

**POLITEHNIKA NOVA GORICA**

**DODIPLOMSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM OKOLJE**

**BIOKEMIJA**

**VAJE ZA ŠOLSKO LETO 2004/05**

**Dr. Uroš Petrovič  
Mojca Mattiazzi**

## Uvodna navodila za biokemijske vaje 2004/05:

Vaje bodo potekale v šestih terminih približno po 4 polne ure. Prvih pet terminov bo potekalo na Politehniko, zadnji na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani:

Datum	Vaja	Lokacija
18.02.2005	1 (Uvodna)	P-NG
25.02.2005	2	P-NG
04.03.2005	3	P-NG
11.03.2005	4	P-NG
18.03.2005	5	P-NG
bo sporočen naknadno	6	IJS, LJ

Udeležba na vajah je obvezna, h kolokviju lahko pristopijo samo študentje, ki bodo imeli opravljene vse vaje. Za opravljeno vajo je poleg aktivne prisotnosti na vaji potrebno tudi od vodje vaj pregledano poročilo o vaji. V primeru, da študent opravičeno izostane od vaje, lahko največ eno vajo opravi teoretično, z zagovorom pri vodji vaj.

Po končanih vajah boste opravljali kolokvij, sestavljen iz desetih vprašanj, ki se navezujejo na vsebino vaj. Uspešno opravljen kolokvij (min. 60%) je pogoj za opravljen izpit iz biokemije.

Pri vsaki vaji je potrebno individualno izdelati poročilo o vaji. Poročilo je kratko in se napiše ob koncu posamezne vaje, vodja vaj ga bo pregledal in s podpisom potrdil, da je študent vajo opravil. Poročilo naj vsebuje naslednje točke:

- Namen vaje: kratek opis, kaj smo želeli pri vaji doseči,
- Potek vaje: kratka in shematična predstavitev praktične izvedbe vaje,
- Meritve: rezultati opravljenih meritev,
- Rezultati: namesto opisovanja rezultatov odgovorite na vprašanja, ki so podana ob koncu vsake vaje,
- Razprava: opis eventualnih posebnosti pri delu, predlaganih izboljšav ipd. Ta točka je posebej pomembna kot razlaga v primeru, če katera od vaj ne bo uspela oziroma če ne bo vseh potrebnih meritev.

Iz varnostnih razlogov je v laboratoriju prepovedano uživanje hrane in pijače, iz istih razlogov je obvezna uporaba laboratorijske halje. Vsaka kemikalija je v zadostni količini lahko strupena in vsak mikroorganizem je potencialno nevaren zdravju, zato izvajajte vaje previdno, čeprav so izbrane tako, da ob normalnem poteku niso nevarne ali škodljive za zdravje.

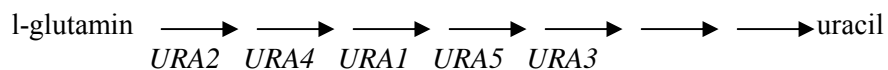
Aparature in kemikalije so drage, zato preverite vsak eksperimentalni korak in če karkoli ni jasno, vprašajte vodjo vaj.

Poleg pričujočih navodil za izvedbo praktičnih vaj priporočava kot študijski pripomoček pri vajah tudi skripta »Biokemija v praksi: načela in tehnike« avtorja Roberta Kuhelj, ki jih je izdala Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

## Vaja 1: Ugotavljanje mesta mutacije v biosintezi uracila pri kvasovki *S. cerevisiae*

Kvasne celice (vrsta *Saccharomyces cerevisiae*) so – poleg tega, da se uporabljajo za fermentacijo alkoholnih pijač ter za vzhajanje testa – najpogosteje uporabljan in najboljše preučen modelni evkariontski organizem. Celice kvasovke *S. cerevisiae* lahko živijo v haploidni obliki, torej s samo enim setom svojih 16 kromosomov, ali v diploidni obliki, kjer je v jedru celic 32 kromosomov, torej dva seta homolognih kromosomov. Celice *S. cerevisiae* so lahko enega od dveh paritvenih tipov (angl. »mating type«, oznaka Mat), Mat a in Mat  $\alpha$ , in lahko s spolnim razmnoževanjem, ki poteče samo med haploidnima celicama nasprotnih paritvenih tipov, preidejo iz haploidne (a ali  $\alpha$  oblike) v diploidno (a/ $\alpha$ ) obliko. Prehod iz diploidne v haploidno obliko pa se zgodi, če diploidna celica zaradi okoljskega stimulusa (npr. pomanjkanja hranil) vstopi v mejozo, kjer iz ene diploidne celice nastanejo štiri haploidne spore, od katerih sta po dve med seboj genetsko identični in tudi istega paritvenega tipa. Zaradi te sposobnosti je kvasovka *S. cerevisiae* zelo uporaben organizem za genetske študije.

Uracil je kot sestavina RNA nujno potreben za rast in delitev kvasnih celic. Tako kot vse kompleksne molekule, ki gradijo celico kvasovke, je vsaka kvasna celica sposobna iz osnovnih sladkorjev in mineralnih virov sintetizirati tudi uracil. Za biosintezo uracila iz l-glutamina so potrebni produkti petih genov, *URA1-URA5*:



Mutacija v kateremkoli od teh petih genov povzroči, da kvasovka ne more sintetizirati uracila in zatorej ni več sposobna rasti, razen če lahko dobi uracil iz svojega okolja. Sev takšnih celic imenujemo avksotrofen za uracil (t.j. ni sposoben rasti brez uracila), za razliko od prototrofnih sevov, ki za svojo rast ne potrebujejo dodatka kompleksnih molekul v okolju. Prototrofne seve lahko od avksotrofnih ločimo z gojenjem na minimalnih gojiščih, ki vsebujejo samo preprosta hranila (najpogosteje glukozo kot vir C in amonijeve ione kot vir N). Za rast za uracil avksotrofnega seva na minimalnemu gojišču pa moramo v gojišče dodati še uracil.

Mutacije v biosintetskih genih, katerih posledica je neaktivnost proteina, produkta prizadetega gena, so recesivne mutacije. Le izjemoma najdemo primer biosintetskih genov, kjer je mutacija dominantna, vendar v teh primerih produkt gena z mutacijo najpogosteje pridobi drugačno funkcijo. V diploidni kvasni celici je že ena nemutirana (funkcionalna) oblika vsakega od genov *URA1-URA5* dovolj, da je celica sposobna sintetizirati uracil – na primer, heterozigot *URA1/ura1* (pri kvasovki *S. cerevisiae* se po dogovoru z velikimi črkami piše nemutirana oziroma funkcionalna oblika gena, z malimi pa mutirana oziroma nefunkcionalna oblika) je zatorej prototrofen. To nam omogoča, da lahko s križanji med različnimi za uracil avksotrofnimi sevi ugotavljamo, kateri od genov v biosintezi uracila je mutiran oziroma nefunkcionalen.

### Praktični del:

Vaja se izvaja v treh zaporednih terminih, hkrati z drugimi vajami.

**VARNOSTNO OPOZORILO:** Zaradi dela z mikroorganizmi, da ne bi prišlo do okužbe plošč ali vas, delajte z uporabo sterilnih tehnik, vse ob gorilnikih.

1. dan: Vsaka od skupin bo dobila pet haploidnih (testerskih) sevov z znano mutacijo v sintezi uracila (Mat a *ura1*, Mat a *ura2*, Mat a *ura3*, Mat a *ura4* in Mat a *ura5*) in en (preiskovani) sev Mat  $\alpha$  z neznano mutacijo v biosintezi uracila.

Na pripravljene agarne plošče z bogatim gojiščem (vsebuje kompleksne molekule, vključno z uracilom) z »Drigalski« spatulo (t.j. steklenim trianglom) razmažite 100  $\mu$ l predpripravljene kulture preiskovanega seva – pred nanosom kulturo dobro premešajte, da dobite homogeno suspenzijo. Nato s cepilno zanko na isto ploščo nacepite v petih ločenih predelih plošče še testerske seve, tako da jih nacepite v obliki kvadrata približne velikost 1 cm<sup>2</sup>. Vse plošče ustrezno označite! Poročilo o vaji boste oddali, ko bo vaja končana, že danes pa poskusite odgovoriti na vprašanje 1.

Plošče inkubirajte 4 dni pri sobni temperaturi, nato jih prestavite v hladilnik (4°C).

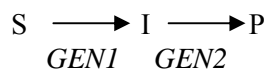
2. dan (skupaj z vajo 2): Vse plošče, ki ste jih pripravili na prejšnji vaji, preko sterilnega žameta odtisnite (duplicirajte) na minimalno gojišče brez uracila oziroma na minimalno gojišče z dodanim uracilom za kontrolo.

Plošče inkubirajte 4 dni pri sobni temperaturi, nato jih prestavite v hladilnik (4°C).

3. dan (skupaj z vajo 3): Preglejte rast posameznih sevov *S. cerevisiae* po ploščah in odgovorite še na vprašanja 2 do 4.

#### VPRAŠANJA:

1. Predpostavimo hipotetičen primer: gena *GEN1* in *GEN2* sta vključena v biosintezo produkta P iz substrata S preko intermedijata I:



P je nujno potreben za rast kvasnih celic. S križanjem smo ugotovili, da so sevi (*GEN1/GEN1,GEN2/GEN2*), (*gen1/GEN1,GEN2/GEN2*), (*GEN1/GEN1,gen2/GEN2*) in (*gen1/GEN1,gen2/GEN2*) sposobni rasti na gojišču brez dodanega P, sevi (*gen1/gen1,GEN2/GEN2*), (*GEN1/GEN1,gen2/gen2*), (*gen1/gen1,gen2/GEN2*), (*gen1/GEN1,gen2/gen2*) in (*gen1/gen1,gen2/gen2*) pa ne. Kaj lahko o biosintetski poti produkta P ter o udeleženi genih sklepate iz teh podatkov?

2. Sestavite tabelo, iz katere bo razvidno, kateri križanci so zrastle na posameznih gojiščih!
3. Mutacijo v katerem od uracilnih biosintetskih genov je nosil vaš preiskovani sev? Utemeljite!
4. Za pripravo diploidnih križancev smo uporabili bogato gojišče. Če bi namesto njega uporabili minimalno gojišče, ali bi bilo potrebno vanj dodati tudi uracil, da bi dobili enak rezultat eksperimenta? Utemeljite!