



Frakcjonowanie komórek

- Wprowadzenie
- Przeczytaj
- Wirtualne laboratorium - WL-I
- Sprawdź się
- Dla nauczyciela



Fracjonowanie komórek

Wirowania były stosowane w laboratoriach chemicznych już od 1852 r. Urządzenie używane w tym procesie to wirówka.

Źródło: Darko Stojanovic, Pixabay, domena publiczna.

Rozwój wielu dziedzin biologii, w tym biologii komórki, genetyki czy biologii molekularnej, był możliwy dzięki poznaniu metod izolacji struktur komórkowych. Odróżnienie organelli umożliwiło prowadzenie szczegółowych badań procesów zachodzących nie tylko na poziomie komórki, ale także w jej poszczególnych elementach. W jaki sposób naukowcom udaje się pozyskać tak niewielkie struktury?

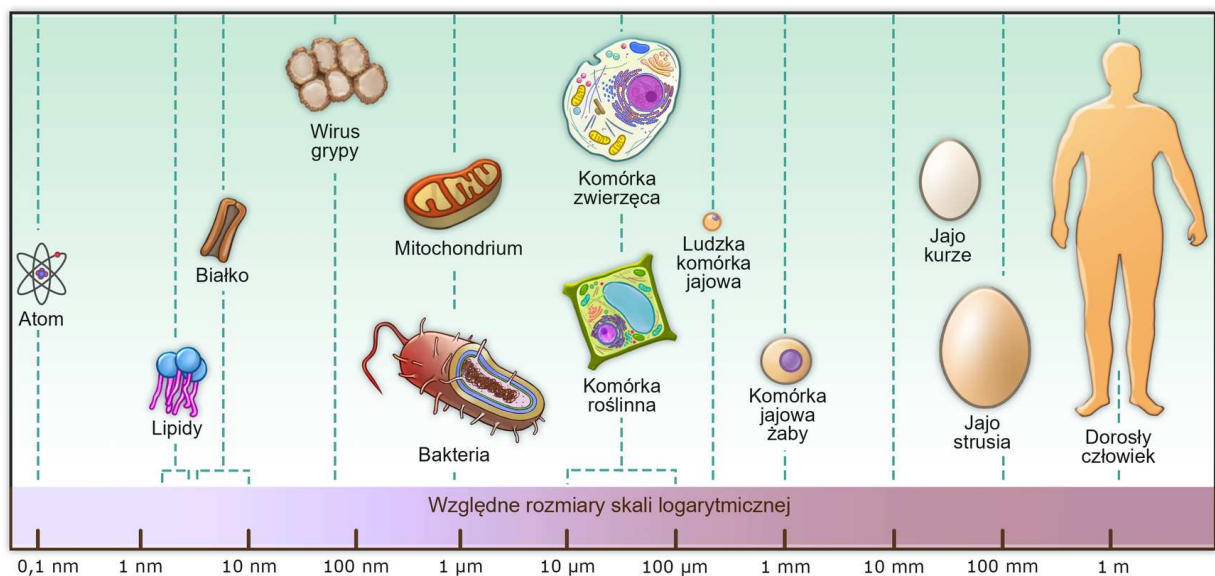
Twoje cele

- Opiszysz metody dezintegracji komórek.
- Wykażesz zależność między gęstością struktur komórkowych a ilością obrotów w wirówce podczas różnicowania.
- Omówisz etapy frakcjonowania komórek.
- Przeprowadzisz frakcjonowanie komórek w wirtualnym laboratorium.

Przeczytaj

Komórka jest podstawową jednostką budulcową i funkcjonalną organizmów. Składa się ona z protoplazmy i zawieszonych w niej struktur komórkowych (**organelli**), które otacza błona komórkowa. Niektóre komórki mogą mieć dodatkowe struktury otaczające – ścianę komórkową.

Organelle pełnią różne funkcje: mogą m.in. uczestniczyć w oddychaniu wewnątrzkomórkowym, usuwaniu zbędnych metabolitów czy magazynowaniu substancji. Elementy strukturalne komórki różnią się między sobą nie tylko rolą, lecz także wielkością i gęstością. Te dwie ostatnie cechy wykorzystuje się do rozdzielania poszczególnych struktur komórkowych, czyli frakcjonowania.



Porównanie wielkości różnych obiektów z uwzględnieniem różnych typów komórek.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Etapy frakcjonowania komórek

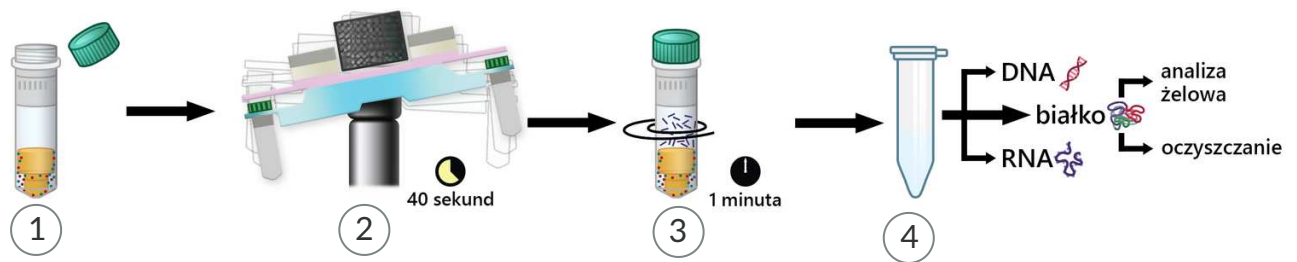
Frakcjonowanie komórek przebiega trój etapowo. Pierwszy etap polega na dezintegracji komórek, w drugim wykorzystuje się **wirowanie różnicowe**, a w trzecim – wirowanie gradientowe.

1. Dezintegracja komórek

Dezintegracja komórek polega na rozbiciu ich barier zewnętrznych, takich jak błona i ściana komórkowa. W jej wyniku z komórek zostają uwolnione organelle i makromolekuły (cząsteczki złożone z więcej niż 1000 atomów, np. DNA). Ważne jest, aby do dezintegracji materiału biologicznego dobrać odpowiednią metodę, która pozwoli na izolowanie pożądaných cząstek i zachowanie ich właściwości. W tym celu komórki zawieszają się w specjalnych roztworach, zwanych buforami. Istnieje kilka metod wykorzystywanych do dezintegracji komórek. Należą do nich metody fizyczne (np. rozcieranie, wytrząsanie z kulkami szklanymi/krzemionkowymi, **homogenizacja**, zamrażanie–rozmarzanie), biologiczne (trawienie enzymatyczne) i chemiczne (**liza** odczynnikami alkalicznymi i detergentami).

Ważne!

Homogenizacja polega na rozdrobnieniu komórek w urządzeniu zwanym homogenizatorem. W wyniku homogenizacji powstaje jednorodna mieszanina nazywana **homogenatem**.



1

Przygotowanie próbki do dezintegracji

2

Homogenizacja mechaniczna ze szklanymi kuleczkami o różnej średnicy

3

Wirowanie w celu uzyskania osadu

4

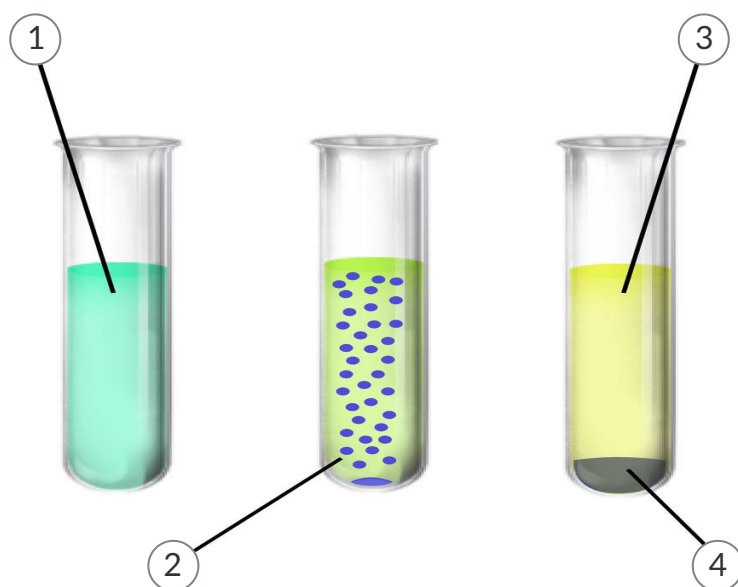
Przeniesienie płynnej warstwy nad osad (supernatantu) do nowej probówki

Schemat przedstawiający etapy frakcjonowania.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

2. Wirowanie różnicowe

W celu odróżnienia zawieszonych w roztworze struktur komórkowych przeprowadza się wirowanie różnicowe, polegające na wykorzystaniu różnic w gęstości struktur komórkowych. Pod wpływem działania siły odśrodkowej, w zależności od gęstości, struktury układają się w roztworze warstwowo: cięższe opadają szybciej (tworząc osad na dnie), zaś lżejsze wolniej i pozostają zawieszone w górnych warstwach roztworu zwanych **supernatantem**.



1

roztwór przed wirowaniem różnicowym

2

roztwór poddany wirowaniu różnicowemu

3

supernatant

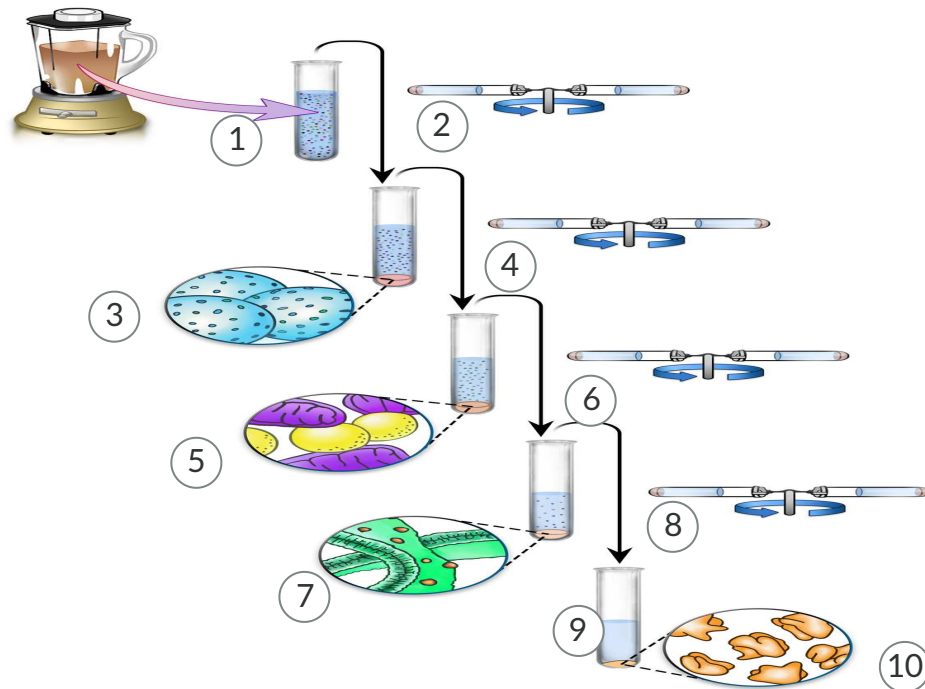
4

osad

Schemat przedstawiający powstawanie osadu i supernatantu.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Aby otrzymać osad z elementów strukturalnych komórek o mniejszej gęstości, supernatant przenosi się do nowej probówki, a następnie przeprowadza wirowanie przy większych prędkościach obrotowych.



1

Homogenat zawierający zawieszone w nim elementy komórkowe (np. rybosomy, kwasy nukleinowe, fragmenty błony komórkowej).

2

Wirowanie
1000 × g (10 min)

3

Osad z jąder komórkowych.

4

Wirowanie supernatantu
20 000 × g (20 min)

5

Mitochondria, lizosomy i chloroplasty w osadzie.

6

Wirowanie supernatantu
80 000 × g (60 min)

7

Osad z retikulum endoplazmatycznego i fragmentów błony komórkowej.

8

Wirowanie supernatantu
150 000 × g (3 h)

9

Cytozol

10

Osad z rybosomów.

Fracjonowanie komórek.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., na podstawie: Biologia Campbella, praca zbiorowa, Rebis, Poznań 2016, licencja: CC BY-SA 3.0.

3. Wirowanie w gradiencie gęstości roztworu

Do odseparowania poszczególnych struktur komórkowych stosuje się również wirowanie w gradiencie gęstości. Metoda ta polega na tym, że w czasie wirowania cząstki przemieszczają się jedynie do tych miejsc, w których ich gęstość odpowiada gęstości środowiska i tam pozostają. Do wytworzenia gradientu gęstości najczęściej używa się roztworu sacharozy. Do próbki wprowadza się roztwory sacharozy o różnej gęstości

(30%, 15%, 5%), dbając, aby nie doszło do zmieszania się warstw: na dnie próbówki umieszcza się najgęstszy roztwór (o największym stężeniu), a na górze – najmniej gęsty (o najmniejszym stężeniu).

Ważne!

Parametry poszczególnych wirowań są zależne od typu komórek, rodzaju materiału biologicznego oraz rodzaju struktur komórkowych, jakie się chce wyizolować.

Ciekawostka

Separacja komórek ssaków za pomocą wirowania została wykonana po raz pierwszy przez H.C. Mela w 1963 roku.

Słownik

homogenat

jednorodna mieszanina powstała w wyniku homogenizacji

homogenizacja

proces, w wyniku którego powstaje jednorodna mieszanina, tzw. homogenat

rozpad komórek bakteryjnych, roślinnych lub zwierzęcych pod wpływem czynników litycznych uszkadzających ściany i błony komórkowe, prowadzący do śmierci komórki i uwolnienia jej zawartości

organelle

struktury wewnątrzkomórkowe oddzielone od cytoplazmy błoną biologiczną

supernatant

górną warstwę roztworu nad osadu uzyskana po wirowaniu jednorodnej mieszaniny

wirowanie różnicowe

wirowanie ze wzrastającym przyspieszeniem; najczęściej stosowana metoda rozdzielania homogenatu na frakcje subkomórkowe (organelle)

Wirtualne laboratorium – WL-I

Laboratorium 1

Przeprowadź doświadczenie w wirtualnym laboratorium biologicznym. Rozwiąż problem badawczy. W formularzu zapisz swoje wyniki, a następnie sformułuj wnioski i zweryfikuj hipotezę.

Temat: Izolacja chloroplastów z liści szpinaku metodą wirowania w gradiencie gęstości.

Problem badawczy: Jaką gęstość mają chloroplasty w porównaniu z innymi organellami komórkowymi?

Hipoteza: Chloroplasty różnią się gęstością od innych organelli.

Materiał biologiczny:

- liście szpinaku

Odczynniki:

- bufor do izolacji chloroplastów (1 × CIB BSA)
- percoll
- woda

Sprzęt:

- cylinder miarowy
- homogenizator
- kuweta z lodem
- zlewka
- filtr bibułowy

- probówki dedykowane do wirówki typu falcon
- automatyczna pipeta z odpowiednimi końcówkami zależnie od objętości pobieranego płynu.



Zasób interaktywny dostępny pod adresem <https://zpe.gov.pl/a/D1dYA7j32>

Analiza doświadczenia: *Izolacja chloroplastów z liści szpinaku metodą wirowania w gradencji gęstości.*

Problem badawczy: Jaką gęstość mają chloroplasty w porównaniu z innymi organellami komórkowymi?

Hipoteza: Chloroplasty różnią się gęstością od innych organelli.

Wyniki

Wnioski

Weryfikacja hipotezy

Polecenie 1

Podaj przykłady badań, w jakich można wykorzystać wyizolowane chloroplasty.

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:   

Ćwiczenie 1



Zaznacz poprawne dokończenie zdania.

Istotą frakcjonowania komórek jest...

- uwolnienie struktur komórkowych w wyniku wirowania różnicowego.
- uwolnienie struktur komórkowych oraz ich odseparowanie.
- zniszczenie komórek i uzyskanie homogenatu.
- uwolnienie struktur komórkowych w wyniku szoku osmotycznego.

Ćwiczenie 2



Wskaż prawdziwe zdania.

- Frakcjonowanie komórek polega na naprzemiennym stosowaniu buforów zasadowego i kwaśnego.
- Wirowanie różnicowe jest poprzedzone procesem dezintegracji.
- Frakcjonowanie komórek umożliwia izolację więcej niż jednego typu składnika komórkowego.
- Odseparowanie poszczególnych struktur komórkowych możliwe jest dzięki wirowaniu różnicowemu.

Ćwiczenie 3



Przyporządkuj poniższe sposoby dezintegracji komórek do odpowiednich metod.

Metody fizyczne

Wytrząsanie z kulkami krzemionkowymi

Liza detergentami

Metody biologiczne

Wytrząsanie z kulkami szklanymi

Liza odczynnikami alkalicznymi

Trawienie enzymatyczne

Metody chemiczne

Rozcieranie

Zamrażanie–rozmarzanie

Homogenizacja

Ćwiczenie 4



Oceń poprawność poniższych stwierdzeń.

| Stwierdzenie | Prawda | Fałsz |
|--|-----------------------|-----------------------|
| Homogenizacja polega na rozdrobieniu tkanek na mniejsze fragmenty. | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Cytozol izoluje się w osadzie podczas wirowania homogenatu przy obrotach równych $1000 \times g$. | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Wybór metody dezintegracji komórek zależy od preferencji badacza. | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| W celu dezintegracji komórek wykorzystuje się metody fizyczne, chemiczne i biologiczne. | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Ćwiczenie 5



Uzupełnij tekst.

Wirowanie różnicowe pozwala na [] cząsteczek zawieszonych w roztworze. Podczas niego wykorzystywane są [] oraz gęstość cząsteczek. W wyniku wirowania różnicowego [] cząsteczki szybciej opadają na dno probówki, zaś [] znajdują się w [] warstwie płynnej zwanej [].

siła dośrodkowa

lżejsze

górnej

cięższe

rozdzielenie

dolnej

siła odśrodkowa

rozdrobienie

supernatantem

homogenatem

Ćwiczenie 6



Uzereguj struktury komórkowe w kolejności wytrącania się osadu wraz ze wzrostem prędkości w wirówce oraz czasu wirowania.

Retikulum endoplazmatyczne i fragmenty błony komórkowej



Rybosomy



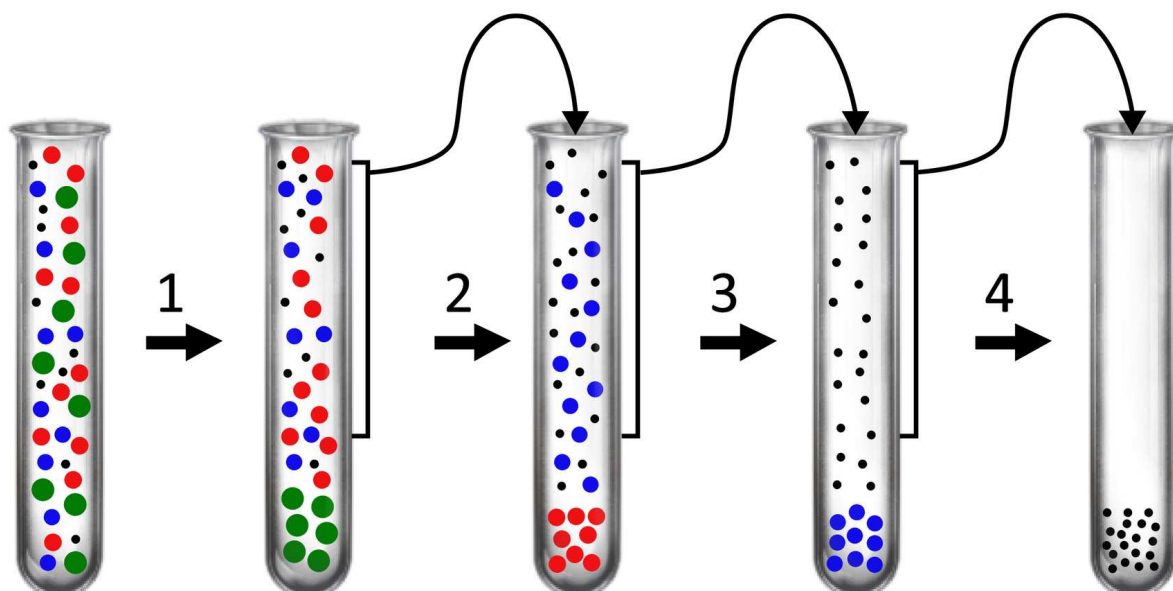
Mitochondria i lizosomy



Jądra komórkowe



Ćwiczenie 7



Schemat odwirowywania elementów komórkowych o najmniejszej gęstości.

Źródło: Englishsquare Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Wyjaśnij, jaki proces został przedstawiony na schemacie i określ, do czego jest wykorzystywany w laboratoriach biologicznych.

Ćwiczenie 8



Zaproponuj metodę, dzięki której wyizolujesz mitochondria i lizosomy z 50 g wątroby myszy.

Wymień główne etapy tego procesu (pomijając potrzebne odczynniki).

Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan

Przedmiot: Biologia

Temat: Frakcjonowanie komórek

Grupa docelowa: uczniowie III etapu edukacyjnego – kształcenie w zakresie podstawowym i rozszerzonym

Podstawa programowa:

Zakres podstawowy

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

II. Komórka. Uczeń:

2) wykazuje związek budowy błony biologicznej z pełnionymi przez nią funkcjami;

Zakres rozszerzony

Cele kształcenia - wymagania ogólne

II. Rozwijanie myślenia naukowego; doskonalenie umiejętności planowania i przeprowadzania obserwacji i doświadczeń oraz wnioskowania w oparciu o wyniki badań. Uczeń:

6) przygotowuje preparaty świeże oraz przeprowadza celowe obserwacje mikroskopowe i makroskopowe.

Kształtowane kompetencje kluczowe:

- kompetencje obywatelskie;
- kompetencje cyfrowe;
- kompetencje osobiste, społeczne i w zakresie umiejętności uczenia się;
- kompetencje matematyczne oraz kompetencje w zakresie nauk przyrodniczych, technologii i inżynierii.

Cele operacyjne (językiem ucznia):

- Opiszysz metody dezintegracji komórek.
- Wykażesz zależność między gęstością struktur komórkowych a ilością obrotów w wirówce podczas różnicowania.
- Omówisz etapy frakcjonowania komórek.

- Przeprowadzisz frakcjonowanie komórek w wirtualnym laboratorium.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- odwrócona klasa;
- z użyciem komputera;
- rozmowa kierowana;
- ćwiczenia interaktywne;
- doświadczenie;
- gwiazda pytań.

Formy pracy:

- praca indywidualna;
- praca w parach;
- praca w grupach;
- praca całego zespołu klasowego.

Środki dydaktyczne:

- komputery z głośnikami, słuchawkami i dostępem do internetu;
- zasoby multimedialne zawarte w e-materiale;
- tablica interaktywna/tablica, pisak/kreda;
- schemat do gwiazdy pytań (materiały pomocnicze – zał. 1).

Przed lekcją:

1. Uczniowie zapoznają się z treścią w sekcji „Przeczytaj”.

Przebieg lekcji

Faza wstępna:

1. Nauczyciel wyświetla na tablicy temat lekcji oraz cele zajęć, omawiając lub ustalając razem z uczniami kryteria sukcesu.
2. **Wprowadzenie do tematu.** Nauczyciel pyta uczniów, jakie struktury komórkowe występują w komórce roślinnej, a jakie w zwierzęcej. Następnie wyjaśnia uczniom pojęcie „frakcjonowanie komórek” i zadaje pytanie: „Jakie możliwości daje umiejętność różnicowania struktur komórkowych?”.

Faza realizacyjna:

1. **Gwiazda pytań.** Nauczyciel rozdaje szablony z gwiazdą pytań (zob. materiały pomocnicze). Uczniowie pracują we wcześniej stworzonych grupach. Na podstawie informacji zawartych w tekście zamieszczonym w sekcji „Przeczytaj” każda grupa uzupełnia rozpoczęte pytania. Następnie grupy wymieniają się gwiazdami pytań i udzielają odpowiedzi na zawarte w niej pytania. Po zakończeniu pracy wybrane grupy prezentują po dwa pytania i odpowiedzi na nie.
2. **Praca z multimediami („Wirtualne laboratorium – WL-I”).** Nauczyciel dzieli uczniów na 4-osobowe grupy. Każda z nich przeprowadza doświadczenie „Izolacja chloroplastów z liści szpinaku” w wirtualnym laboratorium zawartym w e-materiale. Uczniowie zapisują wyniki, formułują wnioski i weryfikują hipotezę. Wybrane osoby prezentują wyniki swojej pracy, nauczyciel koryguje ewentualne błędy.
3. Uczniowie wykonują w parach polecenia nr 1 („Wyjaśnij, co zawierał pierwszy odlewany supernatant (punkt 6), a co znalazło się w drugim supernatancie (punkt 8)”) oraz nr 2 („Podaj przykłady badań, w jakich można wykorzystać wyizolowane chloroplasty”). Ochotnicy przedstawiają swoje odpowiedzi na forum klasy.
4. **Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie samodzielnie wykonują ćwiczenie nr 8 (w którym mają zaproponować metodę, dzięki której wyizolują mitochondria i lizosomy z 50 g wątroby myszy oraz wymienić główne etapy tego procesu) z sekcji „Sprawdź się”. Następnie w 4-osobowych grupach omawiają prawidłowe rozwiązanie. Po upływie wyznaczonego czasu wskazany przez nauczyciela przedstawiciel grupy prezentuje odpowiedź wraz z jej uzasadnieniem. Klasa ustosunkowuje się do niej. Nauczyciel udziela uczniom informacji zwrotnej.

Faza podsumowująca:

1. Nauczyciel prosi uczniów o rozwinięcie zdań: „Dziś nauczyłem/nauczyłam się...”, „Zrozumiałem/zrozumiałam, że...”, „Zaskoczyło mnie...”, „Dowiedziałem/dowiedziałam się...”.
2. Nauczyciel zadaje pytanie w celu sprawdzenia stopnia opanowania wiedzy przez uczniów: „Komórki roślinne i zwierzęce różnią się między sobą budową. W jaki sposób różnice te wpływają na przebieg frakcjonowania komórek?”.

Praca domowa:

1. Wykonaj ćwiczenia od 1 do 7 z sekcji „Sprawdź się”.

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella”, tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.
- „Encyklopedia szkolna. Biologia”, red. Marta Stęplewska, Robert Mitoraj, Wydawnictwo Zielona Sowa, Kraków 2006.

Załącznik 1. Gwiazda pytań.

Plik o rozmiarze 68.83 KB w języku polskim

Dodatkowe wskazówki metodyczne:

- Treści w sekcji „Wirtualne laboratorium – WL-I” można wykorzystać na lekcji jako podsumowanie i utrwalenie wiedzy uczniów.