

## 2. Wyodrębnianie i identyfikacja fosfolipidów z mózgu

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Tkanka biologiczna – mózg
2. Płytki chromatograficzne (20×20 cm) pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego z indykatorem UV (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck)
3. Szkło laboratoryjne: komora chromatograficzna, spryskiwacz, moździerz, probówki, kapilary, pipety, zestaw do sączenia (lejek zwykły + bibuła filtracyjna), cylindry miarowe
4. Suszarka do włosów
5. Spryskiwacz do płytek chromatograficznych
6. Lampa UV ( $\lambda=254$  nm)
7. Wirówka
8. Roztwór CHCl<sub>3</sub> : MeOH (2 : 1; v/v)
9. Roztwór 0,5 M KCl w 50% MeOH
10. Układ rozwijający: CHCl<sub>3</sub> : EtOH : trietyloamina : H<sub>2</sub>O (4 : 5 : 4 : 1; v/v/v/v)
11. Układ wywołujący: 0,01% roztwór rodaminu 6G w 95% etanolu
12. Standardy lipidów: fosfatydyloseryny, fosfatydylocholiny, lizofosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy, *N*-metylofosfatydyloetanolaminy, *N,N*-dimetylofosfatydyloetanolaminy, lizofosfatydyloetanolaminy (1 mg/ mL w CHCl<sub>3</sub> : MeOH (2 : 1; v/v)).

Wykonanie doświadczenia:

200 mg mózgu rozdrobnić w moździercu. Dodać 10 mL roztworu CHCl<sub>3</sub> : MeOH (2 : 1; v/v) i poddać homogenizacji. Całość przenieść do probówki plastikowej, sonikować na łaźni ultradźwiękowej i dokładnie wytrząsnąć na "Vortexie". Zawiesinę odwirować przez 5 min przy 1500 RPM. Zebrać pipetą Pasteura supernatant. Do pozostałego osadu dodać ponownie 10 mL roztworu CHCl<sub>3</sub> : MeOH (2 : 1; v/v), wytrząsnąć na "Vortexie", odwirować jak poprzednio i zebrać supernatant. Do połączonych warstw organicznych (supernatant 1 i 2) dodać 5 mL 0,5 M KCl w 50% MeOH, wytrząsnąć na "Vortexie" i odwirować jak poprzednio. Za pomocą pipety Pasteura usunąć ostrożnie górną warstwę, a do warstwy dolnej dodać ponownie 5 mL 0,5 M KCl w 50% MeOH, następnie wytrząsnąć na "Vortexie" i odwirować. Ponownie usunąć górną warstwę, a do pozostałej warstwy organicznej dodać bezwodnego MgSO<sub>4</sub>. Po 10 min roztwór przesączyć do suchego i zważonego naczynka wagowego. Rozpuszczalnik organiczny usunąć za pomocą strumienia azotu lub chłodnym strumieniem suszarki do włosów. Pozostałą mieszaninę lipidów zważyć i ponownie rozpuścić w 0,5 mL roztworu CHCl<sub>3</sub> : MeOH (2 : 1; v/v).

Na płytce chromatograficznej\* (20×20 cm) w odległości 2 cm od brzegu narysować delikatnie miękkim ołówkiem linię, na której co 1,5 cm zaznaczyć punkty. W oznaczonych punktach nanieść kapilarą poszczególne roztwory standardów lipidów oraz ekstrakt lipidów. Odparować rozpuszczalnik chłodnym strumieniem powietrza z suszarki do włosów. Włożyć płytkę do komory chromatograficznej nasyconej parami układu rozwijającego i pozostawić do momentu, gdy czoło układu rozwijającego osiągnie poziom około 2 cm od górnego brzegu płytki. Po wyjęciu płytki z komory chromatograficznej położyć ją na czystej bibule na blacie pod włączonym wyciągiem, narysować miękkim ołówkiem linię czoła rozpuszczalnika, po czym wysuszyć za pomocą suszarki do włosów i spryskać (**pod włączonym wyciągiem!**) układem wywołującym. Odparować etanol (chłodny strumień suszarki do włosów), umieścić płytkę w świetle lampy UV ( $\lambda_{254}$ ) i delikatnie miękkim ołówkiem obrysować pojawiające się plamy. Wyznaczyć wartości  $R_f$  dla standardów lipidów i badanej próbki. Na podstawie obliczonych wartości  $R_f$  zidentyfikować lipidy obecne w badanej tkance.

\*podczas wszystkich operacji należy unikać dotykania złoza płytki palcami.

Zakres materiału:

Zasada rozdzielania w chromatografii TLC, budowa i funkcje lipidów oraz błon komórkowych