

BIOCHEMIA

(wersja mała)

Materiały do ćwiczeń dla studentów Wydziału Biologii (kierunek Ochrona Środowiska)

PODSTAWY BIOCHEMII

dla
OCHRONY ŚRODOWISKA

Materiały do ćwiczeń dla studentów Międzywydziałowych Studiów Ochrony Środowiska

BIOCHEMIA

Materiały do ćwiczeń dla studentów makrokierunku Bioinformatyka i Biologia Systemów

**Rafał Derlacz, Agnieszka Girstun, Barbara Kowalska-Loth, Piotr Kozłowski,
Agnieszka Piekiełko-Witkowska, Anna Szakiel i Joanna Trzcńska-Danielewicz**



**Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Biochemii
Warszawa, 2009**

wersja 7.0

przygotowano przy użyciu pakietu biurowego OpenOffice.org 3.0

wydrukowano na papierze z odzysku

udostępniono w formie elektronicznej na www.biol.uw.edu.pl/zbm

Wstęp

Biochemia bada właściwości i przemiany związków (głównie organicznych) występujących w żywych komórkach, przybliżając nas do zrozumienia fenomenu jakim jest Życie. Zakres materiału przedstawiany w ramach niniejszych ćwiczeń jest próbą kompromisu między olbrzymim dorobkiem tej dziedziny nauki, a bardzo krótkim czasem przeznaczonym na jedyny, dla większości biorących w nich udział studentów, kontakt z tego typu przedmiotem w trakcie toku studiów.

W trakcie ćwiczeń przedstawione zostaną właściwości wszystkich głównych grup tych związków organicznych: białek wraz z aminokwasami i peptydami, kwasów nukleinowych wraz z nukleotydami, węglowodanów i lipidów, którym poświęcone będą cztery zajęcia. Dwa osobne zajęcia przeznaczone będą dla wybranych, ze względu na swoje fundamentalne znaczenie, grup białek: enzymów, warunkujących przemiany wszystkich tych związków w żywej komórce oraz przeciwciał, nadających niektórym organizmom odporność na choroby. Studenci zapoznają się również z ważniejszymi technikami stosowanymi w badaniach biochemicznych, z których niektóre używane są także w diagnostyce medycznej, kryminalistyce, przemyśle spożywczym lub farmaceutycznym: chromatografią żelową, chromatografią cienkowarstwową adsorpcyjną, dializą, denaturującą elektroforezą białek, niespecyficznym barwieniem białek, immunoblottingiem, łańcuchową reakcją polimerazy (PCR), elektroforezą kwasów nukleinowych, niespecyficznym barwieniem kwasów nukleinowych, spektrofotometrią, biochemicznym oznaczeniem zawartości substancji, otrzymywaniem substancji z materiału biologicznego oraz badaniem aktywności enzymów.

Ćwiczenia zaplanowano do wykonywania w 2 – 4 osobowych zespołach. W przypadku każdego ćwiczenia, część praktyczna poprzedzona jest teoretycznym wstępem. Jego zadaniem jest jednak jedynie wprowadzenie w dane zagadnienie i w żadnym wypadku nie zastąpi on stosownych rozdziałów z książek podanych w spisie literatury. Pod koniec opisu każdego ćwiczenia przewidziano miejsce na wpisanie najważniejszych wyników z przeprowadzonych eksperymentów. W trakcie wykonywania ćwiczeń, studenci będą mieli kontakt z niebezpiecznymi substancjami. Z tego względu, wymagane jest zapoznanie się i przestrzeganie podanego regulaminu w pełnym jego zakresie. W trakcie pracy z roztworami będą używane pipety automatyczne. Ich obsługa jest opisana w oddzielnej instrukcji. W przypadku wykonywania rozcieńczeń lub określania ilości substancji w objętości roztworu o znanym jej stężeniu molowym, pomocne będą umieszczone w skrypcie przykłady obliczeń biochemicznych.

Spis treści

Ćw. 1. Aminokwasy, peptydy i białka	1
Ćw. 2. Przeciwciała	7
Ćw. 3. Węglowodany	12
Ćw. 4. Nukleotydy i kwasy nukleinowe	17
Ćw. 5. Lipidy	23
Ćw. 6. Enzymy	28
Regulamin ćwiczeń	32
Spis literatury	32
Obsługa pipet automatycznych	wewnętrzna strona tylnej okładki
Obliczenia biochemiczne	wewnętrzna strona tylnej okładki

Ćw. 1. AMINOKWASY, PEPTYDY I BIAŁKA

Aminokwasy

Aminokwasy są to związki drobnocząsteczkowe, będące podstawowymi jednostkami strukturalnymi peptydów i białek. W budowie białek wszystkich organizmów uczestniczy tylko 20 typowych aminokwasów. W ich cząsteczce wyróżnia się centralnie położony atom węgla α , do którego kowalencyjnie przyłączone są: grupy aminowa i karboksylowa (stąd nazywane są α -aminokwasami), atom wodoru oraz łańcuch boczny (R) (rys. 1). Łańcuchy boczne determinują właściwości fizykochemiczne α -aminokwasów. Podział α -aminokwasów ze względu na budowę ich łańcucha bocznego przedstawiono w tab. 1. Wszystkie α -aminokwasy są bezbarwne.

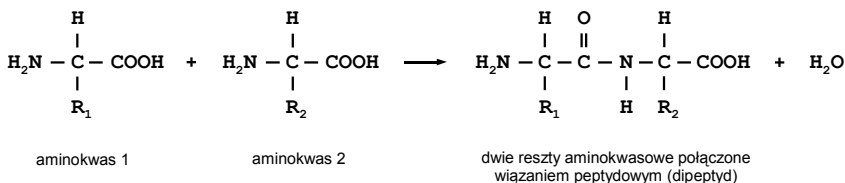
aminokwasy hydrofobowe	alifatyczne		glicyna, alanina, walina, leucyna, izoleucyna, metionina, cysteina i prolina
	aromatyczne		fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan
aminokwasy hydrofilowe (polarne)	pozbawione ładunku		asparagina, glutamina, seryna i treonina
	obdarzone ładunkiem	zasadowe	lizyna, arginina i histydyna
		kwasowe	kwas asparaginowy i kwas glutaminowy

Tab. 1. Podział aminokwasów występujących w białkach ze względu na właściwości łańcucha bocznego.

W organizmach występują także dodatkowe α -aminokwasy, które nie uczestniczą w budowie białek, lecz biorą udział w wyspecjalizowanych przemianach, np. ornityna i cytrulina w syntezie argininy (α -aminokwasu występującego w białkach) i w cyklu mocznikowym w wątrobie lub są hormonami, np. tyroksyna i trójiodotyronina (hormony tarczycy). W organizmach spotyka się również aminokwasy o innej budowie cząsteczki niż α -aminokwasy, np. neuroprzebieżnik GABA (kwas γ -aminomasłowy), który jest γ -aminokwasem (grupa aminowa znajduje się przy trzecim atomie węgla, nie licząc atomu węgla z grupy karboksylowej).

Peptydy i białka

Aminokwasy mogą łączyć się liniowo między sobą wiązaniem peptydowym, które jest tworzone między grupą α -karboksylową jednego aminokwasu a α -aminową kolejnego (rys. 1). Powstają wówczas bezbarwne peptydy.



Rys. 1. Schemat budowy α -aminokwasu oraz tworzenie wiązania peptydowego.

Cząsteczki zbudowane z mniej niż 25 reszt aminokwasowych określa się mianem oligopeptydów, a dłuższe, zbudowane z 25 i więcej reszt aminokwasowych – polipeptydów. Przykładami oligopeptydów występujących w naturze są niektóre hormony, np. oksytocyna lub wazopresyna. Są nimi także: przeciwutleniacz glutation oraz niektóre antybiotyki, np. gramicydyna lub walinomycyna (nie są one jednak kodowane przez DNA, jak inne

peptydy czy wszystkie białka, zaś te antybiotyki są peptydami cyklicznymi). Łańcuch polipeptydowy stanowi podstawę budowy białka. Małe białka zawierają ok. 100 reszt aminokwasowych, średnie – kilkadziesiąt, zaś duże – kilka tysięcy takich reszt. Pewne białka mogą być zbudowane z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego, np. 2, przy czym, dwa takie same łańcuchy tworzą homodimer, zaś dwa różniące się między sobą łańcuchy – heterodimer. Dość często spotykane są także trimery (3 łańcuchy) i tetramery (4 łańcuchy). W cząsteczkach białek mogą występować ugrupowania nie będące resztami aminokwasowymi (np. hem w hemoglobinie i cytochromach, reszty fosforanowe, reszty cukrów) lub jony metali. Niektóre z tych ugrupowań mogą nadawać zawierającym je białkom barwę, np. hem - barwę czerwoną. Masę cząsteczkową białek podaje się w daltonach (Da) [1 Da równy jest 1 atomowej jednostce masy (u)]. Małe białka mają masę kilkunastu tysięcy Da (kDa), średnie – kilkudziesięciu kDa, zaś duże – ponad 100 kDa. Kompleksy zbudowane z wielu białek mogą mieć masę milionów Da (MDa).

W wyniku fałdowania łańcucha polipeptydowego powstaje specyficzna konformacja (kształt) białka. Wyróżnia się cztery poziomy struktury przestrzennej białek:

1. struktura pierwszorzędowa – sekwencja aminokwasowa; skład aminokwasowy determinuje właściwości fizykochemiczne białka a także kolejne poziomy jego struktury,
2. struktura drugorzędowa – przestrzenne ułożenie reszt aminokwasowych znajdujących się blisko siebie w łańcuchu polipeptydowym; do najczęściej występujących struktur drugorzędowych należą: α helisa, struktura β i zwrot β ,
3. struktura trzeciorzędowa – przestrzenne ułożenie całego łańcucha polipeptydowego, ułożenie względem siebie poszczególnych struktur drugorzędowych,
4. struktura czwartorzędowa – dotyczy białek zbudowanych z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego i oznacza ułożenie względem siebie tych podjednostek i rodzaj oddziaływań między nimi.

Struktura białek utrzymywana jest przy udziale wiązań kowalencyjnych, jonowych, hydrofobowych, wodorowych i sił van der Waalsa.

Generalna tendencja rządząca fałdowaniem białek to dążenie do ukrycia reszt aminokwasów hydrofobowych wewnątrz cząsteczki, a eksponowanie reszt aminokwasów polarnych na jego powierzchni w przypadku białek funkcjonujących w środowisku hydrofilowym (np. w cytozolu). Białka występujące w środowisku hydrofobowym (np. w błonie komórkowej) wykazują tendencję odwrotną.

Obecnie w badaniach białek można wyróżnić dwa podejścia:

- podejście klasyczne polegające na izolacji pojedynczego białka i jego dalszej analizie,
- podejście proteomiczne polegające na badaniu wzajemnych zależności białek, ich współdziałania. Opiera się ono nie na izolacji poszczególnych białek, ale na analizie całych kompleksów wielobiałkowych lub nawet całego komponentu białkowego organelli lub komórki (proteomu).

Isolacja i oczyszczanie białek

Cel, w jakim ma być wykorzystane białko, determinuje dobór materiału biologicznego, z którego jest ono izolowane oraz metody jego oczyszczania. Zależą one od tego, czy otrzymane białko powinno zachować swoją formę natywną i aktywność biologiczną, np. przy badaniach enzymatycznych, czy powinno zostać oczyszczone do pełnej jednorodności (homogenności), np. przy badaniach strukturalnych lub czy ma być zastosowane jako lek. Najkorzystniejszym źródłem białka będzie materiał zawierający jak najwięcej izolowanego białka dającego się łatwo otrzymać w roztworze w formie stabilnej, a jednocześnie ubogi w zanieczyszczenia i możliwie najtańszy. Obecnie coraz częściej w celu uzyskania potrzebnych białek przeprowadza się ich produkcję w komórkach bakteryjnych, drożdżowych lub w hodowlach komórek ssaczy. Otrzymane w ten sposób białka nazywane są **białkami rekombinowanymi**. Zaletą takiego podejścia jest możliwość otrzymania dużej ilości potrzebnego białka, a jego oczyszczanie do homogenności jest stosunkowo proste.

Dla każdego białka powinno się zastosować indywidualny schemat oczyszczania, wykorzystujący jego własności fizykochemiczne i biologiczne. Oczyszczanie białka można podzielić na kilka etapów:

1. wydrębnienie z materiału biologicznego
 - rozdrobnienie materiału, rozbitcie tkanek i komórek (homogenizacja, rozbitcie ultradźwiękami),
 - ekstrakcja białka do roztworu wodnego i usunięcie pozostałego materiału poprzez odwirowanie lub przesączenie,
2. wstępne oczyszczanie (opcjonalne)
 - wytrącenie białka z roztworu w wyniku frakcjonowania wzrastającymi ilościami rozpuszczalników lub wysolenie siarczanem amonu i usunięcie czynnika wytrącającego białko przy pomocy dializy,

3. oczyszczanie
 - chromatografia (patrz niżej),
4. zmiana warunków jonowych (opcjonalne)
 - dializa (patrz niżej),
5. analiza czystości preparatu
 - elektroforeza (patrz niżej).

Najczęściej izolację białek przeprowadza się w niskiej temperaturze (2 - 4°C) i w obecności inhibitorów proteaz (enzymów degradujących białka).

Chromatografia jest to szeroki zakres metod używanych do rozdzielania i/lub analizowania złożonych mieszanin związków różniących się właściwościami fizykochemicznymi (ładunkiem, wielkością, kształtem, rozpuszczalnością), a także właściwościami biologicznymi. Metodami chromatograficznymi można rozdzielać aminokwasy, peptydy, białka, ale także nukleotydy, kwasy nukleinowe, lipidy i cukry.

Cząsteczki podlegające rozdzielaniu chromatograficznemu rozmieszczają się pomiędzy dwie fazy: fazę stacjonarną i fazę ruchomą, która przepływa przez fazę stacjonarną. W zależności od rodzaju fazy stacjonarnej wyróżniamy chromatografię bibułową, cienkowarstwową, gazową i cieczową.

Białka rozdzielamy metodą chromatografii cieczowej, gdzie fazę stacjonarną stanowi złożo hydrofilowe, które mogą stanowić nierozpuszczalne związki agarozy, dekstranu lub polimerów akryloamidu.

Przy oczyszczaniu białek najczęściej wykorzystujemy chromatografię kolumnową. Kolumna to rurka szklana, plastikowa lub metalowa wypełniona złożem (faza stacjonarna) zrównoważonym buforem o odpowiednim składzie jonowym i pH. Mieszanie rozdzielanych białek wprowadzamy na kolumnę w buforze fazy ruchomej. Im większe powinowactwo białka do fazy stacjonarnej tym wolniej przesuwają się na kolumnie. Białka są eluowane (wymywane) z kolumny kolejnymi porcjami buforu w zależności od ich powinowactwa do złoża – najsłabiej zaadsorbowane pojawiają się w elucji jako pierwsze, najsilniej – jako ostatnie.

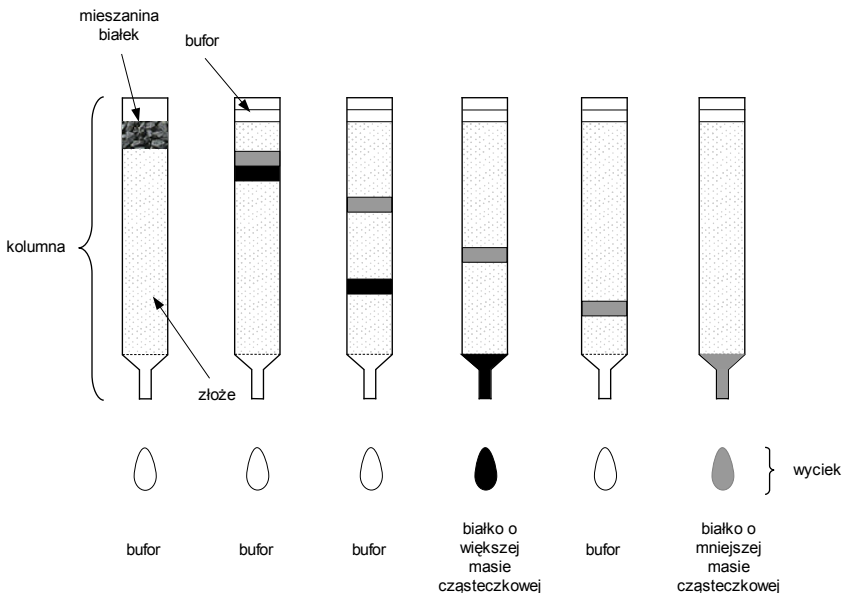
Różne typy chromatografii cieczowej wykorzystują różne własności białek (tab. 2). Aby otrzymać wysoce oczyszczone białko na ogół trzeba zastosować procedurę składającą się z kilku rozdzielów chromatograficznych.

Cecha białka	Technika chromatograficzna
wielkość i/lub kształt	filtracja żelowa (sączenie molekularne)
ładunek	chromatografia jonowymienna
hydrofobowość	chromatografia hydrofobowa
specyficzność biologiczna	chromatografia powinowactwa

Tab. 2. Wybrane typy chromatografii białek.

Techniki chromatograficzne różnią się złożami fazy stacjonarnej. W ramach tego ćwiczenia wykonana zostanie chromatografia kolumnowa na przykładzie **filtracji żelowej**. Do filtracji żelowej wykorzystuje się obojętne chemicznie, hydrofilowe, usieciowane złożo, uformowane w ziarna z porami o ściśle określonych wymiarach. Cząsteczki większe niż pory nie mogą do nich wnikać i przemieszczają się w kolumnie szybciej niż małe cząsteczki, które zajmują przestrzeń wewnątrz i na zewnątrz ziaren. Zatem, w wycieku z kolumny jako pierwsze pojawiają się większe cząsteczki (rys. 2). W zależności od stopnia usieciowania złoża można rozdzielać białka o różnej wielkości. Filtrację żelową można stosować także do usuwania substancji drobnocząsteczkowych z preparatów izolowanego białka oraz do wyznaczenia masy nienaruszonych kompleksów wielobiałkowych.

Inną metodą pozwalającą na usunięcie z wodnego roztworu związków drobnocząsteczkowych (takich jak np. sole, rozpuszczalniki organiczne, aminokwasy, nukleotydy oraz cukry proste) jest **dializa**. Polega ona na przechodzeniu przez półprzepuszczalną błonę (np. celulozową błonę woreczka dializacyjnego) cząsteczek mniejszych niż pory w tej błonie, do roztworu na zewnątrz woreczka, a zatrzymaniu w roztworze w woreczku cząsteczek zbyt dużych, aby mogły przejść przez te pory (substancji wielocząsteczkowych, np. białek lub kwasów nukleinowych). Przechodzenie przez błonę trwa do momentu wyrównania stężenia danego związku drobnocząsteczkowego po obu stronach błony i można je przyspieszyć poprzez stałe mieszanie oraz wymianę roztworu na zewnątrz woreczka.



Rys. 2. Chromatografia kolumnowa białek na przykładzie filtracji żelowej.

Podczas kolejnych etapów oczyszczania oznacza się stężenie białka i ewentualnie jego aktywność enzymatyczną (jeśli ją w ogóle posiada), co pozwala na stworzenie tzw. bilansu preparatyki, czyli obliczenie jej wydajności. Stężenie białka można określić bezpośrednio mierzając absorbancję jego roztworu w nadfiolecie (UV) przy długości fali 280 nm (właściwość ta wynika z występowania w białkach dwóch aminokwasów aromatycznych – tryptofanu i tyrozyny, których pierścienie absorbują UV w tym zakresie) lub przeprowadzając w sposób ilościowy (bezbardzo) białka w barwne kompleksy i mierzając ich absorbancję w świetle widzialnym (patrz także strona 13).

Czystość otrzymanych preparatów białkowych (a także ilość oczyszczonego właściwego białka) można ocenić przy pomocy **elektroforezy**. Elektroforeza to zjawisko przemieszczania się cząstek obdarzonych ładunkiem (jonów) w polu elektrycznym, np. cząsteczek białek lub kwasów nukleinowych. Większość metod elektroforetycznych wykorzystuje specyficzne nośniki – żele poliakrylamidowe lub agarozowe, bibułę. Przeszczanie się jonów w polu elektrycznym zależy od ich ładunku, wielkości i kształtu. Im większy jon lub bardziej rozbudowany jego kształt tym wolniej porusza się w polu elektrycznym, a im bardziej naładowany – tym porusza się szybciej. Jony naładowane ujemnie migrują do anody, naładowane dodatnio do katody. W przypadku cząstek zawierających w swym składzie ugrupowania naładowane dodatnio i ujemnie (np. białka), o kierunku migracji decyduje ich ładunek wypadkowy. Białka różnią się między sobą pod względem tych właściwości, będą różniły się także tempem migracji, a więc możliwe jest ich rozdzielanie.

Białka najczęściej są rozdzielane metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w obecności SDS, tzw. SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS (dodecylsulfian sodu) jest detergentem anionowym denaturującym i oplatującym białko, w wyniku czego łańcuch polipeptydowy: (a) traci strukturę wyższego rzędu i (b) staje się anionem. Dodatkowo, przeprowadza się redukcję wiązań dwusiarczkowych białka i w wyniku tego jego poszczególne łańcuchy polipeptydowe funkcjonują w roztworze niezależnie od siebie. W efekcie, wszystkie białka (łańcuchy polipeptydowe) mają taki sam, liniowy kształt oraz ładunek ujemny, a szybkość ich migracji w żelu zależy wyłącznie od ich wielkości. SDS-PAGE można zatem także wykorzystywać do wyznaczania masy cząsteczkowej analizowanego białka (przez porównanie z wielkością białek wzorcowych) oraz do określania liczby jego podjednostek polipeptydowych.

Ponieważ białka są na ogół bezbarwne, po przeprowadzonym rozdziale elektroforetycznym, należy je wybarwić w żelu, np. przez barwienie błękitem kumasyny, związkami srebra lub barwnikami fluorescencyjnymi.

W czystym preparacie powinien być obecny jedynie pojedynczy prążek właściwego białka (lub prążki w przypadku białka zbudowanego z kilku różnych łańcuchów polipeptydowych). Obecność dodatkowych prążków może świadczyć o jego zanieczyszczeniu przez inne białka lub jego degradacji przez proteazy w trakcie preparatyki.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z technikami: (a) chromatografii kolumnowej na przykładzie filtracji żelowej, (b) dializy oraz (c) elektroforezy SDS-PAGE. W części A i B ćwiczenia zamiast białka stosujemy łatwe do bezpośredniej obserwacji barwne związki: Blue Dekstran 2000 (zabarwiony na niebiesko polisacharyd o masie cząsteczkowej ok. 2 000 000 u) oraz drobnocząsteczkowy związek nieorganiczny – heksacyjanożelazian (III) potasu ($K_3[Fe(CN)_6]$, dawniej żelazicyjanek potasu), o żółtej barwie i masie cząsteczkowej 329 u.

A. Filtracja żelowa

Sprzęt i odczynniki:

1. kolumna chromatograficzna z kranikiem
2. pipeta automatyczna (20 - 200 μ l)
3. pipetka pasteurowska
4. probówki 15 ml typu Falcon (konikalna, ze skalą)
5. 0.9% [w/v] roztwór NaCl w wodzie
6. zawiesina żelu Sephadex G-25 medium w 0.9% [w/v] NaCl
7. roztwór Blue Dekstranu 2000 w 10% [v/v] glicerolu (6 mg/ml)
8. roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu w 10% [v/v] glicerolu (60 mg/ml)

Wykonanie:

Wylot kolumny chromatograficznej zamknąć i podstawić pod niego zlewkę. Kolumnę napełnić roztworem NaCl do ok. 1/3 wysokości, następnie wlać taką ilość zawiesiny żelu Sephadex, aby uformowało się złożo o wysokości 15 - 17 cm. Otworzyć wylot kolumny i przepłukać ją ok. 20 ml roztworu NaCl. Pozostawić ok. 2 cm słupa cieczy nad powierzchnią złoża i zamknąć wylot kolumny. Na powierzchnię złoża delikatnie nanieść 100 μ l mieszaniny roztworów Blue Dekstranu 2000 i heksacyjanożelazianu (III) potasu (zageszczonych glicerolem w celu obciążenia nanoszonej próbki), umieszczając końcówkę mikropipety w roztworze ok. 5 mm nad powierzchnią złoża. Otworzyć kolumnę i od tego momentu do czterech ponumerowanych probówek zbierać wyciek z kolumny (w chwili wniknięcia barwnego roztworu w złożo delikatnie, nie naruszając powierzchni złoża, nawarstwić pipetką pasterowską kilka ml roztworu NaCl i prowadzić chromatografię, uzupełniając poziom roztworu nad złożem):

- frakcja nr 1 – od momentu rozpoczęcia chromatografii,
- frakcja nr 2 – od momentu pojawienia się w wycieku pierwszej niebieskiej kropli,
- frakcja nr 3 – od momentu pojawienia się w wycieku kropli bezbarwnej,
- frakcja nr 4 – od momentu pojawienia się w wycieku pierwszej żółtej kropli do końca żółtego wycieku.

Zanotować skład i objętość poszczególnych frakcji w tabeli jak poniżej.

Numer frakcji	Skład frakcji	Objętość frakcji [ml]
1		
2		
3		
4		

B. Dializa

Sprzęt i odczynniki:

1. mieszadło magnetyczne
2. zlewka
3. woreczek do dializy
4. pipeta automatyczna (1 - 5 ml)
5. roztwór Blue Dekstranu 2000 w wodzie (6 mg/ml)
6. roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu w wodzie (60 mg/ml)
7. woda dejonizowana

Wykonanie:

W woreczku dializacyjnym (namoczonym uprzednio w wodzie) umieścić zmieszane w stosunku 1:1 roztwory Blue Dekstranu 2000 i heksacyjanożelazianu (III) potasu (ok. 5 ml). Woreczek zawiązać i umieścić w zlewce z wodą dejonizowaną, mieszać na mieszadle magnetycznym. **Obserwować** zmiany zabarwienia roztworu w woreczku z zielonego (mieszanina) na niebieski (Blue Dekstran 2000) i cieczy w zlewce z bezbarwnej (czysta woda) na żółtą [roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu].

C. Elektroforeza białka (SDS-PAGE, pokaz)

Sprzęt i odczynniki:

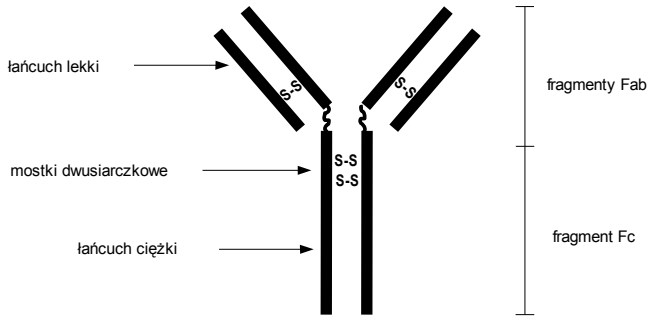
1. aparat do elektroforezy białek wraz z zasilaczem
2. blok grzewczy (100°C)
3. pipeta automatyczna (2 - 20 µl)
4. 10% żel poliakryloamidowy z SDS (o wymiarach 7 x 10 cm i grubości 1 mm)
5. bufor do elektroforezy: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, pH 8.2 - 8.4, 0.1% [w/v] SDS
6. mieszanina białek do rozdzielania elektroforetycznego w buforze Laemmli'ego
7. roztwór do barwienia żelu (zawiera błękit kumasyny R-250)
8. roztwór do odbarwiania żelu (7% [v/v] kwas octowy)

Wykonanie:

Elektroforezę SDS-PAGE przeprowadzamy w żelu umieszczonym między pionowo ustawionymi płytkami szklanymi w aparacie do elektroforezy wypełnionym buforem o pH alkalicznym i zawierającym SDS. Mieszaninę białek ogrzać przez 3 minuty w 100°C. Po schłodzeniu, nanieść do kolejnych studzienek żelu. Płytki szklane z żelem umieścić w aparacie, w którym dolny zbiornik uprzednio napełniono buforem do elektroforezy. Górny zbiornik aparatu dopełnić buforem. Po włączeniu chłodzenia wodnego podłączyć aparat do zasilacza. Elektroforezę prowadzić przy napięciu ok. 110 V prądu stałego do czasu przesunięcia się barwnika do dolnej krawędzi żelu. Po zakończeniu rozdzielania żel wyjąć z szybki i umieścić w naczyniu z roztworem do barwienia żeli na ok. 20 minut. Zabarwiony żel odbarwiać w roztworze 7% kwasu octowego. **Zaobserwować** obraz rozdzielonych białek.

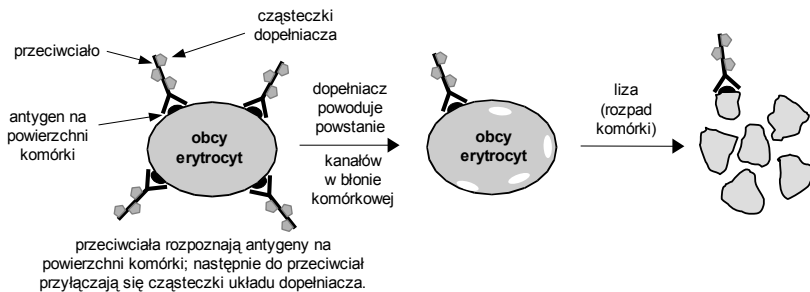
Ćw. 2. PRZECIWCIAŁA

Przeciwciała, zwane również **immunoglobulinami**, są białkami zdolnymi do wiązania z dużą swoistością i powinowactwem **antygenów** – substancji (białek, cukrów, lipidów lub kwasów nukleinowych) wywołujących odpowiedź immunologiczną organizmu. W wyniku tej reakcji powstaje **kompleks antygen-przeciwciało**. Jeśli w roztworze znajdzie się odpowiednia ilość zarówno rozpuszczalnego antygeny jak i skierowanych przeciwko niemu przeciwciał, to powstałe kompleksy mogą przybrać formę dużych agregatów, które są nierozpuszczalne w wodzie i **precypitują** (wytrącają się z roztworu). Reakcja przeciwciała z antygenem znajdującym się na powierzchni nierozpuszczalnej cząstki (np. komórki) może prowadzić do **aglutynacji** (zlepiania się ze sobą) tych cząstek (komórek). Z pięciu klas przeciwciał, najbardziej obfitymi w **surowicy krwi** (krew po usunięciu skrzepu) ssaków są immunoglobuliny klasy G (**IgG**). IgG zapewniają odporność organizmu na czynniki infekcyjne dostające się przez krew. Są też jedynymi przeciwciałami przechodzącymi przez łożysko w celu zapewnienia odporności płodowi oraz niemowlęciu po urodzeniu.



Rys. 1. Schemat budowy przeciwciała.

Pojedyncze przeciwciało IgG ma masę cząsteczkową ok. 150 000 Da i składa się z czterech podjednostek (dwa ciężkie i dwa lekkie łańcuchy polipeptydowe, czyli jest heterotetramerem). Schematycznie budowa IgG przedstawiana jest jako duża litera Y (rys. 1), której każde z jej dwóch górnych "ramion" zawiera po jednym miejscu wiążącym antygen (**fragment Fab**), zaś dolna "nóżka" stanowi **fragment Fc**, odpowiedzialny za oddziaływanie z innymi elementami układu odpornościowego. Jednym z tych elementów jest **dopelniacz** – układ licznych, zależnych od siebie białek surowicy, którego aktywacja prowadzi do zniszczenia (liza) obcych komórek w krwi, np. komórek bakteryjnych przy infekcji lub erytrocytów po przetoczeniu biorcy krwi dawcy z niewłaściwą grupą (rys. 2).

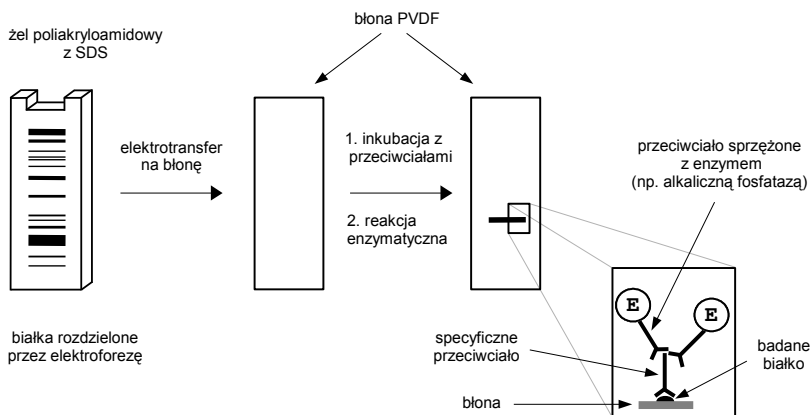


Rys. 2. Udział dopełniacza w reakcji odpornościowej organizmu.

Różnorodność przeciwciał wytwarzanych przez dany organizm jest ogromna (u człowieka szacuje się ją na ponad 10^{91}), ponieważ mają one rozpoznawać/wiązać teoretycznie wszystkie antygeny, z którymi może się on zetknąć w swoim otoczeniu (odkrycie jak taka wielka różnorodność przeciwciał zakodowana jest w materiale genetycznym komórki ssaczki zostało wyróżnione Nagrodą Nobla). Co więcej, organizm naturalnie wytwarza wiele różniących się między sobą przeciwciał skierowanych przeciwko temu samemu antygenowi. Dlatego surowice/przeciwiła przeciwko antygenowi otrzymane z krwi jakiegoś organizmu, np. królika, nazywane są **poliklonalnymi**. Przy użyciu specjalnej techniki (wyróżnionej również Nagrodą Nobla) możliwa jest także produkcja, np. w hodowli komórek mysich, preparatów jednorodnych przeciwciał przeciwko danemu antygenowi (tzw. przeciwciał **monoklonalnych**).

Ze względu na wybiórcze działanie (rozpoznawanie w zasadzie tylko "swojego" antygeny) przeciwiła są niezastąpionym narzędziem mającym zastosowanie w medycynie – przy leczeniu, diagnostyce i profilaktyce oraz w badaniach naukowych. Typowe przykłady zastosowania przeciwciał w leczeniu to podanie surowicy z wysokim mianem odpowiednich przeciwciał, otrzymanej z innego organizmu, przy infekcji tężcem, błonicą, wścieklizną, zapaleniu wątroby typu B czy po ukąszeniu przez żmiję lub podanie stosownych przeciwciał w przypadku ciąży z konfliktem serologicznym (niezgodnością w zakresie czynnika Rh). W diagnostyce obecność stosownych przeciwciał we krwi jest wykorzystywana do oznaczania grup krwi oraz kontaktu osoby z niektórymi czynnikami infekcyjnymi, np. wirusem HIV czy prątkami gruźlicy. Przeciwiłami stwierdza się także obecność pewnych substancji w próbkach, np. hormonów przy testach ciążyowych. W profilaktyce, na drodze szczepień ochronnych (np. przeciwko odrze, zapaleniu wątroby typu B czy cholercze) organizm nabywa zdolności wytwarzania odpowiedniej ilości przeciwciał we krwi, których celem w przyszłości będzie zapobieganie tym infekcjom. W badaniach naukowych przeciwiła wykorzystuje się w szeregu technik używanych przy izolacji i charakterystyce białek. Opis czterech z takich technik podany jest poniżej.

Immunobloting (rys. 3) polega na rozdzieleniu mieszaniny białek za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE, patrz ćw. 1), przeniesieniu ich na błonę (tzw. elektrotransfer) i identyfikacji wśród związanych z błoną białek, badanego białka za pomocą specyficznych dla niego przeciwciał.



Rys. 3. Identyfikacja białek metodą immunoblotingu.

Powstałe kompleksy antygen-przeciwiła wykrywane są przy użyciu kolejnych przeciwciał (rozpoznających fragment Fc specyficznych przeciwciał), sprzężonych z enzymem katalizującym reakcję z barwnym, nierozpuszczalnym produktem. W efekcie na błonie, w miejscu gdzie znajduje się badane białko, pojawia się barwny prążek. Termin immunobloting stosowany jest także w węższym zakresie – obejmującym tylko detekcję białka na błonie za pomocą przeciwciał wraz z barwną reakcją enzymatyczną. Wynika to z faktu, że elektroforeza a następnie elektrotransfer białek nie są jedynym sposobem przygotowania błony z związanym badanym białkiem. Przy niektórych badaniach wystarczy po prostu nanieść kilka kropli roztworu próbki, zawierającej badane białko, bezpośrednio na błonę.

Immunofluorescencja polega na ustaleniu lokalizacji badanego białka w preparacie tkanki lub komórki za pomocą specyficznych przeciwciał. Powstałe kompleksy antygen-przeciwciała wykrywane są przy użyciu kolejnych przeciwciał (rozpoznających fragment Fc specyficznych przeciwciał), sprzężonych z fluoryzującym barwnikiem, widocznym w mikroskopie fluorescencyjnym.

Immunoprecypitacja jest metodą stosowaną do izolacji, z mieszaniny białek w roztworze (np. lizacie komórkowym), niewielkich ilości badanego białka za pomocą specyficznych dla niego przeciwciał. Powstałe kompleksy antygen-przeciwciała odzyskiwane są z roztworu, przy użyciu białka A (wiążącego fragment Fc specyficznych przeciwciał), sprzężonego z nierozpuszczalnym nośnikiem (np. agarozą), w postaci osadu po zwirowaniu.

Chromatografia powinowactwa jest techniką stosowaną do oczyszczania białek, umożliwiającą otrzymanie w pojedynczym etapie dużych ilości czystego badanego białka, w oparciu o jego swoiste oddziaływanie ze stosownym złożem. Takim złożem może być agarozą, trwale połączona ze specyficznym przeciwciałem w kolumnie chromatograficznej (patrz ćw. 1). Po związaniu do takiego złoża badanego białka (jako jedyne z całej mieszaniny białek), jest ono od niego odplukiwane odpowiednim buforem.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Celem ćwiczenia jest wykonanie lizy *in vitro* erytrocytów barana w obecności przeciwciał królika i dopełniacza oraz poznanie w formie pokazu techniki immunoblotingu.

Uwaga! Sugerowana kolejność wykonywania ćwiczenia – zacząć od etapu B3 pokazu, potem realizować B1, B2 oraz A i zakończyć B4.

A. Liza erytrocytów barana *in vitro*

Sprzęt i odczynniki:

1. próbówki 1.5 ml typu Eppendorf (bezbarwne i przezroczyste)
2. statyw na próbówki typu Eppendorf
3. pipety automatyczne (2 - 20 μ l, 20 - 200 μ l i 100 - 1000 μ l)
4. pisak wodoodporny
5. 5% [v/v] zawiesina erytrocytów barana
6. przeciwciała (surowica królika)
7. dopełniacz świnki morskiej
8. sól fizjologiczna (0.9% [w/v] roztwór NaCl)

Wykonanie:

A1. Do czterech podpisanych próbek typu Eppendorf dodać wg poniższej tabeli: krwinki baranie, przeciwciała i dopełniacz (oraz sól fizjologiczną do wyrównania objętości).

Odczynnik	Numer próbówki			
	1	2	3	4
zawiesina erytrocytów barana	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
przeciwciała (surowica królika)	-	10 μ l	-	10 μ l
dopełniacz z świnki morskiej	-	-	20 μ l	20 μ l
sól fizjologiczna	30 μ l	20 μ l	10 μ l	-

A2. Probówki zamknąć i wymieszać ich zawartość, przez kilkakrotne obrócenie próbówki wieczkiem do dołu.

A3. Inkubować ok. 20 minut w statywie w temp. pokojowej.

A4. **Zaobserwować i zanotować** w tabeli poniżej zmiany, które zaszły w zawartości próbek.

Numer próbek			
1	2	3	4

B. Immunobloting (pokaz)

Sprzęt i odczynniki:

1. świeżo przygotowany 12% żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi białkami
2. świeżo zablokowana błona PVDF z przeniesionymi białkami
3. bufor do elektrotransferu (25mM Tris, 192 mM glicyna, pH 8.2 - 8.4)
4. błona PVDF, 1 arkusz 5 cm x 7 cm (BioRad, nr kat. 162-0177)
5. metanol
6. woda dejonizowana
7. bibuła filtracyjna, 4 arkusze 7 cm x 9 cm (3M, Whatman)
8. roztwór Ponceau S (0.1% [w/v] Ponceau S, 5% [v/v] kwas octowy)
9. bufor TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% [v/v] Tween 20)
10. roztwór blokujący (1% [w/v] albumina cielęca lub 5% [w/v] odtłuszczone mleko w TBST)
11. mysie przeciwciała monoklonalne anti-HA (1:2000 w TBST)
12. kozie przeciwciała poliklonalne anti-mysie IgG sprzężone z fosfatazą alkaliczną (1:2000 w TBST)
13. substrat dla fosfatazy alkalicznej (Promega, nr kat. S3841, zawierający: 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan [BCIP] i błękit nitrotetrazolowy [NBT])
14. pipeta automatyczna (100 - 1000 μ l)
15. pęseta
16. pudełko plastikowe 8 cm x 11 cm x 5.5 cm – 4 szt.
17. pudełko plastikowe 11 cm x 16 cm x 7.5 cm – 1 szt.
18. taca plastikowa 30 x 40 cm
19. bagietka lub pipeta serologiczna 10 ml
20. aparat do elektrotransferu wraz z zasilaczem (minimum 500 mA dopuszczalnego obciążenia)
21. wytrząsarka orbitalna

Opis pokazu wykonywanego przez prowadzących:

Uwaga! Pełna procedura składa się z czterech etapów: (1) rozdziálu elektroforetycznego białek, (2) przygotowania błony z białkami, (3) inkubacji z przeciwciałami oraz (4) reakcji enzymatycznej i wymaga w sumie ok. 8 godzin. W celu wykonania pokazu w czasie przewidzianym na to ćwiczenie, prowadzący przygotowali wcześniej: żel z rozdzielonymi białkami do elektrotransferu oraz zablokowaną błonę z przeniesionymi na nią białkami do inkubacji z przeciwciałami, co umożliwi wykonanie w trakcie właściwego immunoblotingu (etapy B3 i B4), pokazu elektrotransferu (etap B2).

B1. Elektroforeza białek (etap pokazu wykonywany w trakcie ćwiczenia 1)

Elektroforeza mieszaniny białek w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS została przeprowadzona tak jak w ćw. 1. Jednak, w przeciwieństwie do ćw. 1, żel przygotowany przez prowadzących nie był barwiony w celu wykrycia rozdzielonych białek.

B2. Przygotowanie błony z białkami – elektrotransfer i blokowanie (etap pokazu wykonywany w trakcie tego ćwiczenia)

Żel z białkami (przygotowany przez prowadzących jak opisano w etapie B1) włożyć wraz z przyciętą do wymiaru żelu błoną PVDF* (błona ta ma zdolność do trwałego, niespecyficznego wiązania białek) i bibulą filtracyjną, do kasyety aparatu do elektrotransferu. Włożyć kasetę do aparatu wypełnionego buforem do elektrotransferu. Podłączyć aparat do zasilacza, pamiętając, że tak jak w czasie elektroforezy, białka przemieszczają się będą w kierunku dodatnio naładowanej anody (czerwony biegun na zasilaczu). Prowadzić elektrotransfer przy napięciu ok. 50 V prądu stałego przez ok. 75 minut. Odłączyć aparat od zasilacza, wyciągnąć kasetę i delikatnie rozdzielić pęsetą błonę od żelu. **Zaobserwować**, że prebarwione wzorce białek zostały przeniesione z żelu na błonę. Zanurzyć błonę na 1-2 minuty w roztworze barwnika Ponceau S w celu przejściowego zabarwienia innych białek, które przeszły z żelu na błonę. Odplukać nadmiar barwnika z błony poprzez 2-3 szybkie zmiany wody dejonizowanej. **Zaobserwować** różowe prążki białek na błonie. Inkubować dalej błonę w roztworze blokującym przez 60 minut na mieszadle orbitalnym w celu zapobieżenia niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciał (które też są białkami) do błony. **Zaobserwować** kompletne odplukanie barwnika Ponceau S w trakcie tej kąpieli. Odplukać nadmiar roztworu blokującego poprzez 3 kąpiele po 5 minut w buforze TBST. Nie susząc błony, przejść do etapu B3.

B3. Inkubacja z przeciwciałami (etap pokazu wykonywany w trakcie tego ćwiczenia)

Otrzymałą (wcześniej przez prowadzących tak jak w etapie B2) zablokowaną błonę inkubować ze specyficznymi przeciwciałami (anty-HA) przez 45 minut. Odplukać nadmiar przeciwciał poprzez 3 kąpiele po 5 minut w buforze TBST. Inkubować dalej błonę z przeciwciałami anti-mysie IgG przez 30 minut. Odplukać nadmiar przeciwciał poprzez 3 kąpiele po 5 minut w buforze TBST. Przemycić błonę jeden raz wodą dejonizowaną i niezwłocznie przejść do etapu B4.

B4. Reakcja enzymatyczna (etap pokazu wykonywany w trakcie tego ćwiczenia)

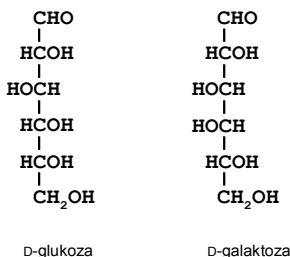
Na błonie (na stronie z białkami) równomiernie rozprowadzić 0.5 - 1 ml roztworu z substratem dla fosfatazy alkalicznej i inkubować przez 5 - 10 minut (aż pojawi się kolorowy prążek na błonie). Zatrzymać reakcję poprzez dwie szybkie zmiany wody dejonizowanej. Błonę można wysuszyć na bibule. **Objeźrzeć** wybarwioną błonę i **zannotować** obserwacje.

* Przed użyciem, błona PVDF wymaga aktywacji poprzez zanurzenie jej na kilkadziesiąt sekund w 100% metanolu, a potem w czystej wodzie.

Ćw. 3. WĘGLOWODANY

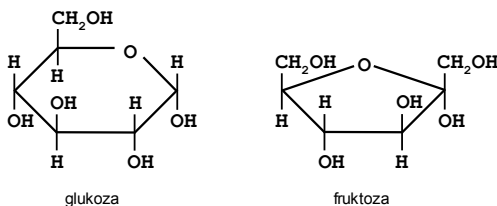
Węglowodany, zwane też cukrowcami, cukrami lub sacharydami, to aldehydy lub ketony wielowodorotlenowe. Jest to bardzo zróżnicowana grupa związków, które mogą być zarówno źródłem energii, jak i materiałem budulcowym czy zapasowym komórki. Dzieli się je na trzy klasy: (i) **monosacharydy** - cukry proste, (ii) **oligosacharydy** oraz (iii) **polisacharydy** - wielocukry. Oligosacharydy i polisacharydy powstają w wyniku połączenia cząsteczek cukrów prostych wiązaniami glikozydowymi.

Cukry proste o ogólnym wzorze $(\text{CH}_2\text{O})_n$, gdzie $n \geq 3$, w zależności od tego, czy posiadają grupę ketonową czy aldehydową, dzieli się, odpowiednio, na ketozy i aldozy. Pod względem długości łańcucha węglowego monosacharydy można dalej podzielić na triozy, tetrazy, pentozy, heksozy itd. W przypadku cukrów prostych jeden lub więcej atomów węgla to tzw. węgle asymetryczne – takie, których wszystkie cztery podstawniki są inne. Nadają one cukrom aktywność optyczną i pozwalają na tworzenie wielu **stereoizomerów** (form danego cukru różniących się przestrzennym układem podstawników przy węglu asymetrycznym np. izomery optyczne szeregu D i L, stanowiące swoje lustrzane odbicia). Cukry, które różnią się konfiguracją podstawników wokół jednego atomu węgla to tzw. **epimery** (np. D-glukoza i D-galaktoza, rys. 1).



Rys. 1. D-glukoza i D-galaktoza są epimerami względem atomu węgla 4 (C-4).

W roztworze wodnym cukry mogą istnieć w formie łańcuchowej lub pierścieniowej (furanozy lub piranozy, rys. 2).

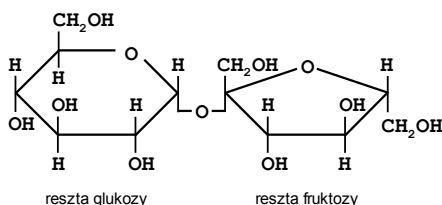


Rys. 2. Formy pierścieniowej glukozy (α -D-glukopiranoza) i fruktozy (α -D-fruktofuranaza).

Przejdzie w formę pierścieniową wiąże się z utworzeniem wewnętrznego hemiacetalu i powstaniem dodatkowego węgla asymetrycznego, zwanego anomerycznym. Formy pierścieniowe cukrów występują wobec tego w postaci izomerów zwanych **anomerami** (forma α i β), mogącymi swobodnie przekształcać się z jednej formy w drugą. Ustalanie się stanu równowagi między obiema formami cukru powoduje zmianę skręcalności optycznej roztworu (czynność optyczna roztworu cukru polega na zdolności do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego) – jest to zjawisko **mutarotacji**. Wolna grupa ketonowa lub aldehydowa cukrów występujących w formie łańcuchowej sprawia, że mają one właściwości redukujące, stanowiące podstawę różnego rodzaju reakcji testowych.

Istotne biologicznie cukry proste to m. in. **aldehyd glicerynowy** (jeden z pośredników glikolizy i glukoneogenezy), **ryboza** i **deoksyryboza** (składniki kwasów nukleinowych), **rybuloza** (akceptor CO₂ w cyklu Calvina) i **glukoza** (główny substrat energetyczny komórki). Cukry proste charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, wpływają wobec tego w istotny sposób na ciśnienie osmotyczne roztworu i dlatego nie mogą być przechowywane jako materiał zapasowy.

Oligosacharydy zawierają od dwu do kilku reszt cukrowych, połączonych wiązaniami O-glikozydowymi. Typowymi oligosacharydami są np. dwucukry takie jak: **sacharoza** (glukoza + fruktoza połączone anomerycznymi atomami węgla wiązaniem α -1,2-glikozydowym, rys. 3) – będąca popularnym cukrem spożywczym uzyskiwanym z buraków i trzciny cukrowej, **laktoza** (galaktoza + glukoza połączone wiązaniem β -1,4-glikozydowym) – dwucukier występujący w mleku i **maltoza** (dwie reszty glukozy połączone wiązaniem α -1,4-glikozydowym) – powstająca podczas hydrolizy skrobi. Oligosacharydy z wolną grupą hydroksylową przy węglu anomerycznym wykazują właściwości redukujące (laktoza, maltoza), w przeciwieństwie do sacharozy, która nie posiadając wolnej grupy –OH przy węglu anomerycznym (żaden z pierścieni nie może ulec otwarciu z odsłonięciem grupy aldehydowej lub ketonowej), nie jest cukrem redukującym.



Rys. 3. Budowa cząsteczki sacharozy (α -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranozydu). Reszty glukozy i fruktozy połączone są wiązaniem O-glikozydowym.

Polisacharydy (wielocukry) zbudowane są z wielu reszt monosacharydowych tworzących długie łańcuchy, które czasem mogą być rozgałęzione. Są one zwykle nierozpuszczalne w wodzie, więc nie wpływają na ciśnienie osmotyczne roztworu. Szczególne znaczenie mają: **skrobia** - materiał zapasowy roślin, **glikogen** - materiał zapasowy zwierząt, niektórych bakterii i grzybów, **celuloza** - podstawowy składnik ściany komórkowej roślin zielonych, **chityna** – składnik ścian komórkowych grzybów i szkieletu zewnętrznego stawonogów.

Niezwykle istotne są różnego rodzaju pochodne cukrów, w których zmodyfikowane zostały grupy hydroksylowe. I tak ufosforylowane cukry (glukozo-6-fosforan, aldehyd-3-fosfoglicerynowy) są ważnymi metabolitami komórkowymi, a aminocukry (*N*-acetylglukozamina) to składniki ścian komórek bakteryjnych. Cukry wchodzą też w skład m. in. białek powierzchniowych komórek (glikoproteiny), czy też w skład lipidów (glikolipidy).

Cukry można oznaczać ilościowo na kilka sposobów. (1) Metoda biologiczna - polega na fermentacji, w której glukoza i fruktoza są ostatecznie przekształcane w alkohol etylowy i dwutlenek węgla. (2) Metody fizyczne - polegają na oznaczaniu ciężaru właściwego roztworu cukru, czy też jego skręcalności właściwej (skręcanie płaszczyzny światła spolaryzowanego); są to metody szybkie, niemniej wymagają dużej ilości materiału. (3) Metody chemiczne – jest to liczna grupa metod oparta na właściwościach redukujących cukrów (w przypadku oligo- i polisacharydów nie posiadających właściwości redukujących konieczna jest ich wcześniejsza hydroliza). (4) Metody enzymatyczne – są to bardzo dokładne metody polegające na wykorzystaniu enzymów specyficznie przekształcających badaną cząsteczkę cukru. Dwie ostatnie metody (3 i 4) zakładają otrzymanie produktu, który będzie oznaczany, np. spektrofotometrycznie.

Spektrofotometria to dział analizy chemicznej, gdzie podstawą ilościowego i jakościowego oznaczenia substancji w roztworze jest jej zdolność do pochłaniania (absorpcji) światła o określonej długości fali, a więc wykazywanie przez nią zabarwienia (wrażenie barwy związków chemicznych jest efektem pochłaniania przez nie fal z pewnych zakresów światła widzialnego). Oprócz substancji barwnych, spektrofotometrycznie można oznaczać także substancje bezbarwne, jeśli wykazują one zdolność do absorpcji w nadfiolecie (UV) lub możliwe jest ich ilościowe przekształcenie w pochodne barwne lub absorbujące w UV. Często, gdy jedna reakcja nie prowadzi do powstania barwnego produktu lub absorbującego w UV, stosuje się dodatkową reakcję przekształcającą produkt pierwszej reakcji w taki produkt końcowy. Wielkość absorpcji (absorbancja) jest miarą ilości substancji. Zgodnie z prawem Lamberta-Beera absorbancja (*A*) światła monochromatycznego jest wprost

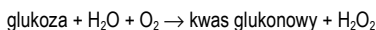
proporcjonalna do stężenia roztworu (c) i grubości warstwy (l) – zwykle chodzi tu o grubość kuwety spektrofotometrycznej:

$$A = \epsilon cl$$

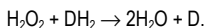
gdzie ϵ to molowy współczynnik absorpcji charakterystyczny dla danego związku. W analizie ilościowej stosuje się zwykle serie roztworów związku chemicznego o znanym stężeniu (roztwory wzorcowe) w celu sporządzenia tzw. krzywej wzorcowej, która pozwala na porównywanie (w obrębie jej prostoliniowego przebiegu) absorpcji substancji badanej o nieznanym stężeniu z wartościami absorpcji roztworów wzorcowych.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Celem ćwiczenia jest po pierwsze – ilościowe oznaczenie i porównanie zawartości glukozy w materiale biologicznym różnego pochodzenia oraz po drugie – porównanie specyficznej (enzymatyczna) i niespecyficznej (chemiczna) metody oznaczania substancji (tutaj glukozy). **Metoda enzymatyczna** polega na: (a) przekształceniu glukozy przez oksydazę glukozową w kwas glukonowy przy jednoczesnym utworzeniu nadtlenu wodoru:



a następnie, na (b) redukcji H_2O_2 przez peroksydazę w obecności o-dianizydyny (DH_2), która ulega utlenieniu tworząc barwny produkt końcowy (związek D):



Metoda chemiczna wykorzystuje właściwości redukujące cukrów i polega na redukcji kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w środowisku alkalicznym i w wysokiej temperaturze do barwnego produktu. Metoda ta jest niespecyficzna, gdyż redukcja DNS będzie w tym przypadku miarą ogólnej zdolności redukcyjnej badanej próby i nie może wobec tego zostać wykorzystana do ilościowego oznaczenia glukozy w obecności innych czynników redukujących (innych cukrów redukujących, np. fruktozy, laktozy i maltozy lub innych związków o właściwościach redukujących).

Sprzęt i odczynniki:

1. pipety automatyczne (2 - 20 μl , 20 - 200 μl i 100 - 1000 μl)
2. pipety serologiczne 10 ml
3. probówki polipropylenowe 11 ml, okrągłodenne (Medlab, nr kat. 20.1611.1)
4. cylindry 100 ml
5. zlewki 500 ml
6. lejki
7. sączki
8. łaźnia wodna (37°C)
9. łaźnia wodna (70°C)
10. łaźnia wrząca
11. spektrofotometr (Spekol 11)
12. woda dejonizowana
13. roztwór C1: 85 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$ (rozpuścić 3.6 g w 100 ml wody)
14. roztwór C2: 250 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (rozpuścić 7.2 g w 100 ml wody)
15. 3 M NaOH
16. 0.4 M NaOH
17. 10 mM glukoza
18. 1% [w/v] roztwór kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0.4 M NaOH
19. 50 ml buforu reakcyjnego z enzymami i o-dianizydyną. Sporządzić tuż przed użyciem poprzez rozpuszczenie w 50 ml 100 mM buforu sodowo-fosforanowego, pH 7.5, 10 mg oksydazy glukozowej, 2.5 mg peroksydazy oraz dodanie 0.3 ml roztworu o-dianizydyny w 96% etanolu (10 mg ml^{-1})
20. sok owocowy (jabłkowy)
21. piwo jasne
22. mleko skondensowane słodzone
23. miód naturalny

Wykonanie:

1. Przygotowanie próbek

Krzywa wzorcowa: Używając 10 mM roztworu glukozy i wody dejonizowanej, przygotować po 5 ml roztworów glukozy o następujących stężeniach: 5 mM, 2,5 mM, 1 mM, 0,5 mM i 0,1 mM.

Sok owocowy (jabłkowy): Do 100 ml klarownego soku w zlewce dodać 5 ml roztworu C1 i dokładnie wymieszać, następnie dodać 5 ml roztworu C2 i ponownie wymieszać. Przy pomocy 3 M NaOH doprowadzić pH mieszaniny do ok. 8,0 (zanotować całkowitą użytą objętość roztworu NaOH) i przefiltrować używając lejka i sączka z bibuły. Przygotować po 5 ml 10- oraz 100-krotnie rozcieńczonych próbek w wodzie dejonizowanej.

Piwo jasne: Wymieszać intensywnie w zlewce 50 ml piwa (w celu usunięcia pęcherzyków dwutlenku węgla) i przygotować 5 ml 10-krotnie rozcieńczonej próbki w wodzie dejonizowanej.

Mleko skondensowane słodzone: Do 1 ml mleka dodać 60 ml wody dejonizowanej i ogrzewać przez 15 minut w temp. 70°C, często mieszając. Dodać 5 ml roztworu C1, starannie wymieszać, dodać 5 ml roztworu C2 i ponownie dokładnie wymieszać. Dodać 2,5 ml 0,4 M NaOH i wymieszać. Pozostawić w temp. pokojowej na 5 minut, zamieszać i przefiltrować używając lejka i sączka z bibuły. Przygotować 5 ml 10-krotnie rozcieńczonej próbki w wodzie dejonizowanej.

Miód naturalny: Ok. 10 g miodu przenieść do zlewki, ogrzewać w temp. 70°C mieszając aż do jego upłynnienia. Przenieść dokładnie 1 g płynnego miodu do nowej zlewki i rozpuścić w 100 ml dejonizowanej wody. Przygotować 5 ml 10-krotnie rozcieńczonej próbki w wodzie dejonizowanej.

2. Oznaczenie poziomu cukrów redukujących w próbach metodą chemiczną przy pomocy kwasu 3,5-dinitrosalicylowego

Do podpisanych probówek odpipetować roztwory wg poniższej tabeli, wymieszać ich zawartość i razem wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 5 minut. Po schłodzeniu, zmierzyć absorbancję przy długości fali 550 nm, stosując jako próbę odniesienia probówkę z samą wodą dejonizowaną. Na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej w oparciu o absorbancję roztworów glukozy o znanym stężeniu, obliczyć ilość materiału redukującego w badanych próbkach. Czy uzyskany wynik rzeczywiście odpowiada zawartości glukozy w badanym materiale?

Typ próbki	Objętość i rodzaj odmierzanego roztworu		
	1 ml	1 ml	5 ml
Krzywa wzorcowa	woda dejonizowana (próba odniesienia)	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	2,5 mM glukoza	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	5 mM glukoza	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	10 mM glukoza	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
Sok	woda dejonizowana (próba odniesienia)	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	nierozcieńczony sok	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	10-krotnie rozcieńczony sok	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	100-krotnie rozcieńczony sok	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
Piwo	woda dejonizowana (próba odniesienia)	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	nierozcieńczone piwo	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	10-krotnie rozcieńczone piwo	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
Mleko	woda dejonizowana (próba odniesienia)	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	nierozcieńczone mleko	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	10-krotnie rozcieńczone mleko	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
Miód	woda dejonizowana (próba odniesienia)	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	nierozcieńczony roztwór miodu	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana
	10-krotnie rozcieńczony roztwór miodu	kwas 3,5-dinitrosalicylowy	woda dejonizowana

3. Oznaczenie poziomu glukozy w próbach metodą enzymatyczną z wykorzystaniem oksydazy glukozy i peroksydazy

Do podpisanych probówek odpipetować roztwory wg poniższej tabeli, wymieszać ich zawartość i razem wstawić do łaźni wodnej na 37°C na 20 minut. Następnie, zmierzyć absorbancję przy długości fali 420 nm, stosując jako próbę odniesienia probówkę z wodą dejonizowaną. Na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej w oparciu o absorbancje roztworów glukozy o znanym stężeniu, obliczyć ilość glukozy w badanych próbkach.

Typ próbki	Objętość i rodzaj odmierzanego roztworu	
	0.2 ml	2.5 ml
Krzywa wzorcowa	woda dejonizowana (próba odniesienia)	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	0.1 mM glukoza	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	0.5 mM glukoza	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	1.0 mM glukoza	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
Sok	woda dejonizowana (próba odniesienia)	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	nierozcieńczony sok	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	10-krotnie rozcieńczony sok	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	100-krotnie rozcieńczony sok	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
Piwo	woda dejonizowana (próba odniesienia)	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	nierozcieńczone piwo	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	10-krotnie rozcieńczone piwo	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
Mleko	woda dejonizowana (próba odniesienia)	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	nierozcieńczone mleko	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	10-krotnie rozcieńczone mleko	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
Miód	woda dejonizowana (próba odniesienia)	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	nierozcieńczony roztwór miodu	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną
	10-krotnie rozcieńczony roztwór miodu	bufor reakcyjny z enzymami i o-dianizydyną

4. Podsumowanie wyników

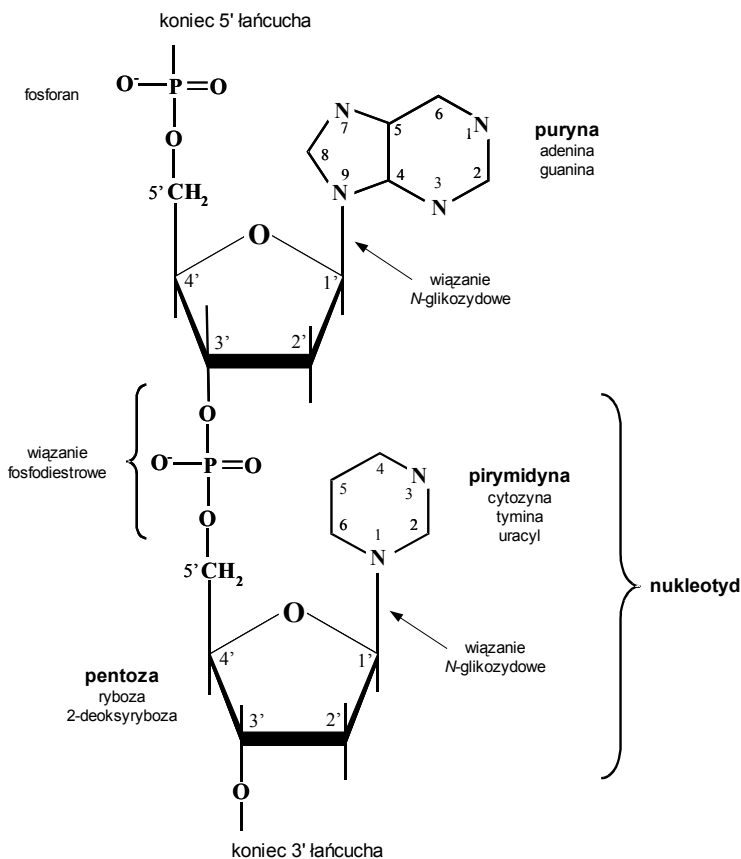
Uzyskane wyniki z punktów 2 i 3 zamieścić w tabeli jak poniżej (masa molowa glukozy wynosi 180 g, a więc 1 mmol waży 180 mg).

Próbka	Metoda chemiczna (zawartość cukrów redukujących)		Metoda enzymatyczna (zawartość glukozy)	
	mmol	mg	mmol	mg
Sok (w 100 ml)	mmol		mmol	
	mg		mg	
Piwo (w 100 ml)	mmol		mmol	
	mg		mg	
Mleko (w 100 ml)	mmol		mmol	
	mg		mg	
Miód (w 1 g)	mmol		mmol	
	mg		mg	

Ćw. 4. NUKLEOTYDY I KWASY NUKLEINOWE

Nukleotydy są zbudowane z cząsteczki cukru (pentozy), zasady azotowej (cyklicznego związku aromatycznego o pierścieniu zbudowanym z atomów węgla i azotu) i reszty kwasu ortofosforowego (rys. 1). Cząsteczką cukru może być ryboza (w rybonukleotydach) lub deoksyryboza (w deoksyrybonukleotydach). Zasady azotowe wchodzące w skład nukleotydów są pochodnymi jednopierścieniowej pirymidyny (cytozyna - C, tymina - T, uracyl - U), bądź dwupierścieniowej puryny (adenina - A, guanina - G). Zasada połączona wiązaniem *N*-glikozydowym z cząsteczką cukru tworzy **nukleozyd**. W nukleotydach nukleozyd jest połączony z resztą kwasu ortofosforowego wiązaniem estrowym. Nukleotydy mogą zawierać jedną, dwie, bądź trzy reszty fosforanowe (mono-, di-, trifosforany nukleozydów).

Nukleotydy pełnią w komórce różnorodne funkcje. Przede wszystkim są elementami budulcowymi **kwasów nukleinowych** - długich łańcuchów polinukleotydowych, w których poszczególne nukleotydy łączą się ze sobą poprzez wiązania fosfodiesterowe. Oprócz tego nukleotydy funkcjonują w komórce jako nośniki energii (np. trifosforan adenozyne ATP), koenzymy (np. NAD) lub składowe koenzymów (np. koenzymu A) oraz specyficzne cząsteczki sygnałowe (np. cykliczny AMP).



Rys. 1. Struktura fragmentu łańcucha kwasu nukleinowego.

W komórce występują dwa rodzaje kwasów nukleinowych: kwas deoksyrybonukleinowy (**DNA**) zbudowany z deoksyrybonukleotydów i kwas rybonukleinowy (**RNA**) zbudowany z rybonukleotydów.

DNA jest materiałem genetycznym komórki. Jest w nim zakodowana informacja o budowie i działaniu całego organizmu. RNA natomiast bierze udział w tłumaczeniu (rozkodowywaniu) tej informacji.

Do syntezy kwasów nukleinowych wykorzystywane są trifosforany nukleozydów, w przypadku DNA: dATP, dGTP, dCTP i dTTP, w przypadku RNA: ATP, GTP, CTP i UTP.

RNA występuje w komórce przeważnie w postaci pojedynczych łańcuchów. DNA natomiast jest prawie zawsze cząsteczką dwuniciową, w której dwa ułożone antyrównolegle łańcuchy polinukleotydowe są skręcone wokół siebie, tworząc w ten sposób tzw. **podwójną helisę**^{*}. Szkielet helisy tworzą łańcuchy cukrowo-fosforanowe, wewnątrz których znajdują się zasady azotowe. Zasady leżące naprzeciw siebie są połączone wiązaniami wodorowymi, przy czym naprzeciw adeniny zawsze znajduje się tymina, a naprzeciw cytozyny guanina. Sposób, w jaki zasady dwóch łańcuchów DNA łączą się w pary, określane są jako **komplementarne parowanie zasad**, a sekwencje nukleotydowe obu nici w helisie jako **sekwencje komplementarne**.

Występujące w naturze cząsteczki RNA na ogół mają długość od ok. 100 do kilku tysięcy nukleotydów. Cząsteczki DNA są znacznie większe i mają długość od kilku tysięcy par zasad (bp) do kilkuset milionów bp.

Jednymi z podstawowych metod stosowanych w analizie kwasów nukleinowych są:

1. trawienie enzymami restrykcyjnymi^{*},
2. elektroforeza,
3. hybrydyzacja,
4. sekwencjonowanie^{*},
5. łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)^{*}.

Ad. 1) **Enzymy restrykcyjne** to nukleazy, które katalizują hydrolizę wiązań fosfodiesterowych w kwasach deoksyrybonukleinowych. Jednak, w odróżnieniu od innych nukleaz, mają one zdolność do rozcinania DNA tylko w obrębie krótkich określonych sekwencji nukleotydowych, co powoduje, że dana próbka DNA poddana trawieniu określonym enzymem restrykcyjnym daje zawsze ten sam zestaw fragmentów DNA (wzór restrykcyjny). Odcinki DNA otrzymane w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi można następnie w określony sposób łączyć ze sobą tworząc nowe cząsteczki, co wykorzystuje się np. podczas klonowania DNA. W biologii molekularnej **klonowanie** oznacza tworzenie wielu identycznych kopii określonej cząsteczki DNA, bądź też izolowanie pewnego odcinka DNA (np. konkretnego genu) i oddzielenie go od pozostałego DNA komórkowego.

Ad. 2) Cząsteczki kwasów nukleinowych, bądź ich fragmenty otrzymane np. w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi można rozdzielić według długości za pomocą **elektroforezy** (zazwyczaj w żelu agarozowym). Dzięki przyłożonemu napięciu w trakcie elektroforezy ujemnie naładowane odcinki DNA wędrują do dodatnio naładowanej elektrody (dłuższe cząsteczki migrują w żelu wolniej, krótsze szybciej). Na podstawie rozdziału elektroforetycznego można określić wielkość i ilość rozdzielonych fragmentów (patrz także ćw. 1).

Ad. 3) W **hybrydyzacji** wykorzystuje się dążenie jednoniciowych cząsteczek kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowej helisy, ale tylko z cząsteczkami o sekwencji komplementarnej. Hybrydyzację stosuje się do identyfikacji odcinków kwasów nukleinowych o sekwencji komplementarnej do specyficznie wyznakowanej (radioizotopowo lub fluorescencyjnie) jednoniciowej cząsteczki DNA (sondy). Hybrydyzacja może zachodzić między dowolnymi łańcuchami kwasów nukleinowych (DNA/DNA, DNA/RNA, RNA/RNA).

W celu identyfikacji określonej sekwencji nukleotydowej do mieszaniny jednoniciowych cząsteczek (najczęściej unieruchomionych na błonie) dodaje się sondę, a następnie zapewnia warunki umożliwiające sondzie hybrydyzowanie z cząsteczkami o komplementarnej sekwencji (tworzenie cząsteczek dwuniciowych). Cząsteczki hybrydujące z sondą wykrywa na podstawie zawartego w nich znacznika.

Ad. 4) **Sekwencjonowanie DNA** polega na ustalaniu kolejności nukleotydów w cząsteczce DNA. Najczęściej stosowaną metodą sekwencjonowania jest metoda enzymatyczna. Sekwencję nukleotydową określa się dla jednoniciowego DNA (**matrycy**) poprzez enzymatyczne wydłużanie **startera** (krótkiej, 18 - 30 nukleotydowej, jednoniciowej cząsteczki DNA o sekwencji komplementarnej do początkowego rejonu matrycy). Jako substraty do syntezy nici komplementarnej stosuje się dwa rodzaje nukleotydów: standardowe (dNTP) i zmodyfikowane (ddNTP). Losowe włączenie ddNTP do nowopowstającej nici DNA nie pozwala na jej dalsze wydłużanie (niemożliwe jest utworzenie następnego wiązania fosfodiesterowego). Przeprowadza się cztery oddzielne reakcje wydłużania startera (dla każdego ddNTP). Otrzymane w każdej reakcji fragmenty DNA rozdziela się według wielkości przy pomocy elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (równocześnie w czterech równoległych ścieżkach), a następnie wykrywa na podstawie zawartego w nich znacznika (radioaktywnego lub

^{*} Odkrycie wyróżniono Nagrodą Nobla

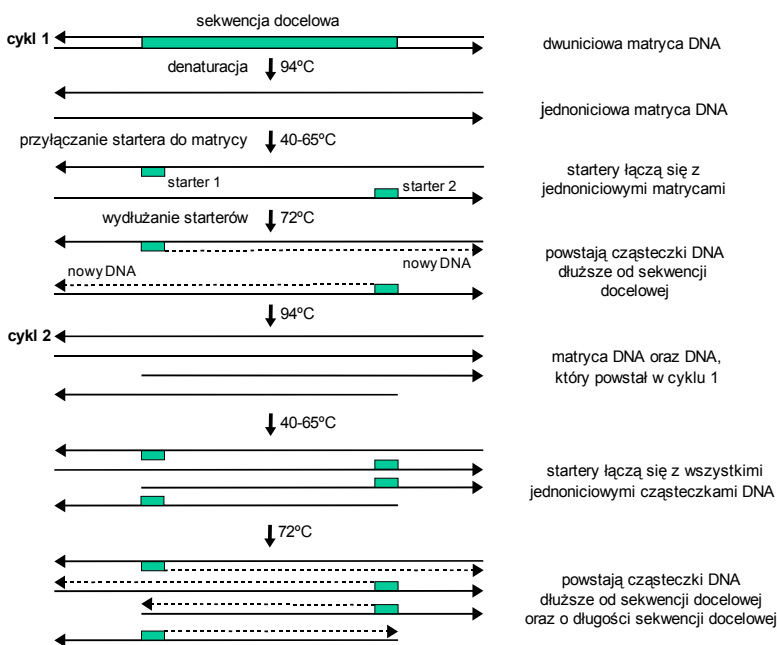
fluorescencyjnego, wprowadzonego bądź do startera, bądź jednego z dNTP). Uwidocznione prążki odpowiadają cząsteczkom DNA różniącym się od siebie długością jednego nukleotydu. Sekwencję nukleotydową matrycy ustala się odczytując kolejność prążków (w kierunku od dołu do góry żelu, uwzględniając wszystkie cztery ścieżki).

Ad. 5) **Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)** jest metodą pozwalającą na namnożenie (amplifikację) określonego odcinka DNA w jednej, powtarzanej cyklicznie reakcji enzymatycznej. Warunkiem, który musi być spełniony, jest znajomość sekwencji nukleotydowej na obu końcach odcinka, który ma być namnożony.

Do każdej reakcji PCR potrzebne są następujące składniki:

- DNA, który będzie namnożony (matryca), będący zazwyczaj częścią mieszaniny różnych cząsteczek DNA (np. genomowego DNA),
- startery o sekwencji komplementarnej do końcowych rejonów odcinka DNA, który będzie namnożony,
- **termostabilna polimeraza DNA** (wytrzymująca wielokrotne podgrzewanie do temp. powyżej 90°C); enzym łączy się z jednoniciowymi starterami i syntetyzuje nić komplementarną do matrycowego DNA,
- substraty dla polimerazy (dATP, dGTP, dTTP i dCTP),
- odpowiedni dla polimerazy bufor, zapewniający optymalne warunki dla działania enzymu.

Namnożanie określonego odcinka DNA następuje podczas powtarzających się cykli syntezy DNA (rys. 2).



Rys. 2. Schemat łańcuchowej reakcji polimerazy.

Każdy cykl syntezy składa się z trzech etapów:

1. denaturacji matrycy,
2. przyłączenia starterów,
3. wydłużania starterów.

W trakcie denaturacji próbna jest podgrzewana do temp. 94°C, w której następuje rozdzielenie dwuniciowych cząsteczek DNA na pojedyncze nici (stanowiące właściwą matrycę).

Przyłączanie starterów do matrycy zachodzi w temp. 40 - 65°C. Dobiera się ją w zależności od sekwencji nukleotydu i długości starterów. Temperatura ta zapewnia przyłączenie starterów do jednoniciowej matrycy w miejscach komplementarnych, jednak nie pozwala na powtórne odtworzenie dwuniciowych cząsteczek DNA.

Wydłużenie startera odbywa się w temperaturze, w której polimeraza DNA wykazuje największą aktywność (dla większości termostabilnych polimeraz DNA jest to 72°C). Polimeraza syntetyzuje nową nić rozpoczynając od startera przyłączonego do jednoniciowej matrycy.

Aby namnożyć określony odcinek DNA, należy przeprowadzić 15 - 40 cykli, w zależności od ilości użytej matrycy. Cząsteczki syntetyzowane w pierwszym cyklu są dłuższe od tych, które mają powstać docelowo, ponieważ nic nie zatrzymuje syntezy nowej nici przez polimerazę poza określony rejon matrycy (ograniczony przez startery). Dopiero w drugim cyklu pojawiają się produkty o właściwej długości (rys. 2). Podczas reakcji PCR liczba cząsteczek DNA dłuższych od sekwencji docelowej przyrasta wolniej – tylko liniowo, natomiast liczba cząsteczek o właściwej długości przyrasta bardzo szybko - wykładniczo. Ogólnie liczbę powstających produktów można wyrazić wzorem $2^n \times M$, gdzie n oznacza liczbę cykli, zaś M początkową liczbę cząsteczek matrycy.

Metoda PCR jest powszechnie wykorzystywana w genetyce i biologii molekularnej na różnych etapach badania genów. Namnożony przy pomocy PCR fragment DNA może na przykład być wykorzystany do klonowania, sekwencjonowania czy hybrydyzacji. PCR ma również zastosowanie w medycynie (do badań chorób dziedzicznych, do diagnostyki niektórych chorób), w sądownictwie (do identyfikacji podejrzanych na podstawie próbek DNA, przy ustalaniu ojcostwa), w biotechnologii (przy produkcji białek), w badaniach ewolucyjnych (przy ustalaniu pokrewieństw gatunków) oraz w antropologii (do badania pochodzenia ras człowieka).

Jednym z przykładów zastosowania PCR w biologii molekularnej jest użycie tej techniki do analizy DNA zawartego w bakteriach. Możliwe jest sprawdzenie, czy bakterie zawierają określone DNA, bez konieczności jego izolowania. Pozwala to na przebadanie w krótkim czasie dużej liczby kolonii bakteryjnych.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Ćwiczenie polega na wykorzystaniu metody PCR i elektroforezy do sprawdzenia obecności wprowadzonego do bakterii DNA.

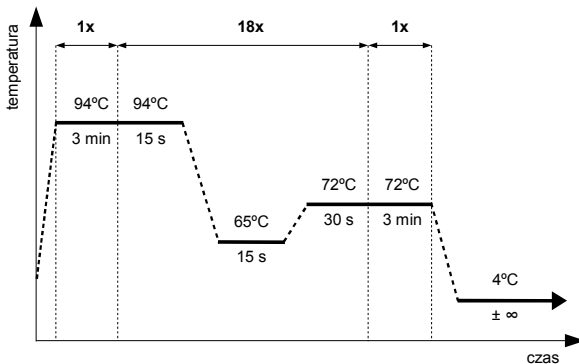
A. Przygotowanie matrycy i reakcja PCR

Sprzęt i odczynniki:

1. probówki 1.5 ml typu Eppendorf
2. probówki 0.5 ml do PCR
3. pipety automatyczne (2 - 20 μ l i 20 - 200 μ l)
4. jednorazowe końcówki do pipet
5. wytrząsarka typu vortex
6. blok grzejny (100°C)
7. mikrowirówka
8. termocykler
9. szalka (z pożywką i odpowiednim antybiotykiem) z bakteriami *Escherichia coli* (szczep XL1-Blue MRF^r), niosącymi plazmid pUC18/cDNAPpRas2
10. woda dejonizowana
11. mieszanina reakcyjna A 1.25x: 94 mM Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 0.0125% [v/v] Tween 20, 0.25 mM każdego dNTP, 3.125 mM MgCl₂, 0.5 μ M starter A1, 0.5 μ M starter A2 i 1.56 U polimerazy Taq (Fermentas)
12. mieszanina reakcyjna B 1.25x: 94 mM Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 0.0125% [v/v] Tween 20, 0.25 mM każdego dNTP, 3.125 mM MgCl₂, 0.5 μ M starter B1, 0.5 μ M starter B2 i 1.56 U polimerazy Taq (Fermentas)
13. olej mineralny
14. barwnik do elektroforezy oranż G 10x: 0.4% [w/v] oranż G, 50% [w/v] glicerol

Wykonanie:

1. Do 1.5 ml próbki typu Eppendorf odpipetować 50 µl wody (próbówka nr 1).
2. Z otrzymanej szalki przy pomocy jednorazowej końcówki przenieść pojedynczą kolonię bakteryjną do próbki nr 1, bakterie zawiesić w wodzie mieszając je na wytrząsarce typu vortex przez ok. 20 sekund.
3. Zawieszono bakterie inkubować przez 5 minut w rozgrzanym do temp. 100°C bloku grzejnym, a następnie zwirować w mikrowirówce przez 1 minutę w temp. pokojowej.
4. Z próbki nr 1 przenieść 10 µl supernatantu do 0.5 ml próbki do PCR (oznaczonej A lub B) zawierającej 40 µl mieszaniny reakcyjnej (A lub B), całość wymieszać.
5. Aby zapobiec parowaniu roztworu podczas reakcji PCR na powierzchnię próbek (w probówkach oznaczonych A lub B) przy użyciu pipety nałożyć 40 µl oleju mineralnego.
6. Tak przygotowaną próbkę wstawić do termocyklera i prowadzić reakcję amplifikacji według profilu termicznego przedstawionego na rys. 3.
7. Po zakończeniu reakcji PCR do próbki dodać 5 µl barwnika do elektroforezy oranż G 10x i zwirować w mikrowirówce przez 10 sekund.
8. Przeprowadzić rozdział elektroforetyczny 15 µl otrzymanej próbki w 1.5% żelu agarozowym.



Rys. 3. Profil termiczny przeprowadzanej reakcji PCR.

B. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Sprzęt i odczynniki:

1. pipeta automatyczna (2 - 20 µl)
2. aparat do elektroforezy
3. zasilacz
4. transiluminator UV ze szklaną płytką ochronną
5. kuchenka mikrofalowa
6. agaroz (w proszku)
7. bufor do elektroforezy TAE 1x: 40 mM Tris-octan, pH 7.6, 1 mM EDTA
8. bromek etydyny (1 µg ml⁻¹)
9. wzorzec wielkości DNA (100 bp DNA Ladder, Fermentas)

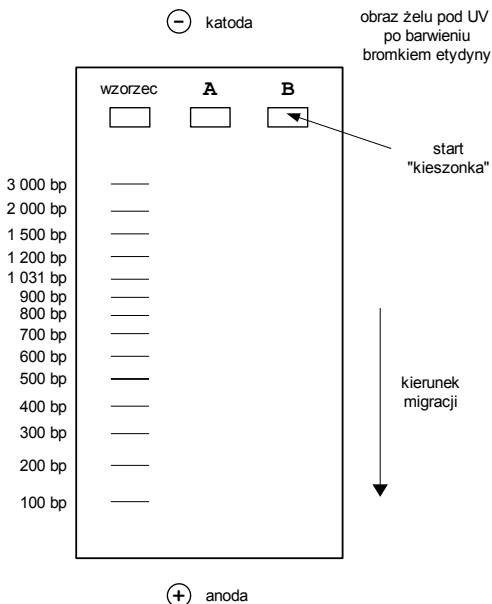
Wykonanie:

1. Odważyć 1.5 g agarozy potrzebnej do przygotowania 100 ml 1.5% żelu.
2. Do odważonej agarozy dodać bufor do elektroforezy TAE 1x i ogrzać w kuchence mikrofalowej do rozpuszczenia się agarozy.
3. Złożyć aparacik do elektroforezy (włożyć przekładki i grzebień).
4. Po lekkim schłodzeniu agarozy, wylać żel o grubości ok. 0.5 cm i pozostawić go do zastygnięcia.
5. Usunąć przekładki i grzebień, zalać żel buforem. Podłączyć aparat do zasilacza (elektroda ujemna od strony kieszonek, elektroda dodatnia od dolnej krawędzi żelu) i sprawdzić, czy płynie prąd.
6. Odłączyć aparat od zasilacza. Próbkę zawierającą barwnik do elektroforezy oranż G 10x nanieść na żel (do "kieszonki") i ponownie podłączyć aparat.
7. Prowadzić elektroforezę przy napięciu ok. 100 V prądu stałego przez ok. 1 godzinę.
8. Wyjąć żel z aparatu i włożyć do naczynia z roztworem bromku etydyny. Żel barwić przez ok. 10 minut.
9. Żel obejrzeć w świetle UV, korzystając z transiluminatora. Na rysunku jak poniżej nanieść pozycje prążków DNA, powstałego w próbkach A i B.

Uwaga!

⚠ Bromek etydyny jest silnym mutagenem i umiarkowanie silną trucizną. Należy założyć rękawiczki przed każdą pracą z roztworami zawierającymi bromek etydyny.

⚠ Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest niebezpieczne i należy go unikać. Żele należy oglądać w UV po przykryciu ich płytką szklaną i po założeniu okularów.

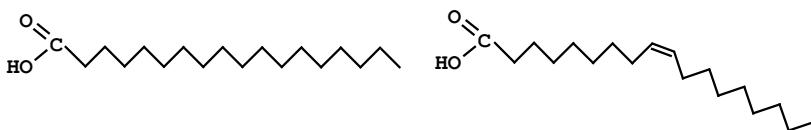


Ćw. 5. LIPIDY

Lipidy, zwane także tłuszczowcami, są bardzo zróżnicowaną grupą związków organicznych, charakteryzujących się słabą rozpuszczalnością w wodzie, a dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych (chloroform, eter etylowy, benzen, metanol). Lipidy spełniają w organizmach żywych wiele istotnych funkcji, m.in. służą jako źródło energii, są składnikami strukturalnymi błon biologicznych, niektóre wykazują silną aktywność biologiczną jako hormony lub witaminy. Lipidy i produkty ich metabolizmu uczestniczą także w przekazywaniu sygnałów w komórce.

Hydrofobowy charakter nadają wielu lipidom występujące w ich cząsteczkach reszty alifatyczne, np. reszty kwasów tłuszczowych czy reszty prenylowe. Lipidy zawierające kwasy tłuszczowe określa się mianem **acylolipidów**, zaś zawierające reszty prenylowe - **lipidów prenylowych**. Lipidy zawierające związane estrowo kwasy tłuszczowe nazywane są często lipidami zmydlającymi się, ponieważ podczas ogrzewania z zasadami ulegają one hydrolizie z utworzeniem soli kwasów tłuszczowych zwanych mydlami (sole sodowe i potasowe).

Kwasy tłuszczowe występujące w składzie lipidów mają na ogół parzystą liczbę atomów węgla (14 - 24, najczęściej 16 lub 18), mogą być nasycone lub nienasycone (zawierające jedno lub więcej niesprężonych wiązań podwójnych, rys. 1 i tab. 1).



Rys. 1. Wzór kwasu stearynowego (z lewej) i oleinowego (z prawej).

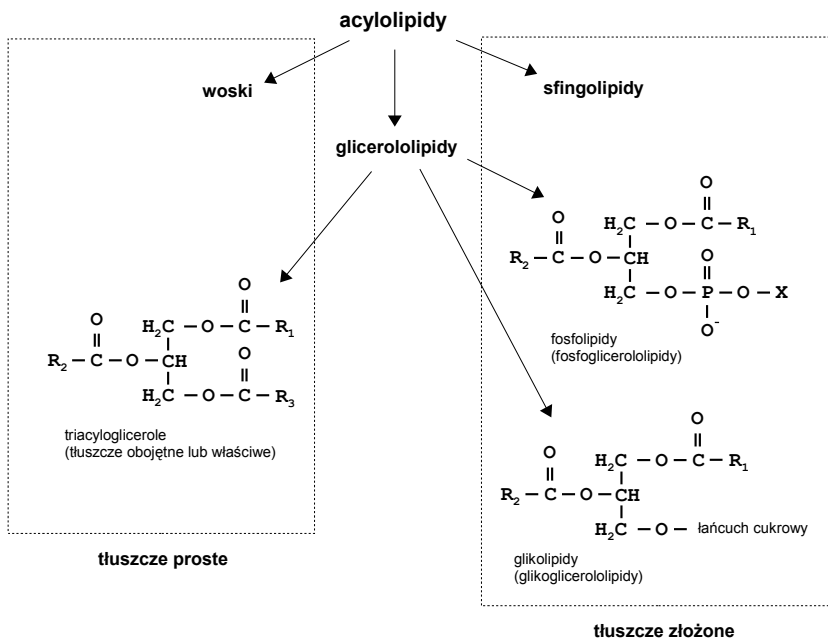
Liczba atomów węgla	Budowa	Nazwa potoczna kwasu	Temperatura topnienia (°C)
Nasycone kwasy tłuszczowe			
12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	laurynowy	44.2
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	palmitynowy	63.1
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	stearynowy	69.6
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	arachidonowy	76.5
Nienasycone kwasy tłuszczowe			
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	oleinowy	13.4
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	linolowy	- 5.0
18	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	linolenowy	- 11.0
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	arachidonowy	- 49.5

Tab. 1. Budowa i nazewnictwo niektórych naturalnie występujących kwasów tłuszczowych.

Właściwości kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, tj. acylo lipidów, w skład których wchodzi, zależą w znacznym stopniu od długości łańcucha i stopnia nienasycenia. Acylo lipidy, których cząsteczki zawierają nasycone kwasy tłuszczowe, mają w temp. pokojowej konsystencję stałą, zaś acylo lipidy z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (często określane jako oleje) - zazwyczaj konsystencję ciekłą. Co najmniej dwa spośród

nienasyconych kwasów tłuszczowych (linolowy i linolenowy) muszą znajdować się w diecie człowieka, gdyż jego organizm nie potrafi ich syntetyzować. Są to tzw. niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT).

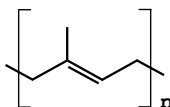
Do acylolipidów (rys. 2) zaliczane są glicerolipidy, woski i sfingolipidy. Najprostszymi glicerolipidami są **triacyloglicerole** (inaczej tłuszcze obojętne lub właściwe) będące estrami kwasów tłuszczowych i alkoholu – glicerolu; stanowią one najekonomiczniejszą formę zapasową paliwa energetycznego i występują powszechnie w organizmach żywych jako główne składniki tłuszczów zapasowych (szczególnie w komórkach tłuszczowych u kręgowców). **Woski** są estrami kwasów tłuszczowych i długołańcuchowych alkoholi alifatycznych; występują najczęściej jako warstwa ochronna na oskórku, skórze, sierści i piórach zwierząt oraz liściach i owocach roślin wyższych. Woski i triacyloglicerole nazywane są zbiorczo tłuszczami prostymi. Odrębną grupę acylolipidów stanowią **sfingolipidy**, w których zamiast glicerolu występuje długołańcuchowy aminoalkohol - sfingozyna, połączony z kwasem tłuszczowym wiązaniem amidowym. Sfingolipidy występują w szczególności dużych ilościach w mózgu i tkance nerwowej (w błonach neuronów i otoczkach mielinowych). Niektóre acylolipidy zawierają dodatkowo w cząsteczkach reszty kwasu fosforowego lub reszty cukrowe; określa się je odpowiednio mianem **fosfolipidów** oraz **glikolipidów**. Fosfolipidy, glikolipidy i sfingolipidy nazywane są zbiorczo tłuszczami złożonymi. Reszta fosforanowa fosfolipidów może być zestyfikowana cząsteczką alkoholu (np. seryny, etanoloaminy, choliny lub inozytolu). Na rys. 2 przedstawiono jedynie fosfo- i glikolipidy należące do grupy glicerololipidów.



Rys. 2. Niektóre grupy acylolipidów występujące w organizmach żywych. R₁, R₂ lub R₃ – reszta kwasu tłuszczowego, X – reszta alkoholu, np. seryny, etanoloaminy, choliny lub inozytolu.

Fosfo- i glikolipidy stanowią, wraz z należącymi do lipidów prenylowych sterolami, fazę lipidową błon biologicznych. Cząsteczki fosfo- i glikolipidów mają charakter amfipatyczny (amfifilowy), jeden z końców cząsteczki ma właściwości hydrofilowe, a drugi - hydrofobowe. Amfipatyczne właściwości cząsteczek powodują, że w środowisku wodnym lipidy tworzą micelle lub struktury o budowie dwuwarstw, w których na zewnątrz skierowane są hydrofilowe (polarne) głowy, a do wnętrza hydrofobowe ogony.

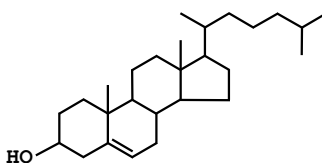
Lipidy prenylowe, zwane lipidami izoprenowymi, izoprenoidami lub terpenoidami, zbudowane są z różnej liczby powtarzających się pięciowęglowych, rozgałęzionych reszt izoprenowych (rys. 3).



Rys. 3. Reszta izoprenowa.

Do lipidów prenylowych zalicza się wiele biologicznie ważnych substancji, pełniących różnorodne funkcje w komórkach roślinnych i zwierzęcych, m. in. wiele hormonów (np. estrogeny, androgeny, kortykoidy u kręgowców, ekdyzyny i hormon juwenilny u owadów, gibereliny i kwas absycosowy u roślin). Z reszt izoprenowych, w całości lub części, zbudowane są cząsteczki witamin grup A, D, E i K. Ubichiny i plastochiny - przenośniki elektronów w łańcuchu oddechowym i fotosyntetycznym - zawierają łańcuchy zbudowane z reszt prenylowych, kotwiczące je w dwuwarstwie lipidowej błon. Występujące w tylakoidach chloroplastów chlorofile a i b zawierają w cząsteczce diterpenowy alkohol - fitol, estrowo związany z cyklicznym układem tetrapirolowym.

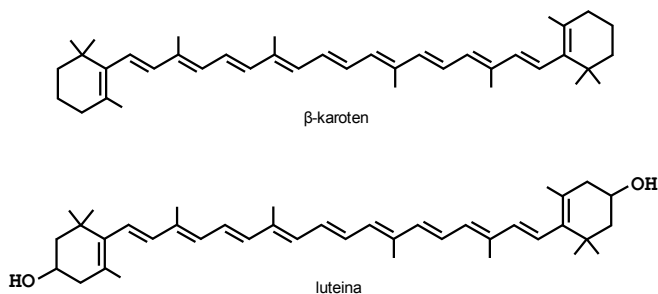
Jedną z ważniejszych grup lipidów prenylowych są **steroidy**, do których należą sterole.



Rys. 4. Wzór strukturalny cholesterolu.

Sterole wchodziły w skład błon wszystkich komórek eukariotycznych, a ponadto są prekursorami wielu ważnych biologicznie związków, np. hormonów. Cholesterol (rys. 4), jako strukturalny składnik błon komórek zwierzęcych moduluje ich płynność, jest także prekursorem pięciu głównych klas hormonów steroidowych, witamin z grupy D oraz kwasów żółciowych. Funkcję składnika błon u roślin wyższych pełnią tzw. fitosterole, np. sitosterol.

Inna grupa lipidów prenylowych to **karotenoidy**, obejmujące karoteny i ksantofile (rys. 5).



Rys. 5. Przykłady karotenoidów.

Są one wysokonienasyconymi tetraterpenami o cząsteczkach liniowych lub częściowo scyklizowanych. U roślin związki te chronią fotoukłady przed fotooksydacją i służą jako pomocnicze barwniki fotosyntetyczne. Ich barwa (od żółtej do czerwonej) uwarunkowana jest liczbą podwójnych wiązań sprzężonych. Karotenoidy są niezbędne także u zwierząt do recepcji światła w procesie widzenia. β -karoten jest prekursorem witaminy A i jej pochodnej retinalu, chromoforu występującego we wszystkich znanych barwnikach wzrokowych.

Standardową metodą izolowania lipidów z materiału biologicznego jest ich ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, np. mieszaniną chloroform: metanol. Do rozdzielania mieszanin lipidów i ich identyfikacji stosuje się metody chromatografii adsorpcyjnej i podziałowej (np. cieczo-gazowej lub cieczo-cieczowej).

Chromatografia adsorpcyjna jest metodą rozdzielania składników analizowanej mieszaniny wykorzystującą różnice siły adsorpcji poszczególnych związków na powierzchni ciała stałego (stanowiącego fazę stacjonarną) – adsorbenta. Różnice siły adsorpcji wynikają z różnicy polarności rozdzielanych związków i zależą od ich budowy chemicznej. Adsorbenty stosowane w chromatografii adsorpcyjnej dzieli się, ze względu na ich siłę sorpcji, na trzy grupy: silne (np. tlenki magnezu i glinu, węgiel aktywny), średnie (np. żel krzemionkowy, węglany oraz fosforany magnezu i wapnia) oraz słabe (np. ziemia krzemkowa). Fazę ruchomą w chromatografii adsorpcyjnej stanowi rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników. Parametrem charakteryzującym te rozpuszczalniki jest związana z ich polarnością siła elucyjna (tym większa, im bardziej polarny jest rozpuszczalnik). Zgodnie z rosnącą siłą elucyjną można rozpuszczalniki uporządkować w tzw. szereg eluotropowy: heksan, toluen, chloroform, eter etylowy, octan etylu, aceton, etanol, metanol, woda. Im większa siła elucyjna rozpuszczalnika, tym silniej wypiera on z powierzchni adsorbenta zaadsorbowane związki. Tak więc ruch rozpuszczalnika powoduje przemieszczanie się rozdzielanych związków, tym szybsze, im większa jest siła elucyjna rozpuszczalnika i słabsza adsorpcja danego związku.

Siła adsorpcji rozdzielanych związków zależy od budowy ich szkieletów węglowych oraz rodzaju i liczby grup funkcyjnych w cząsteczce. Wprowadzenie do cząsteczki węglowodoru grupy funkcyjnej powoduje wzrost polarności związku, a tym samym jego silniejsze oddziaływanie z adsorbentem. Ze względu na wzrastającą wypadkową polarność cząsteczki, grupy funkcyjne można uszeregować w następującej kolejności: wiązanie podwójne, przyłączony chlorowec, ugrupowanie estrowe, grupa karbonylowa, hydroksylowa, aminowa, karboksylowa. Im związek bardziej polarny, tym silniej jest adsorbowany na powierzchni fazy stacjonarnej (czyli wolniej migruje na płytce).

Do rozdzielania związków metodą chromatografii adsorpcyjnej wykorzystuje się technikę kolumnową lub cienkowarstwową. Preparatywne rozdzielanie mieszanin związków metodą chromatografii adsorpcyjnej przeprowadza się z reguły stosując kolumnę, czyli uformowany w rurce szklanej słup adsorbenta, przez który przepływa odpowiednio dobrany rozpuszczalnik (albo mieszanina rozpuszczalników). W chromatografii cienkowarstwowej adsorbent stanowi cienką warstwę na powierzchni płytki plastikowej lub szklanej.

Ruchliwość chromatograficzną związków w technice cienkowarstwowej opisuje współczynnik przesunięcia chromatograficznego R_f , będący stosunkiem drogi przebytej przez dany związek do drogi przebytej przez rozpuszczalnik ($R_f \leq 1$). Na jego podstawie można m. in. porównać własności chromatograficzne badanych związków i wzorców.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Celem ćwiczenia jest otrzymanie ekstraktu lipidowego z roślin i rozdzielenie jego składników metodą cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej.

Sprzęt i odczynniki:

1. moździerz porcelanowy
2. skalpel
3. lejek Schotta oraz szklany
4. kolba ssawkowa
5. bibuła filtracyjna
6. pipety Pasteura
7. zlewka 25 ml
8. kapilary szklane
9. suszarka fryzjerska
10. płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym (5 x 20 cm)
11. kamery do chromatografii - 2 szt.
12. cylinder miarowy 100 ml
13. spryskiwacz do płytek
14. suszarka laboratoryjna
15. materiał roślinny
16. chloroform
17. metanol
18. Na_2SO_4 , bezwodny
19. układ rozpuszczalników do chromatografii cienkowarstwowej I: chloroform : metanol (9:1; [v/v])
20. układ rozpuszczalników do chromatografii cienkowarstwowej II: heksan : etanol : toluen (40:4:5:15; [v/v])
21. 50% kwas siarkowy

Wykonanie:

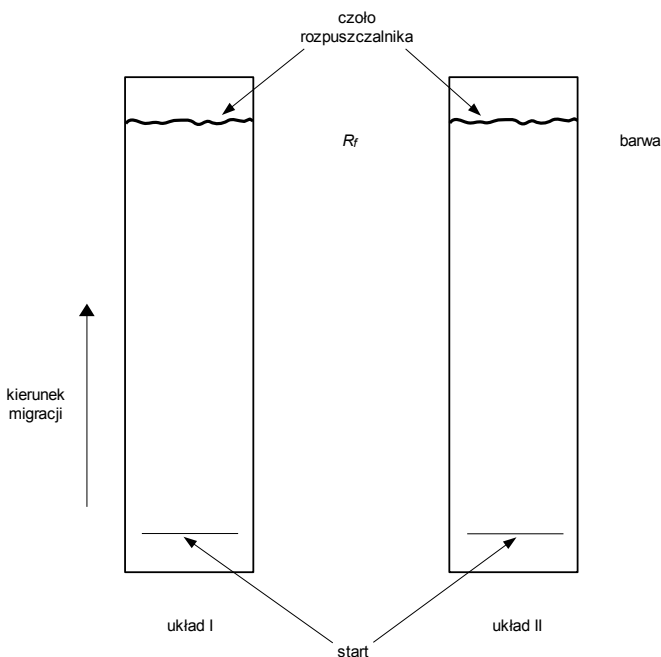
1. Otrzymywanie ekstraktu lipidowego

Ok. 1 g materiału roślinnego, otrzymanego od prowadzącego zajęcia, pokroić skalpelem. Rozdrobniony materiał utrzeć z 8 g bezwodnego siarczanu sodu. Uarty materiał przenieść na lejek Schotta, zalać 10 ml mieszaniny chloroform : metanol (2:1; [v/v]) i przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem do suchej kolby ssawkowej. Pozostałość na lejku przemyć 5 ml mieszaniny chloroform : metanol (2:1; [v/v]). Uzyskany ekstrakt przelać do 25 ml zlewki i odparować rozpuszczalniki za pomocą suszarki fryzjerskiej w strumieniu zimnego powietrza. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny chloroform : metanol (2:1; [v/v]).

Uwaga! Odparowywanie rozpuszczalników przeprowadzać pod wyciągiem.

2. Chromatografia cienkowarstwowa adsorpcyjna

Uzyskany ekstrakt lipidowy (patrz pkt 1) nanieść przy pomocy kapilary na dwie gotowe płytki do chromatografii cienkowarstwowej, pokryte SiO_2 . Ekstrakt nanosić na płytkę pasmem o długości ok. 1 cm, odległym od dolnej krawędzi płytki o 1 cm. Nanoszenie prowadzić tak długo, aż pasmo będzie intensywnie barwne. Jedną płytkę umieścić w kamerze z układem rozpuszczalników I – chloroform : metanol (9:1), a drugą z układem II – heksan : etanol : toluen (40:4.5:15). Płytki rozwijać do czasu, aż czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości ok. 0.5 cm od górnej krawędzi płytki. Płytki wyjąć z kamery i zaznaczyć czoło rozpuszczalnika. Płytkę wyjętą z kamery z układem I po wysuszeniu spryskać 50% H_2SO_4 i wywołać w gorącej suszarce. Na rysunku jak poniżej nanieść pozycje plam. Obok podać barwę plam i obliczone wartości R_f .



Ćw. 6. ENZYMY

Enzymy są biokatalizatorami, które obniżają energię aktywacji i zwiększają szybkość reakcji chemicznej, przyspieszając tym samym osiągnięcie stanu równowagi, same przy tym nie ulegają zmianie. **Energia aktywacji** to minimalna energia umożliwiająca zajście reakcji chemicznej. **Stan równowagi reakcji** jest momentem, w którym szybkość reakcji w kierunku tworzenia produktu równa jest szybkości jego rozpadu i ponownego tworzenia substratu. Szybkość wypadkowa reakcji znajdującej się w stanie równowagi jest wobec tego równa zero. **Szybkość reakcji** to zmian stężenia substratu lub produktu w jednostce czasu, określa ona aktywność enzymu.

Na szybkość reakcji enzymatycznej wpływają warunki środowiska takie jak temperatura, pH, czy siła jonowa, które mogą zmieniać strukturę przestrzenną miejsca aktywnego enzymu lub wpływać na stan substratu (np. na jego jonizację). **Centrum aktywne** (stosunkowo niewielka część całej cząsteczki enzymu) to region wiążący substrat i przekształcający go w produkt. Często jest nim szczelina lub zagłębienie w powierzchni enzymu utworzone przez specyficzne reszty aminokwasowe (tzw. grupy katalityczne). Za właściwości katalityczne enzymów odpowiada przestrzenna budowa białka oraz obecność grup funkcyjnych biorących udział w reakcji na poziomie molekularnym. Pierwszym etapem reakcji enzymatycznej jest faza pre-stacjonarna, która trwa ułamki sekund. Tworzy się wtedy **kompleks enzym-substrat (ES)**, który przechodzi w **aktywny kompleks ES***. Następnie rozpoczyna się faza stacjonarna reakcji, w której zachodzi przekształcanie kompleksu **ES*** w **kompleks enzym-produkt (EP)** i wreszcie rozpad kompleksu EP na enzym i produkt.



Faza stacjonarna charakteryzuje się stałą szybkością reakcji. Wyróżnia się jeszcze fazę poststacjonarną, w której reakcja zmierza do stanu równowagi. Istnieją dwa modele wyjaśniające wiązanie substratu przez enzym: **A - model zamka i klucza**, w którym substrat idealnie pasuje do miejsca aktywnego enzymu oraz **B - model indukowanego dopasowania**, w którym substrat wiążąc się z enzymem indukuje zmiany konformacyjne w centrum aktywnym. W przeciwieństwie do katalizatorów chemicznych enzymy wykazują wysoką specyficzność względem katalizowanej reakcji i substratu (**specyficzność katalityczna i substratowa**). Jeden enzym katalizuje zwykle pojedynczą reakcję lub grupę reakcji pokrewnych.

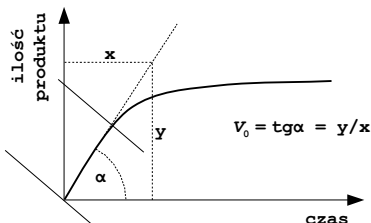
Niektóre substancje mogą hamować aktywność enzymu (**inhibitory**), bądź przez konkurowanie z substratem o centrum aktywne (**hamowanie współzawodnicze**), bądź przez oddziaływanie z enzymem poza centrum aktywnym (**hamowanie niewspółzawodnicze**), z drugiej strony enzymy mogą być też aktywowane przez tzw. aktywatory reakcji. Niezbędnym warunkiem prawidłowego przebiegu metabolizmu komórkowego jest możliwość regulowania aktywności enzymów. Enzymy kluczowe dla funkcjonowania danego szlaku metabolicznego to tzw. **enzymy regulatorowe**, które katalizują zwykle reakcje będące w stanie oddalonym od stanu równowagi.

Co więcej aktywność enzymów może być modulowana przez: (a) regulację syntezy i degradacji białka enzymatycznego, (b) odwracalną kowalencyjną modyfikację enzymu (np. fosforylacja, ADP-rybozylacja, adenylacja), oraz (c) selektywną proteolizę. Aktywność **enzymów allosterycznych** (enzymy których krzywa progresji (rys. 1) ma postać sigmoidalną, zwykle posiadają więcej niż jedno miejsce aktywne, a związanie cząsteczki substratu ułatwia wiązanie kolejnych cząsteczek) - może być modyfikowana przez drobnocząsteczkowe efekторы przyłączające się w specyficznym miejscu enzymu (miejsce efektorowe).

Prawie wszystkie enzymy to białka, niemniej zidentyfikowano cząsteczki RNA o aktywności katalitycznej - **rybozomy**. Niektóre enzymy są białkami złożonymi, obok części białkowej (**apoenzymu**) zawierają też **kofaktor** nie będący polipeptydem. Apoenzym połączony z kofaktorem tworzy **holoenzym**. Rolę kofaktora może odgrywać jon metalu lub cząsteczka organiczna (**koenzym**). Kofaktor związany z enzymem kowalencyjnie to **grupa prostetyczna**.

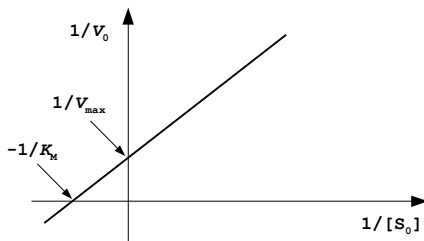
Przy danym stężeniu enzymu **szybkość reakcji (V)** zależy od warunków środowiska (temperatura, pH, siła jonowa, ciśnienie) opisywanych jako **stała szybkości reakcji (k)** oraz od **stężenia substratu [S]**, $V = k[S]$. Szybkość reakcji enzymatycznej mierzy się oznaczając zmiany stężenia / ilości substratu lub produktu w czasie. Przebieg reakcji (zmiany stężeń / ilości reaktantów, czyli substratów i produktów w czasie) można przedstawić w postaci wykresu - **krzywej progresji reakcji** (rys.1). Wykorzystując prostoliniowy odcinek krzywej progresji (faza stacjonarna reakcji) wyznacza się **szybkość początkową reakcji (V₀)**, która mówi nam o szybkości reakcji przy danym **stężeniu początkowym substratu (S₀)**. W pewnym zakresie stężeń substratu, dodając go do mieszaniny reakcyjnej, można zwiększać szybkość początkową reakcji, aż do osiągnięcia jej wartości maksymalnej. W tym momencie dodawanie kolejnych porcji substratu nie zmienia już szybkości powstawania produktu. Oznacza to, że

reakcja osiągnęła **szybkość maksymalną** (V_{max}), a wszystkie cząsteczki enzymu znajdujące się w układzie są wysycone substratem. V_{max} jest wartością charakterystyczną dla reakcji enzymatycznej przy danym stężeniu enzymu i odpowiada maksymalnej wartości szybkości początkowej.



Rys. 1. Krzywa progresji reakcji enzymatycznej; jej prostoliniowy odcinek jest zawarty między dwoma ukośnymi liniami.

Kolejną wartością charakteryzującą reakcję enzymatyczną jest **stała Michaelisa** (K_M), będąca miarą trwałości kompleksu ES. Odpowiada ona takiemu stężeniu substratu przy którym reakcja osiąga połowę szybkości maksymalnej. Obie stałe (V_{max} i K_M) informują o właściwościach kinetycznych enzymu badanego in vitro. Stałe te można wyznaczyć eksperymentalnie mierząc serię szybkości początkowych reakcji przy różnych stężeniach początkowych substratu, a następnie sporządzając wykres zależności szybkości początkowych reakcji od stężeń początkowych substratu. W praktyce dogodnie jest wykorzystanie wykresu zależności odwrotności odwrotności szybkości początkowych od odwrotności stężeń początkowych - **wykres Lineweavera-Burka** (rys. 2), z którego, w miejscu przecięcia osi X i Y, w prosty sposób odczytuje się wartości obu stałych.



Rys. 2. Wykres Lineweavera-Burka.

Aktywność enzymów podaje się w **jednostkach aktywności enzymatycznej (U)** – jest to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 μ mola substratu w ciągu 1 minuty, w optymalnych warunkach. Wartością charakteryzującą preparat enzymatyczny jest **aktywność właściwa** wyrażana w liczbie jednostek aktywności enzymatycznej na mg białka preparatu (U/mg). Często podaje się też **aktywność molekularną** (dawniej liczba obrotów) - jest to liczba cząsteczek substratu przekształconych przez cząsteczkę enzymu w ciągu jednej minuty, w optymalnych warunkach.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Celem ćwiczenia jest zbadanie aktywności enzymu – bakteryjnej β -galaktozydazy w roztworach o różnym stężeniu początkowym substratu, poprzez wyznaczenie szybkości początkowych reakcji dla danych początkowych stężeń substratu, wartości stałej Michaelisa K_M oraz szybkości maksymalnej V_{max} . Enzym ten jest produkowany metodami inżynierii genetycznej w komórkach drożdży, co pozwala na łatwe uzyskanie dużych ilości materiału do ćwiczenia. β -galaktozydaza katalizuje hydrolizę wiązań O-glikozydowego. Substratem reakcji będzie bezbarwny o-nitrofenylo- β -D-galaktozyd (ONPG), w wyniku hydrolizy którego powstaje o-nitrofenol barwiący mieszaninę reakcyjną na żółty kolor. Na podstawie mierzonej spektrofotometrycznie absorbancji roztworu, korzystając z prawa

Lamberta-Beera (patrz ćw. 3, $c = A/\epsilon l$), można wyliczyć stężenie powstałego *o*-nitrofenolu ($\epsilon_{420} = 4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a następnie jego ilość w całej mieszaninie reakcyjnej.

Sprzęt i odczynniki:

1. pipeta automatyczna (100 - 1000 μl)
2. pipety serologiczne
3. probówki chemiczne
4. zlewki szklane
5. łaźnia wodna (30°C)
6. spektrofotometr (Spekol 11)
7. woda dejonizowana
8. homogenat drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*, zawierający bakteryjną β -galaktozydazę
9. 5 mM *o*-nitrofenylo- β -D-galaktozyd (ONPG) w 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
10. 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
11. bufor R: 60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4
12. bufor "stop": 1 M Na_2CO_3

Wykonanie:

1. Oznaczenie aktywności β -galaktozydazy

Przygotować 20 probówek oznaczonych odpowiednio A₀ do A₄, B₀ do B₄, C₀ do C₄, D₀ do D₄, do wszystkich odpipetować po 0.6 ml buforu "stop" (1M Na_2CO_3). Następnie do czterech osobnych probówek opisanych A, B, C i D odmierzyć wg poniższej tabeli:

Probówka	5mM ONPG	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	Bufor R
A	-	1 ml	9 ml
B	0.25 ml	0.75 ml	9 ml
C	0.5 ml	0.5 ml	9 ml
D	1 ml	-	9 ml

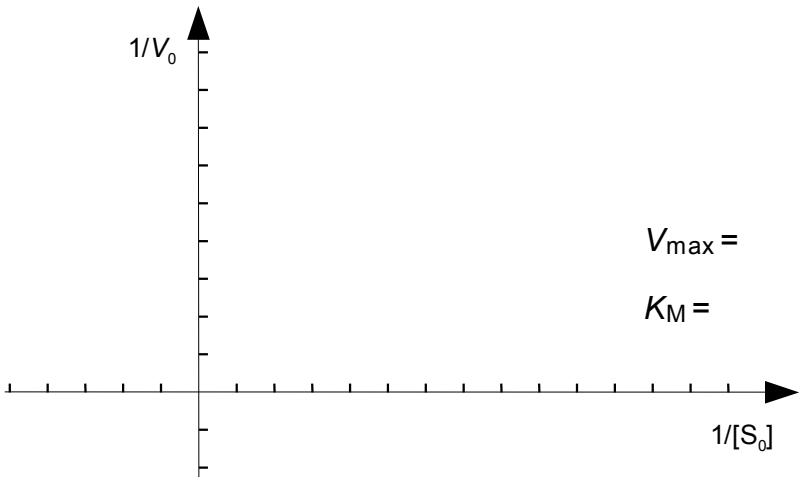
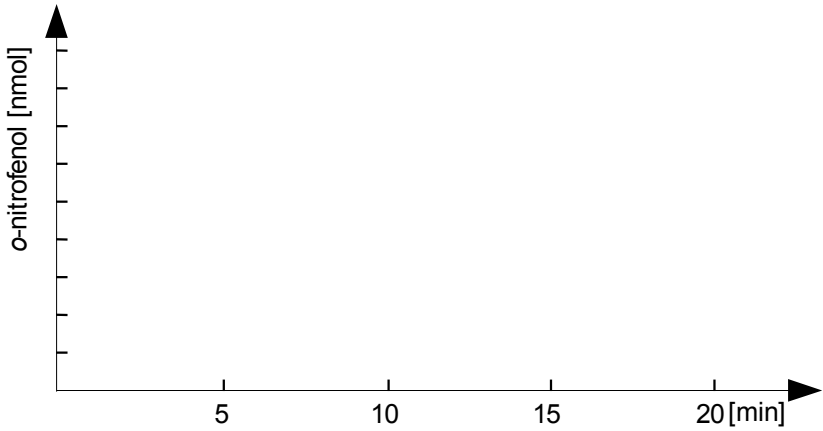
Zawartość probówek A, B, C i D wymieszać dokładnie i wstawić do łaźni wodnej o temp. 30°C, po 2 - 3 minutach preinkubacji do każdej z probówek dodać po 0.5 ml homogenatu drożdży. Próby dokładnie wymieszać, natychmiast pobrać z każdej z nich 1.5 ml mieszaniny reakcyjnej i przenieść do probówek oznaczonych A₀, B₀, C₀ i D₀ (próby odniesienia). Probówki A, B, C, D pozostawić w łaźni wodnej i inkubować dalej w temp. 30°C, co 5 minut pobierając 1.5 ml próby i przenosząc do odpowiednich probówek (po 5 minutach do probówek oznaczonych 1, po 10 minutach do probówek oznaczonych 2, po 15 minutach do probówek oznaczonych 3, po 20 minutach do probówek oznaczonych 4).

Po zakończeniu reakcji zmierzyć absorbancję we wszystkich pobranych próbach (A₁ do A₄, B₁ do B₄, C₁ do C₄, D₁ do D₄) przy długości fali 420 nm, stosując jako próby materiałowe te pobrane w czasie 0 reakcji (A₀, B₀, C₀ i D₀). Na podstawie absorbancji obliczyć stężenie produktu (*o*-nitrofenolu) w każdej próbie. Przeliczyć je na stężenie wyrażone w μM i obliczyć ilość *o*-nitrofenolu wyrażoną w nmol w całej mieszaninie reakcyjnej (10.5 ml), biorąc poprawkę na rozcieńczenie prób buforem stop. Obliczone w ten sposób wartości wpisać do tabeli jak poniżej, a następnie sporządzić osobne wykresy jak poniżej, dla każdego stężenia początkowego substratu (ONPG), odkładając na osi X czas w minutach, a na osi Y ilość *o*-nitrofenolu w nmol. Z prostoliniowego odcinka każdej krzywej wyznaczyć szybkość początkową reakcji $V_0 = \text{tg}\alpha = y/x$ [nmol min^{-1}] (patrz rys. 1).

2. Wyznaczenie stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej reakcji

Znając wartości V_0 dla różnych stężeń początkowych substratu S_0 sporządzić jak poniżej wykres Lineweavera-Burka, odkładając na osi X odwrotności stężeń początkowych ONPG [mM^{-1}], a na osi Y odwrotności szybkości początkowych reakcji [min nmol^{-1}]. Z wykresu odczytać wartości K_M i V_{max} (patrz rys. 2).

Stężenie początkowe substratu (ONPG) [mM]	Ilość produktu (o-nitrofenolu) po czasie reakcji [nmol]				Szybkość początkowa
	5 min	10 min	15 min	20 min	
(B)					
(C)					
(D)					



Regulamin ćwiczeń

1. Do zaliczenia ćwiczeń wymagane jest wykonanie 5 zajęć praktycznych oraz pozytywna ocena z kolokwium.
2. Ocena końcowa z ćwiczeń zostanie wystawiona na podstawie oceny z kolokwium. Ocena ta może być podniesiona o pół stopnia w przypadku osób, które wykazały się wyróżniającym wykonaniem zajęć praktycznych.
3. Osoby, które w trakcie kolokwium będą korzystały z zabronionych pomocy lub będą je piisały niesamodzielnie, automatycznie otrzymają ocenę niedostateczną. Ponadto, o samym fakcie nieetycznego zachowania zostanie niezwłocznie powiadomiony Dziekanat.
4. Osobom, które nie stawia się na kolokwium w pierwszym terminie i nie dostarczą kierownikowi ćwiczeń w ciągu siedmiu dni (licząc od dnia kolokwium) stosownego zwolnienia lekarskiego, pozostaje jedynie drugi termin kolokwium. W przypadku powtórzenia się takiej sytuacji przy drugim terminie, osoby takie otrzymają automatycznie ocenę niedostateczną.
5. W pomieszczeniu pracowni należy zachować ostrożność, porządek i czystość.
6. W pomieszczeniu pracowni należy nosić bezpieczne obuwie i fartuch laboratoryjny, a przy pracy z substancjami szkodliwymi jednorazowe rękawiczki gumowe i okulary ochronne. Okrycia wierzchnie należy pozostawiać w szatni przy wejściu do budynku Wydziału.
7. Opuszczając stanowisko pracy sprawdzić, czy wszystkie zbędne urządzenia elektryczne, gaz i woda zostały wyłączone, drobny sprzęt odłożony na miejsce, a użyte naczynia laboratoryjne umyte i odłożone do suszenia.
8. Studenci nie mogą pracować w pomieszczeniu pracowni bez opieki pracownika dydaktycznego.
9. W pomieszczeniu pracowni nie wolno palić tytoniu, spożywać posiłków i napojów, aplikować kosmetyków. Nie używać do celów spożywczych jakichkolwiek naczyń laboratoryjnych.
10. Odczynniki należy przechowywać w należyłym porządku. Nie wolno trzymać żadnych substancji w nie podpisanych opakowaniach. Łatwopalne rozpuszczalniki, stężone kwasy i zasady można przechowywać w pomieszczeniu pracowni pod wyciągiem, tylko w ilościach zaspakajających bieżące potrzeby.
11. Prace z rozpuszczalnikami organicznymi należy prowadzić przy sprawnie działającej wentylacji. Podczas pracy nie wolno używać otwartego ognia. Etanol używany podczas ćwiczeń jest skażony.
12. Prace z kwasami i zasadami należy prowadzić pod sprawnie działającym wyciągiem chemicznym.
13. Nigdy nie należy pipetować ustami substancji trujących, żrących lub innych szkodliwych dla zdrowia.
14. Odpadów substancji, które mogą stanowić zagrożenie dla środowiska naturalnego nie wolno wyrzucać do koszy na śmieci lub wylewać do zlewów. Należy je składować w specjalnych pojemnikach lub zlewać do odpowiednich butelek i przechowywać pod wyciągiem, skąd będą okresowo zabierane do przetworzenia.
15. Odpady innych stężonych substancji można wylewać do zlewu po ich znacznym rozcieńczeniu i obfitym jego splukaniu wodą z kranu.
16. Ze szczególną starannością obchodzić się z pipetami automatycznymi. Używać ich tylko z jednorazowymi końcówkami i nastawiać je tylko na wartości z przedziału podanego na tłoku pipety.
17. W trakcie doświadczeń z użyciem prądu zachować szczególną ostrożność. Zawsze upewnić się czy otwierany aparat (urządzenie) odłączony jest od zasilacza (prądu), a sam zasilacz wyłączony.
18. Okna w pomieszczeniu pracowni można uchylać tylko w pozycji pionowej. Nie otwierać ich na oścież.
19. W razie zaistnienia nawet najmniejszego wypadku należy niezwłocznie powiadomić osobę prowadzącą ćwiczenia.
20. Na pracowni obowiązuje zakaz korzystania z telefonów komórkowych lub odtwarzaczy MP3, gry w karty itp. oraz zabronione jest rejestrowanie dźwięku lub obrazu bez wiedzy i zgody osób prowadzących ćwiczenia.

Spis literatury

(dowolne wydanie po 2000 r.)

1. **Ćwiczenia z biochemii**, PWN, Warszawa 2003 (pod redakcją: L. Klyszejko-Stefanowicz).
2. **Krótkie wykłady: Biochemia**, PWN, Warszawa 2004 (autorzy: D.B. Hames i N.M. Hooper).
3. **Krótkie wykłady: Immunologia**, PWN, Warszawa 2005 (autorzy: P.M. Lydyard, A. Whelan i M.W. Fanger).
4. **Genomy**, PWN, Warszawa 2001 (autor: T.A. Brown).
5. **Biochemia**, PWN, Warszawa 2005 (autorzy: J.M. Berg, J.L. Tymoczko i L. Stryer).
6. **Biochemistry and Molecular Biology**, OUP, Oxford 2001 (autorzy: W.H. Elliott and D.C. Elliott).

Obsługa pipet automatycznych

Pipety automatyczne są delikatnymi urządzeniami, przeznaczonymi do precyzyjnego odmierzania małych objętości cieczy – tysięcznych części mililitra (μl) roztworów wodnych. W pracowni dostępne są trzy modele pipet. Dwie **pipety z żółtym wykończeniem używane są wyłącznie z małymi końcówkami** do odmierzania objętości z przedziału 2 - 20 μl lub 20 - 200 μl (objętości te zaznaczone są na przycisku tłoka). **Pipeta z zielonym wykończeniem używana jest wyłącznie z dużymi końcówkami** do odmierzania objętości z przedziału 100 - 1000 μl .

Nastawianie żądanej objętości odbywa się poprzez obrót czarnego pokręćła. **Nie wolno nastawiać pipet poniżej lub powyżej ich zakresu pojemności roboczej, gdyż powoduje to ich uszkodzenie.**

Najmniejsza pipeta (2 - 20 μl) nastawiona na 2 μl , ma na liczniku wartość **020**, zaś nastawiona na 20 μl , ma na liczniku wartość **200**, przy czym ostatnia cyfra (od 0 do 9) odnosząca się do dziesiątych części μl jest czzerwona.

Średnia pipeta (20 - 200 μl) nastawiona na 20 μl , ma na liczniku wartość **020**, zaś nastawiona na 200 μl , ma na liczniku wartość **200**, przy czym wszystkie cyfry są czarne.

Największa pipeta (100 - 1000 μl) nastawiona na 100 μl , ma na liczniku wartość **010**, zaś nastawiona na 1000 μl , ma na liczniku wartość **100**, przy czym pierwsza cyfra (0 lub 1) jest czzerwona.

Pipet używać zawsze z końcówkami, które są jednorazowe, a ich zakładanie i zdejmowanie nie wymaga dotykania ich palcami.

W celu pipetowania, założyć odpowiednią końcówkę poprzez delikatne wbicie pipety w jedną z końcówek w pudełku, które należy przytrzymać drugą ręką. Nacisnąć przycisk tłoka (ten z zaznaczonym przedziałem roboczej pojemności pipety) do pierwszego oporu. Zanurzyć końcówkę na głębokość ~ 1 cm do odpipetowywanego roztworu i powoli zwolnić tłok. Wyciągnąć napełnioną końcówkę z roztworu i wprowadzić ją do docelowego naczynia, np. probówki. Nacisnąć powoli przycisk tłoka, aż do drugiego oporu. Wyciągnąć opróżnioną końcówkę z naczynia i delikatnie zwolnić tłok. Nad pojemnikiem na zużyte końcówki nacisnąć przycisk wypychacza do końcówek (ten karbowany), aż użyta końcówka zsunie się z pipety.

Obliczenia biochemiczne

Rozcieńczenia: W celu dokonania 2-krotnego rozcieńczenia roztworu, należy zmieszać ze sobą 1 jego objętość i 1 objętość wody dejonizowanej, np. mając 10 mM roztwór wyjściowy i chcąc otrzymać 2 ml 5 mM roztworu końcowego, należy zmieszać ze sobą 1 ml roztworu wyjściowego i 1 ml wody dejonizowanej.

W celu dokonania 10-krotnego rozcieńczenia roztworu, należy zmieszać ze sobą 1 jego objętość i 9 objętości wody dejonizowanej, np. mając 10 mM roztwór wyjściowy i chcąc otrzymać 2 ml 1 mM roztworu końcowego, należy zmieszać ze sobą 0.2 ml roztworu wyjściowego i 1.8 ml wody dejonizowanej.

W celu dokonania większych rozcieńczeń, należy wykonywać je etapami, np. dla 50-krotnego rozcieńczenia, wpierw wykonujemy 10-krotne rozcieńczenie, a następnie z tak otrzymanego roztworu przygotowujemy 5-krotne rozcieńczenie. Końcowy roztwór jest więc rozcieńczony 10×5 , czyli 50-krotnie.

Obliczanie zawartości substancji w roztworze o znanym stężeniu molowym: Chcąc określić ilość substancji w gramach w objętości roztworu o znanym stężeniu molowym, należy wpierw obliczyć jej zawartość w molach w tej objętości roztworu, a następnie przeliczyć wynik w molach na gramy, wykorzystując znajomość masy molowej tej substancji. Dla przykładu, należy obliczyć ile miligramów glukozy znajduje się w 100 ml 20 mM roztworu glukozy, której masa molowa wynosi 180 g. W tym celu należy dokonać następujących obliczeń:

1. Przeliczyć milimole na mole: 20 mM roztwór to inaczej 0.02 M roztwór.
2. Roztwór 0.02 M oznacza, że w jego 1 l, czyli 1000 ml znajduje się 0.02 mola substancji. Zatem, w 100 ml tego roztworu znajduje się pewna część tej substancji, która wynosi 100/1000, czyli 1/10 część tego, co w 1000 ml. W przeliczeniu na mole wynosi to $1/10 \times 0.02$ mola, czyli 0.002 mola substancji.
3. Masa molowa 180 g oznacza, że 1 mol substancji waży 180 g. 0.002 mola waży: $0.002/1$, czyli 1/500 tego co 1 mol, a więc $1/500 \times 180$ g, czyli 0.36 g.
4. Przeliczyć gramy na miligramy: 0.36 g równa się 360 mg.

Zatem, 100 ml tego roztworu zawiera 360 mg glukozy. Alternatywnie, powyższe obliczenia można przeprowadzić pozostając przy jednostkach z przedrostkiem "mil" (mmol i mg) i przyjmując, że 1 mmol glukozy waży 180 mg.

Zajęcia odbywają się w sali **221D**, na II piętrze budynku D Wydziału Biologii, przy ul. Miecznikowa 1.

Do zaliczenia ćwiczeń wymagane jest wykonanie **PIĘCIU** z sześciu zajęć praktycznych oraz pozytywna ocena z kolokwium.

dr Piotr Kozłowski

Wydział Biologii UW
pokój 107D
tel. (0)22-55-43-108
pkozlowski@biol.uw.edu.pl



**Chrońmy wspólnie
nasze lasy**

egzemplarz bezpłatny

ISBN