

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
ZAVOD ZA BIOKEMIJU**

Biokemija 2

**Upute za rad u praktikumu iz Biokemije 2
za studente 3. godine preddiplomskog studija molekularne biologije**

Upute za rad u praktikumu namijenjene su studentima 3. godine preddiplomskog studija molekularne biologije kao i studentima drugih smjerova koji paralelno pohađaju predavanja iz kolegija Biokemija 2. Ove upute služe kao pomoć u eksperimentalnom radu u praktikumu iz Biokemije 2.

Sadržaj

Napomene	3
UVOD U PRAKTIKUM	4
VJEŽBA L: CIJEPANJE PLAZMIDA RESTRIKCIJSKIM ENDONUKLEAZAMA <i>Xho</i> I <i>Nco</i> I ..	9
VJEŽBA EC: IZOLACIJA NADEKSPRIMIRANIH MOLEKULA tRNA.....	14
VJEŽBA E: ELEKTROFOREZA NUKLEINSKIH KISELINA NA GELU AGAROZE	16
VJEŽBA P: PROČIŠĆAVANJE PROTEINA S POLIHISTIDINSKIM PRIVJESKOM NA Ni-NTA AGAROZI.....	18
VJEŽBA R: NATIVNA GEL-ELEKTROFOREZA NEKOVALENTNIH KOMPLEKSA IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZE i tRNA ^{Ile}	25
VJEŽBA T: TERMIČKA DENATURACIJA MOLEKULA DNA	28
VJEŽBA B: SUPRESIJA TERMINACIJSKIH KODONA U GENU ZA β-GALAKTOZIDAZU POMOĆU SUPRESORSKE tRNA ^{Tyr} I TEST AKTIVNOSTI β-GALAKTOZIDAZE	32
PITANJA ZA REFERAT	35
Pravilno korištenje automatskih mikropipeta	39

Napomene

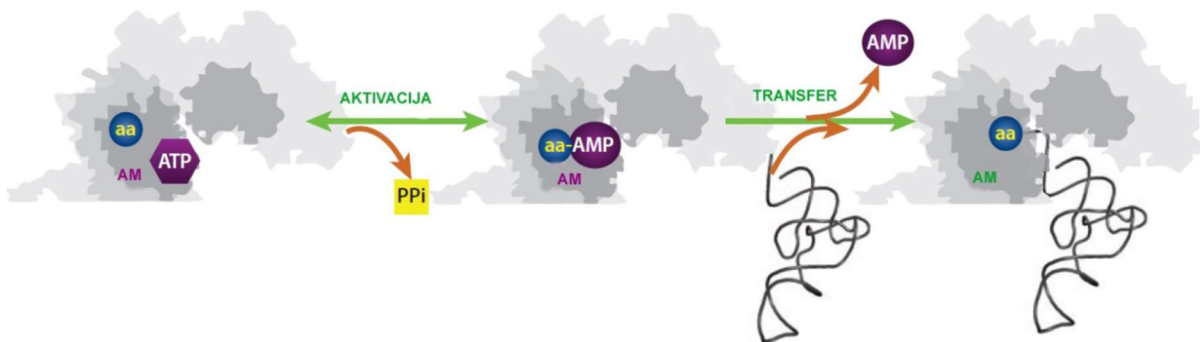
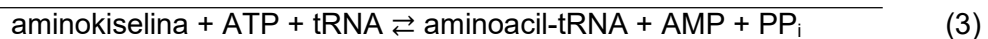
- Praktikum se održava na 1. katu Zajedničkog objekta kemije i biologije, u prostoriji 114, kućni broj telefona: 6285
- Obavezno donijeti kutu, masku, naočale, par rukavica i vodootporni flomaster.
- Na početku praktikuma piše se ulazni kolokvij. Studenti koji **ne zadovolje na ulaznom kolokviju ne mogu pristupiti vježbama i moraju ponovo upisati kolegij sljedeće akademske godine!**
- Očekuje se da ćete kod kuće pročitati vježbu unaprijed i razmisliti na koji način napraviti vježbu jer vježbe treba izvoditi samostalno, što brže i elegantnije. Praktikum je zamišljen kao jedan vaš eksperiment kojeg čine pet vježbi (L, EC, E, P, R), a ostale dvije vježbe (T, B) nisu međusobno povezane.
- Čuvati sav inventar u praktikumu, a posebice pipete. Ako nešto razbijete, prijavite to asistentu ili tehničaru.
- Na početku praktikuma, izvježbajte pipetiranje prema Prilogu uz nadzor asistenta.
- Vježbe ćete raditi samostalno!
- Asistenti će s vama diskutirati vježbe tijekom praktikuma i mogu vas po potrebi ispitati usmeno.
- Očekuje se redovito pohađanje praktikuma, a nadoknade se uvažavaju samo iznimno. Budite točni i koncentrirani. U slučaju bilo kakve nedoumice u vezi protokola, pitajte asistenta.
- Pridržavati se savjeta asistenata prilikom izvođenja vježbi. Ukoliko je bilo odstupanja od protokola, zabilježite to u referat.
- **Na kraju radnog dana nadopuniti kutije nastavcima, te pospremiti pipete i kutije s nastavcima prema uputama asistenta i/ili višeg tehničara. Kivete operite odmah i ostavite da se suše u kutiji. Suđe koje koristite operite i ostavite na mjestu s kojeg ste ga uzeli.**
- Pitanja za referat nisu zamišljena tako da ih diskutirate na vježbama, već se očekuje samostalan rad studenta kod kuće prilikom pisanja referata (koristite *Internet*, udžbenike i znanstvene radove).
- Nije dozvoljeno mijenjanje turnusa tijekom trajanja praktikuma.
- Vaša konačna ocjena iz praktikuma ovisit će o vašem radu i zalaganju, dojmu asistenta, referatu i ulaznom kolokviju. Referat predajte do dogovorenog datuma.
- Uspješnost vježbe, tj. rezultat, će se nagraditi što znači da ste marljivo i pažljivo radili u praktikumu. Nagrađuju se i dobre ideje u referatu.

UVOD U PRAKTIKUM

Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su esencijalni stanični enzimi odgovorni za esterifikaciju 3'-kraja molekule tRNA s pripadnom (engl. *cognate*) aminokiselinom u reakciji aminoacilacije. S obzirom da povezuju aminokiselinu s onom tRNA koja sadrži antikodon komplementaran kodonu koji kodira tu aminokiselinu, aaRS su zapravo jedine molekule koje znaju „čitati“ genetički kod, jer povezuju informaciju zapisanu kao slijed nukleotida u molekuli DNA, odnosno molekuli mRNA sa slijedom aminokiselina u polipeptidnom lancu. Za svaku proteinogenu¹ aminokiselinu postoji u stanici najmanje jedna aaRS, a uz citosolne aaRS, eukariotski organizmi sadrže aaRS i u mitohondrijima i kloroplastima.

Sve aaRS provode reakciju aminoacilacije u dva koraka. Prvo, pravilnim pozicioniranjem α -fosfata ATP-a i α -karboksilata aminokiseline omogućen je nukleofilni napad α -karboksilne skupine aminokiseline na α -atom fosfora molekule ATP-a mehanizmom S_N2 . Produkti aktivacije su pirofosfat i anhidrid aminoacil-adenilat (aa-AMP) koji ostaje nekovalentno vezan za enzim (korak 1). Aktivacija se odvija u aktivnom, sintetskom, mjestu enzima, u kojem u pravilu ne sudjeluje tRNA. Drugi korak reakcije uključuje nukleofilni napad 2'- ili 3'-OH skupine riboze terminalnog adenzina 3'-kraja molekule tRNA na α -karbonilni ugljikov atom aminoacil-adenilata (korak 2), pri čemu nastaje aminoacilirana tRNA (tRNA esterificirana pripadnom aminokiselinom na 3'-kraju) uz oslobađanje adenilata (AMP) kao izlazne skupine (korak 3) (slika 1.).



Slika 1. Sinteza aminoacil-tRNA. aa – aminokiselina; AM – aktivno mjesto enzima; PP_i – pirofosfat; aa-AMP – aminoacil-adenilat

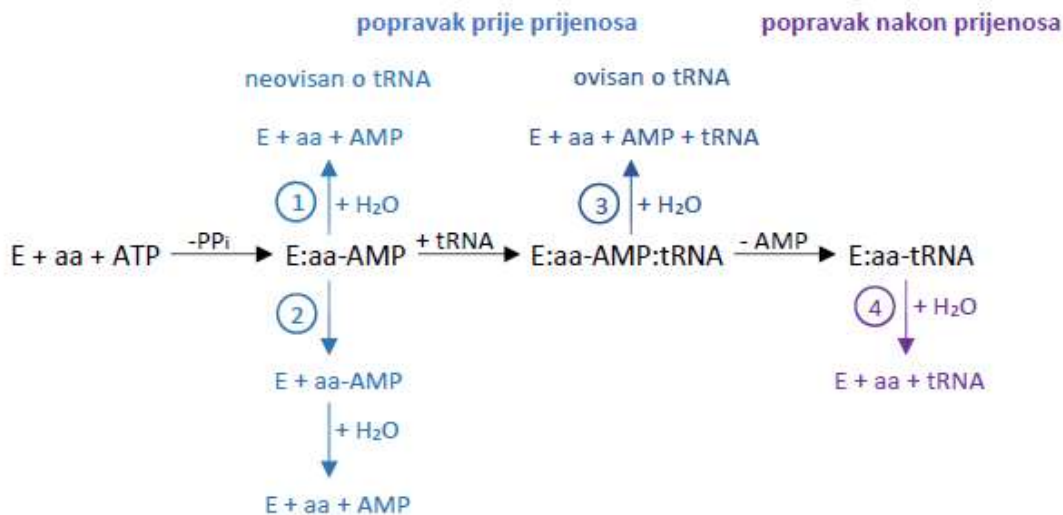
Za točnost reakcije aminoacilacije, nužno je da svaka aaRS veže isključivo pripadnu tRNA. Sve tRNA sadrže pozitivne i negativne elemente identiteta kojima se osigurava da enzim veže samo pripadnu tRNA. Pod pozitivnim elementima identiteta smatraju se strukturni

¹ Proteinogene aminokiseline su one aminokiseline koje grade proteine (u pravilu 20 aminokiselina).

elementi koji osiguravaju nastajanje odgovarajućeg para aaRS:tRNA. Negativni elementi identiteta sprječavaju prepoznavanje i aminoaciliranje neprikladnih tRNA. Vrlo često element identiteta su nukleotidi antikodona. Iznimka su naravno tRNA specifične za aminokiseline koje su kodirane s većim brojem kodona, primjerice leucin i serin. Bitan element identiteta mnogih tRNA je i akceptorska peteljka, varijabilna omča te diskriminacijska baza 73.

Aminoacil-tRNA-sintetaza mora moći prepoznati i pripadnu aminokiselinu, uz istovremenu diskriminaciju svih neprikladnih (engl. *noncognate*) proteinogenih i neproteinogenih² aminokiselina. Diskriminacija neprikladnih aminokiselina puno je veći problem nego diskriminacija neprikladnih tRNA, prvenstveno jer su aminokiseline puno manje molekule nego tRNA i često nemaju dovoljno izražene strukturne razlike na temelju kojih ih aaRS mogu jednostavno razlikovati. Primjerice, aminokiseline izoleucin i valin se razlikuju samo u jednoj metilenskoj skupini, pa je aktivacija valina koju katalizira enzim IleRS svega 200 × manje učinkovita od aktivacije pripadnog izoleucina. To znači da će se na svakih 200 aktiviranih izoleucina aktivirati i valin, koji će se onda ugraditi na izoleucinska mjesta u proteinima. Budući da je pokazano da se u proteinima valin pogrešno ugrađuje samo 1 u 3000 slučajeva na izoleucinska mjesta, očito postoje mehanizmi koji popravljaju navedenu pogrešku. AaRS, kao primjerice IleRS, razvile su mehanizme diskriminacije i popravka neprikladno vezanih aminokiselina kako bi ukupna razina pogreške u biosintezi proteina ostala na prihvatljivoj razini.

Današnje razumijevanje mehanizama popravka pogreške bazirano je prvenstveno na poznavanju kristalnih struktura aaRS, ali i na provedenim kinetičkim eksperimentima. Tako je pokazano da enzim može direktno hidrolizirati neprikladni aminoacil-adenilat već u sintetskom mjestu (slika 2: 2), što je pokazano za MetRS, SerRS i LysRS razreda II. Ovaj način popravka naziva se popravak pogreške prije prijenosa, i može biti tRNA-ovisan ili neovisan (slika 2: 1,



Slika 2. Shematski prikaz mehanizma popravka pogreške. Popravak pogreške prije prijenosa aminokiseline na tRNA odvija se disocijacijom neprikladnog aminoacil-adenilata (2) ili enzimskom hidrolizom neprikladnog aminoacil-adenilata u sintetskom mjestu (1, 3), pri čemu enzimaska hidroliza može biti neovisna (1) ili ovisna o tRNA (3). Misacilirana tRNA hidrolizira se mehanizmom popravka pogreške nakon prijenosa aminokiseline na tRNA u domeni za popravak (4).

² U svakoj stanici uz proteinogene aminokiseline postoji mnoštvo neproteinogenih aminokiselina, koje ne grade proteine, npr. ornitin koji sudjeluje u ciklusu ureje.

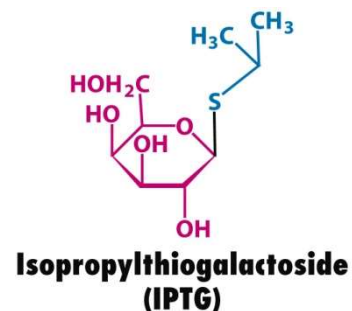
3). Drugi način popravka je popravak pogreške nakon prijenosa nepripadnog aminokiselinskog ostatka na tRNA, a karakterističan je za sedam aaRS (IleRS, ValRS, LeuRS, PheRS, ThrRS, ProRS, AlaRS) koje nisu u mogućnosti dovoljno dobro diskriminirati nepripadne aminokiseline u sintetskom mjestu, stoga su te aaRS razvile posebnu domenu za hidrolizu misacilirane tRNA (slika 2: 4). Sve ostale aaRS sposobne su diskriminirati sve nepripadne aminokiseline već u sintetskom mjestu te nisu razvile posebne mehanizme ili domene za popravak.

Priprema izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) i tRNA^{Ile} korištenjem sustava pET

Izoleucil-tRNA-sintetaza (IleRS) odgovorna je za esterifikaciju pripadnog izoleucina na izoakceptorske tRNA^{Ile}. Iako većina organizama u genomu sadrži samo jedan gen koji kodira za IleRS, neki organizmi u genomu sadrže dva gena koji kodiraju dva različita proteina IleRS. Primjerice, bakterija *Priestia megaterium* (stariji latinski naziv *Bacillus megaterium*) u genomu sadrži gene *ileS1* i *ileS2* koji kodiraju za proteine PmIleRS1 i PmIleRS2. U praktikumu ćete pripremiti oba enzima, kao i tRNA^{Ile} iz bakterije *P. megaterium*. Geni za PmIleRS1, PmIleRS2, te gen za tRNA^{Ile} iz *P. megaterium* (PmtRNA^{Ile}) ugrađeni su u plazmidne vektore pET sustava kako bi se omogućila njihova prekomjerna ekspresija u bakteriji *Escherichia coli*.

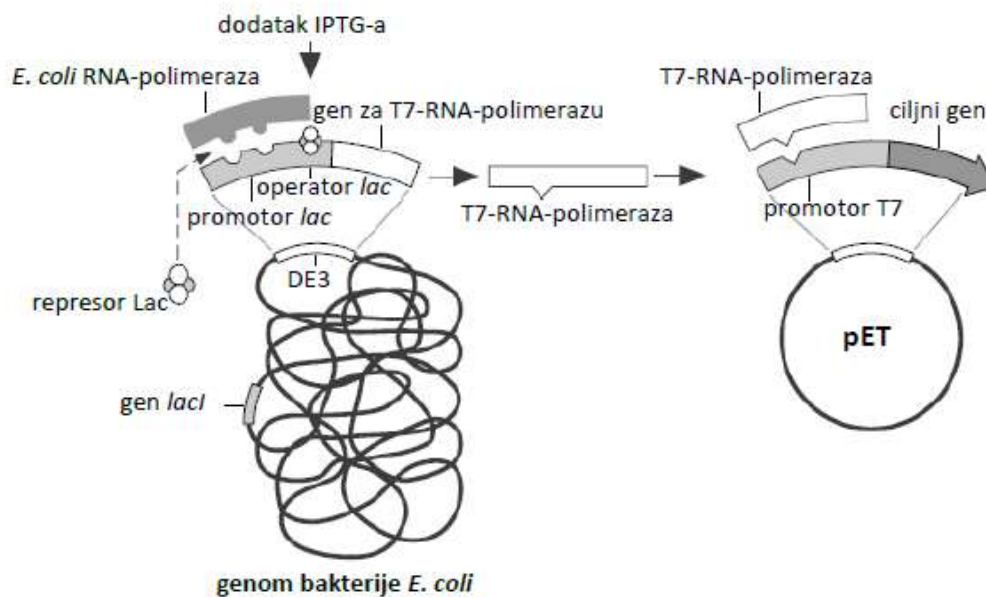
pET sustav za prekomjernu ekspresiju utemeljen je na genetičkim elementima iz bakteriofaga T7, a sastoji se od niza plazmidnih vektora pET te posebnog soja bakterije *E. coli*. Ciljni gen se ugrađuje u pET vektor između T7-promotora i T7-terminatora transkripcije. Važno je napomenuti da T7-promotor prepoznaje isključivo T7-RNA-polimerazu, a ne nativna RNA-polimeraza iz bakterije *E. coli*. Kako se onda postiže transkripcija s navedenog promotora?

U genom bakterije *E. coli* genetičkim inženjerstvom ugrađen je gen za T7-RNA-polimerazu. Ovakav soj se naziva BL21 (DE3) soj bakterije *E. coli*. Gen za T7-RNA-polimerazu je pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* i operatora *lac*. Promotor *lacUV5* je pod kontrolom nativne RNA-polimeraze iz *E. coli*. Genom bakterije uobičajeno sadrži i gen *lacI* (također pod kontrolom nativne RNA-polimeraze iz *E. coli*) koji kodira za represor Lac. Represor Lac se veže za operator *lac* i onemogućuje transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu. Dodatkom IPTG-a (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozida, analog alolaktoze, slika 3) inducira se transkripcija gena za T7-RNA-polimerazu sa promotora *lacUV5*, budući da se IPTG veže na represor Lac koji tada zbog promjene konformacije disocira s operatora *lac*. Novonastala T7-RNA-polimeraza prepoznaje T7-promotor na plazmidu pET (koji se nalazi uzvodno od gena od interesa u plazmidu pET) i transkribira nizvodni gen. Na ovaj način dodatkom IPTG-a u stanice bakterije *E. coli* soja BL21 (DE3) i korištenjem vektora serije pET postignuta je prekomjerna ekspresija ciljnog gena ugrađenog u navedeni vektor (slika 4.).



Unnumbered Figure 19.19
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Slika 3. Struktura molekule IPTG



Slika 4. Shematski prikaz ekspresijskog sustava pET. Gen za T7-RNA-polimerazu ugrađen je kao lizogen u genom bakterije *E. coli* soja BL21 (DE3) i pod kontrolom je inducibilnog promotora *lac*. Genom bakterije sadrži i gen za represor Lac koji se veže na operator *lac* i sprječava transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu. Dodatkom IPTG-a aktivira se ekspresija T7-RNA-polimeraze koja onda prepoznaje promotor T7 unutar vektora serije pET i transkribira sljedove koji su nizvodno od promotora T7.

Cilj praktikuma

Praktikum iz Biokemije 2 zamišljen je kao skup međusobno povezanih vježbi (L, EC, E, P i R). U vježbi L naučit ćete koristiti restrikcijske endonukleaze i njihovu važnost u genetičkom inženjerstvu. U vježbi EC izolirat ćete nadeksprimiranu molekulu PmtRNA^{le} (nadekspresija je napravljena u bakteriji *E. coli*), a uspješnost izolacije ćete provjeriti u vježbi E. U vježbi P ćete pročistiti nadeksprimirane proteine PmlleRS1 i PmlleRS2 (nadekspresija je napravljena u bakteriji *E. coli*) afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. U istoj vježbi ćete provjeriti uspješnost pročišćavanja poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) i odrediti frakcije najbogatije proteinima metodom po Bradfordu. Konačno, u vježbi R ćete ispitati dolazi li do nastanka kompleksa između enzima PmlleRS i PmtRNA^{le}, te vežu li oba enzima pripadnu tRNA jednako dobro.

Naime, proteini PmlleRS su proizvedeni u bakteriji *E. coli*, ali kodirajući sljedovi za navedene proteine dolaze iz bakterije *P. megaterium*. Heterologna ekspresija proteina se danas rutinski provodi u bakteriji *E. coli*, te osim za specifične eukariotske proteine ne predstavlja preveliki problem. Međutim, heterologna ekspresija PmtRNA^{le} u bakteriji *E. coli* je potencijalni problem, jer bakterija *E. coli* možda neće biti u mogućnosti stvoriti funkcionalnu PmtRNA^{le} koju dobro prepoznaju proteini PmlleRS. Naime, moguće je da enzimi PmlleRS prepoznaju PmtRNA^{le} samo ako je ispravno posttranskripcijski modificirana, a pitanje je da li enzimi koji u bakteriji *E. coli* sudjeluju u procesiranju primarnih tRNA transkripata mogu provesti modifikacije kakve se prirodno nalaze u PmtRNA^{le} iz bakterije *P. megaterium*. Ako su takve modifikacije bitne za aktivnost PmtRNA^{le}, a ne mogu nastati u bakteriji *E. coli*, onda enzimi PmlleRS neće moći koristiti heterologno eksprimiranu PmtRNA^{le} kao svoj supstrat. Ovo može predstavljati eksperimentalni problem jer je pročišćavanje nativne PmtRNA^{le} iz bakterije *P. megaterium* iznimno mukotržno. Stoga, tijekom praktikuma želite odgovoriti na sljedeća pitanja:

- Hoće li proteini PmlleRS1 i PmlleRS2, heterologno nadeksprimirani u bakteriji *E. coli*, moći vezati PmtRNA^{le} heterologno nadeksprimiranu u bakteriji *E. coli*?
- Hoće li oba proteina, PmlleRS1 i PmlleRS2, jednako dobro prepoznati i vezati pripadnu PmtRNA^{le}?
- Je li pokretljivost oba proteina jednaka u nativnoj gel-elektroforezi?

Ostale vježbe obuhvaćaju termičku denaturaciju DNA (vježba T) i supresiju terminacijskog kodona pomoću supresorske tRNA (vježba B).

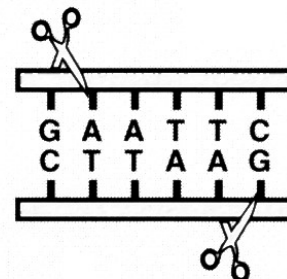
VJEŽBA L: CIJEPANJE PLAZMIDA RESTRIKCIJSKIM ENDONUKLEAZAMA *Xho*I I *Nco*I

Uvod

Otkriće restrikcijskih endonukleaza je dovelo do razvoja tehnika rekombinantne DNA. Spomenute tehnike omogućuju spajanje odsječaka DNA iz najrazličitijih izvora s prikladnim molekulama DNA koje se samostalno repliciraju (vektorima). Tako nastale rekombinantne molekule se mogu klonirati (višeputno umnožiti) unošenjem u stanice domaćina gdje se umnažaju koristeći se staničnim enzimima za replikaciju DNA. Ukoliko rekombinantna DNA sadrži gen, on se u stanici domaćina može transkribirati i translirati dajući rekombinantni protein. Tehnike rekombinantne DNA omogućuju istraživanje funkcije, strukture i evolucije gena, a omogućuju i dobivanje velikih količina proteinskih produkata ekspresijom kloniranih gena.

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju određene sljedove u lancu DNA, vežu molekule DNA i cijepaju okosnicu DNA na točno definiran način (slika 5 i 6). Biološka uloga ovih enzima je zaštita bakterijske stanice od stranih molekula DNA (primjerice od infekcije s DNA bakteriofaga). Sljedovi baza u molekuli DNA koje prepoznaju ovi enzimi su često palindromi, dakle sljedovi koji imaju dvostruku os simetrije. Svaki pojedini restrikcijski enzim prepoznaje svoj sljed i cijepa ga uvijek na isti način (slika 5). Tako cijepanjem mogu nastajati tupi krajevi ili krajevi koji strše na 5'-kraju ili 3'-kraju. Stršeći krajevi se nazivaju i ljepljivi (kohezivni) krajevi, jer se mogu međusobno spariti, stvarajući vodikove veze među bazama. Restrikcijske endonukleaze (Tablica 1) dobivaju naziv prema bakteriji iz koje su izolirane, prvo slovo dolazi od roda, druga dva slova u imenu su prva dva slova bakterijske vrste, iza čega može slijediti slovo koje označava soj ili rimski broj, ukoliko je iz tog organizma izolirano više enzima.

Pocijepamo li neku veću molekulu DNA određenim restrikcijskim enzimom, nastat će različiti odsječki DNA, čija će veličina ovisiti o broju mjesta na kojima enzim cijepa početnu molekulu. Analiziramo li jednu takvu enzimsku razgradnju elektroforezom u agaroznom gelu, možemo uočiti različite fragmente i na temelju njihovih veličina konstruirati restrikcijsku kartu ispitivane molekule DNA.



Slika 5. Prikaz slijeda koji prepoznaje i cijepa restrikcijska endonukleaza *EcoRI* iz bakterije *Escherichia coli* (soj RY13). Slijed baza gornjeg lanca pisan je od 5'-kraja prema 3'-kraju. Naznačen je i način cijepanja, vidljivo je da ovaj enzim ostavlja stršeće krajeve na 5'-kraju.



Slika 6. Trodimenzijska struktura restrikcijske endonukleaze *HindIII* u kompleksu s DNA. Restrikcijske endonukleaze su najčešće homodimeri i posjeduju os dvostruke simetrije, pa stoga prepoznaju palindromske sljedove u DNA koji također imaju os simetrije drugog reda. PDB kôd: 2e52, N. Watanabe i sur.

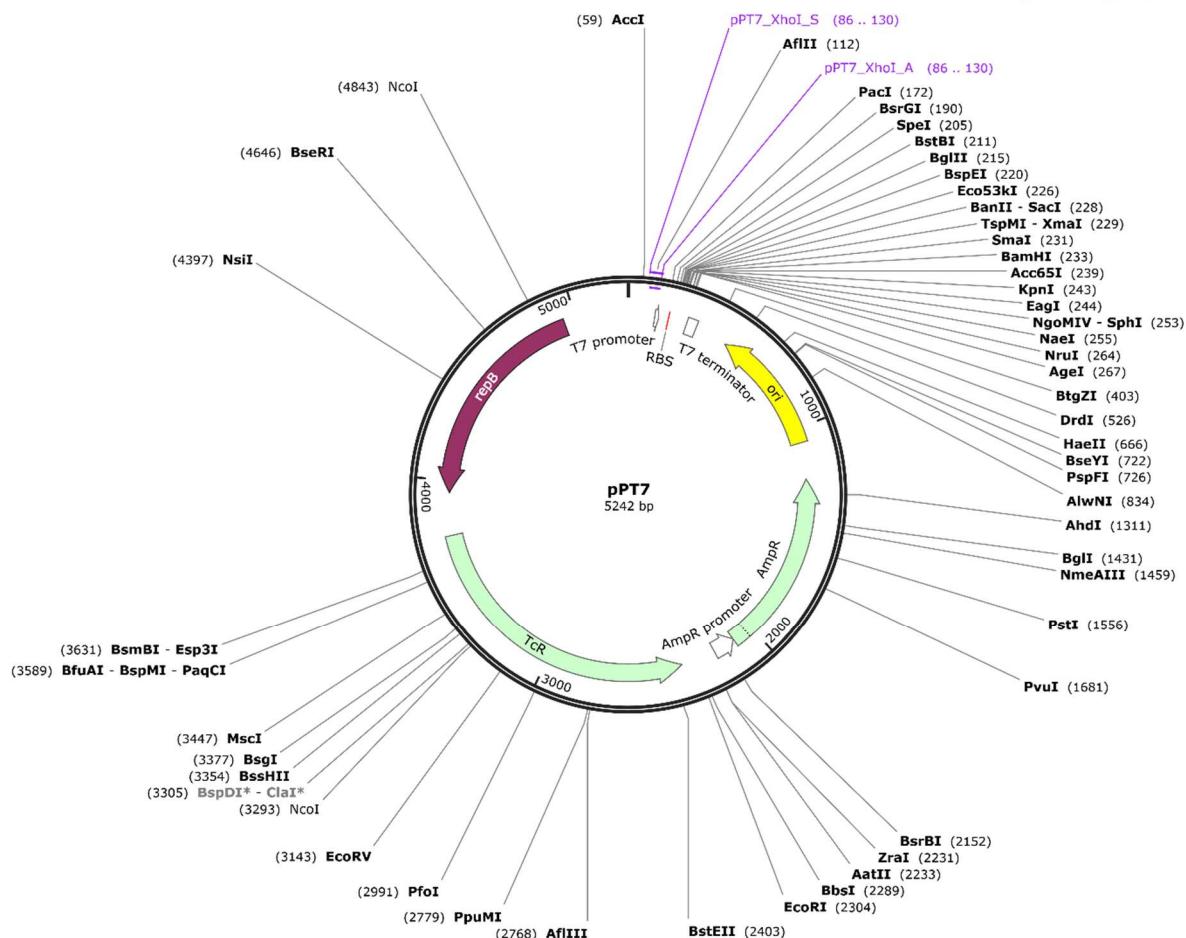
Tablica 1. Primjer nekih restrikcijskih endonukleaza.

Restrikcijska endonukleaza	Gen iz organizma	Mjesto prepoznavanja	Rezultat cijepanja
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	G/AATTC CTTAA/G	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	A/AGCTT TTCGA/A	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA/G GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	CCC/GGG GGG/CCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'

Plazmidi su kružne, dvolančane molekule DNA koje postoje u bakterijama kao genetički materijal neovisan o bakterijskom kromosomu. U molekularnoj biologiji plazmidi služe kao vektori (prenositelji) ispitivane DNA u bakterijske stanice. Uz plazmide i bakterijski virusi mogu poslužiti kao pogodni vektori. Plazmidi sadrže vlastito ishodište replikacije i kao takvi se umnažaju odvojeno od bakterijskog genoma, ali ipak koriste sve enzime za replikaciju kao i genomska DNA bakterije. Plazmidi nisu nužni za opstanak bakterije, ali često nose gene koji bakterijama daju svojstva koja im donose selektivnu prednost u nepovoljnim uvjetima. Primjeri za to su geni za otpornost na antibiotike, za proizvodnju antibiotika, za proizvodnju toksina, za otpornost na teške metale, za razgradnju složenih organskih spojeva, te za restrikcijske i modifikacijske enzime.

Plazmidi koje koristimo u ovoj vježbi su izolirani iz bakterija *E. coli* prema standardnom protokolu tzv. 'alkalnom lizom' na sljedeći način: bakterije su uzgajane preko noći na 37 °C do rane stacionarne faze. Bakterije su oborene centrifugiranjem i talog bakterija resuspendiran je u malom volumenu odgovarajućeg pufera. U suspenziju stanica dodana je otopina NaOH i SDS-a, pri čemu dolazi do razaranja stanične stijenke i membrane te denaturacije proteina i nukleinskih kiselina. Smjesa je neutralizirana dodatkom otopine kalijevog acetata, koji taloži kompleks SDS-a, denaturiranih proteina i genomske DNA. Plazmid i degradirana RNA zaostaju u otopini. Talog SDS-a i denaturiranih makromolekula ukloni se centrifugiranjem, a supernatant koji sadrži plazmid i fragmente RNA dodatno se pročisti ekstrakcijom fenol-kloroformom u svrhu uklanjanja zaostalih lipida i proteina. Plazmidna DNA istaloži se dodatkom etanola, i otopi u malom volumenu pufera uz dodatak RNaze A, radi potpune razgradnje zaostale RNA. Nakon kratke inkubacije, RNaza A ukloni se ekstrakcijom fenol-kloroformom, a plazmidna DNA istaloži se dodatkom PEG-a 8000 koji selektivno taloži nukleinske kiseline visoke molekulske mase.

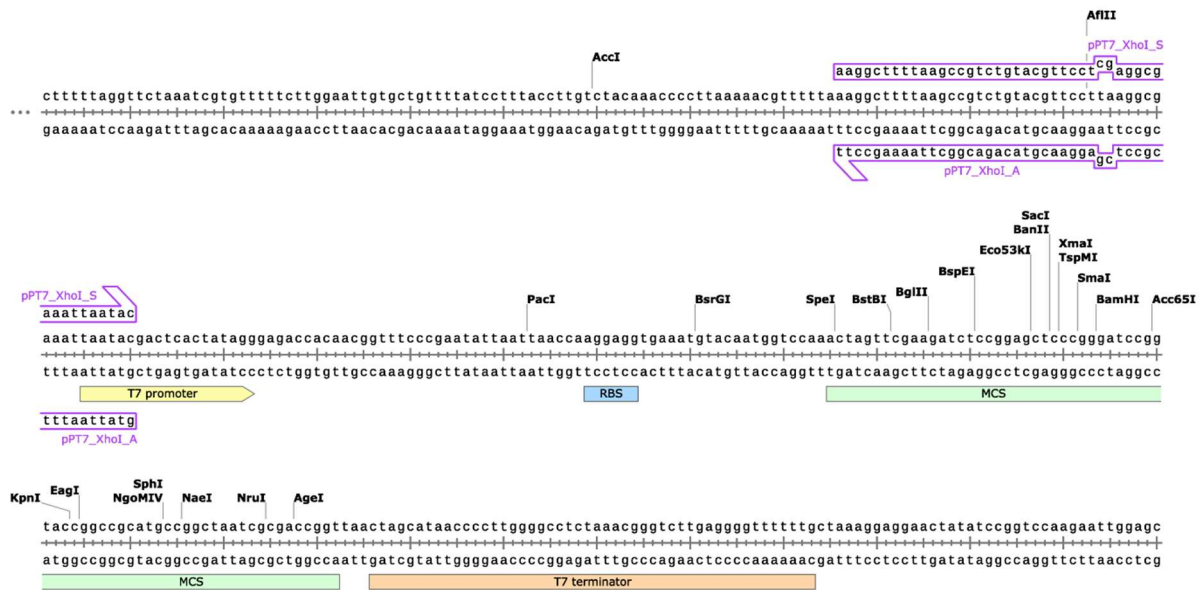
Na slici 7 je prikazana shema plazmidnog vektora pPT7, veličine 5242 bp. Plazmid pPT7 je vektor koji sadrži dva ishodišta replikacije: *ori* koji mu omogućuje umnažanje u bakteriji *E. coli* (gram negativna bakterija) i *repB* koji mu omogućuje umnažanje u bakteriji *P. megaterium* (gram pozitivna bakterija). Uz to, plazmid sadrži dva gena koju mu omogućuju otpornost na antibiotike: AmpR omogućuje otpornost na antibiotik ampicilin u bakteriji *E. coli*, a TcR omogućuje otpornost na tetraciklin u bakteriji *P. megaterium*. Vi želite ugraditi gen za PmtRNA^{lle} (gen za tRNA^{lle} iz bakterije *P. megaterium*) u plazmidni vektor pPT7 tako da bude pod kontrolom T7-promotora kako bi heterologno i prekomjerno eksprimirali PmtRNA^{lle} u soju



Slika 7. Mapa plazmida pPT7.

BL21 (DE3) bakterije *E. coli*. Međutim, ako pogledate nukleotidni slijed plazmida pPT7 (slika 8) i višestruko mjesto kloniranja (engl. *multi cloning site*, MCS), vidjet ćete da se između T7-promotora i T7-terminatora nalazi mjesto za vezanje ribosoma (engl. *ribosome binding site*, RBS). Budući da vi želite prekomjerno ekspimirati molekulu tRNA, mjesto za vezanje ribosoma vam smeta, jer ne želite da dođe do translacije transkripta. Također, ne možete ugraditi gen za PmtRNA^{le} u neko restriksijsko mjesto iza T7-promotora jer ćete imati dodatne nukleotide između početka transkripta i PmtRNA^{le}, stoga vam i dio plazmida oko T7-promotora smeta. Jedan od načina da ugradite gen za PmtRNA^{le} je da kemijski sintetizirate sintetski polinukleotid koji sadrži sekvencu za T7-promotor nakon koje odmah slijedi gen za PmtRNA^{le} i ugradite takav polinukleotid u neko restriksijsko mjesto prije T7-terminatora. Međutim, onda ćete imati dva T7-promotora unutar plazmida, a to je potencijalni problem za dobivanje ispravnog transkripta. Kako bi izbacili dio vektora pPT7 koji sadrži T7-promotor i slijed RBS, odlučili ste ugraditi sintetski polinukleotid između restriksijskih mjesta *AflII* i *BamHI*. Međutim, u laboratoriju nemate restriksijski enzim *AflII*, ali imate restriksijski enzim *XhoI*. Stoga ste odlučili napraviti ciljanu mutagenezu s ciljem da se u mjesto za restriksijski enzim *AflII* (CTTAAG) uvedu mutacije tako da nastane mjesto za restriksijski enzim *XhoI* (CTCGAG), kako bi sintetski gen za PmtRNA^{le} ugradili koristeći restriksijska mjesta *XhoI* i *BamHI*. U tu svrhu dizajnirali ste dvije mutagene početnice, pPT7_XhoI_S i pPT7_XhoI_A. Mutagenim PCR-om ste umnožili ishodišni plazmidni vektor, te se nadate da ste uspješno dobili mutirani

plazmidni vektor pPT7_XhoI. Cilj ove vježbe je provjeriti je li ciljanom mutagenезom uvedeno restrikcijsko mjesto za enzim *XhoI* u plazmid pPT7.



Slika 8. Dio nukleotidnog slijeda plazmida pPT7. Na slici su prikazani T7_promotor i T7_terminator, mjesto vezanja ribosoma (RBS) i višestruko mjesto kloniranja (MCS). Mutagene početnice su označene sa pPT7_XhoI_S i pPT7_XhoI_A.

Reagensi

Pufer NEBuffer 3.1 (*New England Biolabs*) je u konačnoj reakciji sastava 50 mmol/dm³ Tris-HCl, pH 7,9, 100 mmol/dm³ NaCl, 10 mmol/dm³ MgCl₂, 100 µg/mL BSA. Pripremljeni pufer je 10 × koncentriran.

Restrikcijski enzim *XhoI* (*NEB*), 20 U/µL.

Restrikcijski enzim *NcoI* (*NEB*), 10 U/µL.

Jedna jedinica enzimske aktivnosti restrikcijskog enzima (1 U) je definirana kao ona količina enzima koja je potrebna za razgradnju 1 µg DNA faga λ tijekom 1 sata pri 37 °C u ukupnom reakcijskom volumenu 50 µL.

Asistent će 5 × razrijediti restrikcijske enzime u puferu 1 × NEBuffer 3.1, u ukupnom volumenu od 30 µL.

Na raspolaganju imate dva plazmida, nemutirani plazmid pPT7 i potencijalno mutirani plazmid pPT7_XhoI (masene koncentracije 50 ng/µL).

Izvođenje vježbe

- Kute, naočale i rukavice su obavezne!
- Restrikcijski enzim treba uvijek odložiti na led!
- Uvijek mijenjati nastavak i uzeti nekorišteni pri pipetiranju sljedeće otopine!
- Volumene manje od 20 µL pipetirajte pipetom koja omogućuje pipetiranje do najvećeg volumena od 20 µL! Pipetirajte PRECIZNO prema tablici 2.

- Najprije pipetirate vodu, zatim pufer i potom ostale komponente. Predlažemo da stavite kvačicu/oznaku pokraj svake komponente koju ste dodali kako ne biste pogriješili.
- Jedan student priprema razgradnju samo jednog plazmida. Označite tubice na čepiću s oznakama R1 (pPT7) ili R2 (pPT7_XhoI) i vlastitim inicijalima. Sa strane epruvete napišite turnus.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese

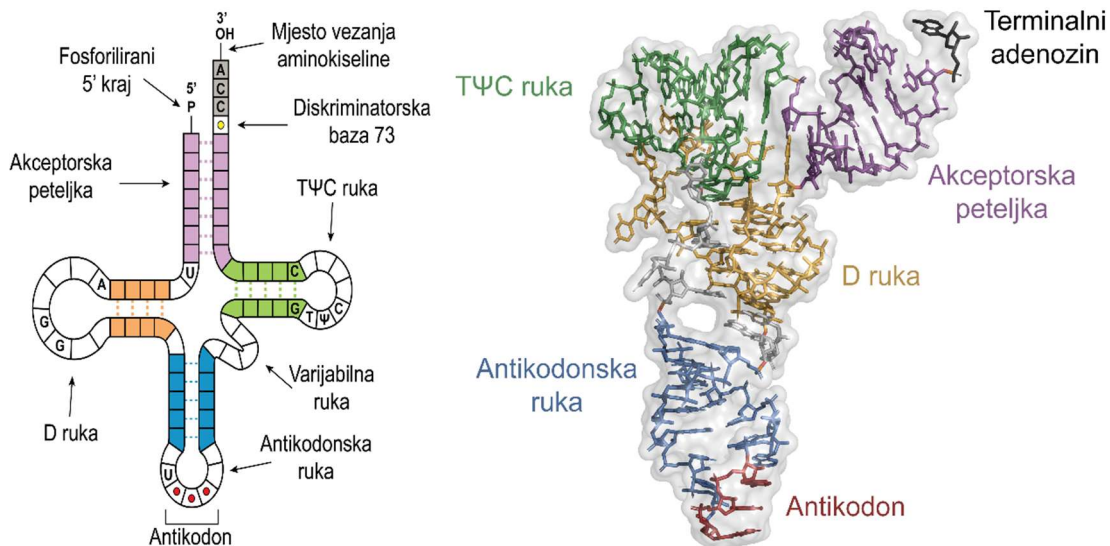
Reagens	R1	R2
10 × pufer NEBuffer 3.1	2 µL	2 µL
Plazmidna DNA (50 ng/µL)	5 µL pPT7	5 µL pPT7_XhoI
Enzim XhoI	2 µL	2 µL
Enzim NcoI	2 µL	2 µL
ReH ₂ O	9 µL	9 µL
Σ	20 µL	20 µL

Uzorke premjestite u termoblok ili inkubator kojeg ste prethodno namjestili na 37 °C i inkubirajte reakcije 2sata. Nakon toga, spremite epruvete u frižider na -20 °C. Rezultat ćete analizirati u vježbi E i odgovoriti na pitanja.

VJEŽBA EC: IZOLACIJA NADEKSPRIMIRANIH MOLEKULA tRNA

Uvod

Molekule tRNA su jednolančane molekule RNA građene od 60 do 95 nukleotida, tipično oko 76 nukleotida (slika 9). 5'-kraj je fosforilirani, dok 3'-kraj nije. Peteljka koja sadrži 3'- i 5'-kraj sastoji se od sedam parova baza i naziva se akceptorska peteljka jer se na slobodnu hidroksilnu skupinu 3'-kraja molekule tRNA veže aminokiselina koju tRNA prenosi. 3'-kraj završava slijedom CCA. Peteljke predstavljaju dvolančane uzvojnice u tRNA. Na akceptorsku peteljku na 5'-kraju molekule nastavlja se D-regija (D-ruka; engl. *D-arm*). Ona sadrži peteljku od svega tri ili četiri para baza. Ime je dobila po petlji kojom završava, a koja često sadrži modificiranu bazu dihidrouridin. Zatim slijedi antikodonska regija s peteljkom od pet parova baza i petljom u kojoj se nalazi triplet baza antikodona. Na 3'-kraju molekule tRNA slijed nukleotida prelazi iz akceptorske peteljke u peteljku T ψ C ili kraće T-regiju (T-ruku), nazvanj po očuvanom T ψ C slijedu. Simbol ψ označava pseudouridin, jednu od neuobičajenih baza. Između T-regije i antikodonske regije nalazi se varijabilna regija. To je mjesto najveće raznolikosti među poznatim molekulama tRNA. Može sadržavati od 3 do 21 nukleotida koji mogu formirati peteljku.



Slika 9. Sekundarna i terciarna struktura tRNA. Ljubičasta boja predstavlja akceptorsku peteljku, žuta predstavlja D-ruku, plava predstavlja antikodonsku ruku, a zelenom bojom označena je T ψ C ruka. Varijabilno područje obojano je bijelom bojom. Lijevo: sekundarna struktura tRNA oblika lista djeteline. Desno: terciarna struktura tRNA^{Phe} iz bakterije *Escherichia coli* (PDB kôd: 3LOU). Većina je baza sparena i sudjeluje u interakcijama slaganja baza. Uočite strukture zavojnica i kompaktnost molekule. Adaptirano iz I. Živković, Mehanizmi ostvarivanja supstratne specifičnosti u sintetskom i korektivnom mjestu izoleucil-tRNA-sintetaze, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021., str. 14.-15.

U sekundarnoj strukturi tRNA postoje očuvani položaji (engl. *invariant positions*) na kojima se javljaju uvijek isti nukleotidi, te djelomično očuvani (engl. *semi-invariant*) položaji s nukleotidima istog tipa (samo purinska ili samo pirimidinska baza). Oni se obično nalaze u petljama. Neki očuvani položaji već su spomenuti (CCA slijed na 3'-kraju, T ψ C slijed u T-petlji).

Gen za PmtRNA^{Ile} (antikodon GAT) iz bakterije *Priestia megaterium* ugrađen je u plazmidni vektor pET Δ 3, čime je dobiven rekombinantni plazmid pET Δ 3_PmtRNA^{Ile} koji je transformiran u soj BL21(DE3) bakterije *E. coli*. Navedeni plazmid nosi gen za ampicilinsku rezistenciju, pa bakterije koje su primile navedeni plazmid mogu rasti na hranjivim podlogama u prisutnosti ampicilina. Transformirane stanice *E. coli* uzgojene su u odgovarajućem mediju,

a dodatkom IPTG-a potaknuta je prekomjerna ekspresija PmtRNA^{lle}. Nakon indukcije stanice su istaložene i na raspolaganju imate taloge induciranih bakterijskih stanica.

Cilj vježbe je izolirati ukupnu tRNA iz taloga bakterijskih stanica. S obzirom da ukupna tRNA sadrži prekomjerno ekspimiranu bakterijsku PmtRNA^{lle}, na ovaj način se izolira ukupna tRNA koja sadrži veliki udio bakterijske PmtRNA^{lle}. Uzorak ukupne tRNA obogaćen bakterijskom PmtRNA^{lle} kasnije će se koristiti u nativnoj elektroforezi (vježba R).

Izvođenje vježbe:

- Kute, naočale i rukavice su obavezne!
- Pazite da centrifuga bude uvijek uravnotežena i epruvete čvrsto zatvorene prije centrifugiranja!
- **Epruvete koje sadrže fenol kao otpad odložite na zasebno mjesto koje će odrediti asistent! Fenol dodati u digestoru!**
- Sve raditi na sobnoj temperaturi, osim ako nije drukčije naglašeno! Eventualno odložiti uzorke na led dok čekaju u nekim međufazama.

Postupak izolacije tRNA temelji se na ekstrakciji nukleinskih kiselina iz bakterije *E. coli* pomoću fenola, pri čemu fenol permeabilizira i razara stanice, te denaturira proteine.

Protokol

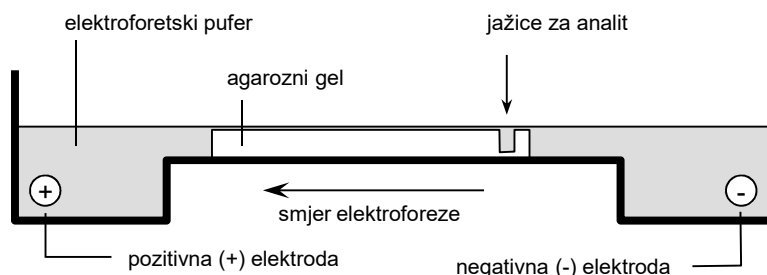
1. Talog dobro resuspendirati u 300 μL pufera za izolaciju tRNA (10 mmol/dm^3 Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/dm^3 $\text{Mg}(\text{OAc})_2$).
2. Izdvojiti alikvot od 150 μL i **OPREZNO** dodati 150 μL fenola solubiliziranog vodom.
3. Žestoko potresati 2-3 min (može se koristiti i vorteks ili rotator uz brzinu okretanja od 20 rpm). Fenol "curi" iz mikroepruveta čak i kada su mikroepruvete čvrsto zatvorene. Zato pažljivo i po mogućnosti omotajte čep parafilmom!
4. Razdvojiti organski i vodeni sloj centrifugiranjem 5 min pri 10 000 rpm.
5. Prebaciti 100 μL vodenog sloja u novu epruvetu, istaložiti nukleinske kiseline dodatkom 1/10 volumena (10 μL) 3 mol/dm^3 NaOAc pH 4,8 i 2,5-3 volumena (300 μL) ledeno-hladnog 96% etanola.
6. Inkubirati uzorak na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ minimalno 20 minuta, potom centrifugirati 20 min pri 10 000 rpm. Trebao bi nastati vidljiv bijeli talog. Pažljivo ukloniti supernatant pipetom pazeći da se pri tom ne povuče talog.
7. Talog isprati s 1 mL 70 %-tnog ledeno hladnog etanola, centrifugirati 5 min, posušiti na termobloku pri $50\text{ }^\circ\text{C}$ ili u *speed vac*-u.
8. Otopiti u 50 μL pufera za izolaciju tRNA. Ukoliko se talog ne otopi, dodati još pufera (npr. još 50 μL).
9. Napišite na mikroepruvetu: EC, turnus i vaše inicijale te ju smrznite na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

VJEŽBA E: ELEKTROFOREZA NUKLEINSKIH KISELINA NA GELU AGAROZE

Uvod

Nukleinske kiseline u gelu mogu se detektirati na različite načine. Najrasprostranjeniji način je bojanje fluorescentnom bojom, etidij-bromidom. To je interkalirajući agens (veže se umetanjem između dvaju parova baza) te je najučinkovitiji pri detekciji dvolančane DNA. Identificira se pobudom UV-svjetlom ($\lambda = 312 \text{ nm}$) uslijed koje fluorescira narančasto. Potencijalni je mutagen, stoga s otopinama koje sadrže etidij-bromid treba pažljivo rukovati. U praktikumu koristimo boju *GelRed* koja ima slične karakteristike kao i etidij-bromid, ali je manje toksična. No, bez obzira, i s otopinama koje sadrže *GelRed* treba pažljivo rukovati.

Uzorci koji se nanose u jažice pomiješani su s puferom za nanošenje na gel koji sadrži boje bromfenol plavo i ksilencijanол kako bismo pratili brzinu kretanja uzoraka, te saharozu ili glicerol radi lakšeg nanošenja uzorka na gel. Elektroforeza se provodi u kadici za elektroforezu (slika 10) pod naponom od 120 V pri sobnoj temperaturi u trajanju od 45 minuta.



Slika 10. Shematski prikaz aparature za horizontalnu elektroforezu.

Reagensi

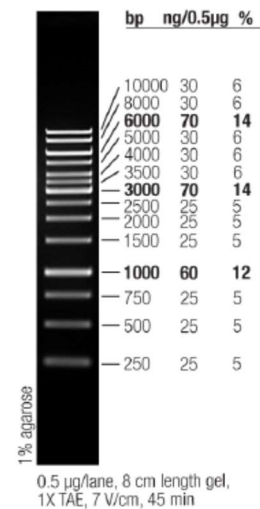
6 × boja za nanošenje uzoraka i praćenje tijekom elektroforeze: 10 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH 7,6, 0,03% (w/v) bromfenol plavo, 0,03% (w/v) ksilencijanол FF, 60% glicerol (w/v), 60 mmol dm^{-3} EDTA, *GelRed*.

1 %-tni (w/v) agarozni gel

50 × TAE pufer.

Marker molekularne mase *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*

GeneRuler 1 kb DNA Ladder



Upute za pripremu agaroznih gelova

1. Potrebno je pripremiti 300 mL 1% otopine (w/v) agaroze u puferu 1 × TAE (40 mmol dm⁻³ Tris, 20 mmol dm⁻³ CH₃COOH, 1 mmol dm⁻³ EDTA, pH 8).
2. Izvažite potrebnu količinu agaroze i odmjerite potrebnu količinu pufera.
3. Bocu s puferom i agarozom potrebno je poklopiti čepom (**NE ZAVRTATI ČEP** da ne bi došlo do prevelikog pritiska tijekom grijanja i staviti u mikrovalnu pećnicu).
4. Odaberite željeno vrijeme i snagu na gumbima mikrovalne pećnice (potrebno je cca 3 minute pri jačini 600 W za ovu količinu agaroze i pufera). Za vrijeme otapanja promatrajte što se događa u boci kako biste na vrijeme prekinuli zagrijavanje. Poželjno je zagrijavati otopinu u intervalima.
5. Otopina je pripremljena kada se sva agarozna otopila (otopina će početi ključati).
6. Izvadite bocu iz mikrovalne posebnom rukavicom **VRLO OPREZNO** jer je vruća i ostavite da se hladi.
7. Kada se otopina dovoljno ohladila (tako da bocu s otopinom možete držati u ruci, a da se ne opečete), izlijte otopinu u pripremljenu kadnicu s češljevima postavljenim u otore.
8. Nakon što se gel polimerizirao i ohladio možete ga koristiti ili ga prebacite u kutiju s puferom 1 × TAE i pohranite.

Izvođenje vježbe

- Kute, naočale i rukavice su obavezne!
- Uvijek mijenjati nastavak i uzeti nekorišteni pri pipetiranju sljedeće otopine!
- Volumene manje od 20 µL pipetirajte pipetom koja omogućuje pipetiranje do najvećeg volumena od 20 µL!

Protokol

1. Izvadite iz frižidera vaše uzorke razgradnje (vježba L) i tRNA (vježba EC).
2. Pripremite uzorke prema tablici 3.
3. Nanesite uzorke na gel prema predloženom rasporedu u tablici 3.
4. Na svaki gel stavite i 10 µL markera molekulskih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.
5. Elektroforeza se provodi u puferu TAE u kadnici za elektroforezu pod naponom od 120 V pri sobnoj temperaturi u trajanju od 35-40minuta odnosno dok se boje dovoljno ne razdvoje.

Tablica 3. Priprema uzoraka za nanošenje na gel.

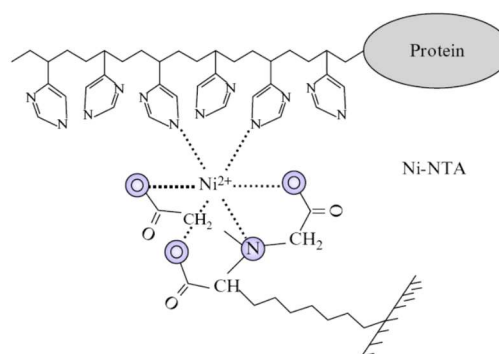
	pPT7	pPT7_XhoI	Svaki student (razgradnje)	Svaki student (tRNA)
uzorak	2 µL	2 µL	R1/R2 (cijela smjesa)	3 µL
boja	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
ReH₂O	15 µL	15 µL	-	14 µL
Σ	20 µL	20 µL	23 µL	20 µL

Gel ćete pogledati i snimiti CCD kamerom pod UV svjetlom.

VJEŽBA P: PROČIŠĆAVANJE PROTEINA S POLIHISTIDINSKIM PRIVJESKOM NA Ni-NTA AGAROZI

Uvod

Polihistidinski privjesak je slijed od najčešće 6 uzastopnih histidina i njime obilježeni proteini mogu se pročistiti afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *immobilized metal-ion affinity chromatography*). Afinitetna kromatografija se temelji na specifičnim interakcijama između dvije molekule, npr. receptora i liganda, enzima i supstrata, antigena i antitijela, itd. U slučaju kromatografije na nosaču s imobiliziranim metalnim ionom, protein se preko histidinskog privjeska veže na metalni ion (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ili Cu^{2+}), koji je u kompleksu s imobiliziranim agensom na kuglicama. U svrhu brzog i jednostavnog pročišćavanja, proteini su u ovoj vježbi prekomjerno ekspimirani s histidinskim privjeskom na N-kraju proteina. U postupku pročišćavanja kao kromatografsko punilo koristimo Ni^{2+} -NTA agarozu.



Slika 11. Interakcija bočnih ogranaka histidina iz histidinskog privjeska s ionom nikla u Ni-NTA agarozu

Nitrilotrioctena kiselina (eng. *nitrilo triacetic acid*, NTA) vezana je na 4 od ukupno 6 veznih mjesta u koordinacijskoj sferi iona nikla, dok se na preostala 2 vezna mjesta vežu histidini iz histidinskog privjeska (slika 11). Propuštanjem smjese proteina iz proteinskog ekstrakta kroz kolonu, na nju će se vezati samo onaj protein koji specifično veže imobilizirani ligand. Protein se s kolone eluira imidazolom, koji je strukturno sličan bočnom ogranku histidina, te se umjesto njega veže na Ni^{2+} .

Geni za IleRS iz bakterije *P. megaterium* (PmlleRS1 i PmlleRS2) ugrađeni su u plazmidni vektor pET28b. Ovaj vektor sadrži kodirajući slijed za afinitetni heksahistidinski privjesak (His_6 -privjesak). U rekombinantnim plazmidnim vektorima pET28b_His-PmlleRS1 i pET28b_His-PmlleRS2 otvoreni okviri čitanja gena za PmlleRS1 i PmlleRS2 poklapaju se s otvorenim okvirom čitanja kodirajućeg slijeda za His_6 -privjesak te ekspresijom fuzijskih gena nastaju fuzijski proteini PmlleRS1, odnosno PmlleRS2 s His_6 -privjeskom (His_6 -PmlleRS1 i His_6 -PmlleRS2). Vektor pET28b nosi gen za kanamicinsku rezistenciju, pa bakterije koje su primile navedeni plazmid mogu rasti na hranjivim podlogama u prisutnosti kanamicina.

Bakterijske stanice su prethodno uzgojene na sljedeći način. Uzgojene su zasićene prekončne kulture stanica *E. coli* soja BL21 (DE3) koje su transformirane vektorom **pET28b_His-PmlleRS1**, odnosno **pET28b_His-PmlleRS2**. Zasićene prekončne kultura razrijeđene su u omjeru 1:100 u 500 mL svježeg LB medija s kanamicinom, te uzgajane pri temperaturi od 30 °C do optičke gustoće $\text{OD}_{600} = 0,2$. Zatim je dodan ZnCl_2 do konačne koncentracije 1 mmol/dm³ i stanice su dalje rasle do optičke gustoće $\text{OD}_{600} = 0,5-0,6$. Stanice su inducirane dodatkom IPTG-a (konačna koncentracija 0,25 mmol/dm³) u trajanju od 3 sata pri temperaturi od 30 °C za protein His_6 -PmlleRS1, odnosno u trajanju od 16 sati pri temperaturi od 15 °C za protein His_6 -PmlleRS2, pri čemu dolazi do prekomjerne ekspresije fuzijskih proteina. Stanice se nakon uzgoja obore centrifugiranjem u trajanju od 15 minuta pri 5000 × g na 4°C. Nakon centrifugiranja, medij je odstranjen, a talog stanica resuspendiran u 5 mL pufera A, uz dodatak 0,1 mmol dm⁻³ PMSF, 13 µg/mL lizozima i 20 µg/mL DNaze I.

Stanice se soniciraju uz pomoć ultrazvuka 8 puta po 45 sekundi s pauzama na ledu od jedne minute. Stanični ostaci se istalože centrifugiranjem u trajanju 1 sat pri $10\,000 \times g$ na 4°C . Supernatant sadrži proteinski ekstrakt koji se alikvotira po 0,5-1 mL i koristi za pročišćavanje proteina His₆-PmlleRS1 i His₆-PmlleRS2 afinitetnom kromatografijom na Ni²⁺-NTA agarozima.

Izvođenje vježbe

- Kute, naočale i rukavice su obavezne!
- Uvijek mijenjati nastavak i uzeti nekorišteni pri pipetiranju sljedeće otopine!
- Volumene manje od 20 μL pipetirajte pipetom od max 20 μL !
- Držati pufere i vodu uvijek na ledu!
- Čuvati proteinski ekstrakt na ledu!
- Dio studenata pročišćava protein His₆-PmlleRS1, a dio studenata pročišćava protein His₆-PmlleRS2.

Kromatografski puferi

Otopina	Sastav
Pufer A	20 mmol/dm ³ Hepes-KOH, pH 7,5, 500 mmol/dm ³ NaCl, 5 mmol/dm ³ MgCl ₂ , 10 mmol/dm ³ imidazol, 10 mmol/dm ³ β -merkaptetoetanol
Pufer B	20 mmol/dm ³ Hepes-KOH, pH 7,5, 500 mmol/dm ³ NaCl, 5 mmol/dm ³ MgCl ₂ , 20 mmol/dm ³ imidazol, 10 mmol/dm ³ β -merkaptetoetanol
Pufer C	20 mmol/dm ³ Hepes-KOH, pH 7,5, 500 mmol/dm ³ NaCl, 5 mmol/dm ³ MgCl ₂ , 200 mmol/dm ³ imidazol, 10 mmol/dm ³ β -merkaptetoetanol

Otopine za čišćenje i pohranjivanje Ni-NTA agaroze

Otopina	Svrha
2 mol/dm³ imidazol	Otopina za čišćenje Ni-NTA agaroze
20% (v/v) etanol	Otopina za pohranjivanje Ni-NTA agaroze

$$c(\beta\text{-merkaptetoetanol}) = 14,3 \text{ mol dm}^{-3}$$

Pročišćavanje proteina

1. Izračunati i dodati odgovarajući volumen β -merkaptoetanolu u pufere A, B i C, radeći pritom u digestoru.
2. 400 μ L suspenzije agaroznih kuglica supstituiranih niklom (Ni^{2+} -NTA agaroz) nanijeti na kolonu.* Napomena: kolona s Ni-NTA agarozom ne smije presušiti tijekom izvođenja vježbe!
3. Maknuti čepić i odložiti ga na čisti komad papira. Pustiti da tekućina iz kolone isteče u čašicu.
4. Nanijeti na kolonu 8 CV hladne redestilirane vode.
5. Nanijeti na kolonu 8 CV hladnog pufera A.
6. Odvojiti po 15 μ L proteinskog ekstrakta u novu mikroeprovetu i označite s PE, turnus, inicijali.
7. Nanijeti proteinski ekstrakt (ukupni proteinski ekstrakt iz *E. coli* s nadeksprimiranim proteinom). Pustiti da ekstrakt isteče iz kolone i prikupite ovu nevezanu frakciju kao NF, turnus, inicijali (engl. *flow-through*).
8. Isprati sa 28 CV hladnog pufera A. Pustiti da isteče. Sakupite ove uzorke ispiranja kao ISPA, turnus, inicijali.
9. Isprati sa 8 CV hladnog pufera B. Pustiti da isteče. Sakupite ove uzorke ispiranja kao ISPB, turnus, inicijali.
10. Eluirati proteine vezane na Ni^{2+} -NTA agarozu pomoću hladnog pufera C. Eluirajte kolonu u 5 obroka po 200 μ L pufera C. Sakupite eluate kao zasebne frakcije u 5 polipropilenskih mikroepreveta ("epica"). Frakcije označite F1 – F5, turnus, inicijali prema redoslijedu elucije.

Čuvati sve prikupljene uzorke (PE, NF, ISPA, ISPB, F1-F5) na ledu dok ih asistent ne pospremi!

* Budući da se Ni-NTA agaroz čuva kao 50%-tna otopina u 20%-tnom etanolu, dodatkom 400 μ L suspenzije zapravo dodajete 200 μ L Ni-NTA agaroze. Volumen od 200 μ L Ni-NTA agaroze predstavlja 1 volumen kolone (1 CV, engl. *column volume*).

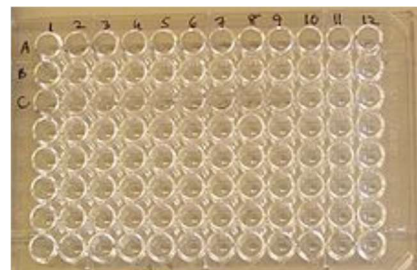
Čišćenje Ni^{2+} -NTA kolone

1. Nanesite 2 CV 2 mol/dm³ imidazola. Pustite da isteče.
2. Isperite kolonu sa 8 CV ReH_2O . Pustite da isteče.
3. Dodajte 1 CV 20% etanola. Suspenziju etanola i Ni-NTA agaroze prebacite u bočicu s oznakom "korištena Ni-NTA".

Provjera prisutnosti proteina u eluatima pomoću Bradfordovog reagensa

Bradfordov reagens sadrži kiselu otopinu boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* koja ima maksimum apsorbancije pri valnoj duljini od 465 nm i otopina se čini sivkasto-tamnocrvena. Molekule boje su u anionskom obliku i vežu se sulfonskim skupinama uglavnom za arginin, histidin i lizin, ali i za tirozin, triptofan i fenilalanin jer osim elektrostatskih interakcija, za vezanje boje i proteina u kompleks važne su hidrofobne i Van der Waalsove interakcije. Prilikom vezanja boje za protein, maksimum se pomiče na valnu duljinu od 595 nm i otopina se čini plavom.

Bradfordov reagens se najčešće koristi za kvantitativno određivanje koncentracije proteina. Pri tome se upotrebljavaju standardi poznatih koncentracija pomiješani s Bradfordovim reagensom i nakon mjerenja apsorbancije iscrtava se baždarni pravac te interpolacijom odredi koncentracija proteina u željenom uzorku.



Slika 12. A Mikrotitarska pločica.

Bradfordov reagens se može primijeniti i u općenite svrhe za detekciju proteina u uzorku te za približnu procjenu koncentracije proteina nakon postupka pročišćavanja.

Protokol

1. U jažice mikrotitarskih pločica (slika 12) nanosite 50 μL već pripremljenog Bradfordovog reagensa i dodajte 10 μL frakcija koje ste skupili nakon elucije imidazolom (F1-F5). Prema intenzitetu boje, vizualno ćete odrediti koje frakcije sadrže najviše proteina.
2. U dogovoru s asistentom odabrat ćete uzorke za analizu na SDS-poliakrilamidnom gelu, a dvjema proteinskim frakcijama koje su dale najintenzivnije plavo obojenje odredit ćete masene koncentracije metodom po Bradfordu.
3. Isperite mikrotitarsku pločicu etanolom, a potom destiliranom vodom.

Priprema gelova za SDS-gel-elektroforezu

U praktikumu se koristi aparatura *Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio-Rad*.

Potrebno je pripremiti 3-4 gela, ovisno o broju studenata.

1. Uz pomoć asistenta pripremite konstrukciju za izlijevanje gelova.
2. Pripremite smjesu gela za razdvajanje i smjesu gela za sabijanje prema protokolu ispod.

Gel za razdvajanje:

- 1 mL akrilamid/bisakrilamid 29:1 (T=40%, C=3,3%)
 - $T = ((m_{\text{akrilamid}} + m_{\text{bisakrilamid}})/g / V_{\text{smjese}}/ml) \times 100\%$
 - $C = (m_{\text{bisakrilamid}}/(m_{\text{akrilamid}} + m_{\text{bisakrilamid}})) \times 100\%$; tj. $(1/(29+1)) \times 100\%$
- 1 mL 4 × koncentriranog pufera za razdvajanje ($1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl, 4 g dm^{-3} SDS, pH 8,8)
- 2 mL ReH₂O
- 14 μL 20% APS*
- 2 μL TEMED*

Gel za sabijanje:

- 0,2 mL akrilamid/bisakrilamid 29:1 (T=40%, C=3,3 %)
- 0,5 mL 4 × koncentriranog pufera za sabijanje ($0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl, 4 g dm^{-3} SDS, pH 6,8)
- 1,3 mL ReH₂O
- 7 μL 20% APS*
- 1 μL TEMED*

*APS i TEMED se dodaju neposredno prije izlijevanja.

3. U smjesu gela za razdvajanje dodajte APS i TEMED te promiješajte.
4. Pomoću pipete ulijte oko 3-3,5 mL smjese gela za razdvajanje između stakala. Pazite da ne unesete mjehuriće zraka!
5. Na rub nepolimeriziranog gela POLAKO nanesite 0,5 mL vode.
6. Pustite da gel polimerizira 30 min.
7. Odlijte vodu sa polimeriziranog gela za razdvajanje.
8. U smjesu gela za sabijanje dodajte APS i TEMED te promiješajte.
9. Smjesu pipetom nanesite do gornjeg ruba nižeg stakla. Pazite da na površini ne bude mjehurića zraka.
10. Kako bi oblikovali jažice, potrebno je umetnuti češalj s 10 jažica.
11. Nakon 30 minuta, pažljivo uklonite češalj pazeći da ne oštetite jažice.

Sastav elektroforetskog pufera (pH 8,3): $14,4 \text{ g dm}^{-3}$ glicin, $3,0 \text{ g dm}^{-3}$ Tris, $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ SDS

Analiza pročišćavanja pomoću SDS-poliakrilamidne elektroforeze

1. Uzorke pripremite u dogovoru s asistentom (u zagradi su predloženi volumeni)

Barem jedan student priprema sljedeće uzorke:

PE; proteinski ekstrakt, tj. supernatant nakon sonikacije (2 μ L)

NF; nevezana frakcija (8 μ L)

ISPA; ispiranje kolone puferom A (15 μ L)

ISPB; ispiranje kolone puferom B (15 μ L)

F1; frakcija 1 (2-10 μ L, prema dogovoru sa asistentom)

F2; frakcija 2 (2-10 μ L, prema dogovoru sa asistentom)

F3; frakcija 3 (2-10 μ L, prema dogovoru sa asistentom)

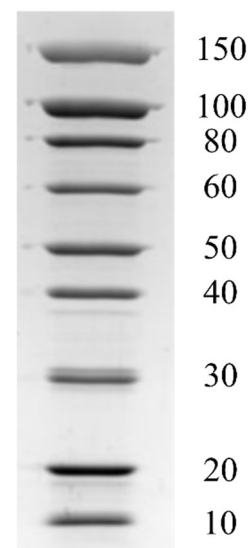
Ostali studenti pripremaju po jednu frakciju koja je dala najintenzivnije plavo obojenje.

2. U svaki uzorak dodajte 5 μ L 4 \times SDS pufera za nanošenje i vode do ukupno 20 μ L.
3. Skuhajte uzorke 5 min u kipućoj vodi ili u termobloku na 94 $^{\circ}$ C.
4. Nanesite 15 μ L uzoraka na SDS gel sljedećim redoslijedom:

M (marker molekulskih masa), PE, NF, ISPA, ISPB, F1, F2, F3, po jednu frakciju dva studenta

Na sljedeći gel nanesite M (marker molekulskih masa) i po jednu frakciju ostalih studenata

5. Provedite elektroforezu oko 15 minuta (dok uzorci ne uđu u gel za razdvajanje) na 120 V i zatim još 45 minuta na 180 V (dok boja ne dođe do cca 0,5 cm od donjeg ruba gela).
6. Obojite gel otopinom boje *Coomassie Brilliant Blue* u trajanju od 15 minuta te odbojite u vrućoj destiliranoj vodi u trajanju od 10 minuta.
7. Komentirajte vaše rezultate s asistentom. Diskutirajte razinu prekomjerne ekspresije, uspješnost vezanja proteina na kolonu, uspješnost pročišćavanja... Usporedite vaše rezultate s rezultatima ostalih studenata.



Slika 12. B Slika gradijentnog poliakrilamidnog gela (8-16 %) s markerom molekulskih masa *The Penn State Protein Ladder system SDS-PAGE molecular weight markers*. Marker sadrži smjesu 9 proteina različitih molekulskih masa.

Za vrijeme elektroforeze odredite koncentraciju proteina u dvije frakcije koje su dale najintenzivnije plavo obojenje metodom po Bradfordu.

Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Sastav Bradfordovog reagensa (nije potrebno pripremati):

0,1 g/dm³ *Coomassie BB G-250*

5 % (v/v) etanol

8,5 % (v/v) H₃PO₄

1. Pipetirajte 1-10 µL dvije najkoncentriranije frakcije (točan volumen će vam reći asistent, ovisno o procjeni količine proteina u frakcijama). Dodajte vode do volumena 100 µL.
2. Pripremite uzorke za baždarni dijagram. Koristite otopinu BSA masene koncentracije 1 mg/mL. Pripremite po 100 µL otopina koje sadrže 0, 3, 5, 8, 12, 15, 18 µg BSA.
3. Svim uzorcima dodajte 1000 µL Bradfordovog reagensa.
4. Inkubirajte 10-15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.
5. Očitajte A₅₉₅.
6. Nakon mjerenja, plastične kivete odmah isperite i potopite u otopinu detergenta.
7. Izračunajte masenu koncentraciju proteinskih frakcija pomoću baždarnog dijagrama.
8. Svaka grupa u dogovoru s asistentom odabire onu proteinsku frakciju koja je najčišća i koja ima najviše proteina. Odabrana frakcija se sprema na -20°C do trenutka analize u nativnoj gel-elektroforezi. Označite broj frakcije, turnus, inicijali.

VJEŽBA R: NATIVNA GEL-ELEKTROFOREZA NEKOVALENTNIH KOMPLEKSA IZOLEUCIL-tRNA-SINTETAZE I tRNA^{Ile}

Uvod

Nativna elektroforeza kompleksa proteina i nukleinske kiseline (engl. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) je elektroforetska metoda za proučavanje interakcija između proteina i DNA, odnosno proteina i RNA molekula. Metoda se temelji na različitom putovanju uzoraka (proteina, proteina vezanog za nukleinsku kiselinu i same nukleinske kiseline) kroz poliakrilamidni nativni gel ovisno o ostvarenoj interakciji proteina i nukleinske kiseline. Brzina putovanja uzoraka kroz gel ovisi o njihovoj veličini i naboju, slično kao i kod denaturirajuće SDS-PAGE elektroforeze. Razlika u odnosu na SDS-PAGE je da se ovaj tip elektroforeze radi u nendenaturirajućim, nativnim uvjetima, jer se želi održati potencijalno nastala interakcija između proteina i nukleinske kiseline. Pri tome je izrazito bitno da sustav (gel, pufer za elektroforezu i pufer za stvaranje kompleksa) ne sadrži tvari koje mogu denaturirati proteine (primjerice SDS), te da sadrži odgovarajući pH i ionsku jakost pri kojima je kompleks proteina i nukleinske kiseline stabilan.

Metoda se izvodi na način da se pomiješa uzorak proteina i nukleinske kiseline u odgovarajućem puferu koji omogućuje nastanak kompleksa protein:nukleinska kiselina, te nanese na prethodno pripremljen nativni poliakrilamidni gel. Veličina gela i postotak umreženja akrilamida-bisakrilamida određuje se eksperimentalno za ispitivani uzorak. Na gel se nanosi kontrolni uzorak nukleinske kiseline te smjesa proteina i nukleinske kiseline. U slučaju da je došlo do vezanja proteina na nukleinsku kiselinu, stvoreni kompleks će imati manju elektroforetsku pokretljivost nego kontrolni uzorak (sama nukleinska kiselina), odnosno vezani protein će usporiti (retardirati) gibanje nukleinske kiseline u nendenaturirajućem gelu. Stoga se ova metoda još naziva gel-retardacijom. Detekcija nukleinskih kiselina nakon provedene elektroforeze moguća je bojanjem gela u otopini etidijeva bromida ili toluidinskog modrila, ili korištenjem radioaktivno obilježenih sondi koje su komplementarne slijedu korištene nukleinske kiseline.

Međutim, eksperiment se može izvesti i na drugačiji način, a to je da se detektira protein, a ne nukleinska kiselina, na način da se gel nakon provedene elektroforeze oboja u otopini boje *Coomassie Brilliant Blue*. Kao kontrolni uzorak u ovom slučaju stavlja se protein, a ne nukleinska kiselina, budući da se ona ne može detektirati bojanjem sa *Coomassie Brilliant Blue*. U sklopu vježbe, na gel se nanosi kontrolni uzorak (protein) i kompleks protein:tRNA. U slučaju da je došlo do nastanka kompleksa između proteina (PmIleRS) i tRNA (PmtRNA^{Ile}), kompleks će putovati puno brže nego sam protein, zbog izrazito velikog negativnog naboja kojeg nosi molekula PmtRNA^{Ile}. U ovom slučaju, vezanje tRNA za protein povećava njegovu elektroforetsku pokretljivost, te kompleks putuje brže prema pozitivnoj elektrodi u odnosu na sam protein.

Reagensi

- **10 × pufer TA:** 3,03 g Tris, 1,43 mL octene kiseline (u 100 mL), pH ~ 7
- **1 × pufer TA:** razrijediti od 10 × pufera TA, ukupno 1 L
- **5 × pufer za komplekse:** 250 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM MgCl₂
- **6 × boja za nativni gel:** 0,06% (w/v) bromfenolplavo, 30% (w/v) glicerol
- 40% 29:1 akrilamid:bisakrilamid (T=40%, C=3,3%)
- 20% (w/v) APS
- TEMED

Pripremite 2-3 tanka (0,75 mm) 8%-tna nativna poliakrilamidna gela koristeći češljeve s 10 jažica.

Smjesa za 1 gela (5 mL):*

- 0,5 mL 10 × TA pufer
- 1 mL 40% akrilamid:bisakrilamid
- 3,5 mL ReH₂O
- 17,5 µL APS
- 2,5 µL TEMED

***Nakon dodatka vode, pufera i smjese akrilamida ostaviti otopinu na sobnoj temperaturi minimalno 15 minuta da se temperira, tek onda dodati APS i TEMED!**

Napomena: pH pufera Tris znatno se mijenja s temperaturom, tj. snižava se pri višim temperaturama (npr. ista otopina pufera Tris pri 5°C ima pH 8,58; pri 25°C ima pH 8; pri 37°C ima pH 7,71). Stoga smjesu za pripremanje gela treba temperirati do sobne temperature, jer se smjesa akrilamida čuva na 4°C, a 10 × TA pufer se priprema na sobnoj temperaturi.

S obzirom da stvaranje kompleksa proteina i tRNA ovisi o vrijednosti pH, važno je da uvjeti u gelu odgovaraju uvjetima u reakcijskoj smjesi.

Izvođenje vježbe:

- Kute, naočale i rukavice su obavezne!
- Sve raditi na sobnoj temperaturi, osim ako nije drukčije naglašeno!
- Smjese pažljivo pipetirajte na dno mikroeprovete koristeći pipetu od 20 µL.

Priprema i analiza kompleksa proteina i tRNA:

1. Uključite izvor struje i provedite predelektroforezu 20-30 minuta pri 80 V kako bi se sustav uravnotežio (predelektroforezu možete provesti dok pripremate uzorke ili za vrijeme inkubacije enzima sa tRNA).
2. Pripremite reakcijske smjese prema uputama u tablici 4. Koristite frakciju proteina koja ima najveću masenu koncentraciju. Na temelju prethodno određene masene koncentracije proteina, izračunajte koliki volumen proteinskog uzorka je potrebno dodati u reakcijsku smjesu kako bi reakcijska smjesa sadržavala 5-6 µg proteina. Ukoliko je protein previše

razrijeđen, te ne možete dodati navedenu količinu proteina (5-6 μg), dodajte proteina maksimalno koliko možete. Označite epruvete prema poziciji u gelu koju će zauzeti vaš uzorak u dogovoru s asistentom. Najprije pipetirajte vodu, pa pufer pa ostale komponente. Predlažemo da stavite kvačicu/oznaku pokraj svake komponente koju ste dodali kako ne biste pogriješili.

Tablica 4: Predloženi uzorci za gel-retardacijsku elektroforezu

Uzorci	ReH ₂ O / μL	5 × pufer / μL	enzim / μL	tRNA / μL	Σ
PmIleRS1 (kontrola)*	10,5 μL	3 μL	1,5 μL	-	15 μL
PmIleRS1 + tRNA (kontrola)*	8,5 μL	3 μL	1,5 μL	2 μL	15 μL
PmIleRS2 (kontrola)*	7 μL	3 μL	5 μL	-	15 μL
PmIleRS2 + tRNA (kontrola)*	5 μL	3 μL	5 μL	2 μL	15 μL
Svaka grupa (samo protein)		3 μL	5-6 μg	-	15 μL
Svaka grupa (protein + tRNA)		3 μL	5-6 μg	2 μL	15 μL

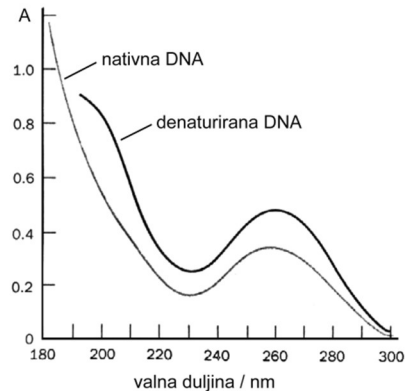
* kontrolne uzorke priprema asistent

- Inkubirajte uzorke 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi došlo do stvaranja kompleksa.
- U svaki uzorak dodajte 3 μL 6 × boje za nativni gel, resuspendirajte i nanesite 10 μL uzorka na gel.
- Nanesite uzorke uz pomoć asistenta i provedite elektroforezu pri 80 V. Elektroforeza je završena kada boja istekne u pufer koji se nalazi u kadici (oko 1-1,5 h).
- Gel obojite inkubiranjem u otopini boje *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Bojanje gela traje 15 minuta, a odbojavanje 10 minuta prokuhavanjem u destiliranoj vodi.
- Komentirajte nastajanje kompleksa i usporedite s brzinom putovanja uzorka proteina koji ne sadrži tRNA.

VJEŽBA T: TERMIČKA DENATURACIJA MOLEKULA DNA

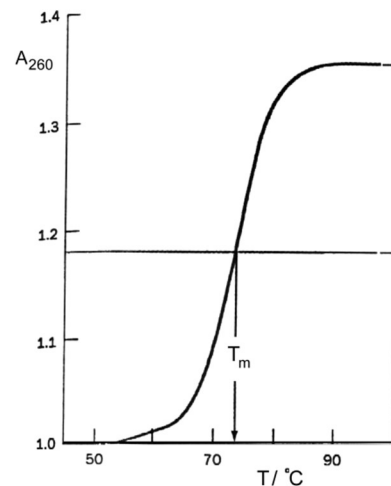
Uvod

Uređena sekundarna struktura DNA se može narušiti promjenom parametara sustava, poput temperature, ionske jakosti, vrijednosti pH i općenito uvođenjem novih komponenti u sustav (primjerice proteina koji se vežu pretežito na jednolančanu DNA). Tada se ukidaju vodikove veze među parovima baza i odvajaju se lanci DNA. Taj proces nazivamo *denaturacija* (slika 13). Proces je povratan, pa je moguće ponovno uspostaviti nativnu strukturu. Ako se parametri sustava vrate na početne vrijednosti, molekula DNA će se *renaturirati*. Zagrijemo li otopinu koja sadrži zavojnicu DNA iznad određene temperature, DNA će se denaturirati. Pojedini lanci se odvajaju i u otopini zauzimaju strukturu nasumičnog klupka. Ova promjena je popraćena mjerljivim promjenama fizičkih svojstava otopine. Primjerice, otopina nativne DNA je viskozna jer se ukočena zavojnica opire deformiranju (nastoji ostati opružena), a nakon denaturacije viskoznost otopine se bitno smanjuje, jer su odvojeni lanci puno savitljiviji.



Slika 13. Apsorpcijski spektar nativne i denaturirane DNA iz bakterije *Escherichie coli*. Uočite da denaturacija ne utječe na oblik krivulje, već samo ravnomjerno podiže intenzitet apsorpcije na svim valnim duljinama. Spektar nativne DNA je sniman na 25 °C, a denaturirane na 82 °C. Apsorbancija je izražena u relativnim jedinicama.

Denaturacijom molekule DNA se mijenja i njena apsorbancija; mjerenje promjene apsorbancije je vrlo pogodan način praćenja procesa denaturacije. Baze apsorbiraju u ultraljubičastom području. Njihova apsorpcija je ovisna o okruženju u kojem se nalaze, kada se DNA denaturira, baze iz gusto složene strukture postaju razmjerno pokretne i apsorbancija im poraste za oko 40 % na svim valnim duljinama u ultraljubičastom dijelu spektra. Taj učinak denaturacije na apsorpcijski spektar nazivamo *hiperkromizam* (slika 14). Do ovog učinka dolazi u uskom rasponu promjene temperature, što ukazuje da je denaturacija *kooperativan* proces (slika 14). To znači da razdvajanje zavojnice na jednom mjestu jako destabilizira ostatak zavojnice i potiče daljnju denaturaciju. Proces denaturacije DNA možemo opisati kao otapanje jednodimenzijske krutine. Mjerimo li apsorbanciju u ovisnosti o temperaturi, (prikazano na Slici 13) dobijemo krivulju koju nazivamo krivulja denaturacije. Karakterističnu temperaturu u središnjoj točki krivulje, kada je 50 % strukture denaturirano, nazivamo temperatura mekšanja i označavamo je kao T_m . Ta vrijednost je mjera stabilnosti zavojnice. DNA koja je otpornija na ovu vrstu denaturacije će imati višu T_m , dakle



Slika 14: Krivulja denaturacije DNA. Prikazana je relativna apsorbancija na 260 nm u ovisnosti o temperaturi.

treba je više zagrijati da se denaturira. Ako denaturiranu DNA naglo ohladimo i držimo na niskoj temperaturi, lanci DNA će se renaturirati, ali samo djelomično, jer neće biti dovoljno vremena da se svi komplementarni dijelovi “nađu” i pravilno spare. Jedan dio lanaca će se potpuno renaturirati, ali većina će imati sparene samo pojedine regije. Takva sparivanja mogu biti intramolekulska (unutar istog lanca) i intermolekulska (između dva lanca). U tom stanju određeni dijelovi lanaca i dalje ostaju nesporeni. No, ako denaturiranu DNA polako ohladimo i držimo na temperaturi oko 25 °C ispod T_m , u sustavu ima dovoljno toplinske energije da se djelomično sparene regije otpuste i preurede, tako da nastaju dulje sparene regije koje se više na toj temperaturi ne mogu olabaviti i postupno sva DNA prelazi u nativnu konformaciju.

Čimbenici koji utječu na T_m

Priroda molekule DNA. Homogena DNA (primjerice virusna ili plazmidna DNA) sastoji se od identičnih kratkih molekula DNA i denaturira se u uskom području promjene temperature.

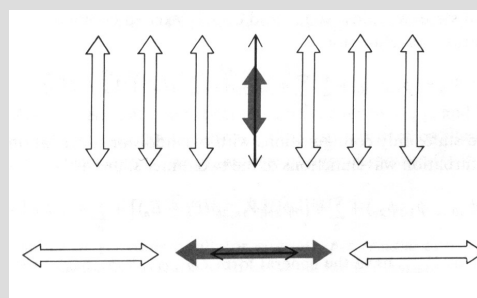
Heterogena DNA (primjerice pripravak genomske DNA) sadrži mnoštvo različitih fragmenata nastalih nasumičnim kidanjem kromosoma. Svaki od fragmenata ima svoju karakterističnu vrijednost T_m , neki fragmenti su već denaturirani dok se drugi tek počinju denaturirati. Stoga krivulja izgleda složenije, širi je temperaturni raspon u kojem se DNA denaturira.

Sastav baza. Baze G i C se međusobno sparuju stvarajući tri vodikove veze, a baze A i T stvaraju samo dvije. Nadalje, slaganjem sparenih parova GC se ostvaruju jače “okomite” interakcije unutar zavojnice nego slaganjem parova AT. Stoga odsječci DNA koji sadrže više parova GC imaju višu vrijednost T_m i teže se denaturiraju.

Ionska jakost. Fosforilne skupine u okosnici molekule DNA su pri fiziološkim vrijednostima pH negativno nabijene, tako da u prosjeku na svaki par baza dolaze i po dva negativna naboja na okosnici. Tolika koncentracija negativnih naboja destabilizira zavojnicu. Elektrostatsko odbijanje istoimenih naboja je ovisno o dielektričkoj konstanti otopine. Veća ionska jakost povećava dielektričku konstantu, smanjuje međusobno odbijanje fosforilnih

Nešto više o uzrocima hiperkromizma

Već smo spomenuli da u ultraljubičastom području pratimo apsorpciju dušičnih baza. Pri apsorpciji elektromagnetskog zračenja dolazi do preraspodjele gustoće elektrona i nastaje *prijelazni dipol* kojega prikazujemo kao vektor u ravnini same baze. Pri uvjetima u kojima mjerimo apsorpciju dolazi do istovremene pobude susjednih baza, tako da njihovi prijelazni dipoli interagiraju. Kako su sve baze slično orijentirane, tako je i sa njihovim prijelaznim dipolima. Dakle, plus-krajevi dipola su međusobno blizu, a tako je i s minus-krajevima dipola. Ako u okolini već postoji više dipola orijentiranih u istom smjeru, teže im je dodati još jedan zbog elektrostatskog odbijanja istoimenih krajeva dipola, tako da se vektori svih sljedećih pobuđenih dipola skraćuju, a time izravno i intenzitet apsorpcije (intenzitet apsorpcije je ovisan o duljini vektora prijelaznog dipola). Kada se nativna struktura poremeti, nestaju ove interakcije, baze više nisu zbijene (engl. *unstacking*) i apsorpcija pojedine baze je manje ovisna o pobudi susjednih baza. Zamislimo li imaginarnu alternativnu strukturu DNA u kojoj bi baze bile poredane ne jedna iznad druge, nego jedna iza druge, u orijentaciji “glava-rep”, onda bi se pozitivni i negativni krajevi prijelaznih dipola na susjednim bazama privlačili i imali bismo produljenje pripadnih vektora, odnosno *hipokromizam* pri denaturaciji takve strukture.



skupina, dakle stabilizira zavojnicu. Pri većim vrijednostima ionske jakosti raste T_m i sužava se krivulja denaturacije.

Vrijednost pH. Ekstremne vrijednosti pH dovode do razbijanja vodikovih veza među bazama DNA. Pri $\text{pH} > 11,5$ sve funkcionalne skupine na bazama su deprotonirane, a pri $\text{pH} < 2,3$ posve protonirane, tako da je izvan tog raspona nemoguće ostvariti dovoljno vodikovih veza za održavanje nativne strukture. Lužine su vrlo prikladne za denaturaciju DNA, jer ne narušavaju njenu kovalentnu strukturu, dok dovode do hidrolize RNA (zbog postojanja hidroksilne skupine na 2'-atomu riboze koja stabilizira prijelazno stanje u reakciji hidrolize).

Molekule koje se vežu na DNA. Bilo koja molekula koja može stvoriti vodikove veze s funkcionalnim skupinama baza u DNA može doprinijeti denaturaciji zavojnice. Isto je i s molekulama koje ometaju slaganje baza jedne iznad druge. Da bi male molekule (ureja, formamid, cijanogvanidin) denaturirale DNA, moraju biti prisutne u velikim koncentracijama, jer je potrebno ostvariti prednost natječući se za vodikove veze s bazama drugog lanca DNA. Proteini koji se vežu na jednonolančanu DNA također mogu denaturirati nativnu strukturu.

Denaturacija i renaturacija DNA su važne za biološku ulogu ove molekule u procesima replikacije i transkripcije. Ovo svojstvo se koristi i u eksperimentalnim uvjetima u reakcijama hibridizacije nukleinskih kiselina.

Reagensi

- pufer TE (Tris-HCl 10 mmol dm^{-3} , pH 7,5, EDTA 1 mmol dm^{-3} , pH 8)
- pufer TE/3 mol dm^{-3} urea
- pufer TE/10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- pufer TE/10 mM MgCl_2
- pufer TE/20% DMSO
- otopina DNA izolirane iz lososa u puferu TE
- otopina DNA izolirane iz lososa u 3 mol dm^{-3} urea
- otopina DNA izolirane iz lososa u 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- otopina DNA izolirane iz lososa u 10 mM MgCl_2
- otopina DNA izolirane iz lososa u 20% DMSO

Izvođenje vježbe:

PRAĆENJE PROCESA DENATURACIJE DNA MJERENJEM PROMJENE A_{260} UZORKA OVISNO O TEMPERATURI

⇒ Pažljivo i **POSTEPENO** (ne prebrzo) zagrijavati DNA!

Podijelite se u parove (u dogovoru s asistentom).

Na početku vježbe ćete dobiti uzorke DNA otopljene u puferu TE, od kojih će neki uzorci imati dodane različite aditive.

1. Izmjerite apsorbanciju vašeg uzorka na $\lambda = 260$ nm. Kao slijepu probu koristite TE pufer sa ili bez aditiva, ovisno koji uzorak DNA koristite u vježbi.
2. Uzorak DNA raspipetirajte u 12 obilježenih plastičnih mikroepreveta po **1 ml**. Epruvete stavite u termoblok.

3. Namjestiti termoblok na željenu temperaturu. Kada termoblok dosegne željenu temperaturu inkubirajte uzorak 3 minute. Nakon toga izvadite mikroeprijetu i odmah je ohladite na ledu. Sada namjestite sljedeću temperaturu na termobloku i ponovite postupak. Epruvete neka stoje na ledu sve do trenutka mjerenja. Predlažemo sljedeće temperature za inkubaciju uzoraka (prvo mjerenje može biti pri 40°C):

30 50 60 64 68 72 76 80 84 88 92 96 / °C

4. Kada ste prikupili i ohladili sve mikroeprijetu, izmjerite A_{260} . Kao slijepu probu koristite TE pufer sa ili bez aditiva, ovisno koji uzorak DNA ste koristili u vježbi.

VJEŽBA B: SUPRESIJA TERMINACIJSKIH KODONA U GENU ZA β -GALAKTOZIDAZU POMOĆU SUPRESORSKE tRNA^{Tyr} I TEST AKTIVNOSTI β -GALAKTOZIDAZE

Uvod

Translacija molekula mRNA u proteine rezultira otpuštanjem polipeptidnog lanca kad ribosom naiđe na jedan od stop-kodona: UAA (oker), UAG (amber) ili UGA (opal). Terminacija translacije proces je koji se odvija u više koraka. Bakterija *E. coli* kao i drugi organizmi obično ne sadrži molekule tRNA koje čitaju stop-kodone, već njih prepoznaju terminacijski proteini. Međutim, u pojedinim organizmima moguće je naći supresorske tRNA koje čitaju stop-kodone, i pri tom ne dovode do terminacije translacije, već do ugradnje određene aminokiseline u polipeptidni lanac. Na taj način se suprimiraju stop-kodoni.

Sustav koji koristi supresorske tRNA pogodan je za istraživanje strukturnih i funkcionalnih obilježja molekula tRNA, kao i ostalih komponenti translacijskog sustava s kojima one interagiraju. Sustav se temelji na supresiji određene mutacije u izvjestiteljskom genu (engl. *reporter gene*) koja se testira ili *in vivo* ako je produkt gena esencijalan, ili ako je produkt gena enzim, mjerenjem enzimске aktivnosti što omogućuje i kvantifikaciju supresije. Kvantifikacija supresije u sustavu koji koristi gen za β -galaktozidazu kao izvjestiteljski gen je jednostavna zbog postojanja mnoštva supstrata za β -galaktozidazu koji daju obojene produkte jednostavne za detekciju. Primjerice, djelovanjem β -galaktozidaze na ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktozid) nastaje žuto obojeni *o*-nitrofenol, a djelovanjem na X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) nastaje plavo obojeni produkt.

Reagensi

Z-pufer (Na_2HPO_4 60 mmol/dm³; NaH_2PO_4 40 mmol/dm³; KCl 10 mmol/dm³; MgSO_4 1 mmol/dm³; pH 7,0), ONPG (2 mg/ml); kloroform, Na_2CO_3 (1 mol/dm³)

- **Plazmid pTech:** niskokopijski vektor koji je poslužio za ugrađivanje i konstitutivnu ekspresiju gena za supresorske tRNA. Konstruiran je fuzijom dijelova roditeljskih plazmida pGFIB i pACYC184. Nosi gen za kloramfenikolsku rezistenciju.
- **Bakterijski sojevi** koje ćete upotrebljavati:
 - *E. coli* XAC-A24 soj s amber stop kodonom u fuzijskom genu *lacI-Z* koji kodira za enzim β -galaktozidazu. Može biti transformiran različitim genima za supresorske tRNA i koristi se za kvantifikaciju supresije mjerenjem aktivnosti nastale β -galaktozidaze (produkt gena *lacI-Z*).
 - *E. coli* XAC Δ 14 soj s fuzijskim genom *lacI-Z* koji kodira za enzim β -galaktozidazu. Pozitivna kontrola.
- **Kombinacije transformanata:**
 - XAC-A24 + pTech (plazmid za supresiju, ali bez gena za tRNA).
 - XAC-A24 + pTech_tRNATyrA73 (supresorska tRNA^{Tyr} koja prepoznaje STOP kodon i na to mjesto uvodi Tyr. Aminoacilira je domaćinska TyrRS iz *E. coli*.)
 - XAC-A24 + pTech_tRNATyrG73 (mutirana supresorska tRNA^{Tyr} s bazom G73 na mjestu prirodne A73.)

Izvođenje vježbe:

- ☞ Kute, naočale i rukavice su obavezne!
- ☞ KIVETE U KOJIMA MJERITE APSORBANCIJU ODMAH NAKON MJERENJA ISPERITE U DESTILIRANOJ VODI JER KLOROFORM NAGRIZA STIJENKE KIVETA!

Stanice su uzgajane u odgovarajućem mediju do iste optičke gustoće ($OD_{600} = 0,8$) i pripremljeni su bakterijski talozi tih sojeva. Svaki talog stanica je dobiven iz 9 ml bakterijske kulture.

1. Na talog stanica dodajte 300 μ l redestilirane vode i dobro resuspendirajte talog koristeći pipetu.
2. Izdvojite 50 μ l suspenzije stanica u novu mikroeprovetu i dodajte ostale komponente kao što je navedeno ispod u koraku 3. Ovisno o broju studenata, grupa studenata će prirediti 2-4 replike po svakom talogu (u dogovoru s asistentom).
3. Na 50 μ l suspenzije stanica dodati redom:
 - 625 μ l Z-pufera
 - 65 μ l kloroforma
 - 30 μ l 0,1% SDS
 - 10 μ l 100 mmol/dm³ DTT
4. Napraviti i kontrolni uzorak bez dodatka stanica: sve isto kao u gornjoj smjesi, samo što umjesto 50 μ l suspenzije stanica dodajete 50 μ l redestilirane vode.
5. Provjeriti jesu li mikroeprove čvrsto zatvorene i kratko vorteksirati (oko pola minute). Ovim postupkom stanice se liziraju.
6. Inkubirati 5 minuta na 37 °C u termobloku. Nakon ovog koraka uzorke možete čuvati na ledu, ili odmah započeti reakciju.
7. Dodati 60 μ l ONPG (2 mg/ml). Smjesu dobro promiješati (nekoliko puta okrenite mikroeprovete rukom). Započeti mjerenje vremena.
8. Inkubirati pri 37 °C u termobloku 2-20 minuta do razvitka žute boje (vrijeme razvijanja žute boje može biti različito za svaki uzorak). β -galaktozidaza cijepa β -glikozidnu vezu ONPG-a pri čemu nastaje *o*-nitrofenol, spoj koji daje žuto obojenje.
9. Nakon razvitka dovoljno intenzivne žute boje (konzultirati se s asistentom), potrebno je dodati 375 μ l 1 mol/dm³ Na₂CO₃ koji povećava pH i denaturira enzim.
10. Zaustavite mjerenje vremena i zapišite vrijeme trajanja pojedine reakcije. Nakon ovog koraka uzorci mogu biti na sobnoj temperaturi.
11. Smjesu centrifugirajte u centrifugi 10 min pri 12000 rpm da uklonite ostatke stanica iz suspenzije.
12. Prenesite 800 μ l bistrog supernatanta u plastične kivete za mjerenje apsorbancije.
13. Izmjerite u spektrofotometru apsorbanciju svakog uzorka pri valnoj duljini $\lambda = 420$ i 550 nm. Kao slijepu probu koristite Z-pufer. Ne zaboravite "nulirati" kod obje valne duljine.
14. KIVETE U KOJIMA MJERITE APSORBANCIJU ODMAH NAKON MJERENJA ISPERITE U DESTILIRANOJ VODI JER OSTACI KLOROFORMA MOGU NAGRISTI STIJENKE KIVETE!

15. Aktivnost β -galaktozidaze u uzorcima izračunajte na sljedeći način:

Pri A_{420} mjerimo apsorpciju *o*-nitrofenola, a pri A_{550} apsorpciju staničnih dijelova. Aktivnost enzima izražava se u Millerovim jedinicima pomoću formule:

$$\text{Millerove jedinice (MU)} = 1000 \times (A_{420} - 1,75 \times A_{550}) / (t/\text{min} \times V/\text{ml})$$

Aktivnost β -galaktozidaze u različitim uzorcima je proporcionalna količini nastalog produkta. Produkt reakcije hidrolize ONPG-a je *o*-nitrofenol - žuto obojani spoj koji maksimalno apsorbira svjetlost valne duljine 420 nm. Međutim, osim *o*-nitrofenola izmjerenoj apsorpciji pri 420 nm (A_{420}) zbog raspršenja pridonose i zaostale stanice ili stanični ostaci koji se nisu uspješno maknuli nakon centrifugiranja i izdvajanja supernatanta (koraci 9 i 10). Stoga je potrebno napraviti korekciju izmjerene A_{420} s obzirom na raspršenje. Stanični ostaci i/ili stanice raspršuju svjetlost i pri 550 nm, dok *o*-nitrofenol pri toj valnoj duljini ne apsorbira pa faktor $1,75 \times A_{550}$ odgovara korekciji izmjerene A_{420} . Broj 1,75 ispred A_{550} dodaje se jer se jačina refleksije smanjuje s valnom duljinom.

Vrijeme (t) se izražava u minutama, a računa se od trenutka dodavanja supstrata do trenutka dodavanja Na_2CO_3 . V je volumen početne bakterijske kulture (iz koje je dobiven talog) koji odgovara 50 μl suspenzije stanica koja je dodana u reakciju. Prodiskutirajte s asistentom.

U literaturi je moguće pronaći sličnu formulu za Millerove jedinice koja dodatno sadrži OD_{600} u nazivniku. Na taj način se aktivnost β -galaktozidaze normira s obzirom na količinu stanica iz kojih je izolirana. OD_{600} je ovdje izbačen iz formule jer su sve stanične kulture uzgajane do iste optičke gustoće ($\text{OD}_{600} = 0,8$).

PITANJA ZA REFERAT

Vježbe L i E (dio koji se odnosi na L): Restriksijska razgradnja plazmida pPT7 i pPT7_XhoI

1. Navedite cilj vježbe.
2. U program *SnapGene* unesite nukleotidne sljedove plazmida koje ćete koristiti u ovoj vježbi i naznačite restriksijska mjesta za enzime korištene u vježbi. Priložite slike odgovarajućih restriksijskih mapa.
3. Napišite sastav reakcijskih smjesa R1 i R2.
4. Navedite veličine fragmenata DNA koje očekujete nakon restriksijske razgradnje u smjesama R1 i R2.
5. Koja je uloga uzorka R1? Zbog čega je plazmid pPT7 potrebno pocijepati i enzimom *NcoI*?
6. Priložite sliku dobivenog agaroznog gela s označenim jažicama i veličinama markera. Komentirajte izgled gela u odnosu na očekivanja. Objasnite nalaze li se pruge na očekivanom mjestu u odnosu na pruge u markeru? Ako očekivana pruga izostaje ili se ne nalazi na očekivanom mjestu, objasnite mogući razlog i navedite promjene u postupku vježbe koje biste uveli kako biste dobili očekivani rezultat. Ako u odnosu na očekivanja ima dodatnih pruga, navedite čemu odgovaraju.
7. Navedite zaključak vježbe (odgovor na cilj vježbe).

Vježbe EC, E (dio koji se odnosi na EC), P i R: Pročišćavanje IleRS i izolacija tRNA^{Ile} s ciljem analize kompleksa IleRS:tRNA^{Ile}

1. Navedite cilj vježbe.
2. Koje sve tvari očekujete u uzorku EC? Pronađite u literaturi i navedite očekivane veličine navedenih tvari.
3. Kako biste iz uzorka EC pročistili samo PmtRNA^{Ile}?
4. Priložite sliku dobivenog agaroznog gela s označenim jažicama i veličinama markera. Komentirajte izgled gela u odnosu na očekivanja. Objasnite nalaze li se pruge na očekivanom mjestu u odnosu na pruge u markeru? Ako očekivana pruga izostaje ili se ne nalazi na očekivanom mjestu, objasnite mogući razlog i navedite promjene u postupku vježbe koje biste uveli kako biste dobili očekivani rezultat. Ako u odnosu na očekivanja ima dodatnih pruga, navedite čemu odgovaraju.
5. Pretražite odgovarajuće baze podataka, te ispišite nukleotidni slijed gena i aminokiselinski slijed proteina kojeg ste izolirali u vježbi P. Navedite i odgovarajuće

- pristupne kodove. Pomoć: Dva proteina (PmlleRS1 i PmlleRS2) razlikuju se u veličini, pri čemu PmlleRS1 ima manje aminokiselina (< 1000 ak) nego PmlleRS2 (> 1000 ak).
- Navedite uloge pufera A, B i C u vježbi P. Koja je uloga β -merkaptoetanolu u puferima i zašto se dodaje neposredno prije njihova korištenja?
 - Prikažite sliku Bradfordovog testa za uzorke F1-5. Na slici označite položaj uzoraka. Navedite koje frakcije sadrže najviše proteina.
 - Na kojem principu Bradfordov reagens omogućava određivanje koncentracije proteina? Koji su tehnički nedostaci navedenog postupka?
 - Prikažite baždarni dijagram za protein BSA kojeg ste određivali u vježbi P. Navedite cijeli izračun određivanja masene koncentracije pročišćene IleRS u dvije najkoncentriranije frakcije.
 - Uz pomoć online alata *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) i aminokiselinskog slijeda iz zadatka 5 odredite M_r rekombinantnog proteina kojeg ste pročistili (pri tom ne zaboravite da rekombinatni protein dodatno sadrži heksahistidinski privjesak) te izračunajte molarnu koncentraciju proteinskih frakcija kojima ste u zadatku 9 odredili masenu koncentraciju.
 - Navedite uzorke koje ste skupljali tijekom izolacije proteina i koje ste analizirali na SDS-PAGE gelu. Navedite koje pruge očekujete u pojedinom uzorku.
 - Priložite sliku dobivenog SDS-PAGE gela s označenim jažicama i prugama markera. Komentirajte izgled gela u odnosu na očekivanja. Objasnite nalaze li se pruge na očekivanom mjestu u odnosu na pruge u markeru? Objasnite slaže li se količina proteina u frakcijama F1-5 na gelu s onom dobivenom Bradfordovim testom?
 - S obzirom na rezultate SDS gel-elektroforeze diskutirajte (za oba proteina) razinu prekomjerne ekspresije, uspješnost vezanja proteina na kolonu, uspješnost pročišćavanja... Ovisno o dobivenim rezultatima, razmislite što bi bilo dobro promijeniti da poboljšate pročišćavanje proteina.
 - Opišite uzorke nanese na gel za nativnu elektroforezu. Skicirajte očekivani rezultat vježbe i objasnite. Kako biste još mogli detektirati kompleks na ovom gelu osim bojom *Coomassie Brilliant Blue*?
 - Priložite sliku dobivenog gela u nativnoj elektroforezi s označenim jažicama. Argumentirajte izgled jažica i je li u skladu s Vašim očekivanjima.
 - Pomoću programa *ProtParam* odredite pI proteina PmlleRS1 i PmlleRS2. Objasnite i usporedite s dobivenim rezultatima na koji način pI proteina utječe na pokretljivost samostalnog proteina u nativnoj gel-elektroforezi.
 - Zbog čega stvaranje kompleksa proteina i tRNA ovisi o pH vrijednosti reakcijske smjese? Pomoć: Razmislite koje interakcije mogu ostvarivati molekule proteina i tRNA u kompleksu.

18. Navedite zaključak vježbe. Među ostalim, odgovorite na pitanja: Mogu li proteini PmlleRS1 i PmlleRS2, heterologno nadeksprimirani u bakteriji *E. coli*, vezati PmtRNA^{lle}, heterologno nadeksprimiranu u bakteriji *E. coli*? Mogu li oba proteina, PmlleRS1 i PmlleRS2, jednako dobro prepoznati i vezati PmtRNA^{lle}?

Vježba T: Termička denaturacija molekula DNA

1. Navedite cilj vježbe.
2. Na početku eksperimenta odredili ste A_{260} za otopinu DNA. Izračunajte masenu koncentraciju DNA s obzirom na činjenicu da apsorbancija pri 260 nm otopine DNA masene koncentracije 50 $\mu\text{g/ml}$ iznosi $A_{260} = 1$.
3. Prikažite graf s eksperimentalnim točkama i krivuljama denaturacije za sve uzorke DNA u vašem turnusu. Na grafu označite osi i legendu. Napišite jednadžbu krivulje koju ste koristili za nelinearnu regresiju i objasnite zašto ste odabrali baš nju. Objasnite parametre u jednadžbi. Napomena: T_m se može odrediti i pomoću prve derivacije krivulje denaturacije, pa tko voli matematiku neka proba i na taj način odrediti T_m 😊
4. Navedite temperature mekšanja pojedinih uzoraka. Na koji način pojedini aditivi utječu na stabilnost DNA? Objasnite teorijsku podlogu za opažen utjecaj korištenih aditiva na stabilnost DNA.
5. Zamislite da imate uzorak kružne dvolančane DNA. Uzorak ste razdijelili u dva dijela i u jednom alikvotu ste linearizirali DNA, razrezavši je na jednom mjestu restriksijskim enzimom, dok je DNA u drugom alikvotu ostala netaknuta. Denaturirali ste oba uzorka. Hoće li se DNA u oba uzorka renaturirati jednakom brzinom kada počnete postupno hladiti otopinu? Objasnite.
6. Postoje organizmi koji mogu opstati na temperaturama oko 100 °C. Kakav je sastav baza njihove DNA i citoplazme u odnosu na druge organizme? Objasnite.

Vježba B: Test aktivnosti beta-galaktozidaze i supresija terminacijskih kodona u genu za galaktozidazu pomoću supresorske tRNA^{Tyr}

1. Navedite cilj vježbe.
2. Nacrtajte reakciju koju katalizira β -galaktozidaza koristeći strukturne formule za supstrat ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) i produkte koji nastaju.
3. Koristeći bazu podataka Genomic tRNA Database (<https://gtrnadb.ucsc.edu/>) pronađite i ispišite nukleotidni slijed gena za tRNA^{Tyr} za soj K12 (podsoj MG1655) bakterije *E. coli*. Prikažite sekundarnu strukturu tRNA^{Tyr}, označite antikodon i nukleotid

- A73. Objasnite koja je antikodonska promjena potrebna da se suprimira amber STOP kodon.
4. Navedite koje stanice ste koristili u vježbi, opišite ih i navedite njihovu ulogu u vježbi.
 5. Objasnite čemu služi kontrolni uzorak bez dodatka stanica.
 6. Navedite tablicu s izmjerenim apsorbancijama pri 420 i 550 nm, te vremenom inkubacije s ONPG-om. Izračunajte koliko iznosi volumen početne bakterijske kulture (iz koje je dobiven talog) koji odgovara 50 μ L suspenzije stanica koja je dodana u reakciju (objasnite izračun), te upišite u tablicu. Studenti jedne grupe trebaju međusobno razmijeniti podatke o apsorbancijama pri 420 i 550 nm i vremenima inkubacije, te samostalno izračunati Millerove jedinice za sve replike.
 7. Podatke o aktivnosti β -galaktozidaze (izražene u Millerovim jedinicama) u svakom uzorku prikažite tablično i grafički. Odredite srednje vrijednosti replika i standardnu devijaciju i/ili SEM (razmislite je li prikladnije odrediti SD ili SEM i objasnite).
 8. Studentovim *t*-testom odredite postoji li statistički značajna razlika između pojedinih uzoraka.
 9. Na temelju vaših rezultata zaključite je li nukleotid A73 važan element prepoznavanja tRNA^{Tyr} od strane TyrRS. Objasnite.
 10. Na temelju vaših rezultata zaključite je li antikodon tRNA^{Tyr} ključan element prepoznavanja tRNA^{Tyr} od strane TyrRS. Objasnite.

Pravilno korištenje automatskih mikropipeta

Automatske mikropipete ("pipetmeni") služe jednostavnom i preciznom pipetiranju malih volumena vodenih otopina (od 1 μl do 10 ml). Iako se rutinski koriste u svakodnevnom radu u mnogim i raznovrsnim laboratorijima (biokemijski, biološki, medicinski, dijagnostički, forenzički laboratoriji...) nestručnim rukovanjem mogu se vrlo brzo pokvariti i uništiti, stoga je neophodno pridržavanje pravila i određeno iskustvo u njihovom korištenju.

Ako nikada do sada niste koristili automatske mikropipete, zamolite asistenta ili demonstratora da vam objasni i pokaže kako se pravilno koriste!

Nekoliko jednostavnih pravila:

- Obratite pažnju odgovara li volumen otopine koji namjeravate pipetirati radnom rasponu automatske mikropipete (vidi tablicu 0-1!).
- Proučite podjelu na skali automatske mikropipete, tj. što vam označavaju pojedini odjeljci skale.
- Podesite željeni volumen okretanjem za to predviđenog gumba ili cilindra (slika 0-1). Pri tome nikako ne smijete "odvrtiti" volumen preko maksimalnog volumena automatske mikropipete. Isto tako, nemojte pokušavati "odvrtiti" mikropipetu na nulu.
- Prije pipetiranja natakните odgovarajući plastični nastavak (plastični vršak, "tip") na mikropipetu (slika 0-1). Pri tome nemojte koristiti pretjeranu snagu jer ćete slomiti mikropipetu. Provjerite da li nastavak dobro prijanja uz pipetu.
- Laganim pritiskom na klip istisnite zrak iz pipete, dok ne osjetite blagi otpor ("koljeno") - to označava da ste klip pritisnuli do podešenog volumena (slika 0-2). Zrak se istiskuje dok je nastavak mikropipete izvan tekućine.
- Uronite plastični nastavak u uzorak i polaganim otpuštanjem klipa uvucite tekućinu u nastavak (slika 0-2). Pipetirajte u razini očiju, držeći pipetu uspravno i obratite pažnju da li tijekom pipetiranja tekućina ravnomjerno ulazi u nastavak.
- Prilikom ispuštanja tekućine, pristonite vrh plastičnog nastavka uz stijenku posude, a klip polagano pritisnite do kraja, preko "koljena", da bi u potpunosti istisnuli otpipetirani volumen (slika 0-2). Prije nego ponovno otpustite klip, plastični nastavak izvadite iz otopine.
- Nakon pipetiranja, korišteni nastavak odbacite u za to predviđenu posudu.
- Automatske mikropipete u pravilu se čuvaju u uspravnom položaju, u za to predviđenim stalcima.

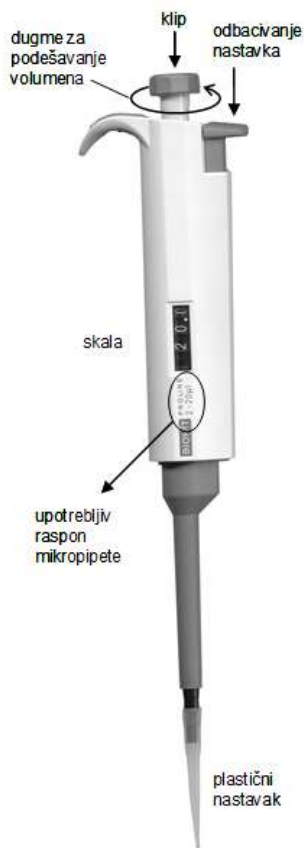
Tablica 0-1: upotrebljiv radni raspon volumena za različite pipete

max. volumen	raspon
1000 μl	200 - 1000 μl
200 μl	20 - 200 μl
20 μl	2 - 20 μl

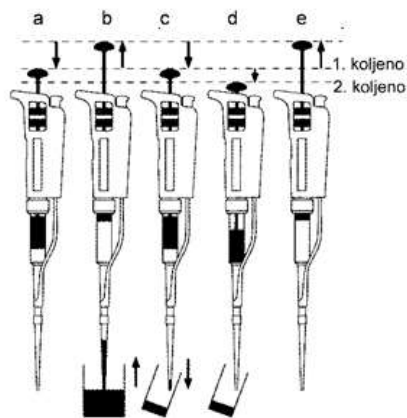
Važne napomene:

- Tekućina nikad ne smije prodrijeti u tijelo automatske mikropipete. To će onečistiti precizni mehanizam mikropipete, otežati pipetiranje, izazvati koroziju i u konačnici potpuno uništenje automatske mikropipete. Pazite da nepravilnim pipetiranjem ne povučete tekućinu u mikropipetu. **Ako kojim slučajem povučete tekućinu u automatsku mikropipetu, odmah obavijestite asistenta!**
- Automatska mikropipeta uvijek se drži okrenuta prema dolje, a pogotovo tijekom pipetiranja, tj. dok se u plastičnom nastavku nalazi tekućina. Ne ostavljajte pipetu u horizontalnom položaju dok se u plastičnom nastavku nalazi tekućina! Ne okrećite pipetu vrškom prema gore prilikom manipulacije tekućinama!

- Ne pipetirajte istim nastavkom različite tekućine! Kontaminirats ćete uzorke!
- Automatske mikropipete su krhke! Pazite da vam ne padnu i ne ostavljajte ih na rubu radnog stola! Ne ostavljajte ih po radnim plohamama ili ispod ostalih stvari, već ih nakon upotrebe vratite na svoje mjesto!



Slika 0-1: dijelovi automatske mikropipete.



Slika 0-2: ispravan postupak pipetiranja. Pritisnuti klip do prvog koljena (a), nastavak uroniti u tekućinu (b) i klip lagano otpustiti. Nastavak priloniti uz stijenku druge posude (c) i klip stisnuti do kraja (d). Klip otpustiti kada se nastavak nalazi izvan tekućine (e)