

UNIwersYTET MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ



UMCS
UNIwersYTET MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ



ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

dla studentów II roku biologii medycznej UMCS

LUBLIN 2015

Wersja 1.0

Spis treści:

1. Izolacja genomowego DNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
2. Amplifikacja genów kodujących rybosomowe białka P1A i P1B drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
3. Badanie wpływu inhibitorów translacji na wzrost komórek bakteryjnych i drożdżowych.
4. Elektroforeza 2D jako narzędzie w diagnostyce chorób genetycznych (2 ćwic.) :
Przygotowanie ekstraktów S30 i nastawienie pierwszego kierunku
Przeprowadzenie drugiego kierunku i barwienie CBB
5. Immunologiczne metody identyfikacji białek o znanej sekwencji.

Izolacja genomowego DNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Izolacja kwasów nukleinowych jest pierwszym etapem wielu procedur stosowanych w inżynierii genetycznej oraz diagnostyce molekularnej. Celem metody jest uzyskanie materiału o wysokiej czystości, czyli wolnego od białek i polisacharydów, mogących negatywnie wpływać na dalsze analizy. Istotne jest także, aby izolowany kwas nukleinowy nie uległ zbyt dużej fragmentacji czy enzymatycznej degradacji w czasie stosowanych procedur. Aktualnie dysponujemy bardzo zróżnicowanymi metodami otrzymywania kwasów nukleinowych, od złożonych, wieloetapowych procedur wykorzystujących rozpuszczalniki organiczne do metod szybszych, prostszych i bezpieczniejszych, których wybór zależy od:

- rodzaju otrzymywanego kwasu nukleinowego (DNA genomowe, mitochondrialne, plazmidowe, RNA itd.),
- źródła pochodzenia (roślinne, zwierzęce, bakteryjne, wirusowe itd.) i rodzaju materiału z którego przeprowadzamy izolację (np. z tkanek, organu, hodowli komórkowej itd.),
- docelowego przeznaczenia kwasu nukleinowego (np. PCR, klonowanie, synteza cDNA, itd.), co nakłada konkretne wymagania względem jego czystości i jakości.

Każda izolacja drożdżowego DNA wymaga rozbicia ściany komórkowej. W przypadku drożdży stosowane są metody mechaniczne lub łagodniejsze obejmujące enzymatyczną degradację ściany komórkowej i lizę otrzymanych sferoplastów przy udziale detergentów. Enzymy wykorzystywane do otrzymania sferoplastów drożdżowych to najczęściej: litykaza (z *Arthrobacter luteus*) lub glukulaza (ze ślimaka), hydrolizujące wiązanie β -1,3 glikozydowe występujące w glukanie ściany komórkowej.

Zastosowana w niniejszym ćwiczeniu metoda izolacji DNA umożliwia otrzymanie kilkunastu mikrogramów preparatu, który jest gotowy do cięcia enzymami restrykcyjnymi i może służyć jako matryca w reakcji PCR.

Materialy i odczynniki

1. 12- godzinna hodowla drożdży *S. cerevisiae* w pożywce YPD (50 ml)
2. Bufor do sferoplastyzacji:
 - 1 M sorbitol,
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 20 mM EDTA,
 - 20 mM β -MET (dodać bezpośrednio przed użyciem)
3. Zymoliza 100T (handlowy preparat zawierający litykazę) - 2,5 mg/ml w buforze do sferoplastyzacji
4. 10 % w/v SDS
5. Bufor do lizy (50 mM Tris pH 7.5; 20 mM EDTA)
6. 5 M octan potasu
7. 96% i 70% etanol (oziębiony)
8. Bufor TE (10 mM Tris – HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA)
9. Termoblok lub łaźnia wodna
10. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 2 ml i końcówki do pipet
11. Mikroskop świetlny oraz szkiełka podstawowe i nakrywkowe
12. Odczynniki i zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych (patrz załącznik do ćwiczeń)

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować łaźnię wodną o temp. 37°C oraz blok grzejny o temp. 65°C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4°C

Wykonanie ćwiczenia

1. Przenieść 4 ml zawiesiny komórek do dwóch probówek Eppendorfa o poj. 2 ml. Osadzić komórki przez wirowanie przy prędkości 5000 rpm przez 3 min. w temp. 4°C.
2. Uzyskane osady komórek zawiesić łącznie w 0,5 ml buforu do sferoplastyzacji w jednej probówce Eppendorfa (**dodać β -MET do końcowego stężenia 20 mM!**).
3. Dodać 20 μ l roztworu zymolizy 100T, dobrze wymieszać i inkubować przez 20 min w temp. 37°C .

4. Uzyskane sferoplasty osadzić przez wirowanie przy prędkości 3000 rpm przez 5 min. w temp. 4⁰C. Supernatant delikatnie usunąć za pomocą pipety, a do osadu sferoplastów dodać 0,5 ml buforu do lizy i kilkakrotnie przepipetować w celu wymieszania zawartości próbówki.
5. Dodać 25 µl 10% SDS (końcowe stężenie 0,5 % SDS). Zawartość dokładnie wymieszać przez kilkakrotne odwracanie próbówki. **Uważać aby zawartość próbówki nie uległa spienieniu!** Całość inkubować 20 min. w temp. 65⁰C.
6. Po inkubacji schłodzić próbówkę w lodzie po czym dodać 0,2 ml 5M octanu potasu, Zawartość dokładnie wymieszać przez kilkakrotne odwracanie próbówki, a następnie inkubować w lodzie przez 20 min. Widoczny po dodaniu octanu potasu biały precipitat tworzą kompleksy SDS ze zdenaturowanymi białkami.
7. Próbkę odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 10 min. w temp. 4⁰C.
8. Przenieść 500 µl supernatantu do nowej próbówki Eppendorfa o poj. 2 ml (temp. pokojowa) i dodać do niego trzy objętości oziębionego 96% etanolu (precypitacja kwasów nukleinowych). Próbkę pozostawić w temp. -20⁰C do kolejnych ćwiczeń.
9. Osadzić wytrącony kwas nukleinowy przez wirowanie przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w temp. 4⁰C, po czym delikatnie usunąć supernatant.
10. Uzyskany osad DNA przemyć 1 ml oziębionego 70% etanolu, a następnie odwirować przez 5 min. przy prędkości 10000 rpm w temp. 4⁰C. Supernatant odrzucić, a osad wysuszyć w eksykatorze przez ok. 20 min. (aż do całkowitego zaniku zapachu etanolu).
11. Otrzymany osad rozpuścić w 50-100 µl buforu TE (pH 8.0); jeśli pojawią się problemy z rozpuszczalnością DNA - inkubować ok. 10 min w temp. 62⁰C lub pozostawić w lodówce na okres około 12 godzin.
12. Sprawdzić jakość wyizolowanego DNA metodą elektroforezy w 0.7 % żelu agarozowym W tym celu przygotować próbki do elektroforezy zawierające 15 µl otrzymanego roztworu genomowego DNA i 5 µl buforu próbkowego do DNA. Preparat otrzymanego DNA przechowywać w temp. - 70⁰C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i odmrażania próbek DNA.

ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ DNA W ŻELU AGAROWYM

Agaroza to polisacharyd będący polimerem pochodnych galaktozy, otrzymywany przez oczyszczanie z agaru jadalnego. Agaroza jest łatwo rozpuszczalna w wodzie, w temperaturze pokojowej odwracalnie tworzy żel. Temperatura przejścia żelu w zol (potocznie topnienie agarozy) jest wyższa od temperatury zestalania.

Elektroforeza DNA w żelu agarowym jest standardową metodą pozwalającą rozdzielić, zidentyfikować lub oczyścić fragmenty DNA. Do zalet tej metody należy zaliczyć jej prostotę a także możliwość bezpośredniej lokalizacji fragmentów DNA w żelu przy pomocy barwnika interkalującego – bromku etydyny

Czynniki wpływające na tempo migracji DNA w żelu agarowym.

Masa cząsteczkowa DNA:

Większe cząsteczki DNA migrują wolniej niż cząsteczki małe ze względu na większe opory ruchu oraz większe trudności w penetrowaniu porów żelu będącego rodzajem sita molekularnego. Tempo migracji jest odwrotnie proporcjonalne do logarytmu dziesiętnego ilości par zasad.

Stężenie agarozy:

Zwiększając stężenie agarozy zwalnia się tempo migracji DNA w żelu. Na podstawie prac doświadczalnych ustalono optymalne stężenie agarozy do rozdzielów fragmentów DNA o określonej wielkości. Dane te przedstawiono w tabeli:

Optymalne stężenie agarowy	
Wielkość cząsteczki DNA (kb)	Stężenie agarozy (%w/v)
5 - 60	0,3
1 - 20	0,6
0,8 - 10	0,7
0,5 - 7	0,9
0,4 - 6	1,2
0,2 - 3	1,5
0,1 - 2	2,0

Stosowane napięcie prądu podczas elektroforezy:

Przy niskich napięciach tempo migracji liniowych cząsteczek kwasów nukleinowych jest wprost proporcjonalne do napięcia. Zależność ta przestaje obowiązywać dla dużych cząsteczek DNA rozdzielanych przy zastosowaniu wysokich napięć, dlatego też w czasie rozdziału cząsteczek większych niż 2000 pz (2 kb) nie należy stosować napięcia większego niż 5 V/cm.

Temperatura rozdziału:

Temperatura w jakiej dokonuje się rozdziału w zakresie od 4°C do temperatury pokojowej nie wpływa w istotnym stopniu na elektroforetyczne właściwości DNA. Ma jednakże wpływ na bierną dyfuzję kwasów nukleinowych w żelu, co może mieć wpływ (szczególnie w przypadku wyższych temperatur a także mniejszych fragmentów DNA) na ostrość prążków. Obniżenie temperatury podczas rozdziału powoduje wyostrenie poszczególnych prążków. W celu przeprowadzenia elektroforezy w obniżonej temperaturze należy zastosować aparat z wymiennikiem ciepła.

Bromek etydyny:

Obecność bromku etydyny w buforze do elektroforezy (i żelu) lub w barwniku do próbek zwalnia tempo przemieszczania się cząsteczek o ok. 15%.

Skład i siła jonowa buforu:

W buforze o niskiej sile jonowej DNA przemieszcza się bardzo wolno. W wypadku stosowania buforu o dużej sile jonowej wydzielana jest duża ilość ciepła, które może spowodować roztopienie agarozy i denaturację DNA. Najpowszechniej stosowany jest bufor TAE.

Materiały i odczynniki

1. Bufor próbkowy do elektroforezy DNA:

- 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 30 % glicerol
- 0,04% błękit bromofenolowy

3. Bufor TAE 50 x stężony:

- 242 g Tris
- 57,1 ml kw. octowy lodowaty
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- dopełnić H₂O do 1000 ml

4. Agaroz

5. Bromek etydyny 10 mg/ml
6. Markery do elektroforezy kwasów nukleinowych
7. Zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Pracę z bromkiem etydyny wykonywać w rękawicach ochronnych.

Zgodnie z zaleceniami prowadzącego ćwiczenia, przygotować 100 ml 0,7% roztworu agarozy w buforze TAE. W tym celu 0,7 g agarozy rozpuścić w 100 ml buforu TAE (2 ml 50x stężonego buforu TAE + 98 ml H₂O). Agarozę gotować przez ok. 2 minuty w celu dobrego rozpuszczenia. Następnie roztwór agarozy schłodzić do temp. 60-70⁰C i dodać 5 µl roztworu bromku etydyny. Dokładnie wymieszać, wylać na płytkę i pozostawić do zastygnięcia.

Badane próbki DNA zawiesić w buforze próbkowym do elektroforezy. Płytkę z zastygniętym żelem agarozowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat napełnić buforem elektrodowym (1x stężony TAE). Na żel nanosić po 5-30 µl próbek kwasów nukleinowych. Rozdział prowadzić przy napięciu 100V dopóki czoło barwnika nie dotrze do 3/4 długości żelu. Po zakończonej elektroforezie obserwować rozdzielone kwasy nukleinowe pod lampą UV.

Amplifikacja genów kodujących rybosomowe białka P1A i P1B drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Oczyszczone genomowe DNA może służyć jako matryca do amplifikacji genów z wykorzystaniem metody PCR (z ang. *Polymerase Chain Reaction*). Amplifikacja sekwencji DNA odbywa się z użyciem pary oligonukleotydowych starterów, z których każdy jest komplementarny do jednego końca docelowej sekwencji DNA. Startery te są wydłużane w kierunku do siebie przy udziale termostabilnej polimerazy DNA w cyklu kilkunastu (kilkudziesięciu) reakcji, na które składają się: denaturacja, przyłączanie starterów oraz polimeryzacja. Poszczególne etapy cyklu reakcji PCR zachodzą w różnych temperaturach:

- zaczynająca cały cykl reakcja denaturacji odbywa się w temperaturze 93-96°C, czego wynikiem jest rozplecenie podwójnych nici DNA,
- następnie odbywa się ochłodzenie mieszaniny reakcyjnej do doświadczalnie dobranej temperatury (42-68°C), w której dochodzi do przyłączania się starterów do matrycy (ang. *annealing*). Na tym etapie można kontrolować specyficzność łączenia się starterów do DNA),
- w kolejnym etapie, polimeryzacji, temperatura wzrasta do 72°C (optymalna temp. działania polimerazy) i następuje wydłużanie nici - począwszy od końca 3' startera enzym dokłada kolejne, komplementarne w stosunku do matrycy nukleotydy w tempie około 1000 nukleotydów na minutę dla najczęściej wykorzystywanej polimerazy Taq (z *Thermus aquaticus*).

Ze względu na jednoczesne kopiowanie dwóch komplementarnych nici matrycy, po każdym cyklu następuje podwojenie liczby amplifikowanych cząsteczek DNA. Liczba kopii DNA po zakończeniu około 30 cykli przekracza kilka milionów. Jakość uzyskanego, metodą reakcji PCR, DNA można analizować za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, wybierając DNA bromkiem etydyny.

Interpretując wyniki uzyskane metodą PCR, należy pamiętać, że najczęstszą przyczyną braku amplifikacji jest hamujący wpływ zanieczyszczeń obecnych w matrycowym DNA. Innym często występującym problemem jest obecność niespecyficznych produktów amplifikacji, która najczęściej wynika z niewłaściwego doboru temperatury przyłączania się

starterów czy nieodpowiedniego stężenia jonów Mg^{2+} , koniecznych do prawidłowego łączenia się DNA ze starterami.

Celem ćwiczenia jest porównanie długości genów dla dwóch drożdżowych białek rybosomowych: P1A i P1B (powielonych metodą PCR z genomowego DNA drożdży). Białka te cechuje jednakowa długość łańcucha polipeptydowego (106 aminokwasów) i duże podobieństwo struktury pierwszorzędowej, czego pochodną są zbliżone masy cząsteczkowe białek wynoszące odpowiednio 10 908 i 10 667 Da. Pozwala to założyć jednakową długość sekwencji nukleotydowej mRNA kodującego te białka. Startery reakcji PCR zostały zaprojektowane w ten sposób, aby powieleniu uległa sekwencja obejmująca początkowy kodon ATG jak też kodon STOP obu białek, dlatego uzyskane po reakcji PCR fragmenty DNA będą bezpośrednio odpowiadały długości genów kodujących te białka.

P1A	1	MSTESALS	YA ALILADSEIE	ISSEKLLT	LT NAANVPVENI	WADIFAKALD
P1B	1	MSDSIISFAA	FILADAGLEI	TSDNLLTITK	AAGANVDNVW	ADVYAKALEG
P1A	51	GQNLKDLLVN	FSAGAAAPAG	VAGGVAGGEA	GEAEAEKEEEE	EAKEESDDDM
P1B	51	KDLKEILSGF	HNAGPVAGAG	AASGAAAAGG	DAAAEKEEEE	EAAEESDDDM
P1A	101	GFGLFD				
P1B	101	GFGLFD				

Rys. Porównanie sekwencji aminokwasowych drożdżowych białek P1A i P1B

Materialy i odczynniki

1. Genomowe DNA drożdży uzyskane w poprzednim ćwiczeniu.
2. Startery reakcji PCR dla genów kodujących białka P1A i P1B
3. Polimeraza *Taq* 0,5U/ μ l
4. Bufor dla polimerazy *Taq* (firmowy)
5. 2 mM mieszanina deoksynukleotydów (dNTP)
6. 25 mM $MgCl_2$ (firmowy)
7. Jałowa dejonizowana woda
8. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 0,5 ml, cienkościenne probówki do reakcji PCR o poj. 0,2 ml oraz końcówki do pipet

9. Odczynniki i zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych

Wykonanie ćwiczenia

1. Do probówki Eppendorfa o poj. 0,5 ml, umieszczonej w lodzie, odmierzyć następujące składniki mieszaniny reakcyjnej:
 - 23 μ l dejonizowanej wody
 - 5 μ l dNTP
 - 5 μ l buforu dla polimerazy *Taq*
 - 5 μ l roztworu $MgCl_2$
 - 2 μ l genomowego DNA drożdży
 - 2 μ l polimerazy DNA *Taq*
2. Wymieszać zawartość probówki i osadzić płyn ze ścianek przez krótkie odwirowanie, po czym rozdzielić mieszaninę reakcyjną na dwie równe części do dwóch probówek do PCR. Następnie, do jednej z probówek dodać po 2 μ l obu starterów do amplifikacji genu kodującego białko P1A, a do drugiej probówki dodać po 2 μ l obu starterów do amplifikacji P1B.
3. Reakcje przeprowadzić w termocyklerze w warunkach wskazanych przez prowadzącego ćwiczenia. Po reakcji, do każdej probówki dodać po 5 μ l buforu do elektroforezy DNA i dokonać elektroforetycznego rozdziału powstałych fragmentów oraz komercyjnego wzorca DNA w 1% żelu agarozowym (według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń).

Interpretacja wyników

1. Określić długość, rozdzielonych w żelu agarozowym, fragmentów DNA i zinterpretować otrzymane wyniki.
2. Samodzielnie przeprowadzić porównanie sekwencji genów kodujących oba białka korzystając z bazy <http://www.yeastgenome.org/> (nazwy genów dla białek to odpowiednio RPP1A i RPP1B) i przedstawić zestawienie sekwencji nukleotydowej genów dla obu białek w formie pisemnej na następnych zajęciach.

Badanie wpływu antybiotyków na wzrost komórek bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae*

Zdolność precyzyjnej translacji mRNA na białko jest jedną z podstawowych cech życia na Ziemi. Choć aparat translacyjny wykazuje znaczne podobieństwa między organizmami to jednak w toku ewolucji wykształciły się subtelne różnice w mechanizmie biosyntezy białka u prokariotów i eukariotów. Te różnice wykorzystano w medycynie, gdyż wiele związków selektywnie hamujących proces translacji u bakterii należy do najbardziej skutecznych antybiotyków stosowanych przez człowieka. Miejscem działania wielu chemicznie zróżnicowanych antybiotyków jest rybosom. Antybiotyki te wiążą się ze specyficznymi fragmentami rybosomu, wpływając w ten sposób na syntezę białka i wzrost komórek. Mutacje w niektórych białkach rybosomowych mogą powodować zmianę wrażliwości komórek na inhibitory translacji.

Celem ćwiczenia jest przebadanie wpływu niektórych antybiotyków (cykloheksimidu, chloramfenikolu, streptomycyny, kanamycyny, higromycyny B, paromomycyny, puromycyny) na wzrost komórek bakterii oraz mutantów drożdżowych pozbawionych różnych białek rybosomowych.

Chloramfenikol i cykloheksimid są inhibitorami aktywności peptydylotransferazy, odpowiednio, w podjednostce 50S rybosomów bakteryjnych i w podjednostce 60S rybosomów eukariotycznych. Z kolei higromycyna B i paromomycyna należą do antybiotyków aminoglikozydowych, działających zarówno na komórki bakteryjne jak i eukariotyczne, które wiążą się z rRNA małej podjednostki rybosomowej. Poprzez oddziaływanie z miejscem A na rybosomie aminoglikozydy zwiększają częstotliwość błędów w odczytywaniu mRNA. Ponadto higromycyna B hamuje etap translokacji podczas biosyntezy białka. Puromocyna zaś jest strukturalnym analogiem aminoacylo-tRNA i powoduje przedwczesną terminację syntezy białka zarówno w komórkach bakterii jak i eukariotów.

Materiały i odczynniki

1. Całonocne hodowle drożdży *S. cerevisiae* – po 10 ml
(dwa szczepy wskazane przez prowadzącego ćwiczenia)
2. Całonocne hodowle bakterii *E. coli* – po 10 ml
(dwa szczepy wskazane przez prowadzącego ćwiczenia)
3. Podłoże YPD oraz YPD z 2% agarem
4. Podłoże LB oraz LB z 1,5% agarem
5. Roztwór higromycyny B (15 mg/ml w H₂O)
6. Roztwór paromomycyny (250 mg/ml w H₂O)
7. Roztwór cykloheksimidu (0,25 mg/ml w H₂O)
8. Roztwór streptomycyny (1 mg/ml w H₂O)
9. Roztwór kanamycyny (3 mg/ml w H₂O)
10. Roztwór chloramfenikolu (3 mg/ml w 96% etanolu)
11. Roztwór puromycyny (10 mg/ml w H₂O)
12. Jałowe płytki Petriego
13. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i końcówki do pipet
14. Jałowe krążki bibuły Whatman 3MM o średnicy 6 mm i pęsety.
15. Jałowe patyczki do rozprowadzania hodowli na płytkach Petriego.

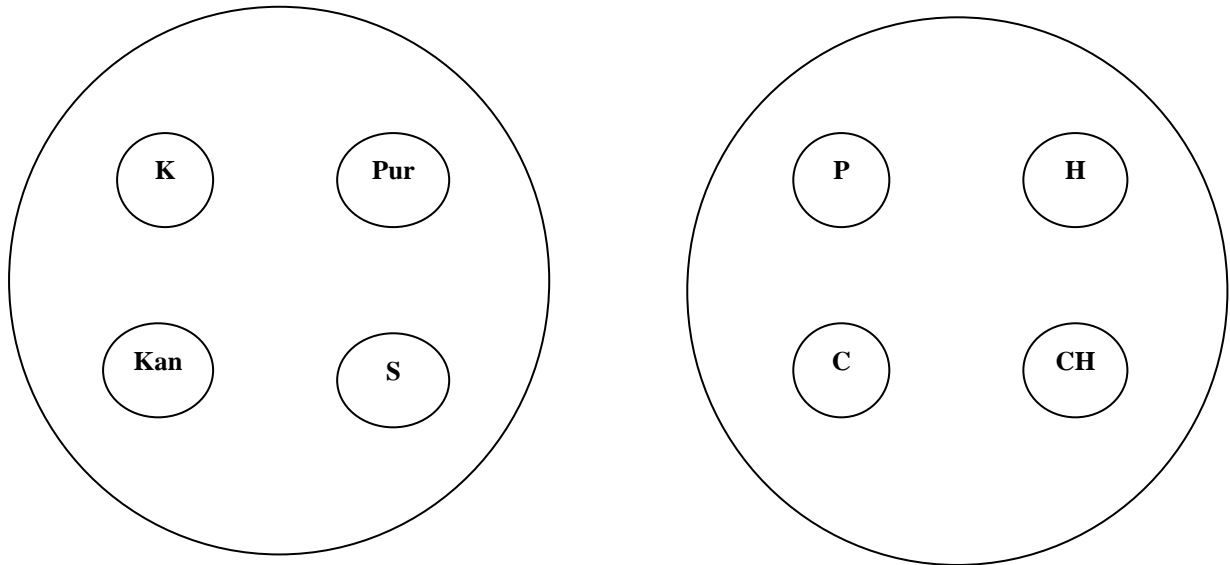
Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych

1. Na cztery jałowe płytki Petriego wylać po 20 ml podłoża YPD z agarem i pozostawić do zastygnięcia.
2. Zmierzyć gęstość optyczną wskazanych całonocnych hodowli drożdży przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀). Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (podłoże YPD). Jeśli zaistnieje konieczność, (tzn. wielkość OD przekracza 1), należy próbkę hodowli rozcieńczyć, a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jej gęstości. Znając gęstość optyczną hodowli drożdży przygotować po 1 ml obu hodowli drożdżowych rozcieńczonych pożywką YPD do OD₆₀₀ = 0,2.
3. Rozprowadzić po 200 µl tak rozcieńczonych hodowli na przygotowane wcześniej płytki Petriego ze stałym podłożem YPD (dwie płytki Petriego na jeden szczep drożdżowy).
4. Po 10 min. na płytki nanieść po cztery jałowe krążki bibuły Whatman 3MM i nakropić na nie po 10 µl roztworów paromomycyny (P), higromycyny B (H)

i cykloheksimidu (CH), chloramfenikolu (C), streptomycyny (S), kanamycyny (Kan), puromycyny (Pur) i wody (K-kontrola) wg poniższego schematu. Po dwóch dniach inkubacji w temperaturze 30⁰C zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu komórek drożdży wokół krążków bibuły nasączonych roztworami antybiotyków.

5. Identyczne doświadczenie wykonać z bakteriami *E. coli*, stosując podłoże LB i zachowując temperaturę inkubacji 37⁰C.



Interpretacja wyników

Porównać wpływ antybiotyków na wzrost poszczególnych szczepów bakteryjnych i drożdżowych, mierząc średnicę strefy zahamowania wzrostu (odległość między krawędzią krążka i krawędzią wzrostu w najszerszym miejscu, podana w milimetrach).

Elektroforeza 2D jako narzędzie w diagnostyce chorób genetycznych

Elektroforeza dwukierunkowa (dwuwymiarowa) 2D (ang. *two-dimensional*) jest powszechnie stosowaną techniką rozdzielania białek badanego proteomu. Metoda ta pozwala na wykrycie zmian w ekspresji białek, ich izoform czy modyfikacji potranslacyjnych (takich jak fosforylacja, glikozylacja czy ograniczona proteoliza). Składa się z dwóch etapów. Pierwszym etapem (kierunkiem, wymiarem) jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF), w którym białka są rozdzielane w gradiencie pH w zależności od ich punktu izoelektrycznego (pI). W ogniskowaniu izoelektrycznym stosowane są komercyjne paski żeli z immobilizowanym gradientem pH gwarantującym wysoką rozdzielczość i powtarzalność uzyskanych wyników, bądź kapilary z żelem poliakrylamidowym z określonym gradientem pH. Drugim etapem (kierunkiem, wymiarem) jest elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS/PAGE) w której białka są rozdzielane zgodnie z ich masą cząsteczkową. W wyniku rozdzielania białek metodą elektroforezy 2D, a następnie wybarwienia uzyskanego żelu (najczęściej stosowanymi barwnikami są - błękit *Coomassie Brilliant Blue* oraz sole srebra) otrzymujemy „mapę białkową” składającą się z wielu plam, z których każda stanowi białko o określonych parametrach masy cząsteczkowej i punktu izoelektrycznego. Porównanie takich map pochodzących z komórek zdrowego i chorego organizmu może nam dostarczyć wiele informacji na temat białek charakterystycznych dla danej choroby, które potencjalnie mogą się stać nowymi markerami choroby. Dodatkowo, niektóre z tak wykrytych białek mogą stać się celem terapeutycznym. Mimo wielu zalet, metoda ta ma pewne ograniczenia. Dużą trudność sprawia uzyskanie profilu białkowego charakterystycznego dla całego proteomu, ponieważ białka występujące w komórce różnią się rozpuszczalnością. Na przykład, białka błonowe, hydrofobowe oraz o wysokiej masie cząsteczkowej mogą nie zostać wykryte przy zastosowaniu mocznika, który jest typowym składnikiem roztworów, w których przeprowadza się elektroforezę. Innym problemem jest wykrycie białek występujących w badanej próbce białkowej w bardzo niskich stężeniach. Jest to o tyle poważne ograniczenie, gdyż wiele białek regulatorowych, sygnałowych czy czynników transkrypcji, ważnych z punktu widzenia diagnostyki i prognostyki chorób, występuje w niskich stężeniach. Najprostszym sposobem na wyeliminowanie tych ograniczeń jest wstępne frakcjonowanie badanej próby. Kolejnym problemem jest uzyskanie odpowiedniej

powtarzalności między rozdzielanymi tą samą próbką białkową na kilku żelach, co utrudnia precyzyjną komputerową analizę uzyskanych obrazów.

Powtarzalność techniki klasycznej elektroforezy dwukierunkowej można zwiększyć dzięki zastosowaniu zmodyfikowanej metody, zwanej dwukierunkową fluorescencyjną elektroforezą różnicową (ang. *difference in gel electrophoresis*) – 2D DIGE. Technika ta opiera się na znakowaniu próbek białkowych trzema fluorescencyjnymi barwnikami cyjaninowymi (Cy2, Cy3, Cy5) wiążącymi się kowalencyjnie do reszt lizyny. Na jednym żelu podczas elektroforezy 2D rozdzielane są dwie próbki badane, wyznakowane Cy3 i Cy5, oraz standard wewnętrzny wyznakowany Cy2. Zastosowanie standardu wewnętrznego minimalizuje wpływ różnic pomiędzy otrzymanymi żelami, w konsekwencji ułatwia ich dopasowanie, a tym samym czyni analizę ilościową badanych proteomów łatwiejszą i bardziej wiarygodną. W zależności od wielkości żelu i zastosowanego gradientu pH można jednocześnie rozdzielić ponad 5000 białek (zwykle do 2000) i wykryć < 1 ng białka na plamkę.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką elektroforezy 2D oraz porównanie obrazów białek po rozdzielaniu metodą 2D pochodzących z komórek nowotworowych i prawidłowych.

Materiały i odczynniki

1. Hodowla komórek nowotworowych i prawidłowych w oddzielnych szalkach Petriego o gęstości komórek ok. 80% (dwie szalki z komórkami jednego typu na zespół studentów)
2. Bufor PBS
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄, pH 7,5
3. 9 M mocznik
4. 1 M DTT
5. Bufor do IEF (komercyjny IPG Buffer 3-10)
6. Bufor do rehydratacji (2 x stężony)– przechowywać w -20°C w porcjach po 100 µl
 - 9 M mocznik

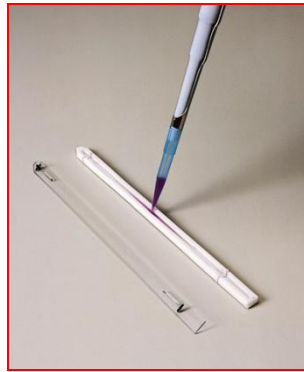
6 % CHAPS
80 mM Tris base
100 mM DTT – dodać bezpośrednio przed użyciem
1 % IPG bufor - dodać bezpośrednio przed użyciem

7. Gotowe paski z żelem do IEF o zakresie pH 3-10, o długości 7 cm
8. Odczynnik Bradford
9. Zdrapywacz do komórek
10. Bufor do równoważenia pasków przed SDS/PAGE:
 - 6 M mocznik
 - 75 mM Tris-HCl pH 8,8
 - 30 % glicerol
 - 2 % SDS
 - 0,002 % błękit bromofenolowy
 - 20 mM DTT – dodać bezpośrednio przed użyciem
11. Zestaw odczynników i sprzętu do elektroforezy SDS/PAGE
12. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet.
13. Jałowe probówki typu Falcon o poj. 15 ml
14. Vortex
15. Pęseta

Wykonanie ćwiczenia (dzień pierwszy)

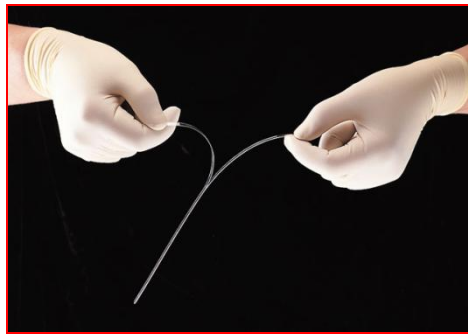
1. Płytkę Petriego z komórkami o gęstości ok. 80% przenieść na lód i ściągnąć pipetą płyn hodowlany.
2. Przepłukać komórki na płytce za pomocą 5 ml oziębionego buforu PBS.
3. Po ściągnięciu pipetą buforu PBS zeskrobać komórki fibroblastów z płytek za pomocą specjalnego zdrapywacza do komórek. Zawiesinę komórek spłukać z płytki 0,8 ml oziębionego PBS i przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 2 ml.
4. Powtórnie popłukać płytkę Petriego 0,8 ml oziębionego PBS i połączyć zawiesinę z zawiesiną otrzymaną w punkcie 3.
5. Komórki odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 5 min w 4°C . Supernatant odrzucić za pomocą pipety, a osad zawiesić w 150 μl 9 M mocznika.

6. Zawiesinę mieszać poprzez vorteksowanie 5 razy po 30 sek. z 30-sekundowymi przerwami.
7. Odwirować zawiesinę przy prędkości 10000 rpm przez 10 min.
8. Supernatant (lizat komórkowy) przenieść do nowej probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml. a osad wyrzucić.
9. Oznaczyć stężenie białka w otrzymanym lizacie komórkowym metodą Bradford.
[Do dwóch probówek zawierających po 0,8 ml wody, odmierzyć 2 – 10 μ l badanego roztworu białka (zgodnie z zaleceniami prowadzącego ćwiczenia). Do obu probówek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradford* i dokładnie wymieszać. Równocześnie przygotować próbkę kontrolną nie zawierającą białka. Po upływie 5 min, zmierzyć absorpcję w kolorymetrze przy długości fali 595 nm. Stężenie białka odczytać z przygotowanej krzywej wzorcowej.]
10. Przygotować bufor do rehydratacji: do 89 μ l gotowego buforu dodać 10 μ l roztworu 1M DTT oraz 1 μ l IPG buforu
11. Objętość lizatu zawierającą 100 μ g białka dodać do 65 μ l przygotowanego buforu do rehydratacji tak, aby otrzymać końcową objętość 130 μ l. (*Przykład: Jeśli w otrzymanym lizacie komórkowym stężenie białka wynosi 4,6 μ g/ μ l, wówczas 100 μ g białka znajduje się w 21,7 μ l lizatu komórkowego. Aby przygotować próbkę do rozdziału metodą elektroforezy 2D należy zmieszać w nowej probówce Eppendorfa o poj. 1,5 ml - 65 μ l buforu do rehydratacji, 21,7 μ l lizatu komórkowego i 43,3 μ l 9 M mocznika, aby otrzymać próbkę w końcowej objętości 130 μ l)*)
12. Wymieszać dokładnie roztwór białka z buforem do rehydratacji poprzez vorteksowanie, a następnie krótko odwirować próbkę, aby całość roztworu znalazła się na dnie probówki.
13. Za pomocą pipety nanieść całość próbki (130 μ l) do specjalnego naczynia do rozdziału IEF (*ang. strip holder*) jak pokazano na rysunku poniżej. Rozprowadzić roztwór powoli pomiędzy elektrodami. Usunąć duże bąbelki powietrza.



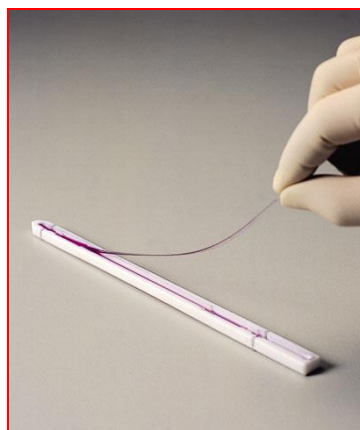
Fot. GE Healthcare

14. Usunąć folię zabezpieczającą pasek żelowy zaczynając od strony anody (+).



Fot. GE Healthcare

15. Przy użyciu pęsety umieścić pasek żelowy w naczynku – **ŻELEM DO DOŁU**, tak aby żel miał kontakt z elektrodami z obu stron naczynia. Aby ułatwić pokrycie całego żelu roztworem i ewentualnie usunąć powstałe bąbelki powietrza, kilkakrotnie, delikatnie podnosić i opuszczać pasek z żelem.



Fot. GE Healthcare

16. Pokryć pasek żelowy 0,8 ml oleju mineralnego (ang. *cover fluid*) aby zminimalizować parowanie i w ten sposób zapobiec krystalizacji mocznika. Nanosić olej kroplami najpierw od jednego końca naczynia aż połowa paska z żelem zostanie przykryta,

a następnie od drugiego końca naczynia aż cały pasek z żelem zostanie przykryty olejem.

17. Przykryć naczynie pokrywką i umieścić w urządzeniu (Ettan IPGphor III, GE Healthcare) do rozdziału IEF.



Fot. GE Healthcare

18. Ustawić program do rehydratacji paska żelowego (12-16 godz.) i rozdziału w pierwszym kierunku – IEF wg wartości podanych przez producenta.

Rehydratacja	50 μ A/pasek 14 godzin temperatura 20°C		
Ogniskowanie izoelektryczne (4 kroki S1-S4)	S1 step	300 V	200 Vhr
	S2 grad	1000 V	300 Vhr
	S3 grad	5000 V	4500 Vhr
	S4 step	5000 V	3000 Vhr and hold

19. Po zakończeniu rozdziału IEF można bezpośrednio przejść do rozdziału w drugim kierunku lub przechowywać paski z żelem w temp. -70°C.

Wykonanie ćwiczenia (dzień drugi)

**ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ BIAŁEK W ŻELU
POLIAKRYLAMIDOWYM**

Żel poliakrylamidowy posiada następujące cechy: jest bezbarwny, pozbawiony ładunków, odznacza się dużą wytrzymałością mechaniczną, łatwy w przygotowaniu i formowaniu w odpowiednich naczyniach. Żel poliakrylamidowy to łańcuchy akrylamidu ($H_2C=CH-CO-NH_2$) połączone wiązaniami poprzecznymi za pomocą N,N'-metyleno-bisakrylamidu ($H_2C=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$). W ten sposób tworzy się sieć, przez „oczka” której migrują rozdzielane cząsteczki. Wielkość „oczek” sieci żelu zależy od stężenia akrylamidu oraz bisakrylamidu. Polimeryzacja żelu odbywa się w obecności nadsiarczuanu amonu (APS) oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE) umożliwia rozdział cząsteczek białkowych różniących się wielkością i ładunkiem elektrycznym. Rozdział ten można prowadzić w warunkach niedenaturujących oraz w warunkach denaturujących. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących określana skrótem SDS-PAGE odbywa się w obecności soli sodowej siarczuanu dodecyłu (SDS), który jest detergentem jonowym. SDS łącząc się z grupami hydrofobowymi aminokwasów nadaje białkom ładunek ujemny. Sprawia to, że migrują one w kierunku dodatniej anody. Ilość związanego SDS jest proporcjonalna do wielkości cząsteczek białkowych. Dzięki temu rozdzielają się one w żelu pod względem masy cząsteczkowej. Polipeptydy o niższej masie cząsteczkowej migrują szybciej, zaś większe wolniej. Metoda SDS-PAGE stosowana jest między innymi do: identyfikacji i monitorowania składu mieszaniny białek, sprawdzania jednorodności (homogenności) białek, oznaczania masy cząsteczkowej białek, analizy struktury podjednostkowej aktywnych biologicznie kompleksów białkowych.

Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Materiały i odczynniki

1. 30% roztwór akrylamidu + 0,8% roztwór bisakrylamidu
2. 1,5M roztwór Tris - HCl pH 8,8
3. 0,5M roztwór Tris - HCl pH 6,8

4. 10% roztwór SDS

5. 10% roztwór APS

6. TEMED

7. Bufor próbkowy (4x stężony) :

1,25M roztwór Tris-HCl pH 6,8	0,5ml
Glicerol	1,0ml
10% roztwór SDS	2,0ml
DTT	154mg
H ₂ O	1,3ml
1% roztwór błękitu bromofenolowego	200μl

8. Bufor elektrodowy:

Glicyna	14,4g
Tris	3,0g
SDS	1,0g
uzupełnić wodą do 1000ml	

9. Wzorce białkowe

10. Zestaw do elektroforezy białek

1. Przygotować 10% żel SDS/PAGE wg poniższej procedury:

Umyte i odtłuszczone specjalne płytki szklane do elektroforezy złożyć zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia. Przygotować żel poliakrylamidowy według przepisu:

Uwaga! Pracę z akrylamidem wykonywać w rękawicach ochronnych.

Roztwory dodawać wg przedstawionej kolejności.

TEMED – inicjator polimeryzacji, dodawać jako ostatni składnik, bezpośrednio przed wylaniem mieszaniny między płytki !

Żel separujący

ODCZYNNIK	Żel 10% (8 ml)
H ₂ O	3,8 ml
40% akrylamid -bisakrylamid	2,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,0 ml
10% SDS	80 µl
10% APS	80 µl
TEMED	8 µl

Żel zagęszczający

ODCZYNNIK	na 2,5 ml żelu
H ₂ O	1,57 ml
40% akrylamid -bisakrylamid	0,25 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,625 ml
10% SDS	25 µl
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Polimeryzację żelu wykonać między przygotowanymi płytkami szklanymi, zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia .

- Umieścić pasek z żelem w probówce Falcona o poj. 15 ml i dodać 5 ml buforu do równoważenia pasków zawierającego DTT (**DTT dodajemy bezpośrednio przed użyciem**). Mieszać probówkę na kołyszce laboratoryjnej przez 15 min.
- Usunąć z probówki bufor po czym dodać kolejną porcję 5 ml buforu do równoważenia z DTT i mieszać probówkę dalsze 15 min.
- Płytki ze spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat napęlić buforem elektrodowym. Zrównoważony pasek z żelem ostrożnie wsunąć do studzienki w żelu zagęszczającym. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego.

Wyłączyć zasilacz, wyjąć płytki z żelem i wybarwić je za pomocą barwnika *Coomassie Brilliant Blue*.

Interpretacja wyników

Porównaj obrazy plamek białkowych uzyskanych po rozdziale białek z komórek HeLa i fibroblastów. Czy widoczne są zmiany ilościowe i jakościowe? W jaki sposób możemy zidentyfikować białka po rozdziale 2D?

Literatura

1. 2-D Electrophoresis Principles and Methods (GE Healthcare handbook)
2. 2-D Electrophoresis Workflow How-To Guide, Fourth Edition (Bio-rad handbook)

Immunologiczne metody identyfikacji białek o znanej sekwencji

Do metod immunologicznych często wykorzystywanych do detekcji i identyfikacji białek należą techniki: ELISA, immunobloting oraz immunohistochemia.

Immunodetekcja białek metodą immunoblotingu

Technika immunoblotingu, zwana inaczej techniką western blot, składa się z kilku etapów. Pierwszym etapem jest rozdzielenie mieszaniny białek w żelu poliakrylamidowym. Następnie białka przenoszone są na membranę (w naszym przypadku jest to transfer pół-suchy), która niespecyficznie wiąże wszystkie białka. Ostatnim etapem jest detekcja białek przy udziale przeciwciał.

Po rozdziale elektroforetycznym w obecności SDS (jonowego, naładowanego ujemnie, detergentu) białka są zdenaturowane i wszystkie posiadają ładunek ujemny proporcjonalny do ich masy. Transfer odbywa się zatem w kierunku elektrody dodatniej. Należy więc tak ułożyć membranę względem żelu, by znalazła się ona na drodze migracji białek z żelu. Wyróżniamy dwa typy transferu: transfer mokry i półsuchy.

Transfer mokry

W metodzie tej „kanapka” złożona z żelu, membrany i bibuły Whatman ułożona jest pionowo pomiędzy dwiema elektrodami. Całość umocowana jest w aparacie wypełnionym buforem. W niektórych typach aparatów można umieścić i prowadzić transfer dla czterech takich „kanapek” jednocześnie. Transfer mokry zalecany jest w przypadku białek dużych (>100 kDa), hydrofobowych lub trudno rozpuszczalnych ze względu na możliwość prowadzenia go nawet przez 24 godziny, bez ryzyka wyparowania buforu. Należy jednak pamiętać, że przy transferach trwających dłużej niż godzinę, trzeba zapewnić chłodzenie, aby utrzymać temperaturę w granicach 10 – 30°C. Transfer mokry przeprowadza się przy stałym napięciu prądu, zwykle 20 – 30 V. Konieczność chłodzenia, jak również duża ilość buforu niezbędna do przeprowadzenia transferu są niewątpliwie wadami tej metody.

Transfer pół-suchy

Drugi rodzaj transferu to transfer półsuchy. W tym przypadku „kanapka” ułożona jest poziomo i znajduje się między płaskimi elektrodami. Żel i membrana umieszczone są

pomiędzy bibułami Whatman nasączonymi buforem. Transfer ten prowadzi się przy stałym natężeniu prądu, wynoszącym zwykle $0,8 - 1,5 \text{ mA/cm}^2$ membrany. Transfer białek z żelu można przeprowadzić na różnego typu membrany. Najpopularniejsze z nich to membrany nitrocelulozowe lub membrany z polifluorku winylidenu (PVDF). Membrany nitrocelulozowe są niezbyt drogie, wiążą do $249 \mu\text{g}$ białka na cm^2 . Wielkość porów w membranach nitrocelulozowych waha się od $0,45 \mu\text{m}$ do $0,1 \mu\text{m}$, dzięki czemu można transferować małe białka, tj. poniżej 1500 Da . Membrany te od razu nasączają się buforem do transferu, bez uprzedniego zanurzenia ich w metanolu. Membrany PVDF charakteryzują się nieco mniejszą zdolnością do wiązania białek w porównaniu do membran nitrocelulozowych ($172 \mu\text{g/cm}^2$), mają za to dużo większą wytrzymałość mechaniczną. Należy pamiętać o wcześniejszym zanurzeniu ich w metanolu i dopiero później w buforze do transferu.

Blokowanie membran

Po transferze wolne miejsca wiązania białek na membranie są blokowane, aby zapobiec niespecyficjnej adsorpcji przeciwciał. Do blokowania membran najczęściej używa się odtłuszczonego mleka lub albuminy z surowicy bydlęcej.

Wiązanie przeciwciał

Antygeny będące przedmiotem badań identyfikuje się przy użyciu wyznakowanych przeciwciał, bądź przeciwciał niewyznakowanych a identyfikowanych poprzez wyznakowane przeciwciała drugorzędowe specyficzne dla pierwszorzędowych. Następnie przeprowadza się detekcję, której sposób zależy od rodzaju użytych przeciwciał.

Detekcja

Metoda detekcji białek w technice western blot zależy od rodzaju znacznika, jaki dołączony jest do przeciwciał. Najczęściej stosowane są alkaliczna fosfataza lub peroksydaza chrzanowa. Wizualizacja tych enzymatycznych znaczników może być przeprowadzona kolorymetrycznie (alkaliczna fosfataza, w miejscu związania przeciwciał do białka na membranie powstaje barwny produkt) lub chemiluminescencyjnie (peroksydaza, enzym przeprowadza reakcję z wytworzeniem światła, które naświetla kliszę fotograficzną).

W trakcie ćwiczeń przeprowadzimy identyfikację rybosomalnych białek P drożdży stosując skróconą odmianę metody immunoblotingu zwaną dot blot. W tym celu wykorzystamy niewyznakowane przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające drożdżowe, rybosomalne białka P i drugorzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą. Technika dot blot różni się od metody western blot tym, że nie przeprowadza się elektroforetycznego rozdzielania białek, tylko bezpośrednio nakrapla się próbkę białka na membranę.

Materiały i odczynniki

1. Membrana nitrocelulozowa (paski 2cm x 6cm)
2. Roztwory badanych białek
3. Przeciwciała pierwszorzędowe (poliklonalna surowica skierowana przeciwko drożdżowym białkom P)
4. Drugorzędowe przeciwciała sprzężone z alkaliczną fosfatazą
5. Roztwór blokujący (10 % roztwór mleka odtłuszczonego w PBS)
6. Bufor PBS
7. Bufor PBS-T (PBS z 0,1 % Tween 20)
8. Bufor AP
9. NBT (18 mg NBT rozpuścić w 1400 μ l DMF i 600 μ l wody). Przechowywać w -20°C .
10. BCiP (8 mg BCiP rozpuścić w 2 ml DMF). Przechowywać w -20°C .
11. Płytki Petriego

Wykonanie ćwiczenia

1. Na paski membrany nitrocelulozowej nanieść po 2 μ l badanych roztworów białek wg schematu podanego przez prowadzącego ćwiczenie (**uwaga: nie dotykać membrany palcami, używać rękawiczek i pęsety**).
2. Poczekać aż naniesione na nitrocelulozę roztwory białka wyschną.
3. Paski membrany przenieść do roztworu blokującego (na płytce Petriego) i zostawić na kołyszce laboratoryjnej w temp. pokojowej na 15 min. Na tym etapie, membranę można przechowywać w $+4^{\circ}\text{C}$ przez kilka dni.
4. Wylać roztwór blokujący i dodać do membrany przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczone 1:1000 w 10 ml PBS i pozostawić przez 20 min. na kołyszce w temp. pokojowej.
5. Odpłukać przeciwciała roztworem PBST: 4 razy przez 1 min.

6. Dodać przeciwciała drugorzędowe rozcieńczone 1:10000 w 10 ml PBST i pozostawić na kołysce w temperaturze pokojowej na 20 min.
7. Odpłukać przeciwciała roztworem PBST: 4 razy przez 1 min.
8. Przepłukać membranę buforem AP: 2 razy przez 1 min.
9. Przeprowadzić detekcję białek na membranie. W tym celu do płytki Petriego wlać 10,5 ml buforu AP, dodać jednocześnie dwa przygotowane barwniki (NBT i BCiP) i pozostawić na kołysce do pojawienia się prążków. Reakcje barwienia przerwać poprzez płukanie wodą dejonizowaną, po czym membranę wysuszyć na powietrzu.