

Stephanie [REDACTED]
BTA-OH
Gruppe A, Arbeitsplatz 5
Partner: Martin [REDACTED]

Versuch vom 26./27.09.2002

„Chloroplastenisolierung“

(Dichtebestimmung von Chloroplasten)

Botanisches Praktikum
Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

bei: Dr. Klaus Fuisting

Isolierung von Chloroplasten aus Blattspinat und Bestimmung ihrer Dichte

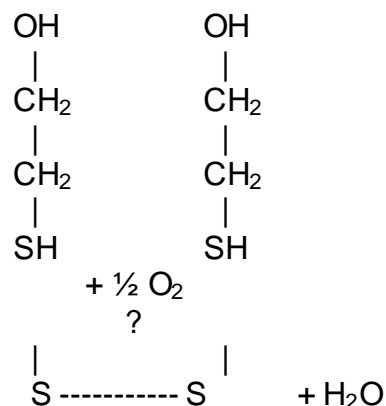
Theorie / Prinzip des Versuchs

In diesem Versuch wollen wir Organellen aus Pflanzenzellen isolieren, genauer gesagt Chloroplasten. In der Zelle sind die Organellen von einer Membran umgeben, sie haben daher ihre eigene osmotische Umgebung. Zerstört man die Zelle, so geht diese Umgebung kaputt. Die Organellen würden auch kaputtgehen, wenn man die neue Umgebung nicht osmotisch regulieren würde. In einem **Isoliermedium** geschieht dies durch ein **Osmotikum**. Eine 0,3-M Sorbitlösung ersetzt hier die osmotische Umgebung in der Zelle.

Freigesetzte Enzyme wie Proteasen und Cellulasen würden beginnen, die defekte Zelle und ihre Bestandteile abzubauen, da sich ihr pH-Wert verändert. Ein **Puffer** reguliert den pH-Wert und hält ihn bei 7,6 bis 7,8. Wir verwenden im Versuch HEPES, welches physiologisch unbedenklich ist, die Organellen also nicht schädigt. Eine 0,05-M Lösung hat eine ausreichend hohe Pufferkapazität.

EDTA wird dem Medium zugefügt als Ionenfänger und **Komplexbildner**. Es bindet **Ionen**, die nicht in der Lösung der Zellfragmente herumschwimmen sollen. Bestimmte Ionen wie Manganchlorid und Magnesiumchlorid werden dem Medium extra zugefügt, um die Aktivität bestimmter Organellen aufrecht zu erhalten sowie um die Organellmembranen zu stabilisieren.

Zum Schluß muß man noch ein **Antioxidans** zugeben, damit die Lösung nicht mit dem Luftsauerstoff reagiert und oxidiert. Wir verwenden Mercaptoethanol in 5mM Lösung. Mercaptoethanol bindet den Luftsauerstoff wie folgt:



In einem solchen Medium ist die Chance relativ gut, intakte Organellen zu erhalten. Um die Organellen von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen, filtert man zunächst die Lösung. Danach wird das Filtrat über einen Dichtegradienten zentrifugiert. Ein **Dichtegradient** ist am Boden des Zentrifugenröhrchens am dichtesten und nimmt mit der Höhe an Dichte ab. Für die Bildung von Gradienten für die Organellisolierung sind folgende Substanzen besonders geeignet: Saccharose, Ficoll, Percoll oder Metrizamid. Welche Substanz man wählt hängt davon ab, zu welchem Ergebnis man kommen will. Durch die Zentrifugation wandern die Partikel durch den Gradienten und bleiben genau dort hängen, wo die Umgebungsdichte ihrer eigenen Dichte entspricht. Da intakte Chloroplasten eine höhere Dichte aufweisen als Thylakoidfragmente, bilden sie eine Bande ziemlich weit unten im Gradienten. Darüber liegen die übrigen Bestandteile, die sich noch im Medium befinden. Indem wir den Saccharosegehalt im Bereich der Banden bestimmen, können wir in einer Dichtetabelle die Dichte der jeweiligen Proben und somit die Dichte der Chloroplastenproben bestimmen.

Material

Untersuchungsmaterial: junger Blattspinat
Spinacia spec.
Chenopodiaceae
Caryophyllales

Geräte: übliches Laborgerät
Gradientenmischer
Pumpe Typ 101 von Rena
Mixer, Typ MX32, Braun AG
Laborzentrifuge Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Instruments
Zentrifugenröhrchen, Glas, 25x89 mm von Schott Duran
Zentrifugengehänge Centri Lab von Heraeus Instruments
Gradientenröhrchen, Polyclear, 25x89 mm, von Sience Service GmbH
Videokamera Digital Handycam DCR-VX 700E von Sony
Videoprinter
Mikrotiterplatte, 96 wells
Elisareader EL x800 von Bio-TEK Instruments
Refraktometer Abbé, Typ A von Zeiss

Chemikalien: Saccharose (C₆H₂₂O₁₁), M: 342,3 g/mol von Sigma
Sorbit (C₆H₁₄O₆), M: 182,18g/mol, Merck
Hepes (C₈H₁₈N₂O₄S), M : 238,3 g/mol, Sigma
Titriplex III, M: 372,24 g/mol, Merck
Magnesiumchlorid (MgCl₂), reinst, M: 203,30 g/mol, Merck
Manganchlorid (MnCl₂), reinst, M: 161,88 g/mol, Merck
Mercaptoethanol (C₂H₆OS), 99%, M: 78,13 g/mol, δ: 1,12 g/ml, giftig,
ätzend und umweltgefährdend

Durchführung

1. Praktikumstag

- Isoliermedium 250 ml: 0,33M Sorbit M = 182,18g/mol
V = 0,25l
c = 0,33 mol/l

$$m = M \cdot V \cdot c$$

$$= 182,18 \text{ g/mol} \cdot 0,25\text{l} \cdot 0,33 \text{ mol/l}$$
$$= \mathbf{15,031 \text{ g Sorbit}}$$

- genauso werden die Massen für die anderen Zutaten berechnet; es ergibt sich:

$$2,979 \text{ g Hepes (0,05M)}$$
$$0,186 \text{ g Titriplex III (0,002M)}$$
$$0,051 \text{ g MgCl}_2 \text{ (0,001M)}$$
$$0,041 \text{ g MnCl}_2 \text{ (0,001M)}$$

- Zutaten in 100ml-Becherglas vorlösen
- pH einstellen auf 7,8
- im Meßkolben auf 250 ml auffüllen
- kühlen auf 4°C
- kurz vor dem Mixen des Spinats am Folgetag kommen noch 0,005mol/l

Mercaptoethanol dazu:

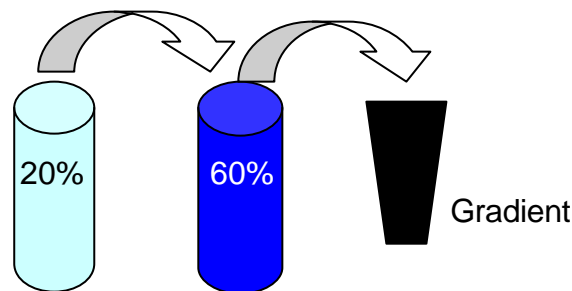
$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$= 0,005 \text{ mol/l} \cdot 0,1 \text{ l} \cdot 78,13 \text{ g/mol}$$
$$= 0,039 \text{ g}$$

$$\delta = m / V \quad | \cdot V : \delta$$

$$V = m / \delta$$
$$= 0,039 \text{ g} / 1,12 \text{ g/ml}$$
$$= 0,035 \text{ ml}$$
$$= \mathbf{35 \mu l \text{ Mercaptoethanol}}$$

- Gradientenmedium 100 ml: 1,192 g Hepes (50mM) (Rechnung wie oben)
- pH 7,8 einstellen
- mit dem Puffer die Gradientenmedien herstellen:
50 ml 20%ig = 10 g Saccharose + 40 g Puffer
50 ml 60%ig = 30 g Saccharose + 20 g Puffer
- mit den beiden Medien werden 2 lineare Saccharose-Gradienten hergestellt, indem man den Gradientenmischer wie folgt befüllt:



- die jeweils 50ml reichen für 2 Gradienten pro Gruppe; die Pumpe wird jeweils bis etwas über die untere Markierung des Gradientenmischers gefüllt
- dann werden die Schrauben langsam so geöffnet, dass das Medium kontinuierlich in beiden Kammern weniger wird und langsam und kontinuierlich an der Wand des Gradientenröhrchens herabläuft
- die unterste Schicht im Gradienten hat demnach eine Saccharosekonzentration von 60%, dann fällt sie kontinuierlich bis auf 20% in der obersten Schicht ab
- der Gradient muß 24h auf 4°C gekühlt werden und stehen, damit er wirklich kontinuierlich werden kann; die einzelnen Schichten müssen sich durch Diffusion vermischen
- Spinatmaterial ebenfalls gut kühlen

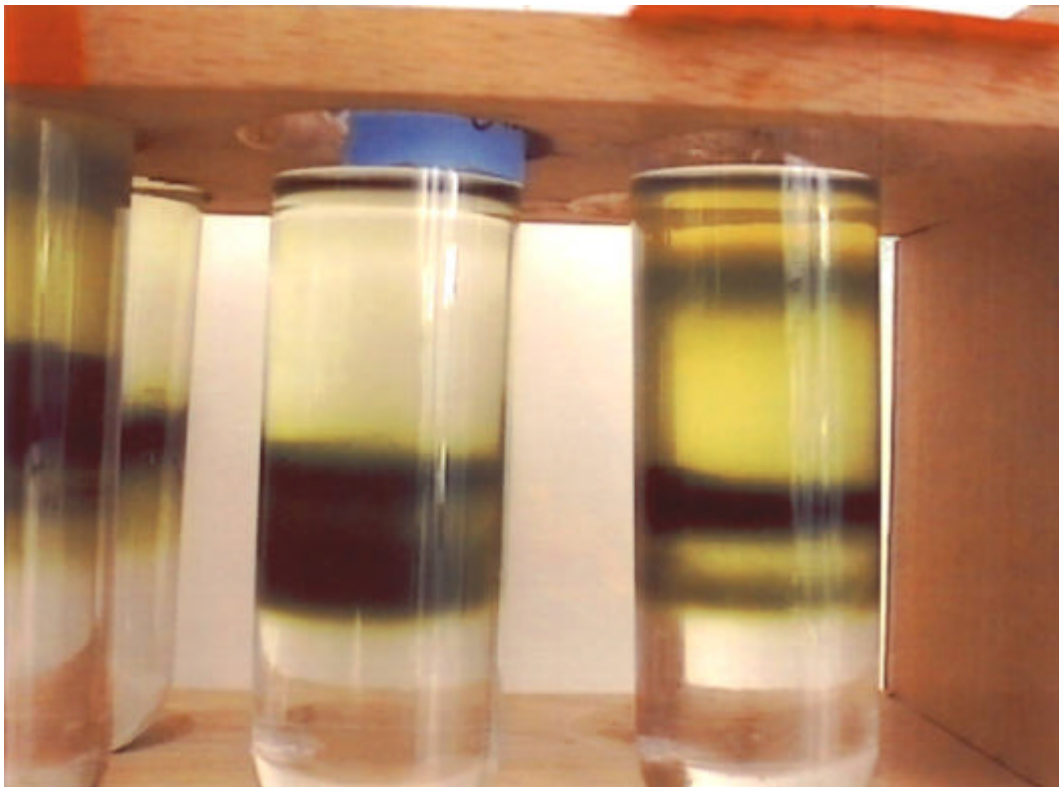
2. Praktikumstag:

- 50g Blattspinat ohne Mittelrippe vorbereiten (EW: 53,56g) und kühlen
- die Zentrifuge auf 4°C kühlen
- Braunmixer mit Eis kühlen
- 100 ml Isoliermedium + 35 µl Mercaptoethanol + 53,56 g Spinatblätter im Braunmixer mehrfach kurz und zum Abschluß einmal lang mixen
- Suspension filtrieren, Filtrat in einem im Eisbad stehenden Becherglas auffangen
- etwas Filtrat (etwa 10 ml) aufbewahren
- den Rest zentrifugieren: 3000g, 60 sec
- Überstand (SN) verwerfen

- es bilden sich zwei Pellets: oberes = defekte Thylakiodmembranen, vorsichtig resuspendieren und absaugen (leicht zähflüssig)
unteres = intakte Chloroplasten, in wenig Medium gründlich resuspendieren
- die beiden Gradienten aus dem Kühlschrank nehmen
- einen Gradienten vorsichtig mit etwa 4 ml Filtrat überschichten
- den zweiten mit etwa 1 ml Chloroplasten-Resuspension
- Gradienten zentrifugieren: 30 min, 2000g, 4°C im Swing-Rotor
- Gradienten photographieren
- Gradienten unten mit heißer Nadel anstechen in 2ml-Fractionen in eine Elisaplatte fraktionieren
- in einem Elisareader bei 630 nm durchmessen lassen
- mit dem Refraktometer die Gewichtsprozent von 3-5 Proben (am besten aus einer senkrechten Probenreihe der Elisaplatte) bestimmen, daraus aus einer Dichtetabelle die Dichte ablesen
- in einem Diagramm die Fraktionen gegen die Extinktion auftragen
- ins selbe Diagramm die Dichten der bestimmten Proben als Gerade einzeichnen und so die Dichte der beiden Peaks (intakte und kaputte Chl.) bestimmen

Ergebnisse

Nach dem Zentrifugieren der Gradienten kann man optisch schon gut unterscheiden, welcher mit Filtrat und welcher mit Resuspension überschichtet worden ist:



Der linke Gradient auf dem Photo wurde mit Resuspension überschichtet. Das Gradientenmedium ist überwiegend klar. Nur im mittleren Bereich befinden sich zwei undeutlich voneinander abgetrennte Banden. Im rechten Gradienten befinden sich oberhalb der untersten Bande mehrere Banden. Die nächsthöhere enthält ebenfalls Chloroplasten, die übrigen weitere Zellbestandteile, die beim Filtern nicht abgefangen wurden. Es wurde also mit Filtrat überschichtet.

Nach dem Fraktionieren der beiden Gradienten und lesen im Elisareader erhielten wir folgende Extinktionen:

Pellet

Fraktion	Extinktion	Dichte [g/ml]	% Zucker
1	0,102		
2	0,185		
3	0,101	0,228	21,2
4	0,122		
5	0,071		
6	0,07		
7	0,155		
8	0,465		
9	0,287		
10	0,148		
11	0,096		
12	0,294		
13	0,369		
14	0,223		
15	0,178		
16	0,188	0,364	32
17	0,436		
18	0,472		
19	0,378		
20	0,895		
21	0,285		
22	0,339		
23	1,602		
24	1,831		
25	0,767		
26	0,867		
27	1,118	0,457	38,5
28	1,136		
29	0,984		
30	1,214		
31	0,843		
32	0,941		
33	0,836		
34	0,734		
35	0,874		
36	0,929		
37	0,944		
38	0,839		
39	0,933		
40	1,068	0,57	47,6
41	0,932		
42	0,969		
43	1,042		
44	0,897		
45	0,716		
46	0,547		
47	0,322		
48	0,195		
49	0,139		
50	0,09		
51	0,087	0,645	52,2
52	0,084		

Filtrat

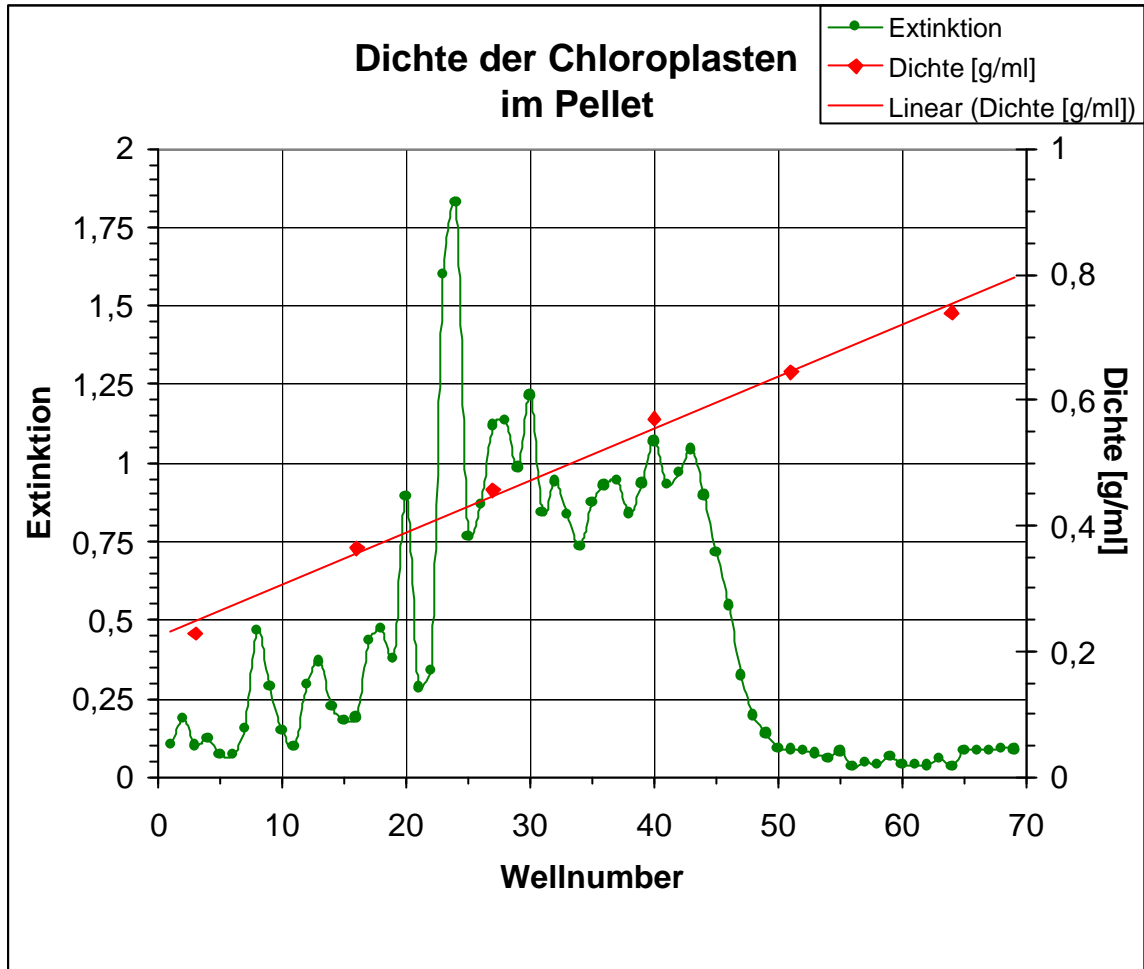
Fraktion	Extinktion	Dichte [g/ml]	% Zucker
1	0,3		
2	0,233		
3	0,227		
4	0,256		
5	0,28		
6	0,273		
7	0,297		
8	0,369		
9	0,47		
10	0,579		
11	0,658		
12	0,955		
13	0,916		
14	0,882		
15	0,776		
16	0,572		
17	0,524	0,276	25,3
18	0,436		
19	0,342		
20	0,344		
21	0,313		
22	0,294		
23	0,278		
24	0,27		
25	0,258		
26	0,244		
27	0,314		
28	0,278		
29	0,525		
30	0,225	0,364	32,3
31	0,426		
32	0,836		
33	0,889		
34	0,73		
35	0,675		
36	0,922		
37	0,852		
38	1,036		
39	1,256		
40	2,431		
41	2,081	0,457	38,9
42	2,852		
43	2,563		
44	1,409		
45	0,827		
46	0,482		
47	0,361		
48	0,323		
49	0,269		
50	0,329		
51	0,389		
52	0,483		

53	0,074		
54	0,06		
55	0,08		
56	0,033		
57	0,047		
58	0,039		
59	0,065		
60	0,039		
61	0,039		
62	0,036		
63	0,057		
64	0,035	0,739	58,7
65	0,084		
66	0,085		
67	0,085		
68	0,092		
69	0,088		

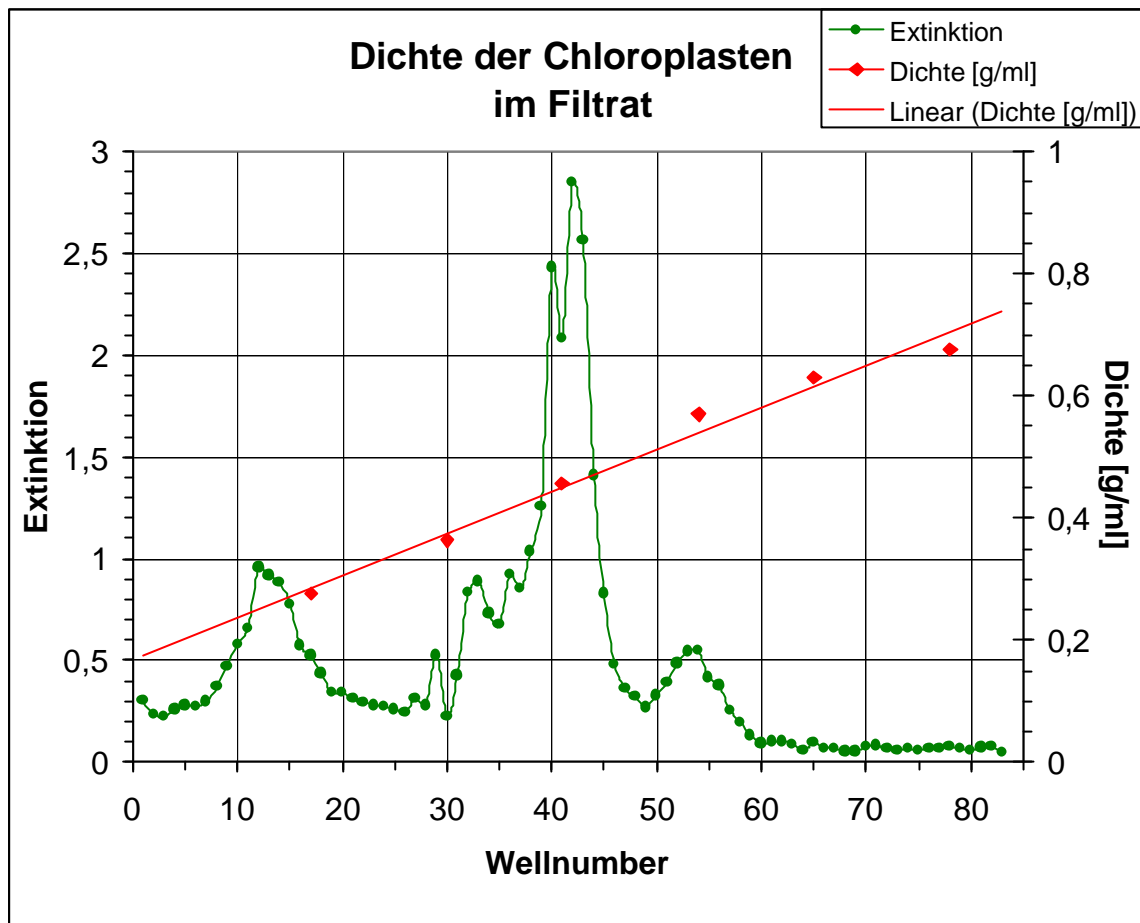
53	0,542		
54	0,546	0,57	47,3
55	0,417		
56	0,374		
57	0,255		
58	0,195		
59	0,132		
60	0,092		
61	0,099		
62	0,103		
63	0,086		
64	0,057		
65	0,094	0,63	51,5
66	0,069		
67	0,067		
68	0,051		
69	0,052		
70	0,074		
71	0,083		
72	0,066		
73	0,058		
74	0,064		
75	0,057		
76	0,07		
77	0,065		
78	0,075	0,676	53,9
79	0,065		
80	0,058		
81	0,073		
82	0,074		
83	0,047		

Durch Bestimmung der Gewichtsprozentage mehrerer Proben konnte die Dichte einiger Proben ermittelt werden. Daraus kann man eine Gerade herleiten, die man in den Graphen „Fraktion/Extinktion“ integriert und daran die Dichte der Peaks ablesen kann.

Auswertung



Aus diesem Graphen kann man nicht sehr gut zwei Peaks ablesen. Ein Peak liegt eindeutig bei Wellnumber 24 mit einer Extinktion von 1,83. Hierbei muß es sich um die Fraktionen mit den Thylakiodfragmenten handeln, da der Peak sehr hoch ist; der Anteil defekte Chloroplasten erwartungsgemäß auch. Es ist eine Dichte von **0,43 g/ml** zu messen. Der Peak mit den Intakten muß direkt als Erstes kommen, in den ersten Fraktionen. Hier ist ein kleiner Peak bei Wellnumber 8 zu verzeichnen: Extinktion = 0,47 und Dichte = **0,24 g/ml**.



Im zweiten Graphen kann man die Peaks der beiden Chloroplastenbanden viel besser erkennen. Der erste Peak für die Intakten liegt bei Fraktion 12 bei einer Extinktion von 0,96. Die Dichte dieser Chloroplasten beträgt **0,25 g/ml**. Der große Peak der Defekten befindet sich bei Fraktion 42, bei einer Extinktion von 2,85. Die Dichte der Thylakoisfragmente beträgt hier also **0,46 g/ml**. Die Werte der beiden Kurven bestätigen sich demnach. Im Durchschnitt ergibt sich folgendes:

intakte Chloroplasten haben eine Dichte von $(0,25+0,24 \text{ g/ml})/2 = \mathbf{0,245 \text{ g/ml}}$

Thylakoidmembranen haben eine Dichte von $(0,46+0,43 \text{ g/ml})/2 = \mathbf{0,445 \text{ g/ml}}$

Fehlerdiskussion

Die zweite Kurve ist uns nicht gelungen, da beim Fraktionieren der Abstand zwischen Titerplatte und Gradientenröhrchen zu groß war und die Probe gespritzt ist. Ansonsten hat der Versuch gut geklappt.