

**INSTYTUT BIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
I BIOTECHNOLOGII ROŚLIN
WYDZIAŁ BIOLOGII UW**

**TECHNIKI BIOLOGII
EKSPERYMENTALNEJ ROŚLIN**



Warszawa 2018

Celem zajęć fakultatywnych „Techniki Biologii Eksperymentalnej Roślin” jest zapoznanie studentów z zasadami i zastosowaniem szeregu metod używanych w badaniach fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych.

Wybraliśmy metody najczęściej używane i niezbędne w prowadzeniu wielu badań, takie jak np. chromatografia, elektroforeza, sączenie molekularne, oznaczanie metabolitów, frakcjonowanie i oznaczanie białek. Metody te mają jednak pewne ograniczenia w zastosowaniu i często wymagają zabiegów przygotowujących badany materiał do analizy. Do tego niezbędna jest znajomość zasad i zakresu funkcjonowania danej metody. Na ćwiczeniach i zajęciach seminaryjnych problemy te będą szeroko i szczegółowo dyskutowane.

Zajęcia fakultatywne „Techniki Biologii Eksperymentalnej Roślin” prowadzone są przez zespół pracowników Instytutu Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin od wielu lat i cieszą się powodzeniem nie tylko wśród studentów zainteresowanych biologią roślin, ale również studentów mikrobiologii czy biologii molekularnej. Prowadzone przez nas ćwiczenia są stale unowocześniane i, mamy nadzieję, odpowiadają współczesnym potrzebom eksperymentalnym biologów różnych specjalności.

Koordynator

Dr Danuta Solecka

Spis zadań

- 1. Metody wyodrębniania i oznaczania białek z materiału roślinnego**
Prowadzący ćwiczenie – dr Anna Podgórska.....5
- 2. Oznaczanie zmian ekspresji genu techniką qRT-PCR**
Prowadząca ćwiczenie - dr Alicja Sobkowiak11
- 3. Sączenie molekularne na żelach typu Sephadex, chromatografia jonowymienna**
Prowadząca ćwiczenie – dr Maciej Jończyk..... 14
- 4. Selekttywne oznaczanie metabolitów metodami enzymatycznymi**
Prowadząca ćwiczenie – dr Anna Podgórska..... 17
- 5. Elektroforetyczny rozdział białek na żelu poliakrylamidowym**
Prowadząca ćwiczenie – dr Piotr Kowalec..... 20
- 6. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)**
Prowadząca ćwiczenie – dr Danuta Solecka.....25

Kolejność zadań

	Grupa I
04.X	Zebranie organizacyjne
Tydzień I 11.X, 12.X	Zadanie 2 Dr A. Sobkowiak
Tydzień II 18.X, 19.X	Zadanie 5 Dr P. Kowalec
Tydzień III 25.X, 26.X	Zadanie 4 Dr A. Podgórska
Tydzień IV 08.XI, 09.XI	Zadanie 1 Dr A. Podgórska
Tydzień V 15.XI, 16.XI	Zadanie 3 Dr M. Jończyk
Tydzień VI 22.XI, 23.XI	Zadanie 6 Dr D. Solecka Egzamin

Zadanie 1

METODY WYODRĘBNIANIA I OZNACZANIA BIAŁEK Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Materiał roślinny jest mieszaniną związków chemicznych o różnej budowie, a zatem i o różnych właściwościach fizycznych. Wykorzystując te różnice można tę mieszaninę związków rozdzielić na określone frakcje. Frakcjonowanie materiału biologicznego jest niezbędną czynnością wstępną w preparatyce składników, może też poprzedzać czynności analityczne, mające na celu wykrycie lub ilościowe oznaczenie poszczególnych związków. W większości metod frakcjonowania materiału biologicznego wykorzystuje się różnice w rozpuszczalności rozdzielanych składników w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku. Wyróżnia się dwa typy metod: 1) ekstrakcję i 2) frakcjonowane wytrącanie z roztworu. Metody ekstrakcyjne polegają na potraktowaniu badanej próby odpowiednim rozpuszczalnikiem w celu przeprowadzenia badanego związku do roztworu. Wytrącenie badanej substancji z roztworu polega na zmniejszeniu jej rozpuszczalności w tym roztworze, co można uzyskać poprzez:

- 1) zmianę składu rozpuszczalnika (wytrącanie za pomocą rozpuszczalnika lub wysalania)
- 2) zmianę właściwości badanego rozpuszczonego składnika
- 3) zmianę temperatury roztworu (krystalizacja)

Białka to ilościowo znacząca grupa związków w materiale roślinnym, pełniąca różnorodne funkcje w żywych organizmach, od zapasowych poprzez strukturalne do regulacyjnych. Wyodrębnienie z tkanek roślin białek, szczególnie pełniących funkcje enzymatyczne, w niezmienionej postaci, umożliwia dalsze ich badanie.

Jedną z wielu szeroko stosowanych metod wydzielenia białek z roztworu wodnego jest ich wytrącanie alkoholem lub acetonem. Ponieważ jednak te rozpuszczalniki organiczne mogą powodować denaturację niektórych białek, niezbędne jest ścisłe przestrzeganie odpowiedniej temperatury i właściwych stosunków objętościowych. Wytrącanie białka z roztworu wodnego często prowadzi się też za pomocą soli nieorganicznych. Obecność elektrolitu w roztworze zmienia warunki hydratacji cząsteczek białka - zmniejsza się powinowactwo wody do tej cząsteczki i obniża się rozpuszczalność białka. Poszczególne białka różnią się między sobą wartościami tzw. *stałej wysalania*, co umożliwia frakcjonowane wytrącanie białek poprzez stopniowe zwiększanie stężenia soli.

Stężenie soli potrzebne do wytrącenia danego białka z roztworu wodnego wyraża się w % całkowitego nasycenia roztworu solą. Wysalanie polega na powolnym dodawaniu porcjami odważonej soli do roztworu białka, przy równoczesnym i ciągłym mieszaniu. Przy frakcjonowanym wysalaniu mieszaniny białek, po każdorazowym doprowadzeniu stężenia soli dożądanego nasycenia oddziela się wytrącony osad białka, a do supernatantu dodaje następną porcję soli do osiągnięcia wyższego stopnia nasycenia i wytrącenia następnej frakcji białka. Osad wysolonego białka zawiera zawsze pewną ilość użytej soli, co może powodować błędy np. w oznaczaniu zawartości białka. Usunięcie soli możliwe jest poprzez dializę lub odsalanie na kolumnie.

Metody oznaczania białek oparte są na następujących cechach budowy i właściwościach tych związków:

1. obecności w aminokwasach, wchodzących w skład białek, grup funkcyjnych (karboksylowej i aminowej), dających charakterystyczne reakcje.
2. obecności w niektórych aminokwasach grup: tiolowej, fenolowej, indoilowej -umożliwiających charakterystyczne reakcje, pozwalające na wykrycie tych aminokwasów w białkach.
3. wiązania peptydowe w cząsteczce białka mają zdolność do tworzenia barwnych kompleksów z jonami miedzi.

Najpowszechniej stosowanym sposobem wyrażania aktywności metabolicznych jest ich przeliczenia na ilość białka. Skuteczne i dokładne oznaczenie zawartości białka pozwala zatem na precyzyjną ocenę badanych aktywności. Znanych jest wiele metod umożliwiających określenie zawartości białka w materiale biologicznym, ale większość z nich nie jest zbyt pewna i dokładna bowiem w wielu metodach, związki niebiałkowe lub odczyn pH, mogą w znacznej mierze wpływać na oznaczaną rzeczywistą zawartość białka. Stąd niezwykle ważny jest dobór właściwej metody.

Metody oznaczania białka można podzielić na bezwspółczynnikiowe i współczynnikiowe. Do bezwspółczynnikiowych należą metody wagowe oraz częściowo kolorymetryczne, wykorzystujące odczyn barwny wiązania peptydowego. Dużą grupę stanowią metody współczynnikiowe polegające na oznaczaniu jednego ze składników białka i obliczaniu zawartości białka przez mnożenie uzyskanego wyniku przez współczynnik określający procentowy udział tego składnika w badanym białku. Poszczególne białka różnią się pomiędzy sobą zawartością azotu lub poszczególnych aminokwasów. Stosowane metody polegają zatem na oznaczaniu zawartości azotu białkowego lub zawartości aminokwasów (w oparciu o charakterystyczne reakcje).

Obecnie w preparatyce biologicznej najpowszechniej stosowanymi metodami są:

a) **metoda Lowry'ego** z odczynnikiem fenolowym Folina i Ciocalteu.

Zasada metody:

Jest to metoda kolorymetryczna, w której końcowa barwa jest wynikiem: 1) reakcji biuretowej białka z jonami miedzi w środowisku zasadowym oraz 2) redukcji odczynnika fosfomolibdeno-fosfowolframowego (Folina i Ciocalteu) przez tryptofan i tyrozyne, obecne w białku. Pierwszy etap polega na przyłączeniu jonów miedzi do wiązań peptydowych, drugi na redukcji odczynnika Folina do błękitu fosfomolibdenowego nie tylko przez oba aminokwasy, ale i przez miedź związaną z białkiem. Szereg substancji obecnych w środowisku reakcji może wpływać na intensywność barwy błękitu fosfomolibdenowego, albowiem odczynnik Folina-Ciocalteu ulega redukcji również w obecności pochodnych fenoli (z wyjątkiem nitrofenoli), a także pochodnych zasad purynowych i pirymidynowych czy kwasu moczowego. Metodą Lowry'ego można skutecznie oznaczać białko w zakresie od 10 do 200 μg w próbie.

b) **metoda wg Bradford:**

Zasada metody:

Jest to szybka i czuła metoda kolorymetryczna, której końcowa barwa jest wynikiem selektywnej adsorpcji barwnika Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 ($\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}$) - zawartego w odczynniku Bradford - na cząsteczce białka. Metoda Melanii M. Bradford wykorzystuje fakt przesunięcia maksimum absorpcji roztworu barwnika CBB z 465 nm do 595 nm po związaniu z białkiem. Cząsteczka barwnika CBB oddziałuje poprzez grupy SO_3^- z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi. Z barwnikiem reagują głównie reszty argininy, w mniejszym stopniu reszty histydyny, lizyny, tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny. Błękit brylantowy Coomassie G-250 w środowisku kwaśnym ma brunatne zabarwienie, które po reakcji z białkiem zmienia się na błękitne. Natężenie barwy jest proporcjonalne do zawartości białka w roztworze. Można przy jej pomocy oznaczać białka w szerokim zakresie stężeń od 2.5 μg o 200 μg w próbie. Barwa rozwija się w pełni po 5 min od dodania białka, szczególnie przy jego wysokiej zawartości w próbie.

Celem ćwiczenia jest:

a) zapoznanie się z dwoma metodami izolacji białek z materiału roślinnego: ekstrakcją białek rozpuszczalnych oraz metodą frakcjonowanego wysalania białka z materiału roślinnego przy użyciu siarczanu amonu

b) poznanie i opanowanie prawidłowego dobierania metod oznaczania całkowitej zawartości białka w materiale roślinnym

Wykonanie ćwiczenia

A. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA

I. Oznaczenie zawartości białka metodą Lowry'ego:

Do 0.1 ml roztworu (standard białka lub ekstrakt enzymatyczny) dodać 1 ml odczynnika miedziowego. Próby dobrze wymieszać i po 10 min. dodać 0.1 ml 0.1 M odczynnika Folina-Ciocalteu. Po dodaniu odczynnika próby jak najszybciej intensywnie wymieszać. Po 20 min. zmierzyć absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali $\lambda = 750$ nm wobec próby ślepej odczynnikowej (nie zawierającej białka). Wykonać krzywą wzorcową zawierającą od 20 do 200 μg białka w próbce. Odczynnik miedziowy:

(A) - 2% bezwodny węglan sodu (Na_2CO_3) w 0.1 M NaOH.

(B) - 0.5% uwodniony siarczan miedzi ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) w 1% roztworze cytrynianu sodowego.

Do oznaczeń (tuż przed użyciem) zmieszać 50 ml odczynnika A z 1 ml odczynnika B.

II. Oznaczenie białka metodą z odczynnikiem Bradford

Do 20 μl roztworu (standard białka lub ekstrakt enzymatyczny) dodać 1 ml odczynnika Bradford, dobrze wymieszać i po ok. 2 min. mierzyć absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali $\lambda = 595$ nm, wobec ślepej próby odczynnikowej (nie zawierającej białka). Wykonać krzywą wzorcową w zakresie od 5 do 100 μg białka w próbce.

B. WYODRĘBNIANIE BIAŁEK Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

FRAKCJONOWANE WYSALANIE β -GLUKOZYDAZY SIARCZANEM AMONU

Aktywność β -glukozydazy oznaczyć w proszkach acetonowych uzyskanych z nasion: jabłoni i migdała.

I. Przygotowanie proszku acetonowego z nasion.

2 gramowe porcje nasion homogenizować (3 x po ok. 30 sek.) w 50 ml oziębionego do temperatury -20°C acetonu. Po uzyskaniu jednolitego homogenatu przesączyć go na lejku Büchnera przy użyciu pompy próżniowej. Znajdujący się na lejku osad przepłukać kilkoma objętościami zimnego acetonu. Osad dobrze wysuszyć (ok. 20 min.), rozdrobnić łopatką laboratoryjną i używać do dalszych oznaczeń.

II. Ekstrakcja β -glukozydazy z proszku acetonowego

Uzyskany proszek acetonowy zważyć a następnie umieścić w zlewce na 100 ml, zalać 20 ml 0.1 M buforu fosforanowego pH 7.0 i ekstrahować w łaźni lodowej, na mieszadło magnetycznym przez ok. 15 min. Uzyskany ekstrakt rozlać do probówek wirówkowych i odwirować przy 15 000 x g w temp. ok. 4° C, przez 15 min. Po zakończonym wirowaniu supernatant przesączyć przez bibułowy sącdek karbowany. Pobrać 500 μ l ekstraktu i pozostawić w probówce, przechowywanej w lodowce (**frakcja 0**).

Resztę przesącza wykorzystać do wysalania białka. Zmierzyć objętość początkową przesącza i wysalać białko siarczanem amonu do osiągnięcia 30% nasycenia.

Sporządzenie nasyconego roztworu siarczanu amonu:

$$g = \frac{53,3 \times V / 100 \times (S_2 - S_1)}{1 - (0,3 \times S_2)}$$

53,3 – współczynnik podający g siarczanu amonu w 100 ml nasyconego roztworu; V – objętość początkowa; S₁ nasycenie początkowe w ułamkach dziesiętnych; S₂ – nasycenie pożądane w ułamkach dziesiętnych; 0,3 – współczynnik dla korekcji objętości roztworu końcowego

Roztwór odwirować przy 15 000 x g przez 15 min. Osad zawiesić w 2 ml buforu fosforanowego, pH 7.5 (**frakcja 1**). Supernatant zlać do cylindra i zmierzyć objętość. W analogiczny sposób wysolić pozostały supernatant do osiągnięcia 70% nasycenia siarczanu amonu (**frakcja 2**).

Uzyskane roztwory frakcja 1 oraz 2 nanieść na kolumnę EconoPack przeznaczoną do odsalania, wcześniej przepłukaną buforem fosforanowym pH 7.5; pozwolić aby naniesiony na kolumnę roztwór wsiąknął w złożę, następnie nanieść na kolumnę 4 ml buforu, wyciekający eluat zebrać do probówki. We wszystkich zebranych frakcjach 0,1,2 oznaczyć aktywność β -glukozydazy oraz zawartość białka.

III. Oznaczanie aktywności β -glukozydazy

Do oznaczeń aktywności enzymatycznej zastosować jeden z wymienionych substratów w stężeniu 1 mg/ml w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7.5:

- β -D-glukopiranozyd p-nitrofenolu
- α -D-galaktopiranozyd p-nitrofenolu
- β -D-ksylopiranozyd p-nitrofenolu

Do 400 μl ekstraktu enzymatycznego (otrzymanego w pkt. II) dodać 100 μl roztworu odpowiedniego substratu. Równolegle wykonać próbę kontrolną, w której zamiast substratu znajduje się 100 μl buforu fosforanowego. Próby inkubować w termostacie w temp. 37° C przez 30 min. (wykonać po 2 powtórzenia chemiczne). Po upływie czasu inkubacji do każdej próbówki dodać 500 μl 5% roztworu węgla sodu, kończąc tym samym reakcję enzymatyczną. Równolegle wykonać tzw. ślepe próby enzymatyczne, w których reakcja zostanie zatrzymana w czasie „0” przez dodanie węgla sodu. Absorbancję barwnego produktu reakcji zmierzyć na spektrofotometrze przy długości fali $\lambda = 420 \text{ nm}$ i od uzyskanego odczytu odjąć wartość absorbancji tzw. ślepej próby enzymatycznej, w której reakcja została przerwana natychmiast po dodaniu substratu.

Aktywność β -glukozydazy wyrazić w jednostkach absorbancji/mg białka/min

Porównać uzyskane wyniki, wyciągnąć wnioski dotyczące zastosowania różnych metod ekstrakcji białek w preparatyce enzymatycznej oraz przydatności metod Lowry'ego i Bradford w oznaczaniu białka w materiale roślinnym.

Zadanie 2

OZNACZANIE ZMIAN EKSPRESJI GENU TECHNIKĄ qRT-PCR

Metoda PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) umożliwia powielanie fragmentów DNA przy zastosowaniu enzymu – polimerazy oraz specyficznych starterów ograniczających wybrany odcinek tego kwasu nukleinowego. Jednoniciowe mRNA nie może być wykorzystane jako matryca przez polimerazę, konieczne jest zatem zsyntetyzowanie najpierw drugiej, komplementarnej nici (cDNA) przez inny enzym- odwrotną transkryptazę (ang. *reverse transcriptase*, RT). Pierwotnie, w metodzie RT-PCR (kombinacji reakcji przeprowadzanej przez odwrotną transkryptazę i cyklicznych reakcji przeprowadzanych przez polimerazę) poziom mRNA w próbkach oznaczano poprzez porównanie ilości końcowego produktu po jego rozdzieleniu w żelu agarozowym (tzw. półilościowy RT-PCR). Obecnie, poziom transkrypcji oznacza się głównie zmodyfikowaną metodą PCR, zwaną ilościowym PCR (ang. *quantitative real time PCR*, qRT-PCR). Prosta, ale bardzo skuteczna modyfikacja pierwotnej metody opiera się na wykorzystaniu specjalnych barwników interkalujących między dwuniciową DNA. Barwniki te (np. SYBR Green) wbudowane w struktury dwuniciowe, po wzbudzeniu, emitują światło o charakterystycznej długości fali. Umożliwia to śledzenie syntezy produktu w czasie rzeczywistym, ponieważ mierzona wartość fluorescencji jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego w danym cyklu produktu. We wczesnej fazie reakcji qRT-PCR synteza produktu podczas kolejnych cykli zachodzi prostoliniowo i jest proporcjonalna do log wyjściowego stężenia matrycy. Technika qRT-PCR jest bardzo powszechnie stosowana, ponieważ jest bardzo czuła i dokładna a jednocześnie łatwa w wykonaniu. Jednak efektywne wykorzystanie tej metody wymaga poznania zasad: projektowania starterów używanych w metodzie qRT-PCR, doboru odpowiedniego środowiska reakcji (dobranie optymalnych temperatur poszczególnych etapów, stężeń starterów oraz jonów Mg^{2+} itd.), uwierzytelniania wyników (sprawdzenie homogenności otrzymanego produktu) oraz metod analizy otrzymanych wyników (wartość *Efficiency*, *Ct* itd.).

Celem ćwiczenia jest izolacja RNA z tkanek roślinnych oraz oznaczenie techniką qRT-PCR poziomu wybranych transkryptów. Jako materiał wykorzystamy liście roślin hodowanych w warunkach optymalnych oraz poddanych stresowi abiotycznemu.

I. IZOLACJA RNA

Do izolacji całkowitego RNA wykorzystamy specjalny zestaw odczynników i kolumnenek dostępny komercyjnie (Qiagen). Najważniejszym etapem przy izolowaniu dobrej jakości RNA jest praca sterylna (RNA jest bardzo szybko degradowane przez RNAzy), dlatego rękawiczki i fartuchy są obowiązkowe!

Do otrzymanych próbek zawierających po 100 mg zamrożonych tkanek liści należy odpipetować 350 μ l buforu lizującego RA1 i 3,5 μ l β -merkaptoetanolu oraz włożyć po dwie metalowe kulki. Probówki wytrząsać 3 min. w homogenizatorze, następnie wyjąć metalowe kulki i nanieść homogenat pipetą na fioletową kolumnę umieszczoną w nowej probówce i wirować 1 min. przy 11.000g. Filtrat przenieść do nowych próbek i dodać 350 μ l 70% etanolu a następnie dobrze wytrząsać przez 1-2 min. Lizat nanieść na niebieską kolumnę umieszczoną w probówce i wirować 30 sek. przy 11.000g. Kolumnę umieścić w nowej probówce i nanieść bufor odsalający MDB i wirować 1 min. przy 11.000g. Na suchą membranę w kolumnie nanieść 95 μ l roztworu DNAzy i inkubować 15 min. w temperaturze pokojowej. Aby dezaktywować DNAzę nanieść na kolumnę 200 μ l buforu RA2 oraz wirować 30 sek. przy 11.000 g. Kolumnę umieścić w nowej probówce i dodać 600 μ l buforu RA3 oraz wirować 30 sek. przy 8.000g. Ponownie umieścić kolumnę w nowej probówce i przemyć drugi raz 250 μ l buforu RA3 oraz wirować 2 min. przy 11.000g. Elucje czystego RNA przeprowadzić sterylną wodą, przemywając kolumnę 40 μ l wody i wirując 1 min. przy 11.000g.

II. OCENA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA RNA

Przed wykorzystaniem uzyskanego RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji niezbędne jest oznaczenie stężenia RNA oraz sprawdzenie jakości RNA.

a) Jakość RNA sprawdzamy po rozdzieleniu próbek w żelu agarozowym.

Rozdział elektroforetyczny: Na 1,8% żel agarozowy w umieszczony buforze TBE (44,5 mM Tris; 44,5 mM kwas borowy; 0,5 mM EDTA) z dodanym 0,01% barwnikiem GelRed należy nanieść po 5 μ l prób RNA zmieszanych z 1 μ l buforu obciążającego (40% sacharoza; 0,1% błękit bromofenolowy w 0,5 x TBE). Do jednej ze studzienek należy nanieść marker wielkości. Elektroforezę prowadzić przy napięciu stałym 72V (czas wg wskazań prowadzącego). Następnie wyjąć żel z urządzenia, obejrzeć na transiluminatorze pod UV i ocenić jakość wyizolowanego RNA.

b) Stężenie RNA w próbce oznaczymy spektrofotometrycznie

Pomiaru absorbancji rozcieńczonych odpowiednio próbek RNA dokonujemy przy długości fali $\lambda=260$ nm. Dla jednoniciowego RNA absorbancja wynosi 1 dla roztworu tego

kwasy nukleinowe o stężeniu 40 µg/ml. Jednocześnie poprzez dodatkowy pomiar przy długości fali $\lambda=260$ nm możemy określić zanieczyszczenie naszej próbki RNA białkami. Dla RNA dobrej jakości wartość A260/A280 powinna oscylować w granicach 1,8 – 2,1.

III. REAKCJA ODWROTNEJ TRANSKRYPCJI

Do wyznaczenia poziomu transkryptu niezbędnym krokiem jest przepisanie mRNA na cDNA. Ten etap eksperymentu zostaje wykonany przez prowadzącego przed zajęciami.

IV. TECHNIKA qRT-PCR

Otrzymane próby 10x rozcieńczonego cDNA stanowią matrycę do reakcji PCR dla wszystkich badanych genów. Należy przygotować oddzielną mieszaninę reakcyjną dla każdego z genów, tak, aby wystarczyło na trzykrotne powtórzenie chemiczne. Do sterylnego eppendorfa odpipetować na każdą reakcję: 4µl 40x rozcieńczone cDNA; 5,6µl wody; po 0,2µl obu starterów; 10µl bufor IQ (Bufor IQ zawiera jony MgCl₂, mieszaninę nukleotydów dNTP, barwnik SYBR Green oraz polimerazę GoTaq). Dodatkowo niezbędne jest sprawdzenie ekspresji co najmniej jednego genu referencyjnego, którego poziom powinien być zawsze stały. Po wymieszaniu prób nanieść po 20µl do studzienek na płytce i szczelnie zakleić. Tak przygotowana płytka jest gotowa do pomiaru fluorescencji w termocyklerze.

Po zakończeniu reakcji wyliczyć poziom mRNA z uzyskanych wartości Ct (ang. *cycle threshold*) oraz podanej przez prowadzącego wartości *E* (ang. *efficiency*) dla par starterów ze wzoru:

$$\Delta\Delta C_t = \frac{(E_{\text{gen badany}})^{\Delta C_t \text{ gen badany (kontrola - próba)}}}{(E_{\text{gen referencyjny}})^{\Delta C_t \text{ gen referencyjny (kontrola - próba)}}$$

Zadanie 3

SĄCZENIE MOLEKULARNE NA ŻELACH TYPU SEPHADEX CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA

Do rozdzielania składników mieszanin o różnych wielkościach cząsteczek stosować można struktury porowate (żele), z reguły uformowane w kolumny. Na objętość całkowitą (V_t) kolumny składają się: tzw. objętość pusta (V_0), czyli objętość rozpuszczalnika wypełniającego przestrzeń nie zajęte przez ziarna żelu (faza ruchoma) oraz objętość rozpuszczalnika związanego z żelem (V_i , faza stacjonarna).

Jony i substancje drobnocząsteczkowe dyfundują łatwo w głąb ziaren żelu, natomiast wielkie cząsteczki nie wchodzą do wnętrza ziaren. Zdolność rozdzielania przez ziarna żelu cząsteczek o różnych rozmiarach jest podstawą techniki zwanej filtracją żelową (sączenie molekularne, chromatografia na sitach molekularnych). Podstawowym nośnikiem jest Sephadex, chemicznie zmodyfikowany dekstran. Pod wpływem epichlorohydryny liniowe cząsteczki dekstranu ulegają połączeniu. Liczba poprzecznych mostków pomiędzy łańcuchami (zależna od warunków reakcji) wyznacza rozmiary "oczek" sieci. Dostępne są żele o różnych rozmiarach „oczek” sieci, od których zależy zakres frakcjonowania poszczególnych związków, różne mogą być też rozmiary ziaren. Dobór odpowiedniego typu żelu zależy od rodzaju i wielkości rozdzielanych substancji. Ważne jest również dostosowanie wielkości kolumny i szybkości przepływu fazy rozpuszczalnika.

Chromatografia jonowymienna polega na wymianie wszystkich zdolnych do wymiany jonów (dodatnich lub ujemnych) jonitu na inne jony o tym samym ładunku zawarte w roztworze. Ze względu na naturę chemiczną można wyróżnić jonity nieorganiczne i organiczne. Do półsyntetycznych jonitów organicznych można zaliczyć przede wszystkim pochodne celulozy: CM-celuloza (karboksymetyloceluloza), DEAE-celuloza (dwuetyloaminoetyloceluloza). Do rozdziału mieszaniny białek stosuje się najczęściej DEAE-celulozę (białka obojętne i kwasowe) oraz CM-celulozę (białka zasadowe).

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z podstawowymi rodzajami zastosowań sit molekularnych typu Sephadex oraz wymienniczy jonowych w badaniach o charakterze biochemicznym.

I. UKŁADANIE KOLUMNY Z ŻELU SEPHADEX G-100

W pełni napęczniały w buforze octanowym Sephadex G-100 (3 doby w temp. pokojowej lub 5 godz. w temp. 100°C) wlać do firmowej kolumny przy zamkniętym kranie dolnym. Nadmiar buforu spuszczaamy dolnym kranem. Przy dolewaniu kolejnych porcji żelu mieszamy jego powierzchnię bagietką tak, aby nie doprowadzić do tworzenia się warstw żelu w kolumnie. Kolumnę wypełnić do wysokości kilku cm poniżej górnej krawędzi, unikając tworzenia się pęcherzy powietrza. Dopełnić buforem. Tak przygotowaną kolumnę przepłukać 100 ml buforu. Po ustabilizowaniu się wysokości warstwy żelu w kolumnie, zmierzyć linijką jej wysokość tak, aby znając średnicę kolumny, można było obliczyć objętość złoża żelu. Na tak przygotowaną kolumnę nanieść ok. 1 ml mieszaniny wzorcowych związków o znanych masach cząsteczkowych.

II. ROZWIJANIE KOLUMNY

Kolumnę rozwijamy buforem octanowym 0.05M, pH 4.5 zawierającym 0.5 M NaCl, zbierając eluat za pomocą kolektora frakcji. Należy tak dobrać czas przesuwu kolektora, aby objętość zbieranych frakcji wynosiła około 3 ml. Rozwijanie kolumny przy pomocy automatycznego kolektora prowadzimy przez kilkanaście godzin. Po zakończeniu rozwijania kolumny, wyznaczamy położenie maksimum stężenia wzorcowych związków. W tym celu mierzymy zmiany wartości absorbancji na spektrofotometrze przy 280 nm dla kolejnych frakcji.

Wykreślamy profil elucyjny kolumny odkładając na osi odciętych objętość wycieku (sumując objętości poszczególnych frakcji) a na osi rzędnych - wartość ekstynkcji. Objętości odpowiadające maksimum stężenia danych wzorców noszą nazwę objętości elucyjnych - V_e , przy czym objętość elucyjna Dextranu Blue 2000 jest równa tzw. objętości swobodnej kolumny - V_0 , to znaczy takiej, w której wychodzą związki wielkocząsteczkowe niepenetrujące w ogóle ziaren Sephadexu.

Dla poszczególnych wzorców wyznaczamy współczynnik podziału pomiędzy fazą ciekłą a fazą żelową:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e - objętość elucyjna danego związku

V_0 - objętość swobodna kolumny

V_t - całkowita objętość złoża żelu w kolumnie

W celu przygotowania krzywej wzorcowej do wyznaczania mas cząsteczkowych należy odłożyć na skali logarytmicznej (oś odciętych) masy cząsteczkowe stosowanych wzorców a na osi rzędnych wyliczone dla nich współczynniki K_{av} . Otrzymujemy krzywą wskazującą na liniową zależność współczynnika K_{av} od logarytmu masy cząsteczkowej. Taką krzywą możemy wykorzystać do wyznaczania masy cząsteczkowej innych związków.

III. UKŁADANIE KOLUMNY Z DEAE-CELULOZY

Do dużej zlewki wsypać 8 g DEAE-celulozy, zalać 300 ml wody destylowanej i powoli wymieszać. Pozostawić na 20 min, do spęcznienia. Zdekantować płyn znad osadu, celulozę zalać 300 ml 0.5 M HCl, pozostawić na 20 min, od czasu do czasu mieszając. Powtórzyć procedurę, zalewając celulozę 300 ml 0.5 M NaOH. DEAE-celulozę zawiesić w 0.05 M buforze Tris-HCl pH 7.2, zawierającym 20 mM NaCl i ułożyć kolumnę (patrz: pkt. I), przepłukując ją dwukrotną objętością buforu. Na tak przygotowaną kolumnę nanieść mieszaninę białek o znanym punkcie izoelektrycznym. Kolumnę rozwijać porcjami 0.05 M buforu Tris-HCl (o objętości równej objętości kolumny) o wzrastającym stężeniu NaCl (schemat 1), zbierając eluat za pomocą kolektora frakcji.

Schemat 1:

0.05 M bufor Tris-HCl pH 7.2, zawierający NaCl o stężeniu:

20 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM; 200 mM; 250 mM; 300 mM;

Należy tak dobrać czas przesuwu kolektora, aby objętość zbieranych frakcji wynosiła około 3 ml. Po zakończeniu rozwijania kolumny zmierzyć dla kolejnych frakcji zmiany wartości absorbancji przy 280 nm.

LITERATURA:

1. Kłyszejko - Stefanowicz L. (red)- Ćwiczenia z biochemii., PWN, Warszawa, 2004.
2. Brzeski W., Kaniuga Z.- Praktikum z biochemii., PWRiL, Warszawa, 1972
3. Gel filtration - theory and practice., Pharmacia LKB Biotechnology.

Zadanie 4

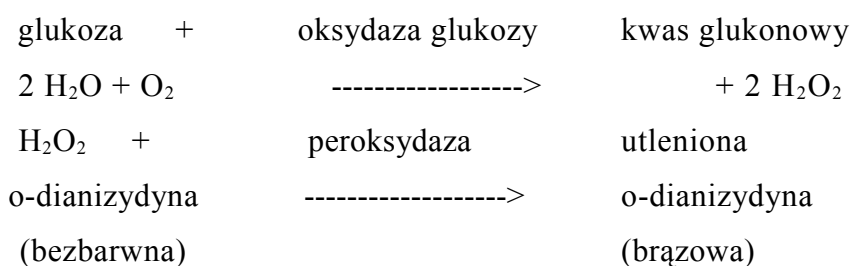
SELEKTYWNE OZNACZANIE METABOLITÓW METODAMI ENZYMATYCZNYMI

Badania regulacji metabolizmu wymagają często zastosowania precyzyjnych technik selektywnego oznaczania poziomu metabolitów. Metabolity te występują niekiedy w bardzo niskich stężeniach (p- lub nmolarnych), mogą się różnić między sobą tylko podstawnikiem. Oznaczenie ich tradycyjnymi metodami chemicznymi wymagałoby oczyszczenia i zatężania ekstraktów, co wiąże się z koniecznością przerobu dużych ilości materiału roślinnego i ze znacznymi niedokładnościami uzyskiwanych wyników. Przy pomocy reakcji enzymatycznej z użyciem enzymu specyficznego dla danego metabolitu można określić jego stężenie oznaczając w prosty sposób (zwykle spektrofotometrycznie) powstający produkt reakcji. Oznaczenie produktu reakcji może być sprzęgnięte z następną reakcją enzymatyczną (lub reakcjami enzymatycznymi) i kończyć się spektrofotometrycznym oznaczeniem np. NAD lub NADH (oznaczenie fruktozo-6-fosforanu, fruktozo-2,6-bisfosforanu i pirofosforanu). W takim przypadku niezbędne jest wykonanie dwóch krzywych wzorcowych, jednej, gdy do mieszaniny reakcyjnej dodaje się znane ilości oznaczanego metabolitu, i drugiej, gdy do ekstraktu wolnego od metabolitu (po zakończeniu reakcji enzymatycznej) dodaje się znane ilości metabolitu; jest to tzw. wewnętrzna krzywa wzorcowa uwzględniająca wpływ substancji zawartych w ekstrakcie mogących wpływać na oznaczenie. Należy również oznaczyć wydajność ekstrakcji dodając do homogenatu znaną ilość metabolitu.

Enzymatyczne oznaczenie poziomu metabolitu w tkance może być również sprzężone z reakcją chemiczną np. utlenieniem dianizydyny przez H_2O_2 katalizowanym przez peroksydazę. Przykładem, zastosowania enzymów do oznaczeń stężenia metabolitu może być oznaczenie poziomu glukozy. Metody chemiczne stosowane do oznaczenia glukozy są mało specyficzne i nie odznaczają się dużą czułością. Podstawą tych oznaczeń jest zwykle redukcja jonów metalu, ciężkiego lub znitrowanego kwasu aromatycznego przez grupę aldehydową glukozy. Inne heksozy z grupą aldehydową oraz substancje redukujące również reagują w tych warunkach, dając znacznie zawyżone wyniki. Toteż metody takie, jak np. Somogyi-Nelsona, zalecają stosowanie ekstraktów wolnych od substancji redukujących, co wymaga dodatkowego oczyszczania ekstraktu i są znacznie mniej czułe.

Enzymatyczna metoda oznaczania glukozy w ekstrakcie polega na użyciu oksydazy glukozy i peroksydazy sprzężonym z utlenianiem chromogenego akceptora tlenu, jakim może być o-dianizydyna lub o-toluidyna. Metoda ta opiera się na dużej specyficzności substratowej oksydazy glukozy dla β -glukozy i niskiej reaktywności z ewentualnie występującymi w ekstrakcie innymi cukrami jak: 2-dezoksy-D-glukoza, D-mannoza, D-fruktoza.

Zasada oznaczenia:



Intensywność zabarwienia mierzona kolorymetrycznie przy długości fali 425 - 475 nm jest proporcjonalna do stężenia glukozy w próbce.

Wykonanie oznaczenia:

A. Przygotowanie odczynników

Roztwór o-dianizydyny 0.21 mM w 0.05 M buforze octanowym pH 5.1 (13,2 mg rozpuścić w 2 ml wody destylowanej, z tego roztworu pobrać 1 ml i dopełnić buforem octanowym do 100 ml.)

Roztwór peroksydazy - 60 jedn/ml

Roztwór oksydazy glukozy - 25 jedn/ ml 0.05 M buforu octanowego pH 5.1

Roztwór inwertazy - 95 jedn/ml buforu octanowego 0,05 M pH 4,5

Roztwór wzorcowy glukozy 5.56 mM

B. Wykonanie krzywej wzorcowej

Pipetować kolejno różne stężenia glukozy

0,4 ml glukozy (lub ekstraktu)

2,4 ml roztworu o-dianizydyny

0,1 ml peroksydazy

0.1 ml oksydazy glukozy

Wymieszać, inkubować przez 30 min w temp. 35° C, zmierzyć ekstynkcję przy długości fali $\lambda = 445$ nm.

C. Przygotowanie ekstraktu i oznaczenie glukozy

Odważyć 500 mg tkanki (ziemniak, jabłko, gruszka).

Tkanę rozetrzeć w dobrze zmrożonym moździerzu, dodać ok. 3 ml 80% etanolu. W celu wyznaczenie wydajności ekstrakcji do drugiej próby dodać dodatkowo 20 mg glukozy. Przenieść ilościowo do probówek wirówkowych, popłukując moździerz 1-2 ml etanolu. Inkubować ekstrakty ok. 2 godz. w temp. 37° C, a następnie odwirować 15 minut przy 14 000 obr./min. Supernatanty delikatnie zlać do parowniczek i przez noc odparować do sucha. Dodać 3 ml wody dest. i supernatanty używać do oznaczeń ew. rozcieńczyć.

D. Oznaczenie zawartości sacharozy w ekstrakcie

Zawartość sacharozy w tkance oznaczamy jako ilość glukozy powstałej w wyniku hydrolizy sacharozy przy udziale dodanej do ekstraktu inwertazy.

Odpipetować 1 ml supernatantu, dodać 1 ml roztworu inwertazy i inkubować próbę w 50° C przez 45 min. Oznaczyć ilość glukozy powstałej w wyniku hydrolizy sacharozy uwzględniając zawartość glukozy w ekstrakcie i rozcieńczenie.

Obliczyć zawartość glukozy i sacharozy w badanym materiale oraz wydajność ekstrakcji.

LITERATURA:

1. Mejsbaum-Katzenellebogen W, Mochnacka I, 1966. Kurs praktyczny z biochemii. PWN, Warszawa, ss 180-190
2. Kowalczyk S, 1993. Fruktozo-2,6-bisfosforan - efektor integrujący metabolizm cukrów i pirofosforanu w przedziałach subkomórkowych roślin. Post. Biol. Kom., tom 20, nr 1. ss 67-85
3. Bergmayer HU, Bemt E, Schmidl F, 1974. W: Methods of Enzymatic Analysis (red. Bergmayer HU) vol. 3. Acad. Press., ss 1176-1179, 1205-1214, 1238-1242, 1304-1307
4. Edwards J, ap Rees T, Wilson PM and Morrell S, 1984. Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissues *Pisum sativum* L, Planta 162:188-191
5. ap Rees T, Green JH and Wilson PM 1985. Pyrophosphate: fructose 6-phosphate, 1-phosphotransferase and glycolysis in non-photosynthetic tissues of higher plants. Biochem. J. 227-229-304
6. Van Schaftingen E. Lederer B, Bartrons R and Hers HG 1982. A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Eur. J.

Zadanie 5

ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

Elektroforeza jest ruchem fazy rozproszonej względem fazy rozpraszającej, zachodzącym pod wpływem przyłożonej zewnętrznie różnicy potencjałów elektrycznych. Istotą zjawiska elektroforezy stanowi proces rozdzielania cząsteczek posiadających dodatni lub ujemny ładunek elektryczny na skutek różnicy szybkości ich wędrowania w roztworze (elektroforeza swobodna) bądź w nośnikach, dokładniej, w roztworach wypełniających kapilary nośników. Nośnikami mogą być: bibuła, żel krzemionkowy, żel poliakrylamidowy, celuloza, agar, skrobia. Bufor powinien być tak dobrany, aby rozdzielane substancje dobrze się w nim rozpuszczały.

Droga przebyta przez substancję jest wprost proporcjonalna do napięcia i natężenia prądu przepływającego przez elektrolit.

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym umożliwia rozdzielenie cząsteczek na zasadzie różnic w ruchliwości elektroforetycznej przy jednoczesnym działaniu nośnika jako sita molekularnego. Żel poliakrylamidowy ma wiele zalet: łatwość i szybkość przygotowania, zdefiniowane wymiary oczek sita molekularnego, duża wytrzymałość mechaniczną i termiczną, obojętność chemiczną i całkowity brak ładunków elektrostatycznych.

Zależnie od proporcji między substratami polimeryzacji (akrylamidem i N,N'-metyleno-*bis*-akrylamidem) uzyskuje się polimer o pożądanej gęstości i wymiarach oczek sita molekularnego; od ilości *bis*-akrylamidu w mieszaninie reakcyjnej zależy liczba wiązań poprzecznych (mostków metylenowych) między łańcuchami polimeru, decydująca o rozmiarach sita molekularnego. Do przeprowadzenia polimeryzacji konieczny jest dodatek nadsiarczanu amonu i N,N,N',N'-czterometyloetyleno-dwuaminy (TEMED). W wyniku katalizowanego przez TEMED rozpadu nadsiarczanu amonu powstają wolne rodniki tlenowe; pod ich wpływem tworzą się rodniki akrylamidowe, które reagując tworzą polimer. Polimeryzację żelu wykonuje się pod osłoną warstwy wody, ponieważ dostęp tlenu utrudnia ten proces.

Rozdzielaną próbkę nanosi się na żel najczęściej w roztworze sacharozy, co zapobiega dyfuzji rozdzielanych cząstek przed ich wniknięciem w sieć polimeru. Cząstki zbierane są najpierw wewnątrz żelu poliakrylamidowego o dużych porach (żel zagęszczający) w wąską, bardzo stężoną strefę startową. Następnie, wewnątrz żelu o małych porach (żel dzielący) cząsteczki są dzielone według wielkości, budowy i ładunku.

Elektroforeza natywna na żelu poliakrylamidowym jest używana do określania składu i budowy natywnych białek (zwłaszcza, gdy zachowanie ich aktywności jest niezbędne do dalszych badań), jak również do rozdzielania małych fragmentów DNA i oligonukleotydów.

Denaturująca elektroforeza na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) jest najpowszechniej stosowaną techniką elektroforetyczną.

Izoelektroogniskowanie (IEF) jest techniką rozdzielania elektroforetycznego białek, używaną do rozdzielania cząsteczek różniących się składem aminokwasowym, co wpływa na różnice między ich punktami izoelektrycznymi. Przy połączeniu rozdzielania IEF w pierwszym kierunku i SDS-PAGE w drugim, można otrzymać bardzo dokładny obraz elektroforetyczny białek. Tego typu elektroforeza dwukierunkowa (2-D) jest wykorzystywana m.in. w badaniach medycznych.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodą elektroforezy natywnej w żelu poliakrylamidowym.

I. ROZTWORY PODSTAWOWE

1 M bufor Tris-HCl pH 8,8 (żel rozdzielający)

1 M bufor Tris-HCl pH 6,8 (żel zagęszczający)

30% roztwór akrylamidu i N,N-metyleno-bis-akrylamidu (Akryl-bis-akryl) zmieszanych w stosunku 30 : 1

10% roztwór nadsiarczanu amonu (APS) – przygotowany bezpośrednio przed użyciem

TEMED (N,N,N,N',N'-czterometylenodwuamina)

20% roztwór SDS (siarczanu dodecyłu)

Bufor migracyjny o składzie 25 mM Tris; 192 mM glicyna (do elektroforezy denaturującej zawierający ponadto 0,1% SDS).

Wszystkie prace z akrylamidem należy wykonywać w rękawiczkach !

II. PRZYGOTOWANIE ŻELU ROZDZIELAJĄCEGO

Do niewielkiej zlewki ostrożnie odpipetować odpowiednie ilości (**wg załączonej tabelki**) buforu Tris-HCl (pH 8,8), roztworu akryl-bis-akryl oraz wody redestylowanej. Przygotowując żele do elektroforezy denaturującej mieszaninę uzupełnić odpowiednią ilością roztworu SDS. Całość delikatnie zamieszać. Następnie dodać APS oraz TEMED, powtórnie delikatnie zamieszać i wylewać żele na przygotowane odpowiednio płytki do wysokości zaznaczonej na aparacie. Na powierzchnię żelu delikatnie nawarstwić niewielką ilość wody redestylowanej i

pozostawić do spolimeryzowania (ok. 30 min.). Po zakończeniu polimeryzacji usunąć wodę i ostrożnie osuszyć powierzchnię żelu bibułą.

Uwaga: pierwszego dnia ćwiczeń przygotować 12,5 % żele (do elektroforezy natywnej oraz denaturującej), natomiast drugiego dnia 7 % żele rozdzielające (do elektroforezy natywnej).

	Żel 12,5 %		Żel 7 %	
	natywna	denaturująca	natywna	denaturująca
Tris-HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Akryl-bis-akryl	8,35 ml	8,35 ml	4,65 ml	4,65 ml
woda	4,1 ml	3,95 ml	7,8 ml	7,7 ml
SDS	-	100 µl	-	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl

III. PRZYGOTOWANIE ŻELU ZAGĘSZCZAJACEGO

Do niewielkiej zlewki ostrożnie odpipetować odpowiednie ilości (wg załączonej tabelki) buforu Tris-HCl (pH 6,8), roztworu akryl-bis-akryl oraz wody redestylowanej. Przygotowując żele do elektroforezy denaturującej mieszaninę uzupełnić odpowiednią ilością roztworu SDS. Całość delikatnie zamieszać. Następnie dodać APS oraz TEMED, powtórnie delikatnie zamieszać i nawarstwić na powierzchnię żelu rozdzielającego. W przygotowanych płytkach umieścić „grzebień”.

	Żel 4,5%	
	natywna	denaturująca
Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	1,25 ml
Akryl-bis-akryl	1,5 ml	1,5 ml
woda	7,1 ml	7,0 ml
SDS	-	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl
APS	100 µl	100 µl

IV. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO ELEKTROFOREZY

Badany ekstrakt połączyć w stosunku 4 : 1 z buforem do prób (mieszanina o składzie 0,3 M Tris-HCl o pH 6,8; 50% glicerol; 0,2% błękit bromofenolowy oraz w przypadku prowadzenia elektroforezy denaturującej 5% SDS oraz β-merkaptoetanol w ilości 100 µl do 900 µl buforu do prób). Ekstrakty zmieszane z buforem do prób podczas wykonywania elektroforezy denaturującej gotować w temp. 95°C przez 4 min. i następnie ostudzić do temperatury pokojowej.

V. NANIESIENIE PRÓB I PRZEPROWADZENIE ELEKTROFOREZY

Płytki z przygotowanym żelem przenosimy z aparatu do wylewania żelu do aparatu do elektroforezy. Jeżeli to konieczne usuwamy resztki żelu znajdujące się na zewnątrz płytek. Pomiedzy płytki a ściany aparatu oraz na dno naczynia wlewamy bufor migracyjny. Ostrożnie usuwamy grzebień. Do powstałych studzienek наносimy przygotowane próby lub wzorce białek. Następnie zamykamy komorę aparatu i podłączamy aparat do zasilacza. Elektroforezę prowadzimy przy przyłożonym napięciu ok. 200V i natężeniu 40 mA na żel. Podczas przeprowadzania elektroforezy natywnej żele należy utrzymywać w temp. ok. 4°C.

Gdy barwnik znajdzie się na końcu płytki wyłączamy zasilacz i wyjmujemy płytki z aparatu.

VI. BARWIENIE

Żele barwimy w 0,25 Coomasie Blue R-250 w mieszaninie metanol : kwas octowy : woda (5:1:1) przez ok. 1 godz. i następnie odbarwiamy w mieszaninie 30% metanol i 10% kwas octowy kilkakrotnie zmieniając roztwór do barwienia.

VII. WYWOŁANIE AKTYWNOŚCI PEROKSYDAZ

Substraty: 0,2 M guajacol w 100 mM buforze octanowym pH 5,0 lub 0,01 M pirogallol w 50 mM buforze octanowym pH 5,0

Żel zanurzyć na 30 min w 20 ml roztworu odpowiedniego substratu, następnie dodać H₂O₂ do stężenia końcowego 0,1%. Żele inkubować w roztworze aż do pojawienia się prążków.

Substrat: o-dianizydyna

Żel płukać dwukrotnie przez 10 min. w 50 mM buforze octanowym o pH 5,0 z dodatkiem 1 mM MgCl₂ oraz 1 mM CaCl₂ (2 x 40 ml). Następnie dodać roztworu o-dianizydyny (25 mg/ml wody) w ilości 254 µl na 40 ml buforu oraz 1 M nadtlenu wodoru w ilości 20µl na 40 ml buforu. Żele inkubować w roztworze aż do pojawienia się prążków.

Barwa prążków jest nietrwała, dlatego należy jak najszybciej utrwalić otrzymany obraz.

VIII. WYWOŁANIE AKTYWNOŚCI DYSMUTAZ PONADTLENKOWYCH

Żel inkubować w ciemności przez 30 min., w temperaturze pokojowej w buforze o składzie: 50 mM bufor fosforanowy o pH 7,8; 10 mM EDTA; 28 mM TEMED; 30 µM ryboflawina; 245 µM błękit tetrazoliowy. Następnie żele wywoływać na świetle do uzyskania wyraźnych jasnych prążków na niebieskim tle.

Zadanie 6






WYSOKOSPRAWNA CHROMATOLOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

Współczesna chromatografia cieczowa określana jest, jako wysokosprawna chromatografia cieczowa (lub wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa), HPLC. Nazwa ta podkreśla najistotniejsze cechy: wysoką sprawność, dobrą rozdzielczość, dużą szybkość procesu i stosowanie wysokich ciśnień. Analizę mieszanin techniką HPLC wykonuje się przy użyciu chromatografów cieczowych. W urządzeniach tych fazę ruchomą ze zbiornika pompuje się (po filtracji i odgazowaniu) przez kolumnę chromatograficzną. Analizowaną próbkę wstrzykuje się w postaci wąskiego pasma, gdyż tzw. pozakolumnowe poszerzenie pasma, ma istotny wpływ na wartości współczynnika retencji. Wypływające z kolumny próbki są wykrywane przez detektor, a sygnał przekazywany w postaci zapisu cyfrowego.

W HPLC powszechnie stosowane są dwa typy wypełnień:

- na bazie krzemionki
- na bazie żywic porowatych/silikonu

Podstawowym nośnikiem jest mikroporowata krzemionka o małych ziarnach (3-10 μm). Fazy chemicznie związane z krzemionką mogą mieć różny charakter chemiczny:

-  wypełnienia z polarnymi grupami – **faza normalna** (NP), w takim układzie faza stacjonarna jest bardziej polarna niż faza ruchoma. Podstawowym rozpuszczalnikiem (fazą ruchomą) jest rozpuszczalnik niepolarny, najczęściej heksan, a jego moc elucyjną modyfikuje dodatek np. chloroformu.
-  wypełnienia z niepolarnymi grupami – **faza odwrócona** (RP), w takim układzie faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. Jako eluentów używa się najczęściej mieszaniny metanol-woda lub acetonitryl-woda.
-  wypełnienia z grupami jonowymiennymi – do chromatografii jonów
-  wypełnienia z grupami optycznie czynnymi – do rozdzielania mieszanin racemicznych
-  sita molekularne – do rozdzielania mieszanin pod względem wielkości cząsteczek

Czas retencji składników próbki regulowany jest przez odpowiedni dobór mocy elucyjnej fazy ruchomej. Skład eluentu może być jednakowy przez cały czas rozdzielania (**elucja izokratyczna**) lub zmieniać się (**elucja gradientowa**).

Technika HPLC jest stosowana do rozdziału:

- związków biologicznie czynnych: białek, polipeptydów, aminokwasów, witamin, sterydów, fenylopropanoidów, kwasów nukleinowych;
- preparatów farmaceutycznych
- środków ochrony roślin
- węglowodorów policyklicznych i innych zanieczyszczeń środowiskowych
- związków metaloorganicznych i kompleksowych
- pierwiastków ziem rzadkich

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką rozdziału mieszaniny związków organicznych (związków fenolowych frakcji cytoplazmatycznej liści roślin) przy użyciu chromatografu cieczowego i kolumny o fazie odwróconej.

Rozdział mieszaniny związków fenolowych prowadzony będzie przy użyciu chromatografu cieczowego firmy Shimadzu, wyposażonego w kolumnę COSMOSIL(R) Cholester (5 μm) z prekolumną Bionacom (Filter Column Protector 316). Fazą ruchomą jest układ acetonitryl/ kwas octowy/woda (10/2/88, v/v/v). Kwasy fenolowe wykrywane będą przy $\lambda = 330 \text{ nm}$ przez detektor VWM 2141 i identyfikowane przez porównanie z wzorcami. Zawartość każdego związku fenolowego obliczana jest przy użyciu integratora komputerowego na podstawie zliczania powierzchni szczytów i porównywania z krzywymi kalibracyjnymi dla poszczególnych związków.

I. OTRZYMYWANIE WOLNYCH ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH

Do zakręczanych probówek szklanych (Pyrex) dodać 500 μl (w dwu powtórzeniach) ekstraktu otrzymanego od prowadzącego ćwiczenie. Dodać 1.5 ml wody destylowanej i 2 ml 4M kwasu trójfluorooctowego. Probówki lekko zakręcić i wstawić na 30 min. do suszarki o temperaturze 110°C. Po zakończeniu hydrolizy probówki schłodzić ostrożnie pod bieżącą wodą. Przeprowadzić trzykrotną ekstrakcję octanem etylu (porcjami po 2 ml). Octan etylu odparować w strumieniu zimnego powietrza. Kwasy fenolowe rozpuścić w dokładnie 500 μl metanolu do HPLC. Przechowywać w temperaturze <0°C.

II. OZNACZANIE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH METODĄ FOLINA

Do małych probówek odpipetować po 15 μl roztworów metanolowych zawierających kwasy fenolowe (w 3 powtórzeniach). Do probówek przygotowanych dla krzywej wzorcowej odpipetować kolejno 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 μg kwasu ferulowego (w 3 powtórzeniach). Uzupełnić wodą dejonizowaną do 250 μl . Do próby kontrolnej („ślepej”) dodać od razu 250 μl wody dejonizowanej. Dodać 250 μl odczynnika Folina & Ciocalteu’a (rozcieńczonego dwukrotnie). Inkubować w temperaturze pokojowej **dokładnie** 3 min. Następnie dodać 500 μl nasyconego roztworu Na_2CO_3 , dokładnie wymieszać i inkubować 1 godz. Mierzyć przy $\lambda = 750 \text{ nm}$. Zawartość kwasów fenolowych wyrazić w mg/g świeżej masy.

III. ROZDZIAŁ I IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH METODĄ HPLC

Przygotować układ rozpuszczalników: woda-acetonitryl-kwas octowy (88/10/2, v/v) i przesączyć przez filtr nylonowy (Nalgene, 0.2 μm). Uruchomić pompy i przez 15 min płukać kolumnę (przepływ 2 ml/min, nie przekraczać ciśnienia 12 MPa). Rozdzielić przygotowane wzorce, a następnie związki fenolowe otrzymane w pkt. 1. (po przesączeniu przez filtr z octanu celulozy 0.2 μm).

Dokonać identyfikacji związków fenolowych przez porównanie ze wzorcami.