

TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA

Laboratorioalan koulutusohjelma

Tutkimuspainotteinen suuntautumisvaihtoehto

OPINNÄYTETYÖ

PLASMAMEMBRAANIEEN PUHDISTUS KUUSEN (*Picea abies*) SOLUKKOVILJELYISTÄ SOLUISTA KAKSIFAASISYSTEEMIÄ KÄYTTÄEN

Työn tekijä: Sadette Salonvaara
Työn valvoja: Arja Miettinen-Oinonen
Työn ohjaaja: Anna Kärkönen

Työ hyväksytty: __. __. 2006

Arja Miettinen-Oinonen



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston maa- ja metsätieteellisen tiedekunnan soveltavan biologian laitoksella osana laitoksen ligniiniprojektissa tehtävää tukimusta. Haluan kiittää kaikkia ligniiniprojektissa olevia siitä kaikesta avusta ja neuvoista mitä harjoittelujakseni aikana sain. Erityisesti kiitän Luk Maaret Mustosta, joka aina pyyteettömästi neuvoi ja auttoi minua työni eri vaiheissa. Kun aikani loppui kesken hän myös ajoi puolestani viimeisistä näytteistä natiivigeelielektroforeesin ja teki NADHP-oksidaasiaktiivisuusvärjäyksen. Kiitokset myös Kaj-Roger Hurmeelle, joka kärsivällisesti opasti minua nestetuikelaskimen käytössä. Lisäksi haluan kiittää Prof. Teemu Teeriä siitä, että hän otti minut työskentelemään laboratorioonsa ja mahdollisti näin koko opinnäytetyön valmistumisen.

Ennen kaikkea haluan kiittää ohjaajaani filosofian tohtori Anna Kärköstä, joka niin persoonana kuin ammattitaitoisena ja työlleen omistautuneella ohjaajana teki minuun suuren vaikutuksen. Annan ansiosta harjoittelujaksostani tuli erittäin mielenkiintoinen ja antoisa.

Kiitos! Kanssanne oli ilo työskennellä.

Helsingissä 13.11.2006

Sadette Salonvaara

OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Sadette Salonvaara	
Työn nimi: Plasmamembraanien puhdistus kuusen (<i>Picea abies</i>) solukkoviljelyistä soluista kaksifaasisysteemiä käyttäen.	
Päivämäärä: 13.11.2006	Sivumäärä: 37
Koulutusohjelma:	Suuntautumisvaihtoehto:
Laboratorioalan koulutusohjelma	Tutkimuspainotteinen
Työn valvoja: Arja Miettinen-Oinonen	
Työn ohjaaja: Anna Kärkönen FT	
<p>Tässä opinnäytetyössä optimoitiin kuusen (<i>Picea abies</i>) solukkoviljeltyjen solujen plasmamembraanien puhdistusmenetelmä. Menetelmänä käytettiin dekstran- polyetyleeniglykoli-kaksifaasiuuttoa, joka perustuu membraanien erottumiseen toisistaan niiden pintaominaisuuksien mukaan. Optimointiin kuului solujen homogenisointipuskurin ja homogenointiolosuhteiden sekä faasisysteemin komponenttien oikean pitoisuuden määrittäminen.</p> <p>Työ liittyi läheisesti Helsingin yliopiston maa- ja metsätaloustieteellisen tiedekunnan soveltavan biologian laitoksen ligniiniprojektin tutkimuksiin, jossa eräänä kohteena ovat peroksidaasivälitteisen ligniinin biosynteesiin tarvittava H_2O_2 ja sen syntymekanismit. Tämän työn tavoitteena oli valmistaa puhtaita, entsyymiaktiivisuutensa säilyttäneitä plasmamembraaneja sekä tutkia, löytyykö plasmamembraaneista NADPH-oksidaasia, joka on yksi mahdollinen H_2O_2:n tuottoon tarvittava entsyymi.</p> <p>Plasmamembraanien puhdistus aloitettiin solujen homogenisoinnilla ja sentrifugoimalla solun kalvot eroon solun muista partikkeleista, jonka jälkeen kalvot uutettiin polymeeri- ja suolapitoisuudeltaan erilaisissa faasisysteemeissä. Eristettyjen plasmamembraanien puhdistus tarkistettiin erilaisten merkkientsyymien avulla. Fraktioista mitattiin kalloosisyntaasiaktiivisuus sekä vanadaatti-sensitiivinen ATPaasi-aktiivisuus. Muiden kalvojen kontaminaatio fraktioissa määritettiin mittaamalla fraktioiden klorofyllipitoisuudet sekä sytokromi c-oksidaasi-aktiivisuudet. Lopuksi puhdistetut plasmamembraanit ajettiin natiivigelelelektroforeesissa, jonka jälkeen geeli värjättiin käyttämällä nitroblue tetrazoliumia mahdollisen plasmamembraanissa sijaitsevan NADPH-oksidaasin identifioimiseksi.</p> <p>Puhdistuksessa oikeilla homogenisointiolosuhteilla havaittiin olevan hyvin merkittävä rooli plasmamembraanien saannon ja puhtauden kannalta. Tälle materiaalille faasisysteemin polymeeripitoisuus 6.1 %, jossa on 3 mM KCl, antoi parhaimman tuloksen.</p> <p>Tästä opinnäytetyöstä saatuja tuloksia voidaan jatkossa käyttää hyväksi puhdistettaessa plasmamembraaneja kuusen soluista niin lignifikaatioon kuin muihinkin solun tapahtumiin kohdistuvia tutkimuksia varten.</p>	
Avainsanat: Plasmamembraani, kaksifaasiuutto, merkkientsyymi	

ABSTRACT

Name: Sadette Salonvaara	
Title: Purification of plasma membranes from suspension-cultured cells of Norway spruce (<i>Picea abies</i>) by two-phase partitioning as a method.	
Date: 13.11.2006	Number of pages: 37
Department: Laboratory Sciences	Study Programme: Research
Instructor: Arja Miettinen-Oininen	
Supervisor: Anna Kärkönen FT	
<p>In this graduate study, isolation method for plasma membranes of suspension-cultured cells of Norway spruce (<i>Picea abies</i>) was optimized by using dextran-polyethylene glycol two-phase partitioning as a method. In this method, the membranes are separated according to the differences in their surface properties. The optimisation included the determination of homogenization buffer, homogenization properties and the right concentration of the components in the polymer phase system.</p> <p>This study was carried out as a part of the research in the lignin project at the the Department of Applied Biology of the Faculty of Agriculture and Forestry at the University of Helsinki. One aim of the research in the ligning project is to study lignification-related H₂O₂ generation in the cell walls of spruce cells. The objective of this graduate study was to prepare pure plasma membranes with active enzymes and to identify the possible plasma membrane-bound NADPH-oxidase in plasmamembranes, which may be a candidate for producing H₂O₂.</p> <p>The purification of the plasma membranes started with cell homogenization and by isolating the membranes from the other cell particles by centrifugation. After this, the membranes were extracted in different two-phase systems by varying the polymer and salt concentration. The purity of the isolated plasma membranes was detected using specific enzyme markers such as callose synthase II and vanadate sensitive ATP-ase. The contamination of the intracellular membranes was measured by using chlorophyll and cytochrome <i>c</i>-oxidase as markers. The purified plasma membrane proteins were separated by native PAGE, and NADPH-oxidase activity assays were conducted in gel using nitroblue tetrazolium as a substrate to detect superoxide produced by the enzyme.</p> <p>This study shows that the method of homogenization has a significant effect on the yield and purity of the plasma membranes isolated from Norway spruce cells. Also, with this material the phase system concentrations of 6.1 % dextran and polyethylene glycol and 3 mM KCl, gave the best results.</p> <p>The results of this study may be used not only for reseach in the ligning project but also in other studies of Norway spruce cells that focus on the interaction between the cytoplasm and the outer space of the cell.</p>	
Keywords: Plasma membrane, two-phase partitioning, enzyme marker	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

SISÄLLYS

LYHENNELISTA

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1	Plasmamembraani; tärkeä rajapinta sytoplasman ja solun ulkoisen tilan välillä	2
2.2	Ligniinin biosynteesi	3
2.3	Kaksifaasiuutto plasmamembraanien puhdistusmenetelmänä	4
2.3.1	<i>Faasisysteemin komponentit</i>	4
2.3.2	<i>Membraanien jakautumiseen vaikuttavat tekijät</i>	5
2.3.3	<i>Menetelmän kuvaus</i>	6
2.3.4	<i>Fraktioiden puhtauden määrittäminen merkkientsyymien avulla</i>	8
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	10
3.1	Materiaali	10
3.2	Faasisysteemien valmistus	10
3.2.1	<i>Faasisysteemi</i>	10
3.2.2	<i>Erilliset ylä- ja alafaasit</i>	11
3.3	Plasmamembraanien eristyksen optimointi	12
3.3.1	<i>Homogenisointi ja faasisysteemin polymeerikonsentraation määrittäminen</i>	12
3.3.2	<i>Faasisysteemin KCl-pitoisuuden määrittäminen</i>	14
3.4	Plasmamembraanien eristys faasierottelulla	14
3.5	Proteiinipitoisuuden määrittäminen	15
3.6	Fraktioiden puhtaus	16
3.6.1	<i>Klorofyllimäärittäminen</i>	16
3.6.2	<i>Sytokromi c-oksidaasimäärittäminen</i>	16
3.6.3	<i>Vanadaatti-sensitiivinen ATPaasi-määrittäminen</i>	17
3.6.4	<i>Glukaanisyntaasi II -aktiivisuusmäärittäminen</i>	19
3.7	SDS-PAGE	20
3.8	NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäys	21

3.9	Tulosten laskennalliset perusteet	22
4	TULOKSET	23
4.1	Faasituksen optimointi	23
4.2	NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäys.....	29
5	TULOSTEN TARKASTELU	30
6	JOHTOPÄÄTÖKSET	33
	VIITELUETTELO	35

LYHENNELISTA

AF	alafaasi
ATP	adenosiinitrifosfaatti
CHAPS	3-[(3-hiiliamidopropyli)dimetyyliammonium]-propaanisulfonaatti
DPI	difenyleenijodoniumkloridi
DTT	ditiotreitoli
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
MES	(N-morfolini)etaanisulfonihappo
MOPS	(N-morfolini)propaanisulfonihappo
MF	mikrosomaalinen fraktio, fraktio, joka sisältää plasmamembraanien lisäksi kaikki muutkin solun kalvot.
NBT	nitrobluetetrazolium
PEG	polyetyleeniglykoli
PMSF	fenyylimetyylisulfonyylifluoridi
PVP-K30	polyvinyylipyrrolidone –K30
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
SOD	superoksididismutaasi
TCA	trikloorietikkahappo
YF	yläfaasi

1 JOHDANTO

Kasvisolujen eri kalvojen eristämisessä toisistaan on lajista riippumatta käytetty pitkään menetelmänä kaksifaasisysteemiuttoa. Menetelmän avulla on onnistuttu menestyksekkäästi puhdistamaan plasmamembraaneja monista eri kasveista, kuten pinaatista /1/, arabidopsiksesta /2/ ja vehnästä /3/. Membraaneja on puhdistettu myös puiden eri osien soluista kuten kuusen (*Picea abies*) ja männyn (*Pinus sylvestris*) juuristosta /4, 5/ sekä neulasista /6/. Tutkimustulokset ovat osoittaneet kaksifaasisysteemiuton olevan menetelmänä nopea ja tutkittavalle materiaalille hyvin hellävarainen /7/. Toisaalta, tutkittava materiaali vaikuttaa osaltaan uuton kulkuun. Tutkimusten mukaan havupuut ovat materiaalina vaativampia kuin ruohovartiset kasvit /6/.

Kaksifaasisysteemiutto perustuu membraanien jakautumiseen pintaominaisuuksiensa mukaan kahden polymeeristä valmistetun faasin välillä. Yleisimmin käytetyt polymeerit ovat dekstran ja polyetyleeniglykoli, joiden oikealla konsentraatiolla faasisysteemissä on ratkaiseva merkitys erottelemisen onnistumiseen. Koska tutkimuksen kohteena on biomateriaali, näytteen käsittely ja faasisysteemin polymeerien sekä muiden komponenttien optimaaliset pitoisuudet vaihtelevat materiaalin mukaan ja jokaiselle uudelle materiaalille on uutto-olosuhteet optimoitava erikseen. Kun olosuhteet saadaan tutkittulle materiaalille optimaaliseksi, voidaan tällä menetelmällä päästä 90%:sesti, tai joissain tapauksissa jopa 100%:sesti, puhtaisiin plasmamembraaneihin.

Tässä työssä optimoitiin puhdistusmenetelmä kuusen (*Picea abies*) suspensioviljeltyjen solujen plasmamembraaneille, käyttämällä dekstran-polyetyleeniglykoli-faasiuttoa niiden erottamiseen solun muista kalvoista.

Työ liittyy läheisesti Helsingin yliopiston maa- ja metsätaloustieteellisen tiedekunnan soveltavan biologian laitoksen ligniiniprojektiin. Ligniiniprojektissa tehtävän tutkimuksen yhtenä tavoitteena on tutkia mm. peroksidaasientsyymivälitteisen ligniinin synteisiin vaadittavan vetyperoksidin tuottoa soluseinässä. Tutkimuksen kohteena ovat plasmamembraanin entsyymit ja erityisesti NADPH-oksidaasi.

Tämän työn tavoitteena oli valmistaa ligniinitutkimuksen tarpeisiin puhtaita, entsyymeiltään aktiivisia ja ulkopuoli ulospäin olevia plasmamembraani-

vesikkeleitä. NADPH-oksidaasin identifioimiseksi puhdistetuista plasmamembraaneista ajettiin natiivigeelielektroforeesi, joka värjättiin NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäyksellä.

Plasmamembraanit puhdistettiin 4 vrk ikäisestä kuusen suspensioviljellyistä soluista. Viljelmä kuuluu kallussolukkolinjaan (A3/85), joka tuottaa solunulkoista ligniiniä /8/. Solukkolinja antaa erinomaisen mahdollisuuden tutkia ligniinin synteesiin osallistuvia entsyymejä, ja ennen kaikkea niitä lignifikaation myöhäisiä tapahtumia, joita ei vielä tarkkaan ole selvitetty.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Plasmamembraani; tärkeä rajapinta sytoplasman ja solun ulkoisen tilan välillä

Kasvisolu sisältää useita erilaisia kalvostoja, joista uloinna on plasmamembraani eli solukalvo, joka on läheisessä kosketuksessa soluseinään. Plasmamembraanin lisäksi kasvisolu sisältää monia solunsisäisiä kalvoja, joita ovat endoplasminen kalvosto, golgin laitteen kalvostot, mitokondrionaaliset kalvot, kloroplastien tylakoidit, tumakalvo sekä peroksisomien kalvot. Kaikki kalvot muodostuvat kahdesta lipidikerroksesta, joihin on kiinnittyneenä useita erilaisia proteiineja. Eri organellien kalvojen muoto sekä proteiini- ja rasvakoostumukset eroavat kuitenkin toisistaan. /9./

Plasmamembraanilla on sijaintinsa ansiosta tärkeä rooli solun sisäisten organellien ja solun ulkoisen tilan välissä tapahtuvassa liikenteessä ja kommunikaatiossa. Se osallistuu erilaisten molekyylien kuten ionien ja fotosyntetistien tuotteiden sekä elektronien kuljetukseen solun ulko- ja sisäpuolelle. Siinä sijaitsee reseptoreja, jotka toimivat solujen välisessä viestiliikenteessä. Selluloosasyntaasikompleksinsa avulla plasmamembraani syntetisoi selluloosaa, joka on yksi soluseinän komponenteista. Lisäksi plasmamembraani osallistuu toisen soluseinäkomponentin, ligniinin, synteesiin kuljettamalla ligniinin esiasteet sytoplasman puolelta soluseinään.

Plasmamembraani osallistuu myös solun patogeenipuolustukseen reseptoriensa kautta. Patogeenin tietyn osan tarttuessa reseptoriin, reseptori aktivoituu ja välittää signaalin, jolloin solun puolustusmekanismit aktivoituvat.

Eläimissä neutrofiilien NADPH-oksidaasi katalysoi reaktiota $O_2 + NADPH \rightarrow O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$ /10/. Syntynyt reaktiivinen superoksidiradikaali ($O_2^{\cdot-}$) voi edelleen muuttua vetyperoksidiksi. Kasvisolun plasmamembraanissa mahdollisesti sijaitsevan NADPH-oksidaasin on arvioitu osallistuvan neutrofiilien tavoin solun puolustukseen, sillä äkillinen happiradikaalien kuten superoksidin ja vetyperoksidin (H_2O_2) tuotto havaitaan myös kasvisoluisissa patogeenialtistuksen jälkeen /11/.

Jotta näitä, sekä monia muita solun sisä- ja ulkopuolen välisiä tapahtumia voidaan tutkia, on välttämätöntä pystyä eristämään riittävä määrä hyvin puhdistettuja, entsyymiaktiivisuutensa säilyttäneitä plasmamembraaneita.

2.2 Ligniinin biosynteesi

Ligniini on yksi kasvin soluseinän komponenteista selluloosan, hemiselluloosan ja pektiinin ohella. Se on vahva, vedenpitävä polymeeri, joka antaa soluseinälle lujuutta. Lajista riippuen noin 15% - 35% kasvin puutuneiden osien solujen soluseinästä koostuu ligniinistä. /12./ Soluseinän lignifikaatio alkaa yleensä vasta kun seinän hiilhydraattikomponentit ovat jo syntetisoituneet, jolloin ligniini täyttää näiden välit ja kiinnittää kuidut toisiinsa.

Ligniinin esiasteiden, monolignolien, biosynteesi tunnetaan melko hyvin /12/. Ligniini muodostuu kolmesta fenyylipropaniyhdisteestä, koniferyyli-, *p*-kumaryyli-, ja sinapyylialkoholista, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa erilaisin sidoksin muodostaen hyvin kompleksisen ja heterogeenisen rakenteen. Alkoholit syntetisoidaan solulimassa, josta ne kuljetetaan vesikkeleiden avulla plasmamembraanin kautta soluseinään. /12./ Varsinainen ligniinin synteesi tapahtuu soluseinässä. Synteesi tapahtuu hapetusreaktioiden kautta, joissa peroksidaaseilla on merkittävä rooli /13/. Soluseinän peroksidaasit käyttävät H_2O_2 :a. H_2O_2 muodostuminen soluseinään, sekä muut ligniinin synteessin myöhäiset vaiheet ovat kuitenkin vielä osittain epäselvät.

Aikaisempien tutkimustulosten mukaan on mahdollista, että jokin plasmamembraanissa sijaitseva entsyymi osallistuu ligniinin biosynteesissä tarvittavan vetyperoksidin tuottoon. Tässä tapauksessa entsyymi (NADPH - oksidaasi) käyttäisi sytosolin NAD(P)H:ta hapen pelkistäjänä, tuottaen apoplastiseen eli plasmamembraanin ulkopuoliseen tilaan hyvin reaktiivisia

happiradikaaleja, jotka muuttuvat helposti H_2O_2 :ksi. /14./ Peroksidaasit käyttävät H_2O_2 hapettimena, jolloin ligniinin esiasteet muuttuvat radikaaleiksi ja reagoivat toistensa kanssa muodostaen ligniinille tyypillisen verkkorakenteen.

2.3 Kaksifaasiuutto plasmamembraanien puhdistusmenetelmänä

Plasmamembraanien erottaminen muista solupartikkeleista dekstran-polyetyleeniglykolifaasisysteemin avulla esiteltiin vuonna 1981 vaihtoehtona siihen asti käytetylle menetelmälle, joka perustui sokerigradienttisentrifugaatioon /15/. Menetelmän havaittiin olevan hyvin herkkä ja hellävarainen solujen ja erilaisten partikkelien, kuten mitokondrioiden ja kloroplastien sekä plasmamembraanien ja muiden kalvojen fraktioimiseksi. Toisin kuin gradienttisentrifugaatio, joka perustuu organellien fraktioimiseen niiden tiheyden mukaan, kaksifaasisysteemissä partikkelien jakautuminen eri faasien välillä tapahtuu niiden pintaominaisuuksien mukaan /16, s. 327/. Menetelmän avulla päästään korkeisiin puhtausprosentteihin ja noin 90 % tuotetuista plasmamembraanivesikkeleistä on suljettuina ja oikea puoli ulospäin /17/ .

Plasmamembraanit eroavat pintaominaisuuksiltaan muista solun kalvoista ja asettuvat uutettaessa pääasiallisesti polyetyleeniglykolirikkaaseen yläfaasiin, kun taas muut membraanit, kuten mitokondrionaaliset kalvot ja endoplasmiset kalvostot, asettuvat dekstran-rikkaaseen alafaasiin. Jakautuminen johtuu osittain kalvojen erilaisista hydrofobisista/hydrofiilisistä ominaisuuksista. /20./

2.3.1 Faasisysteemin komponentit

Faasisysteemin pääkomponentit ovat dekstran T500 ja PEG 3350 (polyetyleeniglykoli), joista tehdään ensin esimerkiksi 20 % ja 40% (w/w) kantaliuokset veteen. Faasiseokseen lisätään sakkaroosia, puskureita ja suoloja, jotta olosuhteet saadaan tutkitulle materiaalille optimaaliseksi /18/. Faasisysteemiä valmistettaessa on polymeerikonsentraatioissa otettava huomioon ns. kriittinen raja, jonka alapuolella faasit eivät muodostu /19, s. 86/. Yleisimmin käytettyjä ovat systeemit, joissa dekstran T500:n ja PEG 3350:n pitoisuudet ovat 5.5 - 6.5 % (w/w) /7/. Jotta saanto ja membraanien puhtaus olisi opti-

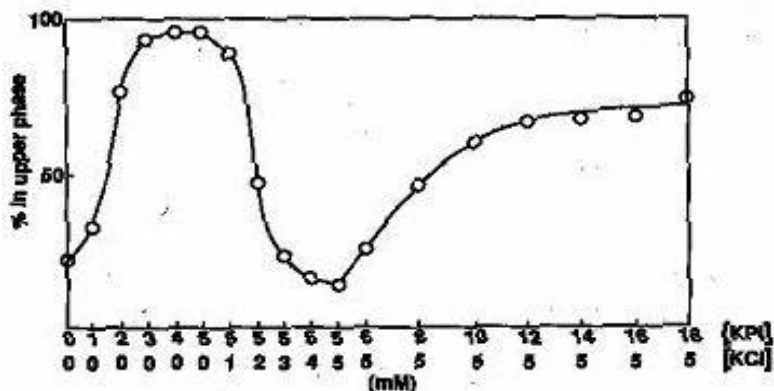
maalinen, on jokaiselle uudelle materiaalille faasisysteemin polymeerikon-
sentraatio kuitenkin testattava erikseen. Kun etsitään optimaalisia olosuhteita, faasisysteemin kooksi riittää tällöin 4 g (3,0 g faasiseosta ja 1,0 g näytettä) /21/.

2.3.2 Membraanien jakautumiseen vaikuttavat tekijät

Oikean polymeeripitoisuuden löytyminen on hyvin tärkeää, jotta membraanit saadaan eron toisistaan. Liian alhaisessa dekstraani- ja polyetyleeniglykolipitoisuudessa kaikki solun membraanit jäävät yläfaasiin. Kun polymeerikon-
sentraatiota nostetaan, alkavat membraanit kerääntyä interfaasiin ja lopulta alafaasiin. Polymeerikon-
sentraation nousuun reagoivat herkemmin mitokondrionaaliset kalvostot ja endoplasmakalvostot, kun taas kloroplastien tylakoidit, Golgin laitteen kalvostot ja erityisesti plasmamembraanit reagoivat hitaammin. /7./ Erottumiseen vaikuttavat osaltaan membraanien hydrofobiset ja hydrofiiliset ominaisuudet, sekä pinnalla olevat varaukset /21/.

Polymeeripitoisuuden lisäksi faasiseoksen suolapitoisuudella on merkittävä vaikutus membraanien erottumiseen. Yleisimmin käytetty yhdistelmä on 2-5 mM KCl, yhdessä 5 mM kaliumfosfaatin kanssa. /7./ KCl lisäys synnyttää faasien välille elektrostaattisen potentiaalilin /20/, jolloin membraanit alkavat erottua toisistaan niiden pinnalla olevien varausten voimakkuuksien mukaan. Tällöin herkemmin reagoivat mitokondrionaaliset membraanit ja endoplasmakalvostot alkavat kerääntyä interfaasiin. Plasmamembraanit jäävät yleensä vielä 5 mM KCl-konsentraatiossa yläfaasiin. /21./

Kuvassa 1 on esitettyä kaliumfosfaatti- ja KCl-lisäyksen vaikutus pinaatista puhdistettujen kloroplastitylakoidien jakautumiseen ylä- ja alafaasin välillä.



Kuva 1. Kaliumfosfaatin (KPi) , pH 7.8 ja KCl:n vaikutus pinaatista puhdistettujen kloroplastitylakoidien jakautumiseen 5.7 %:ssa (w/w) dekstranista ja polyteyleeniglukolista valmistetussa faasisysteemissä. Lämpötilassa +4°C. /22, s. 284./

Tutkitulle materiaalille optimaaliset faasisysteemin komponenttipitoisuudet voidaan määrittää uuttamalla näytettä ensin polymeerikonsentraatioiltaan erilaisissa faasiseoksissa, niin että pitoisuuksista tulee nouseva sarja. Kun konsentraatio, jossa suurin osa plasmamembraaneista on yläfaasissa ja suurin osa muista solun kalvoista alafaasissa, löytyy, tutkitaan KCl-pitoisuuden vaikutus kyseisessä faasisysteemissä. / 7./

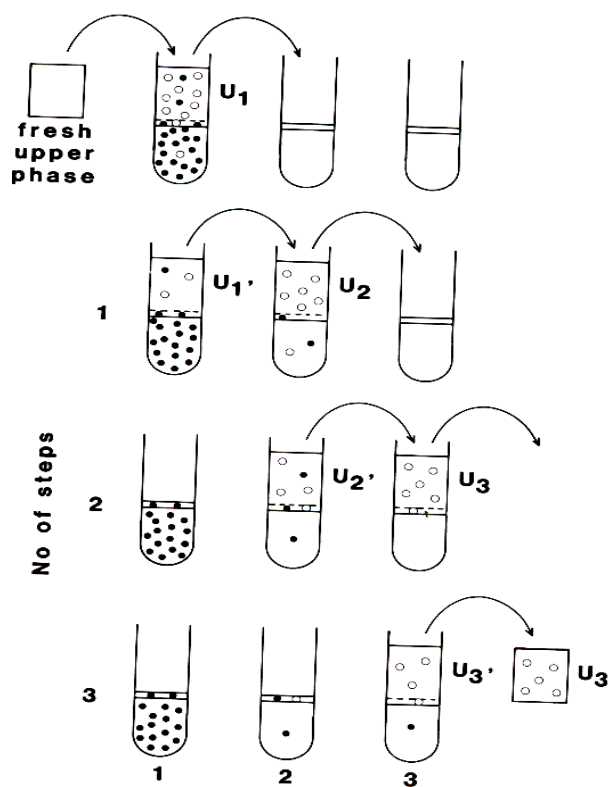
Membranien jakautumiseen faasien välillä vaikuttaa polymeerikonsentraation ja suolapitoisuuden lisäksi lämpötila. Tästä johtuen on tärkeää pitää valittu lämpötila (esim. + 4°C) samana faasien valmistuksen ja näytteen uuttamisen ajan. Jotta kalvojen entsyymit pysyvät aktiivisina, on erottelu tehtävä kylmässä. /19, s. 93./

2.3.3 Menetelmän kuvaus

Kalvojen erottelua varten kasvisolunäyte homogenisoidaan ja uutetaan sopivalla puskurilla. Näytteen proteiineja suojaamaan puskuriin voidaan lisätä esim. BSA:ta (naudan seerumi albumiini), kysteiiniä ja askorbiinihappoa. Kysteiini toimii askorbiinihapon kanssa näytteessä olevien fenolien pelkistäjinä (antioksidanttina). /22, s. 60; 4./ Fenolit ovat hapettuessaan hyvin reaktiivisia, ja reagoivat proteiinien kanssa muodostaen kinoneja, joka näkyvät näytteen värjäytymisenä ruskeaksi. Myös polyvinyylipyrrolidoni puskurissa

suojaa proteiineja sitoen fenoleja. Homogenaatista eristetään kalvot sentrifugoimalla. Kalvot suspensoidaan samaan puskuriin, kuin mitä faasisysteemi sisältää. /21./

Suspensiota pipetoidaan esimerkiksi falcon-putkeen punnitun faasisysteemin päälle niin, että haluttu ja lopullinen faasisysteemin paino saavutetaan (taulukko 1). Putkea käännettään 20 - 30 kertaa. Faasit saadaan erottumaan toisistaan sentrifugoimalla putkea muutaman minuutin ajan, jolloin ylä- ja alafaasin välille syntyy selvä interfaasi. Tällöin yläfaasi on samea, mikä osoittaa sen sisältävän kalvoja, interfaasi vaalea, ja alafaasi vihreä, mikä osoittaa sen sisältävän kloroplastien kalvoja. /21./ Jotta plasmamembraanit saadaan mahdollisimman puhtaaksi on faasitus tehtävä useammassa osassa /7/. Erottelun kulku on esitettyä kuvassa 2.



Kuva 2. Plasmamembraanien (o) erottaminen muista solun kalvoista (●) kaksifaasisysteemillä. Kun näyte on pipetoitu faasisysteemin päälle, sekoitettu ja sentrifugoitu, 90 % yläfaasista U_1 poistetaan pipetillä varoen rikkomasta interfaasia ja faasitetaan uudelleen kahdesti uuden alafaasin kanssa, joihin on lisätty 10 % uutta yläfaasia. Näin saadaan U_3 . Saannon parantamiseksi ensimmäisestä faasituksesta jäänyt alafaasi faasitetaan uuden yläfaasin kanssa, jolloin saadaan U_1' . Tämän jälkeen U_1' uudelleenfaasitetaan edellisistä faasituksista jääneiden alafaasien kanssa, niin että lopulta saadaan U_3' . /7, s. 456./

2.3.4 Fraktioiden puhtauden määrittäminen merkkientsyymien avulla

Kun faasitus on suoritettu, fraktioiden puhtaus voidaan määrittää käyttämällä kullekin kalvotyypille spesifisiä entsyymejä markkereina. Tällaisia merkkientsyymejä ovat esimerkiksi plasmamembraanien glukaanisyntaasi II eli kalloosisyntaasi (EC 2.4.1.3) /22, s. 68/ sekä mitokondrioiden sisäkalvojen sytokromi c-oksidaasi (EC 1.9.3.1) /19, s. 99/. Myös muita kuin entsyymejä voidaan käyttää apuna eri kalvojen määrittämisessä näytteestä. Tällaisia kalvomerkkejä ovat esimerkiksi kloroplastitylakoideihin kiinnittyneet klorofyllit.

Klorofyllipitoisuus näytteestä voidaan määrittää spektrofotometrisesti. Sen määrittäminen näytteestä perustuu kaikille väriaineille tyypilliseen ominaisuuteen absorboida valoa maksimaalisesti tietyllä aallonpituusalueella. Klorofylleillä on kaksi valon absorptiomaksimia: 400-480 nm (violetti-sininen) ja 620-680 nm (oranssi-punainen). Klorofyllejä on useita eri tyyppisiä. Tärkein niistä on klorofylli-a, jota löytyy kaikista happea tuottavista ja yhteyttävistä organismeista. Muita tyyppisiä kutsutaan apupigmenteiksi, sillä ne siirtävät absorboimansa energian edelleen klorofylli-a:lle. Määritettäessä näytteen klorofylli-a -pitoisuutta, näyte laimennetaan puskuriin, joka sisältää Mg^{2+} -ioneja. Lisätty Mg varmistaa klorofyllin keskusatomina toimivan Mg pysymisen paikallaan. Absorbanssi mitataan klorofyllin maksimaalisen aallonpituusalueilta ja näytteen klorofyllipitoisuus lasketaan saatujen absorbanssiarvojen avulla. /23./

Mitokondrionaalisten kalvojen määrä näytteessä voidaan määrittää mitokondrion sisäkalvolla sijaitsevan sytokromi c-oksidaasi -entsyymin (EC 1.9.3.1) avulla. Entsyymi osallistuu hengitysketjuun vastaanottamalla sytokromi c:ltä elektronin jolloin sytokromi c hapettuu. Sytokromi c:n hapettuminen voidaan detektoida spektrofotometrisesti, sillä hapettuneen ja pelkistyneen muodon spektrit poikkeavat toisistaan. Hapettuneen sytokromi c:n absorbanssi aallonpituusalueella 550 nm on huomattavasti pelkistynyttä korkeampi. /22, s. 166./

Plasmamembraanien puhtauden tarkistamisessa on kuitenkin ongelmana juuri plasmamembraaneille spesifisten entsyymien vähyys. Kyseisiä entsyymejä on käytössä vain kaksi: kalloosisyntaasi (EC 2.4.1.3) ja vanadaattisensitiivinen (K^+ , Mg^{2+})-ATPaasi (EC 3.6.1.3).

Plasmamembraanissa sijaitseva vanadaattisensitiivinen, K^+ -ioneilla aktivoituva (Mg^{2+}) ATPaasi (EC 3.6.1.3) poikkeaa solun kahden muun ATPaasin, tonoplastien ja mitokondrionaalisten kalvojen ATPaasien toiminnasta sillä, että se voidaan inhiboida vanadaatilla. (K^+ , Mg^{2+}) ATPaasin aktiivisuus näytteessä voidaan määrittää Baginskin ja Zakin menetelmällä /24/, joka perustuu ATPaasin toiminnassa vapautuneen inorgaanisen fosfaatin ja liuokseen lisätyn molybdaatin muodostaman kompleksin värjäämiseen askorbiinihapolla pelkistämällä ja detektoimiseen spektrofotometrillä. Askorbiinihappo liuotetaan TCA:han (trikloorietikkahappo). TCA:n lisäyksestä johtuva pH:n lasku pysäyttää reaktion. Reaktioseokseen lisätään arseniittiä, jotta ylimääräinen molybdaatti sitoutuisi siihen, eikä näin reagoisi pH:n laskusta johtuvan ei-entsyymaattisesti vapautuvan fosfaatin kanssa. Jotta solun muut ATPaasit eivät aiheuta vääristymiä aktiivisuustuloksissa, voidaan reaktioseokseen lisätä näitä inhiboivia aineita. Esimerkiksi puskuriin lisättävä NaN_3 inhiboi mitokondrion ATPaasin toimintaa /25/. Vääristymiä voidaan myös vähentää valitsemalla reaktioseokseen oikea pH. Jokaisella ATPaasilla on oma optimi-pH:nsa, jossa ne voivat toimia. Plasmamembraanin ATPaasi entsyymi sijaitsee sytoplasman puolella. Tästä syystä reaktioseokseen on lisättävä detergenttiä, joka lisää membraanien läpäisevyyttä.

Toisen plasmamembraanimarkkerin, 1,3- β -D-glukaanisyntaasi II (EC 2.4.1.3), aktiivisuus voidaan detektoida radiokemiallisesti nestetuikelaskimella käyttämällä radioaktiivisesti leimattua UDP-glukoosia substraattina. 1,3- β -D-glukaanisyntaasi II ts. kalloosisyntaasi muodostaa membraanin ulkopinnalle kalloosiketjua liittämällä glukoosiyksiköitä toisiinsa. Kun entsyymi-substraattiliuos pipetoidaan selluloosapaperille, kiinnittyvät syntyneet kalloosiketjut paperiin vetysidoksilla. UDP-glukoosimonomeerit voidaan tällöin pestä pois ja näytteen, eli syntyneen polymeerin radioaktiivisuus määrittää. Entsyymi tarvitsee aktivoituaakseen Ca^{2+} -ioneja. Myös spermiinin on todettu aktivoivan entsyymin toimintaa /26/. Glukaanisyntaasi II -aktiivisuuksia mitattaessa näytteestä tuloksia saattaa väärentää kasvisoluissa sijaitseva toinen glukoosista ketjua syntetisoiva entsyymi. Tämä 1,4- β -D-glukaanisyntaasi I, joka sijaitsee Golgin laitteen kalvolla, aktivoituu myös spermiinillä, mutta tarvitsee toimiakseen Mg^{2+} -ioneja. Jos reaktioseoksen UDP-glukoosipitoisuus on hyvin pieni (μM) ja seoksessa on Mg^{2+} -ioneja, syntynyt glukoosiketju on todennäköisemmin peräisin Golgin laitteesta. /22, s. 145./

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työssä optimoitiin kuusen solukkoviljeltyjen solujen plasmamembraanien puhdistusmenetelmä. Tässä luvussa esitellään työssä käytetyt materiaalit ja menetelmät sekä kuvataan työn suoritus.

Optimointi toteutettiin Larssonin ym. menetelmän pohjalta /7/, käyttäen erottamisessa dekstran-polyetyleeniglykoli-kaksifaasisysteemiä.

3.1 Materiaali

Kalvoeristyksissä käytettiin kuusen (*P. abies*) kallusviljelmän (A3/85) soluja /8/. Kalluslinjaa ylläpidettiin Kärkönen ym. mukaan /27/ kiinteällä 2-N-alustalla, pH 5.6, jossa oli 10 μM 2,4-dikloorifenoksisietikkahappo (2,4-D) ja 2.5 μM kinetiini kasvunsäätelijöinä sekä 58.4 mM sakkaroosi, 0.56 mM myoinositoli ja N6-makroravinteet, T-mikroravinteet, NaFe-EDTA sekä MS-vitamiineja /28/. Solut siirrettiin neljän viikon välein uudelle alustalle ja kasvatettiin 25°C:ssa heikossa valossa (n. 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 18 h valo / 6 h pimeä). Kalvoeristyksiä varten solut siirrettiin kallusalustalta suspensioalustalle, noin 1 g soluja / 50 ml kasvualustaa, jossa oli 2,4-D (0.5 μM), kinetiini (2.5 μM), T-makro- ja mikroravinteet, 58.4 mM sakkaroosi, 0.56 mM myoinositoli, NaFe-EDTA sekä MS-vitamiineja. Viljelmiä inkuboitii ravistelussa (100 rpm) +25°C lämpötilassa valorytmissä 16 h valo / 8 h pimeä.

Neljän vuorokauden liuosviljelyn jälkeen kasvatusalusta poistettiin, solut pestiin Bühner-suppilossa tislattulla vedellä, punnittiin ja siirrettiin nestetyypen kautta -80°C:seen, josta ne tarvittaessa otettiin käyttöön.

3.2 Faasisysteemien valmistus

3.2.1 Faasisysteemi

Faasituksen optimointia varten homogenisoidut kuusen kallussolut uutettiin polymeeri- ja suolapitoisuuksiltaan erilaisissa faasisysteemeissä. Faasien valmistamista varten Dekstran T500:sta (Amersham Biosciences) ja PEG 3350:stä (Sigma) valmistettiin ensin 20% (w/w) ja 40% (w/w) kantaliuokset veteen. Koska dekstran liukenee veteen huonosti osa vedestä lisättiin dekst-

ranin päälle, jolloin muodostui ensin pasta, johon lopullinen vesimäärä huolellisesti sekoittaen lisättiin. Valmiit kantaliuokset säilytettiin - 20°C:ssa.

Faasisysteemit valmistettiin 15 ml:n falcon-putkiin vaa'an avulla. Komponentit siirrettiin edellisenä päivänä kylmään (+5° C). Taulukossa 1 on esitettynä polymeerikonsentraatioiltaan 5.7-6.3% faasisysteemien komponentit ja niiden määrät. Kantaliuokset pipetoitiin taulukon 1 mukaisessa järjestyksessä, jolloin painavimmat komponentit punnittiin ensin. Näin voitiin helposti korjata yliannostelut, koska viimeksi lisätty komponentti jäi aina edellisen päälle.

Taulukko 1. Eri faasisysteemien komponentit ja niiden pipetointimäärät, kun KCl-pitoisuus on 3 mM.

Komponentti	5.7/5.7%	5.9/5.9%	6.1/6.1%	6.3/6.3%
DxT500 (20% w/w)	1.14 g	1.18 g	1.22 g	1.26 g
PEG 3350 (40% w/w)	0.57 g	0.59 g	0.61 g	0.63 g
Sakkaroosi	0.339 g	0.339 g	0.339 g	0.339 g
0.2 M K-fosf, pH 7.8 (loppupit: 5 mM)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
2 M KCl (loppupit. 3 mM)	4.5 µl	4.5 µl	4.5 µl	4.5 µl
0.5 M DTT 50 mM EDTA:ssa ^a (loppupit.1 mM DTT, 0.1mM EDTA)	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Vettä kunnes paino	3.00 g	3.00 g	3.00 g	3.00 g
Näyte ^b	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Faasisysteemin paino	4.00 g	4.00 g	4.00 g	4.00 g

^a) tuore 0.5 M DTT 50 mM EDTA:ssa lisättiin vasta faasierottelun aikana niin, että loppupitoisuus faasissa oli 1 mM DTT, 0.1mM EDTA

^b) Näyte lisättiin faasisysteemin vasta uutettaessa, jolloin faasisysteemin lopulliseksi painoksi tuli 4.00 g.

3.2.2 Erilliset ylä- ja alafaasit

Uuttotuloksen parantamiseksi valmistettiin erillisiä ylä- ja alafaaseja. Faasit valmistettiin erotussuppilossa, niin että faasisysteemin kooksi tuli 225 g. Polymeeripitoisuuksiksi valittiin kirjallisuuden perusteella 6.5 % ja KCl pitoisuudeksi 3 mM /6/. Taulukossa 2 on esitettynä erillisten ylä- ja alafaasien valmistuksessa käytettyjen komponenttien pipetointimäärät. Faasien valmistus tehtiin kylmähuoneessa. Komponentit punnittiin ja kaadettiin erotussuppi-

loon. Suppiloa ravisteltiin ja faasien annettiin erottua yön yli. Seuraavana päivänä ylä- ja alafaasit kerättiin erikseen ja säilöttiin -20°C :seen.

Taulukko 2. Erillisten ylä- ja alafaasien valmistuksessa käytetyt komponentit ja niiden punnitusmäärät 6.5 %:ssa faasisysteemissä

Komponentti	6.5 %
DxT500 (20% w/w)	69.75 g
PEG 3350 (40% w/w)	34.875 g
Sakkaroosi	25.425 g
0.2 M K-fosf, pH 7.8 (loppupit.5 mM)	5.625 ml
2 M KCl (loppu pit. 3 mM)	0.3375 ml
0.5 M DTT 50 mM EDTA:ssa ^c	
Vettä kunnes paino	225 g
Faasisysteemin paino	225 g

^c) tuore 0.5 M DTT 50 mM EDTA:ssa lisättiin vasta faasierottelun aikana niin, että loppupitoisuus faasissa oli 1 mM DTT, 0.1mM EDTA

3.3 Plasmamembraanien eristyksen optimointi

3.3.1 Homogenisointi ja faasisysteemin polymeerikonsentraation määrittäminen

Näytteen homogenisoinnissa kokeiltiin useita eri menetelmiä. Aluksi (uutto 1) solut homogenisointiin Larssonin ym. mukaisesti [7] soveltavin osin. Solut (23.71 g) hierrettiin huhmareessa jäällä käyttäen 23,7 ml 50 mM 3-(N-morfolini)propaanisulfonihappo (MOPS) –KOH-puskuria, pH 7.5, jossa oli 5 mM EDTA, 0.33 M sakkaroosi, 5 mM DTT (ditiotreitoli, tuore), 5 mM askorbiinihappo (tuore), 0,5 mM PMSF (fenyylimetyylisulfonyylifluoridi, tuore) ja 0,6 % (w/v) Polyclar AT (Serva) [7]. Suurimpien soluriekaleiden poistamiseksi, homogenaatti suodatettiin Miracloth-kankaan (CalBiochem) läpi sentrifuugiputkiin. Miraclothiin jäi paljon materiaalia. Suodos sentrifugoitiin (10 000 g, 10 min, $+4^{\circ}\text{C}$), jolloin ehjät plastidit, mitokondrioit ja muut solun osat saatiin erilleen kalvoista. Supernatantti oli väriltään vihreää, mikä osoitti sen sisältävän kloroplastikalvoja. Supernatantti siirrettiin uusiin putkiin ja putket tasapainotettiin 50 mM MOPS-KOH-puskurilla, jossa oli 0.33 M sakkaroosi. Solukalvot pelletoitettiin sentrifugoimalla ultrasentrifugoimalla (Optima L-90K ultrasentrifuge, Beckman Coulter, 70 000 g, 1 h, $+4^{\circ}\text{C}$), jonka jälkeen pelletit oli-

vat tumman vihreitä. Pelletit yhdistettiin ja suspensoitiin 4,5 ml 5 mM K-fosfaattipuskuria, pH 7.8, jossa oli 0.33 M sakkaroosi, 1 mM DTT (tuore) ja 0.1 mM EDTA sekä 3 mM KCl. Seos homogenisoitiin lasihomogenisaattoris-
sa. Faasitusta varten 1 ml näytettä pipetoitiin 5.5 %, 6.0 %, 6.25 % ja 6.5 % faasisysteemien päälle, joissa oli 3 mM KCl. Faasitus suoritettiin kuten luvussa 3.4. kerrotaan, niin että yläfaasit faasitettiin kolmesti uusien alafaasien kanssa.

Uutossa 2 homogenisointipuskuria modifioitiin lisäämällä siihen proteiineja suojaamaan 0,5 % (w/v) BSA (naudan seerumialbumiini, A-2153; Sigma) ja 4 mM kysteiini (tuore, pelkistynyt muoto, Fluka) sekä lisäämällä Polyclar AT:n (10 % w/v) ja sakkaroosin (0,5 M) määrää puskurissa. Solut (58,62 g) homogenisoitiin jälleen puskurin (58,62 ml) kanssa huhmareessa jäällä ja suodatettiin Miraclothin läpi. Membraanit eristettiin kuten yllä ja suspensoitiin K-fosfaattipuskuriin kuten edellä. 1 ml näytettä faasitettiin 6.3 %:ssa ja 6.5 %:ssa faasisysteemeissä, joissa 3 mM KCl.

Uutossa 3 homogenisointipuskuria modifioitiin Tollin ym. /6/ sekä Kaakisen /S. Kaakinen, henkilökohtainen/ mukaan. Solut (52,14 g) hierrettiin huhmareessa nestetyypen kanssa, jonka jälkeen solut uutettiin 141 ml:aan uuttopuskuria (50 mM MOPS-KOH, pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM askorbiinihappo, 0,5 mM PMSF, 0,5 % (w/v) BSA, 4mM kysteiini, 0,5 M sakkaroosi ja 1,5% (w/v) PVP-K30 (polyvinyylipyrrolidoni, Fluka); jatkossa uuttopuskuri). Miraclothin sijasta solut suodatettiin nylonkankaan läpi, jonka ansiosta kankaaseen jäävä osuus pieneni. Näyte uutettiin 6.5 %:ssa faasisysteemeissä kuten luvussa 3.4.

Uutossa 4 solut (41,50 g) homogenisoitiin kuten uutossa 3, jonka jälkeen soluihin lisättiin 150 ml uuttopuskuria. Mikrosomaalinen fraktio eristettiin kuten yllä. Membraanit uutettiin polymeerikonsentraatioiltaan 5.7 %, 5.9 %, 6,1 % ja 6.3 % faasisysteemeissä, joissa KCl-pitoisuus pidettiin edelleen 3 mM. Plasmamembraanien eristys suoritettiin kappaleen 3.4 mukaisesti, niin että faasitus tehtiin vain kerran.

3.3.2 Faasisysteemin KCl-pitoisuuden määrittäminen

Solujen homogenisointiolosuhteiden optimoinnin ja oikean faasisysteemin dekstran- ja polyetyleeniglykolipitoisuuden määrittämisen jälkeen testattiin KCl-pitoisuuden vaikutus kalvojen jakautumiseen (uutto 5). Määrittystä varten valmistettiin polymeerikonsentraatioiltaan 6.1 % faasisysteemit, joissa 0 mM, 1 mM, 3 mM ja 5 mM KCl.

Uuttoa varten solut punnittiin (43,75 g) ja homogenisoitiin hiertämällä neste-tyypin kanssa huhmareessa. Hierrettyihin soluihin lisättiin 150 ml uuttopuskuria. Homogenaatti suodatettiin nylonkankaan läpi sentrifuugiputkiin. Suodos sentrifugoitiin (10 000 g, 10 min, +4°C). Supernatantti siirrettiin uusiin putkiin ja putket tasapainotettiin 50 mM MOPS-KOH-puskurilla, jossa 0.33 M sakkaroosi. Kalvot pelletoitettiin sentrifugoimalla (70 000 g, 1 h, +4°C). Pelletit yhdistettiin ja suspensoitiin 4,8 ml 5 mM K-fosfaattipuskuria, pH 7.8, jossa 0.33 M sakkaroosi, 1 mM DTT ja 0.1 mM EDTA. Seos homogenisoitiin lasihomogenisaattorissa. Suspensio jaettiin neljään 1 ml erään. Eriin lisättiin 0 mM, 1 mM, 3 mM ja 5 mM KCl. Näytteet pipetoitiin faasisysteemien päälle ja faasitus suoritettiin kertaalleen.

3.4 Plasmamembraanien eristys faasierottelulla

Plasmamembraanien eristys suoritettiin +5° C:ssa, jotta näytteen proteiinit säilyisivät aktiivisina. Homogenisoitua solususpensiota pipetoitiin 1 ml pieniin falcon-putkiin valmistettujen 4-g-faasisysteemien päälle. Putkia käännettiin 30 kertaa ja sentrifugoitiin (1500 g, 5 min) faasien eroamisen edistämiseksi. Yläfaasit poistettiin pipetillä varoen samalla rikkomasta interfaasia ja siirrettiin uusiin putkiin. Jäljelle jääneen suspension eli mikrosomaalisen fraktion ti-lavuus otettiin ylös ja se säästettiin myöhempää pelletointia varten.

Osassa määrittämisistä yläfaasit ja alafaasit uutettiin vielä uusien puhtaiden faasin kanssa kolmesti kuvan 2 mukaisesti. Ajan vähyyden vuoksi ja koska tarkoitus ei ollut varsinaisesti valmistaa näytettä käyttöä varten, vaan löytää optimiolosuhteet, viimeisimmässä eristämässä faasitukset suoritettiin vain kertaalleen käyttämättä uusia alafaaseja.

Faasitusten jälkeen koko yläfaasit ja 1 ml alafaaseista pipetoitiin ultrasentrifugiputkiin membraanien pelletointia varten. Putket täytettiin 10 mM:lla

MOPS-KOH-puskurilla, pH 7.5, jossa 1 mM DTT 0.1 mM EDTA ja 330 mM sakkaroosi. Kalvot pelletoititiin (100 000 g, 1 h, +4 °C). Myös mikrosomaaliseen fraktiosta pipetoitiin 1 ml sentrifugiputkeen ja membraanit pelletoititiin kuten edellä. Sentrifugoinnin jälkeen alafaasien pelletit suspensoitiin 500 µl:aan ja mikrosomaalisen fraktion pelletti 1000 µl:aan säilytyspuskuria (10 mM MOPS-KOH, pH 7.5, jossa 330 mM sakkaroosi).

Jotta plasmamembraaneista saatiin vesikkelien sisälle jääneet sytoplasman liukoiset proteiinit samoin kuin membraaneissa löyhästi kiinni olevat proteiinit pois, yläfaaseista saadut membraanipelletit pestiin suspensoimalla pelletit 10 mM MOPS-KOH-puskuriin, pH 7.5, jossa oli 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.01 % Triton X-100 (Sigma) ja 330 mM sakkaroosi. Putket täytettiin puskurilla ja sentrifugoitiin (100 000 g, 1 h, +4 °C). Pelletit suspensoitiin 500 µl:aan säilytyspuskuria.

Näytteet jaettiin osiin ja osaan lisättiin 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA suoja-aineiksi. Sytokromi c -oksidaasi-aktiivisuussmittauksiin meneviin näytteisiin ei lisätty DTT:tä. Näytteet pakastettiin nestetyypen kautta -80°C:seen.

3.5 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Proteiinipitoisuudet mitattiin Bradfordin menetelmällä /29/ käyttäen Beardeinin modifiointia /30/.

Määrittämisessä käytetty väri valmistettiin liuottamalla Coomassie Brilliant Blue G-250 85 %:seen *ortho*-fosforihappoon 1 mg / ml. Liuos laimennettiin vedellä (1:5) ja suodatettiin suodatinpaperin läpi. Valmis liuos säilytettiin folioon käärittynä huoneen lämmössä.

Proteini määrät mitattiin spektrofotometrillä (Agilent 8453) näytetilavuudessa 1 ml niin, että 20 µl näytettä ja 480 µl 10 mM MOPS-KOH-puskuria, pH 7.5, jossa 0.33 M sakkaroosi ja 0.01 % Triton X-100 sekä 500 µl väriä pipetoitiin muovikyvetiin ja sekoitettiin kääntämällä. Absorbanssit mitattiin kahden minuutin kuluttua aallonpituusalueilla 465 ja 595 nm. Spektrofotometri nollattiin seoksella, jossa oli 500 µl puskuria ja 500 µl väriä.

Naudan seerumialbumiinista (BSA, Sigma) valmistettiin standardit 1 µg/ml, 5 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml ja 40 µg/ml 10 mM MOPS-KOH-puskuriin, pH

7.5, jossa 0.33 M sakkaroosi. Standardeihin ei lisätty Triton X-100:a. Absorbanssit mitattiin kuten näytteistä.

3.6 Fraktioiden puhtaus

3.6.1 Klorofyllimääritys

Fraktioiden klorofyllipitoisuus mitattiin spektrofotometrisesti käyttämällä 3 ml:n lasikyvettejä. Spektrofotometri (Agilent 8453) nollattiin 100 % asetonilla. 30 µl näytettä laimennettiin 80 %:lla asetonilla, jossa oli 0.01 % MgCl₂ niin, että lopputilavuudeksi tuli 3 ml. Absorbanssi mitattiin aallonpituusalueilla 663 nm ja 645 nm.

3.6.2 Sytokromi c- oksidaasimääritys

Pelkistyneen sytokromi c:n hapettumista eri fraktiossa mitattiin Møllerin ja Palmerin menetelmän mukaan, jossa sytokromi c pelkistetään ennen kokeen alkua askorbiinihapolla /31/.

Sytokromi c:stä (C 2037, Sigma) valmistettiin veteen 1 mM liuos, johon lisättiin askorbiinihappo (loppupitoisuus 40 mM) niin, että lopputilavuudeksi tuli 2,5 ml. Seoksen annettiin seistä huoneenlämmössä 10 min ajan, jonka jälkeen askorbiinihappo poistettiin seoksesta geelisuodatuspylväessä.

Pylvään tasapainotus ja askorbiinihapon poisto tehtiin +5 °C:ssa. Sephadex G-25 geelisuodatuspylväs (PD-10 Desalting column, GE Healthcare) tasapainotettiin 25 ml:llä 50 mM MOPS-KOH-puskuria, pH 7.5. Näyte (2.5 ml) pipetoitiin pylvääseen ja annettiin imeytyä. Sytokromi C eluointiin pylväästä 3,5 ml:llä MOPS-KOH pH 7.5 puskuria, jolloin sytokromi laimeni pylväessä 1.4-kertaisesti eli 714 µM:ksi. Pelkistynyt sytokromi säilytettiin -20 °C:ssa, josta otettaessa käyttöön siihen lisättiin hieman natriumditioniittiä (Na₂S₂O₄) pelkistymisen varmistamiseksi. Pelkistyminen määritettiin silmämääräisesti: hapettunut sytokromi oli väriltään oranssia, kun taas pelkistyneen sytokromin väri vivahti pinkkiin. Ylimääräinen ditioniitti hapetettiin puhaltamalla seokseen ilmaa lasipipetillä.

Sytokromin hapettuminen näytteessä mitattiin spektrofotometrin kinetiikka-ohjelmalla aallonpituusalueella 550 nm, näytetilavuuden ollessa 1 ml. Laitte nollattiin reaktioseoksella, jossa oli 840 µl 50 mM MOPS-KOH-puskuria, pH 7.4 ja 50 µl 0.5 % (w/v) Triton X-100:ia 50 mM MOPS-KOH-puskurissa. Seokseen lisättiin 70 µl 714 µM sytokromi C (loppupitoisuus 50 µM) ja inkuboitiin 10 minuutin ajan huoneenlämmössä. Tausta-absorbanssi mitattiin 45 sekunnin ajan. Seokseen lisättiin 40 µl näytettä, jossa ei ollut DTT:a, sekoitettiin ja absorbanssi mitattiin kuten edellä.

3.6.3 Vanadaatti-sensitiivinen ATPaasi-määritys

Vanadaatti-inhiboituvan ATPaasin aktiivisuus määritettiin Larssonin ym. mukaisesti /7/.

Natrium *ortho*-vanadaatti aktivoitiin keittämällä, jotta saavutettaisiin maksimaalinen inhibitio /32/. 200 mM kantaliuos valmistettiin veteen ja pH säädettiin 10:ksi 1 M HCl:llä. Tässä pH:ssa liuos muuttui keltaiseksi. Liuosta keitettiin noin 7 minuuttia, kunnes se muuttui täysin värittömäksi. pH tarkistettiin ja liuos laimennettiin 1.2 mM:ksi. Valmis liuos säilytettiin -20°C:ssa.

Detergenttinä käytettiin Brij 58:a (Sigma), koska Triton X-100 liian suurina annoksina saattaa inhiboida entsyymin toimintaa /15/.

Seuraavat kantaliuokset valmistettiin MES-KOH-puskuriin pH 6.0, jossa oli 0.33 M sakkaroosi: 0.5 M DTT, 48 mM MgSO₄, 36 mM ATP (Merck) ja 0.6% (w/v) Brij 58.

Reaktioseos pipetoitiin taulukon 3 mukaisesti eppendorf-putkiin. Puskuriseos sisälsi 50 mM MES-KOH-puskuria, pH 6.0, jossa 0.33 M sakkaroosi, 50 mM KNO₃, 1 mM NaN₃, 0.1 mM Na-molybdaatti ja 1 mM DTT (tuore). Lisäksi valmistettiin kontrollit a ja b joihin ei pipetoitu näytettä. Kaikkia tehtiin rinnakkaiset.

Taulukko 3. Vanadaatti-sensitiivinen ATPaasi -määrityksen komponentit ja pipetointimäärät.

	Putki a	Putki b	Putki c	Putki d	Kontrolli a	Kontrolli b
Puskuriseos	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
48 mM MgSO ₄	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
MES-puskuri	5 µl	-	5 µl	-	20 µl	15 µl
0,6 % Brij	-	5 µl	-	5 µl	-	5 µl
Vesi	5 µl	5 µl	-	-	-	-
1,2 mM vanadaatti	-	-	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
näyte	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	-	-
Vesi	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	-
ATP	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Magnesiumkontrollia varten valmistettiin lisäksi näytteet a, b, c ja d ilman MgSO₄:a. Tilalle pipetoitiin 5 µl MES-KOH-puskuria.

Reaktio aloitettiin pipetoimalla näytteisiin 5 µl 36 mM ATP:a (loppupitoisuus 3 mM), niin että näytteiden lopputilavuudeksi tuli 60 µl. Näytteitä inkuboitiin 25°C:ssa 30 minuutin ajan.

Reaktio pysäytettiin Baginskin ja Zakin menetelmän [24] mukaisesti pipetoimalla 40 µl näytettä 400 µl:aan seosta, jossa oli 2 % askorbiinihappo 10 % TCA:ssa (trikloorietikkahappo) ja 0.1 % EDTA, jonka jälkeen lisättiin välittömästi 200 µl 2.5 % ammoniummolybdaattia ja 400 µl seosta, joka sisälsi 2 % (w/v) Na-sitraattidihydraattia ja 2 % (w/v) natriumarseniittiä 2 %:ssa (v/v) etikkahapossa. Näytteitä inkuboitiin 15 min huoneen lämmössä ja absorbanssit mitattiin aallonpituusalueella 750 nm.

Fosfaattistandardit, 0, 2.5, 12.5, 25, 50 ja 100 nmol / µl, valmistettiin kaliumdivetyfosfaatista (KH₂PO₄) 50 mM MES-KOH-puskuriin, pH 6.0, jossa oli 0.33 M sakkaroosi. Standardeihin lisättiin 3 mM ATP. Standardit käsiteltiin kuten näytteet.

3.6.4 Glukaanisyntaasi II -aktiivisuusmääritys

Näytteiden glukaanisyntaasiaktiivisuus määritettiin Palgremin ym. mukaisesti soveltavin osin /33/.

Substraattiliuokseksi valmistettiin 10 mM UDP-glukoosi (UDP-Glc, leimamaton, Sigma) 50 mM MOPS-KOH-puskurissa pH 7.25, jossa oli 0.33 M sakkaroosi. Seokseen lisättiin leimattua [¹⁴C] UDP-Glc:a (Amercham Biosciences, CFB 102, 370 kBq / 400 µl) niin, että aktiivisuudeksi tuli 0,5 kBq / 50 µl reaktio. Osassa määriksiä käytettiin [³H] UDP-Glc:a.

Lisäksi valmistettiin 0.1 % (w/v) digitoniini 50 mM MOPS-KOH-puskuriin, jossa 0.33 M sakkaroosi, sekä puskuriseos, joka sisälsi 50 mM MOPS-KOH-puskuria, pH 7.25, jossa 0.33 M sakkaroosi, 5 mM DTT, 5 mM spermiini, 50 mM sellobioosi, 0.5 mM CaCl₂. Näytteet valmistettiin taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. Glukaani syntaasi II -määritystä varten valmistetut reaktioseokset ja niiden komponenttien pipetointimäärät.

	Näyte a	Näyte b	Kontrolli	Standardi
Puskuriseos	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
0.1 % digitoniini (loppupit. 0.01 %)	5 µl	-	5 µl	5 µl
50 mM MOPS-KOH, 0.33 M sakkaroosi näyte	-	5 µl	15 µl	5 µl
[¹⁴ C]UDP-Glc (loppupit. 2 mM)	15 µl	15 µl	-	15 µl
	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl ^d

^d UDP-Glc lisättiin vasta reaktion pysäytyksen jälkeen.

Kontrollinäytteeseen ei lisätty näytettä, jotta tausta-aktiivisuus saatiin määritettyä. Standardinäytteellä mitattiin 1 mM UDP-Glc:n sisältämä kokonaisaktiivisuus ja UDP-Glc lisättiin siihen vasta reaktion pysäytyksen jälkeen.

Putkia inkuboitiin noin 5 minuutin ajan +25°C:ssa vesihauteessa, jotta lämpötila tasapainottuisi +25°C:ksi ja reaktio näin ollen alkaisi heti substraattilisäyksen jälkeen. Tämän jälkeen putkeen a ja b sekä kontrolliin lisättiin 10 µl substraattiliuosta (UDP-Glc, loppupitoisuus 2 mM) ja putkia inkuboitiin 30 minuutin ajan +25°C:ssa. Reaktiot pysäytettiin lisäämällä näytteisiin 5.5 µl 98 %:sta muurahaishappoa (loppupitoisuus 9,7 %).

Näytteistä ja kontrollista pipetoitiin 53 µl selluloosasuodatinpaperille (Whatman 3 MM, halkaisija 25 mm). Paperien annettiin kuivua noin 30 minuuttia, jonka jälkeen ne siirrettiin erlenmeyeriin, jossa 0.5 M ammoniumasetaatti pH 3.6 ja etanoli sekoitussuhteessa 3:7 (30 suodatinpaperia / 250 ml pesuliuos-ta). Paperien annettiin peseytyä heikossa ravistelussa UDP-glukoosimonomeerien poistamiseksi 45 minuutin ajan, jonka jälkeen pesu-liuos vaihdettiin ja pesu toistettiin. Standardi (53 µl) pipetoitiin lasikuitupa-perille (Whatman). Lasikuitupaperia käytettiin siksi, että selluloosapaperilla UDP-glukoosi olisi imeytynyt selluloosakuitujen väliin, mikä näin ollen vai-mentaisi säteilyä. Paperia ei pesty, jotta UDP-Glc monomeerit eivät irtoa.

Pesun jälkeen paperit kuivattiin +40°C:ssa lämpökaapissa 20 minuutin ajan. Paperit siirrettiin tuikenestepulloihin ja tuikenestettä (Insta-Gel plus 6013399, Perkin ElmerLife) lisättiin 6 ml. Paperiin sitoutunut [¹⁴C]kalloosi mitattiin tui-kenestelaskimella (Wallac liquid scintillation counter 1411).

3.7 SDS-PAGE

Plasmamembraaniproteiineista ajettiin SDS-PAGE Sagin ja Fluhrin mukai-sesti /34/. Ajoa varten valmistettiin 5 % konsentroitigeeli ja 9 % erotusgeeli taulukon 5 mukaisesti.

Taulukko 5. SDS-PAGE -geelien komponentit ja pipetointimäärät.

	5 % Konsentroitigeeli V = 4 ml	9 % Erotusgeeli V = 10 ml
40 % akryyliamidi- bisakryyliamidi	0,5 ml	2,25 ml
3 M Tris- HCl pH 8.8		1,25 ml
3 M Tris-HCl, pH 6.8	0,167 ml	
Vesi	3,313 ml	6,45 ml
20 % SDS	20 µl	50 µl
TEMED	6 µl	6 µl
10 % APS	30 µl	40 µl

Näytteisiin lisättiin näytepuskuria, jossa loppupitoisuudet 47 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2 % (w/v) SDS, 7.5 % (v/v) glyseroli, 40 mM DTT sekä 0.002 %

bromfenolisininen (Sigma) Näytteitä inkuboitiin proteiinien solubilisoimiseksi 30 minuuttia +45°C:ssa. Inkuboinnin jälkeen näyteproteiinit pipetoitiin kaivoihin (5 ja 10 µg / kaivo). Standardia (ColorBurst™, C 4105, Sigma) pipetoitiin 4 µl. Ajo suoritettiin ajopuskurissa pH 8.3, jossa 25 mM Tris, 190 mM glysiini ja 0.1% SDS. Geeli värjättiin hopeavärjäyksellä.

3.8 NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäys

Membraanifraktioiden NADPH-oksidaasiaktiivisuus määritettiin ajamalla näytteet natiivipolyakryyliamidigeelielektroforeesissa ja värjäämällä geelit NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäyksellä. Värjäyksessä käytetty NBT (nitrobluetetrazolium) saostuu siniseksi yhdisteeksi reagoidessaan superoksidin kanssa, mikä näkyy geelille muodostuvana sinisenä juovana. DPI:n (difenyleenijodoniumi, Sigma) ja CuZnSOD:n (CuZn-superoksididismutaasi, Sigma) lisäys oli kontrollina. DPI:n vaikutuksesta flaviinia sisältävä NADPH-oksidaasientsyymi inhiboituu, eikä näin ollen geelille pitäisi syntyä juovaa. CuZnSOD poistaa superoksidia, joten värijuovan puuttuminen geeliltä osoitaisi reaktion olevan superoksidista riippuvainen. /34./

Uuton 5 yläfaasinäyteproteiinit eroteltiin natiivigeelielektroforeesissa Sagin ja Fluhrin mukaisesti /34/.

Konsentrintigeeli ja erotusgeeli valmistettiin muuten kuten SDS-PAGE-geelit (taulukko 5), mutta SDS:n tilalle pipetoitiin 20 µl vettä. Kirjallisuuden perusteella kokeiltiin myös 0,1 % (w/v) CHAPS:n (3-[(3-hiiliamidopropyli)dimetyyliammonium]-propanirikkihappo, Fluka) lisäämistä geeleihin, mutta geelit eivät tällöin polymerisoituneet kunnolla /34/.

Yläfaasinäytteeseen, jossa oli 3 mM KCl (YF3), lisättiin näytepuskuri (loppupitoisuudet 47 mM Tris-HCl, pH 7.8, 7.5 % (v/v) glyseroli, 40 mM DTT, 0.002 % bromfenolisininen (Sigma) sekä 0.1 % CHAPS), jonka jälkeen sitä inkuboitiin membraaniproteiinien solubilisoimiseksi 30 minuuttia +45°C:ssa. Yläfaasinäytteeseen, jossa oli 5 mM KCl (YF5), lisättiin näytepuskuri, jossa ei ollut CHAPS:a. Tälle näytteelle ei tehty lämpökäsittelyä. Kaivoihin pipetoitiin 20 µl näyte-puskuriseosta (proteiinia 5,1 µg (YF3) ja 3,3 µg (YF5) / kaivo).

Ajon jälkeen geeli jaettiin kolmeen osaan ja siirrettiin ravistelijan päälle maljoille. Mahdollisen NADPH:sta riippumattoman superoksidin syntymisen detektoimiseksi osia inkuboitiin ensin 20 minuutin ajan foliolla peitettynä 50 mM Tris-HCl -puskurissa, pH 7.4, jossa 0.2 mM NBT (nitrobluetetrazolium), 0.1 mM MgCl₂ ja 1 mM CaCl₂. Toiseen kontrolleista lisättiin 10 µM DPI:a (10 mM kantaliuos valmistettiin DMSO:hon) ja toiseen CuZnSOD:ia pitoisuudessa 50 U / ml. Kun esi-inkuboinnin aikana geeleissä ei ollut tapahtunut värireaktiota, värjäysliuokseen lisättiin 0.2 mM NADPH. Geelejä inkuboitiin huoneenlämmössä viikonlopun yli. Reaktio pysäytettiin vaihtamalla värjäysliuoksen tilalle tislattu vesi ja geelit kuvattiin.

3.9 Tulosten laskennalliset perusteet

Näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin standardeista piirretyn kuvaajan $A_{595} - A_{465} = f(C)$ avulla.

Klorofylli-a -pitoisuus laskettiin käyttämällä kaavaa 1, jossa V = näytteen tilavuus ja W = tuorepaino

$mg\ chl\ a / g\ FW =$

$$(12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645}) * \left(\frac{V}{1000 * W} \right) * \text{laimennus kerroin} \quad (1)$$

Sytokromi c-oksidaasin totaaliaktiivisuus näytteessä laskettiin käyttämällä pelkistyneen sytokromi c:n molaarisen absorptiviteetin arvoa $\epsilon_{550} = 18500\ M^{-1}\ cm^{-1}$.

4 TULOKSET

Tässä opinnäytetyössä optimoitiin kuusen solukkoviljeltyjen solujen plasmamembraanien puhdistusmenetelmä. Puhdistuksessa käytettiin kaksi-faasisysteemiä. Plasmamembraanien puhtaus määritettiin sen mukaan, paljonko faasituksen jälkeen fraktioissa oli plasmamembraaneille sekä muille solun kalvoille tyypillisten entsyymien aktiivisuuksia. Tässä luvussa esitetään faasisysteemin optimointitulokset sekä NADPH-oksidaasi -aktiivisuusvärjäystulos.

4.1 Faasituksen optimointi

Kuusen suspensioviljeltyjen solujen uutto-olosuhteiden optimointi aloitettiin hiertämällä solut huumareissa jäällä käyttäen 0,6 % (w/v) Polyclar AT:a puskurissa, ja faasittamalla solut polymeerikonsentraatioiltaan 5.5 %, 6.0 %, 6.25 %, 6.5 % faasisysteemeissä, joissa KCl-pitoisuus oli 3 mM (uutto 1). Faasituksen jälkeen yläfaasit olivat kirkkaita eikä selvää interfaasia faasisysteemeihin muodostunut. Polymeerikonsentraatioissa 5.5 % faasit eivät erottuneet lainkaan. Muissa polymeerikonsentraatioissa proteiinisaanto jäi hyvin pieneksi (taulukko 6) ja entsyymiaktiivisuudet lähes olemattomiksi (tuloksia ei esillä).

Kun solujen homogenisointipuskuriin lisättiin 0,5 % BSA sekä 4 mM kysteiini, ja sakkaroosin (0,5 M) sekä Polyclar AT:n (10 % w/v) pitoisuutta lisättiin, proteiinipitoisuudet hieman nousivat, mutta faasisysteemeissä (6.3 % ja 6.5 %) ei edelleenkään muodostunut interfaasia ja yläfaasit olivat kirkkaita (uutto 2). Fraktioista mitattiin vanadaatti-sensitiivinen ATPaasi-aktiivisuus. Mikrosomaalisessa fraktiossa aktiivisuutta oli jonkin verran (181,6 pkat / g soluja), mutta ala- ja yläfaasinäytteissä ei aktiivisuuksia ollut (totaaliaktiivisuudet < 4 pkat / g soluja).

Uutossa 3 homogenisointipuskuria modifioitiin lisäämällä Polyclar At:n tilalle 1,5 % (w/v) PVP-K30 jonka jälkeen solut homogenisoitiin nestetyössä ja suodatettiin miraclothin sijasta nylonkankaan läpi. Tämä menetelmä osoitautui parhaimmaksi kuusen suspensioviljeltyjen solujen homogenisoinnissa. Kun näyte uutettiin 6.5 %:ssa faasisysteemissä, faasituksen jälkeen yläfaasi oli selvästi samea, mutta interfaasia ei edelleenkään muodostunut (uutto 3).

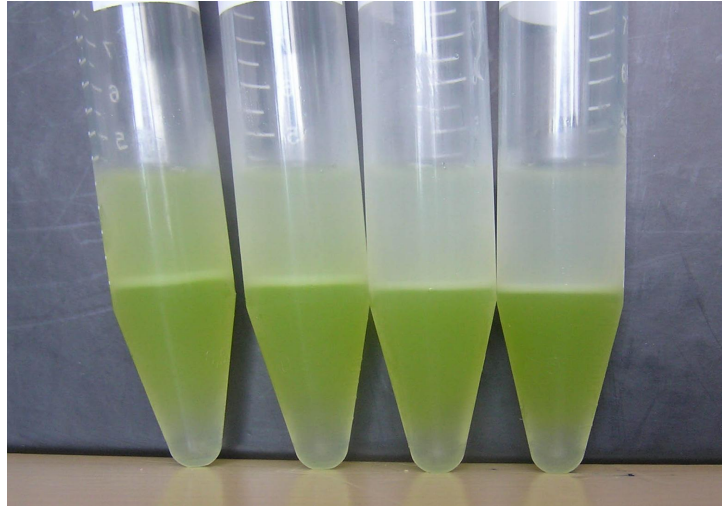
Mittauksissa todettiin kuitenkin, ettei yläfaasi sisältänyt lainkaan plasmamembraanille spesifisen entsyymin, vanadaatti-sensitiivisen ATPaasin, aktiivisuuksia, mutta alafaasissa aktiivisuuksia sen sijaan oli. Näytteille tehtiin myös kalloosisyntaasiaktiivisuusmittaus [³H]UDP-glukoosia käyttäen. Myös kalloosisyntaasiaktiivisuuksien havaittiin olevan alafaasissa (taulukko 6). Tuloksista pääteltiin plasmamembraanien menneen tässä faasikonsentraatiossa alafaasiin. Uuttoa kokeiltiin myös ilman PVP-K30, mutta tällöin yläfaasit eivät sisältäneet lainkaan proteiineja.

Taulukko 6. Uutto 1:stä saatujen fraktioiden proteiinipitoisuudet sekä uutto 3:sta saatujen fraktioiden proteiinipitoisuudet ja vanadaatti-sensitiivinen ATPaasi- ja glukaanisyntaasi II -aktiivisuudet. Uutto 1: Homogenisointi suoritettiin ilman nestetyyppeä, puskurissa, jossa 0,6 % (w/v) Polyclar AT. Ei BSA:ta eikä kysteiniä. Faasitus suoritettiin kolmesti. Uutto 3: Solut homogenisoitiin nestetyyppeä käyttäen ja suspensoitiin puskuriin jossa 1.5 % (w/v) PVP-K30, 0,5 % BSA ja 4 mM kysteini. Faasitus suoritettiin kolmesti. ATPaasi -aktiivisuudet mitattiin detergentin läsnä ollessa. Prosenttiluku kertoo aktiivisuuden suhteessa mikrosomaalisessa fraktiossa havaittuun aktiivisuuteen.

Fraktio	Uutto 1		Uutto 3		
	Proteiini (µg / 23,7g soluja)		Proteiini (µg / 52,14g soluja)	Vanadaatti- sensitiivinen ATPaasi (pkat/g FW)	Glukaanisyntaasi II (pkat/g FW) [³ H]UDP-glukoosi
MF	1154,7 (100%)		4089,9 (100 %)	394,0 (100 %)	+ digit. / - digit. 19,8(100%)/ 18.8(100%)
6,0 %					
YF	14,6 (1 %)				
AF	245,6 (21 %)				
6,25 %					
YF	15,6 (1 %)				
AF	325,3 (28 %)				
6,5 %					
YF	1,5 (0,1 %)		610,9 (15 %)	ei havaittu	0,2 (1 %) / 0,6 (3 %)
AF	349,2 (30 %)		6278,2 (154%)	58,9 (15 %)	11,1 (56 %) / 12,7(68%)

Koska 6.5 % faasisysteemin havaittiin olevan liian korkea kuusen solukko viljeltyjen solujen plasmamembraanien puhdistukseen, membraanit faasitettiin seuraavaksi polymeerikonsentraatioiltaan 5.7 %, 5.9 %, 6,1 % ja 6.3 % faasisysteemeissä, KCl-pitoisuus pidettiin edelleen 3 mM (uutto 4). Faasituksen jälkeen faasisysteemeissä näkyi selvä interfaasi ja klorofyllipitoisuudessa selvä gradientti.

Kuvassa 3 näkyy eri polymeerikonsentraatioiden vaikutus klorofyllien erottumiseen kun faasitus suoritettiin vain kerran. Klorofyllipitoisuus vähenee selvästi faasisysteemin polymeeripitoisuuden kasvaessa. Kuvassa näkyy selvästi myös vaalea interfaasi ylä- ja alafaasien välillä



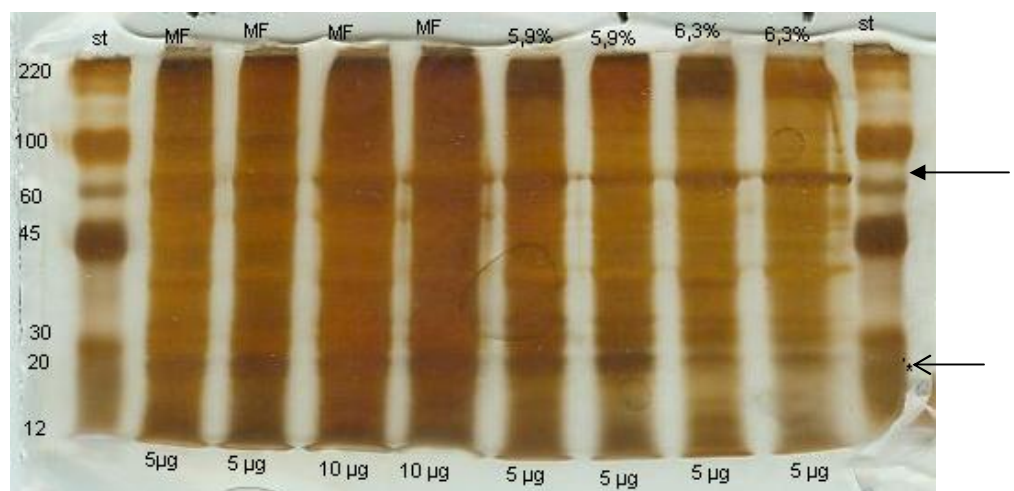
Kuva 3. Polymeerikonsentraation vaikutus membraanien erottumiseen faasisysteemissä, joissa 3 mM KCl-pitoisuus. Vasemmalla 5.7 % faasisysteemi ja siitä seuraavat 5.9 %, 6.1 % ja 6.3 % faasisysteemit PEG:n ja dekstranin suhteen. Faasitus suoritettiin vain kerran.

Uutosta 4 saatujen yläfaasifraktioiden proteiini- ja klorofyllipitoisuudet sekä sytokromi c-oksidaasi ja glukaanisyntaasi II aktiivisuudet on esitettyinä taulukossa 7. Taulukosta voidaan havaita, että glukaanisyntaasi II toimi huonosti tässä määrityksessä. Ilman digitoniinia mitatut aktiivisuudet olivat huomattavasti suurempia kuin digitoniinin läsnä ollessa mitatut. Klorofyllipitoisuus, proteiinipitoisuus ja sytokromi c-aktiivisuus vähenevät yläfaaseissa tasaisesti kun faasikonsentraatio kasvaa 5.7 %:sta 6.1 %:een. Klorofyllipitoisuus ja sytokromi c-oksidaasi-aktiivisuus yläfaasissa on 6.3 % faasisysteemissä suurempi kuin 6.1 %:ssa.

Taulukko 7. Mikrosomaalisen fraktion (MF) sekä yläfaasifraktioiden (YF) proteiini- ja klorofyllipitoisuudet sekä merkkientsyymien aktiivisuudet 5.7 %, 5.9 %, 6.1 % ja 6.3 % faasisysteemeissä, jossa 3mM KCl-pitoisuus. Vastaavia arvoja alafaaseista ei mitattu. Faasitus suoritettiin vain kerran. Prosenttiluku kertoo aktiivisuuden suhteessa mikrosomaalisessa fraktiossa havaittuun aktiivisuuteen.

Fraktio	Proteiini (mg / 41,5 g soluja)	Klorofylli (μ g klorof -a / g FW)	Sytocromi- c oksideasi (pkat / g FW)	Glukaani syntaasi II (pkat/ g FW)
				+ digit. / - digit.
MF	6,9 (100 %)	49,6 (100 %)	1573,9(100%)	0,5 (100 %) / 28,2 (100%)
5.7 %				
YF	1,12 (16 %)	11,5 (23 %)	105,0 (7 %)	0,10 (20%) / 0,10 (0,4%)
5.9 %				
YF	0,88 (13 %)	9,8 (20 %)	57,2 (4 %)	0,04 (8 %) / 0,11 (0,4 %)
6.1 %				
YF	0,75 (11%)	9,1 (18 %)	12,7 (0,8 %)	0,02 (4 %) / 0,10 (0,4%)
6.3 %				
YF	0,67 (8 %)	9,4 (19%)	17,7 (1 %)	0,02 (4 %) / 0,06 (0,2%)

Kuvassa 4 on uuton 4 yläfaasifraktioiden proteiineista (faasisysteemit 5.9 % ja 6.3 %) ajettu SDS-PAGE. Geelillä näkyy selvästi joidenkin proteiinien vähentyvän (esim. 20 kDa; ohut nuoli) ja joidenkin rikastuvan faasikonsentraation suuretessa. Proteiini, joka sijaitsee 70 kDa kohdalla rikastuu selvästi 6.3 %: ssa faasikonsentraatiossa (paksu nuoli).



Kuva 4. Hopeavärjätty SDS-PAGE geeli mikrosomaalisen fraktion (MF)proteiineista sekä yläfaasiproteiineista kun faasisysteemin pitoisuudet 5,9 % ja 6,3 % 3 mM KCl:lla. ST = molekyylipainostandardi. Faasitus suoritettiin vain kerran.

Koska 6.1 % faasikonsentraatioissa suurin osa sytokromi c-oksidaasiaktiivisuuksista ja klorofyllistä on siirtynyt alafaasiin, valittiin polymerikonsentraatio 6.1% jatkoeristykseen (taulukko 7). Optimaalisen KCl-pitoisuuden löytymiseksi membraanit faasitettiin neljässä eri 6.1 % faasisysteemissä, joissa KCl-pitoisuudet olivat 0 mM, 1 mM, 3 mM ja 5 mM (uutto 5). Kuvassa 5 on faasisysteemit ensimmäisen faasituksen jälkeen. Kuvasta näkyy selvästi KCl-pitoisuuden vaikutus kloroplastitylakoidien erottumiseen. 0 mM:ssa KCl-konsentraatioissa klorofyllikalvoja on yläfaasissa vielä paljon ja faasi on vihreä, kun taas 5 mM:ssa pitoisuudessa yläfaasi on lähes väritön.



Kuva 5. KCl-pitoisuuden vaikutus membraanien erottumiseen 6.1 %:ssa faasisysteemissä (uutto 5). Ensimmäisessä putkessa vasemmalta KCl-pitoisuus on 0 mM ja seuraavissa putkissa järjestyksessä 1 mM, 3 mM ja 5 mM.

Uuton 5 faasinäytteistä mitattiin proteiini- ja klorofyllipitoisuudet sekä sytokromi c-oksidaasi- ja glukaanisyntaasi II -aktiivisuudet (taulukko 8). Digito-niinin aktivoiva vaikutus glukaanisyntaasi II -aktiivisuuteen näyttää olevan YF:ssa vahvempi, kun solunsisäisten kalvojen osuus vähenee, ts. kun plasmamembraanit puhdistuvat (YF1, YF3 ja YF5). Alafaaseissa digito-niinin aktiivoinnin suhteellinen osuus on selkeästi pienempi. Glukaanisyntaasi II -aktiivisuutta on alafaaseissa kuitenkin vielä runsaasti.

Taulukosta 8 nähdään että proteiinit ja glukaanisyntaasi II -aktiivisuudet ja-kaantuvat 0 mM KCl-pitoisuudessa tasaisesti ylä- ja alafaasin välillä. Kun

KCl pitoisuus nousee siirtyvät kalvot alafaaseihin. 3 mM KCl pitoisuudessa solun sisäisiä kalvoja on enää 4 - 5 %, mutta glukaanisyntaasi II -aktiivisuutta vielä 32 % (taulukko 8).

Taulukko 8. Fraktioiden proteiini- ja klorofyllipitoisuudet sekä markkerientsyymien aktiivisuudet 6.1 %:ssa faasisysteemeissä, jossa 0 mM, 1 mM, 3mM ja 5 mM KCl-pitoisuus. Faasitus suoritettiin vain kerran. Prosenttiluku kertoo aktiivisuuden suhteessa mikrosomaalisessa fraktiossa havaittuun aktiivisuuteen.

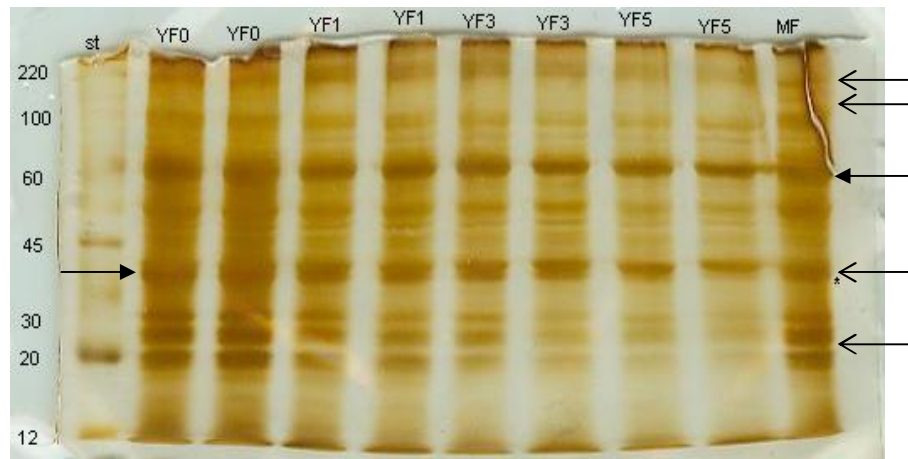
Fraktio	Proteiini (mg / 43,8 g FW)	Klorofylli (µg klorof a/g FW)	Sytocromi- c oksideasi (pkat/ g FW)	Glukaani syntaasi II (pkat/ g FW)
MF	15,6 (100%)	103,2 (100%)	1000,7(100%)	+ digit. / - digit. 12,6 (100%)/14,4(100%)
KCl 0 mM				
YF	1,8 (12 %)	13,0 (13%)	e.m.	6,1 (48 %) / 5,6 (39 %)
AF	2,1 (13 %)	71,8 (70 %)	264,3 (26 %)	5,5 (44 %) / 4,6 (32 %)
KCl 1 mM				
YF	1,4 (9 %)	9,7 (9 %)	71,9 (7 %)	5,4 (43 %) / 4,0 (28 %)
AF	2,1 (13 %)	86,6 (84 %)	521,9 (52 %)	7,2 (57 %) / 7,7(53 %)
KCl 3 mM				
YF	1,0 (6 %)	5,5 (5 %)	41,9 (4 %)	4,0 (32 %) / 2,7 (19 %)
AF	2,2 (14 %)	72,2 (41 %)	707,9 (71%)	7,5 (60 %) / 7,6 (53 %)
KCl 5 mM				
YF	0,6 (4 %)	3,5 (3 %)	1,3 (0,1 %)	3,1 (25 %) / 1,4 (10 %)
AF	2,1 (13 %)	54,3 (53 %)	733,1 (73 %)	6,1 (48 %) / 5,9 (41 %)

e.m. = ei mitattu

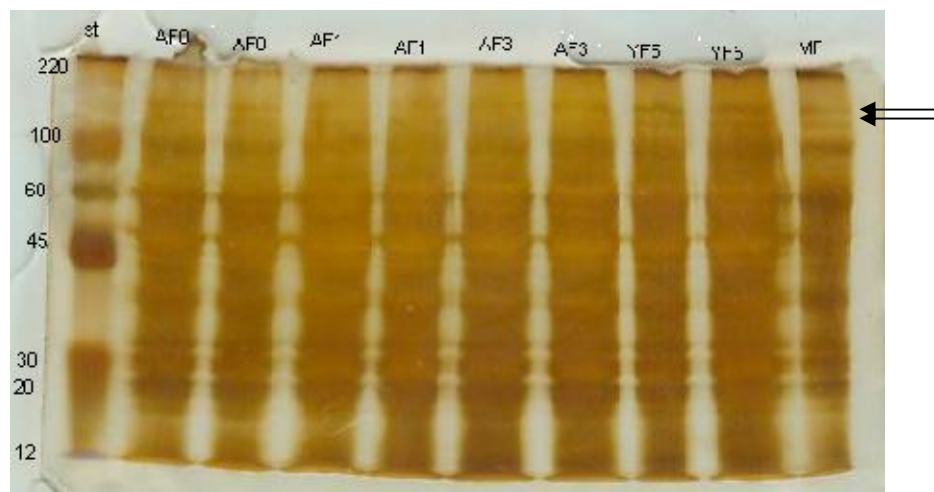
Kuvissa 6 ja 7 on uuton 5 näyteproteiineista ajetut SDS-PAGE -geelit. Yläfaasiproteiineista ajetussa geelissä näkyy vahvat juovat noin 70 kDa ja noin 35 kDa kohdalla (kuva 6; paksu nuoli). Heti noin 35 kDa proteiinin alapuolella oleva proteiini vähenee selvästi KCl-pitoisuuden kasvaessa, samoin kuin noin 20-30 kDa kokoiset kolme proteiinia (kuva 6; ohut nuoli)

Kuvissa 6 ja 7 näkyvä noin 100 kDa proteiini on mahdollisesti plasmamembraaniproteiini (K^+ , Mg^{2+}) ATPaasi.

Kuvasta 7 voidaan havaita 100 ja 220 kDa välissä olevien kahden proteiinin rikastuvan alafaasissa KCl-pitoisuuden kasvaessa. Kyseiset juovat puuttuvat yläfaaseista lähes kokonaan.



Kuva 6. Mikrosomaalisen fraktion (MF) ja yläfaasinäytteiden proteiineista ajettu hopeavärjätty SDS-PAGE -geeli, kun membraanit faasitettiin 6.1 % faasisysteemissä, jossa 0 mM (YF0), 1 mM (YF1), 3mM (YF3) ja 5 mM (YF5) KCl-pitoisuus. Faasitus suoritettiin vain kerran. ST = molekyylipainostandardi. Proteiinimäärä 5 μ g / kaivo.

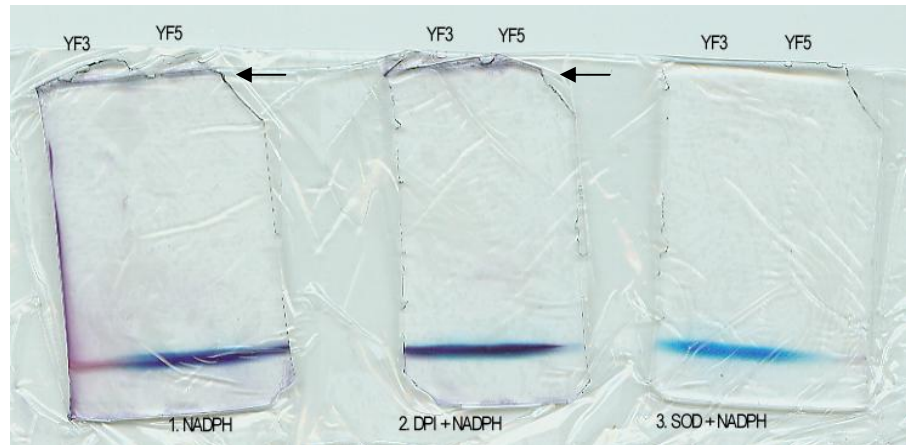


Kuva 7. Mikrosomaalisen fraktion (MF) ja alafaasinäytteiden proteiineista ajettu hopeavärjätty SDS-PAGE -geeli, kun membraanit faasitettiin 6.1 % faasisysteemissä, jossa 0 mM (AF0), 1 mM (AF1), 3mM (AF3) ja 5 mM (AF5) KCl-pitoisuus. Faasitus suoritettiin vain kerran. ST = molekyylipainostandardi. Näyteproteiinia 5 μ g / kaivo

4.2 NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäys

Kun plasmamembraanien eristysmenetelmä saatiin optimoitua, osa uuton 5 yläfaasinäytteistä (kuva 5; YF 3 mM KCl ja YF 5 mM KCl) ajettiin natiivipolyakryyliamidigeelielektroforeesissa ja geeli värjättiin NADPH-oksidaasivärjyksellä, NADPH-oksidaasi-välitteisen superoksidin muodos-

tumisen detektoimiseksi. Geelit olivat värjäyksessä viikonlopun yli, jolloin varsinaisen näytemaljan (vain NADPH:ia sisältänyt värjäysliuos) ja DPI:a sisältävän kontrollimaljan väriliuos oli saostunut. Näissä geeleissä näkyi myös selkeät värjuovat heti erotusgeelin yläreunassa (kuva 8). SOD:a sisältävä kontrollimaljalla väri-saostumaa ei ollut. Tässä geelissä ei myöskään näkynyt värjuovaa (kuva 8).



Kuva 8. Yläfaasinäytteet (faasitus 6.1 % faasisysteemeissä, jossa 3 mM (YF 3) ja 5 mM (YF 5) KCl) ajettiin natiivi-polyakryyliamidigelelelektrofooresigeelissä, jonka jälkeen geelit värjättiin NADPH –oksideasiaktiivisuusvärjäyksellä. Ensimmäisessä geelissä pelkkä 0.2 mM NADPH, toisessa 0.2 mM NADPH ja 10 µM DPI ja kolmannessa 0.2 mM NADPH ja 50 U / ml SOD. Värisaostumat (merkitty nuolilla) osoittavat maljoilla muodostuneen superoksidia.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Kuusen solukkoviljeltyjen solujen plasmamembraanien puhdistuksessa havaittiin homogenisointiolosuhteiden merkitys plasmamembraanien saannolle ja puhtaudelle. Kun solut homogenisoitiin ilman nestetyppeä puskurissa, joka ei sisältänyt proteiineja suojaavia BSA:a ja kysteiiniä, proteiinisaanto jäi erittäin huonoksi, eivätkä entsyymit säilyneet aktiivisina kalvoeristykseen aikana.

Myös PVP-K30:lla havaittiin olevan tärkeä rooli faasituksessa. Kun solut homogenisoitiin ilman PVP-K30:a, yläfaasit jäivät faasituksen jälkeen kirkkaiksi, mikä osoitti, ettei niissä ollut lainkaan kalvoja. Yläfaasit eivät myös-

kään sisältäneet lainkaan proteiineja. Myös 10% Polyclar AT:n käyttäminen PVP-K30 sijasta aiheutti proteiinisaannon jäämisen hyvin pieneksi (taulukko 6, uutto 1) .

Kirjallisuuden perusteella valittu 6.5 % PEG ja dekstran-pitoisuus faasisysteemissä osoittautui kuusen solukkoviljelyille soluille liian suureksi. Yläfaaseista ei ilmennyt tällöin lainkaan vanadaatti-sensitiivinen ATPaasiaktiivisuuksia (taulukko 6, uutto 3). Mikrosomaalisessa fraktiossa vanadaatti kuitenkin inhiboi selvästi ATPaasin toimintaa (tuloksia ei esitetty). Jonkin verran inhibointia näkyi myös alafaaseissa. Myös glukaanisyntaasimäärityksen perusteella alafaaseissa oli enemmän aktiivisuuksia kuin yläfaaseissa (taulukko 6). Nämä tulokset viittaavat siihen, että plasmamembraanit ovat muiden kalvojen lisäksi menneet tässä faasikonsentraatiossa alafaasiin. PEG:n ja dekstranin suhteen 5.5 %:n faasisysteemi sen sijaan osoittautui liian alhaiseksi faasien eroamiselle toisistaan.

Parhaimmaksi faasikonsentraatioksi kuusisoluille osoittautui 6.1%. Tässä konsentraatiossa klorofyllipitoisuus on pienin ja sytokromi c-oksidaasi aktiivisuus matalin yläfaasissa (taulukko 7). Proteiinia yläfaasissa kuitenkin on vielä 11 % (taulukko 7). Glukaanisyntaasi II toimi tässä määrittämisessä jostain syystä huonosti, joten tuloksia ei voitu ottaa huomioon (taulukko 7). Aikaisempien tutkimusten mukaan 1.3- β -glukaani syntaasi II ei ole hyvä plasmamembraanimarkkeri kun tutkimuskohteena on koniferyylialkoholia sisältävä materiaali kuten männyn ja kuusen neulaset /6/. Tässä työssä 1.3- β -glukaani syntaasi II kuitenkin osassa määrittämisä toimi (taulukot 6 ja 8), joten entsyymien voidaan olettaa olevan sopiva markkeri kuusen suspensioviljeltyjen solujen plasmamembraaneille. Digitoniinin aktivoinnin havaittiin näkyvän selvemmin mitä puhtaammaksi fraktio tuli solunsisäisistä kalvoista.

Oikean faasisysteemin polymeeripitoisuuden lisäksi oikealla KCl-pitoisuudella havaittiin olevan merkittävä vaikutus kuusisolujen membraanien jakautumiseen faasien välillä. Klorofyllipitoisuudet ja sytokromi c -oksidaasi aktiivisuudet siirtyivät selvästi alafaaseihin kun KCl-pitoisuus kasvoi (taulukko 8). Myös proteiinipitoisuus yläfaasissa väheni tasaisesti KCl-pitoisuuden kasvaessa. Sytokromi c-oksidaasimäärityksen, klorofyllipitoisuuden, proteiinisaannon sekä glukaanisyntaasi II -aktiivisuuksien perusteella valittiin 3 mM KCl-pitoisuus sopivimmaksi. 3 mM KCl-pitoisuudessa proteiinia on yläfaasissa vielä 6 %. Klorofylliä yläfaasissa on vain 5 % ja sytokromi

c-oksidaasiaktiivisuutta 4 % (taulukko 8). Tuloksista on otettava huomioon, että faasitus suoritettiin vain kerran. Koska alafaaseihin jäi vielä runsaasti glukaanisyntaasi II -aktiivisuuksia, täytyy yläfaasien lisäksi alafaaseille faasitus tehdä vielä uudelleen. Aikaisempien tutkimuksien mukaan faasitusta jatkettaessa intrasellulaariset kalvot siirtyvät suurimmaksi osaksi alafaasiin, mutta plasmamembraanit pysyvät jatkofaasistusten aikanakin vielä yläfaasissa. Sokerijuurikkaalla tehdyssä tutkimuksessa on havaittu solunsisäisten membraanien vähenevän yläfaasissa 90 % jokaisen uuden faasituksen aikana [7, s. 457]. Oletetaan että kuusen solut käyttäytyvät uutettaessa samalla tavalla, suoritettaessa ylä- ja alafaasien faasitus vielä kahdesti, tulokseksi saataisiin hyvin puhtaita plasmamembraaneita.

Taulukossa 8 näkyy proteiinipitoisuuksien pieneneminen yläfaasissa KCl-pitoisuuden kasvaessa, mutta alafaasissa pitoisuudet sitä vastoin pysyvät melko samoina KCl-määrästä huolimatta. Tämä saattaa johtua siitä, että alafaasinäytteestä hukattiin jonkin verran materiaalia käsittelyn aikana. Kun membraanit pelletoitettiin faasituksen jälkeen, yläfaasi napit olivat kiinteitä, mutta alafaasinapit hyvin löysiä ja nappien pinnalta irtosi sakkaa kun supernatantti poistettiin.

SDS-PAGE-geeleiltä voitiin selvästi havaita faasisysteemin polymeerikonsentraation ja KCl-pitoisuuden vaikutus proteiinien jakautumiseen ylä- ja alafaasien välillä. Kuvassa 4 näkyy proteiinien väheneminen yläfaasista, kun polymeerikonsentraatio suurenee 5.9 %:sta 6.3 %:seen. Geeliltä voitiin havaita myös joidenkin proteiinien rikastuminen. Noin 70 kDa proteiini rikastuu selvästi, kun polymeerikonsentraatiota suurennetaan. Samanlainen vaikutus näkyi KCl-pitoisuuden kasvaessa (kuva 6). Yläfaasinäytteissä erottuu selvästi n. 100 kDa:n proteiini (kuva 6). Plasmamembraanientsyymi (K^+ , Mg^{2+}) ATPaasi on kooltaan noin 100 kDa, joten tämä entsyymi on mahdollisesti kyseinen proteiini.

NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäys osoitti membraaninäytteiden sisältävän entsyymiä, joka tuottaa superoksidia. NADPH:n lisäyksen jälkeen maljalla, johon lisättiin vain NADPH:ia, oleva väriliuos saostui, joka johtui maljalle syntyneen superoksidin vaikutuksesta. Koska saostumaa syntyi myös DPI:a sisältävällä maljalla, on mahdollista, että DPI-pitoisuus oli liian pieni inhiboidakseen täysin entsyymien toiminnan, tai kyseessä on muu kuin flaviinia sisältävä entsyymi, joka näin ollen ei inhiboidu DPI:llä. Se, että SOD:a sisäl-

tävällä maljalla ei syntynyt saostumaa, osoittaa reaktion olevan superoksidista riippuvainen. Koska värjuovat ovat jääneet aivan erotusgeelin yläreunaan, geeli on ollut kyseiselle proteiinille liian tiukka, eikä proteiini ole mautunut kulkeutumaan erotusgeeliin. Geelin löysentäminen tai SDS:n lisääminen geeliin olisi saattanut vaikuttaa proteiinin liikkumiseen paremmin kohti anodia. SDS vuoraa proteiinin, jolloin proteiinin negatiivinen varaus kasvaa ja proteiini kulkee nopeammin kohti anodia. SDS:n vaikutus entsyymiaktiivisuuteen on kuitenkin ensin testattava, jos aktiivisuusvärjäys halutaan tehdä.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä opinnäytetyössä optimoitiin kuusen (*Picea abies*) solukkoviljeltyjen solujen plasmamembraanien puhdistusmenetelmä. Menetelmänä käytettiin membraanien erottamista toisistaan dekstran-polyetyleeniglykolikaksifaasisysteemissä. Optimointiin kuului näytteen homogenisointi- ja uuttolosuhteiden määrittäminen. Eristettyjen plasmamembraanien puhtaus tarkistettiin erilaisilla merkkientsyymimäärytyksillä.

Kuusen solujen havaittiin olevan vaativa materiaali homogenisointiolosuhteita määritettäessä. Parhaimmaksi menetelmäksi todettiin homogenisointi huumareessa nestetyypeä käyttäen. BSA:n ja kysteiinin proteiineja suojaava vaikutus oli kalvoja puhdistettaessa oleellinen, sillä proteiinisaanto parani ja merkkientsyymien aktiivisuudet kasvoivat. Myös PVP-K30:lla oli tärkeä merkitys faasituksen onnistumiseen.

Plasmamembraanien puhdistamisessa parhaimmaksi osoittautui pitoisuudeltaan 6.1 % dekstran-polyetyleeniglykoli -faasisysteemi, jossa oli 3 mM KCl. Kun faasitus suoritettiin vain kerran yläfaasissa oli jäljellä mikrosomaaliseen fraktioon verrattuna 6 % proteiinia, 5 % klorofylliä, 4 % sytokromi c-aktiivisuutta ja 32 % glukaanisyntaasi II -aktiivisuutta. Jos noin 90 % solunsisäisistä membraaneista siirtyy jokaisen uuton aikana alafaasiin /7, s. 457/, tässä opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella paras puhdistustulos kuusen solukkoviljelylle soluille saataisiin kolmen faasituksen jälkeen.

NADPH-oksidaasiaktiivisuusvärjäys osoitti plasmamembraanien sisältävän entsyymiä, joka tuottaa superoksidia. Jotta entsyymi voidaan identifioida, on jatkotutkimukset tarpeen.

Tässä työssä saaduilla tuloksilla on merkittävä rooli Helsingin yliopiston ligniiniprojektin tutkimuksessa, jonka eräänä kohteena on peroksidaasivälitteisen ligniinin biosynteesiin tarvittava H_2O_2 :n syntymekanismit. Kuusen solukovijeltyjen solujen puhdistusmenetelmä, joka tässä työssä optimoitiin, palvelee ligniiniprojektin tarpeita ja tuloksia voidaan jatkossa käyttää hyväksi puhdistettaessa plasmamembraaneja kuusen soluista niin lignifikaatioon kuin muihinkin solun tapahtumiin kohdistuvia tutkimuksia varten.

VIITELUETTELO

- [1] Kjellbom, Per – Larsson, Christer, Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley. *Physiological Plantarium* (1984), 62: 501–509.
- [2] Gerbeau, Patricia *etc.*, The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *The Plant Journal* (2002), 30: 71-81.
- [3] Yamaguchi, Mineo *etc.*, Evidence for the Plasma Membrane Localization of Al-activated Malate Transporter (ALMT1). *Plant and Cell Physiology* (2005), 46: 812-816.
- [4] Rosengren-Brinck, Ulrika ym. Enzyme activities in isolated root plasma membranes from a stand of Norway spruce in relation to nutrient status and ammonium sulfatet application. *New Physiologist* (1995), 129: 537 - 546.
- [5] Iivonen, Sari – Vapaavuori, Elina, Seasonal variation in nitrogen net uptake and root plasma membrane H⁺-ATPase activity of Scots pine seedlings as affected by nutrient availability. *Physiology* (2002), 22: 1-10.
- [6] Toll, Elena *etc.*, Purification of plasma membranes from leaves of conifer and deciduous tree species by phase partitioning and free-flow electrophoresis. *Physiological Plantarium* (1995), 95: 399 - 408.
- [7] Larsson, Christer – Sommarin, Marianna - Widell, Susanne, Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods in enzymology*, vol 228. London: Academic Press, Inc. 1994, s. 451 - 469
- [8] Simola, Liisa K – Lemmetyinen, Juha - Santanen, Arja, Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. *Physiologia Plantarium* (1992), 84: 374 - 379.
- [9] Mauseth, J., D., *Plant Anatomy*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1988.
- [10] Taylor, W.R. – Jones, D.T. – Segal, A.W. A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome *b2245 b-chain*. *Protein Science*. (1993), 2: 1675-1685
- [11] Levine, A. – Tenhaken, R. – Dixon, R. – Lamb, C., H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* (1994), 79: 583 - 593.
- [12] Lewis, N.G. – Davin, L.B. – Sarkanen, S, The nature and function of lignins. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol 3. D.H.R Barton, K Nakanishi, O Meth-Cohn, Elsevier, London, 1999. s.618 - 745
- [13] Goldberg, R. – Le, T. Catesson – A.M., Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin synthesis. *Journal of Experimental Botany* (1985), 36: 503 - 510

- [14] Ros Barcelo, A., The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* (1998), 207: 207-216
- [15] Widell, S.– Larsson, C., Separation of presumptive plasma membranes from mitochondria by partition in an aqueous polymer two-phase system. *Physiological Plantarum* (1981), 51: 368 - 374.
- [16] Walter, H., Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, methods, Uses, and Applications to Biotechnology. Walter, H. – Brooks, D. E. – Fischer, D.: Academic Press, Orlando, Florida. 1985.
- [17] Larsson, Christer, *etc.* Sidednes of plasma membrane vesicles purified by partition in aqueous two-phase systems. *FEBS Letters* (1984), 171: 271-276.
- [18] Brooks, Donald, E. – Norris-Jones, Raymond, Preparation and analysis of two-phase systems. *Methods in enzymology*. Vol 228. California: Academic press, 1994. s.14 - 27.
- [19] Larsson, C., *Modern methods of plant analysis new series: Cell components*, Vol 1. Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: H.F.Linskens, J.F Jackson, 1984.
- [20] Albertsson, P. A., *Partition of cell particles and macromolecules*, 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, 1971.
- [21] Walter, Harry – Larsson, Christer, Partitioning Procedures and techniques: Cells, Organelles, and Membranes. *Methods in enzymology*, vol 228. London: Academic Press, Inc. 1994.
- [22] Larsson C., *Isolation of membranes and organelles from plant cells*. J.L.Hall and A.L. Moore. Academic Press, London 1983.
- [23] Fagestedt, K. ym. Kasvifysiologian harjoitustyöt (52071) -moniste. Helsingin yliopisto, Bio- ja ympäristötieteen laitos, Kasvibiologia. Helsinki 2005.
- [24] Baginski, E. S. – Foà, P. P. – Zak, B., Microdetermination of Inorganic Phosphate, Phospholipids, and Total Phosphate in Biological Materials, *Clinical Chemistry* (1967), 13: 326 - 332.
- [25] Gallagher, Sean, R. – Leonard, Robert, T., Effect of Vanadate, Molybdate, and Azide on Membrane-Associated ATPase and Soluble Phosphatase Activities of Corn Roots, *Plant Physiology* (1982), 70: 1335 -1340.
- [26] Kaus – Jeblick, Activation by polyamines, polycations, and ruthenium red of the Ca²⁺-dependent glucan synthase from soybean cells. *FEBS Letters* (1986), 185 (2): 226-230.
- [27] Kärkönen, Anna *etc.* Lignification related enzymes in *Picea abies* suspensioncultures. *Physiologia Plantarum* (2002), 114 (3): 343
- [28] Simola, L.K. – Santanen, A., Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies*. *Physiologica Plantarum* (1990), 80: 27-35

- [29] Bradford, Mariom.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* (1976), 72 (1-2): 248-254.
- [30] Bearden, J.C., Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim et Biophys Acta* (1978), 533: 525 - 529
- [31] Moller, Ian, M. – Palmer, John, M., Direct evidence for the presence of a rotenone-resistant NADH dehydrogenase on the inner surface of the inner membrane of plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* (1982), 54: 267 - 273
- [32] Gordon, J. A., Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* (1991), 201: 477- 482.
- [33] Palmgren, Michael etc., Sealed Inside-Out and Right-Side-Out Plasma Membrane Vesicles : Optimal Conditions for Formation and Separation. *Plant Physiology* (1990), 92 (4) : 871 - 880.
- [34] Sagi, Moshe – Fluhr, Robert, Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91^{phox} NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology* (2001), 126: 1281-1290.

