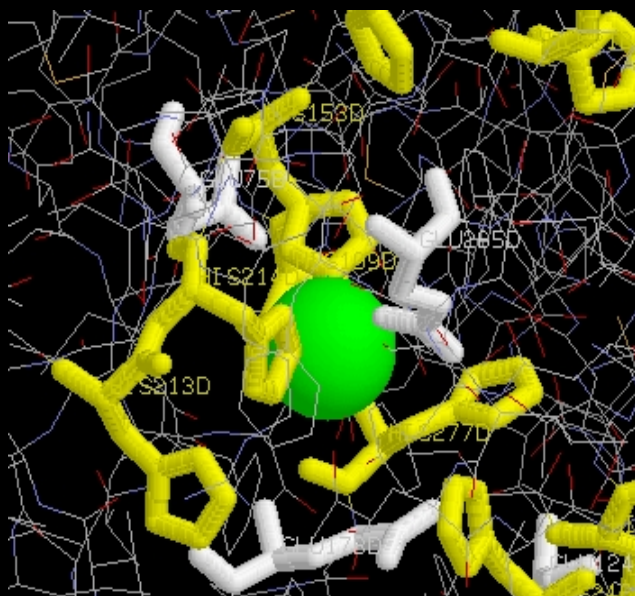


Danuta Wojcieszńska, Urszula Guzik

Elementy enzymologii i biochemii białek



Skrypt dla studentów
biologii i biotechnologii



WYDAWNICTWO
UNIwersytetu Śląskiego
KATOWICE 2015

Elementy enzymologii i biochemii białek

**Skrypt dla studentów
biologii i biotechnologii**

PODRECZNIKI
I SKRYPTY



UNIWERSYTETU
ŚLĄSKIEGO
W KATOWICACH

NR 166

Danuta Wojcieszńska, Urszula Guzik

Elementy enzymologii i biochemii białek

**Skrypt dla studentów
biologii i biotechnologii**

Redaktor serii: Biologia
Iwona Szarejko

Recenzenci
Ewa Kaczorek, Danuta Witkowska

Spis treści

Przedmowa	9
Wykaz stosowanych oznaczeń	11
Zasady bezpieczeństwa i higieny pracy obowiązujące w Pracowni biochemii białek	13
1. Izolacja i oczyszczanie enzymu.	15
1.1. Izolacja i wstępne oczyszczanie 1,2-dioksygenazy katecholowej	15
1.1.1. WPROWADZENIE	15
1.1.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	18
1.1.3. WYKONANIE	19
1.1.3.1. Izolacja i wstępne oczyszczanie 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KB2	19
1.1.3.2. Oznaczanie aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej	21
1.1.3.3. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda	22
1.1.3.3.1. Przygotowanie krzywej wzorcowej	22
1.1.3.3.2. Oznaczenie stężenia białka w badanym materiale biologicznym	23
1.1.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	23
1.2. Wyznaczanie mas cząsteczkowych białek metodą sączenia żelowego oraz oczyszczanie białek metodą chromatografii jonowymiennej	24
1.2.1. WPROWADZENIE	24
1.2.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	25
1.2.3. WYKONANIE	26
1.2.3.1. Wyznaczenie masy cząsteczkowej 1,2-dioksygenazy katecholowej metodą sączenia żelowego.	26
1.2.3.2. Oczyszczanie 1,2-dioksygenazy katecholowej metodą chromatografii jonowymiennej.	28
1.2.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	29
1.3. Elektroforeza dwuwymiarowa 2-DE białek	30
1.3.1. WPROWADZENIE	30
1.3.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	32
1.3.3. WYKONANIE	32
1.3.3.1. Przygotowanie surowej frakcji enzymatycznej do elektroforezy 2-DE	32

1.3.3.2. Przygotowanie krzywej wzorcowej do oznaczania stężenia białka metodą Bradforda w obecności buforu do przygotowywania próbek 2-DE	33
1.3.3.3. Rehydratacja pasków IPG	34
1.3.3.4. Izoogniskowanie białek z zastosowaniem pasków IPG	34
1.3.3.5. Przygotowanie pasków do drugiego kierunku SDS-PAGE i rozdział elektroforetyczny	35
1.3.3.6. Detekcja białek w żelu poliakrylamidowym metodą z Coomassie Brilliant Blue	36
1.3.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	36
1.4. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	36
1.4.1. WPROWADZENIE	36
1.4.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	38
1.4.3. WYKONANIE	38
1.4.3.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego i rozdział białek	38
1.4.3.2. Detekcja białek w żelu poliakrylamidowym metodą z Coomassie Brilliant Blue oraz metodą srebrową	39
1.4.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	40
1.5. Literatura	40

2. Kinetyka reakcji enzymatycznej katalizowanej przez 1,2-dioksygenazę katecholową	43
2.1. Wyznaczanie optymalnych warunków reakcji enzymatycznej	43
2.1.1. WPROWADZENIE	43
2.1.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	44
2.1.3. WYKONANIE	45
2.1.3.1. Badanie wpływu temperatury na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	45
2.1.3.2. Badanie wpływu pH na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	46
2.1.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	47
2.2. Wyznaczanie stałych kinetycznych reakcji enzymatycznej	48
2.2.1. WPROWADZENIE	48
2.2.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	51
2.2.3. WYKONANIE	52
2.2.3.1. Badanie wpływu stężenia substratu na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	52
2.2.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	53
2.3. Inhibicja reakcji enzymatycznych	54
2.3.1. WPROWADZENIE	54
2.3.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	55
2.3.3. WYKONANIE	56
2.3.3.1. Badanie wpływu 2,4-dichlorofenolu na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	56

2.3.3.2. Badanie wpływu jonów niklu na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	57
2.3.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	58
2.4. Literatura	59

3. Immobilizacja 1,2-dioksygenazy katecholowej. 61

3.1. Wpływ immobilizacji na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	61
3.1.1. WPROWADZENIE	61
3.1.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	62
3.1.3. WYKONANIE	63
3.1.3.1. Immobilizacja 1,2-dioksygenazy katecholowej	63
3.1.3.2. Oznaczanie stężenia białka w kulkach alginianowych	63
3.1.3.2.1. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej dla oznaczania stężenia białka metodą Bradforda w obecności KOH	63
3.1.3.2.2. Oznaczanie stężenia białkach w kulkach alginianowych metodą Bradforda w obecności KOH	64
3.1.3.3. Oznaczanie aktywności immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	64
3.1.3.4. Wpływ czasu przechowywania na aktywność wolnego i immobilizowanego enzymu	65
3.1.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	66
3.2. Badanie właściwości immobilizowanego enzymu	67
3.2.1. WPROWADZENIE	67
3.2.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	68
3.2.3. WYKONANIE	69
3.2.3.1. Badanie wpływu pH na aktywność wolnej i immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	69
3.2.3.2. Badanie wpływu temperatury na aktywność wolnej i immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej.	70
3.2.3.3. Badanie wpływu jonów metali oraz związków fenolowych na aktywność wolnej i immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	71
3.2.3.4. Oznaczanie stężenia białka w surowej frakcji enzymatycznej i w kulkach alginianowych	72
3.2.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	73
3.3. Literatura	74

Przedmowa

W ostatnim półwieczu nastąpił intensywny rozwój enzymatyki i biochemii białek. Jest to spowodowane rozwojem odpowiednich metod i technik badawczych, bez których nie byłoby możliwe oczyszczenie i zbadanie struktury białek. W Katedrze Biochemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Sylwii Łabużek, od prawie dwudziestu lat prowadzi się badania i zajęcia dydaktyczne związane z szeroko pojętą enzymatyką. Niniejszy podręcznik ma ułatwić studentom biologii, biotechnologii i innych kierunków pokrewnych przygotowanie do ćwiczeń, zaznajomienie się z podstawowymi metodami stosowanymi w enzymologii oraz wykonanie odpowiednich doświadczeń.

Skrypt podzielony został na trzy części, z których każda obejmuje: wstęp teoretyczny, stosowane podczas zajęć materiały i odczynniki, opis przebiegu doświadczeń oraz sposób opracowania uzyskanych wyników. Podana na zakończenie każdej z części skryptu literatura źródłowa umożliwi czytelnikowi samodzielne zaplanowanie badań oraz bardziej wnikliwą analizę wyników. Możliwość zapoznania się z prezentowaną literaturą jest tym istotniejsza, że materiały zawarte w podręczniku nie wyczerpują przedstawianych w nim zagadnień.

Autorki mają nadzieję, że skrypt będzie stanowić istotną pomoc w nauczaniu enzymologii oraz biochemii białek. Jednak zdając sobie sprawę z pewnych jego niedociągnięć, będą wdzięczne za wszelkie wskazówki Czytelników, które mogą być pomocne w przygotowywaniu kolejnego wydania podręcznika.

Serdecznie dziękują także Pani dr hab. Katarzynie Hupert-Kocurek za krytyczne uwagi zgłaszane podczas opracowywania niniejszego skryptu.

Danuta Wojcieszewska, Urszula Guzik

Wykaz stosowanych oznaczeń

2-DE	— dwuwymiarowa elektroforeza żelowa
A_{280}	— absorbancja białka przy długości fali 280 nm
APS	— nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i>)
CBB G-250	— błękit brylantynowy G-250 (ang. <i>Coomassie Brilliant Blue G250</i>)
CHAPS	— niejonowy detergent siarczan 3-[(3-cholamidopropylodimetyloamonio)-1-propanu
CM-celuloza	— karboksymetyloceluloza
CM-Sephadex	— karboksymetylo-Sephadex
dC	— zmiana stężenia
DEAE-celuloza	— dietyloaminoetyloceluloza
DMAP	— β -dimetyloaminopropionitryl
DTE	— ditioerytrol
GC/MS	— chromatograf gazowy sprzężony z detektorem masowym
h	— współczynnik interakcji Hilla
IEF	— ogniskowanie izoelektryczne
IPG	— paski do izoogniskowania (ang. <i>immobilized pH gradient</i>)
K_m	— stała Michaelisa-Menten
MW	— masa cząsteczkowa
NP-40	— niejonowy surfaktant Nonidet P-40
PMSF	— fluorek fenylometylosulfonylu
SDS	— dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	— elektroforeza w warunkach denaturujących (ang. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
t	— czas
TEMED	— N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
Tris	— 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
v	— szybkość reakcji enzymatycznej
V_0	— objętość elucyjna Blue Dextranu
v_0	— szybkość początkowa reakcji enzymatycznej
V_e'	— objętość elucyjna białka badanego
V_e	— objętość elucyjna białka wzorcowego
V_{max}	— szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej
V_t	— objętość całkowita kolumny

DIFP	— diizopropylfluorofosforan
S	— stężenie substratu
F	— fenol
NP	— 2-nitrofenol
CP	— 2-chlorofenol

Zasady bezpieczeństwa i higieny pracy obowiązujące w Pracowni biochemii białek

- Osoby przebywające w laboratorium powinny przestrzegać wszystkich zasad bezpieczeństwa.
- Strojem obowiązującym w Pracowni biochemii białek są fartuch ochronny i buty z podeszwą antypoślizgową.
- Na terenie Pracowni obowiązuje całkowity zakaz spożywania pokarmów i picia napojów.
- Nie wolno przebywać na terenie Pracowni oraz uruchamiać aparatury bez zgody osoby prowadzącej zajęcia.
- Każdy student zobowiązany jest do utrzymywania czystości w miejscu pracy. Odczynniki potrzebne do doświadczeń znajdują się na odpowiednich półkach. Po pobraniu odczynnika każdorazowo należy zamknąć butelkę korkiem i odstawić na właściwe miejsce. Do każdego odczynnika stosuje się oddzielną pipetę (w przypadku pipet automatycznych — oddzielną końcówkę).
- W czasie pracy z materiałem biologicznym oraz odczynnikami chemicznymi nie wolno dotykać rękami twarzy. Należy unikać rozlewania i rozchłapywania odczynników, prace z substancjami trującymi wykonywać pod wyciągiem w rękawiczkach, a jeśli wymagają tego odrębne przepisy, również w okularach i masce ochronnej.
- Papier, szkło, bibułę, materiał biologiczny należy wyrzucać do odpowiednich pojemników.
- O każdym niebezpiecznym zdarzeniu (np. skaleczenie) należy bezwzględnie powiadomić osobę prowadzącą zajęcia.
- W laboratorium znajduje się apteczka zaopatrzona w leki i sprzęt niezbędny do udzielenia pierwszej pomocy.
- W przypadku oparzenia się kwasem oblane miejsce natychmiast spłukać wodą, a następnie wodą wapienną lub roztworem wodorowęglanu sodowego.
- Oparzone lub zanieczyszczone oczy należy przemyć, korzystając z płuczki do oczu, a następnie udać się do lekarza.
- Miejsce oparzone termicznie należy schłodzić pod bieżącą wodą, po czym pokryć pianką typu Panthenol. W przypadku rozległego oparzenia udać się do lekarza.
- W przypadku skaleczenia ranę należy odkazić 70% alkoholem lub wodą utlenioną i opatrzyć sterylną gazą. W przypadku silnego krwawienia założyć po-

wyżej rany opaskę uciskową na okres nie dłuższy niż 1 godz. i wezwać lekarza.

- W przypadku awarii sprzętu, rozbicia naczyń szklanych lub rozlania bądź rozsypania odczynnika chemicznego o zaistniałym zdarzeniu należy powiadomić prowadzącego zajęcia.
- Po zakończeniu ćwiczeń należy uporządkować stanowisko pracy oraz starannie umyć ręce.

Redaktor Barbara Todos-Burny
Projektant okładki Magdalena Starzyk
Redaktor techniczny Barbara Arenhövel
Łamanie Edward Wilk

Copyright © 2015 by
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
Wszelkie prawa zastrzeżone

ISSN 1644-0552

ISBN 978-83-8012-445-5

(wersja drukowana)

ISBN 978-83-8012-446-2

(wersja elektroniczna)

Wydawca
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice
www.wydawnictwo.us.edu.pl
e-mail: wydawus@us.edu.pl

Wydanie I. Ark. druk. 4,75. Ark. wyd. 5,5.
Papier offset. kl. III, 90 g Cena 20 zł (+ VAT)

Druk i oprawa: „TOTEM.COM.PL Sp. z o.o.” Sp.K.
ul. Jacewska 89, 88-100 Inowrocław

Danuta Wojcieszynska, Urszula Guzik

Elementy enzymologii i biochemii białek

Więcej o książce



CENA 20 ZŁ
(+ VAT)

ISSN 1644-0552
ISBN 978-83-8012-446-2