

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



ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

dla studentów II roku biologii

LUBLIN 2019

Wersja 1.6

Spis treści:

1. Charakterystyka chemiczna kwasów nukleinowych.
2. Izolacja genomowego DNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Amplifikacja genów kodujących rybosomowe białka P1A i P1B drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Transkrypcja w warunkach *in vivo* w komórkach bakteryjnych i drożdżowych.
5. Izolacja i elektroforetyczna analiza RNA z komórek drożdży (2 dni).
6. Cykl życiowy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (3 dni).
7. Badanie wpływu inhibitorów translacji na wzrost komórek drożdżowych.
8. Wykrywanie inhibitorów proteaz serynowych.
9. Badanie subkomórkowej lokalizacji białek w komórkach ssaczych – projektowanie i fizyczne otrzymanie konstruktów genetycznych, transfekcja i hodowla komórek ssaczych, analiza lokalizacji białek w komórce metodami mikroskopii konfokalnej.
10. Załącznik do ćwiczeń

Charakterystyka chemiczna kwasów nukleinowych

Analiza składu chemicznego RNA lub DNA jest poprzedzona ich hydrolizą. W przypadku RNA, można stosować zarówno hydrolizę zasadową, jak i kwaśną. DNA zaś jest odporny na działanie zasad. Decyduje o tym brak grupy -OH przy węglu 2'-deoksyrybozy. Z tego względu, analizę chemiczną DNA przeprowadza się po hydrolizie kwasami.

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”.

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować
wrzącą łaźnię wodną

Hydroliza kwaśna RNA i DNA

W celu całkowitej hydrolizy RNA lub DNA i uzyskania wolnych zasad purynowych i pirymidynowych, stosuje się wysokie stężenia kwasu solnego, nadchlorowego lub siarkowego.

Odczynniki

1% wodne roztwory DNA i RNA (preparaty handlowe)

1M roztwór H_2SO_4

Wykonanie ćwiczenia

Do jednej zlewki odmierzyć 10 ml 1% roztworu RNA, a do drugiej 10 ml 1% roztworu DNA. Następnie, do obu zlewek odmierzyć po 10 ml 1M H_2SO_4 . Zlewki zatkać gumowym korkiem z umieszczoną w nim rurką szklaną i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez 60 min. Po tym czasie zlewki wyjąć z łaźni, oziębic i zachować do dalszych doświadczeń.

Wykrywanie pentoz (reakcja Biala)

Pentozy (wolne oraz związane w nukleozydach) ogrzewane ze stężonym HCl ulegają cyklizacji do furfuralu, który w obecności jonów Fe^{3+} kondensuje z orcyną, tworząc związek barwy zielonej.

Odczynniki

0,5% roztwory RNA i DNA po hydrolizie

Odczynnik orcynolowy; nietrwały-przygotować bezpośrednio przed użyciem (0,3 g orcyny rozpuścić w 100 ml stężonego HCl i dodać 5 kropli 10% roztworu FeCl_3)

Wykonanie ćwiczenia

Do jednej probówki odmierzyć 0,5 ml hydrolizatu RNA, a do drugiej 0,5 ml hydrolizatu DNA. Do każdej z probówek dodać po 1 ml odczynnika orcynolowego i ogrzewać ok. 5-10 min. we wrzącej łaźni wodnej. W probówce zawierającej pentozę pojawia się zielone zabarwienie.

Wykrywanie deoksyrybozy (reakcja Dischego)

Odczynniki

Odczynnik difenyloaminowy (1g difenyloaminy rozpuścić w 100 ml lodowatego CH_3COOH z dodatkiem 2,75 ml stężonego H_2SO_4 cz.d.a.)

0,5% roztwory RNA i DNA (przed lub po hydrolizie)

Wykonanie ćwiczenia

Do jednej probówki odmierzyć 0,5 ml roztworu RNA, a do drugiej 0,5 ml roztworu DNA. Do każdej z probówek dodać po 1 ml odczynnika difenyloaminowego. Probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 5-10 min. Pojawienie się niebieskiego zabarwienia w badanej próbce świadczy o obecności deoksyrybozy.

Wykrywanie kwasu ortofosforowego

Wykrywanie ortofosforanów w hydrolizatach kwasów nukleinowych polega na reakcji z molibdenianem amonu. Jon ortofosforowy tworzy kompleks soli amonowej heteropolikwasu tetratrimolibdeniano-fosforowego o barwie żółtej.

Odczynniki

Roztwór molibdenianu amonowego: 10g kwasu molibdenowego rozpuścić w mieszaninie: 14,4 ml 25% roztworu amoniaku i 27,1 ml wody. Następnie, całość wlać powoli, ciągle mieszając, do roztworu kwasu azotowego (48,9 ml stężonego kwasu azotowego plus 114,8 ml wody)

0,5% roztwory RNA i DNA po hydrolizie

0,5% roztwór NaH_2PO_4 (roztwór wzorcowy)

Wykonanie ćwiczenia

Do jednej probówki odmierzyć 0,5 ml hydrolizatu RNA, do drugiej 0,5 ml hydrolizatu DNA, a do trzeciej 0,5 ml wzorcowego roztworu ortofosforanu (kontrola). Do każdej z probówek dodać po 1 ml roztworu molibdenianu amonowego. Zawartość probówek ogrzać na łaźni wodnej do wrzenia. W obecności ortofosforanów wytrąca się żółty osad fosfo-molibdenianu amonowego.

Wykrywanie zasad purynowych

Odczynniki

1M roztwór NaOH

1% roztwór CuSO_4

0,5% roztwór RNA po hydrolizie

Nasycony roztwór $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (10 ml)

Wykonanie ćwiczenia

Do 0,5 ml hydrolizatu RNA dodawać kroplami 1M NaOH, by uzyskać pH roztworu około 6,0 (odczyn sprawdzać papierkiem wskaźnikowym). Następnie, roztwór ogrzewać przez 3 min. we wrzącej łaźni wodnej, po czym wprowadzić 6 kropli 1% CuSO_4 , a potem ostrożnie kroplami nasycony roztwór $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Pirosiarczyn sodu redukuje jony Cu^{2+} do Cu^+ , które z purynami tworzą nierozpuszczalne sole miedziawe.

Rozpuszczalność kwasów nukleinowych w kwasach, zasadach i alkoholu

Odczynniki

1 % wodne roztwory RNA i DNA

2M roztwór HCl

2M roztwór NaOH

Alkohol izopropylowy (oziębiony)

Wykonanie ćwiczenia

1. Do dwóch probówek zawierających oddzielnie po 0,5 ml roztworów RNA i DNA, dodawać kroplami 2M HCl, aż nastąpi wytrącenie się kwasów nukleinowych. Następnie dodawać kroplami 2M NaOH. Zanotować wynik.
2. Do jednej probówki odmierzyć 0,5 ml roztworu RNA, a do drugiej 0,5 ml roztworu DNA. Do każdej z nich dodać po 1,5 ml oziębionego izopropanolu. Zanotować wynik.

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 zbytniej 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”.

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 2-Merkaptoetanol (β -MET) – (dodać bezpośrednio przed użyciem z r-ru wyjściowego o stęż. 1M)
3. Zymoliza 100T (handlowy preparat zawierający litykaze) - 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 8,0; 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 a następnie **dodać 2-merkaptoetanol do końcowego stężenia 20 mM!**
3. Dodać 20 µl roztworu zymolizazy 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. 4°C. 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 µl 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. 65°C.
6. Po inkubacji schłodzić probówkę przez 2 min. w lodzie po czym dodać 0,2 ml r-ro 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. 4°C.
8. Przenieść 500 µl supernatantu do nowej probówki Eppendorfa o poj. 2 ml 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 µl buforu TE (pH 8.0); jeśli pojawią się problemy z rozpuszczalnością DNA - inkubować ok. 10 min w temp. 62°C 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. – 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 72⁰C (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 Mg²⁺, 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	GEAEAEKEEE	EAKEESDDDM
P1B	51	KDLKEILSGF	HNAGPVAGAG	AASGAAAAGG	DAAAEKEEKEE	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”.

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/μl
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 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.

Transkrypcja w warunkach *in vivo* w komórkach bakteryjnych i drożdżowych

W procesie transkrypcji, katalizowanej przez polimerazy RNA zależne od DNA, informacja genetyczna zawarta w DNA zostaje przepisana na RNA. Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu ryfampicyny i aktynomycyny D na transkrypcję w warunkach *in vivo* w komórkach bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae*. Ryfampicyna, półsyntetyczna pochodna ryfamycyn, oddziałuje z podjednostką β bakteryjnej polimerazy RNA i blokuje inicjację transkrypcji nowych łańcuchów RNA nie wpływając na transkrypcję łańcuchów, których synteza już się rozpoczęła. Aktynomycyna D wiążąc się z dwuniciowym DNA, uniemożliwia wykorzystanie takiego DNA jako matrycy w syntezie RNA.

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. 18-godzinna hodowla bakterii *E. coli* w podłożu LB (20 ml)
2. 18-godzinna hodowla drożdży *S. cerevisiae* w podłożu SD (20 ml)
3. Podłoże LB - podłoże do hodowli bakterii (ang. *Luria-Bertani medium*)
4. Podłoże SD - podłoże do hodowli drożdży (ang. *synthetic defined*)
5. Ryfampicyna (20 mg/ml w metanolu)
6. Aktynomycyna D (5 mg/ml w 96% etanolu)
7. [^3H]-urydyna (1mCi/ml)
8. Wysuszone krążki bibuły Whatman 3MM o średnicy 2,0 cm, moczone uprzednio przez dobę w roztworze 0,5M NaCl z dodatkiem 1 mg/ml nie znakowanej urydyny
9. TCA 5% i 10%
10. Płyn scyntylacyjny

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować dwie łaźnie wodne: jedną o temp. 30°C, a drugą o temp. 37°C

Wykonanie ćwiczenia

1. Zmierzyć gęstość optyczną całonocnych hodowli komórek drożdży przy długości fali 600 nm (OD_{600}). Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (pożywka SD). Jeśli zaistnieje konieczność, (tzn. wielkość OD przekracza 1), należy próbkę hodowli rozcieńczyć pożywką, a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jej gęstości.
2. Znając gęstość optyczną hodowli drożdży, przygotować 5 ml hodowli rozcieńczonej pożywką SD, do $OD_{600}=0,4$.
3. Tak przygotowaną hodowlę rozlać, po 1 ml, do trzech probówek. Następnie do jednej z probówek dodać 100 μ g aktynomycyny D, do drugiej 100 μ g ryfampicyny, a trzecią pozostawić jako kontrolę. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i inkubować w temp. 30°C przez 15 min.
4. Do wszystkich probówek dodać znakowaną trytem urydynę w ilości 10 μ Ci/ml i wymieszać. Następnie pobrać z probówek po 50 μ l hodowli i nanieść na przygotowane wcześniej krążki bibuły Whatman 3MM moczone w roztworze nie znakowanej urydyny (czas 0). Identyczne próbki hodowli pobierać po 15, 30, 45 i 60 minutach inkubacji.
5. Krążki wysuszyć pod lampą, przenieść do 10% TCA (ok. 100 ml) i pozostawić przy stałym mieszaniu na 10 min.
6. Przenieść krążki do naczynia z 5% TCA (ok. 100 ml) i ponownie mieszać przez 10 min, po czym wysuszyć pod lampą.
7. Suche krążki umieścić w naczynkach scyntylacyjnych zawierających po 5 ml płynu scyntylacyjnego i zliczyć radioaktywne piętno pochodzące od wbudowanej do RNA [3 H]-urydyny w liczniku scyntylacyjnym.
8. Identyczne doświadczenie wykonać z bakteriami *E. coli*, zachowując temperaturę inkubacji 37°C.

Interpretacja wyników

1. Porównać poziom inkorporacji [3 H]-urydyny w hodowli bakteryjnej i drożdżowej w zależności od czasu inkubacji i obecności antybiotyków. Wyniki przedstawić w formie wykresu, odkładając na osi X czas inkubacji, a na osi Y poziom inkorporacji (w imp/min.) [3 H]-urydyny.

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. 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.

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

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

1. Hodowla *S. cerevisiae* OD₆₀₀ = 2 (100 ml)
2. H₂O (DEPC, oziębiona)
3. Bufor do zawieszania komórek drożdży (bufor AE):

50mM CH₃COONa, 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°C.
6. Mieszanina chloroform – alkohol izoamylowy (24:1)
7. 3 M CH₃COONa, pH 5,3
8. 100% etanol (oziębiony)
9. 70% etanol (oziębiony)
10. 2M LiCl – 0,1M CH₃COONa, pH 5,3
11. Jałowe próbówki 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°C
oraz przygotować blok grzejny o temp. 65°C**

Izolacja RNA z komórek drożdży

Wykonanie ćwiczenia

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

1. Hodowlę drożdży odwirować w próbówkach Eppendorfa o poj. 2 ml przez 3 min. przy 5000 rpm w 4°C tak, aby w każdej próbówce otrzymać osad komórek drożdży pochodzący z 4 ml hodowli. Supernatant odrzucić, a osad komórek drożdży zawiesić w 1 ml oziębionej H₂O, po czym odwirować przez 3 min. przy 5000 rpm w 4°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 próbówkach.**
2. Osad komórek drożdży w każdej próbówce zawiesić w 400 µl buforu AE, dodać po 40 µl 10% SDS i wytrząsać przez 1 min.
3. Dodać do każdej próbówki po 440 µl kwaśnego fenolu i wytrząsać całość przez 5 min. a następnie inkubować przez 15 min. w 65°C (wytrząsając co 5 min.).
4. Po inkubacji próbówki oziębować przez 5 min. w lodzie, a następnie odwirować przez 5 min. **(jeśli nie zaznaczono inaczej wszystkie wirowania wykonywać przy 10000 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 μ l kwaśnego fenolu i wytrząsać przez 5 min. a następnie odwirować przez 5 min.
6. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml, dodać po 400 μ l mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (usuwanie resztek fenolu) i wytrząsać przez 5 min. a potem odwirować przez 5 min.
7. Górne fazy wodne przenieść do nowych probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml, dodać po 40 μ l 3M octanu sodu, pH 5,3 oraz 1 ml oziębionego 100% etanolu.
8. Próbkę pozostawić w temp. -20°C na 30 min. lub na noc w celu precypitacji RNA. Następnie, precypitat RNA odwirować przez 15 min. Uzyskany osad przemyć 1 ml oziębionego 70% etanolu i powtórnie odwirować przez 5 min.
9. Osad z jednej probówki wysuszyć na powietrzu (kilka minut do odparowania etanolu, nie dopuszczając do całkowitego wyschnięcia osadu), a następnie rozpuścić w 20 μ l wody i pozostawić w temp. -70°C do analizy elektroforetycznej (surowy preparat RNA).
10. Osad z drugiej probówki rozpuścić w 1 ml roztworu 2M chlorku litu z 0,1M octanem sodu o pH 5,3 i mieszać przez 15 min.
11. Odwirować próbkę przez 15 min. i delikatnie usunąć, przy pomocy pipety, supernatant. Uzyskany po wirowaniu osad to rRNA, który należy wysuszyć, a następnie zawiesić w 15 μ l wody i pozostawić w temp. -70°C do analizy elektroforetycznej.

Elektroforetyczna analiza RNA

1. Przygotować 80 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.

Badanie wpływu inhibitorów translacji na wzrost komórek drożdżowych

Rybosom jest miejscem działania wielu chemicznie zróżnicowanych antybiotyków, które wiążą się ze specyficznymi fragmentami tego rybonukleoproteinowego kompleksu, 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 cykloheksimidu, higromycyny B i paromomycyny na wzrost komórek mutantów drożdżowych pozbawionych różnych białek rybosomowych.

Cykloheksimid blokuje elongację translacji na poziomie translokacji w komórkach 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.

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

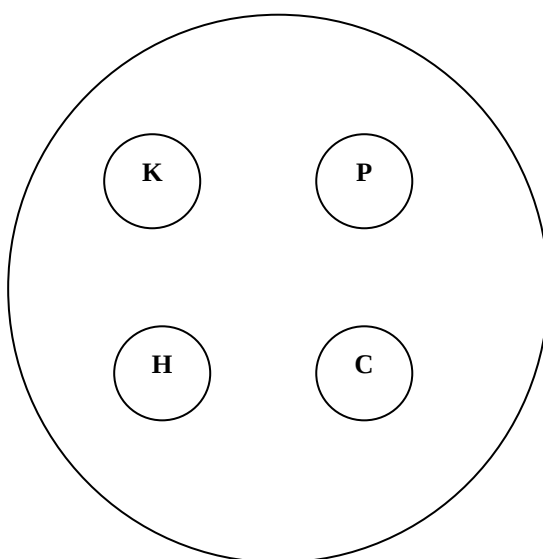
1. Całonocne hodowle drożdży *S. cerevisiae* – po 5 ml
(trzy szczepy wskazane przez prowadzącego ćwiczenia)
2. Podłoże YPD oraz YPD z 2% agarem
3. Roztwór higromycyny B (15 mg/ml w H₂O)
4. Roztwór paromomycyny (250 mg/ml w H₂O)
5. Roztwór cykloheksimidu (0,1 mg/ml w H₂O)
6. Jałowa woda dejonizowana
7. Jałowe płytki Petriego

8. Głaszczki lub jałowe patyczki
9. Jałowe próbówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i końcówki do pipet
10. Jałowe krążki bibuły Whatman 3MM o średnicy 6 mm i pęsety.

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych

1. Rozpuścić podłoże YPD z agarem w gorącej łaźni wodnej lub kuchence mikrofalowej i wylać po 20 ml na trzy jałowe płytki Petriego .
2. Pozostawić uchylone płytki Petriego do zastygnięcia na ok. 15 min.
3. Zmierzyć gęstość optyczną całonocnych hodowli drożdży przy długości fali 600 nm (OD_{600}). 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 (do pomiaru należy przygotować po 1 ml odpowiednio rozcieńczonych próbek). Znając gęstość optyczną hodowli drożdży przygotować 1 ml hodowli rozcieńczonej pożywką YPD, do $OD_{600} = 1,0$.
4. Rozprowadzić po 100 μ l tak rozcieńczonych hodowli na przygotowane wcześniej płytki Petriego ze stałym podłożem YPD.
5. Na płytce nanieść po cztery jałowe krążki bibuły Whatman 3MM i nakropić na nie po 10 μ l roztworów paromomycyny (P), higromycyny B (H), cykloheksimidu (C) i wody (K-kontrola) wg poniższego schematu. Po dwóch dniach inkubacji w temperaturze 30°C zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu komórek drożdży wokół krążków bibuły nasączonych roztworami antybiotyków.



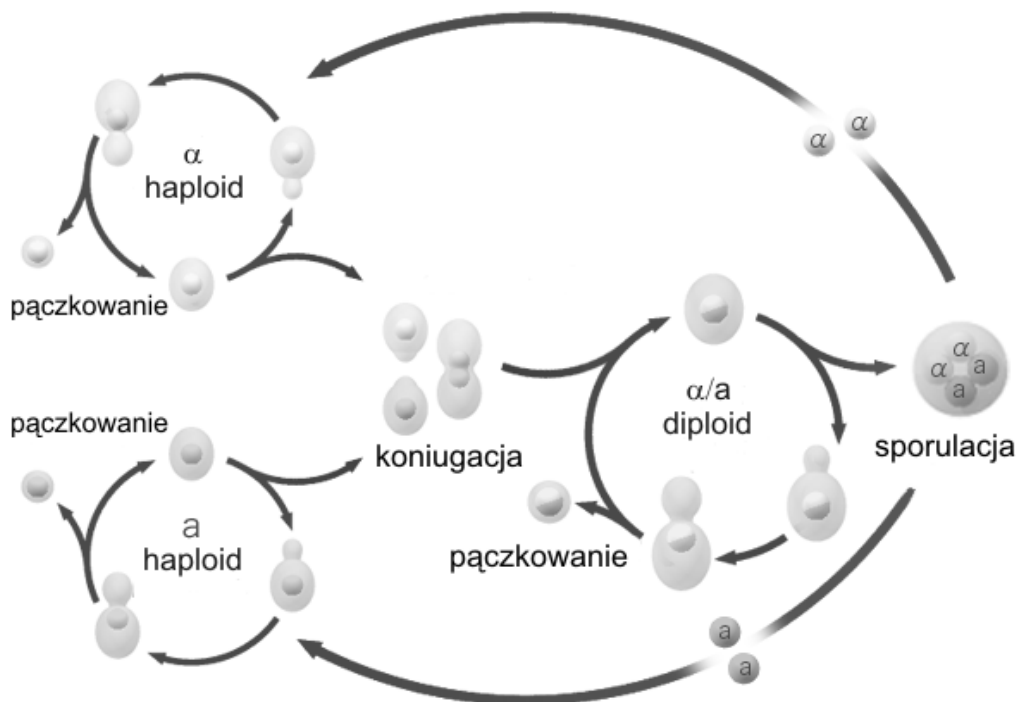
Interpretacja wyników

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

Cykl życiowy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Komórki drożdży mogą występować w dwóch formach: haploidalnej i diploidalnej. Zarówno forma haploidalna jak i diploidalna może się rozmnażać na drodze podziałów wegetatywnych (pączkowanie) i stabilnie rosnać w hodowlach. Haploidalne komórki drożdżowe mogą występować w dwóch typach płciowych – a i α . Poprzez zlanie się dwóch haploidalnych komórek o przeciwnych typach płciowych (koniugacja) powstaje komórka diploidalna a/α . Komórka w fazie diploidalnej może przechodzić normalne wegetatywne podziały, lecz nie może się krzyżować z innymi komórkami. W niekorzystnych warunkach środowiskowych komórka diploidalna może wejść na szlak sporulacji, wytwarzając po podziałach mejotycznych, worek z czterema haploidalnymi zarodnikami (askosporami): dwoma typu a i dwoma α .

Cykl życiowy drożdży *S. cerevisiae* przedstawiono schematycznie na poniższym rysunku.



Koniugacja drożdży *S. cerevisiae*

Techniki koniugacji i sporulacji od lat są wykorzystywane w laboratoriach zajmujących się drożdżami, gdyż pozwalają na połączenie haploidalnych klonów o odmiennych cechach genetycznych. Po wytworzeniu zarodników przez pokolenie diploidalne możliwa jest izolacja klonów pochodzących z jednego zarodnika o pożądanych cechach genetycznych wprowadzonych przez oba szczepy haploidalne użyte do koniugacji. Aby ułatwić takie manipulacje utworzono na drodze mutagenезy liczne tandemy szczepów haploidalnych α i a różniące się posiadanymi markerami auktotroficznymi, co pozwala na swobodne krzyżowanie i łatwą selekcję pokolenia diploidalnego. Przykładem, który to ilustruje jest często wykorzystywany tandem szczepów drożdżowych BY4741 i BY4742 o cechach genotypowych ujętych w tabeli:

Nazwa szczepu	Typ płciowy	markery auktotroficzne
BY4741	a	his3 Δ 1; leu2 Δ 0; ura3 Δ 0; met15 Δ 0
BY4742	α	his3 Δ 1; leu2 Δ 0; ura3 Δ 0; lys2 Δ 0

W obu szczepach obecne są delecje inaktywujące geny związane z biosyntezą histydyny, leucyny i uracylu, co pozwala na dowolne wprowadzanie: (1) mutacji kierowanych (ang. *site directed*) na chromosomie za pomocą aktywnych kopii genów (*HIS3*, *LEU2* i *URA3*), (2) plazmidów posiadających wymienione geny w celu selekcji. Pozostałe markery służą do przeprowadzenia procesu koniugacji pomiędzy tymi szczepami. Po zmieszaniu hodowli obu szczepów haploidalnych i przeniesieniu mieszaniny na podłoże pozbawione metioniny i lizyny, nie zaobserwujemy wzrostu haploidalnych pokoleń rodzicielskich a i α , natomiast uzyskamy wzrost szczepu diploidalnego, powstałego w wyniku koniugacji obu szczepów haploidalnych, który będzie zawierał zarówno po nieaktywnej kopii genów met15 Δ 0 i lys2 Δ 0 jak i ich aktywne kopie wprowadzone przez przeciwny typ płciowy.

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):

<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

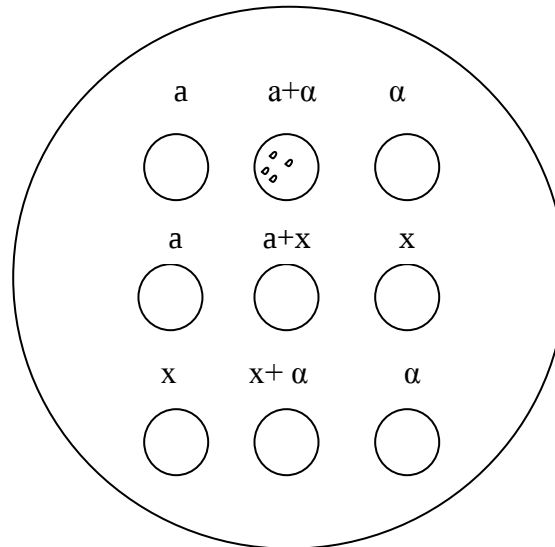
1. Nocna hodowla wzorcowych szczepów drożdży BY4741(a) i BY4742(α) – po 5 ml
2. Nocna hodowla badanych szczepów drożdży (wybranych przez prowadzącego ćwiczenia – po 5 ml, oznaczonych jako x i y)
3. Podłoże SD z 3% agarem
4. 40% roztwór glukozy
5. Mieszanina aminokwasów pozbawiona metioniny i lizyny (10 x stężona)
6. Jałowa woda dejonizowana
7. Jałowe płytki Petriego
8. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i końcówki do pipet

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych.

1. Przygotować stałe podłoże SD– w tym celu rozpuścić 42,5 ml podłoża SD z agarem w gorącej łaźni wodnej lub kuchence mikrofalowej, następnie dodać do niego 5,0 ml roztworu aminokwasów pozbawionych lizyny i metioniny oraz 2,5 ml roztworu 40% glukozy, wymieszać i wylać po 25 ml na dwie jałowe płytki Petriego
2. Pozostawić uchylone płytki do zastygnięcia na ok. 15 minut.
3. Do jałowych probówek Eppendorfa o poj. 1,5 ml pobrać po 200 μ l całonocnych hodowli szczepów wzorcowych i badanych i odwirować przy 10000 rpm przez 1 min.
4. Supernatant odrzucić a osad komórek zawiesić w 1000 μ l jałowej wody i ponownie odwirować w celu usunięcia resztek podłoża.
5. Osad komórek zawiesić w 500 μ l jałowej wody.
6. Wykonać koniugację badanych szczepów z wzorcami typu płciowego a i α wg poniższego schematu, nanosząc na płytkę z podłożem po 8 μ l zawiesiny komórek (górny panel w schemacie to testowa koniugacja szczepów wzorcowych wykonywana w celu sprawdzenia poprawności procedury)
7. Płytki inkubować w temp. 30°C do pojawienia się wzrostu koniugantów (3-4 dni).

**Schemat wykonania koniugacji
dla szczepu x**



Interpretacja wyników

Określić typ płciowy badanych szczepów drożdży.

Sporulacja drożdży *S. cerevisiae*

Wytworzenie zarodników (spor) poprzedzone podziałem mejotycznym jest jedną ze strategii przetrwania komórek drożdży w czasie pogorszenia się warunków wzrostu w środowisku. Spory ze względu na odmienną budowę ścian komórkowych i kondensację cytoplazmy są bardziej odporne niż komórki wegetatywne na szkodliwe czynniki takie jak wysuszenie czy wysoka temperatura.

W warunkach laboratoryjnych proces wytwarzania zarodników możemy indukować dobierając odpowiednio podłoża. W pierwszym pasażu komórki drożdżowe hoduje się na podłożu stałym bogatym w źródła azotu (aminokwasy, pepton, ekstrakt drożdżowy) oraz w obecności niefermentowalnych źródeł węgla takich jak etanol czy gliceryna, w czasie wzrostu metabolizm drożdży przestawiony zostaje na oddychanie tlenowe. Z takiego podłoża komórki drożdży przenosi się na podłoże minimalne pozbawione źródeł azotu oraz z ograniczonym dostępem do substancji mogących stanowić źródła energii. Standardowo wykorzystujemy w tym celu podłoże agarowe zawierające jedynie octan potasu. Gwałtowne pogorszenie warunków wzrostu, połączone z obniżeniem temperatury inkubacji z 30°C do 25°C, indukuje procesy prowadzące do podziału mejotycznego i wytworzenia zarodników.

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. Płytką Petriego z podłożem presporulacyjnym YPGlic (2% pepton, 1% ekstrakt drożdżowy, 2% glicerol, 2% agar) z rosnącymi komórkami drożdży pokolenia diploidalnego – przygotować trzy dni przed zajęciami
2. Podłoże sporulacyjne (1% octan potasu, 2 % agar)
3. Jałowe płytki Petriego
4. Eza
5. Parafilm

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych.

1. Rozpuścić 20 ml podłoża sporulacyjnego w kuchence mikrofalowej i wylać na jałową płytkę Petriego.
2. Pozostawić uchyloną płytkę do zastygnięcia na 15 minut.
3. Za pomocą ezy przenieść komórki drożdży z podłoża presporulacyjnego na podłoże sporulacyjne rozprowadzając je grubą warstwą w postaci kwadratu o powierzchni 1 cm kw.
4. Płytkę Petriego szczelnie zabezpieczyć parafilmem przed wysychaniem.
5. Inkubować płytkę Petriego w temp. 25°C lub w temp. pokojowej do następnych ćwiczeń (min. 7 dni).

Kiełkowanie zarodników drożdży po sporulacji

Poprawa warunków środowiska prowadzi do kiełkowania zarodników. Pokolenie haploidalne najczęściej jeszcze w zarodni wchodzi w proces koniugacji prowadzący do odtworzenia pokolenia diploidalnego. W warunkach laboratoryjnych istotne jest oddzielenie zarodników od komórek wegetatywnych oraz rozbicie zarodni (worków) celem separacji zarodników, aby nie dopuścić do przypadkowych koniugacji.

W tym celu najczęściej dokonujemy mechanicznego rozerwania ścian zarodni poprzez np. wytrząsanie z kulkami szklanymi, bądź prowadzimy enzymatyczną degradację ściany za pomocą enzymów rozkładających wiązanie β (1-3) glikozydowe, np. zymoliazę (ściana zarodnika, ze względu na odmienną budowę, jest na trawienie takimi enzymami odporna). Po uwolnieniu zarodników przeprowadzamy ich izolację wykorzystując różnice w masie zarodników i komórek wegetatywnych lub doprowadzamy do zabicia komórek wegetatywnych działając na nie wysoką temperaturą.

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. Podłoże sporulacyjne z komórkami drożdży przygotowanymi na poprzednich zajęciach
2. Nocna hodowla drożdży BY 4741 na płynnym podłożu YPD – 5 ml
3. Podłoże YPD (2% pepton, 1% ekstrakt drożdżowy 2% glukoza, 2% agar) – 200 ml
4. Jałowy bufor PBS
5. Jałowe płytki Petriego
6. Eza
7. Głaszczka
8. Jałowe próbówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml oraz końcówki do pipet
9. Termoblok
10. Mikroskop świetlny oraz szkiełka podstawowe i nakrywkowe

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych.

1. Przygotować 8 płytek Petriego z podłożem YPD z 2% agarom.
2. Za pomocą ezy pobrać komórki z płytek z podłożem sporulacyjnym i zawiesić je w 1 ml buforu PBS, utrzymując komórki w lodzie.
3. Odwirować przy 10000 rpm przez 1 min. 1 ml komórek nocnej hodowli drożdży. Supernatant odrzucić a osad komórek zawiesić w 1 ml buforu PBS.
4. Zmierzyć gęstość optyczną zawiesiny komórek pobranych z podłoża sporulacyjnego oraz zawiesiny komórek pobranych z nocnej hodowli drożdży przy długości fali 600 nm (OD_{600}). Zachować zawiesiny drożdży do przygotowania preparatów mikroskopowych na późniejszym etapie ćwiczeń.
5. Dla obu próbek przygotować, w probówkach Eppendorfa o poj. 1,5 ml, po 1 ml rozcieńczonej zawiesiny komórek o gęstości $OD_{600} = 0,1$ w buforze PBS.
6. Pobrać do osobnych probówek Eppendorfa po 0,1 ml zawiesiny (czas 0)
7. Pozostałą część zawiesiny umieścić w termobloku w temperaturze 60°C i pobierać po 0,1 ml zawiesiny w odstępach 15 minutowych (czas 15, 30 i 45 min). **Ze względu na szybką sedymentację komórek drożdży, przed pobraniem zawartość probówek wymieszać.**
8. W czasie inkubacji przygotować preparaty mikroskopowe komórek drożdży z płytek z podłożem sporulacyjnym i nocnej hodowli drożdży, nanosząc na szkiełko podstawowe po 5 μ l zawiesiny drożdży. Zanotować różnice w wyglądzie komórek zwracając uwagę na: liczbę pączkujących komórek, ich wielkość oraz obecność tetrad zarodników.
9. Pobrane w czasie 0, 15, 30 i 45 min. zawiesiny komórek rozprowadzić głaszczką na płytkach Petriego z podłożem YPD z 2% agarom.
10. Płytki Petriego szczelnie zabezpieczyć parafilmem przed wysychaniem.
11. Inkubować w temperaturze 30°C do czasu pojawienia się kolonii drożdży (3-5 dni).
12. Policzyc ilość kolonii na każdej płytce i zanotować wynik.

Wykrywanie inhibitorów proteaz serynowych

Proteazy (proteinazy, 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 aspartylowe
- 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. trypsyna, 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 aspartylowy, 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 badane 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 badanego białka 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 (patrz załącznik do ćwiczeń).
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. 37°C, 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 -20°C).
- Przygotować 13,8 % żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
- Próbki zawieszone w buforze próbkowym ogrzewać przez 3 minuty w temp. 90°C. 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 subkomórkowej lokalizacji białek w komórkach ssaczych – projektowanie i fizyczne otrzymanie konstruktów genetycznych, transfekcja i hodowla komórek ssaczych, analiza lokalizacji białek w komórce metodami mikroskopii konfokalnej.

Eksperyment mający na celu zbadanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek w komórkach ssaczych w warunkach *in vivo* składa się z kilku etapów. Pierwszy etap polega na zaprojektowaniu i fizycznym otrzymaniu konstruktu genetycznego, kodującego badane białko połączone z białkiem fluorescencyjnym (stworzenie białka hybrydowego/fuzyjnego). Etap następny polega na przygotowaniu linii komórkowej i wprowadzeniu otrzymanego konstruktu genetycznego do komórek ssaczych (transfekcja). Ostatni etap to analizy z wykorzystaniem techniki mikroskopii konfokalnej.

1. Przygotowanie rekombinowanego DNA kodującego badane białko w fuzji z białkiem fluorescencyjnym obejmuje:

- a) Przygotowanie DNA kodującego badane białko (znalezienie sekwencji nukleotydowej, zaprojektowanie starterów, izolacja i oczyszczanie DNA, reakcja PCR, oczyszczanie produktu reakcji PCR)
- b) Wybór i przygotowanie odpowiedniego wektora (izolacja i oczyszczanie DNA plazmidowego)
- c) Cięcie enzymami restrykcyjnymi produktu reakcji PCR i wektora, oczyszczanie uzyskanego DNA
- d) Przeprowadzenie reakcji ligacji
- e) Wprowadzenie DNA do komórek bakteryjnych (transformacja bakterii)
- f) Selekcję pożądanych klonów, izolację i sekwencjonowanie otrzymanego rekombinowanego DNA.

2. Przygotowanie linii komórkowej oraz wprowadzenie otrzymanego konstruktu genetycznego do komórek ssaczych (transfekcja) obejmuje:

- a) Pasażowanie linii komórkowej i przygotowanie komórek do transfekcji
- b) Transfekcja komórek ssaczych otrzymanym konstruktem genetycznym

3. Analizy *in vivo* lokalizacji badanego białka w fuzji z białkiem fluorescencyjnym za pomocą technik mikroskopii konfokalnej:

- a) Badanie subkomórkowej lokalizacji białka (1D i 3D)
- b) Badanie wpływu leków/antybiotyków na lokalizację białka
- c) Badanie zachowania się białek w komórce (*Time lapse imaging*)
- d) Badanie dynamiki białek w komórce (techniki FRAP, Fotokonwersja)
- e) Badanie interakcji białek w komórce (technika FRET)

Dlaczego badanie lokalizacji białek *in vivo* w komórkach ssaczych jest interesujące? Przede wszystkim eksperyment prowadzony *in vivo* znacznie zmniejsza prawdopodobieństwo pojawienia się błędnych wyników spowodowanych nienaturalnie występującymi artefaktami. Rozmieszczenie białek w komórce może pośrednio sygnalizować ich funkcję. Białka rozmieszczone w błonie komórkowej mogą być zaangażowane w transdukcję sygnałów czy też w transport różnych substancji, natomiast lokalizacja jądrowa może świadczyć o związku tych białek z procesem biogenezy rybosomów. Badania zmiany lokalizacji/rozmieszczenia białek w czasie (opcja *time lapse imaging*) mogą dostarczyć informacji o fizjologii komórki (np. transporcie białek między kompartmentami komórkowymi, sekrecji białek na zewnątrz komórki). Także zmiana lokalizacji/rozmieszczenia białek w komórce wywołana czynnikiem zewnętrznym (czynnik stresowy, antybiotyk) może dostarczyć pewnych informacji o badanym białku czy też o procesie metabolicznym w który to białko jest zaangażowane. Natomiast kolokalizacja białek, czyli występowania białek w tym samym miejscu w komórce może (lecz wcale nie musi) świadczyć o ich interakcji lub zaangażowaniu w ten sam proces biologiczny.

Oddziaływania między białkami są kluczowe dla wszystkich procesów zachodzących w żywej komórce (np. podział komórki, przekazywanie sygnałów).

Powstaje pytanie jak badać lokalizację białek oraz interakcje między białkami *in vivo*? Ze względu na rozmiary białek (rzędu nanometrów) dobrym rozwiązaniem wydaje się użycie mikroskopu świetlnego, który umożliwia obserwację obiektów niewidzialnych dla nieuzbrojonego oka ludzkiego. By jakiś obiekt był widzialny w mikroskopie świetlnym musi cechować się odpowiednim kontrastem względem tła (np. różnice w intensywności światła, barwie światła, we współczynniku załamania światła). Bardzo dobry kontrast zapewniają obiekty fluoryzujące, czyli emitujące światło o określonej długości fali po wcześniejszym zaabsorbowaniu światła o innej (krótszej) długości fali. Czyli aby zbadać lokalizację badanego białka w komórce należy to białko wyznakować cząsteczką zdolną do fluorescencji. Idealnym rozwiązaniem jest stworzenie białka hybrydowego/fuzyjnego, składającego się z badanego białka połączonego krótkim odcinkiem kilku aminokwasów z białkiem fluorescencyjnym.

Jak w skrócie przedstawia się procedura wprowadzenia DNA kodującego białko hybrydowe do komórek ssaczych? Pierwszym etapem jest otrzymanie konstruktu genetycznego kodującego białko fuzyjne. W tym celu cDNA kodujące badane białko oraz odpowiedni wektor są poddawane reakcji enzymatycznego cięcia za pomocą enzymów restrykcyjnych a następnie oba fragmenty DNA są łączone ze sobą w reakcji ligacji. Tak powstałe rekombinowane DNA jest wprowadzane do komórek bakteryjnych w celu amplifikacji, następnie oczyszczane i wprowadzane do komórek ssaczych gdzie ulega ekspresji. Gen dla białka fuzyjnego znajdujący się na cząsteczce wektora jest transkrybowany, powstałe mRNA ulega translacji, zsyntetyzowany polipeptyd fałduje się przyjmując odpowiednią konformację przestrzenną i białko hybrydowe staje się widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym.

Szczegółowa procedura eksperymentu, który mógłby być zatytułowany „Charakterystyka ludzkiego białka X (subkomórkowa lokalizacja, funkcja, dynamika, interakcje z innymi białkami)” jest nieco bardziej skomplikowana. Przed rozpoczęciem pracy należy szczegółowo zaplanować cały eksperyment. W tym celu pomocne może być odpowiedzenie sobie na następujące pytania: Jaki jest cel eksperymentu? Z jakimi biomolekułami będziemy pracować? Co będzie źródłem materiału biologicznego? Jakie techniki będą używane? itp.

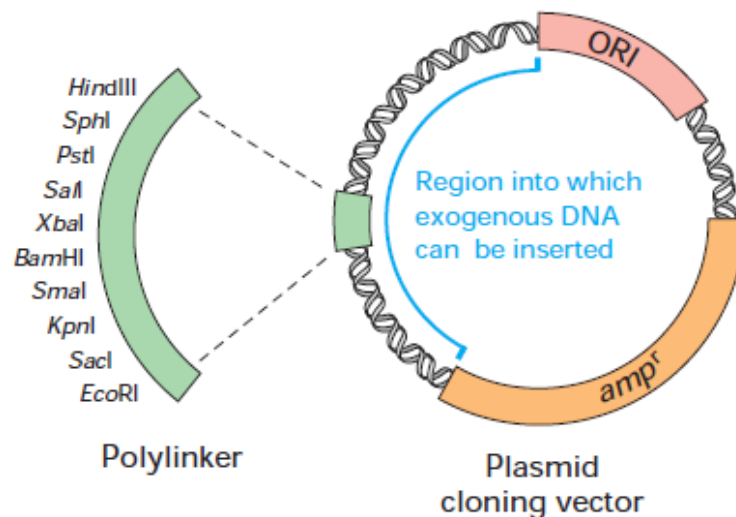
Pierwszy etap procedury obejmuje przygotowanie DNA kodującego badane białko oraz wybór i przygotowanie odpowiedniego wektora, który umożliwi wprowadzenie

konstruktu genetycznego do komórki a następnie jego wydajną ekspresję. Przygotowanie DNA ma na celu zapewnienie bliskiego kontaktu między DNA a czynnikami modyfikującymi oraz usunięcie niepożądanych zanieczyszczeń. Zalecane jest w miarę możliwości używanie świeżego materiału biologicznego, ponieważ jakość biomolekuł zaczyna spadać już od momentu pozyskiwania próbki. Należy starać się by proces izolacji DNA przebiegał z wysoką wydajnością a pozyskane DNA cechowało się wysoką jakością (było wolne od zanieczyszczeń i DNaz), gdyż prawdopodobieństwo uzyskania błędnych wyników i wniosków wzrasta, gdy eksperyment przeprowadzony jest z użyciem niskiej jakości DNA. Każdy następny krok w wieloetapowej procedurze zależy od wcześniejszych etapów, dlatego też przygotowanie DNA jest równie ważne jak końcowa analiza.

Gen kodujący badane białko możemy pozyskać z ludzkiego genomowego DNA (najlepiej jeśli będzie to cDNA np. z komórek linii HeLa). Każda metoda dezintegracji komórki ma na celu zachowanie naturalnego stanu, konformacji i aktywności biologicznej interesującej nas biomolekuły. Znajomość materiału biologicznego pozwala na wybranie odpowiedniej metody dezintegracji komórki. Należy użyć procedury ekstrakcji która w jak najmniejszym stopniu wpłynie na konformację i aktywność biologiczną izolowanej molekuly. Ekstrakcja powinna być przeprowadzana w odpowiednim buforze w celu utrzymania odpowiedniego pH, stabilizacji i ochrony przed degradacją. Izolacja genomowego DNA polega na hodowli odpowiedniej ilości komórek, następnie ich dezintegracji oraz usunięciu białek, lipidów, RNA i innych składników komórkowych. Uzyskane DNA można wyprecypitować etanolem a następnie zawiesić w odpowiednim buforze lub wodzie. Stężenie wyizolowanego DNA można określić spektrofotometrycznie mierząc absorbancję w spektrofotetrze przy długości fali 260nm ($A_{260} = 1 = 50\mu\text{g/ml dsDNA}$), natomiast stopień zanieczyszczenia białkami można ustalić ze stosunku A_{260}/A_{280} .

Mając przygotowane DNA zawierające gen dla badanego białka, który chcemy połączyć z białkiem fluorescencyjnym i wprowadzić do komórek ssaczych, należy wybrać odpowiedni wektor (DNA nośnikowe) to umożliwiający. Jakimi cechami powinna się charakteryzować cząsteczka DNA by mogła służyć jako wektor? Przede wszystkim powinna być zdolna do autonomicznej replikacji w komórce gospodarza, by można było uzyskać wiele kopii utworzonego rekombinowanego DNA. Wektor powinien również cechować się wielkością do 10kbp, ponieważ większe cząsteczki są bardziej narażone na uszkodzenia podczas oczyszczania. Powinien także zawierać w swej sekwencji nukleotydowej unikalne miejsca restrykcyjne (sekwencje rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne), występujące tylko raz w całej cząsteczce. Ostatnią cechą jest obecność markera selekcyjnego

(np. gen oporności na jakiś rodzaj antybiotyku), by móc rozróżnić komórki do których wprowadzony został wektor od komórek które go nie przyjęły. Takimi cechami charakteryzują się plazmidy bakteryjne, czyli naturalnie występujące koliste, dwuniciowe cząsteczki pozachromosowego DNA (Rys. 1). Posiadają sekwencję *ori* (*origin of replication*), która odpowiada za replikację w komórce gospodarza (wykorzystując enzymy gospodarza) oraz marker selekcyjny nadający komórkom zawierającym ten plazmid dodatkowe właściwości a także region zawierający wiele unikalnych miejsc restrykcyjnych (*MCS-multiple cloning site, Polylinker*). Stwierdzenie, że plazmidy są kolistymi cząsteczkami DNA nie jest do końca precyzyjne, ponieważ plazmidy w komórce w większości występują w formie superskręconej (*CCC – covalently closed circular*), gdy jedna z nici DNA ulegnie rozerwaniu plazmid przyjmuje formę *open circular*.

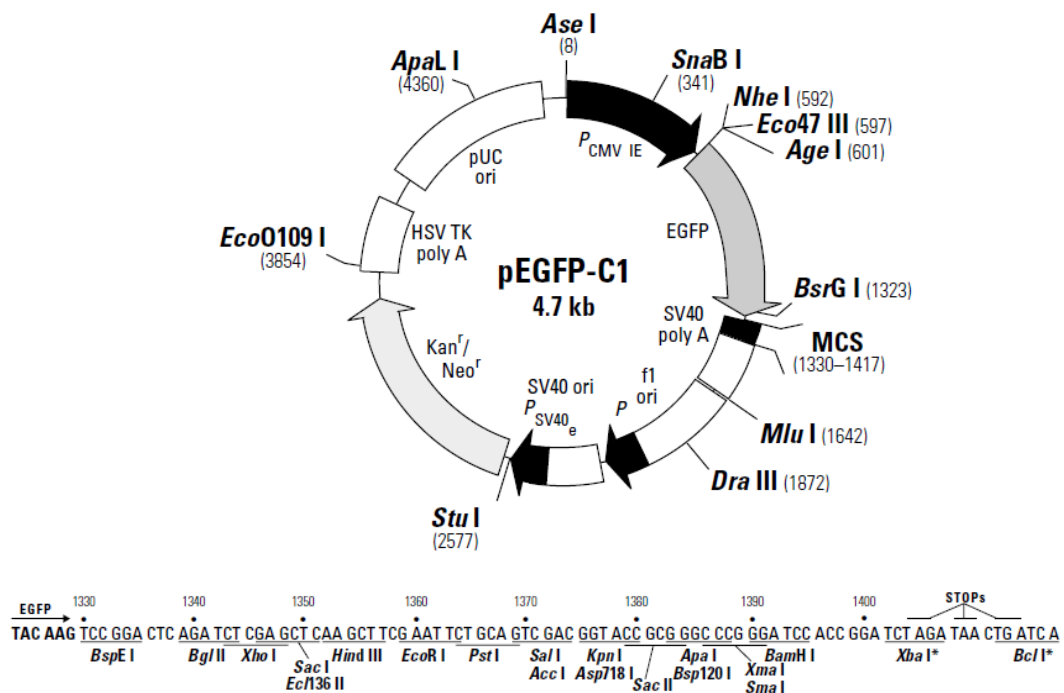


Rys. 1 Schemat wektora bakteryjnego [Gene Cloning and DNA Analysis, T.A. Brown]

Eksperyment wymaga jednak by wprowadzone za pomocą wektora rekombinowane DNA ulegało ekspresji w komórkach ssaczych. Jest niezwykle mało prawdopodobne by DNA kodujące badane białko połączone ze standardowym wektorem uległo ekspresji w komórkach ssaczych. Dlatego zasadny wydaje się wybór wektora ekspresyjnego, czyli wektora zawierającego oprócz w/w elementów także sekwencje promotora, miejsca wiązania rybosomu oraz terminatora, odpowiednie dla komórek gospodarza. Najważniejszym elementem wektora ekspresyjnego jest promotor, czyli sekwencja DNA rozpoznawana przez polimerazę RNA gospodarza, będąca miejscem startu transkrypcji. Po zaindukowaniu

transkrypcji (w przypadku promotora bakteryjnego *lac* poprzez IPTG) syntetyzowane jest białko, którego sekwencja DNA znajduje się pod kontrolą tego promotora.

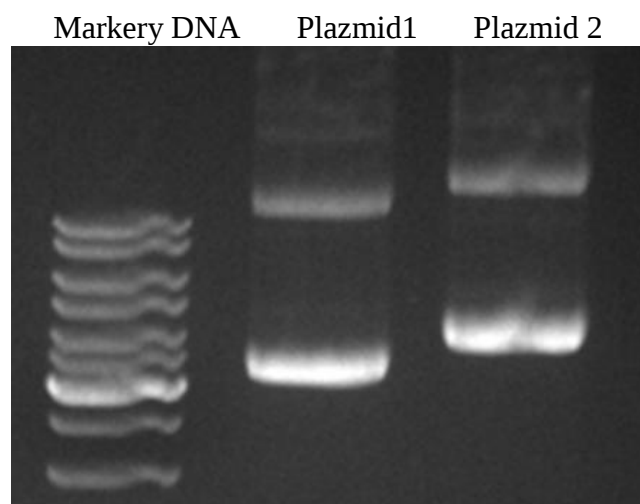
Ekspresja ma mieć miejsce w komórkach ssaczych, dlatego odpowiednim wektorem będzie ssaczy wektor ekspresyjny (Rys 2). Powinien on zawierać następujące elementy: miejsce początku replikacji (*ori*) SV40 (*simian virus 40*), konstytutywny promotor np. promotor wirusa CMV (*cytomegalovirus*), sygnały dla dojrzewania i obróbki mRNA (sekwencja poliadenylacji), marker selekcyjny oraz MCS. Wektor ten również powinien posiadać sekwencję dla białka fluorescencyjnego, którym zamierzamy wyznakować białko badane.



Rys. 2 Ssaczy wektor ekspresyjny wraz z sekwencją nukleotydową MCS

Izolując plazmidowe DNA należy wybrać metodę, która pozwoli na wydajne uzyskanie DNA wysokiej jakości i czystości. Obecnie wiele firm oferuje specjalne zestawy do izolacji plazmidowego DNA. Na wydajność procesu izolacji oraz na czystość uzyskanego DNA ma wpływ gęstość hodowli, napowietrzanie, czas hodowli, rodzaj podłoża, rodzaj plazmidu oraz rodzaj szczepu bakteryjnego. Materiał biologiczny (nocna hodowla bakterii o OD₆₀₀=2.5) zagęszczony przez wirowanie jest zawieszany w odpowiednim buforze. Następnie komórki ulegają lizie na skutek dodania roztworu alkalicznego zawierającego NaOH i SDS. Zdenaturowane genomowe DNA (w pH zasadowym wiązania wodorowe ulegają rozerwaniu) i białka po zobojętnieniu roztworu poprzez dodanie buforu octanowego

precypitują, natomiast plazmidowe DNA pozostaje w roztworze dzięki swojej specyficznej konformacji. Uzyskana ilość plazmidowego DNA może dochodzić nawet do 20 µg z 5ml całonocnej hodowli bakteryjnej. Zarówno jakość jak i stężenie uzyskanego plazmidowego DNA można oszacować po rozdziale elektroforetycznym DNA w żelu agarozowym (Rys 3).



Rys. 3 Zdjęcie żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym

Mając oczyszczone DNA wektora oraz DNA zawierające gen dla badanego białka można przystąpić do przygotowania reakcji PCR, która umożliwi nam amplifikację wybranego genu. W reakcji PCR matrycowe DNA w pierwszym etapie ulega denaturacji (93-96°C), następnie temperatura jest obniżana do 42-68°C by umożliwić przyłączenie się wiązaniami wodorowymi (zgodnie z zasadą komplementarności) starterów do matrycy, trzeci etap cyklu polega na podwyższeniu temperatury do 72°C w której przebiega reakcja polimeryzacji. Cały cykl jest powtarzany wielokrotnie (30x) tak by uzyskać wystarczającą ilość docelowego DNA. By zaszła amplifikacja odpowiedniego genu potrzebne są krótkie odcinki DNA (oligonukleotydy o długości 18-22 pz) zwane starterami, od których polimeraza DNA zacznie przyłączać na zasadzie komplementarności kolejne nukleotydy.

Projektowanie starterów zaczyna się od znalezienia w bazie danych NCBI sekwencji cDNA dla badanego białka. Następnie znając sekwencję nukleotydową wektora należy wybrać enzymy restrykcyjne (dla których miejsca cięcia znajdują się w odcinku MCS wektora), które przetną zarówno DNA wektora jak i powstały produkt reakcji PCR i umożliwią przeprowadzenie reakcji ligacji. Starter tzw. *forward*, będzie miał sekwencję DNA identyczną jak nić 5'-3'. Żeby sekwencja DNA amplifikowanego genu znalazła się

w ramce odczytu w MCS wektora należy „dodać” dwa nukleotydy przed sekwencją rozpoznawaną przez pierwszy enzym restrykcyjny. Starter tzw. *reverse*, musi być komplementarny do nici DNA 5'-3'. Dodając miejsce restrykcyjne dla drugiego enzymu również należy zadbać by pozycja w ramce odczytu była zachowana. Syntezę zaprojektowanych starterów można zamówić w wielu firmach biotechnologicznych.

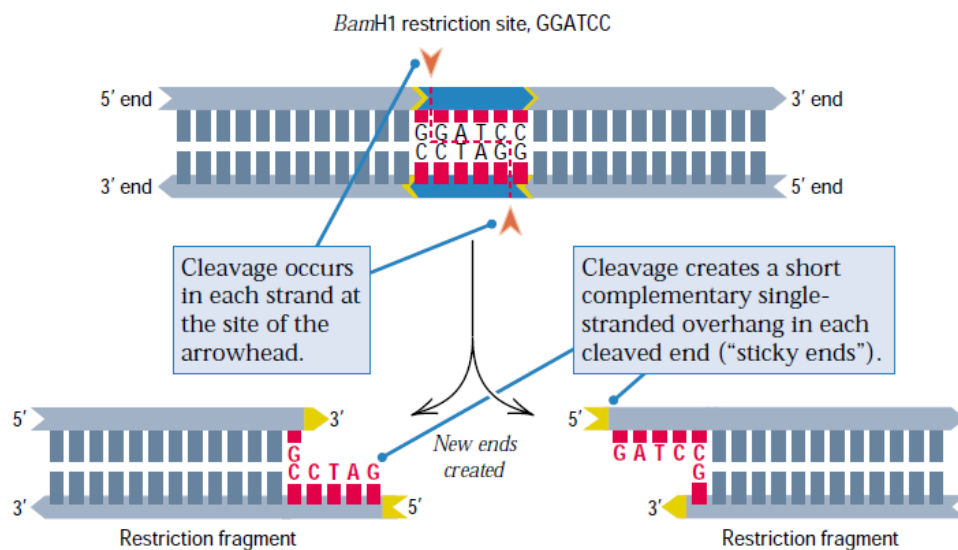


Rys. 4 Schemat przedstawiający miejsce wielokrotnego klonowania wektora wraz z sekwencją nukleotydową badanego białka oraz sekwencjami zaprojektowanych starterów

Reakcja PCR przeprowadzana jest w termocyklerze gdzie mamy możliwość wyboru odpowiedniego programu. Mieszanina reakcyjna powinna zawierać wodę, matrycowe DNA, dNTP, statery F i R, jony Mg^{2+} , bufor dla polimerazy Taq oraz polimerazę Taq. Poprawnej wielkości produkt PCR można wyizolować i oczyścić z żelu agarozowego za pomocą komercyjnych zestawów do izolacji DNA z żelu. Czystość i stężenie produktu PCR można określić spektrofotometrycznie.

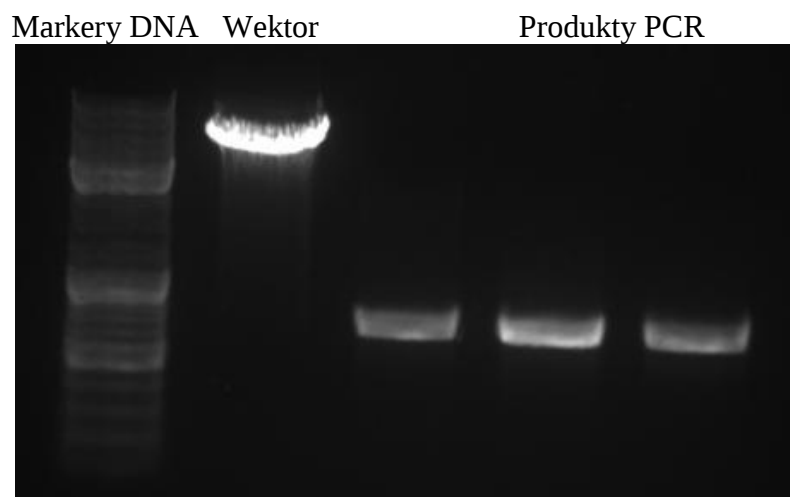
Kolejnym etapem eksperymentu jest przeprowadzenie reakcji enzymatycznego cięcia produktu PCR oraz wektora za pomocą wybranych enzymów restrykcyjnych (dla których miejsca cięcia znajdują się w zaprojektowanych starterach oraz w MCS wektora). Enzymy

restrykcyjne używane do cięcia DNA to endonukleazy restrykcyjne klasy II rozpoznające specyficjnie sekwencje 4-8 nukleotydowe w DNA. Enzymy te katalizują reakcję hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w DNA (wiązanie pomiędzy deoksyrybozą a resztą fosforanową) (Rys. 5). Po reakcji pocięte DNA (wektor i wstawka) jest izolowane i oczyszczane z żelu agarozowego. Czystość i stężenie pociętego produktu PCR oraz wektora można zmierzyć spektrofotometrycznie lub oszacować po rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym (Rys. 6).



Rys. 5 Schemat enzymatycznej hydrolizy wiązań fosfodiesterowych we fragmencie DNA [Gene Cloning and DNA Analysis, T.A. Brown]

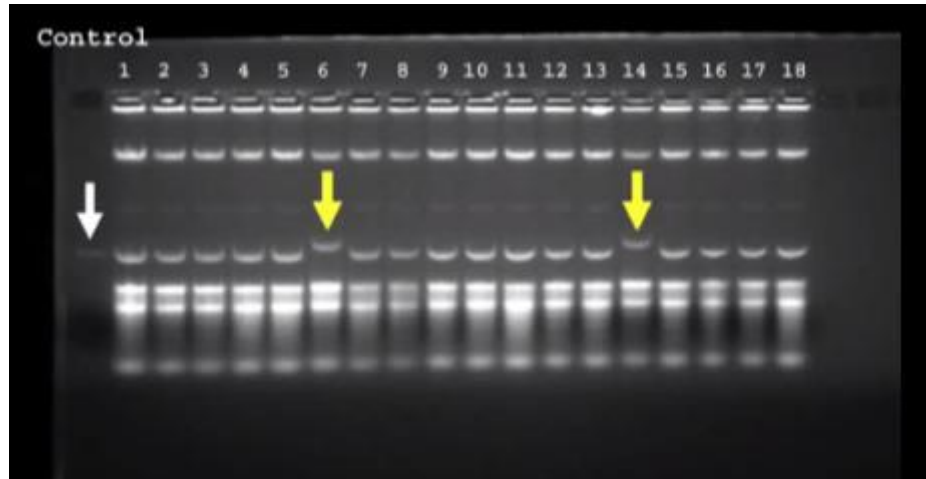
Mając przygotowaną wstawkę i wektor można przystąpić do przeprowadzenia reakcji łączenia „przyciętego” fragmentu DNA zawierającego sekwencję kodującą badane białko z „przyciętym” wektorem (ligacja). Enzym ligaza katalizuje reakcję utworzenia wiązania fosfodiesterowego pomiędzy resztą fosforanową przy węglu 5’ nukleotydu z jednej cząsteczki DNA a grupą hydroksylową przy węglu 3’ nukleotydu z drugiej cząsteczki DNA. Najczęściej używana jest ligaza pochodząca z bakteriofaga T4. By reakcja ligacji przebiegała z odpowiednią wydajnością należy zastosować molowy nadmiar wstawki w stosunku do wektora zmniejszając w ten sposób prawdopodobieństwo tzw. *self-ligacji*.



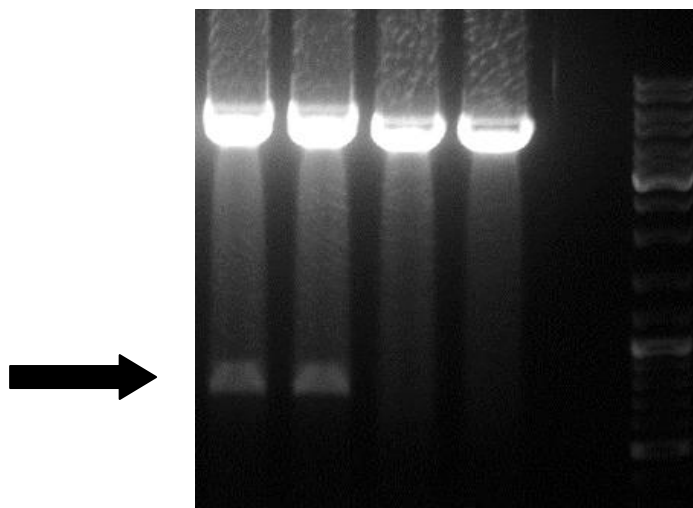
Rys. 6 Zdjęcie żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym DNA plazmidowego oraz produktu PCR pociętych enzymami restrykcyjnymi

Po ligacji, przebiegającej w 16°C, przeprowadza się transformację bakterii, czyli otrzymany konstrukt genetyczny jest wprowadzany do komórek bakteryjnych w celu uzyskania znacznych ilości rekombinowanego DNA. By zwiększyć prawdopodobieństwo wniknięcia obcego DNA do komórki bakteryjnej należy je wcześniej odpowiednio przygotować – sprawić by stały się „kompetentne”. Jedną z metod transformacji komórek bakteryjnych jest metoda z użyciem roztworu TSS (*Transformation and Storage Solution*). W tym celu komórki z hodowli o odpowiedniej gęstości ($OD_{600} = 0,3-0,4$) zawieszają się w podłożu LB o pH 6,5 z dodatkiem 50 mM jonów Mg^{2+} i 5% DMSO (TSS). Następnie do komórek kompetentnych dodaje się plazmidowe DNA i inkubuje w 4°C przez 20-60 min. Później następuje szok cieplny (42°C/90s), po którym komórki są inkubowane w 37°C przez godzinę w celu regeneracji ściany i błony komórkowej oraz ekspresji genów oporności na antybiotyki. Ostatnim etapem transformacji jest wysianie komórek na podłoże stałe z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego. Udana transformacja nie jest tożsama z udanym klonowaniem, ponieważ na podłożu z antybiotykiem wyrosną wszystkie komórki bakteryjne posiadające plazmid niezależnie od tego czy jest nim prawidłowy konstrukt genetyczny czy też plazmid nie zawierający wstawki (*self-ligand*). Z tego powodu kolejną czynnością do wykonania jest tzw. *screening'u*, czyli poszukiwanie klonu zawierającego poprawny konstrukt genetyczny (Rys.7). Po cięciu enzymami restrykcyjnymi potwierdzającym obecność wstawki (Rys.8), plazmid jest sekwencjonowany w celu sprawdzenia występowania poprawnej ramki odczytu. Plazmidowe DNA zawierające pożądany konstrukt genetyczny jest oczyszczane za pomocą specjalnych zestawów do izolacji

ultraczystego DNA w celu otrzymania DNA wysokiej jakości odpowiedniego do transfekcji komórek ssaczych.



Rys.7 Zdjęcie żelu agarozowego po rozdiale elektroforetycznym po przeprowadzeniu *screening'u*. Żółte strzałki oznaczają plazmidy różniące się wielkością w stosunku do wektora kontrolnego (strzałka biała) nie zawierającego żadnej wstawki

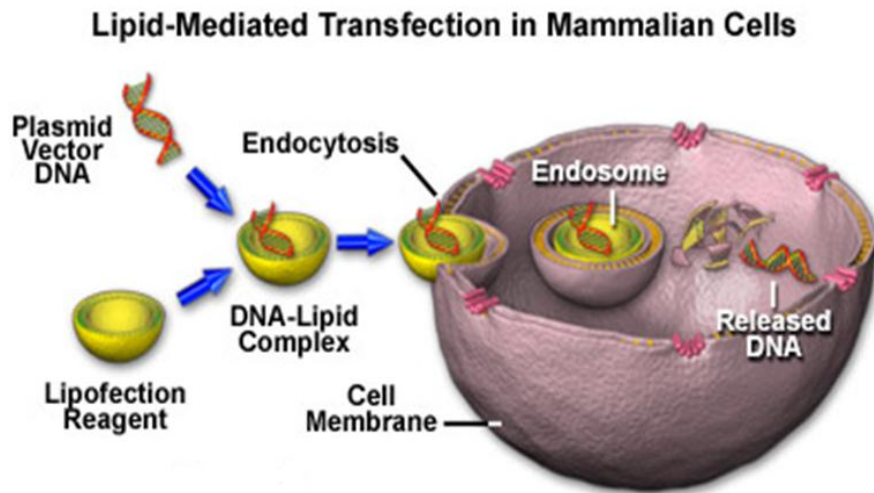


Rys. 8 Zdjęcie żelu agarozowego po rozdiale elektroforetycznym plazmidowego DNA pociętego enzymami restrykcyjnymi. Czarna strzałka wskazuje obecność pożądanej wstawki

Subkomórkowa lokalizacja badanego białka będzie przeprowadzana w komórkach ssaczych, w komórkach nowotworowych linii HeLa (linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy Henrietty Lacks (ang. *Henrietta Lacks cell*). Dlatego niezbędna jest podstawowa wiedza dotycząca utrzymywania poza organizmem, czyli *in vitro*, komórek ssaczych. hodowla pierwotna. Po pierwszym pasażu, który oznacza przeniesienie komórek ze starego naczynia hodowlanego do nowych naczyń, zawierających świeżą pożywkę przed osiągnięciem stanu 100% konfluencji, hodowla pierwotna staje się linią komórkową. W miarę kolejnych pasażu linia komórkowa o określonym czasie życia zamiera, natomiast komórki nowotworowe jak i komórki uniesmiertelnione mogą się dzielić w nieskończoność – są nazywane liniami komórkowymi ciągłymi. Komórki wymagające do wzrostu i podziałów przyklejenia się do podłoża stałego zwane są komórkami adherentnymi, natomiast te rosnące w zawiesinie zwane są komórkami zawiesinowymi.

Hodowle komórkowe prowadzi się w odpowiednich naczyniach hodowlanych - szklanych lub plastikowych (butelki hodowlane, szalki Petriego, płytki 6/24/96-dołkowe). Hodowla komórek *in vitro* wymaga zachowania sterylnych warunków (komory z laminarnym przepływem powietrza), zapewnienia środowiska wzrostu o optymalnej temperaturze, wilgotności i pH (inkubator CO₂) oraz dostarczenia komórkom wszystkich niezbędnych do życia i proliferacji substancji odżywczych (podłoże hodowlane).

Wprowadzenie obcego kwasu nukleinowego za pomocą metod niewirusowych do komórki eukariotycznej nosi nazwę transfekcji. Transfekcja stabilna ma miejsce gdy wprowadzone DNA ulega integracji z genomem komórki gospodarza, natomiast transfekcja przejściowa charakteryzuje się brakiem integracji wprowadzonego DNA do genomu i zanikiem ekspresji wprowadzonego DNA w miarę podziałów komórkowych. DNA, które chcemy wprowadzić do komórki ssaczej powinno cechować się wysoką jakością i czystością. Istnieje wiele metod transfekcji, jedną z nich jest lipofekcja (Rys. 9) polegająca na utworzeniu kompleksu DNA-odczynnika do lipofekcji i wnikięciu do komórki na drodze endocytozy. Następnie wprowadzone DNA ulega ekspresji i po 24h komórki mogą zostać poddane obserwacjom mikroskopowym. Transfekcja może być optymalizowana na różnych etapach (indywidualnie do eksperymentu). Parametry podlegające manipulacjom to: objętość liposomów, stężenie DNA, czas inkubacji DNA + liposomy, % konfluencji.



Rys 9. Schemat wprowadzenie plazmidowego DNA do komórki ssaczej przy użyciu odczynnika lipidowego [<http://www.microscopyu.com>]

Warunkiem koniecznym przy prowadzeniu obserwacji subkomórkowej lokalizacji białek, badaniu dynamiki i oddziaływań białek czy każdego procesu metabolicznego *in vivo* jest zapewnienie komórkom optymalnych warunków do życia (wzrostu i podziałów) przez cały czas trwania eksperymentu. Każde odstępstwo od warunków fizjologicznych jest podstawą do poddania w wątpliwość wyników eksperymentu. Kontrolowane parametry to odpowiednia temperatura, wilgotność powietrza i stężenie CO₂. Obecnie automatyczne systemy do przyżyciowego obrazowania komórek zbudowane wokół mikroskopu konfokalnego w pełni zapewniają optymalne warunki dla życia komórek (Rys. 10).



Rys. 10 Zdjęcie mikroskopu konfokalnego LSM 780 Zeiss

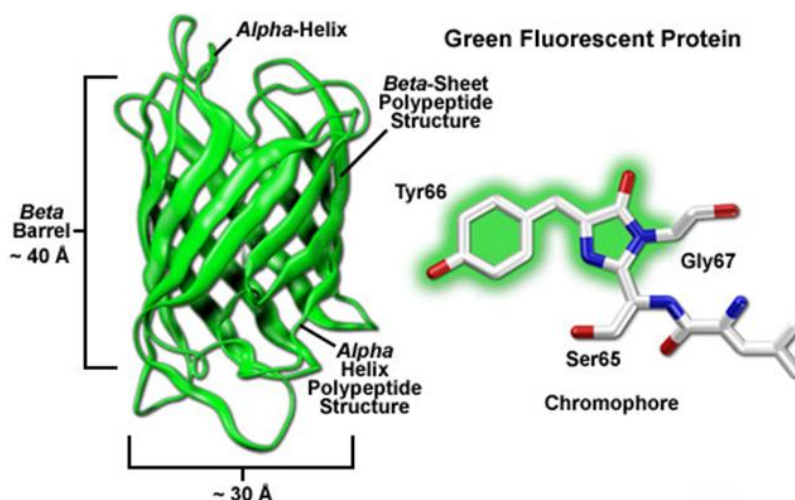
Badane białko syntetyzowane będzie w komórkach ssaczych w fuzji z białkiem fluorescencyjnym więc należy zapoznać się z podstawami zjawiska fluorescencji. W pewnych ściśle określonych warunkach promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła

widzialnego może zostać pochłonięte przez cząsteczkę. Po absorpcji światła cząsteczka przechodzi do stanu wzbudzonego. Istnieje wiele sposobów na które cząsteczka może pozbyć się nadmiaru energii (tzw. kanałów dezaktywacji stanu wzbudzonego) i jednym z nich jest emisja światła charakteryzującego się większą długością fali niż światło pochłonięte. To zjawisko nazywane jest fluorescencją. Czyli cząsteczka zdolna do fluorescencji (zazwyczaj posiadająca budowę pierścieniową i zdelokalizowane elektrony typu π) będzie pochłaniała światło o krótszej długości fali (np. światło niebieskie) i po czasie, zwanym czasem życia fluorescencji (zazwyczaj rzędu nanosekund), wracając do stanu podstawowego wyemituje światło o większej długości fali (np. światło zielone).

Obserwacje będą prowadzone w mikroskopie konfokalnym który, jest ulepszoną wersją mikroskopu fluorescencyjnego. Jak działa mikroskop konfokalny? Światło, o długości fali odpowiedniej do wzbudzenia cząsteczki fluoryzującej, emitowane przez laser ulega odbiciu od lustra dichroicznego i przechodząc przez obiektyw trafia na badany obiekt. Emitowana fluorescencja wraca przez obiektyw i z powodu większej długości fali od światła wzbudzającego, jest transmitowana przez lustro dichroiczne do detektora, którym jest fotopowielacz. Przed detektorem znajduje się niewielka szczelina zwana z ang. „pinhole”, która powoduje, że tylko światło emitowane z jednej płaszczyzny ogniskowania (płaszczyzny gdzie skupiają się promienie świetlne) dociera do detektora, natomiast światło pochodzące z płaszczyzn położonych niżej lub wyżej nie bierze udziału w tworzeniu obrazu (dzięki czemu uzyskany obraz cechuje się doskonałą rozdzielczością, kontrastem i ostrością). Zatem możemy obrazować dowolną płaszczyznę w osi Z i tym samym stworzyć przekroje optyczne preparatu, które po złożeniu dadzą nam obraz trójwymiarowy. W laserowym skaningowym mikroskopie konfokalnym światło lasera skanuje preparat, emitowana fluorescencja tworzy obraz, który następnie jest dzielony na pixele. Każdemu pixelowi przypisana zostaje odpowiednia wartość intensywności fluorescencji. Powstały obraz widzimy na monitorze komputera.

Jak przebiegał rozwój technologii białek fluorescencyjnych? Pierwsze białko fluorescencyjne zostało odkryte przez Osamu Shimomura. Badając białko bioluminescencyjne ekworyna z meduzy *Aequorea victoria* zauważył, że światło niebieskie emitowane przez to białko na skutek reakcji z jonami Ca^{2+} jest konwertowane na światło zielone. Odpowiedzialne za to było białko nazwane Green Fluorescent Protein (GFP). GFP jest białkiem o masie 27 kDa, jego struktura trzeciorzędowa przypomina tzw. beczułkę β mającą wymiary 4 x 3 nm, Składa się z 11 łańcuchów β oraz położonej wewnątrz α helisy zawierającej tripeptyd odpowiedzialny za fluorescencję – Ser 65, Tyr 66, Gly 67 (Rys. 11).

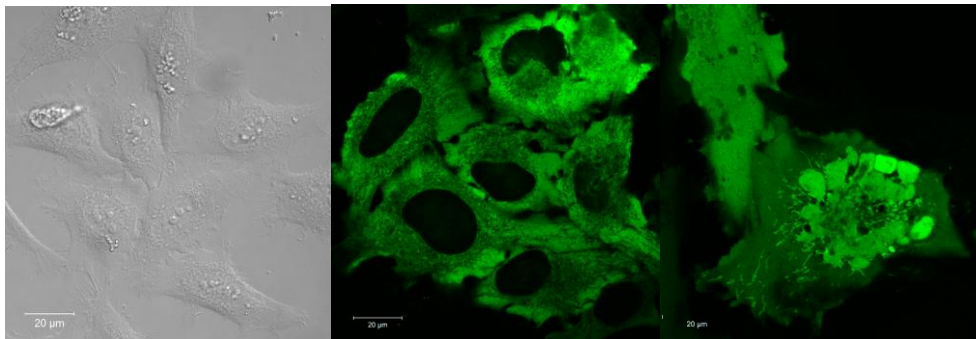
Kolejną osobą, która w znacznym stopniu przyczyniła się do rozwoju technologii białek fluorescencyjnych był Martin Chalfie. Udowodnił on, że gen kodujący białko GFP może ulegać ekspresji w innym organizmie niż *Aequorea victoria*, mianowicie w nicieniu *C. elegans* oraz bakterii *E. coli*. Tym samym dał początek technice projektowania i ekspresji białek hybrydowych. Jednak „dzikie GFP” (*wild type GFP*) miało liczne wady. Posiadało dwa maksima w widmie absorpcji co świadczyło o istnieniu GFP w dwóch formach. Dzikie GFP było efektywnie wzbudzane światłem z zakresu UV, które jest toksyczne dla komórek. Miało również tendencję do oligomeryzacji co utrudniałoby wszelkie analizy lokalizacji i dynamiki. Optimum temperaturowe dla dojrzewania GFP (formowania się chromoforu) znacznie różniło się od optimum dla komórek ssaczych (37°C).



Rys. 11. Schemat struktury trzeciorzędowej GFP [<http://www.microscopyu.com>]

Problemy te zostały przezwyciężone dzięki pracom Roberta Tsien’a, który udoskonalił i zmodyfikował dzikie GFP dając początek wielu białkom fluorescencyjnych. Zamiana seryny 65 na treoninę przesunęła widmo absorpcji dając pojedyncze maksimum przy 488 nm, liczne punktowe mutacje w obrębie struktury GFP zoptymalizowały jego ekspresję w komórkach ssaczych, poprawiły szybkość dojrzewania i efektywność fałdowania białka, tak powstało ulepszone białko GFP – EGFP (*Enhanced GFP*). Inne mutacje w obrębie tripeptydu tworzącego chromofor spowodowały otrzymanie białek świecących na niebiesko (BFP), cyjanowo (CFP), żółto (YFP). Obecnie mamy do dyspozycji całą paletę kolorów białek fluorescencyjnych rozszerzoną o białka czerwone wyizolowane z koralowców *Anthozoa*, noszące takie nazwy jak mTomato, mCherry, DsRed.

Posiadając wiedzę o fluorescencji, białkach fluorescencyjnych i mikroskopii konfokalnej możemy przystąpić do końcowej części eksperymentu – obserwacji mikroskopowych. Oczywiście przed przystąpieniem do analiz należy upewnić się, że komórki posiadają prawidłową morfologię oraz że nie ma śladów kontaminacji bakteriami czy drożdżami. Obserwowane komórki powinny cechować się fizjologicznym poziomem ekspresji białka, ponieważ w ten sposób można uniknąć błędnych wniosków spowodowanych nieprawidłową lokalizacją białka (wynikającą ze zbyt dużego stężenia – agregacja). W mikroskopie konfokalnym możemy zbadać lokalizację danego białka a także zbadać jak zmienia się jego lokalizacja po dodaniu do podłoża hodowlanego np. antybiotyku czy leku. Tworząc przekroje optyczne komórki i składając obraz 3D dostajemy rozmieszczenie białek w całej komórce. Wykorzystując opcję *time lapse imaging* możemy zaprogramować system by obrazował w zadanym przez nas interwale czasowym np. co 10 sekund czy 10 minut. W ten sposób można obrazować dynamikę całych organelli np. dynamikę mitochondriów gdy badane białko lokalizuje się w mitochondriach a nawet stworzyć film przedstawiający ruch organelli w komórce.



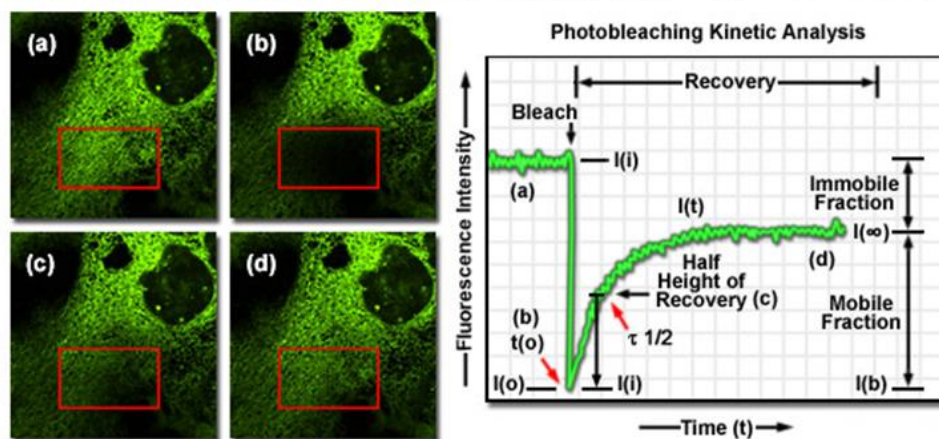
Rys. 12 Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego przedstawiające od prawej: komórki linii HeLa w świetle przechodzącym, komórki linii HeLa wyrażające białko hybrydowe pEGFPC-P1, komórki linii HeLa wyrażające białko hybrydowe pEGFPN-P0

W jaki sposób zbadać dynamikę białek gdy lokalizują się głównie w jądrze czy też tylko w cytoplazmie? Lub gdy obraz lokalizacji mówi nam, że dane białko jest zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie to jednak musi być w jakiś sposób transportowane między tymi kompartmentami. Doskonale do tego celu nadają się tzw. techniki fotoperturbacji, które powodują zaburzenie stanu równowagi (*steady state fluorescence*). Poprzez analizę powrotu

układu do stanu równowagi można uzyskać wiele informacji o tym układzie. Do owych technik zaliczają się FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching* lub *Fluorescence Redistribution After Photoperturbation*) oraz FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*). Obie te techniki wykorzystują zjawisko z ang. zwane *photobleaching*, czyli wygaszanie fluorescencji za pomocą światła. Polega ono na tym, że w cząsteczce fluoryzującej na skutek absorpcji światła o dużej intensywności zachodzą kowalencyjne modyfikacje fluoroforu w wyniku czego molekula nieodwracalnie traci zdolność do fluorescencji.

Na czym polega technika FRAP? W wybranym przez nas miejscu w komórce fluorescencja jest wygaszana (*photobleaching*) na skutek absorpcji światła laserowego o dużej intensywności. Następnie mierząc intensywność fluorescencji w tym regionie (wykorzystując opcję *time lapse*) otrzymujemy obraz zachowania się badanego białka (Rys. 13). Z otrzymanych danych dostajemy krzywą, której kształt odzwierciedla sposób w jaki badane molekuly przemieszczają się do zaznaczonego regionu (dyfuzja, transport aktywny). Jak wytłumaczyć w jaki sposób otrzymujemy krzywą „powrotu” intensywności fluorescencji? W wybranym przez nas regionie molekuly tracą zdolność do fluorescencji i tym samym przestają być dla nas widoczne w mikroskopie. Białka, które utraciły zdolność do fluorescencji przemieszczają się na zewnątrz wybranego obszaru a ich miejsce będą zajmowały białka znajdujące się uprzednio właśnie poza regionem obserwowanym. W ten sposób intensywność fluorescencji w wybranej części komórki będzie wzrastała z szybkością zależną od ruchliwości badanych białek. Natomiast w przypadku gdy molekuly po wygaszeniu nie przemieszczają się na zewnątrz wybranego obszaru na skutek silnych interakcji z innymi molekulami (są zimmobilizowane), molekuly z zewnątrz nie mogą zająć ich miejsca i krzywa „powrotu” intensywności fluorescencji w tym regionie znacznie różni się od przypadku opisanego powyżej.

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) with Green Fluorescent Protein



Rys. 13. Schemat opisujący technikę FRAP. Objasnienia w tekście [<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html>]

Jakie informacje możemy uzyskać za pomocą techniki FRAP? Możemy dowiedzieć się jak szybko poruszają się białka, przez jaki czas białka pozostają związane, jaki jest % białek „zimmobilizowanych” poprzez oddziaływanie z innymi molekułami (np. DNA, aktyna), jak leki/mutacje wpływają na ruchliwość białka, jak szybko białka są transportowane między kompartmentami komórkowymi (import/export).

Jaką metodę zastosować w przypadku gdy interesuje nas wybrana subpopulacja białek np. gdy białka lokalizują się w jąderkach oraz w cytoplazmie a jesteśmy zainteresowani śledzeniem losów białek znajdujących się w jąderkach. Dobrym rozwiązaniem wydaje się stworzenie białka hybrydowego z jakimś białkiem fotokonwertowalnym (*photoconvertible FP*). Białka te charakteryzują się zmianą widma emisji fluorescencji na skutek promieniowania światła o określonej długości fali. Przykładem jest białko Dendra, które przed fotokonwersją emituje światło zielone, natomiast na skutek absorpcji światła UV zachodzą kowalencyjne modyfikacje w obrębie fluoroforu czego skutkiem jest emisja światła czerwonego. Aktywując populację białek np. w jąderku możemy śledzić losy tej populacji i badać ich dalsze losy.

Przejdźmy teraz do metod pozwalających na badania interakcji międzybiałkowych. Przypuśćmy, że mamy podejrzenia co do pewnego białka, że w jakiś sposób oddziałuje z badanym białkiem. Jak sprawdzić czy rzeczywiście zachodzą jakieś interakcje? Pierwsze podejście do tego zagadnienia mogłoby polegać na sprawdzeniu czy te dwa białka znajdują się w tej samej fizycznej przestrzeni w komórce (np. w błonie komórkowej), czyli czy ma miejsce kolokalizacja. Łącząc te białka z białkami fluorescencyjnymi (np. EGFP i DsRed)

w miejscu kolokalizacji w mikroskopie konfokalnym zaobserwujemy kolor żółty (nałożenie koloru zielonego EGFP z czerwonym DsRed). Dlaczego kolokalizacja nie może być dowodem na występowanie interakcji? W mikroskopie świetlnym nie możemy rozróżnić dwóch punktów jako oddzielne, gdy są położone w odległości mniejszej niż 200 nm. Ponieważ białka fluorescencyjne mają wymiary 4 x 3 nm nie możemy stwierdzić, że oddziałują ze sobą mimo ich kolokalizacji. Dlatego też by potwierdzić występowanie fizycznej interakcji musimy zastosować technikę FRET. FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) polega na bezpromienistym transferze energii wzbudzenia elektronowego od molekuly donora do molekuly akceptora. By zachodził transfer energii muszą być spełnione trzy warunki: donor i akceptor muszą znajdować się w odległości 2-10 nm, widmo emisji donora musi nakładać się w znacznym stopniu na widmo absorpcji akceptora oraz obie molekuly muszą być odpowiednio zorientowane w przestrzeni. Oddziaływanie FRET redukuje zarówno intensywność fluorescencji jak i czas życia fluorescencji donora. FRET umożliwia obliczenie fizycznej odległości między donorem a akceptorem i jest jedną z najlepszych o ile nie najlepszą metodą na potwierdzenie interakcji międzybiałkowych *in vivo*.

Literatura:

1. <http://www.microscopyu.com>
2. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html>
3. Gene Cloning and DNA Analysis, T.A. Brown, 2010, Part I, The Basic Principles of Gene Cloning and DNA Analysis

Załącznik do ćwiczeń

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 rozdziłu cząsteczek większych niż 2000 pz (2 kb) nie należy stosować napięcia większego niż 5 V/cm.

Temperatura rozdziłu:

Temperatura w jakiej dokonuje się rozdziłu 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 rozdziłu 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 agarozы i denaturację DNA. Najpowszechniej stosowany jest bufor TAE.

Elektroforezę natywnego RNA przeprowadza się według tych samych zasad co elektroforezę DNA. Jednakże większość cząsteczek RNA tworzy złożone struktury drugorzędowe co powoduje, że szybkość migracji takich cząsteczek RNA nie jest proporcjonalna do ich wielkości. Ponadto, cząsteczki takie mogą tworzyć kilka form widocznych na żelu w postaci oddzielnych prążków. Toteż, próbki RNA przed elektroforezą często poddaje się denaturacji i elektroforezę przeprowadza się w warunkach denaturujących.

Materialy i odczynniki

1. Bufor próbkowy do elektroforezy RNA 2x stężony:

- 95% formamid
- 0,025 % SDS
- 0,025% błękit bromofenolowy
- 0,025% bromek etydyny
- 0,5 mM EDTA, w wodzie

2. 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. Agaroza

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% lub 1% roztworu agarozy w buforze TAE. W tym celu odpowiednio 0,7 g lub 1 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 lub RNA zawiesić w buforze próbkowym do elektroforezy, odpowiednio, DNA lub RNA. Płytkę z zastygniętym żelem agarozowym umieścić w aparacie

do elektroforezy. Aparat napęlić 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.

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 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) połączone wiązaniami poprzecznymi za pomocą N,N'-metyleno-bis-akrylamidu ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). 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 nadsiarczanu amonu (APS) oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE ang. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 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 (ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) odbywa się w obecności soli sodowej siarczany dodecyłu (SDS), który jest deterгентem 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 niedenaturujących (PAGE)

Materialy 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 APS (nadsiarczanu amonu)
5. TEMED
6. 1% roztwór błękitu bromofenolowego
7. 30% roztwór sacharozy
8. Bufor elektrodowy:

Glicyna	14,4 g
Tris	3,0 g
uzupełnić wodą do 1000 ml	
9. Wzorce białkowe
10. Zestaw do elektroforezy białek

Przygotowanie żelu i próbek białkowych

Umyte i odtłuszczone specjalne płytki szklane do elektroforezy, złożyć zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia. Przygotować 2 rodzaje żeli poliakrylamidowych 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)	Żel 10% (8 ml) z edestyną	Żel 12% (8 ml)	Żel 13,8% (8 ml)	Żel 15% (8 ml)
H ₂ O	3,1 ml	2,3 ml	2,6 ml	2,2 ml	1,8 ml
30% akrylamid + 1% bisakrylamid	2,7 ml	2,7 ml	3,2 ml	3,6 ml	4,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
1% edestyna	-	0,8 ml	-	-	-
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl

Żel zagęszczający

ODCZYNNIK	na 2,5 ml żelu	na 5,0 ml żelu
H ₂ O	1,3 ml	2,6 ml
30% akrylamid + 1% bisakrylamid	0,5 ml	1,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,625 ml	1,25 ml
10% APS	25 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

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

Próbki do analizy przygotować w następujący sposób: do każdej próbówki zawierającej analizowane białka lub wzorce białkowe (1–20 µg białka w objętości 30 µl) dodać po 10 µl 30% sacharozy i 1 µl 1% błękitu bromofenolowego. Dokładnie wymieszać i bez ogrzewania używać do doświadczeń.

Płytki ze spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat napełnić buforem elektrodowym. Przygotowane próbki ostrożnie nanieść do studzienek w żelu zagęszczającym. Podłączyć elektrody do zasilacza. Rozdział elektroforetyczny prowadzić pod napięciem 120 V tak długo, aż barwnik przesunie się do

końca żelu separującego. Wyłączyć zasilacz, wyjąć płytki z żelem, a następnie przeprowadzić kolejno barwienie i odbarwianie żelu.

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	0,5 ml
Glicerol	1,0 ml
10% roztwór SDS	2,0 ml
DTT	154 mg
H ₂ O	1,3 ml
1% roztwór błękitu bromofenolowego	200 µl

8. Bufor elektrodowy:

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

9. Wzorce białkowe
10. Zestaw do elektroforezy białek

Przygotowanie żelu i próbek białkowych

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)	Żel 12% (8 ml)	Żel 13,8% (8 ml)	Żel 15% (8 ml)
H ₂ O	3,1 ml	2,6 ml	2,2 ml	1,8 ml
30% akrylamid + 1%bisakrylamid	2,7 ml	3,2 ml	3,6 ml	4,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
10% SDS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl

Żel zagęszczający

ODCZYNNIK	na 2,5 ml żelu	na 5,0 ml żelu
H ₂ O	1,3 ml	2,6 ml
30% akrylamid + 1%bisakrylamid	0,5 ml	1,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,625 ml	1,25 ml
10% SDS	25 µl	50 µl
10% APS	25 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

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

Próbki do analizy przygotować w następujący sposób: do każdej próbówki zawierającej analizowane białka lub wzorce białkowe (1-30 µg białka w objętości 30 µl) dodać po 10 µl buforu próbkowego (4x stężonego) i wymieszać. Następnie, próbki ogrzewać

przez 3 min. w temp. 90°C. Bufor próbkowy zawierający SDS i DTT niszczy strukturę natywną białek w podwyższonej temperaturze.

Płytki ze spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat napełnić buforem elektrodowym. Przygotowane próbki białkowe ostrożnie nanieść do studzienek w żelu zagęszczającym. Rozdział prowadzić pod napięciem 150 V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Wyłączyć zasilacz, wyjąć płytki z żelem do wybarwienia.

Barwienie białek po elektroforezie

Celem uwidocznienia oraz identyfikacji rozdzielonych prążków białkowych, żel poliakrylamidowy po elektroforezie poddaje się barwieniu. Najczęściej stosuje się tu roztwór barwnika *Coomassie* lub barwienie metodą srebrową.

A. Barwienie błękitem *Coomassie*

Odczynniki

Mieszanina barwiąca:

Metanol	400 ml
Kwas octowy	100 ml
H ₂ O	500 ml
Błękit <i>Coomassie</i>	2,5 g

Odbarwiacz:

Metanol	400 ml
Kwas octowy	100 ml
H ₂ O	500 ml

Wykonanie ćwiczenia

Wyjęty żel poliakrylamidowy umieścić w roztworze barwnika na okres około 15-30 min. Po tym czasie, zlać barwnik, żel przepłukać wodą a następnie odbarwiać go roztworem odbarwiającym tak długo, aż widoczne staną się rozdzielone prążki białka. Po

wybarwieniu żel wysuszyć. Barwienie błękitem *Coomassie* pozwala na wykrycie prążków białkowych zawierających około 0,1 µg białka.

B. Barwienie srebrem

Jest to metoda 10-100 razy czulsza od metody barwienia białek błękitem *Coomassie*. W metodzie srebrzej większość białek ulega zabarwieniu na kolor czarny lub brązowy. Lipoproteiny wybarwiają się na niebiesko, a glikoproteiny na brązowo lub czerwono.

METODA I

Odczynniki

Nr 1. 10% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA)

Nr 2. 2% roztwór błękitu *Coomassie* G - 250

Nr 3. Roztwór do barwienia koloidalnego:

(NH ₄) ₂ SO ₄	70 g
85% H ₃ PO ₄	23,6 ml
Metanol	200 ml
uzupełnić wodą do	950 ml

Nr 4. 0,2 mM roztwór DTT: 10 µl 2M DTT w 100 ml H₂O

Nr 5. 0,1% roztwór AgNO₃: 50 mg AgNO₃ w 50 ml H₂O

Nr 6. 3% roztwór Na₂CO₃ + 0,018% HCHO: 7,5 g Na₂CO₃
125 µl 37% HCHO w 250 ml H₂O

Nr 7. 20% kwas cytrynowy: 5 g kw. cytrynowego w 25 ml H₂O

Uwaga! Odczynniki nr 4, 5, 6 przygotować bezpośrednio przed użyciem. Barwienie wykonywać w kuwecie przeznaczonej wyłącznie do tego celu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie utrzymywać przez 1 godz. w 50ml 10% TCA .
2. Płukać 3 x 5 min w 100 ml wody destylowanej.
3. Barwić żel przez 1godz. w 50 ml roztworu do barwienia koloidalnego, zawierającego 2,5 ml 2% błękitu *Coomassie*.
4. Płukać 3 x 5 min. w 100 ml wody destylowanej.
5. Płukać 10 min. w 50 ml wody destylowanej, w gorącej łaźni wodnej stale mieszając.
6. Dodać 50 ml 0,2M DTT i mieszać przez następne 10 min. w gorącej łaźni wodnej.

7. Przepłukać żel w 100 ml wody destylowanej.
8. Barwić w 50 ml 0,1% AgNO_3 w gorącej łaźni wodnej przez 10 min. stale mieszając.
9. Przepłukać żel 100 ml wody destylowanej.
10. Dodać 50ml roztworu wywoływacza barwy (odczynnik nr 6) na około 30 sek., następnie zlać go i powtórnie dodać 50 ml świeżego wywoływacza. Całość dokładnie mieszać. Z chwilą pojawienia się pierwszych prążków białkowych dodać pozostałą porcję wywoływacza i całość mieszać do momentu pojawienia się wyraźnych prążków białkowych.
11. Zatrzymać barwienie przez dodanie 25 ml 20% kw. cytrynowego (odczynnik nr 7).

METODA II

Odczynniki

1. Roztwór A (50% metanol, 10% kw. octowy)
2. 30% etanol
3. Roztwór B (20 mg tiosiarczanu sodu na 100 ml H_2O)
4. Roztwór C (5 ml 25% glutaraldehydu + 95 ml H_2O)
5. Roztwór D (200 mg AgNO_3 + 75 μl 37% formaldehydu + 100 ml H_2O)
6. Roztwór E (6g Na_2CO_3 + 50 μl 37% formaldehydu + 200 μl tiosiarczanu z wyjść. roztworu 20 mg na 10 ml H_2O – dopełnić wodą do 100 ml)

Uwaga! Roztwory B, C, D i E przygotować bezpośrednio przed użyciem. Barwienie wykonywać w kuwecie przeznaczonej wyłącznie do tego celu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie utrzymywać przez 3 x 1 godz. lub przez noc w 100 ml roztworu A.
2. Dodać 100 ml 30% etanolu i mieszać przez 1 godz.
3. Dodać 100 ml roztworu B i mieszać przez 1 min.
4. Dodać 100 ml roztworu C i mieszać przez 30 min.
5. Płukać 3 x 20 sek. w 100 ml wody destylowanej.
6. Barwić w 100 ml roztworu D, stale mieszając przez 20 min.
7. Płukać 3 x 20 sek. w 100 ml wody destylowanej.
8. Dodać 100 ml roztworu E (wywoływacza barwy) i mieszać do momentu pojawienia się wyraźnych prążków białkowych.
9. Płukać 3 x 20 sek. w 100 ml wody destylowanej.
10. Zatrzymać barwienie przez dodanie 100 ml roztworu A na 10 min.
11. Przepłukać żel wodą i wysuszyć.

Oznaczanie stężenia białka - metoda *Bradford*

Metoda ta pozwala na szybkie oznaczenie stężenia białka w roztworze. W metodzie *Bradford* wykorzystywana jest zdolność białka do tworzenia kompleksu z barwnikiem zwanym błękitem *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue*). Błękit *Coomassie* w środowisku kwaśnym posiada zabarwienie brunatne, które zmienia się na błękitne w reakcji z białkiem. Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka. Absorbencję powstałego kompleksu barwnego odczytuje się w zakresie światła widzialnego przy długości fali 595 nm.

Odczynniki

1. Odczynnik *Bradford* (preparat handlowy)
2. Roztwór wzorcowy albuminy wołowej o stężeniu 100µg/ml
3. Roztwór badanego białka

Wykonanie ćwiczenia

a) wykreślenie krzywej wzorcowej

Przygotować 8 ponumerowanych probówek, do których odmierzyć (według tabeli) następujące ilości roztworu białka wzorcowego i wody destylowanej:

Nr probówki	1	2	3	4	5	6	7	8
Wzorzec albuminowy (µl)	20	40	80	100	120	160	200	0
Woda (µl)	780	760	720	700	680	640	600	800
Ilość białka w próbce (µg)	2	4	8	10	12	16	20	0

Do wszystkich probówek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradford* i dokładnie wymieszać.

Po upływie 5 min, zmierzyć absorbencję w kolorymetrze przy długości fali 595nm.

Pomiarów dokonywać względem próby kontrolnej (nr 8). Wykreślić krzywą wzorcową odkładając na osi odciętych (X) stężenia białka, a na osi rzędnych (Y) wartości absorpcji.

b) wykonanie pomiaru w badanej próbce białka.

Do dwóch probówek odmierzyć 2 – 20 µl badanego roztworu białka (zgodnie z zaleceniami prowadzącego ćwiczenia) i uzupełnić wodą do objętości 0,8 ml. Do wszystkich probówek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradford* i dokładnie wymieszać. Po upływie 5 min, zmierzyć absorbencję w kolorymetrze przy długości fali 595 nm.

Stężenie białka odczytać z przygotowanej krzywej wzorcowej.

ILOŚCIOWE OZNACZANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

METODA SPEKTROFOTOMETRYCZNA

Kwasy nukleinowe charakteryzują się zdolnością absorpcji promieniowania ultrafioletowego, której maksimum przypada na fale o długości 260 nm. Na wartość absorpcji mogą wpływać zanieczyszczenia białkami, dla których maksimum absorpcji promieni UV przypada na fale o długości 280 nm i 235 nm. Zasada metody polega na spektrofotometrycznym pomiarze absorpcji promieni UV o długości 260 nm, przez jednocentymetrową warstwę badanego roztworu kwasu nukleinowego i obliczeniu jego stężenia wiedząc że, absorpcja (A) o wartości $A = 1$ odpowiada około 50 $\mu\text{g/ml}$ dwuniciowego dsDNA (ang. *double stranded DNA*), około 33 $\mu\text{g/ml}$ jednoniciowego ssDNA (ang. *single stranded DNA*) oraz około 40 $\mu\text{g/ml}$ jednoniciowego ssRNA (ang. *single stranded RNA*) i 20 -30 $\mu\text{g/ml}$ oligonukleotydów.

Przykład oznaczenia stężenia RNA

Objętość próbki RNA: 100 μl

Rozcieńczenie: 10 μl próbki RNA + 490 μl dest. wody (rozcieńczenie 1/50)

A_{260} rozcieńczonej próbki = 0.55

Stężenie RNA = 40 $\mu\text{g/ml}$ x A_{260} x rozcieńczenie
 = 40 $\mu\text{g/ml}$ x 0.55 x 50
 = 1100 $\mu\text{g/ml}$

Całkowita ilość RNA = stężenie x objętość próbki w ml
 = 1100 $\mu\text{g/ml}$ x 0,1
 = 110 μg RNA

Ponieważ tak roztwory DNA jak i RNA częściowo absorbują światło przy długości fali 280 nm, a roztwory białek częściowo pochłaniają światło również przy długości fali 260 nm, stosunek odczytu przy długości fali 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}) informuje o czystości kwasów nukleinowych. W przypadku dobrej izolacji wartość A_{260}/A_{280} dla DNA wynosi 1,8 – 2,0, a dla RNA 1,9 – 2,1.

Odczynniki

Roztwory badanych kwasów nukleinowych.

Wykonanie ćwiczenia

Przeprowadzić spektrofotometryczny pomiar absorpcji promieni UV przez badany roztwór kwasu nukleinowego przy dwóch długościach fal 260 nm oraz 280 nm. Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (bufor lub H₂O). Jeśli zaistnieje konieczność (tzn. wielkość absorpcji przekracza 1), należy próbkę kwasu nukleinowego rozcieńczyć (najlepiej wodą), a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jego stężenia. Znając wartość absorpcji (A) obliczyć czystość i stężenie badanego kwasu nukleinowego.

WYKAZ WYBRANYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH

Aceton – wykorzystywany do wytrącania białka z roztworu oraz przepłukiwania osadów

białek

APS – nadsiarczan amonowy (ang. *Ammonium Persulphate*)

inicjator polimeryzacji akrylamidu i N,N'-metylenobisakrylamidu

β-MET – β-merkaptioetanol (ang. *β-Mercaptoethanol*)

substancja redukująca, m. in. mostki dwusiarczkowe w białkach

Błękit bromofenolowy – barwnik stosowany w buforach do próbek DNA, RNA i białek

poddawanych elektroforezie żelowej

Bromek etydyny – barwnik wykorzystywany do barwienia kwasów nukleinowych

po elektroforezie żelowej, silny mutagen

DEPC – pirowęglan dietylu (ang. *Diethyl Pyrocarbonate*)

inhibitor RNaz

DTT – ditiotreitól (ang. *Dithiothreitol*)

substancja redukująca, m. in. mostki dwusiarczkowe w białkach

EDTA – kwas etylenodwuaminocteroctowy (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

chelator jonów dwuwartościowych, substancja hamująca nukleazy

Fenol – stosowany do ekstrakcji kwasów nukleinowych, substancja denaturująca białka,
silnie żrąca i toksyczna

NaH₂PO₄ – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu

NaCl – substancja zapewniająca siłę jonową roztworu

PMSF – sulfofluorek fenylometanu (ang. *Phenylmethylsulphonyl Fluoride*)
nieodwracalny inhibitor proteaz serynowych

SDS – sól sodowa siarczanu dodecyłu (ang. *Sodium Dodecyl Sulphate*)
anionowy detergent, upłynniający wszystkie błony komórkowe i denaturujący białka,
nadający białkom ujemny ładunek wypadkowy

TAE – bufor do elektroforezy DNA/RNA (ang. *Tris- Acetate-EDTA*)

TCA – kwas tróchlorooctowy (ang. *Trichloroacetic Acid*)
silny kwas, stosowany do wytrącania białka z roztworu

TEMED – N,N,N',N'-czterometyletylenodiamina
(ang. *N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine*)
katalizator polimeryzacji akrylamidu i N,N'-metylenobisakrylamidu

Tris – trójhdroksymetyloaminometan; 2-amino-2(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
(w formie Tris-HCl, Tris-octan, Tris-glicyna) – substancja buforująca,
utrzymuje pH roztworu w zakresie 7-9

Triton X-100 – detergent używany do lizy błon komórkowych.