

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tilen TRAVNIK

**ENOSTAVNA PREPARATIVNA IZOLACIJA INTAKTNIH
MITOHONDRIJEV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tilen TRAVNIK

**ENOSTAVNA PREPARATIVNA IZOLACIJA INTAKTNIH
MITOHONDRIJEV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**A SIMPLE PREPARATIVE METHOD FOR ISOLATION OF INTACT
MITOCHONDRIA FROM *Saccharomyces cerevisiae* YEAST**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo posvečam babici Ireni Čebašek.

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Postopki svetlobne in elektronske mikroskopije so bili opravljeni na Katedri za zoologijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani ob strokovni pomoči osebja katedre.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorico dr. Polono Jamnik in za recenzenta doc. dr. Roka Kostanjška.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: dr. Polona Jamnik

Recenzent: doc. dr. Rok Kostanjšek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Sonja Smole Možina
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Rok Kostanjšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tilen Travnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 576.31:582.282.23:577.2/3(043)=863
KG kvasovke/mitohondriji/intaktni mitohondriji/*Saccharomyces cerevisiae*/mtDNK/diferencialno centrifugiranje/elektroforeza/restrikcijski encimi/virtualni restrikijski diagram/homogenizacija/sferoplast/presevna elektronska mikroskopija
AV TRAVNIK, Tilen
SA RASPOR, Peter (mentor)/JAMNIK, Polona (somentorica)/KOSTANJŠEK, Rok (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN ENOSTAVNA PREPARATIVNA IZOLACIJA INTAKTNIH MITOHONDRIJEV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 41 str., 6 pregl., 10 sl., 3 pril., 32 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Zaradi vse večjega pomena raziskovanja mitohondrijev smo želeli odkriti enostavno preparativno metodo za njihovo izolacijo iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. V nam dosegljivi literaturi takšna metoda doslej ni bila opisana. Zato smo preučili in preizkusili različne protokole ter na podlagi poskusov sestavili lasten protokol. Z uporabo tega protokola smo uspeli izolirati mitohondrijem podobne strukture, ki so bile primerne za nadaljnje potrditvene raziskave. Nismo pa mogli potrditi začetne hipoteze, saj s predlaganim protokolom nismo mogli pridobiti mitohondrijev v preparativnih količinah. V razpravi navajamo razloge zakaj preizkušene metode niso primerne.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
CD UDC 576.31:582.282.23:577.2/3(043)=863
CX yeasts/mitochondria/intact mitochondria/*Saccharomyces cerevisiae*/mtDNA/differential centrifugation/electrophoresis/restriction enzymes/virtual restriction map/homogenisation/spheroplast/transmission electron microscopy
AU TRAVNIK, Tilen
AA RASPOR, Peter (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/KOSTANJŠEK, Rok (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI A SIMPLE PREPARATIVE METHOD FOR ISOLATION OF INTACT MITOCHONDRIA FROM *Saccharomyces cerevisiae* YEAST
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 41 p., 6 tab., 10 fig., 3 ann., 32 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The research of mitochondria is becoming very important scientific field. Our aim was to develop a simple preparative method for isolation of intact mitochondria from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. From the available literature we were unable to identify any appropriate method for this task. Different protocols were studied and tested to assemble our own protocol based on the experimental findings. Ball-shaped structures appearing to be mitochondria were isolated using that protocol and were subjected to additional conformation experiments. The hypothesis that we developed a simple preparative method for isolation of mitochondria was rejected, because we were unable to isolate the mitochondria in preparative quantities. Possible causes for failure were discussed.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.1.1 Osnovna ideja	1
1.1.1.1 Raziskovanje mitohondrijev	1
1.1.1.2 Preprosta in preparativna izolacija mitohondrijev	2
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MITOHONDRIJ	3
2.2 IDENTIFIKACIJA MITOHONDRIJEV	4
2.2.1 Preverjanje prisotnosti za mitohondrije specifičnih snovi	4
2.2.2 Slikovni prikaz mitohondrijev	5
2.3 PROTOKOLI ZA IZOLACIJO MITOHONDRIJEV	5
3 METODE IN MATERIALI	8
3.1 POTEK POSKUSA	8
3.2 METODE	8
3.2.1 Priprava in ohranjanje kulture	8
3.2.2 Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku	8
3.2.3 Izolacija mitohondrijev	9
3.2.3.1 Predhodna obdelava celic	9
3.2.3.1.1 Predhodna obdelava z litičnim encimom	9

3.2.3.1.2	Predhodna obdelava s hitrim zmrzovanjem in odtajanjem	10
3.2.3.2	Mehansko razbijanje celične stene	10
3.2.3.2.1	Razbijanje celične stene s steklenimi kroglicami	10
3.2.3.2.2	Razbijanje celične stene s teflonskim homogenizatorjem	10
3.2.3.3	Diferencialno centrifugiranje	11
3.2.4	Agarozna gelska elektroforeza	12
3.2.4.1	Ekstrakcija mtDNK iz končnega izolata z mešanico fenola in kloroforma	12
3.2.4.2	Restrikcijska analiza mtDNK	13
3.2.4.3	Virtualni restrikcijski diagram	13
3.2.5	Svetlobna in elektronska mikroskopija	14
3.2.5.1	Svetlobna mikroskopija	14
3.2.5.2	Elektronska mikroskopija	14
3.2.5.2.1	Negativno kontrastiranje z vodno raztopino uranil acetata	15
3.2.5.2.2	Vključevanje v smolo	15
3.3	MATERIALI	16
3.3.1	Mikroorganizem	16
3.3.2	Gojišča	16
3.3.2.1	Trdno YEPD gojišče	16
3.3.2.2	Tekoče YEPD gojišče	17
3.3.3	Reagenti in raztopine	17
3.3.3.1	Izolacija mitohondrijev	17
3.3.3.2	Gelska elektroforeza	19
3.3.3.3	Elektronska mikroskopija	19
3.3.4	Pribor in oprema	20
3.3.4.1	Priprava gojišč in raztopin	20
3.3.4.2	Aerobna submerzna kultivacija	20
3.3.4.3	Izolacija mitohondrijev	21
3.3.4.3.1	Predhodna obdelava celične stene	21
3.3.4.3.2	Razbijanje celic	21
3.3.4.3.3	Diferencialno centrifugiranje	21
3.3.4.4	Gelska elektroforeza	21
3.3.4.5	Elektronska in svetlobna mikroskopija	22

4	REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1	AEROBNA SUBMERZNA KULTIVACIJA	23
4.2	IZOLACIJA MITOHONDRIJEV	23
4.2.1	Predhodna obdelava celic	25
4.2.1.1	Predhodna obdelava z encimom litikaza	25
4.2.1.2	Predhodna obdelava s tekočim dušikom	26
4.2.2	Homogenizacija predhodno obdelanih kvasovk	26
4.2.2.1	Homogenizacija s steklenimi kroglicami	26
4.2.2.2	Homogenizacija s teflonskim homogenizatorjem	26
4.2.3	Diferencialno centrifugiranje	27
4.2.4	Preverjanje prisotnosti mitohondrijev v usedlini	28
4.2.4.1	Dokaz prisotnosti mitohondrijev z gelsko elektroforezo	28
4.2.4.2	Dokaz prisotnosti mitohondrijev z elektronsko mikroskopijo	31
4.3	KONČNO ZAPOREDJE KORAKOV V POSKUSU	35
5	SKLEPI	36
6	POVZETEK	37
7	VIRI	38

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	16
Preglednica 2: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	17
Preglednica 3: Sestava inkubacijskega pufra. (Nguyen in Lepingle, 2000)	17
Preglednica 4: Sestava homogenizacijskega pufra (Jazwinski, 1990)	18
Preglednica 5: Sestava pufra B (Nguyen in sod., 2000)	18
Preglednica 6: Sestava pufra TAE (Sambrook in sod., 1989)	19

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematični prikaz membran v mitohondriju. Prikazani so: notranja membrana (1), zunanja membrana (2), krista (3) in matiks (4) (Mitochondrion - Wikipedia, the free encyclopedia, 2006)	4
Slika 2: Hodogram poskusa	8
Slika 3: Zaslonska slika programa pDRAW32, ki prikazuje virtualni elektroforegram po restrikcijski analizi	14
Slika 4: Elektroforegram izolata kvasovk <i>S. cerevisiae</i> po analizi z restrikcijskimi encimi. Domnevno izolirana mitohondrijska DNK, razrezana z restrikcijskimi encimi. Proga 1: molekularni označevalec (λ DNK obdelana z <i>HindIII</i> in <i>EcoRI</i>), proge 2, 3 in 4: DNK po inkubaciji z restrikcijskim encimom <i>EcoRI</i> , proga 5: DNK po inkubaciji z restrikcijskim encimom <i>HincII</i> , proge 6, 7 in 8: DNK brez dodatne obdelave	29
Slika 5: Virtualni restrikcijski diagram, narisani s programom pDRAW32 za encime <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>HhaI</i> , <i>HincII</i> , <i>NdeI</i> in <i>SalI</i> za nukleotidno zaporedje mtDNK kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . Na progah 1 in 8 (označeni z MW) je prikazan molekularni označevalec (λ DNK obdelana z <i>HindIII</i>) številke pomenijo število baznih parov v fragmentu	30
Slika 6: Kroglasta struktura v preparatu, ki bi po velikosti in obliki lahko ustrezala mitohondrijem, nakazuje možnost, da gre za mitohondrij kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . (Kot tehnika priprave vzorca za elektronski mikroskop je bilo uporabljeno negativno kontrastiranje z uranil acetatom)	32
Slika 7: Mitohondriju podobna kroglasta struktura ujeta v množico nečistoč v preparatu vzorca. (Kot tehnika priprave vzorca za elektronsko mikroskopiranje je bilo uporabljeno negativno kontrastiranje z uranil acetatom)	32
Slika 8: Elektronska mikrofografija ultratanke rezine izoliranih mitohondrijev po vključevanju v smolo. Kroglasta struktura z nakazanimi kristami dopušča razlago, da gre za mitohondrij kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	33
Slika 9: Elektronska mikrofografija ultratankih rezin po vključevanju v smolo prikazuje kroglaste strukture, ki bi lahko predstavljale mitohondrije in nečistoče, prisotne v vzorcu	34
Slika 10: Hodogram končnega protokola	35

KAZALO PRILOG

- Priloga 1: Mikrografije preparatov končne usedline, pridobljene po postopku za izolacijo mitohondrijev, posnete s svetlobnim mikroskopom Axioimager Z1 (Zeiss)
- Priloga 2: Elektronske mikrografije končne usedline pripravljene po metodi negativnega kontrastiranja s 0,5 % raztopino uranil acetata.
- Priloga 3: Elektronske mikrografije ultratankih rezin pripravljenih z vključevanjem v smolo.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozintrifosfat,
CTAB	heksadeciltrimetil amonijev bromid,
DNK	deoksiribonukleinska kislina,
EDTA	etilendiamin tetraacetat,
x g	težni pospešek ($9,81 \text{ m/s}^2$),
mtDNK	mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina,
PCR	verižna reakcija z encimom polimeraza,
PMSF	fenilmetilsulfonoflourid,
RNK	ribonukleinska kislina,
TEM	presevna elektronska mikroskopija,
YEPD	kvasni ekstrakt, pepton, dekstroza,
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

1.1.1 Osnovna ideja

Prvotni cilj diplomske naloge je bil izolirati mitohondrijsko DNK v krožni obliki in uporabiti kot modelno molekulo za študij vezave velikih DNK molekul na kromatografske nosilce. Med potekom poskusa smo zaradi različnih zapletov morali osnovno idejo spreminjati in na novo dograjevati. V končni obliki smo se odločili za enostavno preparativno izolacijo mitohondrijev, saj so le ti primerni kot izhodišče za raziskave osnovne ideje, metoda pa bi bila uporabna tudi v drugih vejah raziskovanja mitohondrijev.

1.1.1.1 Raziskovanje mitohondrijev

Mitohondriji so postali zelo pomemben predmet raziskovanja v bioloških znanostih. Identificirali so jih pred približno 50 leti. Kljub trenutno prevladujoči hipotezi o endosimbiontskem izvoru mitohondrijev, pa njihova evolucija in proces vključitve v evkariontsko celico nista v celoti pojasnjena (Gray in sod., 2001). Raziskovanje mitohondrijev poteka v več smereh. V začetku so jih raziskovalci predvsem pregledovali z elektronskim mikroskopom, ki je bil tudi glavno orodje za identifikacijo mitohondrijev. V današnjem času pa se raziskave mitohondrijev osredotočajo predvsem na njihovo funkcijo (Krebsov cikel, raziskave proteinov dihalne verige, sodelovanje pri apoptozi in oksidativnem stresu) ter njihov genski zapis, ki je za raziskovalce zanimiv tako glede na svoj izvor (endosimbiotska teorija), kot tudi glede na obliko, saj se v nekaterih mitohondrijih ta nahaja v zanimivi krožni obliki. Za tovrstne raziskave je potrebno izolirati čim manj poškodovane mitohondrije v čim večjih količinah. Primeren organizem za izolacijo mitohondrijev mora imeti naslednje lastnosti: biti mora evkariontski organizem, dostopen v velikih količinah in varen za delo (Gillham, 1994).

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je pomemben mikroorganizem, ki ga uporabljajo kot modelni organizem za raziskave organizacije in lastnosti evkariontskih celičnih organelov (Meisinger in sod., 2000). Izolirani mitohondriji kvasovke predstavljajo glavno orodje za analizo mitohondrijskih funkcij. Poudariti je potrebno, da sta število in morfologija

mitohondrijev v kvasovki *S. cerevisiae* tesno povezana z vrsto metabolizma, ki ga trenutno uporablja kvasovka (Visser in sod., 1995). V preiskanih bazah podatkov (Sciencedirect, Springer-link, NCBI) nismo našli podatkov o uporabi iz kvasovk izoliranih mitohondrijev v »preparativnih« količinah. Nekateri avtorji (Jazwinski, 1990; Defontaine, 1991; Nguyen in Lepingle, 2000) opisujejo izvajanje kultivacije v delovnih prostorninah od 100 do 500 ml.

1.1.1.2 Preprosta in preparativna izolacija mitohondrijev

Želeli smo na enostaven način izolirati večjo količino nepoškodovanih mitohondrijev iz kvasovke *S. cerevisiae*. Če bi nam uspelo izolirati večje količine mitohondrijev primerne čistosti ter iz njih izolirati njihovo DNK, bi slednjo o lahko uporabili za nadaljnje raziskave velikih molekul DNK.

Zahtevo po preprostosti postopka utemeljujemo z več dejavniki. Prvi je opremljenost laboratorija, v katerem je potekal poskus (izolacijo smo poskušali izvesti samo z opremo, ki je že na razpolago v laboratoriju), drugi pa je dejstvo, da se postopek, ki ni preprost, veliko težje prenaša v veliko merilo. Tako na primer uporaba zelo specifičnih encimov ali zapletenih aparatov za izolacijo večjih količin mitohondrijev ni več finančno upravičena. Postopek naj bi bil tudi preparativne narave, torej bi morala količina njegovega končnega produkta precej presežati količino, količino potrebno v nadaljnjih poskusih.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

S kombinacijo korakov iz različnih, že znanih protokolov ter opreme, ki je na voljo v laboratoriju, doseči kar najboljšo izolacijo mitohondrijev iz kvasovke *S. cerevisiae* in njihovo potrditev v končnem izolatu.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

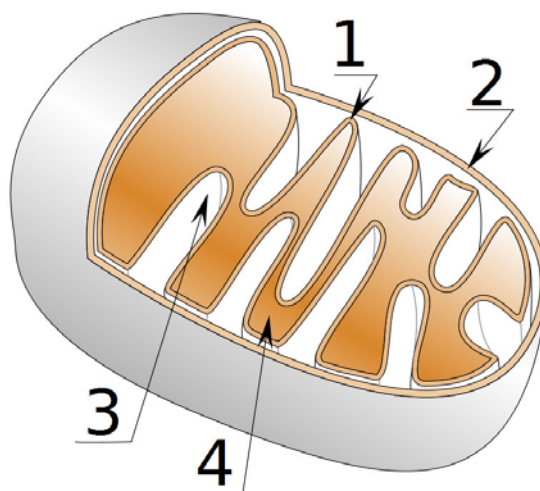
Postavili smo naslednjo hipotezo: Razvili bomo enostavno metodo za preparativno izolacijo intaktnih mitohondrijev iz kvasovke *S. cerevisiae*, obstaja relativno preprosta metoda na podlagi diferencialnega centrifugiranja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MITOHONDRIJ

Mitohondrij je celični organel, ki se nahaja v evkariontskih celicah. Število mitohondrijev v celicah je odvisno od vrste celice in stanja, v katerem se ta nahaja. V mitohondriju potekajo procesi sinteze beljakovin za potrebe Krebsovega cikla, na notranji membrani pa potekata transport elektronov in oksidativna fosforilacija. Tem procesom, ki služijo celici za pridobivanje energije, je popolnoma prilagojena tudi zgradba mitohondrija. Sestavljen je iz dveh fosfolipidnih membran. Zunanja membrana obdaja notranjo, med obema je medmembranski prostor, prostoru znotraj notranje membrane pa pravimo matriks. Matriks vsebuje visoko koncentracijo encimov, ki so potrebni za oksidacijo piruvata in maščobnih kislin v Krebsovem ciklu, nekaj identičnih kopij mtDNK, posebne mitohondrijske ribosome, tRNK molekule in encime, potrebne za izražanje mitohondrijskih genov. Notranja membrana je nagubana v strukture, ki jih imenujemo kriste, kar daje notranji membrani veliko površino. V notranjo membrano so vgrajeni proteini s tremi nalogami (oksidacijske reakcije v dihalni verigi, sinteza ATP in specifični transport metabolitov). Encim ATP sintaza deluje na principu elektrokemičnega gradienta, zato je nujno, da je notranja membrana neprehodna za večino ionov. Zunanja membrana vsebuje velike proteine (porini), ki oblikujejo kanale, kar omogoča prehod velikih molekul (do 5000 daltonov) ter encime, ki sodelujejo pri sintezi mitohondrijskih lipidov in lizi lipidnih substratov, ki se nato metabolizirajo v matriksu. Medmembranski prostor vsebuje encime, ki sodelujejo pri fosforilaciji drugih nukleotidov s pomočjo ATP (Alberts in sod., 1994).

Zunanja in notranja membrana se med seboj razlikujeta tako po kemični sestavi (razmerje med lipidi in beljakovinami), kot tudi po funkcijah beljakovin, ki jih vsebujeta. Posledica tega je razlika v gostotah obeh membran (notranja membrana $1,21 \text{ g/cm}^3$, zunanja membrana $1,13 \text{ g/cm}^3$), kar omogoča ločitev obeh membran z diferencialnim centrifugiranjem. V matriksu mitohondrija se nahaja DNK mitohondrija, encimi, ki so specifični za procese v mitohondriju ter sistem za sintezo proteinov, ki jih potrebuje mitohondrij (Gillham, 1994).



Slika 1: Shematični prikaz membran v mitohondriju. Prikazani so: notranja membrana (1), zunanja membrana (2), krista (3) in matiks (4) (Mitochondrion - Wikipedia, the free encyclopedia, 2006)

2.2 IDENTIFIKACIJA MITOHONDRIJEV

Informacijo o tem, ali so mitohondriji prisotni v določenem vzorcu snovi, lahko dobimo z analizo vzorca na vsebnost za mitohondrij specifičnih spojin (DNK, proteini). Zelo dobro informacijo o dejanski čistosti izolata mitohondrijev pa je možno dobiti s pregledom vzorca pod mikroskopom (Rajapakse in sod., 2001).

2.2.1 Preverjanje prisotnosti za mitohondrije specifičnih snovi

Genom mitohondrija kvasovke *S. cerevisiae* sev S288C sestavlja približno 86000 baznih parov, v mitohondriju pa se večinoma pojavlja v linearni, redkeje v krožni obliki. Genom mitohondrija je precej manjši od vseh kromosomov omenjene kvasovke, saj najmanjši kromosom vsebuje kar 230000 baznih parov. To lastnost lahko uporabimo za ločitev DNK z uporabo pulzne gelske elektroforeze. Ob uporabi primerne velikostnega označevalca lahko ločimo DNK mitohondrija od genomske DNK na podlagi njene velikosti, saj je mitohondrijska DNK velika približno 86 kbp (kilobaznih parov) (Bendich, 1996).

Prisotnost mtDNK v končnem izolatu lahko dokažemo tudi s primerjavo virtualnega restrikcijskega diagrama in dejanske velikosti fragmentov po restrikcijski analizi s specifičnimi endonukleazami (Lichanska, 2001).

Ker je poznano nukleotidno zaporedje genoma kvasovke *S. cerevisiae*, lahko izolirano DNK uporabimo kot matrico v PCR, s katero lahko ob uporabi ustreznih oligonukleotidnih začetnikov dokažemo prisotnost mtDNK (Andrade in sod., 2006).

Prisotnost mitohondrijev, oziroma njihovih delov, lahko ugotavljamo tudi z označevalnimi encimi. Tako je Walker (1998) tabelarično prikazal označevalne encime za matriks (akonitaza, fumaraza), medmembranski prostor (citokrom c peroksidaza), notranjo membrano (citokrom c oksidaza) in zunanjo membrano (kinurenin hidroksilaza).

2.2.2 Slikovni prikaz mitohondrijev

Povprečen mitohondrij je velik 100 nm in je s to velikostjo na pragu ločljivosti najboljših svetlobnih mikroskopov. Pregled vzorca pod svetlobnim mikroskopom nam lahko da zanesljivo informacijo le o prisotnosti večjih nečistoč. Za bolj podrobno analizo strukture mitohondrijev je potrebno uporabiti presežno elektronsko mikroskopijo (TEM - Transmission Electron Microscopy) (Alberts in sod., 1994).

2.3 PROTOKOLI ZA IZOLACIJO MITOHONDRIJEV

Protokol je spisek zaporednih operacij, s pomočjo katerih izbrani začetni vzorec predelamo ali očistimo do končnega produkta. Spominjajo na recepte, saj pri večini navedene tudi količine potrebnih reagentov in tehnični pogoji (vrednost pH, temperatura, ionska jakost,...).

V literaturi (Defontaine, 1991; Nedeva, 2002; Nguyen, 2000; Querol, 1990) smo zasledili protokole, ki opisujejo postopek izolacije mitohondrijev, vendar je cilj teh protokolov izolacija mitohondrijske DNK v obliki, ki je primerna za nadaljnje analize s PCR.

Pogosto je uporabljen protokol, ki vključuje centrifugiranje v gradientu cezijevega klorida. Takšen način izolacije omogoča, da DNK mitohondrija izoliramo iz praktično katerekoli vrste kvasovk, če le te vsebujejo vsaj nekaj mtDNK. Protokol je tehnično zahteven, saj zahteva uporabo ultracentrifuge ter radioaktivnega cezijevega klorida (Bignell in sod., 1996).

Prvi protokol, ki ne zahteva centrifugiranja v gradientu cezijevega klorida, je postavil Querol (1990). Tudi ta protokol zahteva uporabo ultracentrifuge (40000 x g).

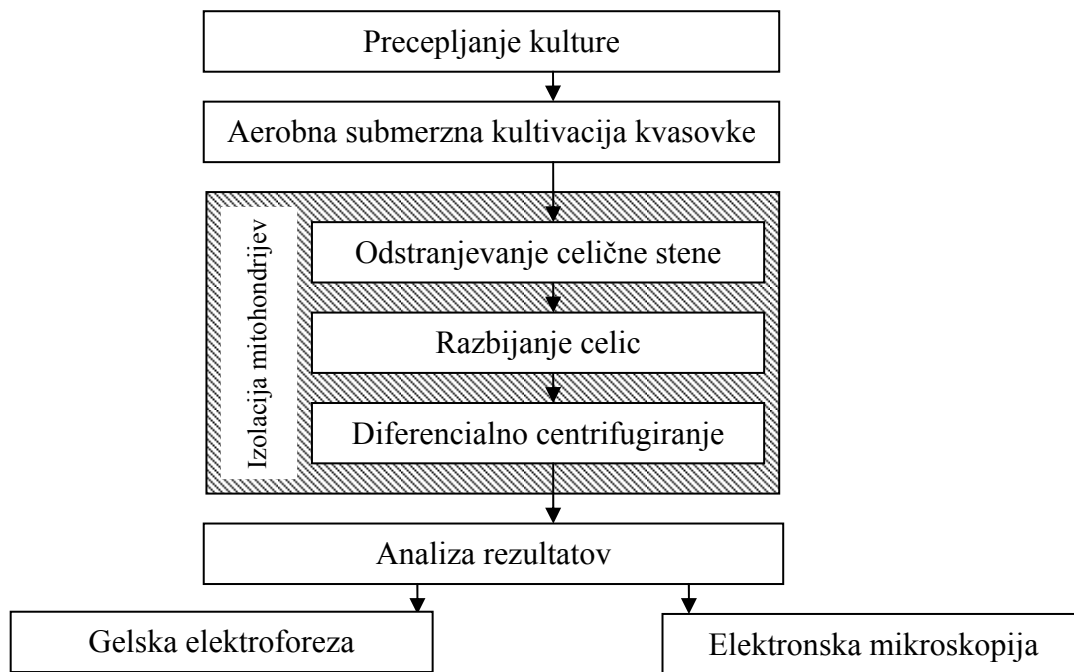
Nedeva in sodelavci (2002) navajajo protokol, ki ne zahteva niti centrifugiranja v gradientu cezijevega klorida, niti uporabe ultracentrifuge in je pravzaprav priredba protokola avtorja Defontaine (1991). Oba protokola uporabljata enak princip delovanja. Prvi korak pri obeh protokolih je kultivacija biomase do pozne eksponentne faze. Sledi ločevanje biomase od preostalega gojišča s centrifugiranjem. Sledi korak razbijanja celične stene, ki pa je pri obeh avtorjih različen. Defontaine (1991) je za mehčanje celične stene uporabil inkubacijo v prisotnosti litičnega encima (Zimolaza 20T) v ustreznem pufru, Nedeva (2002) pa za mehčanje celične stene navaja pufer, ki vsebuje 0,4 % CTAB. Tudi razbijanje celic poteka pri vsakem protokolu drugače. Defontaine (1991) uporabi sonikacijo (razbijanje celic z ultrazvokom), Nedeva (2002) pa mehansko homogenizacijo z uporabo steklenih kroglic. Sledi korak diferencialnega centrifugiranja. Oba protokola sta si v tem koraku zelo podobna, saj oba uporabljata približno enake pospeške (15000 x g in 16000 x g) pri centrifugiranju suspenzije po homogenizaciji. Oba protokola nato nadaljujeta s tremi oziroma štirimi ponovnimi spiranji usedline s homogenizacijskim pufrom. Spiranje je potrebno za doseganje čim manjše kontaminacije z genomsko DNK v končnem vzorcu. V vzorcu se v tej fazi nahaja še nekaj RNK, ki jo oba protokola odstranita z dodatkom encima RNAza. Oba protokola se zaključita z ekstrakcijo mtDNK z uporabo fenol-kloroforma ter etanola. Poudariti je potrebno, da je cilj obeh protokolov mtDNK izolirana v obliki, ki je primerna za nadaljnjo analizo s restrikcijskimi encimi, avtorja pa ne navedeta, v kakšnem stanju se izolirana mtDNK nahaja, oziroma kako poškodovana je.

Naslednji protokol, ki je bil modificiran po Defountainu (1991) je protokol, objavljen kot metoda v članku avtorjev Nguyen in Lepingle (2000). Njegova posebnost je, da uvede posebno tehniko za preverjanje količine sferoplastiranih celic. To doseže z opazovanjem suspenzije celic pod mikroskopom. Če je v supernatantu po prvem centrifugiranju (po sonikaciji) več kot 50 intaktnih celic na opazovano polje (1000-kratna povečava), je avtor povečal težni pospešek pri centrifugiranju za 100 x g, če pa je bilo intaktnih celic manj kot 50, pa je težni pospešek zmanjšal za 100 x g. Ta tehnika omogoča natančnejše ločevanje sferoplastov od ostankov celičnih sten in intaktnih celic.

Cilj druge skupine protokolov je izolacija intactnih mitohondrijev. Jazwinski (1990) opisuje postopek za izolacijo mitohondrijev, ki so primerni za nadaljnjo analizo posameznih struktur v mitohondriju. Postopek za frakcionacijo mitohondrijev je natančno opisan v članku z naslovom *Import of proteins into Mitochondria* (Daum in sod., 1982), posamezni koraki, kot je na primer priprava sferoplastov, pa so vzeti iz starejše literature (Schatz in sod., 1974). Osnovni princip delovanja skupine protokolov je sledeč. Kvasovke kultiviramo do pozne eksponentne faze. Sledi kemična in encimska destabilizacija celične stene, nato pa sferoplastiranje ter mehanska homogenizacija sferoplastov. Protokol loči mitohondrije od ostalih celičnih struktur z diferencialnim centrifugiranjem. Pri tem koraku prihaja med protokoli tudi do največjih odstopanj, saj težnostni pospešek v protokolih obsega interval med 9000 x g in 12000 x g. Mitohondriji, izolirani po enem izmed protokolov v tej skupini, so primerni za nadaljnje raziskave mitohondrijskih proteinov, vendar je v vzorcih poleg mitohondrijev precej nemitohondrijskih proteinov (Meisinger in sod., 2000). Za doseganje visoke čistosti izoliranih mitohondrijev Meisinger (2000) predlaga protokol z uporabo saharoznega gradienta, ki pa je zaradi uporabe visokih težnih pospeškov neprimeren kot preparativna metoda.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 POTEK POSKUSA



Slika 2: Hodogram poskusa

3.2 METODE

3.2.1 Priprava in ohranjanje kulture

Kulturo smo precepljali na 4 sterilne plošče s trdnim YEPD gojiščem. Dve plošči smo po treh dneh kultivacije pri 28 °C porabili za inokulacijo tekočih YEPD gojišč, drugi dve plošči pa sta služili za ohranjanje kulture.

3.2.2 Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku

Kot metodo za pridobivanje biomase smo uporabili aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku. Za kultivacijo smo uporabili delovno prostornino 100 ml.

Pripravili smo 300 ml gojišča in ga razdelili v tri 500 ml elenmajerice s stransko kiveto. Elenmajerice smo zaprli z zamaškom iz vate ter avtoklavirali 20 minut pri temperaturi

121 °C in tlaku 1,2 bar. Dve sterilni gojišči smo inokulirali, eno pa je služilo za umerjanje spektrofotometra.

Koncentracijo celic v gojišču smo ocenjevali s pomočjo optične gostote gojišča, ki smo jo izmerili na spektrofotometru. S sterilno cepilno zanko smo s plošče vedno prenesli toliko celic, da je bila optična gostota na začetku približno 0,1. Inokulirani gojišči smo namestili na stresalnik, ki se je vrtel z 200 obrati v minuti. Kultivacija je potekala pri temperaturi 28 °C 15 do 16 ur oziroma do končne optične gostote 1,75 (pozna eksponentna faza) (Goranovič, 2005).

Po končani kultivaciji smo bioprocesno brozgo iz obeh elemajeric prelili v plastični epruveti z navojnim pokrovom in jih 5 min centrifugirali pri 2540 x g. Supernatant (odvečno gojišče) smo odlili. S takšnim postopkom kultivacije smo dobili približno 0,7 g biomase (mokra biomasa) v vsaki epruveti. Zaradi lažjega centrifugiranja smo za nadaljevanje poskusa ohranili biomaso ločeno v 2 epruvetah.

3.2.3 Izolacija mitohondrijev

Izolacija mitohondrijev je potekala v več zaporednih korakih, ki se od protokola do protokola razlikujejo. V nadaljevanju so opisani posamezni koraki, ne glede na to, ali so bili uporabljeni pri končnem uporabljenem protokolu.

3.2.3.1 Predhodna obdelava celic

V literaturi (Jazwinski, 1990; Nedeva, 2002; Nguyen, 2000; Querol, 1990) smo zasledili več možnih načinov za predhodno obdelavo celične stene. Glede na razpoložljivo opremo in materiale v laboratoriju ter na naravo samega poskusa smo se odločili za dva načina, ki sta opisana spodaj.

3.2.3.1.1 Predhodna obdelava z litičnim encimom

Litični encim litikaza smo zatehtali (0,0002 g) v plastični epruveti z navojnim pokrovčkom. Encimu smo dodali biomaso suspendirano v 4 ml inkubacijskega pufra (preglednica 3) in 28 µl merkaptotetanol. Zaprte epruvete smo inkubirali čez noč v vodni kopeli s temperaturo 37 °C (Nguyen, 2000).

3.2.3.1.2 Predhodna obdelava s hitrim zmrzovanjem in odtajanjem

Suspenzijo celic v 7 ml inkubacijskega pufra (preglednica 3) smo zamrznili s tekočim dušikom. Nato pa smo epruveto prestavili v vodno kopel (60 °C) za hitrejše odtajanje. V vodni kopeli se je vsebina odtalila po približno 20 sekundah (Jazwinski, 1990).

3.2.3.2 Mehansko razbijanje celične stene

Za razbijanje celic avtorji navajajo različne aparature oziroma pripomočke, ki smo jih v našem poskusu želeli nadomestiti s preprostejšimi tehnikami, ki so dosegljive v vsakem laboratoriju ter dajo podoben končni rezultat.

Pred razbijanjem celic smo suspenzijo centrifugirali 5 minut s centrifugalnim pospeškom 2540 x g ter odlili supernatant. Usedlino smo nato resuspendirali v 1,2 M raztopini sorbitola ter ponovno centrifugirali. Spiranje s sorbitolom smo ponovili dvakrat.

3.2.3.2.1 Razbijanje celične stene s steklenimi kroglicami

Razbijanje celične stene s steklenimi kroglicami (Scopes, 1987) deluje na principu trenja med kroglicami ter kroglicami in steno posode. Zmes celic, pufra in biomase je potrebno intenzivno stresati.

Usedlini smo v plastično epruveto dodali dvakratno prostornino steklenih kroglic in enkratno prostornino homogenizacijskega pufra (preglednica 4). Epruvete smo izmenjujoče stresali na vrtinčniku tri krat po 5 minut, med tem pa smo jih hladili na ledu.

3.2.3.2.2 Razbijanje celične stene s teflonskim homogenizatorjem

Kot nadomestek »dounce« homogenizatorja (Jazwinski, 1990) smo uporabili teflonski homogenizator, ki deluje na enakem principu. Sestavljata ga stekleni tulec ter teflonski bat, ki se tesno prilega steni tulca. Med premikanjem bata se v prostoru med batom in steno tulca ustvarijo strižne sile, ki so dovolj velike, da poškodujejo celice. Učinek teflonskega homogenizatorja je tem večji, čim manjša je razdalja med batom in steno.

Pri našem poskusu smo usedlino suspendirali v 5 ml homogenizacijskega pufra (preglednica 4) in mu dodali 25 μ l nasičene raztopine fenilmetilsulfonoflourida (PMSF), ki deluje kot inhibitor proteaz. Homogenizacijskemu pufru (preglednica 4) je dodan tudi goveji serumski albumin.

Stopnjo homogenizacije smo spremljali z uporabo svetlobnega mikroskopa pri 1000-kratni povečavi. Homogenizacija je bila ustrezna, ko je bilo pod svetlobnim mikroskopom vidnih le še nekaj deset nepoškodovanih celic na vidno polje.

3.2.3.3 Diferencialno centrifugiranje

Diferencialno centrifugiranje je ločevalna tehnika, ki temelji na razliki v sedimentacijskih konstantah posameznih delov celic. Deli celic z večjo sedimentacijsko konstanto se posedajo hitreje (pri manjših centrifugalnih pospeških) kot deli z manjšo konstanto. Protokoli za izolacijo mitohondrijev iz kvasovk uporabljajo diferencialno centrifugiranje na več načinov, ki so si med seboj podobni. Spodaj je opisan postopek, ki smo ga uporabili tudi v našem poskusu (Nelson in Cox, 2000 str. 43).

V štiri mikrocentrifugirke smo odpipetirali 0,5 ml suspenzije homogeniziranih celic in dodali 0,5 ml homogenizacijskega pufra (brez dodanega govejega serumskega albumina) (preglednica 4). Vsebinsko mikrocentrifugirk smo premešali z obračanjem in jih centrifugirali 5 minut pri 1000 x g. Supernatante, ki niso vsebovali večjih delov celic (celične stene), smo zbrali v dveh mikrocentrifugirkah in jih centrifugirali 10 minut pri 8000 x g. Med tem centrifugiranjem se v usedlino posedejo vse celične strukture s sedimentacijsko konstanto, ki je podobna gostoti mitohondrijev, torej tudi mitohondriji. Usedlino smo nato previdno resuspendirali v 2 ml homogenizacijskega pufra (brez dodanega govejega serumskega albumina) in ga nato ponovno centrifugirali 5 minut pri 1000 x g. Supernatant smo ponovno prenesli v novo mikrocentrifugirko ter ponovno centrifugirali pri 8000 x g. Ponovno centrifugiranje je potrebno za doseganje večje čistosti končnega vzorca (Jazwinski, 1990). Razlike med režimi centrifugiranj v protokolih so predvsem v centrifugalnih pospeških (od 8000 x g do 20000 x g).

3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je ločevalna tehnika, s katero ločujemo molekule DNK glede na njihovo velikost. Manjše molekule DNK se pri konstantni električni napetosti proti pozitivni anodi premikajo hitreje kot velike (Utah, 2003). V našem poskusu smo agarozno gelsko elektroforezo uporabili kot metodo za določanje uspešnosti in natančnosti izolacije mitohondrijev. V ta namen smo elektroforezo povezali z analizo DNK z restrikcijskimi encimi, ter virtualno restrikcijsko analizo (glej: 3.2.4.3).

3.2.4.1 Ekstrakcija mtDNK iz končnega izolata z mešanico fenola in kloroforma

Mitohondrijsko DNK lahko ločimo od mitohondrijev z ekstrakcijo s fenol-kloroformom. Pri tem koraku vsi preizkušeni protokoli, katerih cilj je izolirana mtDNK, uporabljajo enako metodo ekstrakcije mtDNK: obarjanje beljakovin in nečistoč v kloroform-fenolni fazi ter raztapljanje nukleinskih kislin v vodni fazi, ki ji sledi obarjanje DNK z etanolom ob dodatku soli (Sambrook in sod., 1989).

Mitohondrije smo po izolaciji resuspendirali v 0,6 ml pufru B (preglednica 5) in 0,5 ml fenol-kloroforma (sveže zmešan v razmerju 1:1). Z obračanjem mikrocentrifugirke smo resuspendirali usedlino, liza mitohondrijev pa je potekla v nekaj minutah. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 16000 x g. Supernatant smo z avtomatsko pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko in mu dodali 0,6 ml kloroform izoamil-alkohola (v razmerju 24:1). Mikrocentrifugirko smo z obračanjem premešali in ponovno centrifugirali 10 minut pri 16000 x g. Zgornjo fazo smo s pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko in ji dodali 380 µl izopropanola in 0,04 prostornine 5 M raztopine NaCl. Mikrocentrifugirko smo z obračanjem premešali in ponovno centrifugirali 10 minut pri 16000 x g. Nato smo previdno odlili izopropanol in dodali 380 µl ledeno hladnega 70 % etanola. Mikrocentrifugirko smo z obračanjem premešali in ponovno centrifugirali 10 minut pri 19000 x g. Etanol smo odlili in usedlino z DNK v mikrocentrifugirkah posušili v vakuumski centrifugi. Nukleinske kisline smo raztopili v 30 µl pufru TE (Nguyen in sod., 2000).

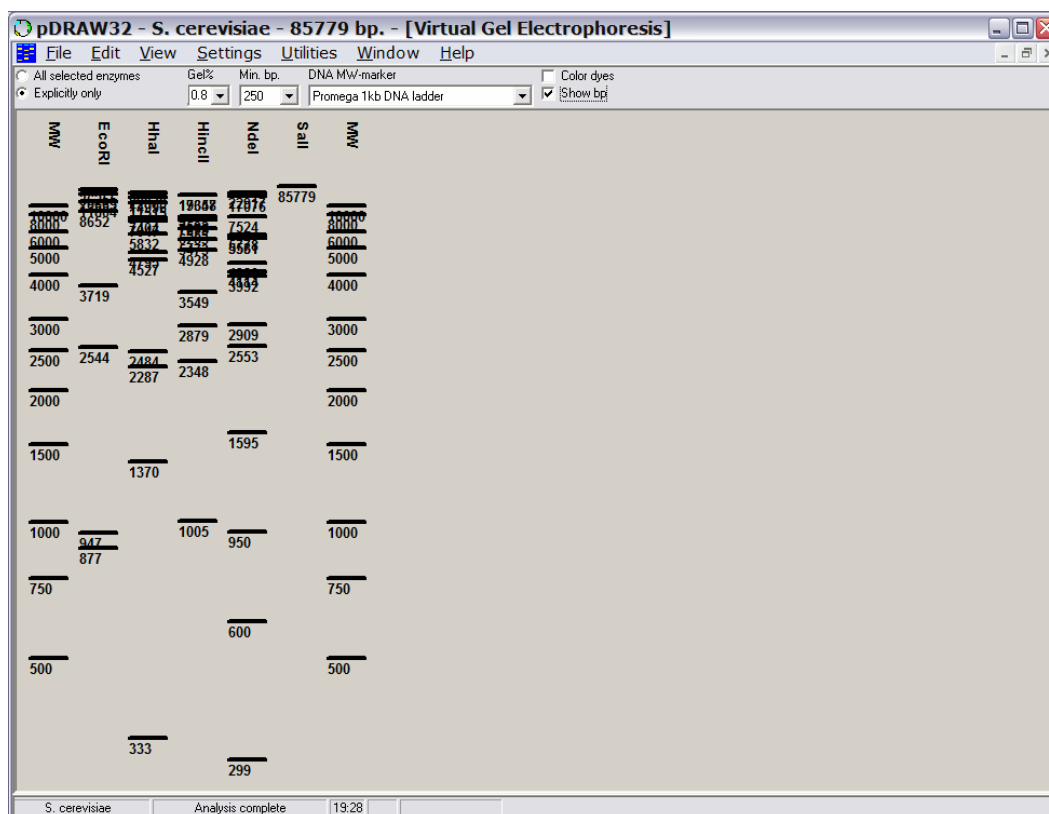
3.2.4.2 Restriksijska analiza mtDNK

Ker se mtDNK v mitohondrijih nahaja v različnih oblikah, in ker je večina oblik prevelikih za ločljivost agarozne gelske elektroforeze, smo se v našem poskusu odločili izolirano mtDNK analizirati s pomočjo specifičnih restriksijskih endonukleaz, ki molekulo DNK režejo le na mestu, kjer je zaporedje nukleotidov ustrezno za določen restriksijski encim.

Raztopino mtDNK v pufru TE (stran 18) smo razdelili v sveže mikrocentrifugirke, in vsaki dodali enega izmed restriksijskih encimov (*EcoRI*, *HincIII*) in pripadajoči pufer po navodilih proizvajalca (Promega) ter inkubirali pri 37 °C 60 minut. Tako pripravljen vzorec smo skupaj z barvilom za elektroforezo prenesli v utore na 0,8 % agaroznem gelu in izvedli elektroforezo pri napetosti 120 V, toku 500 mA in času 60 minut.

3.2.4.3 Virtualni restriksijski diagram

Za kvasovko *S. cerevisiae* je zaporedje nukleotidov za celoten genom poznano. Zaporedje nukleotidov v celotni molekuli mtDNK lahko z uporabo računalniškega programa pDRAW podvržemo virtualni restriksijski analizi, ki nam poda diagram, s pomočjo katerega lahko izberemo najprimernejši restriksijski encim. Prav tako pa lahko restriksijski diagram uporabimo kot referenco, s katero primerjamo restriksijski profil na našem gelu. Če se virtualni in realni restriksijski profil ujemata, obstaja velika verjetnost, da so v vzorcu prisotne pretežno molekule DNK, ki smo jih želeli izolirati (Tippmann, 2004).



Slika 3: Zaslonska slika programa pDRAW32, ki prikazuje virtualni elektroforegram po restrikcijski analizi

3.2.5 Svetlobna in elektronska mikroskopija

Svetlobno (Bradbury, 1998) in presevno elektronsko mikroskopijo (Robards in Wilson, 1993) smo uporabili kot metodi za dokazovanje prisotnosti mitohondrijev v usedlini, pridobljeni po protokolu za izolacijo mitohondrijev iz kvasovk.

3.2.5.1 Svetlobna mikroskopija

Priprava preparata za svetlobno mikroskopijo: na objektno stekelce smo nanegli 30 μ l resuspendirane usedline, nanjo pa kanili kapljico imerzijskega olja. Preparat smo opazovali pod 1000-kratno povečavo svetlobnega mikroskopa Axioimager Z1 (Zeiss) in nekaj opazovanih polj fotografirali (Bradbury, 1998).

3.2.5.2 Elektronska mikroskopija

Pri elektronski mikroskopiji smo uporabili dve tehniki priprave preparatov (Robards in Wilson, 1993), katere smo nato pregledovali s presevnim elektronskim mikroskopom.

3.2.5.2.1 Negativno kontrastiranje z vodno raztopino uranil acetata

Za to tehniko smo uporabili vzorec, ki je bil suspendiran v homogenizacijskem pufru brez dodatka govejega serumskega albumina. Kapljico suspenzije smo nanegli na bakreno mrežico prekrito z Formvar folijo (Robards in Willson 1993) in počakali 30 sekund, da se je del celic usedel na mrežico. Odvečno suspenzijo smo popivnali s kosom filter papirja. Nato smo na mrežico nanegli kapljico 0,5 % vodne raztopine uranil acetata in inkubirali 30 sekund pri sobni temperaturi. Odvečno raztopino smo odstranili s filter papirjem. Mrežice smo posušili na zraku pri sobni temperaturi in jih opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom.

3.2.5.2.2 Vključevanje v smolo

Vzorec v obliki usedline smo v odrezani mikrocentrifugirki zalili z 2 % Nobile agarjem. Strjen agar z vključeno usedlino smo narezali na 2 mm³ velike koščke, ki smo jih fiksirali v 3,5 % glutaraldehidu v 0,1 M fosfatnem pufru (28 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 72 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O [pH 7,2]) (Robinson in sod., 1987) 3,5 do 4 ure pri 4°C. Rezone smo spirali s fosfatnim puffrom 3-krat po 15 minut in jih fiksirali v 1-odstotnem OsO₄ v fosfatnem pufru. Po eno-urni fiksaciji pri 4 °C smo fiksativ spirali 15 minut v fosfatnem pufru. Temu je sledila dehidracija vzorcev v vrsti alkoholov z naraščajočimi koncentracijami: 15 minut v 50 % etanolu, 15 minut v 70 % etanolu, 2-krat 15 minut v 90 % etanolu in 2-krat v 96 % etanolu. Dehidrirane preparate smo postopoma vključili v smolo ERL 4206 "Spurr" (Spurr, 1969) (v nadaljevanju smola). Eno-urnemu vključevanju v 50 % mešanici smole in 96 % etanola je sledilo eno-urno vključevanje v čisti smoli, temu vključevanje preko noči ter ponovno eno-urno vključevanje v čisti smoli. Vključene vzorce smo prenesli v ploščate modele za polimerizacijo, ki je potekala 36 ur pri 70 °C. Ultratanke rezine smo pripravili s steklenimi noži z ultramikrotomom (Reichert Ultracut S, Leica, Avstrija).

Ultratanke rezine smo prenesli na 3-milimetre bakrene mrežice (SPI, ZDA) in jih 7 minut kontrastirali v 4 % raztopini uranil acetata (CH₃COO)₂UO₂ v 70 % etanolu pri sobni temperaturi (Robards in Wilson, 1993). Nato smo mrežice 2-krat spirali v 70 % etanolu, 1-krat v 30 % etanolu in 3-krat v bi-destilirani vodi. Sledilo je 7 minutno kontrastiranje s svinčevim citratom Pb₃(C₆H₅O₇)₂ v bi-destilirani vodi pri sobni temperaturi, pripravljenim

po postopku Fahmy (RobardsWilson, 1993). Kontrastirane mrežice smo 2-krat sprali v 0,1 molarni NaOH, 1-krat v 0,05 M NaOH in 3-krat v bi-destilirani vodi in jih posušili na zraku. Vzorce smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom, nadgrajenim z digitalno kamero in programom za zajemanje in obdelavo slike.

3.3 MATERIALI

3.3.1 Mikroorganizem

Uporabili smo sev kvasovke *S. cerevisiae* - ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete.

Kvasovko smo gojili na petrijevkah s trdnim gojiščem YEPD v inkubatorju pri temperaturi 28 °C in jo precepljali enkrat na teden.

3.3.2 Gojišča

3.3.2.1 Trdno YEPD gojišče

Kvasovko *S. cerevisiae* - ZIM 2155, smo s precepljanjem vzdrževali na ploščah s trdnim 2% YEPD gojiščem, ki je vsebovalo:

Preglednica 1: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

sestavina	količina
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0 g
pepton (Oxoid)	20,0 g
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0 g
agar (Biolife)	20,0 g
dH ₂ O	do 1000 ml

Gojišče smo najprej zaklejili, nato pa sterilizirali 20 minut pri temperaturi 120 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in aseptično razlili v petrijevke.

3.3.2.2 Tekoče YEPD gojišče

Tekoče YEPD gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase na stresalniku.

Preglednica 2: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

sestavina	količina
kvasni ekstrakt (Biolife)	3,3 g
pepton (Oxoid)	6,6 g
brezvodna glukoza (Kemika)	6,6 g
dH ₂ O	do 300 ml

3.3.3 Reagenti in raztopine

3.3.3.1 Izolacija mitohondrijev

Inkubacijski pufer:

Preglednica 3: Sestava inkubacijskega pufra. (Nguyen in Lepingle, 2000)

sestavina	količina
sorbitol	21,86 g
EDTA	0,372 g
Tris HCl (pH 7,4)	0,606 g
dH ₂ O	Dopolnimo do 100 ml

V prazno plastično epruveto smo zatehtali 0,0003 g encima litikaza in mu dodali 0,028 ml merkaptoetanola ter suspenzijo biomase v 4 ml inkubacijskega pufra.

1,2 M raztopina sorbitola

Homogenizacijski pufer:

Preglednica 4: Sestava homogenizacijskega pufra (Jazwinski, 1990)

sestavina	količina
manitol	10,93 g
Tris HCl (pH 7,4)	0,121 g
dH ₂ O	Dopolnimo do 100 ml

Glede na mesto uporabe dodamo pufru tudi goveji serumski albumin v koncentraciji 0,1%.

Pufer B:

Preglednica 5: Sestava pufra B (Nguyen in sod., 2000)

sestavina	količina
NaCl	0,292 g
EDTA	0,186 g
Tris HCl (pH 7,4)	0,303 g
dH ₂ O	Dopolnimo do 50 ml

Pufer TE:

- 10 mM Tris-HCl (pH navadno med 7,6 in 8,0),
- 1 mM EDTA (pH 8,0).

Ostalo:

Merkaptoetanol (Sigma),

PMSF (Sigma),

fenol-kloroform,

kloroform-izoamilalkohol,

izopropanol,

5M NaCl,

70 % etanol.

3.3.3.2 Gelska elektroforeza

Pufer TAE (50 x izhodna raztopina):

Preglednica 6: Sestava pufru TAE (Sambrook in sod., 1989)

sestavina	količina
led očetna kislina	57,1 ml
EDTA	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
tris-HCl	242 g
dH ₂ O	Dopolnimo do 1000 ml

Delovna raztopina: 40 mM Tris-HCl/1 mM EDTA,
agaroz (Biolife, Sigma),

komplet za restrikcijski encim *EcoRI* (Promega),

komplet za restrikcijski encim *HincIII* (Promega).

3.3.3.3 Elektronska mikroskopija

0,5 % uranil acetat,

Nobile agar (Gibco),

smola za vključevanje ERL 4206 "Spurr" (SPI, ZDA),

3,5% glutaraldehyd v 0,1 M fosfatnem pufru (28 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 72 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O [pH 7,2]),

1 % OsO₄ v fosfatnem pufru,

etanol v koncentracijah 50 %, 70 %, 90 % in 96 %,

0,5 % raztopina uranil acetata (CH₃COO)₂UO₂ v 70 % etanolu

svinčev citrat Pb₃(C₆H₅O₇)₂ v bi-destilirani vodi,

0,1 M raztopina NaOH,

0,05 M raztopina NaOH.

3.3.4 Pribor in oprema

3.3.4.1 Priprava gojišč in raztopin

Avtoklav (Sutjeska),
tehnici: Sartorius-exelence, Sartorius-analytic (Sartorius),
magnetno mešalo 550 M (Tehtnica),
magneti za mešanje,
pH meter SevenMulti (Mettler Toledo),
mikrovalovna pečica (Sanyo),
brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra),
petrijevke (Golias),
plastične epruvete z navojnim pokrovom,
steklenice z navojnim pokrovom 50 ml, 150 ml, 500 ml,
merilni valji 50ml, 500ml in 1000 ml,
naprava za filtriranje (Sartorius),
sterilni membranski filtri (premer por 0,2 μm) (Sartorius),
žlice raznih velikosti,
vodna kopel (Heto),
vrtinčnik EV 100 (Tehtnica).

3.3.4.2 Aerobna submerzna kultivacija

cepilne zanke,
brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra),
spektrofotometer MA 9510(Iskra),
rotacijski stresalnik Mrzel,
centrifuga LC-321 (Tehtnica),
500 ml erlenmajerice s stransko kiveto,
steklene centrifugirke,
vrtinčnik EV 100 (Tehtnica),
avtomatske pipete (Gilson),
plinski gorilnik,
mikroskop ATC 2000 (Leica),

inkubator (Sutjeska).

3.3.4.3 Izolacija mitohondrijev

3.3.4.3.1 Predhodna obdelava celične stene

avtomatske pipete (Gilson),
tekoči dušik v izolacijski posodi,
plastične epruvete s navojnim pokrovčkom,
vodna kopel (Amersham),
centrifuga LC-321 (Tehtnica),
vrtinčnik EV 100 (Tehtnica),
svetlobni mikroskop Leica DMLB (Leica).

3.3.4.3.2 Razbijanje celic

avtomatske pipete (Gilson),
stekleni teflonski homogenizator,
digestorij,
posoda z ledom,
steklene kroglice (premer 0,2 mm) (Sigma).

3.3.4.3.3 Diferencialno centrifugiranje

Hlajena centrifuga z rotorjem za mikrocentrifugirke (Sigma),
mikrocentrifugirke - 2 ml (Eppendorf),
avtomatske pipete (Gilson),
stojala za mikrocentrifugirke.

3.3.4.4 Gelska elektroforeza

Centrifuga-vakuumska, za mikrocentrifugirke, UNIVAPO 100H,
hlajena centrifuga z rotorjem za mikrocentrifugirke (Sigma),
usmernik za elektroforezo (Pharmacia Biotech),
kad ter modeli za gel (60 ml) (Pharmacia Biotech),
sistem za dokumentiranje, Gel Doc 1000 UV Gel Documentation system (Bio-Rad),
kadi za barvanje gelov.

3.3.4.5 Elektronska in svetlobna mikroskopija

Avtomatske pipete (Eppendorf),

filter papir,

svetlobni mikroskop Axioimager Z1 (Zeiss),

ultramikrotom Reichert Ultracut S (Leica),

3-milimetrske bakrene mrežice (SPI),

presevni elektronski mikroskop CM 100 (Philips) nadgrajen z:

digitalno kamero Bioscan 792 (Gatan Inc.),

programom za zajemanje in obdelavo slike DigitalMicrograph verzija 3.3.1 (Gatan Inc.).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Na podlagi delovne hipoteze, da bomo razvili preprosto metodo za preparativno izolacijo intaktnih mitohondrijev kvasovke *S. cerevisiae* smo opravili naslednje postopke: enajst kulturacij kvasovke *S. cerevisiae*, devet agaroznih gelskih elektroforez, devet ekstrakcij mtDNK, enajst izolacij mitohondrijev, svetlobno mikroskopiranje, dve elektronski mikroskopiranja z metodo negativnega kontrastiranja z 0,5 % raztopino uranil acetata in eno elektronsko mikroskopiranje ultratankih rezin pripravljeni po metodi vključevanja v smolo.

4.1 AEROBNA SUBMERZNA KULTIVACIJA

Z aerobno submerzno kultivacijo *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo pridobili približno 0,7 g biomase, ki smo jo v celoti uporabili v nadaljevanju poskusa. Med vsemi izvedenimi kultivacijami v celotnem poteku poskusa nismo opazili pomembnih razlik v kakovosti ali količini biomase. Zaradi preprostejšega rokovanja s centrifugami smo kultivacijo izvajali v dveh paralelkah. S tem načinom kultivacije smo želeli doseči, da bi bile kvasovke ob zaključku kultivacije v pozni eksponentni fazi, kar naj bi zagotavljalo večje število mitohondrijev (Defontaine, 1990).

4.2 IZOLACIJA MITOHONDRIJEV

Izolacija mitohondrijev je bil najbolj zahteven del poskusa, pri katerem smo tudi naleteli na največ težav. Glede na zastavljene cilje poskusa je bilo potrebno preveriti uspešnost posameznega protokola za izolacijo mitohondrijev. Zaradi tehnične zahtevnosti in omejenosti z raziskovalno opremo smo se pri načrtovanju poskusa omejili na protokole, ki ne zahtevajo uporabe ultracentrifuge ter cezijevega klorida.

Preskušanje protokolov za izolacijo mitohondrijev in njihove DNK je potekalo v več fazah. Uporabili smo protokole, ki so jih objavili Nedeva (2002), Nguyen (2000) in Defontaine (1991). Posamezni protokol smo preizkusili enkrat in ugotavljali iz katerih razlogov ni dal želenih rezultatov.

V protokolih smo poskušali v zamenjati predpisano opremo za določene korake z opremo, ki nam je bila na voljo. Nekatere zamenjave (sferoplastiranje, homogenizacija celic) smo lahko s pomočjo svetlobnega mikroskopa označili za uspešne, pri drugih (diferencialno centrifugiranje, ekstrakcija mtDNK) pa neposredno dokazovanje uspešnosti zamenjave metode ni bilo mogoče. V takih primerih smo uspešnost zamenjave lahko ocenjevali šele po zaključku celotnega protokola z opazovanjem elektroforegramov ter elektronskih mikrografij (priloge 1, 2 in 3).

Potrebe raziskovalnega procesa so zahtevale tudi preskušanje dodatnih protokolov, ki bi omogočili izolacijo intaktnih mitohondrijev. V ta namen smo preučili protokol Jazwinskega (1990) in ga ocenili kot primernega za predvideni postopek. Bistvo tega protokola je manj agresivno razbijanje.

V celici kvasovke se poleg mitohondrijev, ki jih želimo izolirati, nahajajo tudi druge celične strukture in organeli. Te lahko ovirajo oziroma podaljšujejo postopke, saj je za vsako strukturo v protokol potrebno vključiti dodaten korak za njeno odstranjevanje, kar vpliva tako na končni izkoristek, kot tudi na poškodbe izoliranih mitohondrijev. Tako nam lahko težave pri izolaciji povzročajo:

- Celična stena: zaradi svoje biološke funkcije otežuje homogenizacijo celic. Zaradi potrebe po »nežnejši« obliki homogenizacije, (v homogenizatu naj bi bili nepoškodovani organeli celice) je bilo potrebno celično steno zmehčati in jo odstraniti na način, ki ni povzročil lize sferoplastov. To smo dosegli s predhodno obdelavo celic pred homogenizacijo.
- Drugi organeli, ki so podobne velikosti in gostote kot mitohondriji (liziosomi, endosomi, sekrecijske granule, peroksisomi, lipidne kapljice, diktiosomski vezikli) se med fazami diferencialnega centrifugiranja razporejajo podobno kot mitohondriji. Čim večjo čistost vzorca po diferencialnem centrifugiranju smo poskušali doseči z optimizacijo razmerja pospeškov pri posameznih fazah centrifugiranja.

- Jedro celice z genomsko DNK. Kot se je izkazalo pri analizi končnega izolata z elektroforezo, je bila v izolatu prisotna velika količina genomske DNK. Količino genomske DNK smo poskušali zmanjšati z večkratnim izpiranjem vzorca, v katerem naj bi bili mitohondriji še celi. Kljub našim prizadevanjem, da bi količino genomske DNK v končnem izolatu zmanjšali s spiranjem vzorca, je bilo v končnem izolatu poleg mtDNK še vedno veliko genomske DNK. Zaradi slednje se je tudi dokazovanje prisotnosti mtDNK v končnem izolatu z elektroforezo v povezavi z restriksijsko analizo pokazalo kot neprimerna metoda.

Skupna lastnost protokolov, ki izhajajo iz Defontainovega (1990), je dejstvo, da je končni produkt mtDNK, ki je namenjena za nadaljnjo analizo s pomočjo restriksijskih encimov. Čeprav noben izmed avtorjev ne govori o obliki mtDNK v končnem vzorcu, oziroma o njenih poškodbah, pa v protokolu vsi omenjajo »lizo mitohondrijev«, ki naj bi potekla med postopkom. Predvidevali smo, da bi z zaustavitvijo protokola pred lizo mitohondrijev, dobili frakcijo intaktnih mitohondrijev. Hkrati pa bi po lizi mitohondrijev, ko bi uspeli izolirati mtDNK brez genomske DNK, s suspenzijo ravnali še zelo previdno in s tem ohranili molekule mtDNK.

4.2.1 Predhodna obdelava celic

Po podatkih dobljenih iz literature (Defontaine, 1990; Jazwinski, 2000) ter nekaj uvodnih poskusih je postalo jasno, da bo celično steno potrebno pred razbijanjem ustrezno obdelati, saj je stena odporna na mehanske poškodbe in bi za njeno razbitje v neobdelani obliki potrebovali silo, ki bi zagotovo poškodovala tudi celične organele.

4.2.1.1 Predhodna obdelava z encimom litikaza

Rezultat inkubacije kvasovk v pufru z dodanim encimom litikaza pri 37 °C čez noč je bil opazen ob pregledu vzorca pod svetlobnim mikroskopom, kjer je bilo moč opaziti večje število sferoplastov kot pred inkubacijo. Optimizacija tega koraka je obsegala spreminjanje časa inkubacije (od ene ure do 24 ur), pri čemer pa se razmerje med številom sferoplastov in kvasovk s celično steno po 12 urah ni več bistveno spreminjalo. Omeniti velja še, da se je celična stena kvasovk med inkubacijo dovolj razmehčala tudi pri kvasovkah, ki niso

sferoplastirale, saj se je pri koraku homogenizacije ohranilo le manjše število celic s celično steno, v homogenizatu pa ni bilo prisotnih nepoškodovanih sferoplastov.

Dodaten pomislek izhaja iz dejstva, da so med inkubacijo kvasovke še žive in zato izpostavljene izredno neugodnim pogojem, kar lahko sproži njihove obrambne mehanizme, ki imajo lahko za posledico tudi zmanjšanje števila mitohondrijev (Walker, 1998).

4.2.1.2 Predhodna obdelava s tekočim dušikom

Predhodna obdelava celične stene s tekočim dušikom se je izkazala za neučinkovito, kar smo ocenili z opazovanjem vzorca pod svetlobnim mikroskopom pred in po homogenizaciji. Število opaženih nepoškodovanih kvasovk, ki so bile zmrznjene, je bilo približno enako številu nepoškodovanih nezmrznjenih kvasovk. Sferoplastov pa ne glede na način zamrzovanja nismo opazili. Glede na podatke iz literature lahko sklepamo, da je takšen korak predhodne obdelave celične stene smiseln le v povezavi z uporabo določenega litičnega encima (Zimolaza 20T), ki pa ga za naš poskus ni bilo na voljo (Dingam, 1990).

4.2.2 Homogenizacija predhodno obdelanih kvasovk

4.2.2.1 Homogenizacija s steklenimi kroglicami

Metoda razbijanja celične stene s steklenimi kroglicami se je izkazala za neprimerno, saj je bilo pod mikroskopom že po 5 minutah obdelave moč opazovati veliko število hudo poškodovanih celic. Iz opazovanj pod mikroskopom lahko sklepamo, da je metoda pregroba, saj z njo nismo uspeli doseči zelenega rezultata – to je sferoplastov.

4.2.2.2 Homogenizacija s teflonskim homogenizatorjem

Ker v laboratoriju ni bilo homogenizatorja, ki ga je zahtevala literatura (Dounce homogenizator) (Jazwinski, 1990), smo za naš poskus uporabili kar t. i. teflonski homogenizator, ki je po zgradbi in principu delovanja zelo podoben zahtevanemu. Edina razlika med obema pripomočkoma je material, iz katerega je izdelan bat, ki je pri »Dounce« homogenizatorju steklen, pri teflonskem homogenizatorju pa je izdelan iz teflona. Vzorec smo po inkubaciji v litičnem encimu prelili v tulec teflonskega

homogenizatorja, ki smo ga hladili z ledom. Uspešnost homogenizacije smo spremljali z opazovanjem celic pod svetlobnim mikroskopom Sigma pri 1000-kratni povečavi. V literaturi je bilo uporabljeno 15 potiskov z batom (Jazwinski, 1990). Zaradi uporabe drugačnega homogenizatorja smo z opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom optimizirali število potiskov bata (od 5 do 30). Tudi z uporabljenim homogenizatorjem je bilo najprimerneje uporabiti 15 potiskov bata. Po 15 potiskih bata je bilo v vidnem polju mikroskopa največ približno 70 % poškodovanih celic približno 10 % celic, ki so bile še obdane z celično steno, ter približno 20 % sferoplastiranih celic. Zaradi primernih rezultatov in preproste uporabe smo v nadaljevanju kot metodo za homogenizacijo sferoplastov uporabili homogenizacijo s teflonskim homogenizatorjem (glej 3.2.3.2.2).

4.2.3 Diferencialno centrifugiranje

Metoda diferencialnega centrifugiranja je v našem poskusu predstavljala najpomembnejši korak. Od centrifugiranja je namreč odvisno, kateri deli celice se bodo na koncu nahajali v našem vzorcu. V poskusu smo optimizirali tudi korak diferencialnega centrifugiranja. Rezultat centrifugiranja je bila usedlina, ki naj bi vsebovala mitohondrije.

Pri optimizaciji diferencialnega centrifugiranja smo poskušali ugotoviti, katera nadomestna metoda homogenizacije je najprimernejša. Za potrebe optimizacije smo korak diferencialnega centrifugiranja izvedli po protokolu Defontaine (1990). V tem protokolu se prva faza diferencialnega centrifugiranja izvede pri 1000 x g 10 min, druga pa pri 15000 x g 15 min. Po diferencialnem centrifugiranju vzorca, homogeniziranega s steklenimi kroglicami, nismo dobili usedline, iz česar smo sklepali, da homogenizacija s steklenimi kroglicami ni bila ustrezna metoda za homogenizacijo predhodno obdelanih kvasovk. Po diferencialnem centrifugiranju vzorca, homogeniziranega s teflonskim homogenizatorjem, pa smo dobili usedlino, ki smo jo dali v končno analizo za preverjanje prisotnosti mitohondrijev.

V drugi fazi optimizacije, smo se osredotočili na drugi korak diferencialnega centrifugiranja, za katerega so v objavljenih protokolih na voljo različni podatki. Tako se je pospešek, predviden za drugo fazo centrifugiranja giblje med 8000 x g (Jazwinski, 1990) in 20000 x g (Nelson in Cox, 2000). Preverjanje učinkovitosti predlaganih pospeškov pri

centrifugiranju se je izkazalo za tehnično zahtevno elektronsko mikroskopiranje vzorcev, zato smo se odločili, da bomo v končnem protokolu uporabili zaporedje centrifugalnih pospeškov, kot ga predlaga Jazwinski (1990), torej 1000 x g 5 min, ki mu sledi 8000 x g 10 min, katerega protokol je najbolj ustrezal zastavljenemu cilju izolacije intaktnih mitohondrijev.

4.2.4 Preverjanje prisotnosti mitohondrijev v usedlini

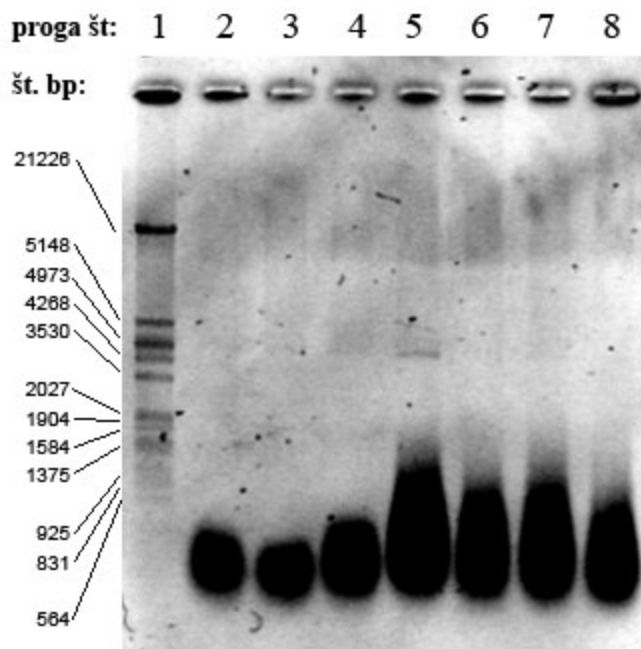
4.2.4.1 Dokaz prisotnosti mitohondrijev z gelsko elektroforezo

Horizontalna elektroforeza v agaroznem gelu je primerna metoda za dokaz prisotnosti mtDNK v vzorcu saj naj bi se mtDNK sprostila iz mitohondrialnega matriksa šele med izolacijo mtDNK iz mitohondrijev, značilno zaporedje nukleotidov in oblika mtDNK pa omogoča dokazovanje njene prisotnosti z restrikcijsko analizo in njeno primerjavo z »*in silico*« restrikcijskim diagramom (slika 5).

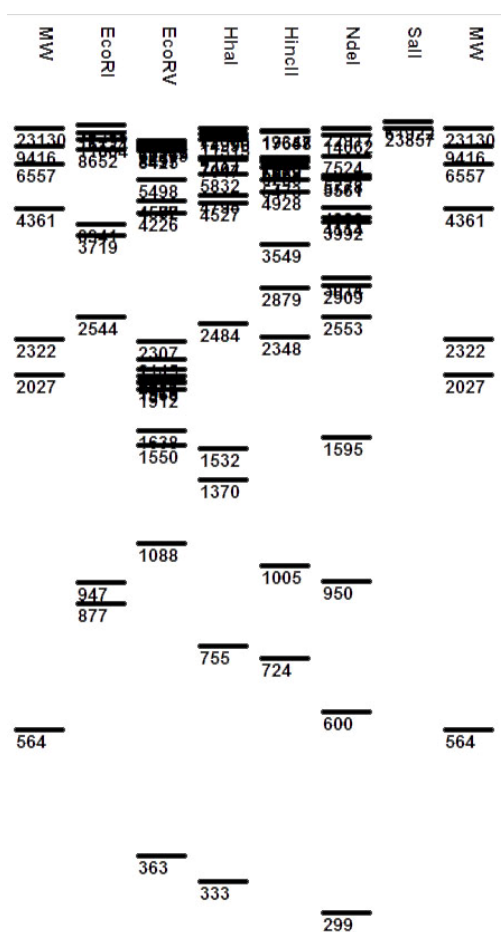
Za izvedbo analize z restrikcijskim encimom je bilo potrebno mtDNK čim bolj očistiti neželenih primesi. V izhodiščnem protokolu (Nguyen in Lepingle, 2000) so v ta namen uporabili tako imenovano alkoholno ekstrakcijo DNK, ki smo jo uporabili tudi v našem poskusu. Metoda je sestavni del protokola, ki jo sestavlja več korakov ekstrakcije in centrifugiranja. Med našim poskusom smo izolacijo mtDNK poskušali izvesti na način, ki bi čim manj poškodoval mtDNK. V ta namen smo faze po ekstrakciji pipetirali z odrezanimi nastavki za avtomatsko pipeto, ki ob pipetiranju ustvarjajo manj strižnih sil. Zaradi predvidevanja, da se mtDNK v vzorcu nahaja v zelo majhni količini, smo opustili dodatek encima DNA-ze, ki lizira vso DNK, ki mu je dostopna (tako genomsko, kot mitohondrijsko). Ker so bili v tej fazi izolacije mitohondriji že vidno poškodovani je DNA-za lizirala tudi mtDNK, kar je vidno tudi iz ferograma. Spremenjena izolacija se je pokazala le kot delno učinkovita. Na elektroforegramu vzorca smo opazili močan signal DNK razvrščen v veliki lisi, nad katero je bilo mogoče opaziti nekaj poudarjenih pasov.

Tako izolirano mtDNK smo razrezali z restrikcijskimi encimi *EcoRV* in *HinCII*, za katere smo z uporabo programa pDRAW32 za sekvenco mtDNK »*in silico*« dobili prepoznaven

restrikcijski vzorec, ki bi, v primeru prisotnosti mtDNK, ustrezal elektroforegramu po restrikcijski analizi.



Slika 4: Elektroforegram izolata kvasovk *S. cerevisiae* po analizi z restrikcijskimi encimi. Domnevno izolirana mitohondrijska DNK, razrezana z restrikcijskimi encimi. Proga 1: molekularni označevalec (λ DNK obdelana z *Hind*III in *Eco*RI), proge 2, 3 in 4: DNK po inkubaciji z restrikcijskim encimom *Eco*RI, proga 5: DNK po inkubaciji z restrikcijskim encimom *Hin*CII, proge 6, 7 in 8: DNK brez dodatne obdelave



Slika 5: Virtualni restrikcijski diagram, narisani s programom pDRAW32 za encime *EcoRI*, *EcoRV*, *HhaI*, *HincII*, *NdeI* in *SalI* za nukleotidno zaporedje mtDNK kvasovke *S. cerevisiae*. Na progah 1 in 8 (označeni z MW) je prikazan molekularni označevalec (λ DNK obdelana z *HindIII*) številke pomenijo število baznih parov v fragmentu

Primerjava elektroforegrama in virtualnega restrikcijskega diagrama je pokazala precejšnja odstopanja iz česar smo lahko sklepali, da vzorcu ni prisotna le mtDNK. Najverjetneje je bila v vzorcu prisotna tudi znatna količina genomske DNK ter RNK (encima RNK-za nismo uporabili), ki je na elektroforegramu po vsej verjetnosti vidna kot lisa v ozadju, ter na dnu slike agaroznega gela (slika 4).

Za slabo ujemanje elektroforegrama po restrikcijski analizi in virtualnega restrikcijskega diagrama lahko navedemo več možnih vzrokov. Med postopkom izolacije mtDNK je lahko prišlo do mehanskih poškodb molekule mtDNK, kar je imelo za posledico odstopanje restrikcijskega profila. Mehanske poškodbe namreč povzročijo nastanek več manjših delov

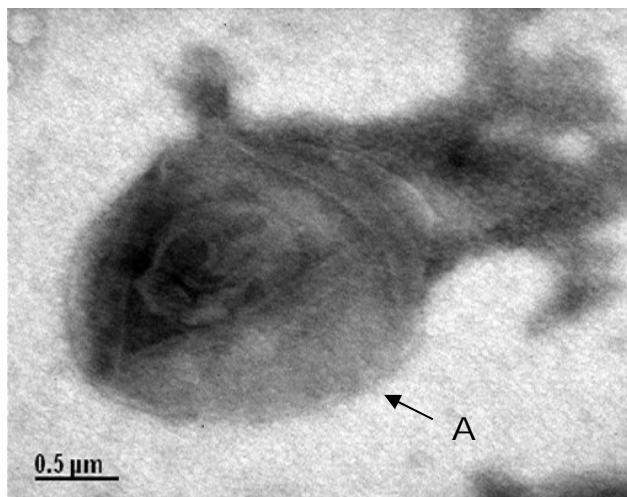
mtDNK, te pa encim razreže na še več manjših delov, kar je opazil že Nguyen in sod. (2000). Poleg tega so uporabljene protokoli za izolacijo mtDNK namenjeni nadaljnji PCR analizi, pri kateri za uspešno analizo zadošča že zelo majhna količina intaktnih molekul mtDNK in je hkrati neobčutljiva na kontaminacijo z genomsko DNK. Ti protokoli pa niso primerni za restrikcijsko analizo, pri kateri je potrebna večja količina nepoškodovanih molekul mtDNK. V našem poskusu smo zaradi zmanjševanja mehanskega stresa na molekule mtDNK zmanjšali število izpiranj vzorca s pufrom, rezultat pa je bila le povečana količina genske DNK, ki naj bi jo ta korak odstranil. Temne lise na dnu elektroforegrama bi lahko pripisali RNK, ki je bila v vzorcih zagotovo prisotna. Encima RNAza nismo uporabili, ker smo domnevali, da se bodo morebitne lise mtDNK pojavile na zgornjem delu elektroforegrama (pričakovali smo velikosti med 20000 in 5000 baznimi pari), to je višje kot lise RNK, katere največji fragmenti niso presegali dolžine 1000 baznih parov. Povzamemo lahko, da metoda primerjanja elektroforegrama po restrikcijski analizi in virtualnega restrikcijskega diagrama zaradi omenjenih razlogov ni dala pričakovanih rezultatov.

4.2.4.2 Dokaz prisotnosti mitohondrijev z elektronsko mikroskopijo

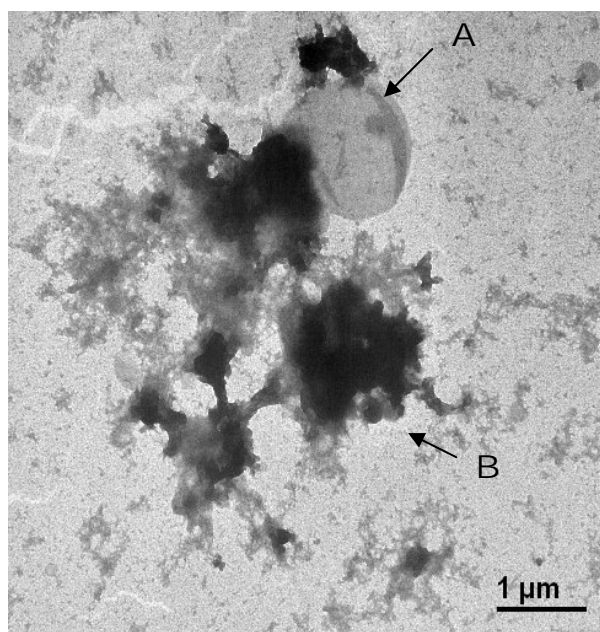
Dokazovanja prisotnosti mitohondrijev z elektronsko mikroskopijo smo se lotili v dveh korakih, opisanih v metodah. Pred tem smo opravili še predposkus s svetlobnim mikroskopom, s katerim smo ocenili, da bi z elektronsko mikroskopijo lahko opredelili strukture, ki jih je vseboval preparat (priloga 1).

Prvi korak, to je negativno kontrastiranje z vodno raztopino uranil acetata, smo uporabili za oceno primernosti vzorca za drugi korak, to je izdelava in opazovanje ultratankih rezin. Rezultat negativnega kontrastiranja je viden na slikah 6 in 7 ter prilogi 2, na katerih so vidne kroglaste membranske strukture, ki bi lahko glede na velikost in številčnost v opazovanem vzorcu lahko ustrezale mitohondrijem. Metodo negativnega kontrastiranja smo ponovili dvakrat, pri drugem poskusu smo, z namenom zmanjšanja organskih snovi v vzorcu, na katere se nespecifično veže kontrastirno sredstvo in tako moti opazovanje, pri izolaciji mitohondrijev izpustili dodatek govejega serumskega albumina v homogenizacijskemu pufri. Po drugem opazovanju preparatov pripravljenih z metodo negativnega kontrastiranja smo ocenili, da je vzorec primeren za potrjevanje

mitohondrijem podobnih membranskih struktur na podlagi njihove ultrastrukture, ki smo jo opazovali na ultratankih rezinah.

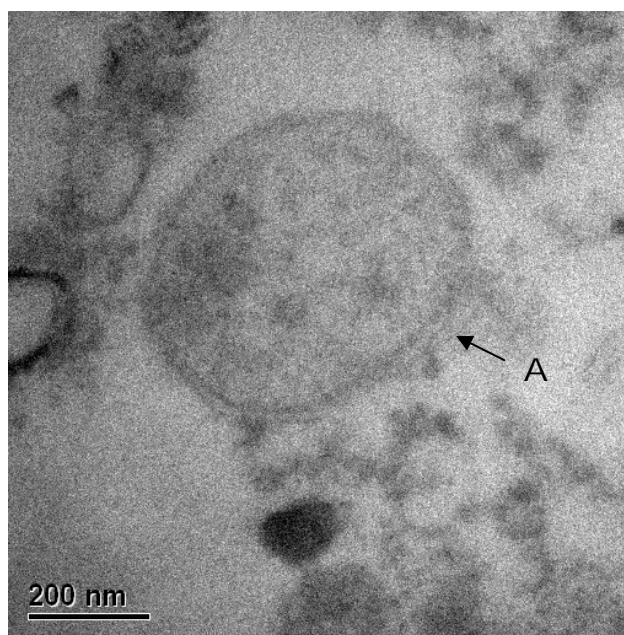


Slika 6: Kroglasta struktura (A) v preparatu, ki bi po velikosti in obliki lahko ustrezala mitohondrijem, nakazuje možnost, da gre za mitohondrij kvasovke *S. cerevisiae*. (Kot tehnika priprave vzorca za elektronski mikroskop je bilo uporabljeno negativno kontrastiranje z uranil acetatom)

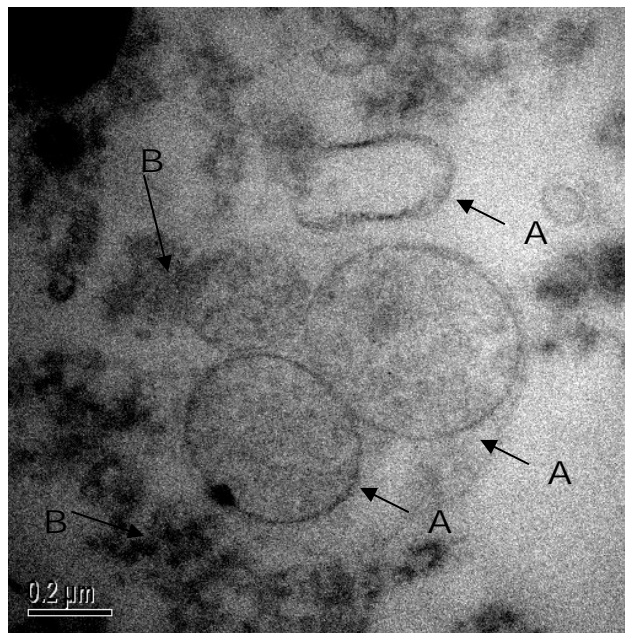


Slika 7: Mitohondriju podobna kroglasta struktura (A) ujeta v množico nečistoč (B) v preparatu vzorca. (Kot tehnika priprave vzorca za elektronsko mikroskopiranje je bilo uporabljeno negativno kontrastiranje z uranil acetatom)

Metoda izdelave in opazovanja ultratankih rezin omogoča opazovanje ultrastrukture opaženih kroglastih membranskih struktur. Kljub podobni zunanji morfologiji imajo le mitohondriji nagubano notranjo membrano, ki jo razlikuje od ostalih organelov podobne velikosti, kar omogoča neposredno ločevanje organel v naših izolatih. Kljub pregledovanju ultrastrukture organelov v naših vzorcih, nismo mogli nedvoumno potrditi prisotnosti večjega števila intaktnih mitohondrijev v vzorcih. Na slikah 8, 9 in prilogi 3 so tako vidne kroglaste in ovalne strukture z nakazanimi strukturami v notranjosti, ki bi morda lahko bile deli notranje mitohondrijske membrane. Opažene strukture se sicer razlikujejo od elektronskih mikrografij mitohondrijev, ki jih najdemo v literaturi (Jastrow, 2006), vendar moramo upoštevati, da so bili v naši raziskavi mitohondriji med izolacijo izpostavljeni različnim ozmotskim in mehanskim obremenitvam. To bi ob občutljivi strukturi mitohondrijev lahko bil razlog za njihov popačen videz v primerjavi s slikami iz literature (Alberts, 1994). Opisane strukture pa bi prav tako lahko predstavljale druge celične organele s podobno strukturo in gostoto, saj metoda diferencialnega centrifugiranja, ki smo jo uporabili za izolacijo mitohondrijev, ni dovolj specifična.

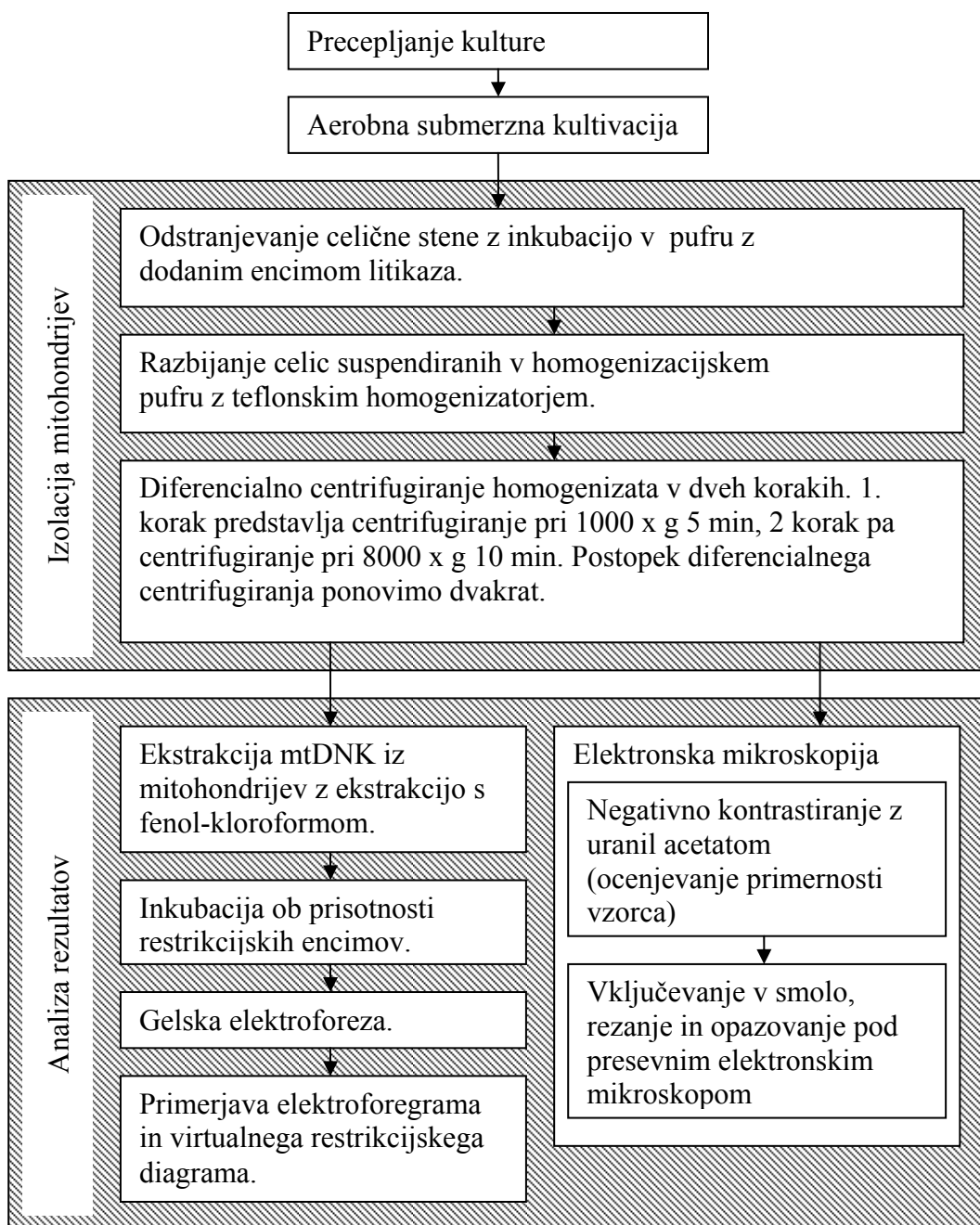


Slika 8: Elektronska mikrofografija ultratanke rezine izoliranih mitohondrijev po vključevanju v smolo. Kroglasta struktura (A) z nakazanimi kristali dopušča razlago, da gre za mitohondrij kvasovke *S. cerevisiae*



Slika 9: Elektronska mikrografija ultratankih rezin po vključevanju v smolo prikazuje kroglaste strukture, ki bi lahko predstavljale mitohondrije (A) in nečistoče (B), prisotne v vzorcu

4.3 KONČNO ZAPOREDJE KORAKOV V POSKUSU



Slika 10: Hodogram končnega protokola

5 SKLEPI

V raziskavi smo preskusili različne protokole, s katerimi smo želeli pridobiti mtDNK iz kvasovke *S. cerevisiae*.

Za izhodišče pri sestavljanju ustreznega protokola smo uporabili protokole, ki so jih različni avtorji uporabili za pridobivanje mitohondrijske DNK ali intaktnih mitohondrijev. Preskusili smo pet protokolov, ki so bili praktično izvedljivi v laboratoriju Katedre za biotehnologijo. Na podlagi opravljenih poskusov smo v naš končni protokol umestili korake, s katerimi smo uspešno pridobili zadostno količino usedline.

Na podlagi študija literature in opravljenih poskusov ugotavljamo, da s preskušeni protokoli nismo odkrili preproste metode za preparativno izolacijo intaktnih mitohondrijev kvasovke *S. cerevisiae*, zato smo ovrgli postavljeno hipotezo.

Slike z elektronskim mikroskopom sicer nakazujejo prisotnost mitohondrijev v usedlini, vendar pa ti niso intaktni in tudi ne v količinah, ki bi zadoščale kriterijem za enostavno preparativno izolacijo.

6 POVZETEK

Zaradi svoje ključne vloge v evkariontskih celicah so mitohondriji predmet intenzivnih raziskav v bioloških znanostih, za kar je potrebno izolirati čim večje količine intaktnih mitohondrijev. Kvasovka *S. cerevisiae* je pogosto uporabljena kot modelni organizem za raziskave organizacije in lastnosti evkariontskih celičnih organelov. Kljub temu v dostopni literaturi nismo našli podatkov o uporabi mitohondrijev, izoliranih iz kvasovk v »preparativnih« količinah. Prvotni cilj diplomske naloge je bil izolirati mtDNK v krožni obliki in jo uporabiti kot modelno molekulo za študij vezave velikih DNK molekul na kromatografske nosilce. Med potekom poskusa smo zaradi tehničnih zapletov osnovno idejo spremenili in dograjevali ter izoblikovali hodogram z naslednjimi koraki: precepljanje kulture *S. cerevisiae*, aerobno submerzno kultivacijo, postopke za izolacijo mitohondrijev (odstranjevanje celične stene, razbijanje celic, diferencialno centrifugiranje) in analizo usedlin z gelsko elektroforezo in elektronsko mikroskopijo. Pri postopkih izolacije mitohondrijev smo izločili tiste, ki so zahtevali laboratorijsko opremo, tehnike ali kemikalije, ki ji nismo imeli na voljo. Za predhodno obdelavo celic smo kot učinkovito metodo izbrali inkubacijo v pufru z dodanim encimom litikaza. Za homogenizacijo sferoplastov smo uporabili teflonski homogenizator. Metoda diferencialnega centrifugiranja je v našem poskusu predstavljala pomemben korak, od katerega je odvisno, kateri deli celice se bodo nahajali v končnem vzorcu. Po diferencialnem centrifugiranju smo usedline analizirali s pomočjo gelske elektroforeze in elektronske mikroskopije. V usedlinah smo z elektronsko mikroskopijo pri 60000-kratni povečavi potrdili prisotnost membranskih struktur, ki bi glede na velikost in morfologijo lahko pripadali mitohondrijem. Z opisanimi poskusi nismo razvili preproste metode za preparativno izolacijo intaktnih mitohondrijev kvasovke *S. cerevisiae*. Na podlagi preučenih lastnosti mitohondrijev *S. cerevisiae* ter preučenih in preskušanih protokolov za izolacijo mitohondrijev ugotavljamo, da diferencialno centrifugiranje ni primerna metoda za preparativno izolacijo mtDNK ali intaktnih mitohondrijev iz *S. cerevisiae*.

7 VIRI

- Alberts B., Bray D., Levis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 1994. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York, Garland Publishing, Inc.: 1294 str.
- Andrade M. J., Rodriguez M., Sanchez B., Aranda E., Cordoba J. J. 2006. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 1: 48-58.
- Atlas M. R. 1993. Handbook of microbiological media. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press Inc.: 1079 str.
- Bendich A. J. 1996. Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 255, 4: 564-588.
- Bignell G. R., Miller A. R. M., Evans I. H. 1996. Isolation of mitochondrial DNA. V: Yeast protocols. Evans I. H. (ed.). Totowa, NJ, Humana Press Inc.: 109-117.
- Bradbury S. 1998. Introduction to Light Microscopy. 2nd ed. New York, Bios Scientific Publishers.: 136 str.
- Daum G., Bohni P. C., Schatz G. 1982. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 21: 13028-13033.
- Defontaine A. 1991. A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 19, 1: 185-185.
- Dignam J. D. 1990. Preparation of extracts from higher eukaryotes. V: Methods in Enzymology, Academic Press: 194-203.
- Gillham N. W. 1994. Organelle genes and genomes. New York, Oxford University Press Inc.: 436 str.

- Goranovič D. 2005. Vpliv matičnega mlečka na vitalnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 60 str.
- Gray M.W., Burger G., Lang B.F. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology*, 2 (6): 10180-10185.
- Jastrow H. 2006. Mitochondria Dr.Jastrow's EM-Atlas. Johannes Gutenberg-University. (junij 2006)
<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMMitoE.html>
(junij 2006): 1 str.
- Jazwinski M. S. 1990. Preparation of extracts from yeast. *Methods in Enzymology*, 182: 154-174.
- Lichanska A. M. 2001. Virtual restriction analysis. *Genome Biology*, 2, 11: 42-42.
- Meisinger C., Sommer T., Pfanner N. 2000. Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Analytical Biochemistry*, 287: 339-342.
- Nedeva T., Petrova V., Hristozova T., Kujumdizeva A. 2002. A Modified procedure for isolation of yeast mitochondrial DNA. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57C: 960-961.
- Nelson D. L., Cox M. M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 1152 str.
- Nguyen H., Lepingle A. 2000. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 71-85.

- Querol A., Barrio E. 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 18, 6: 1657-1657.
- Rajapakse N., Shimizu K., Payne M., Busija D. 2001. Isolation and characterization of intact mitochondria from neonatal rat brain. *Brain Research Protocols*, 8, 3: 176-183.
- Robards A. W., Wilson A. J. 1993. *Procedures in electron microscopy*. New York, John Wiley & Sons Ltd.: 700 str.
- Robinson D. G., Ehlers U., Herken R., Herrmann B., Mayer F., Schürmann F.-W. 1987. *Methods of preparation for electron microscopy*. Berlin, Springer-Verlag: 190 str.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press: loč. pag. E3-E16.
- Schatz G., Kovac L., Fleischer S., Lester P. 1974. Isolation of promitochondria from anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 31: 627-632.
- Scopes R. K. 1987. *Protein purification: principles and practice*. 2nd ed. New York, Springer Verlag: 328 str.
- Spurr A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 31-43.
- Tippmann H. F. 2004. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform*, 5, 1: 82-87.
- Colorful electrophoresis. 2003. Salt Lake City, University of Utah (2003)
<http://learn.genetics.utah.edu/units/activities/electrophoresis/> (maj 2006): 2 str.
- Visser W., Spronsen E. A., Nanninga N., Pronk J. T., Kuenen J. G., Dijken J. P. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3: 243-253.

Walker M. G. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 350 str.

Wikipedia, the free encyclopedia. 2006. Mitochondrion - Wikipedia, the free encyclopedia.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondria/> (maj 2006): 7 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so me v času študija vzpodbujali, mi pomagali z nasveti, nasmehi ali so mi bili zgolj za vzor. Posebna zahvala gre:

Dr. Poloni Jamnik, za pomoč pri vodenju poskusa, urejanju misli pri pisanju diplomske naloge in številne spodbudne besede.

Prof. dr. Petru Rasporju za izziv in priložnost, da sem svoje diplomsko delo lahko pripravljaj na področju biotehnologije ter za tehtne pripombe pri končni izdelavi naloge.

Doc. dr. Roku Kostanjšku za pomoč pri elektronski in svetlobni mikroskopiji ter njegove tehtne in iskrive pripombe.

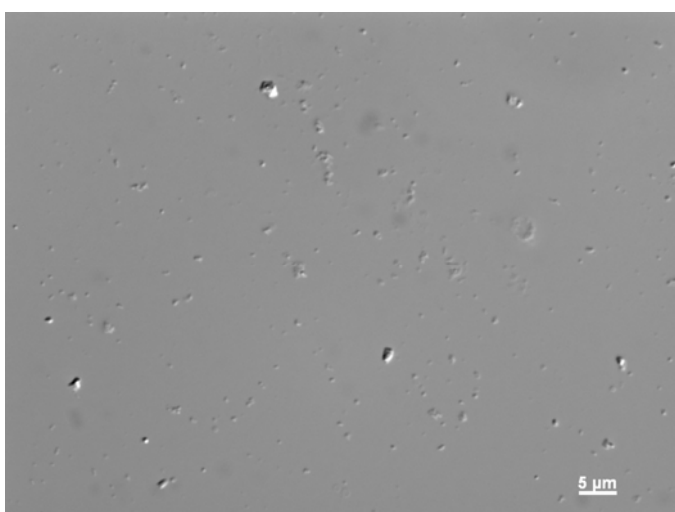
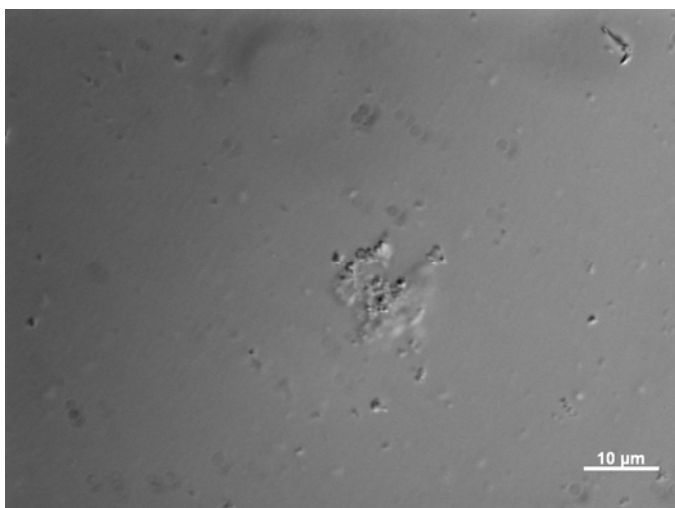
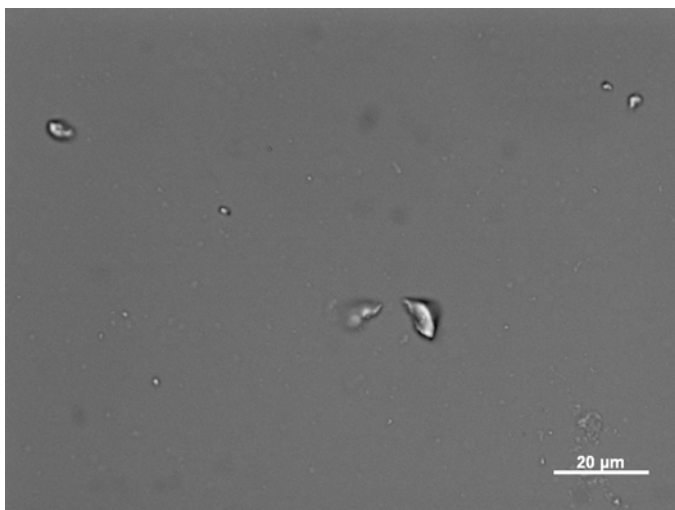
Staršema, da sta me skoraj vedno razumela in bila pripravljena pomagati.

Nini za vse stvari, ki jih je težko napisati.

Sandiju za prijateljstvo in vsa popotovanja v Domžale.

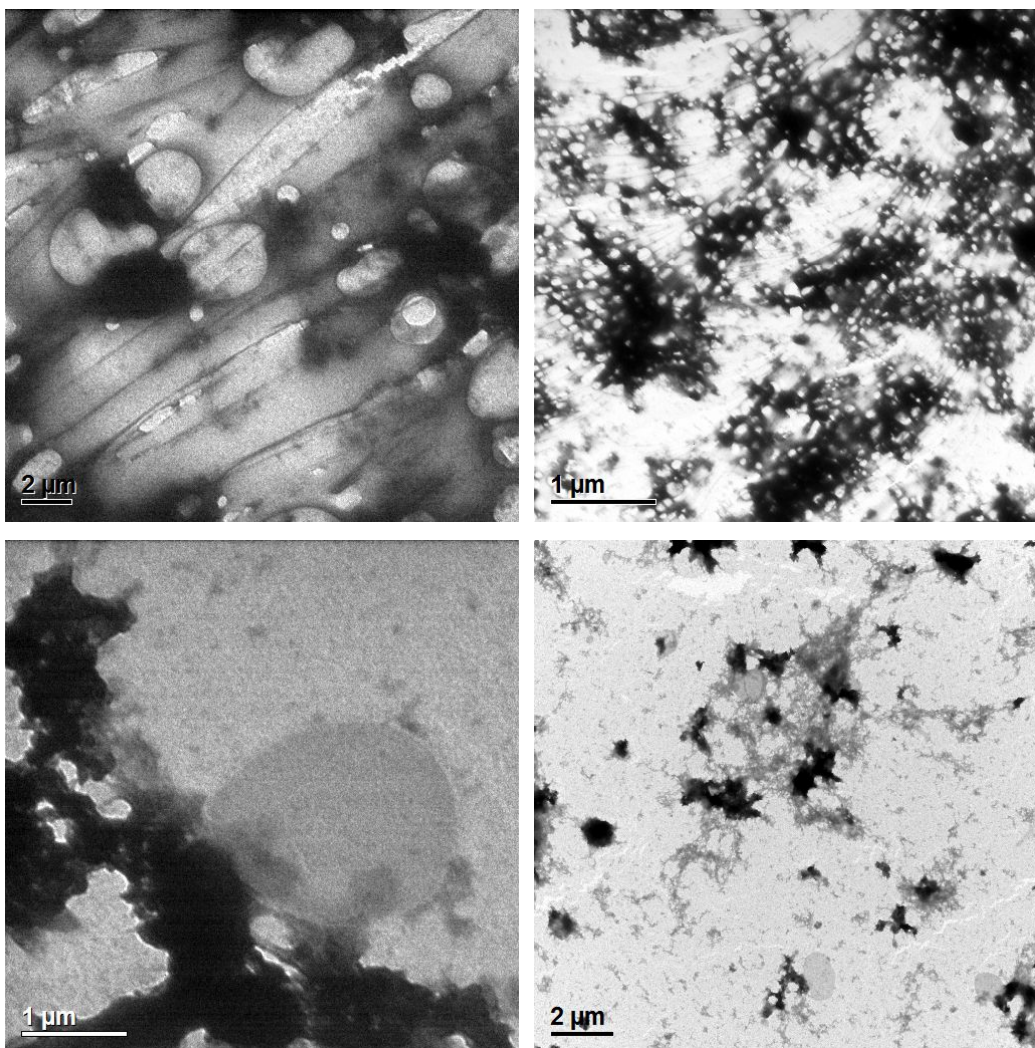
PRILOGE

Priloga 1: Mikrografije preparatov končne usedline, pridobljene po postopku za izolacijo mitohondrijev, posnete s svetlobnim mikroskopom Axioimager Z1 (Zeiss)

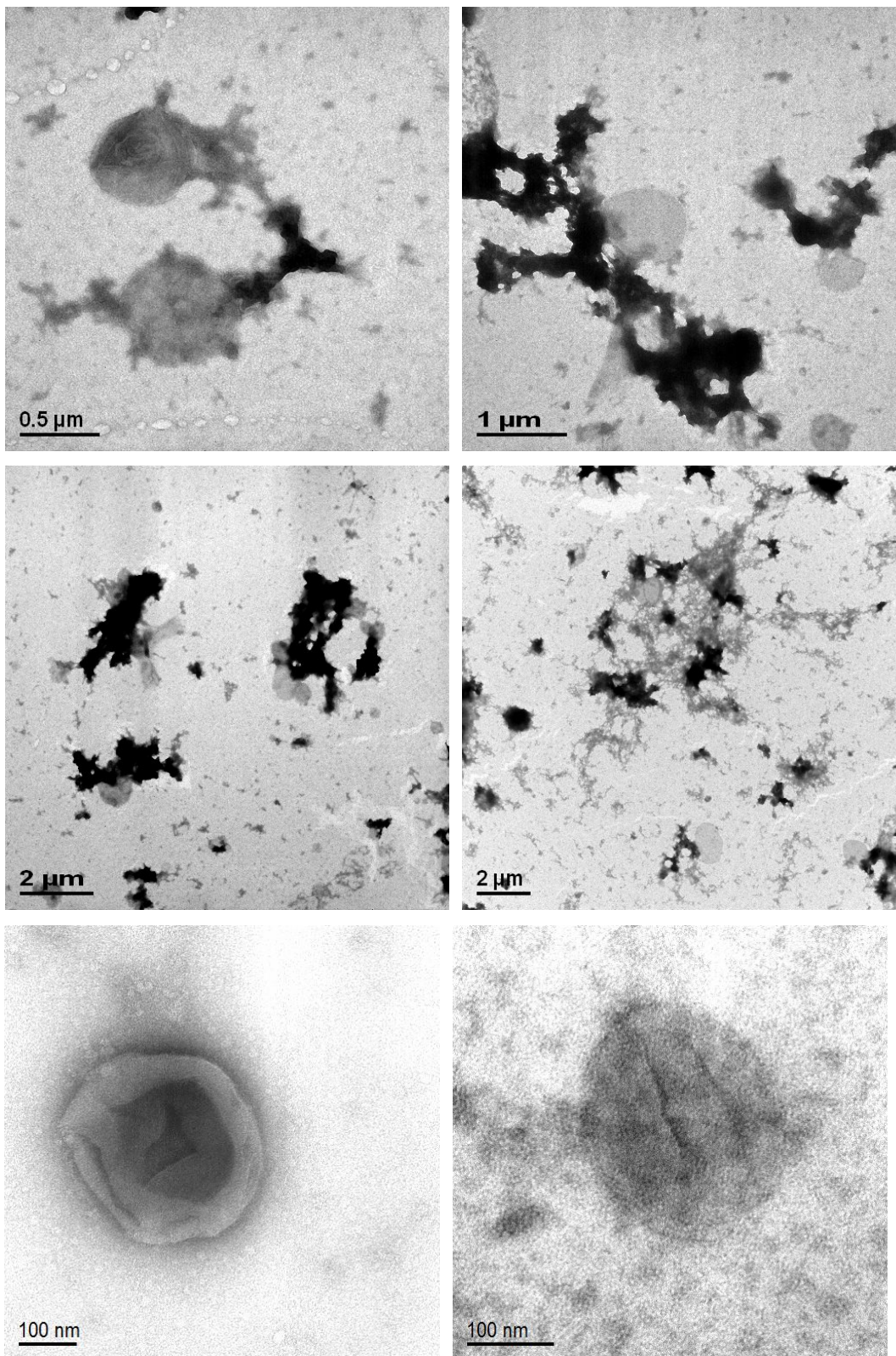


Priloga 2: Elektronske mikrofotografije končne usedline pripravljene po metodi negativnega kontrastiranja s 0,5 % raztopino uranil acetata.

Prva kultivacija (homogenizacijski pufer) (preglednica 4) z dodanim govejim serumskim albuminom:



Druga kultivacija (homogenizacijski pufer) (preglednica 4) brez dodanega govejega serumskega albumina:



Priloga 3: Elektronske mikrofografije ultratankih rezin pripravljenih z vključevanjem v smolo.

