

Biotechnologia Farmaceutyczna - Ćwiczenia

Ćwiczenie 1 – Elektroforeza żelowa.

Celem ćwiczenia jest potwierdzenie obecności genu dehydrogenazy alkoholowej (ADH) w materiale genetycznym pozyskanym z drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz ocena wydajności i specyficzności reakcji PCR.

Organizacja pracy: grupa odbywająca ćwiczenie zostaje podzielona na zespoły. Każdy zespół wykonuje żel agarozowy. Każdy zespół nakłada własne produkty PCR na stanowisku elektroforetycznym.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.

Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Względy bezpieczeństwa: Żaden ze stosowanych odczynników nie został oznaczony jako niebezpieczny dla zdrowia, z wszelkimi odczynnikami należy jednak postępować z ostrożnością, w szczególności nie spożywać, nie dopuszczać do kontaktu ze skórą i oczami.

Materiały:

- produkt PCR z poprzednich zajęć,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- wytrząsarka laboratoryjna,
- mikrowirówka laboratoryjna,
- aparat EC3-Chemi HR System,
- aparat do elektroforezy,
- tanki i kuwety elektroforetyczne,
- grzebienie elektroforetyczne,
- zlewki z tworzywa.

Odczynniki:

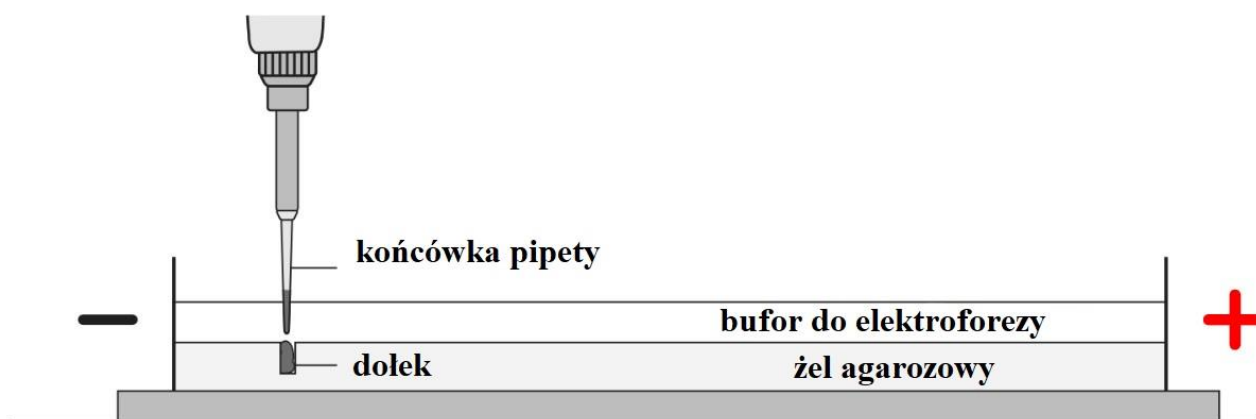
- agarozą,
- obciążnik molekularny,
- marker mas cząsteczkowych,
- roztwór TBE,
- woda destylowana,
- barwnik MidoriGreen.

Elektroforeza żelowa

1. Przygotować naczynie do elektroforezy z buforem 1x TBE,
2. Przygotować stolik do wykonywania żelu, saneczki elektroforetyczne, grzebienie elektroforetyczne.
3. Przygotować 2.5% żel agarozowy:
 - odważyć 2.5 g agarozy, następnie zawiesić w 100ml buforu 1xTBE w zlewce,
 - wstawić mieszaninę do mikrofalówki, doprowadzić agarozę do wrzenia,

- wyciągnąć gorącą agarozę z mikrofalówki i dodać 5 μ l barwnika MidoriGreen, zamieszać w celu rozpuszczenia,
- wylać agarozę do przygotowanego wcześniej naczynia z grzebieniem,
- poczekać do zastygnięcia żelu (ok. 30 min),
- po wystygnięciu usunąć grzebień elektroforetyczny, żel na saneczkach przenieść do kuwety elektroforetycznej, kuwetę uzupełnić buforem 1xTBE.

4. Wymieszać produkt PCR z ok. 5 μ l odczynnika obciążającego z barwnikiem, przepipetować, nałożyć mieszaninę ostrożnie do studzienek żelu,



5. Ustawić następujące parametry elektroforezy: napięcie 115V, czas 45 minut.
6. Po zakończeniu elektroforezy wyjąć żel z naczynia (w rękawiczkach!), położyć na transiluminatorze UV (aparat EC3-Chemi HR System), ocenić wydajność oraz specyficzność reakcji PCR,
7. Wykonać zdjęcie żelu i wykonać wydruk, opisać próby.

Ćwiczenie 2. Oznaczanie stężenia białka całkowitego metodą Bradforda

Celem ćwiczenia jest oznaczenie ilości białka całkowitego w próbkach poddanych różnym metodom homogenizacji oraz porównanie wydajności poszczególnych metod homogenizacji.

Organizacja pracy: grupa odbywająca ćwiczenie zostaje podzielona na zespoły. Grupa ćwiczeniowa wspólnie przygotowuje odczynniki do wykonania krzywej kalibracyjnej. Każdy zespół oznacza poziom białka w swoich próbach z poprzednich ćwiczeń.

Zasada metody: Błękit brylantynowy (Coomassie Brilliant Blue G-250) wiąże się z białkami za pomocą wiązań jonowych i hydrofobowych, reagując głównie z resztami Arg oraz w mniejszym stopniu z resztami His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Barwnik ten w środowisku kwasowym ma zabarwienie brunatne, natomiast jego kompleks z białkiem – niebieskie (następuje przesunięcie maksimum absorpcji z 465 nm do 595 nm). Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka w roztworze.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.

Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Względy bezpieczeństwa: Żaden ze stosowanych odczynników nie został oznaczony jako niebezpieczny dla zdrowia, z wszelkimi odczynnikami należy jednak postępować z ostrożnością, w szczególności nie spożywać, nie dopuszczać do kontaktu ze skórą i oczami.

Materiały:

- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- wytrząsarka laboratoryjna,
- mikrowirówka laboratoryjna,
- jednorazowe probówki 2.0 ml,
- spektrofotometr DeNovix DS-11 FX+,
- kuwety spektrofotometryczne,
- izolaty białkowe z poprzednich ćwiczeń,
- zlewka,
- tryskawka.

Odczynniki

- odczynnik Bradford (preparat handlowy),
- roztwór wzorcowy albuminy wołowej (BSA).
- roztwór PBS,
- etanol 96%.

Wykonanie ćwiczenia

Wykonanie krzywej wzorcowej

1. Przygotować 1 ml wzorcowego roztworu albuminy o stężeniu 1-30 mg/ml.
2. Przygotować szereg rozcieńczeń: 1:1, 1:3, 1:7. W tym celu przygotować 3 probówki 2.0 ml, dodać do nich po 0.5 ml PBS. Przenieść 0.5 ml wzorcowego roztworu do probówki opisanej jako rozcieńczenie 1:1 i przepipetować. Z rozcieńczenia 1:1 przenieść 0.5 ml do probówki opisanej jako rozcieńczenie 1:3 i przepipetować. Analogicznie przygotować rozcieńczenie 1:7.
3. Przygotować 5 probówek 2.0 ml i dodać do nich po 900 µl odczynnika Bradford.
4. Do jednej z probówek dodać 100 µl PBS. Probówkę zamknąć i odpowiednio podpisać (próba zerowa), a następnie wytrząsać przez 30 s na worteksie.
5. Do przygotowanych roztworów Bradford przenieść pipetą automatyczną po 100 µl roztworu stężeń wzorcowych BSA zawieszonych w PBS (rozcieńczamy w ten sposób stężenie BSA 10-krotnie) – jeden roztwór Bradford = jedno stężenie. Probówki zamknąć i odpowiednio podpisać, a następnie wytrząsać przez 30 s na worteksie.
6. Inkubować 5 minut w temp. pokojowej.
7. Uruchomić spektrofotometr i wybrać odpowiedni program do oznaczania stężenia białka.
8. Wykonać oznaczenie próby ślepej: przenieść 1 ml wcześniej przygotowanej próby zerowej do kuwety pomiarowej, kuwetę umieścić w spektrofotometrze i nacisnąć „blank”. Po dokonanej kalibracji podnieść ramię spektrofotometru, wyjąć kuwetę i odstawić.
9. Do następnej kuwety przenieść roztwór Bradford o najniższym stężeniu BSA, kuwetę umieścić w spektrofotometrze, zamknąć wieko urządzenia, wybrać odpowiednie stężenie, wykonać pomiar, usunąć kuwetę.

10. Tak samo wykonać pomiary kolejnych roztworów Bradford-BSA, umieszczając je w spektrofotometrze w kolejności wzrostu ich stężeń.

Pomiar białka w badanych próbach

Przygotować odpowiednią liczbę probówek 2.0 ml i dodać do nich po 900 μ l odczynnika Bradford.

1. Z podanych homogenizacji i wirowaniu próbek, przenieść przy pomocy pipety automatycznej po 100 μ l nadsącza do probówek z roztworem Bradford.
2. Probówki zamknąć i wytrząsać na wortexie przez 30 s, a następnie krótko zwirować.
3. Inkubować 5 minut w temp. pokojowej.
4. Przenieść próby do kuwet spektrofotometrycznych.
5. Kuwetę umieścić w spektrofotometrze, zamknąć wieko urządzenia, odczytać i zapisać uzyskany wynik.
5. Usunąć kuwetę, wylać jej zawartość, kuwetkę opłukać wodą destylowaną z tryskawki.

Uwaga: Próbkę po dezintegracji chemicznej (Triton X-100 + SDS) oznaczyć na samym końcu (interferencja z odczynnikiem Bradford).

6. Po zmierzeniu absorbancji ostatniej próbki ponownie umieścić kuwetę zawierającą roztworów Bradford-BSA o stężeniu „0”, odczytać i zapisać wynik.
7. Porównać wydajność poszczególnych metod homogenizacji.

Kompleks białko-barwnik jest trwały przez 60 minut. Po pomiarze absorbancji przepłukać kuwety wodą destylowaną z tryskawki. Do wycierania kuwet stosować papierową chusteczkę.

Po zakończeniu pomiarów na spektrofotometrze przepłukać kuwety 96% etanolem.