

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



ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

**dla studentów II roku biologii medycznej
i bioanalitik**

LUBLIN 2019

Wersja 1.4

Spis treści:

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

Izolacja genomowego DNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Izolacja kwasów nukleinowych jest pierwszym etapem wielu procedur stosowanych w inżynierii genetycznej oraz diagnostyce molekularnej. Celem metody jest uzyskanie materiału o wysokiej czystości, czyli wolnego od białek i polisacharydów, mogących negatywnie wpływać na dalsze analizy. Istotne jest także, aby izolowany kwas nukleinowy nie uległ 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-ru 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 μ l 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 μ l otrzymanego roztworu genomowego DNA i 5 μ l buforu próbkowego do DNA. Preparat otrzymanego DNA przechowywać w temp. – 70°C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i odmrażania próbek DNA.

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 agarozowym 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 agarozowym.

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

Temperatura rozdzielu:

Temperatura w jakiej dokonuje się rozdzielu 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 rozdzielu 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. Z kolei w przypadku stosowania buforu o wysokiej sile jonowej wydzielana jest duża ilość ciepła, które może spowodować roztopienie agarozy i denaturację DNA. Najpowszechniej stosowany jest bufor TAE.

Materiały i odczynniki

1. Bufor próbkowy do elektroforezy DNA:

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

3. Bufor TAE 50 x stężony:

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

4. Agaroz

5. Bromek etydyny 10 mg/ml

6. Markery do elektroforezy kwasów nukleinowych

7. Zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych

Wykonanie ćwiczenia**Uwaga! Pracę z bromkiem etydyny wykonywać w rękawicach ochronnych.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

P1A	1	MSTESALS	YA	ALILADSEIE	ISSEKLLT	LT	NAANVPVENI	WADIFAKALD
P1B	1	MSDSIIISFAA	FILADAGLEI	TSDNLLTITK	AAGANVDNVW	ADVYAKALEG		
P1A	51	GQNLKD	LLVN	FSAGAA	PAG	VAGGVAGGEA	GEAEAEKEEEE	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/ μ l
4. Bufor dla polimerazy *Taq* (firmowy)
5. 2 mM mieszanina deoksynukleotydów (dNTP)
6. 25 mM $MgCl_2$ (firmowy)
7. Jałowa dejonizowana woda
8. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 0,5 ml, cienkościenne probówki do reakcji PCR o poj. 0,2 ml oraz końcówki do pipet
9. Odczynniki i zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych

Wykonanie ćwiczenia

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

Interpretacja wyników

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

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

Zdolność precyzyjnej translacji mRNA na białko jest jedną z podstawowych cech życia na Ziemi. Chociaż 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, higromycyny B, paromomycyny, puromycyny, streptomycyny, kanamycyny) na wzrost komórek 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 eukariontów.

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>

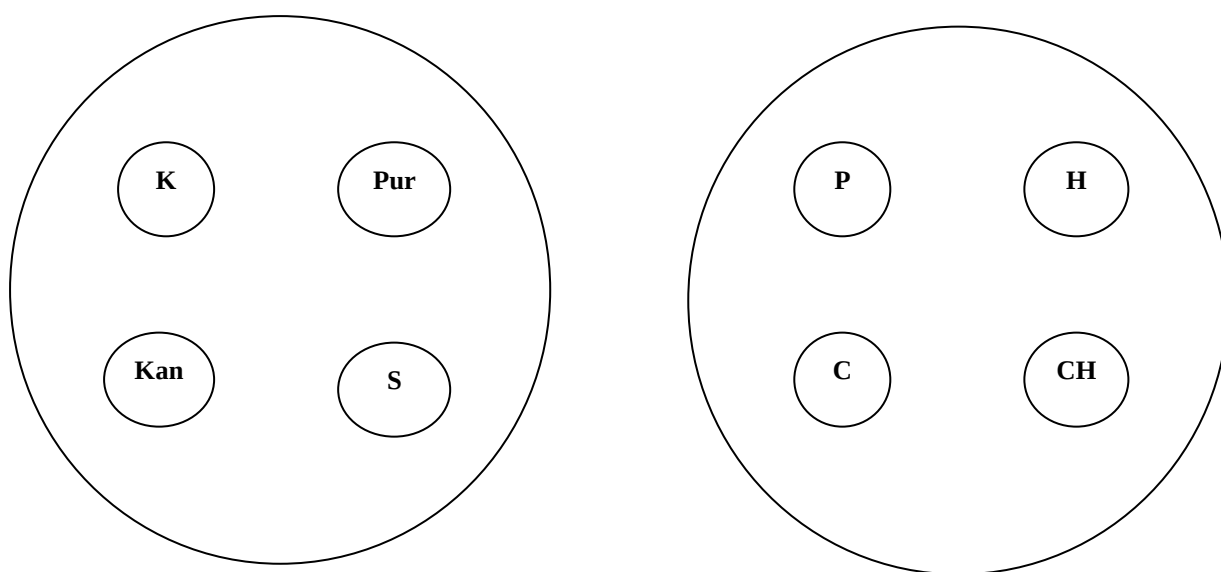
W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materialy i odczynniki

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

Wykonanie ćwiczenia**Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać z zachowaniem warunków jałowych**

1. Na cztery jałowe płytki Petriego wylać po 20 ml podłoża YPD z agarem i pozostawić do zastygnięcia.
2. Zmierzyć gęstość optyczną wskazanych całonocnych hodowli drożdży przy długości fali 600 nm (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. Znając gęstość optyczną hodowli drożdży przygotować po 1 ml obu hodowli drożdżowych rozcieńczonych pożywką YPD do $OD_{600} = 0,4$.
3. Rozprowadzić po 200 μ 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 μ 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°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°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).

Elektroforeza 2D jako narzędzie w diagnostyce medycznej

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

występujących w badanej próbce białkowej w bardzo niskich stężeniach. Jest to o tyle poważne ograniczenie, gdyż wiele białek regulatorowych, sygnałowych czy czynników transkrypcji, ważnych z punktu widzenia diagnostyki i prognozy chorób, występuje w niskich stężeniach. Najprostszym sposobem na wyeliminowanie tych ograniczeń jest wstępne frakcjonowanie badanej próby. Kolejnym problemem jest uzyskanie odpowiedniej powtarzalności między rozdzielanymi tą samą próbką białkową na kilku żelach, co utrudnia precyzyjną komputerową analizę uzyskanych obrazów.

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

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

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”.

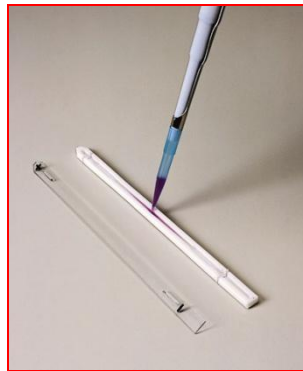
Materialy i odczynniki

1. Hodowla komórek nowotworowych i prawidłowych w oddzielnych szalkach Petriego o gęstości komórek ok. 80% (dwie szalki z komórkami jednego typu na zespół studentów)
2. Bufor PBS
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄, pH 7,5
3. 9 M mocznik
4. 1 M DTT
5. Bufor do IEF (komercyjny IPG Buffer 3-10
6. Bufor do rehydratacji (2 x stężony)– przechowywać w -20°C w porcjach po 100 µl
 - 9 M mocznik
 - 6 % CHAPS
 - 80 mM Tris base
 - 100 mM DTT – dodać bezpośrednio przed użyciem
 - 1 % IPG bufor - dodać bezpośrednio przed użyciem
7. Gotowe paski z żelem do IEF o zakresie pH 3-10, o długości 11 cm
8. Odczynnik Bradford
9. Zdrapywacz do komórek
10. Bufor do równoważenia pasków przed SDS/PAGE:
 - 6 M mocznik
 - 75 mM Tris-HCl pH 8,8
 - 30 % glicerol
 - 2 % SDS
 - 0,002 % błękit bromofenolowy
 - 20 mM DTT – dodać bezpośrednio przed użyciem
11. Zestaw odczynników i sprzętu do elektroforezy SDS/PAGE
12. Jałowe próbówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet.
13. Naczynie do równoważenia pasków z żelem.
14. Vortex
15. Pęseta

Wykonanie ćwiczenia (dzień pierwszy)

1. Płytkę Petriego z komórkami o gęstości ok. 80% przenieść na lód i ściągnąć pipetą płyn hodowlany.
2. Przepłukać komórki na płytce za pomocą 5 ml oziębionego buforu PBS.
3. Po ściągnięciu pipetą buforu PBS zeszkrobać komórki fibroblastów z płytek za pomocą specjalnego zdrapywacza do komórek. Zawiesinę komórek spłukać z płytki 0,8 ml oziębionego PBS i przenieść do próbówki Eppendorfa o poj. 2 ml.
4. Powtórnie popłukać płytkę Petriego 0,8 ml oziębionego PBS i połączyć zawiesinę z zawiesiną otrzymaną w punkcie 3.
5. Komórki odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 5 min w 4°C. Supernatant odrzucić za pomocą pipety, a osad zawiesić w 100 µl 9 M mocznika.
6. Zawiesinę mieszać poprzez vorteksowanie 5 razy po 30 sek. z 2-minutowymi przerwami.
7. Odwirować zawiesinę przy prędkości 10000 rpm przez 10 min. w 10°C.
8. Supernatant (lizat komórkowy) przenieść do nowej próbówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml. a osad wyrzucić.
9. Oznaczyć stężenie białka w otrzymanym lizacie komórkowym metodą Bradford (patrz strona 25).
[Do dwóch próbek zawierających po 0,8 ml wody, odmierzyć 2 – 10 µl badanego roztworu białka (zgodnie z zaleceniami prowadzącego ćwiczenia). Do obu próbek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradford* i dokładnie wymieszać. Równocześnie przygotować próbkę kontrolną nie zawierającą białka. Po upływie 5 min, zmierzyć absorpcję w kolorymetrze przy długości fali 595 nm. Stężenie białka odczytać z przygotowanej krzywej wzorcowej.]
10. Przygotować bufor do rehydratacji: do 100 µl gotowego buforu dodać 10 µl roztworu 1M DTT oraz 1µl IPG buforu
11. Objętość lizatu zawierającą 100 µg białka dodać do przygotowanego buforu do rehydratacji tak, aby otrzymać końcową objętość 200 µl. *(Przykład: Jeśli w otrzymanym lizacie komórkowym stężenie białka wynosi 4,6 µg/µl, wówczas 100 µg białka znajduje się w 21,7 µl lizatu komórkowego. Aby przygotować próbkę do rozdzielu metodą elektroforezy 2D należy zmieszać w nowej próbówce Eppendorfa o poj. 1,5 ml - 111 µl buforu do rehydratacji, 21,7 µl lizatu komórkowego i 67,3 µl 9 M mocznika, aby otrzymać próbkę w końcowej objętości 200 µl)*

12. Wymieszać dokładnie roztwór białka z buforem do rehydratacji poprzez vorteksowanie, a następnie krótko odwirować próbkę, aby całość roztworu znalazła się na dnie probówki.
13. Za pomocą pipety nanieść całość próbki (200 μ l) do specjalnego naczynia do rozdziału IEF (*ang. strip holder*) jak pokazano na rysunku poniżej. Rozprowadzić roztwór powoli pomiędzy elektrodami. Usunąć duże bąbelki powietrza.



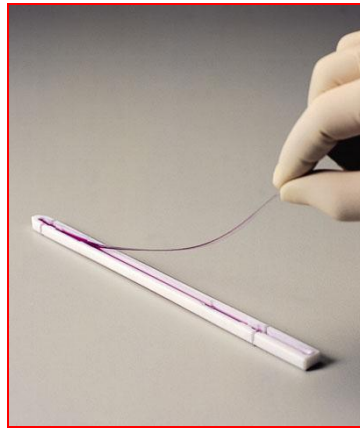
Fot. GE Healthcare

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



Fot. GE Healthcare

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



Fot. GE Healthcare

16. Pokryć pasek żelowy 0,8 ml oleju mineralnego (ang. *cover fluid*) aby zminimalizować parowanie i w ten sposób zapobiec krystalizacji mocznika. Nanosić olej kroplami najpierw od jednego końca naczynia aż połowa paska z żelem zostanie przykryta, a następnie od drugiego końca naczynia aż cały pasek z żelem zostanie przykryty olejem.
17. Przykryć naczynie pokrywką i umieścić w urządzeniu (Ettan IPGphor III, GE Healthcare) do rozdziału IEF.



Fot. GE Healthcare

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

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

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

Wykonanie ćwiczenia (dzień drugi)

ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

Żel poliakrylamidowy posiada następujące cechy: jest bezbarwny, pozbawiony ładunków, odznacza się dużą wytrzymałością mechaniczną, łatwy w przygotowaniu i formowaniu w odpowiednich naczyniach. Żel poliakrylamidowy to łańcuchy akrylamidu ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) 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 nadsiarczuanu amonu (APS) oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE) umożliwia rozdział cząsteczek białkowych różniących się wielkością i ładunkiem elektrycznym. Rozdział ten można prowadzić w warunkach niedenaturujących oraz w warunkach denaturujących. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących określana skrótem SDS-PAGE odbywa się w obecności soli sodowej siarczuanu dodecyłu (SDS), który jest 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 denaturujących (SDS-PAGE)

Materiały i odczynniki

1. 30% roztwór akrylamidu + 0,8% roztwór bisakrylamidu
2. 1,5M roztwór Tris - HCl pH 8,8
3. 0,5M roztwór Tris - HCl pH 6,8
4. 10% roztwór SDS
5. 10% roztwór APS
6. TEMED
7. Bufor próbkowy (4x stężony) :

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

8. Bufor elektrodowy:

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

9. Wzorce białkowe
10. Zestaw do elektroforezy białek metodą SDS/PAGE

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

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

Uwaga! Pracę z akrylamidem wykonywać w rękawicach ochronnych.

Roztwory dodawać wg przedstawionej kolejności.

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

Żel separujący

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

Żel zagęszczający

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

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

2. Umieścić pasek z żelem w specjalnym naczyniu do równoważenia pasków z żelem i dodać 2,5 ml buforu do równoważenia pasków zawierającego DTT (**DTT dodajemy bezpośrednio przed użyciem**). Mieszać naczynie na kołysce laboratoryjnej przez 15 min.
3. Usunąć z naczynia bufor po czym dodać kolejną porcję 2,5 ml buforu do równoważenia z DTT i mieszać dalsze 15 min.
4. Zrównoważony pasek z żelem ostrożnie wsunąć do studzienki w żelu zagęszczającym, zalanej buforem elektrodowym. Płytkę ze spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat napęlić buforem elektrodowym. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Wyłączyć zasilacz, wyjąć płytkę z żelem i wybarwić żel za pomocą barwnika *Coomassie Brilliant Blue*.

Literatura

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

ILOŚCIOWE OZNACZANIE 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.

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 srebrowej 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:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70 g
85% H_3PO_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 H_2O

Nr 5. 0,1% roztwór AgNO_3 : 50 mg AgNO_3 w 50 ml H_2O

Nr 6. 3% roztwór Na_2CO_3 + 0,018% HCHO : 7,5 g Na_2CO_3

125 μl 37% HCHO w 250 ml H_2O

Nr 7. 20% kwas cytrynowy: 5 g kw. cytrynowego w 25 ml H_2O

Uwaga! Odczynniki nr 4, 5, 6 przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Barwienie wykonywać w kuwecie przeznaczonych wyłącznie do tego celu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie utrzymywać przez 1 godz. w 50 ml 10% TCA .
2. Płukać 3 x 5 min w 100 ml wody destylowanej.
3. Barwić żel przez 1 godz. 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 0,2 M 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 50 ml 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 (40 ml metanolu, 13,5 ml 37% formaldehydu, 46,5 ml H₂O)
2. Roztwór B - 0,02% Na₂S₂O₃ (0,02 g Na₂S₂O₃ w 100 ml H₂O)
3. Roztwór C - 0,1% AgNO₃ (100 mg AgNO₃ w 100 ml H₂O)
4. Roztwór D (3 g Na₂CO₃ + 50 µl 37% formaldehydu + 2 ml 0,02% Na₂S₂O₃ – dopełnić wodą do 100 ml)
5. Roztwór E – 20% kwas cytrynowy (10 g kw. cytrynowego w 50 ml H₂O)

Uwaga! Roztwory A, B, C, D przygotować bezpośrednio przed użyciem. Barwienie wykonywać w naczyniu przeznaczonym wyłącznie do tego celu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie utrzymywać przez 10 min. w 100 ml roztworu A.
2. Płukać 2 x 5 min. w 100 ml wody dejonizowanej.
3. Dodać 100 ml roztworu B i mieszać przez 2 min.
4. Płukać 2 x 20 sek. w 100 ml wody dejonizowanej.
5. Barwić w 100 ml roztworu C, stale mieszając przez 10 min.
6. Płukać 3 x 15 sek. w 100 ml wody dejonizowanej.
7. Płukać żel 20 sek. w 10 ml roztworu D.
8. Dodać 90 ml roztworu D (wywołująca 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 50 ml roztworu E na 10 min.
11. Przepłukać żel wodą i zeskanować lub wysuszyć.

Immunologiczne metody identyfikacji białek o znanej sekwencji

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

Immunodetekcja białek metodą immunoblotingu

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

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

Transfer

Aby przeprowadzić transfer białek na membranę, należy przygotować „kanapkę” złożoną z żelu, membrany i bibuły Whatman. W przypadku transferu mokrego, „kanapka” ułożona jest pionowo pomiędzy dwiema elektrodami, a całość umieszczana jest w aparacie wypełnionym buforem. Transfer mokry stosuje się zwłaszcza w przypadku białek dużych (>100 kDa), hydrofobowych lub trudno rozpuszczalnych ze względu na możliwość prowadzenia go nawet przez 24 godziny, bez ryzyka wyparowania buforu. Należy wówczas zapewnić chłodzenie, aby utrzymać temperaturę w granicach 10 – 30°C. Transfer mokry przeprowadza się przy stałym napięciu prądu, zwykle 20 – 30 V.

W przypadku transferu półsuchego „kanapka” ułożona jest poziomo między elektrodami. Żel i membrana umieszczone są pomiędzy bibułami Whatman nasączonymi buforem. Transfer ten prowadzi się przy stałym natężeniu prądu, wynoszącym zwykle 0,8 – 1,5 mA/cm² membrany.

Transfer białek z żelu można przeprowadzić na membrany nitrocelulozowe lub membrany z polifluorku winylidenu (PVDF). Wielkość porów w obu typach membranach

waha się od 0,1 μm do 0,45 μm . Membrany nitrocelulozowe są tańsze, wiążą 80-200 μg białka na cm^2 . Membrany te od razu nasączy się buforem do transferu, bez uprzedniego zanurzania ich w metanolu. Membrany PVDF wiążą 150-200 μg białka na cm^2 i mają dużo większą wytrzymałość mechaniczną niż membrany nitrocelulozowe. Należy pamiętać o wcześniejszym zanurzeniu ich w metanolu i dopiero później w buforze do transferu.

Blokowanie membran

Po transferze wolne miejsca wiązania białek na membranie są blokowane, aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciał do membrany. Do blokowania membran używa się odtłuszczonego mleka lub albuminy z surowicy bydlęcej.

Wiązanie przeciwciał

Badane białka identyfikuje się przy użyciu wyznakowanych przeciwciał pierwszorzędowych (swoistych dla badanych białek), lub niewyznakowanych przeciwciał pierwszorzędowych i wyznakowanych przeciwciał drugorzędowych (specyficznych dla pierwszorzędowych). Następnie przeprowadza się detekcję przeciwciał związanych z badanymi białkami, której sposób zależy od rodzaju znacznika, jaki dołączony jest do przeciwciał.

Detekcja

Najczęściej dołączanymi do przeciwciał znacznikami są enzymy: alkaliczna fosfataza i peroksydaza chrzanowa. Wizualizacja tych znaczników może być przeprowadzona kolorymetrycznie (w miejscu wiązania przeciwciał do białka na membranie powstaje barwny produkt) lub chemiluminescencyjnie (enzym przeprowadza reakcję z wytworzeniem światła, odczytu ilości emitowanego światła można dokonać na dwa sposoby, stosując urządzenie do detekcji chemiluminescencji lub za pomocą kliszy fotograficznej).

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

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. Membrana nitrocelulozowa (paski 1,5 cm x 1,0 cm)
2. Roztwory badanych białek
3. Przeciwciała pierwszorzędowe (poliklonalna surowica skierowana przeciwko drożdżowym białkom P)
4. Drugorzędowe przeciwciała sprzężone z alkaliczną fosfatazą
5. Roztwór blokujący (10 % roztwór mleka odtłuszczonego w PBS)
6. Bufor PBS
7. Bufor PBS-T (PBS z 0,1 % Tween 20)
8. Bufor AP
9. NBT (18 mg NBT rozpuścić w 1400 µl DMF i 600 µl wody). Przechowywać w -20°C.
10. BCiP (8 mg BCiP rozpuścić w 2 ml DMF). Przechowywać w -20°C.
11. 6-dołkowe płytki testowe.
12. Probówki Falcona o pojemności 15 ml i 50 ml.
13. Pęsety.
14. Rękawiczki nitrylowe.

Wykonanie ćwiczenia

1. Na 6 pasków membrany nitrocelulozowej ((1,5 cm x 1,0 cm), umieszczonych w 6-dołkowej płytce testowej nanieść po 2 µl badanych roztworów białek (**uwaga: nie dotykać membrany palcami, używać rękawiczek i pęsety**).
2. Poczekać aż naniesione na nitrocelulozę roztwory białka wyschną.
3. Do każdego dołka płytki z paskiem membrany nitrocelulozowej dodać po 2 ml roztworu blokującego i zostawić na kołysce laboratoryjnej w temp. pokojowej na 15 min.

4. Wylać roztwór blokujący i dodać do każdego dołka z membraną po 2 ml przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych kolejno 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 i 1:6400 w buforze PBS i pozostawić przez 20 min. na kołysce w temp. pokojowej.
5. Wylać roztwór przeciwciał i przepłukać membrany roztworem PBST: 4 razy po 2 ml/dołek przez 1 min.
6. Do każdego dołka z membraną dodać po 2 ml przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:10000 w 15 ml PBST i pozostawić na kołysce w temperaturze pokojowej na 20 min.
7. Wylać roztwór przeciwciał i przepłukać membrany roztworem PBST: 4 razy po 2 ml/dołek przez 1 min.
8. Przepłukać membrany buforem AP: 2 razy po 2 ml/dołek przez 1 min.
9. Przeprowadzić detekcję białek na membranie. W tym celu do probówki Falcona dodać 10,5 ml buforu AP a następnie dodać jednocześnie dwa przygotowane wcześniej barwniki (NBT i BCiP) . Wymieszać zawartość probówki Falcona i dodać po 2 ml roztworu barwników do każdego dołka z paskiem membrany. Pozostawić do pojawienia się prążków. Reakcję barwienia przerwać poprzez płukanie wodą dejonizowaną, po czym membranę wysuszyć na powietrzu.