

I. Fotometryczne metody oznaczania stężenia białka

W metodach fotometrycznych wykorzystuje się zjawisko pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego przez różne substancje. Pomiar absorpcji światła przy określonej częstotliwości drgań (długości fali) może być miarą ilości substancji absorbującej i jest podstawą fotometrycznej analizy ilościowej. Do oznaczeń wykorzystuje się widmo określonych związków lub barwnych produktów powstałych w wyniku reakcji chemicznych, które można mierzyć metodami spektrofotometrycznymi i kolorymetrycznymi. Zdolność pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego określonej częstotliwości przez daną substancję zależy od jej struktury, a zwłaszcza od występowania i rozmieszczenia wiązań nienasyconych (głównie podwójnych).

Metody oznaczania zawartości białka oparte są na charakterystycznych cechach jego budowy.

Najczęściej wykorzystywane są następujące cechy białek:

- obecność azotu w składzie pierwiastkowym,
- obecność reszt aminokwasów aromatycznych (fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu) w składzie aminokwasowym,
- występowanie wiązań peptydowych,
- występowanie wolnych grup aminowych.

Spektrofotometryczna metoda oznaczania białka

Większość związków aromatycznych ma zdolność pochłaniania światła nadfioletowego o długości fali 280 nm. Obecność reszt aminokwasów aromatycznych (przede wszystkim tyrozyny i tryptofanu, a w dużo mniejszym stopniu fenyloalaniny i mostków disiarczkowych) w białkach wykazuje zdolność pochłaniania światła, co jest wykorzystywane jako podstawa spektrofotometrycznej metody ich oznaczania. Wadą tej metody jest duża zmienność absorbancji (A_{280}) dla różnych rodzajów białek, wynikająca z niejednakowej procentowej zawartości aminokwasów w białkach. Inną wadą metody spektrofotometrycznej jest możliwość zawyżenia odczytu przez kwasy nukleinowe obecne w próbce oraz inne barwniki, związki fenolowe absorbujące światło przy tej długości fali. Zaletą metody jest jej prostota i szybkość pomiaru, co ma szczególne znaczenie w preparatyce enzymatycznej. Stosując tę metodę można oznaczyć w próbce białko o stężeniu od 10 μg .

Metoda Lowry'ego i wsp.

W metodzie tej wykorzystuje się dwie cechy budowy białek: obecność wiązań peptydowych oraz obecność aminokwasów aromatycznych. Metoda ta składa się z 2 etapów, w pierwszym zachodzi reakcja biuretowa (tworzenie barwnych kompleksów przez wiązania peptydowe i jony miedziowe w środowisku zasadowym). W drugim etapie metody reakcja biuretowa jest wzmocniona reakcją z odczynnikiem Folina-Ciocalteu, w której kwasy: fosforomolibdenowy i fosforowolframowy ulegają redukcji do odpowiednich tlenków z udziałem głównie tyrozyny i tryptofanu. Stężenie barwnego (fioletowego) kompleksu można mierzyć w zakresie widma widzialnego długości 600–700 nm. Podobnie jak w innych metodach kolorymetrycznych stężenie białka odczytuje się z krzywej wzorcowej. Przy tym dla uzyskania właściwych wyników niezmiernie ważny jest dobór białka wzorcowego do sporządzania tej krzywej. Powinno ono zawierać w cząsteczce ilości tyrozyny, tryptofanu możliwie zbliżone do badanego białka. Zaletą metody jest znaczna jej czułość (jest to metoda bardziej czuła od metody spektrofotometrycznej), można bowiem oznaczyć ilość białka już od 10 μg w próbce, a zależność proporcjonalną między intensywnością zabarwienia roztworu a stężeniem białka obserwuje się nawet przy większych stężeniach – do 200 μg . Wadą metody jest błąd oznaczenia wynikający z trudności doboru odpowiedniego białka wzorcowego w stosunku do białka oznaczanego (np. trypsyna daje 3x większe natężenie barwy niż żelatyna). Inną wadą jest zawyżanie wyników oznaczania z powodu redukcji odczynnika Folina przez wolne aminokwasy, niewielkie peptydy, fenole, nitrofenole, w mniejszym stopniu przez puryny i pirymidyny, kwas moczowy oraz niektóre detergenty. Z kolei związki takie jak ZnSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CCl_3COOH , HClO_4 , aceton, etanol, sacharoza, zależnie od stężenia, obniżają intensywność barwy.

Metoda z zastosowaniem kwasu bicynchoninowego (BCA)

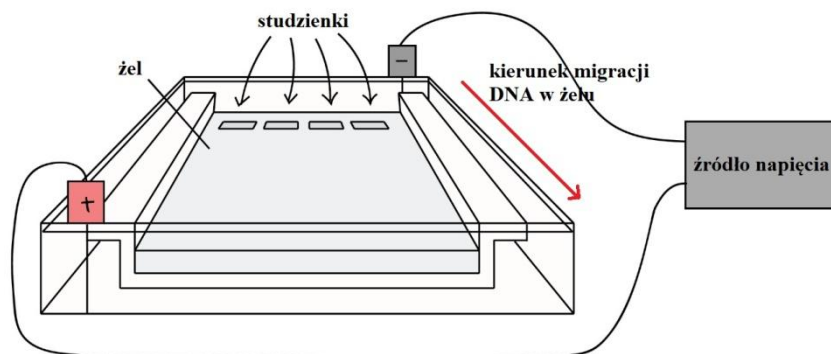
Metoda podobna do metody Lowry'ego, jony Cu^{2+} ulegają redukcji w środowisku zasadowym do Cu^+ i następnie reagują z BCA. Czułość tej metody jest podobna do metody Lowry'ego, zaletą jest to, że przebiega jednoetapowo, a produkt reakcji przyjmuje intensywne czerwone zabarwienie, które można mierzyć przez długości fali 562 nm. Metodę tą można z powodzeniem stosować w obecności detergentów, mocznika, chlorku guanidyny, które przeszkadzają w metodzie Lowry'ego. Wadą tej metody jest to, że duże stężenie cukrów redukujących przeszkadza prawidłowemu oznaczeniu stężenia białka.

Metoda Bradforda

Metoda Bradforda została opublikowana w 1976 roku i od razu zyskała dużą popularność. Kluczowym odczynnikiem w metodzie Bradforda jest policykliczny związek aromatyczny o nazwie błękit brylantowy Coomassie G-250 (ang. *Coomassie Brilliant Blue G-250*). Do roztworu buforowego zawierającego białko dodaje się odpowiednią ilość tego reagenta, który wiąże się chemicznie z proteinami. Efektem tej reakcji jest zmiana barwy roztworu – z brązowej na intensywnie niebieską. Niebieska forma Coomassie Blue silnie absorbuje światło, dając pik absorpcyjny z maksimum przy długości fali $\lambda = 595 \text{ nm}$. Zaobserwowano, że błękit brylantowy Coomassie G-250 tworzy wiązania chemiczne przede wszystkim z resztami aminokwasów zasadowych, znajdującymi się w cząsteczkach białek – głównie z resztami aminokwasowymi lizyny i argininy. Wadą tej metody jest duża zmienność absorbancji (A_{595}) dla różnych rodzajów białek, dla identycznych stężeń wagowych tych białek np. 1 mg/ml , wynikająca z pomiaru w białku reszt aminokwasów aromatycznych, których zawartość w różnych białkach jest niejednakowa. Inną wadą jest zawyżanie wyników przez detergenty, polifenole, amfolyty, oraz zasady obecne w środowisku reakcji. Z kolei związki takie jak chlorowodorek guanidyny, askorbinian sodu, konkurując z barwnikiem o białko obniżają intensywność barwy kompleksu.

II. Elektroforeza DNA

Elektroforeza to przemieszczanie się naładowanych cząsteczek w polu elektrycznym prądu stałego lub zmiennego. Metoda ta jest jedną z głównych metod identyfikacji, rozdzielania i oczyszczania kwasów nukleinowych. Elektroforezę DNA przeprowadza się na żelach agarozowych lub poliakrylamidowych. Żele agarozowe mają mniejszą zdolność rozdzielczą niż poliakrylamidowe, ale pozwalają na rozdział cząsteczek w znacznie większym zakresie wielkości (100-50000 pz).



Rysunek 1 Schemat działania aparatu do elektroforezy.

Na szybkość migracji cząsteczek podczas elektroforezy wpływa ich wielkość, kształt i ładunek. Kwasy nukleinowe posiadają ładunek elektryczny ujemny w całym zakresie pH stosowanym w elektroforezie – wędrują w kierunku elektrody dodatniej (anody). Przy niskim napięciu, szybkość poruszania się liniowego DNA jest proporcjonalna do przyłożonego napięcia. Elektroforetyczne zachowanie DNA w żelu agarozowym nie zależy od składu zasad i słabo zależy od temperatury, co umożliwia jej przeprowadzanie w temperaturze pokojowej. Do uwidocznienia DNA stosuje się rutynowo bromek etydyny lub SYBR Green, który interkalują pomiędzy sąsiednie pary zasad dwuniciowego DNA. Obecność interkalatora zmniejsza ruchliwość elektroforetyczną DNA.

Szybkość elektroforetycznej migracji DNA zależy od:

- masy cząsteczkowej DNA,
- stężenia agarozy,
- konformacji DNA,
- natężenia pola elektrycznego,
- składu buforu do elektroforezy.

Do nanoszenia próbek DNA do studzienek na żelu służą odpowiednie bufony obciążające, które zwiększają gęstość próbek zapewniając dobre umiejscowienie DNA w studzience bez dyfuzji. Dodatkowo, dzięki zabarwieniu próbki, możliwe jest śledzenie rozdziału na żelu. Produkt PCR powinien być widoczny na żelu jako „ostry” prążek o określonej wielkości. Prążek ten porównuje się z tzw. markerem mas cząsteczkowych (mieszanina kwasów nukleinowych o znanej masie). W przypadku analizowania na żelu produktu PCR powinno się wprowadzić kontrolę pozytywną i negatywną. Kontrola pozytywna zawiera wcześniej syntetyzowany gen. Kontrola negatywna zawiera wszystkie substraty PCR, z wyjątkiem matrycy.

Diagnozowanie błędów elektroforezy agarozowej DNA:

- widoczne bardzo słabe lub niewidoczne prążki DNA w żelu:
 - niewystarczająca ilość albo stężenie DNA nałożonego na żel - zwiększyć zawartość DNA,
 - DNA zdegradowane - możliwa kontaminacja nukleazami,
 - DNA „uciekło” z żelu - przeprowadzić elektroforezę ponownie przy krótszym czasie, zastosować niższe napięcie, albo użyć bardziej stężonego żelu,
 - użyć światła UV o krótszej długości fali (254nm), aby znacznie zwiększyć czułość,
 - jeśli chcemy izolować DNA z żelu do dalszych analiz (np. ligacja), zastosować światło UV o długości 315nm (zminimalizowanie degradacji DNA).
- widoczne niewyraźne „rozmazane” prążki DNA:
 - DNA zdegradowane - możliwa kontaminacja nukleazami,
 - nałożono za dużo DNA na żel - zmniejszyć ilość DNA,
 - udoskonalić warunki elektroforezy, nie przykładać napięcia powyżej 20 V/cm,
 - w czasie elektroforezy utrzymywać temperaturę poniżej 30° C.
- jeśli obserwujemy nieprawidłową migrację prążków:
 - udoskonalić warunki elektroforezy – jw.

III. Fermentacja alkoholowa

Fermentacja alkoholowa jest to ciąg reakcji chemicznych przebiegających przy udziale odpowiednich enzymów wytwarzanych przez drożdże, między innymi dekarboksylazy pirogronianowej oraz dehydrogenazy alkoholowej. Procesy życiowe komórek drożdżowych wymagają stałego dopływu energii, którą pozyskują z dostępnych w otoczeniu substratów energetycznych. Glukoza jest podstawowym substratem energetycznym, a wewnątrzkomórkowe procesy metaboliczne bazują na związkach będących jej pochodnymi. Glukoza zapewnia szkielet węglowy wykorzystywany w komórkowych procesach biosyntetycznych.



Rysunek 2 Konwersja glukozy do etanolu (za: Rębas JA, Drożdże i ich metabolity w procesie fermentacji alkoholowej, Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny 3/2021)

Pierwszym etapem oddychania beztlenowego zachodzącego w cytozolu jest glikoliza, czyli ciąg beztlenowych reakcji, w których z glukozy powstaje kwas pirogronowy. Powstały w trakcie glikolizy pirogronian jest transportowany do matriks mitochondrialnej przez przenieśnik znajdujący się w błonie mitochondrialnej komórek drożdży. W matriks mitochondrialnej pirogronian jest oksydacyjnie dekarboksylowany przez kompleks enzymatyczny dehydrogenazy pirogronianowej do aldehydu octowego i dwutlenku węgla. Powstały aldehyd octowy jest przekształcany do alkoholu etylowego przy udziale dehydrogenazy alkoholowej.

W skrócie proces fermentacji obejmuje glikolizę prowadzącą do powstania z cukrów kwasu pirogronowego CH_3COCOOH , następnie jego nieoksydacyjną dekarboksylację do aldehydu octowego oraz redukcję tego ostatniego do etanolu pod wpływem współdziałającej z NAD dehydrogenazy alkoholowej. Cynk jest ważnym kofaktorem dla dehydrogenazy alkoholowej, ostatniego enzymu procesu fermentacji.

Teoretyczną wydajność alkoholu z cukru można obliczyć ze wzoru stechiometrycznego. I tak wydajność alkoholu z cukru prostego oblicza się na podstawie reakcji



Obliczając poszczególne masy cząsteczkowe otrzymamy: $180 = 92 + 88$. Obliczając wydajność reakcji 100g cukru, powinniśmy otrzymać 51,1g alkoholu i 48,2g dwutlenku węgla.