

# BIOKEMIJSKI PRAKTIKUM 2013/2014

- **Seminarji:** ponedeljek
- **Vaje:** torek, 13-16 in 16-19  
sreda, 13-16 in 16-19
- **Asistenti:** dr. Miha Pavšič  
dr. Marina Klemenčič  
Aljaž Gaber, univ. dipl. biokem.

(ime.priimek@fkkt.uni-lj.si)

# LOKACIJA

- Katedra za biokemijo, FKKT

Cesta v Mestni log 88a  
1000 Ljubljana

- Avtobus št. 1  
(smer via Mestni log)
- Izstop postaja Koprška,  
mimo trgovine TUŠ,  
poslovna stavba AMIS,  
2. nadstropje



# OCENJEVANJE

- Oceno predmeta sestavlja: 20 % poročila  
80 % zaključni izpit

Datum	Ura	Predmet	Za način izvedbe	Predavalnica
26. junij 2014	12:00	Biokemijski praktikum - BK111	redni študij	223-FKKT
22. avgust 2014	12:00	Biokemijski praktikum - BK111	redni študij	223-FKKT

- Kolokvijska termina?

DATUM	VAJA	SEMINAR VODI
3.3.	1_Biološko tveganje in aseptično delo	asist. dr. Marina Klemenčič
10.3.	2_Homogenizacija in obarjanje	prof. dr. Brigita Lenarčič
17.3.	3_Gelska kromatografija	prof. dr. Brigita Lenarčič
24.3.	4_Ionska + afinitetna krom. + encimski testi	prof. dr. Brigita Lenarčič
31.3.	5_NaDS PAGE	prof. dr. Brigita Lenarčič
7.4.	6_Imunološke metode	asist. dr. Marina Klemenčič
14.4.	7_Bradford	asist. dr. Marina Klemenčič
21.4.	8_PyMol	asist. Aljaž Gaber
28.4.	/	
5.5.	9_Določanje št. cisteinov	asist. Aljaž Gaber
12.5.	10_Holesterol	asist. Aljaž Gaber
19.5.	11_Encimska kinetika	asist. dr. Miha Pavšič
25.5.	12_Izolacija krom. DNA in hiperkromni efekt	asist. dr. Miha Pavšič
2.6.	13_Izolacija DNA iz bakterij in AGE	asist. dr. Miha Pavšič

# I.VAJA – BIOLOŠKO TVEGANJE



**Kadar koli so ljudje na svojem delovnem mestu v stiku**

- z naravnimi ali organskimi materiali, kot so prst, glina, rastlinski material (seno, slama, bombaž itd.),
- s snovmi živalskega izvora (npr. volna, dlaka),
- s hrano,
- z organskim prahom (npr. moka, papirni prah, odmrle celice kože),
- z vodo, odpadno vodo,
- s krvjo in drugimi telesnimi tekočinami,

**so lahko izpostavljeni biološkemu dejavniku.**

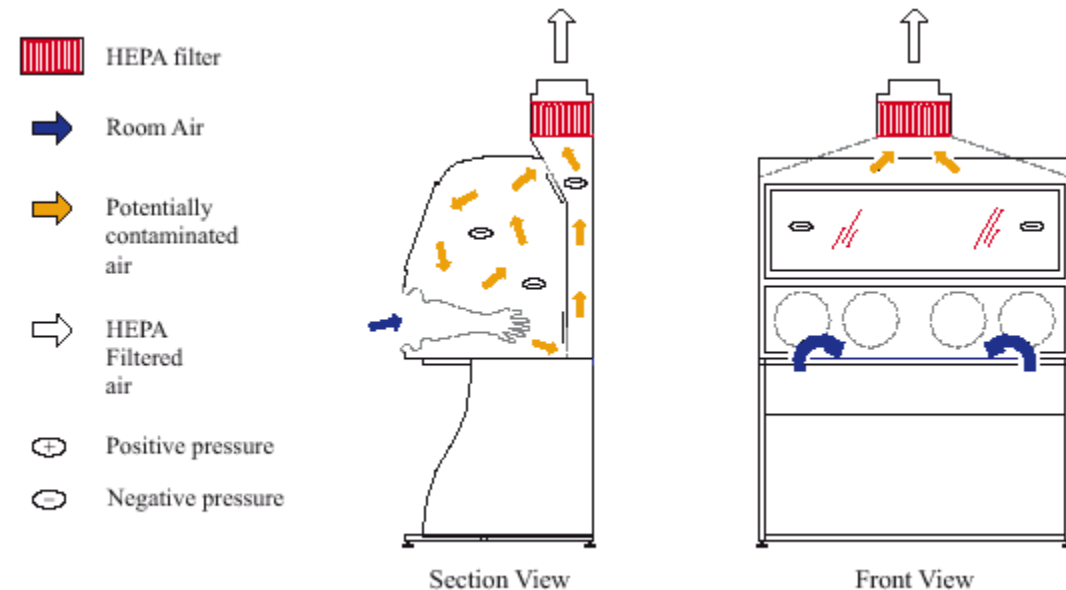
Dejavnosti	Tveganja	Preventivni ukrepi
<b>Proizvodnja hrane (sir, jogurt, salama), proizvodnja prehranskih dodatkov, pekarnice</b>	Plesni/kvasovke, bakterije in pršice povzročajo alergije Organski prahovi zrn, mleka v prahu ali moka, okužene z biološkimi dejavniki Toksini (strupi), denimo botulinotoksini ali aflatoksini	Zaprti procesi Preprečevanje nastajanja aerosolov Ločevanje okuženih delovnih prostorov Ustrezni higienski ukrepi
<b>Zdravstvo</b>	Številne virusne in bakteriološke okužbe, npr. HIV, hepatitis ali tuberkuloza Poškodbe z iglo	Varno ravnanje z okuženimi predmeti, ostrimi odpadki, okuženim perilom in drugim materialom Varno ravnanje in čiščenje polite krvi in drugih telesnih tekočin Ustrezna varovalna oprema, rokavice, oblačila, očala Ustrezni higienski ukrep
<b>Arhivi, muzeji, knjižnice</b>	Plesni/kvasovke in bakterije povzročajo alergije in težave z dihanjem	Zmanjševanje aerosolov in prahu Dekontaminacija Ustrezna osebna varovalna oprema

Dejavnosti	Tveganja	Preventivni ukrepi
<b>Laboratoriji</b>	Okužbe in alergije pri ravnanju z mikroorganizmi in celičnimi kulturami, npr. s človeškimi tkivi Naključna razlitja in poškodbe z iglo	Mikrobiološko varni kabineti Ukrepi za zmanjševanje aerosolov in prahu Varno ravnanje z vzorci in njihovo prevažanje Ustrezna osebna zaščita in higienski ukrepi Dekontaminacija in ukrepi pri razlitju Omejen dostop Nalepka za opozarjanje na biološko nevarnosti

# BIOLOŠKO VARNI KABINETI

Biološki varovalni kabineti so namenjeni varnemu delu z biološkimi materiali. Glede na izvedbo in tudi uporabo jih delimo v tri skupine (I, II in III). Bistveni sestavni del bioloških varovalnih kabinetov so posebni filtri, ki zadržijo 99,97 % delcev velikosti 0,3  $\mu\text{m}$  in s tem sterilizirajo zrak.

**Biološki varovalni kabineti I** delujejo tako, da črpajo zrak iz okolice skozi odprtino za delo in potem filtriranega spuščajo v okolico skozi odprtino na vrhu kabineta. Na ta način ščitijo pred okužbo delavca, ne pa materiala, s katerim ta dela.

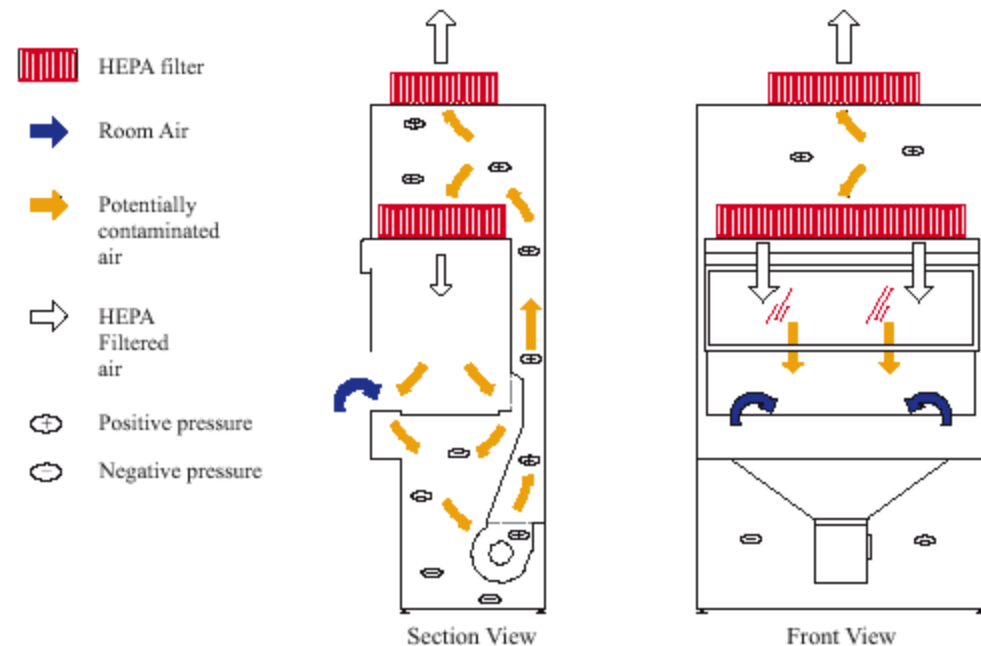




# BIOLOŠKO VARNI KABINETI

Biološki varovalni kabineti so namenjeni varnemu delu z biološkimi materiali. Glede na izvedbo in tudi uporabo jih delimo v tri skupine (I, II in III). Bistveni sestavni del bioloških varovalnih kabinetov so posebni filtri, ki zadržijo 99,97 % delcev velikosti  $0,3 \mu\text{m}$  in s tem sterilizirajo zrak.

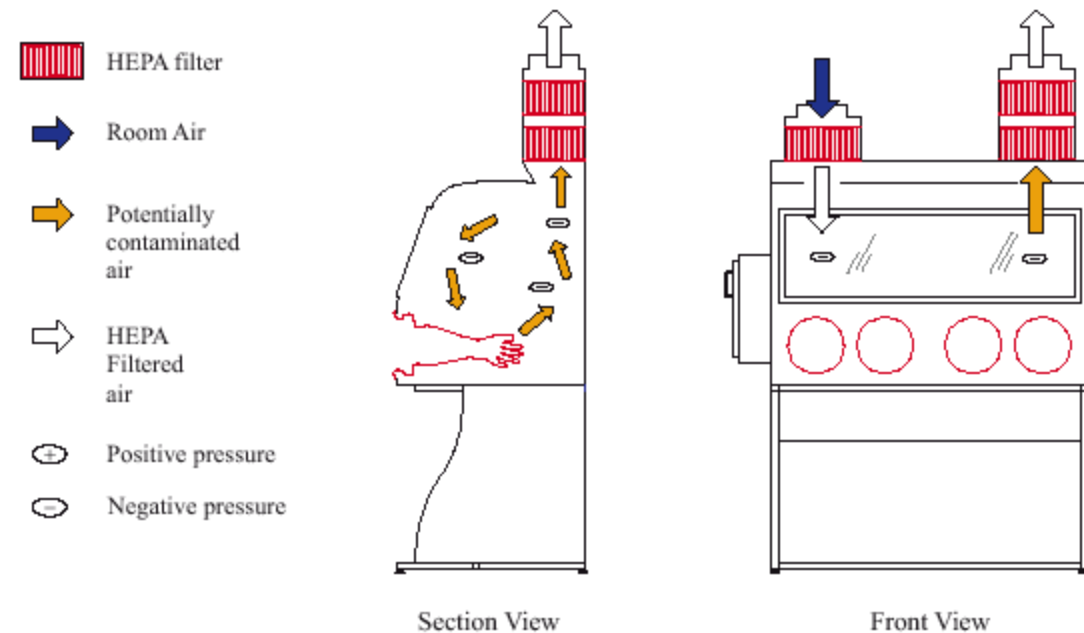
**Biološki varovalni kabineti II** zrak, ki ga črpajo iz okolice, najprej prefiltrirajo, potem sterilni zrak črpajo z vrha kabine proti delovni površini, nakar ta zrak še enkrat prefiltrirajo in spustijo v okolico. Tako ščitijo pred okužbo delavca in material, s katerim se dela. Poznamo več izvedb bioloških varovalnih kabinetov II, ki se razlikujejo po deležu zraka, ki se v kabinetu reciklira.



# BIOLOŠKO VARNI KABINETI

Biološki varovalni kabineti so namenjeni varnemu delu z biološkimi materiali. Glede na izvedbo in tudi uporabo jih delimo v tri skupine (I, II in III). Bistveni sestavni del bioloških varovalnih kabinetov so posebni filtri, ki zadržijo 99,97 % delcev velikosti  $0,3 \mu\text{m}$  in s tem sterilizirajo zrak.

**Biološki varovalni kabineti III** so namenjeni delu z vzorci, ki vsebujejo najbolj nevarne patogene organizme. Zrak se filtriran črpa navzdol proti delovni površini in vrača v okolico skozi dva zaporedna filtra. Material se vnaša in jemlje iz kabineta skozi avtoklav z dvojimi vrati, kar omogoča sterilizacijo materiala, preden ga vzamemo iz kabineta. Delavec rokuje z materialom s pomočjo rokavic.



# BIOLOŠKO VARNI KABINETI

Biološki varovalni kabineti so namenjeni varnemu delu z biološkimi materiali. Glede na izvedbo in tudi uporabo jih delimo v tri skupine (I, II in III). Bistveni sestavni del bioloških varovalnih kabinetov so posebni filtri, ki zadržijo 99,97 % delcev velikosti  $0,3 \mu\text{m}$  in s tem sterilizirajo zrak.

**Biološki varovalni kabineti III** so namenjeni delu z vzorci, ki vsebujejo najbolj nevarne patogene organizme. Zrak se filtriran črpa navzdol proti delovni površini in vrača v okolico skozi dva zaporedna filtra. Material se vnaša in jemlje iz kabineta skozi avtoklav z dvojimi vrati, kar omogoča sterilizacijo materiala, preden ga vzamemo iz kabineta. Delavec rokuje z materialom s pomočjo rokavic.



Dejavnosti	Tveganja	Preventivni ukrepi
Laboratoriji	Okužbe in alergije pri ravnanju z mikroorganizmi in celičnimi kulturami, npr. s človeškimi tkivi Naključna razlitja in poškodbe z iglo	Mikrobiološko varni kabineti Ukrepi za zmanjševanje aerosolov in prahu Varno ravnanje z vzorci in njihovo prevažanje Ustrezna osebna zaščita in higienski ukrepi Dekontaminacija in ukrepi pri razlitju Omejen dostop Nalepka za opozarjanje na biološko nevarnosti

# PRAVILA ZA DELO V LABORATORIJIH

- Po delu si vedno temeljito umijemo roke.
- V laboratoriju je prepovedano uživanje in shranjevanje hrane in pijač, kajenje in nanašanje kozmetičnih sredstev.
- Med delom se nikoli ne dotikamo obraza ali drugih nezaščitenih delov telesa.
- Pipetiranje z usti je prepovedano.
- Vse postopke, kjer bi lahko prišlo do nastanka aerosolov (mešanje, prepihovanje, sonificiranje), izvajamo previdno in počasi.
- Če se nam vzorec polije, polite površine pobrišemo in dekontaminiramo takoj.
- Vse vzorce, preden jih zavržemo, dekontaminiramo. Če v laboratoriju ni možnosti dekontaminacije, jih ustrezno zapakiramo za prevoz do prostorov za dekontaminacijo.

# RAVNANJE Z BIOLOŠKIMI ODPADKI

Vse biološke odpadke in ves material, ki so pri delu prišli v stik z vzorci, moramo sterilizirati, preden jih zavržemo ali operemo za ponovno uporabo. Način sterilizacije je odvisen od vrste materiala. Steklovino, kovinski pribor, tekočine in material iz plastičnih mas avtoklaviramo.

Čisto steklovino in kovinski pribor za ponovno uporabo lahko suho steriliziramo, tekočine, ki jih nameravamo zavržeti, pa lahko dekontaminiramo z dodatkom razkužil.



# RAVNANJE Z BIOLOŠKIMI ODPADKI

Če v laboratoriju ni ustrezne opreme za sterilizacijo, moramo odpadke pravilno zapakirati za prevoz do prostorov za sterilizacijo. Posebej moramo paziti na ostre predmete (igle, rezila), ki jih moramo zapreti v posebne škatle, da pri prevozu ne poškodujejo embalaže ali celo osebja.

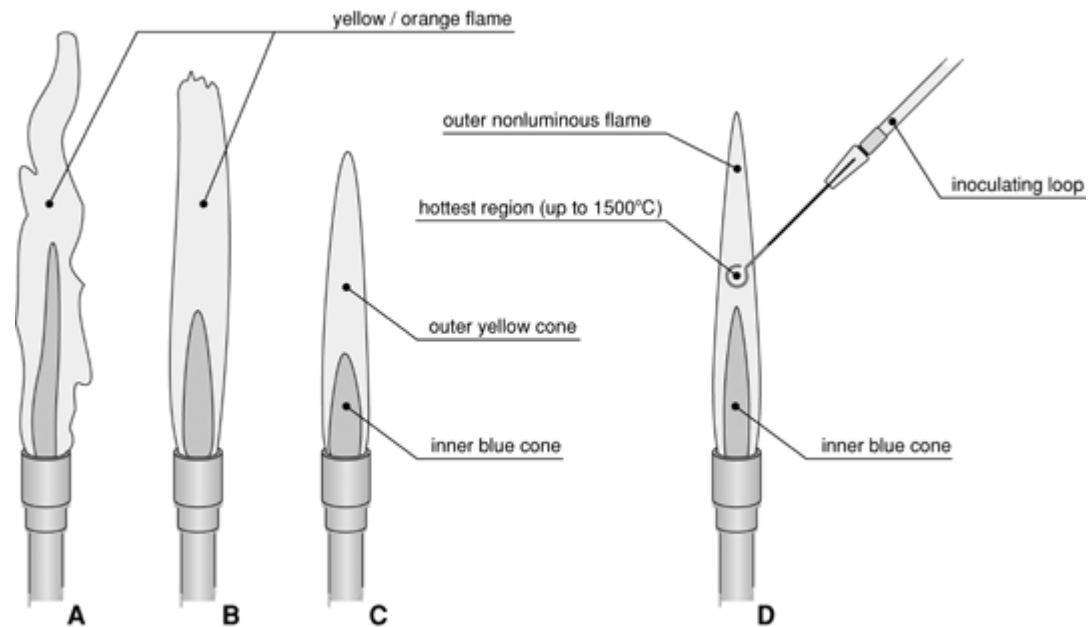


# I.VAJA – ASEPTIČNO DELO

- Vsak mikroorganizem, s katerim delamo, obravnavamo kot potencialno patogen. Zato z njim delamo previdno in aseptično ob plamenu plinskega gorilnika.
- Previdni moramo biti, da ne okužimo gojišč z mikrobi iz okolja ali laboratorija z delovnimi mikrobi.
- Kontaminiran material (material, ki je bil v stiku z živimi mikrobi) odlagamo v odlagalnike ali na označeno mesto (pozneje ga avtoklaviramo).



# I.VAJA – ASEPTIČNO DELO

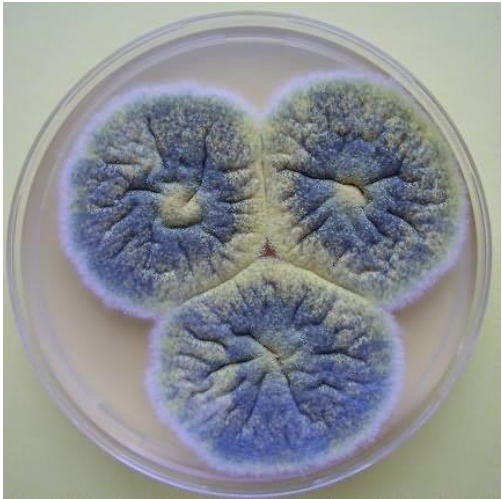
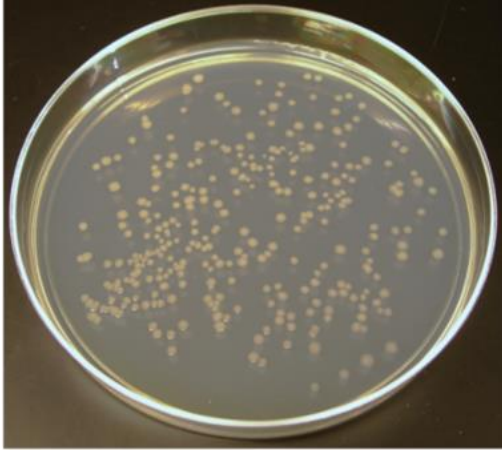


# GOJIŠČE LB



- Pepton/tripton = vir proteinov in aminokislin
- Kvasni ekstrakt = vir organskih molekul
- NaCl = uravnavanje osmolarnosti in vir natrija
- Agar = sredstvo za strjevanje

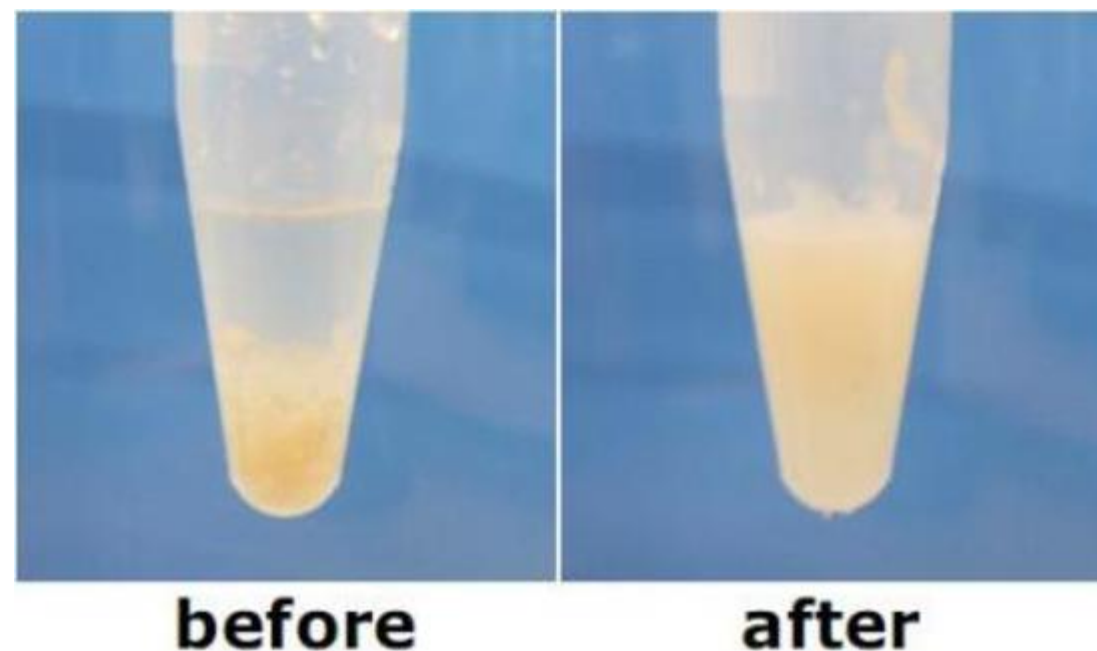




# I.VAJA – HOMOGENIZACIJA TKIVA IN CENTRIFUGIRANJE

**homogenizirati** -am nedov. in dov. (i) delati homogeno: homogenizirati snov

- *agr.* homogenizirati mleko, povzročati, delati, da je maščoba enakomerno porazdeljena po vsej tekočini;
- *metal.* homogenizirati jeklo, s toplotno obdelavo dosežati enakomerno sestavo in kristalno strukturo



# I.VAJA – HOMOGENIZACIJA TKIVA IN CENTRIFUGIRANJE

Metoda homogenizacije je odvisna od vrste tkiva iz katerega želimo izolirati, pogoji pa morajo biti takšni, da se **struktura** in s tem **funkcija** želene snovi, ne spremeni. Metode lahko razdelimo v 3 glavne skupine:

- FIZIKALNE METODE
- KEMIČNE METODE
- ENCIMSKE METODE

# FIZIKALNE METODE

## TERILNICA



## STEKLENE KROGLICE



# FIZIKALNE METODE

## ULTRAZVOK



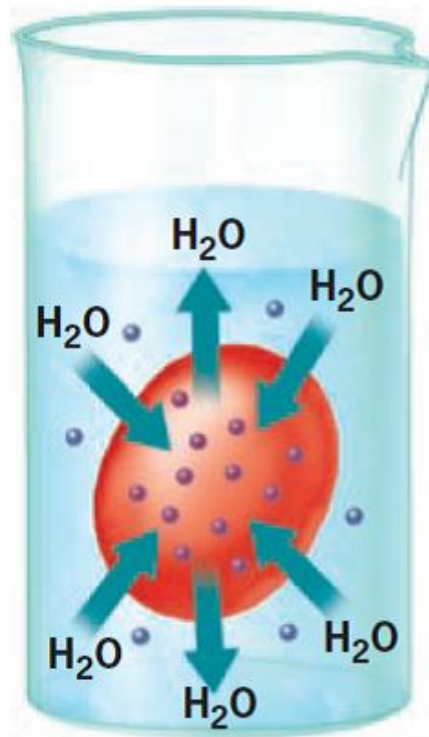
## TEFLONSKI HOMOGENIZER



# FIZIKALNE METODE

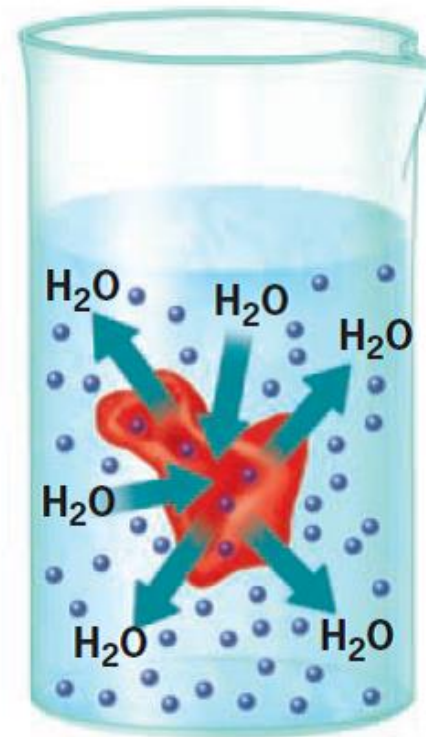
## OSMOZNI ŠOK

(a) Hypotonic solution



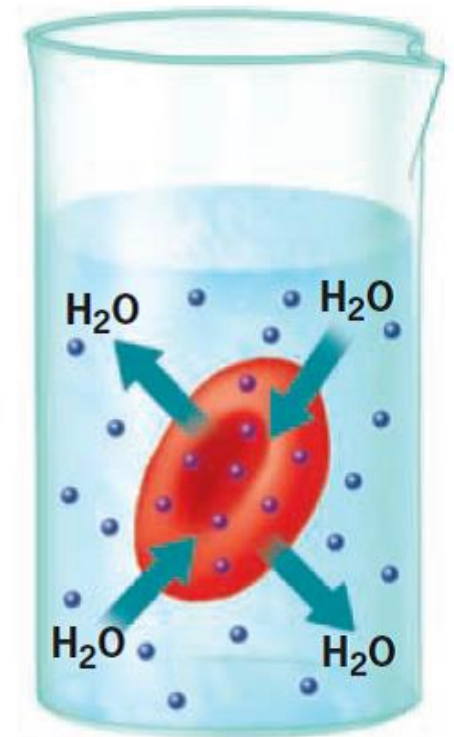
Net water gain  
Cell swells

(b) Hypertonic solution



Net water loss  
Cell shrinks

(c) Isotonic solution



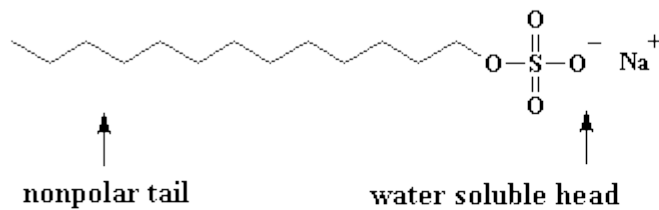
No net loss or gain



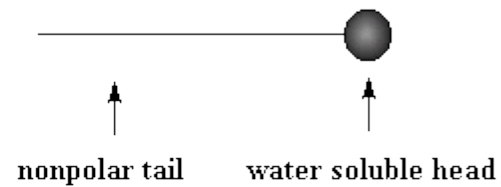
# KEMIČNE METODE

## DETERGENTI

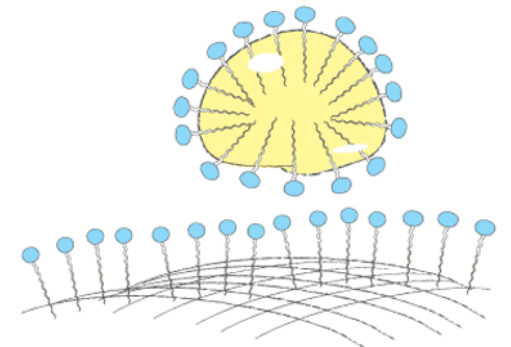
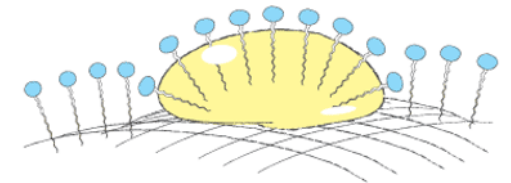
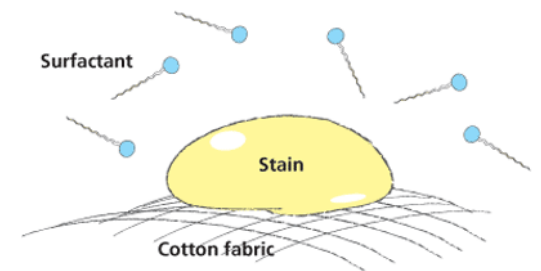
snovi z amfipatičnimi (hidrofilnimi in hidrofobnimi) lastnostmi



Sodium Lauryl Sulfate

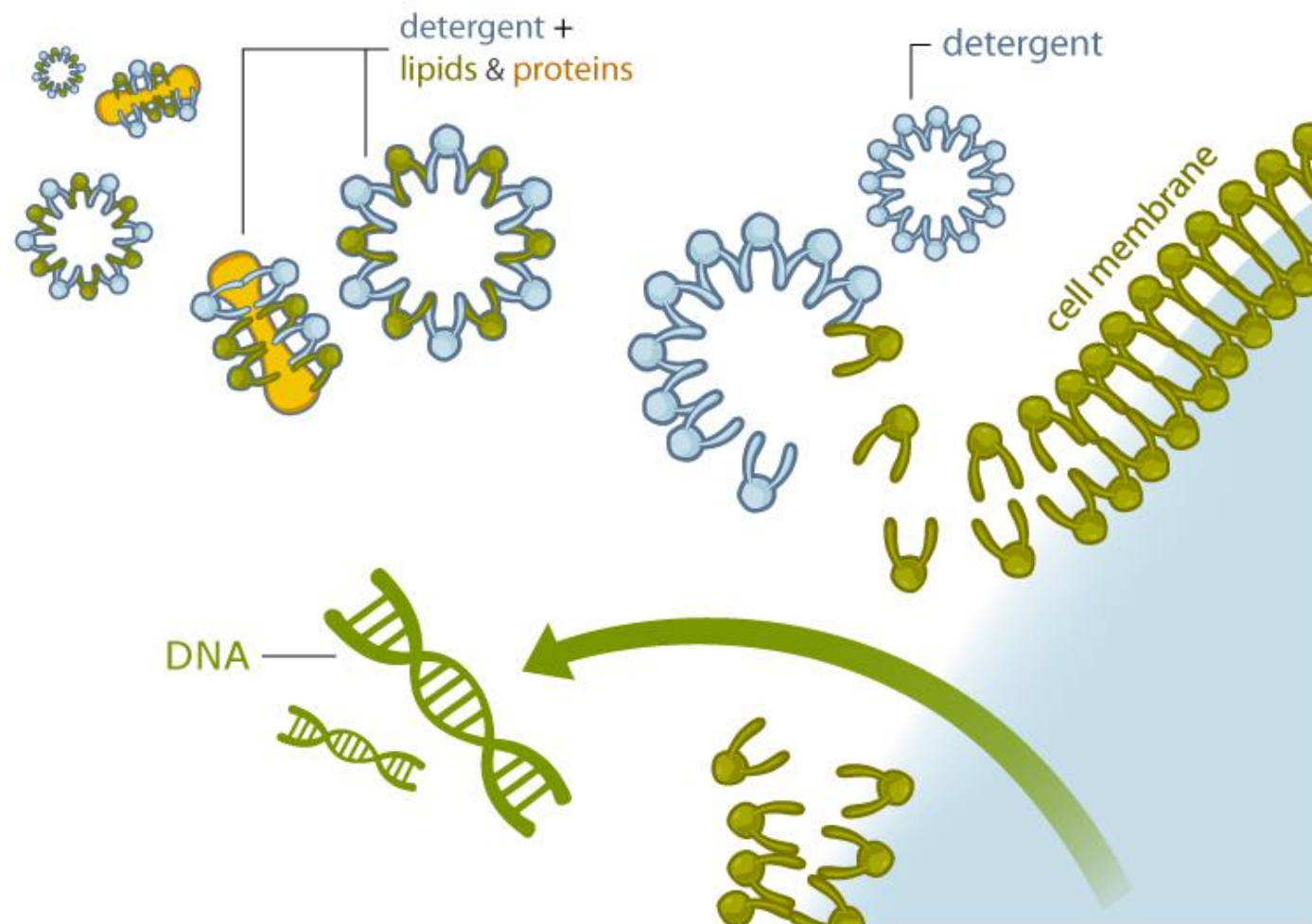


Lazy chemist's representation of Sodium Lauryl Sulfate



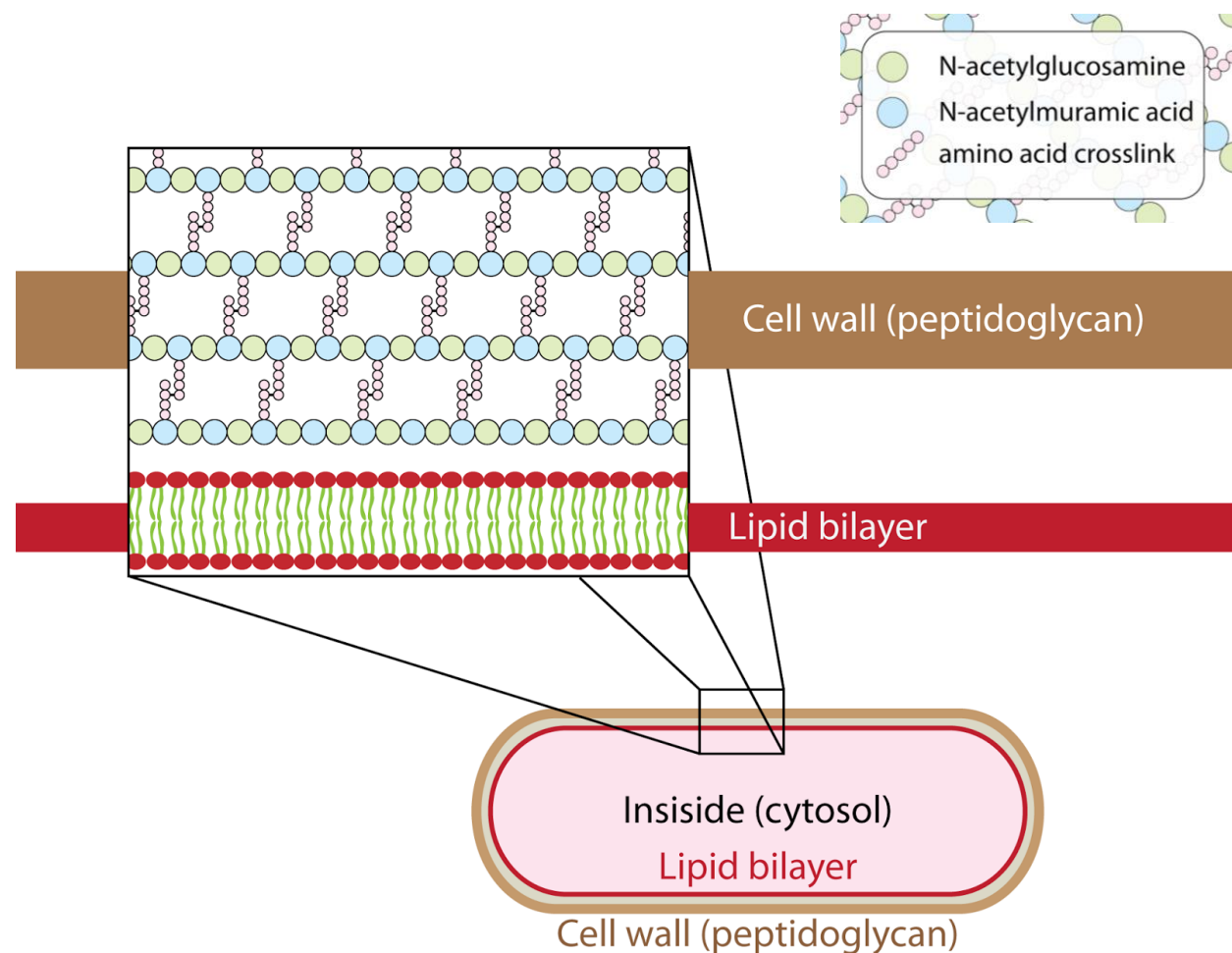
# KEMIČNE METODE

## DETERGENTI



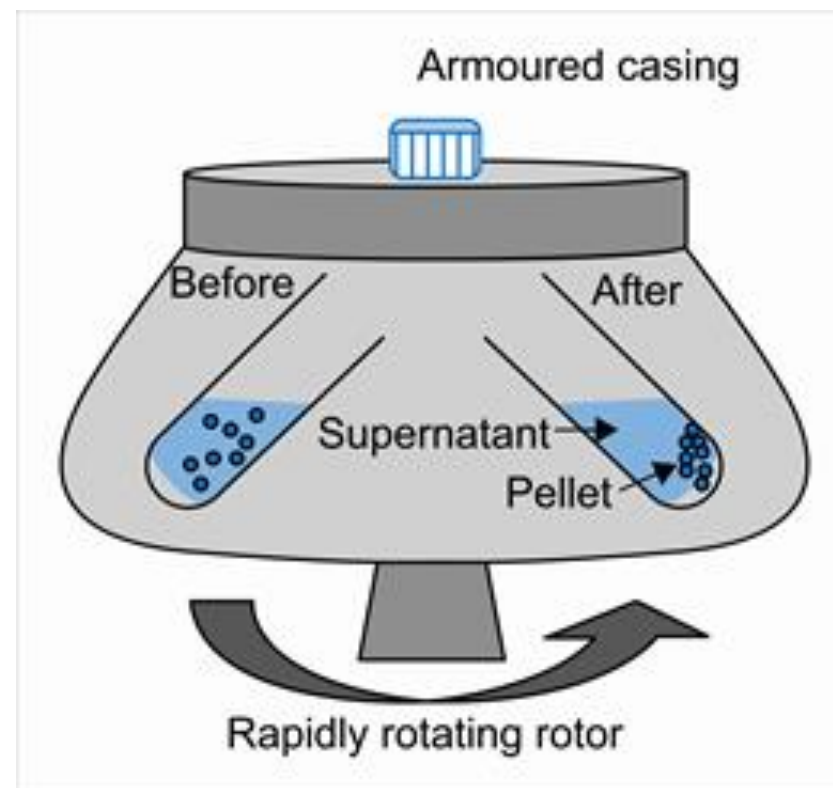
# ENCIMSKE METODE

- **Lizocim** je encim, s katerim lahko obdelamo stene bakterij, saj katalizira cepitev vezi med N-acetilmuraminsko kislino in N-acetilglukozaminom peptidoglikana, ki obdaja celično membrano bakterije.
- Za dezintegracijo celic drugih vrst tkiv lahko uporabimo tudi npr. **celulaze** (rastline) ali **hitinaze** (glive). **Fosfolipaze** lahko uporabimo za vse vrste membran.
- Za odstranitev lipidov lahko upobimo **lipaze**, za proteine pa različne vrste **proteinaz**.



# CENTRIFUGIRANJE

- Centrifugiranje je proces, pri katerem zaradi centrifugalne sile pride do posedanja delcev.
- Aparatura je **centrifuga**, posoda, v kateri se nahajajo vzorci pa **rotor**.
- Velikost nekaterih delcev je premajhna, da bi se posedli zaradi gravitacije, kar pomeni, da za njihovo posedanje potrebujemo večjo silo. Pogosto zasledimo tudi vrednost "g"; npr. na delec, ki se v razdalji 8 cm od osi rotorja vrti s 75.000 vrt./min, deluje centrifugalna sila, ki je 500.000-krat večja od Zemljine gravitacije (g). Pravimo, da ta vzorec centrifugiramo pri 500.000 g.



# CENTRIFUGIRANJE

**Rotor mora biti obremenjen simetrično,**

sicer se lahko os motorja, na katerega je rotor pritrjen, zvije, v skrajnem primeru lahko rotor zleti z osi.



# I.VAJA – POTEK DELA

STERILNO PRECEPLJANJE BAKTERIJSKE KULTURE *E.COLI* NA PLOŠČE LB



HOMOGENIZACIJA GOVEJIH JETER IN LOČITEV FRAKCIJ

