

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



**MECHANIZMY DZIAŁANIA WYBRANYCH**  
**GRUP LEKÓW**

**ćwiczenia dla studentów I roku II° biotechnologii**  
**medycznej**

**LUBLIN 2016**

Wersja 1.3

## **Inhibitory translacji - wpływ na wzrost oraz syntezę białka w komórkach bakterii i drożdży**

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

Celem ćwiczenia jest przebadanie wpływu niektórych antybiotyków (chloramfenikolu, cykloheksimidu, streptomycyny, kanamycyny, higromycyny B, paromomycyny, puromycyny) na wzrost komórek oraz poziom syntezy białka *in vivo* w komórkach bakterii oraz mutantów drożdżowych pozbawionych różnych białek rybosomowych.

Chloramfenikol jest inhibitorem aktywności peptydylotransferazy w podjednostce 50S rybosomów bakteryjnych, zaś 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. Puromycyna zaś jest strukturalnym analogiem aminoacylo-tRNA i powoduje przedwczesną terminację syntezy białka zarówno w komórkach bakterii jak i eukariotów.

## **Ćwiczenie 1. Badanie wpływu antybiotyków na wzrost komórek bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae***

### **Materiały i odczynniki**

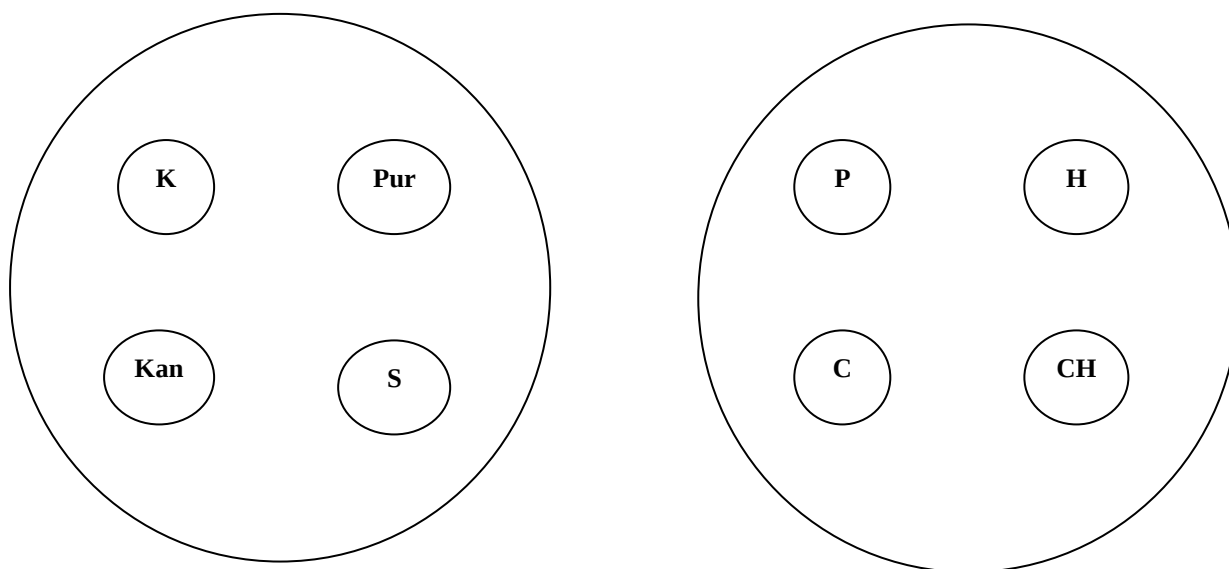
1. Całonocne hodowle drożdży *S. cerevisiae* – po 10 ml  
(dwa szczepy - W303 i  $\Delta$ L12)
2. Całonocne hodowle bakterii *E. coli* – po 10 ml  
(dwa szczepy wskazane przez prowadzącego ćwiczenia)
3. Podłoże YPD oraz YPD z 2% agarem
4. Podłoże LB oraz LB z 1,5% agarem
5. Roztwór higromycyny B (15 mg/ml w  $H_2O$ )
6. Roztwór paromomycyny (250 mg/ml w  $H_2O$ )
7. Roztwór cykloheksimidu (0,25 mg/ml w  $H_2O$ )
8. Roztwór streptomycyny (1 mg/ml w  $H_2O$ )
9. Roztwór kanamycyny (3 mg/ml w  $H_2O$ )
10. Roztwór chloramfenikolu (3 mg/ml w 96% etanolu)
11. Roztwór puromycyny (10 mg/ml w  $H_2O$ )
12. Jałowe płytki Petriego
13. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i końcówki do pipet
14. Jałowe krążki bibuły Whatman 3MM o średnicy 6 mm i pęsety.
15. Jałowe patyczki do rozprowadzania hodowli na płytkach Petriego.

### **Wykonanie ćwiczenia**

#### **Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych**

1. Na cztery jałowe płytki Petriego wylać po 20 ml podłoża YPD z agarem i pozostawić do zastygnięcia.
2. Zmierzyć gęstość optyczną wskazanych całonocnych hodowli drożdży przy długości fali 600 nm ( $OD_{600}$ ). 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. Znajac gęstość optyczną hodowli drożdży przygotować po 1 ml obu hodowli drożdżowych rozcieńczonych pożywką YPD do  $OD_{600} = 0,2$ .

3. Rozprowadzić po 200  $\mu$ l tak rozcieńczonych hodowli na przygotowane wcześniej płytki Petriego ze stałym podłożem YPD (dwie płytki Petriego na jeden szczep drożdżowy).
4. Po 10 min. na płytki nanieść po cztery jałowe krążki bibuły Whatman 3MM i nakropić na nie po 10  $\mu$ l roztworów paromomycyny (P), higromycyny B (H) i cykloheksimidu (CH), chloramfenikolu (C), streptomycyny (S), kanamycyny (Kan), puromycyny (Pur) i wody ( K-kontrola ) wg poniższego schematu. Po dwóch dniach inkubacji w temperaturze 30<sup>0</sup>C zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu komórek drożdży wokół krążków bibuły nasączonych roztworami antybiotyków.
5. Identyczne doświadczenie wykonać z bakteriami *E. coli*, stosując podłoże LB i zachowując temperaturę inkubacji 37<sup>0</sup>C.



### Interpretacja wyników

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

## Ćwiczenie 2. Badanie wpływu antybiotyków na poziom syntezy białka *in vivo* w komórkach bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae*

### Materialy i odczynniki

1. 18-godzinna hodowla bakterii *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) w podłożu M9 (20 ml)
2. 18-godzinna hodowla drożdży *S. cerevisiae* (W303) w podłożu SD (20 ml)
3. Podłoże M9 i SD
4. Chloramfenikol (10 mg/ml w 96% etanolu)
5. Cykloheksimid (10 mg/ml w H<sub>2</sub>O)
6. Puromycyna (10 mg/ml w H<sub>2</sub>O)
7. [<sup>35</sup>S]-metionina (1 mCi – 100  $\mu$ l)
8. Filtry z bibuły szklanej.
9. TCA - 50% i 5%
10. Płyn scyntylacyjny
11. Jałowe probówki typu Falcon
12. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i końcówki do pipet
13. Termoblok, dwie łaźnie wodne, pęsety.
14. Jałowe kolby Erlenmayera o poj. 50 ml – 8 szt. na grupę.

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować dwie łaźnie wodne: jedną o temp. 30°C, a drugą o temp. 37°C oraz blok grzejny o temp. 80°C

### Wykonanie ćwiczenia

6. Zmierzyć gęstość optyczną całonocnej hodowli drożdży przy długości fali 600 nm (OD<sub>600</sub>). Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (pożywka SD). Jeśli zaistnieje konieczność, (tzn. wielkość OD przekracza 1), należy próbkę hodowli rozcieńczyć, a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jej gęstości. Znajac gęstość optyczną hodowli drożdży, przygotować 50 ml hodowli rozcieńczonej pożywką SD, do OD<sub>600</sub> = 0,4.
7. Tak przygotowaną hodowlę rozlać, po 10 ml, do czterech kolb Erlenmayera o poj. 50 ml. Następnie do jednej z kolb hodowli dodać 200  $\mu$ g cykloheksimidu, do drugiej 200  $\mu$ g puromycyny, do trzeciej 200  $\mu$ g chloramfenikolu, a czwartą pozostawić jako

kontrolę. Zawartość kolb dokładnie wymieszać i inkubować w temp. 30°C przez 15 min.

8. Do wszystkich kolb dodać znakowaną metioninę w ilości 1μCi/ml i wymieszać. Bezpośrednio po dodaniu metioniny, z kolb pobrać po 1 ml hodowli i przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml zawierającej 0,2 ml zimnego, 50% TCA (czas 0). Identyczne próbki hodowli pobierać po 15, 30 i 45 min. inkubacji.
9. Po dodaniu TCA probówki inkubować 10 min. w 4°C, a następnie ogrzewać przez 20 min. w bloku grzejmym w temp. 80°C.
10. Zawartość probówek przesączyć na filtrach z bibuły szklanej, przemywając je - trzy razy po 1 ml – 5% roztworem TCA, po czym wysuszyć pod lampą.
11. Suche krążki umieścić w naczynkach scyntylacyjnych zawierających po 2 ml płynu scyntylacyjnego i liczyć radioaktywne piętno pochodzące od wbudowanej do białek [<sup>35</sup>S]-metioniny przy użyciu licznika scyntylacyjnego.
12. Identyczne doświadczenie wykonać z bakteriami *E. coli*, stosując podłoże M9 oraz zachowując temperaturę inkubacji 37°C.

### Interpretacja wyników

Porównać poziom inkorporacji [<sup>35</sup>S]-metioniny 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 [<sup>35</sup>S]-metioniny (w imp/min.)