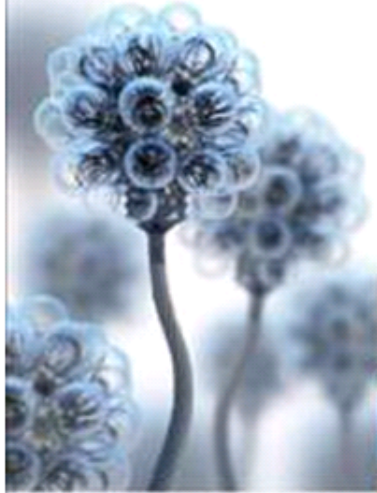




Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



Podstawy inżynierii biotechnologicznej

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych
Materiałów Opakowaniowych**

ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Ćwiczenie 2

Metody rozdrabniania surowców – cz. 1

Przebieg ćwiczenia

Materialy:

- Wątróbka z kurcząt
- Izotoniczny roztwór chlorku sodu (0,9% NaCl)
- Odczynniki do oznaczania białka metodą Bradforda (roztwór roboczy)
 - Roztwór macierzysty barwnika: 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 – 23,8% etanol – 42,5% kwas ortofosforowy (V). 100mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuścić w 50ml 96% etanolu, dodać 100ml 85% kwasu o-fosforowego (V) i uzupełnić wodą do 200ml. Roztwór macierzysty przechowywać w ciemnej butelce w temp. 4°C jest trwały. (ok. rok).
 - Roztwór roboczy barwnika: 1 objętość roztworu macierzystego rozcieńczyć 4 objętościami H₂O. Trwałość roztworu przechowywanego w ciemnej butelce i lodówce wynosi 2 tygodnie. Przed użyciem należy go przesączyć.
- Standardowy roztwór albuminy wołowej (BSA) o stężeniu 10 mg/ml

Sprzet:

- Probówki 15 ml oraz 50 ml typu FALCON, probówki 1.5 ml typu Eppendorf oraz statywy
- Pipety automatyczne 200 µl, 1000 µl, końcówki do pipet
- Spryskiwacz z etanolem i tryskawka z wodą destylowaną
- 2x Zlewki 100ml, 1x zlewka 250-400 ml na NaCl, Ktystalizator ok. 300ml,
- Cylinder miarowy o pojemności 100ml
- Wytrząsarka laboratoryjna (vortex)
- Spektrofotometr, kuwety
- BagMixer i plastikowe worki
- Sonifikator
- Homogenizator
- Moździerz

Metoda z rozcieraniem:

Odważyć 4 g wątróbki i przenieść do moździerza, dodać pipetą automatyczną 4 ml 0,9% roztworu NaCl. Rozcierać wątróbkę przez 15 min., następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 16 ml 0,9% NaCl, wszystko dokładnie wymieszać. Przenieść zawiesinę do 50 ml probówki typu FALCON. Przepłukać dokładnie moździerz 20 ml 0,9% NaCl i przenieść do tej samej probówki (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40 ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 3000 rpm przez 10 min (program nr 1). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Metoda z użyciem sonifikatora:

Odważyć 4 g wątróbki i przenieść do zlewki o pojemności 100ml, następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 40 ml 0,9% NaCl. Do zlewki wrzucić mieszadło magnetyczne i wstawić zlewkę do krystalizatora z zimną wodą w komorze sonifikatora (poprosić o pomoc prowadzącego). Proces sonifikacji prowadzić przez 15 min. (amplituda 45%), a następnie przenieść zawiesinę do 50 ml probówki typu FALCON (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40 ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 3000 rpm przez 10 min (program nr 1). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Metoda z użyciem homogenizatora:

Odważyć 4 g wątróbki i przenieść do zlewki o pojemności 100ml, następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 40 ml 0,9% NaCl. Wstawić homogenizator do zlewki – prędkość obrotów 5000 (poprosić o pomoc prowadzącego). Proces homogenizacji prowadzić przez 15 min., a następnie przenieść zawiesinę do 50 ml probówki typu FALCON (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40 ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 3000 rpm przez 10 min (program nr 1). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Metoda z użyciem BagMixera:

Odważyć 4 g wątróbki i przenieść do plastikowego worka, następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 40 ml 0,9% NaCl (do worka). Wstawić plastikowy worek do BagMixera – prędkość poziom nr 4 (poprosić o pomoc prowadzącego). Proces prowadzić przez 15 min., a następnie przenieść zawiesinę do 50 ml probówki typu FALCON (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40 ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 3000 rpm przez 10 min (program nr 1). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Oznaczanie stężenia białka przed dezintegracją:

UWAGA: przystąpić do tego etapu dopiero po homogenizacji poprzednich czterech próbek.

Odważyć 4 g wątróbki i przenieść do 50 ml probówki typu FALCON i dodać 40 ml 0,9% NaCl. Dokładnie wymieszać, a następnie odwirować przy 3000 rpm przez 10 min (program nr 1). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Przygotowanie krzywej wzorcowej i pomiar stężenia uwolnionego białka komórkowego w procesie dezintegracji:

Przygotować w probówkach Eppendorf roztwory do wyznaczenia krzywej wzorcowej dla standardu białka BSA (końcowa objętość 1 ml) o następujących stężeniach:

| Nr próby | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------|------|-----|------|-----|-----|-----|
| Stężenie BSA [mg/ml] | 0 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2,5 |
| Ilość BSA w μ l | 0 | 10 | 25 | 50 | 100 | 250 |
| Ilość 0,9% NaCl | 1000 | 990 | 975 | 950 | 900 | 750 |

Z przygotowanych roztworów pobrać 100 μ l pipetą automatyczną i przenieść do 5 ml odczynnika Bradforda (wcześniej przygotować w probówkach o pojemności 15ml). Całość wymieszać na wytrząsarce przez 10s i pozostawić na 5 min. Stężenie białka oznaczać przy długości fali 595 nm. **Spektrofotometr wykalibrować wobec próby nr 1 nie zawierającej białka (po włożeniu kuwety do spektrofotometru kliknąć „zero”), do analizy dalszych prób kliknąć „measure”.** Wykreślić krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenie białka BSA: $A = f(c)$.

Z otrzymanych supernatantów w poprzednich etapach pobrać 100 μ l supernatantu i zmieszać z 5 ml odczynnika Bradforda (wcześniej przygotować w probówkach o pojemności 15ml)Całość wymieszać na wytrząsarce przez 10s i pozostawić na 5 min. Stężenie białka oznaczać przy długości fali 595 nm., na podstawie krzywej wzorcowej obliczyć stężenie białka w poszczególnych supernatantach. Wynik podać w mg/ml (należy uwzględnić 10-krotne rozcieńczenie preparatu wątróbki).

Uwaga!

- **Przed przygotowaniem krzywej wzorcowej wymieszać przez 5s standardowy roztwór albuminy (BSA) znajdujący się w eppendorfce.**
- **Kuwety wypełnić roztworem w ok. 2/3 objętości (ok. 3ml roztworu)**
- **Po pomiarze absorbancji przepłukać kuwety wodą destylowaną z tryskawki.**
- **Do wycierania kuwet stosować papierową chusteczkę.**

- **Po zakończeniu pomiarów na spektrofotometrze przeplukać kuwety 96% etanolem, natomiast próbkę o pojemności 15ml denaturatem znajdującym się w spryskiwaczu.**

Sprawozdanie

- Narysować wykres stężenia białka wzorcowego (albuminy) $A = f(cBSA)$ i obliczyć stężenie białka w poszczególnych supernatantach (obliczenia dokonać na podstawie równania prostej). Na wykresie utworzyć linię trendu – typ liniowy, równanie prostej oraz wartość R-kwadrat.
- Przedstawić wyniki w postaci histogramu przedstawiając wzrost stężenia białka w supernatancie po procesie rozbijania w stosunku do preparatu wątroбки nie poddanym dezintegracji.
- Przedstawić w postaci histogramu wydajność procesu rozbijania komórek poszczególnymi metodami względem próby zerowej (oznaczenie białka przed dezintegracją – 0%).
- Opisać, jaka z używanych metod jest najbardziej odpowiednia do rozbijania komórek tkanki wątrobowej.
- We wstępie teoretycznym, proszę podać jaki jest cel stosowania dezintegracji komórek oraz proszę dokładnie opisać tylko jedną metodę dezintegracji komórek – inną niż w ćw. 3 (proszę podać literaturę, z której się korzystało podczas opisywania metody)