

Poniższe procedury stanowią podstawę izolacji diadino- i diatoksantyny, które w znacznym stopniu zostały opisane w pracy magisterskiej Iwony Sadury „Izolacja i oczyszczanie barwników cyklu diadinoksanynowego i ich wpływ na dynamikę molekularną błon modelowych”, Kraków, czerwiec 2014 - promotor dr hab. Dariusz Latowski. Praca magisterska i opisane poniżej procedury zostały opracowane w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ul Gronostajowa 7, 30-387 Kraków.

Autorzy:

Iwona Sadura, Dariusz Latowski, Monika Bojko, Monika Olchawa-Pajor

IZOLACJA I OCZYSZCZANIE DIADINO- i DIATOKSANTYNY

W czasie izolacji i oczyszczania barwnika, jeśli nie wskazano inaczej, próbkę chronić przed światłem i przechowywać w niskiej temperaturze (0-4°C)

1. Izolację diadinoksaniny (Ddx) i diatoksantyny (Dtx) prowadzi się z okrzemk (*Bacillariophyceae*) morskich, gatunku *Phaeodactylum tricornutum* szczep CCAP/1055/1-zsekwencjonowany

2. Szczep CCAP/1055/1 *P. tricornutum* hodowaliśmy w pożywce Guillard'a, o składzie: mikroelementy: (Na₂EDTA (4,16g); FeCl₃·6H₂O (3,15g); CuSO₄·5H₂O (0,01g); ZnSO₄·7H₂O (0,022g); CoCl₂·6H₂O (0,01g); MnCl₂·4H₂O (0,18g); Na₂Mo₄·H₂O (0,006g)): mieszaninę witamin: (witamina B₁₂ (0,0005g); witamina B₁ (0,1g); biotyna (0,0005g)), a także NaNO₃(0,075g) (wartości w nawiasach odnoszą się do roztworów 1000-krotnie stężonych) i NaH₂PO₄·2H₂O (0,00565g) (stosowano roztwór 1000 – krotnie stężony) oraz sól morską (16g) (Tropic Marin). Dodatkowo w przypadku hodowli prowadzonej w pożywce zawierającej krzem, w jej skład, jako źródło krzemu wchodził również metakrzemian sodu (Na₂SiO₃·9H₂O) (30g) (roztwór 1000 – krotnie stężony). W nawiasie podano masy poszczególnych składników jakie należy odważyć na litr danych roztworów podstawowych. Mieszaninę witamin filtrowano i dodawano do pozostałych składników po ich autoklawowaniu.

Przed izolacją okrzemki hodować z fotoperiodem (10:14h D:L) w świetle o intensywności od 40 do 190 μEm⁻²s⁻¹, w temperaturze między 12 a 15°C, od czterech do siedmiu dni w pożywce Guillard'a, bez dodatku krzemu.

3. Po zakończeniu hodowli, na minimum godzinę (a najlepiej około 12 godzin, np. przez noc) przed zbiorem okrzemek hodowlę inkubować w ciemności.

4.

a. W celu izolacji Ddx, zbioru komórek dokonać, bezpośrednio po okresie zaciemnienia, przez wirowanie hodowli przez 7 - 15 minut, 5000 – 6500 x g, w 4°C. Otrzymany osad najlepiej zagęścić np. przez zebranie pipetą do falkonu o poj. 15ml i ponownie wirować (minimum 2 minuty, 5000 - 6500x g, w 4°C). Osad, który zawiera komórki *P. tricornutum* – źródło Ddx, można przechowywać w stanie zamrożenia najlepiej w temperaturze nie wyższej niż -20°C (zamrażać najlepiej w ciekłym azocie). Czasy i intensywności wirowań są uzależnione od gęstości optycznej (OD₆₀₀) hodowli (gęstość optyczna jest miarą ilości komórek – większa ilość komórek wymaga dłuższych czasów wirowania). Wirowanie należy prowadzić tak, aby po otrzymaniu osadu nadsącz był klarowny.

b. W celu izolacji Dtx po okresie zaciemnienia hodowlę w płaskim naczyniu naświetlać, od góry, minimum 60 minut lampą o natężeniu światła białego około 1200 – 1300 μmol·m⁻²·s⁻¹

5. Dokonać homogenizacji komórek:

Osad zebranych komórek zawiesić w buforze o pH 8 (np. bufor fosforanowy: 50mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl) w objętości odpowiadającej objętości osadu i homogenizować przez:

A. sonikację (najlepiej przez czas: 4 minuty, pulse on: 30; pulse off: 10, amplituda: 35%)

B. stosowanie disruptora (constant systems cell disrupter) zgodnie z przepisem do homogenizacji okrzemek dołączonym do sprzętu (rozbijanie komórek stosując ciśnienie 12000 psi, wirowanie 1000 x g, ponowne rozbicie komórek, które zostały w osadzie, 6000 lub 12 000 psi w zależności od ilości osadu, ponowne wirowanie 1000 x g).

6. Ekstrakcja barwników z homogenatu

Dokonać ekstrakcji barwników z homogenatu np. w sposób następujący:

wytrząsać (vortex) przez około 20 sekund i zwirować (minimum 3 minuty, 13800 rpm, w 4°C). Po zwirowaniu, przenieść nadsącz do osobnych probówek Eppendorf. Następnie zarówno do probówek Eppendorf'a zawierających nadsącz jak i osad dodać mieszaninę ekstrakcyjną (np. chloroform : metanol : amoniak – 1 : 2 : 0,004 (v:v:v) – stosowano też mieszaninę: 90% metanol/octan amonu (90% metanolu/10% 0,2 M octan amonu); 10% octan etylu, najlepiej w objętości odpowiadającej objętości zsonikowanej próbki i ponownie wytrząsać (vortex) przez około 20 sekund a następnie wirować (3 minuty, 13 800 rpm, 4°C). Zebrać ekstrakt barwników.

Całość mieszaniny ekstrakcyjnej odparować gazem obojętnym np. azotem, a po osuszeniu wprowadzić eluent do chromatografii (cienkowarstwowej lub kolumnowej) tj. metanol:woda:amoniak – 90 : 10 : 0,12 (v:v:v) (najlepiej 200µl na 1ml początkowej objętości próbki, tj. objętości przed sonikacją).

7. Oczyszczanie barwników prowadzić przez rozdział mieszaniny metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej lub preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej na złożu z odwróconą fazą Silica gel 60 RP-8 F₂₅₄S (Merck KGaA Darmstadt, Niemcy); wykorzystując wcześniej podany eluent, tj. metanol:woda:amoniak – 90 :10 : 0,12 (v:v:v). Prążki Ddx i Dtx wymywać ze złoża 100% acetonem.

Rozdziału można dokonać metodą HPLC z wykorzystaniem kolumny np. ET 250/4 Nucleosil 300-5 C18 RF Säule (Macherey-Nagel, Düren, Germany) i następującego programu gradientowego przy przepływie 0,8 ml/min:

Czas [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	60	40	0
2	0	100	0
7	0	80	20
17	0	50	50
21	0	30	70
28,5	0	30	70
29,5	0	100	0
30,5	60	40	0

Eluent A: 85 % metanol/15 % 0,5 M octan amonu (w wodzie dest.)

Eluent B: 90 % acetonitryl/10 % woda dest.

Eluent C: 100 % octan etylu,

powyższa metoda została opracowana m. in. przez Kraay'a i wsp. (1992), podobnie jak liczne inne metody wykorzystujące HPLC a opisane w literaturze np. Heukelem i wsp. (1994)

Kraay, G. W., Zapata, M., Veldhuis, M. J. W. (1992). Separation of chlorophylls c1, c2, and c3 of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.* 28: 708-712;

Heukelem L., Lewitus A. J., Kana T.M., Craft N.E., Improved separations of phytoplankton pigments using temperature-controlled high performance liquid chromatography *Mar. Ecol. Prog. Vol.* 114: 303-313, 1994

Barwnik przechowywać najlepiej w temperaturze – 20°C w acetonie lub sproszkowany po usunięciu rozpuszczalnika w atmosferze gazu obojętnego lub w próżni.