UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

dla studentów II roku biotechnologii

LUBLIN 2023

Wersja 1.1

Spis treści:

1. Izolacja genomowego DNA z komórek drożdży
2. Amplifikacja genów kodujących rybosomowe białka P1A i P1B drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
3. Izolacja i elektroforetyczna analiza RNA z komórek drożdży
4. Izolacja jąder komórkowych i histonów
5. Analiza składu białkowego chromatyny

6-7. Badanie aktywności enzymatycznej w żelu poliakrylamidowym na przykładzie inwertazy

Izolacja genomowego DNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Izolacja kwasów nukleinowych jest pierwszym etapem wielu procedur stosowanych w inżynierii genetycznej oraz diagnostyce molekularnej. Celem metody jest uzyskanie materiału o wysokiej czystości, czyli wolnego od białek i polisacharydów, mogących negatywnie wpływać na dalsze analizy. Istotne jest także, aby izolowany kwas nukleinowy nie uległ 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 rekcji PCR.

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

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

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

Materiały i odczynniki

1. 12- godzinna hodowla drożdży *S. cerevisiae* w pożywce YPD (50 ml)
2. Bufor do sferoplastyzacji:

   1 M sorbitol,

   50 mM Tris-HCl, pH 7,5

   20 mM EDTA,

   20 mM β-MET (dodać bezpośrednio przed użyciem)
3. Zymoliaza 100T (handlowy preparat zawierający litykazę) - 2,5 mg/ml w buforze do sferoplastyzacji
4. 10 % w/v SDS
5. Bufor do lizy (50 mM Tris pH 7.5; 20 mM EDTA)
6. 5 M octan potasu
7. 96% i 70% etanol (oziębiony)
8. Bufor TE (10 mM Tris – HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA)
9. Termoblok lub łaźnia wodna
10. Jałowe probówki Eppendorfa o poj. 2 ml i końcówki do pipet
11. Mikroskop świetlny oraz szkiełka podstawowe i nakrywkowe
12. Odczynniki i zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych (patrz załącznik do ćwiczeń)

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować łaźnię wodną o temp. 37^0C oraz blok grzejny o temp. 65^0C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4^0C

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. 4^0C.

2. Uzyskane osady komórek zawiesić łącznie w 0,5 ml buforu do sferoplastyzacji w jednej probówce Eppendorfa (**dodać β-MET do końcowego stężenia 20 mM!**).

3. Dodać 20 µl roztworu zymoliazy 100T, dobrze wymieszać i inkubować przez 20 min w temp. 37^0C (sferoplastyzacja trwa od 20 do 120 min, zależnie od szczepu, rodzaju podłoża czy fazy wzrostu komórek).

Uwaga! Formowanie się sferoplastów można monitorować w dwojaki sposób:

a) pod mikroskopem świetlnym - na jedno szkiełko podstawowe nanieść 4 µl zawiesiny komórek oraz 4 µl 0,1% SDS, a na drugie 4 µl zawiesiny komórek oraz 4 µl buforu do sferoplastyzacji; formowanie sferoplastów uznaje się za zakończone, gdy 80-90 % komórek występuje jako tzw. komórki-duchy (z ang. *ghost cells*);

b) do dwóch szklanych probówek dodać po 0,5 ml buforu do sferoplastyzacji, następnie do pierwszej z nich dodać 50 µl 10 % roztworu SDS, po czym do obu probówek dodać po 5 µl zawiesiny komórek i energicznie zamieszać; stopień strawienia ściany komórkowej można uznać za zadowalający, jeśli zawiesina w probówce z SDS stanie się klarowna.

4. Uzyskane sferoplasty osadzić przez wirowanie przy prędkości 3000 rpm przez 5 min. w temp. 4^0C. Supernatant delikatnie usunąć za pomocą pipety, a do osadu sferoplastów dodać 0,5 ml buforu do lizy i kilkukrotnie 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. 65^0C.

6. Po inkubacji schłodzić probówkę w lodzie po czym dodać 0,2 ml 5M octanu potasu, Zawartość dokładnie wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki, a następnie inkubować w lodzie przez 20 min. Widoczny po dodaniu octanu potasu biały precypitat tworzą kompleksy SDS ze zdenaturowanymi białkami.

7. Próbkę odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 10 min. w temp. 4^0C.

8. Przenieść 500 µl supernatantu do nowej probówki Eppendorfa o poj. 2 ml (temp. pokojowa) i dodać do niego trzy objętości oziębionego 96% etanolu (precypitacja kwasów nukleinowych). Próbkę pozostawić w temp. –20^{0}C do kolejnych ćwiczeń.

9. Osadzić wytrącony kwas nukleinowy przez wirowanie przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w temp. 4^{0}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^{0}C. Supernatant odrzucić, a osad wysuszyć w eksykatorze przez ok. 20 min. (aż do całkowitego zaniku zapachu etanolu).

11. Otrzymany osad rozpuścić w 50-100 µl buforu TE (pH 8.0); jeśli pojawią się problemy z rozpuszczalnością DNA - inkubować ok. 10 min w temp. 62^{0}C.

12. Sprawdzić jakość wyizolowanego DNA metodą elektroforezy w 0.7 % żelu agarozowym (przygotowanie żelu i przeprowadzenie elektroforezy DNA – patrz załącznik do ćwiczeń). W tym celu przygotować próbki do elektroforezy zawierające 15 µl otrzymanego roztworu genomowego DNA i 5 µl buforu próbkowego do DNA. Preparat otrzymanego DNA przechowywać w temp. – 70^{0}C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i odmrażania próbek DNA.

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

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

- zaczynająca cały cykl reakcja denaturacji odbywa się w temperaturze 93-96°C, czego wynikiem jest rozplecenie podwójnych nici DNA,
- następnie odbywa się ochłodzenie mieszaniny reakcyjnej do doświadczalnie dobranej temperatury (42-68^{0}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^{0}C (optymalna temp. działania polimerazy) i następuje wydłużanie nici - począwszy od końca 3' startera enzym dokłada kolejne, komplementarne w stosunku do matrycy nukleotydy w tempie około 1000 nukleotydów na minutę dla najczęściej wykorzystywanej polimerazy Taq (z *Thermus aquaticus*).

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

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

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

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

```
P1A   1     MSTESALSYA ALILADSEIE ISSEKLLTLT NAANVPVENI WADIFAKALD
P1B   1     MSDSIISFAA FILADAGLEI TSDNLLTITK AAGANVDNVW ADVYAKALEG

P1A   51    GQNLKDLLVN FSAGAAAPAG VAGGVAGGEA GEAEAEKEEE EAKEESDDDM
P1B   51    KDLKEILSGF HNAGPVAGAG AASGAAAAGG DAAAEEEKEE EAAEESDDDM

P1A   101   GFGLFD
P1B   101   GFGLFD
```

Rys. Porównanie sekwencji aminokwasowych drożdżowych białek P1A i P1B

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

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

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

Materiały i odczynniki

1. Genomowe DNA drożdży uzyskane w poprzednim ćwiczeniu.
2. Startery reakcji PCR dla genów kodujących białka P1A i P1B
3. Polimeraza *Taq* 0,5U/µl
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 (patrz załącznik do ćwiczeń)

Wykonanie ćwiczenia

1. Do probówki Eppendorfa o poj. 0,5 ml, umieszczonej w lodzie, odmierzyć następujące składniki mieszaniny reakcyjnej:

   23 µl dejonizowanej wody
   5 µl dNTP
   5 µl buforu dla polimerazy *Taq*
   5 µl roztworu $MgCl_2$
   2 µl genomowego DNA drożdży
   2 µl polimerazy DNA *Taq*

2. Wymieszać zawartość probówki i osadzić płyn ze ścianek przez krótkie odwirowanie, po czym rozdzielić mieszaninę reakcyjną na dwie równe części do dwóch próbówek do PCR. Następnie, do jednej z próbówek dodać po 2 µl obu starterów do amplifikacji genu kodującego białko P1A, a do drugiej probówki dodać po 2 µl obu starterów do amplifikacji P1B.
3. Reakcje przeprowadzić w termocyklerze w warunkach wskazanych przez prowadzącego ćwiczenia. Po reakcji, do każdej probówki dodać po 5 µl buforu do elektroforezy DNA i dokonać elektroforetycznego rozdziału powstałych fragmentów oraz komercyjnego wzorca DNA w 1% żelu agarozowym (według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń).

Interpretacja wyników

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

Izolacja i elektroforetyczna analiza RNA z komórek drożdży

Uzyskanie wysokiej jakości RNA jest pierwszym i często krytycznym etapem eksperymentów w biologii molekularnej m. in. analizy „Northern", RT-PCR, badaniu ochrony przed nukleazami, translacji *in vitro,* mapowania RNA, konstrukcji bibliotek cDNA. W izolacji RNA duże znaczenie ma szybkość przeprowadzania procedury oczyszczania i kontrolowanie aktywności rybonukleaz komórkowych, które mogą doprowadzić do szybkiej degradacji RNA. Dlatego też podczas izolacji RNA wszystkie odczynniki należy przygotowywać z użyciem wody traktowanej 0,1% pirowęglanem dietylu (DEPC), który jest silnym inhibitorem RNaz. Ponadto trzeba stosować jednorazowy sterylny sprzęt laboratoryjny wykonany z tworzyw sztucznych, który jest wolny od RNaz, a sprzęt wielokrotnego użytku umieszczać w 3% roztworze H_2O_2, po czym przepłukać wodą traktowaną DEPC.

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

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

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

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

IZOLACJA RNA METODĄ EKSTRAKCJI FENOLOWEJ

Materiały i odczynniki

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

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

<u>Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia schłodzić wirówkę do temp. +4^0C oraz przygotować blok grzejny o temp. 65^0C</u>

Wykonanie ćwiczenia

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

1. Hodowlę drożdży odwirować w probówkach Eppendorfa o poj. 2 ml przez 3 min. przy 5000 rpm w 4^0C tak, aby w każdej probówce otrzymać osad komórek drożdży pochodzący z 4 ml hodowli. Supernatant odrzucić, a osad komórek drożdży zawiesić w 1 ml oziębionej H_2O, po czym odwirować przez 3 min. przy 5000 rpm w 4^0C (na tym etapie osad komórek drożdży można zamrozić w ciekłym azocie i przechowywać

w –80^{0}C). **Na wykonanie poniższej procedury potrzebny jest osad komórek drożdży w dwóch probówkach.**

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

Elektroforetyczna analiza RNA

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

Interpretacja wyników

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

Izolacja 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 stanowią komórki wątroby mysiej. Celem ćwiczenia jest otrzymanie preparatów zawierających wszystkie białka jądrowe oraz izolacja histonów z jąder komórek wątroby. Histony oczyszcza się z jąder komórkowych wykorzystując zdolność tych białek do rozpuszczania się w kwasach nieorganicznych, np. 0,25M HCl lub 0,2M H_2SO_4.

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

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

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

Materiały i odczynniki

1. Zamrożone skrawki wątroby mysiej
2. Bufor PBS

   137 mM NaCl

   2,7 mM KCl

   10 mM Na_2HPO_4

   2 mM KH_2PO_4, 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. Bufor próbkowy do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (1x stężony bez dodatku błękitu bromofenolowego)
6. 0,25 M HCl
7. Aceton (oziębiony)
8. Homogenizator szklano-teflonowy o pojemności 2 ml
9. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet.

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować blok grzejny o temp. 95^0C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4^0C

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Jeśli nie zaznaczono inaczej, poniższe czynności należy wykonywać w temp. +4^{0}C

Izolacja jąder komórkowych z wątroby mysiej

1. Zamrożony skrawek wątroby przenieść z probówki Eppendorfa do homogenizatora szklano-teflonowego, następnie dodać 1,5 ml buforu do izolacji jąder i dezintegrować wykonując 10 ruchów teflonowym tłoczkiem, po czym pozostawić do inkubacji 20 min. w lodzie.
2. Po 20 min. inkubacji zawiesinę komórek ponownie dezintegrować wykonując 30 ruchów teflonowym tłoczkiem.
3. Uzyskany dezintegrat komórek przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 2 ml i odwirować przy prędkości 6000 rpm przez 10 min.
4. Supernatant (zawierający białka cytoplazmatyczne) przenieść do nowej probówki Eppendorfa, oznaczyć w nim stężenie białka metodą *Bradforda* (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^{0}C do kolejnych ćwiczeń.
5. Do osadu jąder dodać 1 ml buforu PBS, kilkukrotnie przepipetować zawartość probówki (probówka nr 1) w celu jej dokładnego wymieszania a następnie przenieść 0,3 ml do nowej probówki Eppendorfa (probówka nr 2). Obie probówki Eppendorfa odwirować przy 6000 rpm przez 10 min. Po odwirowaniu delikatnie usunąć z obu próbówek supernatant przy pomocy pipety.

Izolacja histonów z użyciem 0,25 M HCl

1. Osad jąder z probówki nr 1 zawiesić w 50 µl 0,25 M HCl .
2. Próbkę pozostawić w temp. pokojowej na 20 min. (ekstrakcja histonów), a następnie odwirować przy prędkości 3500 x g przez 10 min.
3. Supernatant zawierający histony przenieść do nowej probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml.
4. Do osadu dodać ponownie 50 µl 0,25 M HCl, dokładnie wymieszać i pozostawić na 20 min. w temp. pokojowej (ponowna ekstrakcja w celu zwiększenia wydajności).
5. Próbkę odwirować przy prędkości 3500 x g przez 10 min.
6. Uzyskane supernatanty, zawierające histony, połączyć.
7. Wytrącać histony z supernatantu przez dodanie 8 objętości (0,8 ml) oziębionego acetonu. Całość pozostawić do kolejnych ćwiczeń (minimum na 24 godziny) w temp. -20°C.

Izolacja białek jądrowych

1. Osad jąder z probówki nr 2 zawiesić w 50 µl buforu próbkowego do elektroforezy SDS-PAGE (1x stężony bez błękitu bromofenolowego)
2. Próbkę dokładnie wymieszać i inkubować w temp. 95°C przez 5 min. W wyniku uwolnienia DNA z jąder zawiesina przyjmuje galaretowatą konsystencję.
3. Po inkubacji próbkę odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 5 min. Supernatant zawierający białka jądrowe przenieść do nowej probówki Eppendorfa, oznaczyć w nim stężenie białka metodą *Bradforda,* a następnie przygotować próbki do elektroforezy SDS-PAGE zawierające po 15 µg i 30 µg białka i pozostawić do kolejnych ćwiczeń 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).

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

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

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

Materiały i odczynniki

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

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia przygotować blok grzejny o temp. 90^0C oraz schłodzić wirówkę do temp. 4^0C

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotować 13,8 % żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących według przepisu zamieszczonego w załączniku do ćwiczeń.
2. Próbki z wytrąconymi histonami odwirować przy prędkości 10000 rpm przez 15 min. w 4^0C 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. Próbki zawierające wszystkie białka jądrowe, wyizolowane histony, białka cytoplazmatyczne oraz wzorce białkowe zawieszone w buforze próbkowym do

elektroforezy SDS-PAGE ogrzewać przez 3 min. w temp. 90^0C. 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.

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. płucząc 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 α1-β2 glikozydowym. Po rozerwaniu wiązania powstaje równomolarna mieszanina cząsteczek glukozy i fruktozy. Inwertaza jest syntetyzowana przez wiele szczepów drożdży i bakterii. Ilość enzymu produkowana przez mikroorganizm waha się znacznie w zależności od gatunku, szczepu, czy dostępnego źródła węgla. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzają zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkową inwertazę. Zewnątrzkomórkowa inwertaza występuje w formie wysoce glikozylowanego homodimeru wydzielanego do przestrzeni periplazmatycznej. Wewnątrzkomórkowa inwertaza również tworzy homodimer ale nie ulega glikozylacji. Inwertaza jest powszechnie stosowana w przemyśle spożywczym do produkcji fruktozy czy w biosensorach do stałego monitorowania poziomu sacharozy.

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

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

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

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

Materiały i odczynniki

1. 20-godzinna hodowla drożdży *S cerevisiae,* szczep W303 (50 ml na zespół studentów)
2. $(NH_4)SO_4$ 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. 4^0C.
10. Celulozowe „węże" do dializy
11. Papierki wskaźnikowe pH 5,4 – 7,0
12. 10% roztwór kwasu octowego
13. Odczynniki i zestaw do elektroforezy białek SDS/PAGE

Wykonanie ćwiczenia

Wysalanie i dializa białek z płynu pohodowlanego (dzień 1)

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

Oznaczanie aktywności inwertazy w żelu (dzień 2)

1. Oznaczyć stężenie białka metodą Bradford (przepis – załącznik do ćwiczeń).
2. Przygotować 10% żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS/PAGE) według przepisu w załączniku do ćwiczeń.
3. Przygotować trzy próbki zawierające: 100 µg, 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^{0}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^{0}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.