

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion		Laitos — Institution	
mat.-luonnontieteellinen		Eläintieteen laitos, fys. osasto	
Tekijä — Författare Tuire-Helinä Wuori-Nazzal			
Työn nimi — Arbets titel Tiheysgradienttiultrasentrifugoinnin käyttö kaaliperhosen, <i>Pieris brassicae</i> , 5. asteen toukan hemolymfalipoproteiinien eristämisessä			
Oppiaine — Läroämne Fysiologinen eläintiede			
Työn laji — Arbets art		Aika — Datum	Sivumäärä — Sidoantal
Pro gradu -työ		Toukokuu 1993	35 s. + 16 liites.
Tiivistelmä — Referat			
<p>Holometabolisten hyönteisten toukat varastoivat fat bodynsa ja hemolymfaansa suuria määriä lipidejä, joita hemolymfassa kuljettavat fat bodyn ja muiden elinten välillä lipoproteiinit, erityisesti lipoforiini. Lipoproteiinien konsentraatio on hemolymfassa suurimmillaan juuri ennen kotoitumista.</p> <p>Tämä tutkimus selvittää isopyknisen tiheysgradienttiultrasentrifugoinnin käyttökelpoisuutta lipoforiinin kaltaisten High density- ja Very high density- lipoproteiinien eristämisessä kaaliperhosen, <i>Pieris brassicae</i> viimeisen eli 5. toukka-asteen hemolymfasta. Toistaiseksi lipoproteiineja on eristetty ja karakterisoitu kaaliperhosella ainoastaan elektroforeesin ja lipidivärväyksen avulla.</p> <p>Hemolymfanäytteet kerättiin 300 5. asteen toukasta, sentrifugoitiiin hemosyyttien poistamiseksi ja ultrasentrifugoitiiin eritiheyksisten lipoproteini- ja fosfolipidifaasien erottamiseksi Sorvallin OTD 65 B -ultrasentrifugilla T-865 fixed angle- roottoria käyttäen (+6 °C). Ultrasentrifugointiolosuhteita vältettiin muuntamalla KBr-gradientin konsentraatiota (34.3 % tai 44.3 %), näytteen määrää gradientissa (5-10 %) sekä erityisesti ajoaikaa (24-62 h) kierrosnopeuden säilyessä muuttumattomana (40 000 rpm, n. 115 000 g). Näin suoritettiin kaikkiaan 6 erilaista ultrasentrifugointia.</p> <p>Ultrasentrifugoinnin jälkeen putkien sisältö purettiin fraktioihin, joiden tiheys määritettiin refraktiivisesti ja absorbanssi spektrofotometrisesti. Fraktiosarjan dialysoidusta ja lyofilisoidusta absorbanssihuipuista ajettiin 7 % polyakrylamidigeelielektroforeesi Coomassie Blue- ja Sudan Black- värväystä käyttäen. Lipidit määritettiin 1-suuntaisen ohutkerroskromatografian avulla.</p> <p>Lopuksi selvitettiin lipoproteiinien tehtävää lipidinkuljettajina (1-¹⁴C)linoleenihapolla leimatun dieetin avulla, joskin eri lipoproteiiniryhmien väliset erot jäivät vähäisiksi.</p> <p>Ultrasentrifugointi erotti gradientin yläosaan karotenoidien värjäämän keltaisen faasin (tiheys n. 1.139 g/ml), jonka sijaintiin ja puhtauteen voitiin vaikuttaa KBr:n konsentraatiota ja ajoaikaa muuttamalla. Parhaimman erottelun tuotti 62 h ultrasentrifugointi, joka jätti absorbanssihuippuun vain 3 elektroforeettisesti hidasta lipoproteiinia. Nämä High density -tyyppiset lipoproteiinit koostuivat proteiinista sekä diglyserideistä, fosfolipideistä ja kolesterolista lipidisuhteiden vastatessa hemolymfan lipidisuhteita. Lipoforiini jäi suurikokoisena molekyylinä todennäköisesti väligeeliin. Gradientin alaosaan erottui elektroforeettisesti nopeasti liikkuvien Very high density- lipoproteiinien (tiheys 1.177-1.255 g/ml) muodostama vihreä faasi ultrasentrifugointiajasta riippumatta.</p> <p>Isopykninen tiheysgradienttiultrasentrifugointi soveltuu varsin hyvin lipoproteiinien eristämiseen kaaliperhostoukan hemolymfasta. Keltainen faasi vastasi tiheydeltään ja lipidikoostumukseltaan lipoforiinia, mutta sisälsi pisinmängin ultrasentrifugoinnin jälkeen pelkän lipoforiinin sijasta yhä 3 suurta ja siten ajogeelissä hitaasti liikkuvaa lipoproteiinia ja todennäköisesti väligeeliin jääneen lipoforiinin. Siten on tarpeen tutkia väligeeli tarkemmin ja puhtaan lipoforiini- tai muun lipoproteini-eristämiseksi parannella tutkimusmenetelmää ultrasentrifugoinnin kierrosnopeutta ja g-arvoa lisäämällä sekä fraktiointimenetelmää ja roottoria vaihtelemalla. Mikäli uusitulla menetelmällä onnistutaan eristämään puhtaita lipoproteini-eristämistä, niiden ominaisuudet voidaan määrittää ja rinnastaa ultrasentrifugoinnilla muista lajeista saatuihin.</p>			
Avainsanat — Nyckelord hemolymfa, lipoforiini, lipoproteiini, <i>P. brassicae</i> , ultrasentrifugointi			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe Eläintieteen laitoksen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter			