

**Zakład Biologii Molekularnej
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego**

Białka i Kwasy Nukleinowe

**Materiały do zajęć
w roku akademickim 2022/2023**

wersja 5.4

Wpisz w ramkę poniżej swoje imię i nazwisko

--

Spis treści

Regulamin pracowni	3
Wstęp	4
Literatura ogólna	5
Zespół prowadzący zajęcia	5

Ćwiczenia

1. Oczyszczanie lizozymu z białka jaja kurzego	6
2. Oczyszczanie rekombinowanych białek SR wyrażanych w różnych systemach ekspresyjnych	13
3. Oznaczanie aktywności ludzkiej topoizomerazy I w ekstraktach jądrowych komórek HeLa	22

Załącznik

1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS (SDS-PAGE)	25
2. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	28
3. Aparatura FPLC	29
4. Po co są te substancje w roztworach stosowanych podczas ćwiczeń?	31

W skrypcie zastosowano następujące oznaczenia:

Podane w części opisującej wykonanie ćwiczenia numery odczynników (w nawiasach kwadratowych, np. [6]) odpowiadają numerom stosowanym w spisie odczynników.

Znakiem ☺ oznaczono materiały przygotowane przez prowadzących.

Regulamin pracowni

1. W pracowni należy zachować ostrożność, porządek i czystość. Studenci obowiązani są posprzątać po swojej pracy.
2. W pracowni należy nosić bezpieczne obuwie i fartuch laboratoryjny, a przy pracy z substancjami szkodliwymi rękawiczki lateksowe. Okrycia wierzchnie należy pozostawić w szatni wydziałowej.
3. Opuszczając stanowisko pracy należy sprawdzić czy wszystkie niepotrzebne urządzenia elektryczne, gaz i woda zostały wyłączone, drobny sprzęt odłożony na miejsce, a użyte naczynia laboratoryjne umyte i odłożone do suszenia.
4. Studenci nie mogą pracować w pracowni bez opieki pracownika dydaktycznego.
5. W pracowni nie wolno palić tytoniu, spożywać posiłków i napojów, aplikować kosmetyków. Nie używać naczyń laboratoryjnych do celów spożywczych.
6. Odczynniki należy przechowywać w odpowiednim porządku. Nie wolno trzymać żadnych substancji w niepodpisanych opakowaniach. Łatwopalne rozpuszczalniki, a także stężone kwasy i zasady można przechowywać w pracowniach pod wyciągiem tylko w ilościach zaspokajających bieżące potrzeby.
7. Prace z rozpuszczalnikami organicznymi należy prowadzić przy sprawnie działającej wentylacji. Podczas pracy nie wolno używać otwartego ognia. Etanol używany w pracowni jest skażony.
8. Prace z kwasami i zasadami należy prowadzić pod sprawnie działającym wyciągiem chemicznym.
9. Nigdy nie należy pipetować ustami substancji trujących, żrących lub innych szkodliwych dla zdrowia.
10. Pracując z urządzeniami elektrycznymi należy stosować należyłą ostrożność.
11. Odpady plastikowe (końcówki do pipet, probówki) należy składować w specjalnie oznaczonych pojemnikach w celu poddania dezynfekcji i utylizacji.
12. Odpadów substancji, które mogą stanowić zagrożenie dla środowiska naturalnego, nie wolno wylewać do zlewów. Należy je zlewać do szczelnych podpisanych butelek i przechowywać pod wyciągiem. Będą okresowo zbierane do zniszczenia.
13. Odpady innych stężonych substancji można wylewać do zlewu po ich znacznym rozcieńczeniu, obficie spłukując wodą z kranu.
14. Okna w pracowni można tylko uchylać w pozycji pionowej. Nie można otwierać ich na oścież.
15. W razie zaistnienia nawet najmniejszego wypadku należy niezwłocznie powiadomić opiekującego się pracownią pracownika dydaktycznego.

Wstęp

Szanowni Państwo!

Witamy na zajęciach "białka i kwasy nukleinowe". Cieszymy się bardzo, że wybrali Państwo nasze zajęcia z oferty Wydziału Biologii.

Mamy nadzieję, że w przygotowanym skrypcie do zajęć znajdą Państwo wszystkie niezbędne wskazówki potrzebne do wykonania ćwiczeń oraz wiele dodatkowych informacji. Warunkiem uczestnictwa w zajęciach jest zapoznanie się z Regulaminem Pracowni i zobowiązanie do jego przestrzegania.

Głównym celem naszych zajęć jest zapoznanie Państwa z podstawowymi sposobami uzyskiwania białek zarówno ze źródeł naturalnych, jak i z systemów do ekspresji białek rekombinowanych. Poznają Państwo metody oczyszczania i frakcjonowania białek, także za pomocą zautomatyzowanego systemu FPLC. Wszystkie ćwiczenia wykonują Państwo w parach. Każdy wykona zestaw czterech ćwiczeń. **Ćwiczenie pierwsze** zawiera elementy klasycznej procedury oczyszczania białek ze źródeł naturalnych, choć w tym przypadku materiał wyjściowy jest łatwo dostępny i pomija żmudne procesy homogenizacji materiału biologicznego i wyodrębniania frakcji bogatej w oczyszczane białko. Zawiera natomiast klasyczne elementy oczyszczania takie jak filtracja, chromatografia jonowymienna i sączenie molekularne, analiza aktywności enzymatycznej, przygotowanie próbek do elektroforezy, elektroforeza białek i uwidocznienie białek w żelu. **Ćwiczenie drugie** wykorzystuje nowoczesne złoża stosowane w chromatografii powinowactwa, umożliwiające oczyszczenie białka w krótkiej, jednoetapowej procedurze. Oczyszczenie ludzkiego białka SRSF1 z komórek *Escherichia coli* opiera się na oddziaływaniu znacznika dodanego metodami inżynierii genetycznej z odpowiednim złożem – jest to krótka sekwencja aminokwasowa lub stosunkowo duże białko, w zależności od wariantu ćwiczenia i warunków oczyszczania białek. **Ćwiczenie trzecie** jest przykładem częściowego oczyszczenia aktywności enzymatycznej metodą frakcjonowania organelli komórkowych.

Podstawą zaliczenia fakultetu jest wykonanie wszystkich przewidzianych ćwiczeń, analiza otrzymanych wyników oraz uzyskanie oceny pozytywnej ze sprawdzianu końcowego.

Nie można poprawiać poszczególnych ćwiczeń. W uzasadnionych przypadkach dopuszczalne jest powtórzenie analizy elektroforetycznej uzyskanych preparatów.

Kolokwium końcowe będzie składało się z kilku zadań opisowych. Zadania mogą dotyczyć rozwiązywania problemów laboratoryjnych lub odnosić się do podstaw metod pracy z białkami i DNA.

W trakcie całych zajęć prosimy o:

1. Bezwzględne przestrzeganie regulaminu pracowni.
2. Prowadzenie dziennika laboratoryjnego zawierającego obliczenia i notatki związane z wykonywanymi ćwiczeniami.
3. Ogólną dbałość o salę.

Życzymy Państwu przyjemnych ćwiczeń
zespół prowadzący

Literatura ogólna

1. Kłyszajko-Stefanowicz, L., red. (2017) Ćwiczenia z biochemii. PWN, Warszawa.
2. Autor anonimowy (2009) Recombinant protein purification handbook. Principles and methods. GE Healthcare, Uppsala. www.gelifesciences.com
3. Autor anonimowy (2010) Strategies for protein purification. Handbook. GE Healthcare, Uppsala. www.gelifesciences.com

Zespół prowadzący zajęcia

1. dr hab. Agnieszka Girstun, pok. 111/D
2. dr Takao Ishikawa, pok. 6/C, t.ishikawa@uw.edu.pl – kierownik pracowni
3. dr hab. Piotr Kozłowski, pok. 108/D
4. dr Joanna Trzcińska-Danielewicz, pok. 108/D

Ćwiczenie 1.

Oczyszczanie lizozymu białka jaja kurzego

WSTĘP

Lizozym (EC 3.2.1.17, *N*-acetylmuramoylohydrolaza peptydoglikanowa, muramidaza) katalizuje hydrolizę wiązań β -1,4-glikozydowych między kwasem *N*-acetylmuraminowym a *N*-acetylo-D-glukozaaminą w mukopolisacharydach bakteryjnych ścian komórkowych. Enzym ten jest obecny w organizmach kręgowców i owadów, ale także u niektórych roślin, grzybów, bakterii czy bakteriofagów i stanowi składnik obrony antybakteryjnej (lub umożliwia penetrację komórki bakteryjnej przez fagi). U człowieka obecny jest m.in. we łzach, ślinie i mleku. Szczególnie bogatym i łatwo dostępnym źródłem tego enzymu jest białko jaja kurzego (stanowi ok. 3,5% całkowitej masy białka).

Ćwiczenie polega na wyizolowaniu z białka jaja kurzego oczyszczonego lizozymu. Preparatyka ta wymaga wstępną homogenizację i żmudne frakcjonowanie materiału biologicznego, często niezbędne przy oczyszczaniu białek z tkanek. Do właściwego oczyszczania wykorzystuje się różne właściwości enzymu – jego niewielką masę cząsteczkową (14,3 kDa) i wysokie pI (10,5). Zwykle izolacja białek jest przeprowadzana w niskich temperaturach i z użyciem inhibitorów proteaz. Ze względu na wyjątkową stabilność lizozymu (enzym ten znosi nawet krótkotrwałe podgrzanie do 100°C), oczyszczania chromatograficzne w trakcie tych zajęć będą przeprowadzone na ogół w temperaturze pokojowej. Najpierw wykonane zostanie sączenie molekularne (filtracja żelowa) na złożu Sephadex G75 (zdolnym do rozdzielania białek w zakresie 3-80 kDa). Następnie, wybrane frakcje zostaną poddane ponownie chromatografii poprzez sączenie molekularne w systemie FPLC (fast protein liquid chromatography, na kolumnie ENrich SEC 70 o zakresie roboczym 0,5-70 kDa; w temperaturze ok. 4°C, ponieważ na potrzeby preparatyki innych białek, aparat do FPLC znajduje się w chłodni) albo dalszemu oczyszczaniu metodą chromatografii jonowymiennej na złożu CM Sephadex C25 (kationit z grupą karboksymetylową).

Frakcje uzyskane z oczyszczania na złożu Sephadex G75 zostaną wstępnie poddane analizie pod względem zawartości białka (metodą Bradforda). W wybranych frakcjach ze wszystkich etapów oczyszczania zostanie oznaczona aktywność enzymatyczna lizozymu za pomocą testu polegającego na trawieniu zawiesziny liofilizowanych ścian komórkowych z bakterii *Micrococcus lysodeikticus* (*M. luteus*) i rejestrowaniu zmian w jej zmętnieniu (przy pomocy spektrofotometru). Wybrane frakcje ze wszystkich etapów oczyszczania zostaną też poddane analizie na żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS (SDS-PAGE).

PROCEDURA

Ćwiczenie trwa 4 zajęcia. Pierwszego dnia należy sporządzić bufory, namoczyć złoża i przygotować tzw. buforowane białko. Drugiego dnia trzeba przygotować materiał biologiczny (tzw. buforowane białko) i przeprowadzić sączenie molekularne na przygotowanej przez siebie kolumnie ze złożem Sephadex G75. Trzeciego dnia zostaną przeprowadzone dwie alternatywne chromatografie; część zespołów wykona sączenie molekularne na kolumnie ENrich SEC 70 w systemie FPLC, zaś pozostali, chromatografię jonowymienną na przygotowanej przez siebie kolumnie ze złożem CM Sephadex C25. Ostatniego, czwartego dnia, należy oznaczyć aktywność enzymatyczną lizozymu w uzyskanych frakcjach i wykonać analizę elektroforetyczną całego przebiegu preparatyki.

Uwagi ogólne:

1. **W tym ćwiczeniu wszystkie bufory potrzebne do izolacji należy przygotować samodzielnie w oparciu albo o stężone roztwory przygotowane przez prowadzących (oznaczone ☺) albo z naważek.**
2. **Lizozym jest białkiem wyjątkowo stabilnym. Tym niemniej jego izolację należy wykonywać w obecności świeżo dodanego (niestabilny w roztworze wodnym) fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF), będącego inhibitorem peptydaz.**
3. ☹ **PMSF jest groźny dla błon śluzowych, oczu i skóry. Nigdy nie pipetować ustami. W przypadku kontaktu z PMSF należy natychmiast przemyć skórę (oczy) dużą ilością letniej wody.**
4. ☹ **Wariant D1 ćwiczenia (sączenie molekularne w aparaturze FPLC) będzie wykonywany w chłodni. Osoby wykonujące ten wariant ćwiczenia powinny mieć ze sobą odpowiednio ciepłą odzież!**

Materiał biologiczny

jedno jajo kurze klasy XL od kur z chowu ściółkowego lub z wolnego wybiegu

Odczynniki

1. ☺ 1 M Tris-HCl, pH 8,0
2. ☺ 5 M NaCl
3. ☺ 0,2 M Na₂CO₃, pH 10,5
4. ☺ 0,1 M KH₂PO₄
5. ☺ 0,1 M K₂HPO₄
6. ☺ 100 mM PMSF w 96% etanolu
7. ☺ Blue Dextran 2000, 3 mg/ml

8. Bufor kolumnowy, pH 8,2 (300 ml):
0,05 M Tris-HCl
0,05 M NaCl
pH doprowadzić za pomocą HCl lub NaOH
0,05 mM PMSF (**dodać bezpośrednio przed użyciem odpowiednią ilość [6]**)
9. Bufor fosforanowy pH 7,0 (ok. 100 ml):
Zmieszać ze sobą roztwory obu fosforanów potasu posilując się tabelą nad pehametrem w takich proporcjach, żeby końcowe pH wynosiło 7,0. Do fosforanu dwuzasadowego zanurzyć elektrodę i dodawać jednozasadowego do momentu uzyskania właściwego pH.
10. Roztwór do elucji, pH 10,5 (10 ml):
0,2 M Na₂CO₃ [3]
0,05 mM PMSF (**dodać bezpośrednio przed użyciem odpowiednią ilość [6]**)
11. ☺ Bufor do kolumny ENrich SEC 70, pH 8,2 (100 ml):
0,05 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
pH doprowadzone za pomocą HCl
roztwór filtrowany przez filtr o średnicy porów 0,22 µm
roztwór odgazowany przez sterylizację w autoklawie
12. Złoża:
 - Sephadex G75 (dodać 1,5 g suchego Sephadex G75 do probówki typu Falcon o pojemności 50 ml i zalać 45 ml buforu kolumnowego [8]) i pozostawić w temperaturze pokojowej – **wszystkie pary**
 - CM Sephadex C25 (dodać 0,25 g suchego CM Sephadex C25 do probówki typu Falcon o pojemności 50 ml i zalać 45 ml buforu kolumnowego [8]) i pozostawić w lodówce – **tylko wskazane pary**

Uwaga:

Złoża należy przygotować na ćwiczeniach poprzedzających chromatografię i pozostawić do spęcznienia. Na następnych zajęciach należy ostrożnie zdekantować bufor znad złoża i dodać 40 ml buforu kolumnowego (o temp. pokojowej).

13. ☺ Odczynnik Bradforda
14. ☺ Kobalamina 1 mg/ml
15. ☺ Preparat ścian komórkowych *M. lysodeiktitikus* (nawążka 30 mg)
16. ☺ Bufor Laemmliego 5× (zob. Załącznik pkt 1.)
17. ☺ Preparat białek wzorcowych BR

Wykonanie

A. Przygotowanie materiału do izolacji – tzw. buforowanego białka

1. Izolację rozpocząć od starannego oddzielenia białka od żółtka (zacząć od rozbicia skorupki). Jedno jajko może służyć jako materiał wyjściowy dla trzech par wykonujących ćwiczenie.
2. Uzyskane białko jaja, wolne od jakichkolwiek domieszek żółtka, przefiltrować przez podwójnie złożoną gazę do zlewki o pojemności 100-200 ml (nie ścisnąć gazy). Do dalszej preparatyki potrzebne będzie 2 ml przefiltrowanego białka.
3. Przenieść po 1 ml przefiltrowanego białka do dwóch probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i zwirować w mikrowirówce przez 5 min. przy maksymalnych obrotach.
4. Delikatnie pobrać z jednej z probówek 0,5 ml klarownego supernatantu i przenieść do nowej probówki o pojemności 1,5 ml (druga probówka stanowiła równowagę podczas wirowania, dlatego można teraz ją wyrzucić). Dodać 0,5 ml buforu kolumnowego i delikatnie wymieszać. Oznaczyć jako BB_P (buforowane białko do preparatyki).
5. Przenieść 150 µl buforowanego białka do kolejnej probówki typu Eppendorf podpisanej jako BB₀ i zamrozić. Próbkę BB₀ będzie potrzebna w częściach E i F tego ćwiczenia.
6. Jeśli dalsze etapy ćwiczenia będą wykonywane innego dnia, próbkę BB_P należy również zamrozić.

B. Przygotowanie kolumny ze złożem Sephadex G75 (wspólne dla obu wariantów ćwiczenia)

7. Otrzymaną od prowadzących kolumnę przepłukać wodą, odkręcić kranik i upewnić się, że przepływ jest dobry. W razie kłopotów, skonsultować się z osobą prowadzącą zajęcia. Umocować kolumnę w statywie.
8. Zamknąć kranik (**zawsze przytrzymać kolumnę u wylotu drugą ręką, inaczej może pęknąć jej szklana rurka**) i napełnić kolumnę buforem kolumnowym [8] do ¼ wysokości kolumny. Zawiesinę złoża Sephadex G75 wymieszać i nałożyć na kolumnę za pomocą plastikowej pipety Pasteura.
9. Odkręcić kranik i stopniowo dodawać zawiesiny złoża Sephadex G75, aż do wypełnienia kolumny zwartym złożem do wysokości czerwonego napisu Sigma. Zamknąć kranik. Dbać o to, aby zawsze był słup buforu nad złożem. **Nie dopuścić do wyschnięcia złoża.**
10. Prawidłowe i jednolite ułożenie złoża jest kluczowe w chromatografii. Należy pilnować, żeby nie tworzyły się pęcherzyki powietrza w złożu. Prawidłowe działanie kolumny zostanie sprawdzone przez przepuszczenie roztworu Blue Dextran 2000 – niebiesko zabarwionego wielkocząsteczkowego polisacharydu opuszczającego kolumnę po usunięciu z niej roztworu o objętości równej objętości pustej kolumny. Związek nie mieszczący się w porach złoża do sączenia molekularnego zawsze będzie opuszczać kolumnę wcześniej niż jakiekolwiek białko penetrujące złożo.
11. Odkręcić kranik i pozwolić, aby ciecz wsiąknęła w złożo. Zamknąć kranik.
12. Przygotować 3 probówki typu Falcon o pojemności 15 ml ze skalą.
13. Nawarstwić 100 µl roztworu Blue Dextran 2000 na powierzchnię złoża, następnie otworzyć kranik i pozwolić wsiąknąć w złożo. Nawarstwić 1 ml buforu kolumnowego, ponownie otworzyć kranik i pozwolić wsiąknąć w złożo. Następnie wolno wypełnić

kolumnę buforem i dalej prowadzić chromatografię. Bezbarwny roztwór zbierać do pierwszej probówki. Gdy u wylotu kolumny pojawi się niebieski roztwór, zbierać go do drugiej probówki. Gdy roztwór opuszczający kolumnę stanie się znów przezroczysty, zacząć go zbierać do probówki trzeciej. Zakręcić kranik po zebraniu ok. 2 ml przezroczystego roztworu.

14. Określić objętość pustą kolumny i rozcieńczenie Blue Dextran 2000. Kolumnę pozostawić pod słupem buforu.

C. Sączenie molekularne na złożu Sephadex G75

1. Podpisać od 1 do 12 probówki do zbierania frakcji (probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i wytłoczoną skalą) i umieścić je w statywie.
2. Pod kolumnę podstawić zlewkę. Odkręcić kranik i pozwolić, aby ciecz prawie do końca wsiąknęła w złoże. Zamknąć kranik. Usunąć zlewkę i podstawić statyw z probówką nr 1 pod wylot kolumny. Nawarstwić 0,5 ml buforowanego białka. Otworzyć kranik i pozwolić wsiąknąć w złoże. Zamknąć kranik. Nawarstwić 1 ml buforu kolumnowego. Otworzyć kranik. Kiedy w probówce nr 1 zbierze się 1 ml wycieku, przesunąć statyw, aby pod wylotem znalazła się probówka nr 2. Kiedy ta porcja buforu kolumnowego wsiąknie w złoże, delikatnie wypełnić kolumnę buforem kolumnowym i dalej prowadzić chromatografię, zbierając kolejne frakcje o objętości ok. 1 ml.
3. W zebranych frakcjach oznaczyć obecność białka. Do 12 nowych probówek typu Eppendorf dodać po 80 μ l odczynnika Bradforda [13], a następnie dodać do nich po 20 μ l z każdej zebranej frakcji i zaobserwować zmianę zabarwienia po ok. 7 min. (białko powinno być obecne od frakcji nr 5).
4. Ze względu na to, że w jajkach obficie występuje owoalbumina (ok. 43 kDa), białko to prawdopodobnie spowoduje intensywne zabarwienie próbki nr 5 lub 6 z odczynnikiem Bradforda. Lizozym o m.c. 14,3 kDa prawdopodobnie powinien się znajdować we frakcji nr 7 lub 8, które pod wpływem odczynnika Bradforda zabarwią się mniej intensywnie. To te frakcje zostaną użyte do dalszego oczyszczania techniką sączenia molekularnego w systemie FPLC (wariant D1) lub metodą chromatografii jonowymiennej (wariant D2) w zależności od wariantu wykonywanego ćwiczenia.
5. Z frakcji nr 7 i 8 przenieść po 150 μ l do nowych probówek typu Eppendorf, podpisanych 7A i 8A, a następnie wszystkie 4 probówki zamrozić.

D1. Sączenie molekularne na kolumnie ENrich SEC 70 w systemie FPLC (wariant I ćwiczenia)

1. Rozmrozić frakcję nr 7 lub 8 po sączeniu molekularnym na złożu Sephadex G75 (z pkt. C; wybrać tę o wyższym stężeniu białka) i przefiltrować za pomocą filtra strzykawkowego z membraną PVDF o średnicy porów 0,22 μ m (Millipore) do nowej probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml.
2. Do filtratu (ok. 600 μ l) dodać roztworu kobalaminy [14] do końcowego stężenia ok. 20 μ g/ml (roztwór stanie się lekko różowy).
3. Podpisać od 1 do 25 probówki do zbierania frakcji (probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml z wytłoczoną skalą, którym obcięto wieczka) i umieścić je w odpowiedniej kolejności w statywie kolektora frakcji przy aparacie do FPLC.
4. Do pętli iniekcyjnej aparatu do FPLC wstrzyknąć 500 μ l tak przygotowanego roztworu.
5. Rozdział wykonać przy użyciu buforu do kolumny ENrich SEC 70 [11].
6. Uruchomić odpowiedni profil programu BioLogic Duo Flow – programu do obsługi

aparatu do FPLC (włączony kolektor frakcji i spektrofotometr UV przy 280 nm, przepływ: 0,5 ml/min.; wstępne płukanie kolumny: 1 ml; ładowanie preparatu do kolumny: 0,5 ml; elucja: 20 ml.

7. Po ok. 20 min. pojawi się sygnał od owoalbuminy (o masie 45 kDa).
8. Sygnał od kobalaminy (o masie 1,35 kDa), po ok. 40 min., wskazuje koniec rozdziału chromatograficznego. Tuż przed nim powinien znajdować się sygnał od lizozymu (o masie 14,3 kDa). Otrzymany chromatogram porównać z chromatogramem wzorców.
9. **Uwaga!** Ze względu na konstrukcję detektora (spektrofotometru UV), w trakcie rozdziału **nie wyłączać światła w chłodni**.
10. Frakcje zawierające lizozym **zamrozić**.

D2. Chromatografia jonowymienna na złożu CM Sephadex C25 (wariant II ćwiczenia)

1. Uzyskaną od prowadzących szklaną kolumnę przepłukać wodą, odkręcić kranik i upewnić się, że przepływ jest dobry. W razie kłopotów, skonsultować z osobą prowadzącą zajęcia. Umocować kolumnę w statywie.
2. Zamknąć kranik (przytrzymując wylot kolumny drugą ręką) i napęlnić kolumnę buforem kolumnowym [8] do $\frac{1}{4}$ wysokości. Zawiesinę złoża CM Sephadex C25 wymieszać i nałożyć na kolumnę za pomocą pipety Pasteura.
3. Odkręcić kranik i stopniowo dodawać zawiesiny, aż do wypełnienia kolumny zwartym złożem do objętości 0,7 ml. Zamknąć kranik. Dbać o to, aby zawsze był słup buforu nad złożem. **Nie dopuścić do wyschnięcia złoża**.
4. Podpisać od 1 do 16 probówki do zbierania frakcji (probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i wytluszczoną skalą) i umieścić je w statywie.
5. Odkręcić kranik i pozwolić, aby ciecz wsiąknęła w złoże. Zamknąć kranik. Nawarstwić ok. 1,7 ml rozmrożonych i zmieszanych ze sobą frakcji nr 7 i 8 po sączeniu molekularnym na złożu Sephadex G75 (z pkt. C), następnie pozwolić wsiąknąć naniesionemu preparatowi w złoże. Nawarstwić 1 ml buforu kolumnowego, pozwolić wsiąknąć w złoże. Następnie, wolno wypełnić kolumnę buforem i dalej prowadzić chromatografię. Zebrać 8 frakcji o objętości 1 ml.
6. Następnie przystąpić do elucji korzystając z roztworu do elucji [10]. Zebrać 8 frakcji elucyjnych po ok. 0,5 ml.
7. W zebranych frakcjach elucyjnych oznaczyć obecność białka. Do 8 nowych probówek typu Eppendorf dodać po 80 μ l odczynnika Bradforda [13], a następnie dodać do nich po 20 μ l z każdej zebranej frakcji i zaobserwować zmianę zabarwienia po ok. 7 min.
8. Zebrane frakcje elucyjne **zamrozić**.

E. Oznaczanie aktywności

1. Rozmrozić wszystkie frakcje zamrożone wcześniej próbki.
2. Przygotować zawiesinę substratu – **jedną dla wszystkich grup pracujących danego dnia** – 30 mg ścian komórkowych [15] zawiesić w 20 ml buforu fosforanowego [9] poprzez homogenizację w homogenizatorze Pottera. Przelać do zlewki i dopełnić tym buforem do 100 ml.
3. Ustawić spektrofotometr na długość fali 450 nm. Wyjściową zawiesinę ścian komórkowych rozcieńczyć tak, aby odczyt OD (gęstości optycznej, ang. *optical density*) nie przekraczał 0,8. Niżej opisane reakcje prowadzić w tak przygotowanej zawieszynie. Reakcję prowadzić w temp. pokojowej dodając do kuwety

spektrofotometrycznej 2 ml substratu i 100 μ l badanej frakcji. Pomiar aktywności polega na obserwacji obniżenia zmętnienia substratu w czasie. Należy oznaczyć aktywność w buforowanym białku (próbka BB₀), frakcjach 7A i 8A z sączenia molekularnego na złożu Sephadex G75, we frakcjach elucyjnych z FPLC, w których podejrzewamy obecność lizozymu, albo we frakcjach elucyjnych z chromatografii jonowymiennej na złożu CM Sephadex C25. Pomiar przeprowadzić w czasie 0 i po kolejnych minutach inkubacji, przez 5 minut. Sporządzić wykres przedstawiający zmiany absorbancji przy długości fali 450 nm dla wszystkich badanych frakcji.

F. Elektroforeza (wspólna dla obu wariantów ćwiczenia)

1. Do przygotowania próbek na elektroforezę użyć 2 μ l buforowanego białka (z próbki BB₀), uzupełnionego wodą do 40 μ l i po 40 μ l frakcji elucyjnych. Wybór frakcji do naniesienia na elektroforezę skonsultować z prowadzącym. Próbki przygotowywać w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Do wybranych próbek dodać 10 μ l buforu Laemmliego 5 $\times$ [16]. Podgrzać przez 3 min. w łaźni suchej o temp. 95°C. Gdyby elektroforeza miała być wykonana innego dnia, tak przygotowane próbki zamrozić.
2. Przeprowadzić rozdział elektroforetyczny przygotowanych próbek w 12% żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS (zob. Załącznik pkt 1.), nakładając po 25 μ l każdej próbki i zachowując resztę zamrożoną na wypadek konieczności powtórzenia elektroforezy. Należy pamiętać także o nałożeniu na żel białek wzorcowych [17].

Literatura do ćwiczenia:

Strang, R.H.C. (1984) Purification of egg-white lysozyme by ion-exchange chromatography. *Biochem. Edu.* 12(2):57-59.

Ćwiczenie 2.

Oczyszczanie rekombinowanych białek SR wyrażanych w różnych systemach ekspresyjnych

WSTĘP

Chcąc otrzymać dużą ilość białka będącego przedmiotem badań, najczęściej wyraża się je w postaci tzw. białka rekombinowanego w układzie heterologicznym, tzn. w komórkach innego typu niż te, w których naturalnie występuje. Pierwszym wyborem są zwykle systemy ekspresyjne pozwalające na uzyskanie białka w komórkach specjalnie skonstruowanych szczepów bakterii *E. coli*. Jednak indywidualne właściwości białek powodują, że nie zawsze są one wydajnie wyrażane w komórkach bakteryjnych w formie rozpuszczalnej. W takiej sytuacji można białko docelowe wyrazić w formie fuzji z bakteryjnym białkiem, które zwiększy rozpuszczalność rekombinowanego białka i pozwoli je uzyskać w formie rozpuszczalnej. Do tworzenia takiej fuzji zwykle stosuje się specjalnie przygotowane wektory ekspresyjne, które nie tylko kodują bakteryjne białka (np. GST, glutationo-S-transferazę lub MBP, białko wiążące maltozę), ale także sekwencję rozpoznawaną przez wysoce specyficzne proteazy. Takie rozwiązanie pozwala na odcięcie dodatkowego białka bakteryjnego z oczyszczonego białka fuzyjnego, umożliwiając otrzymanie czystego preparatu białka docelowego.

Przykładem białek, które trudno uzyskać metodą ekspresji w komórkach bakteryjnych, są ssacze czynniki splicingowe należące do rodziny SR. Białka te składają się z jednej lub dwóch ustrukturyzowanych domen RRM (RNA Recognition Motif) i pozbawionej drugorzędowej struktury domeny RS, bogatej w powtórzenia seryna/arginina, od której pochodzi nazwa całej rodziny. Białka SR charakteryzują się słabą rozpuszczalnością. W komórkach ssaków gromadzą się w jądrowej nukleoplazmie w postaci ziarnistości interchromatynowych i dopiero fosforylacja reszt serynowych w powtórzeniach SR nieco zwiększa ich rozpuszczalność. Rekombinowane ssacze białka SR, wyrażane w systemach bakteryjnych, pozostają nierozpuszczalne w natywnych warunkach izolacji, chyba że wyrazi się je w formie fuzji z wyżej wspomnianym bakteryjnym białkiem MBP.

Ćwiczenie ma na celu pokazanie na przykładzie oczyszczania jednego z białek SR:

- czym różni się oczyszczanie białka w warunkach natywnych i denaturujących,
- jakie mogą być zanieczyszczenia w przypadku oczyszczania białek oddziałujących z kwasami nukleinowymi.

Ćwiczenie składa się z trzech części:

- a. izolacji ludzkiego rekombinowanego białka SRSF1 (serine/arginine-rich splicing factor 1) z bakterii *E. coli*. Rekombinowane SRSF1 opatrzone w znacznik 6×His jest wyrażane w komórkach bakteryjnych na wysokim poziomie, ale charakteryzuje się znikomą rozpuszczalnością w buforach natywnych. Oczyszczanie białka zostanie wykonane w warunkach silnie denaturujących przy użyciu buforów zawierających 8 M mocznik. Zamiennie można byłoby zastosować inny, jeszcze silniejszy, związek denaturujący – chlorowodorek guanidyny w stężeniu 6 M.
- b. izolacji ludzkiego rekombinowanego białka SRSF1 z bakterii *E. coli*. Rekombinowane

SRSF1 w formie fuzji z białkiem MBP jest wyrażane w komórkach bakteryjnych na wysokim poziomie i charakteryzuje się dużą rozpuszczalnością w warunkach natywnych, co pozwala na jego wydajne oczyszczenie w buforach niezawierających czynnika denaturującego.

- c. analizy otrzymanych preparatów białkowych metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Ze względu na to, że oba warianty SRSF1 zawierają inny znacznik (6×His lub MBP), do oczyszczania zostaną wykorzystane inne złoża chromatograficzne. Do oczyszczenia SRSF1 w fuzji z 6×His należy zastosować złożo Ni-NTA-agaroz (agaroz z unieruchomionymi jonami Ni^{2+} chelatowanymi kwasem nitrylotrójoctowym), natomiast białko w fuzji z MBP zostanie oczyszczone z wykorzystaniem złoża w postaci ziarenek agarozy z unieruchomionymi cząsteczkami amylozy.

Białko 6×His-SRSF1 i MBP-SRSF1 migrują w żelu poliakrylamidowym z SDS jako białka o masie cząsteczkowej, odpowiednio, około 35 kDa i 75 kDa.

PROCEDURA

Ćwiczenie trwa 3 zajęcia. Pierwszego dnia należy wykonać część 2a, czyli przeprowadzić oczyszczanie białka 6×His-SRSF1 z komórek bakterii *E. coli* w warunkach denaturujących, oraz przeprowadzić indukcję ekspresji genu kodującego białko białka MBP-SRSF1, opisaną w części 2b. Drugiego dnia należy wykonać część 2b, czyli przeprowadzić oczyszczanie białka MBP-SRSF1 z komórek bakterii *E. coli* w warunkach natywnych. Trzeci dzień jest zarezerwowany na przeprowadzenie elektroforezy białek metodą SDS-PAGE.

Uwagi ogólne:

1. Próby z obu izolacji będą analizowane na jednym żelu elektroforetycznym.
2. Jeśli nie zostało podane inaczej, po pobraniu prób do analizy elektroforetycznej wszystkie frakcje chromatograficzne należy zamrozić i zachować do momentu obejrzenia wyników, na wypadek konieczności przeprowadzenia dodatkowej elektroforezy.
3. Jeśli nie zostało podane inaczej, wirowania należy wykonać w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach.
4. W części 2a używa się małych ilości złóż chromatograficznych, które łatwo zgubić na poszczególnych etapach. Należy postępować z nim ostrożnie, szczególnie uważając, aby po wirowaniu nie wciągnąć pipetą złoża razem z usuwanym supernatantem.

Część 2a

Oczyszczanie rekombinowanego białka 6×His-SRSF1 z komórek bakterii *Escherichia coli* w warunkach denaturujących

Uwagi ogólne:

Wszystkie czynności należy wykonywać w temperaturze pokojowej.

Procedura wykonana przed ćwiczeniami:

Do komórek bakterii *E. coli*, szczep BL21DE wprowadzono plazmid pET28a niosący sekwencję nukleotydową kodującą białko SRSF1. Takie bakterie hodowano w podłożu płynnym w temp. 37°C z wytrząsaniem. Gdy hodowla osiągnęła OD₆₀₀=0,8 (gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 600 nm), pobrano część bakterii jako próbę nieindukowaną, a w pozostałej hodowli indukowano ekspresję SRSF1 przez dodanie IPTG (izopropyl-β-D-galaktopiranozyd) do ostatecznego stężenia 0,4 mM. Po 4 godz. ekspresji bakterie odwirowano i zamrożono.

Materiał biologiczny:

Osad bakterii *E. coli* wyrażających rekombinowane ludzkie białko SRSF1, zawieszony przed zajęciami w 5 ml PBS (50 mM fosforan sodu, pH 7,2; 150 mM NaCl) i poddany sonikacji (3 razy po 30 sekund przy amplitudzie 40%).

Odczynniki:

1. ☺ Naważka imidazolu
2. ☺ Bufor B:
100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
8 M mocznik
3. Bufor B z 1 M imidazolem:
rozpuścić otrzymaną od prowadzących naważkę imidazolu [1] w odpowiedniej objętości buforu B [2]
4. ☺ 50% zawiesina Ni-NTA-agarozy w buforze B (80 µl)
5. Bufor do płukania:
bufor B z 20 mM imidazolem
przygotować przez zmieszanie odpowiednich ilości buforu B [2] i buforu B z 1 M imidazolem [3]
6. Bufor do elucji:
bufor B z 250 mM imidazolem
przygotować przez zmieszanie odpowiednich ilości buforu B [2] i buforu B z 1 M imidazolem [3]

7. ☺ Bufor Laemmliego 5× (zob. Załącznik pkt 1.)
8. ☺ Bufor PBS:
50 mM fosforan sodu, pH 7,2
150 mM NaCl
9. ☺ Próbką B0 – osad bakterii *E. coli* niepoddanych indukcji, zawieszony w PBS homogenizowany metodą sonikacji.
10. ☺ 100 mM PMSF w 96% etanolu

Wykonanie:

Uwaga!

**Przed rozpoczęciem ćwiczenia proszę sprawdzić pH buforu B.
W razie potrzeby doprowadzić pH do pożądanych wartości.**

1. Z zawiesiny *E. coli* pobrać próbkę 20 µl, przenieść do próbówki podpisanej B1 i zachować do elektroforezy. Następnie zwirować bakterie przez 10 min. Supernatant odrzucić.
2. Osad zawiesić w 2 ml buforu B [2], przenieść do probówek o pojemności 2 ml i inkubować z mieszaniem przez 40 min. Odwirować przez 10 min. Supernatant zebrać do nowej 2 ml próbówki. Z supernatantu pobrać 20 µl, przenieść do próbówki podpisanej B2 i zachować do elektroforezy.
3. Supernatant przenieść do próbówki z zawiesiną Ni-NTA-agarozy [4].
4. Inkubować ze złożem przez 40 min. z mieszaniem, następnie odwirować przez 1 min. przy 2000 obr./min.
5. Pipetą zebrać supernatant (białka niewiążące się do złoża) i odrzucić.
6. Złoże przepłukać 3 razy po 1 ml buforu B [2]. Za każdym razem kilkakrotnie delikatnie wstrząsnąć probówką i wirować przez 1 min. przy 2000 obr./min. Następnie pipetą zebrać supernatant znad złoża i odrzucić.
7. Złoże przepłukać 1 ml buforu do płukania [5]. Wirować j.w., pipetą zebrać supernatant i odrzucić.
8. Białko eluować 4 porcjami po 80 µl buforu elucyjnego [6]. Wirować j.w. i zebrać frakcje elucyjne do nowych probówek. Z każdej frakcji elucyjnej pobrać po 5 µl, przenieść do jednej wspólnej próbówki podpisanej B3 i zachować do elektroforezy.
9. Następnie do probówek B1, B2 i B3 dodać po 5 µl buforu Laemmliego 5×. Dodatkowo do elektroforezy przygotować próbkę kontrolną B0 [9] otrzymaną od prowadzących. Próbką zawiera 20 µl zawiesiny bakterii po sonikacji. próbki do elektroforezy należy przechowywać w temperaturze -20°C.

Uwaga!

Jeśli po dodaniu buforu Laemmliego kolor roztworu zmieni się z fioletowego na pomarańczowy, należy dodać kroplę NaOH.

Część 2b

Oczyszczanie rekombinowanego białka MBP-SRSF1 z komórek bakterii *Escherichia coli* w warunkach natywnych

Uwagi ogólne:

Wszystkie czynności należy wykonywać w lodzie. Bufory i wszystkie próby należy przechowywać w lodzie.

Do wszystkich buforów dodać bezpośrednio przed użyciem PMSF do stężenia 1 mM. PMSF dodawać tylko do takiej porcji buforu, jaka będzie wykorzystana danego dnia.

Procedura wykonana przed ćwiczeniami:

Dzień przed ćwiczeniami została założona hodowla bakterii *E. coli* ER2523 (NEB Express) stransformowana plazmidem pMAL-c5X-SRSF1 (cDNA kodujący białko SRSF1 połączony z wektorem pMAL-c5X) w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny. Bakterie hodowano w temp. 37°C z wytrząsaniem.

Materiał biologiczny:

Nocna hodowla *E. coli* ER2523 (NEB Express) zawierających plazmid pMAL-c5X-SRSF1.

Odczynniki:

1. ☺ Pożywka LB:
0,5% ekstrakt drożdżowy
1% trypton
1% NaCl
2. ☺ Stężony roztwór ampicyliny (1000×)
3. ☺ Sterylny 10% roztwór glukozy
4. Pożywka LB z ampicyliną i glukozą:
Dodać do 50 ml pożywki LB [1] stężonego roztworu ampicyliny do stężenia 1× [2]
oraz roztworu glukozy [3] do końcowego stężenia 0,2%
5. ☺ 200 mM IPTG
6. ☺ 1 M Tris-HCl, pH 7,5
7. ☺ 5 M NaCl
8. ☺ 0,5 M EDTA
9. Bufor MBP:
20 mM Tris-HCl, pH 7,5
200 mM NaCl
1 mM EDTA
10. ☺ Złoże w formie kuleczek agarozowych z unieruchomionymi cząsteczkami amylozy jako 50% zawiesina w buforze MBP

11. ☺ Naważki maltozy
12. Bufor elucyjny:
bufor MBP [9] zawierający 10 mM maltozę (m.cz. 342 g/mol)
13. ☺ Odczynnik Bradforda
14. ☺ Bufor Laemmliego 5× (zob. Załącznik pkt 1.)
15. ☺ 0,1% SDS
16. ☺ 20% etanol
17. ☺ 100 mM PMSF w 96% etanolu

Wykonanie:

1. Zmierzyć wartość OD₆₀₀ hodowli nocnej korzystając ze spektrofotometru. Hodowlę przed pomiarem należy rozcieńczyć 10× wodą. Optymalna objętość zawiesiny wprowadzanej do plastikowej kuwety wynosi 1 ml. Spektrofotometr należy poddać kalibracji wykorzystując wodę.
2. Do 50 ml pożywki LB zawierającej ampicylinę i glukozę [4] należy sterylnie wprowadzić taką objętość hodowli nocnej, by wartość OD₆₀₀ w nowo zakładanej hodowli wynosiła 0,2.
3. Hodowlę umieścić w inkubatorze w temp. 37°C z wytrząsaniem. Wartość OD₆₀₀ sprawdzać co ok. 30 min. (przy pomiarze nie jest konieczne rozcieńczanie hodowli) i doprowadzić do osiągnięcia wartości OD₆₀₀ równej 0,5.
4. Zachowując sterylność dodać IPTG [5] do końcowego stężenia 0,3 mM. Po 2 godz. hodowli w temp. 37°C z wytrząsaniem przenieść hodowlę do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i zwirować (4000× g, 20 min.), supernatant dokładnie usunąć, a osad zawiesić 1 ml buforu MBP [9]. **Zawiesinę bakterii zamrozić i zostawić do następnych zajęć.**
5. Rozmrozić zawiesinę bakterii i poddać sonikacji 6 razy po 15 sekund (15 sek. przerwy między pulsami sonikacji), pozostawiając probówkę cały czas w lodzie.
6. W ten sposób uzyskany surowy lizat bakteryjny zwirować w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach przez 10 min. Supernatant przenieść do nowej probówki typu Falcon, rozcieńczyć go 7 razy buforem MBP [9] i umieścić w lodzie. Pobrać 10 µl do nowej probówki typu Eppendorf, oznaczyć jako C1 i zachować do elektroforezy.
7. Otrzymaną od prowadzących kolumnę przepłukać wodą, odkręcić kranik i upewnić się, że przepływ jest dobry. W razie kłopotów, skonsultować się z osobą prowadzącą zajęcia. Umocować kolumnę w statywie.
8. Zamknąć kranik (**zawsze przytrzymać kolumnę u wylotu drugą ręką, inaczej może pęknąć jej szklana rurka**) i wprowadzić ok. 0,5 ml zawiesiny złoza [10]. Złoże przepłukać 5 ml buforu MBP [9]. Wypuścić bufor kolumnowy tak, by menisk był możliwie blisko powierzchni złoza i zamknąć kranik.
9. Delikatnie wprowadzić roztwór zawierający białka z bakterii (pkt. 6) na złoże. Podstawić pod kranik probówkę typu Falcon.
10. Otworzyć kranik i ustawić go tak, aby przepływ roztworu przez kolumnę był możliwie wolny.

11. Gdy menisk zbliży się do powierzchni złoża, podstawić kolejną probówkę typu Falcon i wprowadzić do kolumny 1 ml buforu MBP [9].
12. Gdy menisk zbliży się do powierzchni złoża, wprowadzić do kolumny 6 ml buforu MBP [9] i kontynuować płukanie złoża.
13. Gdy menisk zbliży się do powierzchni złoża, zamknąć kranik i zatrzymać przepływ roztworu. Pod kolumnę wstawić statyw z 5 probówkami typu Eppendorf.
14. Do kolumny wprowadzić 1 ml buforu elucyjnego [12] i odczekać 3 minuty.
15. Otworzyć kranik i zebrać 5 frakcji po 0,5 ml (oznaczyć je jako C2-C6) uzupełniając bufor elucyjny w miarę jego ubywania.
16. Ustalić frakcję najbogatszą w białko wykonując test Bradforda. Na arkusz parafilmu o wymiarach ok. 5×10 cm nakropić 6 porcji odczynnika Bradforda [13] o objętości 10 μ l. Do pierwszej kropli dodać 10 μ l buforu elucyjnego [12], a do kolejnych po 10 μ l frakcji C2-C6. Po ok. 7 minutach porównać barwę kropli zawierających frakcje C2-C6 w stosunku do kontroli (z buforem elucyjnym) i wybrać frakcję o najintensywniejszym niebieskim zabarwieniu do dalszych prac.
17. Z wybranej frakcji pobrać po 10 μ l do dwóch nowych probówek i zachować do elektroforezy.
18. Do trzech probówek zawierających próby do elektroforezy (pkt. 6 [C1] i pkt. 17 [wybrana próba]) dodać po 3 μ l buforu Laemmliego [14].
19. Przy użyciu spektrofotometru Nanodrop określić widmo absorpcyjne frakcji elucyjnej wybranej w wyniku testu Bradforda.
20. Przeprowadzić regenerację złoża w następujący sposób:
 - przepłukać złoże 5 ml wody destylowanej
 - przepłukać złoże 5 ml 0,1% SDS [15]
 - przepłukać złoże 1 ml wody destylowanej
 - przepłukać złoże 5 ml buforu MBP [9]
21. Zamknąć kranik i wprowadzić do kolumny 1 ml 20% etanolu [16]. Zawiesić złoże korzystając z pipety pasterowskiej i przenieść do probówki typu Falcon. Czynność powtórzyć 2 razy, aby większość złoża została przeniesiona z kolumny do probówki.

Część 2c

Rozdział elektroforetyczny uzyskanych preparatów białek SR

Materiały i odczynniki:

1. ☺ Mieszanina prebarwionych białek wzorcowych (Załącznik pkt 1.)
2. ☺ Roztwór do barwienia żelu błękitem brylantowym Coomassie R-250 (CBB R-250), do wielokrotnego użycia:
0,2 % (w/v) CBB R-250 w roztworze woda:metanol:kwas octowy = 5:5:1
3. 7,5% (v/v) kwas octowy
4. ☺ Wzorzec wielkości 100 bp DNA Ladder Plus
5. ☺ Roztwór bromku etydydy

Wykonanie:

1. Przeprowadzić rozdział elektroforetyczny uzyskanych lizatów i frakcji elucyjnych z poprzednich części ćwiczenia (zob. Załącznik pkt 1.) w 12% żelu poliakrylamidowym. Nanieść próbki o obj. 10 µl w następującej kolejności: B0, B1, B2, B3, C1, wybrana próbka spośród C2-C6, wzorzec prebarwiony [1], wzorzec wielkości DNA (5 µl) [4], wybrana próbka spośród C2-C6 o obj. 10 µl.
2. Po przeprowadzeniu elektroforezy zdjąć szybkę bez wcięcia (z zaokrąglonymi rogami) i pozostawić żel na drugiej szybce z wcięciem.
3. Korzystając z szarej przekładki, przeciąć żel między ścieżką zawierającą mieszaninę prebarwionych białek wzorcowych a ścieżką z wzorcem wielkości DNA. Krawędź przekładki należy przyłożyć do powierzchni żelu i wcisnąć ku szybce, na której leży żel. Nie należy jej przesuwając równolegle do powierzchni szybki, ponieważ może to spowodować poszarpanie żelu.
4. Część żelu zawierającą mieszaninę prebarwionych białek wzorcowych umieścić w roztworze z barwnikiem [2] i barwić przez przynajmniej 20 minut.
5. Drugą część żelu umieścić w roztworze z bromkiem etydydy [5] i barwić przez przynajmniej 10 minut. Następnie zarejestrować obraz przy użyciu transiluminatora UV.
6. Żel z pkt. 4. przełożyć do 7,5% kwasu octowego [3], aby odpłukać nadmiar barwnika. W celu szybszego odbarwienia żelu odpłukiwanie barwnika w 7,5% kwasie octowym prowadzić na gorąco (w temp. ok. 60-80°C).

Literatura do ćwiczenia:

1. Hoffman, A. i Roeder, R.G. (1991) Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucl. Acids Res.* 19(22):6337-6338.
2. www.sigmaaldrich.com (opis produktu o numerze katalogowym N3158)
3. Autor anonimowy (2007) Affinity Chromatography. Principles and Methods. GE Healthcare, Uppsala. www.sigmaaldrich.com
4. Autor anonimowy (2017) pMAL™ Protein Fusion & Purification System, New England Biolabs. www.neb.com

Ćwiczenie 3

Oznaczanie aktywności ludzkiej topoizomerazy I w ekstraktach jądrowych komórek HeLa

WSTĘP

Ludzka topoizomeraza I jest jądrowym enzymem katalizującym reakcję relaksacji DNA. Oznaczenie aktywności tego enzymu wykonuje się badając zdolność do relaksacji superhelikalnego plazmidu przez kolejne rozcieńczenia preparatu enzymu. W niniejszym ćwiczeniu jednostkę aktywności enzymu definiuje się jako ilość topoizomerazy I potrzebną do zrelaksowania w 50 procentach 50 ng plazmidu pBR322 w ciągu 30 min. w 37°C.

Ćwiczenie polega na przygotowaniu ekstraktu jądrowego komórek HeLa i oznaczenie w nim aktywności topoizomerazy I i obliczeniu całkowitej aktywności otrzymanego preparatu.

Material biologiczny:

osad komórek HeLa S3 przepłukany buforem PBS i zamrożony

Uwaga!

Komórki HeLa należy traktować jak materiał biologiczny potencjalnie niebezpieczny. Należy pracować w rękawiczkach. Wszystkie naczynia mające kontakt z materiałem należy zalać po użyciu Domestosem, jednorazowe plastiki zgromadzić w koszu przeznaczonym do utylizacji.

Odczynniki:

1. ☺ Bufor P2:
 - 3 mM MgCl₂
 - 1 mM EDTA
 - 1 mM DTT
 - 20 mM Tris-HCl, pH 7,8
 - 1 mM PMSF
2. ☺ 10% Triton X-100 w buforze P2
3. ☺ Sacharoza *in substantia*
4. Bufor P2 / 0,88 M sacharoza:
 - rozpuścić 3 g sacharozy [3] w 10 ml P2 [1]
5. ☺ 5 M NaCl
6. ☺ 1 M Tris-HCl, pH 7,5
7. ☺ 3 M KCl
8. ☺ 1 M MgCl₂
9. ☺ 0,5 M EDTA

10. ☺ 14,3 M β -merkaptetoetanol
11. ☺ 100 mM PMSF
12. ☺ bufor TAE
13. ☺ agaroz
14. ☺ preparat plazmidu pBR322 (50 ng/ μ l)
15. ☺ albumina (10 mg/ml)
16. ☺ bufor STOP:
 - 27% sacharoza,
 - 0,67% SDS,
 - 67 mM EDTA,
 - Orange G
17. ☺ roztwór bromku etydyny
18. Bufor relaksacyjny:
 - 40 mM Tris-HCl, pH 7,5 [6]
 - 120 mM KCl [7]
 - 10 mM MgCl₂ [8]
 - 0,1 mM EDTA [9]
 - 10 mM β -merkaptetoetanol [10]
 - 1 mM PMSF [11]

Uwaga!

Wszystkie czynności wykonywać w lodzie, używając schłodzonych probówek. Probówki szklane i gilzy należy dopasować wagą i schłodzić w lodówce. Następnie schłodzić wirówki Heraeus. Do buforu P2 dodać bezpośrednio przed użyciem PMSF do stężenia 1 mM.

Wykonanie:

A. Przygotowanie ekstraktu jądrowego komórek HeLa.

1. Osad komórek HeLa zawiesić w 20 ml buforu P2 [1], dodać 100 μ l roztworu Tritonu X-100 w P2 [2]. Przenieść do homogenizatora Pottera i homogenizować za pomocą 20 uderzeń tłoka teflonowego.
2. Roztwór przenieść do szklanej probówki, podwarstwić 10 ml buforu P2/sacharoza [4] i wirować przez 20 min. przy 5 tys. obrotów w schłodzonej wirówce.
3. Należy zaobserwować resztki niezlizowanych komórek na granicy faz bufor/sacharoza. Supernatant odrzucić, a osad jąder przepłukać pipetując 10 ml buforu P2.
4. Odwirować przez 10 min. przy 5 tys. obrotów. Supernatant odrzucić.

5. Osad zawiesić w 0,5 ml buforu P2, starannie zmierzyć objętość próbki i dodać NaCl [5] do stężenia 0,42 M. Ekstrakcję prowadzić przez 30 min. w lodzie z mieszaniem na kołysce. Po zakończeniu ekstrakcji całą zawartość probówki przenieść do nowej probówki Eppendorfa.
6. Odwirować przy maksymalnych obrotach w schłodzonej wirówce na probówki Eppendorfa przez 10 min. Zebrać supernatant, który stanowi frakcję ekstraktu jądrowego. Zamrozić do następnych ćwiczeń.
7. Przygotować bufor relaksacyjny [18] i schłodzić.

B. Oznaczanie aktywności topoizomerazy I:

1. Pobrać 1 ml buforu relaksacyjnego [18], dodać albuminy [15] do stężenia 0,1 mg/ml.
2. Do 6 probówek Eppendorfa oznaczonych R1-R6 przenieść po 5 μ l plazmidu pBR322 [14]. Do próby stanowiącej kontrolę (R1) dodać 5 μ l buforu relaksacyjnego z albuminą.
3. W 5 nowych probówkach Eppendorfa (E2-E6) przygotować następujące rozcieńczenia ekstraktu jądrowego w buforze relaksacyjnym z albuminą: 20 $\times$ (E2), 40 $\times$ (E3), 80 $\times$ (E4), 160 $\times$ (E5), 320 $\times$ (E6).
4. Do probówek z plazmidem (R2-R6) dodawać po 5 μ l każdego z rozcieńczeń ekstraktu jądrowego (E2-E6).
5. Probówki zwirować przez 20 sek. i inkubować przez 30 min. w łaźni wodnej w 37°C. Następnie zwirować ponownie i dodać po 5 μ l buforu STOP [16].
6. Przeprowadzić rozdzielanie elektroforetyczne próbek w 1,4% żelu agarozowym (zob. Załącznik pkt 2.), **pozwalając wyjść barwnikowi poza żel**. Po zakończeniu elektroforezy, DNA w żelu zabarwić w roztworze bromku etydyny [17], wykonać zdjęcie i ocenić aktywność enzymu.

Załącznik

1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS (SDS-PAGE)

Uwagi ogólne:

- 1. Akrylamid przed polimeryzacją jest silnie trujący. Nigdy nie pipetować ustami.
Wszystkie czynności z akrylamidem wykonywać tylko w rękawiczkach.**
- 2. Opary kwasu octowego są trujące. Nigdy nie pipetować ustami stężonego kwasu.
Odbarwianie żelu przeprowadzać pod włączonym wyciągiem chemicznym.**

Odczynniki:

1. ☺ Mieszanina monomerów:
30% (w/v) akrylamid
0,8% (w/v) *N,N'*-metylenobisakrylamid
2. ☺ 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
3. ☺ 0,625 M Tris-HCl, pH 6,8
4. ☺ 1% (w/v) SDS
5. ☺ 10% (w/v) nadsiarczan amonowy (APS)
6. ☺ *N,N,N',N'*-tetrametylenodiamina (TEMED)
7. ☺ Bufor do elektroforezy (pH 8,3):
0,025 M Tris
0,192 M glicyna
0,1% (w/v) SDS
8. ☺ Mieszanina białek wzorcowych (BR; broad-range) w buforze Laemmliego 1×:
220 kDa
116 kDa
97 kDa
66 kDa
45 kDa
31 kDa
22 kDa
15 kDa
7 kDa
9. ☺ Mieszanina białek wzorcowych prebarwionych w buforze Laemmliego 1×:
250 kDa
130 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
35 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa

10. ☺ Bufor Laemmliego 5×:
 0,325 M Tris-HCl, pH 6,8
 10% (w/v) SDS
 50% (w/v) glicerol
 5% (v/v) β-merkaptotanol
 0,05% (w/v) błękit bromofenolowy
11. ☺ Roztwór do barwienia białek (do wielokrotnego użycia):
 0,2% (w/v) błękit Coomassie R-250 w roztworze woda:metanol:kwasy octowy 5:5:1
12. 7,5% (v/v) kwas octowy

Wykonanie:

1. Złożyć ze sobą dwie czyste (przetarte etanolem) i suche płytki szklane przedzielone szarymi przekładkami. Jedna z płytek powinna być ustawiona wcięciem ku górze, zaś druga z płytek, dwoma zaokrąglonymi rogami na dół. Wokół tej drugiej powinna być owinięta pomarańczowa uszczelka zgrubieniem do środka (między płytkami). Krawędzie górne płytek powinny być na tej samej wysokości, ale przekładki i uszczelka mogą wystawać powyżej górnych krawędzi płytek. Tak przygotowany komplet szybki ustabilizować czterema dużymi białymi klamrami (dwie na dole i po jednej na każdym boku). Między szybki włożyć biały grzebień z 10 ząbkami. Zaznaczyć markerem na szybce punkt ok. 3 mm poniżej dolnej krawędzi ząbków grzebienia. Delikatnie wyciągnąć grzebień.
2. Przygotować odpowiedni żel (10-12%) mieszając ze sobą roztwory wg kolejności w tabeli poniżej. **Uwaga! TEMED zawsze dodawać na chwilę przed waniem mieszaniny do przestrzeni między płytkami.**

Roztwór	10% 1 żel	10% 2 żele	12% 1 żel	12% 2 żele	4% 1 żel	4% 2 żele
Mieszanina monomerów [1]	2,00 ml	4,00 ml	2,40 ml	4,80 ml	0,20 ml	0,40 ml
Woda dejonizowana	1,90 ml	3,80 ml	1,50 ml	3,00 ml	0,90 ml	1,80 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 [2]	1,50 ml	3,00 ml	1,50 ml	3,00 ml	-	-
0,625 M Tris-HCl, pH 6,8 [3]	-	-	-	-	0,30 ml	0,60 ml
1% SDS [4]	0,60 ml	1,20 ml	0,60 ml	1,20 ml	0,15 ml	0,30 ml
10% APS [5]	40 µl	80 µl	40 µl	80 µl	20 µl	40 µl
TEMED [6]	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl

3. Mieszaninę wlać między płytki szklane ustawione na bibule aż do poziomu zaznaczonego uprzednio na płytce. Na powierzchnię roztworu ostrożnie nawarstwić wodę na wysokość ok. 1 cm. Tak przygotowany 10 lub 12% żel rozdzielający pozostawić do polimeryzacji (około 30 minut w temperaturze pokojowej, powinna pojawić się wyraźna granica między spolimeryzowanym żelem a warstwą wody). Następnie wylać wodę z nad żelu.

4. Pod koniec polimeryzacji żelu rozdzielającego przygotować 4% żel zagęszczający mieszając ze sobą roztwory wg kolejności w tabeli powyżej. **Uwaga! TEMED zawsze dodawać na chwilę przed wylaniem żelu.**
5. Mieszaninę nawarstwić na żel rozdzielający do krawędzi szybki z wcięciem. Wsunąć grzebień i tak przygotowany żel zatężający pozostawić do spolimeryzowania (ok. 30 min. w temperaturze pokojowej).
6. Ostrożnie wyciągnąć grzebień, a następnie trzymając płytki, zdjąć klamry i gumową uszczelkę.
7. Umieścić żel w aparacie (płytką z wcięciem do środka aparatu), płytki umocować w aparacie małymi białymi klamrami. Włączyć bufor do elektroforezy [7] do dolnego i górnego zbiornika.
8. Kieszonki w żelu przepłukać buforem do elektroforezy [7].
9. Próbkę do elektroforezy (także mieszaninę białek wzorcowych [8 lub 9] otrzymaną od prowadzących) zawierającą bufor Laemmliego [10] ogrzewać przez 3 min. w 100°C.
10. Po zwirowaniu i schłodzeniu do temperatury pokojowej próbkę nanieść na żel.
11. Włączyć chłodzenie aparatu do elektroforezy (lekko odkręcić kran) i podłączyć aparat do zasilacza (elektroda ujemna od strony kieszzonek, elektroda dodatnia od dolnej krawędzi żelu).
12. Elektroforezę prowadzić przy napięciu około 100 V do czasu przesunięcia się barwnika do dolnej krawędzi żelu (ok. 1,5 godz.).
13. Wyjąć płytki z żelem z aparatu, wyjąć przekładki i rozłożyć płytki (delikatnie podważając jedną z nich). Odciać żel zagęszczający (ze studzienkami).
14. Żel umieścić w naczyniu z roztworem do barwienia białek [11].
15. Białka barwić przez 20 min. (lub dłużej).
16. Wyjąć żel z roztworu do barwienia [11] i odbarwiać go poprzez kilkukrotne płukanie w 7% kwasie octowym [12] na gorąco (około 60-80°C) pod wyciągiem chemicznym.

2. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Uwagi ogólne:

Bromek etydyny jest silnym mutagenem i trucizną. Należy założyć rękawiczki przed każdą pracą z roztworami zawierającymi bromek etydyny.

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest niebezpieczne i należy go unikać. Żele należy oglądać w UV po przykryciu ich płytką szklaną.

Odczynniki:

1. ☺ Agaroza (w proszku)
2. ☺ Bufor do elektroforezy TAE 1×:
40 mM Tris-octan, pH 7,6
1 mM EDTA,
3. ☺ Roztwór bromku etydyny (1 µg/ml)

Wykonanie:

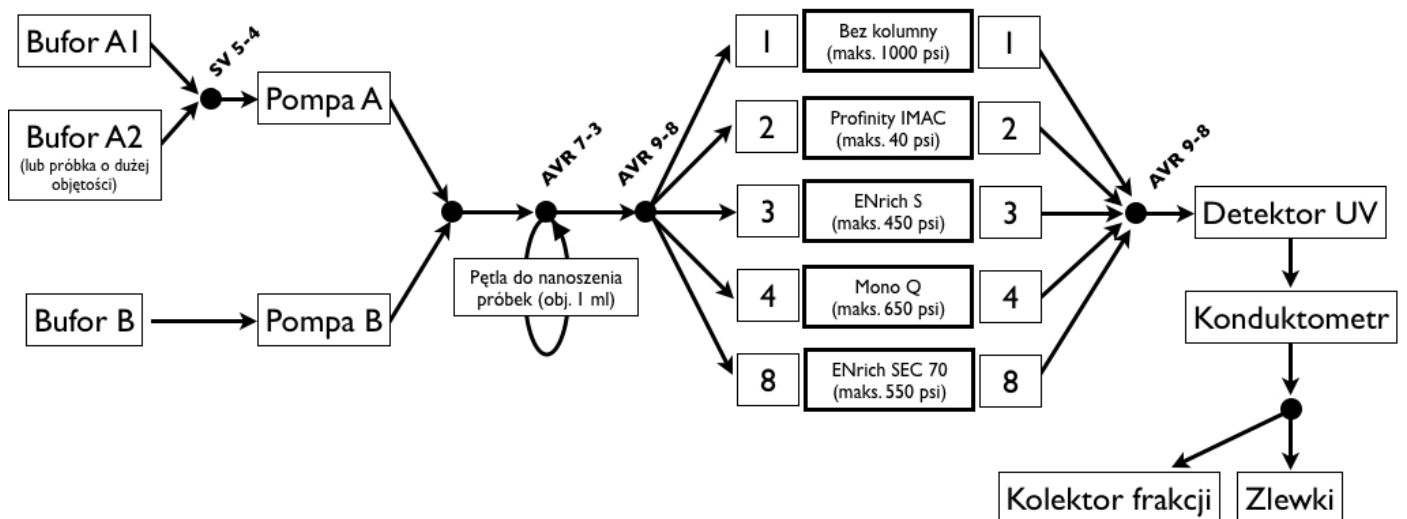
1. Odważyć 0,7 g agarozy [1] potrzebnej do przygotowania 50 ml 1,4% żelu.
2. Do odważonej agarozy [1] dodać bufor do elektroforezy TAE 1× [2] i ogrzać w kuchence mikrofalowej do rozpuszczenia się agarozy.
3. Złożyć aparacik do elektroforezy (włożyć przekładki i grzebień).
4. Po schłodzeniu agarozy, przygotować żel o grubości ok. 0,5 cm (ok. 40 ml agarozy) i pozostawić go do zastygnięcia.
5. Usunąć przekładki i grzebień, zalać żel buforem. Podłączyć aparat do zasilacza (elektroda ujemna od strony studzienek, elektroda dodatnia od dolnej krawędzi żelu) i sprawdzić, czy płynie prąd.
6. Odłączyć aparat od zasilacza. Próbkę zawierającą barwnik do elektroforezy oranż G (lub bufor STOP) nanieść na żel i ponownie podłączyć aparat do zasilacza.
7. Prowadzić elektroforezę przy napięciu 100 V.
8. Wyjąć żel z aparatu i włożyć do naczynia z roztworem bromku etydyny [5]. DNA barwić przez ok. 15 min.
9. Żel obejrzyć w świetle UV, korzystając z transiluminatora. Jeśli potrzeba (gdy żel mocno świeci) odbarwić go płuczając w wodzie destylowanej.

3. Urządzenie FPLC

Chromatografię można w dużej mierze przyspieszyć i zautomatyzować dzięki wykorzystaniu urządzenia FPLC (ang. fast protein/performance liquid chromatography). Jest to system złożony z:

- pomp tłoczących bufor,
- zaworów przełączających bieg roztworów w urządzeniu,
- kolumn zawierających złoża chromatograficzne,
- detektorów monitorujących parametry wycieku,
- kolektora frakcji.

System FPLC jest w pełni sterowany przez komputer. Po ręcznym podłączeniu butelek zawierających odpowiednie roztwory, naniesieniu próbki białek poddawanych chromatografii i zaprogramowaniu przebiegu doświadczenia w programie komputerowym, można rozdzielić białka w trybie automatycznym. Ze względu na to, że do urządzenia FPLC są podłączone kolumny z różnymi złożami, można przeprowadzić zarówno sączenie molekularne, jak i chromatografię jonowymienną (z wykorzystaniem kationitu lub anionitu), a nawet chromatografię powinowactwa. Urządzenie FPLC można więc uznać za bardzo uniwersalny system do oczyszczania białek.



Schemat konfiguracji urządzenia FPLC w Zakładzie Biologii Molekularnej UW. Czarnymi kropkami oznaczono zawory.

Do urządzenia można podłączyć butelki z trzema rodzajami roztworów (bufor A1, A2 i B). Wyboru między buforami A1 i A2 dokonuje się ustawiając, za pomocą komputera, zawór SV 5-4 w odpowiedniej pozycji. Zamiast buforu A2 można także podłączyć butelkę lub probówkę z dużą objętością preparatu zawierającego białko poddawane preparatyce (zwykle powyżej 5 ml). Skład roztworów tłoczonych przez pompy A i B jest ściśle uzależniony od

typu złożeń chromatograficznych stosowanego w doświadczeniu. Jeśli jest to IMAC (ang. immobilized metal ion affinity chromatography; zwykle ze złożem niklowym), najczęściej do pompy B podłącza się bufor wzbogacony o imidazol (w celu przeprowadzenia elucji imidazolem). Jeśli urządzenie FPLC ma być wykorzystane do chromatografii jonowymiennej, zwykle do pompy A podłącza się roztwór niezawierający soli, zaś do pompy B podobny bufor zawierający 1 M NaCl lub KCl (wówczas przeprowadza się elucję przez zwiększenie siły jonowej). Stosunek ilościowy roztworów tłoczonych przez obie pompy także ustala się w programie komputerowym. Na przykład, mając podłączony roztwór 1 M NaCl do pompy B, można zaprogramować urządzenie tak, by w ciągu 10 min. zwiększyło udział roztworu z pompy B od 0% do 100%. Będzie to oznaczało, że stężenie NaCl w całym urządzeniu będzie wzrastało w ciągu 10 min. od 0 M do 1 M. Istotne jest, aby w rurkach urządzenia nie pojawiały się pęcherzyki powietrza, stąd każdy roztwór podłączony do urządzenia jest uprzednio filtrowany i odpowietrzany (np. przez sterylizację w autoklawie).

Do nanoszenia małej objętości próbki wykorzystuje się strzykawkę. W tym przypadku próbkę należy wprowadzić do tzw. pętli, z której po przełączeniu zaworu za pośrednictwem komputera wprowadza się roztwór zawierający białka do urządzenia FPLC.

Oczywiście przed naniesieniem próbki białka (z pompy A lub pętli) należy wybrać odpowiednią kolumnę do zaplanowanego doświadczenia. Do tego służą zawory AVR 9-8, do których podłączone są cztery rodzaje kolumn:

- [port 2] profinity IMAC: złożo niklowe umożliwiające oczyszczanie białek ze znacznikiem histydynowym (maksymalne ciśnienie 40 psi)
- [port 3] ENrich S: kationit umożliwiający oczyszczenie białek naładowanych dodatnio w danych warunkach pH (maksymalne ciśnienie 450 psi)
- [port 4] Mono Q: anionit umożliwiający oczyszczenie białek naładowanych ujemnie w danych warunkach pH (maksymalne ciśnienie 650 psi)
- [port 8] ENrich SEC 70: złożo do sączenia molekularnego białek w zakresie 0,5-70,0 kDa (maksymalne ciśnienie 550 psi)

Białka po przejściu przez kolumnę lub po elucji spowodowanej zmianą roztworu w urządzeniu FPLC trafiają do detektora UV, który rejestruje absorbancję przepływającego przez niego roztworu. Dzięki temu operator urządzenia wie o tym, że u wylotu urządzenia FPLC jest próbka zawierająca białka i może ją skierować do kolektora frakcji w celu zachowania preparatu do dalszych analiz.

Dodatkowym miernikiem będącym częścią urządzenia FPLC jest konduktometr, który przeprowadza pomiary przewodnictwa elektrycznego roztworu. Umożliwia to śledzenie zmiany stężenia soli w urządzeniu FPLC.

Po co są te substancje w roztworach stosowanych podczas ćwiczeń?

Woda – podstawowy rozpuszczalnik stosowany w biologii molekularnej

Tris (w formie **Tris-HCl**, **Tris-octan**, **Tris-glicyna**) – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu (7-8)

Glicyna (w formie **glicyna-HCl**) – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu (2-3)

NaH₂PO₄, **KH₂PO₄**, **Na₂HPO₄**, **K₂HPO₄** – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu (7-8)

NaCl, **KCl** – substancja zapewniająca siłę jonową roztworu (także ciśnienie osmotyczne)

SDS – dodecylosiarczan sodowy, mocny anionowy detergent, upłynniający wszystkie błony komórkowe i denaturujący białka, nadający im ujemny ładunek wypadkowy

Triton X-100 – eter polimeru glikolu polietylenowego (PEG) i *p*-*tert*-oktylofenolu, łagodny niejonowy detergent, upłynniający błony komórkowe i niedenaturujący białek

β-merkaptotanol (β-ME) – substancja redukująca, m.in. mostki dwusiarczkowe w białkach

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

Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) – nieodwracalny inhibitor peptydaz serynowych i cysteinowych

EDTA – substancja hamująca nukleazy poprzez wymiarczkowanie z roztworu ich kofaktorów – kationów dwuwartościowych, np. Mg²⁺

Imidazol – substancja współzawodnicząca z resztami histydyn o miejsca wiążące na Ni-NTA-agarozie

Mocznik – substancja lizująca komórki i denaturująca białka

Akrylamid (i *N,N'*-metylenobisakrylamid) – substancje wytwarzające, w wyniku polimeryzacji, usieciowany poliakrylamid

Nadsiarczan amonu (APS) – inicjator wolnych rodników niezbędnych do rozpoczęcia polimeryzacji akrylamidu

***N,N,N',N'*-tetrametylenodiamina (TEMED)** – katalizator polimeryzacji akrylamidu i *N,N'*-metylenobisakrylamidu

NaOH – substancja do zobojętnienia mocno zakwaszonych próbek przed elektroforezą

Glicerol, **sacharoza** – substancje obciążające próbkę do elektroforezy

Błękit bromofenolowy – ciemnofioletowy barwnik migrujący do anody w trakcie SDS-PAGE

Błękit Coomassie R-250 – barwnik tworzący niebieskie kompleksy z białkami

Kwas octowy – substancja do usuwania nadmiaru barwnika po barwieniu białek w żelu poliakrylamidowym

Agaroza – substancja wytwarzająca, po utworzeniu na gorąco roztworu i ostudzeniu, usieciowany żel

Orange G – pomarańczowy barwnik migrujący do anody w trakcie elektroforezy w żelu agarozowym

Bromek etydyny – barwnik tworzący z DNA kompleksy świecące w UV na pomarańczowo

IPTG – izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd, analog laktozy, induktor ekspresji genów będących pod kontrolą promotora laktozowego

MgCl₂ – sól o dużym znaczeniu dla utrzymania integralności błony jądrowej i chromatyny, jony magnezu są także kofaktorami nukleaz

Albumina – białko służące do stabilizacji innych białek w ich rozcieńczonych roztworach