

Téma: Plazmatická membrána

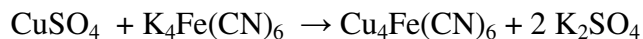
Úvod:

Cytoplazmatická membrána je semipermeabilní neboli polopropustná dvouvrstva ohraničující buňku od okolního prostředí. Je tedy propustná jen pro určité molekuly. Plazmatickou membránou mohou procházet pouze nepolární malé molekuly. Průchod větších či nabitých molekul plazmatickou membránou je zprostředkován kanály či přenašeči. Plazmatická membrána buňky tak hraje zásadní roli v osmotických jevech v živých organismech. Osmotické děje jsou pro život rostlin i živočichů zcela nezbytné. Například příjem vody kořeny rostlin probíhá na základě osmózy, stejně tak se vytváří osmotická rovnováha mezi krví a buňkami tkání živočichů, díky osmóze dochází také k zahušťování primární moči v ledvinových kanálcích. Základem osmotických jevů je difúze. K difúzi dochází, smísíme-li různě koncentrované roztoky nebo roztoky různých látek. Po chvíli dojde k rovnoměrnému rozptýlení částic v celém objemu. Nastane vyrovnaní koncentrací difúzí. Jiný případ nastává, oddělíme-li různě koncentrované roztoky polopropustnou membránou, která propouští pouze molekuly rozpouštědla ne však částice rozpuštěných látek. V tomto případě dochází k přesunu rozpouštědla přes membránu z méně koncentrovaného roztoku do roztoku koncentrovanějšího tak dlouho, dokud se koncentrace na obou stranách membrány nevyrovnají. Současně dochází ke změně objemů na obou stranách membrány. Tento jev se nazývá osmóza. Osmóza je tedy difúze přes polopropustnou membránu.

Roztok, který obklopuje živou buňku, může být vůči ní izotonický, hypotonický či hypertonický. V izotonickém prostředí, tedy v prostředí fyziologického roztoku, kdy okolí má stejný osmotický tlak jako tekutý obsah buněk, je struktura i funkce cytoplazmatické membrány neporušena. Nachází-li se však buňka v prostředí hypotonickém či hypertonickém dochází vlivem osmotického tlaku k nasávání či ztrátám vody buňkou a plazmatická membrána buď praská, nebo ztrácí svůj tvar. Je-li buňka umístěna do prostředí hypotonického, tedy do prostředí, které má nižší obsah solí než buňka samotná, dochází vlivem osmotického tlaku k proudění vody skrze semipermeabilní plazmatickou membránu z okolního prostředí do buňky. Buňka tedy neustálým nasáváním vody zvětšuje svůj objem, až se nakonec vlivem vnitřního tlaku roztrhne. V hypertonickém prostředí, tedy v prostředí s vyšším obsahem solí, prostupuje naopak voda z buňky do prostředí, čímž buňka ztrácí svůj tvar a sevrkává se.

Funkčnost membrány může být narušena řadou vlivů, jedním z nich je například působení detergentu. Detergent se zabudovává do plazmatické membrány buněk, čímž rozruší její strukturu, membrána se následně rozpadá a obsah buňky je uvolněn do prostředí.

Jako chemický model tvorby semipermeabilní membrány a osmotických jevů slouží Traubeho měchýřek. Principem utváření Traubeho měchýřků je reakce krystalů CuSO_4 s roztokem ferokyanidu draselného za vzniku semipermeabilní membrány z ferokyanidu měďnatého, která má tvar měchýřku:



Roztok síranu uvnitř měchýřku je hypertonický vůči okolnímu roztoku $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, čímž vlivem osmotického tlaku dochází k nasávání vody měchýřkem, který se zvětšuje až praskne, vylije se z něj roztok CuSO_4 . Síran měďnatý opět okamžitě reaguje s $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ za vzniku nové membrány. Takto interakcí dvou jednoduše organizovaných soustav (roztoků anorganických látek) vzniká soustava více komplexní (osmotická soustava) s novými strukturami a vlastnostmi: membrány, semipermeabilita, osmóza, měchýřky, růst, pohyb a změny tvaru měchýřků.

Plazmatická membrána je složena z fosfolipidové dvouvrstvy a intergovaných proteinů. Vlastnosti fosfolipidů umožňují vytvořit vnitřní hydrofóbní část a hydrofilní část membrány, která je vystavena vodnému prostředí. Molekuly fosfolipidů jsou amfifilní a vykazují schopnost se za vhodných podmínek poskládat v různé útvary: micely, liposomy nebo membrány. Jako laboratorní model autoagregace fosfolipidů slouží amorfní materiál lecitin. Lecitin je složen z fosfolipidů, jejichž molekuly obsahují na jednom konci (apolárním) hydrofóbní CH_3 skupiny mastných kyselin a na druhém (polárním) konci hydrofilní skupiny jako je glycerol, kyselina fosforečná a cholin. Molekuly vykazují povrchovou aktivitu a po styku s polární tekutinou (vodou) se orientují na hranici fází, čímž snižují povrchové napětí vody. Dochází k vzájemné asociaci pouze nepolárních konců a stejně tak konců polárních, které se navíc spojují i s vodou. Autoagregací fosfolipidů lecitinu vznikají fosfolipidové dvouvrstvy o tloušťce asi 5 nm, k nimž se rychle přiřazují další a další dvouvrstvy vzájemně oddělené mezivrstvou molekul vody. Z velkého počtu těchto dvouvrstev vzniká následně nadmolekulární struktura tvaru trubičky, kterou lze pozorovat v mikroskopu.

Plazmatická membrána má mimo jiné také tu funkci, že odděluje jednotlivé buňky a zabraňuje jejich spontánnímu spojování – fúzím. U specializovaných typů buněk však probíhají geneticky zakódované fyziologické fúze např. fúze gamet po oplození. Fúzi buněk lze navodit také experimentálně *in vitro* pomocí virů, působením elektrického pole či chemických látek (fúzenů).

Úkol č. 1: Autoagregace fosfolipidů

Chemikálie: lecitin; 0,1% vodný roztok KOH

Pomůcky: preparační jehla; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Malé množství (stačí jen 1 až 2 mm³) lecitinu přeneste jehlou na podložní sklo a po skle rozmázněte a překryjte krycím sklem.
2. Při malém zvětšení v preparátu vyhledejte okraj lecitinu (okraj lecitinu je světlolomný a jeví se černě). Bez toho aniž byste preparát sundávali z mikroskopu, přidejte na okraj krycího sklíčka 20 µl 0,1% roztoku KOH. Pozorujte rozhraní lecitinu bez a s roztokem KOH, kde probíhá tvorba váčkovitých útvarů. Sledujte dynamiku autoagregace fosfolipidů a vzniklé myelinové útvary schematicky zakreslete.

Úkol č. 2: Traubeho model osmotické soustavy

Chemikálie: 5% vodný roztok feroxyanidu draselného $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; krystalický síran měďnatý ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Pomůcky: laboratorní váhy; zkumavka; stojánek; pinzeta; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte 5% vodný roztok feroxyanidu draselného.
2. Zkumavku naplňte do poloviny 5% vodným roztokem feroxyanidu draselného.
3. K roztoku $K_4Fe(CN)_6$ přidejte několik krystalů síranu měďnatého.
4. Makroskopicky pozorujte růst měchýřků, schématicky zakreslete uspořádání měchýřků ve zkumavce po 1, 5 a 10 minutách.
5. Na podložní sklo napipetujte 20 μ l destilované vody a umístěte do ní krystal $CuSO_4$, překryjte krycím sklem. Na okraj sklíčka připipetujte 20 μ l roztoku $K_4Fe(CN)_6$.
6. Pod mikroskopem pozorujte (při malém zvětšení) vznik feroxyanidu měďnatého tedy vznik semipermeabilní membrány. Membránu schématicky zakreslete do protokolu.

Úkol č. 3: Indukovaná fúze buněk

Materiál: kultura hmyzích buněk SF9

Chemikálie: 30% roztok polyethylenglykolu (PEG) v 0,01M $CaCl_2$

Pomůcky: vodní lázeň; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Ke 100 μ l buněčné suspenze přidejte 1 ml PEG, lehce protřepejte a po dobu 20 minut inkubujte ve vodní lázni při 30°C.
2. Po uplynutí doby inkubace odeberte 30 μ l suspenze a přeneste je na podložní sklo, překryjte krycím sklíčkem. K hraně krycího skla kápněte 70 μ l fyziologického roztoku, přebytek fyziologického roztoku zlehka odsajte pomocí filtračního papíru.
3. Pod mikroskopem pozorujte shluky buněk, v preparátu vyhledejte polybuněky vzniklé splynutím jednotlivých buněk a schématicky je zakreslete do protokolu.

Úkol č. 4: Chemická lýza

Materiál: kultura hmyzích buněk SF9

Chemikálie: 2% vodný roztok tritonu X-100

Pomůcky: automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; mikrozskumavka eppendorf; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si dostatečné množství (pro celou skupinu) 2% vodného roztoku tritonu X-100.
2. Na podložní sklo napipetujte 5 μ l suspenze hmyzích buněk SF9 a překryjte ji krycím sklem. Pod mikroskopem pozorujte při různých zvětšeních typický tvar buněk SF9 za fyziologických podmínek.
3. Na hranu krycího skla napipetujte 20 μ l 2% roztok tritonu X-100.
4. V preparátu vyhledejte hranici působení tritonu, tedy místo kde lze pozorovat postupný rozpad buněk. Zvolte si konkrétní buňku, kterou pozorujte až do jejího úplného rozpadu. Vhodným zacloněním lze docílit i toho, že v místě, kde se buňka nacházela, je možné pozorovat ještě její „stín“. Ten je tvořen ze zbytků buněčných struktur zvláště pak z cytoskeletu.

Úkol č. 5: Osmotická lýza

Materiál: kultura hmyzích buněk SF9

Chemikálie: 0,1M roztok NaCl

Pomůcky: laboratorní váhy; kádinka; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si dostatečné množství (pro celou skupinu) 0,1M vodného roztoku NaCl.
2. Na podložní sklo napipetujte 5 μ l suspenze hmyzích buněk SF9 a přidejte k ní 20 μ l 0,1M roztoku NaCl, promíchejte a překryjte krycím sklem.
3. Mikroskopem pozorujte lýzi buněk.

Úkol č. 6: Plasmorhiza buněk

Materiál: kultura hmyzích buněk SF9

Chemikálie: 1M roztok NaCl

Pomůcky: laboratorní váhy; kádinka; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si dostatečné množství (pro celou skupinu) 1M vodného roztoku NaCl.
2. Na podložní sklo napipetujte 5 μ l suspenze hmyzích buněk SF9 a přidejte k ní 20 μ l 1M roztoku NaCl, promíchejte a překryjte krycím sklem. Mikroskopem pozorujte plasmorhizu, tedy srašťování buněk.
3. Změnu tvaru buněk zakreslete do protokolu.

Otázky:

1. Pokuste se objasnit rozdíly mezi jednotlivými útvary: micely, liposomy a membránami popište a zakreslete jednotlivé struktury.
2. Uveďte příklady detergentů.
3. Jaké vlivy mohou porušit strukturu a funkčnost cytoplazmatické membrány?

Použitá literatura:

Hejtmánek M. *et al.*, (1999): Praktická cvičení z biologie, Olomouc