UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ĆWICZENIA Z BIOLOGII MOLEKULARNEJ

(załącznik do ćwiczeń)

LUBLIN 2022

Wersja 1.0

ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ DNA W ŻELU AGAROZOWYM

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 ilości par zasad.

Stężenie agarozy:

Zwiększając stężenie agarozy zwalnia się tempo migracji DNA w żelu. Na podstawie prac doświadczalnych ustalono optymalne stężenie agarozy do rozdziałów fragmentów DNA o określonej wielkości. Dane te przedstawiono w tabeli:

Optymalne stężenie agarowy	
Wielkość cząsteczki DNA (kb)	Stężenie agarozy (%w/v)
5 - 60	0,3
1 - 20	0,6
0,8 - 10	0,7
0,5 - 7	0,9
0,4 - 6	1,2
0,2 - 3	1,5
0,1 - 2	2,0

Stosowane napięcie prądu podczas elektroforezy:

Przy niskich napięciach tempo migracji liniowych cząsteczek kwasów nukleinowych jest wprost proporcjonalne do napięcia. Zależność ta przestaje obowiązywać dla dużych cząsteczek DNA rozdzielanych przy zastosowaniu wysokich napięć, dlatego też w czasie rozdziału cząsteczek większych niż 2000 pz (2 kb) nie należy stosować napięcia większego niż 5 V/cm.

Temperatura rozdziału:

Temperatura w jakiej dokonuje się rozdziału 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 rozdziału powoduje wyostrzenie poszczególnych prążków. W celu przeprowadzenia elektroforezy w obniżonej temperaturze należy zastosować aparat z wymiennikiem ciepła.

Bromek etydyny:

Obecność bromku etydyny w buforze do elektroforezy (i żelu) lub w barwniku do próbek zwalnia tempo przemieszczania się cząsteczek o ok. 15%.

Skład i siła jonowa buforu:

W buforze o niskiej sile jonowej DNA przemieszcza się bardzo wolno. W wypadku stosowania buforu o dużej sile jonowej wydzielana jest duża ilość ciepła, które może spowodować roztopienie agarozy i denaturację DNA. Najpowszechniej stosowany jest bufor TAE.

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

Materiały i odczynniki

1. Bufor próbkowy do elektroforezy RNA 2x stężony:

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

2. Bufor próbkowy do elektroforezy DNA:

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

3. Bufor TAE 50 x stężony:

242 g Tris
57,1 ml kw. octowy lodowaty
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
dopełnić H_2O do 1000 ml

4. Agaroza
5. Bromek etydyny 10 mg/ml
6. Markery do elektroforezy kwasów nukleinowych
7. Zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Pracę z bromkiem etydyny wykonywać w rękawicach ochronnych.

Zgodnie z zaleceniami prowadzącego ćwiczenia, przygotować 100 ml 0,7% lub 1% roztworu agarozy w buforze TAE. W tym celu odpowiednio 0,7 g lub 1 g agarozy rozpuścić w 100 ml buforu TAE (2 ml 50x stężonego buforu TAE + 98 ml H_2O). Agarozę gotować przez ok. 2 minuty w celu dobrego rozpuszczenia. Następnie roztwór agarozy schłodzić do temp. 60-70^{0}C i dodać 5 µl roztworu bromku etydyny. Dokładnie wymieszać, wylać na płytkę i pozostawić do zastygnięcia.

Badane próbki DNA lub RNA zawiesić w buforze próbkowym do elektroforezy, odpowiednio, DNA lub RNA. Płytkę z zastygniętym żelem agarozowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat 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.

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 ($H_2C=CH-CO-NH_2$) połączone wiązaniami poprzecznymi za pomocą N,N'-metyleno-bis-akrylamidu ($H_2C=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$). W ten sposób tworzy się sieć, przez „oczka " której migrują rozdzielane cząsteczki. Wielkość „oczek" sieci żelu zależy od stężenia akrylamidu oraz bisakrylamidu. Polimeryzacja żelu odbywa się w obecności nadsiarczanu amonu (APS) oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE) 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 siarczanu dodecylu (SDS), który jest detergentem 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_2O	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

Przygotowanie żelu i próbek białkowych

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

Uwaga! Pracę z akrylamidem wykonywać w rękawicach ochronnych.
Roztwory dodawać wg przedstawionej kolejności.
TEMED – inicjator polimeryzacji, dodawać jako ostatni składnik, bezpośrednio przed wylaniem mieszaniny między płytki !

Żel separujący

ODCZYNNIK	Żel 10% (8 ml)	Żel 12% (8 ml)	Żel 13,8% (8 ml)	Żel 15% (8 ml)
H_2O	3,1 ml	2,6 ml	2,2 ml	1,8 ml
30% akrylamid + 1%bisakrylamid	2,7 ml	3,2 ml	3,6 ml	4,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
10% SDS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl

Żel zagęszczający

ODCZYNNIK	na 2,5 ml żelu	na 5,0 ml żelu
H_2O	1,3 ml	2,6 ml
30% akrylamid + 1%bisakrylamid	0,5 ml	1,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,625 ml	1,25 ml
10% SDS	25 µl	50 µl
10% APS	25 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

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

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

przez 3 min. w temp. 90^0C. Bufor próbkowy zawierający SDS i DTT niszczy strukturę natywną białek w podwyższonej temperaturze.

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

Barwienie białek po elektroforezie

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

A. Barwienie błękitem *Coomassie*

Odczynniki

Mieszanina barwiąca:

Metanol	400 ml
Kwas octowy	100 ml
H_2O	500 ml
Błękit *Coomassie*	2,5 g

Odbarwiacz:

Metanol	400 ml
Kwas octowy	100 ml
H_2O	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:

$(NH_4)_2SO_4$	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 przeznaczonej wyłącznie do tego celu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie utrwalać przez 1 godz. w 50ml 10% TCA .
2. Płukać 3 x 5 min w 100 ml wody destylowanej.
3. Barwić żel przez 1godz. w 50 ml roztworu do barwienia koloidalnego, zawierającego 2,5 ml 2% błękitu *Coomassie.*
4. Płukać 3 x 5 min. w 100 ml wody destylowanej.

5. Płukać 10 min. w 50 ml wody destylowanej, w gorącej łaźni wodnej stale mieszając.
6. Dodać 50 ml 0,2M DTT i mieszać przez następne10 min. w gorącej łaźni wodnej.
7. Przepłukać żel w 100 ml wody destylowanej.
8. Barwić w 50 ml 0,1% $AgNO_3$ w gorącej łaźni wodnej przez 10 min. stale mieszając.
9. Przepłukać żel 100 ml wody destylowanej.
10. Dodać 50ml roztworu wywoływacza barwy (odczynnik nr 6) na około 30 sek., następnie zlać go i powtórnie dodać 50 ml świeżego wywoływacza. Całość dokładnie mieszać. Z chwilą pojawienia się pierwszych prążków białkowych dodać pozostałą porcję wywoływacza i całość mieszać do momentu pojawienia się wyraźnych prążków białkowych.
11. Zatrzymać barwienie przez dodanie 25 ml 20% kw. cytrynowego (odczynnik nr 7).

METODA II

Odczynniki

1. Roztwór A (40 ml metanolu, 13,5 ml 37% formaldehydu, 46,5 ml H_2O)
2. Roztwór B - 0,02% $Na_2S_2O_3$ (0,02 g $Na_2S_2O_3$ w 100 ml H_2O)
3. Roztwór C - 0,1% $AgNO_3$ (100 mg $AgNO_3$ w 100 ml H_2O)
4. Roztwór D (3 g Na_2CO_3 + 50 µl 37% formaldehydu + 2 ml 0,02% $Na_2S_2O_3$ – dopełnić wodą do 100 ml)
5. Roztwór E – 20% kwas cytrynowy (10 g kw. cytrynowego w 50 ml H_2O)

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 utrwalać 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 (wywoływacza barwy) i mieszać do momentu pojawienia się wyraźnych prążków białkowych.
9. Płukać 3 x 20 sek. w 100 ml wody destylowanej.
10. Zatrzymać barwienie przez dodanie 50 ml roztworu E na 10 min.
11. Przepłukać żel wodą i zeskanować lub wysuszyć.

ILOŚCIOWE OZNACZANIE BIAŁKA

METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Białka charakteryzują się zdolnością absorpcji promieniowania ultrafioletowego, której maksimum przypada na fale o długości 280nm oraz 235nm. Wiąże się to z obecnością aminokwasów aromatycznych (tyrozyna, tryptofan) oraz wiązań peptydowych w łańcuchu polipeptydowym. Na wartość absorpcji mogą wpływać zanieczyszczenia kwasami nukleinowymi, dla których maksimum absorpcji promieni UV przypada na fale o długości 260nm.

Metoda *Beavena i Holidaya*

Zasada metody polega na spektrofotometrycznym pomiarze absorpcji promieni UV o długości 280 nm oraz 260 nm, przez jednocentymetrową warstwę badanego roztworu białka. Uzyskane wartości podstawia się do wzoru i oblicza stężenie białka w mg/ml:

$$C_{białka(mg/ml)} = 1{,}55\ A_{280} - 0{,}76\ A_{260}$$

Metoda ta obarczona jest pewnym błędem, wynikającym z różnej zawartości aminokwasów aromatycznych w różnych białkach oraz zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi.

Metoda *Whitakera i Granuma*

Jest to metoda spektrofotometrycznego oznaczenia stężenia białka, w której wykonuje się pomiar absorpcji promieni UV o długości fali 280 nm oraz 235 nm. Otrzymane wartości absorpcji podstawia się do wzoru i oblicza stężenie białka w mg/ml.

$$C_{białka(mg/ml)} = \frac{A_{235} - A_{280}}{2{,}51}$$

W oznaczeniach stężenia białka tą metodą nie przeszkadza obecność kwasów nukleinowych, dla których wartość absorpcji fal świetlnych o długości 235 nm i 280 nm jest taka sama.

Odczynniki

Roztwory badanych białek.

Wykonanie ćwiczenia

Przeprowadzić spektrofotometryczny pomiar absorpcji promieni UV przez badany roztwór białka przy trzech długościach fal 235 nm, 260 nm oraz 280 nm. Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (bufor lub H_2O dest. bez białka). Jeśli zaistnieje konieczność, (tzn. wielkość absorpcji przekracza 1), należy próbkę białka rozcieńczyć, a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jego stężenia. Znając wartość absorpcji (A) obliczyć stężenie białka według podanych wyżej wzorów.

METODA KOLORYMETRYCZNA

Metoda *Bradforda*

Metoda ta pozwala na szybkie oznaczenie stężenia białka w roztworze. W metodzie *Bradforda* 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. Absorpcję powstałego kompleksu barwnego odczytuje się w zakresie światła widzialnego przy długości fali 595 nm.

Odczynniki

1. Odczynnik *Bradforda* (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 próbie (µg)	2	4	8	10	12	16	20	0

Do wszystkich probówek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradforda* i dokładnie wymieszać.
Po upływie 5 min, zmierzyć absorpcję 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 *Bradforda* i dokładnie wymieszać. Po upływie 5 min, zmierzyć absorpcję w kolorymetrze przy długości fali 595 nm.
Stężenie białka odczytać z przygotowanej krzywej wzorcowej.

ILOŚCIOWE OZNACZANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

METODA SPEKTROFOTOMETRYCZNA

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

Przykład oznaczenia stężenia RNA

Objętość próbki RNA: 100 µl

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

A_{260} rozcieńczonej próbki = 0.55

Stężenie RNA = 40 µg/ml x A_{260} x rozcieńczenie

= 40 µg/ml x 0.55 x 50

= 1100 µg/ml

Całkowita ilość RNA = stężenie x objętość próbki w ml

= 1100 µg/ml x 0,1

= 110 µg RNA

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

Odczynniki

Roztwory badanych kwasów nukleinowych.

Wykonanie ćwiczenia

Przeprowadzić spektrofotometryczny pomiar absorpcji promieni UV przez badany roztwór kwasu nukleinowego przy dwóch długościach fal 260 nm oraz 280 nm. Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (bufor lub H_2O). Jeśli zaistnieje konieczność (tzn. wielkość absorpcji przekracza 1), należy próbkę kwasu nukleinowego rozcieńczyć (najlepiej wodą), a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jego stężenia. Znając wartość absorpcji (A) obliczyć czystość i stężenie badanego kwasu nukleinowego.

WYSALANIE BIAŁEK

Dzięki obecności grup polarnych w białkach, następuje wiązanie cząsteczek wody, które wytwarzają tzw. płaszcz hydratacyjny. Dodanie niektórych soli (np. siarczanu amonu bądź siarczanu magnezu) do roztworu białka, powoduje jego odwodnienie, co prowadzi do wytrącenia białka z roztworu. Proces ten nosi nazwę **wysalania.** Wysolone białko można ponownie rozpuścić w wodzie lub w odpowiednim buforze bez straty jego właściwości biologicznych. Dzięki temu wysalanie białek stosuje się często w praktyce jako jeden z etapów ich łagodnego wydzielania z roztworu. Aby uzyskać określony stopień nasycenia siarczanem amonu, należy dokładnie znać objętość badanego roztworu i na podstawie załączonej tabeli (patrz strona 54) odważyć potrzebną ilość gramów soli. Podczas procedury wysalania białek ważna jest znajomość temperatury roztworu. Wytrącone białka obserwuje się jako bezpostaciowe lub kłaczkowate osady zawierające pewną ilość soli, która wpływa ujemnie na pomiar stężenia białka. Usunięcie soli z roztworu białka możliwe jest poprzez dializę.

DIALIZA BIAŁEK

Metoda dializy pozwala m.in. na usunięcie soli i innych związków niskocząsteczkowych z roztworu białka oraz zmianę buforu w którym białko jest zawieszone.

Materiały i odczynniki

2% roztwór węglanu sodu

0,5 M roztwór EDTA, pH 8,0

Rozwór badanego białka

Roztwór dializacyjny (zgodnie z zaleceniami prowadzącego)

Celulozowe „węże" do dializy

Zaciski do „węży" dializacyjnych

Wykonanie ćwiczenia

1. Uciąć potrzebną długość „węża" dializacyjnego i gotować przez 10 minut w 200 ml 2% roztworu węglanu sodu z dodatkiem 1 mM EDTA w celu usunięcia metali ciężkich i siarczków. Długość „węża" obliczyć następująco:
   - długość dializowana (mm) = [poj.(w µl) x 3,2] / [szer. „węża"^{2} (w mm^2)]
   - dodać 10 % długości dializowanej
   - dodać 4 cm na zaciski
2. Po oziębieniu, dokładnie przepłukać „węże" wodą destylowaną (tak przygotowane „węże" można przechowywać w wodzie z dodatkiem substancji konserwujących, np. NaN_3 w 4^0C).
3. Jeden koniec przygotowanego „węża" zamknąć zaciskiem tak, aby wystawał on co najmniej na 1 cm. Otrzymany woreczek wypełnić wodą destylowaną w celu sprawdzenia jego szczelności.
4. Po wylaniu wody, napełnić woreczek roztworem białka przygotowanym do dializy. Z niewypełnionej części woreczka usunąć powietrze ściskając delikatnie woreczek nad płynem.
5. Zamknąć zaciskiem drugi koniec „węża" i umieścić woreczek w roztworze dializacyjnym. Dializę należy prowadzić, przy stałym mieszaniu, w temperaturze 4^0C.
6. Roztwór dializacyjny powinien być zmieniany co najmniej 3 razy w trakcie trwania dializy. Zaleca się wymianę po upływie 2-4 godzin, 6-8 godzin i 10-14 godzin.

Całkowita objętość roztworu powinna być ok. 100 razy większa niż objętość próbki białkowej.

7. Po zakończeniu dializy, zdjąć jeden zacisk, otworzyć woreczek i usunąć roztwór za pomocą pipety.

TABELA WYSYCEŃ $(NH_4)_2SO_4$ (temp. pokojowa)

	Końcowe nasycenie siarczanem amonu w %																
	10	**20**	**25**	**30**	**33**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**	**60**	**65**	**70**	**75**	**80**	**90**	**100**
Nasycenie początkowe %	Ilość gramów siarczanu amonu, którą należy dodać do 1 dm^3 roztworu																
0	**56**	**114**	**144**	**176**	**196**	**209**	**243**	**727**	**313**	**351**	**390**	**430**	**472**	**516**	**561**	**662**	**767**
10		**57**	**86**	**118**	**137**	**150**	**183**	**216**	**251**	**288**	**326**	**365**	**406**	**449**	**494**	**592**	**694**
20			**29**	**59**	**78**	**91**	**123**	**155**	**189**	**225**	**262**	**300**	**340**	**382**	**424**	**520**	**619**
25				**30**	**49**	**61**	**93**	**125**	**158**	**193**	**230**	**267**	**307**	**348**	**390**	**485**	**583**
30					**19**	**30**	**62**	**94**	**127**	**162**	**198**	**235**	**273**	**314**	**356**	**449**	**546**
33						**12**	**43**	**74**	**107**	**142**	**177**	**214**	**252**	**292**	**333**	**426**	**522**
35							**31**	**63**	**94**	**129**	**164**	**200**	**238**	**278**	**319**	**411**	**506**
40								**31**	**63**	**97**	**132**	**168**	**205**	**245**	**285**	**375**	**469**
45									**32**	**65**	**99**	**134**	**171**	**210**	**250**	**339**	**431**
50										**33**	**66**	**101**	**137**	**176**	**214**	**302**	**392**
55											**33**	**67**	**103**	**141**	**179**	**264**	**353**
60												**34**	**69**	**105**	**143**	**227**	**314**
65													**34**	**70**	**107**	**190**	**275**
70														**35**	**72**	**153**	**237**
75															**36**	**115**	**198**
80																**77**	**157**
90																	**79**

Uwaga ! Przystępując do wysalania białek w temperaturze 4^0C należy pomnożyć wyliczoną z Tabeli ilość gramów siarczanu amonu przez współczynnik 0,92, który uwzględnia zmniejszoną rozpuszczalność tego związku w niższej temperaturze.

Przykład : Jeżeli procedurę wysalania białka (0% - 50% nasycenia) prowadzimy w temp. 4^0C, wówczas na 1 dm^3 roztworu białka należy przygotować odważkę 288g (313 g × 0,92) siarczanu amonu. By zwiększyć nasycenie siarczanem amonu od 50% do 100%, należy odważyć dodatkowo 360g (392 g × 0,92) soli.

Tabela 1
Symbole wielokrotności i ułamków dziesiętnych

Symbol	Określenie		Przeliczenie
T	Tera-	10^{12}	1 000 000 000 000
G	Giga-	10^{9}	1 000 000 000
M	Mega-	10^{6}	1 000 000
k	Kilo-	10^{3}	1 000
h	Hekto-	10^{2}	100
dk	Deka-	10^{1}	10
d	Deci-	10^{-1}	0,1
c	Centi-	10^{-2}	0,01
m	Mili-	10^{-3}	0,001
µ	Mikro-	10^{-6}	0,000 001
n	Nano-	10^{-9}	0,000 000 001
p	Piko-	10^{-12}	0,000 000 000 001

Tabela 2
Przybliżona molowość i ciężar właściwy stężonych kwasów

Związek	Procent wagowy	Molowość M	Otrzymanie molowego roztworu (ml/l)	Ciężąr właściwy
Kwas azotowy	70	15,7	64	1,42
Kwas fosforowy	85	14,8	68	1,70
Kwas nadchlorowy	60	9,2	109	1,54
Kwas nadchlorowy	70	11,6	86	1,67
Kwas octowy	99,5	17,4	58	1,05
Kwas siarkowy	96	18	56	1,84
Kwas solny	37	12	84	1,19

Tabela 3
Barwy promieniowania widzialnego

Przybliżony zakres długości fali (mµ)	Barwa	Barwa dopełniająca
400-450	fioletowa	żółtozielona
450-480	niebieska	żółta
480-490	zielononiebieska	pomarańczowa
490-500	niebieskozielona	czerwona
500-560	zielona	purpurowa
560-575	żółtozielona	fioletowa
575-590	żółta	niebieska
590-625	pomarańczowa	zielononiebieska
625-750	czerwona	niebieskozielona

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

APS - nadsiarczan amonowy (ang. Ammonium Persulphate)

β-MET - β-merkaptoetanol (ang. β-Mercaptoethanol)

DEPC - pirowęglan dietylu (ang. Diethyl Pyrocarbonate)

DMEM - podłoże do hodowli komórkowych (ang. Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium)

dsDNA - dwuniciwy DNA (ang. double stranded DNA)

DTT - ditiotreitol (ang. Dithiothreitol)

EDTA - kwas etylenodwuaminoczterooctowy (ang. Ethylenediaminetetraacetic Acid)

HeLa - linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy Henrietty Lacks (ang. Henrietta Lacks cell)

LB - podłoże do hodowli bakterii (ang. Luria-Bertani medium)

NIH 3T3 - linia komórkowa fibroblastów mysich (ang. National Institute of Health, 3-day Transfer, inoculum 3 x 10^5 cells)

PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

PMSF - sulfofluorek fenylometanu (ang. Phenylmethylsulphonyl Fluoride)

RPMI - podłoże do hodowli komórkowych (ang. Roswell Park Memorial Institute medium)

SD - podłoże do hodowli drożdży (ang. synthetic defined)

SDS - sól sodowa siarczanu dodecylu (ang. Sodium Dodecyl Sulphate)

SDS-PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (ang. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ssDNA - jednoniciowy DNA (ang. single stranded DNA)

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

TCA - kwas trójchlorooctowy (ang. Trichloroacetic Acid)

TEMED - N,N,N',N'-czterometyletylenodiamina (ang. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)

Tris - trójhydroksymetyloaminometan; 2-amino-2(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol

UV - promieniowanie ultrafioletowe (ang. Ultraviolet)

WYKAZ WYBRANYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH

Aceton – wykorzystywany do wytrącania białka z roztworu oraz przepłukiwania osadów białek

APS – inicjator polimeryzacji akrylamidu i N,N'-metylenobisakrylamidu

β-MET – substancja redukująca, m. in. mostki dwusiarczkowe w białkach

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

Bromek etydyny – barwnik wykorzystywany do barwienia kwasów nukleinowych po elektroforezie żelowej, silny mutagen.

DEPC – inhibitor RNaz

DTT – substancja redukująca, m. in. mostki dwusiarczkowe w białkach

EDTA – chelator jonów dwuwartościowych, substancja hamująca nukleazy

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

NaH_2PO_4 – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu

NaCl – substancja zapewniająca siłę jonową roztworu

PMSF – nieodwracalny inhibitor proteaz serynowych

SDS – anionowy detergent, upłynniający wszystkie błony komórkowe i denaturujący białka, nadający białkom ujemny ładunek wypadkowy

TCA – silny kwas, stosowany do wytrącania białka z roztworu

TEMED – katalizator polimeryzacji akrylamidu i N,N'-metylenobisakrylamidu

Tris – **(**w formie Tris-HCl, Tris-octan, Tris-glicyna**)** – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu w zakresie 7-9

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