

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



UMCS
UNIwersYTET MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ



ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

dla studentów III roku biotechnologii

LUBLIN 2019

Wersja 1.5

Spis treści:

1. Izolacja genomowego DNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
2. Amplifikacja genów kodujących rybosomowe białka P1A i P1B drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
3. Izolacja i elektroforetyczna analiza RNA z komórek drożdży
4. Izolacja kinaz białkowych z drożdży *S. cerevisiae*
5. Aktywacja i specyficzność substratowa kinazy białkowej CK2
6. Aktywacja i specyficzność substratowa kinazy zależnej od cAMP
7. Izolacja jąder komórkowych i histonów
8. Analiza składu białkowego chromatyny
9. Trawienie DNA chromatyny nukleazą ze *Staphylococcus aureus*
10. Elektroforetyczna analiza DNA po trawieniu nukleazą ze *Staphylococcus aureus*
11. Wykrywanie inhibitorów proteaz serynowych
12. Badanie aktywności enzymatycznej w żelu poliakrylamidowym na przykładzie inwertazy.

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 zbytej 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.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały 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. 37⁰C oraz blok grzejny o temp. 65⁰C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4⁰C

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. 4⁰C.

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. 37⁰C (sferoplastyzacja trwa od 20 do 120 min, zależnie od szczepu, rodzaju podłoża czy fazy wzrostu komórek).

Uwaga! Formowanie się sferoplastów można monitorować w dwojaki sposób:

- a) pod mikroskopem świetlnym - na jedno szkiełko podstawowe nanieść 4 μ l zawiesiny komórek oraz 4 μ l 0,1% SDS, a na drugie 4 μ l zawiesiny komórek oraz 4 μ l buforu do sferoplastyzacji; formowanie sferoplastów uznaje się za zakończone, gdy 80-90 % komórek występuje jako tzw. komórki-duchy (z ang. *ghost cells*);
 - b) do dwóch szklanych probówek dodać po 0,5 ml buforu do sferoplastyzacji, następnie do pierwszej z nich dodać 50 μ l 10 % roztworu SDS, po czym do obu probówek dodać po 5 μ l zawiesiny komórek i energicznie zamieszać; stopień strawienia ściany komórkowej można uznać za zadowalający, jeśli zawiesina w probówce z SDS stanie się klarowna.
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 probówki.
 5. Dodać 25 μ l 10% SDS (końcowe stężenie 0,5 % SDS). Zawartość dokładnie wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki. **Uważać aby zawartość probówki nie uległa spienieniu!** Całość inkubować 20 min. w temp. 65⁰C.
 6. Po inkubacji schłodzić probówkę w lodzie po czym dodać 0,2 ml 5M octanu potasu, Zawartość dokładnie wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki, a następnie inkubować w lodzie przez 20 min. Widoczny po dodaniu octanu potasu biały precypitat tworzą kompleksy SDS ze zdenaturowanymi białkami.
 7. Próbkę odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 10 min. w temp. 4⁰C.

8. Przenieść 500 μ l supernatantu do nowej probówki Eppendorfa o poj. 2 ml (temp. pokojowa) i dodać do niego trzy objętości oziębionego 96% etanolu (precypitacja kwasów nukleinowych). Próbkę pozostawić w temp. -20°C do kolejnych ćwiczeń.
9. Osadzić wytrącony kwas nukleinowy przez wirowanie przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w temp. 4°C , 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. 4°C . Supernatant odrzucić, a osad wysuszyć w eksykatorze przez ok. 20 min. (aż do całkowitego zaniku zapachu etanolu).
11. Otrzymany osad rozpuścić w 50-100 μ l buforu TE (pH 8.0); jeśli pojawią się problemy z rozpuszczalnością DNA - inkubować ok. 10 min w temp. 62°C .
12. Sprawdzić jakość wyizolowanego DNA metodą elektroforezy w 0.7 % żelu agarozowym (przygotowanie żelu i przeprowadzenie elektroforezy DNA – patrz załącznik do ćwiczeń). W tym celu przygotować próbki do elektroforezy zawierające 15 μ l otrzymanego roztworu genomowego DNA i 5 μ l buforu próbkowego do DNA. Preparat otrzymanego DNA przechowywać w temp. -70°C . Należy unikać wielokrotnego zamrażania i odmrażania próbek DNA.

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, wybarwiając 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	MSTESALSYA	ALILADSEIE	ISSEKLLTLT	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

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały 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 MgCl₂ (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 (patrz załącznik do ćwiczeń)

Wykonanie ćwiczenia

1. Do probówki Eppendorfa o poj. 0,5 ml, umieszczonej w lodzie, odmierzyć następujące składniki mieszaniny reakcyjnej:
 - 23 µl dejonizowanej wody
 - 5 µl dNTP
 - 5 µl buforu dla polimerazy *Taq*
 - 5 µl roztworu MgCl₂
 - 2 µl genomowego DNA drożdży
 - 2 µl 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 µl obu starterów do amplifikacji genu kodującego białko P1A, a do drugiej probówki dodać po 2 µl obu starterów do amplifikacji P1B.
3. Reakcje przeprowadzić w termocyklerze w warunkach wskazanych przez prowadzącego ćwiczenia. Po reakcji, do każdej probówki dodać po 5 µl 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.

Izolacja i elektroforetyczna analiza RNA z komórek drożdży

Uzyskanie wysokiej jakości RNA jest pierwszym i często krytycznym etapem eksperymentów w biologii molekularnej m. in. analizy „Northern”, RT-PCR, badaniu ochrony przed nukleazami, translacji *in vitro*, mapowania RNA, konstrukcji bibliotek cDNA. W izolacji RNA duże znaczenie ma szybkość przeprowadzania procedury oczyszczania i kontrolowanie aktywności rybonukleaz komórkowych, które mogą doprowadzić do szybkiej degradacji RNA. Dlatego też podczas izolacji RNA wszystkie odczynniki należy przygotowywać z użyciem wody traktowanej 0,1% piowęgłanem dietylu (DEPC), który jest silnym inhibitorem RNaz. Ponadto trzeba stosować jednorazowy sterylny sprzęt laboratoryjny wykonany z tworzyw sztucznych, który jest wolny od RNaz, a sprzęt wielokrotnego użytku umieszczać w 3% roztworze H₂O₂, po czym przepłukać wodą traktowaną DEPC.

Opracowano szereg metod pozwalających na wyizolowanie czystych i niezdegradowanych preparatów kwasów nukleinowych o pełnej aktywności biologicznej. Celem ćwiczeń jest porównanie dwóch metod izolacji RNA. Jedną z nich jest ekstrakcja fenolowa. W podanej procedurze, całe nienaruszone komórki drożdży poddawane są ekstrakcji fenolowej podczas, której RNA „przechodzi” do tzw. fazy wodnej. DNA jako substancja wielkocząsteczkowa pozostaje w fazie fenolowej, w której obok DNA znajdują się inne składniki komórkowe stanowiące nierozpuszczalną frakcję komórkową. Drugą wykonywaną na ćwiczeniach metodą jest izolacja RNA za pomocą TRIzol zawierającego fenol i izotiocyanian guanidyny.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

IZOLACJA RNA METODĄ EKSTRAKCJI FENOLOWEJ

Materiały i odczynniki

Uwaga! Wszystkie roztwory należy przygotować z użyciem wody traktowanej DEPC.

1. Hodowla *S. cerevisiae* $OD_{600} = 2$ (100 ml)
2. H_2O (DEPC, oziębiona)
3. Bufor do zawieszania komórek drożdży (bufor AE):
50mM CH_3COONa , pH 5,3
10 mM EDTA
4. 10% SDS
5. Kwaśny fenol (stały fenol nasycony wodą a następnie buforem AE)
z 0,1% hydroksychinoliną. Przechowywać w ciemności w $4^{\circ}C$.
6. chloroform
7. 3 M CH_3COONa , pH 5,3
8. 100% etanol (oziębiony)
9. 70% etanol (oziębiony)
10. 2M LiCl – 0,1M CH_3COONa , pH 5,3
11. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 ml i 2 ml oraz końcówki do pipet.
12. Odczynniki i zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych (patrz załącznik do ćwiczeń)

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia schłodzić wirówkę do temp. $+4^{\circ}C$
oraz przygotować blok grzejny o temp. $65^{\circ}C$

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych. Pracę z fenolem wykonywać w rękawicach ochronnych

1. Hodowlę drożdży odwirować w probówkach Eppendorfa o poj. 2 ml przez 3 min. przy 5000 rpm w $4^{\circ}C$ tak, aby w każdej probówce otrzymać osad komórek drożdży pochodzący z 4 ml hodowli. Supernatant odrzucić, a osad komórek drożdży zawiesić w 1 ml oziębionej H_2O , po czym odwirować przez 3 min. przy 5000 rpm w $4^{\circ}C$ (na tym etapie osad komórek drożdży można zamrozić w ciekłym azocie i przechowywać

w -80°C). **Na wykonanie poniższej procedury potrzebny jest osad komórek drożdży w dwóch probówkach.**

2. Osad komórek drożdży w każdej probówce zawiesić w 400 μl buforu AE, dodać po 40 μl 10% SDS i wytrząsać przez 1 min.
3. Dodać do każdej próbki po 440 μl kwaśnego fenolu i wytrząsać całość przez 5 min. a następnie inkubować przez 10 min. w 65°C (wytrząsając co 3 min.).
4. Po inkubacji próbki oziębic przez 5 min. w lodzie, a następnie odwirować przez 3 min. **(jeśli nie zaznaczono inaczej wszystkie wirowania wykonywać przy 14000 rpm w 4°C)** w celu rozdzielenia fazy fenolowej i wodnej
5. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml, ponownie dodać po 400 μl kwaśnego fenolu i wytrząsać przez 5 min. a następnie odwirować przez 3 min.
6. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml, dodać po 400 μl chloroformu (usuwanie resztek fenolu) i wytrząsać przez 5 min. a potem odwirować przez 3 min.
7. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml, dodać po 40 μl 3M octanu sodu, pH 5,3 oraz 1 ml oziębionego 100% etanolu.
8. Próbkę pozostawić w temp. -20°C na 20 min. lub na noc w celu precypitacji RNA. Następnie, precypitat RNA odwirować przez 10 min. Uzyskany osad przemyć 1 ml oziębionego 70% etanolu i powtórnie odwirować przez 5 min.
9. Osad z jednej próbki wysuszyć na powietrzu (kilka minut do odparowania etanolu, nie dopuszczając do całkowitego wyschnięcia osadu), a następnie rozpuścić w 20 μl wody i zmierzyć stężenie otrzymanego RNA (patrz załącznik do ćwiczeń). RNA przechowywać w temp. -70°C do analizy elektroforetycznej (surowy preparat RNA).
10. Osad z drugiej próbki rozpuścić w 1 ml roztworu 2M chlorku litu z 0,1M octanem sodu o pH 5,3 i mieszać przez 10 min.
11. Odwirować próbkę przez 10 min. i delikatnie usunąć, przy pomocy pipety, supernatant. Uzyskany po wirowaniu osad to rRNA, który należy wysuszyć, a następnie zawiesić w 15 μl wody i zmierzyć stężenie otrzymanego RNA (patrz załącznik do ćwiczeń). RNA przechowywać w temp. -70°C do analizy elektroforetycznej.

IZOLACJA RNA PRZY UŻYCIU TRIzolu

Materialy i odczynniki

1. Hodowla *S. cerevisiae* $OD_{600} = 4$ (100 ml)
2. H_2O (DEPC, oziębiona)
3. TRIzol
4. Chloroform
5. Izopropanol
6. 70% etanol
7. Bufor do precypitacji: 1,2 M NaCl; 0,8 M cytrynian disodowy · 15 H_2O
8. Kulki szklane
9. Jałowe próbówki Eppendorfa o pojemności 1,5 ml i 2 ml oraz końcówki do pipet.

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia schłodzić wirówkę do temp. $+4^{\circ}C$ oraz przygotować blok grzejny o temp. $50^{\circ}C$

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych. Pracę z TRIzolem wykonywać w rękawicach ochronnych.

1. Pobrać 2 ml zawiesiny drożdży do próbówki Eppendorfa o poj. 2 ml i odwirować w przez 3 min. przy 5000 rpm w $4^{\circ}C$.
2. Supernatant odrzucić a osad zawiesić w 1 ml oziębionej wody, po czym odwirować przez 3 min przy 5000 rpm w $4^{\circ}C$.
3. Supernatant odrzucić a osad drożdży zawiesić w 1 ml TRIzolu i przenieść do próbówki ze szklanymi kulkami.
4. Mieszaninę wytrząsać na wytrząsarce typu vorteks siedem razy po 30 sekund, robiąc przerwy (30 sekund) po każdym 30 sekundach wytrząsania w celu schłodzenia próbówki z mieszaniną w lodzie.
5. Następnie zawiesinę przenieść do nowej próbówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i inkubować przez 5 min. w $50^{\circ}C$.
6. Po inkubacji zawiesinę wirować przez 1 min, przy 10000 rpm,

7. Przenieść supernatant do nowej probówki Eppendorfa o poj. 1, 5 ml, dodać 200 μ l chloroformu i wytrząsać przez 5 minut.
8. Mieszaninę odstawić na 3 min. w temperaturze pokojowej, po czym wirować przez 15 min., przy 10000 rpm w 4°C
9. Górną fazę wodną przenieść do nowej probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml, dodać 250 μ l izopropanolu i 250 μ l buforu do precypitacji (zmniejsza zanieczyszczenie oligosacharydami i proteoglikanami), zamieszać.
10. Inkubować mieszaninę przez 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirować przez 10 min, przy 10000 rpm w 4°C.
11. Supernatant odrzucić, a do probówki z osadem RNA dodać 0,5 ml 70% oziębionego etanolu i delikatnie wymieszać przez odwracanie.
12. Wirować przez 5 min, przy 10000 rpm w 4°C.
13. Supernatant odrzucić i pozostawić otwartą probówkę Eppendorfa na kilka minut w temperaturze pokojowej w celu odparowania etanolu. **Nie dopuścić do całkowitego wyschnięcia osadu!**
14. Osad rozpuścić w 50 μ l wody (jeśli pojawiają się problemy z rozpuszczalnością RNA - inkubować przez 10 min. w temp. 50°C)
15. Zmierzyć stężenie otrzymanego RNA (patrz załącznik do ćwiczeń). RNA przechowywać w temp. -70°C do analizy elektroforetycznej.

Elektroforetyczna analiza RNA

1. Przygotować 100 ml 1% roztworu agarozy w buforze TAE według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń.
2. Do próbek RNA zawieszonych w wodzie dodać równą objętość buforu próbkowego do elektroforezy RNA.
3. Nanieść przygotowane próbki RNA na żel.
4. Rozdział prowadzić przy napięciu 100V dopóki czoło barwnika nie dotrze do 3/4 długości żelu.
5. Po zakończonej elektroforezie obserwować rozdzielone RNA pod lampą UV.

Interpretacja wyników

1. Porównać skład preparatów poddawanych elektroforezie.
2. Określić masy cząsteczkowe rozdzielonych cząsteczek RNA.

Izolacja kinaz białkowych z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Kinazy białkowe uczestniczą w regulacji wielu procesów metabolicznych, biorą udział w transmisji sygnałów przez błony, regulują procesy wzrostu i różnicowania się komórek.

Oczyszczanie enzymów jest stosowane w badaniach ich struktury i funkcji. W tym celu stosuje się metody chromatografii jonowymiennej, chromatografii powinowactwa i sączenia molekularnego, w których wykorzystuje się takie cechy białek enzymatycznych jak: ładunek, powinowactwo wiązania do nośników, wielkość. Poniżej podana jest jedna z metod oczyszczania białek przez rozdział w procesie chromatografii jonowymiennej (ang. *ion exchange chromatography* – IEC). Rozdział białek w technice IEC polega na odwracalnej adsorpcji obdarzonych ładunkiem elektrycznym makromolekuł na nośniku jonowymiennym (jonowymieniaku). Jonowymieniacz to złoże chromatograficzne z unieruchomionymi na powierzchni polarnymi cząsteczkami posiadającymi ładunek elektryczny określonego znaku. W zależności od tego jakie jony wiąże jonowymieniacz, mówimy o anionowymieniaku (anionicie) – wiążącym aniony lub o kationowymieniaku (kationicie) – wiążącym kationy.

Celem ćwiczenia jest oczyszczenie kinaz białkowych PKA i CK2 z frakcji cytoplazmatycznej komórek drożdży na DEAE-celulozie (anionit) i P-11 celulozie (kationit).

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materialy i odczynniki

1. Wysolony supernatant postrybosomalny z drożdży *S. cerevisiae*
2. DEAE-celuloza (DE-52) i P-11 celuloza wyrównoważone w buforze do preparatyki kinaz białkowych
3. Bufor C (do preparatyki kinaz białkowych)
 - 50 mM Tris – HCl, pH 7,5
 - 0,5 mM EDTA
 - 6 mM β - MET
 - 0,5 mM PMSF

4. 0,2 M NaCl w buforze C
5. 0,4 M NaCl w buforze C
6. 0,7 M NaCl w buforze C
7. Bufor C z dodatkiem 50% glicerolu
8. Wąż dializacyjny
9. Wirówka szybkoobrotowa Allegra

Wykonanie ćwiczenia

Chromatografia na DEAE-celulozie

1. Do 5 ml celulozy dodać odpowiednią ilość wysolonej frakcji cytoplazmatycznej, przyjmując, że 1 ml DE-52 wiąże 5 mg białka.
2. Delikatnie mieszać przez 10 min., a następnie dodać 5 ml buforu C, zamieszać, odwirować (**jeśli nie zaznaczono inaczej wszystkie wirowania wykonywać przy 4000 rpm przez 5 min. w 4⁰C**) i zebrać supernatant (frakcja 1 – zawierająca białka niewiążące się do DE-52),
3. Do DE-52 dodać 40 ml 0,2 M NaCl w buforze C, zamieszać, odwirować i odrzucić supernatant.
4. Powtórzyć pkt 3.
5. Do DE-52 dodać 5 ml 0,4 M NaCl (w celu elucji białek związanych z DE-52), mieszać przez 10 min. i po odwirowaniu zebrać supernatant (frakcja 2).

Oczyszczanie PKA na P-11 celulozie

1. Supernatant zawierający białka niewiążące się do DE-52 (frakcja 1) dodać do 5 ml P-11 celulozy, delikatnie mieszać przez 10 min. po czym odwirować i supernatant odrzucić.
2. Do P-11 celulozy dodać 40 ml buforu C, zamieszać, odwirować i odrzucić supernatant.
3. Powtórzyć pkt 2.
4. Następnie do P-11 celulozy dodać 5 ml 0,2 M NaCl w buforze C, mieszać przez 10 min. po czym odwirować i zebrać supernatant zawierający aktywność kinazy białkowej A.

5. Zebrany supernatant poddać dializie (przepis – patrz załącznik do ćwiczeń) wobec buforu C z dodatkiem 50% glicerolu. Po zakończeniu dializy roztwór przechowywać w temp. -20°C .

Oczyszczanie CK2 na P-11 celulozie

1. Supernatant ulegający elucji przy 0,4 M NaCl (frakcja 2) rozcieńczyć dwukrotnie buforem C i dodać do 5 ml P-11 celulozy, delikatnie mieszać przez 10 min. po czym odwirować i supernatant odrzucić.
2. Do P-11 celulozy dodać 40 ml 0,2 M NaCl w buforze C, zamieszać, odwirować i odrzucić supernatant.
3. Powtórzyć pkt 2.
4. Następnie do P-11 celulozy dodać 5 ml 0,7 M NaCl w buforze C, mieszać przez 10 min. po czym odwirować i zebrać supernatant zawierający aktywność kinazy białkowej CKII.
5. Zebrany supernatant poddać dializie (przepis – patrz załącznik do ćwiczeń) wobec buforu C z dodatkiem 50% glicerolu. Po zakończeniu dializy roztwór przechowywać w temp. -20°C .

Lokalizacja i regulacja aktywności kinazy białkowej CK2

Kinaza białkowa CK2 (dawniej nazywana kinazą kazeinową II) jest tradycyjnie klasyfikowana jako kinaza serynowo-treoninowa, niezależna od wtórnych przekazników. Niemniej pojawiły się doniesienia o zdolności CK2 do fosforylacji białek w resztach tyrozynowych. Wykazano m.in., że jądrowe białko immunofilina FPR3 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest fosforylowane w reszcie tyrozyny w pozycji 183 przez CK2, co czyni ją kinazą o podwójnej specyficzności. Lista przypuszczalnych fizjologicznych substratów tego enzymu zawiera ponad 300 białek, wśród których znajdują się syntaza glikogenu, receptor insuliny, białka c-Myc i c-Myb czy topoizomerazy DNA I i II. Kinaza białkowa CK2 jest szeroko rozpowszechniona w organizmach eukariotycznych. W większości z nich występuje jako tetrameryczny kompleks składający się z dwóch podjednostek katalitycznych (α i/lub α') i dwóch podjednostek regulatorowych β . W fosforylowanym białku CK2 rozpoznaje resztę seryny lub treoniny w sekwencji Ser/Thr – X – X - Asp/Glu/pSer/pThr/pTyr, gdzie X oznacza dowolny aminokwas.

Celem ćwiczenia jest wykazanie obecności CK2 w formie zasocjowanej z rybosomami i wolnej w cytoplazmie komórki drożdżowej oraz określenie specyficzności substratowej i wpływu efektorów na aktywność tej kinazy.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Preparat enzymatyczny kinazy CK2 po oczyszczeniu na DE-52 celulozie i P-celulozie
2. Frakcja mikrosomalna i rybosomy surowe o stężeniu 15 mg/ml
3. Bufor do oznaczania aktywności kinaz – 10 x stężony:
 - 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 150 mM MgCl₂
 - 60 mM β -MET
4. Substraty dla kinaz białkowych – 10 x stężone:

- fosfityna (30 mg/ml)
- kazeina defosforylowana (30 mg/ml)
- histon IIA (3 mg/ml)
- protamina (3 mg/ml)
- rybosomalne białka P (3 mg/ml)
- 5. 0,5 mM polilizyna
- 6. Heparyna – 50 µg/ml
- 7. 2 mM spermina
- 8. 3 mM GTP
- 9. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP
- 10. Kwas octowy 30% i 15%
- 11. Kwas trójchlorooctowy 10% i 5%
- 12. Krążki z bibuły szklanej i P-81
- 13. Płyn scyntylicyjny
- 14. Odczynniki i zestaw do elektroforezy SDS-PAGE (patrz załącznik do ćwiczeń)

Wykonanie ćwiczenia

Ustalenie optymalnej ilości enzymu

Optymalną dla przebiegu reakcji ilość enzymu ustalić badając aktywność kinazy białkowej CK2 wobec kazeiny jako substratu. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 50 µl zawiera:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 15 mM MgCl₂
- 6 mM β-MET
- 30µM [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP
- 150 µg kazeiny
- 2 - 10 µl frakcji enzymatycznej

Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać według kolejności przedstawionej w poniższej tabeli (w μl):

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Probówka nr					
	1	2	3	4	5	6
H ₂ O	uzupełnić do objętości 50 μl					
Bufor do oznaczania aktywności kinaz	5	5	5	5	5	5
Kazeina	-	5	-	5	-	5
[$\gamma^{32}\text{P}$] ATP	5	5	5	5	5	5
Fracja enzymatyczna	2	2	5	5	10	10

Inkubację prowadzić 20 min. w temp. 30⁰C. Reakcję zatrzymać przez dodanie 100 μl 10% TCA w celu precypitacji białek a następnie przesączyć na filtrach z bibuły szklanej, przemywając dwa razy po 5 ml roztworu 5% TCA. Krążki wysuszyć i umieścić w płynie scyntylicyjnym. Zliczyć radioaktywność.

Określenie specyficzności substratowej kinazy białkowej CK2

Zbadać aktywność kinazy białkowej CK2, uwzględniając optymalną ilość enzymu, z wykorzystaniem poniżej podanych substratów. Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać według schematu podanego dla ustalenia optymalnej ilości enzymu.

Lp.	Substrat	Wyjściowe stężenie substratu	Końcowe stężenie substratu (w mieszaninie inkubacyjnej)
1.	fosfityna	30 mg/ml	3 mg/ml
2.	kazeina	30 mg/ml	3 mg/ml
3.	rybosomalne białka P	3 mg/ml	0,3 mg/ml
4.	protamina	3 mg/ml	0,3 mg/ml
5.	histon IIA	3 mg/ml	0,3 mg/ml

Inkubację prowadzić 20 min. w temp. 30⁰C. Reakcję w probówkach zawierających fosfitynę, kazeinę i rybosomalne białka P zatrzymać przez dodanie 100 μl 10% TCA, a następnie przesączyć na filtrach z bibuły szklanej, przemywając dwa razy po 5 ml 5% roztworem TCA po czym wysuszyć i umieścić w płynie scyntylicyjnym. Zliczyć radioaktywność. W przypadku próbek zawierających protaminę i histon IIA bezpośrednio po

inkubacji nanosić po 40 μ l mieszaniny inkubacyjnej na krążki z bibuły P-81. Krążki płukać przez 10 min. kolejno w 30% i 15% kwasie octowym a następnie wysuszyć i umieścić w płynie scyntylicyjnym. Zliczyć radioaktywność.

Badanie wpływu efektorów na aktywność CK2

Zbadać wpływ polilizyny i heparyny na aktywność kinazy białkowej CK2, (uwzględniając optymalną ilość enzymu), wobec kazeiny jako substratu. Końcowe stężenie polilizyny w mieszaninie inkubacyjnej powinno wynosić 0,05 mM, 0,1 mM i 0,2 mM, zaś heparynę należy dodawać do końcowego stężenia równego 5 μ g/ml oraz 10 μ g/ml. Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać i inkubację prowadzić według schematu podanego dla ustalenia optymalnej ilości enzymu.

Lokalizacja CK2 w formie zasocjowanej z rybosomami

Występowanie kinazy CK2 w formie zasocjowanej z rybosomami można wykazać inkubując rybosomy ze źródłem reszty fosforanowej, np. [γ^{32} P] ATP, w obecności efektorów aktywności CK2, bez dodawania preparatu egzogennej kinazy.

Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać według kolejności przedstawionej w poniższej tabeli (w μ l):

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Probówka nr					
	1	2	3	4	5	6
H ₂ O	uzupełnić do objętości 50 μ l					
Bufor do oznaczania aktywności kinaz	5	5	5	5	5	5
Mikrosomy	10	-	-	-	-	-
Rybosomy surowe	-	10	10	10	10	10
Heparyna	-	-	5	10	-	-
Spermina	-	-	-	-	5	-
GTP	-	-	-	-	-	5
[γ^{32} P] ATP	10	10	10	10	10	10

1. Mieszaninę inkubować 30 min. w temp. 30⁰C, po czym dodać 20 μ l buforu próbkowego do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w celu zatrzymania reakcji.

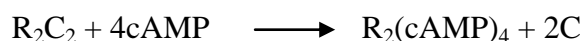
2. Przygotować 13,8 % żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
3. Próbki zawieszona w buforze próbkowym ogrzewać przez 3 minuty w temperaturze 90°C. Bezpośrednio po ogrzaniu nanosić na żel po 20 µl przygotowanych próbek. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Po rozdzieleniu białka wybarwić błękitem *Coomassie* (patrz załącznik do ćwiczeń), wysuszyć, a następnie poddać autoradiografii.

Interpretacja wyników

1. Określić, które białka ulegają fosforylacji przez kinazę białkową CK2.
2. Porównać wpływ poszczególnych efektorów na aktywność kinazy CK2.
3. Porównać poziom fosforylacji mikrosomów i rybosomów surowych przez kinazę białkową CK2 zasocjowaną z rybosomami.

Aktywacja i specyficzność substratowa kinazy zależnej od cAMP

Kinaza białkowa zależna od cAMP, zwana także kinazą A (PKA) należy do najlepiej poznanych wielofunkcyjnych kinaz serynowo-treoninowych. Substratami dla tej kinazy są m.in. białka histonowe, białko S6 podjednostki rybosomowej 40S, syntaza glikogenu. PKA jest holoenzymem składającym się z dwóch podjednostek regulatorowych (R) i dwóch podjednostek katalitycznych (C). W obecności cAMP w komórce następuje aktywacja kinazy w wyniku dysocjacji nieaktywnego holoenzymu na dimer podjednostek regulatorowych i dwa aktywne monomery podjednostki katalitycznej według wzoru:



W warunkach *in vitro*, aktywację kinazy A można przeprowadzić drogą kontrolowanej proteolizy przy użyciu trypsyny, która odcina w podjednostce regulatorowej kinazy A domenę wiążącą cykliczne nukleotydy, co prowadzi do aktywacji kinazy. Podjednostki regulatorowe są istotne dla lokalizacji PKA w komórce. Przy udziale białek AKAP (ang. *A-kinase anchoring protein*) wiążących się z jednej strony do podjednostek regulatorowych PKA a z drugiej do białek cytoszkieletu czy membran organelli kinaza A jest kierowana do określonych miejsc w komórce.

Celem ćwiczenia jest określenie specyficzności substratowej kinazy A oraz sposobów jej aktywacji.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Preparat enzymatyczny kinazy A po oczyszczeniu na DE-52 celulozie i P-celulozie
2. Bufor do oznaczania aktywności kinaz – 10 x stężony
3. Substraty dla kinaz białkowych – 10 x stężone (patrz str. 39)
4. 20 μ M cAMP
5. 20 μ M cGMP
6. [γ ³²P]ATP

7. Bufor T – 10 x stężony:
 - 100 mM Tris-HCl pH 8,0
 - 100 mM β -MET
8. BSA 6 mg/ml
9. Trypsyna 40 μ g/ml w 1 mM HCl
10. 1 mM HCl
11. Inhibitor trypsyny 0,4 mg/ml
12. Kwas octowy 30% i 15%
13. Kwas trójchlorooctowy 10% i 5%
14. Krążki z bibuły szklanej oraz P-81
15. Płyn scyntylacyjny

Wykonanie ćwiczenia

Ustalenie optymalnej ilości enzymu

Optymalną dla przebiegu reakcji ilość enzymu ustalić badając aktywność kinazy PKA wobec protaminy jako substratu. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 50 μ l zawiera:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 15 mM $MgCl_2$
- 6 mM β -MET
- 30 μ M [$\gamma^{32}P$] ATP
- 15 μ g protaminy
- 2 μ M cAMP
- 2 - 10 μ l frakcji enzymatycznej

Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać według kolejności przedstawionej w poniższej tabeli (w μl):

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Probówka nr					
	1	2	3	4	5	6
H ₂ O	uzupełnić do objętości 50 μl					
Bufor do oznaczania aktywności kinaz	5	5	5	5	5	5
Protamina	5	5	5	5	5	5
cAMP	-	5	-	5	-	5
[γ ³² P] ATP	5	5	5	5	5	5
Fracja enzymatyczna	2	2	5	5	10	10

Inkubację prowadzić 20 min. w temp. 30⁰C. Bezpośrednio po inkubacji nanosić po 40 μl mieszaniny inkubacyjnej na krążki z bibuły P-81. Krążki płukać po 5 min. kolejno w 30% i 15% kwasie octowym a następnie wysuszyć i umieścić w płynie scyntylicyjnym. Zliczyć radioaktywność.

Określenie specyficzności substratowej kinazy A

Zbadać aktywność kinazy A, uwzględniając optymalną ilość enzymu, z wykorzystaniem poniżej podanych substratów. Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać według schematu podanego dla ustalenia optymalnej ilości enzymu (zamiast protaminy dodawać podane poniżej substraty).

Lp.	Substrat	Wyjściowe stężenie substratu	Końcowe stężenie substratu (w mieszaninie inkubacyjnej)
1.	fosfityna	30 mg/ml	3 mg/ml
2.	kazeina	30 mg/ml	3 mg/ml
3.	histon IIA	3 mg/ml	0,3 mg/ml
4.	protamina	3 mg/ml	0,3 mg/ml
5.	rybosomalne białka P	3 mg/ml	0,3 mg/ml

Inkubację prowadzić 20 min. w temp. 30⁰C. W probówkach zawierających fosfitynę, kazeinę i rybosomalne białka P, reakcję zatrzymać przez dodanie 100 μl 10% TCA, a następnie przesączyć na filtrach z bibuły szklanej, przemywając, dwa razy po 5 ml, 5% roztworem TCA, po czym wysuszyć i umieścić w płynie scyntylicyjnym. Zliczyć

radioaktywność. W przypadku próbek zawierających protaminę i histon IIA bezpośrednio po inkubacji nanosić po 40 μ l mieszaniny inkubacyjnej na krążki z bibuły P-81. Krążki płukać przez 10 min. kolejno w 30% i 15% kwasie octowym, a następnie wysuszyć i umieścić w płynie scyntylicyjnym. Zliczyć radioaktywność.

Badanie wpływu cGMP na aktywność kinazy A

Zbadać wpływ cGMP na aktywność kinazy A (uwzględniając optymalną ilość enzymu), wobec protaminy jako substratu. Końcowe stężenie cGMP w mieszaninie inkubacyjnej powinno wynosić 2 μ M i 4 μ M. Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać, a także inkubację prowadzić według schematu podanego dla ustalenia optymalnej ilości enzymu (zamiast cAMP dodawać cGMP).

Aktywacja kinazy A drogą kontrolowanej proteolizy

Preparat kinazy A poddać inkubacji z trypsyną i bez trypsyny. Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać według kolejności przedstawionej w poniższej tabeli (w μ l):

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Probówka nr	
	1	2
H ₂ O	uzupełnić do objętości 50 μ l	
Bufor T – 10x stężony	5	5
BSA – 6 mg/ml	5	5
HCl – 1 mM	5	-
Trypsyna – 40 μ g/ml	-	5
Preparat kinazy A	20	20

Inkubację prowadzić 15 min. w temp. 30⁰C, po czym dodać 5 μ l sojowego inhibitora trypsyny w celu zatrzymania reakcji. Następnie w obu preparatach enzymatycznych sprawdzić aktywność kinazy A wobec protaminy jako substratu w obecności cAMP i bez cAMP według schematu podanego dla ustalenia optymalnej ilości enzymu.

Interpretacja wyników

1. Określić, które białka ulegają fosforylacji przez kinazę A.
2. Wymienić sposoby aktywacji kinazy A.

Izolacja jąder komórkowych i histonów

U organizmów eukariotycznych, większość DNA znajduje się w wyspecjalizowanych organellach – jądrach komórkowych. DNA jądrowy występuje w postaci kompleksu nukleoproteinowego, zwanego chromatyną. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom. W skład nukleosomu wchodzi tzw. cząstka rdzeniowa (ang. *core particle*), cząsteczka histonu H1 i fragment DNA o długości ok. 190-220 pz. Cząstkę rdzeniową tworzy kompleks ośmiu histonów (oktamer) zwanych histonami rdzeniowymi (po dwie cząsteczki histonów H2A, H2B, H3 i H4). Wokół oktameru owinięty jest odcinek DNA o długości 140-150 pz. Pozostałą część stanowi łącznikowy DNA (ang. *linker DNA*) o długości 50-70 pz z którym oddziałuje pojedyncza cząsteczka histonu H1. Znanych jest wiele wariantów sekwencyjnych histonu H1, występujących w określonych tkankach lub etapach rozwoju danego organizmu. Na przykład w jądrzastych erytrocytach ptaków zamiast histonu H1 występuje histon H5.

Histony mogą podlegać szeregu modyfikacjom potranslacyjnym, np. acetylacji, metylacji, fosforylacji czy ubikwitynacji. Modyfikacje te mają istotne znaczenie w regulacji stopnia upakowania DNA i jego dostępności dla replikacji i transkrypcji np. acetylacja reszt lizyny na N-końcu łańcucha polipeptydowego histonów rdzeniowych zmniejsza ich powinowactwo do DNA, co powoduje rozluźnienie struktury chromatyny i zwiększenie poziomu ekspresji genów. Warto zauważyć, że wpływ modyfikacji potranslacyjnych histonów na stopień kondensacji chromatyny i ekspresję genów nie zależy tylko od rodzaju modyfikacji ale także od miejsca wystąpienia takiej modyfikacji na białku histonowym, np. metylacja reszty lizyny w pozycji 9 łańcucha polipeptydowego histonu H3 powoduje zwiększenie stopnia upakowania chromatyny i wyciszenie ekspresji genów zaś metylacja reszty lizyny w pozycji 4 wpływa na rozluźnienie struktury chromatyny. Wysunięto więc hipotezę „kodu histonowego”, która zakłada, że istnieją pewne określone wzory modyfikacji histonów odpowiedzialne za zachodzenie konkretnych procesów w komórce.

Materiał badawczy do ćwiczeń stanowi linia komórkowa fibroblastów mysich NIH 3T3 lub linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy HeLa. Komórki hodowane są na płytkach Petriego (10x14cm) odpowiednio w płynie hodowlanym DMEM i RPMI, w temperaturze 37⁰C i w atmosferze 5% CO₂. Celem ćwiczenia jest otrzymanie preparatów zawierających wszystkie białka jądrowe oraz izolacja histonów z jąder komórek linii NIH 3T3 lub HeLa. Histony oczyszcza się z jąder komórkowych wykorzystując zdolność

tych białek do rozpuszczania się w kwasach nieorganicznych, np. 0,25M HCl lub 0,2M H₂SO₄.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Hodowla komórkowa fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa o gęstości komórek ok. 90% (trzy płytki Petriego na jeden zespół studentów)
2. Bufor PBS
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄, pH 7,5
3. Bufor do izolacji jąder:
 - 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 100 mM NaCl
 - 250 mM sacharoza
 - 1 mM EDTA
 - 0,5% Triton X-100
4. Bufor próbkowy do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (4x stężony)
5. 0,25 M HCl
6. Aceton (oziębiony)
7. Zdrapywacz do komórek
8. Homogenizator szklano-teflonowy o pojemności 2 ml
9. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet.

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować blok grzejny o temp. 95⁰C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4⁰C

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Jeśli nie zaznaczono inaczej, poniższe czynności należy wykonywać w temp. +4⁰C

Otrzymywanie jąder z fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa

1. Trzy płytki Petriego z komórkami fibroblastów mysich o gęstości ok. 90% przenieść na lód i ściągnąć pipetą płyn hodowlany.
2. Przepłukać komórki na każdej płytce 5 ml oziębionego buforu PBS.
3. Po ściągnięciu pipetą buforu PBS zeskrabać komórki fibroblastów z płytek za pomocą specjalnego zdrapywacza do komórek. Zawiesinę komórek splukać ze wszystkich płytek 3 ml oziębionego PBS i przenieść do dwóch probówek Eppendorfa o poj. 2 ml.
4. Komórki odwirować przy prędkości 2500 rpm przez 5 min. Supernatant odrzucić, a osad z obu probówek zawiesić łącznie w 1,5 ml buforu do izolacji jąder i inkubować 20 min. w lodzie.
5. Przenieść zawiesinę komórek do homogenizatora szklano-teflonowego i dezintegrować wykonując 40 ruchów teflonowym tłoczkiem (stopień dezintegracji można zweryfikować przy użyciu mikroskopu świetlnego).
6. Uzyskany dezintegrat komórek przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 2 ml i odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
7. Supernatant (zawierający białka cytoplazmatyczne) przenieść do nowej probówki Eppendorfa, oznaczyć w nim stężenie białka metodą *Bradford* (przepis w załączniku do ćwiczeń), a następnie przygotować próbki do elektroforezy SDS-PAGE zawierające po 15 µg i 30 µg białka (przepis w załączniku do ćwiczeń). Gotowe próbki do analizy metodą SDS-PAGE przechowywać w temp. -20⁰C do kolejnych ćwiczeń.
8. Do osadu jąder dodać 1 ml buforu PBS, kilkakrotnie przepipetować zawartość probówki (probówka nr 1) w celu jej dokładnego wymieszania a następnie przenieść 0,3 ml do nowej probówki Eppendorfa (probówka nr 2). Obie probówki Eppendorfa odwirować przy 2000 rpm przez 10 min. Po odwirowaniu delikatnie usunąć z probówek supernatant przy pomocy pipety.

Izolacja białek jądrowych

1. Osad jąder z próbki nr 2 zawiesić w 30 μ l buforu próbkowego do elektroforezy SDS-PAGE (1x stężony).
2. Próbkę dokładnie wymieszać i inkubować w temp. 95⁰C przez 5 min. W wyniku uwolnienia DNA z jąder zawiesina przyjmuje galaretowatą konsystencję.
3. Po inkubacji próbkę odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 5 min. Supernatant zawierający białka jądrowe przenieść do nowej próbki Eppendorfa i zamrozić.

Izolacja histonów z użyciem 0,25 M HCl

1. Osad jąder z próbki nr 1 zawiesić w 50 μ l 0,25 M HCl .
2. Próbkę pozostawić w temp. pokojowej na 25 min. (ekstrakcja histonów), a następnie odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
3. Supernatant zawierający histony przenieść do nowej próbki Eppendorfa o poj. 1,5 ml.
4. Do osadu dodać ponownie 50 μ l 0,25 M HCl, dokładnie wymieszać i pozostawić na 25 min. w temp. pokojowej (ponowna ekstrakcja w celu zwiększenia wydajności).
5. Próbkę odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
6. Uzyskane supernatanty, zawierające histony, połączyć.
7. Wytrącać histony z supernatantu przez dodanie 8 objętości (0,8 ml) oziębionego acetonu. Całość pozostawić do kolejnych ćwiczeń (minimum na 24 godziny) w temp. -20⁰C.

Analiza składu białkowego chromatyny

Ćwiczenie ma na celu dokonanie analizy białek jądrowych techniką elektroforezy jednokierunkowej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących SDS-PAGE (metoda Laemmli'ego).

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Aceton (oziębiony)
2. Odczynniki i zestaw do elektroforezy SDS-PAGE (patrz załącznik do ćwiczeń)
3. Preparaty białek jądrowych, cytoplazmatycznych i histonów otrzymane w poprzednim ćwiczeniu

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować blok grzejny o temp. 90⁰C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4⁰C

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotować 13,8 % żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń.
2. Próbkę z wytrąconymi histonami odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w 4⁰C w celu otrzymania osadu białek histonowych. Następnie osad przemyć 1 ml oziębionego acetonu i wysuszyć na powietrzu. Osad białek histonowych zawiesić w 30 µl buforu próbkowego do elektroforezy SDS-PAGE (1x stężony).
3. Próbkę zawierającą wszystkie białka jądrowe, wyizolowane histony, białka cytoplazmatyczne oraz wzorce białkowe zawieszony w buforze próbkowym do elektroforezy SDS-PAGE ogrzewać przez 3 min. w temp. 90⁰C. Bezpośrednio po ogrzaniu nanosić na żel po 30 µl przygotowanych próbek. Rozdział prowadzić pod

napięciem 150V, tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Po rozdziale białka wybarwić błękitem *Coomassie* (patrz załącznik do ćwiczeń).

Interpretacja wyników

1. Porównać skład białkowy preparatów poddawanych elektroforezie.
2. Określić masy cząsteczkowe białek histonowych.

Trawienie DNA chromatyny nukleazą ze *Staphylococcus aureus*

Nukleaza ze *Staphylococcus aureus* (MN-aza, nukleaza mikrokokowa) jest stosunkowo niespecyficzną endonukleazą, gdyż tnie zarówno jedno- jak i dwuniciowe kwasy nukleinowe, chociaż bardziej aktywna jest wobec substratów jednoniciowych. Cięcie DNA lub RNA następuje preferencyjnie w regionach bogatych w AT lub AU. Zmieszana z chromatyną MN-aza tnie fragmenty DNA, które nie są chronione przez związanie z białkami. Dlatego też w wyniku działania MN-azy na chromatynę otrzymuje się szereg fragmentów odpowiadających mono- i oligonukleosomom. Enzym ten wykazuje swoją aktywność w obecności jonów Ca^{2+} . Reakcję trawienia chromatyny przez MN-azę można zahamować stosując odpowiednie stężenie EGTA lub EDTA, które działają jako chelatory jonów dwuwartościowych.

Ćwiczenie ma na celu otrzymanie mieszaniny oligonukleosomów w wyniku trawienia chromatyny jąder fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa przez niespecyficzną endonukleazę ze *Staphylococcus aureus*.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Hodowla komórkowa fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa o gęstości komórek ok. 90% (trzy płytki Petriego na jeden zespół studentów)
2. Bufor PBS
3. Bufor do izolacji jąder
4. Zdrapywacz do komórek
5. Homogenizator szklano-teflonowy o poj. 2 ml
6. Bufor do cięcia MN-azą:
 - 20 mM Tris-HCl, pH 8,8
 - 5 mM CaCl_2

7. Roztwór MN-azy w H₂O (300 U/μl). Bezpośrednio przed ćwiczeniami rozcieńczyć MN-azę 240-krotnie (1 μl roztworu MN-azy dodać do 239 μl H₂O). Uzyskuje się końcowe stężenie 1,25 U/μl
8. 100 mM EDTA
9. 10% SDS
10. Pronaza E – roztwór w H₂O o stężeniu 25 mg/ml
11. Fenol, pH 7,5- 8,0
12. Chloroform
13. 5 M NaCl
14. 96% etanol (oziębiony)
15. 70% etanol (oziębiony)
16. Jałowe próbówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet.

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować blok grzejny o temp. 37⁰C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4⁰C

Uwaga! Jeśli nie zaznaczono inaczej, poniższe czynności należy wykonywać w temp. +4⁰C

Otrzymywanie jąder z fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa

1. Trzy płytki Petriego z komórkami fibroblastów mysich o gęstości ok. 90% przenieść na lód i ściągnąć pipetą płyn hodowlany.
2. Przepłukać komórki na każdej płytce 5 ml oziębionego PBS.
3. Po usunięciu PBSu, zeszkrobać komórki fibroblastów z płytek za pomocą specjalnego zdrapywacza do komórek. Zawiesinę komórek spłukać ze wszystkich płytek 3 ml oziębionego PBS i przenieść do dwóch probówek Eppendorfa o poj. 2 ml.
4. Komórki odwirować przy prędkości 2500 rpm przez 5 min. Supernatant odrzucić, a osad z obu probówek zawiesić łącznie w 1,5 ml buforu do izolacji jąder i inkubować 20 min. w lodzie.
5. Przenieść zawiesinę komórek do homogenizatora szklano-teflonowego i dezintegrować wykonując 40 ruchów teflonowym tłoczkiem (stopień dezintegracji można zweryfikować przy użyciu mikroskopu świetlnego).

6. Uzyskany dezintegrat komórek przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 2 ml i odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
7. Po odwirowaniu usunąć z probówki supernatant przy pomocy pipety, a do osadu jąder dodać 1 ml buforu do cięcia MN-azą i dokładnie wymieszać (za pomocą pipety).

Trawienie DNA chromatyny MN-azą

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych. Pracę z fenolem wykonywać w rękawicach ochronnych.

1. Zawiesinę jąder komórkowych odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min. Supernatant odrzucić, a osad jąder zawiesić ponownie w 1 ml buforu do cięcia MN-azą
2. Dodać 5 μ l przygotowanego roztworu MN-azy (6,25u) i wymieszać dokładnie zawartość probówki.
3. Bezpośrednio po dodaniu enzymu przenieść 300 μ l mieszaniny do nowej probówki Eppendorfa o poj. 1,5 zawierającej 30 μ l oziębionego 100 mM EDTA (czas trawienia 0).
4. Pozostałą część mieszaniny inkubować w temp. 37°C. Po upływie 5 i 10 min. (licząc od czasu 0) inkubacji, przenosić po 300 μ l mieszaniny do nowych probówek Eppendorfa zawierających po 30 μ l oziębionego 100 mM EDTA.
5. Do tak otrzymanych próbek dodać po 5 μ l 10% SDS i 3 μ l roztworu pronazy.
6. Inkubować próbki przez 30 min. w temp. 37°C (trawienie białek jądrowych). Reakcję zatrzymać przez dodanie 34 μ l 10% SDS.
7. Do każdej probówki dodać po 400 μ l fenolu i wytrząsać całość przez 10 min. (ekstrakcja DNA) po czym odwirować przez 5 min. **(jeśli nie zaznaczono inaczej wszystkie wirowania wykonywać przy 10000 rpm w 4°C)** w celu rozdzielenia faz.
8. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa, dodać po 400 μ l chloroformu i wytrząsać przez 5 min. (usuwanie resztek fenolu), a potem odwirować przez 5 min.
9. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa i dodać po 6 μ l 5M NaCl oraz 800 μ l oziębionego 96% etanolu. Próbkę pozostawić w temp. -20°C, w celu precypitacji DNA, do kolejnych ćwiczeń.

Elektroforetyczna analiza DNA po trawieniu nukleazą ze *Staphylococcus aureus*

Ćwiczenie ma na celu dokonanie analizy otrzymanych na poprzednich ćwiczeniach preparatów DNA techniką elektroforezy w żelu agarozowym.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Odczynniki i zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych (patrz załącznik do ćwiczeń)
2. Preparaty DNA otrzymane w trakcie poprzednich ćwiczeń.

Wykonanie ćwiczenia

1. Wytrącony na poprzednich ćwiczeniach DNA odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w 4⁰C. Uzyskany osad DNA przemyć 1 ml oziębionego 70% etanolu, po czym odwirować przy 10000 rpm przez 5 min. i wysuszyć na powietrzu.
2. Osad DNA rozpuścić w 20 µl buforu próbkowego do elektroforezy DNA.
3. Przygotować 80 ml 1% roztworu agarozy w buforze TAE według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń
4. Na żel agarozowy nanieść otrzymane próbki DNA. Rozdział fragmentów DNA prowadzić przy napięciu 100V dopóki czoło barwnika nie dotrze do 3/4 długości żelu. Po zakończonej elektroforezie obserwować rozdzielone fragmenty DNA pod lampą UV. Obrazem trawienia powinna być „drabinka” prążków, które odpowiadają fragmentom DNA stanowiącym wielokrotność około 200 par zasad.

Interpretacja wyników

1. Porównać obraz elektroforetyczny DNA przed i po trawieniu MN-azą.
2. Określić wielkość fragmentów DNA otrzymanych w wyniku działania MN-azy.

Wykrywanie inhibitorów proteaz serynowych

Proteazy (proteinyazy, peptydazy) to duża grupa enzymów należących do klasy hydrolaz, przeprowadzających hydrolizę wiązań peptydowych. Ze względu na mechanizm katalizy proteazy podzielone zostały na następujące grupy:

- proteazy serynowe,
- proteazy treoninowe,
- proteazy cysteinowe,
- proteazy aspartyłowe
- metaloproteazy
- proteazy glutamylowe

Niektóre proteazy odcinają końcowe aminokwasy od łańcucha peptydowego (egzopeptydazy, np. aminopeptydaza N, karboksypeptydaza A), a inne hydrolizują wewnętrzne wiązania peptydowe (endopeptydazy, np. tripsyna, chymotrypsyna, pepsyna, trombina). Proteazy występują w komórkach wszystkich organizmów. Aktywność proteaz jest hamowana przez specyficzne inhibitory.

Ponad jedną trzecią wszystkich znanych enzymów proteolitycznych stanowią proteazy serynowe. Są one zaangażowane w różnorodne reakcje w organizmie poczynając od prostego trawienia białek w przewodzie pokarmowym po precyzyjnie regulowane kaskady np. kaskada krzepnięcia krwi. Centrum aktywne wszystkich proteaz serynowych zawiera trzy, położone blisko siebie, reszty aminokwasowe: histydynę, serynę i kwas aspartyłowy, tworzące tzw. triadę katalityczną biorącą bezpośredni udział w hydrolizie wiązania peptydowego.

Trombina (EC 3.4.21.5) to enzym osocza należący do proteaz serynowych. Produkowana jest z protrombiny osocza pod wpływem tromboplastyny i aktywatorów. Trombina umożliwia powstanie nierozpuszczalnej fibryny z rozpuszczalnego fibrynogenu umożliwiając krzepnięcie krwi. Trombina rozpoznaje sekwencję Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser i przecina wiązanie peptydowe pomiędzy resztami Arg i Gly. Enzym wykazuje aktywność w pH 5,0-10,0 (optimum to pH 8,3) i nie wymaga obecności dwuwartościowych jonów metali ani kofaktorów.

W ćwiczeniu białko, zawierające sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez trombinę, jest inkubowane z trombiną w obecności i bez inhibitorów proteaz. Po zakończeniu inkubacji przeprowadza się elektroforezę badanego białka w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w celu identyfikacji inhibitorów hamujących aktywność proteolityczną trombiny.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materialy i odczynniki

1. Roztwór białka zawierającego sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez trombinę w PBS (wg zaleceń prowadzącego ćwiczenia)
2. Trombina (2U/ μ l – bezpośrednio przed ćwiczeniami rozcieńczyć 50-krotnie w PBS)
3. EDTA (80 mM roztwór w H₂O pH 8,0)
4. PMSF (16 mM roztwór w etanolu)
5. Pepstatyna A (16 μ M roztwór w metanolu)
6. Bufor PBS:
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄ pH 7,5
7. Odczynnik Bradford
8. Termoblok
9. Odczynniki i zestaw do elektroforezy SDS-PAGE (patrz załącznik do ćwiczeń)

Wykonanie ćwiczenia

1. Oznaczyć stężenie badanego białka metodą Bradford (przepis strona 80).
2. Badane białko poddać inkubacji z trombiną w obecności i bez inhibitorów proteaz według poniższego schematu (na podstawie podanych stężeń substancji używanych w doświadczeniu, należy samodzielnie obliczyć objętość tych substancji, którą trzeba dodać do próbówki):

Uwaga! Składniki mieszaniny reakcyjnej dodawać wg przedstawionej kolejności

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Probówka nr						
	1	2	3	4	5	6	7
PBS	uzupełnić do objętości 40 μ l						
Trombina (0,04 U/ μ l)	0,4 U	-	0,08U	0,4 U	0,4 U	0,4 U	0,4 U
EDTA 80 mM	-	-	-	-	10 mM	-	-
PMSF 16 mM	-	-	-	-	-	2 mM	-
Pepstatyna A 16 μ M	-	-	-	-	-	-	2 μ M

Zawartość próbek dokładnie wymieszać i inkubować 10 min. w temperaturze pokojowej, a następnie dodać badane białko

Badane białko	-	10 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g	10 μ g
---------------	---	------------	------------	------------	------------	------------	------------

- Mieszaninę inkubować 30 min. w temp. 37⁰C, po czym dodać 15 μ l buforu próbkowego do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w celu zatrzymania reakcji (jeśli zachodzi taka potrzeba, próbki można pozostawić do kolejnych ćwiczeń w temperaturze -20⁰C).
- Przygotować 13,8 % żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
- Próbki zawieszony w buforze próbkowym ogrzewać przez 3 minuty w temperaturze 90⁰C. Bezpośrednio po ogrzaniu nanosić na żel po 30 μ l przygotowanych próbek. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Po rozdziale białka wybarwić błękitem *Coomassie* (patrz załącznik do ćwiczeń).

Interpretacja wyników

Określić, które z badanych inhibitorów hamują aktywność proteolityczną trombiny.

Badanie aktywności enzymatycznej w żelu poliakrylamidowym na przykładzie inwertazy

Badanie aktywności enzymów w żelu poliakrylamidowym jest często skuteczną metodą identyfikacji enzymów w nieoczyszczonych preparatach białkowych. Badanie aktywności enzymatycznej można przeprowadzać zarówno po rozdziale białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących jak i po elektroforezie w warunkach natywnych. Wybór metody zależy w dużej mierze od wrażliwości badanego enzymu na obecność SDS. W przypadku niektórych białek, które nie zachowują aktywności enzymatycznej w obecności SDS, można przeprowadzić ich renaturację poprzez usunięcie SDS (np. płuczac żel w roztworze 2,5% tritonu X-100). Jednakże nie ma jednej uniwersalnej, efektywnej metody renaturacji enzymów, toteż aktywność enzymatyczną niektórych białek bada się po przeprowadzeniu elektroforezy w warunkach natywnych.

Inwertaza, albo sacharaza (EC 3.2.1.26) katalizuje hydrolizę sacharozy będącej disacharydem złożonym z cząsteczki α -D-glukozy i cząsteczki β -D-fruktozy połączonych wiązaniem α 1- β 2 glikozydowym. Po rozerwaniu wiązania powstaje równomolarna mieszanina cząsteczek glukozy i fruktozy. Inwertaza jest syntetyzowana przez wiele szczepów drożdży i bakterii. Ilość enzymu produkowana przez mikroorganizm waha się znacznie w zależności od gatunku, szczepu, czy dostępnego źródła węgla. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzają zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkową inwertazę. Zewnątrzkomórkowa inwertaza występuje w formie wysoce glikozylowanego homodimeru wydzielanego do przestrzeni periplazmatycznej. Wewnątrzkomórkowa inwertaza również tworzy homodimer ale nie ulega glikozylacji. Inwertaza jest powszechnie stosowana w przemyśle spożywczym do produkcji fruktozy czy w biosensorach do stałego monitorowania poziomu sacharozy.

Celem ćwiczenia jest identyfikacja aktywności enzymatycznej inwertazy z drożdży *S. cerevisiae* po rozdziale w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. 20-godzinna hodowla drożdży *S cerevisiae*, szczep W303 (50 ml na zespół studentów)
2. $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ cz. d. a. w postaci stałej
3. 10 mM bufor fosforanowy pH 7,0
4. 10 mM bufor fosforanowy pH 7,0 z dodatkiem 30% glicerolu
5. 10 mM bufor fosforanowy pH 5,8
6. 0,1 M r-r sacharozy w 10 mM buforze fosforanowym pH 5,8 (przygotować bezpośrednio przed użyciem)
7. Chlorek tetrazolu w postaci stałej (chronić przed światłem!!!)
8. 1M NaOH
9. Inwertaza - preparat handlowy (1 mg/ml w 10 mM buforze fosforanowym pH 5,8) – przygotować w dniu poprzedzającym ćwiczenia, przechowywać w temp. 4⁰C.
10. Celulozowe „węże” do dializy
11. Papierki wskaźnikowe pH 5,4 – 7,0
12. 10% roztwór kwasu octowego
13. Odczynniki i zestaw do elektroforezy białek SDS/PAGE

Wykonanie ćwiczenia

Wysalanie i dializa białek z płynu pohodowlanego (dzień 1)

1. Po ok. 20 godzinach hodowli, gdy OD_{600} równa się ok. 9-10 (faza stacjonarna) odwirować komórki przy 3000 rpm przez 10 min.
2. Płyn pohodowlany zlać do cylindra (źródło inwertazy) a osad komórek odrzucić.
3. Zmierzyć objętość płynu pohodowlanego, przelać go do zlewki i pozostawić w lodzie na mieszadle magnetycznym.
4. Białka wytrącać stałym siarczanem amonu przy wysyceniu 0-90% (tabela frakcjonowania siarczanem amonu – załącznik do ćwiczeń). Siarczan amonu dodawać stopniowo mieszając przez 1 godz. w temp. 4⁰ C. Następnie zawiesinę odwirować przy 10000 rpm przez 20 min.

5. Osad wytrąconych białek rozpuścić w 200-300 μl 10 mM buforu fosforanowego, pH 7,0 i poddać dializie (przepis – załącznik do ćwiczeń) wobec 10 mM buforu fosforanowego, pH 7,0 z dodatkiem 30% glicerolu. Po zakończeniu dializy roztwór białek przechowywać w temp. -20°C .

Oznaczanie aktywności inwertazy w żelu (dzień 2)

1. Oznaczyć stężenie białka metodą Bradford (przepis – załącznik do ćwiczeń).
2. Przygotować 10% żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS/PAGE) według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
3. Przygotować trzy próbki zawierające: 100 μg , 150 μg i 200 μg białka w objętości 30 μl i dodać do nich po 10 μl buforu próbkowego do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (bezpośrednio przed naniesieniem na żel). Jako wzorzec przygotować dwie próbki zawierające 10 μg i 20 μg inwertazy handlowej w objętości 30 μl i dodać do nich po 10 μl buforu próbkowego. Dokładnie wymieszać (**uwaga! nie ogrzewać próbek w temperaturze 90°C**) i nanieść do studzienek w żelu zagęszczającym.
4. Rozdział elektroforetyczny prowadzić pod napięciem 150 V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego.
5. Po zakończeniu elektroforezy żel przenieść do małego pojemnika, przepłukać 30 ml wody destylowanej, a następnie 30 ml 10 mM buforu fosforanowego pH 5,8.
6. Następnie żel zalać 30 ml 0,1 M roztworu sacharozy w 10 mM buforze fosforanowym pH 5,8 i inkubować w łaźni wodnej w temp. 45°C przez 45 min. **Uwaga! Podczas inkubacji należy kontrolować, za pomocą papierków wskaźnikowych, pH r-ru (pH r-ru wzrasta, zwłaszcza w ciągu pierwszych 15 min. inkubacji). W przypadku zmiany pH, zlać roztwór sacharozy i zalać żel kolejną porcją.**
7. Po zakończeniu inkubacji, zlać roztwór sacharozy, a żel przepłukać trzy razy wodą destylowaną.
8. Ok. 10 min przed zakończeniem inkubacji przygotować wrzącą łaźnię wodną. Naważyć 50 mg chlorku tetrazolu i rozpuścić w 50 ml 1M NaOH.
9. Gdy roztwór chlorku tetrazolu zaczyna zmieniać barwę (z bezbarwnej na różową), wlać barwnik do naczynia z żelem i umieścić we wrzącej łaźni wodnej.
10. Żel barwić do pojawienia się czerwonych prążków białkowych.
11. Reakcję przerwać przez przeniesienie żelu do roztworu 10 % kwasu octowego.