

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



ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

dla studentów III roku mikrobiologii

LUBLIN 2019

Wersja 1.4

Spis treści:

1. Izolacja jąder komórkowych i histonów
2. Analiza składu białkowego chromatyny
3. Trawienie DNA chromatyny nukleazą ze *Staphylococcus aureus*
4. Elektroforetyczna analiza DNA po trawieniu nukleazą ze *Staphylococcus aureus*
5. Badanie aktywności enzymatycznej w żelu poliakrylamidowym na przykładzie inwertazy (2 dni)
6. Otrzymywanie rybosomów i frakcji cytoplazmatycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
7. Izolacja kwaśnych białek rybosomowych z drożdży
8. Analiza otrzymanych białek metodą SDS/PAGE i immunoblotingu (2 dni)

Uwaga!

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

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

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

Izolacja jąder komórkowych i histonów

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

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

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

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

Materialy i odczynniki

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

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

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Jeśli nie zaznaczono inaczej, poniższe czynności należy wykonywać w temp. +4°C

Otrzymywanie jąder z fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa

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

Izolacja białek jądrowych

1. Do probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml przenieść 500 μ l zawiesiny jąder i wirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
2. Supernatant odrzucić a osad jąder zawiesić w 60 μ l buforu próbkowego do elektroforezy SDS-PAGE (1x stężony).
3. Próbkę dokładnie wymieszać i inkubować w temp. 95°C przez 5 min. W wyniku uwolnienia DNA z jąder zawiesina przyjmuje galaretowatą konsystencję.
4. Po inkubacji próbkę odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 5 min. Supernatant zawierający białka jądrowe przenieść do nowej probówki Eppendorfa i zamrozić.

Izolacja histonów z użyciem 0,25 M HCl

1. Do probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml przenieść 500 μ l zawiesiny jąder i wirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
2. Supernatant odrzucić, a do osadu jąder dodać 50 μ l 0,25 M HCl i dokładnie wymieszać.
3. Próbkę pozostawić w temp. pokojowej na 25 min. (ekstrakcja histonów), a następnie odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
4. Supernatant zawierający histony przenieść do nowej probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml.
5. Do osadu dodać ponownie 50 μ l 0,25 M HCl, dokładnie wymieszać i pozostawić na 25 min. w temp. pokojowej (ponowna ekstrakcja w celu zwiększenia wydajności).
6. Próbkę odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
7. Uzyskane supernatanty, zawierające histony, połączyć.
8. Wytrącać histony z supernatantu przez dodanie 8 objętości (0,8 ml) oziębionego acetonu. Całość pozostawić do kolejnych ćwiczeń (minimum na 24 godziny) w temp. -20°C.

Analiza składu białkowego chromatyny

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

Materiały i odczynniki

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

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować blok grzejny o temp. 90°C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4°C

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotować 13,8 % żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń.
2. Próbkę z wytrąconymi histonami odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w 4°C w celu otrzymania osadu białek histonowych. Następnie osad przemyć 1 ml oziębionego acetonu i wysuszyć na powietrzu. Osad białek histonowych zawiesić w 30 µl buforu próbkowego do elektroforezy SDS-PAGE (1x stężony).
3. Próbkę zawierającą wszystkie białka jądrowe, wyizolowane histony, białka cytoplazmatyczne oraz wzorce białkowe zawieszone w buforze próbkowym do elektroforezy SDS-PAGE ogrzewać przez 3 min. w temp. 90°C. Bezpośrednio po ogrzaniu nanosić na żel po 30 µl przygotowanych próbek. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V, tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Po rozdziale białka wybarwić błękitem *Coomassie* (patrz załącznik do ćwiczeń).

Interpretacja wyników

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

Trawienie DNA chromatyny nukleazą ze *Staphylococcus aureus*

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

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

Materialy i odczynniki

1. Hodowla komórkowa fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa o gęstości komórek ok. 90% (trzy płytki Petriego na jeden zespół studentów)
2. Bufor PBS
3. Bufor do izolacji jąder
4. Zdrapywacz do komórek
5. Homogenizator szklano-teflonowy o poj. 2 ml
6. Bufor do cięcia MN-azą:
 - 20 mM Tris-HCl, pH 8,8
 - 5 mM CaCl_2
7. Roztwór MN-azy w H_2O (300 U/ μl). Bezpośrednio przed ćwiczeniami rozcieńczyć MN-azę 240-krotnie (1 μl roztworu MN-azy dodać do 239 μl H_2O). Uzyskuje się końcowe stężenie 1,25 U/ μl
8. 100 mM EDTA
9. 10% SDS
10. Pronaza E – roztwór w H_2O o stężeniu 25 mg/ml

11. Fenol, pH 7,5- 8,0
12. Chloroform
13. 5 M NaCl
14. 96% etanol (oziębiony)
15. 70% etanol (oziębiony)
16. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet.

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

Uwaga! Jeśli nie zaznaczono inaczej, poniższe czynności należy wykonywać w temp. +4°C

Otrzymywanie jąder z fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa

1. Trzy płytki Petriego z komórkami fibroblastów mysich o gęstości ok. 90% przenieść na lód i ściągnąć pipetą płyn hodowlany.
2. Przepłukać komórki na każdej płytce 5 ml oziębionego PBS.
3. Po usunięciu PBSu, zeszkrobać komórki fibroblastów z płytek za pomocą specjalnego zdrapywacza do komórek. Zawiesinę komórek spłukać ze wszystkich płytek 3 ml oziębionego PBS i przenieść do dwóch probówek Eppendorfa o poj. 2 ml.
4. Komórki odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 5 min. Supernatant odrzucić, a osad z obu probówek zawiesić łącznie w 2 ml buforu do izolacji jąder i inkubować 20 min. w lodzie.
5. Przenieść zawiesinę komórek do homogenizatora szklano-teflonowego i dezintegrować wykonując 40 ruchów teflonowym tłoczkiem (stopień dezintegracji można zweryfikować przy użyciu mikroskopu świetlnego).
6. Uzyskany dezintegrat komórek przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 2 ml i odwirować przy prędkości 2000 rpm przez 10 min.
7. Po odwirowaniu usunąć z probówki supernatant przy pomocy pipety, a do osadu jąder dodać 1 ml buforu do cięcia MN-azą i dokładnie wymieszać (za pomocą pipety).

Trawienie DNA chromatyny MN-azą

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

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

Elektroforetyczna analiza DNA po trawieniu nukleazą ze *Staphylococcus aureus*

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

Materialy i odczynniki

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

Wykonanie ćwiczenia

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

Interpretacja wyników

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

Badanie aktywności enzymatycznej w żelu poliakrylamidowym na przykładzie inwertazy

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

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

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

Materiały i odczynniki

1. 20-godzinna hodowla drożdży *S. cerevisiae*, szczep W303 (50 ml na zespół studentów)
2. $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ cz. d. a. w postaci stałej
3. 10 mM bufor fosforanowy pH 7,0
4. 10 mM bufor fosforanowy pH 7,0 z dodatkiem 30% glicerolu

5. 10 mM bufor fosforanowy pH 5,8
6. 0,1 M r-r sacharozy w 10 mM buforze fosforanowym pH 5,8 (przygotować bezpośrednio przed użyciem)
7. Chlorek tetrazolu w postaci stałej (chronić przed światłem!!!)
8. 1M NaOH
9. Inwertaza - preparat handlowy (1 mg/ml w 10 mM buforze fosforanowym pH 5,8) – przygotować w dniu poprzedzającym ćwiczenia, przechowywać w temp. 4°C.
10. Celulozowe „węże” do dializy
11. Papierki wskaźnikowe pH 5,4 – 7,0
12. 10% roztwór kwasu octowego
13. Odczynniki i zestaw do elektroforezy białek SDS/PAGE

Wykonanie ćwiczenia

Wysalanie i dializa białek z płynu pohodowlanego

1. Po ok. 20 godzinach hodowli, gdy OD₆₀₀ równa się ok. 9-10 (faza stacjonarna) odwirować komórki przy 3000 rpm przez 10 min.
2. Płyn pohodowlany zlać do cylindra (źródło inwertazy) a osad komórek odrzucić.
3. Zmierzyć objętość płynu pohodowlanego, przelać go do zlewki i pozostawić w lodzie na mieszadle magnetycznym.
4. Białka wytrącać stałym siarczanem amonu przy wysyceniu 0-90% (tabela frakcjonowania siarczanem amonu – załącznik do ćwiczeń). Siarczan amonu dodawać stopniowo mieszając przez 1 godz. w temp. 4°C. Następnie zawiesinę odwirować przy 10000 rpm przez 20 min.
5. Osad wytrąconych białek rozpuścić w 200-300 µl 10 mM buforu fosforanowego, pH 7,0 i poddać dializie (przepis – załącznik do ćwiczeń) wobec 10 mM buforu fosforanowego, pH 7,0 z dodatkiem 30% glicerolu. Po zakończeniu dializy roztwór białek przechowywać w temp. -20°C.

Oznaczanie aktywności inwertazy w żelu

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

Otrzymywanie rybosomów i frakcji cytoplazmatycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Frakcjonowanie komórek to metoda rozdzielania struktur subkomórkowych polegająca na wstępnej dezintegracji oraz poddaniu homogenatu wirowaniu różnicowemu (kilkukrotnemu wirowaniu ze stopniowo wzrastającą siłą odśrodkową) albo wirowaniu w gradiencie sacharozy czy chlorku cezu (poszczególne struktury subkomórkowe osadzają się w roztworze o różnej gęstości).

Celem ćwiczenia jest izolacja mikrosomów i frakcji cytoplazmatycznej oraz oczyszczenie rybosomów z drożdży *S. cerevisiae* techniką wirowania różnicowego. Mikrosomy są pęcherzykami, powstającymi z samozasklepiających się fragmentów gładkiego lub szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. W celu uwolnienia rybosomów od błon retikulum endoplazmatycznego stosuje się bufor z dodatkiem 1% niejonowego detergentu jakim jest Triton X-100. Tak traktowane rybosomy (tzw. rybosomy surowe) zawierają zasocjowane z nimi białka cytoplazmatyczne, które można usunąć z powierzchni rybosomów za pomocą zbuforowanych roztworów o wysokim stężeniu soli.

Materialy i odczynniki

1. Osad zamrożonych komórek drożdży *S. cerevisiae*
2. Piasek do dezintegracji
3. 2 M Tris
4. 10% roztwór Tritonu X-100 w buforze A
5. Bufor A (do dezintegracji)
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 80 mM KCl
 - 12,5 mM MgCl₂
 - 0,5 mM EDTA
 - 1 mM PMSF
 - 6 mM β- MET

6. Bufor B (do zawieszania rybosomów)
 - 50% glicerol
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 80 mM KCl
 - 10 mM MgCl₂
 - 0,5 mM EDTA
 - 5 mM DTT
7. Bufor A z dodatkiem 0,5 M KCl
8. 30% sacharoza w buforze A z dodatkiem 0,5 M KCl
9. Stały siarczan amonu
10. Bufor C (do preparatyki kinaz białkowych)
 - 50 mM Tris – HCl, pH 7,5
 - 0,5 mM EDTA
 - 6 mM β- MET
 - 0,5 mM PMSF
11. Odczynnik Bradford

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Poniższe czynności należy wykonywać w temp. 4⁰C

Dezintegracja komórek drożdży i otrzymywanie ekstraktu bezkomórkowego

1. Osad zamrożonych komórek drożdżowych zważyć.
2. Komórki drożdżowe dezintegrować, ucierając je z piaskiem w moździerzu porcelanowym przez około 15 min. Piasek dodawać stopniowo w ilości wagowej 3 -krotnie większej od masy komórek. Podczas dezintegracji utrzymywać wartość pH w zakresie 7,2 – 7,5 poprzez dodawanie 2 M Trisu (niebuforowanego).
3. Uzyskany dezintegrat drożdży zawiesić w buforze A i wirować przy 3000 rpm przez 5 min. celem osadzenia piasku i resztek komórek.
4. Uzyskany supernatant wirować przy 30000 x g w ciągu 15 min. aby osadzić struktury subkomórkowe (mitochondria, jądra, ściany komórkowe).
5. Tak otrzymany ekstrakt komórkowy (tzw. frakcja S30) podzielić na dwie części. Do jednej części, przy stałym mieszaniu, dodać 10% Tritonu X-100 tak, aby jego

końcowe stężenie wynosiło 1%, po czym ekstrakt mieszać jeszcze przez 10 min. Drugą część ekstraktu przechowywać w tym czasie w temp. 4⁰C.

6. Obie części wirować przy 400000 x g przez 30 min. W wyniku wirowania otrzymuje się frakcję cytoplazmatyczną, tzw. frakcję S100 i frakcję mikrosomalną (z części nietraktowanej Tritonem X-100) oraz rybosomy surowe (z części traktowanej Tritonem X-100).
7. Osady stanowiące frakcję mikrosomalną oraz rybosomy surowe zawiesić w buforze B (za pomocą homogenizatora szklano-teflonowego) i przechowywać do kolejnych ćwiczeń w temp. -20⁰ C.
8. W supernatancie stanowiącym frakcję cytoplazmatyczną oznaczyć białko metodą Bradford. a następnie przygotować dwie próbki do elektroforezy SDS/PAGE zawierające po 25 µg białka. Gotowe próbki białkowe przechowywać do kolejnych ćwiczeń w temp. -20⁰ C.

Oczyszczanie rybosomów

1. Osad rybosomów surowych zawiesić w buforze A z dodatkiem 0,5 M KCl i mieszać w homogenizatorze szklanym przez 15 min. po czym osadzić przez wirowanie przy 100000 x g przez 1,5 godz. Czynność tę wykonać dwukrotnie.
2. Uzyskany preparat rybosomów ponownie zawiesić w buforze A z 0,5 M KCl i wirować przez 1cm warstwę zbuforowanego roztworu sacharozy (30% sacharoza w buforze A z dodatkiem 0,5 M KCl) przy 100000 x g przez 3 godz. Po osadzeniu, rybosomy zawiesić w buforze B, oznaczyć ich stężenie (przepis – patrz załącznik do ćwiczeń) i przechowywać do kolejnych ćwiczeń w temp. -20⁰ C.

Izolacja kwaśnych białek rybosomowych z drożdży

Większość białek rybosomowych stanowią małe białka o charakterze zasadowym, których punkt izoelektryczny oscyluje w pobliżu pH 8,5 lub wyższym. Duża podjednostka rybosomów zawiera jednak grupę powierzchniowych białek kwaśnych, tworzących charakterystyczną strukturę zwaną „kciukiem”, który oddziałuje z czynnikami translacyjnymi podczas syntezy białka. U bakterii kwaśne białka rybosomowe tworzą pentameryczny lub heptameryczny kompleks, złożony, odpowiednio, z dwóch lub trzech dimerów białka L12 oraz pojedynczej cząsteczki białka L10. U *Escherichia coli* białko L12 nazywane jest L7/L12. Różnica między L7 i L12 polega na potranslacyjnej acetylacji na N-końcu polipeptydu L7. Białko L7/L12 *E. coli* złożone ze 120 aminokwasów i posiada masę cząsteczkową 12,2 kDa. Eukariotyczne białka kwaśne noszą nazwę białek P, ze względu na ich fosforylacyjną modyfikację. Białka te podzielono na dwie grupy. Jedną z nich stanowią dwa małe białka P1 i P2 o masie 11 kDa i pI równym 3,0-3,5, będące funkcjonalnymi odpowiednikami bakteryjnego białka L12. U niższych eukariontów takich jak drożdże stwierdzono obecność czterech białek P1/P2. Kwaśne białka drożdży *S. cerevisiae* nazwano P1A, P1B, P2A i P2B. Ponadto u roślin zidentyfikowano dodatkowo białko P3. Drugą grupę białek P stanowi pojedyncze białko P0 o masie ok. 34 kDa, będące odpowiednikiem bakteryjnego białka L10. Na rybosomie białka P tworzą pentameryczny kompleks $P0-(P1-P2)_2$, który wiąże się, poprzez N-końcowy fragment białka P0, do wysoce konserwatywnego regionu 25S/28S rRNA, zwanego centrum GTPazowym. U *S. cerevisiae* białka z grupy P1/P2 tworzą preferencyjnie dwa heterodimery P1A-P2B i P1B-P2A w których N-końcowe fragmenty białek są odpowiedzialne za dimeryzację i interakcje z białkiem P0, zaś karboksylowe końce są wolne i oddziałują z czynnikami translacyjnymi takimi jak EF-2.

Białka z grupy P1/P2 nie są niezbędne dla aktywności translacyjnej rybosomu, natomiast białko P0 jest stabilnym białkiem rdzenia rybosomowego i jest konieczne dla jego funkcjonowania. Delecja genu dla P0 prowadzi do śmierci komórki. Wszystkie białka P charakteryzują się niezwykle konserwatywną C-kończącą domeną, zawierającą resztę seryny ulegającą fosforylacyjnej modyfikacji oraz stanowiącą antygen, przeciwko któremu skierowane są przeciwciała u ludzi cierpiących na niektóre choroby autoimmunologiczne (układowy toczeń trzewny) i infekcyjne (choroba serca Chagasa, leishmanioza).

W odróżnieniu od pozostałych składników rybosomu kwaśne białka rybosomowe, zarówno bakteryjne jak i eukariotyczne, występują w postaci wolnej w cytoplazmie.

U organizmów eukariotycznych, w przeciwieństwie do bakterii, odbywa się ponadto wymiana tych białek między rybosomem a pulą cytoplazmatyczną.

Materialy i odczynniki

1. Oczyszczone rybosomy drożdżowe o stężeniu 20 mg/ml
2. Bufor do ekstrakcji kwaśnych białek rybosomowych
 - 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 40 mM MgCl₂
 - 6 mM β- MET
 - 1 M NH₄Cl
3. 96% etanol (oziębiony)
4. Aceton (oziębiony)
5. 25 mM Tris-HCl, pH 7,5
6. Odczynnik Bradford

Wykonanie ćwiczenia

1. Kwaśne białka rybosomowe ekstrahować z 2 mg rybosomów oczyszczonych *S. cerevisiae* o stężeniu 20 mg/ml. Do zawiesiny rybosomów (1 objętość) dodać 1 objętość buforu do ekstrakcji białek kwaśnych i pozostawić na 5 min. w lodzie.
2. Dodać 1 objętość 96% etanolu (oziębionego) i pozostawić na 10 min. w lodzie.
3. Powtórzyć punkt 2.
4. Odwirować przy 10000 rpm przez 15 min. w celu osadzenia cząstek rdzeniowych rybosomów (tj. rybosomów zawierających białka, które nie zostały wyekstrahowane).
5. Supernatant zawierający kwaśne białka rybosomowe przenieść do nowej probówki Eppendorfa, dodać trzykrotną objętość oziębionego acetonu (w celu wytrącenia białek z supernatantu) i pozostawić w temp. -20⁰ C przez co najmniej 24 godz.
6. Wytrącone białka osadzić drogą wirowania przy 10000 rpm przez 15 min., po czym supernatant odrzucić, a osad kwaśnych białek rybosomowych wysuszyć na powietrzu i zawiesić w 50 µl 25 mM Trisu – HCl, pH 7,5.
7. Oznaczyć stężenie białka metodą Bradford (przepis w załączniku do ćwiczeń)

Analiza otrzymanych białek metodą SDS/PAGE i immunoblotingu

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

Po rozdziale elektroforetycznym w obecności SDS białka są zdenaturowane i wszystkie posiadają ładunek ujemny proporcjonalny do ich masy. Transfer odbywa się zatem w kierunku elektrody dodatniej. 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 cm². Membrany te od razu nasączają się buforem do transferu, bez uprzedniego zanurzania ich w metanolu. Membrany PVDF wiążą 150-200 µg białka na cm² 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).

Ćwiczenie ma na celu dokonanie analizy białek rybosomowych i cytoplazmatycznych techniką SDS-PAGE i immunoblotingu. Przeprowadzimy identyfikację immunologiczną białek P drożdży. W tym celu wykorzystamy niewyznakowane przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające drożdżowe, białka P i przeciwciała drugorzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą.

Materiały i odczynniki

1. Odczynniki i zestaw do elektroforezy SDS-PAGE (patrz załącznik do ćwiczeń).
2. Preparaty mikrosomów, rybosomów surowych, rybosomów oczyszczonych, frakcji cytoplazmatycznej oraz białek P otrzymane na poprzednich ćwiczeniach.
3. Membrana PVDF.

4. Metanol
5. Bibuła Whatman 3 MM.
6. Bufor Novablot.
7. Czerwień Ponceau.
8. PBS
9. Roztwór blokujący (10 % roztwór mleka odtłuszczonego w PBS).
10. Aparat do pół-suchego transferu białek.
11. Przeciwciała pierwszorzędowe (poliklonalna surowica skierowana przeciwko drożdżowym białkom P)
12. Drugorzędowe przeciwciała sprzężone z alkaliczną fosfatazą
13. Bufor PBS
14. Bufor PBS-T (PBS z 0,1 % Tween 20)
15. Bufor AP
16. NBT (18 mg NBT rozpuścić w 1400 μ l DMF i 600 μ l wody). Przechowywać w -20°C .
17. BCiP (8 mg BCiP rozpuścić w 2 ml DMF). Przechowywać w -20°C .
18. Probówki Falcona o pojemności 15 ml i 50 ml.
19. Pęsety.
20. Rękawiczki nitrylowe.

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotować dwa 12 % żele poliakrylamidowe do elektroforezy białek w warunkach denaturujących według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
2. Oznaczyć stężenie mikrosomów, rybosomów surowych i oczyszczonych (przepis – patrz załącznik do ćwiczeń)
3. Przygotować po dwie próbki białkowe do elektroforezy SDS/PAGE zawierające:
a) 25 μ g mikrosomów, b) 25 μ g rybosomów surowych, c) 25 μ g rybosomów oczyszczonych, d) 25 μ g białek frakcji cytoplazmatycznej, e) 5 μ g białek P, e) wzorce białkowe, według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
4. Próbkę białkową zawieszoną w buforze próbkowym SDS/PAGE nanieść na żele poliakrylamidowe. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Po rozdzieleniu, jeden żel poliakrylamidowy wybarwić błękitem *Coomassie* lub metodą srebrną (przepis w załączniku do ćwiczeń).

5. Drugi żel poliakrylamidowy przepłukać buforem Novablot a następnie przeprowadzić transfer białek z żelu na membranę PVDF (wcześniej nawilżoną metanolem a następnie buforem Novablot), umieszczoną pomiędzy dwiema potrójnymi warstwami bibuły Whatman 3 MM nawilżonej buforem Novablot. Całość umieścić w aparacie do elektrotransferu pomiędzy grafitowymi elektrodami. Transfer białka prowadzić w kierunku anody przy natężeniu prądu 280 mA przez jedną godzinę.
6. Po zakończeniu transferu, membranę PVDF inkubować z 0,02% roztworem czerwieni Ponceau (celem wybarwienia markerów białkowych). Po zaznaczeniu ołówkiem pozycji markerów białkowych, odpłukać barwnik za pomocą buforu PBS. Następnie inkubować membranę w roztworze blokującym, w temp. 4°C, do kolejnych ćwiczeń.
7. Wylać roztwór blokujący i dodać do membrany 20 ml przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych 1:1000, w buforze PBS i pozostawić przez 40 min. na kołysce w temp. pokojowej.
8. Odpłukać przeciwciała roztworem PBST: 4 razy przez 1 min.
9. Na płytkę z membraną wlać 20 ml przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:10000 w 20 ml PBST i pozostawić na kołysce w temperaturze pokojowej na 40 min. (w czasie inkubacji przygotować barwniki do detekcji).
10. Odpłukać przeciwciała roztworem PBST: 4 razy przez 1 min.
11. Przepłukać membranę buforem AP: 2 razy przez 1 min.
12. 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 wylać całość na płytkę z membraną. Pozostawić na kołysce do pojawienia się prążków. Reakcje barwienia przerwać poprzez płukanie membrany wodą dejonizowaną, po czym membranę wysuszyć na powietrzu.

Interpretacja wyników

1. Porównać skład białkowy preparatów poddawanych elektroforezie.
2. Określić masy cząsteczkowe białek P.
3. Określić w jakich frakcjach komórkowych występują białka P drożdży.