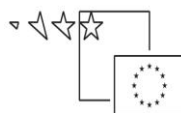




REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



*Naložba v vašo prihodnost*  
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA  
Evropski socialni sklad

# ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA IN BIOTEHNOLOGIJA

## VAJE IZ BIOTEHNOLOGIJE

ROSVITA ARZENŠEK PINTER

Višješolski strokovni program: Živilstvo in prehrana

Živilska mikrobiologija in biotehnologija

Vaje iz biotehnologije

Gradivo za 1. letnik

Avtorica:

Rosvita Arzenšek Pinter, univ. dipl. ing. živ. teh.  
IZOBRAŽEVALNI CENTER PIRAMIDA Maribor  
Višja strokovna šola



Ljubljana, 2008

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Impletum 'Uvajanje novih izobraževalnih programov na področju višjega strokovnega izobraževanja v obdobju 2008–11'.

Projekt oz. operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo RS za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, razvojne prioritete 'Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja' in prednostne usmeritve 'Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja'.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD V BIOTEHNOLOŠKE TEHNIKE DELA .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>SPREMINJANJE OSNOVNIH RASTNIH PARAMETROV ZAPRTEGA BIOPROCESA PRI RAZLIČNIH IZVORIH OGLJIKA.....</b>	<b>4</b>
2.1	NALOGA .....	4
2.2	POTEK VAJE .....	4
2.2.1	Priprava inokuluma.....	4
2.2.2	Priprava tehnike .....	4
2.2.3	Priprava gojišča .....	4
2.2.4	Doziranje različnih izvorov ogljika .....	5
2.3	ZAGON BIOPROCESA .....	5
2.4	NADZOR BIOPROCESA.....	5
2.5	POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA.....	5
<b>3</b>	<b>KINETIKA RASTI KVASOVKE SACCHAROMYCES V ZAPRTEM BIOPROCESU PRI ANAEROBNEM TIPU KULTIVACIJE .....</b>	<b>7</b>
3.1	NALOGA .....	7
3.2	POTEK VAJE .....	7
3.2.1	Priprava inokuluma.....	7
3.2.2	Priprava biorektorske tehnike .....	8
3.2.3	Priprava naravnega gojišča .....	8
3.3	ZAGON BIOPROCESA .....	8
3.4	NADZOR BIOPROCESA.....	8
3.5	MERITVE .....	9
3.5.1	Merjenje pH-vrednosti.....	9
3.5.2	Določanje števila kvasovk v sistemu.....	9
3.5.3	Določanje koncentracije preostalega izvora ogljika .....	9
3.5.4	Določanje koncentracije etanola.....	9
3.6	POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA.....	9
<b>4</b>	<b>METODE IZOLACIJE IN SEPARACIJE .....</b>	<b>12</b>
4.1	HOMOGENIZIRANJE .....	12
4.2	CENTRIFUGIRANJE.....	12
4.3	GELSKO FILTRACIJSKA KROMATOGRAFIJA.....	13
4.4	NALOGA .....	13
4.5	POTEK VAJE .....	14
4.6	POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA.....	16
<b>5</b>	<b>IZOLACIJA DNA IZ TKIV .....</b>	<b>18</b>
5.1	NALOGA .....	18
5.2	REAGENTI IN MATERIAL.....	18
5.3	POTEK VAJE .....	19
5.3.1	Izolacija DNA iz živalskega tkiva .....	19
5.3.2	Izolacija DNA iz rastlinskih tkiv .....	20
5.3.3	Izolacija DNA iz človeške sline .....	21
5.4	NAVODILO ZA DELO: .....	21
5.5	POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA.....	23
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>24</b>



## 1 UVOD V BIOTEHNOLOŠKE TEHNIKE DELA

Da bi lahko spremljali ali celo usmerjali bioproces, moramo poznati številne faktorje, ki vplivajo na njegov potek. Faktorji okolja (temperatura, pH, hranila) lahko izzovejo, okrepijo ali zavrejo biokulturo. Produkt teh uravnanih aktivnosti mora biti pridelek, saj tako upravičimo industrijsko uspešnost bioprocesa.

Vsak bioproces združuje v sebi pozitivno in negativno delovanje. Zato mora vsak tehnolog vedeti, kako vplivati na biokulturo, da bi bilo njeno delovanje pozitivno. Pozitivni bioproces zajema vse aktivnosti, ki vodijo k zelenemu pridelku. Negativni bioproces pa določa vse aktivnosti, ki ovirajo nastajanje kvalitetnih pridelkov ali pa jih celo uničujejo zaradi biosinteze encimov ali metabolitov, ki ovirajo sintezo ali celo razgrajujejo že akumuliran proizvod. Pri neaseptično vodenih bioprocseh pa mora biti posvečena posebna pozornost aktivnosti tehnoloških kvarljivcev, saj lahko usmerijo bioproces v popolno destrukcijo. Seveda pa je potrebno posvetiti po končanem bioprocusu pomembno pozornost varovanju okolja. Glej povezave:

[http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/eko/varokup2001/predavanje\\_5.htm](http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/eko/varokup2001/predavanje_5.htm)

<http://www.umanotera.org/>

<http://www.genomenewsnetwork.org/>

Obvladovanje bioprocesa je področje biotechnologa, ki mora upoštevati, da je ključni element bioprocesa delovna biokultura.

Vaje v tem sklopu seznanjajo študente z značilnostmi pri vodenju bioprocsov in na nujnost poznavanja delovnih biokultur. Spoznajo tudi metode izolacije, separacije in čiščenja produktov bioprocesa ter metode izolacije DNA.

Za izvedbo vaj je potrebno imeti:

- delovno haljo
- kalkulator
- ravnilo

## **2 SPREMINJANJE OSNOVNIH RASTNIH PARAMETROV ZAPRTEGA BIOPROCESA PRI RAZLIČNIH IZVORIH OGLJIKA**

(Vir: Raspor P., in Smole-Možina, S. *Praktikum iz biotehnologije*. Ljubljana: Bia, 1993)

Zaprti bioprocasi so tipični za večino današnjih uspešnih biotehnoloških postopkov. Inokulum vnesemo v sterilizirano ali nesterilizirano gojišče, da bi ga spremenili v uporaben proizvod. Rastna kinetika biokultur je pogojena s substratom, njegovo koncentracijo in razmerjem hranilnih komponent v gojišču. Učinkovitost biosinteze zelenega proizvoda pa je pogojena tudi z ekološkimi faktorji rasti, kot so temperatura, pH vrednost, ozmotski pritiski.

Pri optimiranju bioprocasa v smeri večjih izkoristkov, tako v časovnem kot v količinskem smislu, so izredno pomembne tudi fiziološke posebnosti biokultur v danem okolju.

Zaradi naštetih specifičnosti in široke uporabe tovrstnih bioprocasa še vedno intenzivno raziskujejo obnašanje proizvodnih biokultur, saj se razmerja med biomaso, substratom in proizvodi v vsakem trenutku kultivacije spreminjajo.

### **2.1 NALOGA**

Namnoževanje kvasovke *Saccharomyces* na različnih izvori ogljika in ugotavljanje rasti.

### **2.2 POTEK VAJE**

#### **2.2.1 Priprava inokuluma**

Kulturo kvasovke 25 g suspendiramo v 250 ml fiziološke raztopine v erlenmajerico in jo namnožujemo 24 ur na stresalniku (28 °C, 250 min<sup>-1</sup>).

#### **2.2.2 Priprava tehnike**

Eksperiment lahko poteka v erlenmajericah.

#### **2.2.3 Priprava gojišča**

Pripravimo 1.000 ml sintetičnega gojišča brez izvora ogljika in ga steriliziramo po 45 ml v erlenmajericah. Različne izvore ogljika pripravimo posebej kot 10 % raztopine, jih steriliziramo in z injekcijsko brizgalko skozi folijo na grlu aseptično prenesemo v erlenmajerice.

## 2.2.4 Doziranje različnih izvorov ogljika

kombinacija sladkorjev	erlenmajerica
glukoza 5 ml	1
maltoza 5 ml	2
glukoza 1 ml, maltoza 4 ml	3
glukoza 2,5 ml, maltoza 2,5 ml	4
glukoza 4 ml, maltoza 1 ml	5

## 2.3 ZAGON BIOPROCESA

Erlenmajerice inokuliramo in prenesemo v inkubator s temperaturo 28 °C.

## 2.4 NADZOR BIOPROCESA

Bioprocen spremljamo z direktnim štetjem kvasovk pod mikroskopom vsako uro.

## 2.5 POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA

Zagon biotehnoškega postopka zahteva poleg opreme in pripravljenega delovnega organizma še nekaj – pripravo hranilnega substrata. Hranilni substrat predstavlja bistven delež stroškov postopka, zato mora za čim nižjo ceno zagotavljati vse potrebne hranilne snovi v optimalnih množinah. Pri načrtovanju bioprocasa je potrebno dobro proučiti kakšni so optimalni pogoji za delovanje izbrane biokulture.

Izbira in priprava substrata je vir negotovosti in rizika. Prisiljeni smo iskati najugodnejši kompromis med zahtevami delovnega organizma, sposobnostjo procesne opreme, zahtevnostjo produkta, naravno variabilnostjo sestave komponent substratov, njihovo dosegljivostjo in ceno. Kompleksni substrati so kljub številnejšim neznankam še vedno boljša izbira kot kemično definirani.

**Ime in priimek:** \_\_\_\_\_ **Skupina:** \_\_\_\_\_

1. V tabelo 1 vpiši število kvasovk v mililitru posamezne raztopine sladkorja.

Tabela 1: Rast kvasovk glede na različne izvore ogljika

kombinacija sladkorjev	erlenmajerica	št. kvasovk / ml
glukoza 5 ml	1	
maltoza 5 ml	2	
glukoza 1 ml, maltoza 4 ml	3	

glukoza 2,5 ml, maltoza 2,5 ml	4
glukoza 4 ml, maltoza 1 ml	5

2. Glede na rezultate eksperimenta napiši kako različni izvori ogljika vplivajo na rast kvasovk.

---

---

---

---

3. Kakšni substrati so po tvoji oceni za rast kultur boljši: naravni ali kemijsko definirani? Svojo oceno komentiraj.

---

---

---

---

---



### 3 KINETIKA RASTI KVASOVKE *Saccharomyces* V ZAPRTEM BIOPROCESU PRI ANAEROBNEM TIPU KULTIVACIJE

(Vir: Raspor P., in Smole-Možina, S. *Praktikum iz biotehnologije*. Ljubljana: Bia, 1993)

Med anaerobne bioprocese uvrščamo v živilstvu alkoholno in mlečnokislinsko fermentacijo, fermentirane mesne izdelke in fermentirano zelenjavo.

Skoraj vsi delovni organizmi so fakultativni anaerobi, kar pomeni, da jih prisotnost kisika v začetni fazi kultivacije ne moti oziroma da je določena količina kisika celo nujna, da bi bioprocen normalno potekal. To velja predvsem za kvasovke. Mlečnokislinske bakterije prav tako niso občutljive na prisotnost kisika (*Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*), bakterije *Zimmomonas mobilis*, *Propionibakterium sp.* in *Clostridium acetobutiricum* pa ne tolerirajo kisika. Metanogene bakterije že uvrščamo med striktne anaerobe.

Anaerobnost se običajno vzpostavi postopno, ko ogljikov dioksid izpodrine zrak in organizmi porabijo preostali kisik s svojo metabolno aktivnostjo. Bioprocen se po tej prvi fazi nadaljuje nekoliko počasneje, saj se saharidi pretvarjajo po običajni glikolitični poti do organskih kislin (mlečna, očetna, propionska) ali alkohola (etanol, glicerol, butanol).

Vzpostavljanje anaerobnosti temelji na posebnih bolj ali manj enostavnih ventilih, ki dopuščajo plinom izhod iz sistema, ni pa možen povraten vstop zraka v bioreaktorske sisteme. To je nujno zaradi preprečevanja neželene oksidacije proizvoda in kontaminacije (čeprav ti procesi zaradi akumulacije relativno agresivnih metabolitov in/ali nizke pH-vrednosti sodijo med avtozaščitene bioprocese).

Anaerobni bioproceni imajo ob že omenjenih še nekatere druge prednosti. Energetsko niso zahtevni, saj ni potrebno prezračevanje in vnašanje kisika, ki sta energetsko najzahtevnejša procesa. Konstrukcija bioreaktorja je zaradi tega enostavnejša. Slaba stran teh bioprocen v primerjavi z aerobnimi pa je, da so relativno dolgotrajnejši.

#### 3.1 NALOGA

Prireditve bioreaktorja za anaerobni tip kultivacije. Priprava gojišča in inokuluma čiste kulture *Saccharomyces cerevisiae*, inokulacija, spremljanje rasti v bioreaktorju z merjenjem optične gostote gojišča ter ostalih rastnih parametrov, koncentracije preostalega izvora ogljika, pH, števila kvasovk in akumuliranega etanola.

#### 3.2 POTEK VAJE

##### 3.2.1 Priprava inokuluma

1. Čisto kulturo kvasovke (25 g/50 ml fiziološke raztopine, dodano 3 g glukoze) namnožujemo 24 ur na stresalniku.
2. Direktno inokuliramo substrat z liofilizirano kulturo kvasovk in pri dodani količini upoštevamo navodila proizvajalca.

### 3.2.2 Priprava biorektorske tehnike

Čist, suh bioreaktor vpnemo v nosilno stojalo in steriliziramo v avtoklavu (121 °C, 30 min), ker je predvideno poznejše aseptično polnjenje pasteriziranega gojišča. Po vnosu gojišča in inokulaciji montiramo vrelo veho, da čim prej dosežemo fakultativno anaerobne pogoje in s tem uspešnejšo fermentacijo.

### 3.2.3 Priprava naravnega gojišča

Jabolčni sok pasteriziramo, določimo koncentracijo fermentirajočih sladkorjev ter uravnamo pH-vrednost na 4–5, če je to potrebno.

## 3.3 ZAGON BIOPROCESA

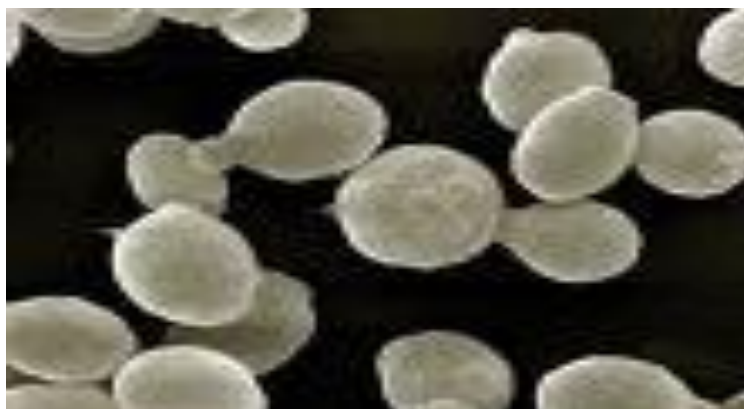
Po aseptičnem prenosu gojišča v bioreaktor opravimo inokulacijo skozi grlo bioreaktorja (volumen inokuluma je 5–10 % volumna substrata). Pokrijemo z vrelo veho in prvič vzorčimo.

## 3.4 NADZOR BIOPROCESA

Med bioprosesom vzorčimo v posebne plastične epruvete vsakih 24 ur. Po določitvi optične gostote in pH-vrednosti hranimo vzorec v zmrzovalniku (–18 °C) do analize sladkorjev in etanola v brozgi.

Dogajanja v bioreaktorju spremljamo z:

- merjenjem pH-vrednosti,
- določanjem števila celic kvasovk v sistemu,
- določanjem koncentracije preostalega izvora ogljika,
- določanjem koncentracije etanola.



Slika 1: Pekovska kvasovka

Vir: <http://images.google.si/images?hl=sl&q=kvasovka&btnG=I%C5%A1%C4%8Di+slike&gbv=2>

### **3.5 MERITVE**

#### **3.5.1 Merjenje pH-vrednosti**

pH-vrednost merimo s pH-metrom.

#### **3.5.2 Določanje števila kvasovk v sistemu**

Štetje kvasnih celic poteka s klasično metodo štetja na posebnem objektnem stekelcu ob sočasni kontroli morfologije kvasnih celic.

#### **3.5.3 Določanje koncentracije preostalega izvora ogljika**

Uporabljamo refraktometer. Pred merjenjem vzorec centrifugiramo in uporabimo supernatant, da zmanjšamo napako zaradi prisotne biomase. Vpliv ostalih komponent gojišča oz. produktov bioprocasa na suho snov lahko zanemarimo.

#### **3.5.4 Določanje koncentracije etanola**

Koncentracijo etanola v brozgi ob zaključku bioprocasa določimo z ebulioskopom. Metoda temelji na merjenju vreliščnih temperatur destilirane vode in alkoholnih raztopin. Na skali ebulioskopa direktno odčitamo koncentracijo etanola v vol. %. Za analizo potrebujemo ca. 100 ml vzorca, zato jo lahko izvedemo le ob zaključku bioprocasa.

### **3.6 POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA**

Z izrazom biotehnološki postopki opisujemo procese, pri katerih nastaja proizvod kot posledica delovanja mikrobnih, rastlinskih ali živalskih celic. Ločimo več vrst komercialno uporabnih bioprocasa, pri katerih lahko dobimo npr. biomaso, mikrobnne encime in mikrobnne metabolite.

**Bioproc** je le osrednji del biotehnološkega postopka, ki je **običajno sestavljen iz naslednjih šestih faz:**

1. priprava medija, ki bo služil kot gojišče za mikroorganizem v nacepnem bioreaktorju in produkcijskem bioreaktorju;
2. sterilizacija medija, bioreaktorjev in opreme;
3. priprava čiste, aktivne kulture v zadostni količini za nacepitev produkcijskega bioreaktorja;
4. bioproc v produkcijskem bioreaktorju pod optimalnimi pogoji za nastajanje produkta;
5. izolacija, čiščenje in pakiranje produkta;
6. odstranitev odpadkov, ki so nastali med zgoraj navedenimi procesi.

**Ime in priimek:** \_\_\_\_\_ **Skupina:** \_\_\_\_\_

1 Nariši tehnično skico bioreaktorja za anaerobno kultivacijo in opiši njegove dele.

2. Zapiši kemijsko formulo, ki opisuje fermentacijo kvasovke v danem sistemu.

\_\_\_\_\_

3. Izračunaj spremenljivke zaprtega anaerobnega bioprocesa in izračunaj izkoristek.

MERITVE:

**IZKORISTEK BIOPROCESA ( $Y_P$ )=** \_\_\_\_\_

4. Grafično predstavi spremenljivke bioprocesa (število celic, pH-vrednost, preostanek sladkorjev, volumski % etanola) s časovno skalo.

5. Razmisli ali bi lahko bioproces še potekal in svoj odgovor utemelji.

---

---

---

---

---

## 4 METODE IZOLACIJE IN SEPARACIJE

Kadar želimo študirati lastnosti in funkcijo določene molekule, ki ima v celici ali tkivu neko funkcijo, moramo tkivo najprej razbiti ali homogenizirati. Dele homogenata pa ločimo s centrifugiranjem.

### 4.1 HOMOGENIZIRANJE

Homogeniziranje ali razbijanje celic je postopek, v katerem tkivo izgubi svoje morfološke in nekatere biokemijske lastnosti. Pri tem razbijemo vezi med celicami, celične stene in membrane ter tako sprostimo vsebino celice v primeren medij.

Na začetku tkivo razrežemo na drobne kose in ga suspendiramo v izotonično raztopino, da preprečimo poškodbe subcelularnih organelov. V ta namen največkrat uporabljamo izotonično raztopino saharoze ali NaCl in po potrebi dodamo suspenziji tudi druga sredstva, ki omogočajo, da organele in biomolekule ne spremenijo svojih lastnosti. Velikokrat se v ta namen doda glutation, EDTA, ipd.

Homogeniziranje tkiva lahko izvedemo na različne načine:

- homogeniziranje s kremenčevim peskom,
- s povišanjem tlaka,
- s homogenizatorjem,
- z ultrazvokom,
- z osmotskim tlakom,
- z encimi.

Homogeniziranje mora potekati pri temperaturi od 0–4 °C, ker večina metod za razbijanje segreje tkivo. Dobljeni homogenizat lahko z diferencialnim centrifugiranjem ločimo na posamezne subcelularne frakcije.

### 4.2 CENTRIFUGIRANJE

Centrifugiranje je ena najbolj razširjenih metod separacije. Z njim lahko ločimo trdne snovi od tekočih ali dve tekočini, ki se ne mešata. Pod vplivom centrifugalne sile se delci v raztopini ali suspenziji, ki so težji od topila, začnejo dosti hitreje sesedati proti dnu centrifugirke. Temu gibanju delcev ali sedimentaciji nasprotujeta sila vzgona in sila trenja.

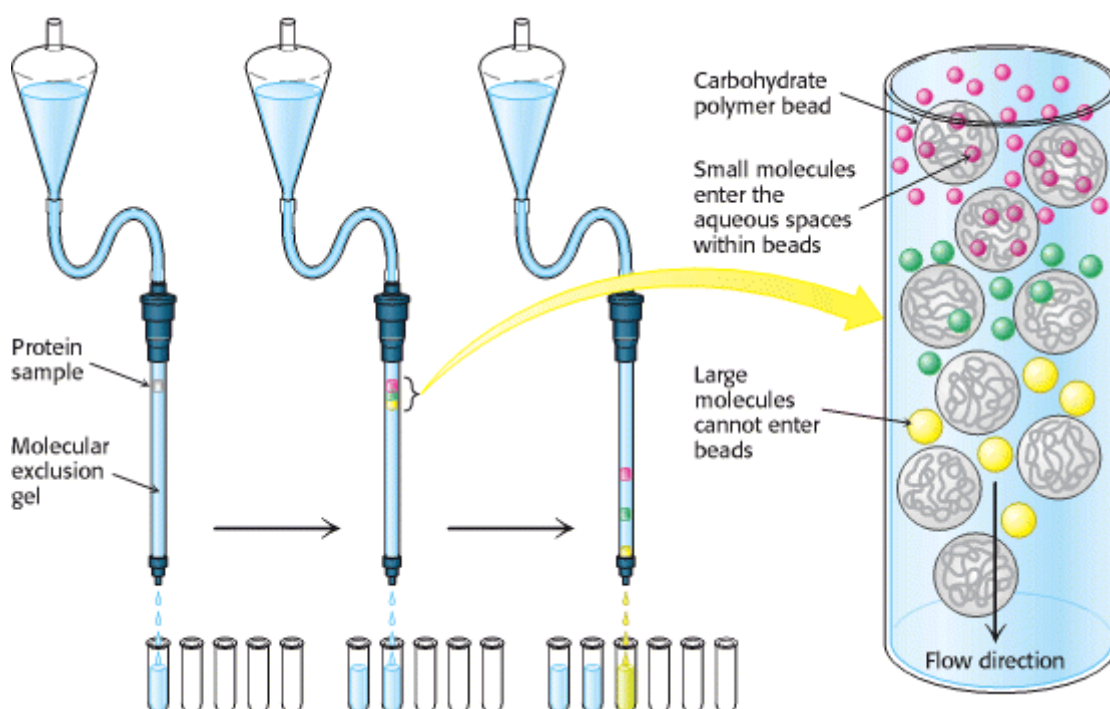
Sedimentacija se uporablja za karakterizacijo makromolekul (beljakovine). Po centrifugiranju dobimo na dnu centrifugirke usedlino ali sediment, tekočino nad njo pa imenujemo supernatant.

Kadar želimo iz subcelularnih frakcij izolirati določene spojine, moramo tkivni homogenizat centrifugirati tako, da dobimo posebej jedra, mitohondrije, mikrosome in citosol. Postopek imenujemo diferencialno centrifugiranje.

### 4.3 GELSKO FILTRACIJSKA KROMATOGRAFIJA

Za čiščenje biomolekul so najbolj primerne metode dializa, gelska filtracija, kromatografija in elektroforeza. Vsem tem tehnikam je skupno to, da ločijo molekule med seboj po majhni razliki v velikosti, obliki, molski masi ali topnosti oziroma adsorpcijskih lastnostih.

Gelska filtracija je metoda s katero ločimo različne molekule med seboj po velikosti. Tako ločitev omogoča kolona, napolnjena s primernim gelom kot npr. Sephadex. To je sicer komercialno ime za polisaharid dekstran, katerega molekule so zamrežene z epiklorhidrinom tako, da nastanejo pore določene velikosti. V te pore lahko vstopajo manjše molekule, večje pa ne in zato večje molekule pridejo hitreje v eluat kot manjše.



Slika 2: Prikaz potovanja molekul skozi gel

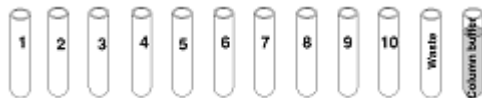
Vir: <http://www.explorer.bio-rad.com>

### 4.4 NALOGA

- Spoznati različne tehnike, ki jih uporabljamo pri čiščenju produktov.
- Ločiti hemoglobin in vitamin B<sub>12</sub> s pomočjo gelske kromatografije. Ker je hemoglobin večji, se bo izločil na začetku, vitamin pa na koncu. Tako dobimo dve čisti snovi.

#### 4.5 POTEK VAJE (Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>)

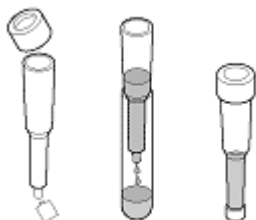
1. Pripravi 12 epruвет. Deset jih označi s števkami od 1 do 10. Ena naj bo označena z oznako odpadki, druga pa z oznako pufer. Epruvete postavi v stojalo in ga označi s svojim imenom. S čisto pipeto odpipetiraj 4 ml pufera v epruveto z oznako pufer.



Slika 3: 12 označenih epruвет

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

2. Odstrani zamašek na vrhu in odlomi konec na koloni. Kolono postavi v epruveto z oznako odpadki in počakaj, da odteče ves pufer iz kolone. Ali je celotna količina pufera odtekla, se prepričaj, če opaziš zrnato strukturo nosilca (gela = polisaharidne kroglice). Nato dno kolone zapri z zamaškom.



Slika 4: Kolona z gelom

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

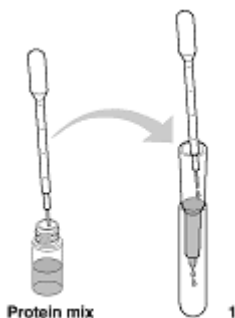
3. Previdno postavi kolono v prvo epruveto. Sedaj je kolona pripravljena za nanos vzorca.



Slika 5: Kolona brez pufera

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

4. Kolono odmaši tik preden naneseš vzorec (zmes hemoglobina in vitamina B<sub>12</sub>) – tako se kolona ne bi osušila. S pipeto previdno nanesi eno kapljico vzorca na vrh nosilca kolone, tako da se ne dotakneš stene kolone in da je pipeta čim bližje kroglicam.

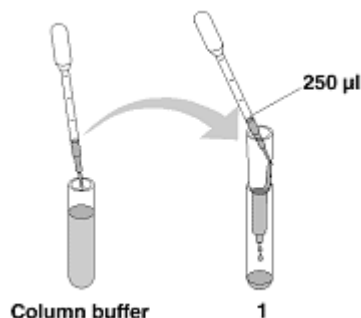


Slika 6: Nanos vzorca

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>



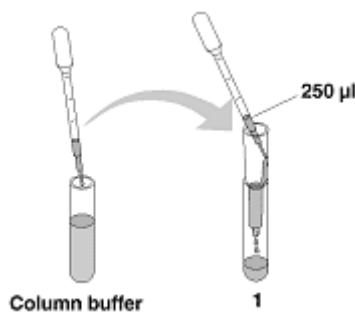
5. Takoj za vzorcem previdno dodaj 250  $\mu$ l puфра. Pufer nalivamo na nosilec ob steni kolone, da ne povzročimo premikanja kroglic v koloni. Kolone ne premikamo in ne stresamo. Tako bo ločevanje molekul v vzorcu boljše. Začni zbirati kapljice v prvi epruveti.



Slika 7: Dodatek puфра

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

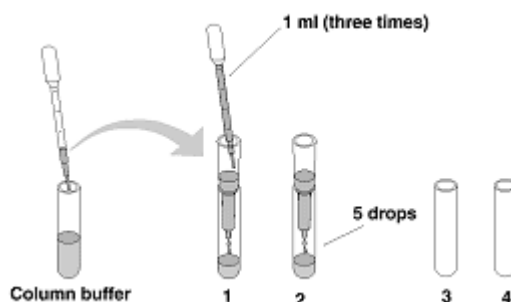
6. V kolono previdno dodaj še 250  $\mu$ l puфра. Nadaljuj z zbiranjem kapljic v prvi epruveti. Kapljic ti še ni potrebno šteti.



Slika 8: Zbiranje kapljic

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

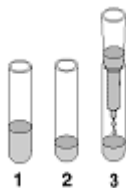
7. V kolono dodaj še 3X1 ml (3ml) puфра. Vzorec je sedaj že v sredini kolone. Kolono prenesi v epruveto št. 2 in začni šteti kapljice. Zberi 5 kapljic.



Slika 9: Potovanje vzorca

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

8. Nato prenesi kolono v epruveto št. 3. Ponovno zberi 5 kapljic in nato ta postopek ponovi do epruvete št. 9.



Slika 10: Elucija vzorca 1

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

9. V epruveti št. 10 zberi 10 kapljic, nato kolono zamaši in jo shrani v hladilnik. Skiciraj svoje rezultate.



Slika 11: Elucija vzorca 2

Vir: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>

#### 4.6 POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA

Po končanem bioprocesu sledi faza izolacije produkta. Postopki izolacije so odvisni od vrste produkta. Idealno je, če omogočajo izolacijo produkta v čisti obliki in v največji možni količini. V ta namen se vedno bolj uporabljajo različne kromatografske metode. Gelska kromatografija omogoča ločevanje posamezne komponente v vzorcu na osnovi njene molske mase. Metoda je zelo natančna in hkrati enostavna, kar je njena velika uporabna prednost.

Ime in priimek: \_\_\_\_\_ Skupina: \_\_\_\_\_

1. Skiciraj graf elucije hemoglobina in vitamina B<sub>12</sub>.

V katerih epruvetah se je eluiral hemoglobin? \_\_\_\_\_

V katerih epruvetah se je eluiral vitamin B<sub>12</sub>? \_\_\_\_\_

V katerih epruvetah se je izločil pufer? \_\_\_\_\_

2. Molekulska masa vitamina B<sub>12</sub> je 1.35 D, hemoglobina pa 65 D. 1 Dalton (D) =  $1,66 \times 10^{-27}$  kg. Kaj lahko razbereš iz teh podatkov?

---

---

---

3. Katere vzorce bi še lahko ločeval s to tehniko ?

---

---

4. Zapiši vse metode izolacije, ki si jih spoznal na vajah in jih med seboj primerjaj.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Več o kromatografskih metodah si lahko prebereš na spletni povezavi:

[http://novebiologije.wikia.com/wiki/Biokemijske\\_in\\_molekularnobiolo%C5%A1ke\\_metode#Kromatografske\\_metode\\_v\\_biokemiji](http://novebiologije.wikia.com/wiki/Biokemijske_in_molekularnobiolo%C5%A1ke_metode#Kromatografske_metode_v_biokemiji)

## 5 IZOLACIJA DNA IZ TKIV

DNK je kot nosilec genske informacije brez dvoma najvažnejša sestavina celice. V človeškem organizmu samo zreli eritrociti ne vsebujejo DNA. Vsaka celica, ki nima DNA, izgubi sposobnost delitve, lahko sicer še nekaj časa sodeluje v metaboličnih procesih, če seveda vsebuje potrebne encime.

Okvare na molekulah DNA so za celico lahko izredno nevarne. Vse proteinske molekule, ki se sintetizirajo pod vodstvom okvarjenega dela DNA (gena), so lahko nefunkcionalne ali pa jim je funkcija zmanjšana. Nefunkcionalnost encima ali strukturnega proteina ima za celico pogosto usodne posledice. Obstaja hipoteza, ki somatskim mutacijam DNA pripisuje celo vzrok za staranje in kancerogenezo.

Visokopolimerno DNA je potrebno izolirati v nativni obliki vedno takrat, kadar nas zanima njena struktura. Zato raziskovalci še vedno izpopolnjujejo metode za pridobivanje čiste DNA v nativni obliki iz vseh vrst organizmov od bakteriofagov do tkiv sesalcev.

DNA se nahaja v celicah skupaj s proteini in drugimi visokopolimernimi spojinami kot so polisaharidi. Zato jo je potrebno ločiti od teh snovi. Beljakovine odstranjujemo na več načinov. Lahko uporabimo raztopino fenola, kloroform ali raztopino detergenta natrijevega dodecilsulfata (NaDS). Pri tem se proteini denaturirajo in jih oborjene ločimo od DNA s centrifugiranjem. Za pridobivanje DNA v čisti in nativni obliki je najprimernejši telečji priželjc ali timus, ker ima relativno malo encimov dezoksiribonukleaz in vsebuje sorazmerno veliko DNA (do 1 % vlažne teže).

DNA je osnova za različne raziskave:

- Klinične preiskave npr. odkrivanje genetskih nepravilnosti pri še nerojenem otroku, ugotavljanje skladnosti tkiv pri transplantaciji organov.
- Ugotavljanje sorodnosti npr. očetovstva, identifikacije trupel.
- Izolaciji želenega gena npr. uporaba GSO in gensko zdravljenje.

### 5.1 NALOGA

- Izolirati DNK iz živalskega tkiva (priželjc ali timus), iz rastlinskih tkiv (banane, kivija, čebule) in svojo lastno DNA iz sline.
- Spoznati različne tehnike, ki jih uporabljamo pri čiščenju produktov.

### 5.2 REAGENTI IN MATERIAL

- Telečji timus, banana, kivi, čebula, slina
- SSC reagent (0,015 M raztopina Na-citrata in 0,15 M raztopina NaCl; 1: 1)
- NaDS reagent (4 % raztopina natrijevega dodecilsulfata v 45 % etanolu)
- SSC + NaDS (50 ml SSC reagenta + 5,6 ml NaDS reagenta)

- NaCl, trden
- 96 % etanol, ledenomrzal
- kuhinjska sol,
- detergent,
- proteaza,
- sterilna voda,
- pufer za lizo celic,
- led
- skalpel (ali škarje)
- pincete
- homogenizator (terilnica)
- centrifuga
- centrifugirke
- tehnica
- kapalke
- vodna kopel
- steklene palčke
- merilni valji (25 ml)
- čaše (100 ml)
- mikropruvete ali epice,
- citološke palčke,
- parafilm,
- pipete,
- verižice za shranjevanje DNA.

### **5.3 POTEK VAJE**

#### **5.3.1 Izolacija DNA iz živalskega tkiva**

1. 0,5 g timusa razreži na drobne koščke in prenesi v posodo homogenizatorja ali terilnice. Dodaj 10 ml SSC reagenta ter homogeniziraj na ledu trikrat po 1 minuto. Vsebino homogenizatorja prelij v centrifugirke in centrifugiraj 10 minut pri 2.500 obratih/minuto. **POZOR! CENTRIFUGIRKE MORAJO BITI URAVNOTEŽENE!**
2. Supernatant odlij, sedimentu dodaj 25 ml SSC + NaDS reagenta in homogeniziraj na ledu eno minuto. Zmes pusti stati pri sobni temperaturi 15 minut, občasno premešaj, nato počasi dodaj 1 g NaCl in mešaj 5 minut pri sobni temperaturi, nato pa še 5 minut na ledu. **POZOR! MED MEŠANJEM NE TOLČI S PALČKO OB STENO POSODE!** Centrifugiraj 15–20 minut pri 3500 obratih/minuto.
3. Supernatant prelij v čašo in mu ob stalnem mešanju s palčko počasi dolivaj dvojni volumen 96 % etanola, ohlajenega na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Med mešanjem se DNA navija na stekleno palčko.



Slika 12: Izolirana in na palčko navita DNA  
Vir: [http://www.biotehnologija.org/strokovne\\_strani](http://www.biotehnologija.org/strokovne_strani)

### 5.3.2 Izolacija DNA iz rastlinskih tkiv

POSTOPEK	KAJ SE DOGAJA ?
3g kuhinjske soli in 10 ml detergenta daj v stekleno čašo in dopolni vsebino z vodo do volumna 100 ml ter z mešanjem raztopi sol.  Rastlinsko tkivo nareži na majhne koščke in jih dodaj v pripravljeno raztopino soli in detergenta.	
Stekleno čašo z mešanico postavi za 15 minut v 60 °C toplo vodno kopel.	
Mešanico postavi za 10 minut v ledeno kopel, da se ohladi na sobno temperaturo. Ohlajamo tako, da v položni legi hitro rahlo obračamo čašo.	
Koščke tkiva razbijemo s paličnim mešalnikom v 5 sekundah.	
Suspenzijo celic filtriramo skozi filter papir (filter za kavo).	
10 ml hladnega etanola previdno zlijemo po steni nagnjene epruvete na ekstrakt.	
V zgornjo plast mešanice izločeno DNA s previdnim vrtenjem navijemo na zobotrebec in izvlečemo iz raztopine.	
<b>Ali ti je uspelo ?</b>	

### 5.3.3 Izolacija DNA iz človeške slin



Slika 13: Material za določanje DNA

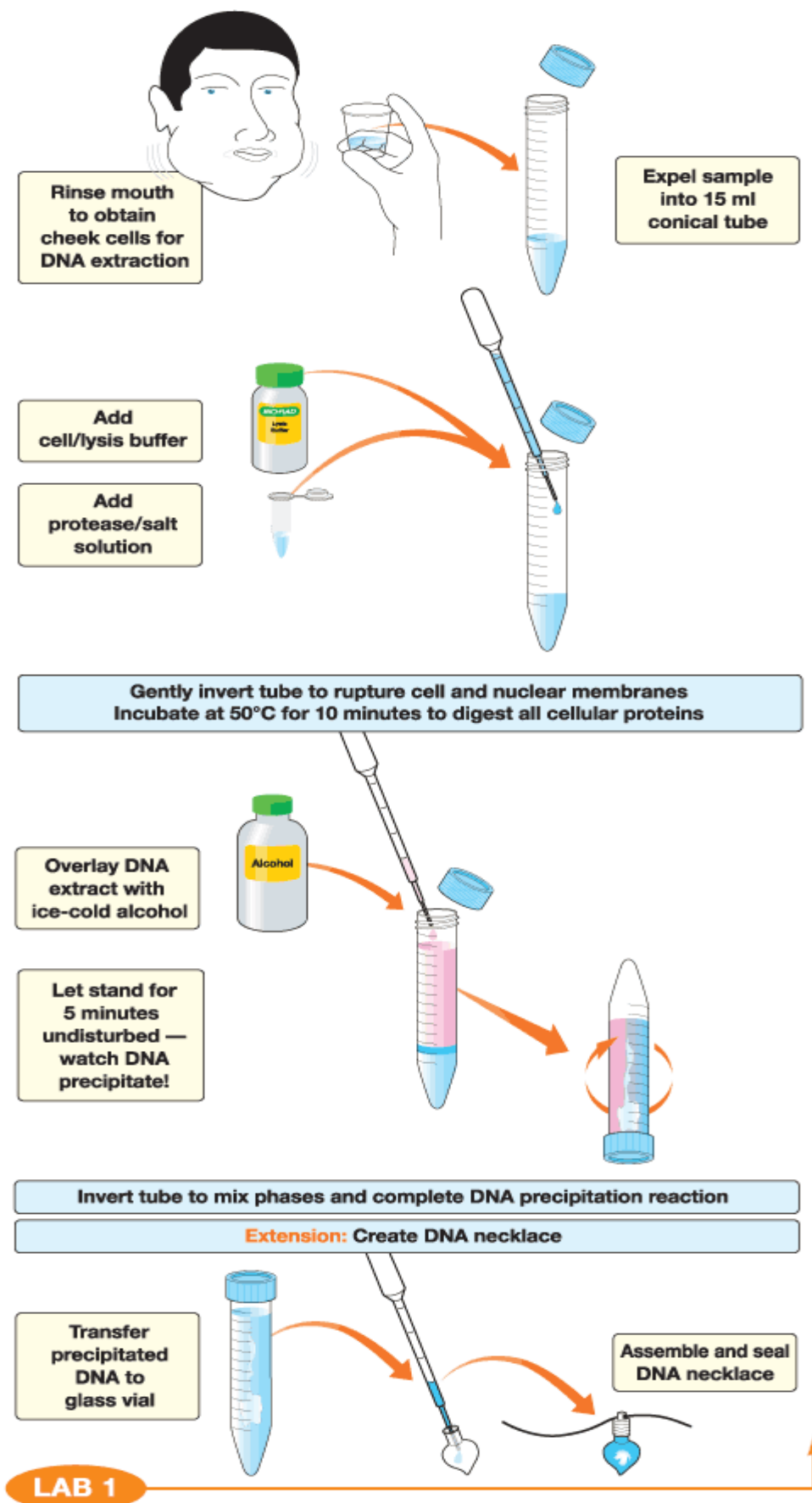
Vir: <http://www.explorer.bio-rad.com>

#### **Zapiši kateri material je potreben za določanje DNA iz človeške slin:**

- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 

#### **5.4 NAVODILO ZA DELO:**

1. Odvzemi vzorec slin in ga suspendiraj v pufri za razgradnjo celic.
2. Dodaj proteazo.
3. Dodaj sol.
4. Inkubiraj pri 50 °C, 10 minut.
5. Prelij z ledenohladnim etanolom in pusti stati 5 minut.
6. Prenesi DNA v obsek verižice.



Slika 14: Potek izolacije DNA iz človeške sline

Vir: <http://www.explorer.bio-rad.com>



## 5.5 POVZETEK VAJE S PREDSTAVITVIJO REZULTATOV EKSPERIMENTA

Spoznali smo, da se molekula DNA nahaja v rastlinski, živalski in človeški celici. Nosi vse genetske informacije posameznega organizma. DNA, ki kodira specifičen protein, odgovoren za individualno genetsko lastnost, imenujemo gen. Metode izolacije DNA so zelo različne. Predvsem moramo biti pozorni na to, da v postopku izolacije DNA ne izgubimo, bodisi zaradi uporabe kemikalij ali pa zaradi previsoke temperature.

**Ime in priimek:** \_\_\_\_\_ **Skupina:** \_\_\_\_\_

---

1. Kaj si opazil pri izolaciji DNA v vseh treh primerih?

---

---

---

2. Za katere preiskave potrebujemo izolirano DNA?

---

---

3. Poglej si spodnji spletni povezavi in pojasni kaj je PCR-tehnika in v čem je njena prednost pred klasično mikrobiološko analizo.

[http://www.medvedi.si/index.php?option=com\\_content&task=view&id=25&Itemid=36](http://www.medvedi.si/index.php?option=com_content&task=view&id=25&Itemid=36)  
<http://images.google.si/images?q=PCR&hl=sl&um=1&ie=UTF-8&sa=X&oi=images&ct=title>

---

---

---

---

---

Več o ugotavljanju identitete posameznika na osnovi DNA si lahko prebereš na naslovu:  
<http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/drobnic-clanek.pdf>

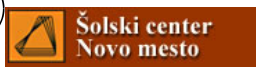
## 6 LITERATURA

- Abram, V. *Vaje iz biokemije*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 1996.
- Atkinson, B., in Favituna, F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. London: Macmillan Stockton Press, 1992.
- Raspor, P. *Biotehnologija*. Ljubljana: Bia, 1992.
- Raspor P., in Smole-Možina, S. *Praktikum iz biotehnologije*. Ljubljana: Bia, 1993.
- Biotehnološki portal. (online). 2008. (citirano 12.11.2008). Dostopno na naslovu: [http://www.biotehnologija.org/strokovne\\_strani](http://www.biotehnologija.org/strokovne_strani)
- Gelska kromatografija. (online). 2008. (citirano 12.11.2008). Dostopno na naslovu: <http://www.biotehnologija.org/kromatografija>.
- Genes in a bottle. (online). 2008. (citirano 12.11.2008). Dostopno na naslovu: <http://www.explorer.bio-rad.com>
- Osnove biotehnologije za razumevanje naravovarstva. (online). 2008. (citirano 12.11.2008). Dostopno na naslovu: [http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/eko/varokup2001/predavanje\\_5.htm](http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/eko/varokup2001/predavanje_5.htm)
- Genome News Network. (online). 2008. (citirano 12.11.2008). Dostopno na naslovu: <http://www.genomenetwork.org/>
- Skrbinšek, T. *Verižna reakcija polimeraze PCR*. (online). 2008 (citirano 12.11.2008). Dostopno na naslovu: [http://www.medvedi.si/index.php?option=com\\_content&task=view&id=25&Itemid=36](http://www.medvedi.si/index.php?option=com_content&task=view&id=25&Itemid=36)

## Projekt **Impletum**

Uvajanje novih izobraževalnih programov na področju višjega strokovnega izobraževanja v obdobju 2008–11

Konzorcijski partnerji:



Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo RS za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, razvojne prioritete Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja in prednostne usmeritve Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja.