

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.04>

ROZDZIAŁ IV. **PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Błony plazmatyczne zbudowane są z lipidów i białek. Zrąb błony stanowi podwójna warstwa fosfolipidów, których cząsteczki mają charakter amfifilowy. Fosfolipidy składają się z części hydrofilowej – nazywanej „głową” – utworzonej przez grupy aminowe, hydroksylowe i karboksylowe, oraz z części hydrofobowej – nazywanej „ogonem” – którą tworzą węglowodorowe łańcuchy kwasów tłuszczowych. Związki te są ułożone w błonie w ten sposób, że ich hydrofobowe części skierowane są do siebie, czyli do środka błony, natomiast części hydrofilowe są zwrócone na zewnątrz, do środowiska wodnego. W podwójną warstwę lipidową wbudowane są białka, wśród których wyróżniamy białka powierzchniowe i integralne. Pierwsze z nich wystają po jednej stronie błony, są luźno z nią związane i można je wyodrębnić z błony za pomocą wody, roztworów soli i czynników chelatujących. Natomiast białka integralne przechodzą przez całą szerokość warstwy lipidowej i wystają ponad obie jej powierzchnie. Są one silnie związane z błoną poprzez oddziaływania hydrofobowe i można je usunąć z błony tylko po zniszczeniu jej struktury, np. za pomocą detergentów.

Błona plazmatyczna jest strukturą dynamiczną, ponieważ zarówno cząsteczki fosfolipidów, jak i białek mogą zmieniać położenie w jej obrębie. Cząsteczki białek mogą obracać się wokół własnej osi, a także zanurzać się i wynurzać z warstwy fosfolipidów. Cząsteczki fosfolipidów wykonują ruchy rotacyjne, lateralne (zmiana położenia w płaszczyźnie warstwy) oraz tzw. ruchy flip-flop, polegające na przemieszczaniu się cząsteczek z jednej warstwy do drugiej.

Błony plazmatyczne oddzielają wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego (plazmolema), a także dzielą wnętrze komórki na mniejsze obszary o różnych funkcjach metabolicznych (błony organelli wewnątrzkomórkowych). Błony plazmatyczne

biorą również udział w transporcie substancji między środowiskiem zewnętrznym a cytoplazmą komórki oraz w oddziaływaniu międzykomórkowym.

Ważną właściwością błon plazmatycznych jest selektywność, dzięki której jedne substancje mogą przenikać przez błonę, a inne nie. Sелеktywną przepuszczalność wykazują tylko błony komórek żywych, mające nieuszkodzoną strukturę. Przepuszczalność błon ulega zmianom pod wpływem różnych czynników fizycznych i chemicznych. Podwyższenie temperatury zwiększa ruchliwość składników błony oraz jej płynność, co w rezultacie powoduje wzrost przepuszczalności. W zakresie temperatur 0–50°C podniesienie temperatury o 10°C zwiększa przepuszczalność błony 2–3-krotnie. Alkohol, kwasy, zasady i rozpuszczalniki organiczne zwiększają przepuszczalność, wpływając negatywnie na budujące błonę cząsteczki białek i lipidów. Kationy dwuwartościowe, np. Ca^{2+} , mogą oddziaływać z ujemnie naładowanymi „głowami” fosfolipidów, niwelując ich wzajemne odpychanie, co prowadzi do ściślejszego upakowania składników błony. Tego typu kationy wywołują też odwodnienie błony, przez co zmniejszają jej przepuszczalność. Natomiast kationy jednowartościowe, np. K^+ , podwyższają uwodnienie błony i powodują wzrost jej przepuszczalności.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu czynników fizycznych i chemicznych na przepuszczalność błon plazmatycznych komórek roślinnych.

Doświadczenie I

Wpływ temperatury na przepuszczalność błon plazmatycznych

I.A. WPŁYW TEMPERATURY NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH KOMÓREK BULWY ZIEMNIAKA

Zasada metody

Wraz ze wzrostem przepuszczalności błony zwiększa się wpływ elektrolitów z komórki. Wpływ temperatury na przepuszczalność

błon można zatem ocenić, mierząc przewodnictwo roztworów, w których umieszcza się tkankę roślinną. Miara przewodnictwa elektrolitu jest przewodnictwo właściwe (κ), które definiujemy jako przewodnictwo 1 cm³ roztworu. Wartość przewodnictwa właściwego roztworu jest zależna od stężenia i ruchliwości obecnych w nim jonów. Jednostką przewodnictwa właściwego jest S m⁻¹ (S-Siemens).

Materiał

bulwa ziemniaka

Sprzęt laboratoryjny

korkobory o średnicy około 1 cm, zlewki 800 cm³, 5 probówek o średnicy około 1,8 cm, cylinder miarowy 25 cm³, 3 łaźnie wodne z termostatem, konduktometr, linijka

Wykonanie doświadczenia

Dużą bulwę ziemniaka umyć pod bieżącą wodą. Za pomocą korkoboru wyciąć z niej 4 fragmenty w kształcie walca. Wyrównać długość wszystkich fragmentów do około 2 cm. Następnie umieścić je w zlewce i dokładnie wypłukać pod bieżącą wodą w celu usunięcia soku komórkowego wypływającego z uszkodzonych komórek. Wypłukane fragmenty bulwy ziemniaka osuszyć na bibule.

Cztery fragmenty wycięte z bulwy ziemniaka umieścić w oddzielnych, ponumerowanych probówkach i do każdej z nich wlać po 15 cm³ wody destylowanej. Wymieszać zawartość probówek i używając konduktometru, zmierzyć przewodnictwo właściwe znajdującego się w nich płynu (κ_1). Dodatkowo zmierzyć przewodnictwo właściwe samej wody destylowanej ($\kappa_{\text{H}_2\text{O}}$). Dla każdej probówki zapisać wartość przewodnictwa oraz temperatury, w której dokonano pomiaru. Następnie umieszczone w probówkach fragmenty bulwy ziemniaka przez 15 minut poddać działaniu temperatury: 20°C (pozostawić na stole roboczym), 50°C, 75°C i 100°C (umieścić w łaźniach wodnych). Po tym czasie doprowadzić zawartość probówek do temperatury pokojowej i ponownie zmierzyć przewodnictwo płynu w każdej probówce (κ_2). Temperatura ma znaczący wpływ na wartość przewodnictwa, więc należy zwracać uwagę na to, aby temperatura znajdującego się w probówkach płynu była taka sama podczas pierwszego i drugiego pomiaru.

Opracowanie wyników

Od wyznaczonych wartości przewodnictwa właściwego roztworów znajdujących się w poszczególnych probówkach odjąć przewodnictwo właściwe wody. Dla każdej próbki obliczyć różnicę przewodnictwa roztworu mierzonego po i przed inkubacją w badanych temperaturach, korzystając ze wzoru:

$$\Delta\kappa = (\kappa_2 - \kappa_{\text{H}_2\text{O}}) - (\kappa_1 - \kappa_{\text{H}_2\text{O}})$$

Narysować wykres zależności otrzymanych wartości przewodnictwa właściwego od temperatury, na osi odciętych (x) zaznaczając wartości temperatury [°C], a na osi rzędnych (y) wartości przyrostu przewodnictwa $\Delta\kappa$ [$\mu\text{S cm}^{-1}$].

I.B. WPŁYW TEMPERATURY NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH KOMÓREK KORZENIA BURAKA CÍWIKŁOWEGO

Zasada metody

Wraz ze wzrostem przepuszczalności błony zwiększa się wypływ składników soku komórkowego wypełniającego wakuolę komórek roślinnych. W soku komórkowym komórek korzenia buraka ćwikłowego znajdują się czerwone barwniki betacyjaniny. Wpływ temperatury na przepuszczalność błon można ocenić na podstawie intensywności zabarwienia roztworów, w których umieszcza się tkankę korzenia buraka. Intensywność zabarwienia roztworu zawierającego betacyjaniny pochodzące z korzenia buraka określa się poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 525 nm.

Sprzęt laboratoryjny

korkobor o średnicy około 1 cm, zlewka 800 cm³, 5 probówek szklanych, cylinder miarowy 25 cm³, 3 łaźnie wodne z termostatem, zamrażarka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, linijka

Wykonanie doświadczenia

Duży korzeń buraka ćwikłowego umyć pod bieżącą wodą. Za pomocą korkoboru wyciąć z niego 5 fragmentów w kształcie walca. Wyrównać długość wszystkich fragmentów do około 3 cm. Następnie umieścić je w zlewce i płukać pod bieżącą wodą przez

kilka minut, aż do momentu usunięcia barwnika wypływającego z uszkodzonych komórek. Wypłukane fragmenty z korzenia buraka osuszyć na bibule.

Pięć fragmentów wyciętych z korzenia buraka umieścić w oddzielnych suchych probówkach i przez 15 minut poddać działaniu temperatury: -20°C (umieścić w zamrażarce), 20°C (pozostawić na stole roboczym), 50°C , 75°C i 100°C (umieścić w łaźniach wodnych). Po zakończeniu inkubacji fragmentów korzeni buraka we wskazanych wartościach temperatury próbówki umieścić w statywie i do każdej wlać po 15 cm^3 wody destylowanej. Po upływie 1 godziny dokładnie wymieszać zawartość probówek i w kuwetach spektrofotometrycznych, przy długości fali 525 nm , zmierzyć w spektrofotometrze absorbancję uzyskanych roztworów wobec wody destylowanej.

Opracowanie wyników

Zanotować wyniki i narysować wykres zależności wartości absorbancji od temperatury, na osi odciętych (x) zaznaczając wartości temperatury [$^{\circ}\text{C}$], a na osi rzędnych (y) wartości absorbancji A_{525} .

Doświadczenie II

Wpływ rozpuszczalników organicznych, stężonych kwasów i zasad na przepuszczalność błon

II.A. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH, STĘŻONYCH KWASÓW I ZASAD NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON KOMÓREK KORZENIA BURAKA ĆWIKŁOWEGO

Zasada metody

Związki chemiczne, oddziałując na cząsteczki wchodzące w skład błony komórkowej, mogą powodować naruszenie struktury błony i w konsekwencji utratę jej selektywnej przepuszczalności, co skutkuje wypływem składników soku komórkowego wypełniającego wakuolę. Po umieszczeniu fragmentów tkanki korzenia buraka ćwikłowego w roztworach związków chemicznych nastąpi wyciek zawartych w soku komórkowym betacyjanin, co spowoduje zabarwienie tych roztworów. Intensywność ich zabarwienia jest zależna od stopnia uszkodzenia błony przez badane związki chemiczne.

Materiał

korzeń buraka ćwikłowego

Odczynniki

50% C_2H_5OH , chloroform ($CHCl_3$), aceton (CH_3COCH_3), 1M HCl, 30% CH_3COOH , 1M NaOH

Sprzęt laboratoryjny

korkobor o średnicy około 1 cm, 7 probówek szklanych, pipety ($0,5-5\text{ cm}^3$)

Wykonanie doświadczenia

Siedem wypłukanych i osuszonych fragmentów wyciętych korkoborem z korzenia buraka (przygotowanych jak w pkt. I.B) umieścić w oddzielnych probówkach. Do probówek dolać odpowiednio:

- a) $5\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}$ destylowanej (kontrola),
- b) $5\text{ cm}^3\text{ 50\% C}_2\text{H}_5\text{OH}$,
- c) $4,5\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}$ destylowanej + $0,5\text{ cm}^3\text{ CHCl}_3$,
- d) $2,5\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}$ destylowanej + $2,5\text{ cm}^3\text{ CH}_3\text{COCH}_3$,
- e) $5\text{ cm}^3\text{ 1 M HCl}$,
- f) $5\text{ cm}^3\text{ 30\% CH}_3\text{COOH}$,
- g) $5\text{ cm}^3\text{ 1 M NaOH}$.

Wstawione do statywu probówki pozostawić na 30 minut. Następnie po dokładnym wymieszaniu zawartości probówek dokonać wizualnej oceny barwy oraz intensywności zabarwienia znajdujących się w nich płynów.

Opracowanie wyników

Intensywność zabarwienia płynu, w którym inkubowała się tkanka korzenia buraka, wyrazić w skali 1–5.

II.B. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH, STĘŻONYCH KWASÓW I ALKOHOLI NA SKŁADNIKI BŁONY KOMÓRKOWEJ (BIAŁKA I LIPIDY)**Zasada metody**

Związki chemiczne mogą powodować uszkodzenie błony komórkowej poprzez oddziaływanie z wchodzącymi w skład jej struktury białkami i lipidami. Efekt działania związków chemicznych na

białka i lipidy można zademonstrować na przykładzie odpowiednio roztworu albuminy jaja kurzego i oleju roślinnego.

Materiał

1% roztwór albuminy jaja kurzego, olej roślinny

Odczynniki

96% C_2H_5OH , 20% HCl , CH_3COCH_3

Sprzęt laboratoryjny

3 probówki szklane, pipety ($0,1-2\text{ cm}^3$)

Wykonanie doświadczenia

Do 2 probówek wlać po około 2 cm^3 roztworu albuminy jaja kurzego. Następnie dodać:

a) 1 cm^3 96% C_2H_5OH ,

b) 1 cm^3 20% HCl .

Do trzeciej probówki wlać około 2 cm^3 oleju roślinnego, a następnie dodać 2 cm^3 CH_3COCH_3 . Obserwować wpływ zastosowanych związków na białka i lipidy.

Opracowanie wyników

Wyniki opisać i zinterpretować.

Doświadczenie III

Przepuszczalność błon plazmatycznych dla wodorotlenków

Zasada metody

Czerwień obojętna poniżej pH 6,8 ma zabarwienie czerwone, natomiast powyżej pH 8,0 – żółte. Szybkość zmiany zabarwienia komórek skórki liści okrywowych cebuli barwionych czerwienią obojętną będzie zależała od szybkości zmiany pH w komórkach umieszczonych w roztworach wodorotlenków. Przepuszczalność błon biologicznych dla wodorotlenków jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia ich dysocjacji.

Materiał

cebula cebuli

Odczynniki

0,1% roztwór czerwieni obojętnej w 70% C_2H_5OH , 0,025 M HCl, 0,025 M NH_4OH , 0,025 M KOH

Sprzęt laboratoryjny

żyłetka, igła preparacyjna, szalka Petriego o średnicy 9 cm, 2 szkiełka podstawowe, pęseta

Wykonanie doświadczenia

Kilka fragmentów wewnętrznej skórki łuski cebuli o powierzchni około 1 cm^2 umieścić na szalce Petriego w roztworze czerwieni obojętnej. Po 5 minutach fragmenty skórki przenieść do szalki zawierającej 0,025 M HCl. Po upływie kolejnych 5 minut dokładnie wypłukać je w szalce z wodą destylowaną i umieścić na szkiełku podstawowym w kropli:

a) 0,025 M NH_4OH ,

b) 0,025 M KOH.

Obserwować zmianę zabarwienia fragmentów skórki łuski cebuli.

Opracowanie wyników

Na podstawie szybkości zmiany zabarwienia fragmentów skórki łuski okrywowej cebuli ustalić, który z wodorotlenków szybciej wnika do komórek. Wyjaśnić, dlaczego tak się dzieje.

Doświadczenie IV

Wpływ kationów jedno- i dwuwartościowych na rodzaj plazmolizy

Zasada metody

Pod wpływem użytych w doświadczeniu stężonych soli w komórkach skórki łuski cebuli nastąpi plazmoliza, której charakter będzie zależny od obecnych w soli kationów.

Materiał

cebula cebuli

Odczynniki

1 M KNO_3 , 1 M $Ca(NO_3)_2$

Sprzęt laboratoryjny

żyłетка, igła preparacyjna, 2 szkiełka podstawowe, 2 szkiełka nakrywkowe, mikroskop świetlny

Wykonanie doświadczenia

Wykonać 2 preparaty mikroskopowe z wewnętrznej skórki łuski okrywowej cebuli w kropli:

a) 1 M KNO_3 ,

b) 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Po upływie 15–30 minut obejrzyć preparaty pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×).

Opracowanie wyników

W zeszycie wykonać rysunki splazmolizowanych komórek i wyjaśnić, dlaczego kationy jedno- i dwuwartościowe wywołują inny rodzaj plazmolizy.

Literatura

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.