айтылған қасиеттерінің жоғалуы соншалықты маңызды емес.
- **Гомогенизацияның мақсаты** – ұлпаларды, клетка қабықшасын, немесе мембранасын талқандап, оның ішіндегі сұйығын шығару болып табылады.

Ұлпалар мен клеткалардың гомогенаттарын дайындау

- Клеткаларды немесе ұлпаларды гомогенизациялау үшін тәжірибеге қолданатын
- 1. Буфердің түрі таңдап алынады және оның pH-тың қажет мәнін беретін концентрациясы алдын-ала дайындалады.
- 2. Буфердің түрі және оның pH мәні бізге қажет макробиомолекуланы тұрақтандырып тұратын болуға тиіс.
- 3.Гомогенизация жүргізілетін буферге биомолекуланың құрамындағы сульфгидрил топтарының ауыр металдармен байланысуына, сонымен қатар олардың бір-бірімен дисульфидті байланыс құруына тосқауыл бола алатын дитиотрейтол (CH_2SH-$CHOH$-$CHOH$-CH_2SH) немесе меркаптоэтанол (HS-CH_2-CH_2-OH) секілді тиолды реагенттерді де қосады. Яғни, тиолды реагенттер сульфгидрил топтарын тотығудан (оттегіден) қорғайды. Сонымен қатар, клеткалар мен ұлпалардың ішінде биомолекуламен байланысып, оның функциясына әсер ететін қажетсіз қосылыстар болуы мүмкін. Мысалы, оларға ауыр металдарды жатқызуға болады. Ауыр металдар өсімдік клеткасының вакуолында жиналады, клетка талқандалғанда олар жалпы сұйықпен араласып кетеді.

- Сынап, қорғасын, кобальт секілді екі валентті ауыр металдардың иондары биомолекулалардың құрамындағы сульфгидрил (тиол, -SH) тобымен өте тез әрекеттесіп, қайтымсыз байланысады.
- Көптеген биомолекулалардың түрлерінде, әсіресе белоктардың құрамында сульфгидрил топтары көп болады және олар биомолекуланың структурасы мен функциясында белсенді роль атқарады.
- Олар ауыр металдармен қайтымсыз байланысқан кезде өздерінің структурасы ғана емес, сонымен қатар функциясын да өзгертуі мүмкін.
- Сондықтан көптеген биохимиялық тәжірибелерде биологиялық материалды гомогенизациялау алдында буферге этилендиаминтөртсірке қышқылының (этилендиаминтетрацетат, ЭДТА) аз мөлшерін қосады. ЭДТА төмендегі схема бойынша ауыр металдарды қайтымсыз байланыстырып, оларды бейтараптандырады**:**



этилендиаминтөртсірке қышқылы (этилендиаминтетрацетат, ЭДТА)

- Ұлпалар мен клеткаларды талқандағаннан кейін біркелкі қою масса пайда болады – оны **клетка гомогенаты** атайды. Оның қою болатын себебі – оның құрамында күйретілген клетка қабығының, органеллалардың мембраналарының қалдықтары, тағы басқа да суда ерімейтін түйіршіктер және суда ертитін мыңдаған түрлі қосылыстардың болуы.
- Клетка сұйығындағы биологиялық қосылыстарды зерттеу үшін жоғарыда айтылған бөлшектерді клетка сұйығынан алып тастау керек. Ол үшін төменде айтылатын центрифугалау әдістері қолданылады. Суда ерімейтін бөлшектер (майлардан басқа) центрифугадан кейін тұнба ретінде арнайы ыдыстың түбіне жиналып, тығыз масса түрінде сұйықтан бөлінеді. Тұнбаның үстіңгі қабаты мөлдір клетка сұйығы болып шығады. Осылай алынған клетка сұйығын **клеткасыз экстракт** (бесклеточный экстракт, cell free extract) деп атайды.

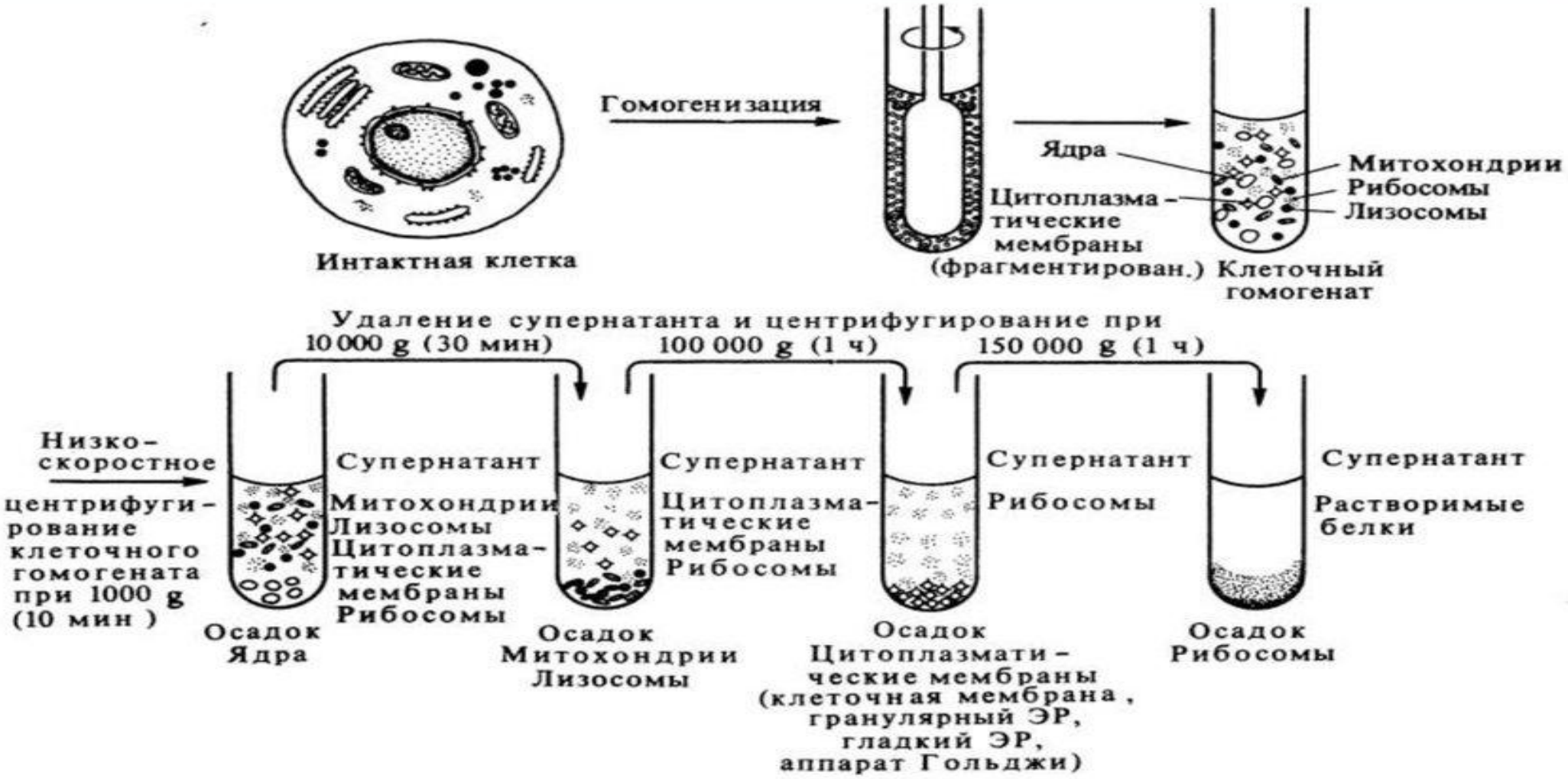


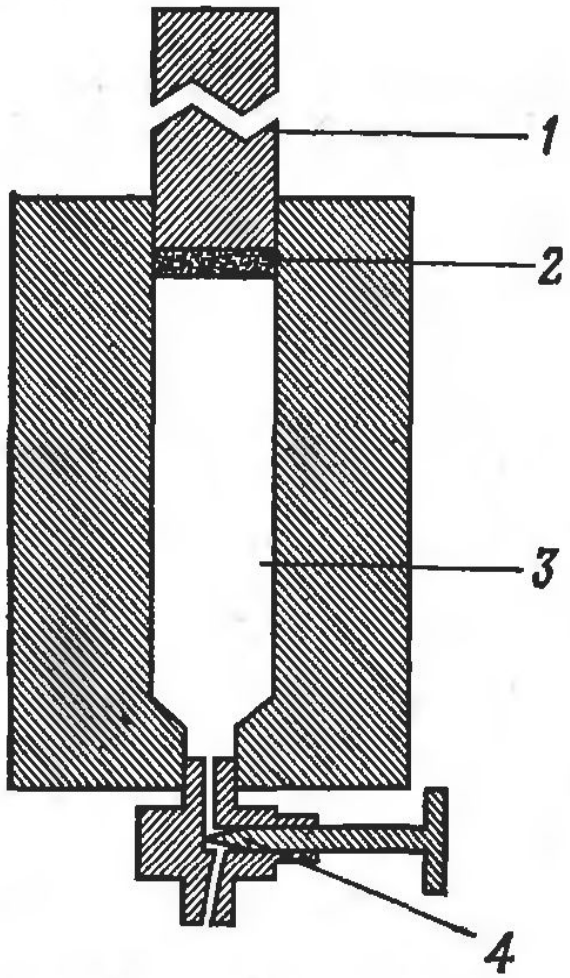
Рис. 1. Схема, иллюстрирующая последовательные этапы фракционирования клетки.

Ұлпалар мен клеткаларды талқандау әдістері.

- Клеткаларды талқандау үшін көбінесе физикалық әдістерді қолданады. Жануарлардың клеткаларына қарағанда өсімдіктер мен бактериялардың клеткаларын талқандау әлдеқайда қиын, себебі – олардың клеткаларының сыртындағы қабығы өте қатты болып келеді.
- **№1.Клеткаларды қатты материалдармен араластырып ұнтақтау.** Әдетте бұл әдіс үшін **фарфор келісі**, оның **келісабы** және **құм** немесе құм түрінде майдаланған **шыны жаңқаларын** қолданады. 1. Фарфор келінің ішіне биологиялық материалдың (ұнтақталатын ұлпа немесе клеткалар) қажет салмақтағы мөлшерін салады да, оған құм немесе шыны жаңқаларын қосады.
- 2.Одан кейін келіге қажетті буфер ерітіндісінің сәйкес келетін көлемін құяды.
- 3.Осы қоспаны фарфор келісаппен биологиялық материал біркелкі сұйық массаға айналғанға дейін әбден езеді.
- Бұл әдіс көбінесе **өсімдіктер мен жануарлар** клеткаларын гомогенизациялауға пайдаланылады.
- Бұл әдістерінің **кемшілігі** – оның нәтижесінде клетка ішіндегі хлоропласт секілді ірі органеллалардың структурасы бұзылады.

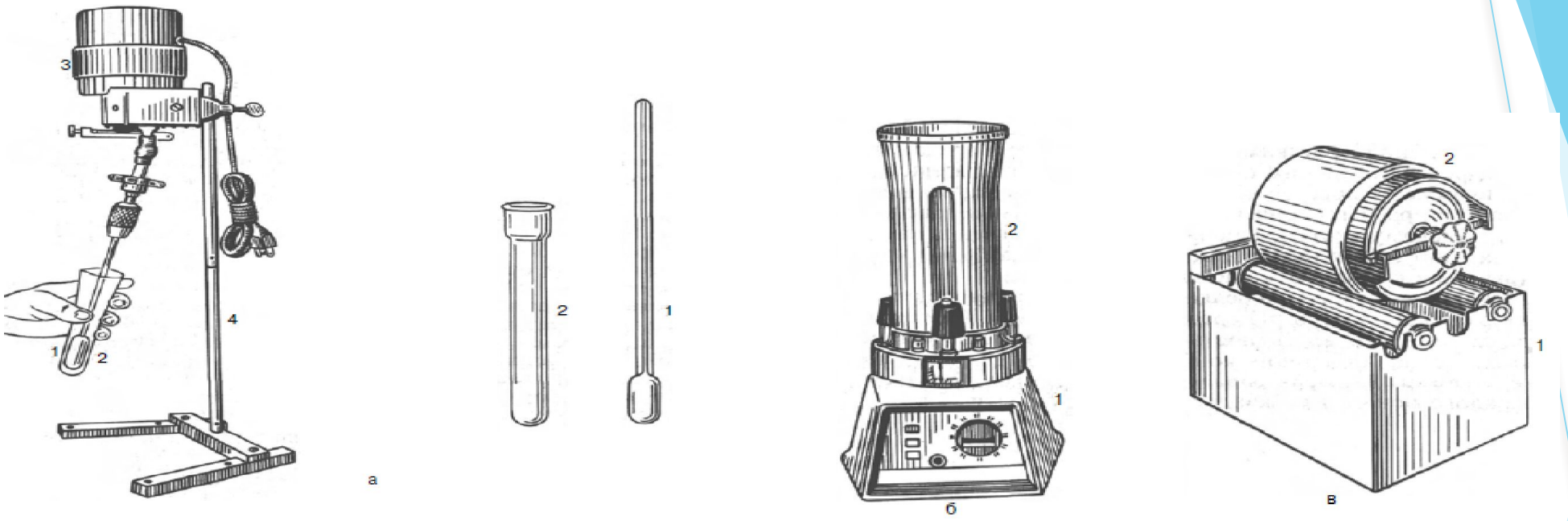
- **№2.Клеткаларды сұйық ортада бұзу**. Бұл әдіс үшін клеткалардың массасын суспензияға айналдырады. Суспензия сұйығындағы клеткаларды талқандау үшін қатты айналатын, кесетін өткір қалақшалары бар қондырғылар немесе гомогенизаторлар қолданылады.
- 1. Ең алдымен суспензияны арнайы пластмасса немесе шыны ыдысқа құяды.
- 2.Оның ішіне қондырғының өз осі бойымен өте жылдам айналатын кескіш қалақшаларын ендіреді.
- 3.Қондырғының қалақшалары қатты жылдамдықпен айналғанда суспензия біршама жылуы мүмкін. Сондықтан, осы әдіспен гомогенизациялау кезінде ішіне суспензия құйылғын ыдысты мұздың немесе ішінде мұзды су бар әлдеқайда кеңірек ыдыстың ішіне орналастырады.

- **№3.Клеткаларды жоғары қысым арқылы талқандау.** Бұл әдіс негізінен **бактериялардың клеткаларын** талқандау үшін қолданылады. Ол үшін арнайы престі, мысалы $10{,}4 \cdot 10^7$ *Па* қысым тудыратын **Френч Пресс** қолданады. Бактерия клеткаларын талқандау болаттан жасалған арнайы құралда жүргізіледі (2-ші сурет). Ол болаттан жасалған, қабырғасы қалың және ортасында бактерия клеткаларының суспензиясы құйылатын цилиндр тәрізді құдықшасы бар негізгі құрал. Оның қозғалмалы бөлігі – цилиндр қуысына тығыз кіретін, болаттан жасалған таяқша. Құдықшаның түбінде қатырылған суспензияның сыртқа шығуы үшін өте тар тесік болады.
- 1. Алдымен негізгі құрал және оған енгізілетін таяқшаны құрғақ мұзда (қатырылған CO_2 газы) әбден салқындағанша ұстайды.
- 2.Клеткалардың қою суспензиясын құралдың құдықшасына құяды. Құралдың құдықшасына құйылған суспензия бірнеше минуттан кейін қатты мұз болып қатады.
- 3. Содан кейін болат таяқшаны ішінде қатып тұрған суспензия бар құдықшаға ендіреді. Мұз болып қатып тұрған биоматериалдың суспензиясы құдықшаға түсірілген қысымның әсерінен және өте тар тесіктен өткен кезде суспензиядағы клеткалардың қабықтары талқандалады.
- 4. Құрал және оған ендірілген таяқшаны болаттан жасалған арнайы екі беткейдің (платформаның) арасына қояды. Құралға қысым түсіретін ол екі платформаның біреуі – қысым жүргізілетін камераның төменгі жағында тұрақты болып орналастырылады. Екіншісі – қысымды іске асыратын, жоғарыдан төмен қарай қозғалатын платформа. Құдықшасына ендірілген таяқшамен бірге құрал престің астыңғы беткейіне қойылады. Бұранда арқылы жоғары платформаны болат таяқшаға тығыз тақалғанға дейін бұрап түсіреді. Содан кейін электр күшінің әсерімен престің жоғарғы және төменгі платформалары бір-біріне қозғалғанда, ішінде мұз болып қатқан суспензияға өте жоғары қысым түседі. Оның нәтижесінде құдықшадағы мұз болып қатқан суспензия құралдың түбіндегі тар тесік арқылы сыртқа шығады. Френч Пресс кесіндісінің бейнесі төменде көрсетілген.



- **2-ші сурет.** Френч Престің кесілгендегі құрылысы.
- 1 және 2 – болат таяқша, 3 – суспензия құйылатын құдықша, 4 – құдықшаның түбіндегі тар тесік.

- **№4.Клеткаларды ультрадыбыс арқылы талқандау.** Клеткаларды жоғары жиіліктегі тербеліс беретін ультрадыбыс аспабында арқылы да талқандауға болады. Ол аспапты **ультрадыбысты дезинтегратор** деп атайды. Ультрадыбыс дезинтегратордың жоғары жиіліктегі толқын тудыратын, болаттан жасалған, бірін екіншісіне ауыстыруға болатын бірнеше арнайы қондырғы ұштары болады. Жоғары жиіліктегі ультрадыбыс толқындарының жиілігіне клетка қабықтарының тербелісі ілесе алмай, ақырында шытынап сынады. Бұл әдістің кемшілігі – ультрадыбыс толқындары кейбір үлкен макромолекуларды да денатурациялауы мүмкін. Оның үстіне, ультрадыбыс толқындарын беретін металл-ұштары қызып кетеді. Сондықтан ішінде клетка суспензиясы бар ыдысты ультрадыбыспен гомогенизациялау кезінде салқындатып тұру қажет.



- **3-ші сурет.** Гомогенизаторлардың кейбір түрлері
- *а* - келісі электр арқылы айналатын гомогенизатор**:** 1-келісап, 2-келі, 3-мотор, 4-моторды бекітетін штатив; б-механикалық диірмен және *в*-шарлы гомогенизатор: 1-электрқозғағыш пен басқару орталығы бар корпус, 2-биоматериалды ұнтақтайтын камера.

- **Гомогенизациялаудың басқа түрлері.** Өсімдіктердің жұмсақ ұлпаларын - жапырақты, гүлді, жас тамырды, шикі дәндер гомогендеуге ең қолайлы оңай әдіс – оларға ешқандай сұйық қоспай, фарфор келісінде сұйық азоттың ішінде ұнтақтау. Біріншіден, сұйық азоттың төмен температурасының өзінде-ақ мұздап қатып бара жатқан ұлпаның клеткалары жарылып бұзылады. Екіншіден, келіде ұнтақтау қатып қалған клеткаларды одан ары, түпкілікті талқандайды. Осылай алынған клеткасыз экстрактқа клетка ішінде болған белоктар және басқа да биомолекулалар толдық шығады деуге болады.
- Басқа әдістерге клеткаларды осмотикалық шок, клетка қабығын лизоцим, хитиназа, липаза және целлюлаза секілді арнайы ферменттермен ыдырату жатады. Кейде клеткалардың ерекше түрлерін мұздатып-қатырып, артынан жібіту арқылы, толуол этилацетат секілді органикалық еріткіштермен өңдеп ыдырату әдістері де қолданылады.