

# Sejtfeltárási technikák

**Készítette:**

**Fraknóy Krisztina**

**Kenyeres Dzszenifer Dalma**

**Kovács Sándor Dávid**

**Przewozniak Eliza**

## Tartalom

<b>Microfluidizer processzor</b> .....	2
<b>Működési mechanizmusa</b> .....	2
<b>A Microfluidizer előnyei</b> .....	2
<b>Ultrahangos sejtfeltárás</b> .....	3
<b>Általánosan az ultrahangos sejtfeltárásról</b> .....	4
<b>Ultrahangos feltáráshoz minták előkészítése sejttípustól függően</b> .....	5
<b>Detergensek</b> .....	3
<b>A detergens kémiai fogalma</b> .....	3
<b>A detergensek vizes oldatban</b> .....	3
<b>Működésük</b> .....	3
<b>Elektronikus sejtfeltárás</b> .....	6
<b>Referenciák</b> .....	8

## **Microfluidizer processzor**

A sejtfeltárás a biológiai molekulák felszabadítása a sejtből. A Microfluidizer processzor alkalmas a sejtek homogenizálására, mivel ez kemény a sejtekhez, de finom az intacelluláris sejtalkotókhoz. A Microfluidizer processzor alkalmas a különböző élő sejtek szétszakításra, - beleértve bakteriális, emlős, növény, rovar, gomba, alga, élesztő sejteket úgy, hogy közben a fehérjék nem, vagy csak kis mértékben károsodnak. Ezek a tulajdonságok a különböző kutatásokban nagy előnyt jelentenek. Felhasználva a sejtekben található és növekvő sejtalkotókat (fehérjék, organelumok, DNS/RNS, enzimek, vektorok) új szinteket érhetünk el a gyógyszerek fejlesztésében. Nagyon fontos, hogy szükségtelen hőmérséklet változtatással vagy erőteljes roncsolással ne denaturáljuk a sejtalkotókat.

### **Működési mechanizmusa**

A betáp tartályból az oldat a nagy nyomás hatására, nagy sebességgel (400m/s) tovább megy az úgy nevezett interakciós térbe, itt történik meg maga a sejtfeltárás. Ezután ha szükséges effektíven lehűtik, majd ezt egy felfogó tartályba vezetik.

Folyamatos működésű rendszer, amely széles hőmérséklet tartományban működhet. A rendszer hőmérsékletét egy hőcserélő szabályozza. Nagy nyomást alkalmaznak, ahhoz, hogy az oldatot átkerüljön a feltáró részre. A készülékben található mikroszatornák mérete 50-500 mikronig terjed.

### **A Microfluidizer előnyei**

Nagyon hasonló a hagyományos homogenizátorokhoz, mégis sokkal hatékonyabb eredmények érhetőek el vele.

Effektív hűtés biztosítható a hőcserélővel, így a mintának jóval kevesebb időt kell töltenie megemelkedett hőmérsékleten. Valamint az alacsony hőmérsékletet kombinálva a rövid reakció idővel minimalizálni lehet a denaturáció lehetőségét.

A microfluidizer gyengéden törli össze a sejteket, ezzel nagy sejtfal fragmenseket létrehozva, amiket aztán sokkal könnyebb elválasztani a kinyert oldattól. Így a szűrési idő lerövidül, valamint a centrifugálás szükségessége is csökken.

A folyamatos működés és az állandó nyomás lehetővé teszi, hogy minden sejtet ugyanakkora energia érjen. Ezzel szemben pl. szonikálásnál a szonikátortól távollévő sejtek lényegesen kevesebb energiát kapnak, mint a közelebbi sejtek.

[1] [2] [3]

# Detergensek

## A detergens kémiai fogalma

A detergensek amfipatikus molekulák, vagyis egy apoláris végből, amelyek általában alifás vagy aromás jellegűek és egy poláris fejből áll. A poláris csoport lehet ionos (anionos vagy kationos), nem-ionos (töltés nélküli) vagy ikerionos (pozitív és negatív csoportot is tartalmaz, de a nettó töltése nulla).

## A detergensek vizes oldatban

A biológiai membránokhoz hasonlóan, a detergensek hidrofób tulajdonságai az apoláris vég következtében alakul ki. Azonban a detergensek a poláris csoport miatt vízben oldódó molekulák. Ennek következtében, lehetővé teszik a vízben oldhatatlan, hidrofób vegyületek vizes közegben való diszpergálását, beleértve a membránfehérjék extrahálását és szolubilizálását.

A detergensek tulajdonságait a kísérleti körülmények is befolyásolják, mint például a koncentráció, a hőmérséklet, a pH, az ionerősség valamint a különböző adalékok jelenléte.

### Detergens típusok

Léteznek a fehérje szerkezetét denaturáló, illetve nem-denaturáló detergensek. A denaturáló detergensek lehetnek anionosak (pl. nátrium-dodecil-szulfát (SDS)) vagy kationosak (pl. etil-trimetil-ammónium-bromid), melyek roncsolják a membránok szerkezetét és denaturálják a fehérjéket. A nem-denaturáló detergensek lehetnek nem-ionosak (pl. Triton X-100), epesók (pl. kólsav) és ikerionosak (pl. CHAPS).

## Működésük

Denaturáló detergensek, pl. SDS-molekulák:

Egyaránt kötődnek a hidrofób membránhoz és a hidrofil fehérjékhez, monomerként (a kritikus koncentráció alatt). A reakció mindaddig végbemegy, míg a monomerek nem telítődnek. Ezért a szabad monomerek koncentrációja határozza meg a detergens koncentrációját. Az SDS-molekulák együttműködnek, miszerint az SDS egy molekulájának kötődése megnöveli annak valószínűségét, hogy egy másik SDS-molekula is kötődik az adott fehérjéhez, és a legtöbb fehérjét merev rudakká változtatják, amelyek hossza arányos a molekulatömeggel.

Nem-denaturáló detergensek, pl. Triton X-100:

Merev, nagyméretű apoláros fejjel rendelkeznek, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba vízdékony fehérjékkel. Ebből következik, hogy általában nem zavarják meg a vízben oldódó fehérjék természetes kölcsönhatásait és azok szerkezetét. A nem-denaturáló detergenssek a membránfehérjék hidrofób részeihez kötődve micellákba zárják azokat. [4]

## **Ultrahangos sejtfeltárás**

### **Általánosan az ultrahangos sejtfeltárásról**

Az ultrahang funkciója a feltárásban a mikroorganizmusok félig áteresztő, merev sejtfalának illetve membránjának eltávolítása, az intracelluláris termékek roncsolása nélkül.

Az eszköz intenzitásának beállítása a folyamat paramétereinek beállításával történik, mely optimuma sejttypustól függően eltérő lehet. Ezen paraméterek közé tartozik, az amplitúdó, az ultrahangozási idő, illetve a minta típusához megfelelő készülék megválasztása. A művelet ideje, általában 15 másodperc és 2 perc közé esik. A sejtek szétlízálása történhet finoman, illetve hirtelen attól, függően, hogy milyen annak szerkezete, és milyen további céljaink vannak a visszamaradó termékekkel. Mivel az ultrahangozás folyamata felmelegedéssel jár, ezért a hőmérsékletet integrált hőmérő segítségével mérik. A rendszer hűtését jeges-sós fürdővel, hűtőkabátokkal rendelkező áramlási cellákkal, vagy impulzusos üzemmódban működő ultrahanggal végzik. Az impulzusos üzemmód működésének lényege hogy szakaszosan üzemel a műszer. A ciklus egyik felében 1-15 másodpercen keresztül ultrahangozzák, majd a másik felében történik a hőelvezetés, illetve hűtés hosszabb ideig.

A sejt feltárása során fontos, hogy egy gyors és hatékony módszerrel dolgozzunk. Az ultrahangos módszerek hatékonysága megfelelő, mivel az alkalmazott intenzitáson a folyamat során az energia elég nagy ahhoz, hogy megtörje a sejtmembránokat, illetve a sejtfalet, de elég szolid is ahhoz, hogy a sejtalkotóknak elkerülje a fizikai illetve kémiai károsodását.

A mikroorganizmusok nagy mértékben különböznek az ultrahangra való érzékenységükben. Így például a rúdszerű formák (bacillus) egyszerűen szétesnek, míg a gömbök (coccus) jóval ellenállóbbak.

Ennek következtében sejttypustól függően más és más eljárásokat alkalmaznak a minták előkészítésére ultrahangos feltáráshoz.

## **Ultrahangos feltáráshoz minták előkészítése sejttípustól függően**

### *Friss állati minta*

Az állati szövetekkel általában frissen dolgozunk. Fontos a friss szövetek hidegen tartása és azonnali feldolgozása a boncolást követően. A GITC lizáló oldat hozzáadását követően azonnal szonikálják a mintát. A lizáló oldatban nem szabad ülni, hagyni. Nagyon kemény szövetminták esetén először szükség van előkezelésre mechanikai úton.

### *Fagyasztott állati minta*

A fagyasztott állati mintákat őrléssel roncsolják el folyékony nitrogénben habarccsal és törmelékkel. A folyamat során a berendezés illetve a szövet kriogén hőmérsékleten marad. Az őrlés után kapott porszerű mintát GITC lízis pufferben szonikálják.

### *Tenyésztett sejtek*

A tenyésztett sejtek feltárása viszonylag egyszerű. Szuszpenzióban lévő sejteket centrifugálják, majd PBS-sel leöblítik, hogy a táptalajt eltávolítsák a mintából. Majd ultrahangosan kezelik GITC-lízispufferben.

### *Puha friss növényi sejtek*

Egyszerű ultrahangos kezeléssel tárják fel lizáló pufferben.

### *Tülevelűek növényi szövetei*

A tülevelűek feltárása előtt fel kell őrölni, folyékony nitrogén hozzáadása nélkül.

### *Fás növényi szövetek*

A minták fagyasztási, illetve folyékony nitrogénben történő őrlést igényelnek az ultrahangos feldolgozás előtt.

### *Fonalas gombák*

A gombák micéliumát hideg habarcsba töltik, majd folyékony nitrogén hozzáadása után porrá törlik és lizáló pufferben szonikálják. A gombák poliszacharidokban gazdagok lehetnek, így polivinil-pirrolidonos előkezelés szükséges lehet.

### *Baktréiumok*

Baktériumok esetén sokféle eljárás lehetséges. A gram+, a gram-, illetve a mikobaktériumok esetén többnyire ajánlott előzetes üveggyöngyös fizikai feltárás lizáló oldatban, majd ultrahangozás.

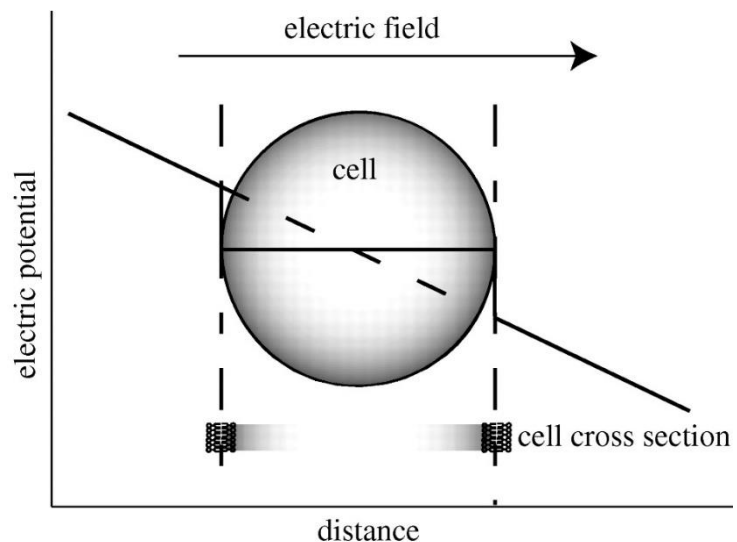


[5] [6]

## Elektronikus sejteltárás

Az elektromos erő által történt sejteltárás lényege, hogy az elektronikus erőtér egy transzmembrán potenciál különbséget okoz a két elválasztott tér közt. Ennek értéke 0,2-1,5 V közé kell eszen, hogy a sejt vagy a sejtalkotó, mely membránnal van határolva szétessen. A sejtltízishez szükséges elektromos térerősség az ábrán látható módon a sejt méretétől és alakjától függ, ezenkívül még a membrán összetételétől (fluiditás). A mérettől való függést egyszerű egy példán bemutatni, ahol egy protoplasztot (20–40 $\mu\text{m}$ ) hasonlítunk össze egy baktériummal (1–2 $\mu\text{m}$ ). Míg a kisebb méretű baktériumhoz szükséges elektromos térerősség  $E = 7 - 10 \frac{\text{kV}}{\text{cm}}$ , míg a nagyobb

protoplaszt már  $E = 1,5 - 1,75 \frac{kV}{cm}$  értékű térerősség esetén lizál. Vizsgálatokkal megállapították, hogy egy sejt lizálásához elég mindössze 33 ms, 1 ms-os impulzushossz mellett. 40 V-os feszültség a két elektróda közt, melyek közt a rész 20  $\mu m$ -es (1 ms-os impulzus hossz mellett)  $E = 20 \frac{kV}{cm}$  elektromos térerősség érhető

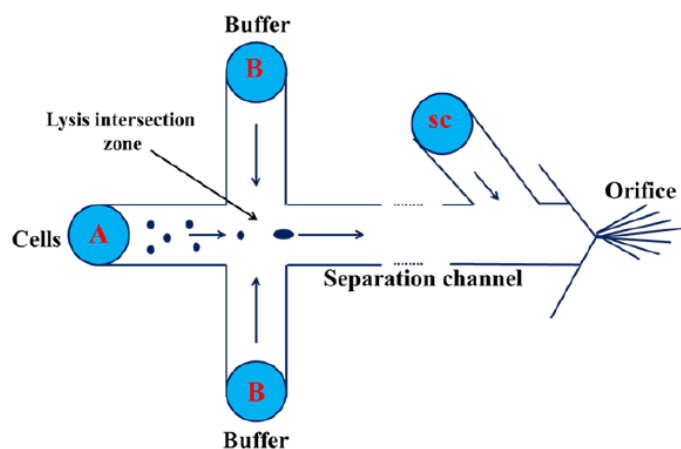


1. ábra

el. Egy ekkora térerősség mellett egy 10  $\mu m$ -es sejt esetén 2V-os feszültség esés jelentkezik a sejten át, ennek oka a sejtmembrán és a sejt citoplazmájának az elektromos rezisztenciája, mely során az elektromos teret befolyásolja, ezáltal egy közel állandó potenciál különbség alakítható ki a folyamat során.

Maga a folyamatot általánosságban kapilláris elektroforézissel csinálják, mely lényege, hogy kapillárisok keresztül áramlik át a sejtszuszpenzió, ez a kapilláris egy elektromos térbe van elhelyezve, mely elhelyezkedés meghatározza a potenciális helyét a sejtek lizálásának. Ezenkívül szokás az egész rendszert egy pufferben tartani, mely összetétele sok féle lehet. Ezzel kapcsolatban kísérletek is folynak, hogy mik az elvárások ezekkel a pufferekkel szemben. Az ezzel kapcsolatos sematikus ábra a, 2. ábra, melyen látható, hogy Egy helyről áramlik be a sejt szuszpenzió ehhez áramlik hozzá az adott puffer, és úgy van a szerkezet összeállítva, hogy kb.

ott történjen meg a lízis, ahol a puffer találkozik a sejtszuszpenzióval. Ugye a puffer önmagában kell, hogy segítse a folyamatot azáltal, hogy jobb körülményeket biztosít az elektromos térnek. Előnyeként megemlítendő mindenképp a gyorsasága a folyamatnak, hisz gyakorlatilag



2. ábra

pillanatszerű, folyamatosan üzemeltethető. Hátrányaként mindenképpen fontos a körülményes technológia (kapillárisról van szó), ezenkívül a puffer megállapítása is fontos, és mivel kapilláris, ezért főként labori használat. Ezekon túl: ez a technológia sejtmembránok szétszedésére alkalmas, így a sejtfallal rendelkező mikróbák esetén nem megfelelő. [7]

## Referenciák

1. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=12998>
2. <https://www.microfluidicscorp.com/about-us/our-technology/>
3. <https://www.microfluidicscorp.com/applications/cell-disruption/>
4. <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/detergents-cell-lysis-protein-extraction.html>
5. D. Cells, “SECTION IV - OPERATING SUGGESTIONS AND TECHNIQUES,” pp. 18–23.
6. [https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm?fbclid=IwAR3JN5GyQBGKRsiPYpnQ\\_SLfMKvyxvnAQ71LJvTuJFnUGjZ\\_NmlCa2xB3IY](https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm?fbclid=IwAR3JN5GyQBGKRsiPYpnQ_SLfMKvyxvnAQ71LJvTuJFnUGjZ_NmlCa2xB3IY)
7. [http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/5/Suppl\\_2/S131.short](http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/5/Suppl_2/S131.short)