

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

NANOBIOINŻYNIERIA W PRAKTYCE

Wybrane zagadnienia

pod redakcją Pawła Nawrotka

Szczecin 2021

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

NANOBIOINŻYNIERIA W PRAKTYCE

Wybrane zagadnienia

pod redakcją Pawła Nawrotka

Szczecin 2021

Autorzy

Adrian Augustyniak, Daria Ciecholewska-Juśko, Alicja Dratwa-Chałupnik, Radosław Drozd, Karol Fijałkowski, Agata Grzesiak, Agnieszka Herosimczyk, Wojciech Ignaczak, Magdalena Jędrzejczak-Silicka, Anita Kołodziej-Skalska, Adam Lepczyński, Katarzyna Michałek, Ewa Mijowska, Paweł Nawrotek, Patrycja Oberska, Małgorzata Ożgo, Piotr Sobolewski, Xymena Stachurska, Magdalena Szymańska, Karolina Wenelska, Anna Żywicka

Recenzent

dr hab. inż. Beata Zielińska, prof. ZUT

Opracowanie redakcyjne

Wojciech Markowski

Na okładce wykorzystano zdjęcie przedstawiające mezoporowatą sferę węglową autorstwa Karoliny Wenelskiej

Projekt okładki

Daria Ciecholewska-Juśko

ISBN: 978-83-7663-321-3

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
70-311 Szczecin, al. Piastów 48, tel. 91 449 47 60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl

SPIS TREŚCI

1. Nanomateriały – otrzymywanie, charakterystyka, zastosowanie	4
2. Badanie biogodności nanomateriałów	24
3. Nanocząstki albuminy	49
4. Bakterie i ich metabolity w syntezie nanocząstek srebra	55
5. Bionanoceluloza – metody otrzymywania, modyfikacje, analiza właściwości oraz możliwości wykorzystania	61
6. Bakteriofagi jako nanobiomateriał – charakterystyka i ocena aktywności	105
7. Proteomika – przygotowanie prób do analiz proteomicznych	118
8. Dwukierunkowa elektroforeza żelowa	130
9. Metody detekcji białek	143
10. Western blot białek	155
11. Spektrometria mas	159
12. Metody inżynierii enzymowej w nanobioinżynierii	166
13. Nanotechnologia w przemyśle rolno-spożywczym	183
14. Ważniejsze pojęcia	187

1. NANOMATERIAŁY – OTRZYMYWANIE, CHARAKTERYSTYKA, ZASTOSOWANIE

Karolina Wenelska, Ewa Mijowska

Nanotechnologia jest interdyscyplinarną nauką, scalającą osiągnięcia z chemii, fizyki, informatyki i biotechnologii i stwarzającą nowe możliwości badawczo-rozwojowe, które zmierzają do sterowania strukturą materii na poziomie pojedynczych atomów i molekuł. Obejmuje wszystkie metody i techniki, które umożliwiają projektowanie, tworzenie oraz stosowanie obiektów, w których przynajmniej jeden z kontrolowanych wymiarów jest wyrażony w skali nano, czyli w umownym zakresie 1–100 nm. **Nanomateriały** już teraz znajdują coraz szersze zastosowanie w technice, medycynie i życiu codziennym. Szczególnie duże oczekiwania stawia się tym materiałom w inżynierii biomedycznej. Wykorzystywane są w transplantologii oraz farmakologii, gdzie uzyskiwane rezultaty są bardzo obiecujące.

Ćwiczenie 1.1

Synteza sfer krzemionkowych typu rdzeń/otoczka

Cel

Preparatyka sfer krzemionkowych typu rdzeń/otoczka zmodyfikowaną metodą Stöbera. Sfery krzemionkowe będą otrzymywane w kilku etapach, a następnie modyfikowane tlenkiem tytanu w celu nadania im wyjątkowych właściwości. Otrzymany produkt będzie charakteryzowany za pomocą zaawansowanych metod mikroskopowych i spektroskopowych.

Wprowadzenie

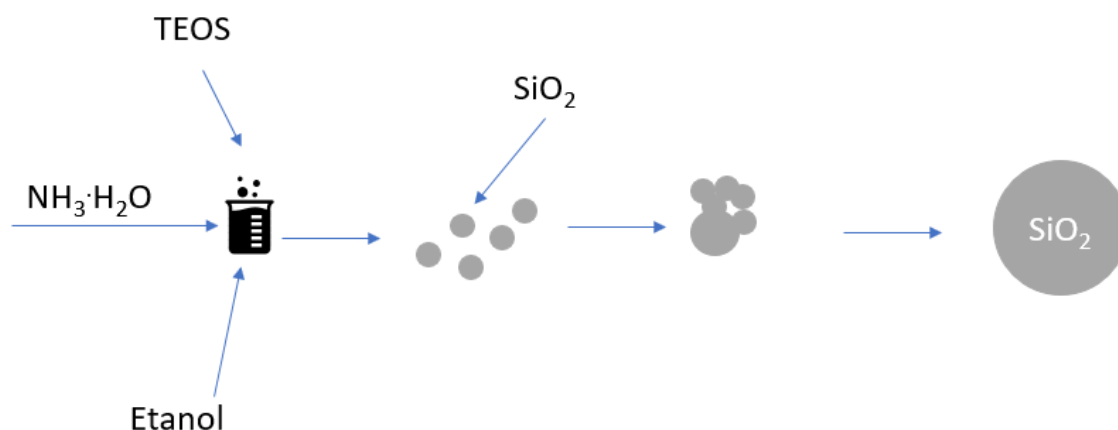
Nanosfery otrzymywane są w wyniku rozkładu związku będącego źródłem krzemionki. Na właściwości końcowego produktu mają wpływ takie parametry procesu, jak: temperatura, czas trwania czy prędkość mieszania. Podstawą każdej metody otrzymywania nanosfer krzemowych są 3 etapy:

1. Proces nukleacji, polegający na otrzymaniu zarodków kryształów. Z powstałych zarodków w późniejszych etapach zostaną otrzymane nanostruktury.
2. Etap polimeryzacji, polegający na tym, że pojedyncze cząsteczki łączą się w dimery, oligomery i większe cząsteczki.
3. Etap wzrostu, polegający na tworzeniu się sfer poprzez koagulację. W tym etapie ważne jest, żeby utrzymać odpowiednią wartość pH. Jeżeli warunek ten nie byłby spełniony, mogłoby np. dojść do żelowania cząstek, które doprowadzi do powstania długich łańcuchów.

Metody syntezy:

1. Synteza temperaturowa z mieszaniem – metoda Stöbera.

Metoda Stöbera polega na syntezie nanosfer krzemionkowych przy użyciu ortokrzemianu tetraetylu (TEOS) – związku będącego źródłem krzemionki, amoniaku – pełniącego funkcję katalizatora oraz wody i etanolu. Wszystkie substraty umieszcza się pod chłodnicą zwrotną. Proces przebiega przy ciągłym mieszaniu i grzaniu. Od wartości temperatury będzie zależała średnica otrzymanych nanosfer. Metoda Stöbera uległa wielu modyfikacjom, np. może być stosowana z użyciem mieszania i ogrzewania lub sonikacji. Proces tworzenia się nanosfer przedstawiono schematycznie na rycinie 1.1.



Ryc. 1.1. Schemat przedstawiający syntezę nanosfer z wykorzystaniem metody Stöbera

2. Synteza z wykorzystaniem L-lizyny i oktanu.

Synteza ta polega na rozpuszczeniu w roztworze wody, oktanu i L-lizyny. L-lizyna w tym procesie pełni 2 główne funkcje. Pierwszą z nich jest kataliza hydrolizy, związku będącego źródłem krzemu. Drugą jest kontrola wzrostu nanosfer krzemowych dzięki możliwości pokrywania powierzchni nowo powstałych struktur w procesie wzrostu. Możliwe jest to dzięki reakcji protonowych grup aminowych z krzemionką. Po rozpuszczeniu się L-lizyny i ustaleniu pożądanej temperatury pH roztworu powinno mieć wartość ok. 9. Kończącym krokiem jest dodanie do roztworu TEOS – źródła krzemionki. Stosunek molowy substratów powinien wynosić 1 TEOS : 0,02 L-lizyna : 1,38 oktan : 154,4 woda. Proces należy prowadzić nieprzerwanie w stałej temperaturze i z ciągłym mieszaniem. Następnie końcowy produkt należy poddać procesowi kalcynacji w celu usunięcia pozostałości po związkach organicznych, takich jak oktan czy L-lizyna.

3. Ultradźwiękowa synteza nanosfer krzemionkowych.

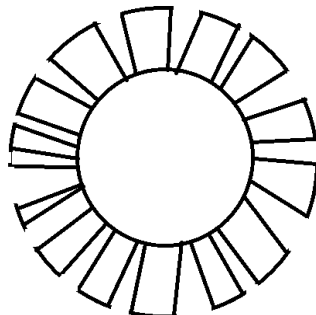
Metoda ta polega na dodaniu do mieszaniny złożonej z surfaktantu dodecylosiarczanu sodu (SDS), bromku tetrapropyloamoniowego (TPAB) i źródła krzemu TEOS. Mieszaninę surfaktantu przygotowuje się poprzez kilkuminutową sonikację SDS. Kolejnym etapem jest dodanie TPAB, a następnie TEOS i poddanie dalszej sonikacji. Na koniec mieszaninę umieszcza się w autoklawie o temp. 180°C na 10 godzin. Kończący produkt przemywa się wodą destylowaną i suszy w temp. 60°C przez noc pod próżnią w celu usunięcia surfaktantów i nieprzereagowanych substratów.

4. Synteza mezoporowatej warstwy na nanosferach krzemionkowych.

W celu otrzymania porowatej warstwy na nanosferach krzemionkowych miesza się wodny roztwór amoniaku oraz związku powierzchniowo czynnego (CTAB). Do mieszaniny dodaje się następnie rdzeń struktury, wokół której będzie syntezowana porowata otoczka/warstwa oraz TEOS. Wodny roztwór surfaktantu oraz rdzeń miesza się nieustannie przez 12 godzin w temp. pokojowej. Otrzymaną mieszaninę odwirowuje się i wygrzewa w temp. powyżej 400°C przez 6 godzin w celu usunięcia środka powierzchniowo czynnego. Otoczka porowata na rdzeniu nanosfery pozwala na tworzenie powłoki ochronnej, błony filtracyjnej lub warstwy nośnej (leku, barwnika, katalizatora) o kontrolowanej grubości i wielkości porów. W celu zmniejszenia grubości otoczki zmniejsza się ilość TEOS, będącego źródłem dwutlenek krzemu. W zależności od zastosowanego odczynnika powierzchniowo czynnego zmienia się wielkość porów –

wraz ze wzrostem długości łańcucha surfaktantu wzrasta średnica kanalików. Inne zastosowanie otoczki pozwala na adsorpcję gazów lub na magazynowanie związków chemicznych.

Dzięki kanalikom usprawniony zostaje proces powlekania sfer krzemionkowych (zamiast kilku powtórzeń wystarcza pojedyncza operacja powlekania), a ujednoliceniu ulegają średnice nanosfer. Na rycinie 1.2 przedstawiono schemat nanosfery krzemowej z mezoporowatą otoczką.



Ryc. 1.2. Schemat nanosfery krzemowej z mezoporowatą otoczką

5. Synteza porowatych nanosfer krzemionki

Synteza w warunkach standardowych przebiega przy udziale środka strukturotwórczego C₁₈₋₃₋₁, wodorotlenku sodu, etanolu, wody destylowanej oraz TEOS. NaOH oraz C₁₈₋₃₋₁ rozpuszcza się w rozcieńczonym alkoholu etylowym do otrzymania klarownego roztworu. W kolejnym etapie podnosi się temp. do 80°C i dodaje TEOS, mieszając przez 10 minut. Następnie odstawia się zawiesinę na 2 dni, utrzymując temp. 80°C. W celu pozbycia się pozostałości po reakcji produkt filtruje się i przemywa. Na koniec otrzymany produkt suszy się w temp. 100°C przez noc.

6. Modyfikacja nanostruktur dwutlenkiem tytanu

Podstawowa metoda funkcjonalizacji nanostruktur dwutlenkiem tytanu polega na hydrolizie prekursora TiO₂ w obecności etanolu (w stosunku 1 : 10). Otrzymane w ten sposób krystality TiO₂ są następnie rozbijane za pomocą sonikacji lub długotrwałego mieszania. W kolejnym etapie do etanolu z wcześniej zdyspergowanymi nanostrukturami dodawany jest roztwór dwutlenku tytanu w stosunku 1 : 8. W kolejnych etapach roztwór dwutlenku tytanu oraz nanomateriałów jest mieszany przez 18 godzin, po czym zostaje odseparowany przez odwirowanie i przemyty etanolem. W trakcie oczyszczania nanomateriałów z nadmiaru dwutlenku tytanu roztwór jest na zmianę mieszany oraz sonikowany. W ostatniej fazie funkcjonalizacji TiO₂ wysuszony materiał poddawany jest kalcynacji w wysokiej temperaturze w celu przemiany fazy amorficznej w krystaliczną.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: etanol cz.a.a.; roztwór amoniaku; ortokrzemian tetraetylu (TEOS); bromek cetylo(trimetylo)amonu (CTAB); propanol; butoksylan tytanu(IV) (TBT).

Przebieg doświadczenia

1. **Synteza nanosfer krzemionki metodą Stöbera.** W kolbie okrągłodennej umieścić 2,5 ml roztworu amoniaku i 50 ml etanolu. Mieszaninę ogrzewać do wyznaczonej temp. 55°C. Po ustaleniu się pożądanej temperatury do roztworu dodać 1,5 ml TEOS, a następnie kolbę z mieszaniną reakcyjną połączyć z chłodnicą zwrotną. Proces prowadzić nieprzerwanie w stałej temperaturze i z ciągłym mieszaniem przez 18 godzin. Po tym czasie zawartość kolby zostaje odwirowana, a otrzymany osad zostaje zdyspergowany w etanolu.

2. **Synteza mezoporowatej otoczki.** Syntezę mezoporowatej otoczki wokół rdzenia z nanosfery przeprowadza się przy użyciu środka powierzchniowo czynnego CTAB. W naczyniu umieścić roztwór amoniaku, etanol, CTAB oraz wodę destylowaną. Otrzymaną mieszaninę (I) mieszać przez 30 minut. W tym czasie odważyć nanosfery krzemionkowe i zdyspergować w etanolu (II). Następnie dodać do mieszaniny reakcyjnej (I) zdyspergowane nanosfery (II). Następnie do roztworu (I + II) dodać TEOS. Całość składników nieustannie mieszać przez ok. 20 godzin. Po upływie tego czasu roztwór odwirować, a następnie osad przemycyć etanolem, aby usunąć pozostałości po reakcji. Otrzymany produkt wygrzewać w piecu przez 2 godziny w temp. 600°C.
3. **Modyfikacja nanosfer krzemionkowych dwutlenkiem tytanu.** Syntezę prowadzić w kolbie wypełnionej czystym butoksylanem tytanu(IV) w warunkach bezwodnych. Następnie do kolby z prekursorem dwutlenku tytanu dodawać porowate nanostruktury i sonikować przez 90 minut w temp. ok. 40°C. W kolejnym etapie TBT (z zdyspergowanymi nanostrukturami) zostaje rozcieńczony propanolem w stosunku objętościowym 1 : 25. TBT niezwiązany z nanomateriałem zostaje odseparowany przez odwirowanie, a następnie przemity świeżą ilością propanolu. Oczyszczony nanomateriał z nadmiaru TBT zostaje zdyspergowany w etanolu w celu hydrolizy prekursora do TiO₂. Następnie etanol zostaje odseparowany. W ostatnim etapie suchy produkt należy poddać kalcynacji w wysokiej temperaturze w celu przemiany fazy amorficznej w krystaliczną.

Wyniki

1. Otrzymane podczas zajęć materiały należy scharakteryzować za pomocą mikroskopii TEM, SEM, spektroskopii ramanowskiej oraz XRD.
2. Otrzymane dane przedstawić w formie sprawozdania.

Ćwiczenie 1.2

Preparatyka katalizatora, proces CVD i oczyszczanie nanorurek węglowych

Cel

1. Preparatyka katalizatora Fe/MgO używanego w procesie syntezy nanorurek węglowych na drodze pirolitycznego rozkładu węglowodoru (wykorzystuje się tu technikę nanoszenia składników aktywnych zdyspergowanych w rozpuszczalniku na nośnik).
2. Otrzymanie nanorurek węglowych za pomocą metody CVD (pirolizy katalitycznej) przy użyciu katalizatora Fe/MgO (jako źródło węgla do otrzymywania nanorurek węglowych zostanie wykorzystany etylen, a jako gaz nośny – argon).
3. Oczyszczenie nanorurek węglowych z węgla amorficznego i resztek katalizatora, poprzez obróbkę materiału z użyciem kwasu chlorowodorowego, a także określenie stopnia oczyszczania przygotowanego materiału.
4. Badanie otrzymanych nanorurek węglowych przy użyciu spektroskopii ramanowskiej i oglądanie ich przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego TEM.

Wprowadzenie

1. Podstawowe techniki chemiczne i fizykochemiczne do otrzymywania katalizatorów
 - 1.1. Otrzymywanie prekursorów
 - **Strącanie osadów** – w tym procesie powstaje nierozpuszczalny osad w postaci amorficznej lub krystalicznej. Zachodzi tu reakcja chemiczna między związkami chemicznymi zawierającymi aktywny składnik katalizatora a czynnikami strącającymi. Jako czynnik strącający używa się najczęściej roztworów alkaliów lub amoniaku, węglanów sodu, potasu i amonu, przy czym użycie alkaliów wymaga starannego przemycia osadów w celu usunięcia jonów litowców. Parametrami zmiennymi, które mogą wpłynąć zarówno na skład chemiczny, objętość i powierzchnię katalizatora, jak i na jego teksturę,

są: stężenie substancji wyjściowych, temperatura strącania, pH roztworu, kolejność dodawania składników, czas starzenia osadu, szybkość strącania. Zaletą metod strącaniowych jest możliwość otrzymywania mieszanych katalizatorów w szerokim zakresie składników, a ograniczeniem trudność otrzymania dobrze zhomogenizowanych pod względem składu prekursorów katalizatorów mieszanych. Trudność tę można ominąć, stosując metodę otrzymywania stałych prekursorów szklanych w drodze kompleksowania.

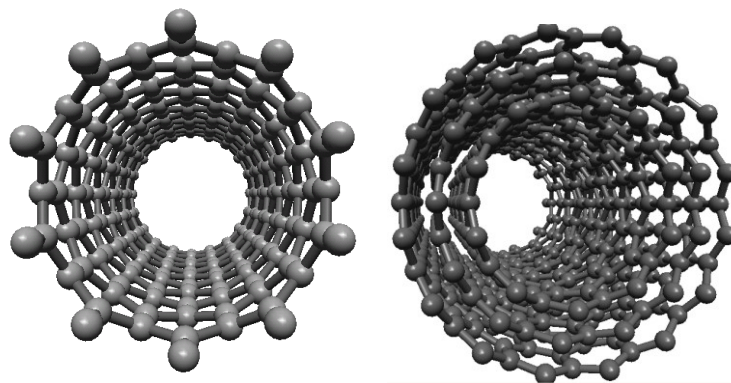
- **Kompleksowanie** – metoda ta polega na reakcji między solami metali a kwasami i solami kwasów organicznych, w czasie której powstają kompleksy o zmiennym składzie.
- **Nanoszenie składników aktywnych z roztworów na nośnik** – technika ta polega na poddaniu nośnika przez określony czas działaniu roztworu zawierającego składnik aktywny. Obserwuje się różny rodzaj oddziaływania aktywnego składnika z nośnikiem: adsorpcję na powierzchni nośnika z wytworzeniem kompleksów powierzchniowych, wymianę jonową z powierzchniowymi grupami, reakcję chemiczną lub słabe oddziaływanie o charakterze adsorpcji fizycznej. W zależności od typu oddziaływania dzieli się metody nanoszenia z roztworu na adsorpcyjne, jonowymienne i impregnacyjne. Techniki przygotowania katalizatorów w przypadku tych wariantów mogą być różne, np. w metodzie adsorpcyjnej i jonowymiennej roztwór po nasyceniu nośnika odsącza się i przemywa, a w metodzie impregnacji prekursor katalizatora otrzymuje się przez odparowanie roztworu z nad nośnika. Ilość składnika aktywnego, jaką można nanieść na powierzchnię nośnika, zależy od natury i struktury nośnika, własności chemicznych składnika aktywnego w roztworze i warunków nanoszenia.
- **Obróbka termiczna prekursorów katalizatorów: suszenie i prażenie** – w procesie suszenia usuwa się wodę fizycznie związaną z prekursorem katalizatora. Kalcynacja (prażenie) polega głównie na rozkładzie prekursorów z wytworzeniem właściwej fazy aktywnej katalizatora. Oprócz procesu rozkładu prekursorów może dochodzić np. do wytworzenia się struktury krystalicznej ze struktur amorficznych czy spiekania fazy aktywnej, polegającej na powstawaniu większych krystalitów z mikrokryształów, oraz do reakcji w fazie stałej między składnikami fazy aktywnej lub fazą aktywną a nośnikiem. Dodatkowo w zależności od atmosfery, w jakiej prowadzi się obróbkę termiczną, składniki fazy aktywnej mogą ulegać utlenieniu lub redukcji. Wybór temperatury obróbki termicznej zależy od temperatury, w której będzie zachodzić reakcja; zwykle powinna być wyższa o 50 K od temperatury reakcji, by uniknąć zmian katalizatora we właściwym procesie powstawania nanorurek węglowych w procesie chemicznego osadzania par.

2. Budowa, charakterystyka i metody otrzymywania nanorurek węglowych

2.1. Budowa nanorurek węglowych

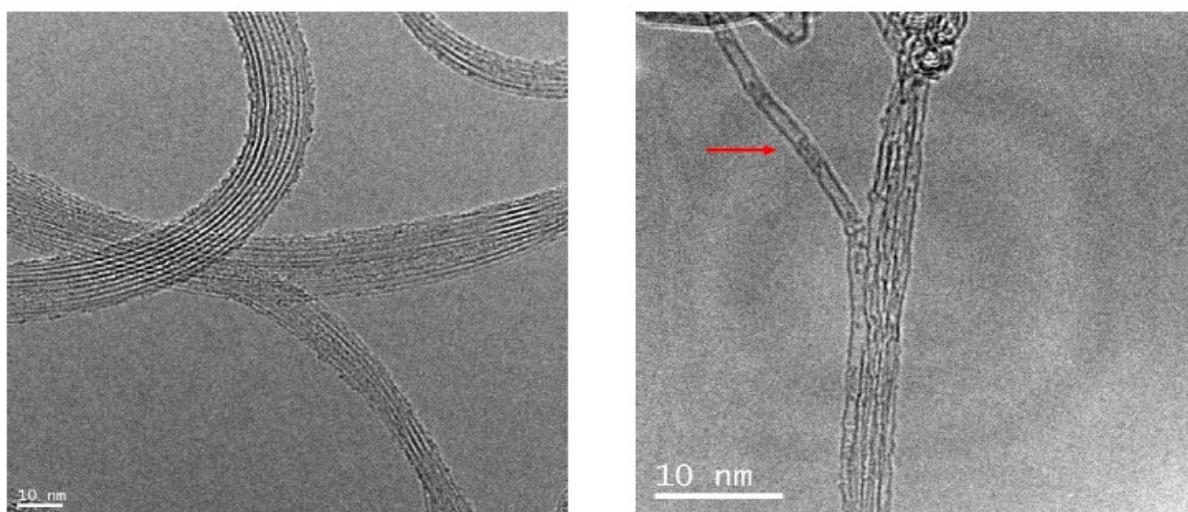
Nanorurki węglowe to zwinięte w cylinder płaszczyzny grafenu (tj. jednoatomowej warstwy grafitu).

Można uzyskać nanorurki jednościenne, gdy tylko jedna płaszczyzna jest cylindrycznie zwinięta (ang. *singlewalled carbon nanotube*, SWCNT; o średnicy 0,8–4 nm), dwuścienne, utworzone przez 2 warstwy koncentrycznie ułożone jedna w drugiej (ang. *doublewalled carbon nanotubes*, DWCNT) oraz wielościenne, utworzone przez kilka (więcej niż 2) warstw grafenu, również koncentrycznie ułożonych względem siebie (ang. *multiwalled carbon nanotubes*, MWCNT). Nanorurki wielościenne składają się z koncentrycznie ułożonych grafitowych cylindrów na zasadzie ułożenia rosyjskich lalek popularnie zwanych „matrioszkami”. Odległość między grafitowymi cylindrami (rurkami) wynosi 0,34 nm, a wewnętrzna ich średnica zawarta jest w przedziale 2–50 nm. Schematyczną budowę nanorurek węglowych z grafenu typu SWCNT oraz MWCNT przedstawiono na rycinie 1.3.



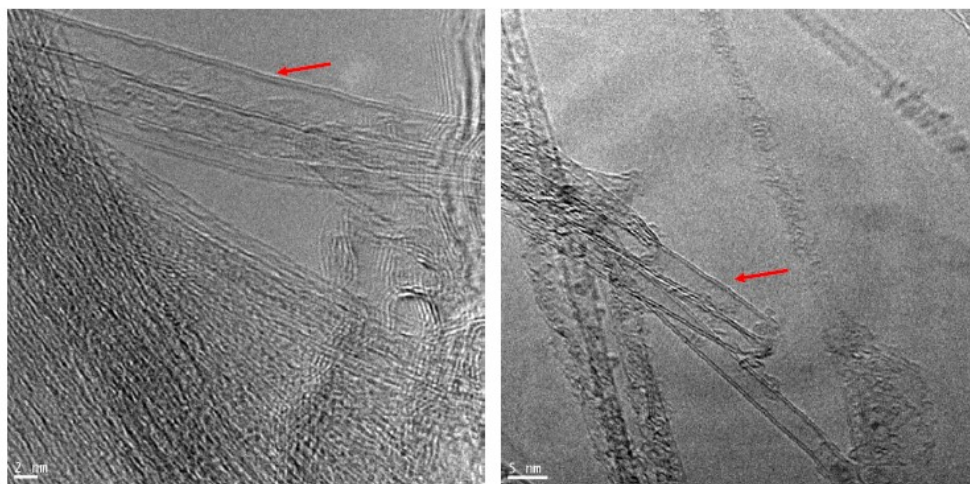
Ryc. 1.3. Schematyczna budowa nanorurek węglowych typu SWCNT (lewy panel) i MWCNT (prawy panel)

Jednościenne nanorurki węglowe mają kształt cylindryczny o średnicy 0,7–3,0 nm i długość do kilku mikrometrów. Nanorurki te mają naturalną tendencję do tworzenia wiązek dzięki występującym między nimi oddziaływaniom van der Waalsa. Bardzo rzadko występują w postaci indywidualnej. Na rycinie 1.4 przedstawiono zdjęcia z transmisyjnej mikroskopii elektronowej typowej wiązki SWCNT (lewy panel) i niewielkiej wiązki z indywidualną nanorurką (prawy panel).



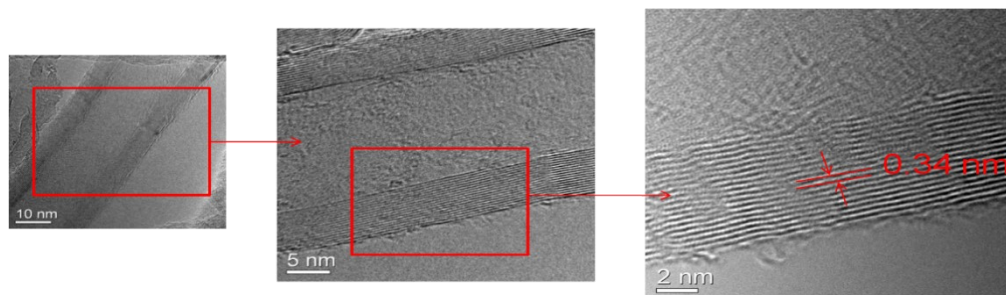
Ryc. 1.4. Mikroskopowe zdjęcie typowych wiązek nanorurek jednościennych (lewy panel) oraz kilkururkowej wiązki SWCNT z indywidualną nanorurką (prawy panel)

Dwuścienne nanorurki węglowe to 2 jednościenne nanorurki węglowe, koncentrycznie umieszczone jedna w drugiej. Odległość między rurkami wynosi 0,34–0,56 nm. Struktury te również występują w postaci wiązek, choć znacznie mniejszych niż w przypadku SWCNT. Ich średnica mieści się w granicach 0,7–5 nm. Są to ciekawe struktury, wykazujące właściwości zarówno jedno-, jak i wielościennych nanorurek węglowych, dlatego są osobno klasyfikowane. Na rycinie 1.5 przedstawiono typowe zdjęcie mikroskopowe podwójnych nanorurek węglowych. Można wyraźnie zauważyć rurki zewnętrzną i wewnętrzną, które tworzą nanorurkę podwójną.



Ryc. 1.5. Mikroskopowe zdjęcia dwuściennych nanorurek węglowych w postaci wiązki i indywidualnych struktur (wskazanych czerwona strzałką)

Wielościenne nanorurki węglowe składają się z 3 lub większej liczby koncentrycznie umieszczonych nanorurek węglowych (ryc. 1.6). Odległość między warstwami wynosi tyle samo, ile w przypadku dwuściennych nanorurek węglowych o długości od 200 nm nawet do 1 mm.



Ryc. 1.6. Mikroskopowe zdjęcia wielościennej nanorurki w różnych powiększeniach

2.2. Mechanizm formowania nanorurek węglowych

Jest wiele hipotez opisujących model wzrostu nanorurek węglowych. Mechanizm ich wzrostu i nukleacja zależą od metody i obecności katalizatora. Wiadomo, że nanorurki jednościenne powstają tylko w procesie katalitycznym, a wielościenne rosną zarówno w procesie katalitycznym, jak i bez katalizatora. Niektóre nanorurki mają otwarte, a niektóre zamknięte końce.

Podstawową teorią opisującą mechanizm tworzenia nanorurek węglowych jest **czteroetapowy model nasycenia i dyfuzji** węgla, powstającego w cząsteczce katalizatora aż do osiągnięcia przesycenia, czego wynikiem jest krystalizacja nanostrukturalnego węgla (ryc. 1.7). Model ten opracowano w latach 80. ubiegłego wieku, ale odnosił się wówczas do mechanizmu wzrostu włókien węglowych. Został on zaadaptowany do wyjaśnienia mechanizmu wzrostu nanorurek. Rozpatruje się cząstkę metalicznego katalizatora (poniżej 1 μm) w atmosferze gazu zawierającego węgiel (np. CH_4 , C_2H_2). Wyróżnia się następujące etapy:

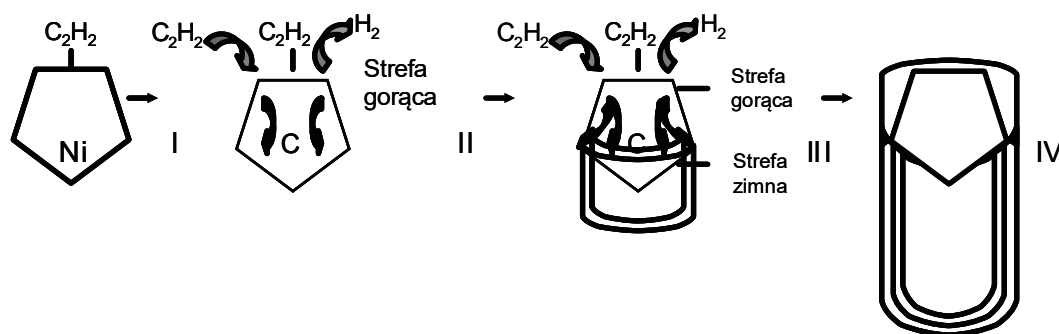
I etap – sorpcja na powierzchni katalizatora i rozkład węglowodoru do węgla i wodoru;

II etap – rozpuszczanie się węgla w katalizatorze;

III etap – dyfuzja węgla w obrębie cząstki i przesycenie węglem amorficznym pewnego jej obszaru. Następnie podczas chłodzenia układu dochodzi do tworzenia fazy węgla krystalicznego (najczęściej grafitu). Wówczas na powierzchni katalizatora powstaje zarodek

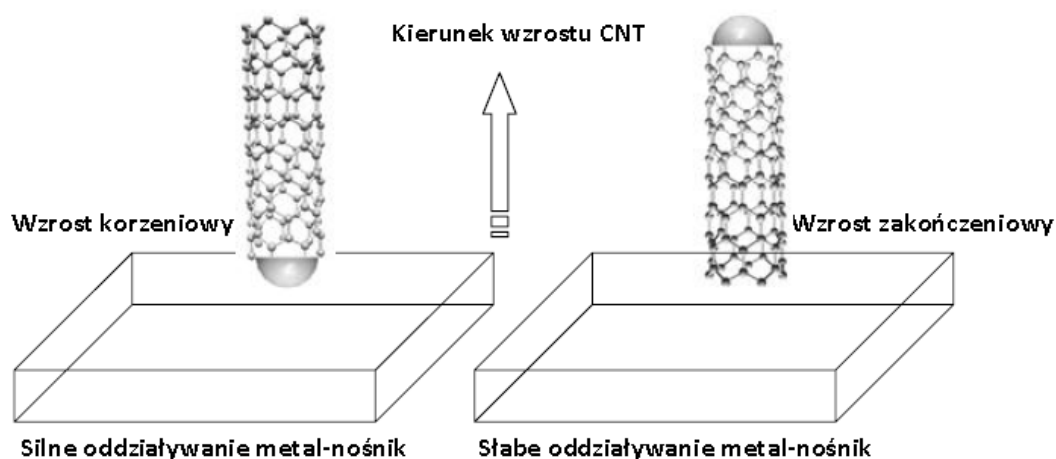
rurki, co generuje jej wzrost. Zachodzi dyfuzja powierzchniowa węgla, rozprowadzającą go po powierzchni w postaci cienkiej warstwy;

IV etap – postępująca akumulacja powierzchniowa węgla (wraz ze spadkiem temperatury następuje spadek rozpuszczalności węgla w katalizatorze), dezaktywacja katalizatora i przetrwanie procesu wzrostu nanorurki.



Ryc. 1.7. Schemat czteroetapowego modelu nasycenia i dyfuzji przedstawiający mechanizm tworzenia nanorurek węglowych

Inne proponowane mechanizmy wzrostu nanorurek węglowych to mechanizm wzrostu „korzeniowy” i „zakończeniowy”. Wybór jednego z nich zdeterminowany jest siłą oddziaływania cząstek katalizatora (np. żelaza, kobaltu, niklu) z nośnikiem katalizatora (tj. tlenkiem magnezu, tlenkiem glinu czy dwutlenkiem krzemu). Jeżeli oddziaływanie nośnik–metal jest słabsze niż oddziaływanie metal–węgiel, to cząstka katalizatora odrywa się z nośnika podczas inicjacji wzrostu nanorurki węglowej i zostaje zlokalizowana na jej szczycie. W „korzeniowym” modelu metal jest uwięziony w nośniku i wzrost nanorurki odbywa się w przeciwnym kierunku, tak jak to przedstawiono na rycinie 1.8.



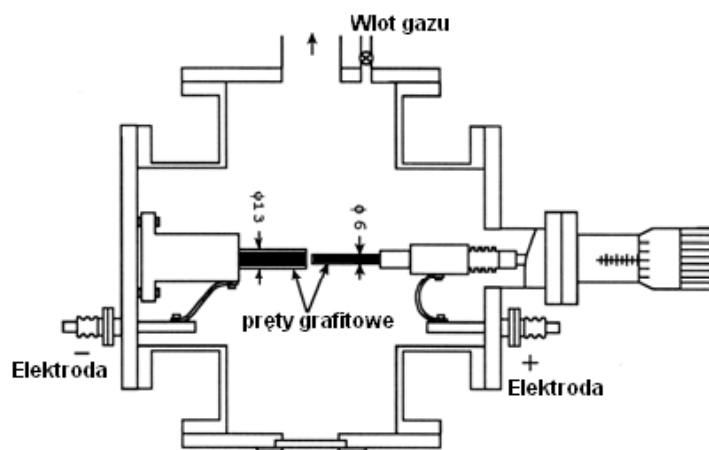
Ryc. 1.8. Model „korzeniowy” i „zakończeniowy” wzrostu nanorurek węglowych

2.3. Otrzymywanie nanorurek węglowych

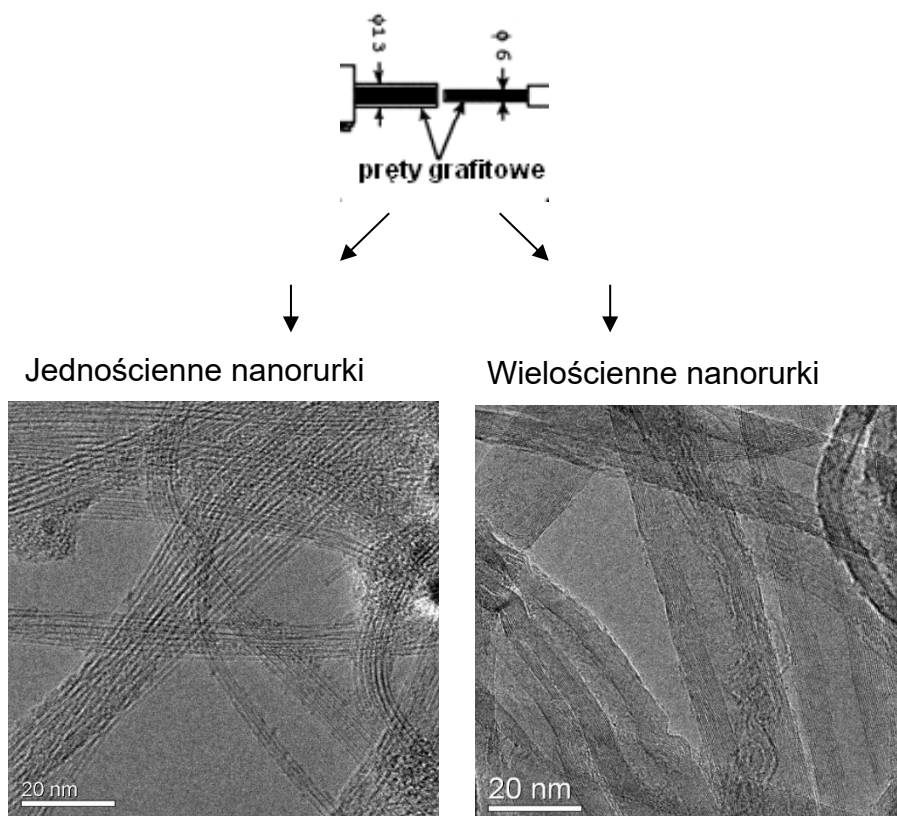
Otrzymywanie nanorurek węglowych odbywa się w następujących procesach:

- wyładowanie w łuku elektrycznym (ang. *arc dischaarge*);
- laserowe parowanie (ang. *laser ablation*);
- proces pirolizy katalitycznej (ang. *catalytic carbon vapor deposition, CVD*).

Metoda elektrołukowa jest najstarszą techniką wykorzystywaną do syntezy nanorurek węglowych, a wcześniej do syntezy fulerenów. Wykorzystał ją S. Ijima podczas pierwszej obserwacji tych struktur. W trakcie syntezy nanorurek węglowych za pomocą tej metody wytwarzana jest bardzo wysoka temperatura, nawet powyżej 3000°C. Warunki takie pozwalają na wprowadzenie odparowanych atomów węgla w stan plazmy. W ten sposób otrzymuje się zarówno wielo-, jak i jednościenne nanorurki węglowe.



Ryc. 1.9. Schemat układu do syntezy nanorurek węglowych wykorzystującego metodę elektrołukową

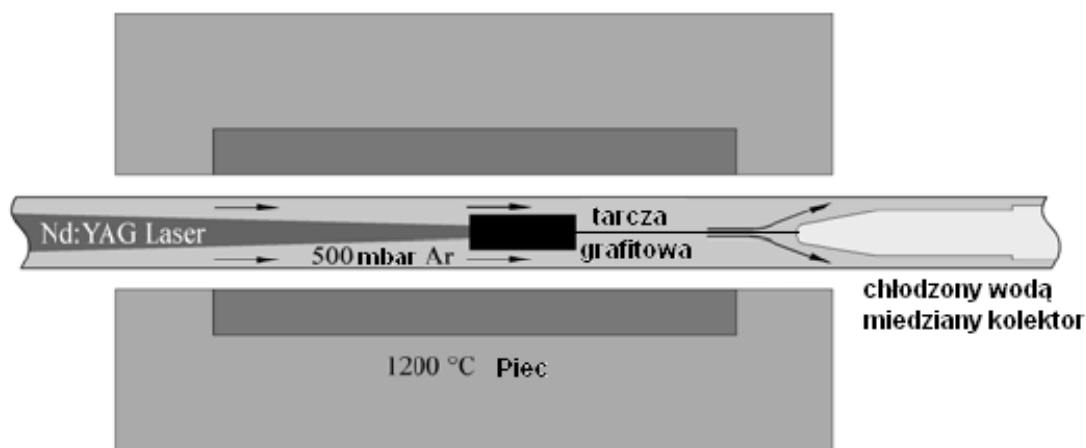


Ryc. 1.10. Wpływ składu anody na typ otrzymanych nanorurek węglowych w łuku elektrycznym

Powstają także inne formy węglowe, np. wiskersy węglowe, sadza i fulereny. Rodzaj otrzymanego produktu jest ściśle związany z ciśnieniem, rodzajem gazu nośnego, zawartością i rodzajem katalizatora użytego podczas syntezy. Na rycinie 1.9 przedstawiono schemat typowego

układu do syntezy nanorurek węglowych, wykorzystującego metodę elektrołukową, a na rycinie 1.10 – typy nanorurek węglowych otrzymanych w łuku elektrycznym w zależności od składu elektrody. Układ składa się z 2 grafitowych elektrod: z grubszej katody, na której zachodzi osadzanie węgla pochodzącego z anody, i z cieńszej anody. Podczas osadzania węgla zużywana jest anoda. Stosuje się napięcie 20–25 V i natężenie w granicach 50–120 A. Optymalne ciśnienie helu dla uzyskania materiału nanorurkowego wynosi ok. 600 mbar (fulereny są wydajnie syntetyzowane pod ciśnieniem poniżej 130 mbar). Do syntezy MWCNT za pomocą tej techniki nie jest konieczna obecność cząstek katalizatora. Wielościenne nanorurki węglowe osadzają się na wewnętrznej części katody i są otoczone twardą warstwą mieszaniny takich struktur, jak: nanocząstki, fulereny i węgiel amorficzny. Jednościenne nanorurki węglowe formują się w przestrzeni między ścianami komory układu reakcyjnego a elektrodami w postaci pajęczek struktury, a nie na powierzchni katody. Ta technika pozwala na wytwarzanie dużej ilości nanorurek, ale również dużej ilości zanieczyszczeń. Otrzymane nanorurki muszą być oczyszczone bezpośrednio po syntezie. Jakość otrzymywanych tą techniką nanorurek jest bardzo dobra, gdyż mają one wysoki stopień grafityzacji, zwykle potwierdzony spektroskopią ramanowską lub dyfrakcją rentgenowską.

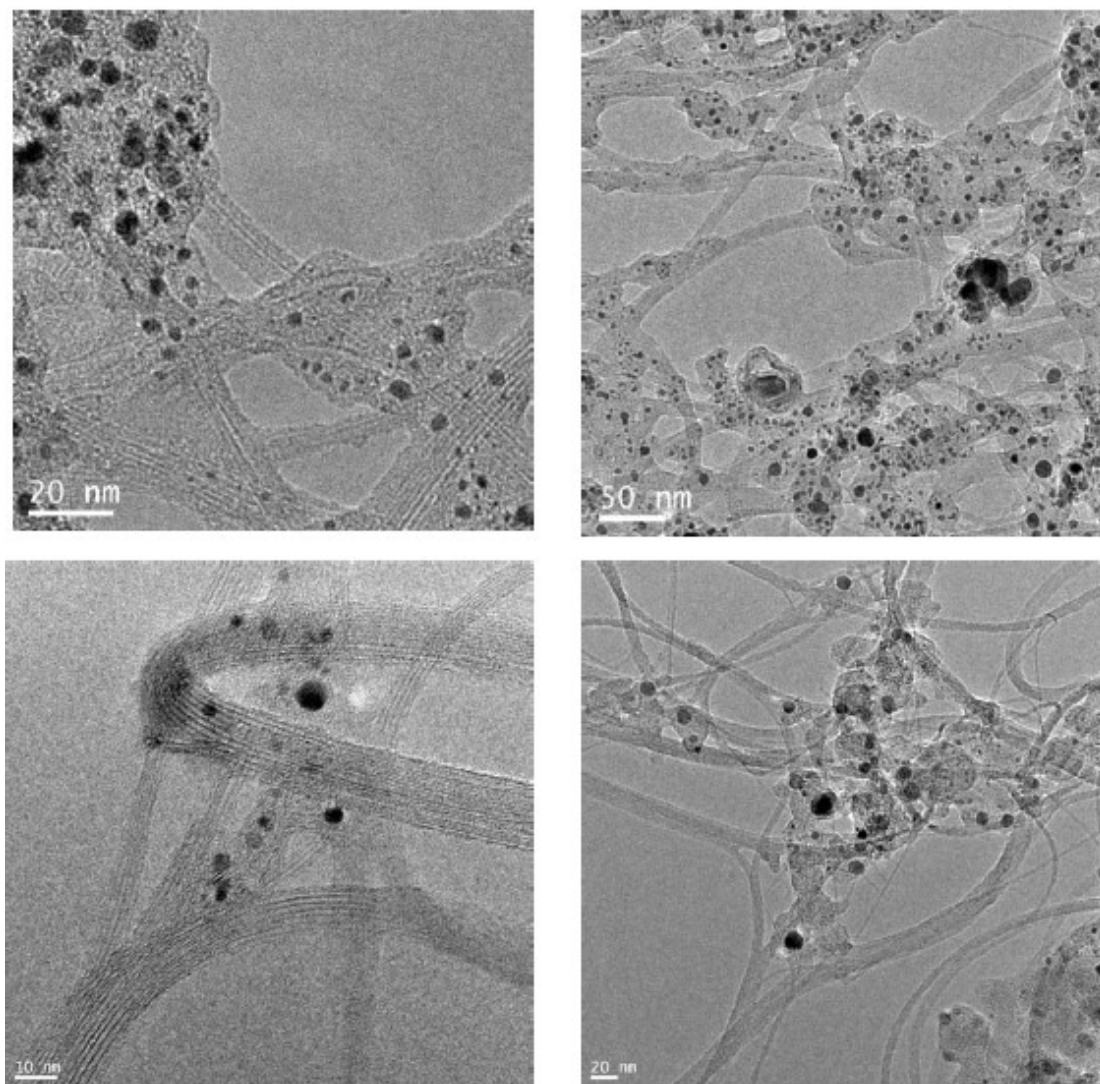
Technika laserowa po raz pierwszy została wykorzystana w syntezie nanorurek węglowych w 1995 r. przez zespół R. Smalleya. Wysoka jakość nanorurek otrzymywanych techniką odparowania laserowego sprawiła, że intensywnie ją rozwijano. Stosowano lasery pracujące w trybie pulsacyjnym i ciągłym. Podstawową różnicą między odmianami tej techniki jest potrzeba zastosowania światła o różnej intensywności: 100 kW/cm² w przypadku lasera pulsacyjnego i 12 kW/cm² w przypadku lasera pracującego w trybie ciągłym. W metodzie laserowego parowania laser jest wykorzystywany jako źródło energii, powodujące odparowanie grafitu z tarczy, która jest umieszczona we wnętrzu pieca i ogrzewana do temp. ok. 1200°C. Przepływający argon (500 mbar) „porywa” nanorurki z obszaru o wysokiej temperaturze, a następnie przenosi je na znajdujący się na zewnątrz pieca chłodzony wodą miedziany kolektor. Na rycinie 1.11 przedstawiono układ do syntezy nanorurek węglowych metodą laserową.



Ryc. 1.11. Schemat otrzymywania nanorurek węglowych przy wykorzystaniu metody laserowej

Metody laserowa i w łuku elektrycznym są do siebie bardzo podobne pod względem warunków procesu. Sądzi się, że nanorurki syntezowane tymi metodami są oparte na tym samym mechanizmie. Gdy podczas syntezy wykorzystywana jest czysta tarcza grafitowa bez cząstek katalizatora, tworzą się wielościenne nanorurki węglowe, tak jak w przypadku syntezy metodą elektrołukową. Jeśli natomiast w skład tarczy grafitowej wchodzi cząstki metalu lub ich mieszanina (np. 1,2% mieszaniny Co/Ni o stosunku Co : Ni = 1 : 1), to tworzą się SWCNT. W celu uzyskania najwyższych wydajności zwykle stosuje się ferromagnetyki Co, Ni z promotorami np. Mo. Dzięki tej metodzie uzyskuje się wysokie wydajności, powyżej 70–90% konwersji

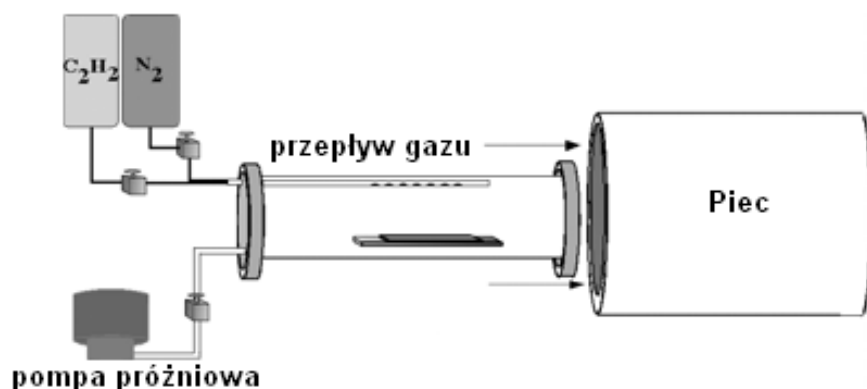
grafitu w jednościenne nanorurki węglowe. Mimo uzyskania wysokiej wydajności materiał po syntezie musi zostać poddany procesowi oczyszczania, a żadna metoda oczyszczania nie daje materiału o 100-proc. czystości. Oczyszczony materiał zawiera niewielkie ilości katalizatora ferromagnetycznego. Tworzy to barierę w zastosowaniach nanorurek w niektórych dziedzinach medycyny i pomiarach właściwości magnetycznych. Z tego powodu poszukiwano nowych, nieferromagnetycznych katalizatorów. Okazało się, że platyna zmieszana z niewielką zawartością rodu i renu jest bardzo aktywnym katalizatorem w syntezie jednościennych nanorurek węglowych. Był to przełom w badaniach prowadzonych tą metodą. Na rycinie 1.12 przedstawiono zdjęcia TEM nanorurek węglowych otrzymanych z wykorzystaniem jako katalizatorów Co/Ni z Mo oraz z Pt/Rh/Re.



Ryc. 1.12. Zdjęcia mikroskopowe SWCNT otrzymywanych na Co/Ni z Mo (górny panel) oraz Pt/Rh/Re (dolny panel) za pomocą laserowego parowania

Nanorurki węglowe otrzymane z użyciem katalizatora Co/Ni z domieszką Mo mają mniejszą średnicę (ok. 1,25 nm) w porównaniu z otrzymanymi z Pt/Rh/Re (ok. 1,5 nm). Zwykle występują w postaci wiązek. Przeciętna średnica nanorurek i ich dystrybucja są kontrolowane przez różne parametry, takie jak temperatura syntezy oraz skład i ilość użytego katalizatora. Dzięki optymalizacji warunków procesu otrzymuje się materiał o bardzo wąskiej dystrybucji średnic, co jest bardzo korzystne w przypadku analizy właściwości optycznych SWCNT.

W **metodzie pirolizy katalitycznej** wymagane są następujące podstawowe elementy: źródło węgla, katalizator, wysoka temperatura, w większości przypadków również gaz nośny. Jako źródło węgla wykorzystuje się różne węglowodory, takie jak: benzen, cykloheksan, acetylen, metan itd., a także tlenek czy też dwutlenek węgla. Stosowane są różne metaliczne katalizatory (np. Fe, Co, Ni, Cu) osadzone na różnych nośnikach (np. MgO, Al₂O₃, ZrO₂, CaO, SiO₂), naniesione różnymi technikami. Temperatura syntezy nanorurek węglowych tą techniką zawiera się przeważnie w przedziale 300–1200°C. Ze względu na konieczność przeprowadzenia procesu w podwyższonej temperaturze klasyczna technika CVD często jest określana jako **termiczne CVD** (ang. *thermal chemical vapor deposition*). Typowy schemat aparatury przedstawiono na rycinie 1.13. Metodę tę przez długi czas wykorzystywano do syntezy nanowłókien węglowych, ale nie było żadnych wskazań, że może ona być stosowana również do syntezy nanorurek węglowych.



Ryc. 1.13. Schemat otrzymywania nanorurek węglowych termiczną metodą pirolizy katalitycznej

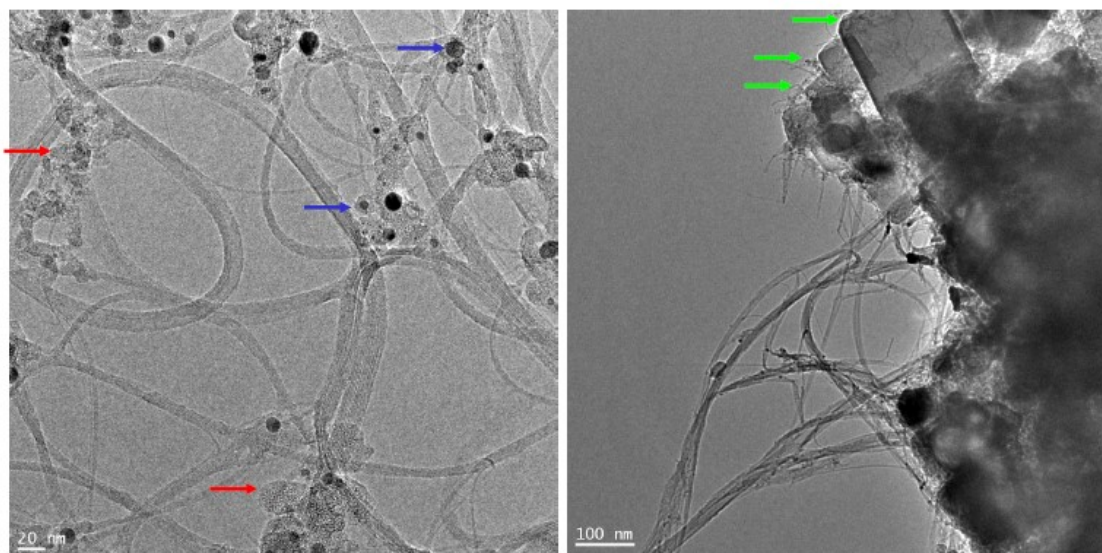
M. Yacamán z zespołem po raz pierwszy opublikowali dane pokazujące, że metodę CVD można stosować do syntezy nanorurek węglowych. Różnica między nanorurkami a włóknami węglowymi nie zawsze jest oczywista. Bardzo często włókna węglowe są grubsze (od 100 nm do setek mikrometrów), mają niższy stopień grafityzacji i czasami inną strukturę niż rurkową, np. strukturę herringbone lub płytkową. Gdy średnica włókien węglowych maleje, to przejawiają one właściwości zbliżone do nanorurek węglowych. Metoda CVD jest najbardziej przydatna do syntezy nanorurek węglowych ze względu na możliwości syntezy tych struktur na masową skalę. Zaletą tej techniki w przeciwieństwie do wyładowania w łuku elektrycznym czy laserowej ablacji jest możliwość wzrostu nanorurek bezpośrednio na nośniku, który jest kontrolowany przez sposób nanoszenia katalizatora. Oprócz tego jest możliwa synteza mat nanorurek o określonej orientacji, i są to główne powody, dla których CVD jest najpopularniejszą techniką syntezy nanorurek węglowych. Jest wiele technik modyfikacji tej metody. Wykorzystuje się układy zawierające pompy próżniowe lub inertne środowisko uzyskiwane dzięki wprowadzeniu do układu gazu obojętnego (np. Ar, N₂, He). Pozostałe metody CVD można sklasyfikować następująco:

- CVD wzmocnione plazmą (ang. *plasma enhanced CVD*);
- CVD z alkoholem (ang. *alcohol CVD*);
- CVD z wzrostem nanorurek z fazy gazowej (ang. *gas phase CVD*);
- żelowe CVD (ang. *gel CVD*);
- laserowe CVD (ang. *laser assisted CVD*);
- metoda CoMoCat;
- wysokociśnieniowe dysproporcjonowanie CO (HiPCO).

2.4. Oczyszczanie nanorurek węglowych

Większość świeżo syntetyzowanych nanorurek węglowych zawiera znaczne ilości zanieczyszczeń. W ich skład wchodzi: węgiel amorficzny, cząstki grafitowe, katalizatory, fulereny, nośnik katalizatora. Metody oczyszczania znacznie się rozwinęły. Przeważnie wykorzystywane są w nich różnice współczynników kształtu i szybkości utlenienia między nanorurkami i zanieczyszczeniami. Mimo że większość zanieczyszczeń można usunąć za pomocą łączonych zabiegów oczyszczających, to powodują one również zdefektowanie struktury krystalicznej, cięcie nanorurek w miejscach najbardziej zdefektowanych lub utlenienie. Należy podkreślić, że proces oczyszczania powinien być każdorazowo optymalizowany z uwzględnieniem rodzaju zanieczyszczeń zawartych w uzyskanym materiale. Czas i temperatura procesów oczyszczania także powinny być odpowiednio dobrane względem oczyszczanego materiału.

Na ogół metaliczne nanocząstki katalizatorów są otoczone warstwami węglowymi, co uwiidoczniiono na rycinie 1.14 (niebieskie strzałki wskazują przykładowe cząstki katalizatora). Zielone strzałki wskazują na nośnik MgO z cząstkami katalizatora i wyrastającymi z nich nanorurkami węglowymi. Zanieczyszczenia węglowe, np. amorficzny węgiel (typową morfologię amorficznego węgla wskazano czerwonymi strzałkami), muszą być zatem usunięte w pierwszej kolejności, żeby możliwe było usunięcie innych zanieczyszczeń z otrzymanego produktu.



Ryc. 1.14. Zdjęcia materiału nanorurkowego bezpośrednio po syntezie. Czerwone strzałki wskazują na amorficzny węgiel, niebieskie – na cząstki katalizatora otoczone warstwami węgla, a zielone – na nośnik MgO

Ze względu na reaktywność zanieczyszczeń oraz stabilność nanorurek węglowych do oczyszczania stosuje się metody fizyczne, chemiczne lub ich kombinację. W rezultacie wiele procesów oczyszczania jest przeprowadzanych dwuetapowo, dzięki czemu znacznie zwiększa się czystość próbek. Dzięki łączeniu technik oczyszczania uzyskuje się wysoki stopień czystości materiału nanorurkowego. Typowe metody oczyszczania dzieli się następująco:

1. **Utlenianie.** Ten etap polega na usuwaniu węglowych zanieczyszczeń (takich jak węgiel amorficzny), jak i warstw grafitowych otaczających cząstki katalizatorów. Parametry utleniania należy dobrać tak, aby utlenić zanieczyszczenia, a nie nanorurki węglowe. Zwykle proces utleniania w fazie gazowej nanorurek węglowych powoduje otwarcie ich końców. Dzieje się tak z powodu występowania tam największej liczby defektów w heksagonalnej sieci nanorurek. Usuwanie zanieczyszczeń jest możliwe dzięki różnej szybkości termicznego utleniania między nanorurkami a innymi cząstkami węglowymi. Podczas utleniania

należy zwrócić uwagę na wybór czasu trwania utleniania oraz temperatury procesu. Parametry muszą być dostosowane do odpowiedniej próbki, aby w możliwie najmniejszym stopniu uległa ona zdefektowaniu. Metoda utleniania może być zastosowana do usunięcia zanieczyszczeń węglowych lub jako obróbka wstępna, przygotowująca próbkę do wyeliminowania metali przez usunięcie warstw grafitowych pokrywających cząstki metali. Usunięcie zarówno cząstek węglowych, jak i grafitowych może nastąpić w powietrzu o temp. do 500°C dla SWCNT i 760°C dla MWCNT. Czasem do usunięcia niepożądanych form węglowych używana jest mieszanina tlenu z bromem, siarkowodorem lub chlorowodorem. Ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną w roztworach takich jak H_2O_2 czy HNO_3 również prowadzi do usunięcia niepożądanych form węglowych. Utlenianie w fazie ciekłej powoduje większe zniszczenie nanorurek niż podczas procesów w fazie gazowej i preferencyjne utlenianie SWCNT bez wprowadzania defektów w ścianie bocznej.

2. **Za pomocą kwasu.** Metoda ta służy do usuwania zanieczyszczeń katalitycznych. Niezbędne jest przeprowadzenie obróbki wstępnej, np. homogenizacji próbki za pomocą ultradźwięków. Najczęściej używane są następujące kwasy: H_2SO_4 , HNO_3 lub HCl . Na ogół ogrzewa się mieszaninę kwasu i próbki nanorurek w kolbie okrągłodennej pod chłodnicą zwrotną. Czas tego procesu jest bardzo zróżnicowany i dopasowany do katalizatora, czasami może trwać nawet kilka dni. Należy mieć na uwadze, że podczas traktowania nanorurek w kwasie tlenowym dochodzi do powstania grup funkcyjnych, czyli $-\text{COOH}$, $-\text{CO}$, $-\text{OH}$. Jeżeli efekt ten jest niepożądany, to próbkę traktowaną kwasem należy poddać procesowi wygrzewania np. w temp. 600°C pod ciśnieniem 10^{-5} mbar przez kilka godzin. Niejednokrotnie jednak jest to efekt pożądaný, będący pierwszym etapem egzohedralnej funkcjonalizacji nanorurek węglowych.
3. **Ultrasonikowanie.** Dzięki wibracjom powstałym podczas procesu ultrasonikowania aglomeraty różnych nanocząstek drgają i przez to stają się bardziej zdyspergowane. Proces ten zależy od rodzaju użytego medium (rodzaju surfaktantu, rozpuszczalnika czy kwasu). Dochodzi do separacji nanocząstek metali od materiału nanorurkowego bez uprzedniego procesu utleniania. Najczęściej używane media to wodne roztwory surfaktantów, różne mieszaniny HNO_3 , H_2SO_4 , H_2O_2 . Podczas tego procesu nanorurki są też cięte na krótsze fragmenty (krótkie sonikowanie, przez ok. 10 min, powoduje zmniejszanie ich długości). Efekt ten może być korzystny i czasami jest osiągany celowo. Dotyczy to szczególnie zastosowań biomedycznych, gdy długość nanorurki determinuje toksyczność.
4. **Oczyszczanie magnetyczne.** Metoda ta opiera się na wykorzystaniu magnetycznych właściwości cząstek katalizatora. Aby odseparować metale od oczyszczanej próbki w stałym polu magnetycznym, najpierw należy usunąć grafitowe otoczki z ich powierzchni. Osiąga się to przez zmieszanie nanorurkowego materiału z nieorganicznymi nanocząstkami (przeważnie z ZrO_2 lub CaCO_3) w łaźni ultradźwiękowej. Warstwy grafitowe otaczające cząstki metali są usuwane mechanicznie.
5. **Mikrofiltracja.** W tej technice oczyszczania wykorzystuje się występowanie w próbce cząstek o zróżnicowanym rozmiarze (cząstek metali czy nanorurek). Roztwór z rozdyspergowanym materiałem przepuszcza się przez odpowiednie membrany (o rozmiarze porów w zakresie 0,2–2,0 μm), wykorzystując w tym celu nad- lub podciśnienie, zależnie od sposobu filtracji. W celu uniknięcia wytrącania substancji na powierzchni filtrów stosuje się dodatkowo sonikowanie lub równomierne mieszanie roztworu. Materiał nanorurkowy zatrzymuje się w dużym stopniu na powierzchni membrany, podczas gdy większość zanieczyszczeń przechodzi do roztworu pofiltracyjnego. Proces filtracji jest powtarzany do momentu uzyskania roztworu pofiltracyjnego zawierającego wyłącznie rozpuszczalniki (woda, aceton, alkohol etylowy) użyte do przemywania materiału osadzonego na powierzchni membrany.

6. **Wyrzewanie.** Po oczyszczaniu nanorurki można poddać procesom wygrzewania w warunkach wysokiej próżni (w zakresie ok. 10^{-6} mbar), w temp. 800–160°C w celu usunięcia zarówno fulerenów, grafitowych form węgla, metali, pozostałości rozpuszczalników, jak i defektów ze struktury krystalograficznej nanorurek.

Dalsze modyfikacje procesów oczyszczania polegają na zastosowaniu kombinacji kilku z przedstawionych technik.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: móżdziej; mieszadło magnetyczne; płyta grzejna; waga analityczna; azotan(V) żelaza; butanol; tlenek magnezu; kwas chlorowodorowy; folia aluminiowa; miedziane siteczko; mikroskop TEM; zestaw do filtracji; waga analityczna; łaźnia ultradźwiękowa; piec CVD.

Przebieg doświadczenia

1. Azotan(V) żelaza jest rozwarzany w butanolu i ucierany w ceramicznym tyglu z MgO w stosunku molowym Fe : MgO = 1 : 50. Ilość użytego MgO to 0,5 g. Następnie mieszanina jest umieszczana w móżdziej na płycie grzejnej i osuszana poprzez mieszanie i odparowywanie rozpuszczalnika w temp. 150°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika tworzy się prekursor bimetalicznego katalizatora (Fe/MgO) osadzonego na tlenku magnezu. W kolejnym etapie porcję prekursora katalizatora umieścić na łódce ceramicznej, a następnie centralnie w rurze kwarcowej w piecu. Ustalić przepływ mieszaniny gazów nośnych na poziomie 50/100 cm³/min odpowiednio dla C₂H₄/Ar. Następnie włączyć grzanie pieca na 850°C. Czas trwania procesu wynosi 30 minut. Po tym czasie wyłączyć grzanie pieca i odciąć dopływ C₂H₄. Chłodzenie odbywa się tylko w obecności argonu. Przy temp. poniżej 300°C zakręcić również butlę z argonem i rozszczelnić reaktor kwarcowy – czynność tę wykonujemy w celu usunięcia amorficznego węgla (temperaturę utrzymujemy przez 15 minut). Następnie schłodzić reaktor do temperatury pokojowej i wyjąć otrzymany produkt zanieczyszczony mieszaniną katalizatora z nośnikiem. Po skończonym procesie zważyć próbkę i obliczyć przyrost masy.
2. Chcąc uzyskać czystą próbkę zawierającą tylko nanorurki węglowe, wprowadzamy ją do 20 ml 12-molowego roztworu HCl, dyspergując w łaźni ultradźwiękowej w czasie 30 minut, a następnie mieszamy przez 2 godziny. Tak przygotowany materiał należy przesączyć, używając do tego celu zestawu do filtracji. Następnie całość przemyć wodą i suszyć wyselekcjonowany produkt. Ostatnim zadaniem będzie przygotowanie oczyszczonych nanorurek węglowych odpowiednio do każdego badania:
 - **mikroskop TEM:** miedziane siteczko umieścić na folii aluminiowej; niewielką ilość materiału nanieść na siteczko i przykryć folią aluminiową, a następnie wetrzeć materiał w siteczko;
 - **spektroskopia ramanowska:** niewielką ilość materiału zawierającego nanorurki węglowe umieścić w probówce i wlać ok. 5 ml acetonu, następnie tak przygotowany roztwór nakropić na folię aluminiową.

Wyniki

Obliczenia przedstawić w tabelach 1.1–1.4, a następnie umieścić w sprawozdaniu.

Tabela 1.1. Preparatyka katalizatora

Substraty	Ilość
Azotan(V) żelaza	
Tlenek magnezu	
Butanol	

Tabela 1.2. Otrzymywanie nanorurek węglowych

Substraty	Przepływ [cm ³ /min]
C ₂ H ₄	
Ar	

Tabela 1.3. Masa poszczególnych komponentów

	Masa [g]
Łódeczka bez katalizatora	
Katalizator Fe/MgO	
Przyrost masy	

Tabela 1.4. Oczyszczanie nanorurek węglowych

	Masa [g]
Nanorurki węglowe	
Kwas chlorowodorowy	

Ćwiczenie 1.3

Ocena morfologii powierzchni nanomateriałów skaningowym mikroskopem elektronowym

Cel

1. Celem ćwiczenia są badania morfologiczne powierzchni za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).
2. Przedmiotem ćwiczenia jest również zapoznanie się ze zjawiskami fizycznymi będącymi podstawą budowy i zasady działania SEM, stosowaną metodyką badań, preparatyką próbki oraz interpretacją wyników.

Wprowadzenie

Ludzkie oko jest w stanie rozróżnić 2 punkty leżące od siebie nie bliżej niż 0,2 mm. Odległość ta jest zdolnością rozdzielczą ludzkiego oka i dla mniejszych odległości punkty „zlewają” się w pojedynczą plamkę. Aby je rozróżnić, potrzebna jest lupa (soczewka) lub inny układ optyczny (mikroskop), gdzie wielkość naszego detalu będzie równa 0,2 mm/P (P – powiększenie). W mikroskopii optycznej istnieje jednak ograniczenie związane z długością fali światła. Minimalna odległość między 2 punktami rozróżnialnymi przez falę określona jest **wzorem Abby’ego**:

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha} = \frac{0,61 \lambda}{A}$$

gdzie: λ – długość fali, n – współczynnik załamania światła, α – połowa kąta rozwarcia stożka światła przechodzącego przez obiektyw, iloczyn $n \sin \alpha$ nazywany jest aperturą numeryczną A .

Im mniejsza długość fali, a większy współczynnik załamania światła i kąt rozwarcia obiektywu, tym lepsza zdolność rozdzielcza. Najkrótsza długość fali światła widzialnego to ok. 380 nm, największe $n = 1,515$ dla oleju cedrowego, największy kąt rozwarcia stożka świetlanego osiąga ok. 75°, a więc $\sin \alpha \approx 0,967$ i A wynosi ok. 1,47. Wynika z tego, że najlepsza zdolność rozdzielcza mikroskopu optycznego wynosić będzie ok. 250 nm (w rzeczywistości jest gorsza i wynosi ok. 1 μ m) przy powiększeniu ok. 1000-krotnym. Dla większych powiększeń, a co

za tym idzie lepszej zdolności rozdzielczej konieczne jest zastąpienie światła strumieniem elektronów, dla których fala ma znacznie mniejszą długość. Wykorzystanie falowych właściwości elektronów, postulowanych przez De Brogliea, stało się podstawą do skonstruowania mikroskopu elektronowego. Elektronom przyspieszonym w polu o potencjale U można przypisać długość fali:

$$\lambda = \frac{h}{p}$$

gdzie: λ – długość fali, h – stała Plancka, p – pęd elektronu. Dla elektronów poruszających się w polu elektrostatycznym o różnicy potencjałów U spełniona jest relacja:

$$\lambda = \frac{1,225}{\sqrt{U}}$$

gdzie: U [V] – napięcie.

Tak więc przy najczęściej stosowanych napięciach 1–30 kV długość fali jest ponad 100 000 razy mniejsza niż długość fali światła, co nawet dla mniejszych kątów rozwarcia promieni stosowanych w mikroskopach elektronowych daje zdolność rozdzielczą na poziomie nanometrów, czyli zdecydowanie lepszą niż w mikroskopach optycznych.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: preparaty do badań; skaningowy mikroskop elektronowy (ryc. 1.15).

Przebieg doświadczenia

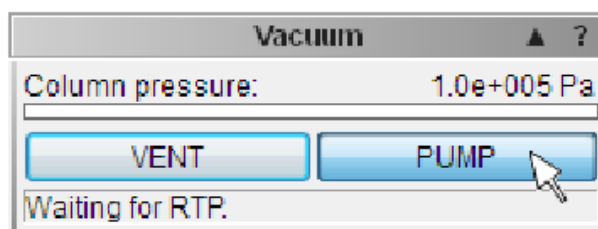
1. Do ćwiczeń wykorzystany zostanie **skaningowy mikroskop elektronowy VEGA 3** firmy TESCAN.
2. Przygotować próbki do obserwacji:
 - próbka przewodząca;
 - próbka nieprzewodząca;
 - próbka nieprzewodząca ceramiczna.
3. Obserwować powierzchnię próbek przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego w warunkach wysokiej próżni.



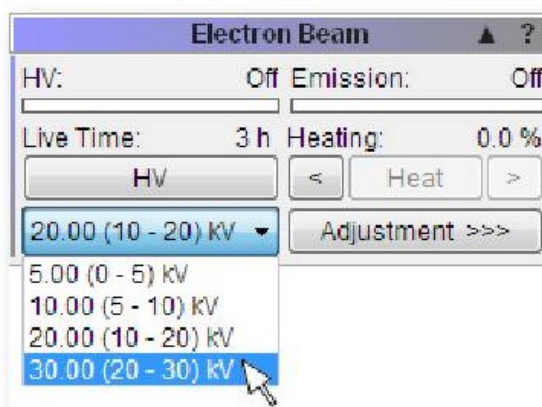
Ryc. 1.15. Zdjęcie skaningowego mikroskopu elektronowego SEM model VEGA 3 TESCAN

Instrukcja obsługi mikroskopu:

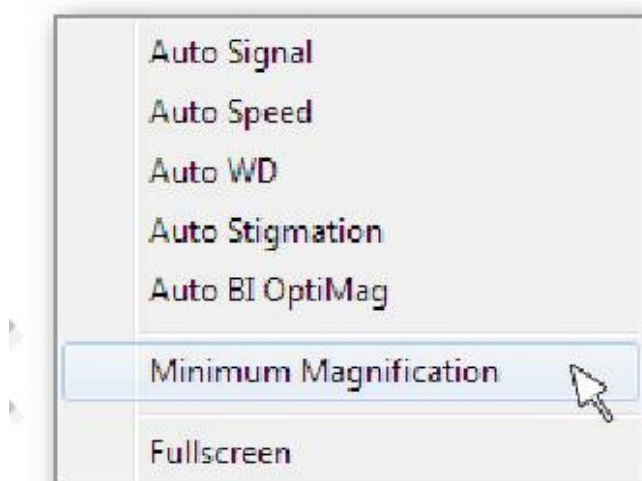
1. Przekręcić pokrętkę na mikroskopie na **ON** i czekać do momentu osiągnięcia przez komputer stanu gotowości.
2. Uruchomić program **VEGATC** i czekać, aż cały panel załaduje się na zielono.
3. Kliknąć przycisk **PUMP** w zakładce **VACUUM**.



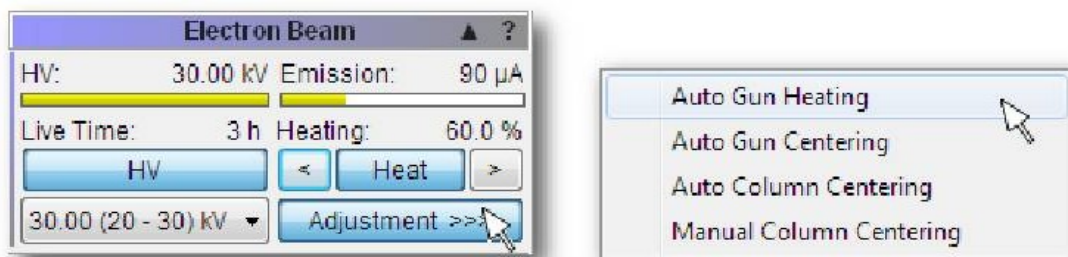
4. Ustawić napięcie, a następnie kliknąć przycisk **HV** w zakładce **ELECTRO BEAM** w celu włączenia wysokiego napięcia i rozpoczęcia ogrzewania żarnika wolframowego.



5. Kliknąć prawym przyciskiem myszy w oknie SEM skanowania, aby otworzyć menu i wybrać funkcję Minimum Magnification.



6. Jeśli okno Skanowanie pozostaje czarne, wybrać Auto Gun – funkcję ogrzewania wykorzystującą combo.



7. Kliknąć ikonę WD w celu ustawienia ostrości obrazu (ewentualnie użyć funkcji for focusing Auto WD). Dwukrotne kliknięcie w oknie skanowania otwiera okno SEM The Focus. Aby usunąć okno ostrości, kliknąć dwukrotnie w dowolnym miejscu okna SEM Scanning.



8. Aby wybrać intensywność wiązki (BI 10 zalecane), najpierw kliknąć lewym przyciskiem myszy na ikonę BI.



9. Aby powiększyć obraz, kliknąć dwa razy ikonę MAG, a następnie kręcić pokrętkiem w prawą lub lewą stronę.



10. Aby wybrać oczekiwany tryb koncentracji, kliknąć ikonę SPEED.



11. Kliknąć na przycisk Acquire na panelu informacyjnym lub na pasku narzędzi zapisać obraz. Wybrać folder, w którym ma zostać zapisany obraz.



12. Po zakończeniu pracy na mikroskopie należy wyłączyć grzanie, następnie napięcie, a na koniec należy zapowietrzyć komorę.

Preparatyka obiektów do obserwacji w SEM. Zastosowanie wiązki elektronowej do badań mikroskopowych narzuca konieczność odprowadzenia ładunku elektrycznego z powierzchni obserwowanej próbki. W związku z tym materiał powinien być przewodzący, gdyż w przeciwnym wypadku nieodprowadzenie padających elektronów powoduje gromadzenie ładunków ujemnych na powierzchni. Następuje wtedy hamowanie i odpychanie wiązki pierwotnej, co prowadzi do zniekształceń obrazu. Z tego powodu obserwowanie materiałów nieprzewodzących w konwencjonalnych mikroskopach (np. ceramika, materiały sztuczne) nastręcza pewne problemy. Powierzchnię materiału nieprzewodzącego należy pokryć cienką warstwą materiału przewodzącego (np. C, Au, Al) poprzez próżniowe naparowanie. W komorze konwencjonalnego mikroskopu skaningowego panuje wysoka próżnia, stąd niektóre preparaty nie nadają się bezpośrednio do badań, gdyż uległyby zniszczeniu (np. tkanki, komórki). W mikroskopach typu ESEM próbki nieprzewodzące lub zawierające wilgoć mogą być obserwowane bez specjalnych przygotowań. Wielkość próbek jest ograniczona wielkością komory preparatowej (maks. średnica próbki 5 cm, wysokość 3 cm).

Wyniki

Otrzymane w ramach ćwiczeń laboratoryjnych obrazy należy scharakteryzować, określając: morfologię powierzchni, wymiar ziaren i rozkład wielkości ziaren, średnicę włókien, jednorodność materiałów, wielkość porów.

Piśmiennictwo

- Grzybowska-Świerkosz B. 1993. *Elementy katalizy heterogenicznej*. Warszawa: PWN.
- Huczko A. 2004. *Nanorurki węglowe*. Warszawa: BEL Studio.
- Jankiewicz B., Choma J., Jamioła D., Jaroniec M. 2010. Nanostruktury krzemionkowo-metaliczne. *Wiadomości Chemiczne* 64, 11–12.
- Konicki W., Cendrowski K., Chen X., Mijowska E. 2013. Application of hollow mesoporous carbon nanospheres as an high effective adsorbent for the fast removal of acid dyes from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal* 228, 824–833.
- Wilgoz K., Chen X., Kierzek K., Machnikowski J., Mijowska E. 2012. Template method synthesis of mesoporous carbon spheres and its applications as supercapacitors. *Nanoscale Research Letters* 7, 269.

2. BADANIE BIOZGODNOŚCI NANOMATERIAŁÓW

Magdalena Jędrzejczak-Silicka

Badania cytotoksyczności i biouzgodności nanomateriałów z wykorzystaniem hodowli komórkowych *in vitro* są istotnym, podstawowym etapem klasyfikacji tych nanostruktur. **Nanomateriały stanowią obszerną i bardzo specyficzną grupę materiałów o złożonych właściwościach fizycznych, chemicznych i mechanicznych**, które w dużym stopniu zależą od ich rozmiarów, powierzchni i efektów kwantowych. W porównaniu z odpowiednikami występującymi w mikro-, makroskali czy w postaci materiału litego (ang. *bulk*) mogą wykazywać odmienne właściwości, jak np. względnie mała masa, duża powierzchnia właściwa, zmieniona reaktywność chemiczna i rozpuszczalność w rozpuszczalnikach, dyspersyjność, zmienność wielkości struktur (poprzez tworzenie agregatów i/lub aglomeratów).

Nanomateriały różnią się między sobą składem (nanomateriały pochodzenia organicznego, nieorganicznego, lipidowe, polimerowe) oraz **stopniem zawartości zanieczyszczeń** (ang. *impurities*), **kształtem**, **porowatością**, **wymiarem** (materiały zerowymiarowe, np. kropki kwantowe, nanocząstki srebra/złota; jednowymiarowe, np. nanowłókna czy nanopręty; dwuwymiarowe, np. nanodyski, nanopryzmy, nanopłatki, nanopaski, nanosześciany; trójwymiarowe, np. nanokryształy), **dyspersyjnością**. Cytotoksyczność nanocząstek (ang. *nanoparticles*, NP) determinowana jest wieloma czynnikami, m.in. składem, strukturą krystaliczną, rozmiarem, tendencją do tworzenia agregatów. Skład chemiczny nanomateriałów determinować może interakcje z komórkami, wpływać na proces internalizacji nanostruktur, wewnątrzkomórkową lokalizację, degradację lub eliminację nanostruktur z komórek. Struktura krystaliczna w przypadku niektórych nanomateriałów może istotnie wpływać na redukcję żywotności komórkowej, podczas gdy inne odmiany alotropowe nie wykazują aktywności cytotoksycznej. Różne odmiany alotropowe TiO_2 wykazują inny poziom cytotoksyczności, np. anataz (minerał, polimorficzna odmiana TiO_2) nie wywołuje wzrostu reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) w przeciwieństwie do nanocząstek rutyłu (TiO_2) o wielkości 10–20 oraz 200 nm.

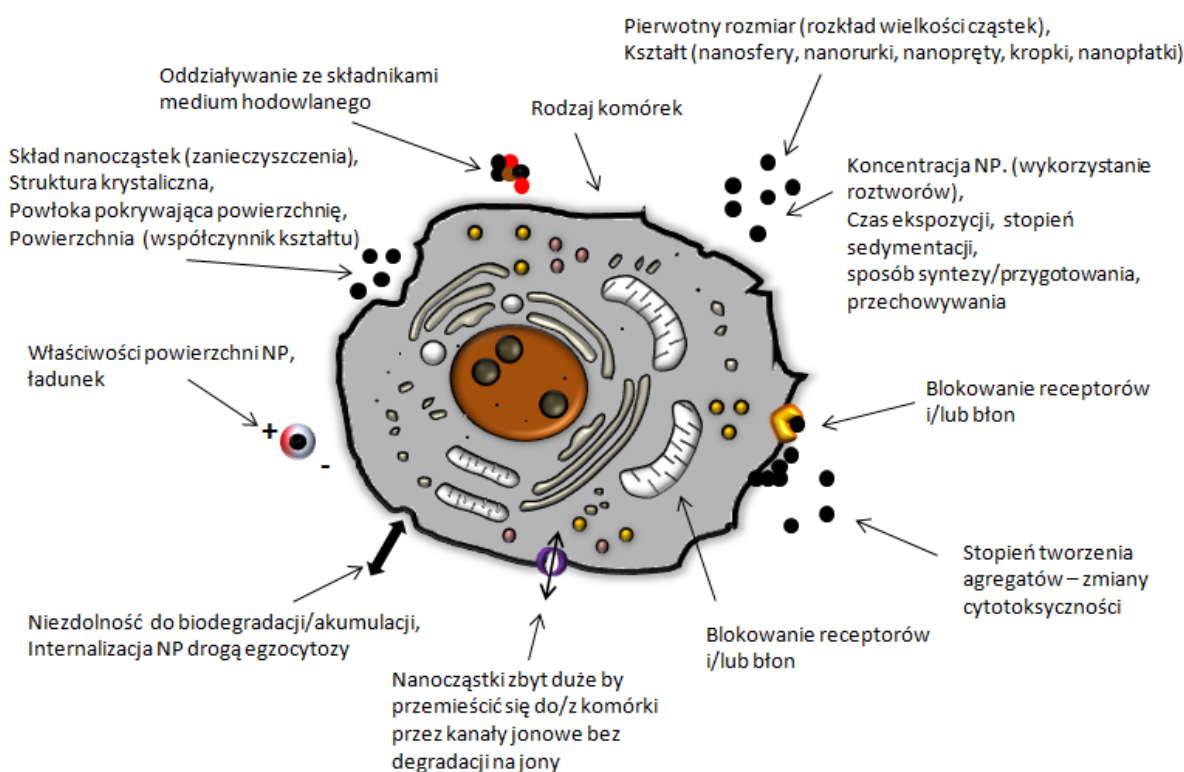
Kolejny czynnik wpływający na potencjał cytotoksyczny nanomateriału związany jest z rozmiarem nanocząstek. W przypadku części nanostruktur mają one zdolność przenikania przez bariery fizjologiczne. Częsteczki takie wnikają do komórek na drodze fagocytozy, mikropinocytozy czy endocytozy receptorowej (ang. *receptor-mediated endocytosis*, RME). Nanocząstki o wymiarach poniżej 50 nm łatwiej wnikają do komórek i wykazują większy potencjał cytotoksyczny, podczas gdy cząstki o wielkości poniżej 20 nm mają możliwość przenikania przez ściany naczyń krwionośnych i kumulacji w tkankach. Co więcej, cząstki o dużej powierzchni wykazują tendencje do aglomeracji/agregacji w płynach, wchodzą w interakcje z biomolekułami takimi jak białka czy DNA. Także funkcjonalizacja powierzchni nanomateriałów różnymi grupami funkcyjnymi (np. grupami $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{Na}$), nanopowłokami, rodzaj wiązań na powierzchni nanomateriałów (kowalencyjnych, niekowalencyjnych), wykorzystanie czynników ułatwiających dyspersję (np. poli(tlenek etylenu), PEG), tworzenie cząsteczek hybrydowych poprzez dekorację nanocząstkami (np. Fe_3O_4 , czy Au) – wszystkie te czynniki mogą wpłynąć na proces internalizacji, kumulację w przedziałach subkomórkowych i dalszy los wewnątrzkomórkowy. Również kształt (proporcje wielkości, ang. *aspect ratio*) nanostruktur stanowi

istotny czynnik wpływający na efektywność ich „pobierania” przez komórki, co może bezpośrednio wpływać na ich żywotność.

Efekt cytotoksyczny nanomateriałów może być różny – dotyczyć może uszkodzenia błon komórkowych, może hamować syntezę białek, wiązać się nieodwracalnie z receptorami i przez to je blokować, hamować reakcje enzymatyczne, syntezę DNA, generować powstawanie rodników i gromadzenie nadtlenu, zmniejszać ilości glutationu (GSH).

Testy określające biogodność/cytotoksyczność badanych nanomateriałów opierają się na różnych aktywnościach komórkowych. Na przykład test MTT bazuje na aktywności enzymów mitochondrialnych (informacja o względnej żywotności komórek), a test CCK-8 (ćwiczenie 2.6) wykorzystuje aktywność dehydrogenazy cytoplazmatycznej (informacja o zdolności komórek do proliferacji oraz względnej żywotności komórek; należy podkreślić, że na wynik wpływ ma wewnątrzkomórkowa aktywność metaboliczna, która nie zawsze jest równoznaczna z ogólną żywotnością komórek). O integralności błon komórkowych informują testy LDH, które bazują na pomiarze „wycieku” enzymu dehydrogenazy mleczanowej w wyniku uszkodzenia błon komórkowych, oraz test NRU (ćwiczenie 2.7), opierający się na zdolności komórek do kumulacji barwnika czerwieni obojętnej w lizosomach. Test alamarBlue (AB) wskazuje na aktywność enzymów zaangażowanych w proces produkcji ATP (enzymy mitochondrialne, diaforazy).

Mimo że układ doświadczalny z wykorzystaniem hodowli komórkowych, który umożliwia obserwację oddziaływań między testowanym nanomateriałem i komórkami, jest układem uproszczonym, wiele czynników ma wpływ na wynik docelowy. Po stronie samych nanomateriałów (ang. *intrinsic properties*) leżą m.in. ich właściwości fizykochemiczne, sposób syntezy, a po stronie środowiska zewnętrznego (ang. *extrinsic properties*) – m.in. typ komórek, skład medium hodowlanego (ryc. 2.1). Wszystko to może wpływać na sposób przeprowadzenia doświadczenia oraz jego wynik.



Ryc. 2.1. Potencjalne oddziaływania komórka–nanomateriał z uwzględnieniem cech komórki i właściwości fizykochemicznych nanocząstek (NP) (wg Schrand i in., 2010, zmodyfikowane)

Ćwiczenie 2.1

Projektowanie doświadczenia w celu analizy przykładowego nanomateriału

Cel

Analiza cech fizykochemicznych wybranych nanomateriałów w kontekście ich wykorzystania w badaniach *in vitro*.

Wprowadzenie

Konsekwencją rozwoju nanobiotechnologii były próby wprowadzenia adekwatnej definicji „nanomateriału” (uwzględniającej cechy fizykochemiczne, a przez to pośrednio właściwości) dla materiałów celowo wytworzonych. Podyktowane było to troską o bezpieczeństwo wielu produktów – żywnościowych, kosmetyków, leków, preparatów biobójczych i miało na celu minimalizację ryzyka związanego z ich stosowaniem zarówno dla zdrowia konsumentów, jak i środowiska.

W 2012 r. Unia Europejska zatwierdziła definicję nanomateriału. Zgodnie z nią **nanomateriał** to „naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony, materiał zawierający cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1–100 nm” (z zastrzeżeniem, iż górna granica jest powszechnie stosowana). W definicji tej również uwzględniono, że w określonych przypadkach, uzasadnionych względami ochrony środowiska, zdrowia, bezpieczeństwa lub konkurencyjności, zamiast wartości progowej liczbowego rozkładu wielkości cząstek wynoszącej 50% można przyjąć wartość z zakresu 1–50%, z wyjątkiem fulerenów, płatków grafenowych oraz jednościennych nanorurek węglowych o co najmniej 1 wymiarze poniżej 1 nm, które także należy uznać za nanomateriały. **Liczbowy rozkład wielkości cząstek** (zgodnie z zaleceniem 2011/696/UE) uwzględnia sytuację, w której nanomateriały są zazwyczaj złożone z wielu cząstek o różnych wielkościach w określonym rozkładzie. Według Komitetu Naukowego ds. Pojawiających się i Nowo Rozpoznanych Zagrożeń dla Zdrowia (ang. *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*, SCENIHR) materiał może być zakwalifikowany jako nanomateriał, jeżeli „ponad 0,15% cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek posiada wymiar poniżej wyznaczonej w definicji górnej granicy wielkości nanomateriału”. Z kolei Komisja Europejska w zaleceniu 2011/696/UE określa inną wartość progową liczbowego rozkładu wielkości cząstek – „co najmniej 50% lub, w wymienionych w definicji nanomateriału przypadkach, od 1% do 50% cząstek w skali od 1 nm do 100 nm”.

Dodatkowo zalecenie 2011/696/UE określa także, że „jeśli jest to technicznie możliwe i wymagane w danym systemie prawnym, zgodność z definicją nanomateriału można określać ilościowo na podstawie **powierzchni właściwej** przypadającej na objętość”. W związku z czym materiał zgodny z definicją nanomateriału to taki, którego „powierzchnia właściwa przypadająca na objętość jest większa niż 60 m²/cm³”. Co więcej, nanomateriał spełniający warunek liczbowego rozkładu wielkości cząstek należy uznać za „zgodny z definicją nanomateriału, nawet jeśli jego powierzchnia właściwa jest mniejsza niż 60 m²/cm³”. Obecnie zastosowanie tego parametru odnosi się wyłącznie do suchych materiałów stałych bądź substancji rozdrobnionych.

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority*, EFSA) rekomenduje wykorzystanie co najmniej 2 różnych metod analitycznych do identyfikacji nanomateriałów zgodnie z regulacją UE. Jedną z tych metod powinna być **mikroskopia elektronowa. Technika transmisyjnej mikroskopii elektronowej** (TEM) zapewnia precyzyjne informacje dotyczące kształtu i rozmiaru pierwotnych cząstek. Standaryzację pomiaru wielkości nanostruktur przedstawił Komitet Techniczny ISO/TC 229 ds. Nanotechnologii Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (ISO). Określenie rozmiaru nanostruktur powinno opierać się na pomiarze minimum 500 struktur z rozdzielczością lepszą niż 0,5 nm/piksel.

Drugą często wykorzystywaną metodą dającą informację o wielkości cząstek jest **metoda dyfrakcji laserowej**, w pełni zautomatyzowana do zastosowań przemysłowych i laboratoryjnych. Metoda ta umożliwia uzyskanie bezpośrednich wyników uziarnienia dla całej populacji cząstek w próbce w zakresie cząstek mikrometrycznych (0,1–3000 μm). Analiza próby odbywa się poprzez podświetlanie skolimowaną wiązką lasera cząstek, które rozpraszają światło pod różnymi kątami (np. cząstki o większych rozmiarach generują większą intensywność rozpraszanego światła, załamując je pod mniejszym kątem, a cząstki mniejsze charakteryzują się niższą intensywnością sygnału o większym kącie rozpraszania światła). Zmiany w intensywności rozpraszanego światła i kątach załamania rejestrowane są przez światłoczuły detektor.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: materiały z analiz nanomateriałów – z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (ang. *transmission electron microscope*, TEM), dyfrakcyjnej analizy laserowej (ang. *laser diffraction spectroscopy*, LDS), mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscope*, AFM), spektroskopii UV-VIS.

Przebieg doświadczenia

4 grupy ćwiczeniowe

1. Na podstawie analiz mikroskopowych (TEM oraz AFM) ocenić kształt badanych nanostruktur.
2. Na podstawie analiz mikroskopowych (TEM oraz AFM) i dyfrakcyjnej analizy laserowej określić: D50, średni rozmiar nanostruktur oraz przedział wielkości nanostruktur.
3. Na podstawie wyników spektroskopii UV-VIS ocenić stabilność roztworu zawierającego określone nanomateriały.

Wyniki

Po interpretacji wyniki zestawień w formie tabelarycznej (tab. 2.1).

Tabela 2.1. Charakterystyka wybranych parametrów analizowanych nanostruktur

Nanomateriał	Kształt/faza krystaliczna	Przedział wielkości nanostruktur	Średni rozmiar nanostruktur	Mediana (D50)	Stabilność roztworu

Ćwiczenie 2.2

Przygotowanie materiału testowego do analiz in vitro

Cel

Wstępne przygotowanie nanomateriałów do analizy z wykorzystaniem hodowli komórkowych.

Wprowadzenie

Jak zaznaczono we wstępie rozdziału, cytotoksyczność nanomateriałów determinowana jest wieloma czynnikami, wśród których poza składem chemicznym (obejmującym również nieczystości materiału), strukturą krystaliczną i rozmiarem istotna jest prezentowana przez nanomateriały tendencja do tworzenia **agregatów/aglomeratów**, mogąca mieć bezpośredni wpływ

na wynik relacji nanomateriał–komórka. Utrzymanie nanomateriału w postaci nanosystemu koloidalnego stanowi wyzwanie z punktu widzenia analiz właściwości fizykochemicznych, badań *in vitro* i *in vivo* oraz wymagań przemysłu farmaceutycznego i procesu komercjalizacji. Niezmiernie ważnym etapem charakterystyki nanomateriału jest określenie sposobu jego zachowania się w środowisku biologicznym, oddającym warunki fizjologiczne – w płynie fizjologicznym, medium hodowlanym, krwi. Możliwe jest określenie w takich warunkach interakcji materiału ze składowymi tego środowiska, co przekłada się na potencjalne dalsze wykorzystanie badanego materiału w nanomedycynie, a badanie takie powinno być przeprowadzone możliwie wcześnie, przed etapem badań przedklinicznych i klinicznych.

Proces tworzenia agregatów (zgodnie ze specyfikacją techniczną ISO/TS 27687:2008 – zbiór cząstek związanych silnymi siłami, których zewnętrzna powierzchnia może być znacznie mniejsza od sumy powierzchni indywidualnych składników) i/lub aglomeratów (zgodnie z specyfikacją techniczną ISO/TS 27687:2008 – zbiór cząstek, agregatów lub ich mieszanin związanych słabymi siłami, np. siłami van der Waalsa, których zewnętrzna powierzchnia jest zbliżona do sumy powierzchni indywidualnych składników) – zależy m.in. od **rodzaju nanostruktur** oraz **funkcjonalizacji** ich powierzchni. Wiele badań sugeruje, że proces funkcjonalizacji zmniejsza tendencje nanomateriałów do tworzenia agregatów i ma przełożenie na los tych materiałów w systemach biologicznych. Zwiększony potencjał do agregacji, zależny od rodzaju materiału, właściwości środowiska (składu medium hodowlanego, płynów ustrojowych), powoduje trudności w ocenie stopnia internalizacji, biodystrybucji czy cytotoksyczności nanomateriału (niejasność, czy cytotoksyczne są pojedyncze nanostruktury czy ich agregaty/aglomeraty).

Formowanie agregatów może przebiegać na drodze oddziaływań elektrostatycznych, van der Waalsa, magnetycznych, interakcji hydrofobowo-hydrofobowych, tworzących się wiązań wodorowych w złożonych, wysoce jonowych mieszaninach wodnych, zawierających elektrolity, białka, lipidy i metabolity. Na przykład nanorurki węglowe (CNT) wykazują wysoką podatność do tworzenia agregatów ze względu na oddziaływanie sił van der Waalsa, podczas gdy tlenki metali wyższą tendencję do agregacji w porównaniu z wielościennymi nanorurkami węglowymi (MWCNT). Wyższe stężenie nanomateriału wpływa na wzrost ryzyka formowania agregatów w warunkach medium do hodowli komórkowych w porównaniu z roztworem PBS. Sam rozmiar powstających agregatów jest większy w mediach hodowlanych w porównaniu z roztworem PSB. Zależność ta związana jest z zjawiskiem adsorpcji składników medium (białek surowicy, jonów Ca^{2+}) na powierzchni nanostruktur. Wyniki wielu badań wykazały także, że pojedyncze nanostruktury nie wykazują takiej cytotoksyczności jak agregaty tych nanostruktur, a agregaty ograniczają proces komórkowej internalizacji.

Jak wykazały jedne z ostatnich badań, różnice w oddziaływaniu nanomateriału na model komórkowy obserwuje się nie tylko w przypadku pojedynczych nanostruktur bądź ich agregatów/aglomeratów, ale także w sposobie wprowadzenia nanomateriału (materiał skoncentrowany, wstępnie wymieszany, przemieszany) do układu doświadczalnego.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: zestaw sterylnych pipet; sterylne tipsy o poj. 10–100 μl , 20–200 μl , 100–1000 μl ; medium pełne hodowlane (DMEM z 10-proc. surowicy) o temp. 37°C; sterylne probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml; sterylne probówki wirówkowe o poj. 15 ml; sonikator; pH-metr; mikroskop optyczny.

Nanomateriały

Nanopłatki GO, nanocząstki Fe_3O_4 . Nanomateriały zawieszone w roztworze PSB w stężeniu 1 mg/ml, sonikowane przez 3 godziny w temperaturze pokojowej.

Przebieg doświadczenia

2 grupy ćwiczeniowe

1. Przygotować roztwory robocze dostępnych nanomateriałów w stężeniu 500 µg/ml w pełnym medium hodowlanym (DMEM z 10-proc. surowicy) i roztworze PBS.
2. Roztwory sonikować przez 30 minut.
3. Dokonać pomiaru pH dla wszystkich przygotowanych roztworów.
4. Przygotować preparaty do obserwacji mikroskopowej i dokonać porównania pomiędzy próbkami.
5. Przygotować docelowe roztwory nanomateriałów w stężeniach – 5, 10, 25, 50 i 100 µg/ml w pełnym medium hodowlanym (DMEM z 10-proc. surowicy) do analiz *in vitro*.
6. Roztwory sonikować przez 30 minut.

Wyniki

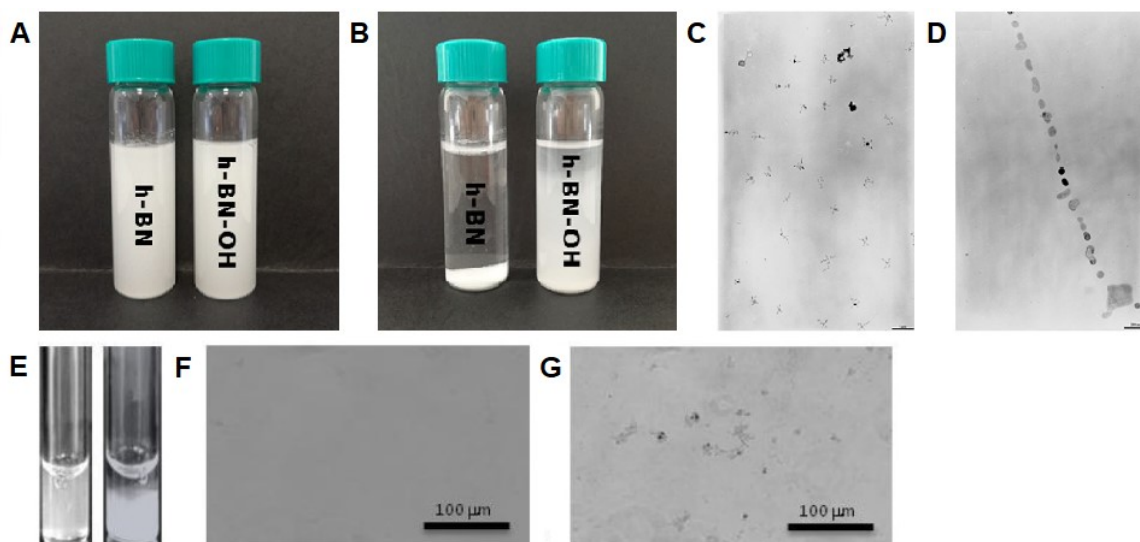
Na podstawie odczytów pH porównać wyniki dla poszczególnych nanomateriałów w zależności od zastosowanego roztworu (tab. 2.2).

Tabela 2.2. Wartości pH dla poszczególnych nanomateriałów

Typ nanomateriału	Wartość pH w środowisku PBS	Wartość pH w środowisku medium hodowlanego
GO		
Fe ₃ O ₄		

Na podstawie wyników analizy mikroskopowej ocenić efektywność sonikacji i dokonać wstępnej oceny dyspersji.

Przykłady nanomateriałów poddanych dyspersji przedstawiono na rycinie 2.2.



Ryc. 2.2. Przykłady dyspersji wybranych nanomateriałów z uwzględnieniem grup funkcyjnych lub obecności białek w środowisku; stabilność dyspersji nanopłatków w zależności od obecności grupy –OH (stężenie 200 µg/ml) w godzinę po sonikacji (A); stabilność dyspersji h-BN i h-BN-OH (stężenie 200 µg/ml) w 48. godzinie po sonikacji (B); analiza TEM dyspersji h-BN-OH w wodzie (skala 1 µm) (C) i (skala 200 nm) (D); stabilność dyspersji nanocząstek PLGA przed inkubacją (po lewej) i po inkubacji (po prawej) z fibrynogenem (E); analiza mikroskopowa nanocząstek PLGA przed inkubacją (F); po inkubacji z fibrynogenem (G) (wg Czarniewska i in., 2010; Fornaguer i Solans, 2017, zmodyfikowane)

Widoczne są różnice w stopniu dyspersji oraz jej efektywności w zależności od rodzaju nanomateriałów (nanopłatki heksagonalnego azotku boru – h-BN, heksagonalnego azotku boru sfunkcjonalizowanego grupami –OH – h-BN-OH, nanocząstki kwasu polimlekowo-glikolowego – PLGA) i ośrodka (PBS, woda, roztwór białka), w którym przeprowadzono dyspersję.

Ćwiczenie 2.3

Określenie wiązania składników medium hodowlanego przez materiał testowy

Cel

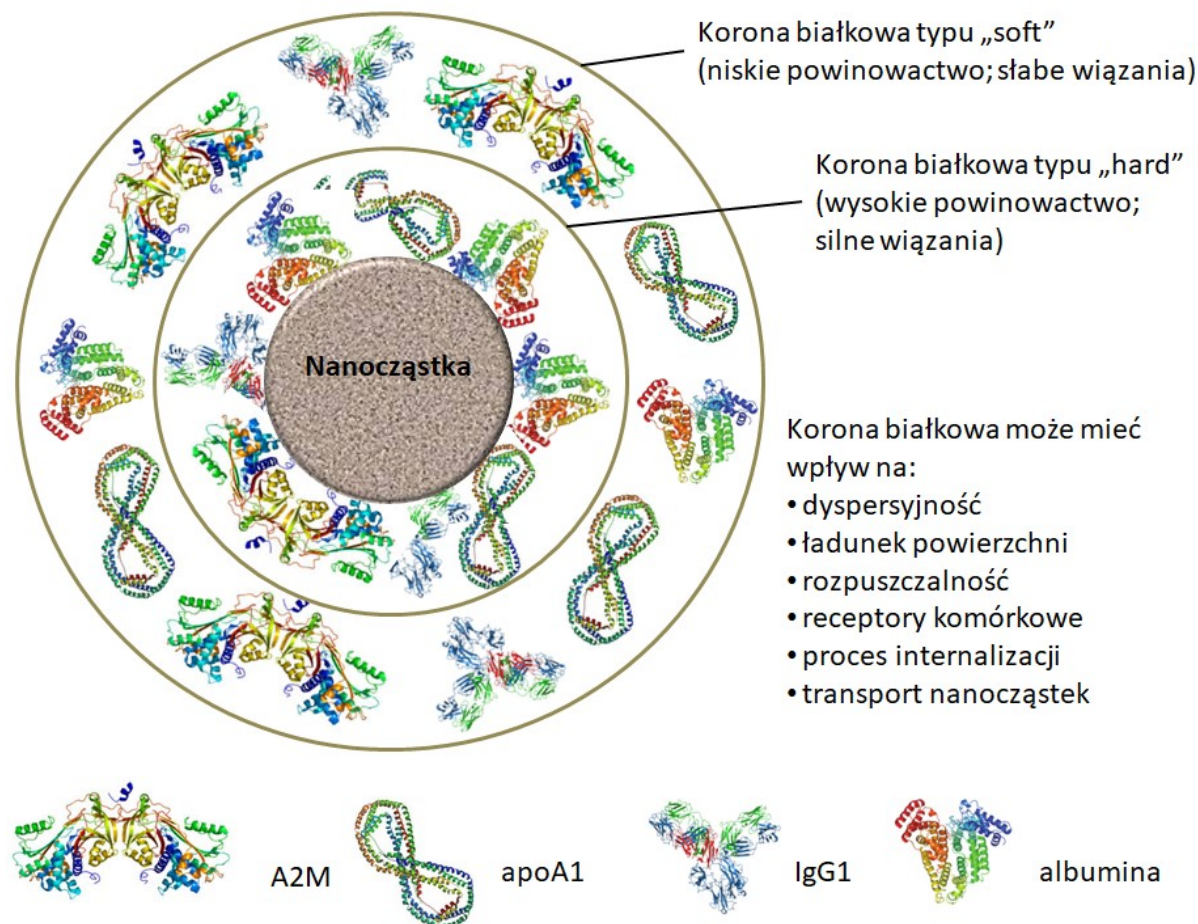
Wykorzystanie testu BCA w ocenie ilości białka potencjalnie wiązanego przez testowane nanomateriały.

Wprowadzenie

Powierzchnia wielu nanomateriałów wykazuje wysoką zdolność do adsorpcji, co prowadzi do ich oddziaływań z białkami środowiska zewnętrznego (np. białkami płynu hodowlanego, płynu ustrojowego) i tworzenia na ich powierzchni kilkunanometrowej warstwy białek, zwanej **koroną białkową** (ryc. 2.3). Korona białkowa składa się z 2 warstw, zewnętrznej typu „soft” (ang. *soft corona*, SC) oraz wewnętrznej typu „hard” (ang. *hard corona*, HC). Adsorpcja białek na powierzchni nanomateriałów jest wynikiem oddziaływań nanomateriał–białko oraz białko–białko. Warstwa zewnętrzna (SC) podlega dynamicznym zmianom na skutek wymiany białek pomiędzy tą warstwą a środowiskiem zewnętrznym. Białka korony typu „soft” oddziałują z koroną HC za pomocą słabych wiązań (niskie powinowactwo). Natomiast warstwa wewnętrzna (HC) oddziałuje bezpośrednio z powierzchnią nanomateriału, tworząc silne wiązania (wysokie powinowactwo), co sprawia, że wykazuje względnie stały skład. Co więcej, pojawiająca się na powierzchni nanomateriału korona białkowa nie maskuje całkowicie powierzchni nanomateriału i jego grup funkcyjnych. Zjawisko tworzenia korony białkowej oraz jej grubość zależy od koncentracji białka w środowisku zewnętrznym, temperatury, czasu trwania interakcji materiał–białko, koncentracji surowicy (w medium hodowlanym), naprężeń ścinających. Zjawisko tworzenia korony białkowej zaobserwowano m.in. w przypadku osocza krwi, gdzie na powierzchni nanomateriału potwierdzono obecność białek oraz drobne ślady lipidów. Analiza składu korony białkowej w wielu doświadczeniach wykazała obecność albuminy, IgG, IgM, fibrynogenu oraz apolipoprotein (ryc. 2.3).

Pojawienie się korony białkowej na powierzchni nanocząstek istotnie wpływa na stopień dyspersji nanocząsteczek, procesy ich wnikania do komórek, interakcje komórka–nanocząstka, wewnątrzkomórkową lokalizację. Przypuszcza się ponadto, że korona białkowa utrudnia internalizację zależną od receptorów. Formowanie korony białkowej może także znacznie wpłynąć na zmianę cytotoksyczności danego nanomateriału. Na przykład nanocząsteczki krzemionkowe 30 nm (AmSil30) pokryte białkami osocza krwi wykazywały niższy potencjał cytotoksyczny w stosunku do ludzkich endotelialnych komórek hodowli pierwotnej i komórek śródbłona mikronaczyniowego linii ISO-HAS1. Najbardziej widoczny efekt zaobserwowano dla tzw. wczesnej korony, formującej się w czasie poniżej 30 minut, natomiast wydłużenie czasu interakcji nanocząsteczki–białko nie wpłynęło na dalsze obniżanie cytotoksyczności nanomateriału. Inne badania dały zgoła odmienne wyniki, te same nanocząsteczki AmSil30 pokryte białkami osocza wykazywały niekorzystny wpływ na hodowle komórek chłoniaka histiocytarnego (linia U937) oraz komórek raka szyjki macicy (linia HeLa). Stąd wniosek, że działanie nanomateriałów wywołujących obecność korony białkowej (wywołujących efekt cytotoksyczny, apoptozę, trombocytozę, koagulację) zależy m.in. od: rodzaju modelu komórkowego, rodzaju medium hodowlanego (inkubacja nanocząstek srebra w 2 różnych mediach hodowlanych – DMEM i RPMI, generowała powstanie odmiennych koron białkowych), typu nanomateriału i grup funkcyjnych na powierzchni, np. nanocząsteczki polistyrenowe (PS) z grupami –COOH i –PO₃ były znacznie łatwiej pobierane przez komórki linii HeLa i hMSC, podczas gdy te same nanocząsteczki

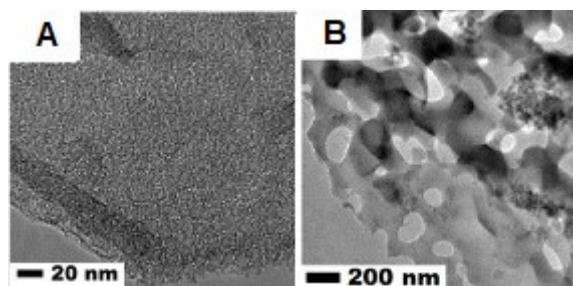
z grupami $-NH_2$ i $-SO_3$ pobierane były przez komórki w znacznie ograniczonym stopniu. Inne czynniki różnicujące wyniki wielu doświadczeń to: ładunek powierzchni nanomateriałów, czas trwania doświadczenia, obecność związków pokrywających powierzchnię nanomateriałów takich jakich jak poli(tlenek etylenu) (PEG) czy związku dipolarnego, redukujących lub całkowicie ograniczających powstawanie korony białkowej.



Ryc. 2.3. Struktura korony białkowej (wg Rahman i in., 2013; Fleischer i in., 2014; Fornaguer i Solans, 2017; Gräfe i in., 2016; Jedrzejczak-Silicka i Mijowska, 2018, zmodyfikowane)

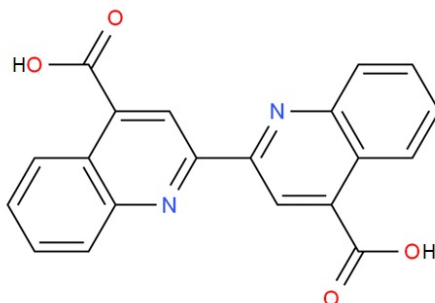
Powierzchnia nanomateriałów poza białkami może też z łatwością adsorbować reagenty (barwniki, szczególnie te zawierające pierścienie aromatyczne) wykorzystane w testach cytotoxyczności oraz wchodzić w interakcje skutkujące redukcją bądź wzrostem absorpcji/emisji fluorescencji.

Poza zmianami nanomateriałów związanymi z adsorpcją różnych związków na ich powierzchni, generującymi docelowo zmiany fizykochemiczne, zmiany te dotyczyć mogą także morfologii tych struktur. Jednym z przykładów jest **biodegradacja** mezoporowatego nanomateriału krzemionkowego $mSiO_2$ poddanego inkubacji z roztworze PBS przez czas 24, 48 i 96 godzin (ryc. 2.4). Jak wykazała analiza TEM, biodegradacja nanomateriału objawiała się wzrastającą porowatością struktury zależną od czasu inkubacji i prowadzącą w efekcie do całkowitej degradacji struktury. Mechanizm biodegradacji nanomateriału krzemionkowego złożony jest z 2 jednocześnie przebiegających procesów – degradacji i redepozycji. Zanotowano także efekt „samoodnowy” (ang. *self-healing*) miejsc degradowanych poprzez wiązania Si–O–Si.



Ryc. 2.4. Analiza mikroskopowa TEM mezoporowatego nanomateriału krzemionkowego $mSiO_2$; próbka kontrolna (A); $miSiO_2$ po 96-godzinnej inkubacji w PBS (B) (wg Mijowska i in., 2015, zmodyfikowane)

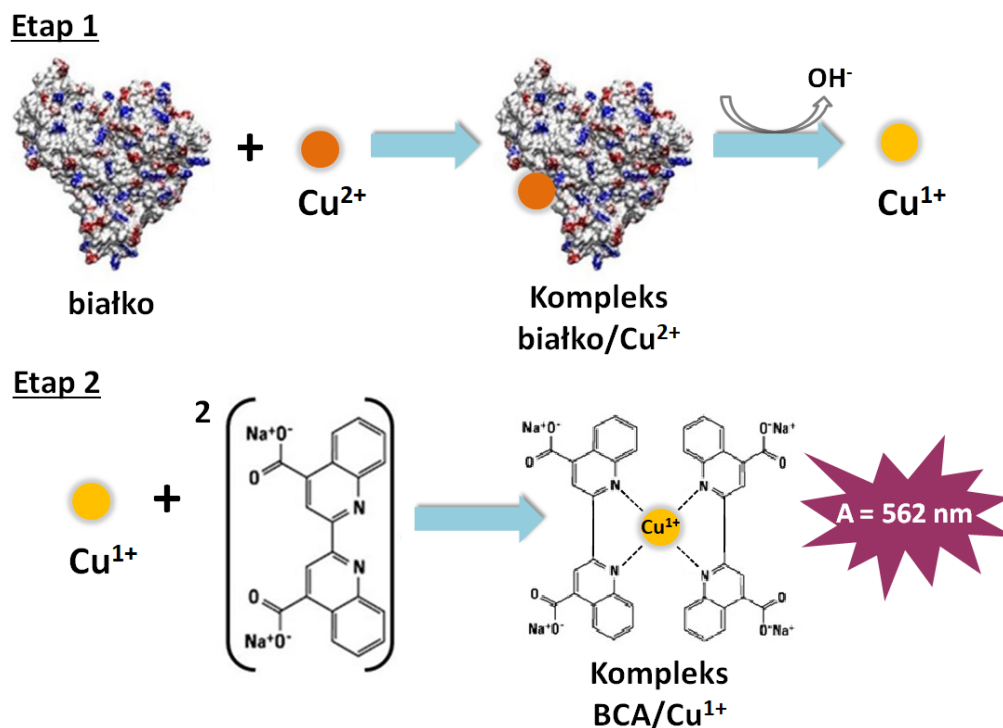
Test BCA (zwany także testem Smitha) jest kolorymetrycznym testem do detekcji i ilościowego oznaczania białka całkowitego, opartym na wykorzystaniu słabego kwasu bicynchoninowego (BCA) składającego się z 2 karboksylowanych pierścieni chinoliny (ryc. 2.5).



Ryc. 2.5. Struktura kwasu bicynchoninowego (BCA)

Metoda ta wykorzystuje dobrze znaną reakcję redukcji Cu^{2+} do Cu^{1+} (reakcja biuretowa) przez białko (ryc. 2.6, etap 1) w środowisku alkalicznym (pH 11,25 w obecności winianu potasu sodu) z wysoce czułą i selektywną detekcją kolorymetryczną kationów miedziawych (Cu^{1+}) przy wykorzystaniu reagentu zawierającego BCA. Intensywnie purpurowy produkt reakcji – kompleks $BCA-Cu^{1+}$ formowany jest w wyniku chelacji 2 cząsteczek BCA z jednym jonem miedziawym (ryc. 2.6, etap 2). Powstający rozpuszczalny w wodzie kompleks wykazuje silną absorpcję przy długości fali 562 nm (odpowiedź liniowa wraz ze wzrostem koncentracji białka w zakresie 20–2000 $\mu g/ml$).

Metoda BCA nie jest w pełni metodą typu „end-point” – zmiana zabarwienia kompleksu nadal przebiega, jednakże dalsza inkubacja zmienia kolor produktu znacznie wolniej. Makromolekularna struktura białek, liczba wiązań białkowych i obecność 4 konkretnych aminokwasów (cysteiny, cystyny, tryptofanu i tyrozyny) odpowiedzialne są za formowanie purpurowego kompleksu z BCA. Badania z wykorzystaniem dwu-, trzy- i czteropeptydów sugeruje, że stopień generacji koloru produktu jest wyższy niż suma poszczególnych kolorów generowanych przez poszczególne grupy funkcyjne. Koncentracja białka określana w teście jest odnoszona do standardów przygotowanych z wykorzystaniem albuminy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*, BSA). Seria rozcieńczeń BSA o znanej koncentracji umożliwia sporządzenie krzywej standardowej i określenie na jej podstawie stężenia białka w próbach nieznanych. Jeśli konieczne jest wysoce specyficzne określenie stężenia białka w badanej próbce, np. immunoglobuliny, zamiast BSA do przygotowania standardów wykorzystać można bydlęcą gammaglobulinę (ang. *bovine gamma-globulin*, BGG).



Ryc. 2.6. Etapy reakcji oznaczania obecności/ilości białka z wykorzystaniem testu BCA (wg Johnson, 2012; Chen i in., 2012; Lewies, 2018, zmodyfikowane)

Procedura testu BCA w wariacie mikropłytkowym (możliwy jest też wariant do odczytu absorbancji w kuwetach pomiarowych, wariant probówkowy) daje możliwość przeprowadzenia reakcji z wykorzystaniem 10–25 μl białka próby badanej przy stosunku próby do roztworu roboczego (ang. *working reagent*, WR) 1 : 8 (v/v). Jednak ze względu na niski stosunek objętości próby badanej do objętości WR wariant mikropłytkowy jest bardziej podatny na działanie substancji interferujących, a przez to może wykazywać obniżoną czułość (dla porównania wariant probówkowy opiera się na stosunku próby do WR na poziomie 1 : 20). Po połączeniu próby badanej/standardów z roztworem WR płytkę poddaje się 30-minutowej inkubacji w temp. 37°C (można także zastosować wyższą temperaturę w przedziale 37–60°C w celu zwiększenia czułości testu), a odczytu dokonuje się przy długości fali 562 nm.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: zestaw sterylnych pipet; sterylne tipsy o poj. 10–100 μl , 20–200 μl ; zestaw do oceny ilości białka Pierce™ BCA Protein Assay Kit; medium pełne hodowlane (DMEM z 10-proc. surowicy); płytka 96-dołkowa; wirówka; czytnik mikropłytek (spektrofotometr).

Nanomateriały

Nanomateriał o określonych stężeniach inkubowany w pełnym medium hodowlanym przez 48 godzin, odwirowany z prędkością 2000 g przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej.

Przebieg doświadczenia

2 grupy ćwiczeniowe

1. Zgodnie z tabelą 2.3 przygotować standardy albuminy (BSA). Rozpuścić zawartość 1 ampułki Albumin Standard (BSA) w podpisanych od A do I sterylnych probówkach (1,5 ml), najlepiej używając tego samego rozpuszczalnika co przy przygotowywaniu prób. Każda ampułka zawiera 1 ml standardu albuminy o stężeniu 2 mg/ml.

Tabela 2.3. Przygotowanie poszczególnych standardów albumin bydlęcych (BSA)

Standard	Objętość rozpuszczalnika [μ l]	Objętość i źródło BSA [μ l]	Końcowa koncentracja BSA [μ g/ml]
A	0	300 z ampułki	2000
B	125	375 z ampułki	1500
C	325	325 z ampułki	1000
D	175	175 ze standardu b	750
E	325	325 ze standardu c	500
F	325	325 ze standardu e	250
G	325	325 ze standardu f	125
H	400	100 ze standardu g	25
I	400	0	0 = tło (blank)

2. Przygotować roztwór roboczy (WR) BCA zgodnie z wytycznymi podanymi poniżej (1):

$$(\# \text{ standardów} + \# \text{ prób}) \times (\# \text{ powtórzeń}) \times (\text{objętość WR na próbę}) = \text{całkowita objętość WR} \quad (1)$$

Na przykład: dla standardów i 3 prób nieznanach po 3 powtórzenia każdy: $(9 \text{ standardów} + 3 \text{ próby}) \times (3 \text{ powtórzenia}) \times (200 \mu\text{l}) = 7,2 \text{ ml}$

- Przygotować roztwór roboczy (WR) poprzez zmieszanie 50 części reagentu A (zestaw BCA) z 1 częścią reagentu B (zestaw BCA), np. zmieszać 50 ml reagentu A z 1 ml reagentu B. Zaraz po dodaniu roztwór może być mętny, ale po zworteksowaniu zmętnienie szybko znika. Przygotowany roztwór jest stabilny przez kilka dni pod warunkiem, że jest przechowywany zamknięty w temperaturze pokojowej.
- Supernatant odrzucić (pozostawić ok. 5 μ l próby) i dodać 20 μ l roztworu PBS.
- Roztwory sonikować przez 30 minut.
- Aby wykluczyć interakcję nanomateriałów ze składnikami testu BCA, przygotować roztwory NP w PSB w wybranych stężeniach. Medium pełne wykorzystać jako kontrolę.
- Rozpipetować 25 μ l każdego standardu i prób badanych (w określonych powtórzeniach) na płytkę 96-dołkową.
- Dodać 200 μ l roztworu WR do każdego dołka i wytrząsać przez 30 sekund.
- Przykryć płytkę i inkubować przez 30 minut w temp. 37°C.
- Po inkubacji płytkę ostudzić do temperatury pokojowej i dokonać odczytu absorpcji przy długości fali 562 nm.

Wyniki

- Po odczycie wyniki zestawić w tabelach 2.4 i 2.5.

Tabela 2.4. Zestawienie wyników standardów w teście BCA

Standard	Stężenie [μ g/ml]	A ₁ [nm]	A ₂ [nm]	A ₃ [nm]	A _{średnia} [nm]	Odchylenie standardowe
A	2000					
B	1500					
C	1000					
D	750					
E	500					
F	250					
G	125					
H	25					
I	0 = tło					

Tabela 2.5. Zestawienie wyników testu BCA

Stężenie NP [μg/ml]	A ₁ [nm]	A ₂ [nm]	A ₃ [nm]	A _{średnia} [nm]	Odchylenie standardowe	Stężenie białka [μg/ml]
Tło 5						
Tło 10						
Tło 25						
Tło 50						
Tło 100						
Kontrola (medium pełne)						
5						
10						
25						
50						
100						

2. Obliczyć średnie dla odczytów. Od standardów odjąć odczyt dla tła (standard I).
3. Przygotować krzywą standardową i na jej podstawie odczytać stężenie białka badanych prób.

Ćwiczenie 2.4

Metody określania internalizacji nanomateriału

Cel

Przygotowanie preparatów do analizy metodą mikroskopii konfokalnej w celu określenia lokalizacji i internalizacji nanomateriałów.

Wprowadzenie

Oddziaływanie nanomateriałów na komórki determinowane jest stopniem ich wnikania (inną drogą oddziaływania nanomateriałów na komórki jest sytuacja, w której nanomateriały tworzą agregaty zbyt duże, by wnikać do komórek, jednak wykazują określony stopień cytotoksyczności). Pobieranie nanomateriałów przez komórki zależy od wielu składowych, do których należą m.in. rodzaj komórek poddanych działaniu czynnika badanego, rodzaj nanomateriału, środowisko (medium hodowlane). Od czynników tych zależy stopień agregacji/aglomeracji materiału, dostępność dla komórek, biodystrybucja. Poza efektywnością pobierania materiału przez komórki istotne są jego wewnątrzkomórkowa lokalizacja i interakcja z komponentami komórkowymi – błoną komórkową, mitochondriami, lizosomami, jądrem komórkowym, one to bowiem mogą wywoływać uszkodzenia membran, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, uszkodzenie DNA prowadzące do zmian w ekspresji genów, nekrozy czy apoptozy.

Nanostruktury są często wymiarami zbliżone do komponentów komórkowych i mogą wnikać do komórek na drodze fagocytozy (w przypadku komórek wyspecjalizowanych), mikropinocytozy czy endocytozy receptorowej. Oprócz aktywnych procesów wnikania nanostruktur do komórek zaobserwować można bierną penetrację błony komórkowej. Zdolność nanostruktur do adhezji do błon komórek, biernej i aktywnej penetracji membran komórkowych oraz **procesu internalizacji** determinowana jest rozmiarami, kształtem, ładunkiem powierzchniowym i reaktywnością powierzchni. Samo środowisko płynów fizjologicznych nie sprzyja procesowi internalizacji ze względu na ich skład i adsorpcje tych składników na powierzchni nanomateriałów (więcej informacji na ten temat zob. ćw. 2.3 *Określenie wiązania składników medium hodowlanego przez materiał testowy*).

Znaczna ilość badań *in vitro* wskazuje, że mechanizm wnikania nanostruktur do komórek może być zależny od ich rozmiaru. Małe nanostruktury o wymiarach poniżej 50 nm, prezentujące ładunek dodatni na powierzchni, łatwiej wnikają do komórek, uszkadzając często błony komórkowe, i wykazują większy potencjał cytotoksyczny. Na przykład nanocząstki złota o promieniu poniżej 50 nm ulegają efektywniejszej internalizacji w porównaniu z nanocząstkami o średnicy 14 i 74 nm. Podobne wyniki uzyskano dla polimerowego azotku węgla (PCN) i nanosfer ditlenku krzemu. Przyczyn tego zjawiska należy poszukiwać w termodynamicznym modelu interakcji nanocząstka–komórka. Zgodnie z tym modelem nanocząsteczki o średnicy mniejszej niż 20 nm są pobierane przez komórki mniej efektywnie ze względu na zbyt niską energię adhezji w stosunku do energii wiązania. W przypadku struktur o średnicy większej niż 60 nm endocytoza występuje stosunkowo rzadko ze względu na niedobory receptorów. Optymalny promień nanocząstek dla procesu endocytozy to zakres 25–30 nm, charakteryzujący się właściwą energią wiązania ligand–receptor oraz możliwością „pokonania” sztywności membrany, która umożliwia tworzenie pęcherzyków endocytarnych. Do czynników warunkujących efektywne wnikanie nanostruktur należy także napięcie błony komórkowej i powierzchniowa koncentracja nanostruktur przylegających do błony. Natomiast cząsteczki mniejsze niż 200 nm podlegają internalizacji poprzez mechanizm endocytozy klatrynozależnej.

Poza procesem internalizacji i jego efektywnością istotna jest lokalizacja i los nanostruktur wewnątrz komórek. Pierwszymi strukturami komórkowymi, do których trafiają nanomateriały, są wczesne pęcherzyki endosomalne (ang. *early endosome*, EE). Wczesne endosomy pełnią funkcję swoistej „sortowni” w szlaku endocytotycznym. Los nanomateriałów w klasycznym szlaku transportu wewnątrzkomórkowego kieruje nanostruktury z powrotem do błony komórkowej, do cystern *trans* aparatu Golgiego lub do lizosomów, gdzie nanostruktury ulegają degradacji. Jednak niekiedy nanomateriały transportowane są do innych struktur komórkowych (spoza ścieżki transportu wewnątrzkomórkowego), np. do jąder komórkowych. Kumulacja nanomateriału w obszarze jądra komórkowego może być skorelowana z procesem uszkodzenia materiału genetycznego.

Najczęściej wykorzystywanymi metodami w analizie internalizacji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji nanomateriałów są mikroskopia elektronowa, mikroskopia fluorescencyjna bądź konfokalna oraz cytometria przepływowa.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: sterylne pipety, sterylne tipsy o poj. 10–100 µl, 100–1000 µl, 1–10 ml; parafilm; PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} o temp. 37°C; sterylne pipetki pasterowskie; 4-proc. (w/v) roztwór paraformaldehydu; roztwór 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI) o stężeniu 5–10 µg/ml lub roztwór jodku propidyny (PI) o stężeniu 5 µg/ml.

Hodowle komórkowe

Linia komórkowa – L929 (ATCC® CCL-1™, USA), linia komórkowa – MCF-7 (ATCC® HTB-22™, USA).

Hodowle na płytce 6-dołkowej, zawierającej jako substrat dla wzrostu komórek nakrywkowe szkiełka mikroskopowe (20 mm × 20 mm), założone poprzez wysianie 3×10^5 komórek/dołek. Po 24 godzinach od wysiania komórki poddano działaniu nanostruktur wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym (np. izotiocyanianem fluoresceiny, FITC) przez czas 48 godzin.

Przebieg doświadczenia

2 grupy ćwiczeniowe

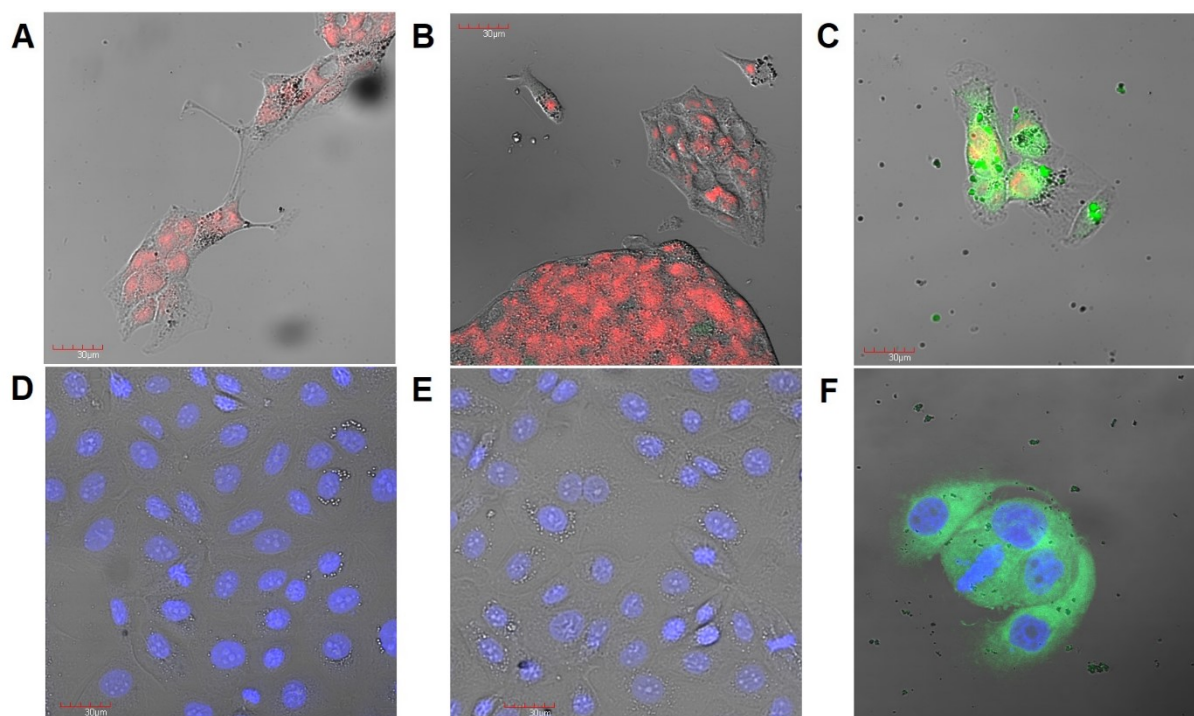
1. Za pomocą pipetek pasterowskich ściągnąć medium hodowlane znad hodowli komórkowych.
2. Komórki przepłukać 3-krotnie roztworem PBS (o temp. 37°C).
3. Hodowle komórkowe pokryć przygotowanym roztworem paraformaldehydu (ok. 2 ml/dołek).

4. Hodowle inkubować w temp. pokojowej (zabezpieczone folią aluminiową) przez 10 minut.
5. Po inkubacji materiał komórkowy przepłukać 3-krotnie roztworem PBS (o temp. 37°C).
6. Szkiełka, na których są hodowle, pokryć przygotowanym roztworem DAPI (lub PI) i inkubować (zabezpieczone folią aluminiową) przez 20 minut w temp. pokojowej.
7. Następnie szkiełka z komórkami przepłukać 3-krotnie roztworem PBS (o temp. 37°C).
8. Komórki na szkiełkach pokryć roztworem PBS (ok. 3 ml/dolek), płytki zamknąć, a brzegi zabezpieczyć parafilmem.
9. Przechowywać w temp. 4°C do czasu analizy mikroskopowej

Wyniki

Na podstawie wyników analizy mikroskopowej ocenić sygnał pochodzący z wyznakowanego nanomateriału, jego lokalizację w komórkach oraz porównać z obrazem hodowli kontrolnych.

Przykładowy obraz komórek poddanych inkubacji z nanostrukturami polimerycznego azotku węgla (ang. *polymeric carbon nitride*, PCN) i heksagonalnego azotu boru (h-BN) przedstawia ryc. 2.7. Widoczny sygnał pochodzi z nanomateriału wyznakowanego FITC w analizowanych hodowlach komórkowych.



Ryc. 2.7. Przykład analizy lokalizacji wyznakowanych FITC nanomateriałów; hodowla kontrolna bez nanomateriału (czerwony sygnał – jodek propidyny pochodzi z jądra komórkowego) (A); hodowla kontrolna po inkubacji z wolnym FITC (B); komórki po inkubacji z nanomateriałem wyznakowanym FITC (C); hodowla kontrolna bez nanomateriału (niebieski sygnał – DAPI pochodzi z jądra komórkowego) (D); hodowla kontrolna po inkubacji z wolnym FITC (E); komórki po inkubacji z nanomateriałem wyznakowanym FITC (F)

Ćwiczenie 2.5

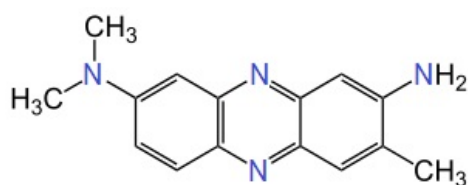
Wykorzystanie testu wychwytu czerwieni obojętnej (NRU) w ocenie materiału testowego

Cel

Poznanie możliwości wykorzystania zdolności żywych komórek do kumulacji barwnika – czerwieni obojętnej w ocenie cytotoksyczności wybranych nanomateriałów.

Wprowadzenie

Test wychwytu czerwieni obojętnej (czerwieni toluekowej, ryc. 2.8) jest relatywnie prostą i niedrogą metodą ilościowej oceny żywotności komórek w odpowiedzi na szerokie spektrum testowanych związków chemicznych z wykorzystaniem hodowli komórkowych. Oryginalnie opracowany przez Borenfreunda i Puernera (1984), jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod w analizach cytotoksyczności związków w badaniach biomedycznych czy środowiskowych (zarówno podstawowych, jak i aplikacyjnych), dając powtarzalne i dokładne wyniki (tab. 2.6).



Ryc. 2.8. Struktura czerwieni toluekowej

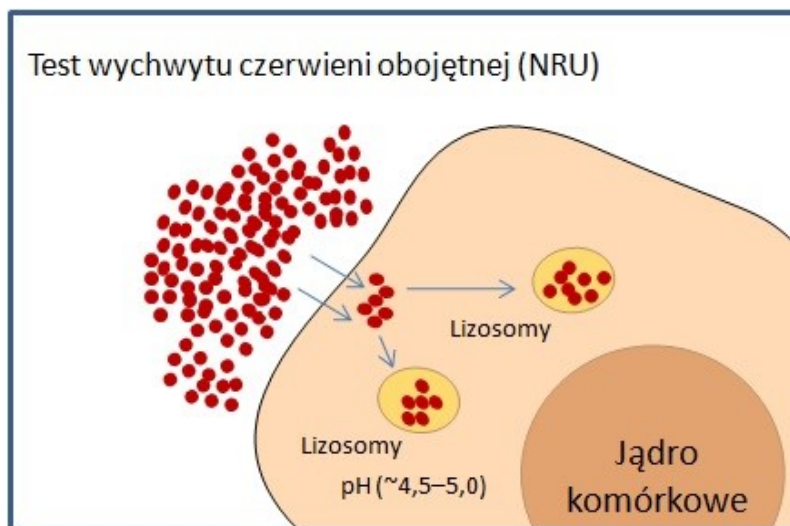
Tabela 2.6. Przykłady wykorzystania testu wychwytu czerwieni obojętnej w wybranych dziedzinach

Medycyna/farmakologia
• Cytopatogenność wirusów i efektywność leczenia. • Szacowanie liczebności populacji limfocytów cytotoksycznych Tc. • Wzrost komórek nowotworowych i efektywności chemioterapii. • Identyfikacja toksyczności organo, tkankowo i komórkowo specyficznej. • Zapobieganie działaniu toksycznemu różnych związków/efektywność leczenia. • Badania cytotoksyczności produktów biotransformacji (procesy toksykacji i detoksykacji). • Badania toksyczności zależnej od temperatury. • Określenie potencjału toksycznego/niebezpieczeństwa badanych substancji. • Ustalenie relacji między strukturą chemiczną a potencjałem toksyczności.
Rolnictwo/ochrona środowiska
• Cytotoksyczność czynników fizycznych, działających pojedynczo lub w kombinacji z czynnikami chemicznymi, np. fitotoksyczność. • Ocena czynników toksycznych w próbkach biologicznych, środowiskowych i produktach biotechnologicznych. • Wyjaśnienie antagonistycznej/synergistycznej interakcji pomiędzy różnymi czynnikami chemicznymi. • Toksyczność związków aktywnych pochodzenia roślinnego (różnice międzygatunkowe).

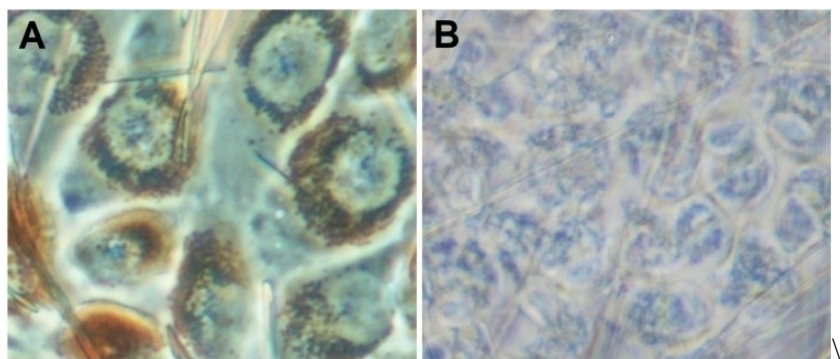
Działanie testu wychwytu czerwieni obojętnej (ang. *neutral red uptake assay*, NRU) wynika ze zdolności żywych komórek do kumulacji tego barwnika. Czerwień obojętna jest słabo kationowym barwnikiem, który penetruje błony komórkowe na drodze niejonowej, pasywnej dyfuzji i kumuluje się w lizosomach (ryc. 2.9). W organellach tych barwnik łączy się za pomocą

elektrostatycznych, hydrofobowych wiązań z anionowymi i/lub grupami fosforanowymi macierzy lizosomalnej. Wychwyt czerwieni obojętnej jest różny dla różnych komórek i zależy od ich zdolności do utrzymywania gradientu pH poprzez produkcję ATP. W pH fizjologicznym barwnik ten wykazuje ładunek bliski zera, co umożliwia penetrację błony komórkowej. We wnętrzu lizosomów gradient protonów utrzymuje pH niższe niż w cytoplazmie, dlatego barwnik wykazując ładunek, pozostaje w lizosomach. Komórki martwe lub o obniżonym gradiencie pH nie są w stanie kumulować barwnika.

Test wychwytu czerwieni obojętnej standardowo przeprowadzany jest z wykorzystaniem hodowli komórek rosnących na 96-dółkowych płytkach. Komórki poddaje się działaniu badanego czynnika przez określony czas (np. 24, 48, 72 godzin), po czym dołki płytki przepłukuje się roztworem PBS w celu wypłukania testowanej substancji. Komórki poddaje się inkubacji z czerwienią obojętną (w stosunku 1 : 10) w medium hodowlanym przez czas (określony eksperymentalnie) 1–4 godzin (ryc. 2.10). Wychwyt czerwieni obojętnej wzrasta wraz z czasem inkubacji z maksymalnym wynikiem w czasie ok. 3,5 godziny. Nie poleca się stosowania barwnika o wyższym niż 10% stężeniu ze względu na cytotoksyczność nawet po godzinnej inkubacji. Wyższe stężenia czerwieni obojętnej wpływają także na zmienność wyników, precypitację barwnika, mogą również utrudniać analizę morfologiczną komórek. Po inkubacji komórki poddaje się płukaniu roztworem PBS.



Ryc. 2.9. Mechanizm testu wychwytu czerwieni obojętnej (NRU)



Ryc. 2.10. Przykład komórek poddanych inkubacji z czerwienią obojętną; komórki żywe (A); komórki martwe (B)

W celu pomiaru (pomiar spektrofotometryczny) ilości pochłoniętego barwnika przez żywe komórki czerwień obojętna musi zostać uwolniona z lizosomów za pomocą środowiska kwaśnego (najczęściej 1-proc. roztworu kwasu octowego w 50-proc. roztworze etanolu). Odczytu spektrofotometrycznego dokonuje się przy długości fali 540–550 nm, a ilość wychwyconego barwnika jest wprost proporcjonalna do liczby żywych, nieuszkodzonych komórek. Im bardziej testowany związek oddziałuje na integralność błon komórkowych, tym niższy jest odczyt absorbancji w stosunku do hodowli kontrolnej.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: sterylna pipeta wielokanałowa; sterylne tipsy o poj. 20–200 µl; PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} (o temp. 37°C); roztwór czerwieni obojętnej (1 : 10 w DMEM z 10-proc. v/v surowicy, o temp. 37°C); roztwór 1-proc. kwasu octowego w 50-proc. etanolu; czynnik mikropłytek (spektrofotometr).

Hodowle komórkowe

Linia komórkowa – L929 (ATCC® CCL-1™, USA), ciągła linia prawidłowych mysich fibroblastów (komórek tkanki łącznej).

Hodowla na płytce 96-dołkowej przed testem została założona poprzez wysianie 5×10^3 komórek/dołek. Po 24 godzinach od wysiania komórki poddano działaniu nanocząstek przez czas 48 godzin.

Przebieg doświadczenia

2 grupy ćwiczeniowe

1. Medium hodowlane wraz z materiałem testowym należy zebrać znad komórek.
2. Hodowle przepłukać dwukrotnie roztworem PBS (z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} o temp. 37°C).
3. Do hodowli dodać 150 µl roztworu czerwieni obojętnej (10-proc. NR w pełnym medium hodowlanym o temp. 37°C, przefiltrowany).
4. Inkubować 2–3 godziny (w inkubatorze – temp. 37°C, 5% CO_2 , wilgotność 95%).
5. Medium z barwnikiem ostrożnie ściągnąć znad komórek.
6. Hodowle przepłukać za pomocą PBS (z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} o temp. 37°C).
7. Związaną w komórkach czerwień obojętną uwalniać poprzez dodanie do każdego dołka 150 µl roztworu 1-proc. kwasu octowego w 50-proc. etanolu.
8. Wytrząsać przez 10 minut.
9. Dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm (przy długości fali referencyjnej 690 nm).

Wyniki

1. Po odczycie wyniki zestawić w tabeli 2.7.
2. Obliczyć średnie wartości odczytanych absorbancji dla każdego ze stężeń oraz odchylenia standardowe.
3. Korzystając ze wzoru (2), obliczyć, jaki procent wartości uzyskanej dla komórek w próbie kontrolnej (100%) stanowią wyliczone średnie wartości absorbancji dla każdego z testowanych stężeń.
4. Korzystając ze wzoru (3), obliczyć odchylenie standardowe z % wzrostu komórek dla każdego z testowanych stężeń.
5. Na podstawie uzyskanych danych przygotować wykres zależności wzrostu komórek od logarytmu stężenia badanego nanomateriału. Wyznaczyć linię trendu i podać jej równanie. Na podstawie równania obliczyć EC_{50} .
6. Dokonać interpretacji wyników.

Tabela 2.7. Zestawienie wyników testu NRU

Stężenie [μg/ml]	A ₁ [nm]	A ₂ [nm]	A ₃ [nm]	A _{średnia} [nm]	Odchylenie standardowe	% kontroli	Odchylenie standardowe z % wzrostu komórek
Tło							
Kontrola						100	
5							
10							
25							
50							
100							

$$\text{Żywotność komórek (\%)} = \frac{A_{540 \text{ nm dla komórek testowanych}} - A_{540 \text{ nm dla tła}}}{A_{540 \text{ nm dla kontroli}} - A_{540 \text{ nm dla tła}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Odchylenie standardowe z \% wzrostu komórek} = \frac{(\text{Odchylenie standardowe} \times 100)}{A_{\text{średnia}}} \quad (3)$$

gdzie: A – absorbancja.

Ćwiczenie 2.6

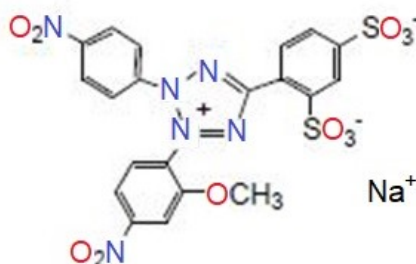
Wykorzystanie testu aktywności metabolicznej komórek (CCK-8) w ocenie materiału testowego

Cel

Analiza poziomu żywotności komórek na podstawie aktywności dehydrogenazy w ocenie cytotoksyczności wybranych nanomateriałów.

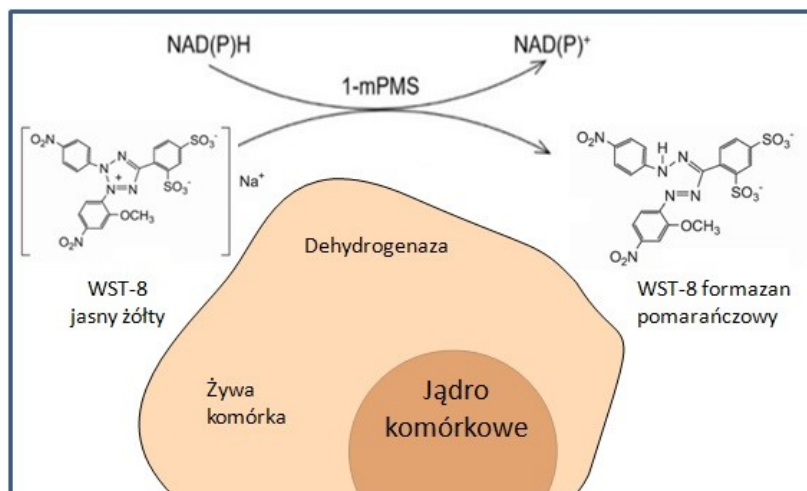
Wprowadzenie

CCK-8 (ang. *cell counting kit*) jest czułym testem kolorymetrycznym umożliwiającym określenie żywotności komórek dzięki wykorzystaniu łatwo rozpuszczalnej w środowisku wodnym soli WST-8 [sól sodowa – (2-2-metoksy-4-nitrofenylu)-5-(2,4-disulfofenylu)-2H tetrazoliny] (numer patentowy WO97/38985), która ulegając redukcji (w obecności nośników elektronów), daje rozpuszczalny w wodzie barwnik formazan (ryc. 2.11).

**Ryc. 2.11.** Struktura soli WST-8

WST (ang. *water-soluble tetrazolium salts*) to wysoce stabilne i rozpuszczalne w wodzie sole tetrazolowe, opracowane jako alternatywa dla testu MTT, dające produkt w postaci rozpuszczalnych w środowisku wodnym formazanów o różnych widmach absorpcji. WST-1, a w szczególności WST-8, ulega redukcji poza komórkami w obecności 1-metoksy PMS (qng. *1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate*) – nośnika elektronów, dając rozpuszczalny w wodzie żółty

formazan. Możliwością redukcji soli WST-8 charakteryzują się jedynie komórki żywe, które wykazują aktywność enzymu – dehydrogenazy cytoplazmatycznej (ryc. 2.12). Redukcja jasnożółtego WST-8 do pomarańczowego formazanu rozpuszczalnego w medium hodowlanym jest wynikiem aktywności dehydrogenaz. Ilość wytworzonego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek w analizowanej hodowli komórkowej.



Ryc. 2.12. Ocena żywotności komórek za pomocą testu CCK-8

Ze względu na to, że powstający produkt jest rozpuszczalny w wodzie i jego gromadzenie nie wywołuje efektu cytotoksycznego (w teście MTT powstający nierozpuszczalny formazan, kumulujący się w komórkach uszkadza je), test na bazie soli WST-8 można wykorzystać nie tylko do określenia cytotoksyczności badanych związków, ale również proliferacji komórek (czas inkubacji 1–4 godziny, dobrany eksperymentalnie). Kolejną zaletą testu CCK-8 jest jego wyższa czułość niż innych soli tetrazoliowych (MTT, XTT, MTS czy WST-1). Co więcej, testy z grupy WST mogą być odczytywane bezpośrednio po inkubacji (w odróżnieniu od testu MTT, gdzie produkt, którym są kryształy formazanu, wymaga rozpuszczenia w DMSO przed pomiarem absorbancji).

Doświadczenie z wykorzystaniem testu CCK-8 jest łatwe w wykonaniu. Test z użyciem soli WST-8 standardowo przeprowadza się z wykorzystaniem hodowli komórek rosnących na 96-dołkowych płytkach. Komórki poddaje się działaniu badanego nanomateriału przez określony czas (np. 24, 48, 72 godzin). Następnie Cell Counting Kit-8, dostępny w postaci gotowego do użycia roztworu, dodaje się bezpośrednio do medium w ilości 1 : 10 v/v (w zależności od objętości płynu hodowlanego w studzienkach 96-dołkowej płytki). Płytkę inkubuje się w standardowych warunkach hodowli (temp. 37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%), po czym dokonuje pomiaru spektrofotometrycznego dla długości fali 450 nm.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: sterylna pipeta; sterylne tipsy o poj. 10–100 µl; odczynniki CCK-8 (o temp. pokojowej); czytnik mikropłytek (spektrofotometr).

Hodowle komórkowe

Linia komórkowa – L929 (ATCC® CCL-1™, USA), ciągła linia prawidłowych mysich fibroblastów (komórek tkanki łącznej).

Hodowla na płycie 96-dołkowej przed testem została założona poprzez wysianie 5×10^3 komórek/dołek. Po 24 godzinach od wysiania komórki poddano działaniu nanomateriału przez czas 48 godzin.

Przebieg doświadczenia*2 grupy ćwiczeniowe*

1. Przygotować roztwór CCK-8 – rozmrozić w temp. pokojowej (ok. 30 minut lub 5 minut w łaźni wodnej w temp. 37°C).
2. Do medium hodowlanego (100 µl) prowadzonych hodowli, kontroli oraz tła dodać 10 µl roztworu CCK-8 (uważać, by nie utworzyć bąbli, które będą wpływały na wartości odczytu).
3. Inkubować 1–4 godziny (w inkubatorze – temp. 37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%).
4. Dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 540 nm (przy długości fali referencyjnej 650 nm).

Wyniki

1. Po odczycie wyniki zestawić w tabeli 2.8.
2. Obliczyć średnie wartości odczytanych absorbancji dla każdego ze stężeń oraz odchylenia standardowe.
3. Korzystając ze wzoru (4), obliczyć, jaki procent wartości uzyskanej dla komórek w próbie kontrolnej (100%) stanowią wyliczone średnie wartości absorbancji dla każdego z testowanych stężeń.
4. Korzystając ze wzoru (5), obliczyć odchylenie standardowe z procentem wzrostu komórek dla każdego z testowanych stężeń.
5. Na podstawie uzyskanych danych przygotować wykres zależności wzrostu komórek od logarytmu stężenia badanego nanomateriału. Wyznaczyć linię trendu i podać jej równanie. Na podstawie równania obliczyć EC₅₀.
6. Dokonać interpretacji wyników.

Tabela 2.8. Zestawienie wyników testu CCK-8

Stężenie [µg/ml]	A1 [nm]	A2 [nm]	A3 [nm]	Aśrednia [nm]	Odchylenie standardowe	% kontroli	Odchylenie standardowe z % wzrostu komórek
Tło							
Kontrola							
5							
10							
25							
50							
100							

$$\text{Względna żywotność (\%)} = \frac{A_{450-650 \text{ nm}} \text{ dla komórek testowanych}}{A_{450-650 \text{ nm}} \text{ dla kontroli}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Odchylenie standardowe z \% wzrostu komórek} = \frac{(\text{Odchylenie standardowe} \times 100)}{A_{\text{średnia}}} \quad (5)$$

gdzie: A – absorbancja.

Ćwiczenie 2.7

Ocena wpływu nanomateriału na integralność materiału jądrowego komórek

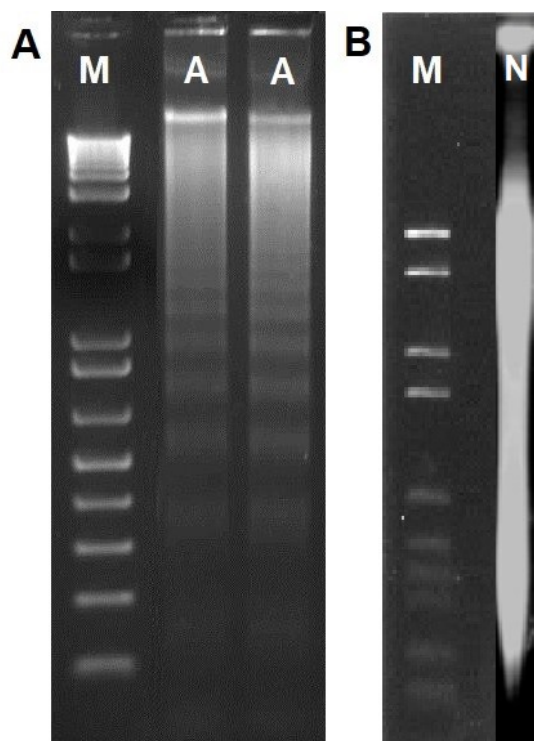
Cel

Określenie działania apoptotycznego testowanych nanomateriałów dzięki ocenie integralności genomowego DNA.

Wprowadzenie

Fragmentacja genomowego DNA (chromatyny) jest jedną z charakterystycznych, naturalnych biochemicznych oznak apoptozy (programowanej śmierci komórki). W trakcie **apoptozy** DNA internukleosomalne łączące poszczególne nukleosomy podlegają cięciu, generując w efekcie wysokocząsteczkowe (> 50 kbp) fragmenty DNA o długości 180–200 pzb lub fragmenty odpowiadające ich wielokrotności, np. 360, 540 pzb. Proces fragmentacji DNA przebiega w wyniku aktywności specyficznej endonukleazy CAD (ang. *caspase-activated DNase*, CAD). Naturalnie CAD podlega inhibicji przez białko ICAD (ang. *inhibitor of caspase activated DNase*), jednak wraz z uruchomieniem procesu apoptozy kaspaza efektorowa – kaspaza 3 powoduje rozpad kompleksu CAD-ICAD, czyli aktywację endonukleazy CAD i cięcie DNA na fragmenty (pojawienie się w rozdziale elektroforetycznym specyficznej „drabinki” DNA, ryc. 2.13A). W odróżnieniu od apoptozy fragmentacja genomowego DNA w procesie **nekrozy** jest losowa i w rozdziale elektroforetycznym widoczna jest w postaci smugi (smear DNA, ryc. 2.13B).

Jedną z klasycznych metod identyfikacji fragmentacji genomowego DNA jest elektroforeza agarozowa. Jest prostą metodą półilościową, która daje wiarygodne wyniki. Fragmentację genomowego DNA można przeanalizować również, wykorzystując metodę TUNEL i detekcję za pomocą cytometru przepływowego lub mikroskopu.



Ryc. 2.13. Rozdział genomowego DNA komórek linii Jurkat poddanych działaniu kamptotecyny; apoptotyczna fragmentacja DNA (studzienki A) (Abcam) (A); nekrotyczna degradacja DNA (studzienka N) (B); studzienki M – drabinki DNA (wg Zhivotosky i Samali, 1999; Zhivotosky i Orrenius, 2001, zmodyfikowane)

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: zestaw sterylnych pipet; sterylne tipsy o poj. 10–100 µl, 20–200 µl; sterylne probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml; sterylne probówki wirówkowe o poj. 15 ml; PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (o temp. 37°C); sterylne pipetki pasterowskie; sterylne skrobaki do hodowli komórkowych; zestaw do izolacji genomowego DNA (Genomic Mini, A&A Biotechnology); agarozę; bufor TBE (1 szt.); 1-procentowy bromek etydyny (v/v) (EtBr); termoblok; zestaw do elektroforezy horyzontalnej; transiluminator.

Hodowle komórkowe

Linia komórkowa – L929 (ATCC® CCL-1™, USA), ciągła linia prawidłowych mysich fibroblastów (komórek tkanki łącznej).

Hodowla na płytce 6-dółkowej przed testem została założona poprzez wysianie 3×10^5 komórek/dółek. Po 24 godzinach od wysiania komórki poddano działaniu nanocząstek w stężeniu 5, 10, 25, 50 i 100 µg/ml przez 48 godzin. Komórki z kontroli negatywnej nie zostały poddane działaniu nanocząstek, natomiast komórki z kontroli pozytywnej poddano działaniu czynnika wywołującego apoptozę (np. etopozydu, staurosporyny, kamptotecyny).

Przebieg doświadczenia

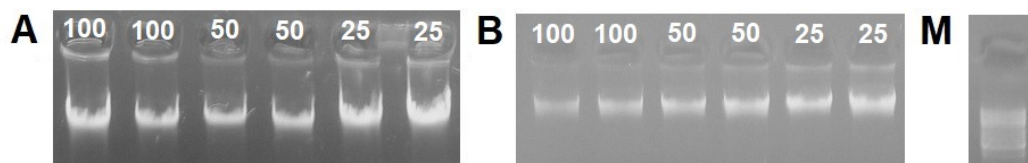
2 grupy ćwiczeniowe

1. Za pomocą pipetek pasterowskich ściągnąć medium hodowlane z dna hodowli komórkowych.
2. Komórki przepłukać 3-krotnie roztworem PBS (o temp. 37°C).
3. Do hodowli dodać 3 ml PBS, po czym za pomocą silikonowych skrobaczek ściągnąć materiał komórkowy z powierzchni naczynia hodowlanego.
4. Materiał komórkowy przenieść do probówek wirówkowych o poj. 15 ml i wirować przez 5 minut przy 1500 obrotów/minutę w temp. 22°C.
5. Ściągnąć supernatant, pozostawiając osad komórkowy na dnie probówki.
6. Osad zawiesić w 100 µl buforu Tris i przenieść do probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 ml.
7. Dodać 200 µl uniwersalnego buforu lizującego LT oraz 20 µl roztworu proteiny K.
8. Całość wymieszać i inkubować przez 20 minut w temp. 37°C.
9. Przenieść próbkę do termobloku o temp. 75°C i inkubować przez 5 minut.
10. Próbkę intensywnie worteksować przez 20 sekund.
11. Wirować przez 3 minuty przy 10–15 tys. obrotów/minutę.
12. Pobrać supernatant i nanieść na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA.
13. Wirować przez 1 minutę przy 10–15 tys. obrotów/minutę.
14. Następnie do kolumny dodać 500 µl roztworu płuczącego A1.
15. Wirować przez 1 min przy 10–15 tys. obrotów/minutę.
16. Przenieść minikolumnę do nowej probówki o poj. 2 ml i dodać 400 µl roztworu płuczącego A1.
17. Wirować przez 2 minuty przy 10–15 tys. obrotów/minutę.
18. Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej probówce o poj. 1,5 ml i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodać 200 µl buforu Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) uprzednio ogrzanego do temp. 75°C.
19. Inkubować próbkę przez 5 minut w temp. pokojowej.
20. Wirować przez 1 minutę przy 10–15 tys. obrotów/minutę.
21. Minikolumnę usunąć, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przetrzymywać w lodówce do czasu dalszych analiz.
22. Przygotować 1,8–2,0-proc. żel agarozowy (na objętość 50 ml).
23. Przygotować bufor obciążający (roztwór błękitu bromofenolowego, glicerolu, EDTA, wody) w ilości 3 µl na każdą rozdzielaną próbę DNA (5 µl).
24. Rozdział elektroforetyczny prowadzić przez 30–60 minut.
25. Odczytać wynik rozdziału elektroforetycznego w świetle UV przy długości fali 312 nm za pomocą transiluminatora (dokonać dokumentacji fotograficznej).

Wyniki

Na podstawie wyniku rozdziału elektroforetycznego przeanalizować integralność izolatu genomowego DNA pochodzącego z hodowli kontrolnych oraz hodowli poddanych działaniu nanomateriału w stężeniach – 5, 10, 25, 50 i 100 µg/ml.

Przykładowy rozdział izolatów DNA komórek poddanych inkubacji z nanocząstkami przedstawiono na ryc. 2.14. Widoczny wysokocząsteczkowy izolat DNA wskazuje na brak zjawiska apoptozy w analizowanych hodowlach komórkowych.



Ryc. 2.14. Rozdział genomowego DNA komórek linii L929 (A) i MCF-7 (B) poddanych inkubacji z GO-Fe₃O₄ (stężenie w µg/ml podano powyżej studzienek); marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific) (M)

Piśmiennictwo

- Aleksandrak M., Jędrzejczak-Silicka M., Sielicki K., Piotrowska K., Mijowska E. 2019. Size-dependent *in vitro* biocompatibility and uptake process of polymeric carbon nitride. *ACS Applied Materials and Interfaces* 11 (51), 47739–47749.
- Borenfreund E., Puerner J.A. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 9 (1), 7–9.
- Borenfreund E., Puerner J.A. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24 (2-3), 119–124.
- Brzuzan P., Woźny M., Łuczyński M.K. 2007. Genotoksyczność. W: *Toksykologia molekularna*. Red. P. Brzuzan, M. Woźny, M.K. Łuczyński. Olsztyn: Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, s. 6–15.
- Chen L., Yu Z., Lee Y., Wang X., Zhao B., Jung Y.M. 2012. Quantitative evaluation of proteins with bicinchoninic acid (BCA): resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman scattering-based methods. *Analyst* 137, 5834–5838.
- Chithrani B.D., Ghazani A.A., Chan W.C. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* 6 (4), 662–668.
- Chmielewski M., Linke K., Zabel M. 2008. Metody wykrywania zjawiska apoptozy w komórkach wątrobowych *in situ*. *Nowiny Lekarskie* 77 (3), 223–226.
- Czarniewska E., Mrówczyńska L., Jędrzejczak-Silicka M., Nowicki P., Trukawka M., Mijowska E. 2019. Non-cytotoxic hydroxyl – functionalized exfoliated boron nitride nanoflakes impair the immunological function of insect haemocytes *in vivo*. *Scientific Reports* 9 (1), 14027.
- Fleischer C.C., Payne C.K. 2014. Nanoparticle-cell interactions: Molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Accounts of Chemical Research* 47 (8), 2651–2659.
- Florek J., Caillard R., Kleitz F. 2017. Evaluation of mesoporous silica nanoparticles for oral drug delivery – current status and perspective of MSNs drug carriers. *Nanoscale* 9, 15252–15277.
- Fornaguer C., Solans C. 2017. Methods for the *in vitro* characterization of nanomedicines – Biological component interaction. *Journal of Personalized Medicine* 7 (1), 1–16.
- Gao H., Shi W., Freund L.B. 2005. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (27), 9469–9474.
- Gliński Z., Majer-Dziedzic B. 2017. Nanobiomateriały w medycynie i weterynarii. *Życie Weterynaryjne* 92 (3), 163–166.
- Gräfe C., Weidner A., Lühse B.C., Schacher F.H., Clement J.H., Dutz S. 2016. Intentional formation of a protein corona on nanoparticles: Serum concentration affects protein corona mass, surface charge,

- and nanoparticle-cell interaction. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 75, 196–202.
- ISO/TS 27687:2008. *Nanotechnologies – Terminology and definitions for nanoobjects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*.
- Jachimska B., Tokarczyka K., Łapczyńska M., Puciul-Malinowska A., Zapotoczny S. 2016. Structure of bovine serum albumin adsorbed on silica investigated by quartz crystal microbalance. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 489, 163–172.
- Jankowska E., Łukaszewska J., Zatorski W. 2013. *Ocena narażenia zawodowego na nanoobiekty. Zalecenia*. Warszawa: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, s. 5–35.
- Jedrzejczak-Silicka M. 2017. Cytotoxicity and genotoxicity of GO-Fe₃O₄ hybrid in cultured mammalian cells. *Polish Journal of Chemical Technology* 19 (1), 27–33.
- Jedrzejczak-Silicka M., Mijowska E. 2018. *General cytotoxicity and its application in nanomaterial analysis*. W: *Cytotoxicity*. Red. T.A. Çelik. London: IntechOpen, s. 177–207.
- de Jesus M.B., Kapila Y.L. 2014. *Cellular mechanisms in nanomaterial internalization, intracellular trafficking, and toxicity*. W: *Nanotoxicology. Nanomedicine and nanotoxicology*. Red. N. Durán, S. Guterres, O. Alves. New York: Springer, s. 201–227.
- Jiang W., Kim B. Y., Rutka J. T., Chan W. C. 2008. Nanoparticle mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology* 3 (3), 145–150.
- Johnson M. 2012. Protein quantitation. *Materials and Methods* 2, 115.
- Jurewicz M. 2014. Kontrowersje wokół definicji nanomateriału w ujęciu prawa Unii Europejskiej. *Chemik* 68 (12), 1090–1095.
- Krawczykowski D. 2017. Zastosowanie dyfrakcyjnej analizy laserowej do kontroli uziarnienia produktów przeróbki rud metali. *Inżynieria Mineralna* 18 (1), 233–240.
- Lewies A. 2018. *An in vitro evaluation of the antibacterial and anticancer properties of the antimicrobial peptide nisin Z*. Praca doktorska. Potchefstroom: Uniwersytet Bophuthatswana.
- Li S., Mulloor J.L., Wnag L., Ji Y., Mullor C.J., Micic M., Orbulescu J., Leblanc R.M. 2014. Strong and selective adsorption of lysozyme on graphene oxide. *ACS Applied Materials and Interfaces* 6, 5704–5712.
- Mahmoudi M., Lynch L., Ejtehadi M.R., Monopoli M.P., Bombell F.B., Laurent S. 2011. Protein nanoparticle interactions: Opportunities and challenges. *Chemical Reviews* 111 (9), 5610–5637.
- Malinowska I. 2004. Rola apoptozy w patogenezie i leczeniu nowotworów układu hematopoetycznego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 58, 548–559.
- Masato E., Hideki S., Hideki Y., Katsuya O., Akihiro I., Shigekazu N. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662), 43–50.
- Mijowska E., Cendrowski K., Brylak M., Konicki W. 2015. Sandwich-like mesoporous silica flakes for anticancer drug transport-synthesis, characterization and kinetics release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136, 119–125.
- Moore T.L., Urban D.A., Rodriguez-Lorenzo L., Milosevic A., Crippa F., Spuch-Calvar M., Balog S., Rothen-Rutishauser B., Lattuada M., Petri-Fink A. 2019. Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction. *Scientific Reports* 9 (1), 1–9.
- Nagata S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 256 (1), 12–18.
- Paduch R. 2019. *Metody określania wzrostu komórek*. W: *Praktikum z hodowli komórek i tkanek*. Red. R. Paduch, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, s. 71–78.
- Peruzynska M., Cendrowski K., Barylak M., Roginska D., Tarnowski M., Tkacz M., Kurzawski M., Machalinski B., Mijowska E., Drozdziak M. 2015. Study on size effect of the silica nanospheres with solid core and mesoporous shell on cellular uptake. *Biomedical Materials* 10 (6), 065012.
- Pulit J., Banach M., Kowalski Z. 2011. Czy wygląd ma znaczenie? Charakterystyka nanosrebra w zależności od kształtu jego cząsteczki. *Chemik* 65 (5), 445–456.

- Rahman M., Laurent S., Tawil N., Yahia L., Mahmoudi M. 2013. *Nanoparticle and protein corona*. W: *Protein-Nanoparticle Interactions. The Bio-Nano Interface*. Red. M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, M. Mahmoudi. Berlin: Springer, s. 21–44.
- Repetto G., del Peso A., Zurita J.L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 3 (7), 1125–1131.
- Runowski M. 2014. Nanotechnologia – nanomateriały, nanocząstki i wielofunkcyjne nanostruktury typu rdzeń/powłoka. *Chemik* 68 (9), 766–775.
- Ruszała G. 2015. *Wstępne badania genotoksyczności nanokompozytu GO-Fe₃O₄ na przykładzie ssaczych linii komórkowych*. Praca magisterska. Szczecin. Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny.
- Schrand A.M., Johnson J., Dai L., Hussain S.M., Schlager J.J., Zhu L., Hong Y., Ōsawa E. 2009. *Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanomaterials*. W: *Safety of Nanoparticles, nanostructure science and technology*. Red. T.J. Webster. New York: Springer, 159–187.
- Shahbazi M.A., Herranz B., Santos H.A. 2012. Nanostructured porous Si-based nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomatter* 2 (4), 296–312.
- Sohaebuddin S. K., Thevenot P.T., Baker D., Eaton J.W., Tang L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology* 7 (22), 1–17.
- Treuel L., Jiang X., Nienhaus G.U. 2013. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society Interface* 10 (82), 20120939.
- Urbas K., Jędrzejczak-Silicka M., Rakoczy R., Zaborski D., Mijowska E. 2016. Effect of GO-Fe₃O₄ and rotating magnetic field on cellular metabolic activity of mammalian cells. *Journal of Biomaterials Applications* 30 (9), 1392–1406.
- Wang S.H., Lee C.W., Chiou A., Wei P.K. 2010. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of Nanobiotechnology* 8 (1), 1–13.
- Yamamoto K., Fujimoto T., Grulke E.A. 2016. Primary particle size distribution measurement of aggregated nanoparticles. *16th European Microscopy Congress, Proceedings*, 63–64.
- Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S. 2009. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials* 21, 419–424.
- Zhang Y., Wu C., Guo S., Zhang J. 2013. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. *Nanotechnology Reviews* 2 (1), 27–45.
- Zhivotosky B., Orrenius S. 2001. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Current Protocols in Cell Biology* 12 (1), 18.3.1–18.3.23.
- Zhivotosky B., Samali A. 1999. Orrenius S. Determination of apoptosis and necrosis. *Current Protocols in Toxicology* 00 (1), 2.2.1–2.2.34.

3. NANOCZĄSTKI ALBUMINY

Wojciech Ignaczak, Piotr Sobolewski

Nanomedycyna to interdyscyplinarna gałąź nauki, która wykorzystuje wszelkie zalety i możliwości szeroko pojętej nanotechnologii. Jednym z głównych zastosowań nanotechnologii w medycynie są nanometryczne **nośniki leków** (Kim i in., 2010; Niemirowicz i Car, 2012), najczęściej w formie **nanocząstek** (ang. *nanoparticle*). Układy te wiążą leki (lub geny, środki obrazujące itp.) w swoich rdzeniach lub na powierzchni. W ten sposób jako **koloidy** w roztworach wodnych (np. sól fizjologiczna) umożliwiają bardziej efektywne dawkowanie związków hydrofobowych, które się słabo rozpuszczają w wodzie oraz mają wpływ na biodystrybucję leku. Zależnie od oddziaływań lek–nośnik układy te pozwalają na kontrolę procesu uwalniania leku (ang. *controlled release*) np. poprzez dyfuzję leku lub degradację nośnika. Dodatkowo dzięki modyfikacji powierzchni nośnika i wprowadzeniu specyficznych biomolekuł naprowadzających (np. przeciwciała) można umożliwić tzw. **terapię celowaną** (ang. *targeted therapy*). Podsumowując, nanometryczne nośniki leków mają ogromny potencjał jako **systemy dostarczania leków** (ang. *drug delivery systems*), a coraz więcej tego typu układów jest dopuszczonych do stosowania w praktyce klinicznej (Anselmo i Mitragotri, 2016, 2019).

W literaturze przedstawionych jest wiele rodzajów nanonośników, tj.:

- micelle;
- nanorurki węglowe;
- dendrymery;
- liposomy;
- nośniki polimerowe.

Wyjątkowo dużym zainteresowaniem cieszą się te ostatnie. Nośniki polimerowe zasadniczo możemy podzielić na te pochodzenia naturalnego, tzw. **biopolimery** (np. polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe), oraz syntetyczne. **Białka**, a wśród nich **albumina osocza** (ang. *serum albumin*), ze względu na swą naturalną funkcję transportu hydrofobowych substancji we krwi (np. hormonów, kwasów tłuszczowych itp.) są bardzo obiecujące jako nośniki leków (Elzoghby i in., 2012; Konopska i in., 2018). Cechują je nanometryczne rozmiary, biogodność, dostępność oraz naturalne pochodzenie. Istotny jest również amfifilowy charakter białek, który powoduje, że są doskonałym materiałem do tworzenia nanocząstek, ponieważ pozwala na jednoczesną interakcję z organiczną substancją (np. lekiem) oraz środowiskiem wodnym (np. płynami ustrojowymi, płynami fizjologicznymi). Białka posiadają również reaktywne grupy funkcyjne (tj. tiolowe, aminowe, karboksylowe), co pozwala na ich prostą modyfikację z wykorzystaniem standardowej preparatyki chemicznej.

Albumina osocza jest białkiem globularnym rozpuszczalnym w wodzie. Jest głównym białkowym składnikiem osocza krwi (60%), wytwarzanym przez komórki wątrobowe. Główne właściwości albuminy osocza pozwalające traktować ją jako potencjalny nośnik substancji leczniczych to (Irache i Espuelas, 2007):

- biostabilność;
- biodegradowalność;
- kontrolowalna chemia powierzchni;
- średnica cząstek ~7 nm;
- masa cząsteczkową ~66 kDa;
- stabilność w szerokim zakresie pH 4–9.

Albumina pochodzenia zwierzęcego, bydlęca (ang. *bovine serum albumin*, BSA), ma sekwencję aminokwasową podobną do albuminy pochodzącej od człowieka (ang. *human serum albumin*, HSA). Obok wielu zastosowań już od ponad 10 lat (od 2005 r. w USA; od 2008 r. w UE) nanocząstki albuminy są dopuszczone do zastosowania klinicznego jako nośnik hydrofobowego leku antynowotworowego paklitakselu, występującego pod nazwą handlową Abraxane (Anselmo i Mitragotri 2016; Konopska i in. 2018).

Ćwiczenie 3.1

Otrzymywanie nanocząstek albuminy metodą nanostrącania

Cel

1. Zapoznanie z metodą nanostrącania i otrzymanie nanocząstek białka.
2. Zbadanie wpływu różnych roztworów strącających lub innych wybranych parametrów procesu, takich jak stosunek objętościowy środka strącającego do roztworu białka, wpływ stabilizacji itp.

Wprowadzenie

Najczęściej stosowaną metodą otrzymywania nanocząstek polimerowych, w tym z białek takich jak albumina osocza, jest **nanostrącanie** (ang. *nanoprecipitation* lub *desolvation*) (Martínez Rivas i in., 2017). Jest to stosunkowo prosty proces porównywalny do emulgowania, którym można wytworzyć nanocząstki o małych rozmiarach, pożądanych w zastosowaniach medycznych. Metoda ta zasadniczo polega na zmieszaniu roztworu polimeru z rozpuszczalnikiem – środkiem strącającym, w którym polimer się nie rozpuszcza. Jednak wyjątkowo istotne jest to, żeby oba rozpuszczalniki (ten, w którym rozpuszczony jest polimer, oraz ten, który stanowi środek strącający) były ze sobą mieszalne.

Najbardziej istotnymi parametrami wpływającymi na powodzenie metody są (Martínez Rivas i in., 2017):

- rodzaj dodanego środka strącającego – jego mieszalność z roztworem polimeru;
- stosunek objętościowy środka strącającego do roztworu polimeru;
- stężenie roztworu polimeru;
- szybkość wkraplania, szybkość mieszania;
- dodatek środków powierzchniowo czynnych.

W przypadku nanocząstek albuminy osocza (Irache i Espuelas, 2007) białko jest rozpuszczane w roztworze wodnym, a środkiem strącającym może być np. alkohol, aceton lub mieszanina rozpuszczalników. Ze względu na docelowe zastosowanie otrzymanych cząstek w środowisku wodnym, w którym albumina osocza bardzo dobrze się rozpuszcza, istotny jest etap stabilizacji, mający zapobiec rozpuszczeniu się powstałych nanocząstek. W tym celu dodaje się środek sieciujący bądź stabilizuje się je termicznie w warunkach ciągłego mieszania. Następnie powstałe nanocząstki poddaje się wirowaniu lub odparowaniu, w celu ich oczyszczenia z pozostałości środka strącającego lub niestrąconej albuminy.

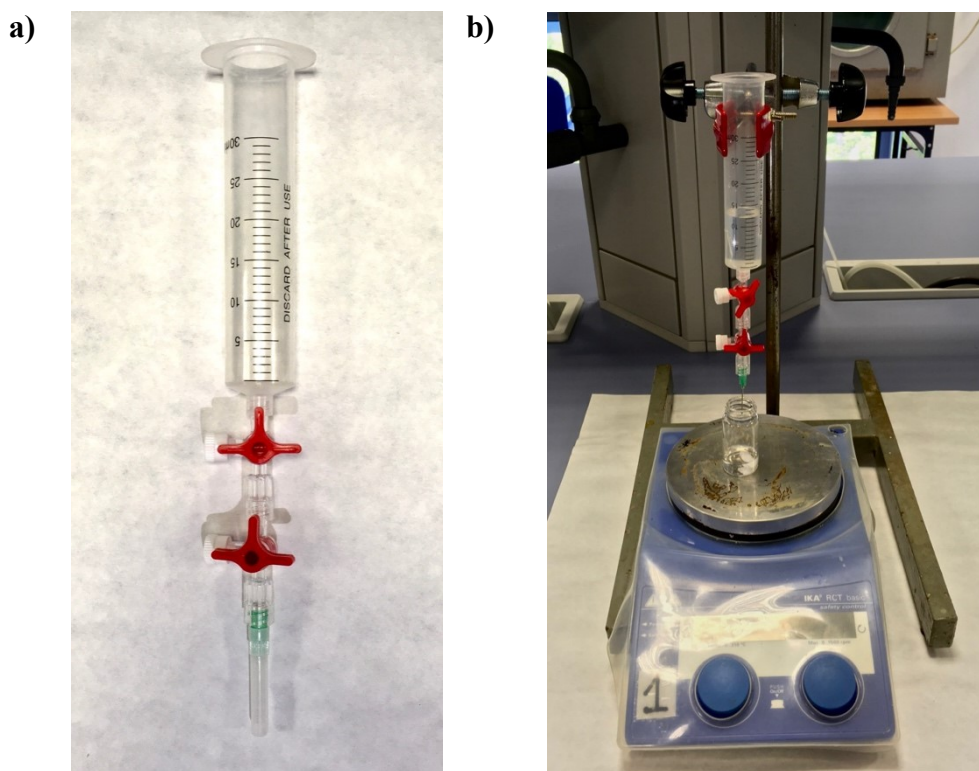
Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: mieszadło magnetyczne z możliwością grzania; łaźnia olejowa; mikrowirówka z chłodzeniem; zestaw do wkraplania: strzykawka (polipropylen) o poj. 20 ml, 2 zawory typu Luer, igła 18G; statyw laboratoryjny (Jahanban-Esfanhlani i in., 2016) lub pompa strzykawkowa; albumina osocza (bydlęca), BSA (Sigma Aldrich A7906) (>100 mg); wybrane rozpuszczalniki mieszalne z wodą, np. etanol, metanol, izopropanol, aceton (>25 mL), które będą służyły jako środki strącające. Zależnie od czasu trwania zajęć oraz liczby grup/stanowisk można wykonać szereg doświadczeń, stosując różne rozpuszczalniki, mieszaniny wybranych rozpuszczalników lub różne stosunki objętościowe środka strącającego do roztworu białka.

Przebieg doświadczenia

Przygotowanie stanowiska dla grupy ćwiczeniowej podzielonej na zespoły 2-osobowe

1. Zmontować zestaw do wkraplania: strzykawka bez tłoku, z 2 zaworkami połączonymi szeregowo oraz igłą (ryc. 3.1a). Zestaw umocować w łapie i ustawić nad pustą zlewką z dipolem magnetycznym (ryc. 3.1b).
2. Przy zamkniętych zaworkach strzykawkę uzupełnić 12 ml wybranego rozpuszczalnika (lub mieszaniny rozpuszczalników) służącego jako środek strącający.
3. Otworzyć górny zaworek, a następnie częściowo otworzyć dolny, aż rozpuszczalnik zacznie kapać. Manipulując **dolnym zaworkiem**, ustawić szybkość wkraplania na ~2 ml/minutę. Potwierdzić ustawienie: nie ruszając dolnego zaworka, zamknąć górny i uzupełnić 12 ml rozpuszczalnika (ze zlewki). Po otwarciu górnego zaworka do całkowitego wkroplenia powinno minąć ~6 minut. W razie potrzeby zamknąć górny zaworek i powtórzyć, manipulując **wyłącznie dolnym** zaworkiem.

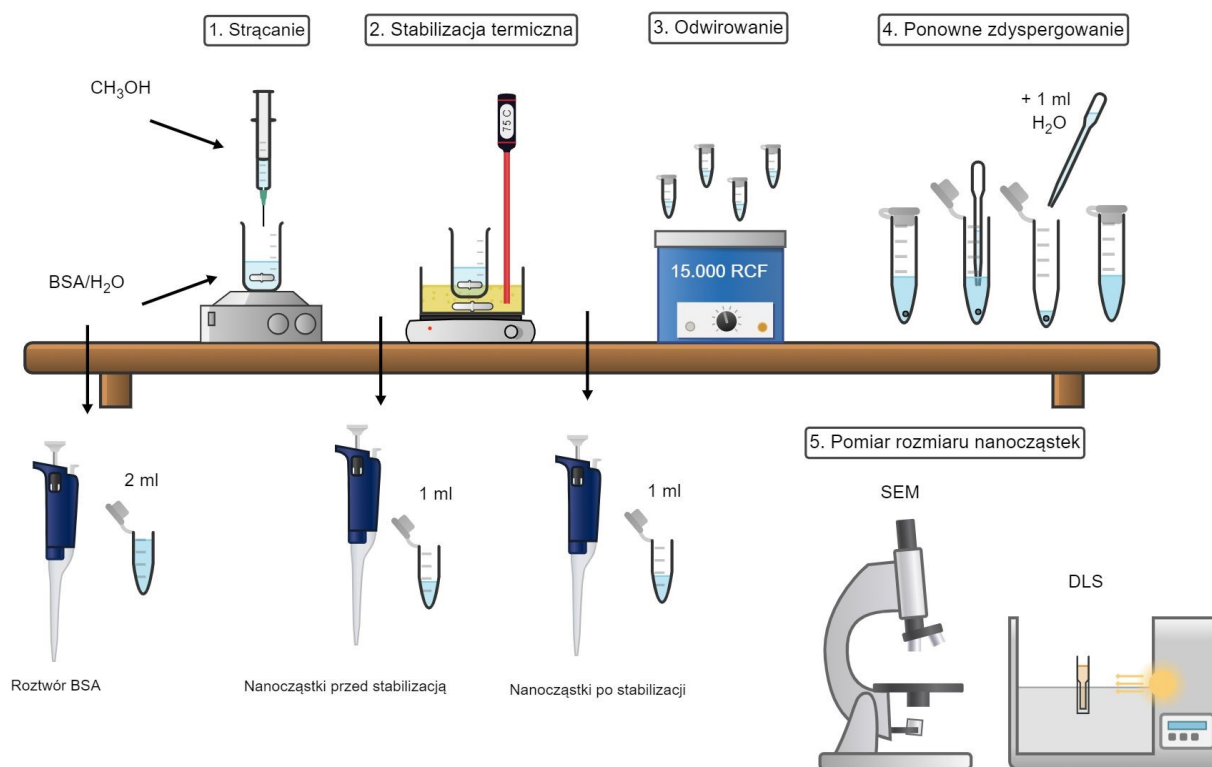


Ryc. 3.1. Zestaw do wkraplania (a); gotowe stanowisko (b)

4. Przygotować roztwór albuminy osocza (BSA):
 - na każde doświadczenie potrzeba 2 ml roztworu (50 mg/ml), czyli 100 mg BSA;
 - odważyć odpowiednią ilość BSA (minimum 200 mg: 1 doświadczenie plus 1 badanie odniesienia) i umieścić w fiolce/zlewce (**uwaga: jeżeli planowane są dodatkowe doświadczenia, należy uwzględnić to w ilości odważonej BSA!**);
 - uzupełnić odpowiednią ilością wody uzdatnionej, aby otrzymać roztwór 50 mg/ml;
 - odczekać kilka minut i delikatnie zacząć mieszać do całkowitego rozpuszczenia: albo poprzez ustawienie niskich obrotów na mieszadło magnetycznym, albo przez delikatne odwracanie zakręconej fiolki do góry dnem (**uwaga: powstanie piany jest niepożądane!**).
5. Przeprowadzić proces nanostrącania:
 - ustawić mieszadło magnetyczne poniżej zestawu do wkraplania (ryc. 3.1b);

- szklaną fiolkę uzupełnić 2 ml roztworu BSA i dodać dipol magnetyczny;
 - ustawić obroty mieszałki na 500 rpm;
 - strzykawkę uzupełnić 12 ml wybranego środka strącającego (środek strącający : roztwór BSA 6 : 1 v/v) (**uwaga: należy się upewnić, że igła znajduje się dokładnie nad zlewką z BSA!**);
 - delikatnie otworzyć górny zaworek i odnotować czas;
 - obserwować proces całkowitego wkroplenia się rozpuszczalnika (~6 minut) i odnotować wszelkie zmiany: koloru, mętności itp. oraz czas, po którym te zmiany zaszły;
 - powtórzyć proces dla kolejnego środka strącającego, mieszaniny lub innego stosunku objętościowego;
 - jako badanie odniesienia zastosować 12 ml wody uzdatnionej zamiast środka strącającego;
 - porównać wszystkie otrzymane materiały, odnotować wszelkie różnice: koloru, mętności itp.;
 - zachować 2 ml każdego otrzymanego materiału: przenieść do podpisanej fiołki za pomocą mikropipety.
6. Ustabilizować termicznie:
- na mieszałce magnetycznym umieścić łaźnię olejową i ustawić temp. na 75°C, obroty na 500 rpm i pozwolić, żeby temperatura się ustabilizowała;
 - za pomocą łapy i statywu umieścić zakręcone fiołki (wraz dipolami) z otrzymanymi zawiesinami w oleju;
 - odczekać 30 minut;
 - ostrożnie wynurzyć fiołki z łaźni i ostudzić;
 - porównać wszystkie materiały przed stabilizacją i po stabilizacji, odnotować wszelkie różnice: koloru, mętności itp.
7. Odwirować:
- pobrać 1 ml każdego materiału, przed stabilizacją i po stabilizacji termicznej i przenieść do podpisanej fiołki 2 ml;
 - włączyć mikrowirówkę i ustawić siłę obrotową (RCF) na $15\,000 \times g$, temp. na 4°C, a czas wirowania na 15 minut;
 - po schłodzeniu wirówki odwirować wszystkie materiały (**uwaga: należy pamiętać, aby zapewnić równomierny rozkład masy w wirówce – fiołki z tymi samymi objętościami cieczy umieścić naprzeciwko siebie**);
 - po odwirowaniu delikatnie wyjąć fiołki;
 - odnotować obecność (lub brak) osadu na dnie.
8. Ponownie zdyspergować:
- delikatnie pobrać supernatant (roztwór nad osadu, ~1 ml) i przenieść go do podpisanej fiołki 2 ml (**uwaga: należy uważać, żeby nie pobrać lub wzburzyć osadu!**);
 - w celu zdyspergowania pozostawionego w fiołce osadu dodać 1 ml wody uzdatnionej i zdyspergować za pomocą mikropipety lub ewentualnie wytrząsarki;
 - porównać otrzymane dyspersje: materiały wyjściowe, materiały po stabilizacji, oraz przed wirowaniem, po wirowaniu i po ponownym zdyspergowaniu.

Schemat postępowania podczas otrzymywania i stabilizacji nanocząstek, przy przykładowym zastosowaniu metanolu jako środka strącającego, przedstawiono na rycinie 3.2.



Ryc. 3.2. Schemat otrzymywania i stabilizacji nanocząstek BSA

Wyniki

1. Podstawowe wyniki ćwiczenia stanowią odnotowane obserwacje dotyczące przygotowanych roztworów oraz otrzymanych dyspersji przed procesem strącania i po nim, przed procesem stabilizacji i po nim oraz przed ponownym dyspergowaniem i po nim. Podstawowym parametrem obserwacji jest stopień zmętnienia, gdyż jest to efekt rozpraszania światła przez cząstki, czyli świadczy o zmianie układu z roztworu w układ dyspersyjny, tj. o pojawieniu się drugiej fazy i obecności nanocząstek. Ponadto stopień zmętnienia jest powiązany z rozmiarem cząstek: mniejsze cząstki rozpraszają światło w mniejszym stopniu.
2. Kluczowe jest porównanie efektów stosowanych środków strącających względem siebie oraz względem badania odniesienia, gdzie zastosowano wodę. W celu podsumowania obserwacji należy przygotować tabelę – zgodnie z przykładem zamieszczonym w tabeli 3.1. Obecność osadu po odwirowaniu również świadczy o powstaniu cząstek, natomiast ponowne ich zdyspergowanie – lub rozpuszczenie – wskazuje na efekt stabilizacji termicznej.
3. Otrzymane materiały mogą być dalej badane pod względem rozmiaru nanocząstek, np. za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) itp. (zob. rozdz. 1 *Nanomateriały – otrzymywanie, charakterystyka, zastosowanie*). Natomiast wydajność procesu można scharakteryzować za pomocą np. pomiaru stężenia białka (np. **metoda BCA** z kwasem bis-cynchoninowym) w supernatantach lub rozpuszczonych cząstkach (tych niepoddanych stabilizacji termicznej) lub liofilizacji i ważenia osadu.

Tabela 3.1. Podsumowanie obserwacji

Środek strącający	Stosunek objętości środka strącającego do roztworu BSA	Czas do zaobserwowania zmętnienia	Stopień zmętnienia (np. -/+ /++ /+++)	Rozmiar otrzymanych cząstek
Woda	6 : 1			
Etanol	6 : 1			

4. Po zakończeniu ćwiczenia należy przygotować sprawozdanie końcowe zawierające następujące elementy:
- temat oraz cel pracy;
 - spis autorów oraz oświadczenie o przestrzeganiu zasad uczciwości akademickiej;
 - krótkie wprowadzenie teoretyczne;
 - zwięzły opis metod, w szczególności zastosowanych środków strącających lub wariantów procesu/przebiegu ćwiczenia;
 - opis wyników w postaci obserwacji, zdjęć oraz tabel;
 - zwięzła dyskusja;
 - wnioski oraz podsumowanie;
 - spis wszelkich stosowanych źródeł;
 - podziękowania dla osób, które nie są autorami.

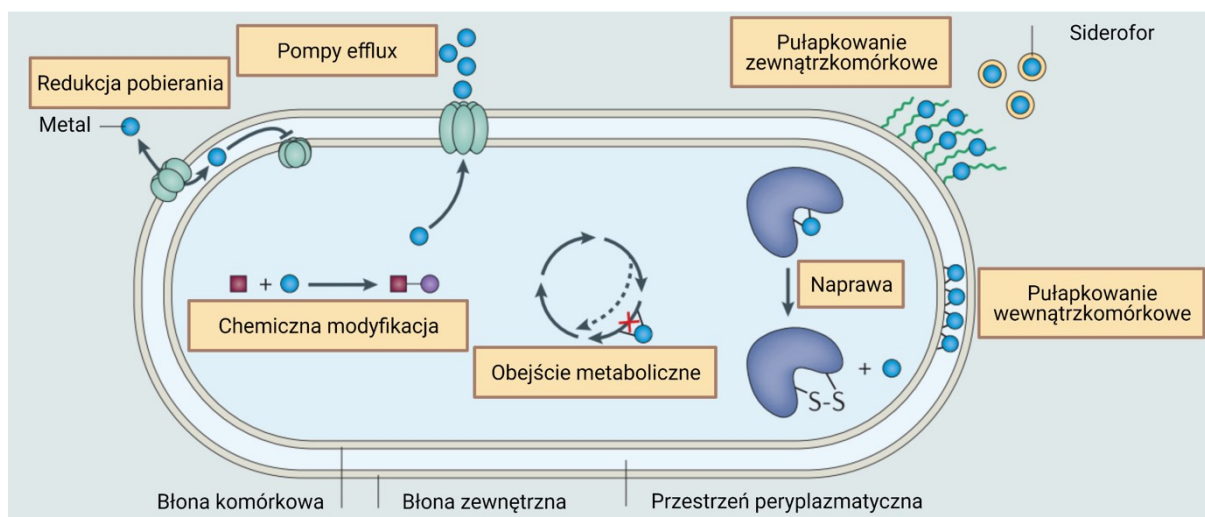
Piśmiennictwo

- Anselmo A.C., Mitragotri S. 2016. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine* 1 (1), 10–29.
- Anselmo A.C., Mitragotri S. 2019. Nanoparticles in the clinic: an update. *Bioengineering & Translational Medicine*, e10143.
- Elzoghby A.O., Samy W.M., Elgindy N.A. 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* 161 (1), 38–49.
- Irache J.M., Espuelas S. 2007. Albumin nanoparticles. W: *Nanotechnologies for the life sciences*. Red. C.S. Kumar. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, s. 185–218.
- Jahanban-Esfahlan A., Dastmalchi S., Davaran S. 2016. A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 91, 703–709.
- Kim B.Y., Rutka J.T., Chan W.C. 2010. Nanomedicine. *New England Journal of Medicine* 363 (25), 2434–2543.
- Konopska B., Krzysztof G., Juszczynska K., Gburek J. 2018. Albuminowe nanosystemy w medycynie. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 72, 1004–1017.
- Martínez Rivas C.J., Tarhini M., Badri W., Miladi K., Greige-Gerges H., Nazari Q.A., Galindo Rodríguez S.A., Álvarez Román R., Fessi H., Elaissari A. 2017. Nanoprecipitation process: from encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 532 (1), 66–81.
- Niemirowicz K., Car H. 2012. Nanonośniki jako nowoczesne transportery w kontrolowanym dostarczaniu leków. *Chemik* 66 (8), 868–881.

4. BAKTERIE I ICH METABOLITY W SYNTEZIE NANOCZĄSTEK SREBRA

Adrian Augustyniak

W toku ewolucji mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów przystosowujących je do środowiska, w którym występują. Wiele z tych przystosowań pozwala im przeżyć w miejscach zanieczyszczonych, a nawet je przekształcać, co może zostać wykorzystane np. w bioremediacji skażonych gleb i wód. Nanostruktury i związki chemiczne, z których są zbudowane, mogą dla bakterii stanowić **ksenobiotyki**, który z reguły (i w odpowiedniej dawce) jest dla komórki szkodliwy. W przypadku skażenia środowiska metalami i związkami metali bakterie mogą wykorzystywać kilka mechanizmów obronnych, w tym wyrzucanie nanocząstek z komórki dzięki **pompom efflux**, **chemiczną modyfikację**, **zredukowanie poboru substancji ze środowiska**, **naprawę uszkodzonych enzymów**, **zamianę zaburzonych szlaków metabolicznych**, a także **pułapkowanie zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowe**. Mechanizmy te zaprezentowano na rysunku 4.1.



Ryc. 4.1. Podstawowe mechanizmy obrony komórki przed jonami metali i metalicznymi nanocząstkami (na podstawie Lemire i in., 2013, za zgodą Nature publishing group, tłum. własne)

Istnieje możliwość wykorzystania niektórych spośród powyższych mechanizmów do wytworzenia nanocząstek w mikroorganizmach lub dzięki wytwarzanym przez nie metabolitom. Bakterie z rodzajów *Pseudomonas* i *Streptomyces* mogą być wykorzystane do tego celu. Poszczególne szczepy tych mikroorganizmów mogą charakteryzować się wysokim **potencjałem biotechnologicznym** i wykazywać zwiększoną **tolerancję** na skażenie środowiska związkami metali, co może objawiać się w ich pochłanianiu, a niekiedy nawet degradacji. W określonych warunkach może zostać przeprowadzona **biosynteza nanocząstek** zarówno wewnątrz komórek tych drobnoustrojów, jak i z wykorzystaniem ich metabolitów. Proces ten wpisuje się w tzw. **zieloną chemię**, która kładzie nacisk na procesy prowadzone w sposób zbliżony do naturalnego i ze zredukowaną ilością toksycznych odpadów powstających wskutek produkcji.

Ćwiczenie 4.1

Przygotowanie mikroorganizmów do przeprowadzenia syntezy nanocząstek

Cel

1. Poznanie przykładowych drobnoustrojów, które mogą być wykorzystywane do „zielonej” syntezy nanocząstek.
2. Omówienie metod przechowywania i namnażania drobnoustrojów testowych.
3. Zrozumienie zasad pracy z mikroorganizmami.

Wprowadzenie

Odpowiednie przechowywanie i przygotowywanie bakterii do badań jest jednym z kluczowych elementów każdej procedury mikrobiologicznej. Ze względu na szybkie namnażanie bakterii (krótki **czas generacji**) należy każdorazowo przygotować nowy materiał do pracy. Deponowanie szczepów w temperaturach poniżej zera (°C) wspomagane stosowaniem **substancji krio-protekcyjnych** (np. glicerolu) jest obok **liofilizacji** najczęściej stosowaną metodą kolekcjonowania mikroorganizmów. Materiał biologiczny nie powinien być **pasażowany** (przenoszony z jednej hodowli do kolejnej) więcej niż kilka razy (np. 5-krotnie), ponieważ może to prowadzić do zmiany jego **cech morfologicznych i genetycznych**. Takie zjawisko może objawiać się m.in. obniżeniem żywotności komórek w hodowli i spadkiem wydajności produkcyjnej.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: szalki Petriego z hodowlami drobnoustrojów (24-godziną hodowlą *Pseudomonas aeruginosa* oraz 5-dniową hodowlą *Streptomyces griseus*) (2 szt.); zamrożone próbówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml zawierające po 1 ml podłoża Tryptone Soy Broth (TSB) z 10-proc. dodatkiem glicerolu oraz biomasę badanych drobnoustrojów (2 szt.); preparaty mikroskopowe zabarwione metodą Grama przygotowane z hodowli badanych bakterii (2 szt.); szalki Petriego z ogólnowzrostowym podłożem Tryptone Soy Agar (TSA) (2 szt.); kolby stożkowe (o poj. 250 ml) zawierające 100 ml jałowego podłoża wzrostowego TSB (2 szt.); spektrofotometr obsługujący płytki 96-dółkowe; płytka 96-dółkowa z polistyrenu, płaskodenna, jałowa, z pokrywką; eza wielorazowa; palnik gazowy; mikroskop optyczny z powiększeniem 1000×; ciepłarka z wytrząsaniem oraz ciepłarka bez wytrząsania nastawione na 30°C; lodówka (4°C); zamrażarka (−21°C).

Mikroorganizmy

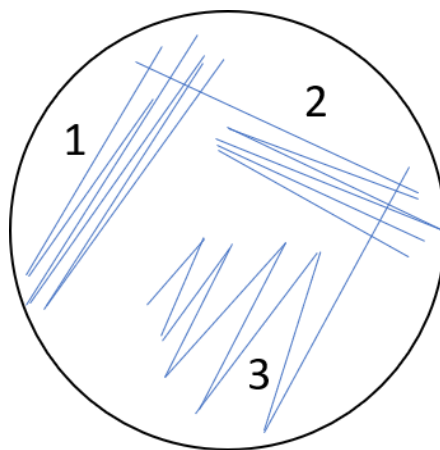
Streptomyces griseus ATCC® 10137™, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 2-osobowe

1. Dla każdego zespołu przygotowany jest pakiet składający się z 5 elementów:
 - próbówki z zamrożonymi szczepami testowymi;
 - podłoża ogólnowzrostowego;
 - czystych hodowli drobnoustrojów wybranych do badań;
 - gotowych preparatów mikroskopowych;
 - 2 kolb stożkowych z podłożem ogólnowzrostowym.
2. Każdy zespół ma do wykonania kolejno następujące po sobie zadania:
 - **posiew redukcyjny** – nazywany także **metodą suchych rozcieńczeń**, który pozwoli uzyskać pojedyncze **kolonie** drobnoustrojów, czyli odosobnione nagromadzenie biomasy, które można zaobserwować nieuzbrojonym okiem, a które powstało z jednej komórki macierzystej lub grupy komórek;

- obserwacja i opis wyrosłych hodowli bakteryjnych (wybrane bakterie charakteryzują się różną **morfologią** oraz odmiennym wynikiem **barwienia Grama**);
 - obserwacja i opis preparatów mikroskopowych bakterii (mikroskopowanie z **olejkiem immersyjnym**, dzięki któremu możliwa jest analiza obrazu o powiększeniu 1000×);
 - założenie płynnej hodowli bakteryjnej poprzez **inokulację** 1 kolonii bakteryjnej do odpowiedniego podłoża ogólnowzrostowego, do którego zaszczerpione bakterie będą uwalniać metabolity wspomagające syntezę nanocząstek w kolejnym etapie.
3. Doświadczenie przeprowadzić w następujących etapach:
- **rozmrożenie** – próbki z zamrożonymi hodowlami drobnoustrojów należy umieścić w cieplarni i odczekać do pełnego rozmrożenia płynu (10–15 minut); po rozmrożeniu zawartości przystąpić do wykonania posiewu (zgodnie z procedurą opisaną poniżej), a następnie bezzwłocznie umieścić próbki w zamrażarce w celu dalszego przechowywania;
 - **posiew redukcyjny** – posiew należy przeprowadzić z użyciem ezy bakteriologicznej, po pobraniu jednej kolonii, poprzez rozprowadzenie biomasy po powierzchni stałej podłoża ogólnowzrostowego (TSA) według wzoru ukazanego na rycinie 4.2; przed pobraniem biomasy należy rozgrzać eżę oraz ostudzić w podłożu, w miejscu, w którym nie ma biomasy widocznej gołym okiem; na docelowej szalce Petriego należy wykonać posiew z utworzeniem 3 stref (ryc. 4.2); po każdej strefie należy ponownie wysterylizować eżę nad palnikiem i ostudzić w agarze;
 - **hodowla** – płytki z wysianymi bakteriami należy włożyć do cieplarki celem rozpoczęcia inkubacji (w temp. 30°C); szalki Petriego powinny zostać podpisane w sposób umożliwiający identyfikację osób, które wykonały posiew, a następnie umiejscowione dnem ku górze, tak aby spoczywały na pokrywie (pozwoli to uniknąć nadmiernej utraty wody w czasie hodowli);



Ryc. 4.2. Schemat posiewu redukcyjnego

- **analiza preparatów mikroskopowych** – przed przystąpieniem do mikroskopowania należy upewnić się, czy światło w mikroskopie zostało włączone, a urządzenie rewolwerowe jest ustawione tak, aby umożliwić obserwację przez obiektyw 100×; na gotowym preparacie należy umieścić niewielką kroplę olejku immersyjnego, a następnie szkiełko powinno zostać umieszczone na stoliku mikroskopu (jeżeli kropla nie znajduje się dokładnie pod obiektywem, należy zmienić pozycję preparatu); mikroskopowanie w trybie mokrym (z immersją) wymaga połączenia kropli olejku immersyjnego z obiektywem, dlatego należy podnieść stolik przedmiotowy za pomocą śruby makrometrycz-

nej, jednocześnie obserwując powierzchnię styku (jeżeli napotkany zostanie opór, dalsze dociskanie stolika do obiektywu może zakończyć się pęknięciem preparatu); po zetknięciu kropli olejku z obiektywem należy ostrożnie regulować obraz do momentu pojawienia się obrazu preparatu, a następnie doregulować ostrość za pomocą śruby mikrometrycznej; wyniki obserwacji należy opisać w zeszycie laboratoryjnym z adnotacją dotyczącą wyniku barwienia Grama oraz schematycznie naszkicować kształt i ułożenie komórek w preparacie;

- **zaszczepienie podłoża płynnego** – sterylną (i wystudzoną) eżę należy pobrać 1 kolonię szczepu testowego i zawiesić w podłożu znajdującym się w kolbie stożkowej; szyjkę kolby należy rozgrzać nad płomieniem palnika (1–2 sekund) w celu sterylizacji, a następnie zamknąć korkiem materiałowym, zabezpieczyć folią aluminiową i pozostawić w cieplarni z wytrząsaniem (30°C, 100 rpm) na 24 godziny w przypadku *P. aeruginosa* i 7 dni w przypadku *S. griseus*.

Wyniki

1. Uzyskane wyniki zebrać w formie tabelarycznej, korzystając z tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Charakterystyka drobnoustrojów, które mogą być wykorzystywane do syntezy nanocząstek

Mikroorganizm	Morfologia kolonii (kształt, kolor, profil, brzeg, wielkość)	Morfologia komórki (kształt, ułożenie)	Wynik barwienia Grama	Wygląd w obrazie mikroskopowym (szkic)
<i>P. aeruginosa</i>				
<i>S. griseus</i>				

2. Sporządzić notatkę dotyczącą procedur przechowywania drobnoustrojów oraz zakładania nowych hodowli.

Ćwiczenie 4.2

Zewnątrzkomórkowa synteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem bakterii z rodzajów Pseudomonas i Streptomyces

Cel

1. Poznanie i przeprowadzenie procedury syntezy nanocząstek srebra z wykorzystaniem płynu pochodowlanego.
2. Wykorzystanie spektrofotometrii do oceny efektywności syntezy.
3. Usystematyzowanie wiedzy dotyczącej przeprowadzania eksperymentów naukowych i notowania wyników.

Wprowadzenie

W ćwiczeniu zostanie wykorzystane zjawisko **redukcji jonów srebra** pochodzących z azotanu srebra przez płyn pochodzący z bakterii z rodzajów *Pseudomonas* i *Streptomyces*. Zjawisko to jest możliwe dzięki wytwarzaniu przez te bakterie metabolitów, które mają wystarczający **potencjał oksydoredukcyjny**, by katalizować reakcję syntezy nanocząstek.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: kolby stożkowe z hodowlami drobnoustrojów o poj. 100 ml – 24-godziną hodowlą *Pseudomonas aeruginosa* oraz 7-dniową hodowlą *Streptomyces griseus* (2 szt.); jałowe kolby stożkowe o poj. 100 ml (2 szt.); probówki typu Falcon o poj. 50 ml (4 szt.); kolba stożkowa o poj. 250 ml zawierająca 100 ml filtratu jałowej pożywki bakteriologicznej (TSB); spektrofotometr obsługujący płytki 96-dołkowe; płytka 96-dołkowa z polistyrenu, płaskodenna, jałowa, z pokrywką; pipety jednorazowe o poj. 20 ml (jałowe, z filtrem) (2 szt.) oraz pipetor do nabierania płynu; pipeta automatyczna z końcówkami o poj. 100–200 µl; filtr strzykawkowy (nylon) o poj. 0,45 µm; strzykawka jednorazowa o poj. 20–100 ml; cieplarka z wytrząsaniem oraz cieplarka bez wytrząsania ustawione na temp. 30°C; wirówka na probówki o poj. 50 ml; gogle ochronne (do filtrowania).

Mikroorganizmy

Streptomyces griseus ATCC® 10137™, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 2-osobowe

1. Każdy zespół ma do dyspozycji:
 - 2 kolby z czystą hodowlą drobnoustrojów testowych;
 - 4 probówki typu Falcon o poj. 50 ml;
 - 4 roztwory azotanu srebra (o koncentracji 0,01–0,001 M AgNO₃);
 - 4 jałowe kolby stożkowe o poj. 100 ml;
 - 4 kolby stożkowe zawierające 50 ml płynu po syntezie nanocząstek.
2. Każdy zespół ma do wykonania kolejno następujące po sobie zadania:
 - przygotowanie **supernatantu** do syntezy;
 - otrzymanie filtratu pozbawionego komórek bakteryjnych;
 - przeprowadzenie syntezy;
 - wykonanie odpowiedniego rozcieńczenia roztworu AgNO₃ i nastawienie reakcji (każdy zespół będzie dysponował inną koncentracją wyjściową roztworu AgNO₃);
 - pomiar spektrofotometryczny zawiesiny nanocząstek otrzymanej po syntezie (ze względu na czas syntezy wynoszący 3–4 dni zespoły otrzymują gotowy produkt reakcji do dalszych badań).
3. Doświadczenie przeprowadzić w następujących etapach:
 - materiał z hodowli rozdzielić po 50 ml do 2 probówek typu Falcon, a następnie zwirować przy 5000 rpm przez 10 minut w temp. 20°C;
 - supernatant przefiltrować do nowych probówek typu Falcon, a następnie przenieść po 45 ml filtratu do jałowych kolb stożkowych;
 - do kolb przygotowanych w poprzednim etapie należy dodać 5 ml roztworu AgNO₃ (kolby należy zabezpieczyć korkiem i opisać w sposób, który będzie pozwalał na późniejsze odczytanie koncentracji AgNO₃ oraz zidentyfikowanie osób wykonujących ćwiczenie);
 - przygotowaną zawiesinę należy inkubować w cieplarni z wytrząsaniem (100 rpm) przez 3–4 dni;

- z otrzymanych kolb stożkowych po reakcji biosyntezy należy odczytać koncentrację wykorzystanego roztworu AgNO_3 i zapisać w zeszycie laboratoryjnym;
- pipetą automatyczną pobrać z każdej kolby po 100 μl i nanieść do odpowiedniej celki w płytce 96-dołkowej (czynność powtórzyć 3-krotnie); podobnie należy przygotować próbki kontrolne z jałowej pożywki bakteriologicznej;
- po naniesieniu wszystkich próbek na płytkę titracyjną włączyć spektrofotometr oraz ustawić program pozwalający na dokonanie skanu absorbancji próbek (należy wyznaczyć zakres 350–700 nm ze skokiem co 10 nm i wykonać pomiar);
- zapisać wyniki w formie elektronicznej.

Wyniki

1. Sporządzić notatkę zawierającą opis poszczególnych etapów i procedury wykonania syntezy.
2. Wyniki odczytu ze spektrofotometru nanieść na wykres zależności długości fali (x) od absorbancji (y).
3. Przeprowadzić podsumowanie statystyczne wyników (średnia, odchylenie standardowe) na podstawie powtórzeń i porównać wyniki próby badanej do kontroli (filtratu jałowej pożywki).
4. Po zakończeniu ćwiczeń 4.1 i 4.2 przygotować **sprawozdanie końcowe** na 1000–2000 słów (bez piśmiennictwa), zawierające następujące elementy:
 - temat: „Biosynteza nanocząstek srebra z wykorzystaniem wybranych bakterii”;
 - spis autorów opracowania;
 - krótkie wprowadzenie teoretyczne ze wskazaniem kilku pozycji piśmiennictwa naukowego podsumowujące cele biosyntezy nanomateriałów oraz krótka charakterystyka wykorzystanych mikroorganizmów;
 - zwięzły opis metod, z podaniem zalet i wad zastosowanej metodologii;
 - opis wyników w postaci tabel i wykresów;
 - zwięzła dyskusja z odniesieniem do kilku pozycji piśmiennictwa;
 - wnioski;
 - spis źródeł.

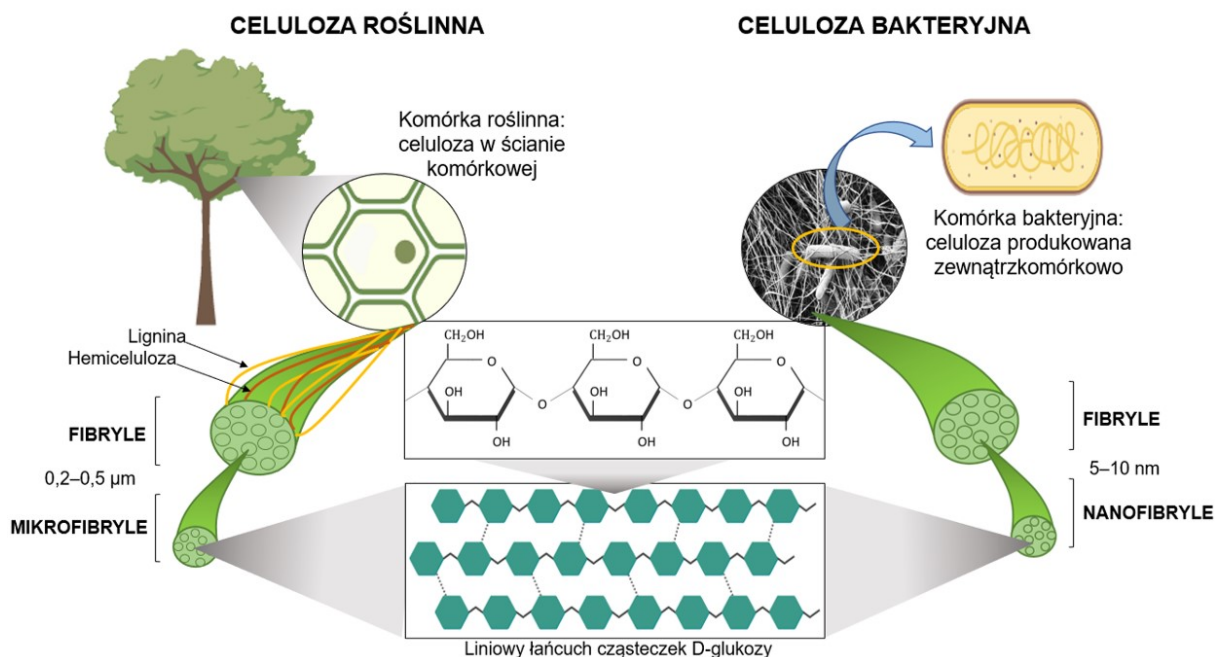
Piśmiennictwo

- Abirami M., Kannabiran K. 2016. Streptomyces ghanaensis VITHM1 mediated green synthesis of silver nanoparticles: mechanism and biological applications. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 10 (4), 542–551.
- Lemire J., Harrison J.J., Turner R.J. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews. Microbiology* 11 (6), 371–184.
- Nawrotek P., Augustyniak A. 2015. Nanotechnologia w mikrobiologii – wybrane aspekty. *Postępy Mikrobiologii* 3, 275–282.
- Shivaji S., Madhu S., Singh S. 2011. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochemistry* 46 (9), 1800–1807.
- Wypij M., Czarnecka J., Świecimska M., Dahm H., Rai M., Golinska P. 2018. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34 (2), 23.

5. BIONANOCELULOZA – METODY OTRZYMYWANIA, MODYFIKACJE, ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI ORAZ MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA

Karol Fijałkowski, Anna Żywicka, Daria Ciecholewska-Juśko

Zgodnie z zaleceniem Komisji Europejskiej **nanomateriałami** są te materiały, których przynajmniej 1 wymiar mieści się w granicach 1–100 nm. Materiały takie charakteryzują się wysoką reaktywnością chemiczną, jak również posiadają unikatowe właściwości magnetyczne, optyczne i elektryczne, dzięki którym znajdują szerokie zastosowanie praktyczne. Nanomateriały otrzymuje się najczęściej na drodze chemicznej, fizycznej lub fizykochemicznej syntezy. Metody te wymagają zastosowania wyspecjalizowanej aparatury i wysokich nakładów finansowych. Alternatywą jest produkcja nanomateriału na drodze biotechnologicznej. Tak też otrzymywana jest **celuloza bakteryjna (CB)**.



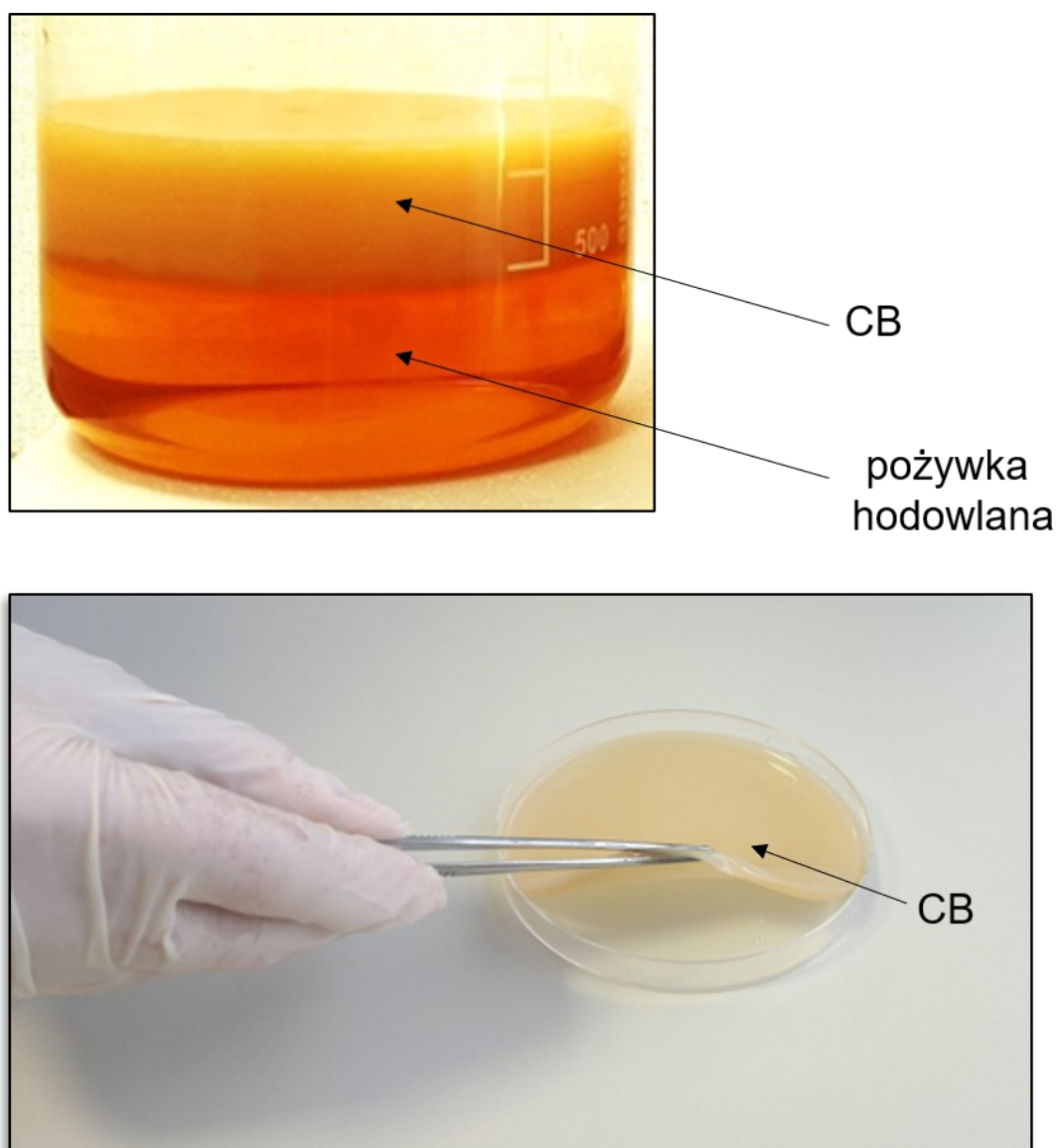
Ryc. 5.1. Porównanie celulozy roślinnej i bakteryjnej: pochodzenie i struktura

Celuloza jest najbardziej rozpowszechnionym i jednocześnie jednym z najbardziej użytecznych polimerów na Ziemi. Występuje ona w ścianie komórkowej roślin wyższych wraz z substancjami podporowymi (ligniny, hemicelulazy, pektyny). W XIX w. odkryto jednak, że producentami celulozy mogą być również niektóre bakterie. Celuloza wytwarzana przez bakterie jest chemicznym analogiem celulozy roślinnej (ryc. 5.1), czyli polisacharydem zbudowanym z liniowych łańcuchów β -1,4-glukanu tworzących włókna. CB jest biopolimerem silnie uwodnionym, w 96% składa się z wody, pozostałą część stanowią cukry. W przeciwieństwie do celulozy roślinnej celuloza wytwarzana przez bakterie należy do wysoko krystalicznych celuloz,

bogatych we frakcję Ia. Jest to szczególnie istotna cecha CB, mająca wpływ na jej właściwości mechaniczne i międzyfazowe.

Proces biosyntezy tego polisacharydu prowadzony na drodze fermentacji obejmuje 2 etapy. Etap pierwszy polega na polimeryzacji cząsteczek glukozy w liniowy β -1,4-glukan, natomiast etap drugi – na łączeniu i krystalizacji indywidualnych łańcuchów polimerowych w większe struktury – nanofibryle, które następnie agregują w jeszcze większe struktury, tworząc tzw. wstążki celulozowe – fibryle. Fibryle CB budują uporządkowaną sieć o dużej powierzchni, tworząc strukturę w postaci rozległej i wysoce porowatej matrycy. Powstała w ten sposób włókniasta sieć CB przyjmuje w końcowym efekcie postać wielowarstwowej, hydrożelowej membrany (ryc. 5.2) o znacznej powierzchni właściwej i dużej porowatości.

Wymiary syntetyzowanych przez bakterie włókien (nanofibryli) celulozy mieszczą się w granicach nanometrów, co pozwala zaliczyć CB do nanomateriałów (z tego powodu inną, powszechnie używaną nazwą stosowaną dla celulozy wytwarzanej przez bakterie jest bionanoceluloza (BNC). Przekrój poprzeczny nanofibryli CB wynosi 5–10 nm $\times$ 30–35 nm. Włókna CB są 200-krotnie cieńsze niż włókna bawełny i wykazują niezwykle dużą powierzchnię.



Ryc. 5.2. Celuloza bakteryjna

Celuloza bakteryjna dzięki unikatowej nanofibrylarnej strukturze odznacza się licznymi właściwościami, które czynią z niej doskonały bionanomateriał. Dzięki czystości chemicznej (brak lignin, pektyn i hemiceluloz w przeciwieństwie do celulozy roślinnej), wysokiej wytrzymałości mechanicznej, dużemu stopniowi polimeryzacji, zdolności do pochłaniania i utrzymywania wody, elastyczności, wysokim zdolnościom adsorpcyjnym, krystaliczności, biogodności oraz drobnej i smukłej budowie fibryli, a także braku działania toksycznego, alergizującego i drażniącego – CB ma znacznie lepsze właściwości niż celuloza roślinna i z tego powodu jest szeroko stosowana zarówno w stanie mokrym, jak i suchym.

W przemyśle CB może być wykorzystywana jako nośnik do unieruchamiania substancji bioaktywnych, enzymów, białek czy mikroorganizmów o wysokim potencjale biotechnologicznym. W przemyśle papierniczym i tekstylnym CB może służyć do wyrobu wytrzymałego papieru (także papieru elektronicznego) oraz tkanin wysokiej jakości. Wykorzystuje się ją również jako membrany i akustyczne materiały filtracyjne. CB znajduje zastosowanie w maskach używanych w przemyśle kosmetycznym, a także w przemyśle spożywczym jako niskokaloryczny dodatek do żywności, substancja stabilizująca oraz materiał opakowaniowy. Jednak największe zainteresowanie wzbudza zastosowanie CB w medycynie regeneracyjnej i implantacyjnej. Na bazie tego biopolimeru można produkować materiały kompozytowe do celów medycznych, wytwarzać implanty, stenty, sztuczne naczynia krwionośne czy rusztowania w inżynierii tkankowej. Właściwości CB sprawiają, że jest ona również dobrym materiałem do wytwarzania opatrunków oraz innych materiałów sanitarnych (ryc. 5.3).



Ryc. 5.3. Możliwości zastosowania CB w przemyśle

Ćwiczenie 5.1

Izolacja bakterii produkujących celulozę bakteryjną

Cel

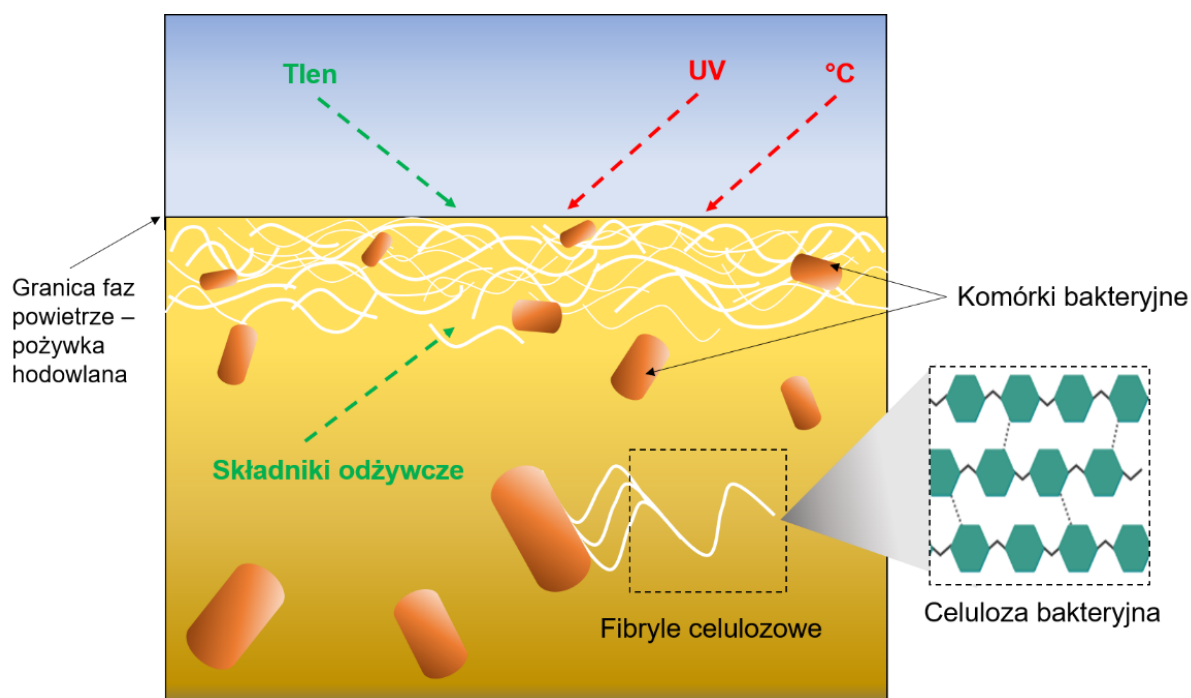
Izolacja bakterii produkujących CB.

Wprowadzenie

Celuloza bakteryjna (CB) została po raz pierwszy opisana w 1886 r. przez Adriana Browna, podczas pracy z *Bacterium aceti*. Od czasu jego odkrycia bakterii tej nadawano wiele nazw, w tym *Acetobacterium xylinum* i *Bacterium xylinodes*. W późniejszym czasie bakterię tę przemianowano na *Acetobacter xylinum*, co zostało jej oficjalną nazwą według Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury Bakterii. Obecnie ta Gram-ujemna, bezwzględnie tlenowa bakteria jest sklasyfikowana do gatunku ***Komagataeibacter xylinus***.

Celuloza bakteryjna może być wytwarzana przez wiele innych bakterii, np. *Agrobacterium* spp., *Aerobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Sarcina* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Rhodobacter* spp., *Pseudomonas* spp. Jednakże tylko *K. xylinus* jest gatunkiem, który produkuje duże ilości CB i tylko ta bakteria jest zdolna produkować ten polimer w ilościach przemysłowych. Najczęściej przyjmuje się, że ilość CB produkowana przez *K. xylinus* waha się od 1,0 do 4,0% (w/v) pożywki fermentacyjnej.

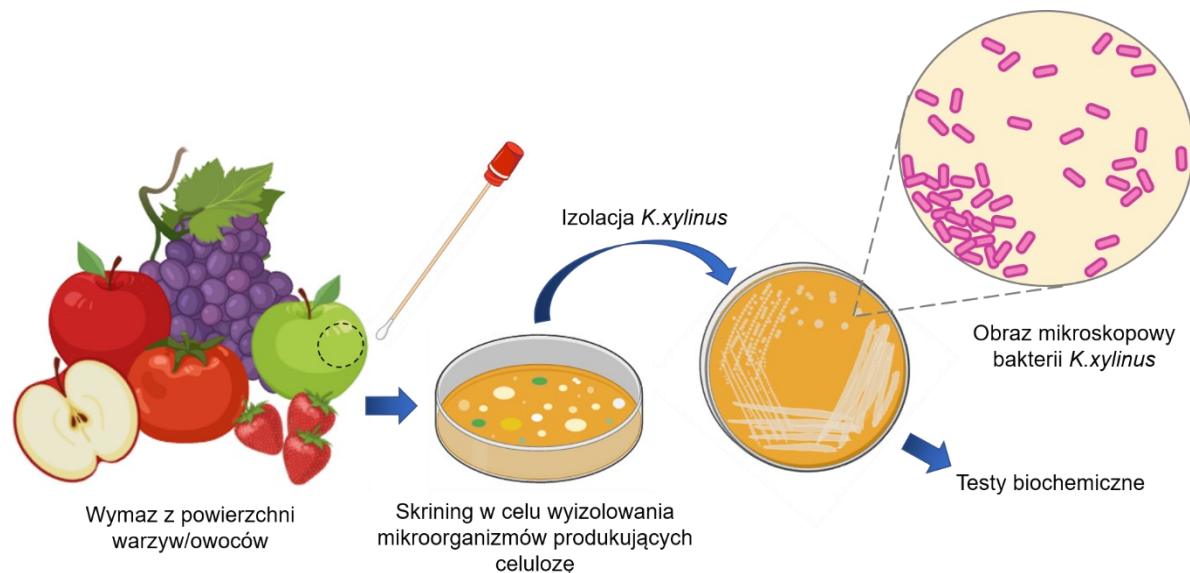
K. xylinus to bakterie fermentacji octowej, które naturalnie występują w środowisku i mogą być izolowane z powierzchni owoców, kwiatów oraz liści licznych gatunków uprawnych i dziko rosnących roślin, a także ze sfermentowanej żywności (marynat owocowych i warzywnych), wina, piwa czy octu. Bakterie te wytwarzają CB z 2 powodów. Po pierwsze syntetyzują membranę, żeby utrzymać się na powierzchni ciekłych pożywek, gdzie mają swobodny dostęp do tlenu. Drugą przyczyną jest ochrona przed szkodliwymi czynnikami środowiska (promieniowanie UV, niska wilgotność) – w tym przypadku CB pełni rolę biofilmu (ryc. 5.4).



Ryc. 5.4. Biosynteza CB w płynnej pożywce hodowlanej

Materialy

Owoce i warzywa; jałowa sól fizjologiczna (0,85-proc. roztwór NaCl); płynna pożywka Hestrin-Schramm (H-S); szalki Petriego ze stałą pożywką H-S; skalpel; głaszczki; jałowe wymazówki; probówki z filtrem o porach średnicy 0,22 μm ; probówki typu Eppendorf; statywy na probówki; pipety; tipsy; waga analityczna; naczynka wagowe; komora laminarna; inkubator.

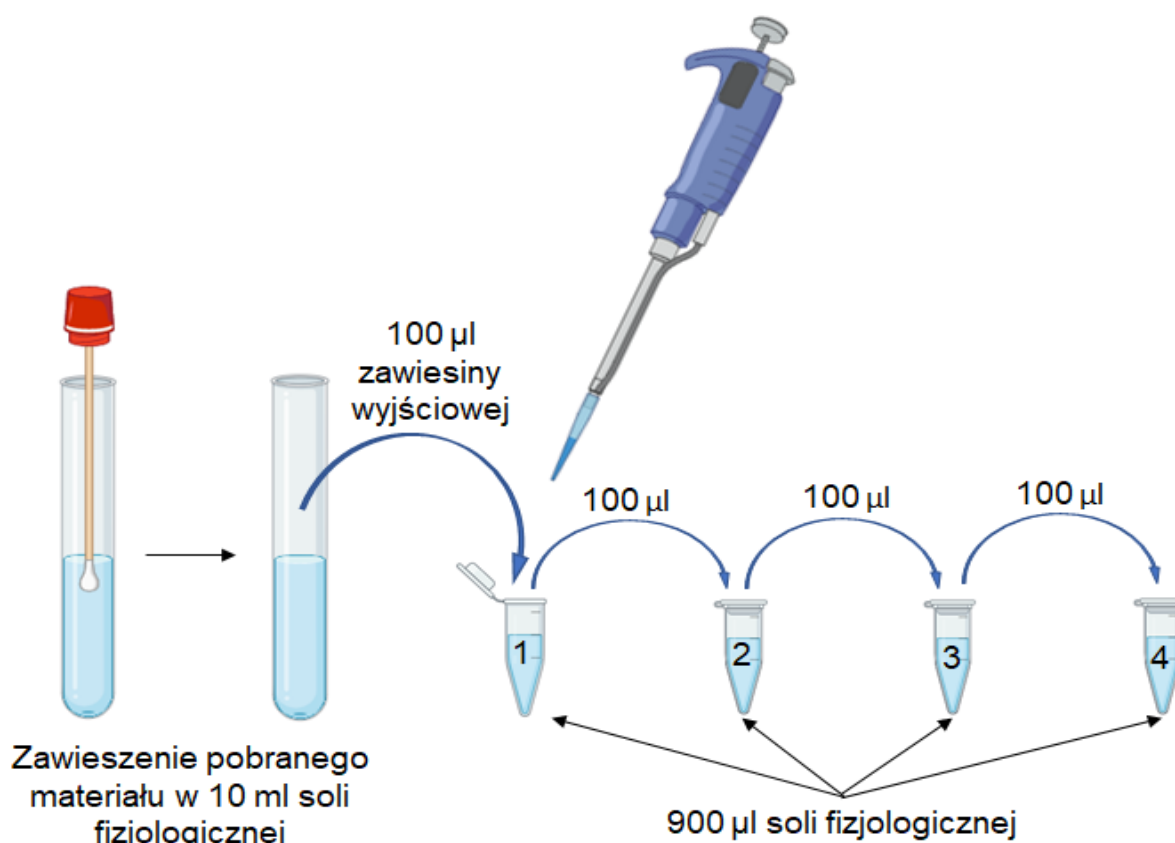


Ryc. 5.5. Izolacja i identyfikacja bakterii produkujących CB

Przebieg ćwiczenia

Izolacja szczepów produkujących CB

1. W pierwszym etapie jałową wymazówką pobrać materiał z powierzchni owoców (np. jabłko, banan, gruszka, śliwka, wiśnie) oraz warzyw (np. pomidor, ogórek, papryka) (ryc. 5.5).
2. Pobrany materiał zawiesić w 10 ml soli fizjologicznej. Wykonać szereg rozcieńczeń dziesiętnych:
 - do probówki nr 1 zawierającej 900 μl soli fizjologicznej przenieść pipetą 100 μl zawiesiny wyjściowej, dokładnie wymieszać. W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1 : 10, oznaczane jako 1;
 - z probówki nr 1 przenieść 100 μl do kolejnej probówki zawierającej 900 μl soli fizjologicznej. W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1 : 100, czyli 2;
 - czynność powtórzyć do uzyskania rozcieńczenia 4 (ryc. 5.6).



Ryc. 5.6. Schemat przygotowania rozcieńczeń dziesiętnych

3. Uzyskane rozcieńczenia wysiać w objętości 100 µl na pożywkę stałą H-S z dodatkiem selektywnych inhibitorów, w celu ograniczenia wzrostu niepożądanych mikroorganizmów jak np. grzyby.
4. Posiany materiał dokładnie rozprowadzić jałową gładką po powierzchni pożywki.
5. W drugim etapie, używając skalpela, odkroić ok. 1 g skórki owocu/warzywa (z jak najmniejszą ilością miąższu), przenieść do probówki zawierającej 20 ml płynnej pożywki H-S z dodatkiem selektywnych inhibitorów i dokładnie wymieszać. Procedurę wykonać pod komora laminarną.
6. Płytki oraz probówki opisać markerem (nr rozcieńczenia; data, imię i nazwisko, nr grupy).
7. Płytki oraz probówki inkubować w temp. 28–30°C przez 7 dni.

Ćwiczenie 5.2

Identyfikacja i charakterystyka bakterii produkujących celulozę

Cel

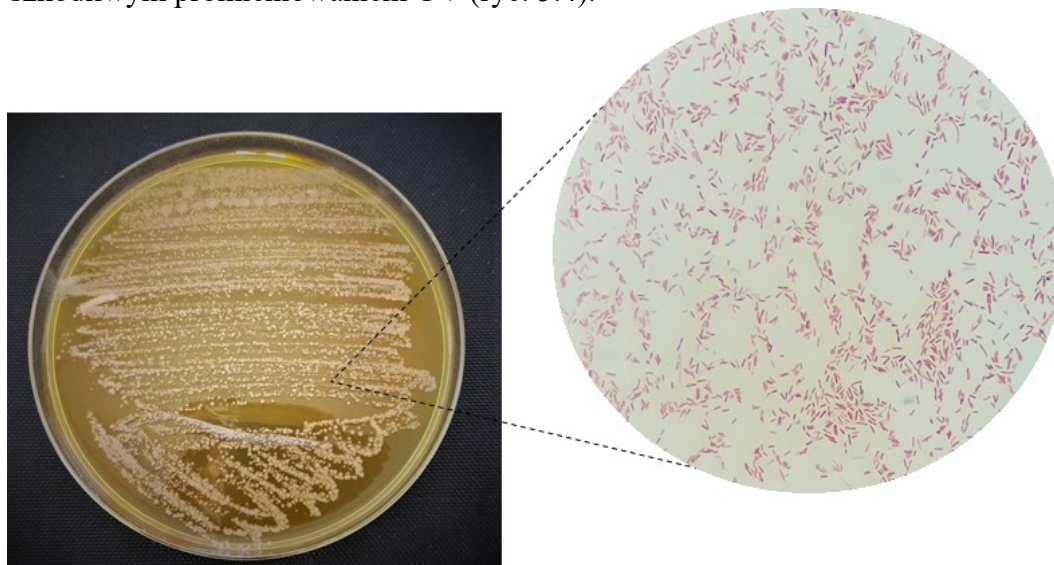
1. Identyfikacja i charakterystyka bakterii produkujących CB.
2. Wyizolowanie czystych kultur bakterii produkujących CB z mieszanych hodowli mikroorganizmów.

Wprowadzenie

W 1886 r. chemik pochodzący z Wielkiej Brytanii, Adrian Brown, odnotował, iż w galaretowatej błonce utworzonej po fermentacji octowej, którą przeprowadzają bakterie *Bacterium xylinum*, kluczowym składnikiem jest właśnie celuloza. Między innymi dzięki temu odkryciu

bakterie kwasu octowego stały się organizmem modelowym służącym do badań nad syntezą celulozy oraz jej funkcji.

Bakterie produkujące celulozę bakteryjną (CB) to **Gram-ujemne, katalazo-, ureazo- i oksydazododatnie, niepatogenne pałeczki** o wymiarach ok. 0,5 μm średnicy i 1–1,5 μm długości. Na pożywce stałej wzrastają w postaci drobnych, lekko wypukłych, mlecznych kolonii o regularnym kształcie (ryc. 5.7). Komórki tej bakterii występują pojedynczo, w parach lub tworzą łańcuszki, mogą również wykazywać zdolność do ruchu, co według ostatnich doniesień może mieć bezpośredni związek z procesem wytwarzania CB. Bakterie zdolne do wytwarzania celulozy wyposażone są w enzym – syntazę celulozową, który katalizuje reakcję polimeryzacji cząsteczek glukozy, zawartych w pożywce hodowlanej, w liniowy polisacharyd – β -1,4 glukan gromadzący się poza komórką. Z takich łańcuchów glukanowych, łączących się w procesie krystalizacji w nanofibryle, zbudowana jest struktura CB. Dzięki celulozie bakterie unoszą się na powierzchni cieczy (np. pożywki hodowlanej), co pozwala im z jednej strony na dostęp do tlenu z powietrza, a z drugiej do substancji odżywczych z pożywki, a ponadto zabezpiecza je przed szkodliwym promieniowaniem UV (ryc. 5.4).



Ryc. 5.7. *K. xylinus* na pożywce stałej i w obrazie mikroskopowym (barwienie Grama, powiększenie 1000 $\times$)

Materialy

Jałowa sól fizjologiczna (0,85-proc. roztwór NaCl); zestaw odczynników do barwienia metodą Grama; 3-proc. roztwór H_2O_2 ; paski testowe na oksydazę; paski testowe na ureazę; szalki Petriego ze stałą pożywką Hestrin-Schramm (H-S); szalki Petriego z półpłynną pożywką H-S; szalki Petriego ze stałą pożywką z mocznikiem i czerwienią fenolową; lupa; pipety; tipsy; szkiełka podstawowe; czy mikrobiologiczne; pęsety; waga analityczna; naczynka wagowe; densytometr; transiluminator UV; inkubator.

Mikroorganizmy

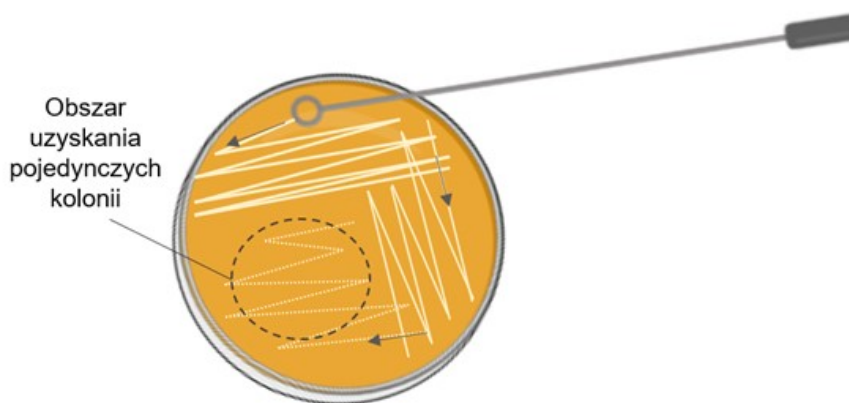
Hodowle mieszane mikroorganizmów produkujących celulozę wyizolowanych z powierzchni owoców i warzyw. Hodowle szczepów wzorcowych *K. xylinus*.

Przebieg ćwiczenia

1. Analiza morfologii kolonii bakteryjnej:

- Dokonać analizy morfologii kolonii bakterii wyizolowanych z powierzchni owoców i warzyw wyrosłych na pożywce stałej H-S. Określić kształt, kolor, profil oraz brzeg

- kolonii. Wyniki uzyskane dla analizowanych izolatów porównać ze szczepami wzorcowymi.
2. Analiza morfologii komórki bakteryjnej:
 - Przygotować preparaty mikroskopowe barwione metodą Grama (zob. s. 70) w celu oceny morfologii komórki wyizolowanych szczepów. Należy wziąć pod uwagę tylko kolonie o morfologii zbliżonej do szczepów wzorcowych *K. xylinus*. Określić kształt, sposób ułożenia komórek i reakcję na barwienie metodą Grama. Wyniki uzyskane dla analizowanych izolatów porównać ze szczepami wzorcowymi.
 3. Analiza właściwości biochemicznych wytypowanych kolonii bakteryjnych:
 - Wykonać test wykrywający oksydazę cytochromową – na pasek reakcyjny nanieść eż analizowaną kolonię – dodatni wynik testu to zabarwienie paska na kolor ciemnobrązowy lub fioletowy, wynik ujemny – brak zmiany zabarwienia.
 - Wykonać test na obecność katalazy – na szkiełko podstawowe nanieść kroplę 3-proc. roztworu H_2O_2 i zawiesić w niej pobraną kolonię, pojawienie się pęcherzyków gazu wskazuje na obecność katalazy.
 - Wykonać test na obecność ureazy – na paski testowe nanieść eż analizowaną kolonię – dodatni wynik testu to zabarwienie paska na kolor czerwony, wynik ujemny – brak zmiany zabarwienia. Dodatkowo bakterie przesiać na pożywkę z mocznikiem i czerwienią fenolową; zmiana barwy pożywki z żółtej na różowoczerwoną świadczy o wytwarzaniu ureazy przez bakterie.
 - Wyniki uzyskane dla analizowanych izolatów porównać ze szczepami wzorcowymi.
 4. Na podstawie uzyskanych wyników wytypować bakterie należące do rodzaju *Komagataeibacter* spp., a następnie przesiać je redukcyjnie na pożywkę stałą H-S (ryc. 5.8). Płytki inkubować w temp. 28–30°C przez 7 dni.



Ryc. 5.8. Schemat wykonania posiewu redukcyjnego

- Po inkubacji płytki zalać 10 ml soli fizjologicznej i inkubować przez 30 minut.
 - Widoczna galaretowata otoczka wokół kolonii świadczy o zdolności wyizolowanych bakterii do produkcji CB.
 - Aby lepiej uwidocznąć CB wokół kolonii, z płytki należy usunąć sól fizjologiczną i zalać 10 ml roztworu barwnika fluorescencyjnego (0,02% w/v, Fluorescent Brightener 28), który wykazuje powinowactwo do biosyntetyzowanej celulozy.
 - Celuloza produkowana przez bakterie wykazuje fluorescencję w trakcie obserwacji w świetle UV (ryc. 5.9).
5. Analiza ruchliwości bakterii *K. xylinus*:
 - Przygotować zawiesinę wyizolowanych bakterii zaklasyfikowanych do rodzaju *Komagataeibacter* spp. o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, co w przybliżeniu odpowiada $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

- Gęstość zawiesiny oznaczyć, wykorzystując densytometr.
- Zaszczepić pożywki półpłynne H-S zawierające 0,6% agaru oraz 2% celulozy, poprzez naniesienie 5 μ l hodowli punktowo na płytkę.
- Inkubować w temp. 28–30°C przez 7 dni.
- Po 7 dniach zmierzyć średnice skupisk kolonii bakteryjnych (ryc. 5.10). Wyniki zinterpretować według poniższego schematu:

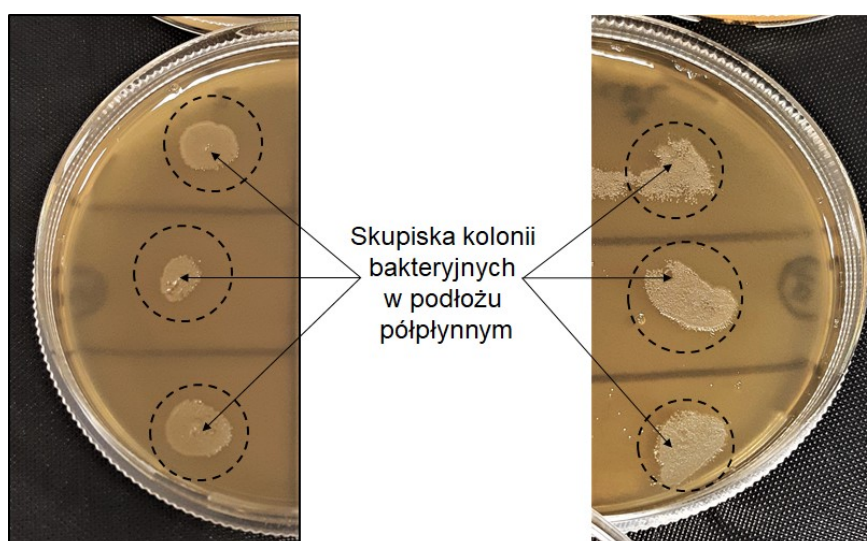
Średnica skupisk kolonii bakteryjnych	Ruchliwość
0,5 cm $\geq$	+
0,6–0,8 cm	++
0,9–1,1 cm	+++
1,2 cm $\leq$	++++

Ruchliwość: + słaba; ++ średnia; +++ dobra; ++++ bardzo dobra

6. W przypadku hodowli w pożywce płynnej (ćw. 5.1 *Izolacja szczepów produkujących CB*, pkt 5), jeśli pojawiła się membrana celulozowa, należy ją usunąć za pomocą pęsety z probówki i zważyć na wadze analitycznej w celu wstępnego oszacowania produktywności wyizolowanego szczepu.



Ryc. 5.9. Celuloza bakteryjna wokół kolonii *K. xylinus*



Ryc. 5.10. Skupiska kolonii bakteryjnych różnych szczepów *K. xylinus* na podłożu półpłynnym H-S

Barwienie metodą Grama

- utrwalone preparaty umieścić w kuwecie do barwienia i zalać roztworem fioletu krystalicznego na 20 sekund;
- delikatnie zmyć barwnik wodą destylowaną;
- zalać preparaty płynem Lugola i pozostawić na 20 sekund;
- zlać płyn Lugola;
- odbarwiać preparaty acetonem (lub 96-proc. etanolem) przez ok. 10–20 sekund, do momentu, aż przestanie wypływać barwnik;
- niezwłocznie spłukać preparaty wodą destylowaną;
- zalać preparaty safraniną na 1 minutę;
- dobrze spłukać preparaty wodą destylowaną i wysuszyć na powietrzu.

Wyniki

1. Uzyskane wyniki wpisać do tabeli 5.1.
2. Na podstawie uzyskanych wyników oraz poczynionych obserwacji wytypować bakterie należące do rodzaju *Komagataeibacter* spp.
3. Zamieścić zdjęcia kolonii oraz preparatów mikroskopowych wyizolowanych bakterii.

Tabela 5.1. Charakterystyka wyizolowanych mikroorganizmów

Analizowane parametry	Wyizolowane mikroorganizmy			
	1	2	3	4
Morfologia kolonii (kształt, kolor, profil, brzeg kolonii, fluorescencja w świetle UV)				
Morfologia komórki (kształt, sposób ułożenia komórek)				
Gram +/–				
Test na katalazę				
Test na oksydazę				
Test na ureazę				
Ruchliwość				
Zdolność do produkcji CB				
Ilość produkowanej CB				

Ćwiczenie 5.3*Metody wytwarzania celulozy bakteryjnej***Cel**

1. Przygotowanie inokulum komórek *K. xylinus*.
2. Ocena efektywności produkcji i właściwości CB w zależności od metody i parametrów hodowli oraz zastosowanego szczepu *K. xylinus*.

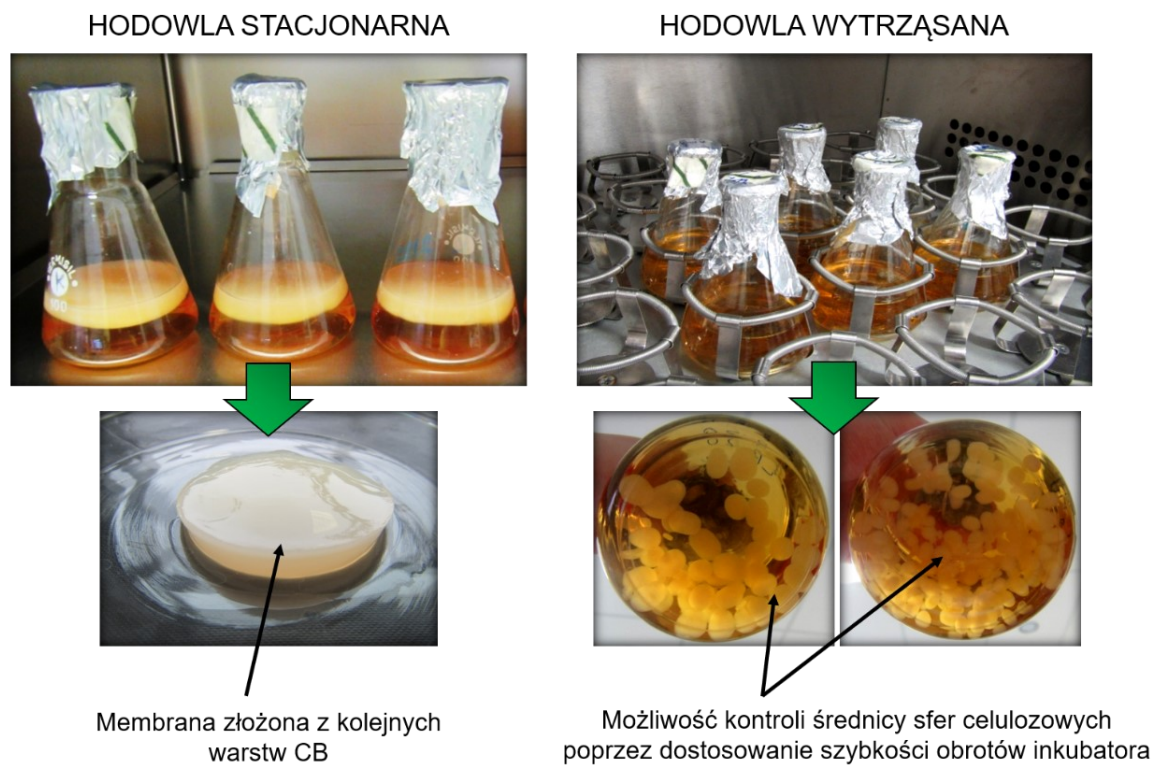
Wprowadzenie

Wydajność i opłacalność produkcji oraz właściwości CB uzależnione są od warunków hodowlanych, w tym przede wszystkim od: **temperatury, pH, napowietrzania, parametrów mieszania, od szczepu *K. xylinus* oraz długości i sposobu prowadzenia hodowli.**

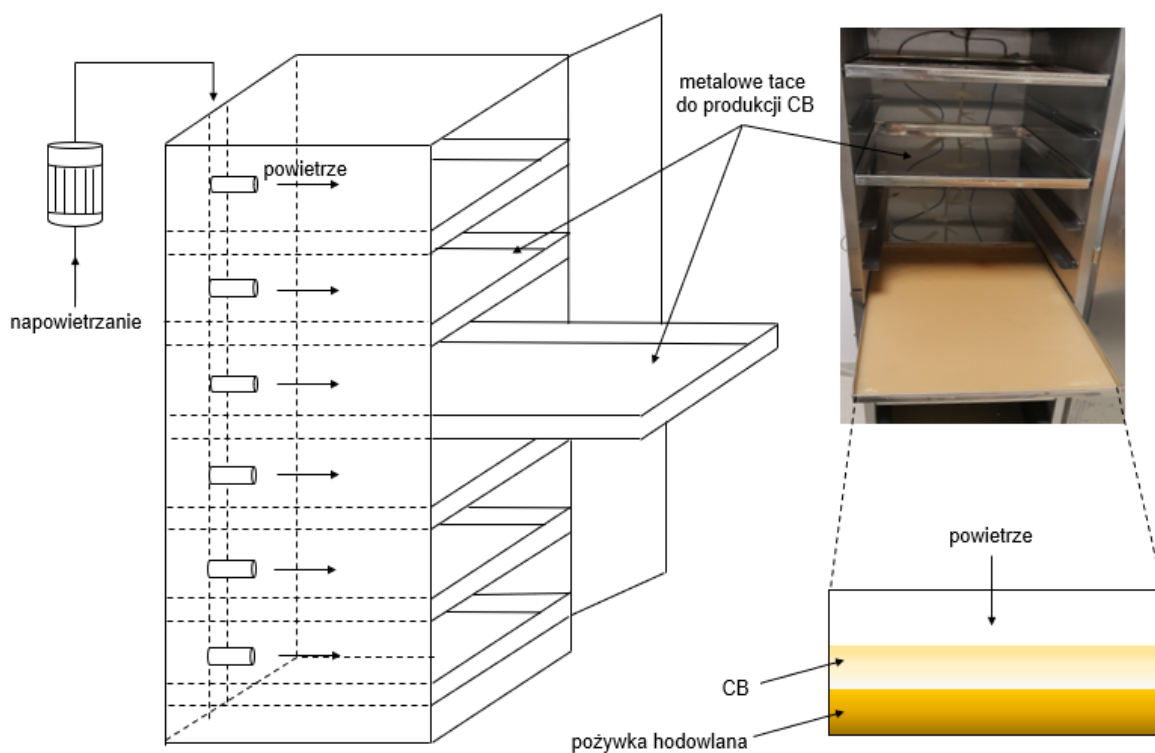
Jedną z powszechnie stosowanych metod hodowli przy produkcji CB są **hodowle powierzchniowe**, w trakcie których wytwarzanie polimeru odbywa się na dużych powierzchniach pożywek stałych bądź płynnych (ryc. 5.11). Ten rodzaj hodowli bakterii stosowany jest przede wszystkim w celu uzyskania CB w formie płaskiej i elastycznej membrany o jednorodnej strukturze i zdefiniowanej grubości. W skali laboratoryjnej ten rodzaj produkcji przeprowadzany jest w naczyniach zapewniających dużą powierzchnię swobodną pożywki hodowlanej/produkcyjnej. Powszechnie stosowanymi naczyniami zapewniającymi powyższe warunki są płytki Petriego, kolby oraz zlewki. Na skalę przemysłową produkcję metodami statycznymi przeprowadza się w wielolitrowych tacach, kuwetach i wannach ociekowych wypełnionych pożywką, na powierzchni której formuje się membrana celulozowa (ryc. 5.12). Innym wariantem hodowli w warunkach statycznych są hodowle okresowe z wykorzystaniem wielolitrowych fermentorów. W tego typu hodowli, określanej terminem **hodowli wsadowej**, następuje okresowe uzupełnianie świeżej pożywki oraz okresowe pobieranie wytworzonej CB z powierzchni pożywki hodowlanej. Kolejnym przykładem hodowli statycznej są hodowle kultur bakteryjnych prowadzone w tzw. **reaktorach aerozolowych**. W tego typu reaktorach składniki odżywcze dla komórek bakteryjnych są natryskiwane w kierunku prostopadłym do płaskiej powierzchni przesuwającej się taśmy, na której następuje formowanie się błony celulozowej. W przypadku produkcji CB statycznymi metodami powierzchniowymi intensywność syntezy tego polimeru jest istotnie ograniczona ilością tlenu docierającego do powierzchni pożywki.

Odminnym sposobem produkcji jest wytwarzanie CB w warunkach **hodowli wytrząsanych** (ryc. 5.11). Prowadzenie hodowli metodą wytrząsaną ma na celu wprowadzenie do pożywki dodatkowych ilości powietrza. Napowietrzenie jest jednym z głównych zabiegów technologicznych mających na celu poprawę wydajności produkcji CB. W warunkach hodowli wytrząsanych, w których wykorzystywane są pożywki ciekłe, bakterie wytwarzają CB w postaci **kulek** o włóknistych nieregularnych brzegach. Produkcję CB metodą wytrząsaną prowadzi się zazwyczaj w szklanych kolbach stożkowych (np. Erlenmeyera), które umieszczone są w inkubatorach z wytrząsaniem. Tego typu hodowle prowadzi się zazwyczaj przy 10–50-proc. wypełnieniu kolb pożywką hodowlaną, najczęściej przy szybkości obrotowej od 100–200 obrotów/min. oraz w zakresie temperatur 28–30°C w czasie 72–150 godz. Poprzez zmianę każdego z tych parametrów można wpływać na przebieg produkcji CB oraz dostosowywać warunki biosyntezy do konkretnego rodzaju bakterii, jak również do właściwości i planowanych do uzyskania cech fizykochemicznych wytwarzanego biomateriału.

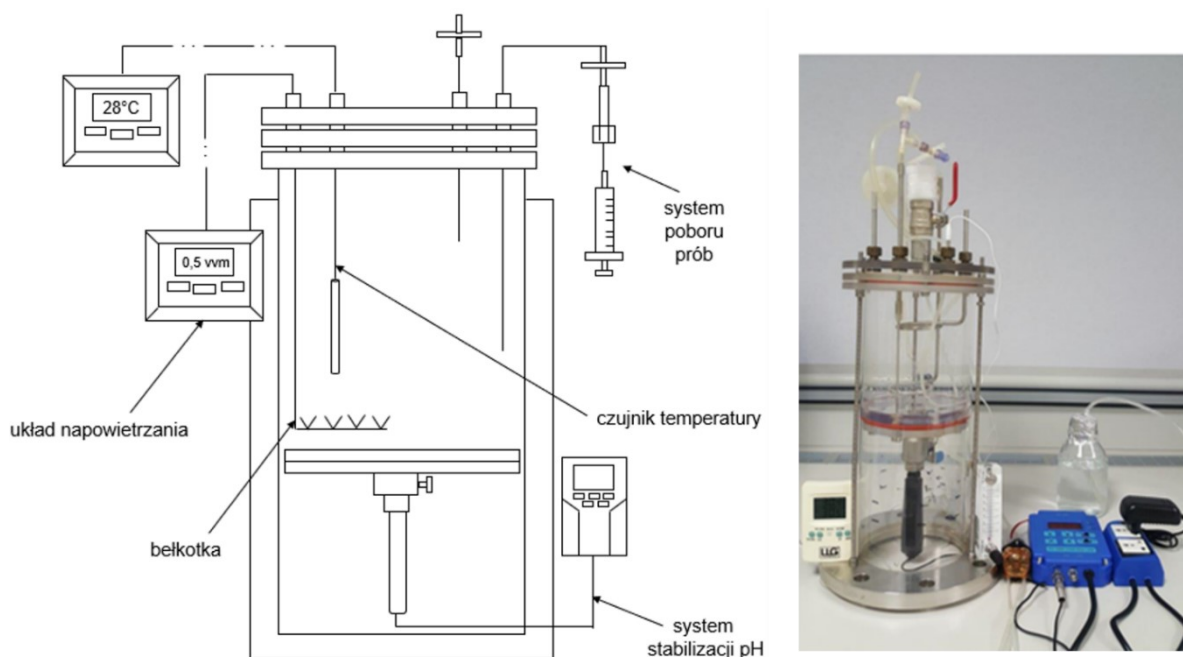
Kolejnym powszechnie stosowanym rodzajem hodowli bakterii produkujących CB są **hodowle wgłębne**, prowadzone w bioreaktorach mikrobiologicznych z wykorzystaniem płynnych pożywek hodowlanych (ryc. 5.13). Hodowle w bioreaktorach przeprowadzane są w celu osiągnięcia większej wydajności procesu biosyntezy. Proces syntezy CB można realizować w aparatach wyposażonych w **mieszadło mechaniczne** lub w **kolumnach typu air-lift**, w których cyrkulacja pożywki hodowlanej wymuszona jest przepływem powietrza (ryc. 5.14). Znane są również metody wytwarzania tego biopolimeru z wykorzystaniem **bioreaktorów przepływowych, dyskowych** oraz **wspomaganych polem magnetycznym**. Wybór metody hodowli jest ściśle powiązany z dalszym przeznaczeniem CB. Należy jednak pamiętać, że nieprawidłowo dobrane parametry mieszania i/lub napowietrzania mogą prowadzić do powstawania **mutantów nieprodukujących celulozy (Cel⁻)**.



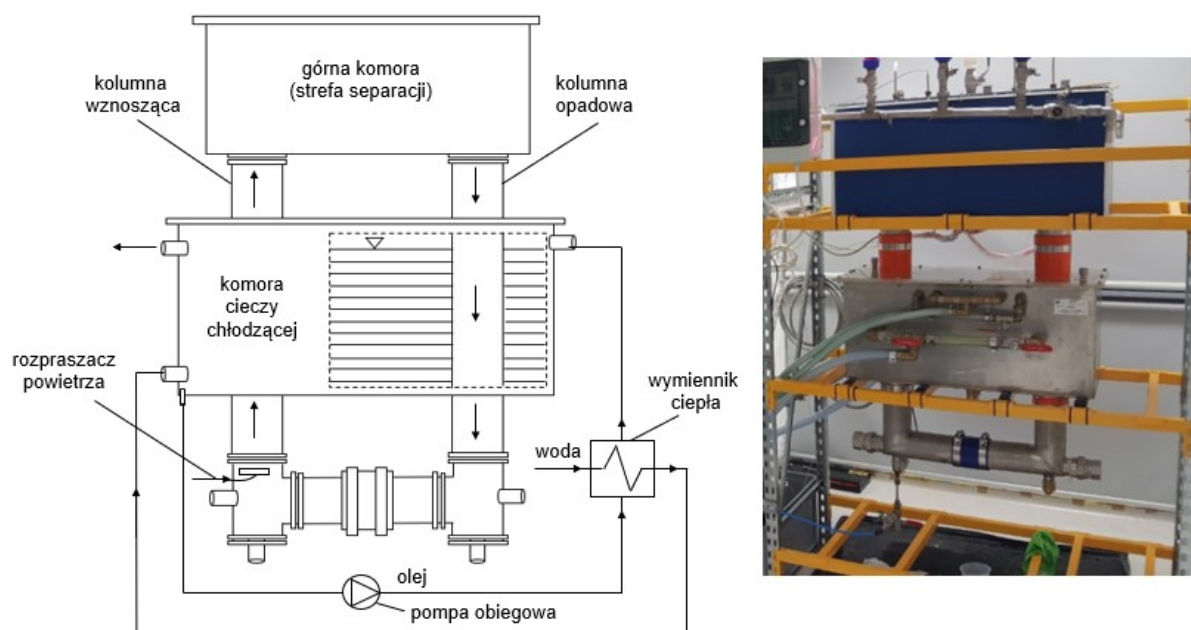
Ryc. 5.11. Biosynteza CB w hodowli stacjonarnej i wytrząsanej



Ryc. 5.12. Inkubator do produkcji CB w hodowli stacjonarnej



Ryc. 5.13. Bioreaktor do produkcji CB w hodowli napowietrzanej



Ryc. 5.14. Bioreaktor typu air-lift do półprzemysłowej produkcji CB

Materialy

Płynna pożywka Hestrin-Schramm (H-S); próbówki z filtrem o porach średnicy 0,22 μm ; statywy na próbówki; kolby Erlenmeyera; naczynia fermentacyjne; cylindry miarowe; pipety; tipsy; pH-metr; suwmiarka; miernik grubości; waga analityczna; naczynka wagowe; inkubator; inkubator z wytrząsaniem; densytometr; łaźnia wodna; komora laminarna.

Mikroorganizmy

Szczepy wzorcowe *K. xylinus*.

Przebieg ćwiczenia

Przygotowanie inokulum

1. Płynną pożywkę H-S należy zaszczerpić, pobierając 1 kolonię bakteryjną z pożywki stałej, 10 μ l z bulionu glicerolowego lub 1 koralik z mikrobanku, w zależności od metody przechowywania drobnoustrojów, jaką stosuje się w laboratorium.
2. Tak przygotowaną hodowlę należy prowadzić w warunkach stacjonarnych lub mieszanych w temp. 28–30°C, przez 4–20 dni, przy pH pożywki 6, w pojemnikach szklanych, plastikowych bądź metalowych (wykonanych ze stali nierdzewnej) wyposażonych w pokrywki umożliwiające dostęp powietrza, np. posiadających filtry membranowe o porach średnicy 0,22 μ m.
3. Po okresie inkubacji należy energicznie wytrząsać hodowlę przez 5 min w celu uwolnienia do pożywki komórek bakteryjnych z utworzonej błony celulozowej.
4. Należy uzyskać zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, co w przybliżeniu odpowiada $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.
5. Gęstość zawiesiny należy oznaczyć, wykorzystując densytometr.

Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum

1. Naczynia hodowlane (probówki) uzupełnić 20 ml wysterylizowanej płynnej pożywki H-S.
2. Zaszczerpić pożywkę, stosując wcześniej przygotowane inokulum wybranego wzorcowego szczepu *K. xylinus* w objętości 0,5% v/v, 1% v/v, 2% v/v, 5% v/v, 10% v/v, 20% v/v.
3. Probówki opisać markerem (data, imię i nazwisko, nr grupy).
4. Probówki inkubować przez 7 dni w temp. 28–30°C.
5. Po inkubacji należy zważyć mokrą CB na wadze analitycznej, zmierzyć jej grubość suwmiarką oraz zmierzyć pH pożywki.
6. Mokrą CB należy 3-krotnie przepłukać w wodzie destylowanej, a następnie umieścić na folii teflonowej i wysuszyć w suszarce laboratoryjnej w temp. 60°C.
7. Po wysuszeniu określić wagę suchej CB na wadze analitycznej oraz zmierzyć jej grubość, wykorzystując w tym celu miernik grubości.

*Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od szczepu *K. xylinus**

1. Naczynia hodowlane (probówki) uzupełnić 20 ml wysterylizowanej płynnej pożywki H-S.
2. Zaszczerpić pożywkę, stosując wcześniej przygotowane inokulum wybranych wzorcowych szczepów *K. xylinus* w objętości 1% v/v.
3. Probówki opisać markerem (data, imię i nazwisko, nr grupy).
4. Probówki inkubować przez 7 dni w temp. 28–30°C.
5. Po inkubacji należy określić grubość, wagę mokrej i suchej CB oraz zmierzyć pH pożywki, jak opisano w pkt 5–7 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*.

Produkcja CB w hodowli wytrząsanej w zależności od prędkości mieszania

1. Naczynia hodowlane (kolby Erlenmeyera) uzupełnić 20 ml wysterylizowanej płynnej pożywki H-S.
2. Zaszczerpić pożywkę, stosując wcześniej przygotowane inokulum wybranego wzorcowego szczepu *K. xylinus* w objętości 1% v/v.
3. Kolby opisać markerem (data, imię i nazwisko, nr grupy).
4. Kolby inkubować przez 4 dni w temp. 28–30°C w cieplarni z wytrząsaniem przy prędkości 100, 150 i 200 RPM (ang. *revolutions per minute*; obroty na minutę).
5. Po inkubacji należy określić wagę mokrej i suchej CB oraz zmierzyć pH pożywki, jak opisano w pkt. 5–7 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*.

Produkcja CB w hodowli napowietrzanej w zależności od przepływu powietrza

1. Naczynia fermentacyjne do hodowli napowietrzanej (ryc. 5.13) uzupełnić 1 l wysterylizowanej płynnej pożywki H-S.
2. Zaszczepić pożywkę, stosując wcześniej przygotowane inokulum wybranego wzorcowego szczepu *K. xylinus* w objętości 1% v/v.
3. Naczynia hodowlane inkubować przez 5 dni w łaźni wodnej w temp. 28–30°C z napowietrzaniem 0,1 oraz 1 vvm (szybkość napowietrzania wyrażona w litrach powietrza na min na litr naczynia hodowlanego [$l / min \times l$]).
4. Po inkubacji należy określić wagę mokrej i suchej CB oraz zmierzyć pH pożywki, jak opisano w pkt 5–7 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*.

Wyniki

1. Uzyskane wyniki wpisać do tabel 5.2–5.5.
2. Na podstawie wyników ocenić i porównać efektywność produkcji CB (g suchej masy na 1 pożywkę) w zależności od ilości inokulum, szczepu *K. xylinus*, szybkości mieszania, przepływu powietrza oraz rodzaju hodowli.
3. Porównać jakość CB uzyskanej z hodowli stacjonarnej, wytrząsanej i napowietrzanej.
4. Wykonać zdjęcia CB uzyskanej w hodowli stacjonarnej, wytrząsanej i napowietrzanej.

Tabela 5.2. Wyniki uzyskane dla procesu prowadzonego w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum

Analizowane parametry	Objętość inokulum (% v/v)					
	0,5	1	2	5	10	20
Mokra CB (g)						
Grubość CB (mm)						
Sucha CB (mg)						
pH pożywki						
Efektywność procesu (g/l)						

Tabela 5.3. Wyniki uzyskane dla procesu prowadzonego w hodowli stacjonarnej w zależności szczepu *K. xylinus*

Analizowane parametry	Szczep <i>K. xylinus</i>					
	1	2	3	4	5	6
Mokra CB (g)						
Grubość CB (mm)						
Sucha CB (mg)						
pH pożywki						
Efektywność procesu (g/l)						

Tabela 5.4. Wyniki uzyskane dla procesu prowadzonego w hodowli wytrząsanej w zależności od prędkości mieszania

Analizowane parametry	Prędkość mieszania (RPM)		
	100	150	200
Mokra CB (g)			
Sucha CB (mg)			
pH pożywki			
Efektywność procesu (g/l)			

Tabela 5.5. Wyniki uzyskane dla procesu prowadzonego w hodowli napowietrzanej w zależności od przepływu powietrza

Analizowane parametry	Przepływ powietrza (vvm)	
	0,1	1
Mokra CB (g)		
Sucha CB (mg)		
pH pożywki		
Efektywność procesu (g/l)		

Wnioski

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.4

Optimalizacja składu pożywki do produkcji celulozy bakteryjnej

Cel

Ocena efektywności produkcji CB w zależności od rodzaju i składu pożywki hodowlanej.

Wprowadzenie

Ukierunkowana manipulacja warunkami, w których prowadzona jest hodowla *K. xylinus*, umożliwia uzyskanie biomateriału o odmienionych właściwościach fizykochemicznych. Modyfikacjom może podlegać również skład pożywki hodowlanej lub/i pożywki produkcyjnej. Pożywki stosowane w mikrobiologicznych procesach wytwarzania mogą być zdefiniowane chemicznie, co oznacza, że tworzą je substraty o znanych stężeniach. Pożywki niezdefiniowane składają się z komponentów pochodzenia naturalnego o nieznanym stężeniu. Proces wytwarzania CB przeprowadza się najczęściej z użyciem pożywek zawierających takie składniki jak cukier (glukoza, fruktoza, sacharoza, mannitol) jako źródło węgla, związki kompleksowe zawierające azot oraz źródła witamin takie jak ekstrakt drożdżowy czy pepton. Dowiedziono, że rodzaj użytych składników pożywek determinuje efektywność procesu biosyntezy CB, ponieważ zwykle preferencje dotyczące tych komponentów zależą od konkretnych szczepów produkcyjnych. Potwierdzono również, że stopień polimeryzacji CB jest w dużym stopniu zależny od odczynu środowiska hodowlanego, w jakim następuje namnażanie bakterii i jej synteza. Obserwacja ta ma istotne znaczenie dla procesu wytwarzania CB o określonych właściwościach wytrzymałościowych. Wykazano także, że wytrzymałość mechaniczna CB wzrasta wraz z obniżeniem odczynu. Związane jest to z obniżoną aktywnością w zakresie pH 4–4,5 bakteryjnych enzymów hydrolitycznych (takich jak celulazy), które zmniejszają stopień polimeryzacji CB poprzez jej rozkład na celobiozę (dimer glukozy) i celotriozę (3-glukozową celulodekstrynę), a następnie na pojedyncze cząsteczki glukozy.

Standardową pożywką, zdefiniowaną chemicznie i używaną do hodowli mikroorganizmów syntetyzujących celulozę, jest Hestrin-Schramm (H-S), zawierająca w swoim składzie glukozę (2% w/v), ekstrakt drożdżowy (0,5% w/v), pepton bakteryjny (0,5% w/v), kwas cytrynowy (0,115% w/v), Na₂HPO₄ (0,27% w/v), MgSO₄·H₂O (0,05% w/v). Nie jest to jednak jedyna dostępna komercyjnie pożywka. Wyróżnia się również pożywkę HSA, zawierającą w swoim składzie kwas askorbinowy, pożywkę Hassid-Barker (HB), pożywki YPD, GYB, AHS, Yamanaka, Zhou, Son, Park, M1A05P5, CSL z fruktozą, pożywkę fermentacyjną FM, buforowaną octanem (AB) i inne (tab. 5.6).

Należy pamiętać, że rodzaj i skład pożywki powinien zostać indywidualnie zoptymalizowany w zależności od szczepu *K. xylinus*, warunków prowadzonego procesu i przeznaczenia uzyskanego biomateriału.

Tabela 5.6. Kompozycja komercyjnych pożywek dla bakterii produkujących CB

Typ pożywki	Składniki						
AB	glukoza (20–60 g/l)	ekstrakt drożdżowy (5 g/l)	pepton (5 g/l)	C ₂ H ₃ NaO ₂ (5,772 g/l)	CH ₃ COOH (1,778 g/l)	–	–
AHS	glukoza (50 g/l)	ekstrakt drożdżowy (4 g/l)	etanol (20 g/l)	K ₂ HPO ₄ (2 g/l)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (0,73 g/l)	–	–
CSL	fruktoza (40 g/l)	ług kukurydziany (20 ml/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (3,3 g/l)	K ₂ HPO ₄ (1 g/l)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (0,25 g/l)	FeSO ₄ · 7H ₂ O (0,0036 g/l)	CaCl ₂ · 2H ₂ O (0,0147 g/l)
FM	glukoza (15 g/l)	ekstrakt mięsny (3 g/l)	pepton (5 g/l)	NaCl (5 g/l)	–	–	–
GYB	glukoza (20 g/l)	ekstrakt drożdżowy (5 g/l)	–	–	–	–	–
HB	sacharoza (100 g/l)	ekstrakt drożdżowy (2,5 g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (8,25 g/l)	K ₂ HPO ₄ (5 g/l)	MgSO ₄ (2 g/l)	CaSO ₄ (2,5 g/l)	–
H-S	glukoza (20 g/l)	ekstrakt drożdżowy (5 g/l)	pepton (5 g/l)	Na ₂ HPO ₄ (2,7 g/l)	kwas cytrynowy (1,115 g/l)	–	–
HSA	glukoza (20 g/l)	ekstrakt drożdżowy (5 g/l)	pepton (5 g/l)	Na ₂ HPO ₄ (2,7 g/l)	kwas cytrynowy (1,115 g/l)	Wit. C (5 g/l)	–
M1A05P5	glukoza (10 g/l)	ekstrakt drożdżowy (10 g/l)	pepton (7 g/l)	CH ₃ COOH (1,5 ml/l)	etanol (1,5 ml/l)	–	–
Park	glukoza (10 g/l)	ekstrakt drożdżowy (7 g/L)	pepton (10 g/l)	CH ₃ COOH (1,5 ml/l)	kwas bursztynowy (2 g/l)	–	–
Son	glukoza (15 g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (2 g/l)	K ₂ HPO ₄ (3 g/l)	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (3 g/l)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (0,8 g/l)	etanol (6 ml/l)	nikotynamid (0,0005 g/l)
Yamanaka	sacharoza (50 g/l)	ekstrakt drożdżowy (5 g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (5 g/l)	K ₂ HPO ₄ (3 g/l)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (0,05 g/l)	–	–
YPD	glukoza (20 g/l)	ekstrakt drożdżowy (5 g/l)	pepton (5 g/l)	–	–	–	–
Zhou	glukoza (18 g/l)	sacharoza (21 g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (4 g/l)	ług kukurydziany (20 g/l)	K ₂ HPO (2 g/l)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (0,4 g/l)	–

Materialy

Glukoza; sacharoza; skrobia; glicerol; pepton; woda destylowana; probówki z filtrem o porach średnicy 0,22 µm; statywy na probówki; butelki; cylindry miarowe; pipety; tipsy; suwmiarka; miernik grubości; waga analityczna; naczynka wagowe; densytometr; pH-metr; komora laminarna; inkubator.

Przebieg ćwiczenia

Przygotowanie pożywek hodowlanych

1. Naważyć 20 g glukozy, sacharozy, skrobi lub glicerolu (źródło węgla) oraz 10 g peptonu (źródło azotu) i wsypać do szklanych butelek. Każda pożywka powinna zawierać w swoim składzie inne źródło węgla oraz pepton jako źródło azotu.
2. Do szklanych butelek dodać 1 l wody destylowanej (ilość wody odmierzyć, wykorzystując cylinder miarowy). Wszystkie składniki dokładnie wymieszać.
3. Po rozpuszczeniu wszystkich składników zmierzyć pH pożywek i doprowadzić za pomocą NaOH lub HCl do wartości 6.
4. Wysterylizować pożywki w autoklawie przez 20 minut w temp. 121°C.

Założenie hodowli

1. Do probówek dodać 20 ml płynnej pożywki hodowlanej, w której źródłem węgla jest glukoza, sacharoza, skrobia lub glicerol.
2. Przygotować inokulum wybranego wzorcowego szczepu *K. xylinus* według instrukcji w ćw. 5.3 *Przygotowanie inokulum*.
3. Wysterylizowaną płynną pożywkę hodowlaną należy zaszczyć przygotowanym inokulum w objętości 1% v/v.
4. Probówki opisać markerem (data, imię i nazwisko, nr grupy).
5. Probówki inkubować przez 7 dni w temp. 28–30°C.
6. Po inkubacji należy określić grubość, wagę mokrej i suchej CB oraz zmierzyć pH pożywki, jak opisano w ćw. 5.3 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*, pkt 5–7.

Wyniki

1. Uzyskane wyniki wpisać do tabeli 5.7.
2. Na podstawie wyników ocenić i porównać efektywność produkcji CB (gram suchej masy na litr pożywki) w zależności od składu pożywki.
3. Wykonać zdjęcia CB uzyskanej w hodowli stacjonarnej z wykorzystaniem pożywek hodowlanych o różnym składzie.

Tabela 5.7. Wyniki uzyskane dla procesu prowadzonego w hodowli stacjonarnej z wykorzystaniem pożywek hodowlanych o różnym składzie

Analizowane parametry	Źródło węgla			
	glukoza	sacharoza	skrobia	glicerol
Waga mokrej CB (g)				
Grubość CB (mm)				
Waga suchej CB (mg)				
pH pożywki				
Efektywność procesu (g/l)				

Wnioski

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.5

Biosynteza celulozy bakteryjnej z wykorzystaniem surowców naturalnych, w tym produktów odpadów przemysłu rolno-spożywczego

Cel

1. Przygotowanie pełnowartościowej pożywki hodowlanej z zastosowaniem surowców naturalnych.
2. Przeprowadzanie procesu produkcji CB na drodze hodowli stacjonarnej z zastosowaniem pożywki na bazie surowców naturalnych.
3. Porównanie efektywności procesu produkcji CB uzyskanej w hodowlach prowadzonych z wykorzystaniem pożywki na bazie surowców naturalnych oraz komercyjnej pożywki H-S.

Wprowadzenie

Niezwykle duży potencjał aplikacyjny CB, determinowany przez jej unikatowe właściwości, wiąże się z ciągle rosnącym zapotrzebowaniem na ten bionanomateriał. Mimo to produkcja CB na skalę przemysłową jest wciąż stosunkowo niewielka, co ma związek przede wszystkim z jej wysokimi kosztami.

Pożywka jest czynnikiem najbardziej wpływającym na koszt procesu produkcji CB, a tym samym na ostateczną cenę tego biomateriału jako produktu w przemyśle. Szacuje się, że koszt pożywki produkcyjnej stanowi 50–65% całkowitych wydatków w procesie fermentacyjnym. Zatem kluczowym aspektem w syntezie tego biopolimeru jest dążenie do zastosowania taniej pożywki produkcyjnej, która dodatkowo powinna umożliwić zwiększenie efektywności procesu biosyntezy CB, co pozwoli na stworzenie ekonomicznie korzystnego rozwiązania do zastosowania w szerokim zakresie dziedzin nauki i przemysłu. Jako surowce do produkcji pożywki można rozpatrywać wszelkiego rodzaju **warzywa, owoce czy ekstrakty roślinne**. Mogą stanowić one tanie źródło substancji odżywczych dla bakterii. Jednak w ostatnim dziesięcioleciu, obok poważnych globalnych problemów środowiskowych, gospodarczych i energetycznych, podnosi się również znaczenie zrównoważonego wykorzystania odpadów przemysłowych. Naukowcy, wykorzystując postępy w technikach biotechnologicznych i obecne podejście do „czystych” technologii, koncentrują się na zwiększeniu wykorzystania odpadów rolnych i przemysłowych jako nowych źródeł odżywczych dla bakterii syntetyzujących celulozę. Oprócz taniej i wydajnej produkcji CB ma to również na celu uczynienie tego przemysłu bardziej **ekologicznym** (poprzez gospodarowanie odpadami i oczyszczanie środowiska), a całą technologię produkcji bardziej „zieloną”. Połączenie technologii wytwarzania CB z wykorzystaniem surowców stanowiących **produkty uboczne przemysłu** stanowi korzyść dla obu tych gałęzi, wynikającą również z rosnącej świadomości ekologicznej i zapotrzebowania na tego typu rozwiązania.

Na przykład **sok z bulw ziemniaków** może być pozyskiwany z procesu technologicznego produkcji krochmalu, w którym stanowi odpad organiczny, powstający w wyniku oddzielania miazgi ziemniaczanej za pomocą wirówek miazgowych. Składa się on zarówno z minerałów (1%), jak i substancji organicznych (4%) – przede wszystkim białek (2%). Pozostałe substancje organiczne to głównie witaminy – B1, B2, B6, PP, C i E. Dzięki zastosowaniu pożywki wytworzonej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków możliwe jest wytworzenie CB przy znacznie niższym nakładzie finansowym w porównaniu ze standardowymi, najczęściej stosowanymi do produkcji CB pożywkami mikrobiologicznymi na bazie peptonu i ekstraktu drożdżowego, np. pożywką Hestrin-Schramm (H-S).

Materiały

Owoce i warzywa; płynna pożywka Hestrin-Schramm (H-S); woda destylowana; obieraczka do owoców/warzyw; probówki z filtrem o porach średnicy 0,22 μm ; statywy na probówki; cylinder miarowy; butelki szklane; zlewki; wysokoobrotowa sokowirówka; suwmiarka; miernik grubości; pH-metr; sitka; komora laminarna; inkubator.

Mikroorganizmy

Szczepy wzorcowe *K. xylinus*.

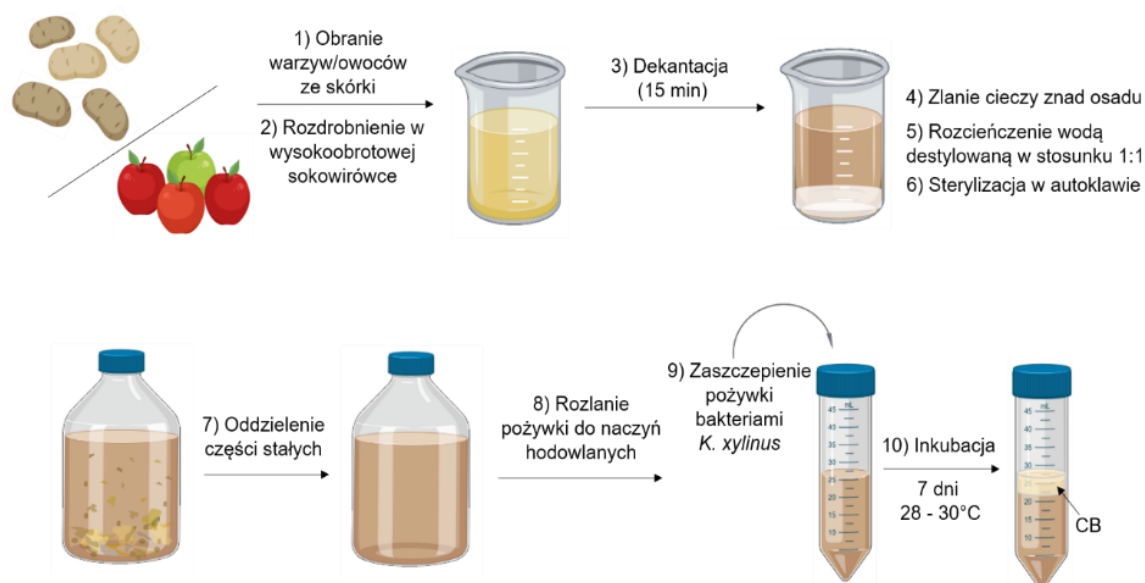
Przebieg ćwiczenia

Przygotowanie pożywki hodowlanej/produkcyjnej

1. Owoce i warzywa należy obrać ze skórki i rozdrobnić, wykorzystując w tym celu wysokoobrotową sokowirówkę lub wirówkę miazgową.
2. Uzyskany sok komórkowy należy pozostawić w temperaturze pokojowej przez 15 minut w celu dekantacji części stałych.
3. Zdekantowany sok komórkowy rozcieńczyć wodą destylowaną w proporcji 1 : 1 (sok do wody) i zmierzyć wyjściowe pH pożywki.
4. Uzyskany roztwór poddać procesowi sterylizacji (15 minut, temp. 121°C).
5. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej należy oddzielić części stałe w celu otrzymania klarownej pożywki, zachowując przy tym zasady aseptyki (ryc. 5.15).

Produkcja CB w hodowli stacjonarnej

1. Do probówek dodać 20 ml przygotowanej pożywki hodowlanej lub komercyjnej pożywki H-S.
2. Przygotować inokulum wybranego wzorcowego szczepu *K. xylinus* według instrukcji w ćw. 5.3 *Przygotowanie inokulum*.
3. Wysterylizowaną płynną pożywkę należy zaszczyć przygotowanym inokulum w objętości 1% v/v.
4. Probówki opisać markerem (data, imię i nazwisko, nr grupy).
5. Probówki inkubować przez 7 dni w temp. 28–30°C.
6. Po inkubacji należy określić grubość, wagę mokrej i suchej CB oraz zmierzyć pH pożywki, jak opisano w ćw. 5.3 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*, pkt 5–7.



Ryc. 5.15. Schemat przygotowania pożywki do produkcji CB na bazie surowców naturalnych

Wyniki

1. Uzyskane wyniki wpisać do tabeli 5.8.
2. Na podstawie otrzymanych wyników ocenić efektywność procesu (gram suchej masy na litr pożywki) w zależności od użytej pożywki hodowlanej.
3. Wykonać zdjęcia CB uzyskanej w hodowli stacjonarnej z wykorzystaniem pożywek na bazie surowców naturalnych i pożywki komercyjnej H-S.

Tabela 5.8. Wyniki uzyskane dla procesu prowadzonego w hodowli stacjonarnej z wykorzystaniem pożywek na bazie surowców naturalnych oraz komercyjnej pożywki H-S

Analizowane parametry	Rodzaj pożywki	
	pożywka na bazie surowców naturalnych	pożywka komercyjna H-S
Waga mokrej CB (g)		
Grubość CB (mm)		
Waga suchej CB (mg)		
pH pożywki		
Efektywność procesu (g/l)		

Wnioski

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.6

Proces oczyszczania celulozy bakteryjnej

Cel

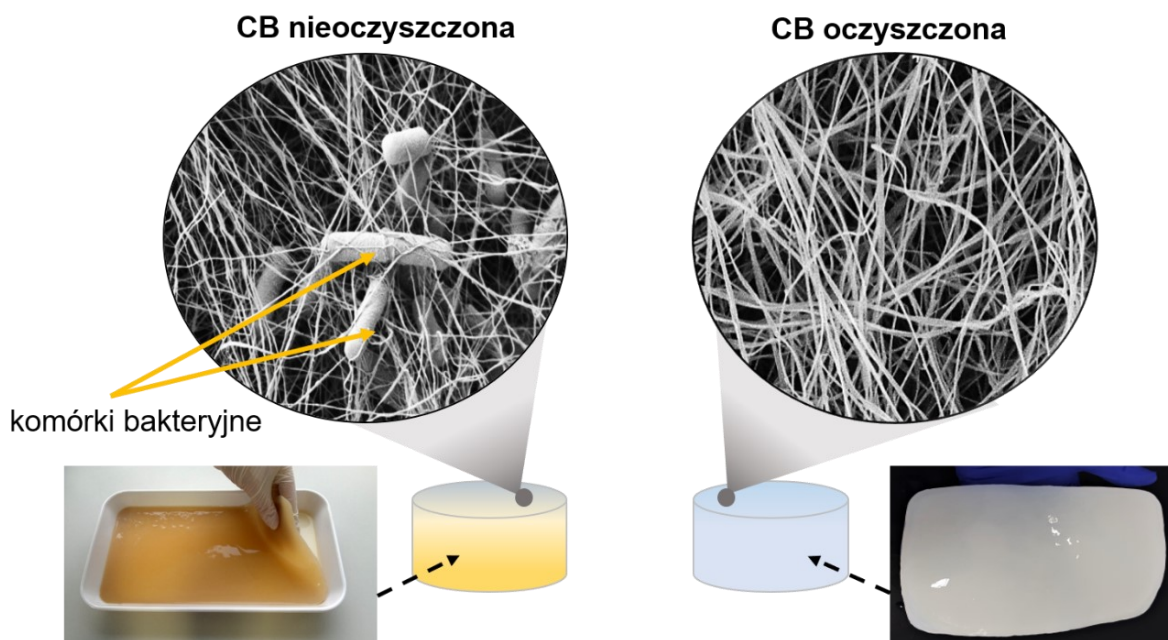
1. Oczyszczenie membrany celulozowej po procesie biosyntezy.
2. Ocena skuteczności zastosowanej metody oczyszczania CB.

Wprowadzenie

W przeciwieństwie do nieprzetworzonej celulozy roślinnej celuloza produkowana przez bakterie (CB) pod względem chemicznym jest ultraczystym materiałem, który przede wszystkim nie zawiera lignin, pektyn i hemiceluloz. Niemniej jednak po zakończonym procesie biosyntezy membrana CB zawiera pewną ilość **zanieczyszczeń pofermentacyjnych**, w tym przede wszystkim wytwarzających ją **komórek bakteryjnych i składników pożywki hodowlanej** (ryc. 5.16). Dlatego też po procesie biosyntezy CB poddaje się procesowi oczyszczania. Jest to szczególnie istotne ze względu na dalsze wykorzystanie otrzymanego bionanomateriału, np. w celach medycznych (wywarzanie opatrunków na uszkodzenia skóry, implantów dla chirurgii rekonstrukcyjno-odtwórczej), a także dlatego, że bakterie produkujące bionanocelulozę – *K. xylinus*, jak wszystkie bakterie Gram-ujemne, w strukturze swojej ściany komórkowej zawierają endotoksynę – **lipopolisacharyd (LPS)**. Najczęściej w celu oczyszczenia CB wytworzoną błonę przemywa się wodą destylowaną oraz namacza w 0,1-molowym **NaOH** w temp. 80°C przez 1 godzinę. W powyższych warunkach następuje hydroliza zanieczyszczeń organicznych (w tym przede wszystkim komórek bakteryjnych). Po usunięciu komórek bakteryjnych i pozostałości pożywki hodowlanej uformowane maty CB ponownie kilkakrotnie przemywa się wodą destylowaną, aby całkowicie usunąć pozostałości ługu sodowego i tym samym nadać błonie nanocelulozowej odczyn obojętny (ryc. 5.16).

Etapy oddzielania i oczyszczania CB mogą być modyfikowane i obejmować (w zależności od grubości, powierzchni i dalszego zastosowania materiału): oddzielenie od cieczy pochodzącej poprzez filtrację, wyżymanie lub przemywanie wodą, a następnie usunięcie komórek bakterii związanych z fibrylami celulozowymi lub na nich zaadsorbowanych, przy zastosowaniu merceryzacji wodorotlenkiem sodu o stężeniu 0,1–1 M, w temp. 60–100°C, w czasie od kilkunastu minut do nawet kilkunastu godzin. W ostatnim etapie CB zostaje poddana płukaniu w wodzie destylowanej, aż do uzyskania przez materiał pH w zakresie 6,5–7,5, przy czym proces ten może zostać poprzedzony przemywaniem w roztworze kwasu (np. kwasu octowego) w celu przyspieszenia neutralizacji.

Etapem końcowym pozyskiwania materiału nanocelulozowego, w zależności od pożądanych właściwości fizykochemicznych, może być proces suszenia wytworzonej CB. Najczęściej przeprowadza się go w suszarkach z naturalnym obiegiem powietrza w temp. ok. 60°C przez 12–24 godzin. Zaletą tego rodzaju suszenia jest równomierne nagrzewanie i całkowite usunięcie wody z surowca przy zachowaniu wszystkich pożądanych właściwości CB.



Ryc. 5.16. Nieczyszczona i oczyszczona CB

Materialy

Celuloza bakteryjna; wodorotlenek sodu; woda destylowana; czerń amidowa; szkiełka podstawowe i nakrywkowe; szklane zlewki; cylindry miarowe; szklane butelki; probówki; statywy na probówki; pipety, tipsy; łaźnia wodna; pH-metr; suwmiarka; miernik grubości; waga analityczna; naczynka wagowe.

Przebieg ćwiczenia

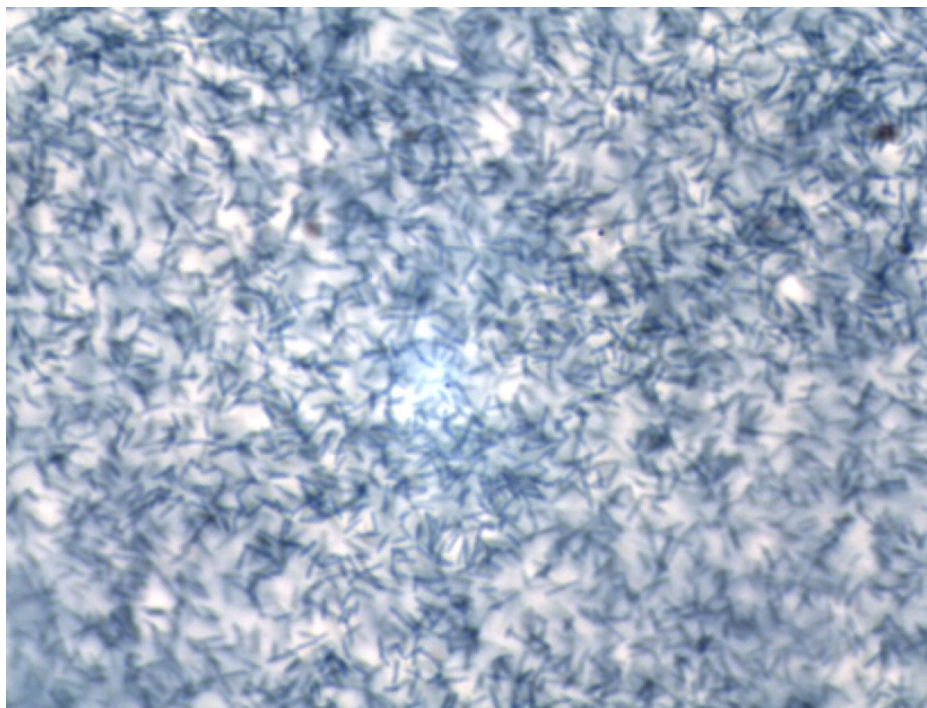
Proces oczyszczania CB

1. Określić grubość oraz wagę nieoczyszczonej CB w postaci mokrej i suchej, jak opisano w ćw. 5.3 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*, pkt 5–7.
2. Do probówek dodać 30 ml 0,1-molowego roztworu wodorotlenku sodu.

3. Za pomocą pęsety uprzednio zważone i zmierzone próby CB przenieść do probówek z roztworem NaOH. Przygotować również próbę kontrolną, w której zamiast NaOH należy użyć wody destylowanej.
4. Probówki inkubować w łaźni wodnej w temp. 80°C przez 15, 30 oraz 45 minut, po każdym 15 minutach wymieniać roztwór NaOH/wodę destylowaną na świeżą.
5. Po inkubacji próby CB należy przełożyć do probówek i płukać w wodzie destylowanej do momentu ustabilizowania się pH na poziomie 6,5–7,5.
6. Po procesie oczyszczania należy ponownie określić grubość oraz wagę CB w postaci mokrej i suchej.
7. Próby CB po 15, 30 oraz 45 minutach inkubacji w NaOH oraz próbę kontrolną należy przeanalizować pod względem efektywności procesu oczyszczania.

Ocena efektywności procesu oczyszczania

1. Za pomocą skalpela odciąć kawałek CB o długości ok. 0,5 cm i umieścić go na szkiełku podstawowym, a następnie zabarwić poprzez naniesienie kropli czerni amidowej.
2. Po 5 minutach inkubacji preparat należy przepłukać.
3. Zabarwioną próbę CB przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
4. Preparat oglądać w mikroskopie świetlnym przy użyciu obiektywu immersyjnego (100 ×) (ryc. 5.17).



Ryc. 5.17. Komórki *K. xylinus* w nieoczyszczonej CB wybarwionej czernią amidową

Wyniki

1. Uzyskane wyniki wpisać do tabeli 5.9.
2. Na podstawie ilości bakterii widocznych w obrazie mikroskopowym ocenić, która z metod oczyszczania była najskuteczniejsza.
3. Zamieścić zdjęcia preparatów mikroskopowych wykonanych dla CB oczyszczonej i nieoczyszczonej.

Tabela 5.9. Waga oraz grubość oczyszczonej i nieoczyszczonej CB

Analizowane parametry	Metoda oczyszczania				Przed oczyszczaniem
	NaOH/ 15 min	NaOH/ 30 min	NaOH/ 45 min	H ₂ O	
Waga mokrej CB (g)					
Waga suchej CB (mg)					-
Grubość mokrej CB					
Grubość suchej CB					-

Wnioski

.....

.....

.....

.....

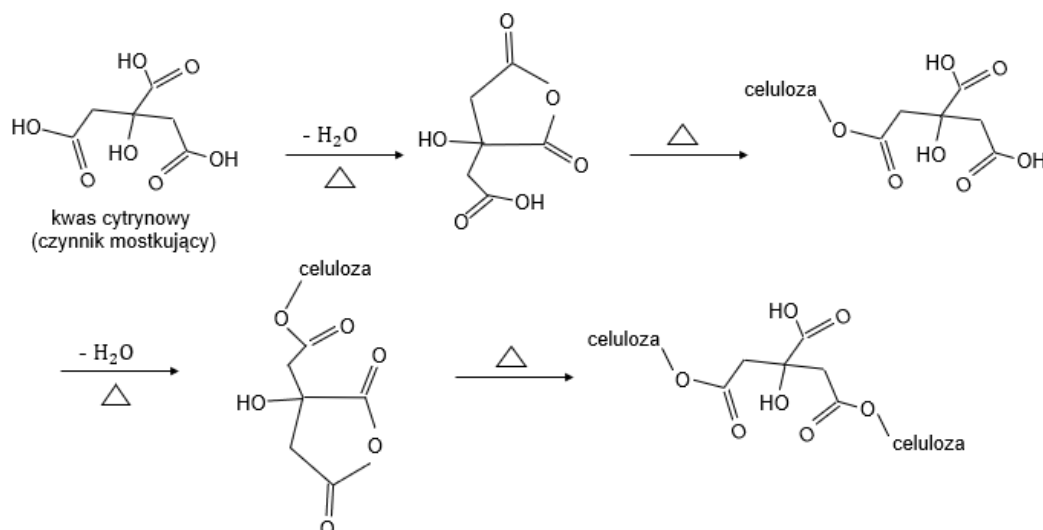
Ćwiczenie 5.7*Modyfikacja właściwości celulozy bakteryjnej***Cel**

1. Modyfikacja właściwości CB w reakcji krzyżowego sieciowania.
2. Ocena struktury modyfikowanej CB.

Wprowadzenie

Struktura celulozy bakteryjnej (CB) jest uzależniona od indywidualnych cech mikroorganizmu, chociaż jej właściwości takie jak elastyczność, zawartość wody, stopień polimeryzacji i krystalizacji w największym stopniu zależą od warunków hodowli, czasu jej trwania i składu stosowanej pożywki (różne źródła węgla i azotu). Poza zastosowaniem odpowiednich warunków hodowlanych podczas procesu produkcji CB istnieje wiele innych metod modyfikacji CB, w tym np. manipulacje genetyczne bakterii wytwarzających CB lub modyfikacje wytworzonej CB poprzez zastosowanie czynników chemicznych i/lub enzymatycznych. Wybór metody wytwarzania bionanocelulozy zależy ściśle od dalszego przeznaczenia biopolimeru.

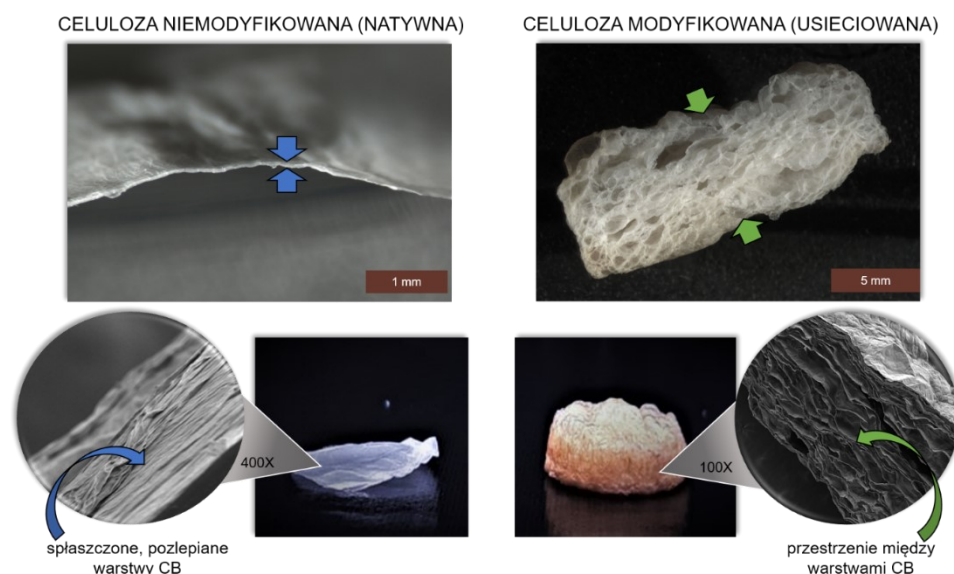
Materiał na bazie CB można poddać suszeniu w celu usunięcia wody (zawartość wody w CB to ok. 95–98%), co znacznie zwiększa jego trwałość, wydłużając możliwy czas przechowywania produktu. Niestety konsekwencją tego procesu jest znaczny **spadek zdolności do jego ponownego uwodnienia**, co ogranicza możliwości jego zastosowania. Związane jest to z nieodwracalnymi zmianami w mikrostrukturze CB, jakie zachodzą podczas usuwania wody z przestrzeni między fibrylami celulozowymi (fibryle zapadają się, nieodwracalnie tracąc swoją strukturę przestrzenną). Dlatego w przypadku suchej CB istnieją wyraźne ograniczenia w zakresie zastosowań biomedycznych i biotechnologicznych.



Ryc. 5.18. Schemat krzyżowego sieciowania celulozy z zastosowaniem kwasu cytrynowego jako czynnika mostkującego

Wspólną cechą nanomateriałów – a zatem również CB – jest względna łatwość ich modyfikacji i funkcjonalizacji dzięki charakterystycznej powierzchni. Jednym ze sposobów na modyfikację biopolimerów w celu poprawy ich właściwości fizycznych jest reakcja **krzyżowego sieciowania**, stanowiąca jedną z możliwych metod chemicznej modyfikacji struktury polimerów. Polega ona na łączeniu kolejnych łańcuchów polimeru za pomocą czynnika mostkującego, w celu promowania zmiany właściwości fizycznych tych materiałów (ryc. 5.18). Tworzenie się połączeń krzyżowych może być inicjowane przez wysoką temperaturę, ciśnienie, zmianę pH lub napromieniowanie. Gdy łańcuchy polimerowe są usieciowane, materiał staje się bardziej sztywny. Kluczową rolę w procesie chemicznego sieciowania odgrywa **czynnik mostkujący**. Jednym z takich czynników jest **kwas cytrynowy**, szczególnie korzystny ze względu na fakt, iż jest bezpieczny i niedrażniący dla ludzkiej skóry oraz wykazuje trwałe wiązania sieciujące. Ponadto jest on szeroko dostępny w stosunkowo niskich cenach, dzięki czemu jest możliwe jego komercyjne wykorzystanie. Wydajność sieciowania można dodatkowo zwiększyć, stosując do reakcji związki działające jako **katalizatory**. Są to substancje mogące promować reakcję krzyżowego sieciowania poprzez przyspieszanie zachodzących procesów (np. tworzenie bezwodnika kwasowego) i umożliwianie tym reakcjom zajścia w niższych temperaturach. Substancje opisane jako nadające się do zastosowania jako katalizatory w reakcji sieciowania obejmują chlorek cynku, azotan cynku, chlorek amonu, siarczan amonu, chlorek magnezu, octan magnezu, siarczan glinu, podfosforyn sodu, fosforyn sodu, wodorowęglan sodu, wodorowęglan amonu oraz ich mieszaniny.

Reakcja sieciowania CB prowadzi do znaczącej zmiany jej właściwości fizykochemicznych, sprawiając, że podczas dehydratacji fibryle nie zapadają się, będąc usztywnione przez katalizowaną reakcję z czynnikiem mostkującym. W ten sposób celuloza nie traci swojego przestrzennego kształtu i zyskuje **gąbczastą strukturę** i możliwości znacznej absorpcji cieczy w porównaniu z celulozą niemodyfikowaną (ryc. 5.19).



Ryc. 5.19. Struktura suchej CB natywnej i modyfikowanej z wykorzystaniem reakcji sieciowania

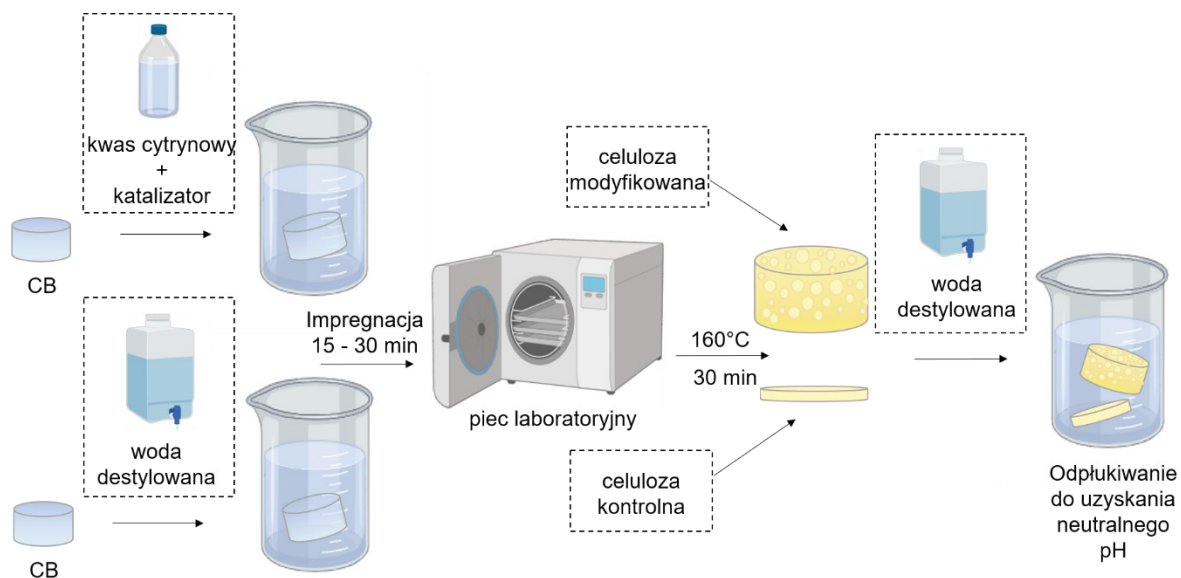
Materialy

Oczyszczona CB; 20-proc. roztwór kwasu cytrynowego; 10-proc. roztwory wodorofosforanu disodu (Na_2HPO_4) oraz wodorowęglanu sodu (Na_2HCO_3); woda destylowana; zlewki szklane; pęseta; waga analityczna; naczynka wagowe; suwmiarka; miernik grubości; pH-metr; próbki; statywy na próbki; mikroskop stereoskopowy; suszarka.

Przebieg ćwiczenia

1. Należy określić grubość oraz wagę niemodyfikowanej CB w postaci mokrej i suchej, jak opisano w ćw. 5.3 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*, pkt 5–7.
2. Mokłą CB zanurzyć w mieszaninie 20-proc. roztworu kwasu cytrynowego i 10-proc. roztworu katalizatora, w stosunku wagowym kwasu cytrynowego do katalizatora 2 : 1, a następnie impregnować przez 15–30 minut w temp. 28–30°C.
3. W ćwiczeniu stosowane są 4 modyfikacje:
 - M1 – kwas cytrynowy oraz wodorofosforan disodu (Na_2HPO_4);
 - M2 – kwas cytrynowy oraz wodorowęglan sodu (Na_2HCO_3);
 - M3 – kwas cytrynowy oraz mieszanina Na_2HPO_4 i Na_2HCO_3 w stosunku masowym 1 : 1;
 - M4 – kwas cytrynowy (bez katalizatora).
4. Dodatkowo jako próbę kontrolną zanurzyć CB w wodzie destylowanej, a następnie inkubować przez 15–30 minut w temp. 28–30°C.
5. Po okresie inkubacji prób CB (doświadczalne oraz kontrolne) należy przełożyć pęsetą na arkusz folii teflonowej. W razie potrzeby nadmiar cieczy odsączyć za pomocą ręczników papierowych.
6. Próby należy umieścić w piecu laboratoryjnym rozgrzanym do temp. 160°C i inkubować przez ok. 30 minut w celu ich dehydratacji oraz przeprowadzenia reakcji krzyżowego sieciowania.
7. Po zakończeniu etapu sieciowania próby CB należy przełożyć delikatnie pęsetą do wody destylowanej i wymieniać ją kilkakrotnie w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek kwasu cytrynowego oraz katalizatorów. Prowadzić ten proces do momentu ustabilizowania się pH na poziomie 6,5–7,5 (ryc. 5.20).

8. Próby CB wysuszyć w temp. pokojowej, następnie określić grubość oraz wagę suchej modyfikowanej CB. Pomiary wykonać 3-krotnie.
9. Wykonać przekrój poprzeczny próbek modyfikowanej CB, a następnie dokonać obserwacji struktury pod mikroskopem stereoskopowym (w powiększeniu 10–20 ×). Zanotować obserwacje.



Ryc. 5.20. Schemat procesu modyfikacji CB – reakcja krzyżowego sieciowania

Wyniki

1. Uzyskane wyniki wpisać do tabeli 5.10. Wyniki należy przedstawić jako średnią z 3 pomiarów wraz z odchyleniem standardowym.
2. Na podstawie uzyskanych wyników oraz poczynionych obserwacji należy ocenić, która z zastosowanych modyfikacji wpłynęła najkorzystniej na właściwości sorpcyjne CB.
3. Wykonać zdjęcia CB modyfikowanej i natywnej.

Tabela 5.10. Wyniki uzyskane dla modyfikowanej i natywnej CB

Analizowane parametry	Modyfikacje CB				
	M1	M2	M3	M4	Kontrola
Waga mokrej CB (g)					
Waga suchej CB					
Grubość mokrej CB (mm)					
Grubość suchej CB (mm)					
Opis struktury w przekroju poprzecznym					

Wnioski

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.8

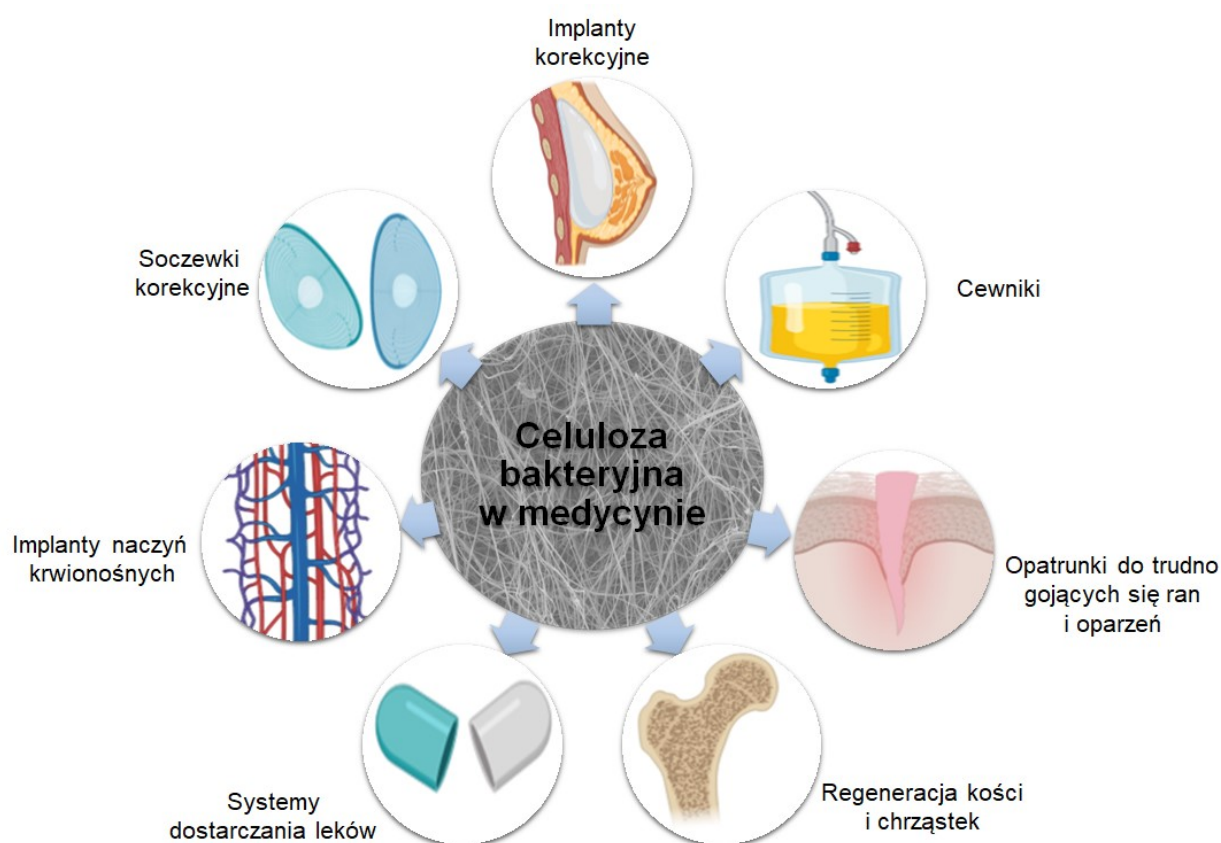
Ocena parametrów wodnych celulozy bakteryjnej

Cel

Ocena właściwości wodnych (procentowa zawartość wody, współczynnik pęcznienia w czasie, współczynnik retencji) celulozy bakteryjnej natywnej i modyfikowanej.

Wprowadzenie

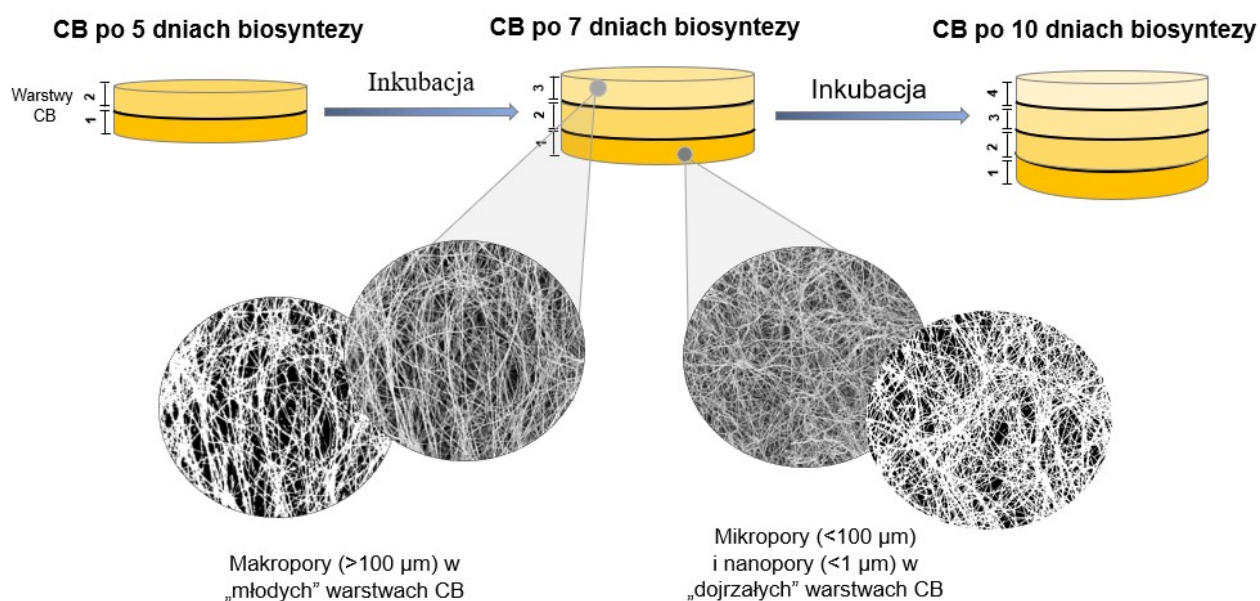
Obecnie CB jest wykorzystywana w różnych gałęziach przemysłu, główne zastosowanie znajdując w medycynie jako materiał zastępczy tkanek skóry, implanty naczyń krwionośnych, a przede wszystkim jako materiał opatrunkowy (ryc. 5.21). Opatrunek z CB przewyższa tradycyjne, szeroko stosowane preparaty, takie jak gazy czy maści, ponieważ posiada **wysoki stopień uwodnienia** oraz może przybierać **różne kształty**, przystosowując się do zmian w gojącej się ranie. Te właściwości pozwalają na ciągłe **nawilżenie** rany, a także **dopasowanie** się do każdego miejsca na ciele. Ponadto wysoka **porowatość** CB pozwala na swobodną wymianę gazową między raną a otoczeniem, co sprzyja procesowi gojenia.



Ryc. 5.21. Możliwości zastosowania CB w medycynie

Ważne jest, aby odpowiednia struktura celulozy została dobrana do potencjalnego zastosowania. Celuloza bakteryjna pełniąca funkcję skafoldów (rusztowań), wykorzystywana do implantacji, powinna charakteryzować się wysoką porowatością, by umożliwić łatwą integrację tkanek czy naczyń krwionośnych do struktury sieci CB. Natomiast w przypadku zastosowania materiału do opatrunków powinna być przepuszczalna dla tlenu, a także charakteryzować się wysokim stopniem uwodnienia, by utrzymywać stałą wilgotność podczas procesu gojenia. Parametry te są również bezpośrednio związane z porowatością materiału.

Stopień porowatości CB znajduje bezpośrednie odzwierciedlenie w jej **właściwościach wodnych**. Zdolność do absorpcji wody zależy głównie od **liczby i ilości porów** w strukturze biopolimeru. Wzrost liczby i wielkości porów przekłada się na zwiększenie warstwy powierzchniowej CB. Te cechy nie są stałe i wahają się w pewnym zakresie w zależności od aktywności produkcyjnej bakterii, składu pożywki hodowlanej i rodzaju źródła węgla użytego w pożywce fermentacyjnej. Wpływ na absorpcję wody przez błony celulozowe ma też długość prowadzenia hodowli produkcyjnych. Gęstość (stopień usieciowania) CB rośnie wraz z długością prowadzenia hodowli (procesu produkcyjnego) – z upływem czasu więcej fibryli jest wydzielanych poza komórkę. Dlatego zdolność do pochłaniania wody maleje wraz z wydłużeniem czasu hodowli – gęstsza struktura to mniejsza porowatość i mniej „miejsz” na molekuły wody (ryc. 5.22).



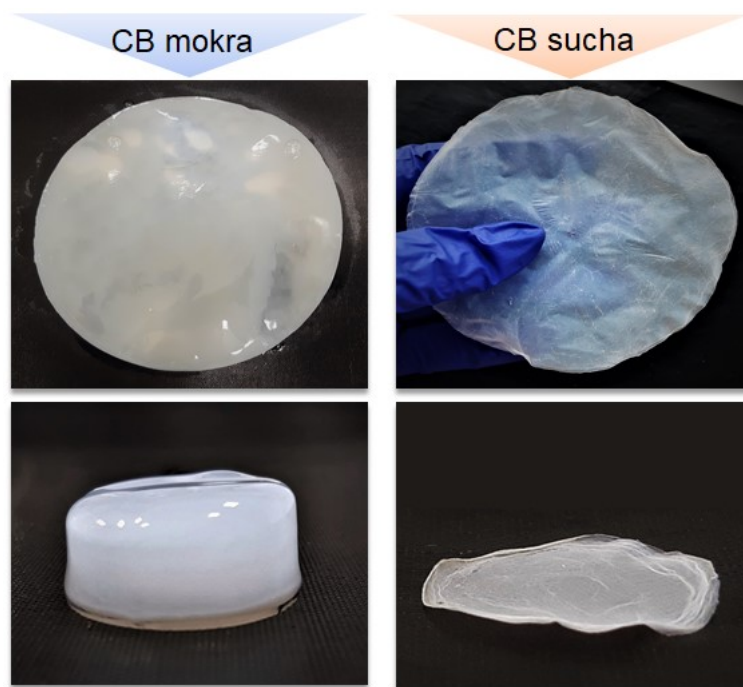
Ryc. 5.22. Porowata struktura CB w zależności od długości trwania hodowli

Luźny układ fibryli i duże rozmiary porów wzmagają zdolność do retencji wody przez CB. W ciasnym układzie mikrofibryli woda jest wiązana bardziej efektywnie przez silniejsze wiązania wodorowe – mniejsza ilość wody ulega zatrzymaniu, jednak zwiększa się czas utrzymania jej w strukturze błony. Dlatego membrany celulozowe o małych porach zatrzymują wodę dłużej – małe pory chronią wodę przed wyparowaniem. Z kolei więcej wody może zostać zatrzymane w CB o większej powierzchni właściwej, związanej z obecnością dłuższych i cieńszych mikrofibryli, zwiększających stopień porowatości CB.

Znajomość parametrów określających właściwości wodne CB jest niezbędna do konstrukcji hydrożeli (np. opatrunków, które powinny się charakteryzować dużą zdolnością do pochłaniania płynów, ale także ich odpowiednio długim utrzymaniem w swojej strukturze) bądź nośników leków (pożądana jest zdolność do uwalniania płynów z membran w określonym czasie w danych warunkach). Standardowo określone parametry charakteryzujące parametry wodne CB to: **współczynnik pęcznienia** (*swelling ratio*, SR%), **współczynnik retencji** (*water retention capacity*, WRC), **współczynnik ponownego uwodnienia** (*rehydration ratio*, RR) oraz **współczynnik uwalniania wody** (*water release value*, WRV).

Parametr SR% określa zdolność błon celulozowych do pęcznienia. Procesy pęcznienia i zdolność do zatrzymywania wody (współczynnik retencji) przez membranę celulozową są uważane za najważniejsze czynniki w odniesieniu do jej biomedycznych zastosowań. Parametr WRC określa pierwotną zdolność celulozy do adsorpcji wody podczas procesu jej biosyntezy. Nigdy niesuszona błona CB zawiera więcej wody niż błony wysuszone i ponownie uwodnione

– zdolność do adsorpcji wody jest częściowo tracona podczas procesu suszenia (ryc. 5.23). Parametr WRC odzwierciedla pierwotny układ fibryli, gdyż taki układ po wysuszeniu ulega zmianie w wyniku zapadnięcia się struktury mikrofibryli. Parametr WRV pozwala określić zdolność do uwalniania wody przez błonę celulozową w trakcie inkubacji w określonej temperaturze (parowanie) lub po wirowaniu jej w określonych warunkach (obroty, czas i temperatura). Czynniki, które wpływają na ten parametr, to: masa próby, czas i siła wirowania, wielkość porów użytego filtra oraz rozmiar błon/fibryli CB. Parametr RR to współczynnik ponownego uwodnienia błony celulozowej. Pozwala na analizę ponownego uwodnienia próby w odniesieniu do masy próby natywnie uwodnionej, zebranej z pożywki hodowlanej.



Ryc. 5.23. Porównanie CB nigdy niesuszonej i suchej

Materialy

Celuloza bakteryjna natywna i modyfikowana; woda destylowana; szalki Petriego; pęseta; szarka laboratoryjna; waga analityczna; naczynka wagowe.

Przebieg doświadczenia

1. Określić wagę mokrej, nigdy niesuszonej i suchej CB, jak opisano w ćw. 5.3 *Produkcja CB w hodowli stacjonarnej w zależności od objętości inokulum*, pkt 5–7.
2. Do szalki Petriego nalać 10 ml wody destylowanej.
3. Zanurzyć próbę suchej CB w wodzie destylowanej za pomocą pęsety.
4. W czasie inkubacji w temperaturze pokojowej próbę CB należy ważyć co 2 minuty do momentu maksymalnego wysycenia.
5. Po osiągnięciu maksymalnego wysycenia próbę należy umieścić na suszarce laboratoryjnej.
6. W czasie suszenia w temp. 60°C próbę CB należy ważyć co 2 minuty do momentu całkowitego wysuszenia próby.
7. Wszystkie pomiary wykonać 3-krotnie.
8. Wykorzystując przedstawione poniżej wzory, obliczyć parametry wodne natywnej i modyfikowanej CB.

Procentowa zawartość wody w membranie celulozowej:

$$\% \text{H}_2\text{O} = (W_s / W_m) \times 100$$

Współczynnik pęcznienia w czasie (SR%):

$$\text{SR}\% = [(W_u - W_s) / W_s] \times 100$$

Współczynnik uwalniania wody w czasie (WRV%):

$$\text{WRV}\% = [(W_u - W_s) / W_u] \times 100$$

W_s – masa suchej CB

W_m – masa mokrej CB

W_u – masa ponowienie uwodnionej CB

Wyniki

1. Sporządzić wykres zależności współczynnika uwodnienia oraz retencji w czasie dla CB natywnej i modyfikowanej z uwzględnieniem odchylenia standardowego.
2. Na podstawie wyników należy ocenić, która z analizowanych próbek charakteryzowała się największą powierzchnią sorpcyjną, oraz scharakteryzować porowatość badanych prób CB.

Wnioski

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.9

Analiza właściwości cytotoksycznych celulozy bakteryjnej

Cel

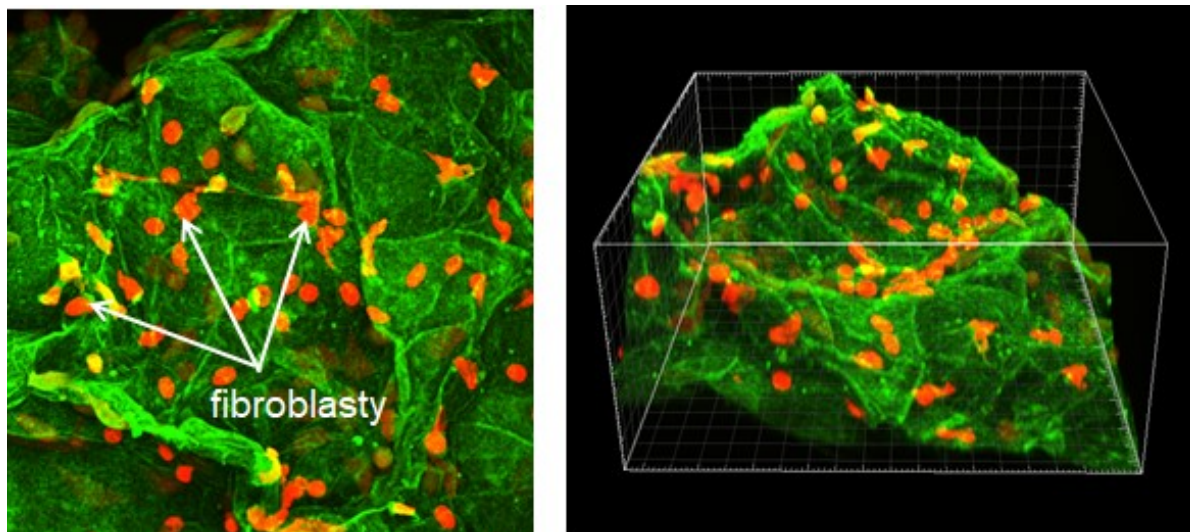
Ocena właściwości cytotoksycznych bionanocelulozy natywnej i modyfikowanej.

Wprowadzenie

Celuloza bakteryjna stanowi uniwersalny oraz biofunkcjonalny materiał o właściwościach takich jak **biozgodność** czy **biokompatybilność**. Biozgodność jest to zdolność prawidłowego zachowania materiału w kontakcie z tkanką w określonym zastosowaniu. Zgodność biologiczna i biochemiczna pozwala na wszczepienie materiału do żywego organizmu bez ryzyka odrzucenia, a także możliwości wystąpienia zakażenia oraz alergii jako skutków ubocznych.

Wykorzystanie CB w medycynie, szczególnie jako **materiału opatrunkowego** oraz sztucznych organów, jest możliwe dzięki takim jej właściwościom, jak: **wysoka czystość, wytrzymałość mechaniczna, zdolność chłonięcia cieczy, bardzo dobra zgodność z żywą tkanką**, a w szczególności z **krwią**. Ponadto materiał uzyskiwany z CB jest **biokompatybilny, porowaty, elastyczny, w pełni biodegradowalny, łatwy w zastosowaniu i przechowywaniu, zapewnia optymalną wilgotność sprzyjającą gojeniu się ran i może być sterylizowany termicznie**. Właściwie oczyszczone błony celulozowe, wytworzone metodą hodowli stacjonarnej, mogą stanowić materiał opatrunkowy spełniający standardy przypisane nowoczesnym opatrunkom. CB można wykorzystać m.in. w nowoczesnym leczeniu oparzeń oraz przewlekłych ran. Rozwój przemysłu medycznego pozwala także na zastosowanie jej wewnątrz ciała. Dzięki takim cechom jak biokompatybilność oraz stabilność mechaniczna, celuloza wprowadzona do

żywego organizmu stanowi naturalny biomateriał, który można wykorzystać do tworzenia zastępczych układów mechanicznych. Z tego powodu CB stała się obiecującym tworzywem do wykorzystania w **medycynie implantacyjnej**. Wysoka biogodność, brak cytotoksyczności, stymulacja wzrostu komórek oraz niepobudzanie systemu immunologicznego stanowią o przewadze celulozy bakteryjnej nad innymi materiałami stosowanymi w implantacji oraz w tworzeniu opatrunków. Właśnie z uwagi na tak liczne zastosowania medyczne uzyskany materiał bionanocelulozowy w pierwszym etapie poprzedzającym określenie możliwości jego zastosowania analizowany jest pod kątem braku efektu cytotoksycznego względem hodowli komórek eukariotycznych *in vitro* (ryc. 5.24).



Ryc. 5.24. Fibroblasty kolonizujące CB

Materiały

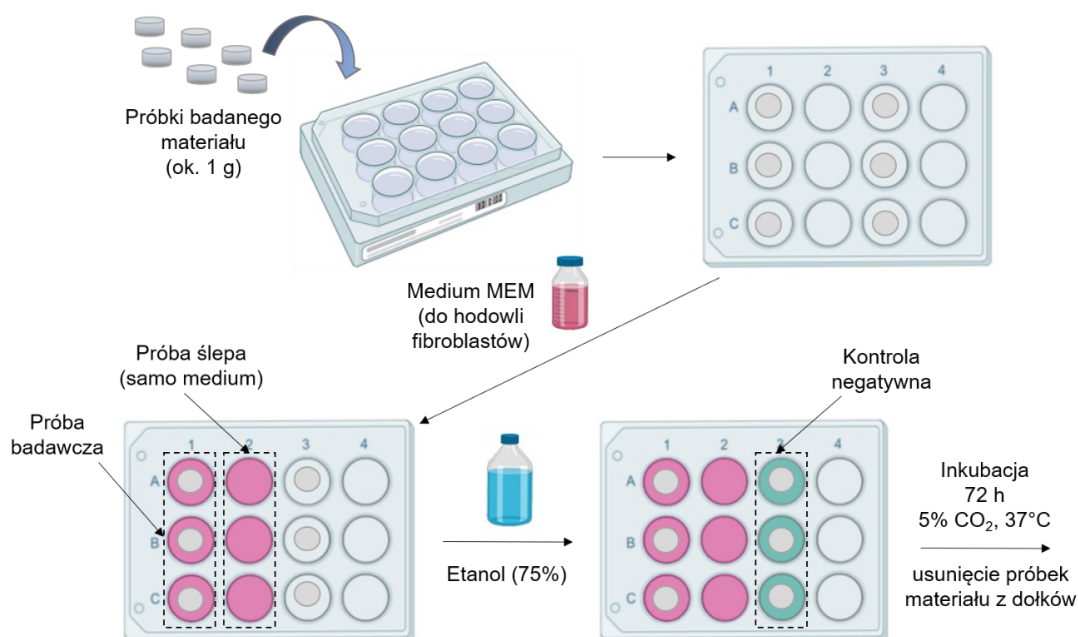
CB natywna oraz modyfikowana; hodowle fibroblastów; barwnik resazuryna; kompletna pożywka do hodowli fibroblastów MEM (ang. *eagle's minimal essential medium*); PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna); 75-proc. etanol; 12-dołkowe; płytki 96-dołkowe; probówki; statywy na probówki; tipsy; pipety; komora laminarna; inkubator; inkubator z wytrząsaniem; czytnik mikropłytek.

Przebieg ćwiczenia

Przygotowanie ekstraktów z CB natywnej i modyfikowanej

1. Sterylne próby CB natywnej i modyfikowanej o masie ok. 1 g przenieść do dołków płytki 12-dołkowej.
2. Do dołków dodać 3 ml medium MEM do hodowli fibroblastów.
3. Przygotować dodatkowo kontrolę sterylności pożywki (próba ślepa), w której w dołku znajduje się tylko pożywka; kontrolę negatywną, w której do próbek CB należy dodać 75-proc. etanol zamiast pożywki. Całą procedurę należy wykonać pod komorą laminarną.
4. Płytkę inkubować przez 72 godziny w 5% CO₂ w temp. 37°C z wytrząsaniem (ryc. 5.25).
5. Po inkubacji CB należy usunąć z dołków, a uzyskane ekstrakty przechowywać w temp. 4°C do czasu dalszych analiz.

Opisana procedura przygotowania ekstraktów jest zgodna z normą ISO 10993: Biologiczna ocena wyrobów medycznych; Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro* (ISO 10993-5: 2009).



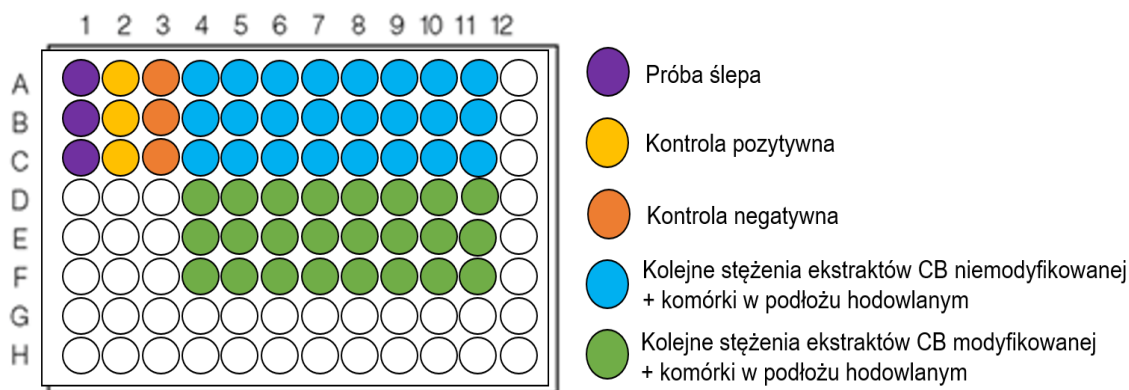
Ryc. 5.25. Procedura przygotowania ekstraktów do testów cytotoksyczności

Przygotowanie zawiesiny komórek

1. Wyjściowa gęstość zawiesiny przygotowanych do testu komórek (fibroblastów) wynosi $10^6/\text{ml}$. Wykorzystując czyste medium MEM, należy rozcieńczyć wyjściową zawiesinę tak, aby jej końcowa gęstość wynosiła $2 \times 10^5/\text{ml}$.
2. Zawiesinę komórek należy wysiać na płytkę 96-dółkową w objętości 200 μl .

Ocena właściwości cytotoksycznych ekstraktów z CB względem komórek fibroblastów

1. W pierwszym etapie należy najpierw rozplanować i odpowiednio opisać płytkę 96-dółkową, tak żeby znalazły się na niej niezbędne kontrole, próby ślepe oraz próby badane (ryc. 5.26).
2. Przygotować roztwory ekstraktów o różnym stężeniu, wykorzystując w tym celu bufor PBS z zachowaniem sterylności roztworu. Roztwory ekstraktów przygotowuje się 10-krotnie stężone w stosunku do założonych końcowych stężeń (10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001%), gdyż dodawane są one w objętości 20 μl do 180 μl hodowli (komórki + medium) w studzience płytki 96-dółkowej.
3. Komórki traktuje się roztworami ekstraktów w następujący sposób:
 - 3 pierwsze studzienki to kontrola sterylności pożywki (próba ślepa) i do niej dodaje się tylko pożywkę (200 μl) i PBS – rozpuszczalnik badanych substancji (20 μl);
 - kolejne 3 dołki to kontrola pozytywna (100% żywych komórek nietraktowanych ekstraktem) i do nich dodaje się tylko komórki w pożywce hodowlanej (200 μl) i PBS (20 μl);
 - kolejne 3 dołki to kontrola negatywna i do nich dodaje się tylko komórki w pożywce hodowlanej (200 μl) i 75-proc. etanol (20 μl);
 - do następnych studzienek z hodowlami komórek dodaje się kolejne stężenia ekstraktów z CB natywnej i modyfikowanej, począwszy od najniższego stężenia – każde stężenie 3-krotnie.
4. Procedurę wykonać pod komorą laminarną.
5. Tak przygotowaną płytkę należy umieścić w inkubatorze i inkubować w standardowych warunkach hodowlanych (temp. 37°C, 5% CO₂, atmosfera wysycona parą wodną), przez okres 7 dni.



Ryc. 5.26. Przykładowe rozplanowanie płytki

Określenie stopnia zahamowania wzrostu komórek przez badany związek z zastosowaniem barwnika resazuryny

1. Po okresie inkubacji komórek z ekstraktami do każdej studzienki dodać po 20 μ l roztworu resazuryny (1 mg/1 ml PBS).
2. Płytki inkubować w standardowych warunkach hodowlanych przez 20 minut.
3. Przenieść płytkę do czytnika mikropłytek i odczytać fluorescencje przy długości fali 540 nm i 590 nm.

Resazuryna to barwnik o barwie niebieskiej, który w procesach oksydoredukcyjnych jest przekształcany przez żywe komórki w resorufinę o różowym zabarwieniu i specyficznej fluorescencji. Barwnik ten stosowany jest do oceny żywotności komórek prokariotycznych i eukariotycznych.

Wyniki

1. Obliczyć średnie wartości fluorescencji uzyskanych dla każdego stężenia badanego ekstraktu.
2. Wyznaczyć, jaki procent wartości fluorescencji uzyskanej dla komórek kontrolnych (100%) stanowią wyliczone średnie wartości fluorescencji dla poszczególnych stężeń badanych ekstraktów.
3. Uzyskane wyniki zamieść w tabeli 5.11.
4. Sporządzić wykres zależności wzrostu/aktywności komórek (% kontroli) od stężenia lub logarytmu stężenia ekstraktu.

Tabela 5.11. Ocena cytotoksyczności ekstraktów CB

Stężenie (%)	F ₁	F ₂	F ₃	F _{średnia}	Odchylenie standardowe	% kontroli
Kontrola						100
0,001						
.....						
10						

Wnioski

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.10

Impregnacja celulozy bakteryjnej substancjami przeciwdrobnoustrojowymi

Cel

1. Impregnacja swobodna CB substancjami przeciwdrobnoustrojowymi.
2. Ocena właściwości antybakteryjnych impregnowanej CB.
3. Ocena efektywności impregnacji CB w zależności od badanej substancji i właściwości CB.

Wprowadzenie

Celuloza bakteryjna (CB) pomimo wielu cennych właściwości takich jak biokompatybilność, porowatość, wodorochłonność i wytrzymałość mechaniczna **nie posiada właściwości leczniczych czy przeciwdrobnoustrojowych**. Dlatego w celu jej funkcjonalizacji w tym kierunku można poddać ją **wysycaniu** w roztworze odpowiednich substancji czynnych (antybiotyki, antyseptyki, chemioterapeutyki). CB może być również wysycana substancjami o działaniu przeciwpalnym lub wspomagającym leczenie, w tym substancjami pochodzenia naturalnego (ekstrakty z roślin), związkami z grupy witamin, lipidów, enzymów, a także substancjami przeciwutleniającymi i regulującymi poziom nawilżenia. Znana jest również metoda wytwarzania opatrunku celulozowego powlekanego nanosrebrem, nadająca mu właściwości przeciwbakteryjne. Błony celulozowe są bardzo dobrymi **nośnikami do immobilizacji** różnorodnych substancji bioaktywnych przyspieszających proces gojenia czy umożliwiającymi **ukierunkowany i kontrolowany transport** leków, np. przeciwnowotworowych. W wyniku immobilizacji substancji bioaktywnych na CB wzmocnieniu ulega lecznicze działanie opatrunku i w konsekwencji skrócony zostaje czas leczenia, przyspieszony proces gojenia i zmniejszone ryzyko wystąpienia powikłań infekcyjnych. Dlatego wysycone lub impregnowane substancjami bioaktywnymi błony CB są szczególnie przydatne do przygotowania **opatrunków** znajdujących zastosowanie w leczeniu rozległych, trudno gojących się ran oraz łagodzeniu uszkodzeń skóry po zabiegach leczniczych oraz dermatologiczno-kosmetycznych. Opatrunki takie mogą znaleźć również zastosowanie w leczeniu ran wysokowysiękowych, gdyż są w stanie pochłaniać przez długi czas duże ilości substancji płynnych (np. wysięk z rany).

Materialy

Celuloza bakteryjna natywna oraz modyfikowana; jałowa sól fizjologiczna (0,85 proc. roztwór NaCl); Octenisept – antyseptyk o działaniu przeciwdrobnoustrojowym; płytki agarowe z pożywką M-H; szklane probówki; wymazówki; głaszczki; ezy mikrobiologiczne; szalki Petriego; płytki 12-dołkowe; płytki 96-dołkowe; pipety; tipsy; linijka; densytometr; inkubator.

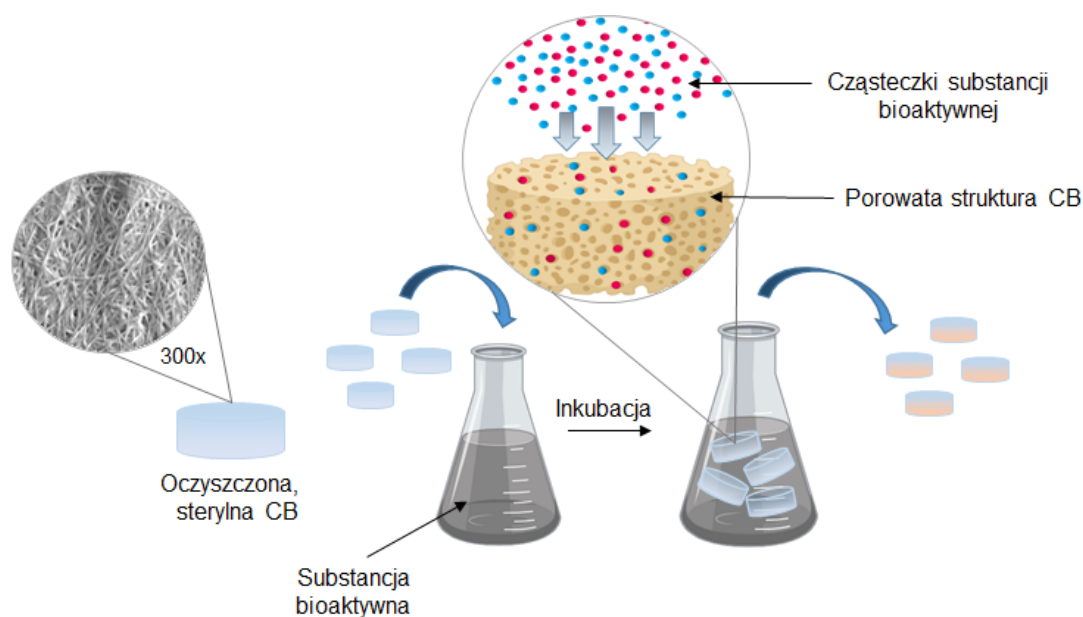
Mikroorganizmy

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas areuginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

Przebieg ćwiczenia

Proces impregnacji metodą adsorpcji

1. W płytkach 12-dołkowych przygotować po 3 ml roztworu testowanej substancji w stężeniach 10%, 20% i 50%.
2. Sterylne próby mokrej CB o identycznej masie zanurzyć w przygotowanych roztworach i inkubować przez 15 minut w temp. pokojowej.
3. Po inkubacji próby CB należy wyciągnąć z roztworu za pomocą pęsety i odsączyć nadmiar płynu na jałowym ręczniku papierowym (ryc. 5.27).



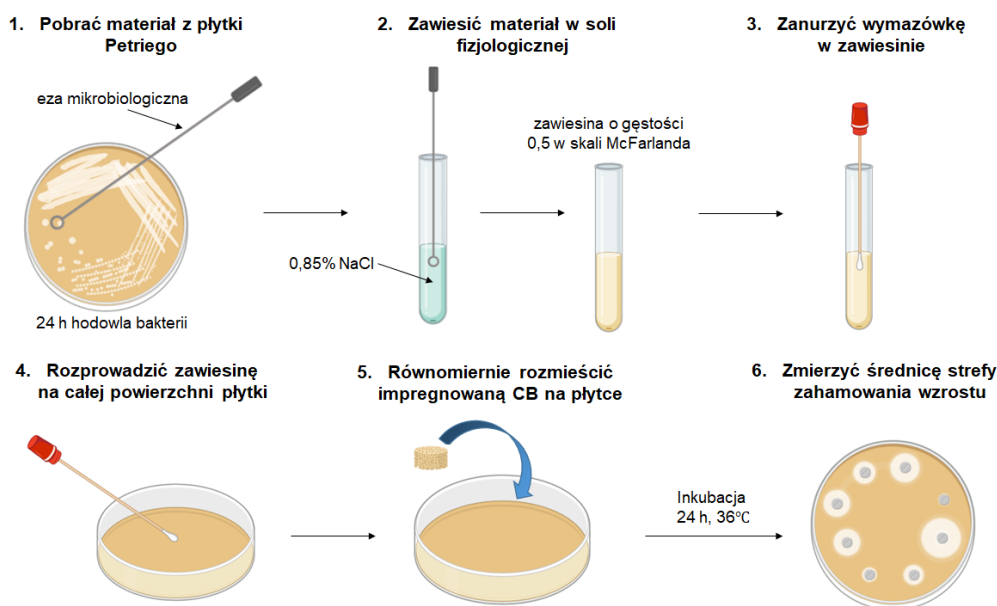
Ryc. 5.27. Proces impregnacji CB metodą adsorpcji

Przygotowanie zawiesiny mikroorganizmów

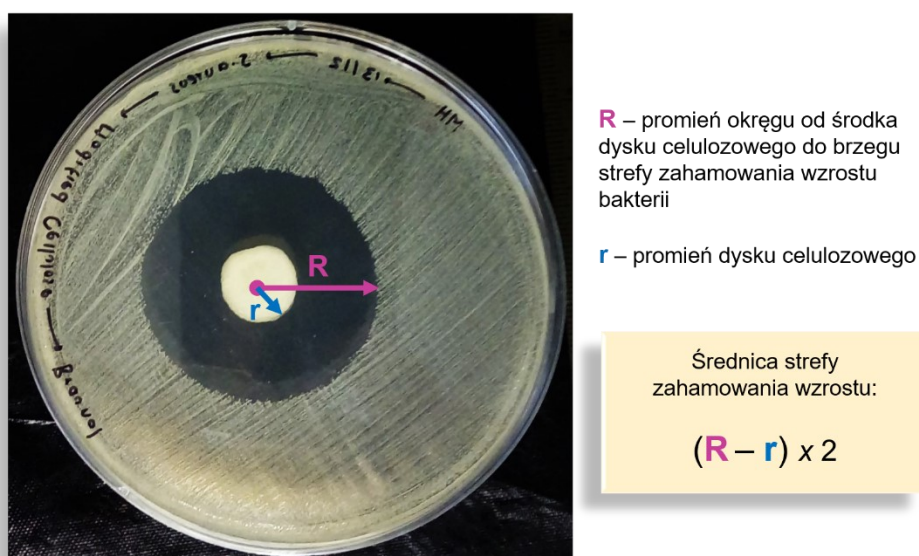
1. Kilka kolonii ze świeżej, 24-godzinnej hodowli testowanych mikroorganizmów zawiesić w 0,85-proc. roztworze NaCl, wykorzystując wymazówkę lub eżę mikrobiologiczną.
2. Należy uzyskać zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, co w przybliżeniu odpowiada $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.
3. Gęstość zawiesiny oznaczyć, wykorzystując densytometr.

Analiza właściwości antybakteryjnych impregnowanej celulozy bakteryjnej metodą dyfuzyjno-krążkową

1. Zanurzyć w inokulum jałową wymazówkę.
2. Usunąć nadmiar zawiesiny, obracając i przyciskając wymazówkę mocno do ściany probówki powyżej poziomu płynu.
3. Zawiesinę 3-krotnie rozprowadzić na całej powierzchni pożywki, przekręcając płytkę za każdym razem o 60° .
4. Po wyschnięciu na posiane pożywki nałożyć impregnowane krążki CB (za pomocą sterylnej pęsety).
5. Próby impregnowanej CB należy równomiernie rozmieścić na płytce. Każdy krążek należy delikatnie przycisnąć, zapewniając równomierny kontakt z pożywką.
6. Płytki wstawić do ciepłarki, inkubować w warunkach tlenowych przez 24 godziny w temp. 36°C (ryc. 5.28).
7. Po inkubacji zmierzyć średnicę każdej strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju (wliczając średnicę krążka) i zanotować odczyt w milimetrach. Pomiaru stref można dokonać za pomocą linijki lub suwmiarki (ryc. 5.29).



Ryc. 5.28. Analiza właściwości antybakteryjnych impregnowanej celulozy bakteryjnej metodą dyfuzyjno-krążkową



Ryc. 5.29. Procedura oceny strefy zahamowania wzrostu z antybiogramu

Ocena efektywności procesu impregnacji

1. Nanieś na płytkę 96-dołkową po 200 μ l substancji o właściwościach antybakteryjnych we wszystkich testowanych stężeniach przed oraz po procesie impregnacji.
2. Zmierzyć spektrofotometrycznie absorbancję badanych roztworów przy długości fali 270 nm.
3. Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć efektywność impregnacji według wzoru podanego poniżej.

$$E_A\% = (Abs_s - Abs_i) / Abs_s \times 100$$

Gdzie: $E_A\%$ – efektywność adsorpcji; Abs_s – absorbancja roztworu substancji antybakteryjnej w danym stężeniu zmierzona przy odpowiedniej długości fali; Abs_i – absorbancja roztworu tej samej substancji po impregnacji.

Wyniki

1. Na podstawie strefy zahamowania wzrostu określić, która z badanych substancji miała najsilniejsze właściwości antybakteryjne względem testowanych drobnoustrojów chorobotwórczych.
2. Określić, który z testowanych materiałów charakteryzował się największym stopniem adsorpcji (efektywność impregnacji) substancji aktywnej.

Tabela 5.12. Strefy zahamowania wzrostu bakterii testowych

Stężenie substancji	Modyfikacje celulozy bakteryjnej			
	M1	M2	M3	Kontrola
10%				
20%				
50%				
10%				
20%				
50%				

Tabela 5.13. Efektywność impregnacji

Stężenie substancji	Modyfikacje celulozy bakteryjnej			
	M1	M2	M3	Kontrola
10%				
20%				
50%				
10%				
20%				
50%				

Wnioski

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 5.11

Immobilizacja mikroorganizmów o wysokim potencjale biotechnologicznym na nośniku na bazie celulozy bakteryjnej

Cel

1. Immobilizacja mikroorganizmów o wysokim potencjale mikrobiologicznym na nośniku na bazie celulozy bakteryjnej.
2. Ocena efektywności immobilizacji w zależności od morfologii immobilizowanych mikroorganizmów.
3. Ocena efektywności immobilizacji w zależności od właściwości nośnika.

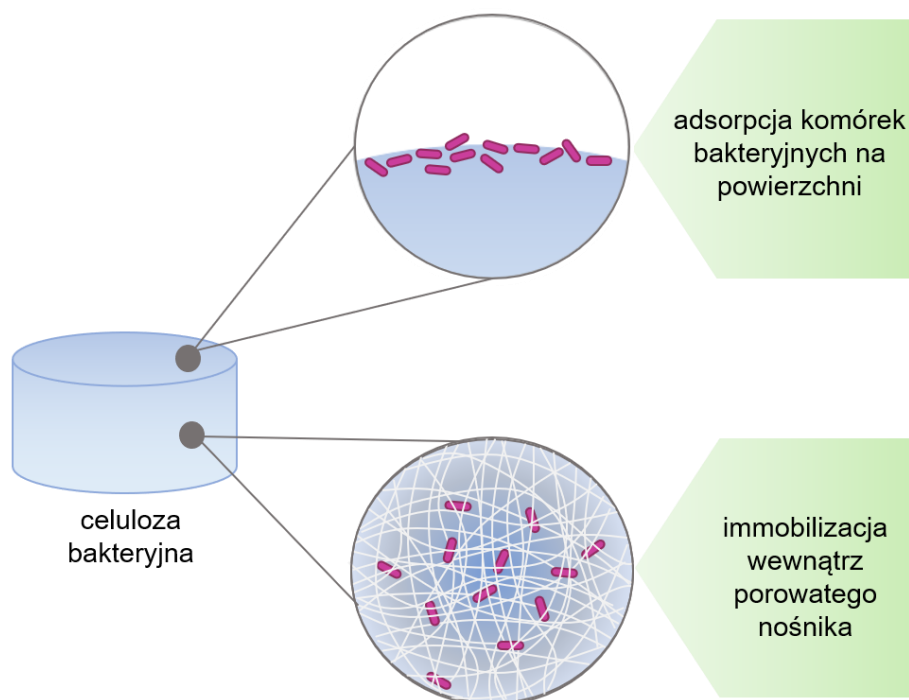
Wprowadzenie

Immobilizacja jest definiowana jako zespół metod, które ograniczają całkowicie lub częściowo swobodę poruszania się określonych cząsteczek, substancji lub materiału biologicznego, w tym enzymów i mikroorganizmów na pożywcze stałej czy też wewnątrz specyficznych struktur. W przypadku mikroorganizmów proces ten polega na wiązaniu drobnoustrojów z nośnikiem, tak aby ograniczyć ich swobodny ruch, a jednocześnie zapewnić dostęp do składników odżywczych i odpływ produktów przemiany materii (ryc. 5.30). Immobilizacja znajduje szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego, farmaceutycznego, kosmetycznego, chemicznego i w analityce medycznej.

W procesie unieruchamiania istotny jest nie tylko dobór odpowiedniej techniki, ale także właściwego nośnika. **Dobry nośnik** powinien się cechować: **brakiem toksyczności w stosunku do immobilizowanych komórek (biokompatybilność), zdolnością do efektywnego zatrzymywania komórek w obrębie nośnika, odpowiednią porowatością (umożliwienie kontrolowanego uwalniania substancji i/lub swobodnej dyfuzji substratów i produktów), stabilnością chemiczną i mechaniczną, możliwością regeneracji, łatwą dostępnością oraz relatywnie niskim kosztem.** Pomimo wielu zalet zarówno nośniki syntetyczne, jak i naturalne mają pewne ograniczenia.

Najczęściej stosowanymi polimerami syntetycznymi jako nośniki w procesie immobilizacji są pochodne polimetakrylanów, poliamin i poliakrylany. Niewątpliwie zaletą tych materiałów jest możliwość regulowania ich struktury na poziomie makromolekularnym. Na etapie ich syntezy można wpływać na ich budowę, co może z kolei w konsekwencji regulować porowatość, średnicę porów oraz inne właściwości fizyczne nośnika, takie jak jego polarność i hydrofobowość. Ponadto nośniki te są stosunkowo łatwo dostępne i tanie, jednak mają ograniczoną możliwość regeneracji, a sam proces ich sieciowania zazwyczaj jest toksyczny. Dodatkowo polimery syntetyczne są z reguły niebiodegradowalne i mogą wykazywać toksyczne działanie na wzrost komórek

Pośród naturalnych polimerów do immobilizacji najczęściej wykorzystuje się materiały porowate, jak np. alginiany, *kappa-karageniany*, agarozy i polimery pochodzenia celulozowego. Większość naturalnych nośników charakteryzuje nietoksyczność, biokompatybilność i biodegradowalność oraz niskie koszty produkcji. Wykazują one jednak brak stabilności w chemicznych procesach przemysłowych, mają zróżnicowaną strukturę, a zatem wymagają specjalnego traktowania przed użyciem. Co więcej, ich wytrzymałość mechaniczna nie jest zadowalająca, a przeszką dla namnażania komórek jest niewystarczająca. Niedostateczna ilość lub za mała średnica porów ogranicza wzrost żywych komórek immobilizowanych na takim nośniku. Ponadto struktura nośnika może być przerywana podczas trwania fermentacji z powodu narastania ciśnienia generowanego w czasie podziału komórki. Wykazano np., że struktura nośników naturalnych (alginianu i *kappa-karagenianu*) wykorzystywanych do immobilizacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* uniemożliwia swobodną dyfuzję kwasu mlekowego podczas procesu fermentacji. Dodatkowo nośniki naturalne wykazują wrażliwość na rozpuszczalniki organiczne oraz mają wąski zakres pH, w którym pozostają stabilne. Ze względu na te ograniczenia wciąż poszukuje się alternatywnych, równie efektywnych i bezpiecznych nośników do immobilizacji. Jak pokazują ostatnie doniesienia naukowe, **innowacyjnym biomateriałem, który spełnia wszystkie cechy idealnego nośnika do immobilizacji, może być celuloza bakteryjna.**



Ryc. 5.30. Poziomy immobilizacji mikroorganizmów na nośniku celulozowym: adsorpcja na powierzchni i immobilizacja wewnątrz nośnika

Materialy

Celuloza bakteryjna natywna i modyfikowana; jałowa sól fizjologiczna (0,85-proc. roztwór NaCl); barwnik czerń amidowa; barwnik MTT; roztwór enzymu celulazy w buforze octanowym; olejek immersyjny; probówki; statywy na probówki; płytki 96-dołkowa; szklane probówki; wymazówki; pęseta; skalpel; szkiełka podstawowe i nakrywkowe; densytometr; inkubator; czytnik mikropłytek.

Mikroorganizmy

Saccharomyces cerevisiae, *Yarrowia lipolytica*, *Lactobacillus delbrueckii*.

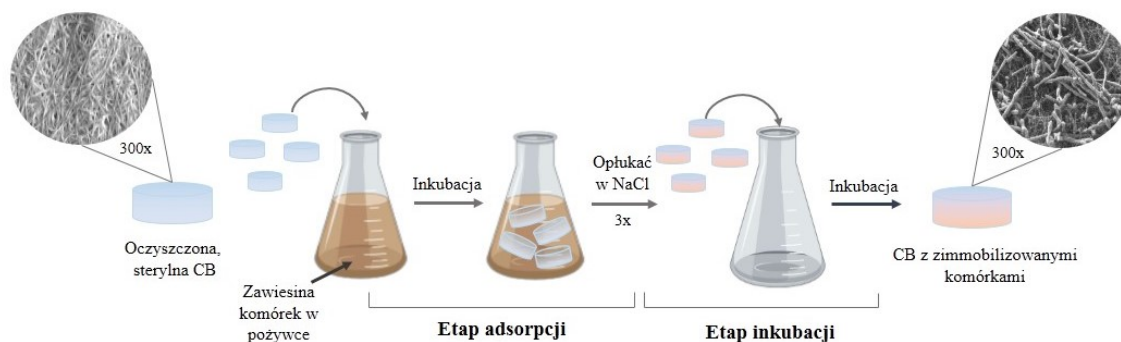
Przebieg ćwiczenia

Przygotowanie zawiesiny testowanych mikroorganizmów

1. Za pomocą wymazówki lub ezy mikrobiologicznej pobrać kilka kolonii ze świeżej, 24-godzinnej hodowli i zawiesić w płynnej pożywce (optymalnej dla wykorzystywanego mikroorganizmu).
2. Należy uzyskać zawiesinę o gęstości 2,0 w skali McFarlanda, co w przybliżeniu odpowiada $6,0 \times 10^8$ CFU/ml.
3. Gęstość zawiesiny oznaczyć, wykorzystując densytometr.

Proces immobilizacji metodą adsorpcji-inkubacji

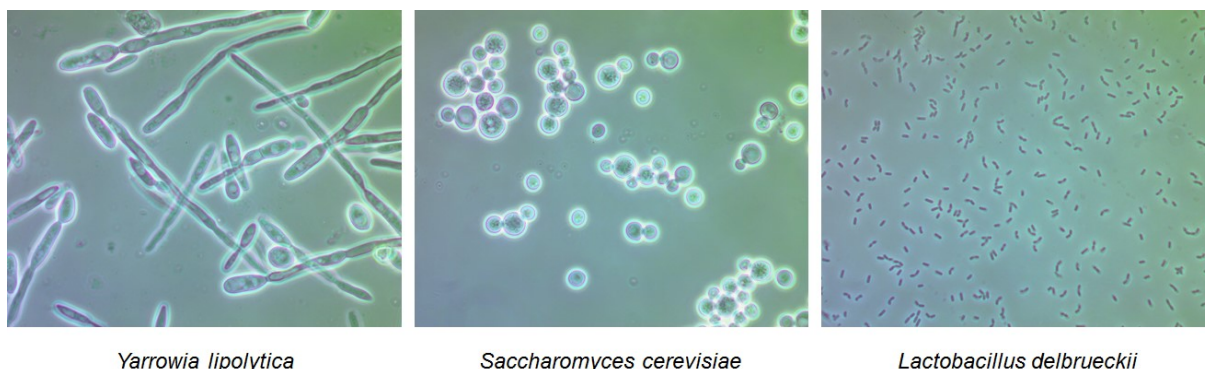
1. Do probówek nalać 30 ml przygotowanej zawiesiny komórek.
2. Do zawiesiny dodać 5 g CB i inkubować w inkubatorze z wytrząsaniem w temp. 30°C przez 20–30 minut.
3. Próby CB przemyć w 0,85-proc. roztworze NaCl w celu usunięcia niezimmobilizowanych komórek i przenieść do czystej kolby.
4. Próby CB inkubować przez 24 godziny. Metoda adsorpcji-inkubacji pozwala na immobilizację komórek zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz nośnika (ryc. 5.31).



Ryc. 5.31. Proces immobilizacji metodą adsorpcji-inkubacji z wykorzystaniem CB jako nośnika

Ocena efektywności immobilizacji metodą mikroskopową

1. Po inkubacji za pomocą pęsety usunąć CB z zawiesiny komórek i przepłukać w 0,85-proc. roztworze NaCl w celu usunięcia niezimmobilizowanych komórek.
2. Za pomocą skalpela odciąć kawałek CB o długości ok. 0,5 cm, umieścić go na szkiełku podstawowym i zabarwić poprzez naniesienie kropli barwnika (czern amidowa).
3. Po 5 minutach inkubacji należy przepłukać fragment CB w 0,85-proc. roztworze NaCl i ponownie umieścić go na szkiełku.
4. Zabarwioną próbę CB przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
5. Preparat oglądać w mikroskopie świetlnym przy użyciu obiektywu immersyjnego (100 ×) (ryc. 5.32).



Yarrowia lipolytica

Saccharomyces cerevisiae

Lactobacillus delbrueckii

Ryc. 5.32. Różnice w morfologii mikroorganizmów użytych do immobilizacji

Ocena efektywności immobilizacji – test MTT

1. Po procesie immobilizacji próby CB przenieść pęsetą do probówki.
2. Do probówki dodać 30 ml buforu z enzymem celulazą.
3. Probówki inkubować w inkubatorze z wytrząsaniem w temp. 28–30°C, aż do całkowitego rozpuszczenia CB.
4. Po inkubacji zawiesinę należy zwirować (3000 × g przez 10 minut), zlać supernatant i dodać 30 ml 0,85-proc. roztworu NaCl. Procedurę wykonać 3-krotnie.
5. Zawiesinę komórek należy przenieść na płytkę 96-dołkową w 3 krokach w objętości 100 µl.
6. W doświadczeniu należy uwzględnić próbę ślepą (kontrola jałowości NaCl) – 100 µl 0,85-proc. roztworu NaCl oraz kontrolę 100% – 100 µl wyjściowej zawiesiny komórek użytej do immobilizacji.
7. Następnie do wszystkich studzienek przenieść po 10 µl barwnika MTT.

8. Tak przygotowaną płytkę należy umieścić w inkubatorze i inkubować przez 30 minut w temp. 28–30°C.
9. Jeśli po inkubacji wytrąciły się kryształy formazanu, do każdej studzienki należy dodać po 100 µl rozpuszczalnika formazanu (DMSO lub izopropanol).
10. Płytki umieścić na wstrząsarce i łagodnie mieszać, aby kryształy formazanu uległy rozpuszczeniu.
11. Intensywność koloru oznaczyć spektrofotometrycznie przy długości fali 540–570 nm za pomocą czytnika mikropłytek.

Barwnik MTT ulega w żywych komórkach redukcji (aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów) do barwnych, purpurowych kryształów formazanu (ma miejsce otwarcie pierścienia tetrazolowego przez enzymy z grupy dehydrogenaz). Oznaczanie aktywności metabolicznej, żywotności i proliferacji komórek z zastosowaniem barwnika MTT opiera się na założeniu, że tylko żywe komórki redukują MTT do kryształów formazanu.

Wyniki

1. Obliczyć średnie wartości absorbancji uzyskanych dla każdej próby.
2. Na podstawie poniższego wzoru oblicz efektywność immobilizacji

$$E\% = (A_a \times 100\%) / A_b$$

Gdzie: E% – efektywność immobilizacji; A_a – absorbancja dla zawiesiny komórek immobilizowanych na CB; A_b – absorbancja wyjściowej zawiesiny komórek użytej do immobilizacji.

3. Uzyskane wyniki zamieścić w tabeli 5.14.
4. Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć, który z testowanych mikroorganizmów immobilizował się najefektywniej.
5. Na podstawie uzyskanych wyników ocenić, na którym z analizowanych nośników testowane mikroorganizmy immobilizowały się najefektywniej.
6. Zamieścić zdjęcia preparatów mikroskopowych mikroorganizmów immobilizowanych na CB.

Tabela 5.14. Efektywność immobilizacji na CB

Mikroorganizm	A ₁	A ₂	A ₃	A _{średnia}	Odchylenie standardowe	Efektywność immobilizacji
<i>S. cerevisiae</i>						
<i>Y. lipolytica</i>						
<i>L. delbuecki</i>						

Wnioski

.....

.....

.....

.....

Piśmiennictwo

- Bielecki S., Krystynowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H. 2005. *Polysaccharides: Bacterial Cellulose*. W: *Biopolymers*. Red. A. Steinbüchel, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Ciecholewska-Jusko D., Żywicka A., Junka A., Drozd R., Sobolewski P., Migdal P., Kowalska U., Toporkiewicz M., Fijałkowski K. 2020. Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. *BioRxiv* DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.04.975003>.
- Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown Jr. R.M. 2006. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27, 145–151.
- Fijałkowski K., Drozd R., Rakoczy R., Junka A.F. 2016. Biomedyczne zastosowanie bakteryjnej celulozy. *Forum Zakażeń* 7 (5), 377–379.
- Fijałkowski K., Żywicka A., Drozd R., Junka A.F., Peitler D., Kordas M., Konopacki M., Szymczyk P., Rakoczy R. 2016. Increased water content in bacterial cellulose synthesized under rotating magnetic fields. *Electromagnetic Biology and Medicine* 36 (2), 192–201.
- Fijałkowski K., Żywicka A., Drozd R., Kordas M., Rakoczy R. Effect of Gluconacetobacter xylinus cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose. *Polish Journal of Chemical Technology* 2016, 18 (4), 116–122.
- Fijałkowski K., Żywicka A., Drozd R., Niemczyk A., Junka A.F., Peitler D., Kordas M., Konopacki M., Szymczyk P., El Fray M., Rakoczy R. 2015. Modification of bacterial cellulose through exposure to the rotating magnetic field. *Carbohydrate Polymers* 133, 52–60.
- Gama M., Bielecki S. 2017. *Bacterial nanocellulose from biotechnology to bio-Economy*, Amsterdam: Elsevier B.V.
- Junka A., Fijałkowski K., Ząbek A., Mikołajewicz K., Chodaczek G., Szymczyk P., Smutnicka D., Żywicka A., Sedghizadeh P.P., Dziadas M., Młynarz P., Bartoszewicz M. 2017. Correlation between type of alkali rinsing, cytotoxicity of bio-nanocellulose and presence of metabolites within cellulose membranes. *Carbohydrate Polymers* 157, 371–379.
- Junka A., Żywicka A., Chodaczek G., Dziadas G., Czajkowska J., Duda-Madej A., Bartoszewicz M., Mikołajewicz K., Krasowski G., Fijałkowski K. 2019. Combining forces of nature by coupling essential oils and bio-cellulose carrier to fight against bone-formed biofilm. *Scientific Reports – Nature* 9, 1–13.
- Krystynowicz A., Czaja W., Bielecki S. 1999. Biosynteza i możliwości wykorzystania celulozy bakteryjnej. *Żywność* 3 (20), 21–34.
- Kubiak K., Kalinowska H., Peplińska M., Bielicki S. 2009. Celuloza bakteryjna jako nanobiomateriał. *Postępy Mikrobiologii* 36, 85–98.
- Olędzki R., Walaszczyk E. 2020. Bionanoceluloza – właściwości, pozyskiwanie i perspektywy zastosowania w przemyśle spożywczym. *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology* 59 (1), 87–109.
- Pecoraro E., Manzani D., Messaddeq Y., Ribeiro S. 2008. Bacterial cellulose from Gluconacetobacter xylinus: preparation, properties and applications. W: *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Red. M.N. Belgacem, A. Gandini, Elsevier, s. 369–383.
- Trovatti E. 2013. *Bacterial cellulose*. W: *Biopolymer nanocomposites: processing, properties, and applications*. Red. A. Dufresne, S. Thomas, L. A. Pothen, John Wiley & Sons, Inc., s. 339–366.
- Żywicka A., Fijałkowski K., Junka A., Grzesiak J., El Fray, M. 2018. Modification of bacterial cellulose with quaternary ammonium compounds based on fatty acids and amino acids and the effect on antimicrobial activity. *Biomacromolecules* 19, 1528–1538.
- Żywicka A., Junka A., Szymczyk P., Chodaczek G., Grzesiak J., Sedghizadeh P., Fijałkowski K. 2018. Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil. *Carbohydrate Polymers* 199, 294–303.
- Żywicka A., Peitler D., Rakoczy R., Konopacki M., Kordas M., Fijałkowski K. The effect of different agitation modes of bacterial cellulose synthesis by Gluconacetobacter xylinus strains. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica* 2015, 14 (1), 137–150.

- Żywicka A., Wenelska K., Junka A., Chodaczek G., Szymczyk P., Fijałkowski K. 2019. Immobilization pattern of morphologically different microorganisms on bacterial cellulose membranes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35, 1–11.
- Żywicka A., Wenelska K., Junka A., Czajkowska J., Fijałkowski K. 2019. An efficient method of *Yarrowia lipolytica* immobilization using oil- and emulsion-modified bacterial cellulose carrier. *Electronic Journal of Biotechnology* 41, 30–36.

6. BAKTERIOFAGI JAKO NANOBIOMATERIAŁ – CHARAKTERYSTYKA I OCENA AKTYWNOŚCI

Xymena Stachurska, Paweł Nawrotek

Bakteriofagi (fagi) są wirusami specyficznymi względem komórek bakteryjnych. Ich zakres infekcyjny najczęściej obejmuje określony gatunek bakterii, a w niektórych przypadkach nawet konkretne szczepy. Fagi **lityczne**, eradykujące bakterie poprzez mechanizm lizy, wykazują znaczący potencjał antybakteryjny i jako pasażowalne jednostki bakteriolityczne są wykorzystywane w jedno- lub wielofagowej (koktajle fagowe) **terapii chorób bakteryjnych**, w tym wywoływanych przez szczepy wielolekooporne (Górski i in., 2009). Ponadto bakteriofagi można stosować jako **nośniki** DNA, białek lub leków (Sunderland i in., 2017). Złożoność biochemiczna cząsteczek tworzących wirion fagowy oraz jego zróżnicowana wielkość wyrażana w skali nanometrycznej sprawiają, iż bakteriofagi mogą być traktowane jako **naturalne nanocząstki**, które mogą oddziaływać również z innymi materiałami, w tym nanomateriałami (Nawrotek i in., 2020). Potencjał aplikacyjny bakteriofagów i nanomateriałów jest intensywnie rozwijany. Obecnie podejmowane są m.in. próby zwiększenia ich działania i aktywności bakteriofagowej poprzez uzyskanie **efektu synergistycznego**. Tworzenie biohybrydowych materiałów nanostrukturalnych, złożonych zarówno z nieorganicznych nanocząstek, jak i biomolekuł fagowych, znajduje wiele nowych możliwości zastosowań w bardzo różnych dziedzinach, w tym takich jak np. medycyna czy **nanobiotechnologia** (Yang i in., 2013; Farr i in., 2014).

Ćwiczenie 6.1

Izolacja bakteriofagów środowiskowych

Cel

Izolacja bakteriofagów o potencjale litycznym z różnych środowisk naturalnych.

Wprowadzenie

Fagi są najliczniejszymi formami życia na Ziemi i można je znaleźć w wielu różnych źródłach pochodzenia środowiskowego, roślinnego i zwierzęcego. Najlepszym źródłem izolacji danego faga jest taki materiał wyjściowy, w którym występuje konkretny gospodarz bakteryjny, wrażliwy na infekcję tym fagiem. Zatem w przypadku fagów infekujących ludzką florę jelitową doskonałym źródłem ich pozyskiwania są ścieki komunalne, natomiast dla **cyjanofagów** (wirusów infekujących sinice) będzie to woda morska.

Przed rozpoczęciem izolacji fagów gospodarz bakteryjny musi zostać namnożony i być utrzymywany w stanie aktywności metabolicznej. Podczas izolacji fagów na ogół powinno się używać hodowli gospodarza bakteryjnego znajdującej się w logarytmicznej fazie wzrostu, chociaż niektóre fagi wydają się również zdolne do namnażania w komórkach bakteryjnych będących w stacjonarnej fazie wzrostu.

Fagi specyficzne dla danego gospodarza są czasami trudne do bezpośredniej izolacji. Z tego powodu często wymagane są **procedury wzbogacania**, czyli dodawania gospodarza bakteryjnego do oczyszczonej próby wyjściowej w celu inicjacji proliferacji fagów jeszcze przed ich izolacją. Niestety może to ograniczać różnorodność izolowanych fagów, ponieważ dowolna procedura wzbogacania indukuje błąd polegający na dominacji tych fagów, które mogą rozprzestrzeniać się najsukuteczniej jedynie w warunkach eksperymentalnych. Dlatego też niniejsza

procedura doświadczalna przewiduje wzbogacanie prób wyjściowych 3 różnymi gatunkami bakteryjnych gospodarzy.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: próbka wyjściowa wody stawowej, osadu stawowego, ścieków komunalnych lub wody ze zbiorników stojących (50 ml); sterylny, podwójnie stężony bulion lizogenny (LB) (30 ml); sterylne płytki Petriego z agarem lizogennym (LA) (3 szt.); sterylne kolby Erlenmeyera o poj. 100 ml (3 szt.); sterylne probówki typu Falcon o poj. 50 ml (10 szt.); całonocne lub 24-godzinne hodowle szczepów bakteryjnych w bulionie LB (10 ml, 3 szt.); sterylne strzykawki o poj. 20 ml (4 szt.); sterylne filtry strzykawkowe PES o średnicy porów 0,22 μm (4 szt.); chloroform (10 ml); statyw na probówki typu Falcon; pipety zmiennopojemnościowe o poj. 100–1000 μl , 10–100 μl i 0,5–10 μl ; sterylne tipsy (końcówki do pipet); sterylne głaszczki (3 szt.); wirówka laboratoryjna; worteks; cieplarka lub łaźnia wodna z wytrząsaniem.

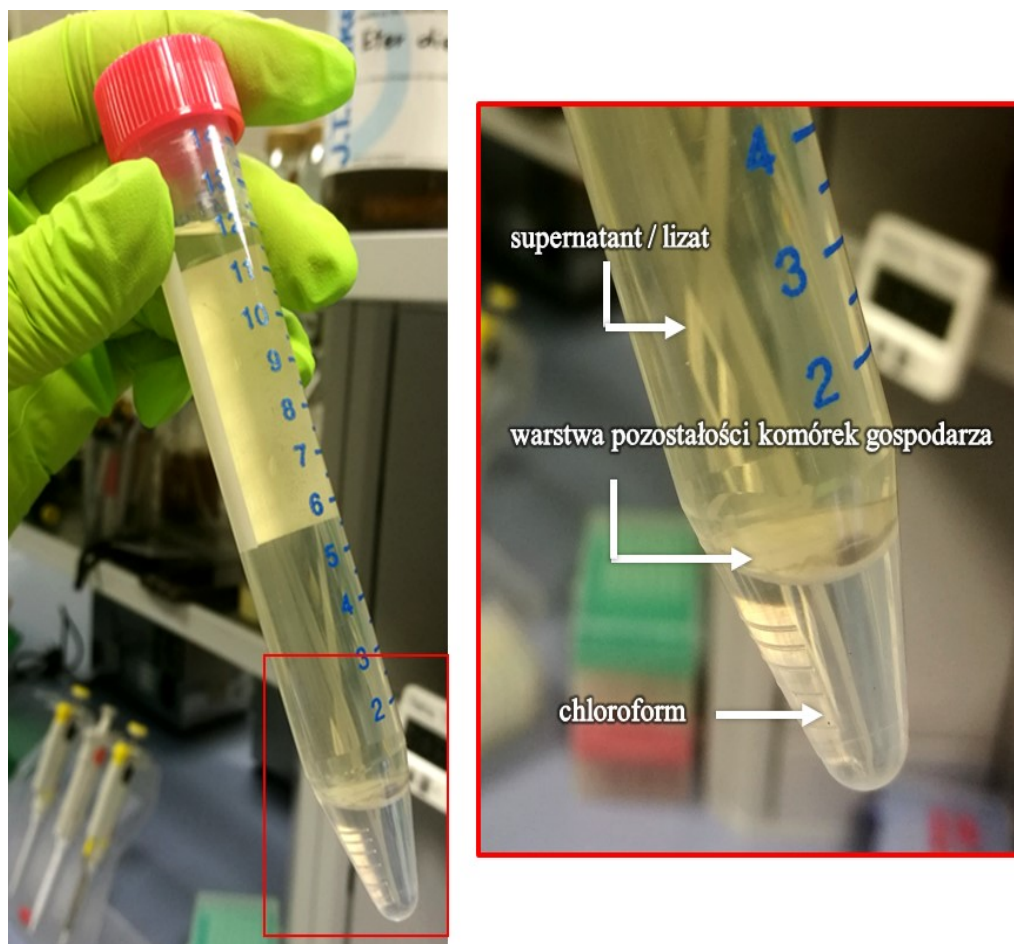
Mikroorganizmy

Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 2-osobowe

1. **Próbkę wyjściową zwirować** (3500 rpm, 10 minut) w wirówce laboratoryjnej w celu oddzielenia osadu, dużych zanieczyszczeń i cząstek stałych. Przygotować statyw z 1 sterylną probówką typu Falcon. Po odwirowaniu próbkę **ostrożnie umieścić w statywie**. Strzykawkę odpakować i wyjąć tłok. Usunąć górną folię z opakowania filtra strzykawkowego i następnie **mocno nasadzić** na łącznik stożkowy strzykawki. Odkręcić nakrętkę sterylnej probówki typu Falcon i umieścić w jej górnej części filtr ze strzykawką. Odkręcić nakrętkę probówki typu Falcon z próbą wyjściową i za pomocą pipety automatycznej **ostrożnie przenosić supernatant do strzykawki**. Nasadzić tłok strzykawki i **powoli** przepuszczać płyn przez filtr. Czynność powtarzać aż do **wysterylizowania całego supernatantu**. Probówkę typu Falcon z filtratem **zakręcić**, aby uniknąć jego kontaminacji, i przechowywać w temp. 4°C.
2. Do kolb Erlenmeyera o poj. 100 ml przenieść za pomocą pipety po 10 ml sterylnego, **podwójnie stężonego** bulionu LB i dodać 10 ml **oczyszczonego filtratu**. Każdą z kolb **zaszczepić** 100 μl całonocnej hodowli danego gospodarza bakteryjnego (1 gospodarz bakteryjny na 1 kolbę). Inkubować w temp. 37°C z delikatnym mieszaniem (50–70 rpm) przez 24 godziny.
3. Po 24-godzinnej inkubacji **zawartość kolb przenieść** do osobnych sterylnych probówek typu Falcon (3 szt.) i **zwirować** (3700 rpm, 15 minut), aby odseparować pellet bakteryjny. Przygotować statyw z 6 sterylnymi probówkami typu Falcon. Po odwirowaniu próby **ostrożnie umieścić w statywie**. Supernatanty powstałe po odwirowaniu ostrożnie rozpipetować do 3 nowych probówek typu Falcon i dodać po 500 μl **chloroformu** w celu usunięcia resztek komórek bakteryjnych. Mieszać poprzez energiczne wytrząsanie i worteksowanie przez 5 minut. Próby ponownie zwirować (3700 rpm, 15 min) i **ostrożnie umieścić w statywie**. Supernatanty **sterylizować** za pomocą filtrów strzykawkowych i rozdzielić do nowych probówek typu Falcon, analogicznie do sterylizacji próby wyjściowej (ryc. 6.1). **Należy uważać, aby nie naruszyć przy tym powstałego kożuszka z warstwy pozostałości komórkowych gospodarza bakteryjnego!** Oczyszczone lizaty przechowywać w temp. 4°C.



Ryc. 6.1. Rozdział faz po odwirowaniu supernatantu z dodatkiem chloroformu

4. Następnym etapem jest przetestowanie lizatu na **obecność bakteriofagów** z użyciem komórek gospodarza bakteryjnego za pomocą testu kropelkowego (**spot-testu**). W tym celu na płytki Petriego (3 szt.) z podłożem LA nanieść 100 μ l zawiesiny całonocnej hodowli odpowiedniego gospodarza bakteryjnego i **dokładnie** rozprowadzić na powierzchni płytki za pomocą gładzeczki. Odczekać, aż płyn wyschnie, a następnie na każdą z płytek 5-krotnie (z zachowaniem odstępów) napipetować po 5 μ l lizatu na powierzchnię podłoża, tworząc kropelkowe **spoty**. Odczekać do wchłonięcia się spotów i inkubować przez 24 godziny w temp. 37°C (wg Carlson, 2005; Van Twest i Kropinski, 2009, zmodyfikowane).

Wyniki

1. Na podstawie obserwacji zidentyfikować strefy zahamowania wzrostu na powierzchni murowek bakteryjnych – tzw. łysinki (ryc. 6.2), świadczące o obecności bakteriofagów w testowanym lizacie oraz – co za tym idzie – ich obecności w próbce wyjściowej.
2. Obecność łysinek fagowych świadczy o zdolności wyizolowanych bakteriofagów do zakażenia (infekcji) i lizy badanych szczepów bakteryjnych.
3. Charakterystykę wyizolowanych fagów przedstawić w tabeli 6.1.



Ryc. 6.2. Łysinki fagowe obserwowane jako strefy zahamowania wzrostu na powierzchni murawki bakteryjnej

Tabela 6.1. Charakterystyka wyizolowanych fagów środowiskowych

Kryteria oznaczania obecności bakteriofagów	Gospodarz bakteryjny		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Obecność łysinek (tak/nie)			
Liczba łysinek/spotów ($\times/5$)			
Morfologia łysinek*			

* Średnica łysinek (mm), łysinki przejrzyste/mętne, obecność strefy halo (dodatkowej strefy przejaśnienia wokół łysinki).

Ćwiczenie 6.2

Oznaczanie miana bakteriofagów w lizacie fagowym

Cel

Oznaczanie ilości cząstek wirusowych w lizacie poprzez wyznaczenie miana fagowego.

Wprowadzenie

Najstarszą, ale wciąż najczęstszą i najbardziej przydatną metodą liczenia cząsteczek fagowych, a dzięki temu określania ich miana, jest **test łysinkowy** (ang. *plaque assay*), który po raz pierwszy został opisany przez d’Herelle wkrótce po odkryciu bakteriofagów.

Powstawanie **łysinek fagowych** jest w tym przypadku ograniczone powolną dyfuzją faga w półstałym miękkim agarze (**top agar**/soft agar) i – w większości przypadków – przez fakt, że komórki gospodarza wspierają wzrost faga tylko tak długo, jak długo same aktywnie metabolizują. Tym samym, gdy wzrost komórek ustaje, wzrost faga również. Rozmiar łysinki zależy przede wszystkim od rodzaju i wielkości faga, grubości dolnej (**base agar**) i górnej (top agar) warstwy agaru, stężenia agaru w górnej warstwie (i wynikającej z tego szybkości dyfuzji), rodzaju podłoża, gęstości komórek gospodarza bakteryjnego, czasu adsorpcji faga i liczby uwalnianych bakteriofagów, określanej jako wielkość wyrzutu (**burst size**).

Jednym z wariantów testu łysinkowego jest jego połączenie z testem kropelkowym (spot-testem), co skutkuje poprawą jego wydajności oraz szybkości. Zwiększa także efektywność przetwarzania dużych ilości próbek i analizę miana kilku lizatów fagowych jednocześnie względem danego gospodarza bakteryjnego.

Każda cząsteczka fagowa, która powoduje powstanie łysinki, jest nazywana **jednostką tworzącą łysinkę** (ang. *plaque-forming unit*, PFU). Liczba PFU w danej objętości próbki daje wgląd w realne stężenie fagów i ich miano. Czynności podjęte w celu oznaczenia ilości cząstek wirusowych w lizacie (wyznaczenie miana fagowego) nazywane są także **miareczkowaniem**. Niniejsza procedura doświadczalna przewiduje uzyskanie informacji o mianie badanego bakteriofaga poprzez zastosowanie zmodyfikowanego testu łysinkowego.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: lizat fagowy przechowywany w temp. 4°C (1 ml); sterylna płytka Petriego z agarem lizogennym (LA) służąca jako base agar (1 szt.); bulion lizogenny (LB) z dodatkiem 7-proc. agaru służący jako top agar (5 ml); sterylna probówka o poj. 10 ml (1 szt.); sterylne, ponumerowane (1–12) probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml (12 szt.); bufor TM (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂) (15 ml); statyw na probówki typu Eppendorf; całonocna lub 24-godzinna hodowla gospodarza bakteryjnego w bulionie LB (1 ml); pipety automatyczne zmiennopojemnościowe o poj. 100–1000 µl, 10–100 µl i 0,5–10 µl; sterylne tipsy (końcówki do pipet); łaźnia wodna; palnik laboratoryjny; pudełka po końcówkach do pipet; ciepłarka.

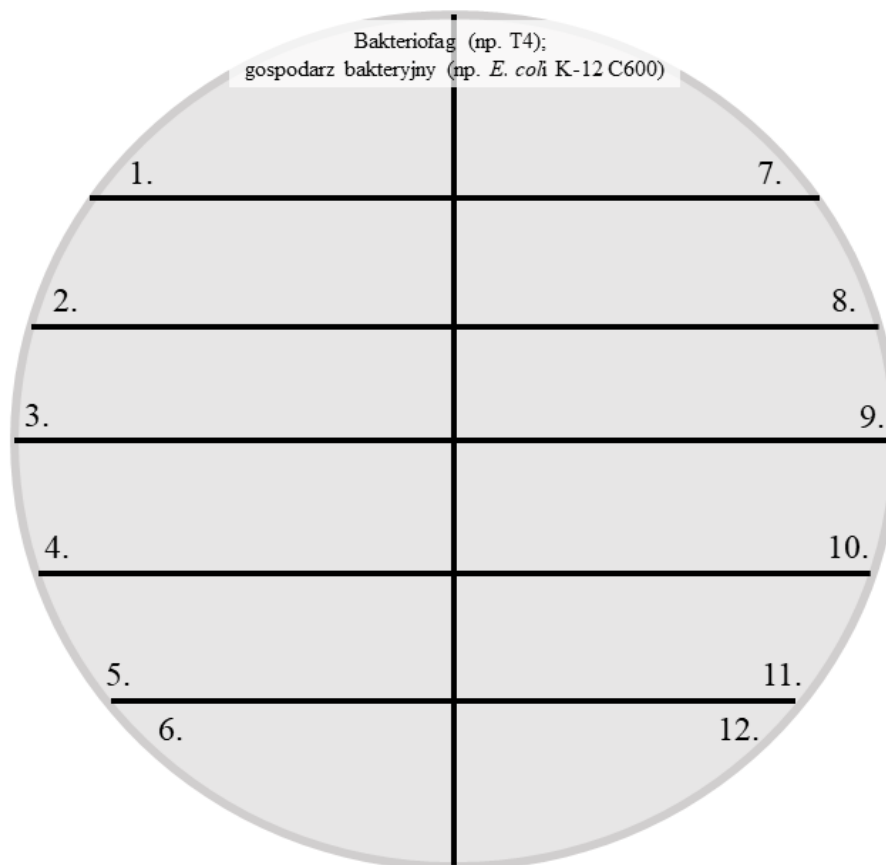
Mikroorganizmy

Escherichia coli, bakteriofag T4 (lub ewentualnie gospodarz bakteryjny i bakteriofag wyizolowany podczas ćwiczenia 6.1).

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 2-osobowe

1. Top agar umieścić w łaźni wodnej w celu jego **dokładnego rozpuszczenia**. Przygotować płytkę z base agarem. Płytkę opisać i narysować siatkę rozcieńczeń (ryc. 6.3) na płytce od strony podłoża.



1. – pierwsze rozcieńczenie dziesiętne; 10^{-1} ; 2. – drugie rozcieńczenie dziesiętne; 10^{-2} ;
3. – trzecie rozcieńczenie dziesiętne; 10^{-3} ; itd.

Ryc. 6.3. Schemat opisu płytki Petriego wraz z naniesioną siatką rozcieńczeń dziesiętnych

2. Przygotować statyw i umieścić w nim 12 probówek typu Eppendorf. Do każdej z probówek (**zachowując zasady aseptyki**) dodać bufor TM w ilości niezbędnej do wykonania **rozcieńczeń dziesiętnych** (np. 900 μ l, 450 μ l, 180 μ l itd.). Wyjąć z lodówki lizat fagowy i pobrać odpowiednią jego ilość w celu wykonania pierwszego rozcieńczenia dziesiętnego (np. 100 μ l, 50 μ l, 20 μ l itd.) – lizat wprowadzić do pierwszej probówki z buforem TM i zmieszać poprzez kilkukrotne przepipetowanie. Zmienić końcówkę pipety i przenieść odpowiednią ilość zawartości probówki pierwszej do probówki drugiej i także przepipetować. Czynność powtarzać analogicznie do uzyskania **12 rozcieńczeń dziesiętnych**.
3. Po dokładnym rozpuszczeniu top agaru wyjąć go z łaźni wodnej i studzić w temperaturze pokojowej do osiągnięcia temp. ok. **45°C**. Przenieść 3 ml nadal **płynnego** top agaru do sterylnej probówki o poj. 10 ml. Następnie pobrać 200 μ l zawiesiny nocnej hodowli gospodarza bakteryjnego, dodać do wyżej wymienionej probówki, **zamieszać** jej zawartość i **wylać równomiernie** na powierzchnię base agaru (ostrożne przechylenie płytki base agar z wylanym top agarem na boki spowoduje otrzymanie równomiernej warstwy). Płytkę pozostawić na blacie w temperaturze pokojowej agarem do dołu w celu zestalenia się top agaru.
4. Po zestaleniu górnej warstwy z dodatkiem komórek gospodarza bakteryjnego **3-krotnie** nakropić po 3 μ l każdego z przygotowanych rozcieńczeń dziesiętnych lizatu fagowego, w odpowiednich obszarach siatki rozcieńczeń, uważając, aby **nie dotknąć** warstwy top agaru końcówką tipsa („zrzucanie kropki”). Płytkę z naniesionymi spotami (kroplami) **ostrożnie** przenieść (agarem do dołu) na podwyższenie z pudełek po końcówkach do pipet, ustawionych wokół **włączonego palnika laboratoryjnego**. Uchylić wieczko płytki w celu

podsuszenia kropeł w sterylnym, ciepłym obiegu powietrza przez ok. 10–20 minut lub do zaobserwowania braku widoczności kropeł (ryc. 6.4). Płytkę zamknąć i wyłączyć palnik. Następnie przenieść płytkę (agarem do góry) do ciepłarki i inkubować przez 24 godzin w temperaturze dostosowanej do wzrostu gospodarza bakteryjnego (dla *E. coli* – w temp. 37°C) (wg Carlson, 2005; Van Twest i Kropinski, 2009, zmodyfikowane).



Ryc. 6.4. Suszenie płytek w obiegu powietrza palnika

Wyniki

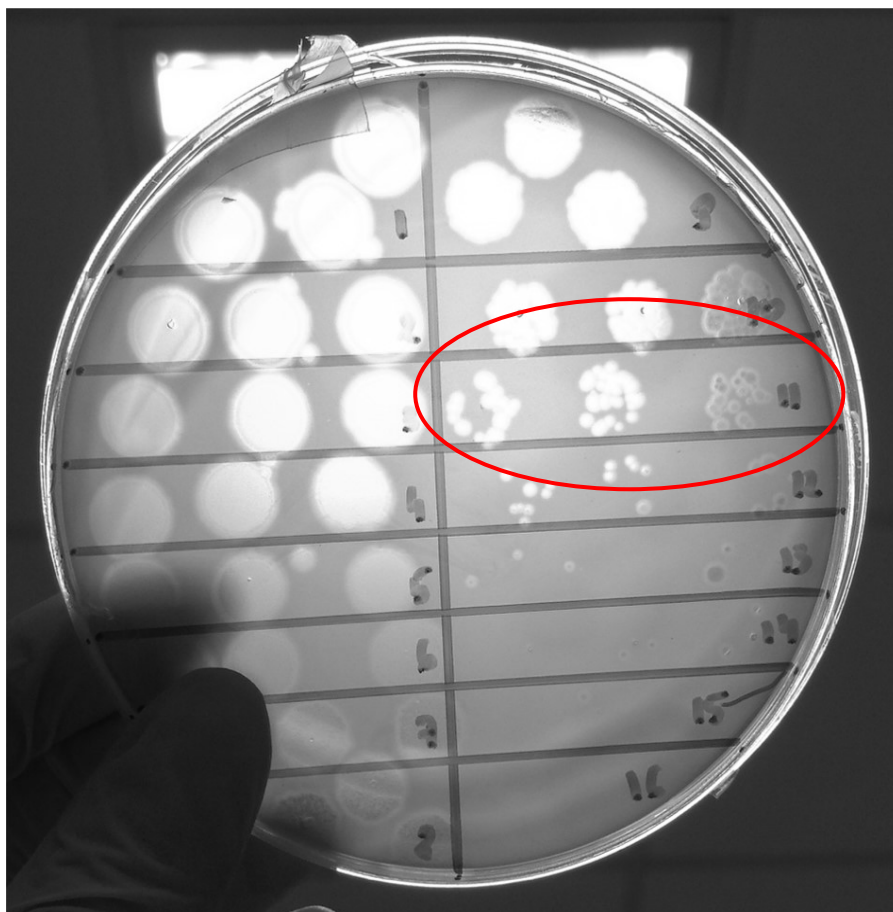
1. Zaobserwować pojedyncze, policzalne łysinki (3–30), w przypadku co najmniej 1 z rozcieńczeń dziesiętnych, pozwalające na wyznaczenie miana fagowego (ryc. 6.5).
2. Policzyć zaobserwowane pojedyncze łysinki (przy danym rozcieńczeniu) dla każdego z powtórzeń, a następnie obliczyć ogólną średnią, np. 18, 21 i 20 → średnia: 19,7. Wartość tę podstawić do wzoru w celu obliczenia PFU/ml:

$$\text{PFU/mL} = \text{średnia liczba łysinek} \times \frac{1000}{\text{ilość naniesionego lizatu w } \mu\text{L}} \times \text{rozcieńczenie}$$

Przykład:

$$\text{PFU/mL} = 19,7 \times \frac{1000}{3} \times 10^8 = 6566,7 \times 10^8 = 6,57 \times 10^{11}$$

3. Wyniki obliczeń przedstawić w tabeli 6.2.



Ryc. 6.5. Wynik miareczkowania lizatu fagowego; rozcieńczenie 11 i 12 pozwala na zaobserwowanie pojedynczych, policzalnych łysinek fagowych

Tabela 6.2. Liczba cząstek fagowych w lizacie

Rozcieńczenie	Powtórzenie I (ilość łysinek)	Powtórzenie II (ilość łysinek)	Powtórzenie III (ilość łysinek)	Średnia
Miano fagowe (PFU/ml)				

Ćwiczenie 6.3

Koinkubacja bakteriofagów i nanomateriałów

Cel

Określenie wpływu wybranych nanomateriałów na zdolność formowania łysinek przez bakteriofagi lityczne.

Wprowadzenie

Po zmieszaniu ok. 100–500 cząstek bakteriofagów z ok. 10^8 komórkami bakteryjnymi (wspierającymi namnażanie faga) w warstwie top agaru wylanego na powierzchni stałego podłoża (wspierającego wzrost bakterii) **niezainfekowane przez bakteriofaga bakterie** będą kontynuować wzrost i ostatecznie osiągną fazę stacjonarną, tworząc gładką nieprzezroczystą warstwę (**murawkę bakteryjną**). Cząstki faga wkrótce wejdą w kontakt z bakteriami wykazującymi niewrażliwość, a następnie je zainfekują. Fagi potomne z każdej zainfekowanej bakterii zakażą sąsiednie bakterie, a **cykl lityczny** będzie powtarzany wiele razy, powodując powstanie strefy lizy, która ostatecznie stanie się widoczna gołym okiem jako „**łysinka**” na powierzchni murawki bakteryjnej. Zdolność bakteriofagów do tworzenia łysinek jest więc jednym z podstawowych mechanizmów określania ich **aktywności litycznej**.

Ciekawym zagadnieniem w tej materii jest określanie wpływu **nanomateriałów i nanocząstek** na aktywność lityczną bakteriofagów. Ich mechanizm **interakcji** z nanomateriałem może być związany z rodzajem i charakterystyką danego nanomateriału, a także typem morfologicznym faga. W literaturze opisywane były już przypadki **działania stymulującego** nanocząstek ZnO na rozwój lityczny kolifaga MS2, a także **efekt inaktywujący** nanocząstek srebra na różne rodzaje fagów, przy czym efekt ten zależał przede wszystkim od wybranego stężenia nanocząstek i ich wielkości, a także od czasu ekspozycji. Z tego względu niniejsza procedura doświadczalna zakłada uzyskanie informacji o zdolności do formowania łysinek testowanego bakteriofaga po ekspozycji na SiO₂ i TiO₂ w wysokich stężeniach, z uwzględnieniem czasu trwania **koinkubacji**.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: lizat fagowy przechowywany w temp. 4°C (6 ml) o mianinie $\approx 1 \times 10^7 / 1 \times 10^6$ (PFU/ml); TiO₂ i SiO₂ zawieszone w sterylnej wodzie destylowanej o określonym stężeniu wyjściowym; sterylna 12-dołkowa płytka polistyrenowa (1 szt.); sterylna woda dejonizowana (5 ml); sterylna płytka Petriego z agarem lizogennym (LA) służąca jako base agar (7 szt.); bulion lizogenny (LB) z dodatkiem 7-proc. agaru służący jako top agar (100 ml); sterylna probówka o poj. 10 ml (7 szt.); sterylne probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml (21 szt.); statyw na probówki typu Eppendorf; całonocna lub 24-godzinna hodowla gospodarza bakteryjnego w bulionie LB (5 ml); pipety automatyczne zmiennopojemnościowe o poj. 100–1000 µl, 10–100 µl i 0,5–10 µl; sterylne tipsy (końcówki do pipet); łaźnia wodna; palnik laboratoryjny; pudełko po końcówkach do pipet; ciepłarka; minutnik.

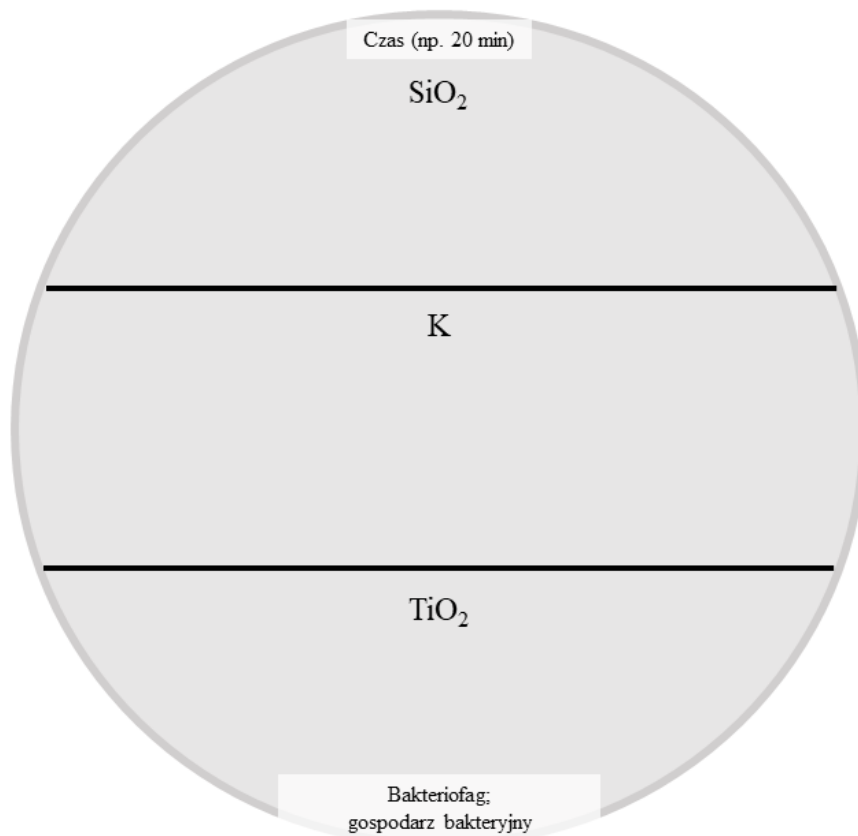
Mikroorganizmy i nanomateriały

Escherichia coli, bakteriofag T4 (lub ewentualnie gospodarz bakteryjny i bakteriofag wyizolowany podczas ćwiczenia 6.1), SiO₂, TiO₂.

Przebieg doświadczenia

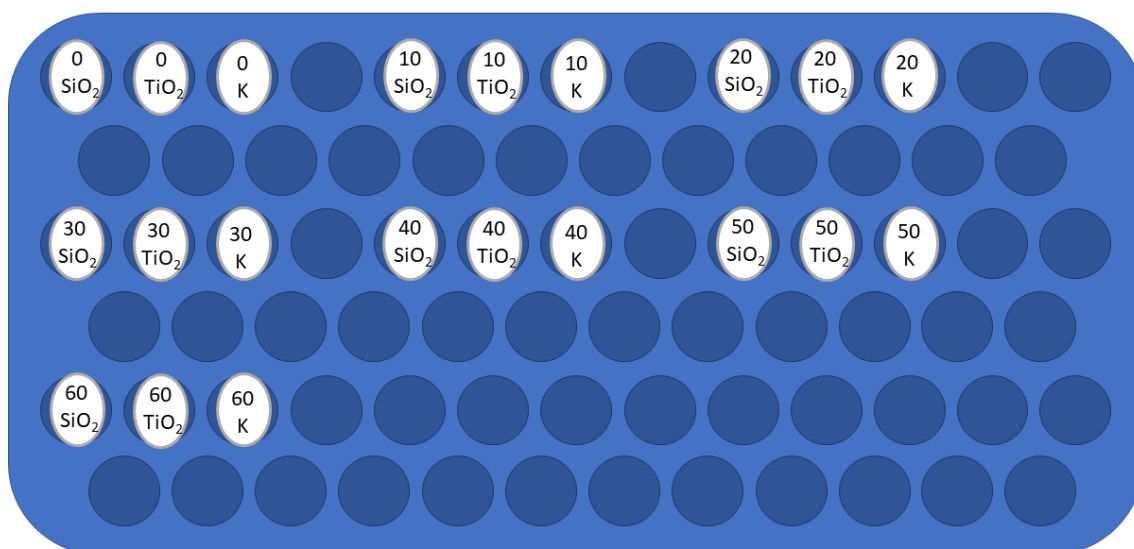
Dla całej grupy ćwiczeniowej (studenci wspólnie wykonują kolejne przydzielane zadania)

1. Top agar umieścić w łaźni wodnej w celu jego **dokładnego rozpuszczenia**. Przygotować płytki z base agarem (7 szt.). Płytki opisać od strony podłoża z uwzględnieniem czasów inkubacji (0, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 min), 2 prób badanych (SiO₂ i TiO₂) oraz kontroli (K) (ryc. 6.6).



Ryc. 6.6. Schemat opisu płytki Petriego

2. Przygotować statyw na probówki typu Eppendorf i umieścić w nim w 7 rzędach (odpowiadających czasom punktów pomiarowych: 0, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minut) po 3 probówki (oznaczone jako SiO_2 , TiO_2 i K) (ryc. 6.7).

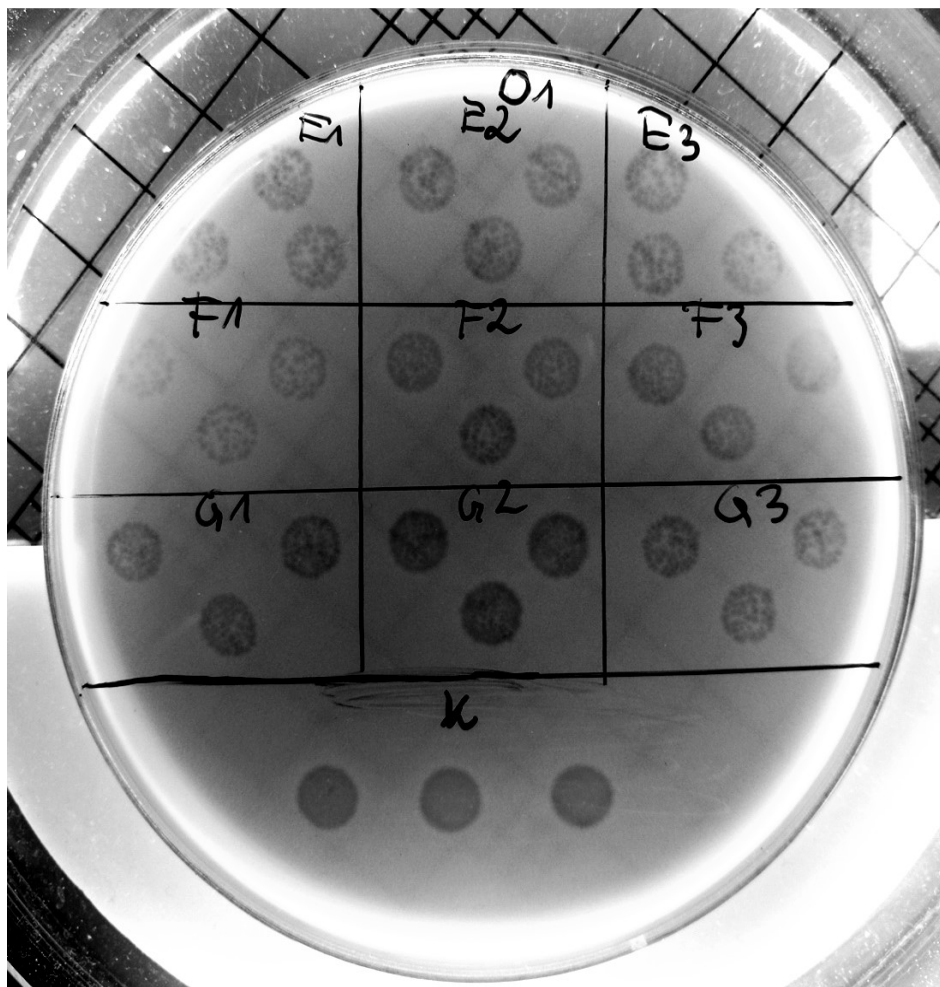


Ryc. 6.7. Schemat przykładowego rozmieszczenia probówek typu Eppendorf w statywie laboratoryjnym

3. Po dokładnym rozpuszczeniu top agaru wyjąć go z łaźni wodnej i studzić w temp. pokojowej do osiągnięcia ok. **45°C**. Przenieść po 3 ml nadal **płynnego** top agaru do sterylnych probówek o poj. 10 ml (7 szt.). Następnie do probówek dodawać po 200 µl zawiesiny nocnej hodowli gospodarza bakteryjnego, **zamieszać i wylewać równomiernie** na powierzchnię płytek base agar (7 szt.). Płytki pozostawić na blacie w temp. pokojowej agarem do dołu w celu zestalenia się topów.
4. Przygotować płytkę 12-dołkową. Wybrać 3 dołki i podpisać je na wieczku płytki jako SiO₂, TiO₂ i K. Wyjąć z lodówki lizat fagowy i rozpipetować po 2 ml do każdego z oznaczonych dołków. Następnie dodać **odpowiednią ilość** zawiesin nanocząstek, tak aby ich **stężenie końcowe wynosiło 0,5 mg/ml**. Do dołka „K” dodać analogiczną ilość wody dejonizowanej w celu zapewnienia identycznych objętości. Włączyć minutnik i **natychmiast** pobrać po 20 µl z każdej próby (czas 0 min) i przenieść do wcześniej przygotowanych odpowiadających im probówek typu Eppendorf. Przygotować płytkę z zestalonym top agarem opisaną jako „0 min”. Każdą z pobranych prób nakrapiać co najmniej **3-krotnie** w ilości 3 µl w odpowiednich obszarach płytki, uważając, aby **nie dotknąć** warstwy top agaru końcówką tipsa („zrzucanie kropli”). Płytkę z naniesionymi spotami (kroplami) **ostrożnie** przenieść (agarem do dołu) na podwyższenie z pudełek po końcówkach do pipet, ustawionych wokół **włączonego palnika laboratoryjnego**. Uchylić wieczko płytki w celu podsuszenia kropel w sterylnym, ciepłym obiegu powietrza przez ok. 10–20 minut lub do zaobserwowania braku widoczności kropel.
5. Czynności powtarzać analogicznie w pozostałych punktach czasowych: 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minut. Następnie przenieść podsuszone płytki do cieplarki i inkubować przez 24 godziny w temperaturze dostosowanej do wzrostu gospodarza bakteryjnego (dla *E. coli* – w temp. 37°C).

Wyniki

1. Zaobserwować spoty łysinkowe spowodowane dużą ilością zlanych ze sobą łysinek, co potwierdza obecność bakteriofagów w wysokim mianie i prawidłową zdolność fagów do formowania łysinek (K). W przypadku prób badanych (SiO₂, TiO₂) może zaistnieć taka sama zależność, co oznaczać będzie, że wybrane nanomateriały nie wpływają negatywnie na fagową zdolność do tworzenia łysinek.
2. Z kolei w przypadku zaobserwowania pojedynczych wstępnie policzalnych łysinek można założyć, że dany nanomateriał wpływa negatywnie na fagowe łysinkowanie (ryc. 6.8). W takim wypadku należy zwrócić uwagę na przypisany mu punkt czasowy, co pozwoli na wstępne określenie czasu koinkubacji, potrzebnego do zaobserwowania niniejszego efektu.
3. Wyniki obserwacji przedstawić w tabeli 6.3.



Ryc. 6.8. Przykładowy wynik eksperymentu koinkubacji z uwidocznionym spadkiem zdolności do łyśinkowania testowanego bakteriofaga; E₁–E₃, F₁–F₃, G₁–G₃ – nanomateriały w 3 różnych stężeniach, K – kontrola

Tabela 6.3. Wpływ wybranych nanomateriałów na zdolność formowania łyśinek fagowych

Czas inkubacji	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
SiO ₂ (zdolność bakteriofaga do tworzenia łyśinek, w stosunku do kontroli)*							
TiO ₂ (zdolność bakteriofaga do tworzenia łyśinek, w stosunku do kontroli)*							

* bez zmian / nieznaczny spadek / wyraźny spadek

Piśmiennictwo

- Carlson K. 2005. *Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches*. W: *Bacteriophages: biology and applications*. Red. E. Kutter, A. Sulakvelidze. CRC press, vol. 1, s. 439–490.
- Farr R., Choi D.S., Lee S.W. 2014. Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 10 (4), 1741–1750.
- Górski A., Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Lobočka M., Fortuna W., Letkiewicz S., Zimecki M., Filby G. 2009. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Current Opinion in Investigational Drugs* 10 (8), 766–774.
- Nawrotek P., Stachurska X., Augustyniak A. 2020. Perspektywiczne możliwości wykorzystania kombinacji działania bakteriofagów i nanomateriałów w zwalczaniu chorób bakteryjnych u zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna* 76 (7), 375–381.
- Sunderland K.S., Yang M., Mao C. 2017. Phage-enabled nanomedicine: from probes to therapeutics in precision medicine. *Angewandte Chemie International Edition* 56 (8), 1964–1992.
- Van Twest R., Kropinski A.M. 2009. *Bacteriophage enrichment from water and soil*. W: *Bacteriophages. Methods in molecular biology*. Red. M.R. Clokie, A.M. Kropinski. Humana Press, vol. 501, s. 15–21.
- Yang S.H., Chung W.J., McFarland S., Lee S.W. 2013. Assembly of bacteriophage into functional materials. *The Chemical Record* 13 (1), 43–59.

7. PROTEOMIKA – PRZYGOTOWANIE PRÓB DO ANALIZ PROTEOMICZNYCH

Alicja Dratwa-Chałupnik

Proteomika zajmuje się określeniem struktury białek, w tym izoform i modyfikacji potranslacyjnych, a także badaniem ich funkcji, lokalizacji oraz analizą interakcji pomiędzy nimi. Badania proteomiczne łączą metody biochemiczne, fizykochemiczne i bioinformatyczne. Umożliwiają równoczesną analizę wszystkich białek obecnych w komórce, tkance i płynach ustrojowych. Skład białkowy (**proteom**) danego systemu biologicznego ulega nieustannym zmianom w odpowiedzi na czynniki wewnątrz- i zewnątrzustrojowe, z tego powodu wyniki analiz proteomicznych dostarczają informacji o aktywności białek w danym czasie. Pozwala to na wytypowanie białek wskazujących na zmiany procesów biochemicznych zachodzących w organizmie.

Proteom jest strukturą bardzo dynamiczną, dlatego w analizach proteomicznych bardzo istotne jest właściwe pobranie materiału biologicznego oraz jego odpowiednie przechowywanie.

Kolejnym ważnym etapem jest **izolacja białek** z materiału biologicznego i przygotowanie próbek do analiz proteomicznych. Istotne jest, aby stosowane podczas tego procesu procedury wykonane były precyzyjnie i powtarzalnie. Mają one bowiem decydujący wpływ na jakość i wiarygodność uzyskanych później wyników badań.

Izolację białek z materiału biologicznego wykonuje się przez dezintegrację komórek (tkanek), wykorzystując łagodne lub mocniejsze metody homogenizacji. Podczas dezintegracji tkanek są uwalniane lub aktywowane endogenne proteazy, których obecność zmienia wyjściowy skład białkowy danej próbki. Proteazy można dezaktywować przez szybkie zamrażanie, denaturację próbki lub stosując **inhibitory proteaz** dedykowane danemu materiałowi biologicznemu. Inhibitory proteaz dodajemy tam, gdzie jest to konieczne. Należy brać pod uwagę, że dodane inhibitory wchodzą w pulę białek docelowej próbki.

Nie istnieje jeden uniwersalny sposób postępowania z preparatem biologicznym. Każdy materiał biologiczny (ekstrakt komórkowy, homogenat tkankowy czy płyn ustrojowy) wymaga przygotowania odrębnej **procedury**. Najbardziej zróżnicowane pod względem ilości białek oraz substancji niebiałkowych są **płyny ustrojowe**. Dlatego każdy z nich wymaga innego przygotowania do analiz proteomicznych. Na przykład próbki osocza/surowicy krwi wymagają zredukowania ilości białek wysokokopijnych (albumin, immunoglobulin), które w obrazie elektroforetycznym przysłaniają białka występujące w niewielkim stężeniu. Natomiast ubogie w białka próbki moczu oraz płynu mózgowo-rdzeniowego należy zagęścić i pozbyć substancji zakłócających proces rozdziału białek.

Przed rozpuszczeniem próbek w **buforze lizującym** należy usunąć z nich niebiałkowe zanieczyszczenia utrudniające analizę proteomiczną, takie jak: sole, tłuszcze, polisacharydy, kwasy nukleinowe.

Ostatnim etapem przygotowania próbek do analiz proteomicznych jest rozpuszczenie białek. W tym celu używa się **buforów lizujących**, których zadaniem jest denaturacja białek oraz utrzymanie ich w stanie rozpuszczonym i niezagregowanym w ciągu całego procesu analizy.

Ćwiczenie 7.1

Przygotowanie buforu lizującego

Cel

1. Poznanie składowych buforu zapewniającego rozpuszczenie, dezagregację i denaturację białek.
2. Wyjaśnienie znaczenia poszczególnych składowych buforu lizującego.

Wprowadzenie

Do lizy białek używa się buforów, których zadaniem jest denaturować białka oraz utrzymać je w stanie rozpuszczonym i uniemożliwiającym ich agregację w ciągu całego procesu analizy. W skład buforu lizującego wchodzi **czynniki chaotropowe** (mocznik, tiomocznik), **detergenty** (CHAPS), **związki redukujące** (DTT, TBP) oraz **amfolity**.

Materiały

Jednorazowe rękawice nitrylowe; probówka typu Falcon o poj. 10 ml; zlewka o poj. 25 ml; naczynka wagowe jednorazowe o poj. 7 ml; szpatułki i łyżeczki do naważania; pipeta zmienno-pojemnościowa o poj. 10–200 μl ; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 1000–5000 μl ; końcówki do pipety o poj. 200 μl (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 1000–5000 μl ; cylinder o poj. 25 ml; magnesik do mieszadła; mieszadło magnetyczne; waga; maseczki z filtrami; wytrząsarka na probówki; mocznik; tiomocznik; Tris; biolit; TBP.

Przebieg doświadczenia

1. W 25-mililitrowej zlewce należy naważyć mocznik i dolać do niego czystą wodę ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) w ilościach podanych w tabeli 7.1.
2. W zlewce umieścić magnesik i mieszać roztwór na mieszadle magnetycznym. Po rozpuszczeniu się mocznika dodać tiomocznik itd.; odczynniki dodawać po rozpuszczeniu się wcześniej dodanych do zlewki w ilości podanej w tabeli, w tym celu używać jednorazowych naczynek wagowych i szpatulek lub łyżeczek do naważania (**uwaga: nie używać tych samych szpatulek i łyżeczek do naważania różnych odczynników!**), natomiast ilość płynów odmierzać za pomocą pipet automatycznych, za każdym razem zmieniając końcówkę, gdy pobierany jest inny płyn.
3. Przygotowany roztwór przelać do cylindra o poj. 25 ml i dopełnić czystą wodą ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) do objętości 10 ml. Następnie bufor wlać do probówki typu Falcon o poj. 10 ml i wymieszać na wytrząsarce przez 1 minutę

Tabela 7.1. Składowe buforu lizującego

Odczynniki	Ilość odczynnika
7-molowy mocznik	4,20 g w 4 ml H ₂ O
2-molowy tiomocznik	1,52 g
4-proc. CHAPS	0,40 g
1-proc. DTT – dodać 30 minut przed użyciem	0,10 g
2-proc. amfolit – dodać 30 minut przed użyciem	2000 μl
H ₂ O	dopełnić do 10 ml

Wyniki

Podsumowanie doświadczenia zestawić w tabeli 7.2.

Tabela 7.2. Podsumowanie wyników doświadczenia

Napisz, do jakiej grupy składowych buforu lizującego należą mocznik i tio-mocznik, oraz wyjaśnij ich funkcję	
Napisz, do jakiej grupy składowych buforu lizującego należy CHAPS, i wyjaśnij jego funkcję	
Napisz, do jakiej grupy składowych buforu lizującego należy DTT, i wyjaśnij jego funkcję	
Jaka jest funkcja biolitów w buforze lizującym?	
Dlaczego biolity mają różny zakres pH?	

Ćwiczenie 7.2*Homogenizacja tkanki mięśnia szkieletowego i wątroby***Cel**

1. Izolacja białek z materiału biologicznego.
2. Poznanie metody pozyskiwania białek z tkanek.
3. Wyjaśnienie znaczenia precyzyjności i powtarzalności procesu dezintegracji tkanek w późniejszych analizach proteomicznych.

Wprowadzenie

Każda z tkanek różni się strukturą i łatwością jej dezintegracji. W prezentowanym doświadczeniu zastosowano mocniejszą metodę homogenizacji prób. Za każdym razem przed przystąpieniem do procesu dezintegracji tkankę należy opłukać w płynie fizjologicznym w celu oczyszczenia jej np. z resztek krwi i zabrudzeń. Zastosowana metoda homogenizacji poprzedzona jest pocięciem za pomocą skalpela tkanek na drobne kawałki, co ma na celu ułatwienie właściwego procesu homogenizacji.

Materiały

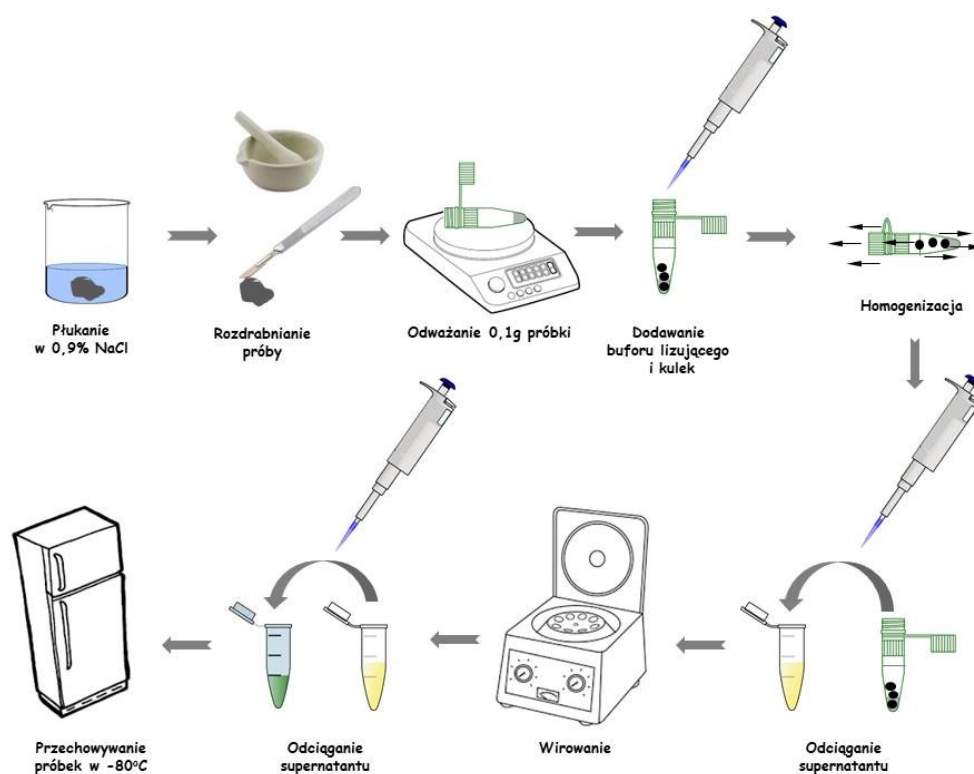
Jednorazowe rękawice nitrylowe; probówki z zakręcaną nakrętką o poj. 2 ml (2 szt.); probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml (4 szt.); butelka szklana z nakrętką (o poj. 1 l); zlewka o poj. 25 ml; zlewka o poj. 50 ml; tacka do cięcia skalpelem; kulki metalowe do homogenizacji; bibułki filtracyjne; uchwyt do skalpela chirurgicznego; ostrze do skalpela; pinceta; nożyczki; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 10–200 µl; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 100–1000 µl; końcówki do pipety o poj. 200 µl (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 100–1000 µl (pojemnik); statyw na probówki typu Eppendorf; statyw na probówki typu Falcon o poj. 25 i 50 ml; styropianowe pudełko; statyw chłodzący na probówki typu Eppendorf; pudełko laboratoryjne do przechowywania probówek typu Eppendorf (w temp. –80°C); wytrząsarka na probówki; waga; homogenizator; wirówka; zamrażarka głębokiego mrożenia; 0,9-proc. roztwór NaCl; bufor lizujący; kruszony lód; woda destylowana.

Materiał biologiczny

Mięsień szkieletowy, wątroba.

Przebieg doświadczenia

1. Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia nałożyć rękawiczki i opisać 2 probówki o poj. 2 ml z zakręcaną nakrętką (jedną MS/..., drugą W/... – w miejsce kropek wpisuje się własne oznaczenie, MS oznacza mięsień szkieletowy, W – wątrobę) oraz w ten sam sposób opisać probówki o poj. 1,5 ml typu Eppendorf (2 probówki opisujemy MS i 2 probówki W).
2. Następnie do zlewek wlać schłodzony płyn fizjologiczny (butelki z 0,9-proc. roztworem NaCl muszą stać w styropianowych pudełkach wypełnionych kruszonym lodem, aby utrzymać niską temperaturę płynu) i opłukać w nich dokładnie tkankę, potem osuszyć z użyciem bibułki filtracyjnej. Odcięty fragment tkanki ułożyć na tacy i pociąć za pomocą skalpela na drobne kawałki. Przed przystąpieniem do krojenia kolejnej tkanki narzędzia chirurgiczne dokładnie umyć i opłukać w wodzie destylowanej. Po czym odważyć 0,1 g tkanki w probówce z nakrętką. Przed użyciem wymieszać na mieszadłe probówkę typu Falcon z buforem lizującym, co najmniej przez 1 minutę. Do każdej probówki z odważoną tkanką wlać 1 ml buforu lizującego i wstawić do schłodzonego (w temp. -80°C) statywu chłodzącego na probówki typu Eppendorf oraz wprowadzić dwie metalowe kulki. Tak przygotowane w probówkach typu Eppendorf próbki należy równomiernie rozmieścić w schłodzonym (w temp. -80°C) specjalnym bloczku, który należy mocno przykręcić do ramion homogenizatora. Próby homogenizować przez 20 minut przy 21 Hz.
3. Po zakończeniu homogenizacji prób z każdej probówki odciągnąć supernatant i wlać do odpowiednio oznaczonych probówek typu Eppendorf. Następnie probówki zwirować w temp. 0°C przez 20 minut z siłą 20 800 g. Po zwirowaniu próbek delikatnie odciągnąć supernatant, który należy wlać do odpowiednio opisanych probówek i przechowywać w pudełkach w temp. -80°C do czasu wykonania analiz. Na rycinie 7.1 przedstawiono schematycznie etapy postępowania z badaną próbą opisane powyżej.



Ryc. 7.1. Schemat dezintegracji i przygotowywania prób do analiz proteomicznych

Wyniki

Podsumowanie doświadczenia zestawień w tabeli 7.3.

Tabela 7.3. Podsumowanie wyników doświadczenia

Którą z tkanek łatwiej było pociąć na drobne kawałki i dlaczego?	
Czy byś zaproponował(a) inną metodę dezintegracji tkanek? Uzasadnij swoją wypowiedź	
Jak sądzisz, dlaczego nie homogenizowano całego narządu?	
Wyjaśnij, dlaczego za każdym razem odważana była ta sama ilość tkanki?	
Czy homogenizacja całego narządu ma uzasadnienie, gdy jest on niewielki? Uzasadnij swoją wypowiedź	
Jak sądzisz, dlaczego podczas wykonywania ćwiczenia starano się utrzymać niską temperaturę prób? Uzasadnij swoją wypowiedź	

Ćwiczenie 7.3

Dezintegracja tkanek z użyciem mózdzierza

Cel

1. Zapoznanie z procedurą dezintegracji tkanek twardych i włóknistych.
2. Izolacja białek z materiału biologicznego.

Wprowadzenie

Dezintegracja tkanek twardych i włóknistych jest trudna. Dzięki metodzie polegającej na ucięciu materiału biologicznego w mózdzierzu w obecności ciekłego azotu uzyskujemy próbę o konsystencji pudru. Ponadto niska temperatura badanej próby zabezpiecza ją przed proteolizą i zmianą wyjściowego profilu białkowego w trakcie procesu izolacji białek. Dodatkowo wykorzystanie homogenizatora zwiększa pozyskiwanie białek z materiału biologicznego.

Materialy

Jednorazowe rękawice nitrylowe; probówka z zakręcaną nakrętką o poj. 2 ml; probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml (2 szt.); butelka szklana z nakrętką o poj. 1 l; zlewka o poj. 25 ml; zlewka o poj. 50 ml; kulki metalowe do homogenizacji; bibułki filtracyjne; mózdzierz; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 10–200 µl; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 100–1000 µl; końcówki do pipet o poj. 200 µl (pojemnik); końcówki do pipet o poj. 100–1000 µl (pojemnik); statyw na probówki typu Eppendorf; statyw na probówki typu Falcon o poj. 25 i 50 ml; styropianowe pudełko; statyw chłodzący na probówki typu Eppendorf; pudełko laboratoryjne do przechowywania probówek typu Eppendorf w (–80°C); wytrząsarka na probówki; waga; homogenizator; wirówka; zamrażarka głębokiego mrożenia; 0,9-proc. roztwór NaCl; bufor lizujący; kruszony lód; woda destylowana.

Material biologiczny

Dowolna tkanka twarda i włóknista (np. mięsień szkieletowy, naczynie krwionośne, żołądek, jelito).

Przebieg doświadczenia

1. Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia nałożyć rękawiczki i opisać probówki z zakręcaną nakrętką oraz w ten sam sposób opisać 2 probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml.
2. Następnie do zlewek wlać schłodzony płyn fizjologiczny (butelki z 0,9-proc. roztworem NaCl muszą stać w styropianowych pudełkach wypełnionych kruszonym lodem, aby utrzymać niską temperaturę płynu) i opłukać w nich dokładnie tkankę, potem osuszyć z użyciem bibułki filtracyjnej. Odciać fragment tkanki i umieścić go w mózdzierzu, do którego ostrożnie należy wlać ciekły azot i szybko rozetrzeć tkankę. Po czym należy odważyć 0,1 g spudrowanej tkanki w probówce z nakrętką. Przed użyciem wymieszać na wytrząsarce probówkę typu Falcon z buforem lizującym (co najmniej przez 1 minutę).
3. Do każdej probówki z odważoną tkanką należy wlać 1 ml buforu lizującego i wstawić do schłodzonego (w temp. –80°C) statywu chłodzącego na probówki typu Eppendorf oraz wpuścić 2 metalowe kulki. Tak przygotowane w probówkach typu Eppendorf próbki należy równomiernie rozmieścić w schłodzonym (w temp. –80°C) specjalnym bloczku, który powinien być mocno przykręcony do ramion homogenizatora. Próby należy homogenizować przez 20 minut przy 21 Hz.
4. Następnie z każdej probówki odciągnąć supernatant i wlać do odpowiednio oznaczonej probówki typu Eppendorf. Następnie probówki zwirować w temp. 0°C przez 20 minut z siłą 20 800 g. Po zwirowaniu próbek delikatnie odciągnąć supernatant, który należy wlać do odpowiednio opisanych probówek i przechowywać w pudełkach w temp. –80°C do czasu wykonania analiz. Na rycinie 7.1 przedstawiono schematycznie etapy postępowania z badaną próbą opisane powyżej.

Wyniki

Podsumowanie doświadczenia zestawić w tabeli 7.4.

Tabela 7.4. Podsumowanie wyników doświadczenia

Czy ucieranie w mózdzierzu tkanek może być powszechnie używaną metodą dezintegracji tkanek twardych w analizach proteomicznych? Uzasadnij swoją wypowiedź	
--	--

Czy przy dezintegracji tkanek miękkich konieczne jest ucieranie w moździerzu? Uzasadnij swoją wypowiedź	
Jakie znasz metody pozyskiwania białek z materiału biologicznego?	

Ćwiczenie 7.4

Przygotowanie homogennych tkanek

Cel

1. Poznanie zasad poprawnego przygotowania tkanek zwierzęcych do analiz proteomicznych.
2. Izolacja białek z homogennego materiału biologicznego.
3. Wyjaśnienie celowości izolacji białek z różnych struktur danego narządu.

Wprowadzenie

Podczas przygotowywania tkanek zwierzęcych do analiz proteomicznych bardzo istotne jest zminimalizowanie ich heterogenności. Pozyskiwane z tkanek próbki powinny być czyste, ale nie pozbawione charakterystycznej dla danej tkanki specyfiki komórkowej.

Materiały

Jednorazowe rękawice nitrylowe; probówki z zakręcaną nakrętką o poj. 2 ml (2 szt.); probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml (4 szt.); butelka szklana z nakrętką o poj. 1 l; zlewka o poj. 50 ml; zlewka o poj. 100 ml; tacka do cięcia skalpelem; kulki metalowe do homogenizacji; bibułki filtracyjne; uchwyt do skalpela chirurgicznego; ostrze do skalpela; pinceta; nożyczki; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 10–200 µl; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 100–1000 µl; końcówki do pipety o poj. 200 µl (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 100–1000 µl (pojemnik); statyw na probówki typu Eppendorf; statyw na probówki typu Falcon o poj. 25 i 50 ml; styropianowe pudełka; statyw chłodzący na probówki typu Eppendorf; pudełko laboratoryjne do przechowywania probówek typu Eppendorf w temp. -80°C ; wytrząsarka na probówki; waga; homogenizator; zamrażarka głębokiego mrożenia; 0,9-proc. roztwór NaCl; bufor lizujący; kruszony lód; woda destylowana.

Materiał biologiczny

Serce, nerka.

Przebieg doświadczenia

1. Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia nałożyć rękawiczki i opisać 3 probówki o pojemności 2 ml z zakręcaną nakrętką (jedną S/..., drugą NK/..., trzecią NR/... – w miejsce kropek wpisać własne oznaczenie; S oznacza serce, NK – korę nerki, NR – rdzeń nerki); w ten sam sposób należy opisać probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml (2 probówki opisać

S, 2 probówki – NK i 2 probówki – NR). Następnie do zlewek wlać schłodzony płyn fizjologiczny (butelki z 0,9-proc. roztworem NaCl muszą stać w styropianowych pudełkach wypełnionych kruszonym lodem, aby utrzymać niską temperaturę płynu) i opłukać w nich dokładnie tkankę, potem osuszyć z użyciem bibułki filtracyjnej.

- **Przygotowanie serca.** Usunąć za pomocą pincety worek osierdziowy, następnie wyciąć duże naczynia krwionośne. Oczyszczony narząd płukać w czystym płynie fizjologicznym i osuszyć na bibule filtracyjnej.
 - **Przygotowanie nerki.** Odciać korę nerki od rdzenia. Z rdzenia nerki wyciąć kliny o podstawie skierowanej ku korze nerki. Oczyszczony narząd płukać w czystym płynie fizjologicznym i osuszyć na bibule filtracyjnej.
2. Odcięte fragmenty tkanek ułożyć na tacy i pociąć za pomocą skalpela na drobne kawałki. Dalej postępować zgodnie z opisem umieszczonym w ćwiczeniu 7.2.

Wyniki

Podsumowanie doświadczenia zestawić w tabeli 7.5.

Tabela 7.5. Podsumowanie wyników doświadczenia

Jakie znaczenie w analizach proteomicznych ma minimalizowanie heterogenności tkanek? Uzasadnij swoją wypowiedź	
Wyjaśnij celowość analiz proteomicznych poszczególnych struktur określonego narządu? Uzasadnij swoją wypowiedź	

Ćwiczenie 7.5

Przygotowanie próbek mleka do analiz proteomicznych

Cel

1. Izolacja białek z płynu ustrojowego.
2. Zapoznanie z procedurą przygotowywania płynów ustrojowych do analiz proteomicznych.

Wprowadzenie

W analizach proteomicznych opierających się na rozdziale białek z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej (2DE) istotne jest usunięcie z prób niebiałkowych zanieczyszczeń, które uniemożliwiają lub utrudniają rozdział. Do takich związków należą tłuszcze, które tworzą kompleksy z białkami. Mleko jest bogate w tłuszcze oraz kazeiny. W celu przygotowania mleka do analiz proteomicznych należy usunąć z niego tłuszcze i strącić kazeiny.

Materiały

Jednorazowe rękawice nitrylowe; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 10–200 µl; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 100–1000 µl; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 1000–

5000 μ l; końcówki do pipety o poj. 200 μ l (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 100–1000 μ l (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 1000–5000 μ l; statyw na probówki typu Eppendorf; pipety zakraplacze; probówki typu Falcon o poj. 50 ml; statyw na probówki typu Falcon o poj. 50 ml; zlewka o poj. 25 ml; zlewka o poj. 50 ml; łyżeczki do naważek; probówki typu Eppendorf o poj. 1,2 ml; statyw na probówki typu Eppendorf; pudełko laboratoryjne do przechowywania probówek typu Eppendorf (w temp. -80°C); wytrząsarka na probówki; wirówka; wytrząsarka z nakładką na probówki typu Eppendorf; magnes do mieszadła; mieszadło magnetyczne; pehametr do próbek biologicznych; zamrażarka głębokiego mrożenia; 30-proc. kwas octowy; roztwory buforowe do kalibracji pehametru o pH 4, 7 i 10; aceton; bufor lizujący; zamrażarka (-20°C); koncentrator.

Material biologiczny

Mleko (50 ml).

Przebieg doświadczenia

1. Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia nałożyć rękawiczki i opisać probówkę typu Falcon o poj. 50 ml. Następnie wlać do probówek typu Falcon za pomocą pipety o poj. 1000–5000 μ l mleko w ilości 40 ml.
2. Następnie próby zwirować przez 20 minut w temp. 4°C z siłą 4500 g. W trakcie wirowania prób mleka należy skalibrować pehametr. Po pierwszym zwirowaniu prób usunąć utworzony kożuch tłuszczu za pomocą łyżeczki oraz pipety o poj. 100–1000 μ l do 25 ml zlewki. Ponownie zwirować próby przy takich samych parametrach, ale tym razem przez 10 minut, i ponownie odciągnąć tłuszcz.
3. Następnie próbkę mleka przelać do zlewki o poj. 50 ml, włożyć magnes, ustawić na mieszadle magnetycznym i włączyć delikatne mieszanie. Wprowadzić diodę pehametru. W celu usunięcia kazein stopniowo za pomocą pipetki plastikowej zakrapiać do mleka 30-proc. kwas octowy do momentu uzyskania przez próbkę pH 4,6. Wynik uzyskanego pH zapisać w zeszycie. Po precypitacji kazein próby zwirować w 4°C z siłą 3380 g przez 15 minut, a uzyskany supernatant rozdzielić po 300 μ l do probówek typu Eppendorf i dolać do każdej probówki 1200 μ l acetonu schodzonego do temp. -20°C . Próby wymieszać z acetonem na wytrząsarce przez 1 minutę. Tak przygotowane próby pozostawić na 2 godziny (w temp. -20°C). Na pół godziny przed końcem precypitacji w acetonie należy schłodzić wirówkę, w tym celu ustawić temp. -9°C i włączyć wirówkę na „Fast cool”. Po 2 godzinach precypitacji (w temp. -20°C) próby zwirować przez 0,5 godziny w temp. 0°C przy maksymalnej prędkości.
4. Po zwirowaniu odciągnąć aceton; pozostałą resztkę acetonu w próbówce delikatnie wylać na bibułę filtracyjną, tak żeby nie uszkodzić białka. Następnie wysuszyć próby w koncentratorze przez 2 minuty.

Wyniki

Podsumowanie doświadczenia zestawić w tabeli 7.6.

Tabela 7.6. Podsumowanie wyników doświadczenia

Wyjaśnij konieczność oczyszczania próbek z substancji niebiałkowych przed ich rozpuszczeniem w buforze lizującym	
--	--

Podaj przykłady zanieczyszczeń próbek i wyjaśnij, jak ich obecność może wpływać na rozdział 2DE	
Wyjaśnij rolę użytego acetonu w doświadczeniu	

Ćwiczenie 7.6

Zagęszczanie płynów fizjologicznych

Cel

1. Pozyskiwanie białek z płynu ustrojowego.
2. Wyjaśnienie konieczności zagęszczania niektórych płynów ustrojowych przed analizami proteomicznymi.

Wprowadzenie

W przypadku próbek rozcieńczonych i zanieczyszczonych substancjami niebiałkowymi (np. mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy) próbkę należy zagęścić i pozbawić substancji przeszkadzających w rozdziale elektroforetycznym (np. poprzez ultrawierowanie lub ultrafiltrację i precypitację). Mocz jest płynem ustrojowym ubogim w białka, a bogatym w sole; chcąc go użyć do analiz proteomicznych, należy go zagęścić i oczyścić ze związków niebiałkowych. Jedną z metod zagęszczania jest przepuszczenie próby przez ultrafiltry do wirowania.

Materialy

Jednorazowe rękawice nitrylowe; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 10–200 µl; pipety o poj. 500 µl; pipeta zmiennopojemnościowa o poj. 1000–5000 µl; końcówki do pipety o poj. 200 µl (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 100–1000 µl (pojemnik); końcówki do pipety o poj. 1000–5000 µl; probówki typu Eppendorf o poj. 1,2 ml; statyw na probówki typu Eppendorf; statywy na probówki typu Falcon o poj. 50 ml; ultrafiltry o poj. 15 ml.

Material biologiczny

Mocz (50 ml).

Przebieg doświadczenia

1. Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia nałożyć rękawiczki i opisać ultrafiltry. Następnie wlać do ultrafiltrów 15 ml moczu za pomocą pipety o poj. 1000–5000 µl i wirować przez 60 minut w temp. 4°C, przy maksymalnych obrotach. Pozostały mocz pozostawić w lodówce do czasu rozpoczęcia oznaczenia koncentracji białka w próbach moczu niezagęszczonego i zagęszczonego. W czasie wirowania prób należy przygotować krzywą białkową według protokołu opisanego w ćwiczeniu 8.1 w rozdziale 8 *Dwukierunkowa elektroforeza żelowa*. Po zakończeniu wirowania przyjrzeć się miarce objętości na ultrafiltrze i zapisać uzyskaną objętość moczu po jego zagęszczeniu.

2. Następnie za pomocą pipety odciągnąć zagęszczony mocz do probówki typu Eppendorf. Przystąpić do oznaczenia stężenia białka w obu próbach moczu (zagęszczonym i niezagęszczonym).

Wyniki

Podsumowanie doświadczenia zestawić w tabeli 7.7.

Tabela 7.7. Podsumowanie wyników doświadczenia

Jaką objętość moczu otrzymano po jego zagęszczeniu i ilokrotnie jest go mniej?	
Jakie stężenie białka ma próba moczu niezagęszczonego i zagęszczonego?	
Jakich składników ma mniej próbka moczu zagęszczonego?	
Jaki powinien być kolejny krok w przygotowywaniu tego płynu ustrojowego po jego zagęszczeniu z użyciem ultrafiltru?	

Piśmiennictwo

- Bodzon-Kulakowska A., Bierczynska-Krzysik A., Dylag T., Drabik A., Suder P., Noga M., Jarzebinska J., Silberring J. 2007. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 849, 1–31.
- Dratwa-Chałupnik A. 2011. *Przygotowanie materiału biologicznego do analiz proteomicznych*. W: *Proteomika. Wybrane zagadnienia*. Red. W.F. Skrzypczak. Szczecin: Wydawnictwo Zapol, s. 25–30.
- Dratwa-Chałupnik A., Ożgo M., Herosimczyk A., Lepczyński A., Michałek K. 2016. Lactose rich milk replacer modifies the proteome of blood plasma in two-week-old calves. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 40 (1), 21–27.

- Dratwa-Chałupnik A., Ożgo M., Lepczyński A., Herosimczyk A., Michałek K. 2016. Excessive amount of lactose in the diet of two-week-old calves induces urinary protein changes. *Archives Animal Breeding* 59 (4), 417–422.
- Dratwa-Chałupnik A., Wojdyła K., Ożgo M., Lepczyński A., Michałek K., Herosimczyk A. and Rogowska-Wrzesińska A. 2020. Urinary proteome of newborn calves – new potential in non-invasive neonatal diagnostic. *Animals* 10 (8), 1257.
- Lepczyński A., Ożgo M., Dratwa-Chałupnik A., Robak P., Pyć A., Zaborski D., Herosimczyk A. 2018. An update on medium- and low-abundant blood plasma proteome of horse. *Animal* 12 (1), 76–87.
- Medeńska W., Dratwa-Chałupnik A., Ożgo M., Cichy A., Pikuła R., Bobik J. 2020. Identification of mare colostrum proteins. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica* 19 (4), 25–32.
- Niedziółka M. 2010. *Przygotowanie materiału biologicznego do analizy*. W: *Proteomika i metabolomika*. Red. A. Kraj, A. Drabik, J. Silbering. Warszawa: Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, s. 21–36.

8. DWUKIERUNKOWA ELEKTROFOREZA ŻELOWA

Agnieszka Herosimczyk

Dwukierunkowa (dwuwymiarowa) elektrotroforeza żelowa (ang. *two-dimensional electrophoresis*, 2-D) jest jedną z technik molekularnych wykorzystywanych w badaniach z zakresu szeroko pojętych nauk o życiu. Popularność tej metody wynika z faktu, że umożliwia ona jednoczesny rozdział i/lub frakcjonowanie złożonej mieszaniny białek oraz peptydów występujących w szerokim zakresie stężeń w danym materiale biologicznym. Pierwsze doniesienia związane z możliwością zastosowania elektrofory 2-D do analizy składu białkowego *E. coli* zostały opublikowane w 1975 r. przez Patricka O'Farrella, którego uznaje się za twórcę tej metody. Późniejsze modyfikacje tej techniki, wprowadzone przez Klosego (1975) oraz Görg i in. (2000), przyczyniły się do znacznego zwiększenia jej czułości oraz powtarzalności analiz, a w konsekwencji uczyniły z elektrofory dwukierunkowej jedno z najważniejszych narzędzi badawczych stosowanych w proteomice.

W elektrofory dwuwymiarowej białka rozdzielane są ze względu na dwie niezależne od siebie cechy fizyczne, takie jak **punkt izoelektryczny (pI)** w pierwszym wymiarze oraz **masa cząsteczkowa (Mr)** w drugim wymiarze. Metoda ta w zależności od wielkości zastosowanego żelu poliakrylamidowego oraz długości paska IPG pozwala na separację aż do 10 000 różnych białek pochodzących z komórek, tkanek czy też płynów biologicznych. W rezultacie tworzą one swoistą mapę, na której pozycja poszczególnych spotów białkowych dostarcza szczegółowych informacji na temat ich pI (oś X) oraz Mr (oś Y). Do głównych zalet elektrofory dwukierunkowej należy możliwość analizy zmian ekspresji poszczególnych białek na żelach 2-D oraz obserwacji modyfikacji potranslacyjnych, jak również możliwość łączenia jej z technikami służącymi do identyfikacji białek, jak np. spektrometria mas lub Western-blot. Modyfikacje potranslacyjne, które odnoszą się do występowania chemicznych zmian reszt aminokwasowych białek, będą wpływały m.in. na ich właściwości fizykochemiczne, a tym samym na szybkość ich migracji elektroforetycznej w trakcie pierwszego kierunku (fosforylacja, acetylacja, alkylacja) oraz drugiego kierunku rozdziału (glikozylacja, ubikwitynacja, farnetylacja). Po zakończonej procedurze separacji białek na żelu 2-D można różnicować liczne formy tego samego białka powstałe wskutek modyfikacji potranslacyjnych, które najczęściej obserwowane są jako liczne spoty białkowe zlokalizowane blisko siebie, mogące występować w dwóch kierunkach rozdziału. Natomiast do głównych wad tej metody zaliczyć należy przede wszystkim trudności w rozdzielaniu dużych (powyżej 150 kDa) oraz bardzo małych (poniżej 10 kDa) białek, jak również białek transbłonowych, wykazujących silne właściwości hydrofobowe. W tym kontekście należy również nadmienić, że elektrofory dwukierunkowa jest techniką czaso- oraz kosztochłonną, a także brak w niej jakiegokolwiek automatyzacji.

Ćwiczenie 8.1

Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)

Cel

Praktyczne zapoznanie się ze sposobem przygotowania oraz aplikacji próby biologicznej (zhomogenizowanego fragmentu wątroby) na pasek z żelem IPG w celu przeprowadzenia ogniskowania izoelektrycznego.

Wprowadzenie

Ogniskowanie izoelektryczne (ang. *isoelectric focusing*, IEF) stanowi pierwszy kierunek rozdziału w elektroforezie dwukierunkowej, w którym białka są rozdzielane w gradiencie pH w zależności od ich punktu izoelektrycznego. **Punkt izoelektryczny (pI)** definiowany jest jako określona wartość pH, przy której ładunek wypadkowy białka wynosi zero, powodując tym samym brak jego migracji w polu elektrycznym. Przyjmuje się, że pI dla większości białek mieści się w przedziale pH wynoszącym od 3 do 12. Obecnie ten etap rozdziału prowadzi się z wykorzystaniem komercyjnych **pasków z żelem zawierających immobilizowany gradient pH** (ang. *immobilized pH gradient*, IPG). Paski IPG oferują bardzo dużą rozdzielczość, pozwalającą na efektywną i przede wszystkim powtarzalną separację mieszaniny białek, których pI różnią się jedynie o 0,001 jednostki pH. Paski z żelem IPG występują w różnych długościach (7, 11, 13, 17, 18 i 24 cm) oraz w wielu zakresach gradientu pH (szeroki zakres – pH 3–10; średni zakres – pH np. 3–6 lub 5–8; wąski zakres – pH np. 6,8–8,3 lub 3,9–5,1; ultrawąski zakres – pH np. 4,9–5,3). Wybór odpowiedniej długości oraz gradientu pH paska IPG jest podyktowany charakterem prowadzonych analiz (celami, jakim ma służyć), rodzajem materiału biologicznego (ilością białka w próbie) oraz rodzajem dostępnej aparatury badawczej.

Relatywna zdolność ogniskowania białek oraz peptydów na paskach z żelem IPG jest zależna od ich długości oraz zakresu pH. Paski o długości 7 cm i pH 3–10 mają najmniejszą zdolność ogniskowania przyjmowaną jako 1, co stanowi punkt odniesienia do dalszych obliczeń, które można przedstawić następująco:

- w sytuacji, kiedy 2 paski mają ten sam zakres pH, ale różnią się długością: z porównania 7-centymetrowego paska o pH 3–10 z 11-centymetrowym paskiem o pH 3–10 wynika, że pasek o długości 11 cm ma relatywną siłę rozdzielczości równą 1,6 ($11\text{ cm}/7\text{ cm} = 1,6$);
- w sytuacji, kiedy 2 paski mają tę samą długość, ale różny zakres pH: z porównania 7-centymetrowego paska o pH 3–10 z 7-centymetrowym paskiem o pH 5–8 wynika, że pasek w zakresie pH 3–10 ma relatywną siłę ogniskowania wynoszącą 2,3 ($7\text{ jednostek pH}/3\text{ jednostki pH} = 2,3$).

Optymalna ilość białka, jaka może być nałożona na pasek IPG, będzie zależała przede wszystkim od jego długości oraz sposobu barwienia żeli 2-D. Proces ogniskowania izoelektrycznego rozpoczyna się od **rehydratacji**, czyli uwodnienia pasków IPG. Komercyjnie dostępne są one w formie liofilizowanej, wobec czego należy przywrócić ich oryginalną grubość wynoszącą ok. 0,5 mm oraz umożliwić rozszerzenie porów w żelu poliakrylamidowym, tak aby białka znajdujące się w próbce mogły do niego swobodnie wnikać. Proces rehydratacji pasków dzieli się na 2 etapy: **rehydratację pasywną** oraz **aktywną**. W trakcie rehydratacji pasywnej paski poddaje się uwadnianiu bez udziału napięcia w temp. 20°C przez 6 godzin, natomiast podczas rehydratacji aktywnej, prowadzonej przez ok. 12 godzin, aplikuje się niewielkie napięcie rzędu 30–50 V w tych samych warunkach temperaturowych. Proces ten umożliwia wniknięcie białek w głąb żelu poliakrylamidowego znajdującego się w pasku IPG. Po zakończonej rehydratacji następuje właściwy proces IEF, który składa się z serii następujących po sobie zmian napięć, przy czym natężenie prądu w trakcie trwania poszczególnych faz nie może przekroczyć 50 μA na pasek. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wielkość przyłożonego napięcia jest ściśle uzależniona od długości ogniskowanych pasków. Im dłuższy jest pasek IPG i im węższy jest gradient pH, tym dłuższy czas jest potrzebny do przeprowadzenia ogniskowania białek. Zbyt krótki czas skutkował będzie występowaniem tzw. horyzontalnego smużenia na żelu 2-D, natomiast zbyt długi czas (przeogniskowanie) może powodować powstanie zjawiska elektroendoosmozy, czyli migracji cząsteczek wody z żelu w kierunku katody. Powyższe może prowadzić do zaburzonego wzorca ekspresji białek, występowania poziomych smug, jak również utraty części białka z analizowanej próby.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: fragment wątroby zhomogenizowany w buforze lizującym (7-molowy mocznik, 2-molowy tiomocznik, 4-proc. w/v CHAPS, 1-proc. w/v DTT, 2-proc. v/v Biolyte, 1-proc. v/v koktajl inhibitorów proteaz, 0,1% v/v nukleaz); odczynniki: gotowy zestaw odczynnikowy do oznaczania stężenia białka całkowitego, wzorzec albuminy bydlęcej (BSA), olej mineralny, 7-centymetrowe paski z żel IPG (zakres pH 3–10), bibuły knotowe, woda dejonizowana; bufor: bufor lizujący (7-molowy mocznik, 2-molowy tiomocznik, 4-proc. w/v CHAPS, 1-proc. w/v DTT, 2-proc. v/v Biolyte); aparatura i wyposażenie: pipety nastawne, probówki typu Eppendorf, probówki plastikowe o poj. 15 ml, statyw na probówki, 96-dołkowa płytka do spektrofotometru, pincety, rękawiczki nitrylowe, szklana zlewka o poj. 10 ml, worki, spektrofotometr mikroplótkowy, płyta do ogniskowania, zestaw do ogniskowania PROTEAN IEF.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 4-osobowe

1. Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy założyć rękawiczki nitrylowe.
2. Rozcieńczenie zhomogenizowanej próbki wątroby:
 - próbkę ze zhomogenizowanym fragmentem wątroby należy dokładnie zworteksować przez 5 minut;
 - przygotować czystą probówkę typu Eppendorf, podpisać i przygotować 20-krotne rozcieńczenie próbki, wykorzystując do tego celu bufor lizujący (**uwaga: najpierw pipetujemy bufor lizujący, a następnie próbkę badaną!**);
 - zworteksować rozcieńczoną próbę przez 5 minut;
 - odstawić rozcieńczoną próbkę do statywu.
3. Oznaczanie koncentracji białka całkowitego z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody Bradforda przy użyciu gotowego zestawu odczynnikowego:
 - A. Przygotowanie krzywej wzorcowej:
 - w tym celu należy przygotować 6 ponumerowanych probówek typu Eppendorf, do których należy odmierzyć odpowiednie ilości roztworu białka wzorcowego (BSA) oraz buforu lizującego (tab. 8.1). **Należy pamiętać o kolejności pipetowania, tzn. najpierw dodajemy bufor lizujący, a następnie roztwór wzorca albuminowego.** Próbki z krzywą wzorcową worteksujemy przez 5 minut.

Tabela 8.1. Ilości [μl] roztworu białka wzorcowego (BSA) oraz buforu lizującego potrzebne do sporządzenia krzywej wzorcowej

Numer probówki	1	2	3	4	5	6
Ilość [μl] buforu lizującego	50,0	45,0	40,0	30,0	25,0	20,0
Ilość [μl] BSA	0,0	5,0	10,0	20,0	25,0	30,0
Koncentracja białka [μg/μl]	0	0,2	0,4	0,8	1,0	1,2

B. Przygotowanie roztworu barwiącego (500 μl/próbkę):

- rozcieńczyć zagęszczony barwnik (dołączony do gotowego zestawu do oznaczania białka) wodą dejonizowaną w stosunku **1 : 4** (1 ml barwnika + 4 ml wody). Do tego celu należy wykorzystać probówki o poj. 15 ml. **Nie worteksujemy roztworu, natomiast delikatnie mieszamy w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny.**

C. Przygotowanie krzywej wzorcowej oraz próby badanej do pomiaru absorbancji:

- przygotować 6 nowych ponumerowanych probówek typu Eppendorf (dla próbek z krzywą wzorcową) oraz 1 (dla rozcieńczonej próbki wątroby);
- do każdej probówki dodać **500 μl** rozcieńczonego barwnika (pkt 2b);

- następnie z przygotowanej wcześniej serii wzorców (pkt 2a) oraz rozcieńczonej próby wątroby (pkt 1) należy odmierzyć **4 μ l** i umieścić w odpowiednich probówkach zawierających 500 μ l rozcieńczonego barwnika. **Po dodaniu prób nie worteksujemy, delikatnie mieszamy w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny;**
- inkubujemy przez 5 minut w temperaturze pokojowej;
- po tym czasie aplikujemy **200 μ l** roztworów (wzorce oraz próba badana w dwukrotnym powtórzeniu) w określonych studzienkach na mikropłytkce według wzoru (ryc. 8.1). **Bezpośrednio przed nałożeniem prób należy delikatnie je wymieszać.**

D. Odczyt absorbancji próbek wzorcowych oraz prób badanych:

- z pomocą prowadzącego ćwiczenia zmierzyć absorbancję próbek wzorcowych przy długości fali 595 nm, wykorzystując do tego celu spektrofotometr mikropłytkowy. Na tej podstawie zostanie wykreślona krzywa wzorcowa, gdzie na osi odciętych (X) będą zaznaczone stężenia białka, a na osi rzędnych (Y) wartości absorbancji. Następnie należy zmierzyć absorbancję prób badanych (długości fali 595 nm) i dokonać odczytu stężenia białka (μ g/ μ l) całkowitego na podstawie krzywej wzorcowej.

4. Przeprowadzenie rehydratacji oraz ogniskowania izoelektrycznego:

A. Wyliczenie odpowiedniej koncentracji białka oraz aplikacja próby na pasek IPG:

- na podstawie uzyskanych wyników koncentracji prób badanych (pkt 2d) obliczyć objętość próby, w której będzie znajdowała się odpowiednia ilość białka, przy założeniu, że do badań wykorzystane zostaną 7-centymetrowe paski IPG o zakresie pH 3–10 oraz że żele 2-D barwione będą błękitem Coomassie (według tabeli zamieszczonej poniżej). **Należy pamiętać, że próby do odczytu absorbancji zostały rozcieńczone.** Po obliczeniu objętości próbki badanej należy dopełnić ją buforem lizującym, tak aby uzyskać maksymalną objętość rehydratacyjną dla danego paska (tab. 8.2) i dokładnie zworteksować;

Tabela 8.2. Informacje dotyczące prawidłowej aplikacji ilości białka [μ g] oraz buforu lizującego [μ l] w zależności od długości paska IPG oraz sposobu barwienia żeli 2-D

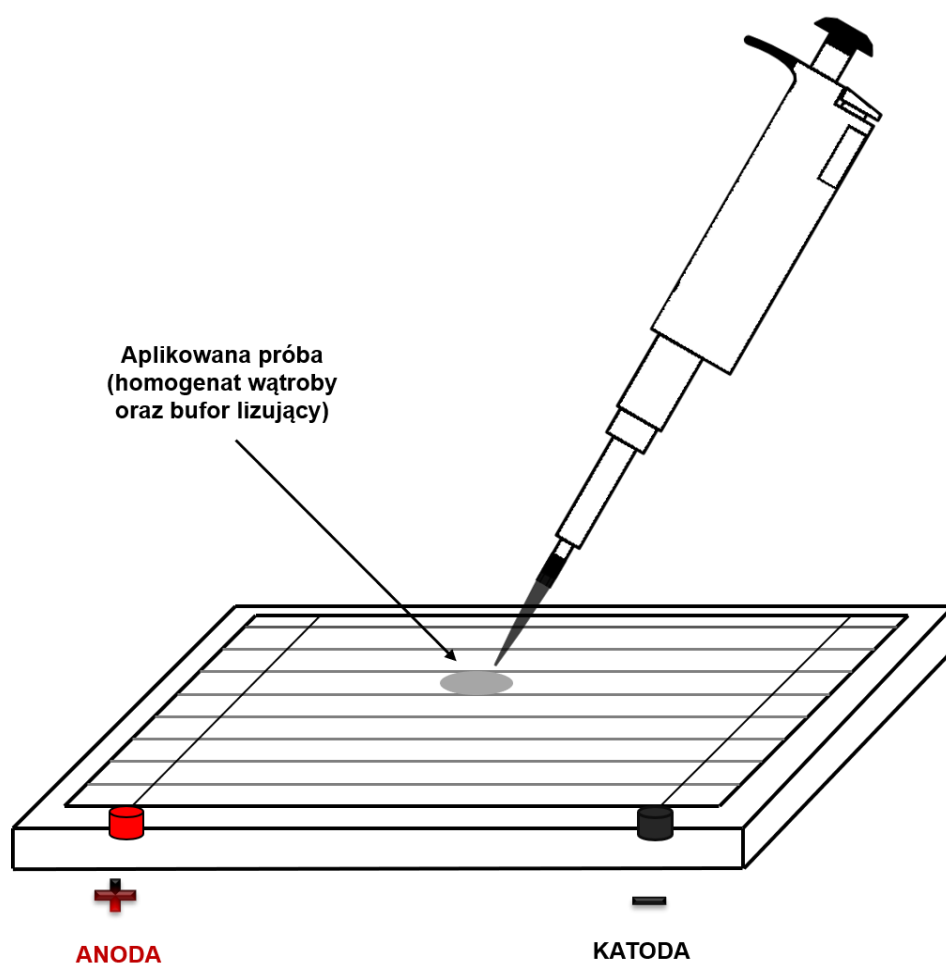
Długość paska IPG [cm]	7	11	17	24
Maksymalna objętość rehydratacyjna paska IPG [μ l]	125	185	300	450
Ilość białka [μ g] aplikowana na pasek:				
Azotan srebra	5–20	20–50	50–80	50–150
Błękit Coomassie G-250	50–100	100–200	200–400	400–800
SYPRO Ruby	5–25	20–50	50–100	50–200

- następnie próbkę należy umieścić w centralnym miejscu w rowku płyty do ogniskowania (ryc. 8.2), a następnie równomiernie rozprowadzić próbkę na całej jego powierzchni (w tym celu obiema rękami unieść płytę do ogniskowania i delikatnie przesuwając w lewo i prawo, rozprowadzić próbę);
- przy użyciu pincety usunąć folię ochronną z paska IPG (ryc. 8.3) i **umieścić go żelem do dołu** w rowku płyty do ogniskowania, **przy czym należy zwrócić uwagę na polaryzację paska oraz elektrod umieszczonych w płycie (ryc. 8.4)**. Następnie należy upewnić się, czy pasek nie przywiera do płyty oraz czy próba jest równomiernie rozmieszczona (pasek powinien być całkowicie nawilżony). Usunąć ewentualne pęcherzyki powietrza formujące się pod paskiem IPG, używając do tego celu pincety;

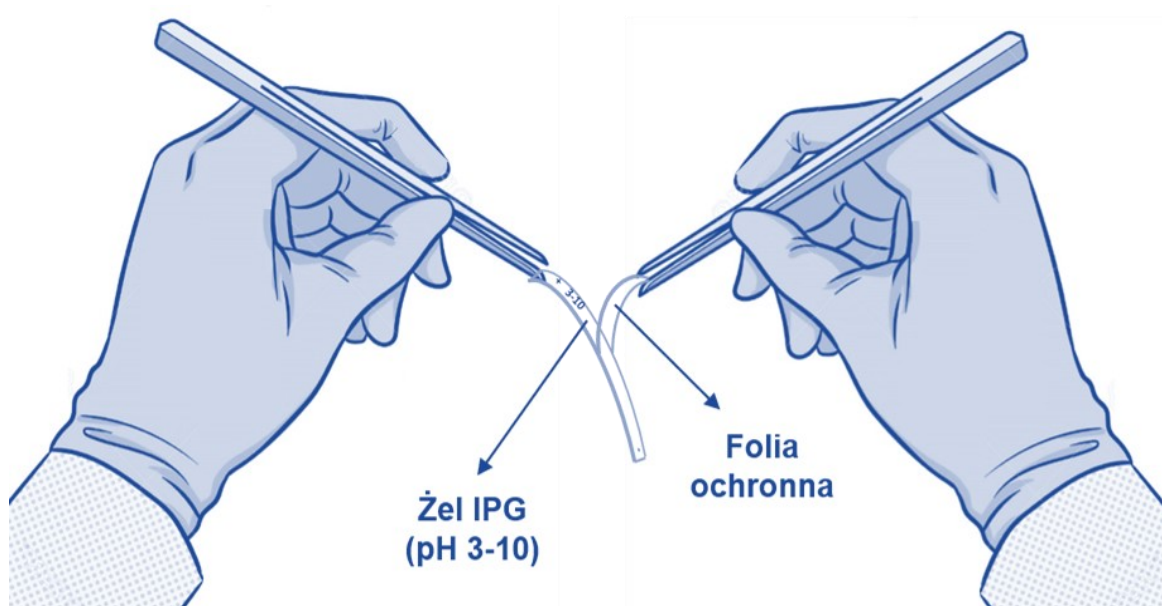
- następnie dodać ok. 1 ml (bezpośrednio na pasek) olejku mineralnego (**olejek aplikujemy w taki sposób, żeby fizycznie nie dotykać paska**) i umieścić pokrywę na płytę do ogniskowania.
- B. Przeprowadzenie procesu rehydratacji pasywnej oraz aktywnej:
- płytę do ogniskowania umieścić wewnątrz aparatu PROTEAN IEF, upewniając się, że jej elektrody połączone są z elektrodami znajdującymi się w aparacie do ogniskowania;
 - z pomocą prowadzącego zajęcia należy wybrać odpowiednią metodę i uruchomić ją: rehydratacja pasywna (6 godzin, 0 V, 20°C) oraz następująca po niej rehydratacja aktywna (12 godzin, 50 V, 20°C).
- C. Przeprowadzenie procesu ogniskowania izoelektrycznego:
- po zakończonej rehydratacji (pasywna + aktywna) zwilżyć wodą dejonizowaną (10 µl) bibuły knotowe i umieścić je między elektrodami a paskiem IPG;
 - ponownie umieścić pokrywę na płycie do ogniskowania;
 - umieścić płytę do ogniskowania w aparacie PROTEAN IEF;
 - z pomocą prowadzącego ustawić odpowiednią metodę ogniskowania i uruchomić ją. Przykładowy program do ogniskowania dla pasków IPG o długości 7 cm:
- 1) **250 V / 125 Vh** (liniowy wzrost napięcia);
 - 2) **500 V / 250 Vh** (liniowy wzrost napięcia);
 - 3) **1000 V / 500 Vh** (liniowy wzrost napięcia);
 - 4) **3000 V 1 h** (szybki wzrost napięcia);
 - 5) **3000 V 60 000 Vh** (liniowy wzrost napięcia).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	1,0										
B	0	1,0										
C	0,2	1,2										
D	0,2	1,2										
E	0,4	PB										
F	0,4	PB										
G	0,8											
H	0,8											

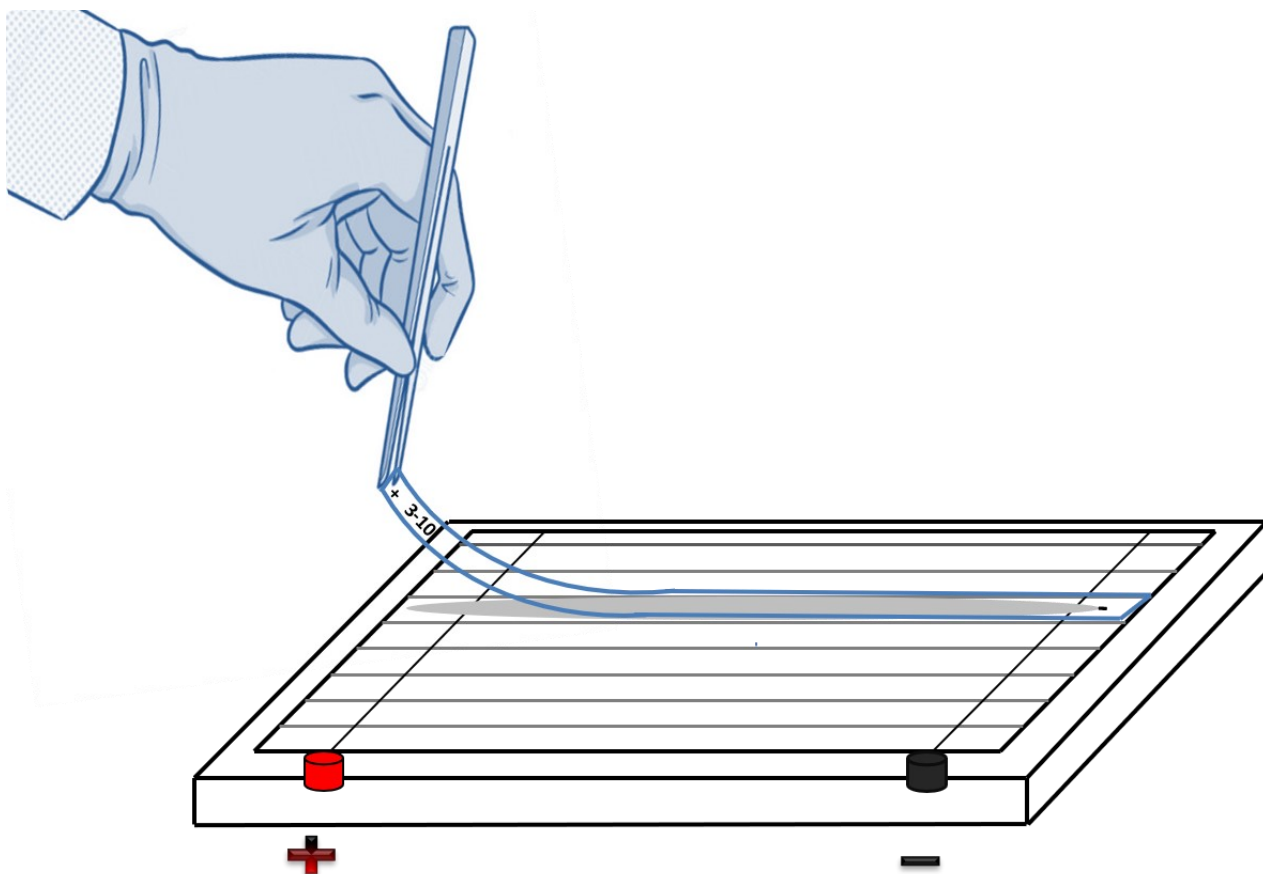
Ryc. 8.1. Wzór rozmieszczenia roztworów wzorcowych o koncentracjach 0–1,2 µg/µl (200 µl) oraz próby badanej (PB) w podwójnym powtórzeniu w określonych studzienkach na mikropłytkce



Ryc. 8.2. Sposób aplikacji próby badanej w rowku płyty do ogniskowania



Ryc. 8.3. Usuwanie folii ochronnej z paska z żelem IPG



Ryc. 8.4. Sposób umieszczenia paska IPG w rowku płyty do ogniskowania

Ćwiczenie 8.2

Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Cel

Praktyczne zapoznanie się ze sposobem przygotowania zogniskowanych pasków z żelem IPG w celu przeprowadzenia drugiego kierunku rozdziału białek (SDS-PAGE).

Wprowadzenie

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z wykorzystaniem dodecylsiarczanu sodu (ang. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) stanowi drugi kierunek rozdziału w 2-D, w którym to białka separuje się ze względu na ich masę cząsteczkową. Migracja białek w drugim wymiarze poprzedzona jest procesem tzw. równoważenia. Polega to na inkubacji pasków IPG w buforach zapewniających zogniskowanym białkom odpowiedni odczyn (Tris-HCl, pH 6,8) oraz lepkość (mocznik, glicerol). Ponadto SDS (anionowy detergent), który jest również składnikiem buforu do równoważenia, denaturuje białka oraz nadaje im jednolity, negatywny ładunek. Równocześnie podczas procesu równoważenia dochodzi do dalszej redukcji (DTT) oraz alkilacji (jodoacetamid) grup sulfhydrylowych białek, co zapobiega tym samym ich ponownej reoksydacji w trakcie separacji w drugim wymiarze.

Przygotowane w ten sposób paski IPG umieszczane są na szczycie żeli poliakrylamidowych (najczęściej 12-proc.), przytwierdzone przy użyciu 0,5-proc. żelu agarozowego (zabarwionego

błękitem bromofenolu) i następnie umieszczane w aparacie do elektroforezy, wypełnionym buforem migracyjnym. Po przyłożeniu napięcia białka będą migrowały w kierunku anody z różną szybkością, zależną od wielkości rozdzielanych białek (mniejsze migrują szybciej, natomiast większe poruszają się wolniej). Rozdział SDS-PAGE może trwać 2–18 godzin w zależności od zastosowanego rozmiaru matrycy poliakrylamidowej oraz przyłożonego napięcia prądu. W przypadku długotrwałego rozdziału elektroforetycznego należy skutecznie odprowadzać nadmiar produkowanego ciepła (optymalna temp. buforu to 15–20°C). Brak kontroli temperatury może prowadzić do przyspieszonej migracji białek oraz peptydów w żelu, co w konsekwencji skutkuje powstaniem rozmytych spotów białkowych. Elektroforezę należy zatrzymać w momencie, kiedy czoło barwnika (błękit bromofenolu migrujący z żelu agarozowego) będzie znajdowało się przy końcu żelu poliakrylamidowego.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: zogniskowane paski IPG (ćwiczenie 8.1); odczynniki: agaroz, jodoacetamid, DTT, TEMED, 30-proc. roztwór akrylamidu/bisakrylamidu, woda dejonizowana, 96-proc. alkohol etylowy, błękit bromofenolu, 10-proc. (w/v) roztwór SDS; bufony: bufor do równoważenia (0,5-molowy Tris-HCl (pH 6,8), 6-molowy (w/v) mocznik, 30-proc. glicerol, 2-proc. (w/v) SDS), bufor Tris-HCl 1,5-molowy (pH 8,8), bufor Tris-HCl 0,5-molowy (pH 6,8), bufor migracyjny (25-milimolowy (w/v) Tris, 192-milimolowa (w/v) glicyna, 0,1-proc. (w/v) SDS); aparatura i wyposażenie: pipety nastawne, probówki typu Eppendorf, probówki plastikowe o poj. 15 ml, pincety, statywy na probówki, rękawiczki nitrylowe, mieszadełka magnetyczne, bibuła filtracyjna, szklane zlewki o poj. 100 ml, szklany cylinder o poj. 10 ml, waga, mieszadła magnetyczne z termostatem, worteks, kołyska, płytki do rehydratacji, mikrofalówka, płytki szklane (2 szt. – 1 dłuższa 10,1 cm × 8,2 cm oraz 1 krótsza 10,1 cm × 7,3 cm), statyw do płytek szklanych, zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Cell, zasilacz do aparatu.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 4-osobowe

1. Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy założyć rękawiczki nitrylowe.
2. Równoważenie pasków IPG:
 - przygotować bufony do równoważenia (tab. 8.3). Do 2 podpisanych probówek o poj. 15 ml odważamy **DTT – BUFOR 1** oraz **jodoacetamid – BUFOR 2**, po dodaniu buforu do równoważenia należy dokładnie je zworteksować przez 5 minut;

Tabela 8.3. Skład buforów do równoważenia

Bufor 1	1 pasek IPG
Ilość buforu do równoważenia	5 ml
DTT (1%)	0,05 g
Bufor 2	1 pasek IPG
Ilość buforu do równoważenia	5 ml
Jodoacetamid (2,5%)	0,125 g

- przygotować płytkę do rehydratacji i przy użyciu pincety przenieść do niej zogniskowany pasek IPG;
- dodać **5 ml buforu 1**, umieścić płytkę do równoważenia na kołysce laboratoryjnej i inkubować przez **15 minut**;

- usunąć bufor 1 przy użyciu pipety i następnie dodać **5 ml buforu 2**, umieścić ponownie na kołysce laboratoryjnej, inkubować przez **20 minut**.
3. Przygotowanie poliakrylamidowej matrycy rozdzielającej:

A. Przygotowanie płytek szklanych:

- płytki szklane (2 szt.) – 1 dłuższą ze spacerem oraz 1 krótszą należy dokładnie odtłuścić przy użyciu 96-proc. alkoholu etylowego, a następnie osuszyć;
- następnie umieścić je w statywie do płytek w taki sposób, aby krótsza płytka była z przodu, a dłuższa z tyłu (ryc. 8.5);
- sprawdzić szczelność płytek, w tym celu należy nalać wody dejonizowanej; w sytuacji gdy woda nie wycieka, możemy ją usunąć spomiędzy płytek i osuszyć je ponownie przy użyciu bibuły filtracyjnej, odstawić.

B. Przygotowanie 12-proc. żelu poliakrylamidowego:

- przygotować 10-proc. roztwór nadsiarczuanu amonu (1 ml): nadsiarczan amonu + woda dejonizowana (na 1 ml : 0,1 g nadsiarczuanu amonu rozpuścić w 1 ml H₂O); podpisać probówkę, odstawić do statywu;
- przygotować 5 ml 10-proc. roztworu alkoholu izopropylowego, podpisać probówkę, odstawić do statywu;
- dodać i wymieszać roztwory w kolejności przedstawionej w tabeli 8.4, najpierw dodać akrylamid/bisakrylamid, następnie Tris i wodę, całość mieszać ok. 20 minut;
- bezpośrednio przed wylaniem żeli pomiędzy szklane płytki dodać nadsiarczan amonu oraz TEMED – inicjuje on polimeryzację żelu. **Uwaga: kolejność dodawania jest ważna! Najpierw dodajemy nadsiarczan amonu, a następnie TEMED**

Tabela 8.4. Skład 12-proc. żelu poliakrylamidowego

Odczynniki	12-proc. żel
30-proc. akrylamid/bisakrylamid	3,2 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,0 ml
Woda dejonizowana	2,6 ml
10-proc. SDS	80 µl
10-proc. nadsiarczan amonu	80 µl
TEMED	8 µl
Objętość końcowa	8 ml

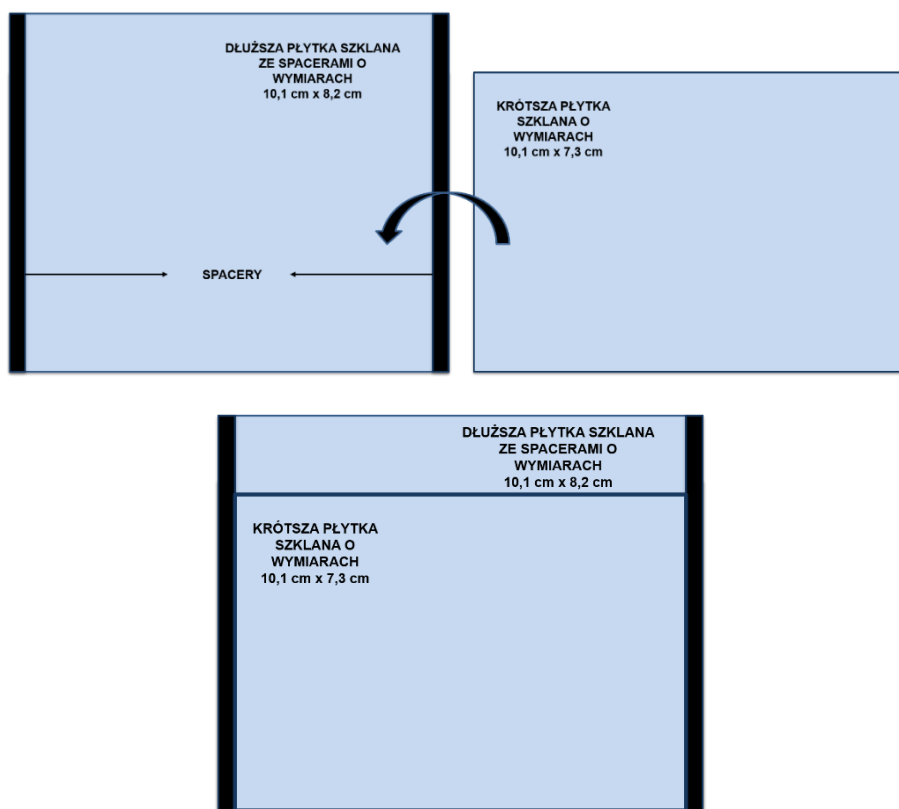
C. Przygotowanie 0,5-proc. żelu agarozowego:

- przygotować 15 ml 0,5-proc. żelu agarozowego: agarozę + bufor migracyjny (na 15 ml: 0,085 g agarozy + 15 ml buforu migracyjnego);
- wstawić do mikrofalówki w celu rozpuszczenia agarozy;
- rozpuszczoną agarozę (**uwaga: gorąca zlewka!**) umieścić na mieszadle magnetycznym, wrzucić mieszadełko, ustawić temp. 70°C na mieszadle magnetycznym, dodać odrobinę błękitu bromofenolu do uzyskania widocznego zabarwienia żelu.

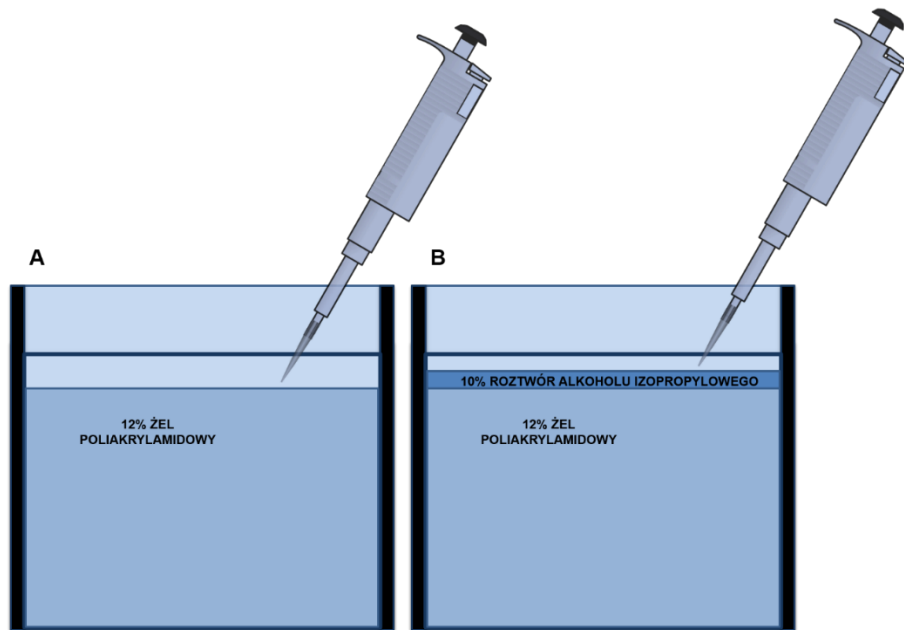
D. Polimeryzacja 12-proc. żelu poliakrylamidowego:

- dodać do zlewki z żelem nadsiarczan amonu oraz TEMED, wymieszać krótko;

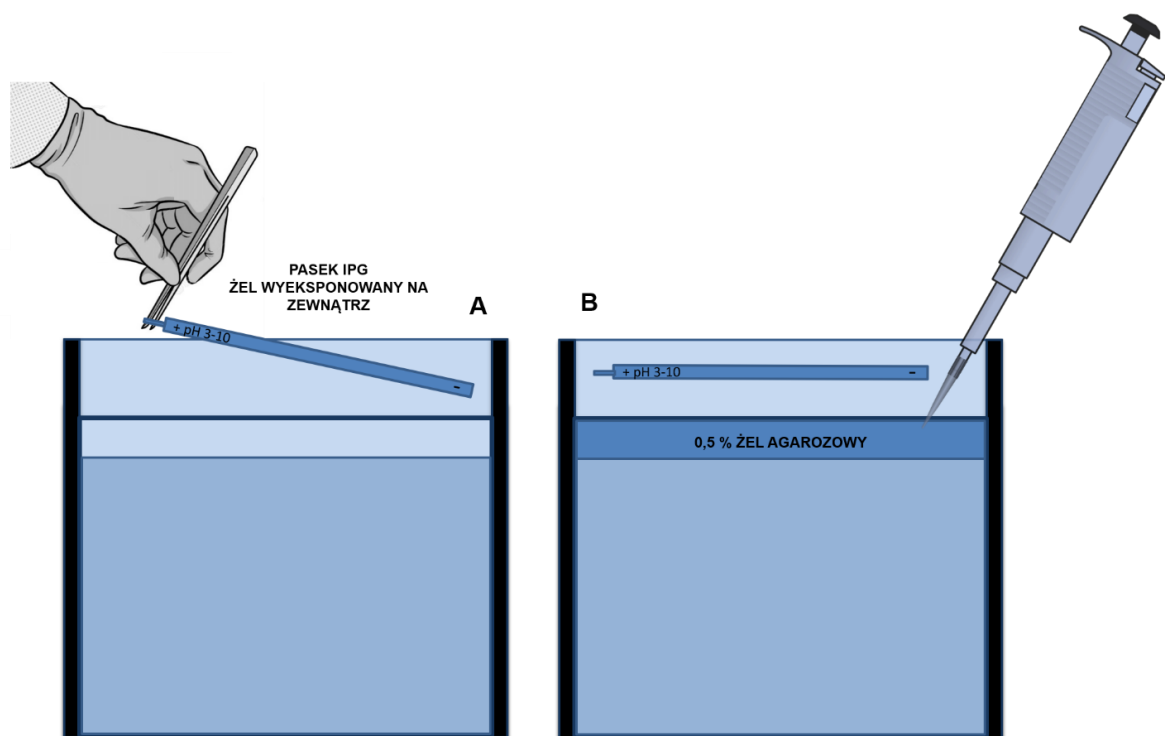
- wylać żel pomiędzy szklane płytki przy użyciu pipety automatycznej, do $\frac{3}{4}$ jej wysokości (należy zostawić miejsce na pasek IPG) (ryc. 8.6A);
 - po wylaniu żelu należy dodać ok. 2 ml 10-proc. roztworu alkoholu izopropylowego (ryc. 8.6B);
 - poczekać, aż żel spolimeryzuje (ok. 10–15 minut).
4. Przeprowadzenie migracji białek w drugim kierunku:
- A. Umieszczenie zrównoważonego paska IPG na szczycie żelu poliakrylamidowego:
- po polimeryzacji żelu znajdującego się pomiędzy szklanymi płytkami usunąć alkohol z jego powierzchni i osuszyć delikatnie bibułą filtracyjną;
 - przygotować cylinder o poj. 10 ml, do którego należy wlać bufor elektrodowy;
 - zanurzyć pasek IPG w buforze migracyjnym i umieścić na ścianie szklanej płytki. **Uwaga: żelem do przodu! Odpowiednia polaryzacja paska musi być zachowana** (ryc. 8.7A);
 - na powierzchnię żelu poliakrylamidowego umieścić ok. 2 ml 0,5-proc. żelu agarozowego (ryc. 8.7B);
 - zsunąć pasek IPG tak, aby ściśle przylegał do żelu poliakrylamidowego (należy zwrócić uwagę, aby nie było pęcherzyków powietrza pomiędzy paskiem IPG a żelem) (ryc. 8.8A);
 - odczekać, aż żel agarozowy całkowicie stężeje; tak przygotowane płytki umieścić w aparacie do elektroforezy (ryc. 8.8B);
 - komorę do elektroforezy napęlić buforem elektrodowym; przykryć pokrywą i podłączyć zasilacz;
 - rozdział prowadzić pod napięciem 150 V tak długo, aż barwnik z agarozy przesunie się do końca żelu separującego (ryc. 8.8C), wyłączyć zasilacz, wyjąć płytki z żelem do wybarwienia.



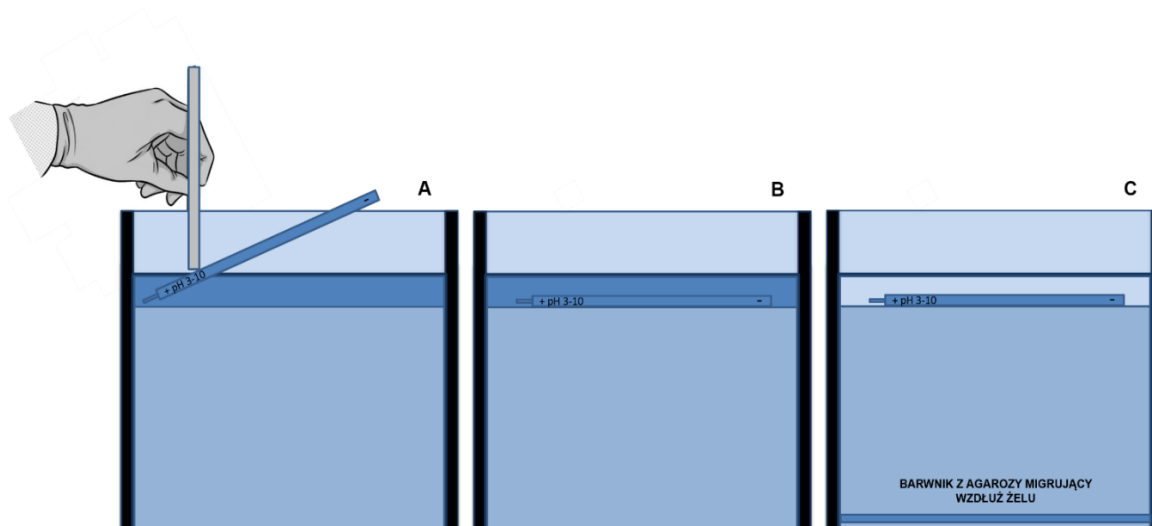
Ryc. 8.5. Sposób składania dwóch płytek szklanych (dłuższej ze spacerami oraz krótszej)



Ryc. 8.6. Sposób wylewania 12-proc. żeli poliakrylamidowych pomiędzy szklane płytki (A) oraz sposób aplikacji roztworu alkoholu izopropylowego umieszczanego bezpośrednio po wylaniu żeli (B)



Ryc. 8.7. Sposób umieszczenia paska IPG na ścianie szklanej płytki (A) oraz aplikacja 0,5-proc. żelu agarozowego zabarwionego błękitem bromofenolu (B)



Ryc. 8.8. Umieszczenie paska IPG na szczycie żelu poliakrylamidowego (A), tak aby pomiędzy paskiem IPG a żelem nie znajdowały się pęcherzyki powietrza (B). W momencie stężenia agarozy (B) całość umieszcza się w aparacie do elektroforezy i podłącza napięcie (150 V). Migrację białek w drugim kierunku należy zakończyć w momencie, gdy barwnik (błękit bromofenolu) pochodzący z agarozy znajdzie się na końcu żelu separującego (C)

Wyniki

1. Po wyjęciu żelu pomiędzy szklanych płytek należy zaznaczyć jego część kwasową (lekko obciąć róg żelu).
2. Następnie delikatnie przenieść żel do plastikowego pudełka wypełnionego wodą dejonizowaną (ok. 100 ml) i wypłukać 3-krotnie przez 5 minut w celu usunięcia pozostałości buforu elektrodowego. Pudełko wraz z żelem i wodą należy umieścić na kołysce laboratoryjnej.
3. Przygotowany w ten sposób żel wybarwić zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 9.
4. Wybarwiony żel 2-D zapisać w postaci cyfrowej. Obserwujemy dystrybucję spotów białkowych oraz oceniamy jakość rozdzielania elektroforetycznego, wyciągamy wnioski. O czym mogą świadczyć poziome i/lub pionowe smużenia, które mogą ewentualnie pojawić się na wybarwionych żelach 2-D?

Piśmiennictwo

- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B, Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21 (6), 1037–1053.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4 (12), 3665–3685.
- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26 (3), 231–243.
- López J.L. 2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B* 849 (1-2), 190–202.
- Magdeldin S., Enany S., Yoshida Y., Xu B., Zhang Y., Zureena Z., Lokamani I., Yaoita E., Yamamoto T. 2014. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Proteomics* 11 (1), 16.
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250 (10), 4007–4021.

-
- Rabilloud T., Chevallet M., Lucheb S., Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics* 73 (11), 2064–2077.
- Rabilloud T., Lelong C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics* 74 (10), 1829–1841.
- Scumaci D., Cuda G. 2019. *2D Gel electrophoresis to address biological issues*. W: *Proteomics technologies and applications*. Red. I.Y. Abdurakhmonov. Intech Open, s. 1–19.

9. METODY DETEKCJI BIAŁEK

Adam Lepczyński, Agata Grzesiak

W celu wizualizacji rozdzielonych elektroforetycznie **białek w żelach** 1-D bądź 2-D niezbędne jest zastosowanie odpowiednich **technik** ich **deteckji**. Obecnie w zastosowaniu znajduje się szereg metod detekcji białek, które ze względu na cel barwienia możemy podzielić na **metody uniwersalne** oraz **specyficzne**.

Metody uniwersalne stosowane są do wybarwienia wszystkich białek występujących w żelu, natomiast **metody specyficzne** wykorzystuje się w celu wybarwienia białek o konkretnych właściwościach, głównie tych o określonych modyfikacjach potranslacyjnych (m.in. ufosforylowanych, glikozylowanych).

Metody barwienia można podzielić również ze względu na możliwość bezpośredniej obserwacji zwizualizowanych białek na **metody kolorymetryczne** i **fluorescencyjne**. W przypadku metod kolorymetrycznych efekt barwienia widoczny jest bez konieczności posiadania specjalistycznych urządzeń, tzw. gołym okiem, natomiast metody fluorescencyjne wymagają odpowiednich urządzeń, które mają możliwość ich wzbudzenia, a następnie akwizycji widma emisyjnego.

Do barwników kolorymetrycznych należą: błękit kumasyny (**błękit Coomassie**), zasadowe oraz kwaśne **sole srebra**, a także barwniki negatywne (strategia ich detekcji polega na barwieniu tła żelu). Do grupy **barwników fluorescencyjnych** należy szereg barwników, z których najpopularniejsze to: **Sypro Ruby**, Flamingo Pink, Krypton oraz Deep Purple. Szczególną grupę technik wizualizacji białek stanowią znaczniki białkowe, spośród których najpopularniejsze są barwniki cyjanidynowe, wykorzystywane w technice elektroforezy różnicującej w żelu poliakrylamidowym.

Ćwiczenie 9.1

Barwienie białek z wykorzystaniem błękitu Coomassie

Cel

1. Porównanie wyników barwienia białek z wykorzystaniem odmiennych procedur barwienia oraz izoform błękitu Coomassie.
2. Określenie wpływu utrwalania białek w żelu na czułość barwienia.
3. Analiza potencjalnych słabych i mocnych stron wykorzystywanych procedur barwienia.

Wprowadzenie

Błękit Coomassie (ang. *Coomassie brilliant blue*, CBB) jest najczęściej stosowanym barwnikiem w celu postelektroforetycznej detekcji białek. Popularność barwienia CBB wynika z szeregu jego zalet, do których należą: wysoka kompatybilność ze spektrometrią mas, relatywnie wysoka czułość i akceptowalna liniowość, a także niski koszt procedury barwienia. W badaniach z zakresu biologii molekularnej wykorzystywane są dwa typy tego barwnika: **R250** oraz **G250**, który różni się od formy R dwiema dodatkowymi grupami metylowymi w obrębie cząsteczki. Detekcja białek przez barwniki z grupy Coomassie możliwa jest dzięki ich zdolności do wiązania się z białkami poprzez aminokwasy zasadowe: lizynę, histydynę oraz argininę. Obie formy różnią się właściwościami fizycznymi oraz czułością detekcji. Rzadziej wykorzystywany **CBB R250** charakteryzuje umiarkowana **czułość rzędu 20–50 ng białka** w pojedynczym prążku lub spocie białkowym. Ma on również wysoką zdolność do penetrowania żelu, co z powodu trudności z jego pełnym wypłukaniem z tej matrycy wpływa na obniżenie czułości barwienia jako efektu niskiego stosunku sygnału (wy-

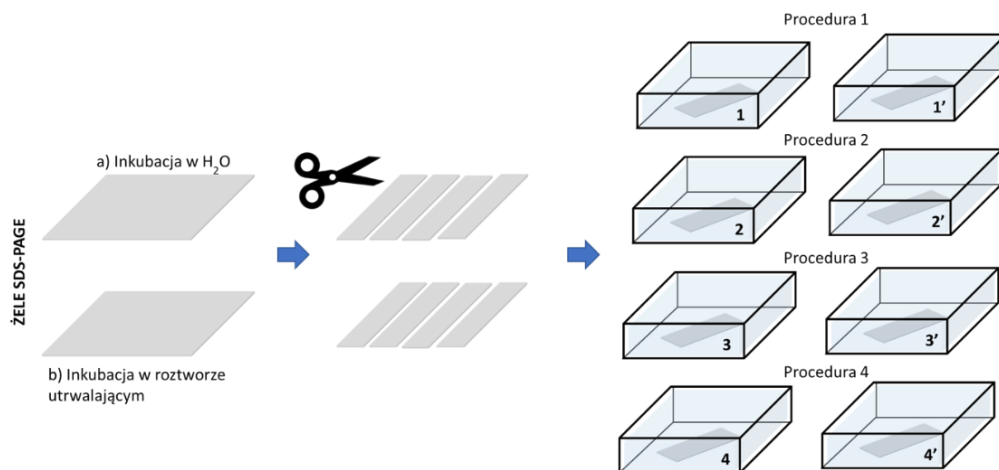
barwione białko) do szumu (tło w postaci wybarwionego żelu). **Forma G-250** tego barwnika charakteryzuje się **poziomem detekcji** w zakresie **1–20 ng białka** w pojedynczym prążku lub spocie białkowym. Dzięki temu, że barwnik ten nie w pełni się rozpuszcza w obecności kwasu i alkoholu, nosi często nazwę koloidalnego błękitu Coomassie. Ze względu na ten fakt barwnik nieznacznie wnika w żel, co wpływa na wyższy kontrast pomiędzy wybarwionym białkiem a tłem. Większość procedur barwienia wykorzystujących CBB wymaga, aby przed właściwym procesem detekcji rozdzielone na żelach polipeptydy inkubowały się w roztworach utrwalających, które zawierają mieszaninę alkoholu (etanol, metanol) oraz kwasu (głównie ortofosforowego). Ma to na celu ograniczenie dyfuzji białek z żelu oraz usunięcie z niego cząsteczek detergentu siarczanu dodecylu sodu (SDS), który ma zdolność do wiązania barwnika.

Materialy

Na każdy zespół: środki ochrony (rękawice ochronne; fartuchy); 5-proc. wodny roztwór błękitu Coomassie CBB G250; 5-krotnie stężony roztwór Bradforda; 0,01-proc. roztwór błękitu Coomassie G250 w 20-milimolowym roztworze HCl; 0,5-proc. roztwór błękitu Coomassie; siarczan glinu $18xH_2O$; 85-proc. kwas fosforowy; 96-proc. alkohol etylowy; woda podwójnie dejonizowana (ddH_2O); waga analityczna; naważki; zlewki o poj. 100 ml (2 szt.); cylinder miarowy o poj. 100 ml; pipeta automatyczna o poj. 1000–5000 μ l; tipsy do pipety o poj. 5000 μ l; mieszadło magnetyczne; magnesy (dipole) do mieszadeł (2 szt.); pudełka plastikowe do inkubacji żeli (8 szt.); kołyska laboratoryjna; żele SDS-PAGE z rozdzielonymi identycznymi próbami o stałej koncentracji białka na kolejnych 10 ścieżkach (2 szt.), z których pierwszy został utrwalony po rozdziale w buforze o składzie: 30-proc. alkohol etylowy, 3-proc. kwas fosforowy w wodzie; drugi został umieszczony po rozdziale w wodzie dejonizowanej; tacka do cięcia żeli; szpatułka do cięcia żeli; stoper; kuchenka mikrofalowa; pisak; kalibrowany skaner optyczny; komputer z oprogramowaniem obsługującym skaner.

Przebieg doświadczenia

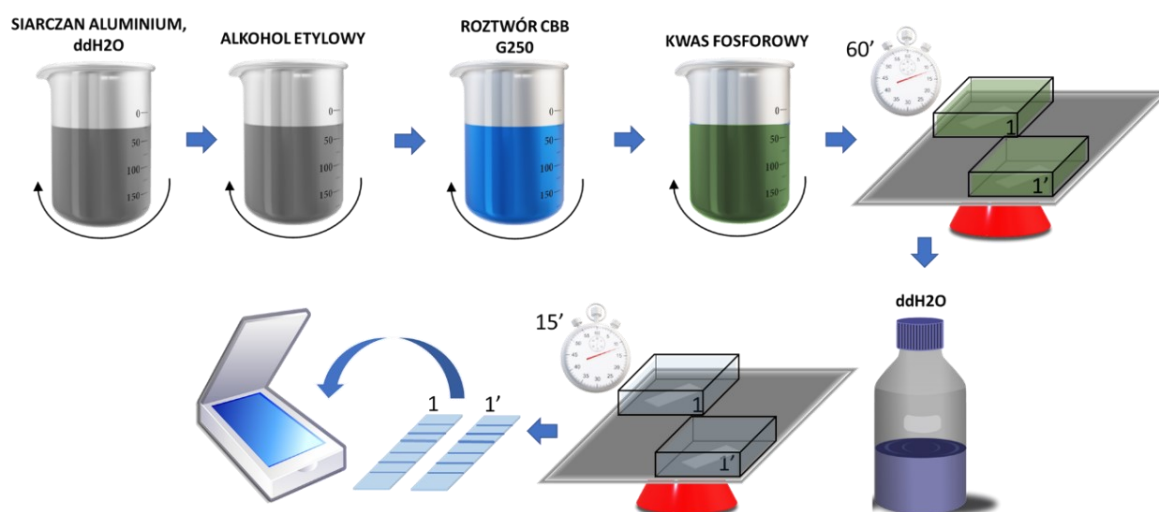
1. W doświadczeniu należy przeprowadzić detekcję białek na żelach z użyciem 4 różnych procedur barwienia z wykorzystaniem CBB. W przypadku każdej z procedur należy wykonać barwienie 1 ścieżki z żelu SDS-PAGE zarówno utrwalanego, jak i niepoddawanego utrwaleniu (ryc. 9.1).
2. W trakcie prowadzenia analizy z użyciem każdej z kolejnych procedur należy opisać pudełka w taki sposób, że te przeznaczone do barwienia żelu nieutrwalonego oznaczone będą kolejno cyframi 1–4, natomiast pudełka przeznaczone do barwienia żeli utrwalonych w roztworze alkoholu i kwasu oznaczone będą cyframi 1'–4'. Z odpowiedniego żelu należy odciąć fragmenty reprezentujące 1 ścieżkę i umieścić w odpowiednio oznaczonych pudełkach.



Ryc. 9.1. Schemat przeprowadzenia doświadczenia

Procedura 1 (ryc. 9.2)

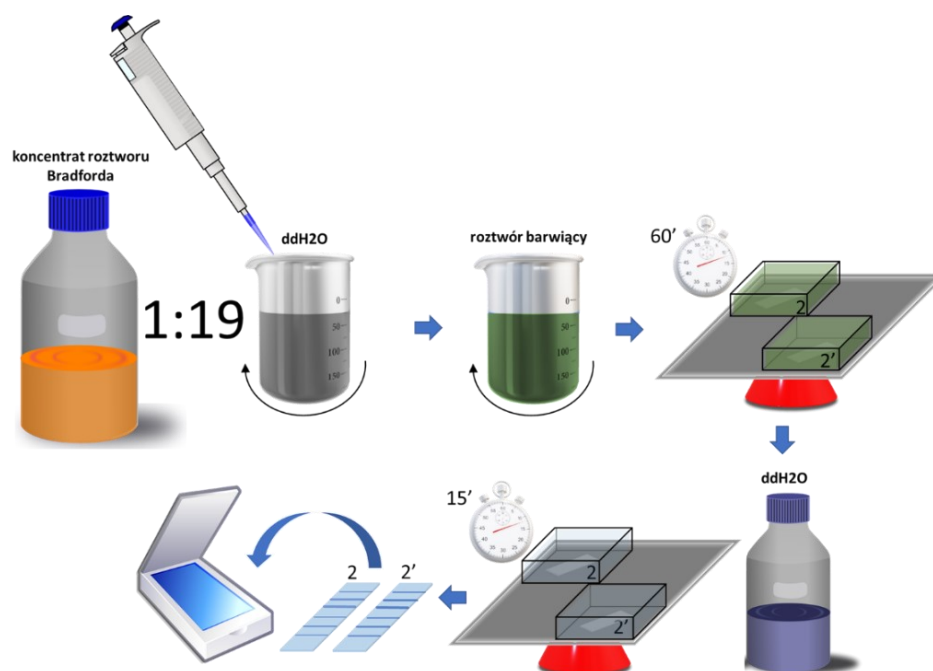
1. Do zlewki należy odważyć 5 g siarczany glinu $18 \times \text{H}_2\text{O}$ i uzupełnić 78 ml ddH₂O. Następnie w zlewce umieścić magnes i ustawić na mieszadło magnetycznym prędkość na 2.
2. Po kompletnym rozpuszczeniu siarczany glinu $18 \times \text{H}_2\text{O}$ odczynnika do zlewki dodać 10,4 ml alkoholu etylowego. Po dodaniu alkoholu roztwór stanie się mętny, dlatego należy odczekać ok. 1 minuty, by stał się klarowny.
3. Następnie do roztworu dodać 0,4 ml 5-proc. błękitu Coomassie G250. Po jego rozpuszczeniu roztwór zabarwi się na granatowo.
4. W kolejnym kroku do zlewki należy dodać 10 ml 85-proc. kwasu fosforowego. Roztwór zmieni zabarwienie na zielone. Roztwór uzupełnić do 100 ml ddH₂O. Po ok. 3 minutach mieszania będzie gotowy do użycia. Należy zwrócić uwagę na wytrącające się w roztworze drobiny błękitu Coomassie G250.
5. Następnie należy opisać plastikowe pudełka numerami 1 oraz 1', po czym do obu wlać po 50 ml roztworu barwiącego.
6. Z żeli odciąć po jednej ścieżce z rozdzielonymi białkami i umieścić fragment żelu inkubowanego w wodzie w pudełku nr 1. W pudełku nr 1' umieścić fragment żelu utrwalonego. Pudełka należy ustawić na kołysce laboratoryjnej i nastawić na prędkość 4. Żele pozostawić do inkubacji przez minimum 1 godzinę.
7. Po upływie wyznaczonego czasu inkubacji roztwór barwiący zlać, a żel zalać ddH₂O.



Ryc. 9.2. Graficzne podsumowanie barwienia białek w żelu z wykorzystaniem procedury nr 1

Procedura 2 (ryc. 9.3)

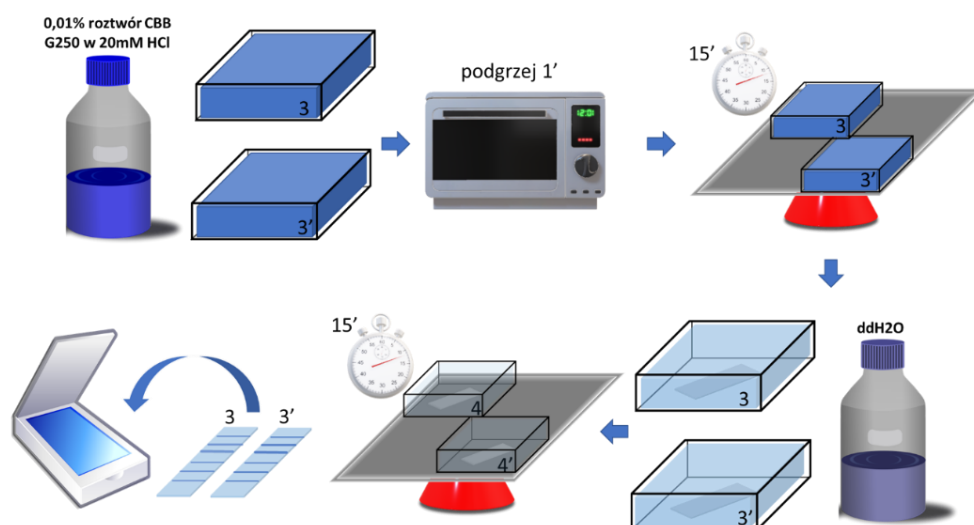
1. Do zlewki należy dodać 5 ml skoncentrowanego odczynnika Bradforda i uzupełnić 95 ml ddH₂O. W zlewce umieścić magnes i ułożyć na mieszadle, ustawiając wybierając szybkość na 2. Następnie należy opisać plastikowe pudełka numerami 1 oraz 1' i do obu wlać po 50 ml roztworu barwiącego.
2. Z żeli odciąć po jednej ścieżce z rozdzielonymi białkami i umieścić fragment żelu inkubowanego w wodzie w pudełku nr 2. Natomiast w pudełku nr 2' umieścić fragment żelu utrwalonego. Pudełka ustawić na kołysce laboratoryjnej z prędkością mieszania ustawioną na wartość 4 i pozostawić żele do inkubacji przez minimum 1 godzinę.



Ryc. 9.3. Graficzne podsumowanie barwienia białek w żelu według procedury nr 2

Procedura 3 (ryc. 9.4)

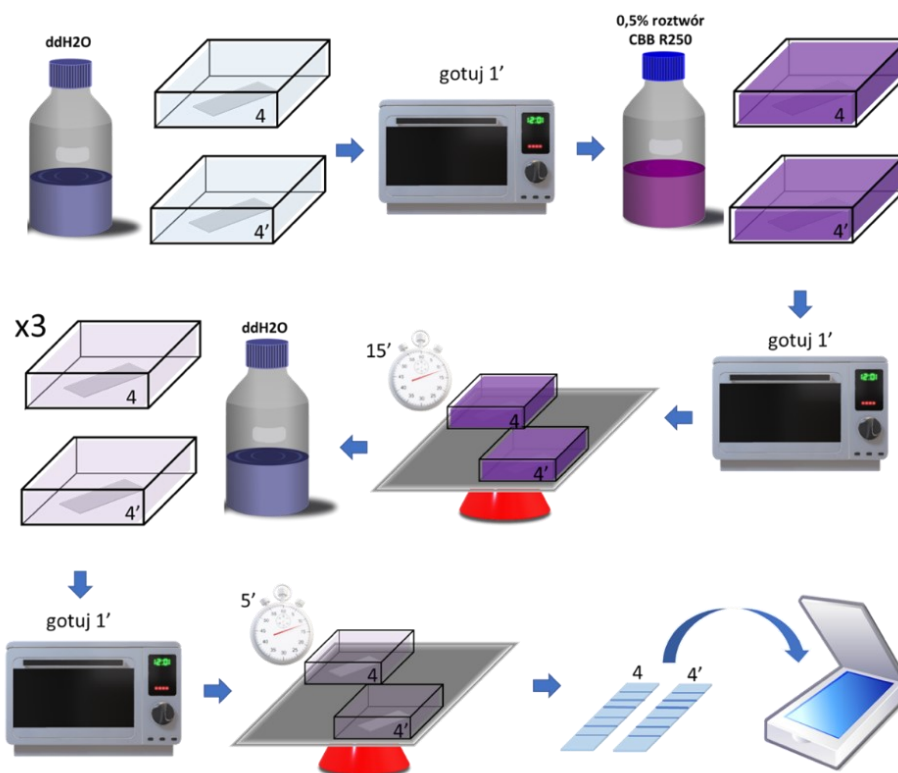
1. Opisać plastikowe pudełka numerami 3 oraz 3'. Z żeli odciąć po jednej ścieżce z rozdzielonymi białkami i umieścić fragment żelu inkubowanego w wodzie w pudełku nr 3. W pudełku nr 3' należy umieścić fragment utrwalonego żelu.
2. Żele zalać 0,01-proc. roztworem błękitu Coomassie G250 w 20-milimolowym roztworze HCl.
3. Następnie pudełka umieścić w mikrofalówce i podgrzewać przez ok. 2 minuty, tak by znacząco podgrzać roztwór, ale go nie zagotować.
4. Pudełka umieścić na kołysce laboratoryjnej ustawionej na prędkość 4 i pozostawić na niej żele do ostygnięcia (ok. 15–20 minut).
5. Po wystudzeniu roztworu należy go zlać, a żele zalać ddH₂O.



Ryc. 9.4. Graficzne podsumowanie barwienia białek w żelu według procedury nr 3

Procedura 4 (ryc. 9.5)

1. Opisać plastikowe pudełka numerami 4 oraz 4'. Z żeli odciąć po jednej ścieżce z rozdzielonymi białkami i umieścić fragment żelu inkubowanego w wodzie w pudełku nr 4. W pudełku nr 4' należy umieścić fragment żelu utrwalonego.
2. Żele zalać ddH₂O, a następnie pudełka umieścić w mikrofalówce i od momentu zagotowania wody żele należy gotować przez ok. 1 minutę.
3. Po ostygnięciu wody do temp. ok. 45°C zlać ją.
4. A następnie żele zalać 0,5-proc. roztworem błękitu Coomassie R250. Pudełka umieścić w mikrofalówce i gotować żele w roztworze przez ok. 1 minutę.
5. Następnie pudełka umieścić na kołysce laboratoryjnej ustawionej na prędkość 4 i pozostawić na niej do momentu ostygnięcia roztworu (ok. 15–20 minut).
6. Po ostygnięciu zlać roztwór barwiący, a żele zalać ddH₂O. Pudełka umieścić w mikrofalówce i gotować żele zalane wodą przez ok. 1 minutę. Po 5 minutach od wyciągnięcia z mikrofalówki wodę zlać. Procedurę należy powtórzyć 3–4-krotnie do momentu uzyskania znacznej redukcji zabarwienia tła.



Ryc. 9.5. Graficzne podsumowanie barwienia białek w żelu według procedury nr 4

7. Po zakończeniu inkubacji ostatnich fragmentów żeli procedurą nr 4 każdy z fragmentów wybarwionych żeli umieścić w ddH₂O na 15 minut. Następnie wybarwione fragmenty żeli ułożyć na skanerze, począwszy od metody nr 1 do 4, układając naprzemiennie fragmenty żeli poddanych utrwaleniu oraz nieutrwalonych.
8. Po uruchomieniu aplikacji QuantityOne należy wybrać opcję skanowania densytometrem GS800, z menu wybrać stosowany barwnik; ustawić wielkość pojedynczego piksela na 63,5 μm i po wstępnym skanowaniu fragmenty żeli poddać skanowaniu właściwemu. Uzyskane obrazy żeli należy zarchiwizować w pamięci komputera.

Wyniki

Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawić w tabeli 9.1.

Tabela 9.1. Pytania i zadania kontrolne podsumowujące ćwiczenie 9.1

Czy zastosowanie utrwalania przed procesem barwienia ma wpływ na czułość zastosowanego protokołu? Jeśli tak, to dlaczego?	
Która z procedur barwienia jest według Ciebie najskuteczniejsza?	
Podaj mocne i słabe strony analizowanych protokołów barwienia	

Ćwiczenie 9.2*Barwienie białek z zastosowaniem soli srebra***Cel**

1. Poznanie podstawowych procedur wizualizacji białek po rozdzielach elektroforetycznych.
2. Określenie newralgicznych punktów w procedurze barwienia solami srebra, umożliwiającą skuteczne barwienie tą metodą.

Wprowadzenie

Najwyższą czułość wśród powszechnie stosowanych metod barwienia białek mają **sole srebra**. Czułość tej grupy barwników oscyluje w granicach 0,2–2 ng białka w pojedynczym prążku lub spocie białkowym. Wynika to z możliwości przyłączenia się tego barwnika do grup karboksylowych, aminowych, sulfhydrylowych oraz imidiazolowych białek. Po przyłączeniu do białek srebro jonowe ulega redukcji pod wpływem glutaraldehydu i/lub formaldehydu, przechodząc w srebro metaliczne (koloidalne). Powoduje to pojawienie się na żelu brunatnych plam w miejscu obecności białek na żelu (ryc. 9.6). Poza wysoką czułością metodę tę charakteryzuje wiele ograniczeń, m.in.: niski zakres dynamiczny detekcji białek – do 1,5 rzędu wielkości, ograniczona kompatybilność ze spektrometrią mas typu **MALDI-ToF**, zależność szybkości wywoływania obrazu od warunków środowiskowych (temperatura, jakość odczynników).

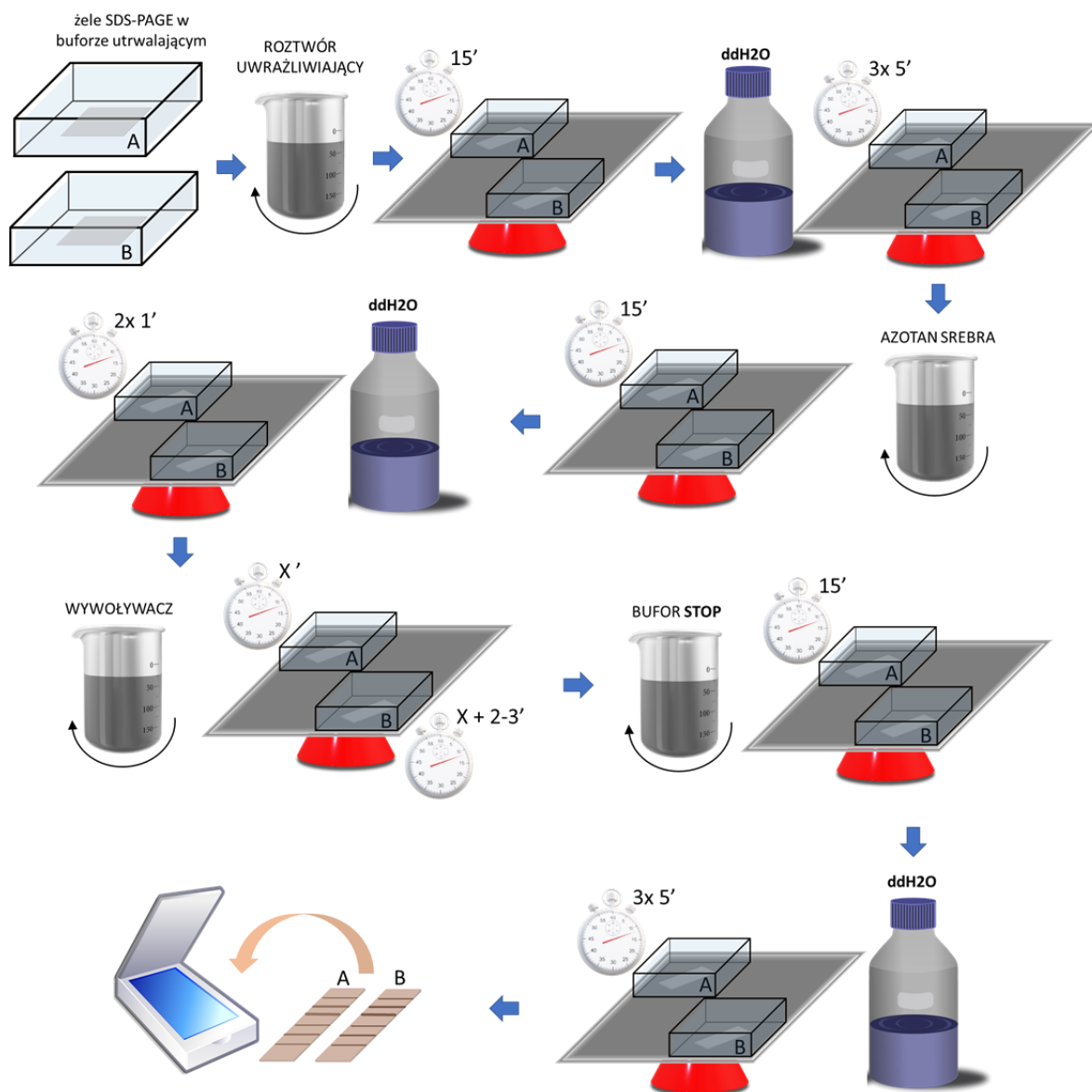
Materialy

Na każdy zespół: środki ochrony (rękawice ochronne, fartuchy); kwas octowy lodowaty; 96-proc. alkohol etylowy; tiosiarczan sodu; octan sodu; węglan sodu; azotan(V) srebra; kwas wersenowy (EDTA); formaldehyd; woda podwójnie dejonizowana (ddH₂O); waga analityczna; naważki; zlewka o poj. 100 ml (5 szt.); cylinder miarowy o poj. 100 ml (3 szt.); pipeta automatyczna o poj. 1000–5000 µl; pipeta o poj. 100–1000 µl; tipsy do pipety o poj. 5000 µl oraz 1000 µl; mieszadło magnetyczne; magnesy (dipole) do mieszadeł (2 szt.); pudełka plastikowe do inkubacji żeli (2 szt.); kołyska laboratoryjna; żel SDS-PAGE z rozdzielonymi

identycznymi próbami o stałej koncentracji białka na kolejnych 10 ścieżkach utrwalony po rozdzieleniu w buforze o składzie: etanol, kwas octowy, woda dejonizowana; tacka do cięcia żeli; szpatułka do cięcia żeli; stoper; kalibrowany skaner optyczny; komputer z oprogramowaniem obsługującym skaner.

Przebieg doświadczenia

1. Sporządzić bufor uwrażliwiający poprzez dodanie do zlewki 69 ml wody dejonizowanej, w której należy rozpuścić 0,2 g tiosiarczanu sodu, a następnie po jego rozpuszczeniu 6,8 g octanu sodu. Po ich rozpuszczeniu do roztworu dodać 31 ml etanolu. Uzyskany bufor podzielić na 2 objętości po 50 ml i wlać do 2 pudełek uprzednio podpisanych: 1 oraz 2. Po wyjęciu żelu bezpośrednio z buforu utrwalającego należy przeciąć go na 2 części, a następnie umieścić je w pudełkach z przygotowanym buforem uwrażliwiającym na 30 minut.
2. W trakcie inkubacji należy przygotować roztwór azotanu srebra. W tym celu do czystej zlewki trzeba wlać 100 ml ddH₂O i rozpuścić w niej 0,25 g azotanu srebra.
3. Po zakończonej inkubacji w buforze uwrażliwiającym należy go zlać, a żele płukać w ddH₂O przez 5 minut. Czynność powtórzyć 3-krotnie. Następnie żele umieścić w uprzednio przygotowanym roztworze azotanu srebra na 20 minut.
4. Bezpośrednio przed upływem inkubacji przygotować bufor wywołujący oraz bufor STOP. W celu przygotowania buforu wywołującego do czystej zlewki należy odważyć 2,5 g węglanu sodu i uzupełnić zlewkę do objętości 100 ml ddH₂O, następnie do roztworu dodać 40 µl formaldehydu. W celu przygotowania buforu STOP w 100 ml ddH₂O rozpuszczamy 1 g EDTA.
5. Po upływie 20 minut bufor zlać, a żele płukać w wodzie dejonizowanej 2-krotnie po 1 minucie.
6. Następnie żele zalać buforem wywołującym, odczytując czas osobno dla obu żeli. Żele należy inkubować w buforze do momentu uzyskania odpowiedniego wybarwienia prążków białkowych. Po tym czasie dla 1 żelu należy zatrzymać stoper. Szybko zlać bufor wywołujący, a żele zalać roztworem STOP. Kolejny z żeli wywoływać przez kolejne 2–3 minuty. Następnie zatrzymać stoper i reakcję barwną. W tym celu jak poprzednio z pudełka należy usunąć bufor wywołujący, a żel zalać buforem STOP.
7. Po upływie 5 minut zlać bufor STOP z obu pudełek, a żele przepłukać 3-krotnie ddH₂O przez 5 minut.
8. Po zakończeniu inkubacji obie połowy żelu umieścić na skanerze. Po uruchomieniu programu QuantityOne należy wybrać z menu opcję skanowania densytometrem GS800. Następnie wybrać w opcjach stosowany barwnik; ustawić wielkość pojedynczego piksela na 63,5 µm i po wstępnym skanowaniu poddać żele skanowaniu właściwemu. Uzyskane obrazy żeli należy zarchiwizować w pamięci komputera.



Ryc. 9.6. Graficzne podsumowanie barwienia białek w żelu z wykorzystaniem soli srebra

Wyniki

Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawić w tabeli 9.2.

Tabela 9.2. Pytania i zadania podsumowujące ćwiczenie 9.2

Jakie punkty krytyczne jesteś w stanie wskazać w przebiegu procedury barwienia?	
Jaki wpływ na wybarwienie spotów miało przedłużenie czasu inkubacji w roztworze wywołującym?	
Wskaż potencjalne słabe i mocne strony barwienia białek jonami srebra	

Ćwiczenie 9.3

Wizualizacja białek z użyciem barwnika Sypro Ruby

Cel

1. Poznanie podstawowych procedur wizualizacji białek po rozdzielach elektroforetycznych.
2. Określenie newralgicznych punktów w procedurze barwienia solami srebra, umożliwiającą skuteczne barwienie tą metodą.

Wprowadzenie

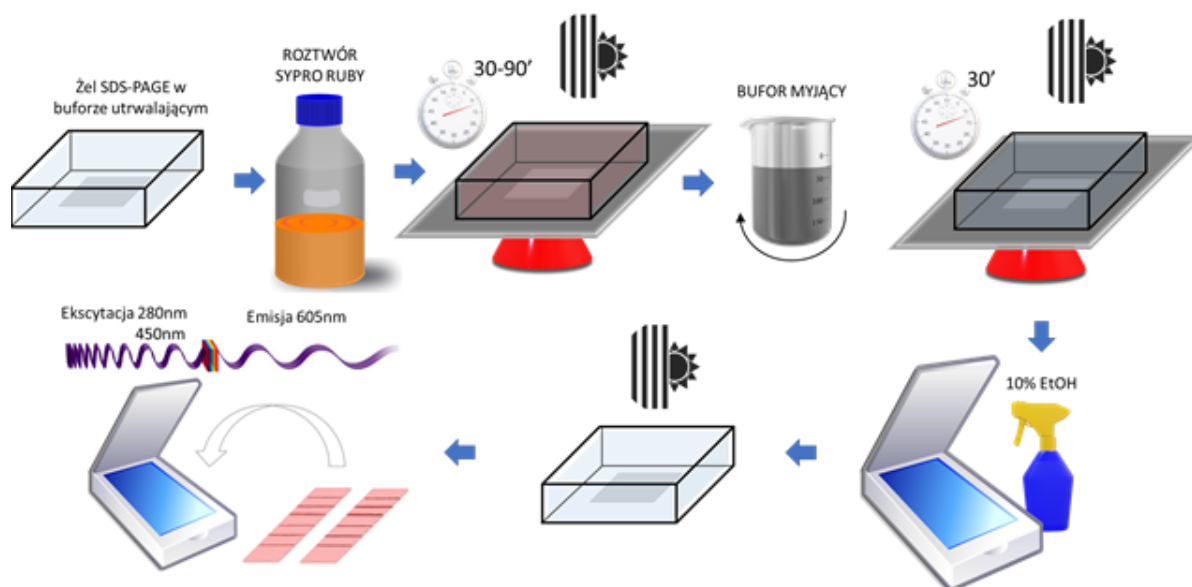
Sypro Ruby – jest fluorescencyjnym barwnikiem bazującym na rutenie. Wiąże się on niekowalencyjnie z aminokwasami zasadowymi rozdzielanych polipeptydów, dzięki czemu jest w pełni kompatybilny ze spektrometrią mas typu MALDI-ToF. Barwnik ten charakteryzuje zbliżona do soli srebra czułość detekcji, wynosząca ok. 1 ng białka na prążek lub spot białkowy. Zakres dynamiczny dla tego barwnika wynosi ponad 3 rzędy wielkości. W związku z tym, że Sypro Ruby jest barwnikiem fluorescencyjnym, wymaga odpowiedniej platformy do akwizycji obrazu żelu, a także odpowiedniego narzędzia umożliwiającego wycięcie spotów/prążków białkowych z żelu. Barwnik wzbudzany jest światłem UV ($\lambda = 280$ nm) lub w zakresie światła widzialnego ($\lambda = 470$ nm). W związku z tym należy uważać, by nie wzbudzić go przedwcześnie, ekspozując żel lub barwnik na intensywne światło. Emisja sygnału dla wzbudzonego barwnika w połączeniu z białkami zachodzi przy $\lambda = 610$ nm (ryc. 9.7).

Materiały

Na każdy zespół: środki ochrony (rękawice ochronne; fartuchy); Sypro Ruby; kwas octowy lodo-
waty; 96-proc. alkohol etylowy; zlewka o poj. 100 ml; cylinder miarowy o poj. 100 ml; pipeta
automatyczna o poj. 1000–5000 μ l; tipsy do pipety o poj. 5000 μ l; mieszadło magnetyczne; ma-
gnesy (dipole) do mieszadła (2 szt.); pudełko plastikowe do inkubacji żelu; kołyska laboratoryjna;
żel SDS-PAGE z rozdzielonymi białkami utrwalony po rozdziale w buforze o składzie: 10-proc.
etanol, 7-proc. kwas octowy, woda dejonizowana; tryskawka z 10-proc. alkoholem etylowym;
chusteczki do czyszczenia optyki; stoper; zestaw do akwizycji obrazów żeli barwionych fluore-
scencyjnie; komputer z oprogramowaniem obsługującym system do archiwizacji.

Przebieg doświadczenia

1. Po usunięciu buforu utrwalającego z plastikowego pudełka żel zalać gotowym roztworem Sypro Ruby, pamiętając o konieczności ograniczenia ekspozycji barwnika na silne natężenie światła. Objętość barwnika jest uzależniona od żelu, w przypadku żeli mało formatowych $7,5\text{ cm} \times 6\text{ cm}$ wynosi ok. 30 ml.
2. Żel zanurzony w roztworze przenieść na kołyskę laboratoryjną, uprzednio ustawioną na prędkość 4 i inkubować przez 30–90 minut. W tym czasie przygotować roztwór myjący. Do zlewki wlać 10,5 ml alkoholu etylowego, dodać 8 ml kwasu octowego i uzupełnić do objętości 100 ml ddH₂O.
3. Po inkubacji roztwór barwiący należy zlać, a żel umieścić w roztworze myjącym i inkubować go w nim na kołyszce przez 30 minut. W tym czasie należy przemyć transiluminator 10-proc. alkoholem, używając do tego chusteczek do czyszczenia optyki.
4. Żel wyjąć z pudełka za pomocą szpatułki i przenieść na transiluminator systemu do archiwizacji. Po uruchomieniu aplikacji QuantityOne z listy należy wybierać widmo ekscytacji oraz ustawić filtr emisji charakterystyczny dla Sypro Ruby. Ustawić zmienny czas akwizycji i zapisać serię zdjęć. Po zapisaniu z uzyskanych obrazów wybrać jeden o najlepszych parametrach zapisu.



Ryc. 9.7. Graficzne podsumowanie barwienia białek z wykorzystaniem barwnika Sypro Ruby

Wyniki

Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawić w tabeli 9.3.

Tabela 9.3. Pytania i zadania podsumowujące ćwiczenie 9.3

Jaka jest długość fali niezbędna do eks- cytacji barwnika Sypro Ruby?	
Jaka jest długość fali dla emisji barw- nika Sypro Ruby?	
Na co powinniśmy zwrócić szczególną uwagę podczas wizualizacji białek barwnikiem Sypro Ruby?	

Ćwiczenie 9.4

Analiza bioinformatyczna żeli lub blotów po elektroforezie SDS-PAGE

Cel

Zapoznanie się z oprogramowaniem umożliwiającym analizę relatywnej ekspresji białek na że-
lach 1-D.

Wprowadzenie

Po zakończonym barwieniu i archiwizacji żeli bądź membran konieczna jest analiza intensywności ich wybarwienia. Nawet pozornie proste analizy membran ze zwizualizowanym jednym prążkiem charakterystycznym dla danego białka wymagają odpowiednich narzędzi, jakimi są **programy bioinformatyczne**. Aplikacje te umożliwiają porównanie zarówno ścieżek w obrębie pojedynczych żeli, jak i pomiędzy nimi. Narzędzia bioinformatyczne bazują na analizie intensywności wybarwienia białek oraz wielkości pola powierzchni danego prążka białkowego i umożliwiają półilościową analizę relatywnej koncentracji analizowanych białek. Zazwyczaj

dostępne narzędzia umożliwiają także odniesienie krotności obserwowanych różnic w relatywnej koncentracji białek do wskazanego przez nas referencyjnego prążka. Ponadto powszechna jest możliwość analizy masy molekularnej analizowanych białek, bazująca na dystansie od frontu rozdziału prążków reprezentujących białka o znanych masach molekularnych.

Materiały

Na każdy zespół: komputer; program do analizy żeli Image Lab (Bio-Rad); obraz żelu 1-D ze zwizualizowanymi białkami prób oraz standardem mas molekularnych.

Przebieg doświadczenia

1. Podczas analizy z użyciem oprogramowania **Image Lab** ująć:

- wycięcie analizowanego obszaru żelu;
- wykrycie i adjustację linii rozdziału białek prób;
- wykrycie i ustalenie granic prążków białkowych;
- wybranie ścieżek z markerem mas molekularnych i określenie prążków o znanych masach;
- redukcję tła żelu;
- analizę mas molekularnych analizowanych prążków białkowych oraz określenie ich relatywnej ekspresji;
- dodawanie adnotacji do wybranych elementów obrazu żelu;
- generowanie raportu.

Wyniki

Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawić w tabeli 9.4.

Tabela 9.4. Pytania i zadania podsumowujące ćwiczenie 9.4

Wyjaśnij, na jakiej podstawie przeprowadzona jest analiza ekspresji wybranych prążków białkowych	
Wyjaśnij, jak szacowana jest masa molekularna określonych prążków białkowych	
Dlaczego konieczne jest usunięcie tła w trakcie półilościowej analizy ekspresji białek?	

Piśmiennictwo

Dong W.H., Wang T.Y., Wang F., Zhang J.H. 2011. Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using Coomassie blue. *PLoS One* 6 (8), e22394.

Drabik A., Bodzoń-Kuślakowska A. 2010. *Elektroforeza dwuwymiarowa 2-DE*. W: *Proteomika i metabolomika*. Red. A. Kraj, A. Drabik, J. Silbering. Warszawa: Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, s. 61–84.

- Hüseyin B. 2008. Coomassie staining without alcohol and acetic acid. *Lab Times* 6, 53.
- Lepczyński A. 2011. *Barwienie i archiwizacja żeli*. W: *Proteomika. Wybrane zagadnienia*. Red. W.F. Skrzypczak. Szczecin: Wydawnictwo Zapol, s. 53–67.
- Pink M., Verma N., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. 2010. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* 31 (4), 593–598.
- Walker J.M. 1996. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press.
- Walker J.M. 2005. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press.

10. WESTERN BLOT BIAŁEK

Katarzyna Michałek, Patrycja Oberska

Western blot (WB) to metoda badawcza powszechnie stosowana w biologii molekularnej, która umożliwia **identyfikację i analizę ekspresji określonych białek** w złożonej mieszaninie wielu protein (np. surowicy krwi, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, homogenatach komórek czy tkanek). Metoda ta jest powszechnie stosowana zarówno w badaniach naukowych, jak i codziennej praktyce lekarskiej. WB umożliwia detekcję swoistych przeciwciał przeciwko określonym antygenom i diagnostykę zakażeń bakteryjnych (np. boreliozy) i wirusowych (np. zakażenia wirusem HIV, zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej SARS), niektórych chorób pasożytniczych (np. wągrzycy, bąblowicy jednojamowej) i nowotworowych (np. detekcja przeciwciał onkoneuronalnych oraz określonych białkowych markerów nowotworowych). W badaniach naukowych WB wykorzystuje się głównie do identyfikacji konkretnych białek. Dzięki odpowiedniemu układowi doświadczenia i analizie zmian ekspresji badanego białka w określonych warunkach WB pozwala na wstępne określenie jego potencjalnej roli w danym procesie.

Znanych jest wiele modyfikacji metody Western blot, niemniej jednak standardowa procedura obejmuje: 1) **przygotowanie próby**, 2) **rozdział elektroforetyczny białek**, 3) **transfer białek z żelu na membranę**, 4) **blokowanie membrany**, 5) **inkubację z przeciwciałami** oraz 6) **detekcję**.

W zależności od rodzaju materiału biologicznego stosuje się odpowiednie procedury izolacji, denaturacji i rozpuszczenia białek, które następnie zostaną poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu. Podczas przygotowania prób należy pamiętać o **zabezpieczeniu ich przed proteolizą** poprzez m.in. zastosowanie odpowiednich inhibitorów proteaz. Podczas identyfikacji białek z wykorzystaniem WB najczęściej stosuje się **elektroforezę jednokierunkową (1-D) w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)** w żelach poliakrylamidowych, których wybór pod względem stężenia poliakrylamidu zależy głównie od wielkości mas cząsteczkowych analizowanej mieszaniny białek. Po zakończonym rozdziale kolejnym etapem WB jest **transfer białek z żelu na odpowiednio dobraną membranę**. Obecnie najczęściej w tym celu stosuje się tzw. elektrotransfer metodą półsuchą na membranę poliwinylidenową (PVDF) o określonych rozmiarach porów (najczęściej 0,2 lub 0,45 μm). Po transferze **wolną powierzchnię błony należy zablokować** przed niespecyficznymi wiązaniami do niej przeciwciał. W tym celu stosuje się najczęściej roztwór 5-proc. odtłuszczonego mleka. Następnie błonę **inkubuje się zwykle całą noc w temp. 4°C** ze swoistymi wobec poszukiwanego białka przeciwciałami **pierwszorzędownymi**. Ostatnim etapem WB jest detekcja i wizualizacja białek na błonie. W tym celu stosuje się przeciwciała **drugorzędowe**, skierowane wobec przeciwciał pierwszorzędowych, związanych z odpowiednim znacznikiem analitycznym. Popularnym elementem znakującym jest **peroksydaza chrzanowa (HRP)**, która w środowisku alkalicznym katalizuje reakcje utleniania luminolu, prowadząc do emisji chemiluminescencji. Emitowane promieniowanie może być zarejestrowane w ciemni na kliszy fotograficznej lub kamerą i zapisane w postaci cyfrowej. Uzyskane obrazy poddaje się odpowiedniej ocenie densytometrycznej.

Ćwiczenie 10.1

Identyfikacja oraz analiza ekspresji β -aktyny

Cel

1. Poznanie techniki oraz nabycie praktycznej umiejętności przeprowadzenia analizy metodą Western blot.
2. Wyjaśnienie znaczenia identyfikacji i analizy ekspresji β -aktyny jako białka referencyjnego do kontroli porównawczej i ilościowej analizy Western blot.

Wprowadzenie

β -aktyna o masie cząsteczkowej ok. **42 kDa** jest jedną z sześciu izoform aktyny, która stanowi jeden z najważniejszych elementów cytoszkieletu komórki. W metodzie Western blot pomiar β -aktyny wykorzystywany jest jako tzw. **loading control**, który umożliwia przede wszystkim ocenę efektywności transferu oraz właściwego nałożenia próbek i związanej z tym odpowiedniej ilości białka całkowitego w poszczególnych studzienkach żelu. Względnie ta sama ekspresja β -aktyny w analizowanych próbach pozwala na właściwą interpretację wyników dotyczących ekspresji poszukiwanego białka.

Materialy

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: próby mieszaniny białek (homogenaty komórkowe lub tkankowe) zawieszone w buforze lizującym (60-milimolowy Tris-HCl pH 6,8, 2-proc. SDS, 10-proc. glicerol, 4-proc. β -merkaptotanol, 0,0005-proc. błękit bromofenolu), których końcowa koncentracja białka całkowitego wynosi 10 μ g/10 μ l; bufony: 1 l buforu elektrodowego pH 8,3 (25-milimolowy Tris, 192-milimolowa glicyna, 0,1-proc. SDS), 500 ml buforu do transferu pH 8,3 (25-milimolowy Tris, 192-milimolowa glicyna, 20-proc. etanol), 2 l buforu PBS-Tween pH 7,5 (80-milimolowy NaH_2PO_4 , 20-milimolowy Na_2HPO_4 , 100-milimolowy NaCl, 0,1-proc. Tween 20), bufor blokujący (5-proc. odtłuszczone mleko w PBS-Tween), 2 ml buforu do detekcji białek metodą chemiluminescencji; 12-proc. żel poliakrylamidowy; membrana PVDF o średnicy por 0,2 μ m; pozostałe odczynniki: 100 ml alkoholu metylowego, bibuła transferowa, roztwór przeciwciał pierwszorzędowych, roztwór przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z HRP, wzorzec mas molekularnych; aparatura: wytrząsarka laboratoryjna, termoblok, dygestorium, zestaw do elektroforezy jednokierunkowej, zestaw do transferu metodą półsuchą, plastikowe pojemniki na membrany, kołyska laboratoryjna, zestaw do wizualizacji i zapisu cyfrowego; oprogramowanie do oceny densytometrycznej uzyskanych wyników.

Przebieg doświadczenia

1 grupa ćwiczeniowa

1. Postępowanie, którego celem jest identyfikacja i analiza ekspresji β -aktyny z zastosowaniem metody Western blot, obejmuje kilka następujących po sobie etapów (ryc. 10.1):
 - A. Jednokierunkowy rozdział białek z zastosowaniem elektroforezy 1-D w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w 12-proc. zminiaturyzowanych żelach poliakrylamidowych:
 - Z żelu wyciągnąć delikatnie grzebyk i przemyć studzienki buforem elektrodowym pH 8,3. Przygotować aparat do elektroforezy. Żele umieścić w modułach elektrod. Moduły umieścić w aparacie do elektroforezy i wypełnić buforem elektrodowym pH 8,3. Następnie należy umieścić na modułach nakładkę do nanoszenia prób. Pod dygestorium przez otwory w nakładce nałożyć do studzienek żelu po 10 μ l badanych prób. Próby z wzorcem mas cząsteczkowych nanieść do pierwszej studzienki. Wypełnić zbiornik dodatkową ilością buforu elektrodowego pH 8,3 i umieścić pokrywę. Podłączyć do aparatu zasilacz. Przeprowadzić elektroforezę przez 2 godziny przy napięciu 110 V.

B. Elektrotransfer białek z żelu na membranę PVDF 0,2 μm :

- Przygotować bufor do transferu pH 8,3 oraz plastikowe pojemniki na żel, membranę PVDF oraz bibułę. Przygotować metanol i pojemnik plastikowy. Wyciąć membranę, dostosowując ją do wielkości żelu. Oznaczyć ołówkiem lub przyciąć prawy dolny róg membrany, a następnie zanurzyć ją pod kątem 45 stopni w metanolu i inkubować nie dłużej niż 15 sekund. Następnie zanurzyć membranę w buforze do transferu i pozostawić na 15 minut. Po zakończonej elektroforezie przełożyć żel oraz bibułę do pojemników z buforem do transferu i inkubować 15 minut. W kolejnym etapie przygotować tzw. kanapkę transferową. Nasączone buforem do transferu bibułę, żel i membranę ułożyć w odpowiedniej kolejności w aparacie do transferu metodą półsuchą. Na płycie anody kolejno położyć bibułę, membranę, żel i bibułę. Delikatnie usunąć bagietką bąble powietrza i nałożyć katodę. Zamknąć aparat i podłączyć go do zasilacza. Przeprowadzić transfer białek z żelu na membranę przez 14 minut przy napięciu 12 V.

C. Blokowanie membrany:

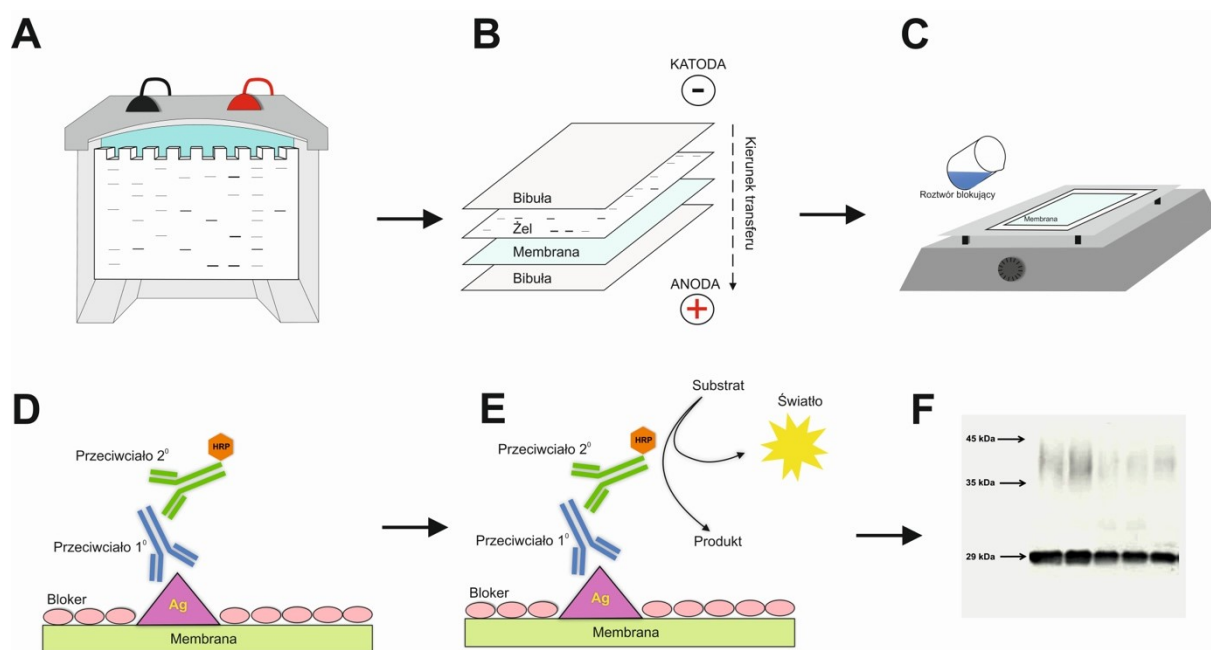
- Przygotować bufor blokujący. W tym celu należy rozpuścić 2,5 g odtłuszczonego mleka w 50 ml PBS-Tween. Po zakończonym transferze przenieść membranę do plastikowego pojemnika z buforem blokującym i inkubować na kołysce laboratoryjnej przez 60 minut w temp. pokojowej.

D. Inkubacja z przeciwciałami pierwszorzędowymi:

- Po zakończonym etapie blokowania membrany należy usunąć roztwór blokujący i płukać membranę 3-krotnie przez 5 minut w PBS-Tween. Następnie przygotować w odpowiednim rozcieńczeniu roztwór przeciwciał pierwszorzędowych i inkubować membranę na kołysce laboratoryjnej 1 godzinę w temp. pokojowej albo całą noc w temp. 4°C.

E–F. Detekcja i wizualizacja:

- Po zakończeniu inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi należy usunąć roztwór i płukać membranę 3-krotnie przez 5 minut w PBS-Tween. Następnie przygotować w odpowiednim rozcieńczeniu roztwór z przeciwciałami drugorzędowymi związanymi z enzymem peroksydazą chrzanową (HRP) i inkubować membranę na kołysce laboratoryjnej 1 godzinę w temp. pokojowej. Po upływie określonego czasu należy usunąć roztwór przeciwciał i płukać błonę 3-krotnie przez 5 minut w PBS-Tween. Należy przygotować roztwór do detekcji oraz szklaną płytkę dokładnie przemytą alkoholem. Ułożyć na niej membranę, a następnie zalać ją buforem do detekcji i inkubować średnio 5 minut (czas inkubacji zależy od rodzaju użytego buforu do detekcji). Po upływie określonego czasu usunąć nadmiar buforu i umieścić membranę w aparacie do detekcji oraz zarejestrować emitowany sygnał chemiluminescencji.



Ryc. 10.1. Schemat przedstawiający etapy standardowej procedury metody Western blot:
 A – elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym; B – elektrotransfer białek z żelu na membranę; C – blokowanie membrany; D – inkubacja membrany z przeciwciałami pierwszo- i drugorzędowymi; E – detekcja; F – reprezentatywny blot przedstawiający poszukiwane białko (w tym przypadku akwaporynę 2 o masie cząsteczkowej 29 kDa i 35–45 kDa); Ag – antygen białka; HRP – peroksydaza chrzanowa

Wyniki

1. Uzyskany sygnał chemiluminescencyjny zapisać w postaci cyfrowej.
2. Następnie z zastosowaniem odpowiedniego oprogramowania określić masę cząsteczkową widocznych prążków oraz ich średnią gęstość optyczną (OD).
3. Porównać OD analizowanych prążków i wyciągnąć wnioski. Czy gęstość optyczna β -aktyny we wszystkich badanych próbach jest względnie taka sama?

Piśmiennictwo

- Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Philips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., Atherton P. J. 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sport* 27(1), 4–25.
- Guevara-Lora I., Gołda A., Kozik A. 2010. Blotting białek. W: *Proteomika i metabolomika*. Red. A. Kraj, J. Silbering. Warszawa: Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, s. 125–138.
- Kozik A., Guevara-Lora I. 2004. Blotting białek. W: *Proteomika*. Red. A. Kraj, A. Drabik, J. Silbering. Kraków: Drukarnia Patria, s. 74–83.
- Mahmood T., Yang P.C. 2012. Western blot: Technique, theory and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4 (9), 429–434.
- Michałek K. 2011. Elektroforeza jednokierunkowa. W: *Proteomika. Wybrane zagadnienia*. Red. W.F. Skrzypczak. Szczecin: Wydawnictwo Zapol, s. 33–38.
- Michałek K. 2011. Identyfikacja białek metodą Western blot. W: *Proteomika. Wybrane zagadnienia*. Red. W.F. Skrzypczak. Szczecin: Wydawnictwo Zapol, s. 69–74.

11. SPEKTROMETRIA MAS

Małgorzata Ożgo

Spektrometria mas jest metodą powszechnie i z powodzeniem stosowaną w analizach proteomicznych. Wykorzystywana jest w badaniach klinicznych, biologicznych i biochemicznych w wielu laboratoriach zarówno naukowych, jak i przemysłowych. Głównymi atrybutami spektrometrii mas jest szczegółowa analiza składników w mieszaninie, możliwość uzyskania informacji o strukturze I-rzędowej białek i modyfikacjach potranslacyjnych.

Historia spektrometrii mas rozpoczęła się w 1911 r., kiedy J.J. Thomson skonstruował pierwszy spektrometr masowy na świecie. Obecnie stosuje się wiele różnych odmian techniki spektrometrii mas o różnych aplikacjach i konstrukcjach. Bez względu jednak na możliwości analityczne, przeznaczenie i konstrukcję tego narzędzia oraz opracowane strategie badawcze każdy spektrometr masowy jest techniką określającą **stosunek masy do ładunku badanego jonu**. Podstawowa konstrukcja spektrometru masowego zawiera zawsze 5 podstawowych elementów: **układ wprowadzania próbki, źródło jonów, analizator, detektor oraz system rejestracji danych** (ryc. 11.1). W związku z tym, że zasada działania spektrometru masowego opiera się na pomiarze stosunku m/z , podstawowym warunkiem analizy danej substancji jest możliwość jej jonizacji. Dlatego pierwszym etapem analizy jest wytworzenie jonów analitu w źródle, którym może być laser w przypadku spektrometrii **typu MALDI TOF**. Jonizacja cząsteczek może mieć charakter „miękkiej” lub „twardej”. W przypadku techniki MALDI TOF dochodzi do **jonizacji miękkiej**, czyli tworzy się jon molekularny bez fragmentacji cząsteczki. W spektrometrach z możliwością jonizacji twardej dochodzi nie tylko do powstania jonu molekularnego, ale również do powstania fragmentów cząsteczki, które tworzą charakterystyczne widmo fragmentacyjne danego związku. Spektrometria dostarcza ponadto informacji na temat struktury związku.

Technika jonizacji MALDI (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) to **desorpcja laserowa wspomagana matrycą**, w której analizowana substancja jest mieszana z drobno-cząsteczkowym związkiem jako podstawowym medium, silnie absorbującym promieniowanie lasera. Jest to matryca, która poza absorpcją promieniowania lasera ulega jonizacji i jednocześnie jonizuje cząsteczki próbki.

Kolejnym podzespołem i najważniejszą częścią spektrometru mas typu MALDI TOF jest **analizator czasu przelotu** (ang. *time of flight*, TOF). Funkcją analizatora jest rozdział jonów pod względem ich stosunku masy do ładunku i skierowanie ich strumienia w kierunku detektora. Współczesne analizatory czasu przelotu często wyposażone są w dodatkowy reflektor elektryczny, którego zadaniem jest zawrócenie lotów jonów przeciwnie do kierunku ich toru. Reflektor występujący w spektrometrii jako układ dodatkowych elektrod umożliwia zmniejszenie różnic między jonami w ich początkowej energii kinetycznej, co umożliwia zwiększenie rozdzielczości pomiaru. Istotnym podzespołem w spektrometrze mas jest również detektor, który reaguje na liczbę i prędkość docierających jonów.

Jedną z powszechnie stosowanych strategii identyfikacji białek z wykorzystaniem spektrometru masowego jest peptydowy odcisk palca (ang. *peptide mass fingerprinting*, PMF). Fragmenty peptydów (ich masy) powstałe w wyniku trawienia trypsyną są charakterystyczne dla danego białka i stanowią fundament identyfikacji w metodzie PMF. Wynik identyfikacji wskazany przez bazę danych jest dopasowaniem mapy peptydowej do sekwencji białka.

Ćwiczenie 11.1

Przygotowanie próbek (po rozdziale białek elektroforezą 2DE) do analizy z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas typu MALDI TOF (jonizacja/desorpcja laserowa wspomagana matrycą). Identyfikacja białek z zastosowaniem strategii PMF

Cel

1. Poznanie protokołu i nabycie umiejętności przygotowania analiz białek i peptydów oraz ich identyfikacji metodą techniki spektrometrii mas typu MALDI TOF.
2. Umiejętność właściwego doboru rodzaju matrycy do związku i proporcji związku użytego w konkretnym doświadczeniu naukowym.
3. Poznanie metod nanoszenia roztworu matrycy i roztworu próbki na płytki MALDI oraz wyjaśnienie trudności i ograniczeń związanych z zastosowaniem w analizach matrycy.
4. Identyfikacja białek na podstawie zarejestrowanych map peptydowych (spektrum masowego) uzyskanych w wyniku trawienia trypsyną.

Wprowadzenie

Metoda spektrometrii mas z zastosowaniem techniki **MALDI TOF** (ryc. 11.1) jest techniką umożliwiającą analizę substancji wysokocząsteczkowych i wymaga zastosowania matrycy jako głównego medium pochłaniającego energię lasera i przekazującego ją dalej cząsteczkom badanej próby. Główną rolą matrycy jest absorbowanie promieniowania lasera i jednoczesna jonizacja cząsteczek znajdujących się w próbce. Ponadto dzięki powstałym w wyniku uderzenia lasera bardzo silnym oddziaływaniom energetycznym (międzycząsteczkowym) matryca umożliwia wywołanie desorpcji cząsteczek z powierzchni płytki. Należy więc pamiętać przed przystąpieniem do eksperymentu techniką MALDI TOF o doborze odpowiedniej matrycy, która powinna spełniać następujące kryteria:

- laser UV używany jako źródło jonów w technice MALDI TOF powinien sprzyjać jonizacji próbki przy zastosowaniu odpowiednich matryc, np. kwas α -cyjano-4hydroksycynamonowy (CHCA); kwas synapinowy;
- matryca powinna krystalizować próbkę oraz uniemożliwiać powstawanie agregatów cząsteczek analitu i być stabilna w warunkach próżni;
- matryca powinna być odpowiednio dobrana do związku, np. białek, peptydów, polimerów organicznych, kwasów nukleinowych.

Materiały

Dla 1 grupy ćwiczeniowej: dowolna tkanka poddana elektroforezie w żelu poliakrylamidowym 2DE; odczynniki: woda destylowana, acetonitryl, kwas trifluorooctowy (TFA), matryce (kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy – CHCA, kwas synapinowy – SA), kalibrant, trypsyna, 25 mM NH_4HCO_3 ; aparatura i wyposażenie: spektrometr masowy typu MALDI TOF, standardowa płytka metalowa do nanoszenia prób, płytka typu AnchorChipTM, cieplarka, pipety automatyczne, wytrząsarka (worteks), łaźnia ultradźwiękowa, wirówka próżniowa, probówki do analiz spektrometrii mas.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 4-osobowe

1. Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy założyć rękawiczki nitrylowe i obowiązkowo związać włosy (częstym zabrudzeniem prób są keratyny z włosów).
2. Wycinanie spotów z żeli:
 - przed wycięciem spotów konieczne jest spłukanie żelu wodą destylowaną w celu uniknięcia jego wysychania. Spoty wyciąć za pomocą końcówek do pipet (tipsów) i przenieść do probówek typu Eppendorf. Należy pamiętać, że probówki muszą być odporne na działanie odczynników (np. acetonitrylu). Technika MALDI TOF jest bardzo czuła

nawet na niewielkie ilości zanieczyszczeń (np. plastyfikatory), co może zaburzać prawidłowy obraz spektrum masowego.

3. **Dekoloryzacja spotów** (w celu pozbycia się pozostałości barwników soli i detergentów):

- wyeliminować zanieczyszczenia poprzez serię płukań z zastosowaniem buforów zawierających acetonitryl (ACN) oraz 25-milimolowy NH_4HCO_3 :

Bufor nr 1: 25 mM NH_4HCO_3 + 5% ACN

Bufor nr 2: 25 mM NH_4HCO_3 + 50% ACN

- pierwsze płukanie w buforze nr 1: do każdej próbki ze spotem dodać 100 μl buforu nr 1 (bufor zawiera: 95% 25-milimolowego roztworu NH_4HCO_3 oraz 5% 100-proc. ACN). Pozostawić do inkubacji. Po upływie 30 minut wyeliminować bufor z próbki;
 - drugie płukanie w buforze nr 2: do każdej próbki ze spotem dodać 100 μl buforu nr 2 (bufor zawiera: 50% 25-milimolowego NH_4HCO_3 oraz 50% 100-proc. ACN). Pozostawić do inkubacji. Po upływie 30 minut wyeliminować bufor z próbki. Ten etap płukania powtórzyć 2-krotnie (spot musi być bezbarwny).
4. Dehydratacja spotów:
- do każdej próbki dodać 200 μl 100-proc. acetonitrylu i pozostawić do inkubacji;
 - po 10 minutach usunąć z próbek ACN, a jego pozostałość odparować z wykorzystaniem koncentratora (Concentrator 5301, Eppendorf);
 - po tym etapie spoty mogą być przechowywane w lodówce w temp. do -20°C w celu dalszego wykonania analiz w terminie późniejszym.
5. Hydroliza białek trypsyną:
- białka należy strawić trypsyną (Promega), która hydrolizuje wiązania peptydowe na C-końcu reszt L-argininy i lizyny. Peptydy powstałe w wyniku hydrolizy trypsyną łatwo ulegają jonizacji dzięki zasadowemu charakterowi występujących na ich C-końcach reszt aminokwasowych;
 - białka są hydrolizowane na peptydy trypsyną w ilości 80–400 ng (8–40 μl na spot) w zależności od wielkości spotów. Przygotować roztwór trypsyny (10 ng/ μl , w 25 mM NH_4HCO_3) i nanieść na każdy spot;
 - pozostawić do inkubacji na 5 godzin bądź na całą noc w cieplarni w temp. 37°C . Po wyjęciu z cieplarki zwirować 1 minuty z siłą 3000 g.
6. Ekstrakcja peptydów:
- w celu ekstrakcji peptydów każdą z prób rozpuścić w 10 μl 100-proc. acetonitrylu. Następnie każdą próbę worteksować, przenieść do łaźni ultradźwiękowej i pozostawić na 2 minuty. Po tym czasie próby inkubować ponownie w temp. 37°C przez 15 minut;
 - po tym etapie próby są gotowe do nałożenia na metalową płytkę.
7. Przygotowanie matrycy i kalibrantu:
- w pierwszym etapie przygotować rozpuszczalnik matrycy zawierający: 1 ml acetonitrylu oraz 1 ml kwasu trifluorooctowego (TFA). Następnie matrycę α -CHCA (kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy) dodać do wcześniej przygotowanego rozpuszczalnika w ilości: 5 mg/ml. Tak przygotowana matryca jest gotowa do użycia;
 - kalibrant (Peptide Calibration Standard II) z zakresem mas 700–3200 Da rozpuścić w 50 μl wcześniej przygotowanej matrycy.
8. Nanoszenie próbki i matrycy na płytki MALDI:
- krople roztworu próbki (1 μl) oraz krople roztworu matrycy (1 μl) nanieść na płytkę i mieszać ze sobą (ryc. 11.2). Jest to bardzo ważny etap analizy, ponieważ od powstania jednorodnej mieszaniny i dobrze wykrywalnej zależy jakość widma.

Krystalizacja może wpłynąć na powstanie tzw. gorących miejsc (hot spotów) na płytce, które wpływają bardzo mocno na wydajność jonizacji w systemie MALDI TOF;

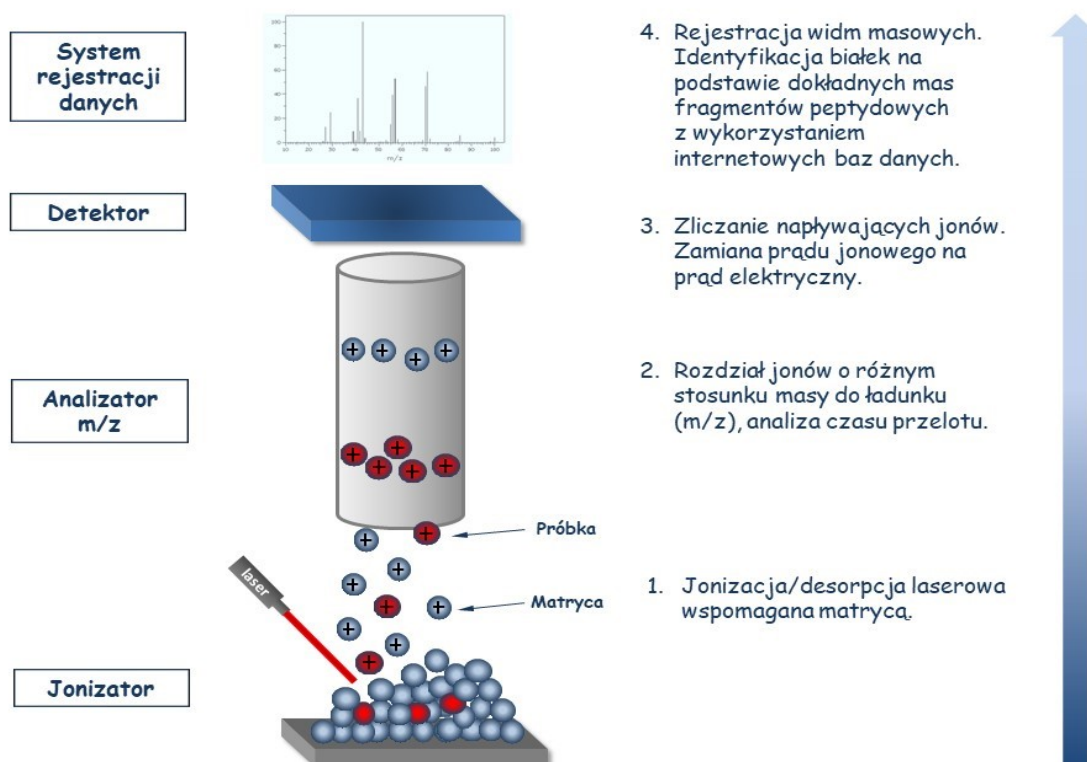
- po skryształizowaniu próbki z matrycą w wyznaczone miejsca na płytce należy nanieść 0,7 µl kalibrantu (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics) z zakresem mas 700–3200 Da (ryc. 11.2).
9. Identyfikacja białek na podstawie mapy peptydowej z wykorzystaniem strategii PMF:
- kolejnym etapem analizy jest identyfikacja białek z wykorzystaniem spektrometru masowego typu MALDI TOF. Za pomocą programów bioinformatycznych z map peptydowych, uzyskanych w wyniku trawienia enzymem proteolitycznym – dokonuje się jednoznacznej identyfikacji białek. Spektrometr mierzy czas przelotu i podaje charakterystyczną dla danego jonu (fragmentu białka) liczbę odzwierciedlającą stosunek masy do ładunku (m/z). Widma masowe rejestrowane są z zastosowaniem dodatniego trybu jonizacji. Zbiór mas peptydów wchodzących w skład białka tworzy jego unikatowy „masowy odcisk palca” (ang. *peptide mass fingerprinting*, PMF), umożliwiający identyfikację analizowanego białka. Uzyskane widma masowe będą porównane z sekwencjami białkowymi dostępnymi w bazach danych NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) i SwissProt (<http://us.expasy.org/uniprot/>), przy użyciu wyszukiwarki MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Wyniki

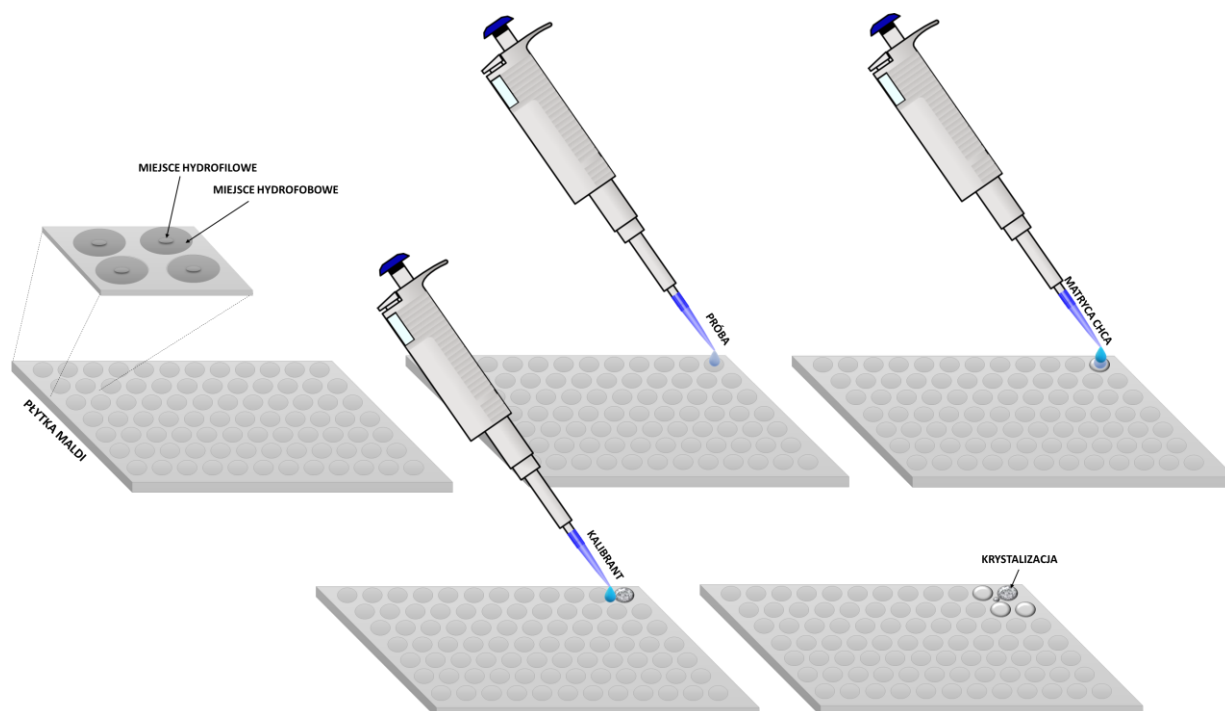
1. Analiza widm w spektrometrze masowym z wykorzystaniem bazy danych MASCOT wymaga zastosowania następujących parametrów: trypsyna jako enzym trawiący białko, karbamidometylacja cysteiny jako modyfikacja stała peptydów, oksydacja metioniny jako modyfikacja zmienna peptydów, tolerancja różnicy mas – 150 ppm, dopuszczalne jedno opuszczone miejsce cięcia przez enzym.
2. Uzyskane wyniki identyfikacji białek należy weryfikować, uwzględniając wartość *score* odzwierciedlającą wiarygodność identyfikacji ($p < 0,05$), procent pokrycia sekwencji aminokwasowej (min. 15%) oraz porównanie teoretycznych wartości mas molekularnych (MW) i punktów izoelektrycznych (pI) białek z uzyskanymi wartościami eksperymentalnymi.
3. Wyniki identyfikacji białek zamieścić w tabeli 11.1.

Tabela 11.1. Wyniki identyfikacji białek uzyskanych z wykorzystaniem baz danych NCBI

Nr spotu	Nazwa białka	Nazwa genu	Nr akcesyjny	Ilość dopasowanych polipeptydów	Stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej	Teoretyczne pI/MW (pH/kDa)	Eksperymentalne pI/MW (pH/kDa)	Organizm
1								
2								
3								
4								



Ryc. 11.1. Schemat budowy i zasada działania spektrometru masowego typu MALDI TOF



Ryc. 11.2. Nakładanie próbek i matrycy na miejsca hydrofilowe

Piśmiennictwo

- Kraj A., Drabik A., Silberring J. 2010. *Proteomika i matabolomika*. Warszawa: Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego.
- Kraj A., Silberring J. 2004. *Proteomika*. Kraków: Wydawnictwo Wydziału Chemii UJ.
- Suder P., Silberring J. 2006. *Spektrometria mas*. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
- Ożgo M. 2011. Spektrometria mas. W: *Proteomika. Wybrane zagadnienia*. Red. W.F. Skrzypczak. Szczecin: Wydawnictwo Zapol, s. 75–84.
- Ożgo M., Lepczyński A., Herosimczyk A. 2015. Two-dimensional gel-based serum protein profile of growing piglets. *Turkish Journal of Biology* 39, 320–327.

12. METODY INŻYNIERII ENZYMOWEJ W NANOBIOINŻYNIERII

Radosław Drozd, Magdalena Szymańska

Enzymy ze względu na swoje unikatowe właściwości katalityczne znajdują zastosowanie w wielu obszarach nanobioinżynierii. Jednakże w niektórych procesach wymagana jest wysoka homogenność preparatów enzymatycznych. W zależności od źródła biokatalizatora, rodzaju organizmu, tkanki etc. proces oczyszczania enzymu może składać się wielu etapów, co jednakże może wpływać na wydajność całego procesu. Ponadto pomimo obiecującego potencjału katalitycznego uzyskanie odpowiedniej ilości biokatalizatora, jego izolacja i oczyszczanie bezpośrednio z komórek organizmu bywają niekiedy utrudnione ze względu na specyficzne wymagania środowiskowe (temperatura, pH, wilgotność itp.) czy też konieczność obecności specyficznych induktorów w medium hodowlanym. Z tego powodu coraz częściej w nanobioinżynierii stosuje się enzymy rekombinowane. Są one otrzymywane poprzez ekspresję genów kodujących białka enzymatyczne, wprowadzonych do komórek wyselekcjonowanych mikroorganizmów z wykorzystaniem wektorów ekspresyjnych. Metoda ta pozwala na modyfikacje enzymów i wprowadzanie do ich struktury elementów pozwalających na szybką izolację i oczyszczanie, znacząco wpływając na redukcję kosztów i wydajność procesu.

Ćwiczenie 12.1

Otrzymywanie enzymów rekombinowanych – izolacja plazmidowego i genomowego DNA

Cel

Izolacja genomowego DNA z *Bifidobacterium* sp. oraz plazmidu pET28a z *E. coli* BL-21 (DE3).

Wprowadzenie

Jedną z metod wykorzystywanych w biologii molekularnej jest **klonowanie DNA**, mające na celu powielenie określonego fragmentu DNA pobranego od dawcy i wprowadzenie do organizmu biorcy z wykorzystaniem odpowiedniego wektora, w wyniku czego powstaje wektor ekspresyjny zawierający pożądaną gen, którego ekspresja prowadzi do syntezy **białka rekombinowanego**. Biorcą mogą być komórki bakteryjne, drożdżowe lub eukariotyczne, natomiast ze względu na łatwość hodowli i szybki czas namnażania najczęściej wykorzystywane są systemy bakteryjne, głównie *Escherichia coli*. Produktami rekombinowanych genów powstających w wyniku procesu klonowania są białka rekombinowane. Głównym celem ich produkcji jest obniżenie kosztów produkcji w porównaniu z oczyszczaniem tych samych substancji występujących w warunkach naturalnych. Obecnie rekombinowane enzymy znajdują szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w procesie wytwarzania syropu z cukru inwertowanego czy produkcji serów oraz medycynie w produkcji ludzkiej insuliny.

Materialy

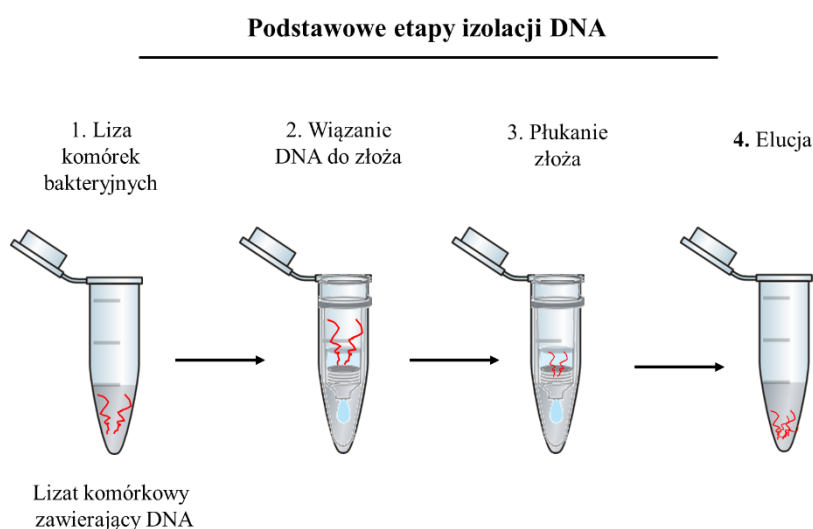
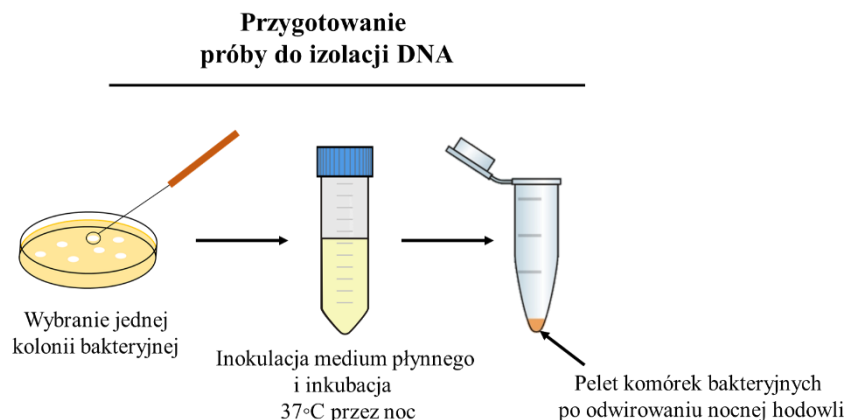
Stałe i płynne medium LB (Luria-Bertani medium); ezy; zestawy do izolacji DNA; jałowe próbki typu Eppendorf o poj. 2 ml; tipsy; pipety; wirówka.

Mikroorganizmy

Bifidobacterium sp., *Escherichia coli* BL-21 (DE3).

Przebieg doświadczenia

1. Zamrożone komórki *E. coli* BL-21 i *Bifidobacterium* sp. wysiać na stałe podłoże LB. Inkubować w temp. 37°C przez noc.
2. Następnie pobrać 1 kolonię i zainokulować 5 ml płynnego medium LB. Inkubować w temp. 37°C z wytrząsaniem (200 rpm) przez noc.
3. Hodowlę przenieść do probówek typu Eppendorf o poj. 2 ml i wirować przez 5 minut przy obrotach 6000 rpm.
4. Kontynuować proces izolacji zgodnie z protokołem przedstawionym w zestawie do izolacji (ryc. 12.1).



Ryc. 12.1. Schemat procesu izolacji DNA z wykorzystaniem złoża krzemionkowego

Wyniki

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.2

Otrzymywanie enzymów rekombinowanych – amplifikacja genu csc i plazmidu PET28A

Cel

Amplifikacja genu *csc* i plazmidu pET28a metodą PCR.

Wprowadzenie

Jedną z podstawowych technik wykorzystywanych w biologii molekularnej jest reakcja **PCR** (ang. *polymerase chain reaction*). Metoda ta została opracowana przez amerykańskiego biochemika Kary'ego Mullisa w 1983 r., za co uhonorowany został Nagrodą Nobla w 1993 r. w dziedzinie chemii. Istotą reakcji PCR jest powielanie określonego fragmentu DNA w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem zaprojektowanych starterów, czyli jednoniciowej sekwencji DNA komplementarnej do fragmentów matrycy. Niezbędnym elementem do przeprowadzenia reakcji PCR jest polimeraza DNA, która po przyłączeniu do matrycy starterów syntetyzuje nowe nici DNA.

Materialy

Komora laminarna; probówki typu Eppendorf o poj. 0,2 µl; tipsy, pipety; blok chłodzący; woda destylowana; dNTP (10 mM); startery; genomowe i plazmidowe DNA; polimeraza PfuPlus!; 10 × bufor PfuPlus!; termocykler.

Przebieg doświadczenia.

1. Rozmrozić potrzebne odczynniki i umieścić na lodzie.
2. Przygotować mieszaninę reakcyjną o składzie przedstawionym w tabeli 12.1.

Tabela 12.1. Skład mieszaniny reakcyjnej i ilości produktów niezbędnych do przeprowadzenia reakcji PCR

Składniki mieszaniny	Próba badana (µl)	Próba negatywna (µl)
Woda destylowana	39	40
10 × bufor	5	5
dNTP	2	2
Starter 1 (10 µM)	1,25	1,25
Starter 2 (10 µM)	1,25	1,25
DNA	1	–
Polimeraza PfuPlus!	0.5	0,5

3. Ustawić program reakcji PCR zgodnie z danymi podanymi w tabeli 12.2.

Tabela 12.2. Warunki reakcji amplifikacji genomowego i plazmidowego DNA

	Insert		Wektor	
Denaturacja wstępna	95°C, 3 min		95°C, 3 min	
Denaturacja	95°C, 30 s	35 cykli	95°C, 30 s	30 cykli
Przyłączanie starterów	60°C, 30 s		57°C, 30 s	
Wydłużanie	72°C, 1 min 30 s		72°C, 5 min	
Końcowe wydłużanie	72°C, 5 min		72°C, 5 min	

4. W czasie trwania reakcji PCR przygotować 1-proc. żel agarozowy:

- przygotować bufor $50 \times$ TAE o składzie przedstawionym w tabeli 12.3 (naważyć odpowiednią ilość Tris i EDTA i rozpuścić w 700 ml dH_2O , a następnie dodać kwas octowy i uzupełnić dH_2O do 1 litra);

Tabela 12.3. Skład buforu $50 \times$ TAE do elektroforezy

Składniki	Ilość na 1 litr
Tris	242 g
EDTA	18,61 g
Kwas octowy	57,1 ml
dH_2O	uzupełnić do 1 l

- naważyć 0,3 g agarozy i rozpuścić w 30 ml buforu $1 \times$ TAE, ogrzewając kilka minut w kuchence mikrofalowej;
- dodać 2,5 μl bromku etydyny;
- wylać żel do rynienki z włożonym grzebieniem;
- po zastygnięciu żelu przenieść go do aparatu do elektroforezy i zalać $1 \times$ buforem TAE;
- po zakończeniu reakcji PCR mieszać 5 μl produktów PCR z 1 μl buforu obciążającego i przenieść na żel;
- elektroforezę prowadzić przy napięciu 100 V przez ok. 30 minut;
- uzyskane produkty PCR przechowywać w temp. -4°C do czasu wykonania kolejnych analiz.

Wyniki

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.3

Otrzymywanie enzymów rekombinowanych – trawienie produktów reakcji pcr enzymem DpnI

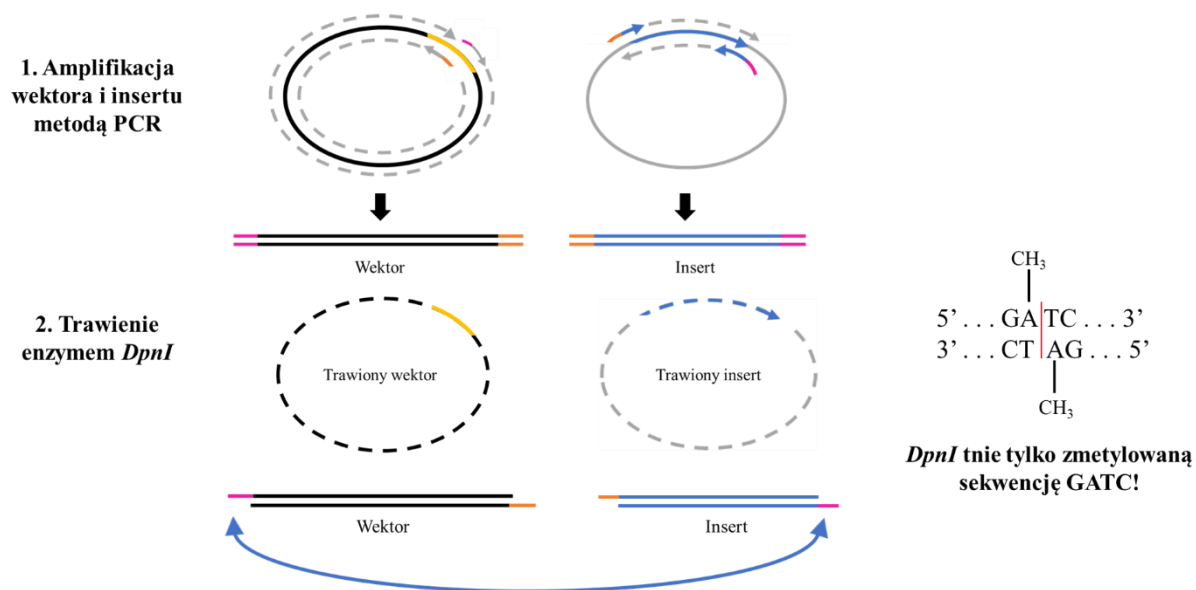
Cel

Trawienie wektora pET28a i insertu z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego *DpnI*.

Wprowadzenie

Klonowanie molekularne jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych technik w laboratoriach biomedycznych. Tradycyjnie metody klonowania polegają na łączeniu insertu i wektora plazmidowego przy udziale ligazy DNA T4 po wcześniejszym ich trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Jest to metoda powszechnie wykorzystywana, mimi iż jest czasochłonna ze względu na występowanie wielu etapów. Aby usprawnić proces klonowania, powstała metoda „FastCloning” (ryc. 12.2), która umożliwia amplifikowanie wektora i insertu metodą PCR.

Nieoczyszczone produkty reakcji PCR są trawione enzymem restrykcyjnym *DpnI*, który rozpoznaje metylowane odcinki DNA.



Ryc. 12.2. Schemat procesu klonowania metodą „FastCloning” (Li i wsp., 2011)

Materialy

Amplifikowany wektor i insert; enzym *DpnI*; pipety; tipsy; cieplarka; blok grzewczy.

Przebieg doświadczenia

1. Do 45 µl produktów reakcji PCR dodać 0,5 µl enzymu *DpnI*.
2. Inkubować w temp. 37°C przez 1 godzinę.
3. Następnie inkubować w temp. 80°C w celu inaktywacji enzymu.
4. Trawiony wektor i gen rozdzielić na 1-proc. żelu agarozowym.
5. Wyciąć prążki z żelu i oczyścić z wykorzystaniem komercyjnych zestawów.
6. Przechowywać w temp. 4°C do momentu wykonywania dalszych analiz.

Wyniki

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.4

Otrzymywanie enzymów rekombinowanych – ligacja

Cel

Wprowadzenie insertu do wektora pET28a i uzyskanie wektora ekspresyjnego.

Wprowadzenie

SLiCE (ang. *seamless ligation cloning extract*) jest nowoczesną metodą wykorzystywaną w klonowaniu molekularnym, która polega na wykorzystaniu ekstraktów ze szczepów *E. coli*, posiadających system rekombinacyjny Red bakteriofaga λ . Jest to alternatywna metoda opierająca się na rekombinacji homologicznej, która może być stosowana w klonowaniu molekularnym jako zamiennik standardowej metody wykorzystującej miejsca cięcia przez enzymy restrykcyjne. SLiCE jest prostą i szybką metodą, w której najważniejszą rolę odgrywa aktywowane przez ATP białko **RecA**, mające za zadanie ułatwienie połączenia się komplementarnych końców plazmidu i insertu.

Materialy

Pipety; tipsy; probówki typu Falcon o poj. 50 ml, probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml; komora laminarna; medium LB; trypton; ekstrakt drożdżowy; NaCl; mikropłytki 96-dołkowe; czytnik mikropłyt; wytrząsarka laboratoryjna; wirówka; woda destylowana; waga laboratoryjna; 3% (w/v) Triton X-100; 50-milimolowy Tris – HCl (pH 8,0); 80-proc. glicerol; suchy lód.

Mikroorganizmy

E. coli TOP10.

Przebieg doświadczenia

1. Przygotować ekstrakt SLiCE:

- komórki *E. coli* TOP10 wysiać powierzchniowo na podłoże LB i inkubować w temp. 37°C przez noc;
- następnego dnia pobrać 1 kolonię i zainokulować 5 ml medium LB; inkubować w 37°C z wytrząsaniem (200 rpm) przez noc;
- dodać 1 ml nocnej hodowli *E. coli* TOP10 do 50 ml 2 × YT medium; zmierzyć OD (ang. *optical density*);
- przygotować medium 2 × YT (zgodnie z danymi podanymi w tabeli 12.4);

Tabela 12.4. Skład podłoża 2 × YT

Składnik	Ilość na litr [g]
Trypton	16,0
Ekstrakt drożdżowy	10,0
NaCl	5,0

- inkubować hodowlę w temp. 37°C z wytrząsaniem (160 rpm) do momentu osiągnięcia OD₆₀₀ 3.0 (późna faza logarytmiczna);
- po osiągnięciu odpowiedniej gęstości optycznej hodowlę zwirować – 5000 g przez 10 minut w temp. 4°C;
- otrzymany pelet przepłukać 50 ml sterylnej zimnej wody i ponownie wirować – 5000 g przez 5 minut w temp. w 4°C; otrzymany pelet zważyć;
- otrzymany pelet rozpuścić w 1,2 ml 3-proc. (w/v) Triton X-100 w 50-milimolowym Tris-HCl (pH 8,0) i inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut;
- lizat odwirować w 20 000 g przez 2 minuty w temp. 4°C (**uwaga: wszystkie kroki wykonywać na lodzie!**);
- otrzymany lizat zawiesić w 80-proc. (v/v) zimnym glicerolu (1 : 1 – 40-proc. końcowe stężenie glicerolu) i delikatnie wymieszać;

- otrzymany SLiCE ekstrakt zamrozić w ciekłym azocie lub suchym lodzie;
 - przechowywać w temp. -80°C w 40-proc. glicerolu.
2. **Przygotować mieszaninę reakcyjną** (ze składników podanych w tabeli 12.5):

Tabela 12.5. Składniki mieszaniny reakcyjnej do ligacji

Wektor + insert DNA	Zmienna ilość w stosunku 3 : 1
10 × SLiCE bufor	1 μl
SLiCE ekstrakt	1 μl
dH ₂ O	Uzupełnić do 10 μl

- inkubować w temp. 37°C przez 1 godzinę.

Wyniki

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.5

Otrzymywanie enzymów rekombinowanych – transformacja

Cel

Uzyskanie stanu kompetencji komórek *E. coli* BL-21 (DE3) i transformacja wektora ekspresyjnego do komórek *E. coli* BL-21 (DE3).

Wprowadzenie

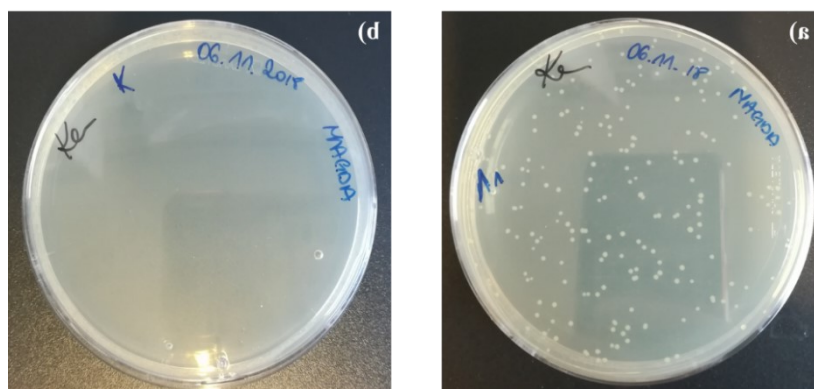
Transformacja jest kluczowym elementem procesu klonowania, w którym bakterie aktywnie pobierają egzogenne cząsteczki DNA (zwykle plazmidowe) ze środowiska. Aby komórki bakteryjne były zdolne do transformacji, muszą osiągnąć stan **kompetencji**. Niektóre mikroorganizmy posiadają naturalne zdolności do wchodzenia w stan kompetencji, np. w przypadku wystąpienia niesprzyjających warunków środowiska (*Bacillus subtilis* i *Haemophilus influenzae* uzyskują stan kompetencji w wyniku wysokiego poziomu cAMP), natomiast *Neisseria gonorrhoeae* jest zawsze bakterią kompetentną. Aby uzyskać stan kompetencji w warunkach laboratoryjnych, najczęściej traktuje się komórki biorcy roztworami zawierającymi jony Ca^{2+} w połączeniu z szokiem temperaturowym. Obniżenie temperatury prowadzi do dezintegracji lipopolisacharydów (LPS) w błonie komórkowej i odsłonięcia kanałów jonowych. Natomiast jony wapnia niwelują ujemny ładunek na powierzchni komórki bakteryjnej, zapobiegając odpychaniu plazmidowego DNA.

Materialy

Podłoże stałe i płynne LB; kanamycyna; inkubator; ezy; wytrząsarka laboratoryjna; probówki typu Falcon; probówki typu Eppendorf; mikropłytki 96-dołkowe; czytnik mikropłytek; lód; wirowka; 100-milimolowy CaCl_2 ; 85-milimolowy CaCl_2 ; suchy lód; 60-proc. glicerol; blok grzewczy; medium SOC (ang. *super optimal catabolite repression*).

Mikroorganizmy*E. coli* BL-21 (DE3).**Przebieg ćwiczenia**

1. Uzyskać stan kompetencji komórek *E. coli* BL-21 (DE3):
 - komórki *E. coli* BL-21 (DE3) wysiać powierzchniowo na podłoże LB i inkubować w temp. 37°C przez noc;
 - następnego dnia pobrać 1 kolonię i zainokulować 5 ml medium LB; inkubować w temp. 37°C z wytrząsaniem (200 rpm) przez noc;
 - zainokulować 100 ml medium LB 1 ml nocnej hodowli i inkubować w temp. 37°C z wytrząsaniem (230 rpm) do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} = 0,5-0,6$;
 - przenieść hodowlę do 2 probówek typu Falcon o poj. 50 ml i inkubować na lodzie przez 20 minut;
 - odwirować hodowlę w 4500 rpm przez 5 minut w temp. 4°C; usunąć supernatant;
 - pelet zawiesić w 20 ml zimnego 100-milimolowego roztworu $CaCl_2$ i inkubować na lodzie przez 1 godzinę;
 - odwirować w 4500 rpm przez 5 minut w temp. 4°C i usunąć supernatant;
 - ostrożnie zawiesić pelet w 2 ml zimnego 85-milimolowego roztworu $CaCl_2$ zawierającego 15-proc. glicerol;
 - rozdzielić komórki do probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 ml po 50–200 μ l (zimnych) i przeprowadzić szok termiczny w ciekłym azocie lub na suchym lodzie;
 - przechowywać w temp. $-80^{\circ}C$.
2. Transformacja:
 - do hodowli kompetentnych komórek *E. coli* BL-21 (DE3) dodać 10 μ l roztworu plazmidowego DNA po ligacji z insertem (**uwaga: wszystkie kroki wykonywać na lodzie!**);
 - inkubować na lodzie przez ok. 5 minut;
 - wykonać „szok cieplny” poprzez inkubację w temp. 42°C przez 45 sekund;
 - dodać 250 μ l ogrzanego do 42°C podłoża SOC (ang. *super optimal catabolite repression*);
 - po dodaniu medium SOC inkubować próby w temp. 37°C przez 15 minut;
 - wysiać powierzchniowo 100 μ l hodowli transformantów na podłoże selekcyjne LB z kanamycyną (50 μ g/ml) i inkubować w temp. 37°C przez noc;
 - wszystkie otrzymane po inkubacji kolonie oznaczają pozytywny wynik doświadczenia ze względu na obecność w plazmidzie pET28a genu oporności na kanamycynę (ryc. 12.3);
 - klony przechowywać w temp. $-80^{\circ}C$ do momentu wykonywania kolejnych analiz.



Ryc. 12.3. Wynik selekcji klonów na podłożu stałym LB z dodatkiem kanamycyny (50 μ g/ml) jako czynnika selekcyjnego: a) pozytywny wynik klonowania (wszystkie kolonie zawierają wektor); b) próba kontrolna

Wyniki

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.6

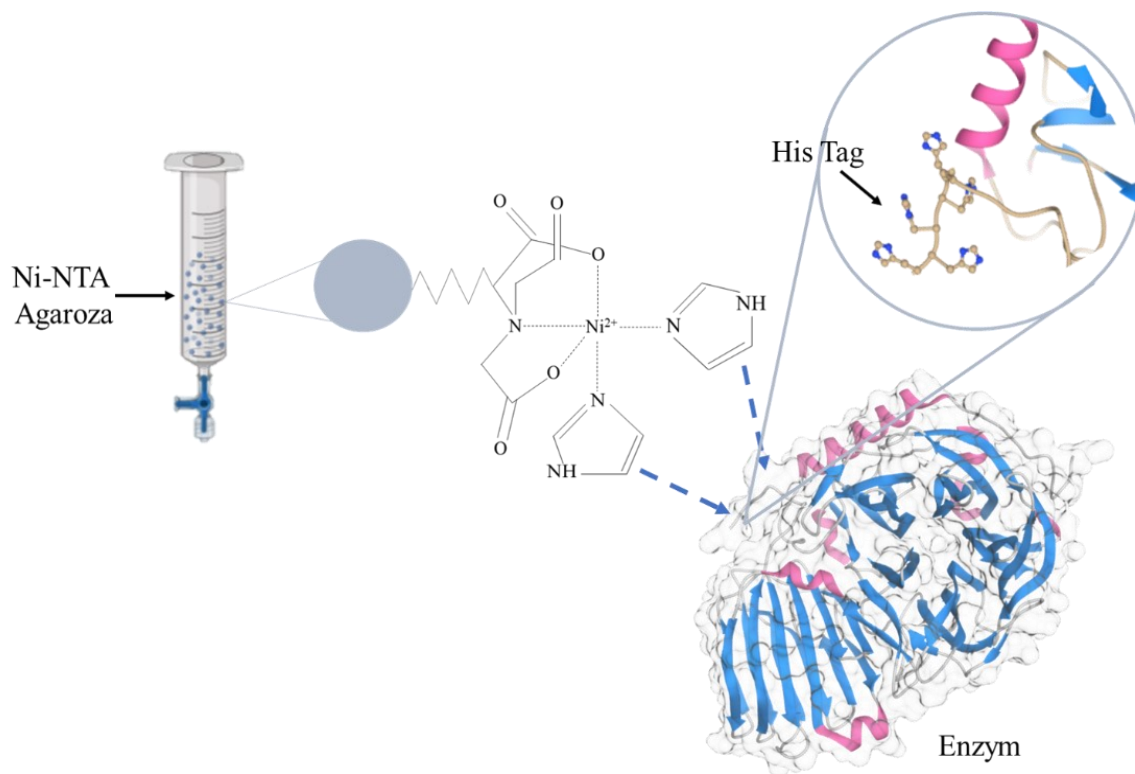
Otrzymywanie enzymów rekombinowanych – izolacja i oczyszczanie

Cel

Oczyszczanie rekombinowanej β -D-fruktofuranozydazy z *Bifidobacterium breve* za pomocą metody chromatografii metalopowinowactwa.

Wprowadzenie

Wykorzystanie na szeroką skalę białek rekombinowanych w przemyśle zmusiło do opracowania szybkiej i taniej metody ich oczyszczania, czyli **chromatografii powinowactwa** (IMAC, ang. *immobilized metal affinity chromatography*). Jest to szczególny rodzaj chromatografii polegający na koordynacyjnym wiązaniu białek i jonów metali przejściowych (np. Ni^{2+} , Co^{2+}), które zostają unieruchomione na złożu. Białko wiąże się ze złożem za pomocą znacznika, jakim jest metka polihistydynowa (His-tag). Jest to sekwencja peptydowa dołączana do końca N- lub C- terminalnego rekombinowanego białka zbudowana z 2–10 reszt histydyny (ryc. 12.4).



Ryc. 12.4. Schemat wiązania rekombinowanego enzymu ze złożem Ni-NTA wykorzystywanych w chromatografii metalopowinowactwa (IMAC)

Materialy

Stałe i płynne podłoże LB; kolba o poj. 1 l; kanamycyna (50 mg/ml); pipety; tipsy; probówki typu Falcon; wytrząsarka laboratoryjna; inkubator; 1-molowy IPTG (izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd); wirówka; sonifikator; imidazol; NaCl; Tris-HCl; glicerol; woda destylowana; mikropłytki 96-dołkowe; czytnik mikropłytek; kolumna ze złożem Ni-NTA agarosa

Mikroorganizmy

E. coli BL-21 (DE3).

Przebieg doświadczenia

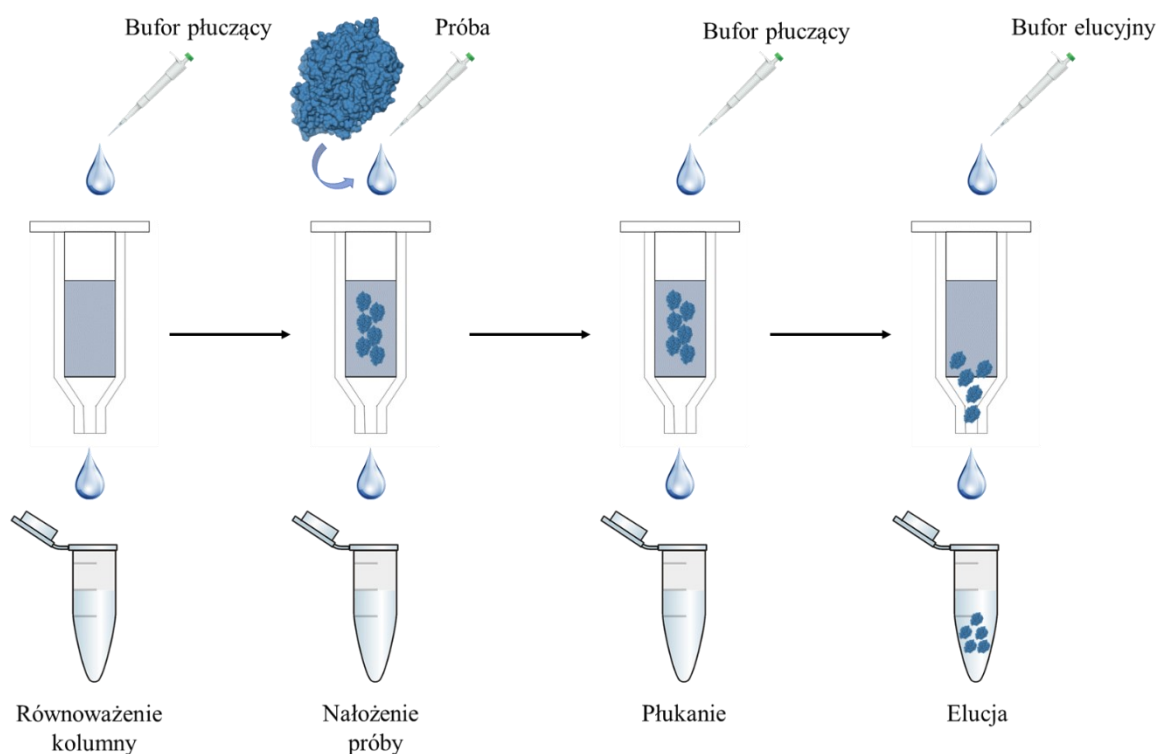
1. Zamrożone komórki *E. coli* BL-21 (DE3) z wektorem ekspresyjnym wysiać na stałe podłoże LB z dodatkiem kanamycyny (50 μ g/ml); inkubować w temp. 37°C.
2. Zainokulować 5 ml medium LB+Kan jedną kolonią otrzymaną na podłożu stałym.
3. Po nocnej inkubacji przenieść 1 ml hodowli do 500 ml medium LB z kanamycyną i inkubować w temp. 37°C z wytrząsaniem (200 rpm) do momentu osiągnięcia gęstości optycznej równej ok. 0,6–0,8.
4. Następnie dodać 500 μ l 1-molowego IPTG (0,238g/10 ml dH₂O).
5. Prowadzić dalej hodowlę w temp. 37°C z wytrząsaniem (200 rpm) przez ok. 3–4 godziny.
6. Przenieść hodowlę do temp. 18°C i inkubować przez noc z wytrząsaniem (200 rpm).
7. Przygotować bufory do oczyszczania białka według danych podanych w tabeli 12.6.

Tabela 12.6. Skład buforów niezbędnych do oczyszczania rekombinowanej beta-D-fruktofuranozydazy

	Składniki	Ilość na 1 l
Bufor lizujący	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	6 g
	300 mM NaCl	17,5 g
	10% glicerol	100 ml
Bufor płuczający	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)	2,4 g
	300 mM NaCl	17,5 g
	20 mM imidazol	0,272 g
	10% glicerol	100 ml
Bufor elucyjny	20 mM Tris-HCl (pH 8,0)	2,4 g
	300 mM NaCl	17,5 g
	250 mM imidazol	17 g
	10% glicerol	100 ml

1. Następnego dnia hodowlę odwirować w temp. 4°C przy 5000 rpm.
2. Otrzymany pelet zważyć i rozpuścić w buforze lizującym.
3. Komórki poddać lizie w wykorzystaniu ultradźwięków.
4. Próbkę odwirować na maksymalnych obrotach w temp. 4°C.
5. Otrzymany supernatant nanieść na kolumnę ze złożem niklowym, wcześniej równoważonym poprzez przepłukanie buforem płuczającym.

6. Po związaniu białka z kolumną przepłukać ją 3-krotnie 1 ml buforu płuczącego.
7. Następnie dokonać elucji białka buforem elucyjnym (ryc. 12.5).
8. Zmierzyć stężenie białka i aktywność otrzymanego enzymu metodami przedstawionymi przez prowadzącego zajęcia.
9. Sprawdzić czystość enzymu metodą SDS-PAGE zgodnie z metodyką przedstawioną przez prowadzącego zajęcia.
10. Rekombinowany enzym połączyć z glicerolem w stosunku 1 : 1 i przechowywać w temp. -25°C do momentu wykonywania dalszych analiz.



Ryc. 12.5. Etapy procesu oczyszczania rekombinowanej beta-D-fruktofuranozydazy z *Bifidobacterium* sp. metodą chromatografii metalopowinowactwa (IMAC)

Wyniki

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.7

Sieciowanie enzymów w połączeniu z nanocząstkami o właściwościach magnetycznych

Cel

Synteza magnetycznych sieciowanych agregatów glukoamylazy z *Aspergillus niger*.

Wprowadzenie

Obecnie coraz większe znaczenie zyskują **sieciowane agregaty enzymatyczne** (ang. CLEA) jako alternatywa dla konwencyjnych metod unieruchomienia enzymów opierających się na różnego rodzaju nośnikach pochodzenia naturalnego lub syntetycznych. Synteza CLEA jest zwykle łatwiejsza i co ważne warunki procesu są o wiele bardziej delikatne dla struktury enzymu. Metoda ta również jest stosunkowo tania, a proces przygotowania preparatu składa się z 2 etapów. W pierwszym enzym ulega precypitacji w wyniku wprowadzenia do roztworu różnego rodzaju związków chemicznych, jak np. siarczan amonu, czy też rozpuszczalników organicznych, jak np. etanol czy aceton. W kolejnym etapie sieciuje się powstające aglomeraty różnego rodzaju substancjami, jak np. glutaraldehyd. Tego rodzaju rozwiązanie pozwala na wysoką koncentrację aktywności enzymów, poprawę ich parametrów katalitycznych, a także podniesienie stabilności operacyjnej w stosunku do wysokiej temperatury czy różnego rodzaju czynników chemicznych. CLEA można łączyć z materiałami wrażliwymi na pole magnetyczne, co zwiększa obszary ich zastosowania, ułatwiając również separacje (ryc. 12.6).

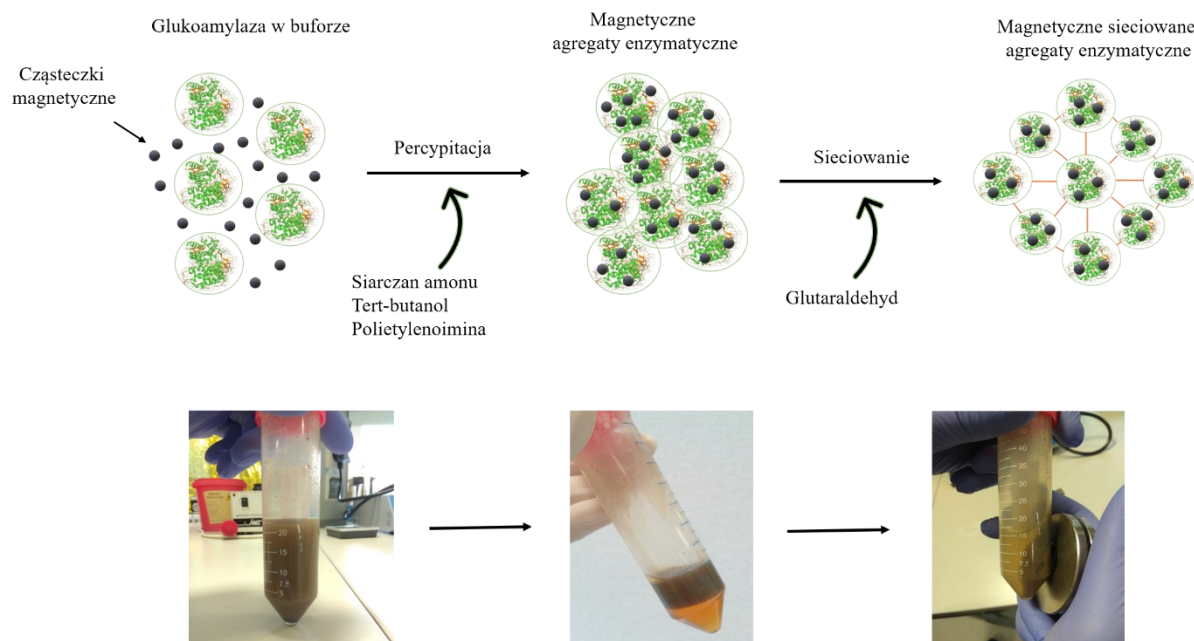
Materiały

Preparat enzymatyczny glukoamylazay; tert-butanol; siarczan amonu; 25-proc. (m/m) glutaraldehyd; 10-proc. (m/m) roztwór polietylenoiminy (Mw 75000) w 50-milimolowym buforze fosforanowym pH 7,0; Fe_3O_4 ; 50-milimolowy bufor fosforanowy, pH 7,0; 0,1-proc. (m/m) roztwór skrobi rozpuszczalnej w 50-milimolowym buforze octanowym pH 5,0; odczynnik do oznaczania stężenia glukozy metodą enzymatyczną (GOD); odczynnik Bradforda do oznaczenia stężenia białka; czytnik mikroplatek; łaźnia wodna lub cieplarka; separator magnetyczny.

Przebieg doświadczenia

1. Przygotować sieciowaną magnetyczną glukoamylazę (SMG):

- do 3 probówek typu Falcon o poj. 50 ml przenieść 15 ml preparatu enzymatycznego glukoamylazy o stężeniu białka 1 g/l; stężenie białka w wyjściowym preparacie oznaczyć zgodnie z metodyką podaną przez prowadzącego i w razie potrzeby rozcieńczyć buforem fosforanowym;
- następnie dodać 7,82 g siarczanu amonu i 50 mg Fe_3O_4 ; wymieszać energicznie do pełnego rozpuszczenia siarczanu amonu;
- do roztworu dodać polietylenoiminę do końcowego stężenia 0,5% (v/v) i wymieszać energicznie;
- do roztworu dodać glutaraldehyd do końcowego stężenia 1% (v/v) i wymieszać energicznie;
- następnie do mieszaniny dodać równą objętość tert-butanolu, zamieszać energicznie i przenieść do łaźni wodnej o temp. 25°C na 90 minut;
- probówki następnie przenieść do wirówki i wirować przez 10 minut przy prędkości 4000 rpm;
- po odwirowaniu bez naruszania uformowanego precypitatu za pomocą pipety automatycznej usunąć dolną i górną fazę;
- pozostały precypitat przepłukać 2-krotnie 20 ml buforu fosforanowego w 10-minutowych odstępach;
- otrzymany preparat SMG przechowywać w lodówce w temp. 4°C.



Ryc. 12.6. Schemat procesu przygotowania CLEA

2. Oznaczyć aktywność SMG:

- do probówki typu Eppendorf o poj. 2 ml przenieść 20 mg SMG;
- dodać 1 ml ogrzanego do temp. 30°C roztworu skrobi rozpuszczalnej i inkubować, mieszając okresowo przez 10 minut w łaźni wodnej lub cieplarni przez 10 minut;
- w czasie inkubacji do 8 celi mikropłytki przenieść 200 µl odczynnika (GOD);
- po inkubacji probówki przenieść na separator magnetyczny i przenieść 5 µl mieszaniny reakcyjnej do 4 kolejnych celi, do 2 następnych dodać 5 µl wzorca glukozy (5,5 µmol/ml);
- mikropłytkę inkubować przez 10 minut w cieplarni w temp. 30°C;
- następnie odczytać absorbancję przy 500 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek;
- następnie obliczyć aktywność SMG według równania:

$$\text{Aktywność SMG} * (U/g) = \frac{(((Abs_b - Abs_0)/(Abs_{wz} - Abs_0)) * 5,5 \mu\text{mol})}{\frac{10 \text{ min}}{\text{masa SMG w g}}}$$

Abs_b – absorbancja próby badanej, Abs_{wz} – absorbancja wzorca, Abs_0 – absorbancja próby odczynnikowej. * Jedna jednostka SMG (U) uwalnia 1 µmol glukozy w ciągu 1 minuty w 30°C i pH 5,0.

3. Przeanalizować stabilność operacyjną SMG – odporność na wielokrotne użycie:

- do probówki typu Eppendorf o poj. 2 ml przenieść 20 mg SMG;
- dodać 1 ml ogrzanego do temp. 30°C roztworu skrobi rozpuszczalnej i inkubować, mieszając okresowo przez 10 minut w łaźni wodnej lub cieplarni przez 10 minut;
- w czasie inkubacji do 8 celi mikropłytki przenieść 200 µl odczynnika (GOD);
- po inkubacji probówki przenieść na separator magnetyczny i po oddzieleniu SMG pobrać 5 µl mieszaniny reakcyjnej do 4 kolejnych celi, do 2 następnych dodać 5 µl wzorca glukozy (5,5 µmol/ml);
- mikropłytkę zakryć pokrywką i inkubować przez 10 minut w cieplarni w temp. 30°C;

- następnie odczytać absorbancje przy długości fali 500 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek;
- z probówki odebrać mieszaninę reakcyjną i dwukrotnie przepłukać SMG 1 ml buforu fosforanowego;
- następnie kroki od 2 do 7 powtórzyć 5-krotnie;
- po zakończonych oznaczeniach obliczyć aktywność SMG w kolejnych cyklach.

Wyniki

Na wykresie wyznaczyć zależność między kolejnymi cyklami a aktywnością SEM w jednostkach względnych, przyjmując aktywność SMG w pierwszym cyklu jako 100%.

.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 12.8

Immobilizacja enzymów na modyfikowanych magnetycznych mikrosferach alginianowych

Cel

Immobilizacja beta-D-fruktofuranozydazy z *Saccharomyces cerevisiae* w mikrosferach alginianowych o właściwościach magnetycznych.

Wprowadzenie

Spośród wielu możliwych metod immobilizacji **pułapkowanie** w różnego rodzaju polimerach naturalnych i syntetycznych jest szeroko stosowaną metodą pozwalającą na szybkie i efektywne unieruchamianie różnego rodzaju enzymów. W metodzie tej istotnym czynnikiem jest struktura i wymiary nośnika mające wpływ na łatwość tzw. wycieku enzymów, a także proces wymiany masy, wpływający niekorzystnie na parametry katalityczne unieruchomionego biokatalizatora. Niektóre z polimerów szeroko stosowanych w tej metodzie immobilizacji, jak np. **alginian**, nie wiążą wydajnie enzymów, co można zmodyfikować, wprowadzając do struktury nośnika np. karboksymetylocelulozę, która zawiera grupy $\text{CH}_2\text{-COOH}$. Dzięki tej właściwości polimer ten poprzez wiązania jonowe ze specyficznymi resztami obecnymi na powierzchni enzymu pozwala na zwiększanie stabilności operacyjnej enzymu i ograniczenie jego utraty sprawności układu podczas wielokrotnego użycia. Immobilizacja może również modyfikować parametry enzymów jak ich optimum pH czy temperaturowe, co jest następstwem oddziaływań między nośnikiem a strukturą enzymu.

Materialy

4-proc. (m/m) roztwór alginianu sodu w buforze octanowym pH 5,0; karboksymetyloceluloza (CMC); alkohol izoamylowy; Fe_3O_4 ; 5-proc. (m/m) wodny roztwór chlorku wapnia; bufor octanowy pH 5,0 z 0,1-proc. (m/m) chlorkiem wapnia; 180-milimolowy roztwór sacharozy w buforze octanowym pH 5,0 z dodatkiem 0,1-proc. (m/m) chlorku wapnia; preparat enzymatyczny beta-D-fruktofuranozydazy (inwertazy) w buforze fosforanowym 50 mM, pH 7,0; odczynnik do oznaczania glukozy (GOD).

Przebieg doświadczenia

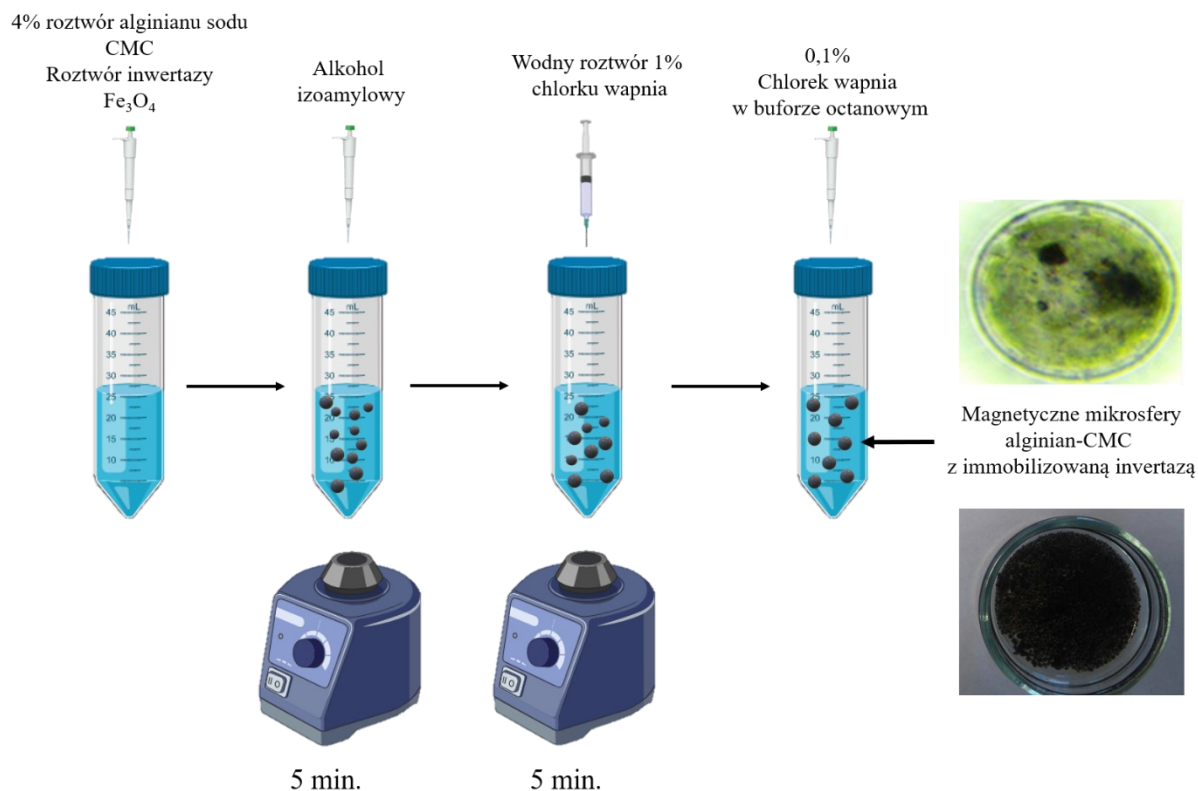
- Otrzymać modyfikowane mikrosfery alginianowe z immobilizowaną inwertazą (**IMA**):
 - do probówki typu Falcon o poj. 50 ml przenieść 10 mg CMC i 2 ml roztworu alginianu sodu, zamieszać energicznie i odczekać 15 minut;
 - następnie dodać 0,1 ml preparatu enzymatycznego i mieszać na mieszadło rolkowym przez 15 minut;
 - następnie dodać 50 mg Fe₃O₄ i wymieszać energicznie;
 - następnie dodać 8 ml alkoholu izoamylowego;
 - do strzykawki pobrać 8 ml roztworu chlorku wapnia;
 - na strzykawkę nałożyć igłę i przebić wieczko probówki (**ostrożnie, nie wkraplając roztworu chlorku wapnia!**);
 - wytrząsać układ z wykorzystaniem wortexu przez 5 minut;
 - następnie **nie przerywając** wytrząsania, powoli wkraplać roztwór chlorku wapnia przez kolejne 5 minut;
 - uformowane mikrosfery zebrać za pomocą magnesu i przepłukać 2-krotnie buforem octanowym z dodatkiem 0,1-proc. chlorku wapnia;
 - preparat przechowywać w lodówce w temp. 4°C;
 - wykonać preparat mikroskopowy i ocenić morfologię nośnika wraz z enzymem (ryc. 12.7).
- Oznaczyć aktywność immobilizowanego i wolnego enzymu:
 - do probówki typu Eppendorf o poj. 2 ml przenieść 20 mg **IMA** lub 20 µl roztworu wolnego enzymu;
 - dodać 1 ml ogrzanego do 30°C roztworu sacharozy w buforze octanowym i inkubować, mieszając okresowo przez 10 minut w łaźni wodnej lub cieplarni przez 10 minut;
 - w czasie inkubacji do 8 celi mikropłytki przenieść 200 µl odczynnika (GOD);
 - po inkubacji probówki przenieść na separator magnetyczny i przenieść 5 µl mieszaniny reakcyjnej do 4 kolejnych celi, do 2 następnych dodać 5 µl wzorca glukozy (5,5 µmol/ml);
 - mikropłytkę inkubować przez 10 minut w cieplarni w temp. 30°C;
 - następnie odczytać absorbancję przy 500 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek;
 - następnie obliczyć aktywność IMA lub wolnego enzymu według równania:

$$\text{Aktywność IMA} * (U/g) = \frac{(((Abs_b - Abs_0)/(Abs_{wz} - Abs_0)) * 5,5 \mu\text{mol})}{\frac{10 \text{ min}}{** \text{ masa IMA w g}}}$$

Abs_b – absorbancja próby badanej, Abs_{wz} – absorbancja wzorca, Abs₀ – absorbancja próby odczynnikowej.

* Jedna jednostka IMA lub wolnej inwertazy (U) uwalnia 1 µmol glukozy w ciągu 1 minuty w 30°C i pH 5.0.

** W przypadku wolnego enzymu jako masę do równania podstawić wartość ilości białka znajdującego się w objętości próby pobranej do oznaczenia.



Ryc. 12.7. Schemat procesu otrzymywania inwertazy immobilizowanej na magnetycznych sferach alginian-CMC

3. Wyznaczyć optimum temperaturowe **IMA**:

- przygotować kolejne 12 plastikowych probówek typu Eppendorf i opisać wg schematu podanego w tabeli 12.7;
- do 6 probówek przenieść 20 mg IMA (**próby badane**);
- przed dodaniem do probówki IMA substrat preinkubować przez 5 minut w odpowiedniej temperaturze zgodnie z warunkami podanymi w tabeli 12.7;
- w czasie inkubacji do 8 celi mikropłytki przenieść 200 μl odczynnika (GOD);
- po inkubacji probówki umieścić w separatorze magnetycznym i przenieść 5 μl mieszaniny reakcyjnej do 4 kolejnych celi, do 2 następnych dodać 5 μl wzorca glukozy (5,5 $\mu\text{mol/ml}$);
- mikropłytkę zakryć pokrywką i inkubować 10 minut w cieplarni w temp. 30°C;
- następnie odczytać absorbancję przy 500 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek;
- czynność powtórzyć dla kolejnych temperatur;
- następnie obliczyć aktywność IMA i wolnego enzymu według równania powyżej i zanotować w tabeli wyników;
- optimum temperaturowe formy wolnej enzymu wyznaczyć w identyczny sposób jak enzymu immobilizowanego.

Tabela 12.7. Skład mieszaniny reakcyjnej do wyznaczania optimum temperaturowego wolnej i immobilizowanej inwertazy

	Temperatura											
	4°C		20°C		40°C		60°C		80°C		100°C	
	Probówka											
	T ₁	T ₁ ⁰	T ₂	T ₂ ⁰	T ₃	T ₃ ⁰	T ₄	T ₄ ⁰	T ₅	T ₅ ⁰	T ₆	T ₆ ⁰
Substrat (μl)	1000											
Wolny enzym (μl)	20	–	20	–	20	–	20	–	20	–	20	–
IMA (mg)	20	–	20	–	20	–	20	–	20	–	20	–
Wyniki												
Aktywność enzymu wolnego U/mg												
Aktywność IMA U/g												

Wyniki

1. Na wykresie wyznaczyć zależność pomiędzy temperaturą a aktywnością immobilizowanego i wolnego enzymu.
2. Aktywność enzymu wyrazić w %, gdzie 100% aktywności należy przyjąć dla wartości temperatury, w której uzyskano najwyższą wartość aktywności.

.....

.....

.....

.....

.....

Piśmiennictwo

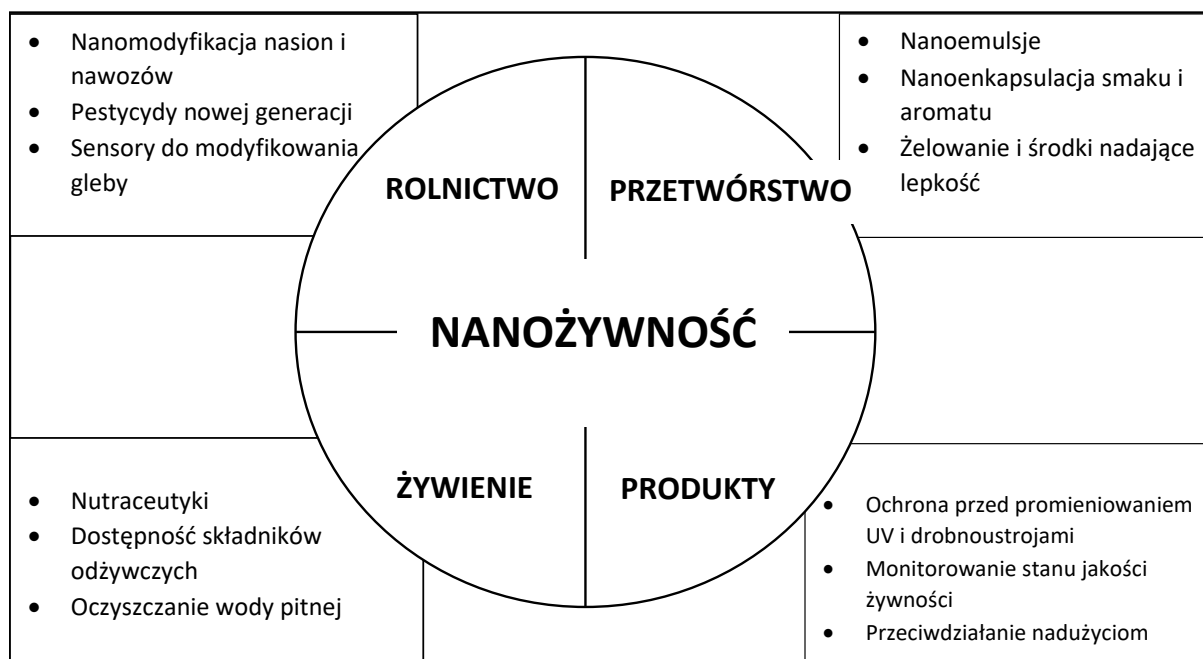
- Guimarães J.R., Giordano R.L., Fernandez-Lafuente R., Tardioli P.W. 2018. Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine pancreas lipase with magnetic properties. *Molecules* 23 (11), 2993.
- Li C., Wen A., Shen B., Lu J., Huang Y., Chang Y. 2011. FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnology* 11, 92.
- Liu W., Wang L., Jiang R. 2012. Specific enzyme immobilization approaches and their application with nanomaterials. *Topics in Catalysis* 55, 1146–1156.
- Motohaski K. 2015. A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnology* 15, 47.
- Okegawa Y., Motohashi K. 2015. Evaluation of seamless ligation cloning extract preparation methods from an *Escherichia coli* laboratory strain. *Analytical Biochemistry* 486, 51–53.
- Sheldon R.A. 2011. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (3), 467–477.
- Zhang Y., Werling U., Edelmann W. 2012. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNAcloning method. *Nucleic Acids Research* 2012, 1–10.

13. NANOTECHNOLOGIA W PRZEMYŚLE ROLNO-SPOŻYWCZYM

Anita Kołodziej-Skalska

Nanotechnologia jest obecnie najszybciej rozwijającą się interdyscyplinarną dziedziną nauki. Łączy w sobie takie dziedziny, jak: fizyka, chemia, biologia, biotechnologia, medycyna, farmacja, informatyka czy inżynieria. Jedną z głównych przyczyn tak dużego zainteresowania nanotechnologią jest to, że odnosi się ona do materiałów na poziomie molekularnym, w którym często charakteryzują się one właściwościami diametralnie innymi niż w normalnym rozmiarze.

Nanotechnologia będzie miała wpływ na cały proces produkcji żywności (od wytwórcy do konsumenta), na utrwalanie produktów, poprawę ich cech organoleptycznych, zachowanie jakości i bezpieczeństwa oraz na właściwości opakowań do żywności (ryc. 13.1). Zastosowanie nanotechnologii w produkcji żywności jest przedsięwzięciem nowym w porównaniu z jej aplikacjami m.in. w medycynie, farmaceutyce i elektronice. Ze względów ekonomicznych jej wdrażanie w przemyśle spożywczym jest dużo wolniejsze niż np. w przemyśle zbrojeniowym.



Ryc. 13.1. Wybrane zastosowania nanotechnologii w przemyśle spożywczym (wg Głód i in., 2014)

Rolnictwo zapewnia żywność ludziom, bezpośrednio i pośrednio. Wraz ze wzrostem liczby ludności na świecie konieczne staje się stosowanie w naukach rolniczych nowoczesnych technologii, takich jak bio- i nanotechnologie. Nanotechnologia zrewolucjonizuje rolnictwo i przemysł spożywczy dzięki m.in.: precyzyjnym technikom rolniczym, zwiększającym zdolność roślin do wchłaniania składników odżywczych, bardziej wydajnemu i ukierunkowanemu wykorzystaniu środków produkcji, wykrywaniu i zwalczaniu chorób, wytrzymywaniu presji środo-

wiskowych i skutecznym systemom przetwarzania, przechowywania i pakowania. Nanotechnologia umożliwiła wprowadzenie do upraw nowych potencjalnie skutecznych pestycydów, regulatorów wzrostu roślin i chemicznych nawozów.

Ćwiczenie 13.1

Produkcja nowych, bezpiecznych środków ochrony roślin z wykorzystaniem nanocząsteczek

Cel

1. Zapoznanie się z istniejącymi na rynku krajowym środkami ochrony roślin, które wytworzone zostały na bazie nanocząsteczek srebra, miedzi i tytanu. Zadaniem jest wyszukanie dostępnych na rynku preparatów ochrony roślin wytworzonych na bazie nanocząsteczek.
2. Wyszukanie i przedstawienie wybranego preparatu służącego do ochrony roślin wytworzonego na bazie nanocząsteczek, omówienie jego składu i zastosowania w ochronie roślin oraz sposobu dawkowania.
3. Omówienie właściwości nanomateriałów, na bazie których zostały wytworzone środki ochrony roślin.
4. Wyciągnięcie wniosków dotyczących zastosowania nanopestycydów.

Wprowadzenie

Wciąż poznawane są nowe zastosowania nanotechnologii w rolnictwie, w którym nanomateriały służą jako nośniki chemicznych środków ochrony roślin, a także jako substancje aktywne pestycydów.

Obecnie szczególnie dużym zainteresowaniem cieszy się **nanosrebro**, wykazujące silne właściwości antyseptyczne. Stąd też jego duża skuteczność w walce z bakteriami, grzybami, drożdżami czy wirusami. **Nanosrebro** to mikroskopijnej wielkości cząsteczki w postaci jonów, które można dostrzec jedynie za pomocą mikroskopu elektronowego. Takie rozdrobnienie cząsteczek sprawia, że wzrasta skuteczność właściwości bakteriobójczych, grzybobójczych i wirusobójczych srebra. Nanosrebro ma większą powierzchnię czynną, tym samym wzrasta jego potencjał biobójczy. Nieczęsto na rynku pojawiają się ciekawe produkty poprawiające jakość plonu i stymulujące naturalną odporność roślin, które wykorzystują nowe technologie. Bez wątpienia należą do nich innowacyjne preparaty zawierające nanocząsteczki srebra czy chitozan srebra, a także nanocząsteczki miedzi.

Chitozan srebra służy do zabezpieczania ran na drzewach i krzewach. Chitozan to substancja stymulująca mechanizmy obronne roślin przeciw wielu grzybom chorobotwórczym. Biokompatybilność chitozanu z żywymi komórkami umożliwia tworzenie się na powierzchni kory specjalnej powłoki (tzw. filmu), która chroni lub zastępuje fizjologiczną powłokę kory.

Nanocząstki miedzi charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną względem mikroorganizmów i szerokim zakresem działania. W związku z dużym stosunkiem powierzchni do objętości na pierwszy plan wysuwają się ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Nanocząstki miedzi wykazują szerokie spektrum aktywności biobójczej względem bakterii, wirusów i grzybów oraz alg. Dotychczasowe wyniki badań potwierdzają silne biobójcze działanie preparatów tworzonych na bazie związków miedzi.

Nanocząstki efektywnie przedostają się przez ścianę komórkową drobnoustrojów, wpływając na ich funkcjonowanie m.in. poprzez upośledzanie wymiany jonowej między środowiskiem a komórką, łącząc się trwale z białkami cyklu oddechowego oraz zaburzając przekazywanie informacji genetycznej. Niski koszt ich produkcji oraz łatwość nanoszenia na różnego rodzaju powierzchnie umożliwiają wszechstronne zastosowanie.

Występują 3 podstawowe metody pozyskiwania nanocząstek: fizyczna, chemiczna i biologiczna. Pierwsza z nich w bezpiecznym stopniu pozwala na uzyskanie jednorodnego i wolnego od dodatków preparatu. To bardzo istotne, ponieważ niejednorodności składu i dodatkowe sub-

stancje są najczęściej źródłem niepożądanych działań. Dla bezpiecznego stosowania nanocząstek ważny jest zarówno brak obecności jonów danego metalu, jak i jednorodność rozmiaru, gdyż te parametry przekładają się na właściwości preparatu.

Zielone metody syntezy nanocząstek z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych są korzystne, ponieważ są proste, wygodne, przyjazne dla środowiska i wymagają krótszego czasu reakcji. Nanomateriały przygotowane metodami ekologicznymi mogą zwiększyć potencjał rolnictwa w zakresie poprawy procesu nawożenia, wzrostu roślin i pestycydów. Ponadto technologia ta minimalizuje ilość szkodliwych chemikaliów, które zanieczyszczają środowisko.

Materiały

Wyszukane w zasobach internetowych przykłady środków ochrony roślin wytworzonych np. na bazie **nanosrebra** lub **nanomiedzi**.

Przebieg doświadczenia

Grupa ćwiczeniowa podzielona na zespoły 2-osobowe

1. Omówić problem wykorzystania nanomateriałów w ochronie roślin.
2. Przedstawić przykład środka ochrony roślin wytworzonego na bazie nanomateriałów.
3. Wybrane przykłady zapisać w formie tabelarycznej (tab. 13.1) i przeanalizować wspólnie w grupie ćwiczeniowej.
4. Podzielić i porównać środki ochrony roślin wytworzone z wykorzystaniem nanomateriałów pod względem sposobu działania.

Tabela 13.1. Zestawienie wybranych przykładów środków ochrony roślin wykorzystujących nanomateriały

Przykład środka ochrony roślin	Zastosowany nanomateriał	Zakres działania	Sposób dawkowania
	nanocząsteczki miedzi		
	chitozan srebra		

Wyniki

1. Omówić sposób działania analizowanych nanomateriałów wykorzystywanych w środkach ochrony roślin.
2. Wyciągnąć wnioski dotyczące rodzajów użytych nanomateriałów, sposobu ich stosowania, docelowego działania, dawkowania (ilość i częstotliwość) oraz kosztów użytkowania (jeżeli są dostępne).

Piśmiennictwo

- Głód D., Adamczak M., Bednarski W. 2014. Wybrane aspekty zastosowania nanotechnologii w produkcji żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 5 (96), 36–52.
- Kędziora A., Sobik K. 2013. Oporność bakterii na nanosrebro – problem stary czy nowy? *Kosmos* 301, 62, 557–570.
- Matysiak M., Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak L. 2018. Nanopestycydy – jasna czy ciemna strona mocy. *Medycyna Pracy* 68 (3), 423–432.
- Prasad R., Bhattacharyya A., Nguyen Q.D. 2017. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in Microbiology* 20 (8), 1014.
- Tomasik P. 2016. *Nanotechnologia żywności*. Kraków: Krakowska Wyższa Szkoła Promocji Zdrowia, https://issuu.com/kwspz/docs/nanotech_przyg_do_druku2.

14. WAŻNIEJSZE POJĘCIA

Bakteriofag (fag) – wirus specyficzny względem komórek bakteryjnych, którego zakres infekcyjny najczęściej obejmuje określony gatunek bakterii, a w niektórych przypadkach nawet konkretne szczepy.

Biozgodność – zdolność prawidłowego zachowania materiału w kontakcie z tkanką w określonym zastosowaniu.

Chromatografia powinowactwa – szczególny rodzaj chromatografii, polegający na koordynacyjnym wiązaniu białek i jonów metali przejściowych (np. Ni^{2+} , Co^{2+}), które zostają unieruchomione na złożu.

Dwukierunkowa elektrotroforeza żelowa – jedna z technik molekularnych umożliwiająca jednoczesny rozdział i/lub frakcjonowanie złożonej mieszaniny białek oraz peptydów występujących w szerokim zakresie stężeń w danym materiale biologicznym.

Katalizator – substancja, która może promować reakcję krzyżowego sieciowania poprzez przyspieszanie zachodzących procesów (np. tworzenie bezwodnika kwasowego) i umożliwianie tym reakcjom zajście w niższych temperaturach.

MALDI TOF – technika umożliwiająca analizę substancji wysokocząsteczkowych, wymagająca zastosowania matrycy jako głównego medium pochłaniającego energię lasera i przekazującego ją dalej cząsteczkom badanej próby.

Nanobioinżynieria – obszar badawczy o charakterze interdyscyplinarnym, leżący na styku biotechnologii i nanotechnologii, wykorzystujący nowoczesne technologie, urządzenia i aparaturę badawczą oraz metody biologii i chemii doświadczalnej, a ponadto praktyczne zastosowanie wiedzy z zakresu fizyki, inżynierii chemicznej, inżynierii materiałowej, biochemii, fizjologii, mikrobiologii, wirusologii, biologii komórki, genetyki molekularnej, inżynierii genetycznej, proteomiki, kultur *in vitro* i informatyki, jak również pracę eksperymentalną z użyciem materiału biologicznego w ujęciu nanotechnologicznym, która umożliwia tworzenie nowych rozwiązań technologicznych i przemysłowych.

Nanomaterial – naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony, materiał zawierający cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma jeden wymiar lub więcej wymiarów w zakresie 1–100 nm (z zastrzeżeniem, że górna granica jest powszechnie stosowana).

Nanostrącanie – proces porównywalny do emulgowania, którym można wytworzyć nanocząstki o małych rozmiarach, pożądaných w zastosowaniach medycznych, polegający na zmieszaniu roztworu polimeru z rozpuszczalnikiem (środkiem strącającym), w którym polimer się nie rozpuszcza.

Nanotechnologia – interdyscyplinarna nauka scalająca osiągnięcia z dziedziny chemii, fizyki, informatyki i biotechnologii, stwarzająca nowe możliwości badawczo-rozwojowe zmierzające do sterowania strukturą materii na poziomie pojedynczych atomów i molekuł. Obejmuje wszystkie metody i techniki, które umożliwiają zarówno projektowanie, tworzenie, jak i stosowanie obiektów, w których przynajmniej jeden z kontrolowanych wymiarów jest wyrażony w skali nano, czyli w umownym zakresie 1–100 nm.

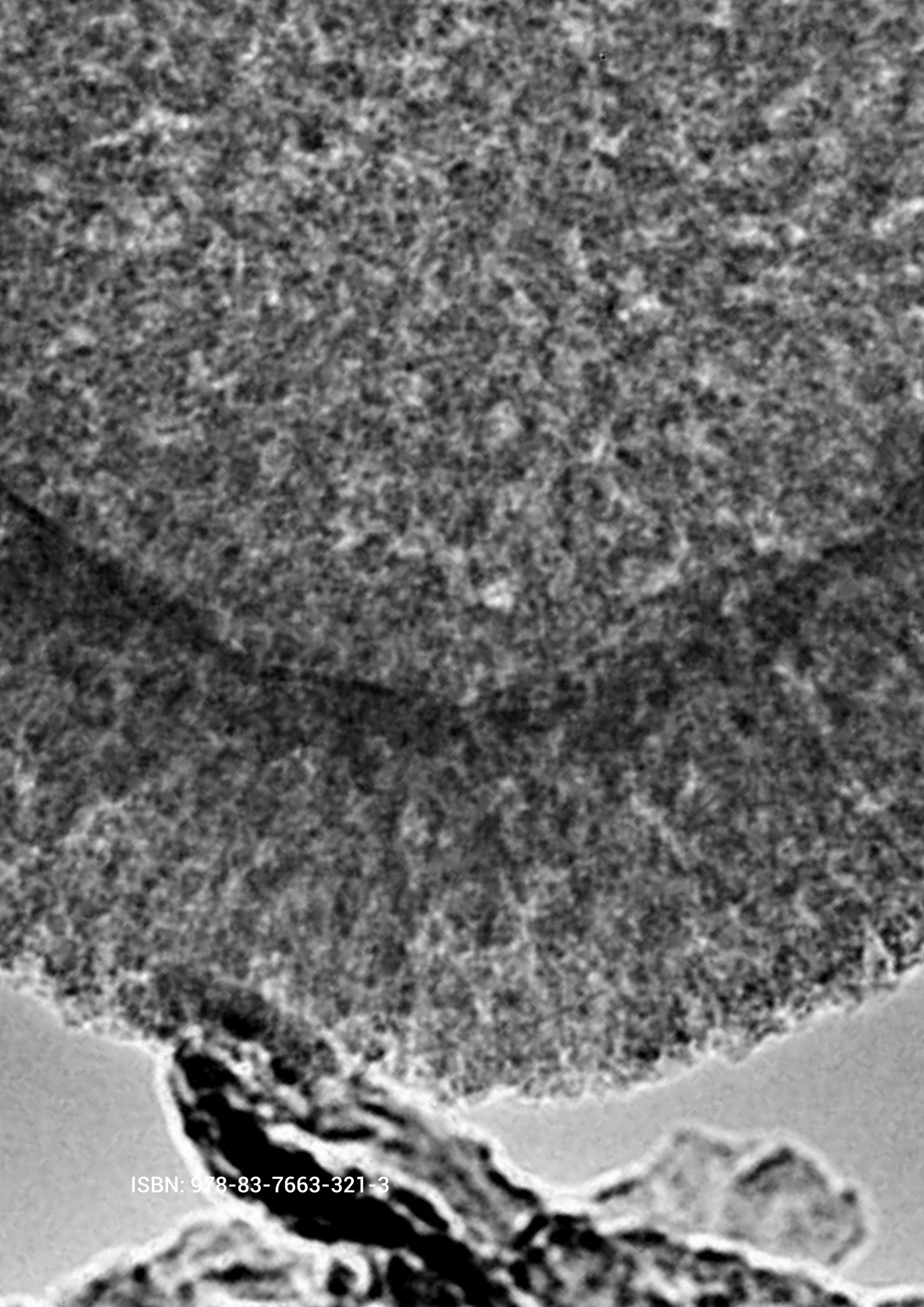
Proteom – skład białkowy danego systemu biologicznego ulegający nieustannym zmianom w odpowiedzi na czynniki wewnątrz- i zewnątrzustrojowe.

SLiCE (ang. *seamless ligation cloning extract*) – nowoczesna metoda wykorzystywana w klonowaniu molekularnym, która polega na wykorzystaniu ekstraktów ze szczepów *E. coli*, posiadających system rekombinacyjny Red bakteriofaga λ .

Spektrometria mas – metoda wykorzystywana w badaniach klinicznych i biologicznych, biochemicznych, umożliwiającą szczegółową analizę składników w mieszaninie, a także uzyskanie informacji o strukturze I-rzędowej białek i modyfikacjach potranslacyjnych.

Western blot – metoda badawcza umożliwiająca identyfikację i analizę ekspresji określonych białek w złożonej mieszaninie wielu protein.

Zielona chemia – ogół działań, w których kładzie się nacisk na procesy prowadzone w sposób zbliżony do naturalnego i ze zredukowaną ilością toksycznych odpadów powstających wskutek produkcji.



ISBN: 978-83-7663-321-3