

Molekularne osnove ved o življenju

Navodila za vaje

za 1. letnik študijskih programov Kemija in Kemijsko inženirstvo

študijsko leto 2013/14

prof. dr. Marko Dolinar

Predgovor

Asistenti vam bodo na začetku vaj dali splošne napotke za pravilno in varno delo v laboratoriju. Ker boste na vajah uporabljali tudi nekatere zdravju nevarne reagente, bodite pri delu natančni in previdni, predvsem pa natančno sledite natisnjenim navodilom in nasvetom asistentov.

Na vaje morate priti pripravljeni – to pomeni, da morate prebrati in razumeti teoretični del vsake vaje. Če kaj ni jasno, si morate to razjasniti pred začetkom dela. Asistenti lahko preverjajo vašo pripravljenost na vaje in to upoštevajo pri oceni.

Navodila za vaje so zasnovana tako, da ima vsaka vaja teoretični uvod, ki mu sledijo napotki za izvedbo. Na ločenem listu je prostor za vpisovanje rezultatov, temu pa sledijo vprašanja, na katera boste morali odgovoriti takoj po končani vaji in liste z rezultati in odgovori na vprašanja pustiti asistentkam, da jih do naslednje vaje pregledajo in ocenijo. Poročila z vaj namreč predstavljajo 10 % skupne ocene predmeta, pri tem pa se upošteva tudi vaša pripravljenost in zavzetost pri opravljanju vaj.

Znanje, ki ga boste pridobili na vajah, bomo preverili na kolokvijih po končanih vajah. Ta ocena predstavlja nadaljnjih 20 % končne ocene predmeta. Dodatne informacije o ocenjevanju pri tem predmetu najdete v spletni učilnici in na wiki straneh tega predmeta.

Želim vam veliko uspeha pri delu v laboratoriju in pri interpretaciji rezultatov.

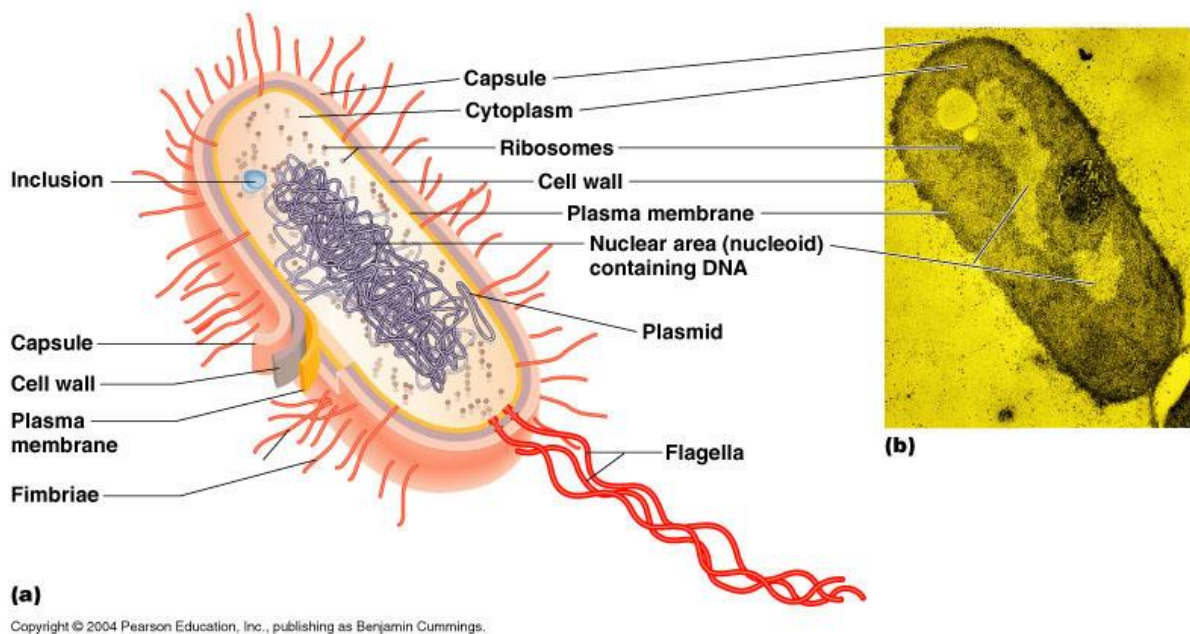
Marko Dolinar

KAZALO

1. Značilnosti celic	7
2. Metode za razbijanje celic	13
3. Določanje koncentracije proteinov	19
4. Elektroforezne metode za ločevanje bioloških makromolekul	25
5. Encimsko katalizirane reakcije	31
6. DNA – izolacija in lastnosti	41

1. Značilnosti celic

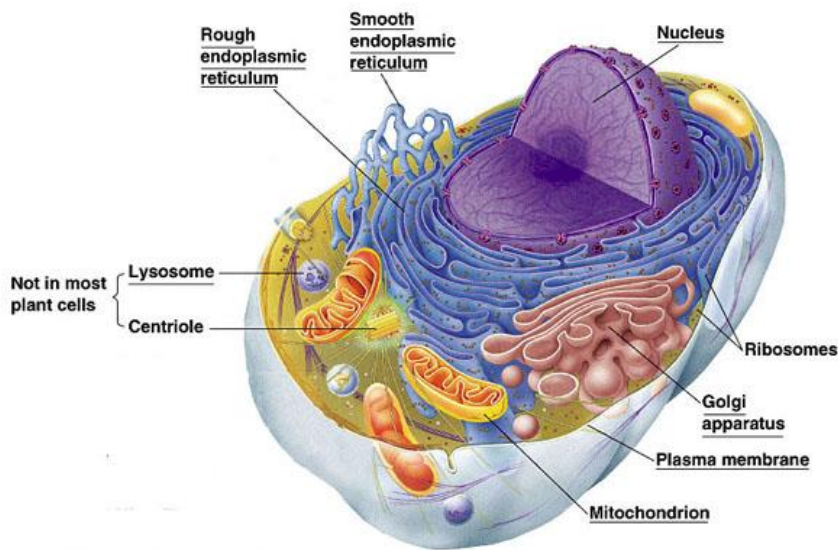
Prokariotski organizmi so predvsem bakterije, ki nimajo jedra niti organelov (slika 1). DNA je običajno v obliki enega krožnega kromosoma, lahko pa imajo še zunajkromosomsko DNA, ki je precej krajša, in se imenuje plazmid. Plazmidi lahko nastopajo v več deset kopijah in se ob celični delitvi tudi sami razporedijo v obe hčerinski celici, podvojujejo pa se hkrati s kromosomsko DNA. V bakterijski citoplazmi razen kromosoma najdemo še ribosome – to so kompleksi proteinov in RNA, na katerih poteka sinteza proteinov. Prokariotske celice so obdane z dvoslojno lipidno membrano. Pri grampozitivnih celicah je membrana prekrita z debelim peptidoglikanskim slojem, pri gramnegativnih pa je sloj tanek in nameščen v periplazemski prostor, ki ločuje notranjo membrano od zunanje. Zunanja membrana, ki ji skupaj s peptidoglikanskim slojem rečemo tudi stena, je prav tako dvoslojna, a ima zunanji sloj številne modificirane lipidne molekule, na katere so vezani sladkorni ostanki.



Slika 1: Shematski prikaz prereza skozi bakterijsko celico in fotografija, posneta pod elektronskim mikroskopom.

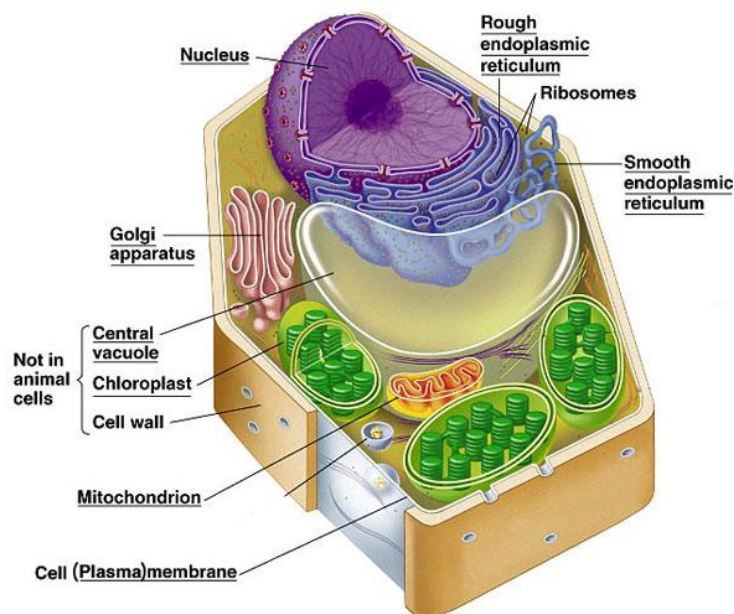
Evkarionti imajo jedro in številne organele, obdane z lipidnim dvoslojem (slika 2). Znotraj jedra je jedrce (nukleolus), ki predstavlja kromosomske regije z zapisi za ribosomsko RNA. Jedrce nima svoje ovojnice. Jedro komunicira z okolico preko jedrnih por – kompleksnih proteinskih struktur, ki omogočajo prehajanje RNA, nekaterih proteinov in manjših molekul. Na jedrno membrano se navezuje zrnati endoplazemski retikulum (ER). Zrnat je zato, ker so nanj pripeti ribosomi, proteini, ki se na njih sintetizirajo, pa vstopajo v notranjost (lumen) ER, kjer se zvijejo v funkcionalno obliko in delno glikozilirajo. Proteini nato z vezikli potujejo v Golgijev aparat (GA), kjer se nadaljuje proces zorenja proteinov. Iz GA brstijo vezikli, napolnjeni s proteini, ki potujejo proti celični membrani in se z njo zlijejo. Tovor, ki je v veziklih, se na ta način sprosti iz celice. Na enak način v celično membrano lahko vstopijo membranski proteini. Ne sintetizirajo pa se vsi proteini na zrnatih ER. Tisti proteini, ki ostanejo v citoplazmi, pa tudi tisti, ki se bodo vključili v strukturo

mitohondrijev, jedra in peroksisomov, se sintetizirajo na prostih ribosomih, ki se pogosto urejajo v verižne strukture – polisome. Lizosomi so celični razdelki, v katerih poteka razgradnja različnih makromolekul, v peroksisomih pa se razgrajuje vodikov peroksid, ki bi sicer bil za celico nevaren. Rastlinske celice (slika 3) nimajo lizosomov, zato pa imajo pogosto vakuole, v katerih imajo zalogo rezervnih snovi in vode. Druga pomembna razlika med rastlinskimi in živalskimi celicami je, da imajo rastlinske celice zelenih rastlin kloroplaste, na katerih poteka fotosinteza. Razen tega imajo rastlinske celice pogosto odebeljene stene, ki dajejo obliko in zaščito celicam, živalske pa imajo izrazit notranji skelet iz proteinskih polimerov.



Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

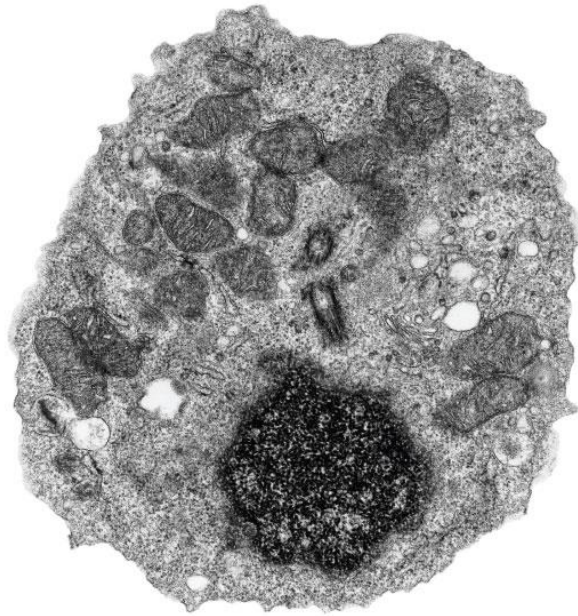
Slika 2: Shematski prikaz živalske celice.



Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Slika 3: Shematski prikaz rastlinske celice.

Na osnovi nekaterih fotografij poskušajte ugotoviti, kateri tip celic je predstavljen na slikah na straneh 11 in 12 in opisati znotrajcelične strukture, ki so na slikah vidne. Za primer je na sliki 4 predstavljena fotografija, posneta s transmisijskim elektronskim mikroskopom, ki predstavlja človeško celico (limfocit – to je ena od celic imunskega sistema).



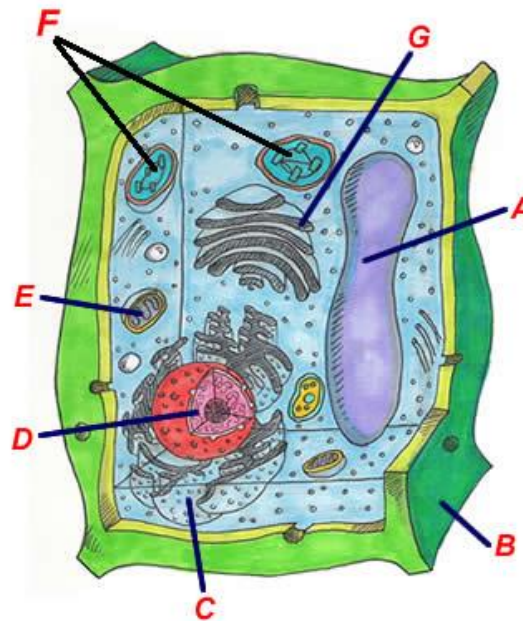
http://www.sinauer.com/cooper/4e/micro/01/01-02_AnimalCell%28NL-Large%29.jpg

Slika 4: Prerez skozi človeško imunsko celico.

Na naslednjem listu so slike preparatov, ki jih ustrezno opišite in oddajte v pregled asistentki še preden začnete z izvajanjem laboratorijske vaje (vaja št. 2)!

Poročilo 1. vaje: Celična zgradba

Na spodnji shemi celice vpišite, kaj predstavljajo strukture, označene z A do G !



<http://www.sciencegeek.net>

A
B
C
D

E
F
G

Na fotografiji na naslednji strani je elektronskomikroskopska slika celičnega preparata. Poskušajte ugotoviti, za kakšno celico gre in kaj so strukture, označene s črkami! Utemeljite!

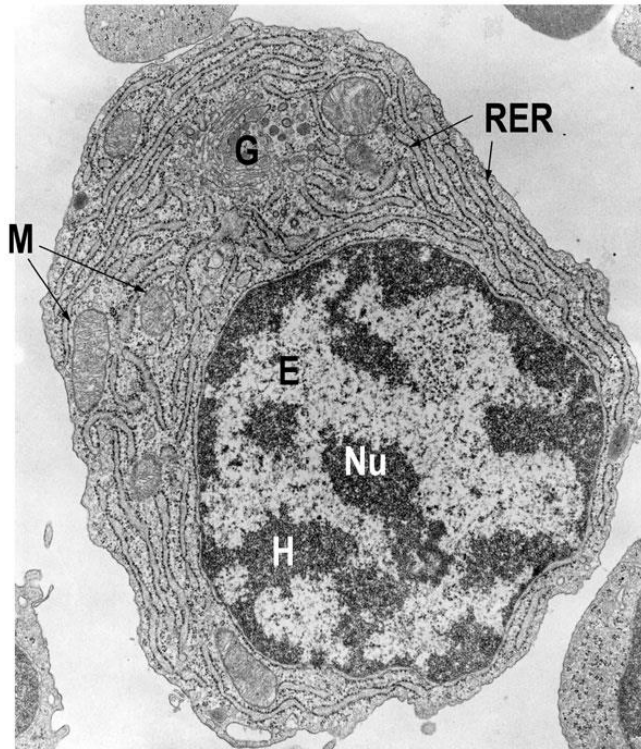
RER

NU

M

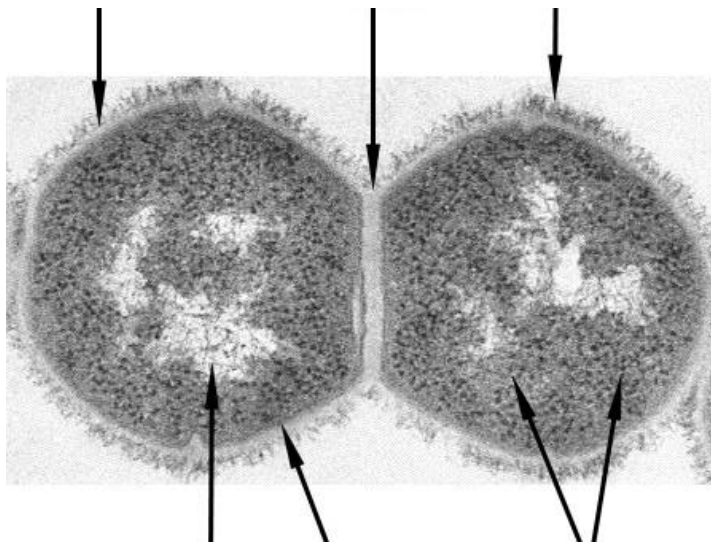
G

Ali vidite plazmalemo in razločite njeno strukturo?



UCSF School of Medicine

Poskušajte ugotoviti, za kateri tip celic gre in vpiši, kar je označeno s puščicami ! (srednja puščica zgoraj kaže na mesto, kjer se celici med selitvijo še stikata, septum)



<http://textbookofbacteriology.net>

2. Metode za razbijanje celic

Celice so obdane s celično membrano, ki jih varuje pred zunanjimi vplivi in omogoča, da izvajajo biokemijske reakcije v konstantnem okolju. To konstantnost označuje izraz homeostaza.

Razen celične membrane imajo nekatere vrste celic še izrazitejši zunanji sloj, ki ga imenujemo stena. Značilna je predvsem za celic višjih rastlin, pa tudi nekateri enoceličarji jo imajo.

Če želimo preučevati molekularne mehanizme v celici s tem, da iz celic najprej izoliramo biološke molekule, je treba celično ovojnico odstraniti. Za to obstaja veliko različnih postopkov, ki so odvisni od vrste tarčnih celic (oziroma tkiv ali organov), saj so ovojnice različno zgrajene. Postopek, s katerim pridemo do celične vsebine, imenujemo homogenizacija.

Za razbijanje živalskih celic večinoma zadošča, da homogeniziramo koščke tkiva v vodni raztopini soli (pogosto pa tudi dodatkov, ki stabilizirajo tarčne molekule) v mešalniku z nožki (slika 5). Pogosto zadošča že kuhinjski mikser.



Slika 5: Mešalnik z nožki.

Za manjše vzorce kuhinjski pripomočki niso primerni, saj niso prilagojeni za delo z manjšimi volumni, npr. 10 ml ali manj. V tem primeru uporabimo laboratorijske aparature, ki omogočajo delo z volumni tudi manjšimi od 1 ml. Na rotorski del elektromotorja je preko osi pritrjen nožek s premerom vsega nekaj mm, ki ga potopimo v vzorec in vklopimo motor. Zadošča že nekaj deset sekundno razbijanje.



Slika 6: Razbijanje tkiva v tarilnici.

Če gre za labilne molekule, je treba celice razbiti v zmrznjenem stanju. V tem primeru lahko koščke zamrznjenega tkiva tremo v tarilnici s pestilom, občasno pa dolivamo tekoči dušik (slika 6). Ta postopek lahko uporabimo tudi za rastlinska tkiva. Včasih zadošča, da delamo na ledu (tarilnica je nameščena v izolacijski posodi z drobljenim ledom).

Mehka tkiva, kakršno je na primer jetrno, lahko razbijemo s homogenizatorjem, ki je sestavljen iz široke steklene epruvete, v katero damo drobno narezan ali zmlet vzorec, nato pa z batom (steklenim ali teflonskim, ki je le malenkost ožji od epruvete) pritiskamo na vzorec. Tak homogenizator (slika 7) bomo uporabili pri 6. vaji. Na stiku med batom in steno epruvete nastanejo strižne sile, ki razbijejo celice.



Slika 7: Teflonski homogenizator.

Izvedbe so primerne za različne volumne, od približno 50 ml pa do manj kot 0,5 ml. V tem primeru ne uporabimo steklene epruvete, pač pa plastično mikrocentrifugirko.

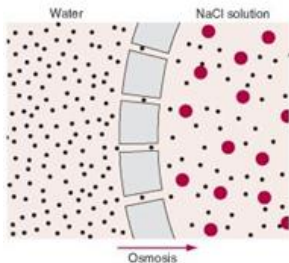
Po razbijanju tkiv prav gotovo ne uspemo razbiti celotnega vzorca. Pri tkivih lahko ostanejo ostanki veziv, žil in podobnega, pa tudi celice se niso vse razbile, tudi če smo jih uspeli ločiti od ostankov tkiva. Nerazbiti material lahko ločimo s filtriranjem skozi tkanino, še bolj učinkovito pa s centrifugiranjem.

Razbijanje kvasovk, ki so s hitinsko steno obdane kroglaste celice, poteka običajno tako, da suspenzijo celic stresamo s steklenimi kroglicami premera 0,5 mm. Za razbijanje bakterij pa sta v uporabi dve osnovni tehniki: osmozni šok in razbijanje z ultrazvokom.

Bakterijske celice v suspenziji, ki so izpostavljene ultrazvoku, zaradi strižnih in kavitacijskih sil začnejo pokati in njihova vsebina se sprosti. Tehnika je hitra in preprosta, zahteva pa posebno opremo, ultrazvočni razbijalnik (slika 8). Pri njegovi uporabi se vzorec močno segreje, zato ga hladimo z ledom. Pri delu uporabljamo zaščitne slušalke, saj so zvoki, ki pri delu nastajajo, za ušesa neprijetni, lahko pa tudi škodljivi za zdravje.



Slika 8: ultrazvočni razbijalnik celic.



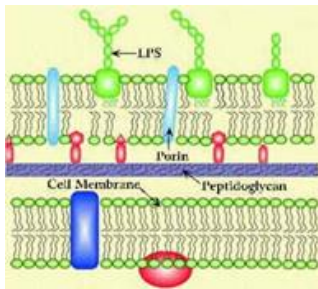
Slika 9: Princip osmoze.

Za razliko od uporabe ultrazvoka je razbijanje celic z osmotskim šokom do makromolekul v vzorcu zelo prijazno. V naravnem okolju mikroorganizmi običajno živijo v okolju, ki je po ionski moči podobno notranjosti celice. Tako okolje imenujemo izotonično. Če celice iz okolja osamimo (pri mikroorganizmih je to najpogosteje s centrifugiranjem), jih lahko nato v laboratoriju prenesemo v drugačno ionsko okolje. Na spremenjene ionske razmere se celice prilagajajo z osmozo. To je pojav, pri katerem voda prehaja membrano v smeri od nižje proti višji koncentraciji soli.

Če celice prenesemo v okolje z izrazito visoko koncentracijo soli (ionov), gre za hipertonično okolje. Žive celice se nanj odzovejo tako, da začnejo dvigati koncentracijo ionov v celici s tem, da izločajo vodo. Kmalu se lahko zgodi, da oddajo skozi membrano toliko vode, da se celica povsem skrči in odmre. Če pa celice prestavimo v hipotonično okolje, to je okolje z nizko koncentracijo soli (ali pa kar v destilirano vodo), pa bodo celice začele prilagajati svoje notranje ionske pogoje s tem, da bodo črpale vodo iz okolja. Ker pa celica ne more sprejeti veliko vode, saj njena ovojnica nima velike zmožnosti širjenja, ovojnica počni in vsebina se sprosti. Celice je na ta način mogoče razbiti samo, če gre za živalska tkiva ali za nekatere vrste bakterij, rastlinske celice pa imajo praviloma debelejšo steno, ki ne počni.

Pri današnji vaji bomo z osmotskim šokom razbijali bakterijske celice. Uporabili bomo bakterije *Escherichia coli* DH5 α (to je ime seva). Sicer je ta bakterijska vrsta običajni del črevesne flore, nekateri sevi pa so lahko patogeni in povzročajo prebavne motnje. Sev DH5 α je nepatogeni laboratorijski sev, ki ga pogosto uporabljajo pri genskem inženirstvu. V naravnem okolju ni sposoben preživetja, saj potrebuje za svojo rast v laboratoriju različne sestavine, ki jih v okolju ni mogoče najti v ustreznih koncentracijah.

Bakterije *E. coli* uvrščamo med gramnegativne, kar pomeni, da imajo razen celične membrane, ki zapira citoplazmo, še zunanjo membrano, ki jo običajno imenujemo



Slika 10: Celična ovojnica po Gramu negativnih bakterijskih celic.

celična stena (slika 10). Ta stena ima v zunanjem sloju po zgradbi bolj kompleksne lipide kot notranja membrana, saj vsebujejo delno razvejane verige ogljikovih hidratov (LPS - lipopolisaharidi z dolgimi stranskimi verigami) na zunanji strani stene. Med obema membranama je periplazemski prostor, ki ga pregrajuje peptidoglikanski sloj (omrežje, sestavljeno iz molekul ogljikovih hidratov, prečno povezanih s peptidi). Zaradi takšne sestave celične ovojnice je mogoče ob milih pogojih osmotsnega šoka razbiti le bolj rigidno zunanjo plast (steno), notranja pa je zaradi pretežno lipidne sestave bolj

prilagodljiva in ne počí takoj. Pri takem načinu dela bi lahko sprostili samo vsebino periplazme, v kateri je veliko različnih proteinskih molekul. Če pa osmotski šok izvajamo ob intenzivnem stresanju celic, pa večinoma popokajo tudi notranje membrane in v raztopino se razen periplazemskih proteinov sprostijo tudi citoplazemski proteini, pa tudi nukleinske kisline (teh v periplazmi sploh ni).

Za vajo bomo uporabili bakterije, ki so rasle preko noči v bogatem gojišču, ki ga sestavljajo kvasni ekstrakt (vir gradnikov iz razgrajenih celic kvasovk; vsebuje tudi vitamine), hidrolizat proteina kazeina (vir aminokislin za sintezo lastnih proteinov) in NaCl (0,4 %). Celice *E. coli* smo gojili pri 37 °C, ker je to optimalna temperatura za njihovo rast (temperatura človekovih prebavil), kisik pa smo v gojišče uvajali s stresanjem (200 obr./min). Pri takih pogojih rasti celice dosežejo gostoto približno 3 x 10⁹/ml.

Celice bomo razbili z osmotskim šokom, tej stopnji pa bo sledilo raztapljanje lipidnih membran z detergentom. Prva stopnja homogenizacije bo potekala pri bolj milih pogojih, pri čemer naj bi se sprostila vsebina periplazme. Ta vsebuje v primerjavi s citoplazmo nekoliko manj proteinov in nobenih nukleinskih kislin. Ostanek nerazbitih celic bomo uporabili za ponovitev postopka ob intenzivnem stresanju. Pri tem naj bi popokale tudi notranje membrane in sprostila bi se celotna vsebina citoplazme. Med molekulami, ki se bodo sprostile, bodo tudi proteini in nukleinske kisline.

Koliko proteinov se je sprostilo iz celic, bomo ocenili na osnovi spektroskopske lastnosti proteinov. Vsi proteini, ki vsebujejo aromatske aminokisline (stranska skupina vključuje benzenski obroč) fenilalanin, tirozin in triptofan, absorbirajo svetlobo z valovno dolžino 280 nm. Večja ko je koncentracija teh aminokislin, večja bo

absorbanca (to pomeni, da bo manj svetlobe te valovne dolžine šlo skozi vzorec). Kot približek lahko privzamemo, da ima mešanica različnih proteinov brez drugih nečistoč s koncentracijo 1 mg/ml $A_{280}=1$.

Ali smo sprostiti tudi nukleinske kisline, bomo preverili tako, da bomo določili absorbanco pri 260 nm. Svetlobo te valovne dolžine namreč intenzivno absorbirajo nukleinske kisline, predvsem DNA, pa tudi RNA. Za čisto DNA s koncentracijo 1 mg/ml velja, da ima $A_{260}=20$.

Izolirane frakcije vseh skupin bomo shranili za nadaljnjo analizo pri dveh naslednjih vajah: za kolorimetrično določanje koncentracije proteinov in za poliakrilamidno gelsko elektroforezo.

IZVEDBA VAJE

1. Odpipetirajte 1 ml prekonočne kulture bakterij *E. coli* iz erlenmajerice v mikrocentrifugirko, ki jo označite.
2. Centrifugirajte 1 min pri 10.000 g, da se celice posedejo na dno.
3. Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
4. Usedlini dodajte 250 μ l pufru 1 (100 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % saharoza). S tem speremo ostanke gojišča.
5. Premešajte, da vse celice iz usedline preidejo v suspenzijo.
6. Inkubirajte na ledu 2 min; rahlo pretresite vsakih 30 s.
7. Centrifugirajte 4 min pri 4.000 g.
8. Odstranite supernatant in ga zavržite.
9. Usedlini dodajte 800 μ l pufru 2 (10 mM Tris/HCl pH 6,8). ← OSMOZNI ŠOK
10. Premešajte, da vse celice iz usedline preidejo v suspenzijo.
11. Inkubirajte na ledu 3 min brez mešanja.
12. Centrifugirajte 4 min pri 4.000 g.
13. Supernatant (700 μ l) prenesite v svežo označeno mikrocentrifugirko (pri tem pazite, da ne boste prenesli nerazbitih celic iz usedline). Ta frakcija predstavlja vsebino periplazme in jo boste nadalje analizirali pri naslednji vaji.
14. Usedlini takoj dodajte 700 μ l pufru 3 (pufer 2 z dodanim 0,05 % detergentom Triton X-100).
15. Premešajte, da vse celice iz usedline preidejo v suspenzijo.
16. Izmenično intenzivno stresajte in inkubirajte na ledu (15 s stresanja, 30 s inkubiranja), skupaj 3 minute.
17. Centrifugirajte 2 min pri 10.000 g.
18. Supernatant (700 μ l) prenesite v svežo označeno mikrocentrifugirko (pri tem pazite, da ne boste prenesli celičnega ostanka iz usedline). Ta frakcija predstavlja vsebino citoplazme in jo boste nadalje analizirali pri naslednji vaji.
19. Ostanek usedline zavržite.
20. Vzorca iz točk 13 in 18 redčite 5-krat: 200 μ l vzorca prenesite v svežo mikrocentrifugirko in dopolnite do 1 ml z destilirano vodo.

Tehnik bo pripravil tudi absorpcijski spekter obeh supernatantov za natančnejšo interpretacijo rezultatov iz prejšnje točke.

Poročilo 2. vaje: Razbijanje bakterijskih celic

REZULTATI

frakcija:	periplazma	citoplazma
ime vzorca:		
A_{260}		
A_{280}		

Vprašanja za poročilo:

1. Opišite morebitna opažanja in posebnosti pri izvedbi vaje!
2. Ali lahko na osnovi rezultatov vaše skupine trdite, da ste izolirali periplazemske proteine?
3. Ali je vzorec periplazme vseboval tudi nukleinske kisline?
4. Ali je mogoče reči, da ste v zadnji stopnji izolirali samo citoplazemske proteine? Utemeljite!
5. Kaj mislite, da vsebuje ostanek iz 18. točke?
6. Tehnik je celice iz enakega volumna prekonočne kulture razbil še z ultrazvokom. Po centrifugiranju je v supernatantu dobil vrednost $A_{280}=1,58$ in $A_{260}=1,22$. Kako lahko komentirate svoj rezultat v primerjavi z njegovim? Kaj opažena razlika pomeni?

3. Določanje koncentracije proteinov

Enega od načinov, kako določiti koncentracijo proteinov v vzorcu, smo že spoznali: preko določanja absorpcijskih lastnosti proteinov, ki vsebujejo aromatske aminokislinske ostanke. Kot ste tudi sami ugotovili, pa je določanje nenatančno, predvsem takrat, ko vzorec vsebuje še druge snovi, ki absorbirajo svetlobe v območju merjenja. Prav tako je meritev precej nenatančna, kadar spektrofotometrično pri 280 nm določamo koncentracijo enega samega očiščenega proteina, saj ni nujno, da bo zanj veljal splošni približek $A=1$ ustreza 1 mg/ml. Glede na različno vsebnost aromatskih aminokislinskih ostankov je sicer mogoče izračunati, kakšna je teoretična vrednost za vsak posamezen protein, vendar je ta izračun natančen le v primeru, da proteinu porušimo strukturo z dodatkom denaturantov, saj v nasprotnem niso vsi aromatski ostanki enako izpostavljeni in je njihov prispevek k skupni absorbanci lahko manjši kot bi izračunali. Razen tega nekateri kratki proteini sploh ne vsebujejo aromatskih aminokislinskih ostankov ali pa samo take, ki svetlobo absorbirajo dokaj šibko (najmočneje absorbira triptofan, tirozin približno 4-krat šibkeje, fenilalanin pa zelo šibko in še to pri ~260 nm).

Če želimo določiti koncentracijo čistega proteina v vzorcu, imamo na voljo še določitev absorbance v območju, kjer šibko absorbira peptidna vez, vendar ker je teh vezi v proteinu veliko, lahko zadošča za določitev koncentracije proteina. Ker pa je absorpcijski vrh peptidne vezi pri 190 nm, kar je na spodnji meji območja delovanja večine spektrofotometrov, obstaja velika nevarnost, da v tem območju absorbirajo tudi nekatere druge sestavine raztopine proteina. S tem je pogosto (razen za izredno čiste vzorce) določanje koncentracije proteina na osnovi absorbance peptidnih vezi nemogoče.

Alternativno predstavljajo kolorimetrične metode. V zgodovini raziskovanja proteinov jih je bilo precej; med najbolj znanimi sta Kjeldahlova metoda iz leta 1883 in Lowryjeva metoda iz leta 1951. Kjeldahlova metoda temelji na določanju skupnega dušika v vzorcu, obdelanem z žvepleno kislino. Najprej nastane amonijev sulfat, ki ga z NaOH pretvorimo v amoniak, tega pa titriramo z borovo kislino. Nепorabljeno kislino titriramo z natrijevim karbonatom v prisotnosti indikatorja metiloranža. Kot vidite, je metoda zamudna in zahteva posebno aparaturo.

Pri Lowryjevi metodi gre za reakcijo bakrovih ionov s peptidno vezjo v proteinih v alkalnem, kar je sicer osnova tako imenovane biuretne reakcije (kjer reakcijo na koncu razvijemo s kalij-natrijevim tartaratom, vendar je ta reakcija nizko občutljiva). Baker (II) se v alkalnem ob prisotnosti peptidnih vezi reducira do bakra (I). Ko testni zmesi dodamo tako imenovani Folin-Ciocalteujev reagent (mešanica fosfotungstenove in fosfomolibdenove kisline v fenolu) pride do interakcije med bakrovimi kationi in molibdenom (VI). Nastane molibdensko modrilo, ki ga zaznamo spektrofotometrično pri 750 nm. Zaradi potrebne dolge inkubacije, motečega vpliva nekaterih snovi, ki so pogoste pri izolaciji proteinov in zaradi delne odvisnosti rezultata od aminokislinske sestave proteina (reagent deluje tudi na aromatske aminokislinske v proteinu), metodo danes le še redko uporabljajo, obstaja pa več izvedenk, ki so enostavnejše za izvedbo.

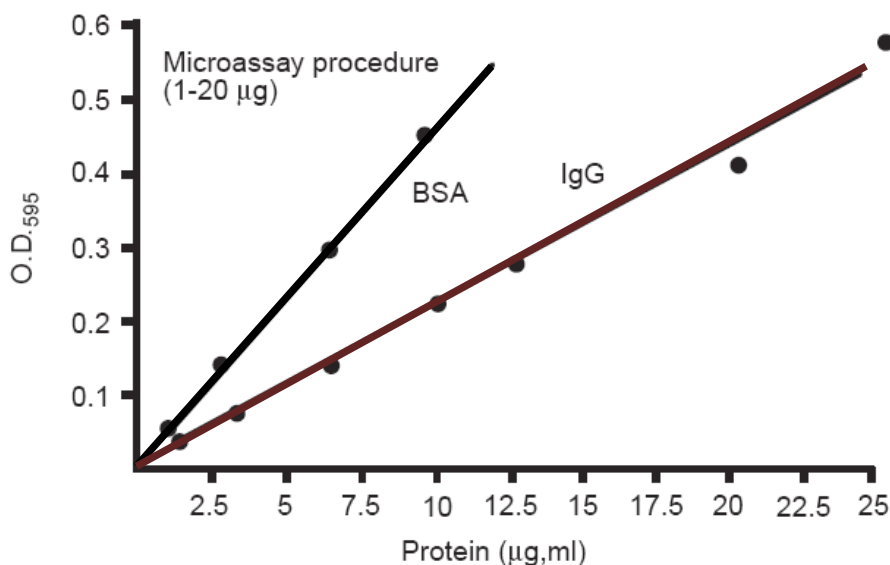
Bradfordova metoda je novejša; pravzaprav bi jo morali imenovati 'metoda po Bradfordovi' (Marion M. Bradford, Anal. Biochem., 1976). Je sicer manj zanesljiva od Kjeldahlove, saj je rezultat delno odvisen od aminokislinske sestave proteina, je pa zelo preprosta za izvedbo in zelo občutljiva. Protein v kislem inkubiramo z raztopino barvila Coomassie modro, ki se adsorbira na aromatske aminokislinske ostanke, na arginin in delno na histidin. Ob tej vezavi se absorpcijski vrh s 465 nm premakne na 595 nm; pri tej valovni dolžini tudi izvedemo meritev.

Pri kolorimetričnih testih moramo pripraviti umeritveno krivuljo. Umeritvena krivulja omogoča, da izmerjeno absorbanco neznanega vzorca primerjamo z absorbancami vzorcev z znanimi koncentracijami proteina.

Za pripravo umeritvene krivulje bi morali vedno uporabiti čist proteina, katerega koncentracijo v vzorcih bomo kasneje določali. Seveda pa to ni vedno izvedljivo, zato krivuljo pogosto pripravimo na osnovi absorpcijskih vrednosti za nek drug protein, ki je po možnosti podoben preiskovanemu, neredko pa tudi kateri od proteinov, ki ga je mogoče dobiti enostavno in v čisti obliki. Tak je na primer goveji serumski albumin, pogost protein v krvi goveda. Kupiti ga je mogoče v čisti obliki, cena za 1 g proteina pa je približno 5 EUR.

Za pripravo umeritvene krivulje izberemo več koncentracij proteina v območju, ki ga test pokriva in v katerem pričakujemo tudi koncentracije vzorcev, ki jih bomo preiskovali. Smiselno si je izbrati le tisto koncentracijsko območje, v katerem je razmerje med absorbanco in koncentracijo linearno. Število izbranih točk mora biti tako, da nam omogoča izris krivulje oz. premice; točk naj bi bilo vsaj 5.

Na vaji bomo izvedli test, ki izhaja iz Bradfordovega, a ga je proizvajalec Bio-Rad priredil, da je še bolj preprost in ga žargonsko imenujemo kar bioradov test. Obstaja v standardni in mikro-izvedbi, pri kateri je linearno območje koncentracij med 1 in 25 $\mu\text{g/ml}$ (slika 11).



Slika 11: umeritvena krivulja za odčitavanje koncentracije dveh različnih proteinov (BSA in IgG).

IZVEDBA VAJE

1. Razredčite vzorca periplazme in citoplazme iz prejšnje vaje. Pripravite 4 epruvete. Označite jih s P1, P2, C1 in C2. Vzorca P bosta paralelki, saj v obe epruveti prenesete po 100 μ l vzorca periplazme in dodate po 700 μ l destilirane vode. Vzorca C bosta paralelki citoplazemskih proteinov. Odpipetirajte po 100 μ l ustreznega vzorca in dodajte po 700 μ l destilirane vode. [Neporabljene vzorce bakterijskih proteinov ponovno zamrznite za naslednjo vajo.]
2. V eno epruveto odpipetirajte 100 μ l pufru 2 s prejšnje vaje (10 mM Tris/HCl, pH 6,8) in dodajte 700 μ l destilirane vode. Ta raztopina predstavlja slepi (ničelni) vzorec.
3. V nadaljnji dve epruveti odpipetirajte po 800 μ l govejega serumskega albumina z različnima koncentracijama – katere, vam bo povedal asistent.
4. Vsakemu vzorcu dodajte po 200 μ l raztopine barvila.
5. Pretresite in inkubirajte 10 min pri sobni temperaturi.
6. Izmerite absorbanco vseh vzorcev pri 595 nm proti slepemu vzorcu.
7. Naredite umeritveno krivuljo iz svojih rezultatov in rezultatov ostalih skupin za vzorce govejega serumskega albumina. V graf vključite meritve vseh skupin, krivuljo pa narišite tako, da bo čimbolj enakomerno oddaljena od vseh izmerjenih točk. Ne pozabite označiti osi!
8. Iz dobljene umeritvene krivulje odčitajte vrednosti za vzorec periplazme in citoplazme. Pri preračunavanju upoštevajte faktor redčenja.

Podatke za umeritveno krivuljo morate ustrezno preračunati ob upoštevanju redčitve v kiveti!

Ime in priimek:

vp. št.:

skupina (dan/ura):

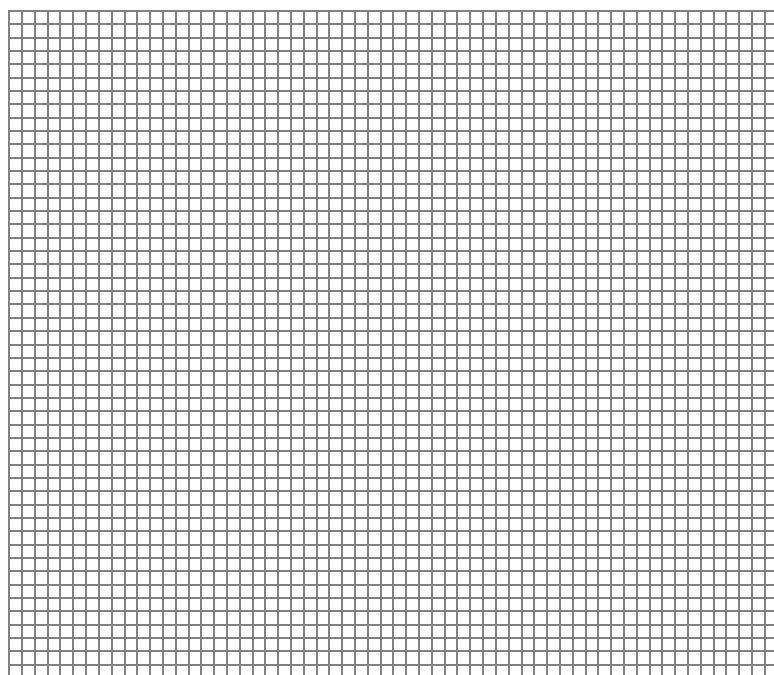
REZULTATI

Tabelarni prikaz vrednosti za umeritveno krivuljo:

št. vzorca BSA	CBSA (v kivetih)	$A_{595} (1)$	$A_{595} (2)$	povprečje
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

Tabelarni prikaz vrednosti za vzorec:

vzorec	$A_{595} (1)$	$A_{595} (2)$	povprečje
periplazma			
citoplazma			



Vprašanja za poročilo:

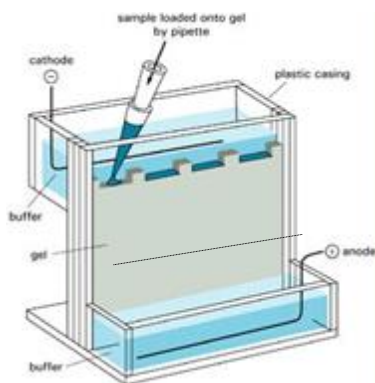
1. Opišite morebitna opažanja in posebnosti pri izvedbi vaje!
2. Ali so meritve z vzorcem BSA omogočale nedvoumno pripravo umeritvene krivulje? Kako se vrednosti vaših dveh vzorcev BSA ujemajo z umeritveno krivuljo?
3. Kakšna je bila koncentracija periplazemskih proteinov, odčitana iz umeritvene krivulje? Kako se rezultat ujema s tistim, ki ste ga dobili pri prejšnji vaji na osnovi A_{280} ?
4. Kakšna je bila koncentracija citoplazemskih proteinov, odčitana iz umeritvene krivulje? Kako se rezultat ujema s tistim, ki ste ga dobili pri prejšnji vaji na osnovi A_{280} ?
5. Ali mislite, da je BSA primeren protein za pripravo umeritvene krivulje glede na to, da je vaš vzorec predstavljal heterogeno mešanico bakterijskih proteinov?

4. Elektroforezne metode za ločevanje bioloških makromolekul

Biološke makromolekule se med seboj razlikujejo po obliki, polarnosti, naboju in velikosti. Predvsem proteine in nukleinske kisline najpogosteje ločujemo na osnovi velikosti, saj različno velike molekule različno hitro potujejo skozi zamrežene strukture. Vendar pa je hitrost potovanja odvisna ne samo od velikosti (molekulske mase), pač pa tudi od naboja pri določenem pH in od oblike molekule. Pri nukleinskih kislinah problema naboja praktično ni, saj so fosfatne skupine v ogrodju strukture izrazito negativno nabite, število nabojev pa je premosorazmerno s številom nukleotidov. Več o nukleinskih kislinah bomo obravnavali pri 6. vaji. Za zdaj le toliko, da nukleinske kisline, ki imajo več kot 100 nukleotidov, med seboj ločujemo na agaroznih gelih (1 % do 2 %), krajše pa na poliakrilamidnih gelih (7 % - 15 %).

Tokrat bomo obravnavali predvsem potovanje proteinskih molekul skozi zamreženo strukturo, ki jo predstavlja poliakrilamidni gel. Akrilamid, ki je sicer zelo strupena snov (draži sluznice in deluje kot živčni strup) polimerizira v gel, ki ni več strupen, vendar pa polimerizacija nikoli ni 100-odstotna, zato s takšnimi geli vedno delamo v rokavicah. Polimerizacija monomera poteka v prisotnosti organskega katalizatorja tetrametiletilendiamina (TEMED) in bisakrilamida, ki je prečni povezovalc, kot sprožilec reakcije pa deluje amonijevega persulfat.

Proteini bi skozi poliakrilamidni gel potovali glede na naboj, obliko molekul in velikost molekul. Tudi če bi do uspešne ločitve proteinov iz mešanice prišlo, pa ne bi vedeli, kateri protein je kateri, saj je hitrost potovanja po treh različnih kriterijih nemogoče izračunati. Zato so razvili preprost način obdelave proteinskih molekul, ki jim porušijo nativno obliko in jih enakomerno nabijejo. Natrijev dodecilsulfat (NaDS ali SDS) je detergent, ki se veže na proteine v konstantnem razmerju (približno ena molekula NaDS na vsaka dva aminokislinska ostanka), kar pomeni, ima statistično gledano vsak aminokislinski ostanek v proteinu po obdelavi enak negativni naboj (-0,5), zato bo hitrost potovanja odvisna le še od velikosti proteina. Majhni proteini bodo potovali skozi gel hitreje kot veliki proteini. Ta tip izvedbe se imenuje poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE). Če na gel nanese proteine z znanimi velikostmi, lahko odčitamo velikost neznanega proteina. Razen tega lahko iz tovrstne analize vidimo, koliko različno velikih proteinov je prisotnih v vzorcu oziroma ali je vzorec proteina čist.



Slika 12: Postavitev in princip vertikalne elektroforeze.

Za nanašanje proteinov na gel (slika 12) raztopini najprej dodamo koncentriran nanašalni pufer. Ta je sestavljen iz elektroforeznega pufera, sredstva za povečevanje gostote (da vzorec pade na dno žepka na gelu) in barvila, ki nam omogoča, da raztopino proteinov sploh vidimo med nanašanjem. Barvilo v nanašalnem pufru je bromfenolmodro, ki v pogojih elektroforeze potuje enako hitro kot najmanjši proteini, zato lahko spremljamo fronto potovanja VZORCEV.

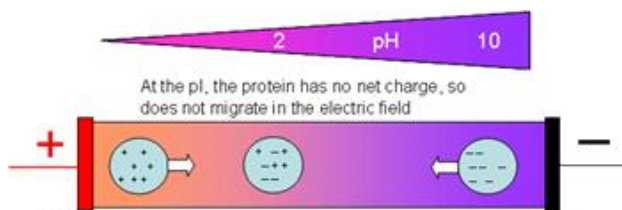
Tisti proteini, ki so sestavljeni iz več polipeptidnih verig, te pa so povezane z disulfidnimi mostički, potujejo v NaDS kot en protein. Če pa vzorcu pred začetkom elektroforeze dodamo reducent (betamerkaptoetanol, ditiotreitol ipd.), pa se disulfidne povezave razcepijo in protein bo dal več lis. Na ta način lahko določimo, koliko različno velikih polipeptidnih verig sestavlja nek protein – seveda ob pogoju, da so med seboj bile povezane z disulfidi. Proteini s kvartarno strukturo, pri katerih polipeptidne verige niso povezane s kovalentnimi vezmi, razpadejo na posamezne podenote že ob dodatku NaDS. Seveda pa v primeru, da so podenote enako velike, po elektroforezni analizi ne bomo vedeli, kako velik je celoten protein.

NaDS-PAGE običajno izvajamo kot diskontinuirni gel. To pomeni, da je gel sestavljen iz dveh različno zamreženih gelov; spodnji je bolj gost in v njem poteka ločevanje, zgornji del pa je bolj redek in v njem poteka koncentriranje vzorca. Do učinka koncentriranja pride zaradi različnih puferskih pogojev, ki povzročijo, da se proteini iz vzorca na stiku obeh gelov zberejo v zelo tanki lisi, kar poveča ločljivost metode.

Glede na to, da večina proteinov ni obarvanih (obarvanost je najpogosteje posledica vgrajenih ali vezanih prostetičnih skupin), proteinov med potovanjem skozi gel ne vidimo, pa tudi po končani elektroforezi jih ne bi, če jih ne bi naknadno obarvali. To lahko naredimo na več načinov. Eden od najbolj občutljivih je barvanje s srebrom, čeprav je postopek dokaj zamuden. Klasičen način barvanja je z barvilom Coomassie modro, princip pa je enak kot pri določanju koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi. Protein po končani elektroforezi prenesemo v raztopino barvila. To difundira v gel in ga v celoti obarva. Nato gel speremo in ga ob mešanju izpiramo toliko časa, da se ozadje (gel brez proteinov) v celoti razbarva, proteinske lise pa ostanejo modre. Gel z obarvanimi proteini nato dokumentiramo (posnamemo z digitalno kamero) in seveda interpretiramo rezultate.

Čeprav elektroforezo na poliakrilamidnem delu (PAGE) najpogosteje uporabljamo v kombinaciji z denaturantom NaDS, pa v nekaterih primerih dobimo ustrezne podatke tudi ob uporabi nativne PAGE, pri kateri proteinov v vzorcu predhodno ne obdelamo na tak način, da bi jim izenačili gostoto naboja. Zato proteini skozi gel potujejo glede na kombinacijo svoje velikosti, naboja in hidrodinamske oblike. Taka analiza je smiselna v primeru, ko preverjamo morebitno identičnost dveh molekul. Primer možne uporabe nativne PAGE je, ko bi z dvema različnima postopkoma izolirali isto beljakovino, na koncu pa bi nas zanimalo, ali sta produkta res identična. Ob uporabi NaDS-PAGE bi razlikovanje potekalo le na osnovi velikosti in bi oba produkta potovala enako hitro. Morebitnih razlik v neto naboju in kompaktnosti (zvitju) proteina s to metodo ne bi mogli odkriti, z nativno PAGE pa lahko. Pri tej izvedbi pa je treba paziti na neto naboj proteina, saj bi se lahko zgodilo, da bi protein potoval iz gela namesto v gel.

Poseben tip nativne elektroforeze je izoelektrično fokusiranje, pri katerem v nizkokoncentriran poliakrilamidni gel vgradimo amfolite. Amfoliti so snovi, ki imajo lahko lastnosti kisline ali baze. V električnem polju se razporedijo na tak način, da v gelu ustvarijo gradient pH vrednosti, običajno med 3 in 10, lahko pa izberemo tudi

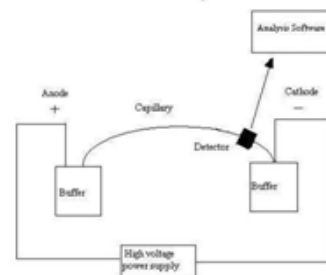


Slika 13: Princip ločevanja pri izoelektričnem fokusiranju.

protein imel neto naboj 0, s tem pa bo izgubil mobilnost v električnem polju (slika 13). To vrednost pH imenujemo izoelektrična točka in je značilna za vsak protein. Proteine z izoelektrično točko (pI) pod $\sim 5,5$ imenujemo kisle proteine, tiste s $pI > 8,5$ pa bazične. Če ima protein eno samo liso na NaDS-PAGE in eno liso pri izoelektričnem fokusiranju, velja za čistega. Včasih se zgodi, da ima protein na NaDS-PAGE eno samo liso, pri izoelektričnem fokusiranju pa več lis, ki se med seboj razlikujejo le malenkostno. V tem primeru gre verjetno pa izooblike istega proteina, ki se med seboj razlikujejo le v nekaterih nabitih aminokislinskih ostankih ali v vezavi nabitih neproteinskih molekul.

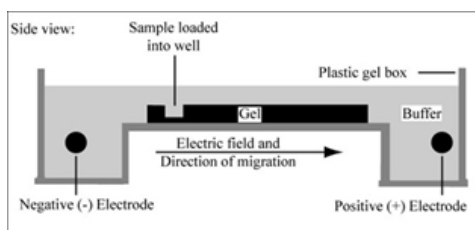
Pri nativni in NaDS-PAGE je gel debel le okrog 1 mm in ga pred polimerizacijo nalijemo med dve stekli. Elektroforeza tega tipa teče v vertikalnem položaju in vzorce nanašamo od zgoraj; na zgornji strani smo namreč pred polimerizaciji z glavničkom oblikovali žepke. Pri izoelektričnem fokusiranju pa gel leži horizontalno, medtem ko vzorec lahko nanesemo kamorkoli na površino gela, lahko tudi na več mest hkrati.

V zadnjem času pogosto uporabljajo posebno izvedbo elektroforeze, pri kateri je gel nalit v kapilari, ki je lahko dolga tudi 1 m (slika 14). Daljša pot pomeni tudi boljšo ločljivost. Taki postopki so predvsem primerni za majhne volumne (npr. fluorescenčno) označenih snovi. Primer uporabe je pri določanju nukleotidnega zaporedja DNA, kjer se produkti med seboj razlikujejo za en nukleotid (~ 330 Da).



Slika 14: Shematski prikaz kapilarne elektroforeze.

Čeprav so elektroforezne metode večinoma orodja v analizi biokemiji, pa obstajajo tudi preparativne izvedbe, pri katerih je z gelom napolnjena kolona, oba konca pa sta priključena na vir napetosti.



Slika 15: Shematski prikaz agarozne gelske elektroforeze za ločevanje nukleinskih kislin.

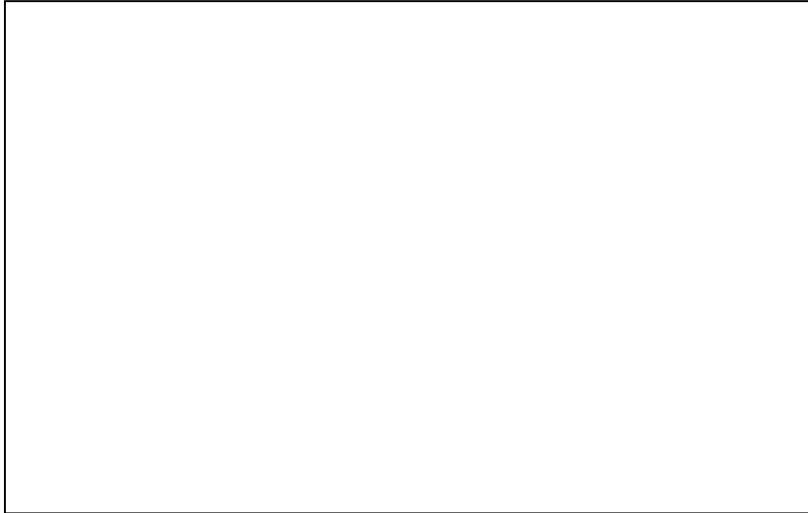
Nukleinske kisline, ki jih večinoma med seboj ločujemo z agarozno elektroforezo (slika 15), po končanem ločevanju obarvamo z barvili, ki so večinoma fluorescirajoča in omogočajo zaznavanje DNA v nanogramskem merilu. Primer takega barvila je etidijev bromid, ki se kot planarna molekula vriva med bazne pare v dvojni verigi DNA. Barvanje s srebrom je uporabno za proteine in za DNA.

IZVEDBA POSKUSA

1. Ob pomoči tehnika pripravite 12,5 % poliakrilni gel v ločevalnem delu in 3,5 % gel v nanašalnem delu. Med tem, ko gel polimerizira, pripravite vzorce.
2. Pripravite vzorce periplazme in citoplazme (s predhodnih vaj). Celotni volumen vzorcev celičnih frakcij oborite s trikloroocetno kislino (TCA) po naslednjem postopku:
 - a) Predhodno določeni volumen vzorca (določi asistent) prenesite v svežo mikrocentrifugirko in dodajte 0,11 V 100 % TCA.
 - b) Pretresite in inkubirajte na ledu 20 min; vmes še večkrat pretresite.
 - c) Centrifugirajte 10 min pri najvišji hitrosti.
 - d) Supernatant odstranite s pipeto, usedlini pa dodajte 200 µl mešanice etanol : eter (1:1).
 - e) Intenzivno stresajte, da se morebitni ostanki soli in TCA raztopijo (proteini v teh pogojih niso topni).
 - f) Centrifugirajte 5 min pri najvišji hitrosti.
 - g) Supernatant odstranite s pipeto do zadnje kapljice.
 - h) Posušite na zraku ali v koncentradorju.
 - i) Proteine raztopite v 10 µl 10 mM Tris/HCl pH 9.
 - j) Nadaljujte s točko 3.
3. Vzorcem dodajte 1/6 volumna nanašalnega pufra, ki vsebuje NaDS in reducent ter denaturirajte s kuhanjem 3 min.
4. Asistent bo nanese standard velikosti.
5. Nanesite vaša vzorca v dva zaporedna žepka na gelu.
6. Izvajajte elektroforezo pri 35 mA dokler fronta potovanja ne doseže dna gela (pribl. 30 minut).
7. Gel ob pomoči asistenta vzemite iz steklenega sendviča in ga prenesite v raztopino barvila Coomassie Brilliant Blue. Stresajte.
8. Po 20 min gel previdno sperite pod tekočo vodo in ga prenesite v razbarvalno raztopino. Stresajte, dokler se ozadje ne razbarva v celoti.
9. Dokumentirajte gel in interpretirajte dobljene rezultate ob primerjavi med nanosi in glede na standarde velikosti, ki jih je asistent nanese v enega od žepkov.

REZULTATI

Skicirajte razporeditev lis na gelu (slika lis na gelu se imenuje elektroferogram) in opišite vzorce ob pomoči spodnjih vprašanj!

**Vprašanja za poročilo:**

1. Koliko proteinov (približno) je vidnih po elektroforezni ločitvi citoplazemskih in periplazemskih proteinov?
2. Ali so v periplazmi prisotni enaki proteini kot v citoplazmi? Kaj to pomeni za delovanje celic, iz katerih ste izvedli izolacijo?
3. Kako mislite, da bi se ločili proteini iz citoplazemske frakcije, če bi jih analizirali na agaroznem gelu?
4. Na elektroferogramu, ki vam ga bo pokazal asistent, so po velikosti ločeni različni proteini. Ob primerjavi s standardi velikosti ugotovite, kakšna je približna velikost proteina _____ v kDa (kilodaltonih)!

Velikost proteina je ~ _____ kDa.

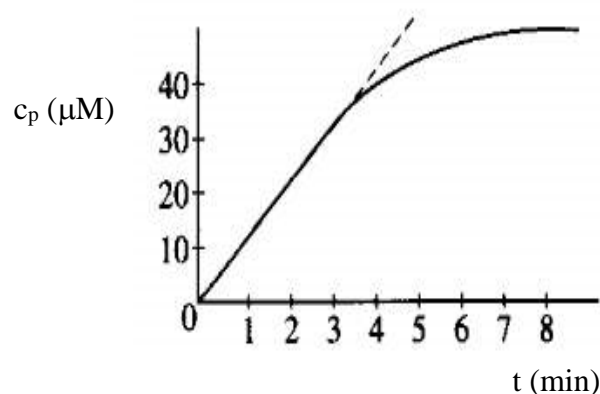
5. Ali je proteinski vzorec iz 4. točke homogen? Ali je mogoče reči, ali je sestavljen iz ene ali iz več polipeptidnih verig? Utemeljite!
6. Ali pričakujete, da vzorec iz 4. točke pri izoelektričnem fokusiranju dal eno ali več lis? Utemeljite!
7. Če bi proteine barvali s srebrom, bi verjetno videli _____
_____.

5. Encimsko katalizirane reakcije

5.1 Značilnosti encimskih reakcij

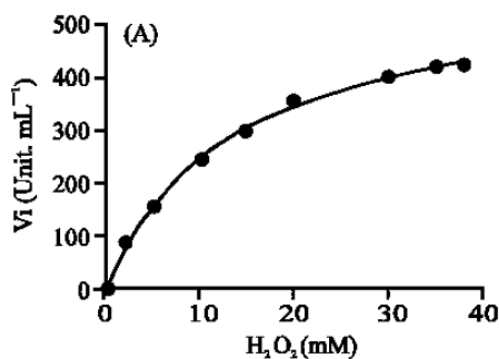
Encimske reakcije običajno potekajo ob prebitku substrata, ki je molarno gledano vsaj 100-kratno. V reakciji se substrat pretvarja v produkt, encim pa ob tem ohranja svojo aktivnost. Seveda to velja samo neko določeno časovno obdobje in pri pogojih, ki za encim niso destruktivni. V laboratoriju reakcije potekajo v definiranim okolju, kjer običajno ni prisotnih drugih makromolekul, razen če želimo preveriti njihov neposreden vpliv na substrat ali encim. V naravi pa je pogosto drugače. Čeprav je znotrajcelično okolje največkrat zelo natančno definirano, celice in medcelična predstavlja kompleksno makromolekulsko okolje, v katerem prihaja do interakcij z inhibitorji in drugimi modulatorji, alternativnimi substrati, netarčnimi molekulami, nabitimi površinami itd. Zato so poskusi *in vitro* le približek tistega, kar se dogaja v celici, vseeno pa dajejo pomembne podatke za razumevanje delovanja encimov. Pomembni so predvsem afiniteta do različnih substratov, hitrost delovanja, odvisnost od pH, posameznih ionov in temperature. To so pomembni podatki tudi za razvoj morebitnih industrijskih procesov z očiščenimi encimi ali z grobimi encimskimi preparati.

Reakcije, ki jih katalizirajo encimi, na začetku potekajo konstanto hitro, postopno pa se zaradi zmanjševanja koncentracije substrata in morebitnega zaviralnega učinka produkta na encim hitrost reakcije zmanjša (slika 16). Če spremljamo spremembo koncentracije produkta v časovnem intervalu, potem je smiselno, da upoštevamo samo začetno encimsko hitrost. Na grafu x-os predstavlja čas (v minutah), y-os pa koncentracijo produkta (μM).



Slika 16: Naraščanje koncentracije produkta s časom v encimsko katalizirani reakciji.

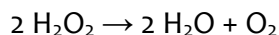
Razen tega encimske reakcije potekajo različno hitro pri različnih koncentracijah substrata. Tipičen graf odvisnosti po Michaelis-Mentenovi kinetiki (glej učbenik za natančnejšo razlago) kaže, da je odvisnost začetne hitrosti reakcije od koncentracije substrata hiperbolična. Pri zelo nizkih koncentracijah substrata je odvisnost skoraj linearna, pri visokih koncentracijah substrata pa se približuje hitrost približuje asimptoti funkcije, ki jo imenujemo mejna hitrost v_{max} (slika 17) in predstavlja hitrost reakcije ob nasičenju encima s substratom.



Slika 17: Odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije substrata.

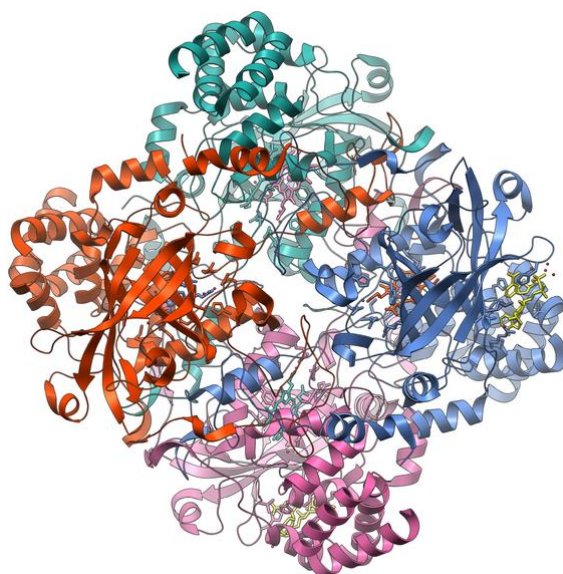
Encime uvrščamo v od enega od razredov encimske klasifikacije (EC; glej učbenik) glede na vrsto reakcije, ki jih katalizirajo. Na današnji vaji bomo raziskali nekatere lastnosti encima katalaze iz govejih jeter. Goveja katalaza je dokaj stabilen encim s širokim pH-optimumom. Sestavljena je iz štirih polipeptidnih verig in ima $M \sim 250$ kDa.

Katalaza (EC 1.11.1.6) je oksidoreduktaza, ki v živih celicah razgrajuje vodikov peroksid, pri čemer nastaneta voda in kisik. Celokupna reakcija je:



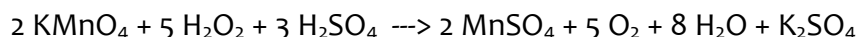
Zaradi svojega delovanja ima katalaza v celicah pomembno zaščitno vlogo, saj varuje celice pred delovanjem reaktivnih kisikovih zvrsti. Katalaze najdemo v rastlinskih, živalskih in mikrobnih celicah in predstavlja enega od parametrov določanja biološke aktivnosti v vzorcih tkiv in okoljskih vzorcih (npr. iz čistilnih naprav ali prsti).

Kemijske značilnosti katalaze je mogoče opisati z molekulsko maso, izoelektrično točko, terciarno in kvartarno strukturo (slika 18), encimsko-katalitičnimi in drugimi lastnostmi, za razumevanje delovanja v celici pa je pomembno tudi, kje v celici najdemo ta encim, kakšna je njegova koncentracija, katere substrate razgrajuje ipd. Ker je katalaza v aktivni obliki tetramer (kot je prikazan na naslednji sliki – vsaka od štirih podenot je predstavljena z drugo barvo), ima razen primarne, sekundarne in terciarne strukture tudi kvartarno. Vsak od štirih monomerov ima vključeno po eno molekulo hema, ki ima vlogo prostetične skupine in sodeluje pri encimskem mehanizmu. Vsak monomer ima okrog 530 aminokislinskih ostankov (pri različnih organizmih so katalaze nekoliko različne tudi po velikosti) in s tem molekulsko maso okrog 60 kDa, kot tetramer pa ima torej molekulsko maso ~ 240 kDa. Na ravni sekundarne strukture prevladujejo α -vijačnice, β -strukture pa je približno pol manj. Če bi molekulo opazovali bolj natančno, bi videli, da ima vsak od monomerov po štiri domene, torej segmente, ki se zvijejo verjetno samostojno in predstavljajo sestavne dele proteinskih podenot. Na spodnji sliki je prikazana prostorska zgradba homotetramera, pri katerem je vsaka od podenot prikazana z drugo barvo.



Slika 18: Kvartarna struktura encima katalaze. Z različnimi barvami so označene štiri polipeptidne verige. Katalaza je tetramerni protein.

Merjenje encimske aktivnosti v laboratoriju poteka tako, da vzorec, ki vsebuje katalazo, inkubiramo s substratom (H_2O_2), pri tem pa spremljamo zmanjševanje koncentracije substrata s časom. Ker vodikov peroksid ni obarvan, ga zaznavamo posredno. Pri natančnejši metodi spremljamo upadanje A_{240} (absorpcijski vrh peroksida) s časom in iz naklona krivulje izračunamo encimsko aktivnost. Za izvedbo na študentskih vajah pa je ta metoda neprimerna, ker lahko hkrati analiziramo samo en vzorec ene skupine. Zato bomo izvedli detekcijo preostalega substrata s titriranjem H_2O_2 s kalijevim permanganatom. Encimsko reakcijo bomo najprej zaustavili z nakisanjem s H_2SO_4 , nato pa bomo vsebnost preostalega peroksida v epruveti določili tako, da bomo v reakcijsko mešanico po kapljicah dodajali KMnO_4 do točke, ko se bo mešanica obarvala rožnato. Enačba reakcije je:



Rožnato obarvanje je posledica prebitnih manganatnih (VII) ionov MnO_4^- . Volumen dodanega permanganata je sorazmeren koncentraciji nezreagirane peroksida ob zaustavitvi reakcije. Veliko permanganata za titracijo pomeni torej nizko aktivnost katalaze.

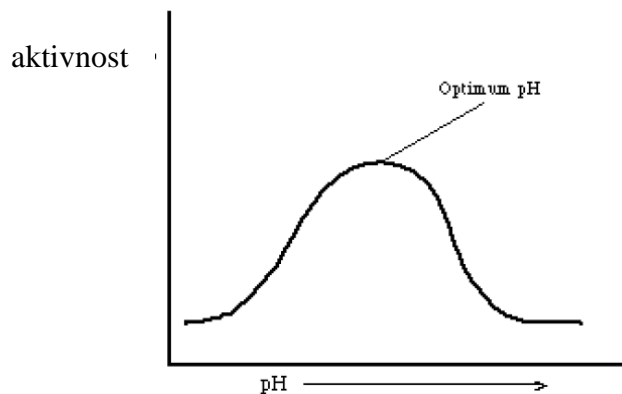
5.2 Vpliv pH na aktivnost encima

Encimi zaradi svojih strukturnih lastnosti in naboja aminokislinskih ostankov v aktivnem centru in njegovi bližini, kjer je vezavno mesto za substrat, niso enako aktivni v vseh pogojih. Zaradi različnega naboja aminokislinskih ostankov, ki je posledica različnih vrednosti pH v okolju, kjer reakcija poteka, lahko npr. pride do odbojnih sil, ki preprečujejo substratu dostop v režo aktivnega mesta, možno pa je

tudi, da ostanki, ki so udeleženi v katalitskem mehanizmu, niso ustrezno nabiti in ne morejo opraviti svoje vloge v procesu.

Katalaza velja za encim, ki je relativno neobčutljiv na spremembe pH v širšem območju med pH 5 in pH 8, pri bolj ekstremnih vrednostih pa se njegova aktivnost na vodikov peroksid zmanjša. Čeprav je celica dokaj stabilno reakcijsko okolje, v katerem večjih nihanj glede pH ne opazimo (z izjemo npr. lizosomov, ki predstavlja dokaj kislo okolje), pa lahko v industrijskih procesih ali v pogojih *in vitro* zaradi narave postopkov encim pride v izrazito neugodne pogoje. Lahko se denaturira in posledično inaktivira, v manj ostrih pogojih pa se ob ohranjeni celokupni strukturi le zmanjša njegova aktivnost.

Med vajo bomo poskušali določiti pH-profil aktivnosti katalaze v območju med pH 3,0 in pH 10,5. Narisali bomo krivuljo odvisnosti aktivnosti na naravni substrat v pogojih *in vitro*. Za večino encimov so tovrstne krivulje zvonaste oblike (slika 19) z bolj ali manj ostrim vrhom pri tisti vrednosti pH, ki jo označujemo kot pH-optimum nekega encima.



Slika 19: Vpliv pH na encimsko aktivnost.

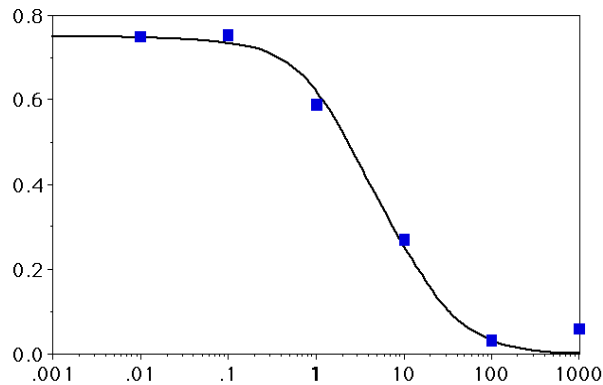
5.3 Titracija encima z inhibitorjem

V tem poglavju je opisan poskus, ki ga na vajah zaradi pomanjkanja časa ne boste izvajali, vam pa teorija utegne biti v pomoč pri razumevanju encimske inhibicije.

Eden od pomembnih načinov uravnavanja encimske aktivnosti v živih sistemih je z delovanjem inhibitorjev. Ti se pogosto z izjemno visoko afiniteto vežejo na encimsko molekulo in s tem preprečujejo njegovo aktivnost. Vezavno mesto za inhibitor se lahko prekriva z mestom vstopanja substrata v aktivno mesto, lahko pa deluje tudi drugače, na primer tako, da spremeni obliko aktivnega mesta in s tem inaktivira encim.

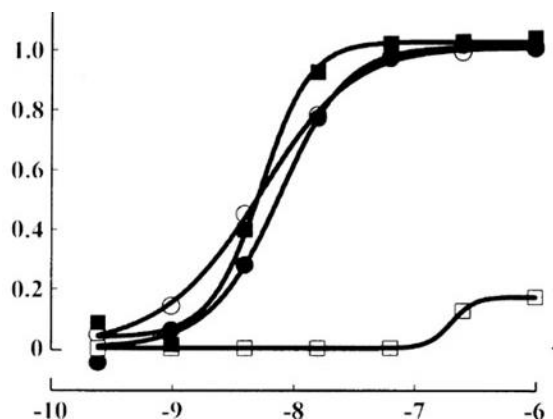
V pogojih *in vitro* lahko encimsko aktivnost uravnavamo s fizikalno-kemijskimi pogoji (pH, temperatura, koncentracija kofaktorjev), delovanje encima pa lahko zavremo z dodatkom običajno nizkomolekularnega inhibitorja. Primer take molekule je natrijev azid (NaN_3), ki ga med drugim uporabljajo kot biocid, npr. v vodnih raztopinah reagentov preprečuje rast mikroorganizmov. Inhibitorno na encime lahko delujejo zelo različne snovi, pa tudi kovinski ioni.

Titracija pomeni, da s postopnim spreminjanjem koncentracije reagenta dosežete točko, pri kateri se (v primeru encimov) aktivnost ustavi. Več ko dodate inhibitorja, večji delež molekul encima bo blokiranih, to pa pomeni, da bo encim v istem času deloval na manj molekul substrata kot bi v odsotnosti reagenta. Krivulje imajo običajno na x-osi koncentracijo inhibitorja, na y-osi pa bodisi preostalo encimsko aktivnost ali pa delež inhibiranih molekul, kakor prikazujeta sliki 20 A in B.



Slika 20: Vpliv inhibitorja na delovanje encima.

A: Padec aktivnosti encima dihidrofolat-reduktaze (dA/min) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (metotreksat, uM)



B: Delež inhibiranih encimskih molekul v odvisnosti od molarne koncentracije inhibitorja.

Vajo bomo izvedli tako, da bomo pred dodatkom substrata (H_2O_2) inkubirali encim (katalazo) z inhibitorjem (NaN_3), pri čemer bo koncentracija encima ves čas enaka, koncentracijo azida pa bomo spreminjali v območju 0 mM do 8 mM. Ker pa testa aktivnosti ne moremo izvesti ob spreminjajoči se koncentraciji azida, bomo pripravili več alikvotov z različnimi končnimi koncentracijami inhibitorja in na osnovi dobljenih rezultatov narisali graf. Merilo encimske aktivnosti bo raven zmanjšanja koncentracije substrata v določenem časovnem obdobju.

Za izvedbo vaje bomo izhajali iz goveje katalaze z aktivnostjo ~ 3000 U/mg proteina. Encimska enota (U) je v tem primeru definirana kot tista množina encima, ki v 1 minuti razgradi 1 mmol H_2O_2 pri pH 7 in 25 °C.

IZVEDBA POSKUSOV

a) Zasledovanje hitrosti encimske reakcije

1. Pripravite 4 epruvete in jih označite z 0, 2, 4 in 8 (minut).
2. V vsako od epruvet dodajte po 500 μ l reakcijskega pufra (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,0) in 500 μ l razredčenega encima (konc. 400 U/ml; končna konc. v reakciji bo 100 U/ml).
3. V prvo epruveto (označeno z »0«) dodajte 5 ml 20-odstotnega H_2SO_4 in premešajte. S tem prekinete delovanje encima.
4. V vse 4 epruvete dodajte po 1000 μ l substrata (4 % H_2O_2 ; končna konc. 60 mM) in epruvete postavite v vodno kopel (37 °C) ter premešajte vsakih 30-60 s. Takoj začnite meriti čas.
5. Po 2 min. vzorcu »2« dodajte enak volumen H_2SO_4 kot prej vzorcu »0«.
6. Po skupaj 4 min. vzorcu »4« dodajte enak volumen H_2SO_4 .
7. Po skupaj 8 min. vzorcu »8« dodajte enak volumen H_2SO_4 .
8. Množino neporabljenega H_2O_2 določite s titracijo z 200 mM $KMnO_4$ tako, da vsakemu vzorcu po kapljicah iz steklene 10 ml birete dodajate reagent, epruveto pa po vsaki dodani kapljici premešate.
9. Zapišite si volumen permanganata, ki ste ga morali dodati, da se je barva raztopine v epruveti stabilno obarvala rožnato. *Večji ko je izmerjeni volumen, več H_2O_2 je ostalo v reakcijski mešanici.*

b) Vpliv pH na encimsko aktivnost

1. Pripravite 6 parov epruvet. Eno iz para označite s 3,0, 4,5, 6,0, 7,5, 9,0 in 10,5, drugo pa enako, a z dodatno črko K (kontrola; npr. 3,0 K).
2. V vsako od epruvet dodajte po 500 μ l reakcijskega pufra* z označenim pH in po 500 μ l razredčenega encima (konc. 400 U/ml; končna konc. v reakciji bo 100 U/ml).
3. V vsako epruveto označeno s K dodajte po 5 ml 20-odstotnega H_2SO_4 in premešajte. *S tem prekinete delovanje encima.*
4. V vse epruvete dodajte po 1000 μ l substrata (4 % H_2O_2 ; končna konc. 60 mM) in epruvete postavite v vodno kopel (37 °C) ter premešajte vsakih 30-60 s. Takoj začnite meriti čas.
5. Po 4 min. dodajte vsakemu vzorcu (RAZEN tistih, označenih s K) po 5 ml 20-odstotnega H_2SO_4 (torej enako kot prej vzorcem »K«).
6. Množino neporabljenega H_2O_2 določite s titracijo z 200 mM $KMnO_4$ tako, da vsakemu vzorcu po kapljicah iz 10 ml birete dodajate reagent, epruveto pa po vsaki dodani kapljici premešate.
7. Zapišite si volumen permanganata, ki ste ga morali dodati, da se je barva raztopine v epruveti stabilno obarvala rožnato. *Večji ko je izmerjeni volumen, več H_2O_2 je ostalo v reakcijski mešanici.*

* Sestava pufrov (vsi vključujejo tudi 100 mM NaCl):

pH 3,0: 50 mM glicin/HCl

pH 4,5: 50 mM Na-acetat

pH 6,0: 50 mM $KH_2PO_4/NaOH$

pH 7,5: 50 mM Tris/HCl

pH 9,0: 50 mM glicin/NaOH

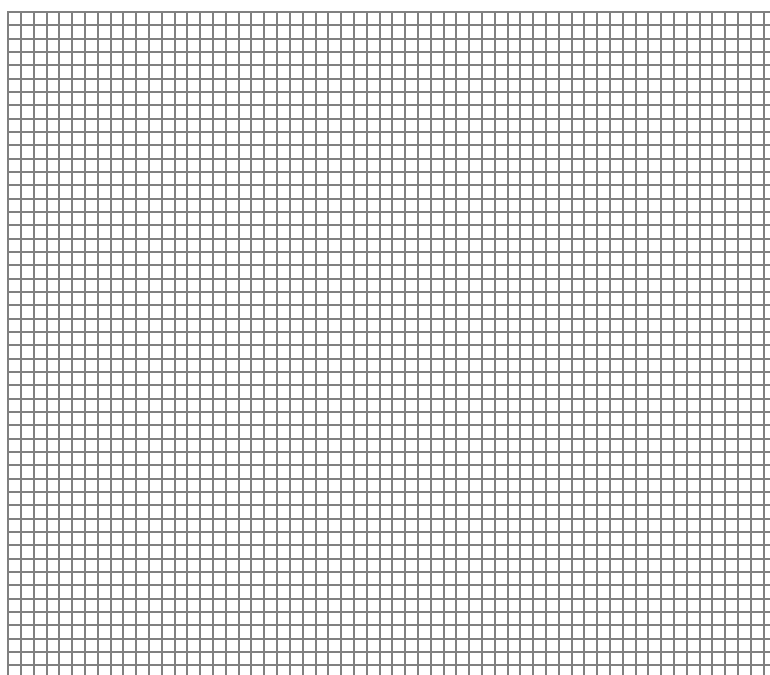
pH 10,5: 50 mM glicin/NaOH

REZULTATI

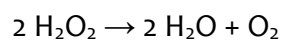
V spodnjo tabelo vpišite volumen permanganata, ki je bil potreben za titriranje preostalega peroksida in koncentracije preostalega in porabljenega peroksida!

čas	0 min.	2 min.	4 min.	8 min.
volumen KMnO_4				
n KMnO_4				
n ostanek H_2O_2				
n porabljeni H_2O_2				
n O_2				
koncentracija O_2				

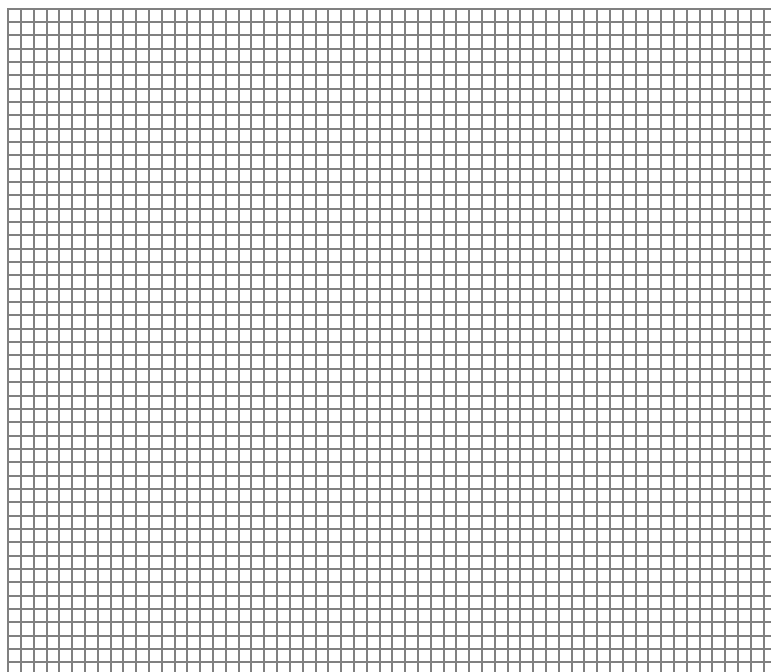
V koordinatni sistem narišite, kako se zmanjšuje količina substrata v odvisnosti od časa delovanja encima! Ne pozabite na enote!



Na osnovi zgornje krivulje na naslednji strani narišite krivuljo odvisnosti koncentracije produkta (kisika) od časa inkubacije! Upoštevajte, da je volumen dodanega permanganata merilo neporabljenega substrata, vrednost v točki »0« (minut) pa predstavlja začetno koncentracijo substrata. Iz tega, koliko substrata se je porabilo v nadaljevanju reakcije, je mogoče izračunati, koliko produkta je nastalo – upoštevajte formulo



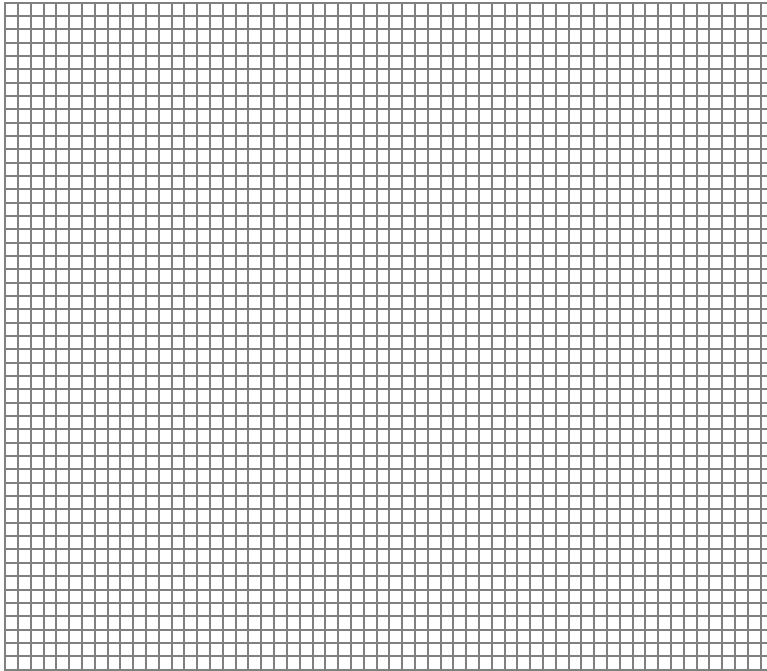
(Pri računanju upoštevajte, da vam vzorci K predstavljajo slepi vzorec – vsebnost nerazgrajenega substrata v odsotnosti encima. To je vrednost, od katere morate odšteti tisto, ki jo dobite kot rezultat encimske razgradnje.)



Nato narišite še graf, ki ponazarja pH-profil katalaze. Ne pozabite označiti osi (enote)!

pH	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0	10,5
volumen KMnO ₄						
n KMnO ₄						
n ostanek H ₂ O ₂						
n porabljeni H ₂ O ₂						
n O ₂						
koncentracija O ₂						

pH-profil katalaze:



Vprašanja za poročilo:

1. Od česa vsega je lahko odvisna encimska aktivnost?
2. Opišite morebitna opažanja in posebnosti pri izvedbi vaje!
3. Če bi namesto vloge pH na aktivnost encimov preučevali vpliv temperature, bi morali preveriti encimsko aktivnost v območju med npr. 10 °C in 90 °C. Kakšna mislite, da bi bila krivulja aktivnosti v odvisnosti od T? Utemeljite!
4. Predvidite, kakšna bi bila krivulja odvisnosti koncentracije substrata od časa, če reakcijo podaljšali na 1 uro! Utemeljite!
5. Izračunajte stroške materiala za izvedbo 200 testov (po postopku, ki ste ga uporabili pri vaji) encimske aktivnosti katalaze v homogenatih različnih rastlinskih in živalskih tkiv! Cene reagentov so:
H₂O₂ (30 % vodna raztopina) - 500 ml: 25 EUR, H₂SO₄ - 1 l: 45 EUR, KMnO₄ (v prahu) – 100 g: 28 EUR. Ocenite tudi stroške dela, če računate, da je cena ure raziskovalca 25 EUR (bruto).

6. DNA – izolacija in lastnosti

Pri evkariontih je večina DNA v celičnih jedrih, manjši del pa v mitohondrijih in pri rastlinah tudi v kloroplastih. Da bi uspeli izolirati DNA, moramo torej razbiti celične membrane, tudi notranje, nato pa se znebiti vseh ostalih tipov molekul: lipidov, proteinov, ogljikovih hidratov, RNA in drugih. Izolirano DNA lahko uporabimo za fizikalno-biokemijske raziskave, za genetske in molekularnobiološke analize. Tudi npr. pri forenzičnih analizah je treba DNA delno očistiti pred izvedbo ključnih analiz, ki običajno vključujejo pomnoževanje točno določenih zaporedij in ugotavljanje lastnosti pomnoženih regij.

Da bi lahko sprostili vsebino jeder, je treba izhodni biološki material najprej mehansko razbiti, tako da je dostop reagentov do posameznih celic čim hitrejši. Ob tem se znebimo tudi nekaterih težko razgradljivih struktur kot so kite in žile pri živalskih vzorcih ali vlakna in ovojnice pri rastlinskih tkivih. Prva stopnja izolacije je torej običajno homogenizacija tkiva. Pri mehkih tkivih je to lahko tudi zamrzovanje in tajanje ali uporaba mešalnika z nožki. Homogenizacija poteka v vodni raztopini soli, ki pomagajo pri ekstrakciji in stabilizirajo sproščeno DNA.

Evkariontska genomska DNA je v jedru zelo tesno navita na proteinske molekule. Proteini, ki znotraj nukleosoma predstavljajo sredico, se imenujejo histoni, zanje pa je značilno, da so v nevtralnem izrazito pozitivno nabiti, s tem pa se tesno vežejo na negativno nabito DNA. Če želimo izolirati prosto DNA, moramo medsebojne interakcije oslabiti, to pa lahko naredimo z dodatkom NaCl.

V vodni raztopini makromolekul, ki se sprostijo iz liziranih celic po dodatku detergenta (ki raztopi membrane), je genomska DNA največja molekula. Pri višjih živalih je dolžina posameznih kromosomov lahko več kot sto milijonov baznih parov (več kot 10^{10} Da), podobno pa velja tudi za rastline. DNA je v vodnem okolju dobro topna, njena topnost pa se zmanjša v organskih topilih. Če na vodno raztopino DNA (in drugih bioloških makromolekul) previdno nalijemo etanol, se bo na vmesni fazi DNA začela obarjati. Nerazgrajena jedrna DNA v takem postopku izolacije ostane nitasta, nitke pa se med seboj sprijemajo v makroskopska vlakna.

Preproste metode izolacije ne dajo čiste DNA, pač pa je v vzorcih pogosto še precej proteinov, pa tudi nekaterih drugih molekul (pri izolaciji iz rastlin so pogoste nečistoče oksidirani polifenoli, ki se kovalentno vežejo na DNA). Povsem čista DNA ima absorpcijski vrh pri 260 nm, čisti proteini pa pri 280 nm. S primerjavo absorbanc pri teh dveh valovnih dolžinah lahko ocenimo, kako čist je preparat DNA. V idealnem primeru bi bila vrednost $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$, nižje vrednosti pa pomenijo večjo vsebnost proteinov. Spektrofotometrično je mogoče tudi oceniti koncentracijo DNA. Čista DNA močno absorbira svetlobo v UV območju, tako da dobimo z raztopino, ki ima koncentracijo 1 mg/ml vrednost $A_{260}=20$. Za primerjavo absorbira povprečen protein pri absorpcijskem vrhu (280 nm) približno 20-krat manj ($A=1$) – ta vrednost je precej odvisna od vsebnosti aromatskih aminokislinskih ostankov.

DNA je dvoverižna struktura. Verigi sta med seboj povezani z vodikovimi vezmi med organskimi bazami v sredini vijačnice. Pri zvišanju pH ali pri zvišanju temperature pride do oslabitve vodikovih vezi in DNA se na posameznih segmentih začne razpirati, če se pogoji ne spremenijo, pa se po principu zadrge s teh mest začenja razpad molekule na posamezni verigi. Temu procesu pravimo denaturacija DNA. Pri proteinih denaturacija pomeni izguba nativne tridimenzionalne strukture, pri DNA pa velja enako, le da je to vedno povezano le z razprtjem dvojne vijačnice in razpadom na dve verigi. S tem pa se spremenijo tudi absorpcijske lastnosti DNA. Če izhajamo iz iste koncentracije DNA in določimo vrednost absorbance pri 260 nm najprej pri nativni, nato pa pri denaturirani strukturi, opazimo, da se z denaturacijo absorbanca poveča. Ta pojav imenujemo hiperkromni efekt.

Pri delu z DNA je v nekaterih postopkih zelo pomembno, da je DNA v enoverižni obliki. Tak primer je določanje nukleotidnega zaporedja (pri katerem se na osnovi ene verige sintetizira komplementarna, to pa fluorescenčno označimo), uvedba mutacij ali delo z biočipi, pa tudi pri reakciji pomnoževanja DNA in vitro (verižna reakcija s polimerazo – PCR). V DNA-tehnologiji denaturacijo dosežemo na dva načina: z alkalno denaturacijo (vzorcu dodamo 10 % končnega volumna 1 M NaOH) ali s termično denaturacijo (običajno v cikličnem termostatu, torej v aparaturi za izvedbo PCR). Ker gre za tako pomemben proces, ga bomo poskusili izvesti tudi na vajah.

IZVEDBA POSKUSA

a) Izolacija DNA iz paradižnika (prirejeno po <http://www.ucbiotech.org/>)

1. Narežite četrtno paradižnika na zelo majhne koščke. Dodajte 30 ml ekstrakcijskega pufra (0,88 % NaCl, 4,4 % Na-citrat) in 7 ml detergenta (0,5 % Triton X-100) ter homogeniziraj s teflonskim homogenizerjem 1 min.
2. Prenesite na lij z gazo ali dvoslojno papirnato brisačo.
3. Prenesite 7 ml raztopine v 50 ml centrifugirko.
4. Dodajte 7 ml dH₂O.
5. Previdno dodajte 30 ml 95 % etanola, tako da ostane kot plast nad vodno raztopino (nič ni narobe, če se sloja na stiku malenkost premešata).
6. Med obema fazama se obori belkasta snov, ki je pretežno DNA. Previdno premešajte in prenesite DNA v svežo centrifugirko (uporabite lahko kapalko).
7. Dodajte 3 ml 10 mM Tris/HCl pH 9,0 in rahlo premešajte, da se DNA raztopi.
8. Centrifugirajte 5 min pri 8000 g in supernatant prenesite v svežo centrifugirko.
9. Določite A₂₆₀ in A₂₈₀ proti pufri in izračunajte razmerje A₂₆₀/A₂₈₀.
10. Asistent bo določil absorpcijski spekter raztopine.

V nadaljevanju boste poskusa b) in c) zaradi večje čistosti opravili s komercialnim preparatom DNA in ne z vašimi vzorci, saj bodo le tako rezultati v skladu s teorijo.

b) Termična denaturacija DNA

1. Pripravite 1 ml vzorca in ga označite glede na temperaturo, pri kateri boste vzorec inkubirali (temperaturo bo določil asistent: sobna temperatura, 40 °C, 60 °C, 80 °C ali 100 °C).
2. Inkubirajte vzorec 5 min. pri določeni temperaturi, nato pa ga takoj prenesite na led.
3. Vzorce na ledu pustite 2 min. in vsakih 15 s na hitro premešajte.
4. Vzorce postavite iz ledene kopeli, da se segrejejo do sobne temperature.
5. Določite A_{260} vseh petih vzorcev.

c) Alkalna denaturacija DNA

1. Pripravite 1 ml vzorca in ga označite glede na pH, pri katerem boste vzorec inkubirali (vrednost bo določil asistent: 7,0, 8,5, 10,0, 11,5 ali 13,0).
2. Vsakemu vzorcu dodajte 0,5 V koncentriranega pufra z označeno pH-vrednostjo in inkubirajte 5 min. ob občasnem premešanju vzorca.
3. Določite A_{260} vseh petih vzorcev proti ustreznemu puftru.

Sestava pufrov za alkalno denaturacijo:

pH 7,0: 1 M Tris/HCl

pH 8,5: 1 M Tris/HCl

pH 10,0: 1 M Tris/HCl ali glicin/NaOH

pH 11,5: 1 M etanolamin ali NaHPO₄/NaOH

pH 13,0: 1 M KCl/NaOH

REZULTATI

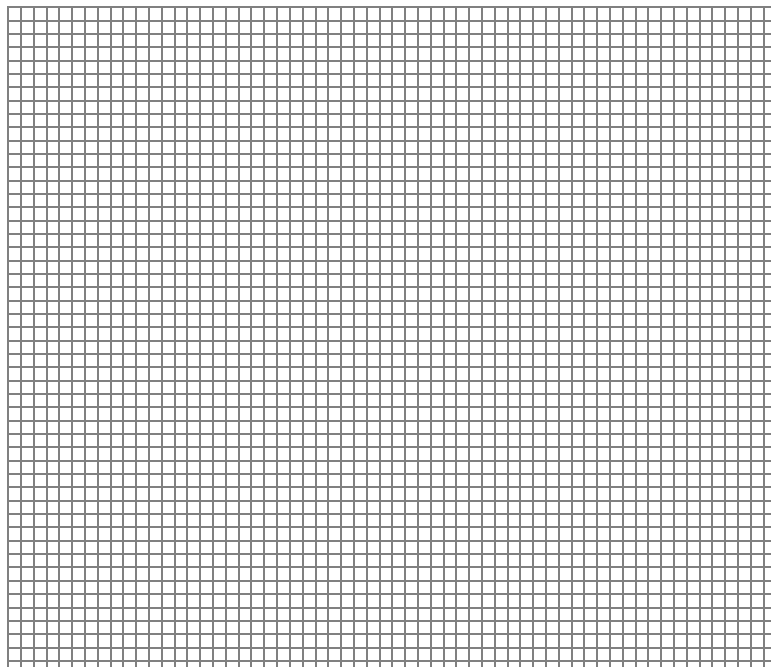
Razmerje A_{260}/A_{280} za naš vzorec je bilo _____, iz česar sklepamo, da _____.

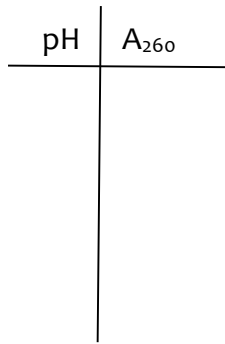
Ali iz razmerja A_{260}/A_{280} lahko sklepate na čistost izolirane DNA? Utemeljite!

V spodnji tabeli vpišite izmerjene vrednosti absorbance in na osnovi rezultatov vaše skupine vaj narišite grafa odvisnosti absorbance DNA od temperature oziroma od pH!

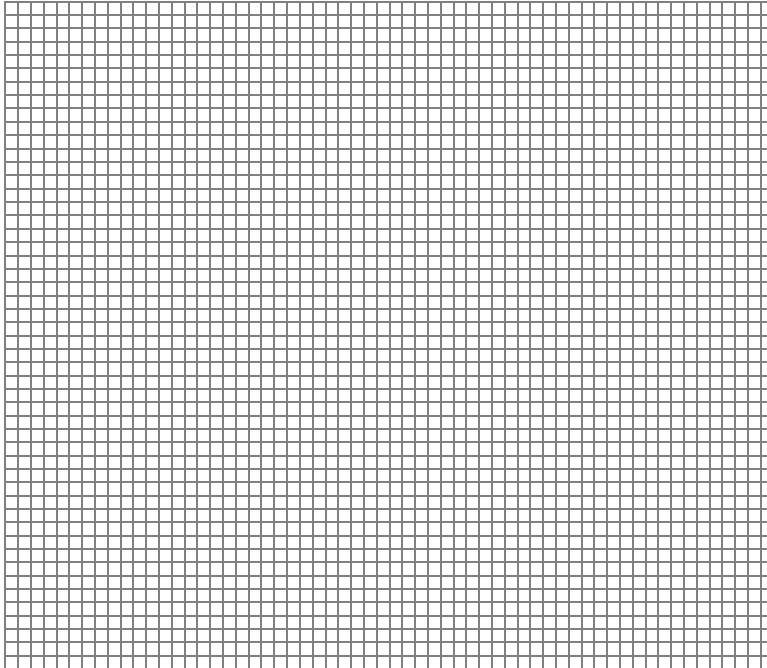
T (°C)	A_{260}
--------	-----------

Graf odvisnosti A_{260} od temperature





Graf odvisnosti A_{260} od pH



Iz dobljenih grafov ugotavljam, da je temperatura tališča izolirane DNA _____ °C, DNA pa se denaturira pri pH _____.

Točki prehoda vrišite v graf!

Za koliko se je ob popolni denaturaciji povečala absorbanca (v %)? _____

Vprašanja za poročilo:

1. Opišite morebitna opažanja in posebnosti pri izvedbi vaje!
2. Zakaj mislite, da pri pomnoževanju DNA z metodo PCR DNA denaturirajo termično, ne z naalkaljenjem?
3. Ali bi pričakovali, da se DNA denaturira tudi v kislem? Zakaj?
4. Pri katerih tehnikah je pomembna denaturacija DNA?