



MD 1772 F1

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1772⁽¹³⁾ F1
(51) Int. Cl.⁷: G 01 N 30/90;
C 12 N 11/16

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: 99-0239 (22) Data depozit: 1999.09.30	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.10.31, BOPI nr. 10/2001
(71) Solicitant: Universitatea de Stat din Moldova, MD (72) Inventatori: Duca Maria, MD; Grigorcea Pavel, MD; Glijin Aliona, MD (73) Titular: Universitatea de Stat din Moldova, MD	

(54) Metodă de identificare a fracției mitocondriale la floarea-soarelui

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la fiziologia și biochimia plantelor și poate fi aplicată în laboratoare la identificarea fracției mitocondriilor.

Metoda de identificare a fracției mitocondriilor la floarea-soarelui include omogenizarea materialului vegetal, izolarea fracției mitocondriilor din mediul omogenizat prin centrifugare diferențiată, spălarea mitocondriilor cu mediul omogenizat ce nu conține cisteină. Suspendarea fracției mitocondriilor se efectuează în soluție ce conține zaharoză și tampon TRIS-HCl. Pentru distrugerea membranelor mitocondriilor în această soluție se adaugă Triton X-100. Identificarea fracției

5

10

15

2

mitocondriilor se realizează prin cromatografie pe plăci de silufole, după apariția zonelor de acizi fumarici și malici, formate ca rezultat al acțiunii enzimelor mitocondriilor respectiv asupra acizilor succinic sau fumaric.

Rezultatul invenției constă în simplificarea, accelerarea și ieftinirea metodei de identificare a fracției mitocondriilor.

Revendicări: 1

Figuri: 1

MD 1772 F1

MD 1772 F1

3

Descriere:

Invenția se referă la fiziologia și biochimia plantelor și poate fi aplicată în laboratoare la identificarea fracției mitocondriilor.

Identificarea fracției mitocondriilor are o mare importanță în activitatea specialiștilor la studiul diferitelor funcții și procese caracteristice mitocondriilor - organite ce conțin un sistem de replicare, transcriere și translație a informației genetice proprii.

Se cunoaște metoda de identificare a fracției mitocondriilor prin determinarea activității succinat dehidrogenazei după modificarea extincției, care se măsoară la spectrofotometru peste fiecare 15 s timp de 3 min a 2,6-diclorfenolindofenolului redus în prezența fenazinmetasulfatului [1].

Dezavantajul acestei metode constă în necesitatea de utilaj special, menținerea temperaturii constante (37°C) atât în termostat, cât și în camera spectrofotometrului pe parcursul întregii perioade de lucru; dificultăți în procesul de calcul și de prelucrare a rezultatelor obținute, ce pot provoca erori în rezultatele finale.

Se mai cunoaște și metoda de identificare a fracției mitocondriilor prin analiza electronomicroscopică, ea servind ca cea mai apropiată soluție [2]. Metoda include omogenizarea materialului vegetal, izolarea fracției mitocondriilor din material vegetal prin centrifugarea diferențiată la 20000 g. Mediul de omogenizare conține zaharoză (0,25 M), soluție-tampon TRIS-HCl (50 mM, pH 7...8), mercaptoetanol (10 mM), ioni de magneziu (10 mM), ioni de calciu (1 mM), polivinilpirolidonă (10%) și cisteină (0,5%). Spălarea mitocondriilor se efectuează cu mediu omogenizat ce nu conține cisteină prin centrifugare repetată. Mitocondriile se suspendează în mediu ce conține zaharoză (0,5 M) și soluție-tampon TRIS-HCl (0,05 M, pH 7,4), care include fixarea mitocondriilor cu tetraoxid de osmiu (OsO_4) timp de 1...2 ore; dehidratarea materialului în alcool etilic (96%) - 1 oră; colorarea cu uranilacetat (30 min); saturarea cu amestec de butilmetacrilat și metilmetacrilat (1:5) în prezența catalizatorului chimic - 3 ore; polimerizarea materialului (50...55°C) - 24 ore; segmentarea prin ultramicrotomare și analiza la microscopul electronic [2].

Dezavantajul acestei metode constă în necesitatea utilizării unui număr mare de reactivi costisitori, utilaj special și un timp îndelungat de efectuare a procedurii (27 ore).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unei metode care ar asigura identificarea fracției mitocondriilor fără folosirea utilajului special, cu un consum minim de reactivi mai puțin costisitori și fără necesitatea efectuării calculelor rezultatelor.

Esența invenției constă în faptul că metoda de identificare a fracției mitocondriilor la floarea-soarelui include omogenizarea materialului vegetal, izolarea mitocondriilor din mediul de omogenizare a materialului vegetal prin centrifugare diferențiată, spălarea mitocondriilor cu mediu omogenizat ce nu conține cisteină, suspendarea mitocondriilor în mediu ce conține zaharoză și soluție-tampon TRIS-HCl; pentru distrugerea membranelor în această soluție se adaugă Triton X-100. Identificarea fracției mitocondriilor se realizează prin efectuarea cromatografiei pe plăci de silufol după apariția zonelor de acizi fumaric și malic, formate ca rezultat al acțiunii enzimelor mitocondriilor respectiv asupra acizilor succinic sau fumaric.

Metaboliți ai activității enzimelor ciclului Krebs localizat în mitocondrii constituie succinat dehidrogenaza, EC 1.3.99.1 și fumarat hidratat, EC 4.2.1.2. Rezultatul obținut este cauzat de capacitatea cromatografiei în strat subțire de a separa acizii organici menționați și în consecință de a identifica activitatea acestor enzime markeri specifice ai mitocondriilor.

Rezultatul invenției constă în simplificarea, accelerarea și ieftinirea metodei de identificare a fracției mitocondriilor.

Exemplu de realizare a invenției

Obținerea de fracțiuni subcelulare pure presupune câteva etape și anume: distrugerea peretelui celular, separarea membranelor citoplasmice și apoi izolarea componentelor prin centrifugare diferențiată ce are la bază diferențele de densitate ale fracțiunilor subcelulare.

Pentru izolarea mitocondriilor s-au luat 10 g material vegetal (apexul floral de floarea-soarelui în perioada de butonizare), care a fost omogenizat manual într-un mojar cu pistil de porțelan în care s-a adăugat sticlă pisată (0,5 g) pentru a îmbunătăți randamentul de obținere a fracțiunilor și 60 ml de mediu de omogenizare cu următoarea compoziție (la 100 ml):

- soluție de zaharoză 0,25 M, izotonic față de citozol (17,1 g);
- soluție-tampon TRIS-HCl, 50 mM, pH 7...8, care neutralizează conținutul acid vacuolar (6,9 g);
- compuși cu funcțiune sulhidril (mercaptoetanol sau ditiotritol) 10 mM, care protejează oxidarea enzimelor ce conțin cisteină (0,4 ml);
- ioni de magneziu de concentrație 10 mM pentru a evita disocierea ribozomilor ($MgCl_2$, 0,0203 g);
- ioni de calciu la concentrația de 1 mM, care previn precipitarea cromatinei nucleare ($CaCl_2$, 0,0745 g);
- polivinilpirolidonă (10%), care precipită taninurile din vacuole, ce inactivează enzimele (5,0 g);

MD 1772 F1

4

- cisteină (0,5%), pentru stabilizarea grupărilor fenolice (0,5 g).

După omogenizare, amestecul a fost filtrat printr-o pânză de nylon (4...6 straturi), înlăturând reziduul ce conține țesut numai parțial distrus, pereți celulari și membrane plasmactice distruse. Supernatantul ce conține componentele subcelulare a fost centrifugat 5 min la 2000 g, înlăturându-se astfel nucleii, cloroplastele și fragmente ale acestor organite. Mai apoi supernatantul a fost supus din nou centrifugării, timp de 15 min la 20000 g obținându-se în precipitat fracția îmbogățită cu mitocondrii. Supernatantul (fracția citoplasmatică) conține un amestec de componente solubile ale citoplasmei, vacuolelor și ale altor organite distruse. Mitocondriile astfel precipitate au fost spălate timp de 3 min cu 4 ml mediu de omogenizare ce nu conține cisteină, apoi din nou precipitate prin centrifugare timp de 5 min la 20000 g. Mitocondriile din precipitatul obținut au fost suspendate în 0,5 ml soluție ce conține zaharoză (0,5 M, pH 7,4) și tampon TRIS-HCl (0,05 M, pH 7,4). Pentru dezintegrarea membranelor mitocondriilor s-a adăugat Triton X-100 (0,025 ml) și s-a omogenizat fără nisip.

Pentru identificarea fracției mitocondriilor, a fost efectuată cromatografia pe plăci de sulfol folosind ca martori acizii succinic, fumaric și malic - produse intermediare ale ciclului Krebs localizat în mitocondrii. S-au pregătit soluții saturate de acid succinic, acid fumaric, acid malic. Drept probe au servit produsele rezultate din reacțiile dintre fracția mitocondriilor și acidul succinic: fracția mitocondriilor și acidul fumaric în raport de 1:0,1. Probele au fost incubate la temperatura camerei 20°C timp de 10 min. Ca eluent pentru executarea cromatografiei s-a luat un amestec de alcool butilic, acid acetic și apă în raportul 4:1:5. În calitate de dezvoltant a fost folosit bromfenol albastru în alcool (96%) și NaOH (0,1 N). Probele și martorii au fost depuși pe plăcile de silufol cu ajutorul capilarelor. După efectuarea cromatografiei au fost obținute tablouri destul de clare din care poate fi demonstrată identificarea fracției mitocondriilor. Astfel, numai în fracția mitocondriilor acidul succinic sub acțiunea succinat dehidrogenazei s-a transformat în acid fumaric, iar acesta sub acțiunea fumarat hidratazei s-a transformat în acid malic, pe când în fracția citoplasmatică aceste transformări nu au avut loc din cauza lipsei acestor enzime de mitocondrii (fig. 1).

(57) Revendicare:

1. Metodă de identificare a fracției mitocondriale la floarea-soarelui, care include omogenizarea materialului vegetal, izolarea fracției mitocondriilor din mediul omogenizat prin centrifugare diferențiată, spălarea mitocondriilor cu mediul omogenizat ce nu conține cisteină, suspendarea fracției mitocondriilor în soluție ce conține zaharoză și tampon TRIS-HCl și identificarea materialului obținut, **caracterizată prin aceea că** după suspendare se efectuează distrugerea membranelor mitocondriilor prin adăugare de Triton X-100 și omogenizare, se adaugă acid succinic sau fumaric după care identificarea materialului obținut se realizează prin cromatografie pe plăci de silufol conform aparției zonelor respective de acizi fumaric și malic.

(56) Referințe bibliografice:

1. Современные методы анализа в биохимии, под ред. В.Н. Ореховича. Москва, 1977, с. 41-49
2. Андреева Н.Н. Методы выделения функционально активных митохондрий из растительных тканей. Клетка и клеточные структуры. Москва, 1968, т. 1, с. 65-70

Sef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria

MD 1772 F1

5

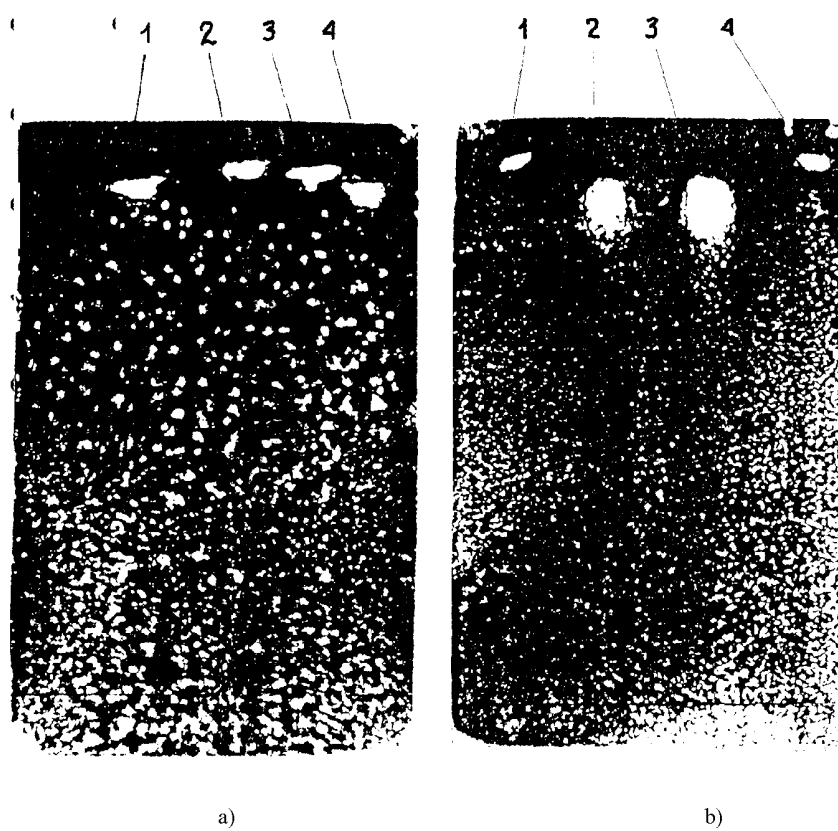


Fig. 1. Cromatograma distribuirii acidului succinic și fumaric în urma acțiunii succinat dehidrogenazei (a) și a acidului fumaric și malic în urma acțiunii fumarat hidratazei de mitocondriilor (b).

- a)
1. acid succinic;
 2. acid fumaric;
 3. fracțiunea mitocondriilor + acid succinic;
 4. fracțiunea citoplasmatică + acid succinic.

- b)
1. acid fumaric;
 2. acid malic;
 3. fracțiunea mitocondriilor + acid fumaric;
 4. fracțiunea citoplasmatică + acid fumaric.

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 99-0239	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 1999.09.30	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) Int. Cl. (7) : G 01 N 11/16, C 12 N 11/16 Alți indici de clasificare: (54) Titlul : Procedeu de identificare a fracției mitocondriale la floarea-soarelui (71) Solicitantul : Universitatea de Stat din Moldova, MD Termeni caracteristici :	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indicii de clasificare)	
C.I.B. 7: G 01 N 11/16, C 12 N 11/16	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente
	Numărul revendicării vizate
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II	
☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează	
* categoriile speciale ale documentelor consultate:	
A - document care definește statutul general al tehnicii	P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data	T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
	& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării documentării 20001.02.15	
Examinatorul Bantaș Valentina	

ANEXĂ la RAPORTUL DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4