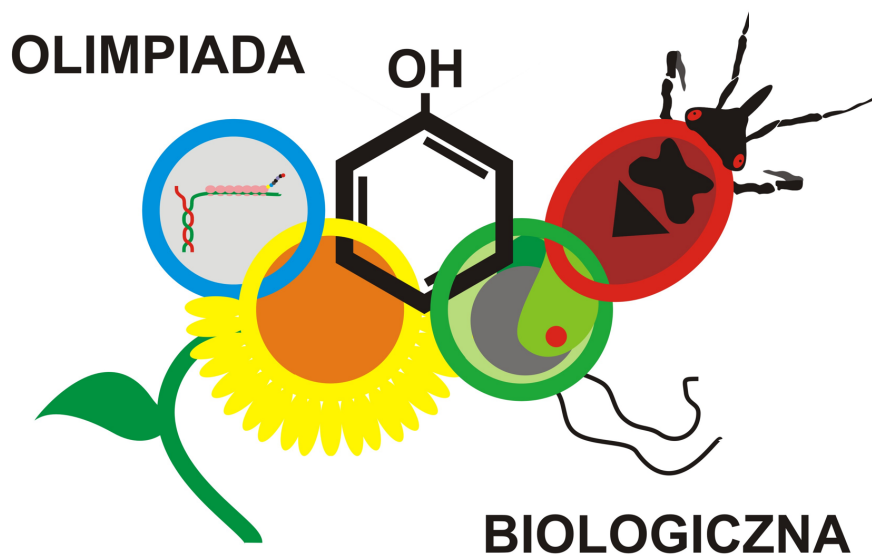


Olimpiada Biologiczna



Informator – pracownia biochemiczna

**Radosław Mazur, Takao Ishikawa,
Agnieszka Kwiatek, Monika Adamczyk-Popławska**

Warszawa, marzec 2019 r.

1. Sporządzanie i mieszanie roztworów

1.1. Stężenia molowe i procentowe

Mol jest jednostką podstawową układu SI będącą miarą liczności materii (atomów, jonów, elektronów itd.) wyrażoną jako liczba atomów znajdujących się w 12 gramach węgla izotopu ^{12}C i wynosi $6,022 \times 10^{23}$. **Masa molowa (M)** to masa jednego mola danej substancji. Jednostką masy molowej jest $\text{g} \times \text{mol}^{-1}$. Między liczbą moli (n), masą molową substancji (M) i masą substancji (m) istnieje następująca zależność:

$$n = \frac{m}{M} \quad (1)$$

gdzie: n – liczba moli substancji [mol];

m – masa substancji [g];

M – masa molowa substancji [$\text{g} \times \text{mol}^{-1}$].

Stężenie molowe roztworu (C_m) to liczba moli danej substancji w 1 dm^3 roztworu. Jednostką C_m jest $\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$:

$$C_m = \frac{n}{V} \quad (2)$$

gdzie: C_m – stężenie molowe substancji [$\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$];

n – liczba moli substancji [mol];

V – objętość roztworu [dm^3].

Jednostka stężenia molowego to [$\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$], ale w praktyce laboratoryjnej bardzo często używa się skróconego oznaczenia „M”. Przykładowo, roztwór o stężeniu $0,5 \text{ [mol} \times \text{dm}^{-3}]$ można oznaczyć jako roztwór 0,5 M – półmolowy.

Uwzględniając zależność (1) otrzymujemy następujące równanie:

$$C_m = \frac{m}{VM} \quad (3)$$

Stężenie procentowe roztworu (C_p) oznacza zawartość substancji rozpuszczonej w stosunku do całości roztworu, wyrażoną w postaci procentowej. Stężenie procentowe może zostać wyrażone na różne sposoby, np.:

(a) stężenie procentowe masowe. Jest to stosunek masy danej substancji do masy całego roztworu (podanych w tej samej jednostce), wyrażony w postaci procentowej:

$$C_{pA} = \frac{m_A}{m} \times 100\% \quad (4)$$

gdzie: C_{pA} – stężenie procentowe masowe substancji A [%];

m_A – masa substancji A [g];

m – masa roztworu (mieszaniny) [g].

Stężenie procentowe masowe można również zdefiniować jako liczbę gramów substancji w 100 gramach mieszaniny. Aby jednoznacznie wskazać, że podane stężenie procentowe jest stężeniem masowym, należy zastosować dodatkowy symbol, np. „% (w/w)”, „% mas.” lub „% wag.”.

Zapis „10% (w/w) wodny roztwór glukozy” oznacza, że w 100 g roztworu znajduje się 10 g glukozy i 90 g wody.

(b) stężenie procentowe objętościowe. Jest to stosunek objętości danej substancji do objętości całego roztworu (podanych w tej samej jednostce), wyrażony w postaci procentowej:

$$C_{pA} = \frac{V_A}{V} \times 100\% \quad (5)$$

gdzie: C_{pA} – stężenie procentowe objętościowe substancji A [%];

V_A – objętość substancji A [dm³];

V – sumaryczna objętość wszystkich składników mieszaniny mierzona przed zmieszaniem [dm³].

Należy pamiętać, że objętość mieszaniny nie jest sumą objętości wszystkich substancji wchodzących w jej skład ze względu na zachodzące zjawisko kontrakcji objętości (nie zachodzi ono jedynie w przypadku roztworów idealnych). Dlatego też objętości poszczególnych składników należy mierzyć przed ich zmieszaniem w tych samych warunkach (temperatura i ciśnienie wpływają na zmiany objętości roztworów).

Stężenie procentowe objętościowe można inaczej zdefiniować jako liczbę jednostek objętości substancji w 100 jednostkach objętości roztworu. Aby jednoznacznie wskazać, że podane stężenie procentowe jest stężeniem objętościowym należy zastosować dodatkowy symbol np. „% (v/v)”, „% obj.” lub „% vol.”.

Przykładowo zapis „10% (v/v) wodny roztwór etanolu” oznacza, że został on sporządzony z 10 jednostek objętości (np. 10 ml) etanolu i 90 jednostek objętości (np. 90 ml) wody.

(c) stężenie procentowe masowo-objętościowe oznaczane symbolem % (w/v) określa liczbę części masowych danej substancji przypadających na 100 części objętościowych mieszaniny. Najczęściej jest definiowane poprzez liczbę gramów substancji przypadającej na 100 ml roztworu, np. zapis „10% (w/v) wodny roztwór glukozy” oznacza, że w 100 ml roztworu znajduje się 10 g glukozy. Z formalnego punktu widzenia stosowanie zapisu procentowego w przypadku stosunku wagowo-objętościowego (w/v) jest nieprawidłowe, ponieważ stosunek ten jest wartością mianowaną (jednostka: $\text{g} \times \text{ml}^{-1}$), a przy pomocy procentów wyraża się jedynie wartości bezwymiarowe. Niemniej zapis % (w/v) jest powszechnie stosowany w laboratoriach biochemicznych.

W przypadku roztworów wodnych o niskim stężeniu substancji rozpuszczonej, których gęstość niewiele odbiega od gęstości wody (100 ml roztworu waży ≈ 100 g) stosunki: wagowo/wagowy (w/w) i wagowo/objętościowy (w/v) są równe (lub prawie równe). Wraz ze wzrostem gęstości roztworu (roztwory o wysokim stężeniu substancji rozpuszczonej) różnica między stosunkami w/w i w/v rośnie. Aby zamienić stosunek w/w na w/v należy uwzględnić gęstość roztworu (d).

Przykład 1:

1 ml 10% (w/w) roztworu o gęstości $1,1 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ waży 1,1 g, zatem 100 ml roztworu będzie ważyć 110 g. Jeżeli w 100 g roztworu jest 10 g substancji, to w 110 g (czyli 100 ml) będzie 11 g. Tak więc zapis 10% (w/w) jest tożsamy z zapisem 11% (w/v).

W przypadku potrzeby zamiany stężenia procentowego masowego na stężenie molowe lub odwrotnie (np. gdy stężenie odczynnika w postaci handlowej podano w stężeniu procentowym, a w stosowanej procedurze jest podane stężenie molowe) w celu przeliczenia stężeń stosuje się następujące równanie:

$$C_M = \frac{C_p d}{100\%M} \quad (6)$$

gdzie: C_M – stężenie molowe [$\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$];

C_p – stężenie procentowe masowe [%];

d – gęstość roztworu [$\text{g} \times \text{dm}^{-3}$];

M – masa molowa substancji [$\text{g} \times \text{mol}^{-1}$].

Należy pamiętać o zachowaniu właściwych jednostek dla wartości podanych w równaniu (6), aby przeliczenie stężeń było poprawne.

1.2. Rozcieńczenia roztworów

Aby obliczyć ilość stężonego (początkowego) roztworu dowolnej substancji ($C_{\text{początkowe}}$) potrzebnego do sporządzenia określonej objętości roztworu rozcieńczonego, czyli o pewnym stężeniu końcowym substancji ($C_{\text{końcowe}}$), należy obliczyć ile razy należy rozcieńczyć roztwór stężony ($C_{\text{początkowe}} \div C_{\text{końcowe}}$), a następnie podzielić objętość końcową roztworu ($V_{\text{końcowa}}$) przez wyznaczone rozcieńczenie roztworu stężonego. Otrzymany wynik będzie objętością stężonego (początkowego) roztworu ($V_{\text{początkowa}}$), którą należy dopełnić rozcieńczalnikiem (np. wodą dejonizowaną) do objętości końcowej ($V_{\text{końcowa}}$). W przypadku sporządzania roztworów wieloskładnikowych potrzebną objętość stężonych substancji należy wyznaczać niezależnie; po zsumowaniu wszystkich objętości mieszaninę należy dopełnić rozcieńczalnikiem do żądanej końcowej objętości.

Przykład 2:

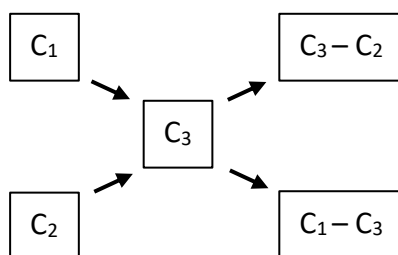
Aby przygotować 1000 ml 25 mM roztworu sacharozy mając do dyspozycji 200 mM roztwór sacharozy, należy najpierw obliczyć ile razy trzeba rozcieńczyć stężony roztwór sacharozy, czyli wyznaczyć stosunek stężenia początkowego do końcowego roztworu: $200 \div 25 = 8$. Tak więc 200 mM roztwór sacharozy należy rozcieńczyć 8 razy. Objętość końcowa to 1000 ml, czyli do sporządzenia takiej ilości roztworu potrzebujemy $1000 \text{ ml} \div 8 = 125 \text{ ml}$ stężonego roztworu sacharozy i dopełnić go wodą dejonizowaną do końcowej objętości 1000 ml.

Przykład 3:

W celu dokonania 10-krotnego rozcieńczenia (R) roztworu, np. mając 10 mM roztwór wyjściowy i chcąc otrzymać 2 ml ($V_{\text{końcowa}}$) 1 mM roztworu końcowego, należy mieszać ze sobą $2 \text{ ml} \div 10 = 0,2 \text{ ml}$ ($V_{\text{końcowa}} \div R = V_{\text{początkowa}}$) roztworu wyjściowego i 1,8 ml wody dejonizowanej. Innymi słowy, należy mieszać ze sobą 1 objętość roztworu wyjściowego i 9 objętości wody dejonizowanej.

W celu dokonania większych rozcieńczeń (szczególnie dla małych objętości końcowych roztworu), należy wykonywać je etapami, np. dla 50-krotnego rozcieńczenia, w pierwszej kolejności wykonujemy 10-krotne rozcieńczenie, a następnie z tak otrzymanego roztworu przygotowujemy 5-krotne rozcieńczenie. Końcowy roztwór jest więc rozcieńczony 10×5 , czyli 50-krotnie.

Przy rozwiązywaniu zadań dotyczących mieszania dwóch roztworów o niezerowej zawartości substancji rozpuszczonej, przydatna jest metoda krzyżowa. Załóżmy, że mamy dwa roztwory o znanym stężeniu C_1 i C_2 , które spełniają warunek $C_1 > C_2$. Poprzez zmieszanie tych dwóch roztworów możemy uzyskać roztwór o stężeniu C_3 , znajdującym się w przedziale $C_1 > C_3 > C_2$. Aby obliczyć objętości roztworów o stężeniach C_1 i C_2 potrzebnych do sporządzenia określonej objętości roztworu C_3 stosujemy następujący schemat:



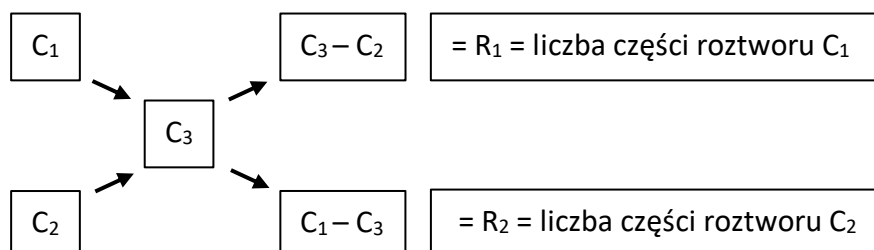
Na podstawie tego diagramu można zapisać następującą zależność:

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{C_3 - C_2}{C_1 - C_3} \quad (7)$$

gdzie: R_1 i R_2 – liczba części roztworów o stężeniu C_1 i C_2 ;

C_1 , C_2 , C_3 – stężenia roztworów wyjściowych C_1 i C_2 oraz roztworu końcowego C_3 .

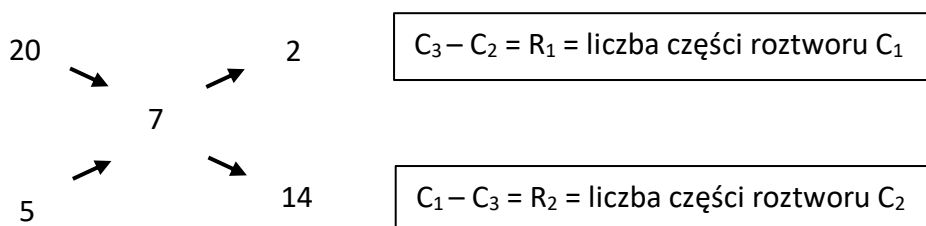
Wartości R_1 i R_2 możemy odczytać bezpośrednio z diagramu:



Przykład 4:

Oblicz w jakich proporcjach należy mieszać roztwory 20% i 5% aby uzyskać roztwór 7%.
Ile ml każdego z roztworów należy odmierzyć, aby uzyskać 500 ml roztworu 7%?

Niech $C_1 = 20\%$, $C_2 = 5\%$ i $C_3 = 7\%$. Korzystając z metody krzyżowej uzupełniamy graf:



Tak więc, aby uzyskać roztwór 7% należy mieszać roztwór 20% i 5% w proporcjach 2 do 14. Aby obliczyć ile ml każdego z roztworów należy odmierzyć do uzyskania 500 ml roztworu 7% należy rozwiązać następujące równanie:

$$2x + 14x = 500 \text{ ml}$$

$$16x = 500 \text{ ml}$$

$$x = 31,25 \text{ ml}$$

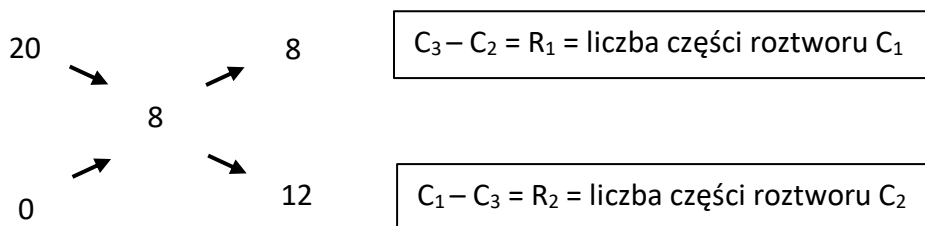
Wartość x jest 1 częścią objętości końcowej roztworu. Aby przygotować 500 ml 7% roztworu należy wziąć dwie części roztworu 20%, czyli $2 \times 31,25 \text{ ml} = \underline{62,5 \text{ ml}}$ oraz 14 części roztworu 5%, czyli $14 \times 31,25 \text{ ml} = \underline{437,5 \text{ ml}}$.

Metodę tę można również stosować do obliczania proporcji roztworów przy ich rozcieńczaniu. Wtedy za C_2 podstawiamy 0% (stężenie rozcieńczonej substancji w rozcieńczalniku).

Przykład 5:

Opisz jak z 20% wodnego roztworu otrzymać 1200 ml roztworu 8%.

Niech $C_1 = 20\%$, $C_2 = 0\%$ i $C_3 = 8\%$. Korzystając z metody krzyżowej uzupełniamy graf:



Tak więc, aby uzyskać roztwór 8% należy mieszać roztwór 20% i wodę dejonizowaną w proporcjach 8 do 12.

Aby obliczyć ile ml każdego z roztworów trzeba odmierzyć do uzyskania 1200 ml roztworu 8%, należy rozwiązać następujące równanie:

$$8x + 12x = 1200 \text{ ml}$$

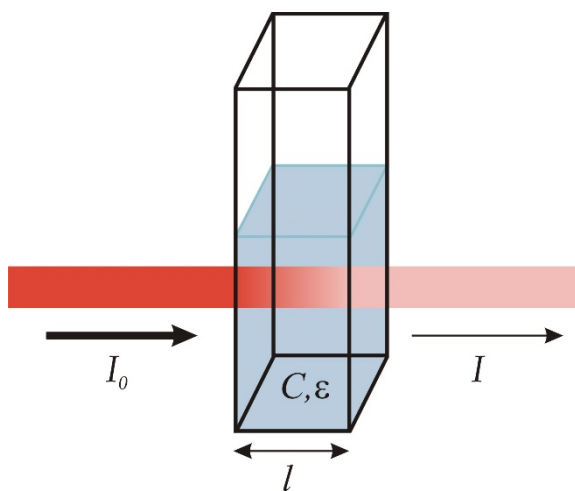
$$20x = 1200 \text{ ml}$$

$$x = 60 \text{ ml}$$

Wartość x jest 1 częścią objętości końcowej roztworu. Aby przygotować 1200 ml 8% roztworu należy wziąć osiem części roztworu 20%, czyli $8 \times 60 \text{ ml} = \underline{480 \text{ ml}}$ oraz 12 części wody dejonizowanej czyli $12 \times 60 \text{ ml} = \underline{720 \text{ ml}}$.

2. Spektrofotometria

Spektrofotometria to dział analizy chemicznej, w której podstawą ilościowego i jakościowego oznaczania substancji w roztworze jest jej zdolność do pochłaniania (absorpcji) światła o określonej długości fali, a więc wykazywanie przez nią zabarwienia – wrażenie barwy związków chemicznych jest efektem pochłaniania przez nie fal z pewnych zakresów światła widzialnego (VIS). Oprócz substancji barwnych, spektrofotometrycznie można oznaczać także substancje bezbarwne, jeśli wykazują one zdolność do absorpcji promieniowania w zakresie nadfioletowym (UV) lub możliwe jest ich ilościowe przekształcenie w pochodne barwne lub absorbujące UV. Często, gdy jedna reakcja nie prowadzi do powstania barwnego produktu lub absorbującego w UV, stosuje się dodatkową reakcję przekształcającą produkt pierwszej reakcji w taki produkt końcowy.



Ryc. 2.1. Ilustracja zjawiska absorpcji światła przez roztwór. Szczegóły w tekście.

Absorbancja to wielkość fizyczna równa logarytmowi dziesiętnemu stosunku natężenia światła padającego na badany ośrodek (np. roztwór) do natężenia światła po przejściu przez ten ośrodek (Ryc. 2.1):

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1)$$

gdzie:

A – absorbancja [jednostka bezwymiarowa];

I_0 – natężenie światła padającego na ośrodek absorbujący [Ix];

I – natężenie światła po przejściu przez ośrodek absorbujący [Ix].

Prawo Lamberta-Beera wiąże ze sobą wartości absorbancji i stężenia molowego badanej substancji:

$$A = \varepsilon Cl \quad (2)$$

gdzie:

A – absorbancja roztworu przy danej długości fali [jednostka bezwymiarowa];

ε – wartość charakteryzująca substancję – molowy współczynnik absorpcji dla danego związku przy danej długości fali [$M^{-1} \times cm^{-1}$];

C – stężenie molowe substancji w badanym roztworze [$mol \times dm^{-3}$, M];

l – długość drogi fali świetlnej przechodzącej przez roztwór [cm].

Uwagi:

- 1) W większości przypadków w pomiarach spektrofotometrycznych stosuje się milimolowy współczynnik absorpcji ε , którego jednostką jest $mM^{-1} \times cm^{-1}$. W konsekwencji obliczone wartości stężenia molowego substancji są wyrażone w milimolach na litr [mM];
- 2) Jeżeli wartość długości drogi świetlnej (l) nie jest podana, to domyślnie jest to 1 cm.

W analizie ilościowej z wykorzystaniem spektrofotometrii stosuje się dwa główne podejścia metodyczne:

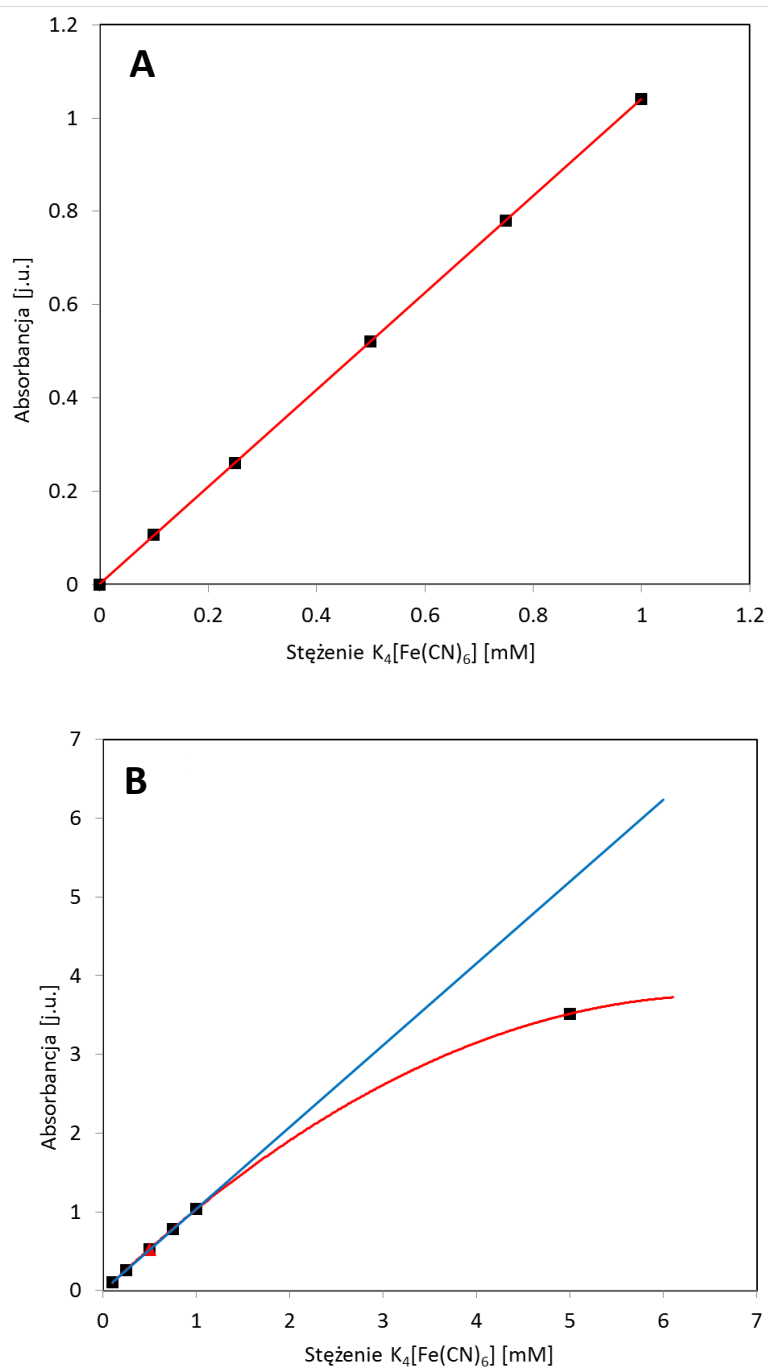
- a) w przypadku, gdy współczynnik absorpcji (ε) badanego związku jest znany, stosuje się bezpośrednio prawo Lamberta-Beera (równanie 2). Należy jednak pamiętać, że wzrost absorbancji roztworu w zależności od stężenia badanej substancji jest nieliniowy (przykład 1, p. niżej). W przypadku, gdy absorbancja badanego roztworu jest większa od 1, należy badany roztwór rozcieńczyć, zmierzyć ponownie jego absorbancję, a wprowadzone rozcieńczenie uwzględnić przy obliczaniu stężenia molowego substancji.
- b) w przypadku, gdy współczynnik absorpcji (ε) badanego związku jest nieznan, stosuje się metodę tzw. krzywej wzorcowej, która polega na przygotowaniu serii roztworów

związku chemicznego o znanym stężeniu (roztwory wzorcowe) i zmierzenia ich absorbancji. Na podstawie uzyskanych danych wykreśla się zależność absorbancji od stężenia (lub zawartości) substancji – tzw. krzywą wzorcową, która pozwala na porównywanie (w obrębie jej prostoliniowego przebiegu) absorbancji substancji badanej o nieznanym stężeniu z wartościami absorbancji roztworów wzorcowych. Podobnie jak opisano w podpunkcie (a), w przypadku, gdy absorbancja badanej próbki znajduje się poza zakresem prostoliniowym krzywej wzorcowej, próbkę należy rozcieńczyć i ponownie dokonać pomiaru absorbancji (przykład 2, p. niżej).

W przypadku stosowania reakcji barwnej w celu ilościowego oznaczenia bezbarwnej substancji, stosujemy metodę krzywej wzorcowej. Warunkiem koniecznym jest identyczne traktowanie (objętość stosowanych odczynników, czas inkubacji itp.) serii roztworów substancji wzorcowej oraz badanych próbek w trakcie procedury reakcji barwnej. Jeżeli absorbancja badanej próbki znajduje się poza zakresem prostoliniowym krzywej wzorcowej, nie można rozcieńczać próbki w celu ponownego zmierzenia absorbancji. Takie postępowanie spowoduje błąd pomiaru, ponieważ przy nadmiarze badanej (bezbarwnej) substancji powstawanie barwnych pochodnych następuje zazwyczaj w sposób niestechiometryczny. Aby poprawnie zmierzyć stężenie badanej substancji należy ponownie wykonać (w identyczny sposób) reakcję barwną stosując mniejszą ilość badanej (bezbarwnej) próbki (np. poprzez jej rozcieńczenie).

Przykład 1:

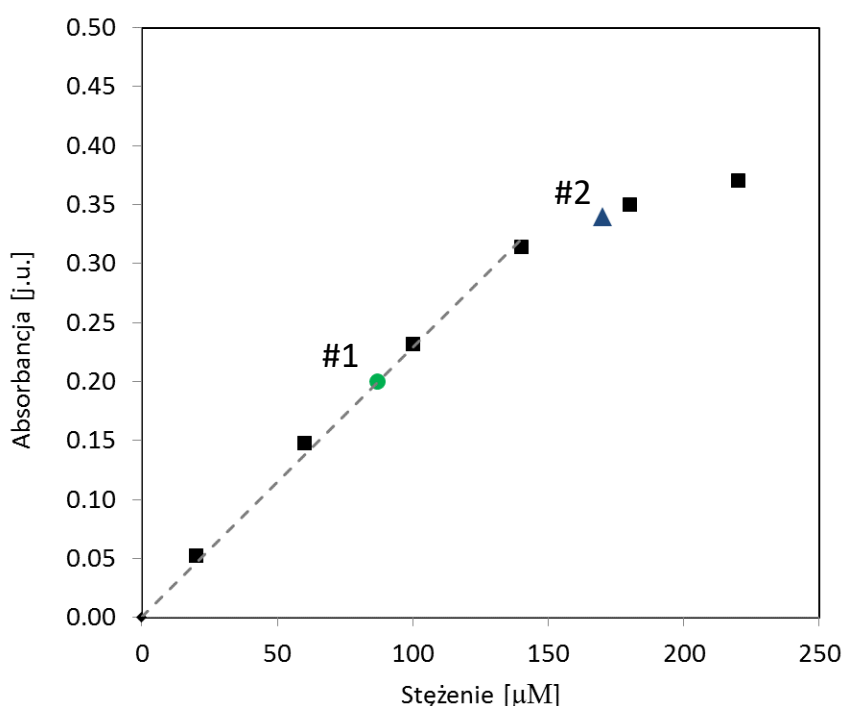
Wykonano pomiary absorbancji przy 420 nm roztworów heksacyjanożelazianu(III) potasu, $K_3[Fe(CN)_6]$ o stężeniach w zakresie 0,1-5 mM. Milimolowy współczynnik absorbcji (ϵ) dla tego związku dla długości fali światła 420 nm wynosi $1,04 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. W przypadku stężeń poniżej 1 mM (Ryc. 2.2A, p.niżej) dane pomiarowe (czarne kwadraty) pokrywają się z obliczeniami wg równania 2 (Ryc. 2.2A, czerwona linia). Natomiast w przypadku stężeń powyżej 1 mM (Ryc. 2.2B, p.niżej) wartości absorbancji są znacznie mniejsze (Ryc. 2.2B, czerwona linia) niż to wynika z prawa Lamberta-Beera (Ryc. 2.2B, niebieska linia); np. dla stężenia 5 mM zmierzona wartość absorbancji wynosi 3,52 w stosunku do wartości oczekiwanej 5,20. Po wykonaniu 10-krotnego rozcieńczenia roztworu 5 mM jego absorbancja wyniosła 0,52 (Ryc. 2.2B, czerwony trójkąt), co jest zgodne z wartością oczekiwaną.



Ryc. 2.2. Zależność pomiędzy absorbancją przy 420 nm a stężeniem molowym $K_4[Fe(CN)_6]$ dla zakresu stężeń 0,1–1 mM (A) oraz 0,1–5 mM (B).

Przykład 2:

W celu pomiaru zawartości barwnego związku X w próbkach biologicznych zastosowano metodę krzywej wzorcowej. Przygotowano roztwory wzorcowe substancji X w stężeniach od 20 do 220 μM i zmierzono ich absorbancję przy długości fali 540 nm. Na Ryc. 2.3 przedstawiono zależność absorbancji od stężenia dla substancji X (czarne kwadraty). Z przebiegu punktów widzimy, że odcinek prostoliniowy występuje w zakresie stężeń 20-140 μM (linia przerywana) i tylko ten fragment może być wykorzystany do wyznaczenia stężenia substancji X. Na Ryc. 2.3 odłożono dwa punkty pomiarowe dla próbek zawierających nieznaną ilość substancji X. W przypadku próbki #1 (zielone koło) jej absorbancja ($A = 0,2$) znajduje się w zakresie prostoliniowego odcinka krzywej wzorcowej i stężenie substancji X można odczytać bezpośrednio z wykresu ($C_M = 87 \mu\text{M}$). W przypadku próbki #2 (niebieski trójkąt) jej absorbancja ($A = 0,34$) znajduje się poza zakresem prostoliniowym krzywej wzorcowej i nie można odczytać stężenia substancji X z wykresu. Aby to zrobić, próbkę #2 należy rozcieńczyć, ponownie przeprowadzić reakcję barwną i zmierzyć absorbancję, i przy obliczeniach uwzględnić rozcieńczenie.



Ryc. 2.3. Wyznaczanie stężenia badanej substancji w próbce metodą krzywej wzorcowej. Szczegółowy opis w tekście.

3. Pomiary aktywności enzymatycznej

3.1. Jednostki aktywności enzymatycznej

Podstawową jednostką aktywności enzymatycznej jest międzynarodowa jednostka aktywności enzymatycznej **U**, której wymiarem jest liczba μmol powstałego produktu w ciągu jednej minuty [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$] w warunkach optymalnych i przy wysyceniu enzymu substratem. Inną wielkością charakteryzującą aktywność enzymatyczną bezpośrednio związaną z czystością preparatu enzymatycznego jest **aktywność właściwa**. Definiuje się ją jako liczbę jednostek aktywności enzymatycznej U na 1 mg białka w preparacie enzymatycznym [$\text{U} \times \text{mg}^{-1}$].

3.2. Pomiar aktywności enzymatycznej

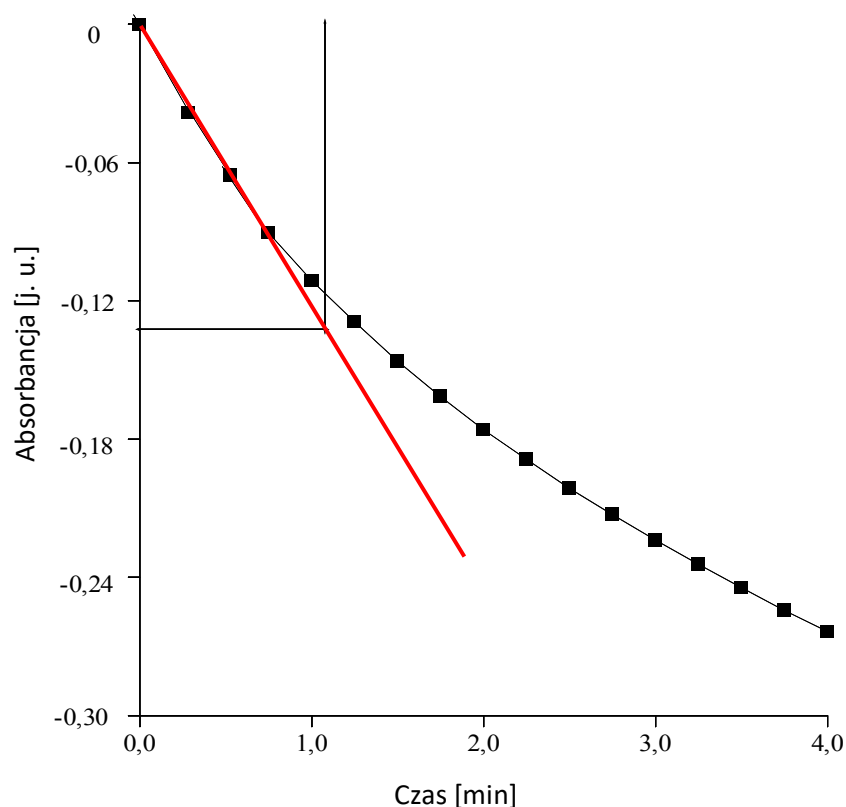
W celu określenia aktywności enzymu należy dobrać odpowiednio wysokie stężenie substratu, tak aby jego ilość nie była czynnikiem limitującym reakcję. Ponieważ jednostka aktywności enzymatycznej jest związana z upływem czasu, w celu zmierzenia tej aktywności należy wykonać od kilku do kilkunastu pomiarów absorbancji od momentu rozpoczęcia reakcji. Przygotowując mieszaninę reakcyjną należy mieszać wszystkie jej składniki poza substratem i pozostawić na około 1–2 minuty. Takie postępowanie ma na celu: (i) ustabilizowanie temperatury wszystkich składników mieszaniny, tak aby aktywność enzymu nie była ograniczona temperaturą; (ii) usunięcie endogenego substratu, którego obecność będzie zaburzać pomiar aktywności. Ma to szczególne znaczenie w przypadku pomiarów aktywności enzymów w lizatach komórkowych.

Przed dodaniem substratu należy zmierzyć absorbancję w czasie $t = 0$, aby określić punkt odniesienia. Reakcję enzymatyczną rozpoczynamy dodaniem substratu o znanym stężeniu. Dalsze pomiary absorbancji zależą od sposobu wykrywania aktywności enzymu. Jeżeli jesteśmy w stanie określić bezpośrednio zmiany absorbancji jednego z reagentów, ponieważ wykazuje on specyficzną absorpcję w zakresie UV-VIS, i znamy stechiometrię reakcji, możemy monitorować zmiany absorbancji (w stałych odstępach czasowych) bezpośrednio w kuwecie pomiarowej umieszczonej cały czas w komorze spektrofotometru. Inną możliwością jest pobieranie określonej objętości próbek mieszaniny reakcyjnej i dodanie odczynnika, który zahamuje aktywność enzymu, tym samym utrwalając stężenia reagentów w danym czasie reakcji. Następnie należy zmierzyć absorbancję próbki i obliczyć aktywność enzymatyczną pamiętając o rozcieńczeniach spowodowanych wprowadzeniem dodatkowej substancji.

Jeżeli żaden z reagentów nie wykazuje specyficznej absorpcji w zakresie promieniowania UV-VIS, konieczne jest wykonanie (jeżeli to możliwe) reakcji barwnej. W tym celu należy w równych odstępach czasowych pobierać próbki mieszaniny reakcyjnej i dodawać do nich odczynnik hamujący aktywność enzymu. Następnie wykonujemy reakcję barwną i stosujemy metodę krzywej wzorcowej.

3.3. Obliczanie aktywności enzymatycznej

Dysponując wartościami absorbancji zmierzonymi w trakcie trwania reakcji enzymatycznej, możemy wykreślić zależność absorbancji od czasu (Ryc. 3.1).



Ryc. 3.1. Zależność zmian absorbancji od czasu dla przykładowej reakcji enzymatycznej. Czerwona linia wskazuje początkowy odcinek prostoliniowy reakcji. Wartości absorbancji zostały znormalizowane do 0 w $t = 0$.

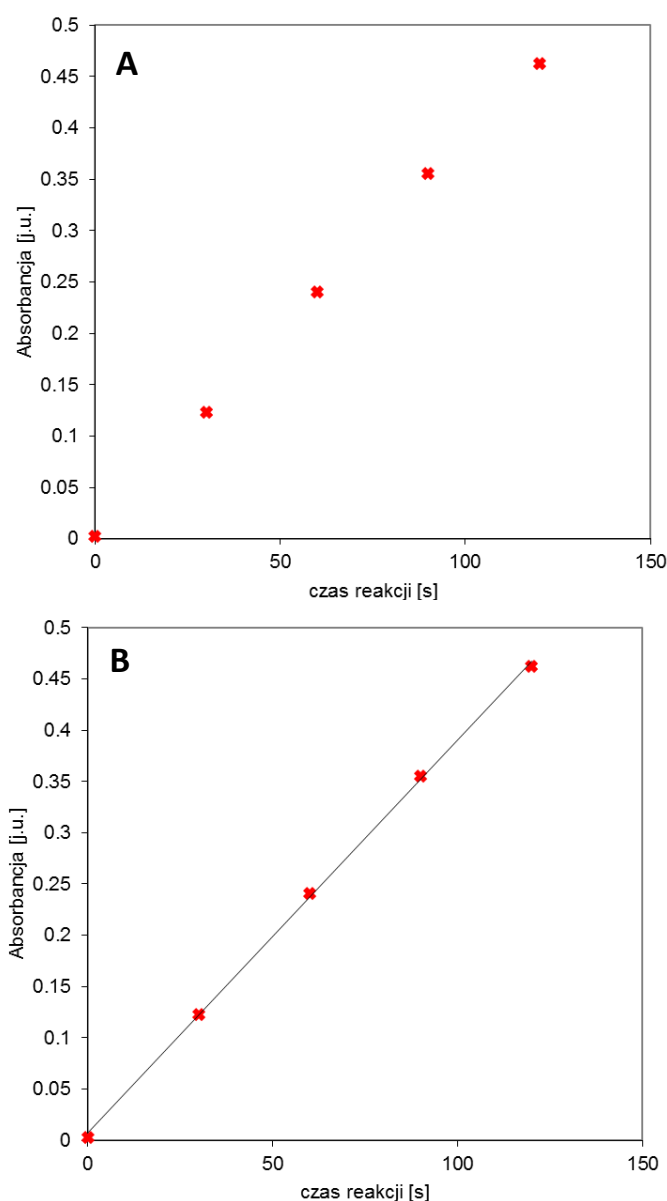
Następnie postępujemy wg poniższego schematu:

- 1) z prostoliniowego początkowego odcinka wykresu wyznaczamy szybkość początkową reakcji V_0 [$\Delta A \times \text{min}^{-1}$].
- 2) Stosując prawo Lamberta-Beera (lub metodę krzywej wzorcowej) obliczamy zmianę stężenia molowego produktu (uwzględniając stechiometrię reakcji) w ciągu jednej minuty.
- 3) Znając zmianę stężenia molowego na minutę [$C_M \times \text{min}^{-1}$] obliczamy aktywność enzymatyczną U [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]. Aby tego dokonać musimy znać objętość mieszaniny w jakiej zachodziła reakcja.
- 4) Jeżeli znamy zawartość białka w badanej próbce możemy policzyć aktywność właściwą [$U \times \text{mg}^{-1}$].

Obliczanie aktywności enzymatycznej ilustrują poniższe przykłady.

Przykład 1:

Badano aktywność enzymu β -galaktozydazy stosując analog substratu ONPG (*o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd), który po hydrolizie uwalnia barwny produkt reakcji. Mieszanina reakcyjna zawierała 50 μ l enzymu, a całkowita objętość mieszaniny (wraz z substratem) wynosiła 5 ml. Po dodaniu substratu i wymieszaniu, natychmiast pobrano 1 ml mieszaniny i dodano do próbówki zawierającej 200 μ l 1M węgla sodu (inhibitor reakcji). Następnie co 30 s pobierano po 1 ml mieszaniny reakcyjnej (w sposób podany powyżej), aż do opróżnienia naczynia reakcyjnego. Następnie zmierzono absorbancję pozyskanych pięciu próbek przy długości fali świetlnej 420 nm (Ryc. 3.2A). Wiedząc, że milimolowy współczynnik absorpcji dla barwnego produktu reakcji wynosi $3,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ oblicz aktywność badanego enzymu.



Ryc. 3.2. (A) Wartości absorbancji zmierzone w trakcie reakcji enzymatycznej katalizowanej przez β -galaktozydazę. (B) wyznaczenie początkowego prostoliniowego odcinka reakcji.

Rozwiązanie:

- 1) Pierwszym krokiem jest wyznaczenie początkowego prostoliniowego odcinka reakcji. Na Ryc. 3.2A widzimy, że przyrost absorbancji jest liniowy przez cały okres monitorowania reakcji. Wykreślamy więc linię prostą przechodzącą przez wszystkie punkty (Ryc. 3.2B) i odczytujemy zmianę absorbancji w ciągu 1 minuty. Wynosi ona 0,238 jednostek absorbancji $\times \text{min}^{-1}$.
- 2) Stosując prawo Lamberta-Beera obliczamy zmianę stężenia produktu na minutę w kuwecie pomiarowej:

$$A = \varepsilon Cl$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon l}$$

$$C = \frac{0,238}{3,5 \times 1}$$

$$C = 0,068 [\text{mM min}^{-1}]$$

- 3) Naszym celem jest obliczenie aktywności enzymu, który znajdował się w komorze reakcyjnej. Musimy więc uwzględnić wszystkie rozcieńczenia dokonane w trakcie procedury pomiarowej. W naszym przypadku 1 ml mieszaniny reakcyjnej był dodawany do 200 μl węgla sodu. Dokonałiśmy więc rozcieńczenia 1,2 razy. Musimy je uwzględnić w obliczeniach:

$$C = 0,068 \times 1,2 [\text{mM min}^{-1}]$$

$$C = 0,082 [\text{mM min}^{-1}]$$

Powyższa wartość jest zmianą stężenia produktu na minutę w mieszaninie reakcyjnej.

- 4) Kolejnym krokiem jest przeliczenie powyższego wyniku na jednostkę U [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]. W wymiarze jednostki U występuje liczba moli, a nie stężenie molowe. Musimy więc uwzględnić objętość, w jakiej zachodziła reakcja. W tym przypadku jest to 5 ml. Z definicji stężenia molowego wiemy, że roztwór o stężeniu 1 M zawiera 1 mol substancji w 1 dm^3 .

W tym przypadku, jeżeli:

$$0,082 \text{ mmol znajduje się w } 1 \text{ dm}^3$$

to:

$$x \text{ mmol znajduje się w } 0,005 \text{ dm}^3 (5 \text{ ml})$$

rozwiązując powyższą proporcję otrzymujemy wynik:

$$0,00041 [\text{mmol} \times \text{min}^{-1}] = 0,41 [\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}]$$

Jest to aktywność enzymu znajdującego się w mieszaninie reakcyjnej, czyli w tym przypadku w 50 μl (0,05 ml) roztworu enzymu.

Aktywność enzymu najczęściej wyraża się jako ilość $\text{U} \times \text{ml}^{-1}$, a więc w przeliczeniu na mililitry będzie to:

$$0,41 \times 20 = 8,2 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$$

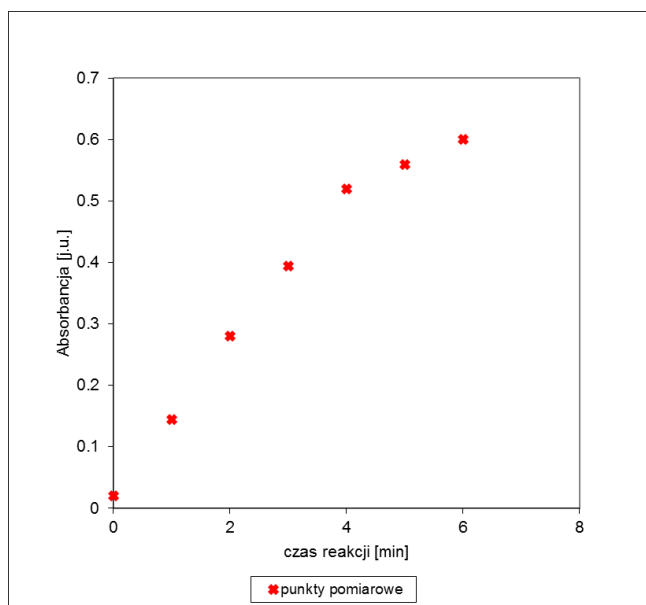
Przykład 2:

Oznaczano aktywność enzymu – dehydrogenazy mleczanowej (LDH) – w 1 ml frakcji lizatu komórkowego, mierząc zmiany absorbancji NADH (jednego z reagentów) w czasie przy 340 nm. Reakcję wykonano dla 20 μl lizatu, a całkowita objętość kuwety wynosiła 2 ml. Jaka jest aktywność całkowita i właściwa badanej frakcji lizatu, jeśli stwierdzono, że 20 μl lizatu zawiera 30 μg białka? Milimolowy współczynnik absorpcji dla NADH $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Wyniki wyraż w jednostkach U.

Czas [min]	0	1	2	3	4	5	6
Absorbancja	0,020	0,144	0,280	0,394	0,520	0,560	0,600

Rozwiązanie:

- 1) Wykreślamy zależność absorbancji od czasu (Ryc. 3.3). Widzimy, że odcinek prostoliniowy obejmuje 4 pierwsze minuty reakcji. Na podstawie tego odcinka obliczamy zmianę absorbancji w ciągu 1 minuty. Wynosi ona 0,125 jednostek absorbancji $\times \text{min}^{-1}$.



Ryc. 3.3. Wartości absorbancji zmierzone w trakcie reakcji enzymatycznej katalizowanej przez LDH.

- 2) Stosując prawo Lamberta-Beera, obliczamy zmianę stężenia produktu na minutę w kuwecie pomiarowej:

$$A = \varepsilon Cl$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon l}$$

$$C = \frac{0,125}{6,22 \times 1}$$

$$C = 0,02 [mM \min^{-1}]$$

- 3) Reakcja była prowadzona bezpośrednio w kuwecie. Nie dokonano więc żadnych rozcieńczeń i wobec tego wartość:

$$C = 0,02 [mM \min^{-1}]$$

jest zmianą stężenia produktu na minutę w mieszaninie reakcyjnej.

- 4) Kolejnym krokiem jest przeliczenie powyższego wyniku na jednostkę U [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]. W wymiarze jednostki U występuje liczba moli a nie stężenie molowe. Musimy więc uwzględnić objętość, w jakiej zachodziła reakcja. W tym przypadku jest to 2 ml. Z definicji stężenia molowego wiemy, że roztwór o stężeniu 1M zawiera 1 mol substancji w 1 dm³.

W tym przypadku, jeżeli:

$$0,02 \text{ mmol} \text{ znajduje się w } 1 \text{ dm}^3$$

to:

$$x \text{ mmol} \text{ znajduje się w } 0,002 \text{ dm}^3 (2 \text{ ml})$$

rozwiązując powyższą proporcję otrzymujemy wynik:

$$0,00004 [mmol \times \min^{-1}] = 0,04 [\mu\text{mol} \times \min^{-1}]$$

Jest to aktywność LDH w lizacie dodanym do mieszaniny reakcyjnej, czyli w tym przypadku w 20 μl .

- 5) Aby obliczyć całkowitą aktywność enzymu we frakcji lizatu (= 1 ml), należy pomnożyć aktywność w kuwecie (dla 20 μl lizatu) przez 50:

$$0,04 \times 50 = 2 \text{ U}$$

- 6) Aby obliczyć aktywność właściwą LDH w lizacie należy najpierw obliczyć całkowitą zawartość białka we frakcji lizatu. Wiemy, że w 20 μl lizatu znajduje się 30 μg białka. Tak więc w 1 ml będzie to:

$$30 \mu\text{g} \times 50 = 1500 \mu\text{g} = 1,5 \text{ mg}$$

- 7) Aktywność właściwa to aktywność całkowita frakcji dzielona przez całkowitą zawartość białka [$\text{U} \times \text{mg}^{-1}$]. W tym przypadku będzie to:

$$2 \text{ U} \div 1,5 \text{ mg} = 1,33 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$$

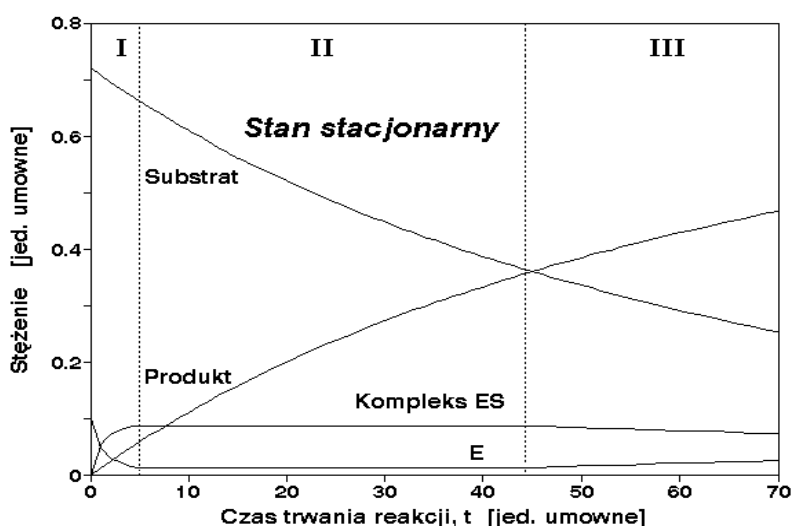
3.4. Wyznaczanie parametrów kinetycznych enzymów

W reakcjach chemicznych katalizowanych przez enzymy proces przekształcania substratu (S) w produkt (P) przebiega z utworzeniem kompleksu ES, gdzie E oznacza cząsteczkę enzymu. Pojawienie się katalizatora (E) powoduje, że w stanie znacznego oddalenia układu od stanu równowagi oraz przy stężeniu substratu [S] znacznie wyższym od stężenia enzymu [E] szybkość reakcji jest zależna od stężenia kompleksu enzym-substrat [ES]. W takim przypadku najprostsza reakcja enzymatyczna (jednocząsteczkowa) przebiega według podanego niżej schematu:



W związku z tym, że reakcja oddalona jest od stanu równowagi można przyjąć, że reakcja jest nieodwracalna, tzn. etap tworzenia produktu P związany jest z wyłącznie z rozpadem kompleksu ES opisanym stałą równowagi k_{+2} . Ponieważ w układzie stężenie [S] jest znacznie wyższe niż stężenie [E], rozpad i powstawanie kompleksu, mimo ciągłego przekształcania $S \rightarrow P$, jest procesem odwracalnym, opisanym stałymi k_1 i k_{-1} . Stałe stężenie kompleksu [ES] powoduje, że szybkość reakcji V też jest stała.

Opis takiego przebiegu reakcji przedstawia Ryc. 3.4. W czasie trwania każdej reakcji enzymatycznej można wyróżnić trzy fazy. Pierwsza z nich, faza prestatjonarna (I) trwa krótko (ms-s) i rozpoczyna się z chwilą dodania enzymu do mieszaniny inkubacyjnej. Następuje wtedy szybkie tworzenie kompleksu enzym-substrat ES i spadek stężenia wolnego enzymu E. Druga faza, stacjonarna (II) trwa wystarczająco długo, aby możliwy był pomiar szybkości reakcji metodami powszechnie stosowanymi w laboratoriach biochemicznych. Charakterystyczne cechy fazy stacjonarnej to: stała szybkość reakcji, stałe stężenie kompleksu ES i enzymu E. Gdy stężenie substratu obniży się na tyle, że zacznie obniżać się stężenie kompleksu ES i spada szybkość reakcji, zaczyna się trzecia, poststacjonarna (III) faza



Ryc. 3.4. Zmiany stężenia substratu [S], produktu [P], wolnego enzymu [E] i kompleksu enzym-substrat [ES] w czasie trwania jednosubstratowej reakcji enzymatycznej.

Fazy reakcji enzymatycznej: I - prestatjonarna, II - stacjonarna, III - poststacjonarna.

reakcji.

Opisany przebieg reakcji enzymatycznej sformalizowali Michaelis i Menten (stąd kinetyka M-M), a później uzupełnili Briggs i Halden. Dzięki ich badaniom było możliwe zdefiniowanie stałych kinetycznych: stałej Michaelisa (K_M) i szybkości maksymalnej (V_{max}). Pozwoliło to na wprowadzenie równania (1) opisującego zależność szybkości reakcji od stężenia substratu S . Zastosowanie definicji szybkości początkowej V_0 pozwoliło odnieść tą zależność do początkowych stężeń substratu $[S]_0$, co jest bardzo przydatne ze względu na praktykę laboratoryjną. Scalona postać równania, zwanego równaniem Michaelisa-Menten (1) ma postać:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad (1)$$

gdzie:

V_0 – szybkość początkowa reakcji [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$];

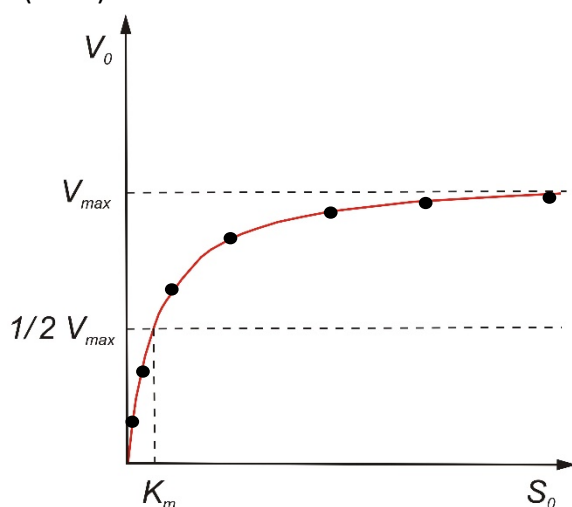
V_{max} – szybkość maksymalna reakcji [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$];

$[S]_0$ – stężenie początkowe substratu [μM];

K_M – stała Michaelisa [μM].

Wyznaczenie stałych kinetycznych enzymu wymaga zmierzenia, w fazie stacjonarnej reakcji, szybkości początkowej reakcji enzymatycznej (V_0) przy znanych wartościach początkowych stężeń substratu ($[S]_0$). Zakres stężeń $[S]_0$ musi być odpowiednio dobrany, tak aby zawierał zarówno stężenia bardzo niskie jak i wysycające zastosowaną ilość enzymu. Wyznaczanie szybkości początkowej reakcji enzymatycznej opisano w rozdziale 3.3.

Na Ryc. 3.5 przedstawiono graficzną reprezentację równania (1) określaną jako krzywa Michaelisa-Menten (M-M).



Ryc. 3.5. Krzywa Michaelisa Menten. Czarne punkty przedstawiają zmierzone wartości szybkości początkowych V_0 dla różnych początkowych stężeń $[S]_0$. Czerwona linia przedstawia hiperbolę dopasowaną do danych eksperymentalnych. Linie przerywane określają graficzną metodę odczytu stałych kinetycznych K_M i V_{max} .

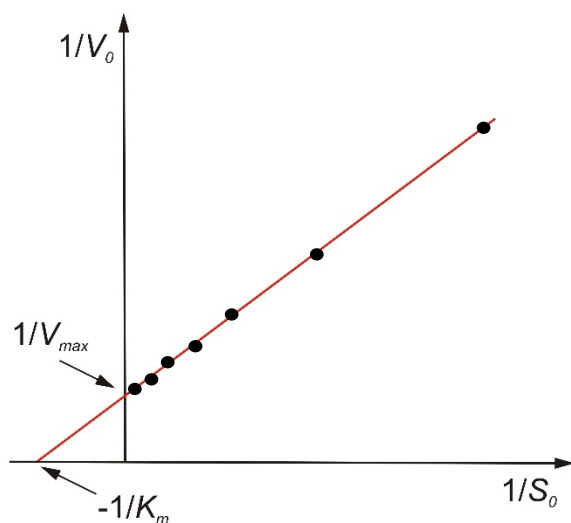
Dokładne wyznaczenie wartości K_M i V_{max} z przebiegu hiperboli jest trudne ze względu na nieliniowy przebieg krzywej – w szczególności błędne odczytanie wartości V_{max} będzie prowadzić do nieprawidłowego wyznaczenia wartości K_M . Dlatego do dokładniejszych obliczeń stosuje się przekształcenia równania Michaelisa-Menten (1) z zależności hiperbolicznej w prostoliniową. Najczęściej stosowana jest metoda Lineweavera-Burke'a (2), gdzie zastosowano odwrotność równania Michaelisa-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (2)$$

gdzie:

wyjaśnienia skrótów przy równaniu (1)

Aby uzyskać wykres Lineweavera-Burke'a (Ryc. 3.6) należy obliczyć wartości odwrotności stężeń początkowych substratu ($1/[S]_0$) oraz odwrotności szybkości początkowych ($1/V_0$). Następnie odkładamy na osi X wartości $1/[S]_0$, a na osi Y wartości $1/V_0$. Wyznaczone punkty XY pozwalają na wykreślenie prostej regresji, która w miejscu przecięcia z osią rzędnych Y wyznacza wartość $1/V_{max}$, a w miejscu przecięcia z osią odciętych X wartość $-1/K_M$ (Ryc. 3.6).



Ryc. 3.6. Wykres Lineweavera-Burke'a dla danych przedstawionych na ryc. 3.5. Czarne punkty przedstawiają wartości $1/[S]_0$ i $1/V_0$ obliczone dla wartości z ryc. 3.5. Czerwona linia przedstawia linię prostą dopasowaną do danych eksperymentalnych. Strzałki wskazują punkty przecięcia z osiami układu współrzędnych oraz ich znaczenie dla odczytania wartości stałych kinetycznych K_M i V_{max} .

Przykład nr 1

Do kuwety pomiarowej o objętości 2 ml zawierającej odpowiednią mieszaninę reakcyjną dodano enzym – dehydrogenazę mleczanową (LDH) i pozostawiono na 1 minutę preinkubacji. Następnie dodano substrat (pirogonian) i mierzono zmiany absorbancji NADH (jednego z reagentów) w czasie przy 340 nm. Pomiaru wykonano dla siedmiu stężeń pirogonianu w

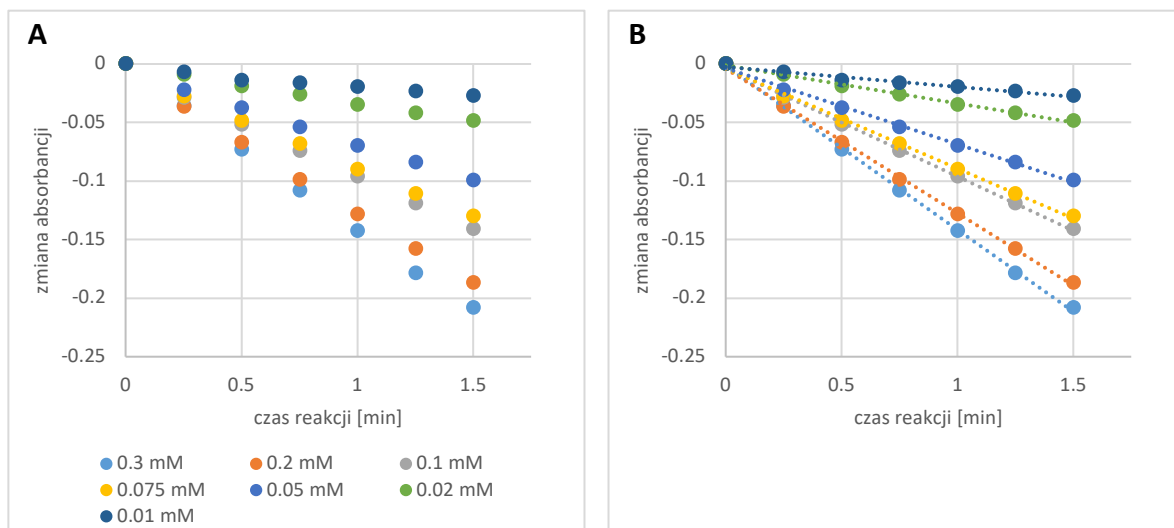
zakresie 0,01 – 0,3 mM. Wyznacz parametry K_M i V_{max} dla tego enzymu. Milimolowy współczynnik absorpcji dla NADH $\varepsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 3.1. Wystandardyzowane (do wartości 0 w $t_0 = 0 \text{ min}$) zmiany wartości absorbancji przy 340 nm w trakcie reakcji enzymatycznej dla różnych stężeń początkowych substratu

	Czas reakcji [min]						
Stężenie początkowe S_0 [mM]	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5
0,3	0	-0,036	-0,073	-0,108	-0,142	-0,178	-0,208
0,2	0	-0,037	-0,067	-0,099	-0,128	-0,158	-0,187
0,1	0	-0,029	-0,052	-0,074	-0,096	-0,119	-0,141
0,075	0	-0,028	-0,049	-0,068	-0,090	-0,111	-0,130
0,05	0	-0,022	-0,037	-0,054	-0,070	-0,084	-0,099
0,02	0	-0,009	-0,019	-0,026	-0,035	-0,042	-0,049
0,01	0	-0,007	-0,014	-0,016	-0,019	-0,023	-0,027

Rozwiązanie:

- 1) Pierwszym krokiem jest wykreślenie zmian absorbancji w zależności od czasu dla wszystkich badanych stężeń. W tabeli podano wystandardyzowane (do wartości 0 w $t_0 = 0 \text{ min}$) wartości absorbancji (można również wykreślić zarejestrowane wartości absorbancji – zmiany absorbancji będą identyczne) Na ryc. 3.7A przedstawiono dane z tabeli 3.1
- 2) Następnie wykreślamy początkowy odcinek prostoliniowy dla każdego stężenia początkowego substratu (Ryc. 3.7B). W omawianym przykładzie przez cały czas pomiaru (0-1,5 minuty) spadek absorbancji jest liniowy – możemy więc wyznaczyć szybkość początkową reakcji z zakresu czasowego 0-1,5 minuty. Jeżeli początkowy odcinek prostoliniowy jest krótszy należy to uwzględnić w obliczeniach (zobacz również rozdział 3.3)
- 3) Z początkowych odcinków prostoliniowych wyznaczamy zmianę absorbancji na minutę ($\text{abs} \times \text{min}^{-1}$), a następnie, korzystając z prawa Lamberta-Beera, wyznaczamy szybkość początkową reakcji V_0 [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$] (zobacz również przykład 2 w rozdziale 3.3). Wyniki przedstawiono w tabeli 3.2.



Ryc. 3.7. (A) Zmiany absorbancji w zależności od czasu; (B) wyznaczanie początkowych odcinków prostoliniowych.

Tabela 3.2. Zmiany absorbancji na minutę oraz szybkość początkowa dla różnych stężeń początkowych substratu		
S_0	Zmiana absorbancji	Szybkość początkowa
[mM]	[abs $\times$ min $^{-1}$]	[μ mol $\times$ min $^{-1}$]
0,300	0,141	0,045
0,200	0,127	0,041
0,100	0,096	0,031
0,075	0,089	0,029
0,050	0,068	0,022
0,020	0,034	0,011
0,010	0,019	0,006

Obliczenia dla stężenia 0,3 mM (dokładne objaśnienia w przykładzie 2 w rozdziale 3.3):

$$A = \varepsilon Cl \quad C = \frac{A}{\varepsilon l} \quad C = \frac{0,141}{6,22 \times 1} \quad C = 0,0227 \text{ [mM min}^{-1}\text{]}$$

Jeżeli 0,02 mmol znajduje się w 1 dm³

to:

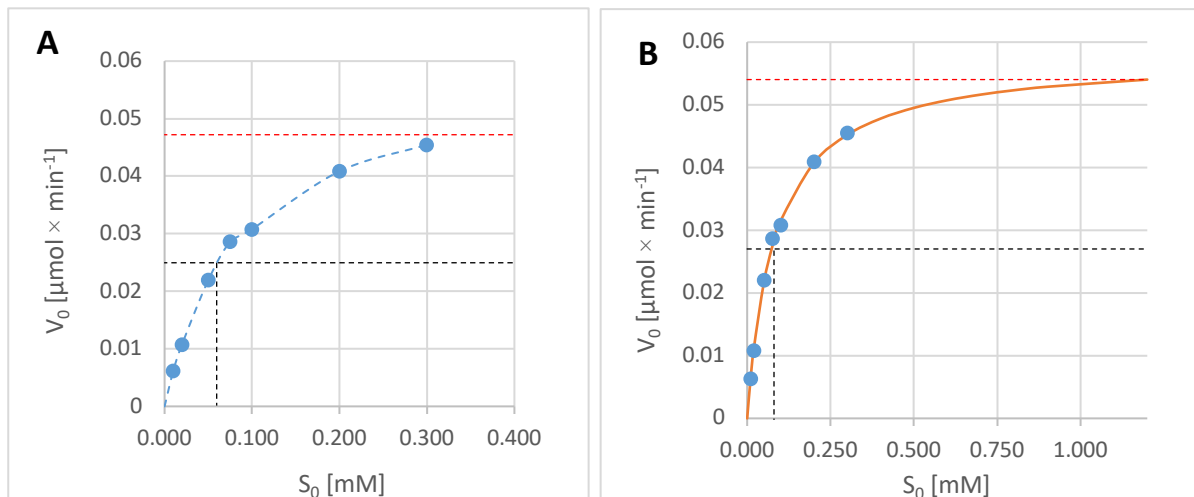
x mmol znajduje się w 0,002 dm³ (2 ml = objętość kuwety)

rozwiązując powyższą proporcję otrzymujemy wynik:

$$0,000045 \text{ [mmol} \times \text{min}^{-1}\text{]} = 0,045 \text{ [\mu mol} \times \text{min}^{-1}\text{]}$$

Obliczona wartość to szybkość początkowa reakcji V_0 dla stężenia początkowego substratu $S_0 = 0,3 \text{ mM}$. Obliczenia dla pozostałych stężeń substratu wykonujemy w analogiczny sposób.

4) Mając pełen zestaw par S_0 , V_0 możemy wykreślić krzywą Michaelisa-Menten (Ryc. 3.8).

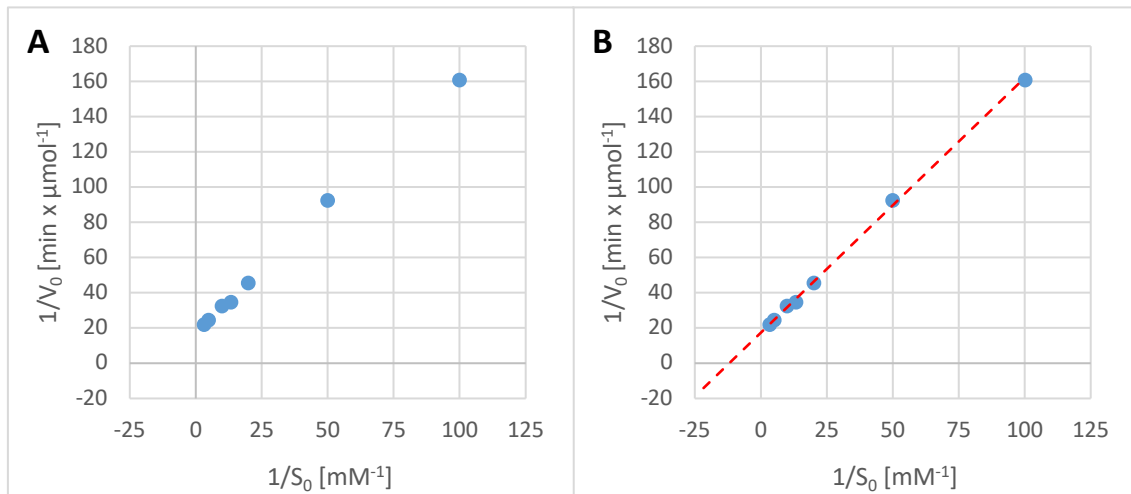


Ryc. 3.8. (A) Krzywa Michaelisa-Menten dla punktów eksperymentalnych; (B) dopasowanie krzywej hiperbolicznej (kolor pomarańczowy) do danych eksperymentalnych (niebieskie punkty). Czerwona linia przerywana wskazuje wartość $V_{\max}$; czarna linia przerywana pozioma wskazuje wartość $\frac{1}{2} V_{\max}$; czarna linia przerywana pionowa wskazuje wartość K_M .

5) Widzimy, że wartości $V_{\max}$ (a w efekcie również wartości K_M) odczytane z wykresów na rycinie 3.8A i B znacząco się różnią. Wynika to z trudności poprawnego dopasowania (bez użycia odpowiedniego oprogramowania) krzywej hiperbolicznej do punktów eksperymentalnych. Aby dokładnie wyznaczyć wartości K_M i $V_{\max}$ należy przeprowadzić linearyzację krzywej M-M np. metodą Lineweavera-Burke'a. W tym celu należy najpierw obliczyć odwrotności S_0 , V_0 (Tabela 3.3).

Tabela 3.2. Dane do wyznaczenia parametrów K_M i $V_{\max}$ metodą Lineweavera-Burke'a.			
S_0	V_0	$1/S_0$	$1/V_0$
[mM]	[$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]	[mM^{-1}]	[$\text{min} \times \mu\text{mol}^{-1}$]
0.300	0.045	3.33	22.0
0.200	0.041	5	24.5
0.100	0.031	10	32.5
0.075	0.029	13.33	35.0
0.050	0.022	20	45.5
0.020	0.011	50	92.7
0.010	0.006	100	166.7

6) Mając pełen zestaw par $1/S_0$, $1/V_0$ możemy wykonać wykres Lineweavera-Burke'a (Ryc. 3.9).



Ryc. 3.9. (A) wykres Lineweavera-Burke'a dla punktów eksperymentalnych; (B) dopasowanie linii prostej (kolor czerwony) do danych eksperymentalnych (niebieskie punkty). Punkty przecięcia z osiami X i Y umożliwiają wyznaczenie odpowiednio K_M i $V_{\max}$;

7) Punkty przecięcia z osiami X i Y umożliwiają wyznaczenie odpowiednio K_M i $V_{\max}$;

Punkt przecięcia z osią X = $-1/K_M = -11,95 \rightarrow K_M = 0,0836 \text{ mM} = 83,6 \mu\text{M}$

Punkt przecięcia z osią Y = $1/V_{\max} = 17,3 \rightarrow V_{\max} = 0,058 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$

4. Wirowanie

Wirowanie to proces wykorzystujący działanie siły odśrodkowej do rozdzielania mieszanin niejednorodnych np. ciał stałych z cieczami. W biologii, biochemii i biologii molekularnej wirowanie jest skuteczną i powszechnie stosowaną metodą do rozdzielania komórek, organelli i makrocząsteczek. Proces rozdzielenia następuje poprzez wprowadzenie mieszaniny w ruch obrotowy – cząstki poruszając się po okręgu o określonym promieniu podlegają działaniu przyspieszenia odśrodkowego, co powoduje ich osadzanie (sedymentację). Szybkość sedymentacji cząstki jest zależna od jej masy, kształtu i gęstości. Im większa masa i gęstość cząstki, tym mniejsze przyspieszenie odśrodkowe jest niezbędne do jej sedymentacji.

Proces wirowania prowadzi się w urządzeniach zwanych wirówkami, napędzanych silnikiem elektrycznym o regulowanej szybkości obrotów. W komorze wirówki znajduje się połączony z silnikiem rotor, w którym umieszcza się pojemniki (próbówki) zawierające rozdzielaną mieszaninę. Wirówki mogą być wyposażone w system chłodzenia, który jest niezbędny przy wirowaniu próbek wrażliwych na wysoką temperaturę. W laboratoriach biochemicznych najczęściej spotykanym typem rotora jest rotor stałokątowy, w którym próbówka jest umieszczona pod stałym kątem (wartości kąta mieszczą się najczęściej w zakresie 45-60°) w trakcie całego procesu wirowania. Wypełnione próbówki wirówkowe muszą być szczelnie zamknięte, mieć taką samą masę (po napełnieniu próbką) oraz należy je równomiernie rozmieścić w rotorze np. dwie próbówki o takiej samej masie umieszczamy naprzeciwko siebie.

Po zakończeniu klasycznego procesu wirowania otrzymujemy: (a) osad, zawierający cząstki, które uległy sedymentacji przy zastosowanym przyspieszeniu odśrodkowym; (b) supernatant, czyli ciecz znajdującą się nad osadem. W zależności od rodzaju próbki osad uzyskany po wirowaniu może mieć różną barwę i konsystencję – im bardziej zwarty osad, tym łatwiej oddzielić go od supernatantu (np. poprzez dekantację lub odciągnięcie supernatantu pipetą). W praktyce laboratoryjnej można spotkać dwa sposoby określania przyspieszenia odśrodkowego:

- a) liczba obrotów na minutę = RPM (ang. revolutions per minute), jest to liczba obrotów wykonywana przez rotor w ciągu minuty,
- b) względna siła odśrodkowa = RCF (ang. relative centrifugal force), jest to wielokrotność przyspieszenia ziemskiego g .

Wartości RPM i RCF nie są sobie liczbowo równe, ponieważ wraz ze wzrostem promienia rotora rośnie również przyspieszenie odśrodkowe. W opisach procedur spotykamy zazwyczaj wartości RCF, natomiast w wirówkach nastawianym parametrem jest zazwyczaj wartość RPM. Znając jedną z tych wartości oraz promień rotora możemy dokonać przeliczenia według poniższego wzoru:

$$RCF = 1,12 \times r \times \left(\frac{RPM}{1000}\right)^2$$

gdzie:

RCF – względna siła odśrodkowa [wielokrotność g];

r – promień rotora [mm];

RPM – liczba obrotów na minutę [min^{-1}].

Dwa główne zastosowania wirowania w biochemii to:

a) Oddzielanie wytrąconych makrocząsteczek

W trakcie procedur izolacji np. białek, kwasów nukleinowych, substancji drobnocząsteczkowych wykorzystuje się różnice w rozpuszczalności określonych grup związków w różnych rozpuszczalnikach. Np. dodanie acetonu powoduje wytrącenie z roztworu białek, które można osadzić za pomocą wirowania.

b) Izolacja organelli komórkowych

Podstawową metodą izolacji organelli jest wirowanie różnicowe zhomogenizowanej tkanki (zwierzęcej/roślinnej). Polega ono na stosowaniu coraz większych prędkości obrotowych wirówki, czyli zwiększaniu przyspieszenia odśrodkowego, co umożliwia kolejno osadzenie jąder, chloroplastów (komórka roślinna), mitochondriów oraz frakcji mikrosomalnej (aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne, plazmalemma, tonoplast), pozostawiając ostatecznie cytozol w supernatancie. Organella te różnią się współczynnikami sedymentacji i odpowiedni dobór szybkości obrotowych i czasów wirowania umożliwia ich separację.

Tabela 1. Warunki optymalne do uzyskania określonych organelli metodą wirowania różnicowego

	Przyspieszenie odśrodkowe [wielokrotność <i>g</i>]	Czas wirowania [min]
Jądra*	600	5
Chloroplasty	2 000	10
Mitochondria	10 000	20
Frakcja mikrosomalna	50 000	30

* w przypadku komórek roślinnych, w szczególności izolowanych z liści, w celu uzyskania jąder komórkowych homogenat należy wirować przy przyspieszeniu 200 *g* przez 2 min, aby uniknąć zanieczyszczenia frakcją chloroplastową.

Metoda ta jednak nie pozwala na uzyskanie bardzo czystej frakcji określonego organellum. Cząstki biologiczne mogą tworzyć agregaty (złożone z jednakowych cząstek lub ich mieszanin) posiadające inne parametry fizyczne, wpływające na współczynnik sedymentacji. W efekcie agregaty cząstek znajdują się w innej frakcji niż same cząstki (gdyby nie utworzyły agregatów), co powoduje zanieczyszczenie frakcji. Aby temu zapobiec, należy tak zoptymalizować proces izolacji, aby zminimalizować procesy agregacji (np.: filtrowanie, dodatek niewielkiej ilości delikatnych detergentów). Do uzyskania czystych preparatów organelli frakcje uzyskane metodą wirowania różnicowego należy poddać procedurze oczyszczania (patrz poniżej), której wybór zależy głównie od rodzaju izolowanego organellum, a także od celu, w którym zostanie ono wykorzystane.

Bardziej skomplikowane metody wirowania obejmują ultrawirowanie (wirowanie przy względnej sile odśrodkowej >50 000 *g*) w gradiencie gęstości, zwane także wirowaniem zonalnym (strefowym). Gradient może być uformowany z roztworów cukrów (najczęściej sacharozy), polimerów (Percoll, Ficoll, glikol polietylenowy) lub soli (chlorek cezu) o różnej gęstości. Odpowiedni dobór parametrów wirowania w gradiencie gęstości umożliwia nie tylko otrzymanie organelli o wysokiej czystości, ale również rozdzielenie białek czy kwasów nukleinowych, a nawet ustalenie ich masy molekularnej.

5. Izolacja białek

Izolację białek rozpoczyna się od tzw. lizy komórek, czyli otwarcia komórek, z których planuje się oczyścić pożądane białko. W przypadku komórek bakteryjnych często stosuje się sonikację (rozbijanie komórek ultradźwiękami), a następnie odwirowuje się resztki (duże fragmenty komórek lub niezniszczone komórki), otrzymując klarowny lizat bakteryjny, zawierający wszystkie rozpuszczalne białka z komórek bakterii. Inna, łagodna metoda otrzymywania białek z komórek bakteryjnych wykorzystuje trawienie otoczki bakteryjnej lizozymem i dalej lizę komórek przy pomocy szoku osmotycznego (w buforze hipotonicznym).

Teoretycznie, wysokowydajne systemy bakteryjne pozwalają uzyskać ekspresję rekombinowanego białka na poziomie nawet 50% wszystkich białek komórkowych. W praktyce jednak, poziom syntezy zależy od cech biologicznych i fizykochemicznych białka, np. niektóre białka mogą być toksyczne dla bakterii, hamując wzrost hodowli.

Osobnym problemem jest rozpuszczalność białka. W wielu przypadkach produkowane białko ulega akumulacji w formie nierozpuszczalnej, w postaci agregatów nazywanych ciałami inkluzyjnymi. Takie "wytrącone" białko, po otwarciu bakterii w łagodnych (natywnych) warunkach pozostanie we frakcji nierozpuszczalnej. Zarówno poziom ekspresji, jak i rozpuszczalność produkowanego białka można modyfikować zmieniając wektor, szczep bakteryjny lub warunki hodowli.

Nawet jeśli są formowane ciała inkluzyjne, to zwykle część białka pozostaje w formie rozpuszczalnej. Dobierając odpowiednio warunki hodowli można próbować zmieniać proporcje frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej białka. Ogólna zasada jest taka, że wraz ze spadkiem szybkości syntezy rekombinowanego białka zwiększa się udział jego formy rozpuszczalnej w ogólnej puli. Szybkość syntezy można zmniejszyć m.in. poprzez: obniżenie temperatury hodowli lub hodowlę na podłożu minimalnym w przeciwieństwie do standardowo używanego podłoża pełnego. Zwiększenie napowietrzania hodowli bakteryjnej w czasie indukcji ekspresji może także zapobiegać tworzeniu ciał inkluzyjnych.

W sytuacji, kiedy produkowane białko, po otwarciu komórek w warunkach natywnych, nadal pozostaje we frakcji nierozpuszczalnej, można zastosować procedurę jego izolacji w warunkach denaturujących. Najczęściej stosuje się w tym celu roztwory do lizy, zawierające 2-8 M mocznik lub 3-6 M chlorowodorek guanidyny. Jednak, z założenia, przy zastosowaniu czynników denaturujących, otrzymuje się białko pozbawione swej natywnej struktury przestrzennej. Aby przywrócić aktywność biologiczną można próbować renaturować białko *in vitro*, ale wydajność renaturacji zależy od indywidualnych cech białka i może być bardzo niska. Z tego powodu ekstrakcję w warunkach denaturujących stosuje się zwykle do pozyskiwania białek do takich celów, które nie wymagają zachowania struktury przestrzennej, np. przy izolacji antygenów używanych następnie do otrzymania przeciwciał, zaś unika się jej w przypadku, np. białek enzymatycznych. Z drugiej strony, formowanie ciał inkluzyjnych może nawet ułatwiać izolację, ponieważ zagregowane białko: a) występuje w wysokim stężeniu i łatwo można je oczyścić, b) jest chronione przed ewentualną proteolizą

oraz c) występując w formie nieaktywnej, nawet jeśli jest potencjalnie toksyczne, nie hamuje wzrostu bakterii.

Obecność białka we frakcji nierozpuszczalnej nie zawsze oznacza, że tworzone są ciała inkluzyjne. Hydrofobowe białka mogą wiązać się silnie z błonami bakteryjnymi, a białka obdarzone silnym ładunkiem elektrycznym – z kwasami nukleinowymi. Zwiększenie rozpuszczalności można wówczas osiągnąć przez dodanie do buforu lizującego detergentów niejonowych, np. Triton X-100 (w pierwszym przypadku) lub przez trawienie kwasów nukleinowych nukleazami, np. DNazą I i RNazą A (w drugim przypadku).

Po otrzymaniu lizatu zwykle oczyszcza się białko metodami chromatografii kolumnowej, które zostały szerzej opisane w rozdziale 11.

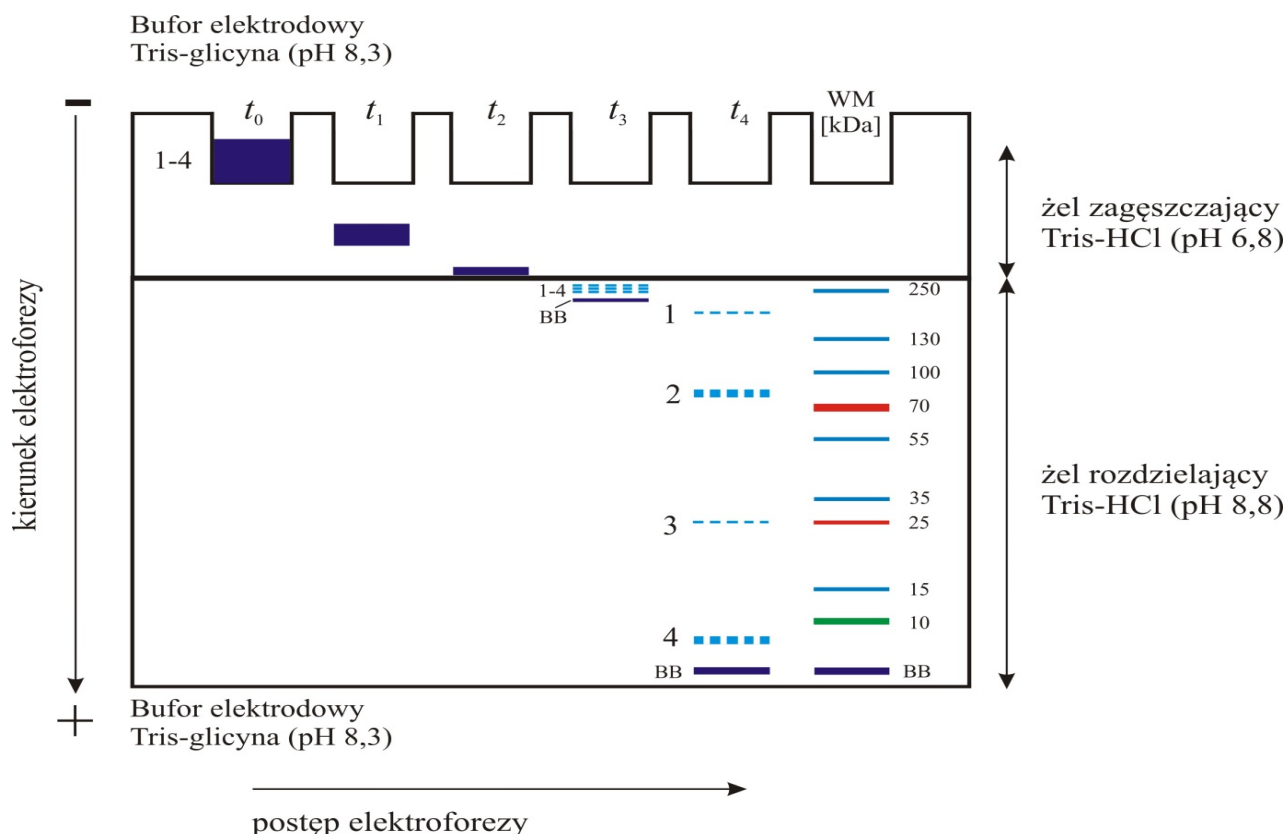
6. Elektroforeza białek

Cząstka obdarzona wypadkowym ładunkiem elektrycznym porusza się w polu elektrycznym. Zjawisko to, zwane elektroforezą, jest powszechnie wykorzystywane m.in. do rozdzielania białek i innych makrocząsteczek, takich jak DNA i RNA.

Białka w roztworze wodnym, w pH różnym od ich punktu izoelektrycznego (pI), są cząsteczkami wykazującymi ładunek wypadkowy różny od zera, czyli są jonami o przewodze jednego z ładunków (w pH powyżej pI są anionami, w pH poniżej pI są kationami). Na kierunek migracji ma wpływ znak jonu, zaś na tempo migracji: wielkość ładunku oraz wielkość i kształt cząstki. W celu rozdzielania między sobą dość podobnych cząstek, np. białek lub kwasów nukleinowych, uwypukla się różnice w ich wielkości i/lub kształcie poprzez zastosowanie na ich drodze usieciowania - żelu, utrudniającego migrację. Do rozdzielania białek najczęściej stosuje się żel poliakrylamidowy otrzymywany w reakcji polimeryzacji monomerów akrylamidu i *N,N'*-metylenobisakrylamidu.

Najczęściej stosowana metoda elektroforezy białek to elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), w której cząsteczki białka poddaje się całkowitej denaturacji i tworzy się ich kompleksy zujemnie naładowanym związkiem. W efekcie, wszystkie one będą liniowymi anionami, zaś stosunek wielkości ładunku do wielkości cząstek dla nich wszystkich będzie stały, a tempo migracji będzie zależeć jedynie od ich wielkości (białka najmniejsze migrują najszybciej, zaś białka największe najwolniej).

W elektroforezie SDS-PAGE, standardowy żel składa się z dwóch części: żelu rozdzielającego, dla którego można dobrać stężenie w zakresie od 8 do 20% (do rozdzielania większych białek stosuje się niskoprocentowe żele, do rozdzielania mniejszych białek, wysokoprocentowe żele; stężenie procentowe liczone jest w stosunku do monomeru akrylamidu) oraz żelu zagęszczającego o stężeniu 4%, w którym znajdować się będą kieszonki na próbki. W celu otrzymania jak najlepszego rozdzielania białek (rozdzielenia jak największej liczby białek w postaci ostrych prążków), oprócz dobrania odpowiedniego usieciowania, czyli stężenia akrylamidu, należy doprowadzić do sytuacji, w której wszystkie białka w momencie rozpoczęcia rozdzielania będą zagęszczone w jednym miejscu - na początku żelu rozdzielającego (wszystkie białka rozproszone w całej naniesionej do kieszonki objętości, rozpoczną właściwą migrację w tym samym czasie z tego samego punktu). Efekt ten uzyskuje się poprzez zróżnicowanie wartości pH żelu zagęszczającego i rozdzielającego. Zastosowanie żelu zagęszczającego o odpowiednim składzie pozwala na zwiększenie objętości próbki nanoszonego do kieszonki (studzienki) białka i jej zagęszczenie bez utraty rozdzielczości (Ryc. 6.1).



Rycina 6.1. Schemat przebiegu elektroforezy białek. Poszczególne etapy rozdzielania oznaczone są jako $t_0 \dots t_4$. Rozdzielane białka są na ogół bezbarwne. Zagęszczenie próbki w pierwszym etapie elektroforezy ($t_0 \dots t_2$) widać po zachowaniu się całego zabarwionego błękitem bromofenolowym roztworu. Etapy t_3 (początek rozdzielania się białek) i t_4 (zakończony rozdział białek) są niewidoczne w trakcie elektroforezy (na schemacie zaznaczone linią przerywaną), ale etap t_4 można zaobserwować po wybarwieniu białek np. błękitem brylantowym Coomassie R-250 po zakończeniu elektroforezy. WM – mieszanina białek wzorcowych o znanej masie cząsteczkowej wyrażonej w jednostkach kDa (tysiące daltonów). Często stosuje się jako wzorce białka przebarwione, których różne zabarwienie ułatwia ich identyfikację w żelu. Masy cząsteczkowe białek 1, 2 i 3 można ustalić na podstawie zależności opisanej w tekście, przy czym masę białka 3 można ustalić także poprzez jego bezpośrednie porównanie z masą wzorca migrującego w tym samym tempie (będącego dokładnie na tej samej wysokości w żelu - tutaj 25 kDa). Masy cząsteczkowe białka 4 nie można ustalić z dużą dokładnością, bowiem znajduje się poza zakresem mas użytych wzorców (wiadomo jedynie, iż jest mniejsza niż 10 kDa). Grubość prążka 2 wskazuje na większą ilość tego białka niż białek 1 i 3. Grubość prążka 4 może wskazywać na większą ilość tego białka niż białek 1 i 3, ale może także wynikać ze zjawiska dyfuzji. Dyfuzja, działając na wszystkie rozdzielane białka, odpowiada za utratę ostrości rozdzielania. W największym stopniu rzutuje to na rozdział najmniejszych białek w danej mieszaninie, gdyż usieciowanie żelu przeciwdziała dyfuzji większych białek. Aby osiągnąć ostry rozdział mniejszych białek, należy użyć żelu o gęstszym usieciowaniu, ale wtedy rozdział większych białek z danej próbki, może w ogóle nie być możliwy. BB - błękit bromofenolowy, barwnik używany do monitorowania postępu elektroforezy.

Białka, które mają być poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu, przed naniesieniem na żel należy zdenaturować (zniszczyć struktury wyższego rzędu białka) poprzez dodanie do

mieszaniny białek odpowiedniego roztworu denaturującego i ogrzanie przez 3-5 min w 100°C. W skład roztworu denaturującego (poza wodą dejonizowaną) wchodzi: (i) dodecylsulfan sodu (SDS; silny detergent anionowy, który denaturuje białka, oplatując je i nadając im ujemny ładunek wypadkowy); (ii) 2-merkaptoetanol (związek tiolowy zrywający mostki dwusiarczkowe w cząsteczkach białek); (iii) związek buforujący (zapewniający odpowiednie pH roztworu); (iv) glicerol (gęsta ciecz obciążająca próbkę, która opada na dno kieszonki/studzienki); (v) błękit bromofenolowy (barwny związek drobnocząsteczkowy służący do monitorowania postępu elektroforezy).

Po rozdziale, białka w żelu można uwidocznić stosując barwniki, które tworzą barwne kompleksy z białkami. Jednym z najczęściej stosowanych barwników jest błękit brylantowy Coomassie R-250, który z białkami tworzy dość trwałe kompleksy o niebieskiej barwie.

Masę cząsteczkową białek oceniamy porównując migrację badanych białek z migracją wzorców mas cząsteczkowych (mieszaniny białek o znanych masach) rozdzielonych na tym samym żelu, korzystając z zależności prostoliniowej malejącej między logarytmem dziesiętnym z masy cząsteczkowej białka a długością jego drogi w żelu (mniejsze białka migrują szybciej). Zwyczajowo masę cząsteczkową białek podajemy w kDa (tysiącach daltonów), gdzie 1 dalton (Da) równy jest 1 u (ujednoliconej jednostce masy atomowej) stosowanej powszechnie w chemii.

Poniżej znajdują się adresy przykładowych filmów (w języku angielskim) w serwisie YouTube, które dotyczą elektroforezy SDS-PAGE:

<https://www.youtube.com/watch?v=3CrzY7jb9fQ>

https://www.youtube.com/watch?v=IWZN_G_pC8U

https://www.youtube.com/watch?v=-H8GU_90Gak

7. Oczyszczanie kwasów nukleinowych

W wielu metodach stosowanych do oczyszczania kwasów nukleinowych wykorzystuje się ich szczególne właściwości: długość cząsteczki i duży ładunek ujemny. Niezależnie od metody stosowanej do oczyszczania kwasów nukleinowych, należy zachować ostrożność, by nie uszkodzić mechanicznie cząsteczek.

W komórkach liczne białka oddziałują z kwasami nukleinowymi, dlatego kluczowym etapem w trakcie oczyszczania kwasów nukleinowych jest skuteczne usunięcie białek. Oczyszczanie kwasów nukleinowych (przede wszystkim DNA) można podzielić na następujące etapy:

1) *homogenizacja materiału biologicznego*: powinna być możliwie łagodna, ponieważ fragmentacja kwasów nukleinowych skutkuje obniżeniem wydajności ich wytrącania, które często jest jednym z ostatnich etapów procedury. Z tego powodu stosuje się m.in. roztwory zawierające detergenty, dzięki którym doprowadza się do łagodnej lizy komórek i upłynnienia otoczki jądrowej (w komórkach eukariotycznych). Otrzymany w ten sposób ekstrakt komórkowy zawiera kwasy nukleinowe w kompleksie z białkami.

2) *usunięcie białek*: można przeprowadzić stosując rozpuszczalniki organiczne, najczęściej mieszaninę fenolu i chloroformu. Pod wpływem rozpuszczalników organicznych białka ulegają denaturacji i wytrąceniu. Można je skutecznie usunąć przeprowadzając wirowanie, w wyniku którego wytrącone białka lokalizują się na granicy fazy organicznej i wodnej tworząc tzw. interfazę, zaś kwasy nukleinowe pozostają rozpuszczone w roztworze wodnym. Inną strategią wykorzystywaną do usunięcia białek jest ich enzymatyczna degradacja. Często stosuje się proteinazę K, która charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową. Jeśli jest potrzebny bardzo czysty preparat kwasów nukleinowych, można również połączyć obie strategie: enzymatyczną degradację białek oraz denaturację białek pod wpływem rozpuszczalników organicznych.

3) *wytrącenie kwasów nukleinowych*: jest stosowane nie tylko w celu usunięcia związków drobnocząsteczkowych, które nie zostały usunięte na wcześniejszych etapach procedury oczyszczania kwasów nukleinowych, ale również do zwiększenia ich stężenia w ostatecznym preparacie. Warto zwrócić uwagę, że w trakcie wieloetapowej procedury objętość preparatu rośnie. Wytrącenie, a następnie rozpuszczenie osadu zawierającego kwasy nukleinowe w określonej (często małej) objętości wody lub roztworu wodnego, pozwala otrzymać roztwór kwasów nukleinowych o wysokim stężeniu.

Obecnie często wykorzystuje się zestawy do oczyszczania kwasów nukleinowych z różnych rodzajów materiału biologicznego oferowane przez firmy biotechnologiczne. W takich zestawach zwykle znajduje się złożo chromatograficzne, które (i) jest anionitem i wiąże DNA (elucję ze złoża przeprowadza się roztworem o dużej sile jonowej) lub (ii) składa się z krzemionki, na powierzchni której adsorbuje się DNA (w tym przypadku elucję przeprowadza się wodą). Warto jednak zwrócić uwagę, że użytkownik takich zestawów nie ma pełnej wiedzy o składzie poszczególnych roztworów oraz wypełniaczach kolumn dostarczanych przez producenta. Nie zawsze można więc wywnioskować, w jaki sposób otrzymuje się dobrej jakości preparat kwasu nukleinowego.

8. Powielanie DNA metodą PCR

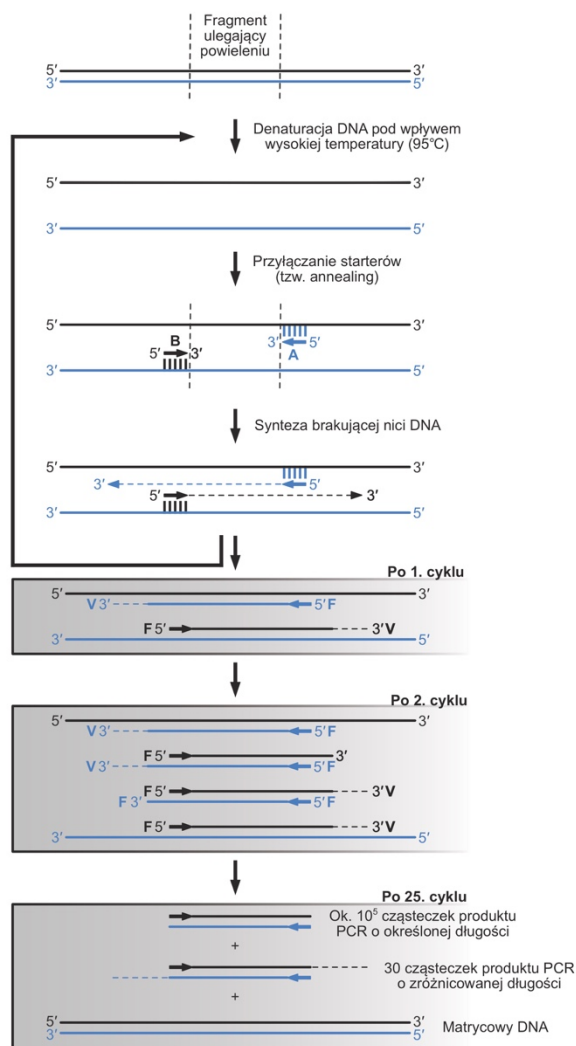
Dzięki PCR możliwe jest powielenie wybranego obszaru długich cząsteczek DNA. Atutem PCR jest niezwykła czułość. Teoretycznie wystarczy jedna cząsteczka DNA, by w procesie przypominającym replikację DNA uzyskać dużą ilość wybranego fragmentu DNA wystarczającą do rozmaitych analiz. Z tego powodu technika PCR jest szeroko wykorzystywana w kryminalistyce do powielenia DNA ze śladowych ilości materiału biologicznego pozostawionego w miejscu zbrodni.

Do przeprowadzenia reakcji niezbędne są następujące odczynniki i materiały:

- Matrycowy DNA
- Mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleozydów (A, T, C i G)
- Para starterów (jednoniciowych DNA o długości ok. 20 nukleotydów)
- Bufor zapewniający optymalne warunki dla polimerazy DNA
- Polimeraza DNA

Metoda PCR (Ryc. 8.1.) polega na wielokrotnym powtarzaniu trzech etapów reakcji: (1) denaturacji matrycowego DNA pod wpływem wysokiej temperatury (95 °C), (2) hybrydizacji starterów (temperatura zależy od sekwencji nukleotydowej starterów, zwykle w zakresie 40-65 °C) i (3) syntezy brakującej nici DNA przez polimerazę (temperatura zależy od rodzaju polimerazy DNA, zwykle 68 °C lub 72 °C).

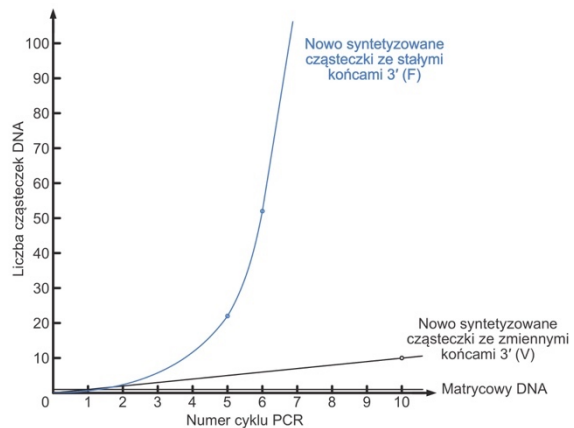
Niezwykle ważną rolę w PCR pełnią startery, ponieważ ich sekwencja decyduje o obszarze matrycowego DNA ulegającego powieleniu. Parę starterów projektuje się w taki sposób, by każdy z nich był komplementarny do przeciwległej nici matrycowego DNA. Zapewnia to syntezę brakujących nici DNA przez polimerazę DNA włączającą odpowiedni trifosforan deoksyrybonukleozydu. W rezultacie, po pierwszym cyklu PCR z jednej



Ryc. 8.1. Przebieg PCR. Startery oznaczono literami A i B. Każdy z nich hybryduje z komplementarną sekwencją nukleotydową, która znajduje się na przeciwległych niciach DNA. Zapewnia to syntezę cząsteczek DNA (produktu PCR), których końce odpowiadają sekwencji nukleotydowej obu starterów (po 25. cyklu). Literami F i V oznaczono końce cząsteczki DNA, których sekwencja nukleotydowa jest, odpowiednio, stała (odpowiadająca sekwencji startera) i zmienna (zależna od przypadkowego miejsca zakończenia syntezy DNA). Warto zwrócić uwagę, że końce 5' są zawsze określone przez sekwencję nukleotydową startera. Dzieje się tak ze względu na to, że polimeraza DNA przeprowadza syntezę DNA wyłącznie w kierunku 5' → 3'. Koniec 3' może mieć określoną sekwencję nukleotydową (komplementarną do sekwencji jednego ze starterów), jeśli matrycą do syntezy będzie DNA ograniczony od strony 5' sekwencją startera.

podwójnej nici DNA powstają dwie podwójne nici DNA. Synteza DNA katalizowana przez polimerazę DNA zawsze zachodzi w kierunku $5' \rightarrow 3'$, co powoduje, że dwie cząsteczki DNA powstające po pierwszym cyklu PCR nie są identyczne (por. Ryc. 8.1.). Powtórzenie wyżej wymienionych trzech etapów 25 razy skutkuje jednak syntezą ponad 10^7 cząsteczek dwuniciowego DNA (z jednej cząsteczki matrycowego DNA) (Ryc. 8.2.), których końce określa położenie sekwencji hybrydującej z parą starterów użytych podczas PCR.

Od drugiego cyklu PCR rolę matrycy spełniają także cząsteczki będące produktem poprzedniego cyklu. Warto zwrócić uwagę, że każdy cykl rozpoczyna się denaturacją matrycowego DNA w temperaturze 95°C . Z tego powodu polimeraza DNA stosowana w PCR pochodzi z organizmów termofilnych. Powszechnie wykorzystywana jest polimeraza *Taq* (z bakterii *Thermus aquaticus* – temperatura syntezy 72°C) oraz polimeraza *Pfu* (z archeona *Pyrococcus furiosus* – temperatura syntezy 68°C).



Ryc. 8.2. Zmiana liczby cząsteczek DNA w trakcie PCR. W wielu źródłach można spotkać opis, według którego po n cyklach PCR liczba produktu PCR wzrasta o 2^n . Warto zwrócić uwagę, że matrycowy DNA pozostaje obecny w mieszaninie reakcyjnej przez cały czas trwania PCR i w każdym cyklu powstaje taka sama liczba produktów o zmiennych końcach $3'$ (V). Po 25 cyklach PCR liczba nowo syntetyzowanych cząsteczek ze stałymi końcami $3'$ (F) jest jednak na tyle duża, że liczba produktów o zmiennych końcach $3'$ (V) oraz obecność matrycowego DNA staje się zaniedbywalna.

9. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Cząsteczki DNA zwykle poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym. Najczęściej stosuje się stężenia agarozy wahające się między 0,8% a 2,0% w buforze TAE (w/v) zapewniającym przepływ prądu przez żel, stałą wartość pH, a także minimalizującym aktywność nukleaz (dzięki obecności EDTA kompleksującego dwuwartościowe kationy będące kofaktorami tych enzymów). Stężenie żelu zależy od wielkości cząsteczek DNA poddawanych rozdzielaniu. Cząsteczki DNA mniejsze niż 50 pz można rozdzielać również w żelu poliakryloamidowym. Niezależnie od rodzaju żelu, z uwagi na ładunek ujemny cząsteczek DNA, ich migracja przebiega od elektrody ze znakiem ujemnym w kierunku elektrody ze znakiem dodatnim.

Śledzenie postępów elektroforezy umożliwiają barwniki naładowane ujemnie, które dodaje się do preparatów DNA przed rozpoczęciem elektroforezy. Do najczęściej stosowanych barwników należą: oranż G i błękit bromofenolowy migrujące jak cząsteczki DNA o wielkości, odpowiednio, 50 pz i 500 pz.

Niezależnie od rodzaju żelu użytego do rozdzielania DNA, jego uwidocznienie w żelu wymaga zastosowania barwników wnikających do przestrzeni między poszczególnymi parami zasad w dwuniciowej cząsteczce DNA. Najczęściej stosuje się w tym celu bromek etydydy, który wzbudzony promieniowaniem UV w kompleksie z cząsteczką DNA emituje światło o długości

fali 590 nm (kolor pomarańczowo-ceglany). Ze względu na właściwości interkalujące, bromek etydyny jest zaliczany do niebezpiecznych dla zdrowia mutagenów. Długotrwała ekspozycja na promieniowanie UV również nie jest wskazana. Podczas obserwacji wyników elektroforezy DNA należy więc zachować szczególną ostrożność zakładając rękawiczki oraz stosując odpowiednie osłony wykonane ze szkła akrylowego. W ostatnich latach coraz częściej stosuje się barwniki mniej szkodliwe niż bromek etydyny, np. SYBR Green, który wzbudzany jest niebieskim światłem i w kompleksie z DNA emituje światło w kolorze zielonym.

10. Spektrofotometryczna ocena ilości i jakości kwasów nukleinowych

Zasady azotowe, wchodzące w skład nukleotydów, wykazują charakterystyczny szczyt absorpcji promieniowania UV przy długości fali ok. 260 nm. Cecha ta często wykorzystywana jest do stwierdzenia obecności kwasów nukleinowych (a także wolnych zasad azotowych, nukleozydów lub nukleotydów) w preparatach pochodzenia biologicznego. Z uwagi na to, że aminokwasy aromatyczne wchodzące w skład białek wykazują szczyt absorpcji przy długości fali 280 nm, ustalając stosunek A_{260}/A_{280} można ocenić jakość preparatu kwasów nukleinowych (stopień zawartości białek w preparacie).

Stosunek współczynnika absorpcji $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ dla kwasów nukleinowych wynosi ok. 2,0 (tzn. światło o długości fali 260 nm jest dwa razy wydajniej pochłaniane niż światło o długości fali 280 nm). W praktyce, wolny od zanieczyszczeń dwuniciowy DNA ma wartość współczynnika A_{260}/A_{280} równą 1,8, czysty RNA około 2,0, natomiast ten sam stosunek dla białek wynosi ok. 0,57. Im większa zawartość białek w preparacie, tym wartość A_{260}/A_{280} maleje, aż w roztworze białek całkowicie pozbawionym kwasów nukleinowych stosunek ten powinien wynieść ok. 0,57.

Innym parametrem stosowanym do oceny jakości preparatu kwasów nukleinowych jest stosunek A_{260}/A_{230} . Na przykład, EDTA, fenol i chlorowodorek guanidyny wykazują stosunkowo dużą zdolność do absorpcji światła o długości ok. 230 nm, dlatego ustalenie stosunku A_{260}/A_{230} może być przydatne w ocenie czystości preparatów kwasów nukleinowych. Jeśli znajdują się znaczne ilości wyżej wymienionych związków, wartość ta będzie mniejsza. Zanieczyszczony preparat DNA może nie nadawać się do dalszych reakcji enzymatycznych.

Oznaczenie obu parametrów jest szczególnie ważne, jeśli w trakcie oczyszczania kwasów nukleinowych został użyty fenol. Fenol i jego związki mogą wpływać na obniżenie zarówno A_{260}/A_{280} jak i A_{260}/A_{230} . Wykorzystując metody spektrofotometryczne można przekonać się, czy udało się skutecznie usunąć te związki i otrzymać dobrej jakości preparat kwasów nukleinowych.

Wiadomo, że $A_{260} = 1$ obserwuje się dla roztworów: dwuniciowego DNA o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$, jednoniciowego DNA o stężeniu 33 $\mu\text{g/ml}$ i RNA o stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$. Dzięki temu, stosunkowo łatwo można obliczyć stężenie kwasów nukleinowych w danej próbce jedynie na

podstawie odczytanej wartości absorbancji. Należy jednak pamiętać, że stężenie molowe zależy od liczby zasad azotowych wchodzących w skład jednej cząsteczki kwasu nukleinowego. Przy takim samym stężeniu wagowym roztwór zawierający krótkie cząsteczki kwasu nukleinowego (np. plazmidowy DNA) będzie miał wyższe stężenie molowe niż roztwór zawierający bardzo długie cząsteczki (np. DNA z chromosomów eukariotycznych).

Absorbancja roztworów kwasów nukleinowych nie jest jednak prostą sumą absorbancji zasad azotowych wchodzących w ich skład. Molowa absorpcja kwasów nukleinowych jest mniejsza o ok. 40% w porównaniu do teoretycznej absorbancji obliczonej na podstawie składu nukleotydowego kwasów nukleinowych. Przyczyna tego zjawiska leży w oddziaływaniach jakie nawiązują zasady azotowe w uporządkowanej strukturze kwasów nukleinowych. Liczne wiązania wodorowe między komplementarnymi zasadami azotowymi, a także siły van der Waalsa między ugrupowaniami hydrofobowymi powodują, że skomplementowane zasady azotowe mają mniejszą zdolność do absorpcji światła. Zjawisko to nazywa się efektem hipochromowym.

Denaturacja termiczna kwasów nukleinowych, hydroliza lub utrata regularnej struktury sprawia, że zdolność do absorpcji światła o długości fali 260 nm tej samej liczby zasad azotowych obecnych w roztworze wzrasta. Zjawisko to określa się mianem efektu hiperchromowego i wykorzystuje się m.in. do rozróżnienia dwuniciowego i jednoniciowego DNA.

11. Techniki chromatograficzne

Chromatografia to technika analityczna (lub preparatywna) służąca do rozdzielania mieszanin związków chemicznych na poszczególne składniki lub ich grupy wykorzystując ich właściwości fizyko-chemiczne. Ze względu na rodzaj wykorzystywanych oddziaływań wyróżniamy m.in. następujące typy chromatografii:

- chromatografia jonowymienna (oddziaływania jonowe)
- chromatografia adsorpcyjna (zjawisko adsorpcji)
- chromatografia oddziaływań hydrofobowych (oddziaływania hydrofobowe)
- chromatografia powinowactwa (powinowactwo do specyficznego ligandu)
- chromatografia sączenia molekularnego (wielkość cząsteczki)
- chromatografia podziałowa (różnice w współczynnikach podziału pomiędzy dwiema fazami: ciecz-ciecz lub ciecz-gaz)

W każdym typie chromatografii możemy wyróżnić nieruchomą fazę stacjonarną oraz fazę ruchomą (inaczej faza mobilna, roztwór rozwijający lub eluent), która porusza się względem fazy stacjonarnej w określonym kierunku. Proces chromatografii rozpoczyna się od nałożenia badanej mieszaniny na fazę stacjonarną, na której następuje wiązanie związków chemicznych (typ oddziaływań związków chemiczny <-> faza stacjonarna zależy od typu chromatografii). Następnie przez fazę stacjonarną zostaje przepuszczona faza ruchoma, co powoduje wymywanie związków chemicznych z fazy stacjonarnej. Intensywność tego procesu jest różna

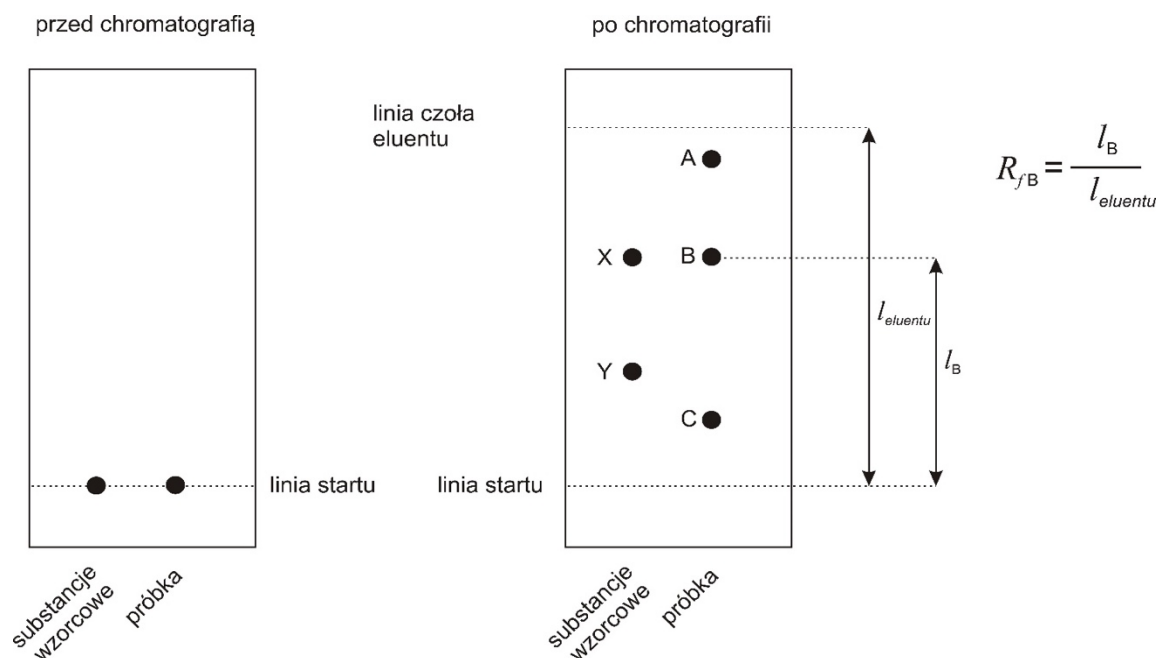
dla poszczególnych składników mieszaniny. Składniki silniej oddziałujące z fazą stacjonarną są wymywane wolniej, a te słabiej – szybciej, dzięki czemu może nastąpić ich separacja. Manipulując składem fazy ruchomej można kierować procesem chromatografii, np. w chromatografii jonowymiennej zmiana pH fazy ruchomej spowoduje utworzenie/zerwanie wiązań jonowych pomiędzy rozdzielanymi substancjami a fazą stacjonarną.

Ze względu na sposób uformowania fazy stacjonarnej wyróżniamy dwie główne techniki chromatograficzne:

1) Technika cienkowarstwowa (TLC, ang. thin layer chromatography)

W chromatografii cienkowarstwowej faza stacjonarna stanowi cienką warstwę naniesioną na sztywną płytkę (szklaną, plastikową lub metalową). Badana próbka jest наносzona w pobliżu dolnej krawędzi płytki chromatograficznej, a następnie płytka jest umieszczana w komorze chromatograficznej, tak aby poziom fazy ruchomej (inaczej eluentu) w komorze był poniżej linii startu (Rycina 10.1). Ruch fazy ruchomej odbywa się z dołu ku górze za pomocą sił kapilarnych i powoduje przemieszczanie się rozdzielanych związków w tym samym kierunku.

Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego dla każdego z rozdzielonych związków na chromatogramie (zarejestrowany efekt procesu chromatograficznego) możemy wyznaczyć współczynnik opóźnienia (przesunięcia) R_f (ang. retardation factor). Jest to stosunek odległości przebytej przez dany związek (l) do odległości przebytej przez czoło eluentu (l_{eluentu}) (Rycina 10.1). Wartości R_f mogą przyjmować wartości $0 \leq R_f < 1$; wynika to z faktu, że



Rycina 11.1. Schematyczne przedstawienie techniki chromatografii cienkowarstwowej oraz definicja współczynnika R_f . Szczegóły w tekście.

rozdzielane substancje mogą się poruszać tylko w kierunku przepływu eluentu i nie mogą się przemieszczać szybciej niż eluent.

Wartość R_f jest charakterystyczna dla konkretnego związku (przy zachowaniu identycznych warunków procesu chromatograficznego) i może być podstawą do jego wstępnej identyfikacji. Metodą o większej wiarygodności jest rozdzielenie na tej samej płytce próbki zawierającej identyfikowany związek oraz jego wzorzec. Poprzez porównane współczynników R_f wzorca i próbki możemy potwierdzić identyfikację danego związku (np. na Rycinie 11.1 związek B z próbki jest tożsamy z substancją wzorcową X).

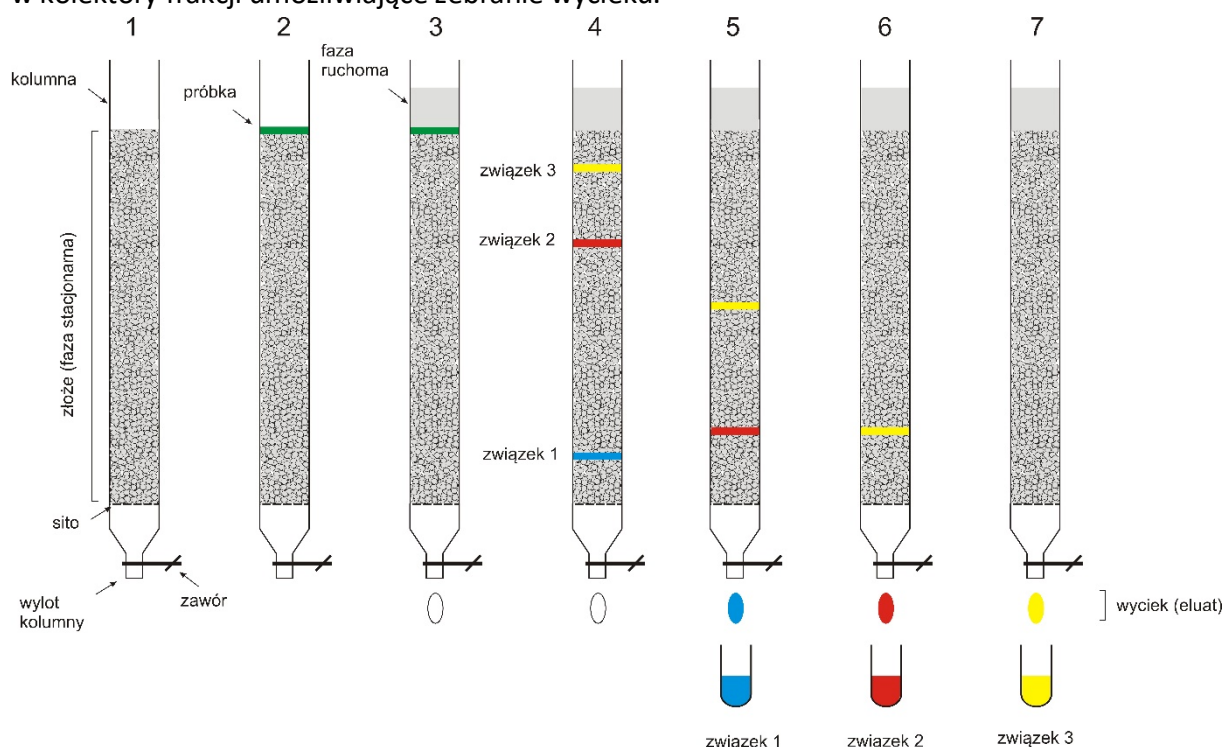
Duża część związków chemicznych jest bezbarwna, przez co nie można bezpośrednio określić pozycji rozdzielonych związków na płytce. Metody wizualizacji możemy podzielić na niespecyficzne i specyficzne. Metody niespecyficzne umożliwiają wykrycie wszystkich rozdzielonych związków. Najpopularniejszą z nich jest spryskanie płytki 50% roztworem H_2SO_4 , a następnie jej ogrzanie w temperaturze około $100^{\circ}C$. Kwas siarkowy powoduje odwodnienie związków, a wysoka temperatura prowadzi do ich spopielenia – w efekcie na chromatogramie pojawiają się brunatne plamy odpowiadające rozdzielonym związkom. W zależności od struktury cząsteczek mogą również powstawać plamy o innych kolorach. Należy podkreślić, że ta metoda wizualizacji powoduje zniszczenie próbki. Druga grupa metod wizualizacji polega na przekształceniu bezbarwnych związków w ich barwne pochodne (w sposób trwały bądź odwracalny), które można obserwować bezpośrednio lub poprzez oświetlenie światłem o określonej długości fali (w zakresie UV i światła widzialnego). Są to metody wysoce specyficzne – opracowane do wykrywania ściśle określonych klas związków, a nawet konkretnych substancji. Obecnie metody te są coraz rzadziej stosowane ze względu na znaczący rozwój technik cząsteczkowych, w szczególności spektrometrii mas.

2) Technika kolumnowa

W chromatografii kolumnowej faza stacjonarna (określana również jako złożo chromatograficzne, najczęściej występuje w postaci kulek o bardzo małej średnicy) jest umieszczona w szklanej (plastikowej lub metalowej) rurce (kolumnie), przez którą, po nałożeniu badanej próbki, przepuszcza się fazę ruchomą. Przepływ fazy ruchomej przez kolumnę można uzyskać grawitacyjnie lub stosując różnicę ciśnień na wlocie i wylocie kolumny. W najprostszym układzie rurka szklana jest zakończona zaworem, a przepływ fazy ruchomej jest grawitacyjny (Ryc. 11.2). Po nałożeniu próbki na górną powierzchnię złoża od góry kolumny podawana jest faza ruchoma, która wymywa związane z fazą stacjonarną związki (na identycznej zasadzie jak w przypadku techniki cienkowarstwowej). Związki najslabiej związane z fazą stacjonarną wypływają z kolumny jako pierwsze; czas przebywania danego składnika w kolumnie określany jest mianem czasu retencji.

W chromatografii kolumnowej znacznie łatwiej jest manipulować składem fazy ruchomej – można bardzo łatwo zmieniać jej właściwości, np. zwiększać (lub zmniejszać) siłę wymywania. Można prowadzić elucję (wymywanie) z użyciem fazy mobilnej o stałym składzie, skokowo (lub liniowo) zmieniać stężenia składników fazy ruchomej lub całkowicie zmienić jakościowy skład fazy ruchomej. Wyciek (eluat) z kolumny zbiera się do kolejnych probówek. Istnieją różne

podejścia (w zależności od celu eksperymentu) do zbierania wycieku: (i) frakcje o stałej objętości, (ii) frakcje o stałym interwale czasowym, czy (iii) frakcje wymywane różnymi fazami ruchomymi. Skład frakcji można zbadać odpowiednimi metodami instrumentalnymi dobranymi do typu rozdzielanych związków, np. w przypadku białek do oznaczenia ich stężenia w kolejnych frakcjach wykonujemy reakcję barwną (z pomiarem spektrofotometrycznym), a do zbadania składu jakościowego wykonujemy elektroforezę SDS-PAGE. Nowoczesne chromatografy (urządzenia wykonujące proces chromatografii w sposób zautomatyzowany) są wyposażone w detektory pozwalające na monitorowanie składu frakcji w czasie rzeczywistym oraz w kolektory frakcji umożliwiające zebranie wycieku.



Ryc. 11.2. Schemat przebiegu chromatografii kolumnowej. 1) elementy składowe kolumny chromatograficznej (sito zapobiega „wypadnięciu” złoże z kolumny; zawór umożliwia zamykanie/otwieranie wylotu z kolumny i zbieranie wycieku); 2) nakładanie próbki (mieszanka trzech barwnych związków) na górną powierzchnię złoże (zawór zamknięty); 3) wprowadzenie fazy ruchomej na górną powierzchnię złoże, otwarcie zaworu i rozpoczęcie zbierania wycieku; 4) wymywanie związków z fazy stacjonarnej w zależności od ich siły wiązania (cały czas dodajemy fazę ruchomą); 5-7) zbieranie poszczególnych barwnych związków do oddzielnych probówek. Po wymyciu wszystkich związków kolumnę można zregenerować i rozpocząć kolejny proces chromatografii dla nowej próbki.

3) Rodzaje złożeń stosowane w oczyszczaniu białek techniką kolumnową

W chromatografii kolumnowej do oczyszczania białek stosuje się rozmaite złoże, które pozwalają na oddzielenie wybranego białka z mieszaniny wielu innych. Cechy białek, które mogą być przydatne w ich oczyszczaniu to: wielkość, kształt, ładunek, obecność określonych grup funkcyjnych, czy zdolność wiązania wybranych ligandów lub substratów. W zależności od właściwości białka, które ma być oczyszczone, stosuje się złoże do (i) chromatografii

jonowymiennej, (ii) chromatografii powinowactwa lub (iii) sączenia molekularnego (filtracji żelowej).

W chromatografii jonowymiennej wykorzystuje się złożę, na którym unieruchomione są grupy funkcyjne z ładunkiem dodatnim lub ujemnym. Określa się je mianem, odpowiednio, anionitu (oddziałuje z anionami) lub kationitu (oddziałuje z kationami). Warto zwrócić uwagę na to, że w zależności od pH roztworu białka zmieniają wypadkowy ładunek, a w pH równym punktowi izoelektrycznemu (pI) wypadkowy ładunek wynosi zero i wówczas białka tracą właściwości pozwalające im oddziaływać ze złożami stosowanymi w chromatografii jonowymiennej. Kluczowe jest więc dobranie takiej wartości pH roztworu, żeby oczyszczane białko wykazywało właściwy ładunek do oddziaływania ze złożem chromatograficznym. Elucję związanego ze złożem białka można przeprowadzić zmieniając pH roztworu (co powinno wywołać zmianę ładunku wypadkowego związanego na złożu białka) lub zwiększając stężenie soli roztworu (co powinno osłabić oddziaływanie między złożem a związanym z nim białkiem).

Innym rodzajem chromatografii często stosowanym w oczyszczaniu białek jest chromatografia powinowactwa. Opiera się ona na wybiórczym oddziaływaniu białka z ligandem, substratem lub z innym białkiem. Złożę chromatograficzne stosowane w tej metodzie ma na swojej powierzchni unieruchomione wyżej wspomniane cząsteczki – ligandu, substratu (częściej analogu substratu, który nie ulega reakcji enzymatycznej i nie przekształca się w produkt) albo białka wchodzącego w interakcję z oczyszczanym białkiem. Bardzo często wektory służące do produkcji rekombinowanych białek mają sekwencję kodującą tzw. His-tag (znacznik histydynowy składający się z sześciu reszt histydyny, który oddziałuje z unieruchomionymi na złożu jonami Ni^{2+}). Jest to przykład małego znacznika, ale czasami oczyszczane białko wyposaża się w duży znacznik, np. białko MBP (duże bakteryjne białko, które wybiórczo wiąże cząsteczki maltozy unieruchomione na złożu, jednocześnie zwiększa rozpuszczalność rekombinowanego białka, jeśli oczyszczane białko ma małą rozpuszczalność w środowisku wodnym).

Sączenie molekularne (inaczej filtracja żelowa) to także technika często wykorzystywana w oczyszczaniu białek. Polega ona na zastosowaniu złoża, które stanowią porowate kuleczki. Substancje, w tym białka, rozdziela się z uwagi na ich wielkość – mniejsze od średnicy otworów w złożu wnikają do jego wnętrza, natomiast większe nie mają takiej możliwości i przemieszczają się jedynie po przestrzeni między kuleczkami złoża. W związku z tym, w kolumnie chromatograficznej wypełnionej złożem do sączenia molekularnego, duże cząsteczki mają mniejszą objętość do dyspozycji, zaś małe cząsteczki – większą. Pokonanie odległości od powierzchni złoża do wylotu kolumny zajmuje więcej czasu małym cząsteczkom, ponieważ mają one do dyspozycji *de facto* większą przestrzeń niż duże cząsteczki, dlatego skutkuje to pojawieniem się najpierw dużych cząsteczek u wylotu kolumny, a potem małych cząsteczek.

12. Podstawowe obliczenia w mikrobiologii

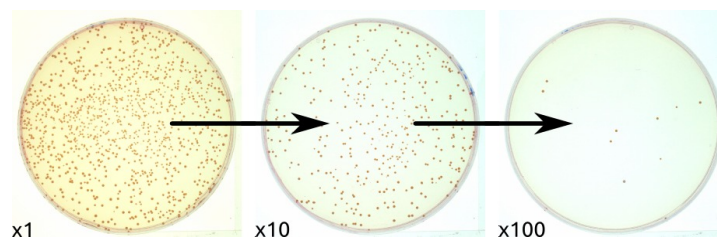
W mikrobiologii wykorzystuje się różne jednostki określające liczbę badanych organizmów i wirusów. Są to:

- CFU;
- PFU;

CFU (ang. colony-forming unit) – jednostka wykorzystywana do określenia liczby żywych mikroorganizmów (bakterii lub grzybów) w badanej próbce. Jeżeli chcemy odnieść się do określonej objętości wówczas uzyskaną liczbę przeliczamy na 1 ml, 1 m³, etc.

Wyznaczenie CFU umożliwia, poprzez hodowlę mikroorganizmów, policzenie tylko żywych komórek, w przeciwieństwie do metod mikroskopowych lub pomiarów spektrofotometrycznych.

Zawiesina o nieznanym liczbie mikroorganizmów jest zazwyczaj seryjnie rozcieńczana w celu uzyskania przynajmniej jednej szalki z policzalną liczbą kolonii. Aby wynik był wiarygodny, na szalce Petriego o średnicy 90 mm, powinno uzyskać się 30–300 kolonii. W tym celu przeprowadza się odpowiednie rozcieńczenie badanej próbki i wysianie kilku rozcieńczeń na szalkę z podłożem. Zazwyczaj stosuje się serie 10-krotnych rozcieńczeń (Rys. 12.1). W obliczeniach CFU trzeba uwzględnić współczynnik rozcieńczenia.



Rys. 12.1. Przykład szalek z uzyskanymi koloniami mikroorganizmów po 10-krotnych rozcieńczeniach badanych zawiesin.

W przypadku pomiaru liczby mikroorganizmów w powietrzu metodą sedymentacji uwzględnia się czas ekspozycji podłoża hodowlanego na mikroorganizmy.

Procedura pomiaru liczby mikroorganizmów z powietrza metodą sedymentacyjną Kocha

- a) Płytki z agarowym odczynem postawić w miejscu, gdzie wykonany będzie pomiar.
- b) Zdjąć wieczko i wystawić pożywkę na działanie powietrza przez 15 minut zależnie od przewidywanego skażenia powietrza w odpowiednim pomieszczeniu. Po ekspozycji płytki zakryć.
- c) Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze pokojowej policzyć kolonie mikroorganizmów, a następnie obliczyć ich liczbę (X) w 1 m³ powietrza według zamieszczonego niżej wzoru (według założenia Omeliańskiego na 1 m² podłoża osiada w ciągu 5 minut tyle mikroorganizmów, ile znajduje się 1 m³ powietrza):

$$X = \frac{n \times 5}{p \times t}$$

n – uśredniona liczba kolonii na płytce

p – powierzchnia płytki w m² (wzór na pole powierzchni koła $S = \pi r^2$)

t – czas otworzenia płytki w min

Przykład obliczeń:

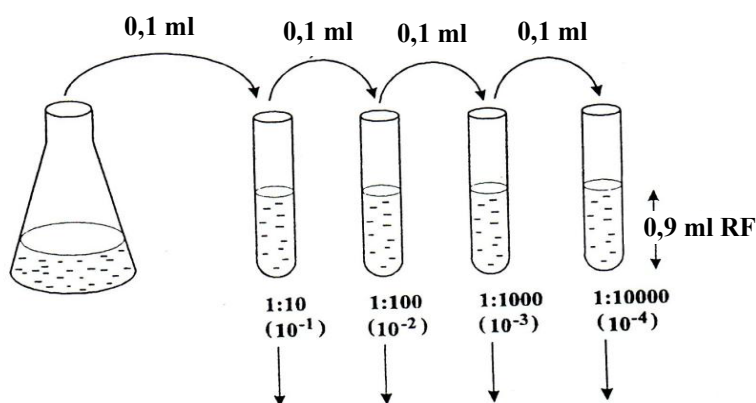
W przeprowadzonych doświadczeniach po 15 min. ekspozycji w różnych pomieszczeniach uzyskano następujące wyniki, które przedstawiono w tabeli 12.1. Oblicz ile drobnoustrojów znajdowało się w danym pomieszczeniu.

Tabela 12.1. Badanie czystości mikrobiologicznej powietrza

Miejsce badania czystości powietrza	Liczba kolonii na płytce o średnicy 90 mm	Liczba drobnoustrojów w 1 m ³ powietrza
łazienka	21	
sypialnia	10	
sala lekcyjna	32	

Procedura izolacji mikroorganizmów z naturalnego zbiornika wodnego i określanie ich liczby

- Rozcieńczyć wodę ze zbiornika ($10^{-1} - 10^{-4}$) wg schematu przedstawionego na rysunku 12.2 poniżej.
 - Wlać do 4 probówek po 0,9 ml soli fizjologicznej;
 - Do pierwszej probówki odmierzyć pipetą po 0,1 ml badanej wody. Pipetę odłożyć, a zawartość probówki dobrze wymieszać. W ten sposób rozcieńczyliśmy badaną wodę dziesięciokrotnie (10^{-1});
 - Przenieść 0,1 ml rozcieńczenia 10^{-1} do następnej probówki z solą fizjologiczną i wymieszać. Uzyskujemy stukrotne rozcieńczenia badanej wody (10^{-2}).
 - Postępując analogicznie otrzymujemy rozcieńczenia 10^{-3} i 10^{-4} .



Rys. 12.2. Schemat wykonania 10-krotnych rozcieńczeń.

- Wysiać po 0,1 ml **odpowiedniego rozcieńczenia** na płytki z agarem odżywczym;
- Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze pokojowej zaobserwować zróżnicowaną morfologię kolonii mikroorganizmów.
- Następnie policzyć kolonie na płytkach. Określić liczbę mikroorganizmów zdolnych do wytworzenia kolonii (CFU) w 1 ml badanej wody (X) wg wzoru:

$$X = a \times b \times 10 \text{ [CFU/ml]}$$

gdzie: **a** – średnia liczba bakterii na płytkach
b – odwrotność wysianego rozcieńczenia
10 – przeliczenie na 1 ml

Przykład obliczeń:

Badano wodę z jeziora Mamry. W tabeli 12.2 podano liczbę kolonii wyrosłych na szalce. Określ liczbę mikroorganizmów w badanej wodzie.

Tabela 12.2. Liczba kolonii.

powtórzenie biologiczne 1		powtórzenie biologiczne 2		powtórzenie biologiczne 3	
rozcieńczenie 10^{-4}	rozcieńczenie 10^{-5}	rozcieńczenie 10^{-4}	rozcieńczenie 10^{-5}	rozcieńczenie 10^{-4}	rozcieńczenie 10^{-5}
350	29	418	51	396	35
389	32	428	55	380	38

Procedura izolacji mikroorganizmów z gleby i określanie ich liczby:

- Przygotować roztwór glebowy. W tym celu odważyć 2 g gleby i wsypać do kolby zawierającej 18 ml soli fizjologicznej i całość wytrząsać kilka minut w celu wymycia mikroorganizmów z cząstek gleby. Poczekać, aż cząstki stałe opadną na dno.
- Przygotować kolejne rozcieńczenia gleby (10^{-1} – 10^{-6}) traktując roztwór glebowy jako rozcieńczenie 10^{-1} . Wysiać 0,1 ml **odpowiedniego rozcieńczenia** na płytkę z agarem odżywczym.
- Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze pokojowej policzyć kolonie, a następnie określić liczbę jednostek (mikroorganizmów) zdolnych do wytworzenia kolonii (CFU) w 1 g gleby, stosując wzór z poprzedniego punktu.

Przykład obliczeń:

Badano glebę z zespołu pałacowo-ogrodowego Łazienki Królewskie. W tabeli 12.3 podano liczbę kolonii wyrosłych na szalce. Określ liczbę mikroorganizmów w badanej glebie.

Tabela 12.3. Liczba kolonii.

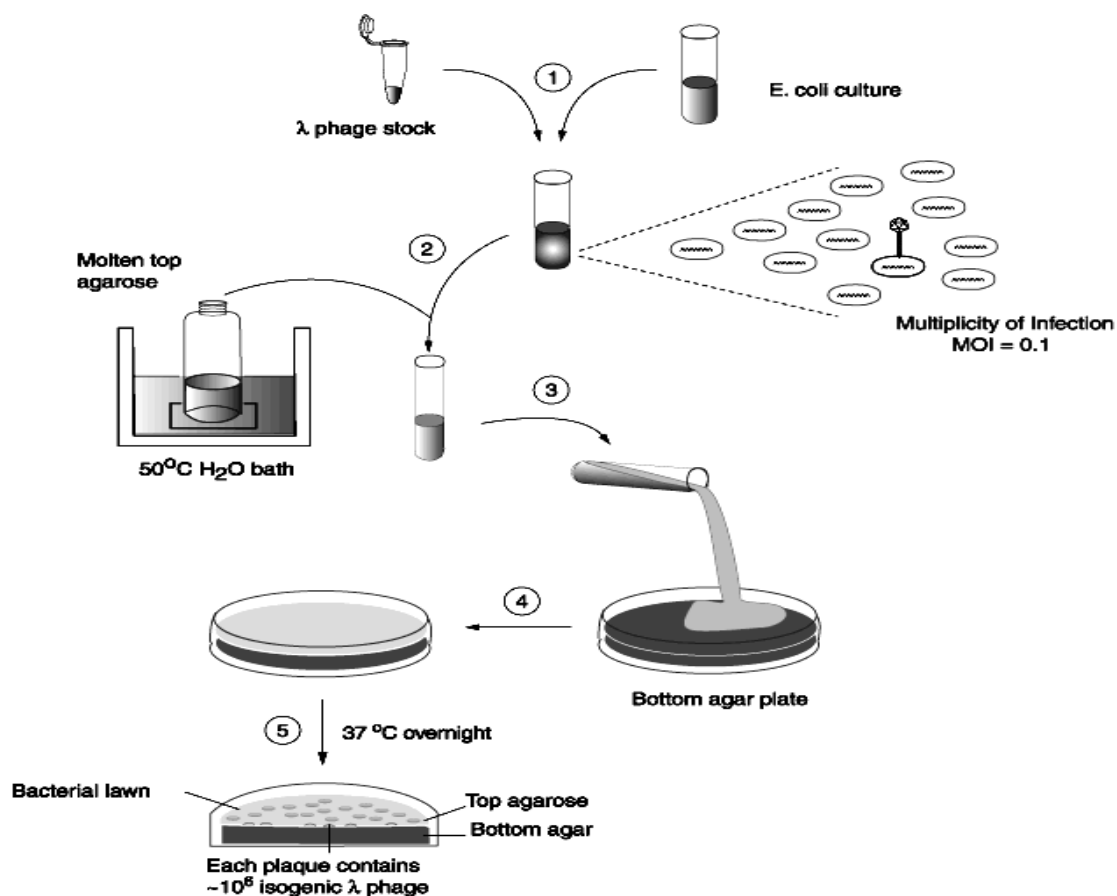
powtórzenie biologiczne 1		powtórzenie biologiczne 2		powtórzenie biologiczne 3	
rozcieńczenie 10^{-6}	rozcieńczenie 10^{-5}	rozcieńczenie 10^{-6}	rozcieńczenie 10^{-5}	rozcieńczenie 10^{-6}	rozcieńczenie 10^{-5}
3	29	4	51	4	35
3	32	5	55	5	38

PFU (ang. plaque forming units) – jednostki tworzące łysinki.

Łysinka to obszar przejaśnienia na hodowlach tkankowych lub bakteryjnych, powstający w wyniku lizy komórek, będącej skutkiem działania wirusów.

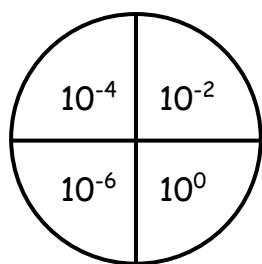
Namnażanie bakteriofagów

Bakteriofagi można namnażać w hodowlach stałych lub płynnych. Bakterie i fagi miesza się w proporcjach takich, aby liczba fagów była znacząco mniejsza niż liczba bakterii. Mieszanina jest inkubowana w warunkach pozwalających bakteriom dzielić się i ulegać infekcji poprzez fagi. W pierwszej metodzie (test płytkowy), do mieszaniny bakterii i bakteriofagów dodajemy tzw. miękki agar (półpłynny) (Rys. 12.3). Wszystko wylewamy na powierzchnię szalki Petriego z podłożem stałym. Bakterie dzielą się, fagi infekują tylko przyległe bakterie, ponieważ są unieruchomione w agarze. Niezainfekowane komórki kontynuują podziały, tworząc tzw. murawę bakterii. Zainfekowane bakterie ulegają lizie: w ten sposób powstają przejrzyste obszary na tle zmętniałej murawy bakterii: nazywamy je łysinkami (*plaque*). Zakłada się, że każda łysinka powstaje na skutek namnażania pojedynczego, wyjściowego wirusa, policzenie ilości łysinek umożliwia wyliczenie liczby wirusów w roztworze (PFU). W obliczeniach należy uwzględnić współczynnik rozcieńczenia faga. Stosowany w przypadku wirusów PFU jest terminem analogicznym do CFU w przypadku mikroorganizmów.



Rys. 12.3. Schemat przedstawiający wykonanie płytek dwuwarstwowych.

Aby wyznaczyć PFU oprócz opisanego powyżej testu płytkowego można wykorzystać test kroplowy (Rys. 12.4).



Test kroplowy (Rys. 12.4) polega na nakropleniu na murawkę bakteryjną 5 μ l zawiesiny fagowej (np. odpowiednio rozcieńczonej). Metoda pozwala na szybkie określenie miana faga (na jednej szalce). Murawkę bakteryjną przygotowujemy metodą płytek dwuwarstwowych poprzez zmieszanie szczepu bakteryjnego z podłożem półpłynnym.

Aby obliczyć miano zawiesiny fagowej tj. liczba jednostek tworzących łysinki w 1 ml (PFU) stosuje się niżej podane wzory:

- wzór do testu płytkowego:

$$\text{PFU (na ml)} = N \times R \times 10$$

N – liczba łysinek
R – odwrotność rozcieńczenia
10 – przeliczenie na 1 ml (do testu używamy 100 μ l badanej zawiesiny)

Analogicznie jak w przypadku CFU liczna łysinek na płytce powinna wynosić 30-300.

- wzór do testu kroplowego liczbę faga w 1 ml obliczyć ze wzoru:

$$\text{PFU (na ml)} = N \times R \times 200$$

N – liczba łysinek
R – odwrotność rozcieńczenia
200 – przeliczenie na 1 ml (do testu używamy 5 μ l badanej zawiesiny)

Wybiera się takie rozcieńczenie, na którym widoczne są pojedyncze i policzalne łysinki.

Przykład obliczeń:

Przeprowadzono namnażanie bakteriofaga T7 na komórkach *Escherichia coli*, wykorzystując zawiesinę wirusową o mianie 10^5 pfu/ml. W tabeli 4 podano liczbę powstałych łysinek po zastosowaniu metody płytkowej. Odpowiedz czy udało się wydajnie namnożyć bakteriofaga.

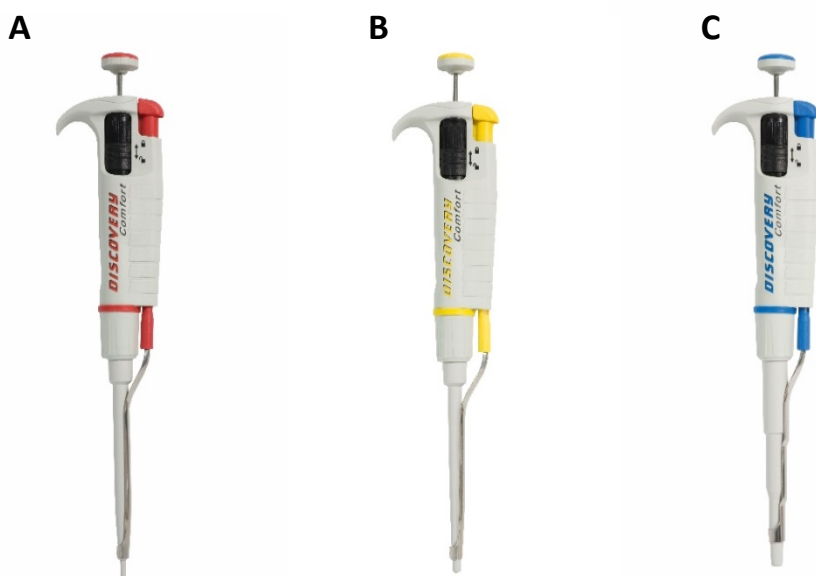
Tabela 12.4. Liczba łysinek.

powtórzenie biologiczne 1		powtórzenie biologiczne 2		powtórzenie biologiczne 3	
rozcieńczenie 10^{-4}	rozcieńczenie 10^{-5}	rozcieńczenie 10^{-4}	rozcieńczenie 10^{-5}	rozcieńczenie 10^{-4}	rozcieńczenie 10^{-5}
495	50	518	61	496	45
500	49	521	55	480	48

13. Technika poprawnego pipetowania

Pracownia Biochemiczna Olimpiady Biologicznej jest wyposażona w pipety automatyczne służące do precyzyjnego odmierzania małych objętości cieczy. Każdy uczestnik ma dostęp do zestawu trzech pipet HTL Discovery Comfort zasponsorowanych przez Fundację grupy Adamed. Ich fotografie znajdują się na następnej stronie niniejszego informatora (Ryc. 13.1.). Każdy zestaw składa się z trzech pipet automatycznych:

- a) model DV10, służący do pipetowania cieczy w zakresie objętości 0,5–10 μl (Ryc. 13.1A),
- b) model DV100, służący do pipetowania cieczy w zakresie objętości 10–100 μl (Ryc. 13.1B),
- c) model DV1000, służący do pipetowania cieczy w zakresie objętości 100–1000 μl (Ryc. 13.1C).



Ryc. 13.1. Pipety automatyczne HTL Discovery Comfort DV10 (A), DV100 (B) i DV1000 (C).

Dokładna instrukcja poprawnego pipetowania znajduje się w pliku pt. „Instrukcja obsługi pipet” przygotowanego przez producenta pipet, firmę HTL. Prosimy o zapoznanie się z sekcjami 1-7 instrukcji.

Poniżej znajdują się adresy filmów w serwisie YouTube, na których zaprezentowano technikę pipetowania pipetami automatycznymi:

- 1) podstawy obsługi pipet automatycznych – poradnik filmowy przygotowany przez KGOB:

<https://www.youtube.com/watch?v=R3Rdk5Rduvk>

- 2) technika pipetowania – wersja w języku polskim:

<https://www.youtube.com/watch?v=VzITXi2WzBk>

3) technika pipetowania – wersja w języku angielskim:

<https://www.youtube.com/watch?v=nOh3kbSZCqU>

4) nastawianie objętości – wersja w języku angielskim

<https://www.youtube.com/watch?v=nCqWOOcdjuM>