



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Katja Repnik, Uroš Potočnik

BIOKEMIJA IN MOLEKULARNA BIOLOGIJA

Navodila za laboratorijske vaje

Maribor, 2013/2014

DELO IN VARNOST V LABORATORIJU

Osnovna pravila varnega dela v laboratoriju

- V laboratorij ne nosimo pijače in hrane.
- Pred pričetkom dela se ustrezno zavarujemo z osebno varnostno opremo (zaščitna halja, zaščitna očala, zaščitne rokavice).
- Dolge lase povežemo v čop.
- Delovni prostor pred izvedbo poskusa očistimo.
- Pred izvajanjem poskusov proučimo osnovne lastnosti kemikalij (strupenost, vnetljivost - nalepka na steklenici oz. varnostni list), ki jih bomo uporabljali.
- Zdravju škodljive hlapne snovi vedno prelivamo v digestoriju.
- Tekočine pipetiramo z nastavkom.
- Odpadkov ne zlivamo v pomivalna korita ali smetišča, ampak jih ločeno zbiramo v zaprtih, označenih posodah.
- Z aparaturami je potrebno ravnati v skladu z navodili in pod nadzorom asistenta oziroma tehničnega sodelavca.
- Pri nesrečah moramo kolikor je mogoče, nuditi prvo pomoč.
- Po končanem delu si umijemo roke.

Posebni varnostni ukrepi za namen izvajanja vaje

- Preberi navodila za ustrezno laboratorijsko vajo, preden prideš na vajo!
- Pri delu z biološkim materialom je potrebno OBVEZNO nositi zaščitno haljo in rokavice. Uporabljalj tudi prijemalke in očala.
- Označite svoje eksperimente z imenom, datumom.
- Napravite si natančne zapiske postopkov in rezultatov. Po opravljeni vaji je potrebno oddati poročilo.
- Pozorno opazuj demonstracije.
- Z opremo ravnaj previdno, v skladu z navodili, ne izvajaj nikakršnih postopkov na silo.
- Preden zapustiš laboratorij pospravi in očisti površino, preveri ali je zaprt dovod plina.
- V laboratoriju ne jej in ne pij, pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnik, peresa, steklovina itd.).
- Uporabljalj aseptično tehniko, pred in po začetku dela si razkuži roke.
- Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje. Dolgi lasje morajo biti speti.
- Med delom z mikrobi in kužnino so vrata in okna zaprta, da zračni tok ne nosi mikrobov po laboratoriju.
- Pri delu pazimo, da mikrobnih kultur ne polivamo po mizi, po tleh in obleki. Z rokami se ne dotikamo kolonij in suspenzij živih mikrobov. Če pride kužnina v stik s kožo ali delavno površino, obvestimo asistenta ali tehničnega sodelavca.

Laboratorijske vaje iz Biokemije in Molekularne biologije

- Kontaminirano delovno površino pokrijemo s staničevino in jo prelijemo z razkužilom. Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
- Kontaminiran material odlagamo v odlagalnike ali na za to označeno mesto in ga nato avtoklaviramo.
- Kovinske predmete, ki pridejo v stik s kužino (pincete, bakteriološke zanke itd.) sproti ožigamo v plamenu. Ožigamo tudi vratove epruvet, erlenmajeric in steklenic z mikrobi, preden jih odpremo in po uporabi.
- Delovni prostor je potrebno pred in po delu obvezno razkužiti (razkužilo, 5% natrijev hipoklorit, etanol).
- Ostanke biološkega materiala je potrebno odlagati v posebej za to namenjene odlagalnike (rdečke vrečke, primerne za avtoklaviranje) ter jih po končanem delu takoj odvreči v rumen zabojnik.
- Raztopino etidijevga bromida lahko pripravlja le usposobljen raziskovalec oz. tehnični sodelavec. Delo z etidijevim bromidom poteka le v digestoriju.
- Agarozne gele vedno prenašamo v za to namenjeni banjici, gele po končani analizi vedno odvržemo v rumen zabojnik. Delovno površino, kjer se izvaja elektroforeza, ter transiluminator, redno čistimo s 75 % etanolom.
- Pri delu z UV transiluminatorjem je potrebno vedno uporabljati zaščitni pokrov.
- Z rokavicami, se je prepovedano dotikati kljuk na vratih oz. površin, s katerimi so v stiku ostali prisotni v laboratoriju.
- Nevarne kemikalije so skladiščimo v ognjevarni omari, ki se nahaja pod digestorijem.
- Oprema za prvo pomoč se nahaja na vidnem mestu nad umivalnikom.
- Ob izrednih dogodkih (požar, razlitje kemikalij, vlom ter ostale nesreče), je potrebno takoj poklicati odgovorne osebe. Seznam s telefonskimi številkami le-teh visi na oglasni deski.

NAVODILO ZA PRIPRAVO LABORATORIJSKEGA DNEVNIKA

Laboratorijski dnevnik mora vsebovati opis vsake vaje po naslednjih razdelkih:

1. UVOD
2. MATERIALI IN METODE
3. REZULTATI
4. DISKUSIJA

V **Uvodu** je potrebno na kratko opisati teoretske osnove, ki so potrebne za razumevanje vaje. Uvod mora obvezno vsebovati tudi namen in cilje vaje.

V razdelku **materiali in metode** so navedeni vsi uporabljeni materiali (kemikalije in laboratorijska oprema) ter opisani vsi postopki tako, da lahko vajo kdorkoli ponovi.

V **Rezultatih** so navedeni dobljeni rezultati (tabele, grafi...).

V **Diskusiji** so dobljeni rezultati razloženi, kaj pomenijo, kaj je iz njih razvidno.

Priznan dnevnik je pogoj za pristop na kolokvij iz vaj.

KAZALO

NAVODILO ZA PRIPRAVO LABORATORIJSKEGA DNEVNIKA	4
<u>1 KVALITATIVNE METODE ZA DOLOČEVANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV</u>	<u>7</u>
1.1 TEORETIČNE OSNOVE	7
1.1.1 OGLJIKOVI HIDRATI	7
1.1.2 METODE ZA DOLOČEVANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV	10
1.2 IZVEDBA VAJE	13
1.2.1 BARVNE REAKCIJE ZA DOLOČANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV	13
<u>2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV</u>	<u>15</u>
2.1 TEORETIČNE OSNOVE	15
2.1.1 PROTEINI	15
2.1.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	19
2.2 IZVEDBA VAJE	21
<u>3 HOMOGENIZACIJA IN EKSTRAKCIJA LIPIDOV IZ SVINJSKIH JETER TER DOKAZ PRISOTNOSTI HOLESTEROLA</u>	<u>22</u>
3.1 TEORETIČNE OSNOVE	22
3.1.1 LIPIDI	22
LIBERMAN BUCHARDOVA REAKCIJA	25
3.1.2 HOMOGENIZACIJA	25
3.1.3 EKSTRAKCIJA	26
3.2 IZVEDBA VAJE	28
<u>4 DOLOČANJE HOLESTEROLA Z LIEBERMAN BUCHARDOVO REAKCIJO</u>	<u>29</u>
4.1 IZVEDBA VAJE	29
<u>5 IZOLACIJA DNA IZ VZORCEV KRVI</u>	<u>30</u>
5.1 TEORETIČNE OSNOVE	30
5.1.1 NUKLEINSKE KISLINE	30
5.2 IZVEDBA VAJE	34
<u>6 PCR REAKCIJA IN GELSKA ELEKTROFOREZA (GENETSKI TEST ZA ODPORNOST NA AIDS)</u>	<u>36</u>

6.1	TEORETIČNE OSNOVE	36
6.1.1	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	36
6.1.2	RAČUNANJE KOLIČIN REAGENTOV POTREBNIH ZA USPEŠNO PCR REAKCIJO	38
6.1.3	GELSKA ELEKTROFOREZA	40
6.2	IZVEDBA VAJE	42
7	LABORATORIJSKE PREISKAVE V KLINIČNI HEMATOLOGIJI	43
7.1	TEORETIČNE OSNOVE	43
7.2	IZVEDBA VAJE	48
8	LITERATURA	50

1 KVALITATIVNE METODE ZA DOLOČEVANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV

1.1 TEORETIČNE OSNOVE

1.1.1 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati so najpogostejši polimeri v živi naravi. Sestavljajo jih samo 3 elementi: ogljik, vodik in kisik. Njihova splošna formula je $(C \cdot H_2O)_n$, pri čemer je $n \geq 3$. Ogljikovi hidrati vsebujejo številne hidroksilne skupine, ki omogočajo interakcije z vodnim okoljem ter tvorbo vodikovih vezi tako znotraj kot tudi med verigami. Derivati ogljikovih hidratov lahko vsebujejo dušikove, fosfatne in žveplove spojine. Ogljikovi hidrati se lahko z lipidi povezujejo v glikolipide, z beljakovinami pa v glikoproteine. Zaradi različnih funkcionalnih skupin lahko ogljikovi hidrati vstopajo v različne kemijske reakcije: alkiliranje (etri), aciliranje (estri), redukcije, oksidacije, hidroliza, nastanek glikozidov.

Ogljikovi hidrati nastajajo pri fotosintezi pri rastlinah, algah in cianobakterijah, pri živalih pa v procesu glukoneogeneze. Oksidativna razgradnja ogljikovih hidratov zagotavlja velik del energije za različne biološke procese. Nekateri ogljikovi hidrati (npr. glukoza, fruktoza) se lahko neposredno uporabijo kot metabolično gorivo, ogljikovi hidrati kot sta škrob in glikogen pa predstavljajo rezervne spojine v rastlinah in živalih. So prav tako pomembni kot strukturni elementi bakterijskih, rastlinskih in glivnih celičnih sten, zunanega oklepa pri členonožcih ter kože in vezivnega tkiva živali in ljudi. Monosaharida riboza in deoksiriboza sta komponenti nukleinskih kislin, glikolipidi in glikoproteini pa kot označevalci na površini celic sodelujejo pri prepoznavi molekul.

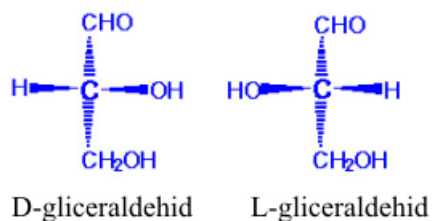
Monosaharidi

Osnovna enota ogljikovih hidratov so monosaharidi, ki so aldehidni ali ketonski derivati polihidroksi alkoholov z ravnimi verigami, ki vsebujejo najmanj 3 ogljikove atome.

Poimenujemo jih glede na kemijsko naravo njihove karbonilne skupine in glede na število C atomov: aldoza če ima aldehidno skupino, ketoza če ima ketonsko skupino, po številu C atomov so trioze, tetroze, pentoze, heksoze, itd.

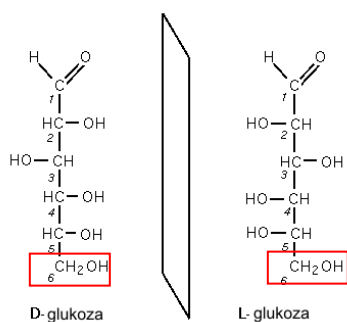
Monosaharidi vsebujejo več asimetrično substituiranih C atomov zaradi česar nastopajo v različnih stereoizomernih oblikah.

Vsi asimetrični atomi prispevajo k optični aktivnosti posameznega sladkorja (sučejo ravnino polarizirane svetlobe). Zrcalno simetrična izomera (optična izomera), ki sučeta ravnino linearno polarizirane svetlobe za enak kot, le v nasprotno smer (d,+ ali l,-) imenujemo enantiomera (Slika 1)



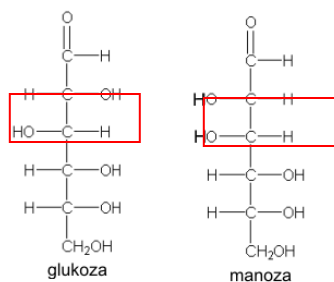
Slika 1. Enantiomera.

D in L obliko določamo glede na položaj hidroksilne skupine na zadnjem asimetričnem ogljikovem atomu, če sladkor napišemo v Fischerjevi projekciji (Slika 2). L-sladkorji so zrcalne slike svojih D oblik. Ker je L oblik bistveno manj kot D oblik, pripone D navadno sploh ne napišemo.



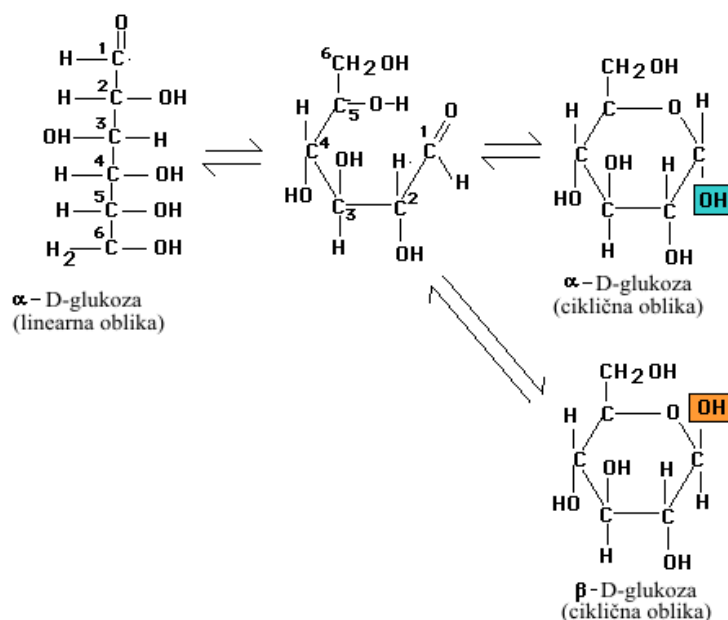
Slika 2. D- in L-oblika glukoze prikazani s Fisherjevo projekcijo.

Sladkorji, ki se razlikujejo le v konfiguraciji okrog enega C atoma, so epimeri drug drugega (Slika 3).



Slika 3. Epimera.

V vodni raztopini se monosaharidi nahajajo predvsem v ciklični obliki, ki jo opišemo z Haworthovo projekcijo. Pri tem vodikove atome in hidroksilne skupine razporedimo tako, da ležijo pod projekcijsko ravnino obroča ali nad njo. Vezi v obroču, ki ležijo pred ravnino, v kateri rišemo projekcijo obroča, odebelimo. Zaradi preglednosti izpuščamo ogljikove atome v obroču. Pri ciklizaciji nastane na C1 nov asimetrični ogljikov atom, ki ga imenujemo anomerni C atom. Sladkorja, ki se razlikujeta po položaju hidroksilne skupine na tem mestu, imenujemo anomera (Slika 4). Anomeri lahko v vodni raztopini nemoteno prehajajo iz ene v drugo obliko. Ogljikove hidrate s šestčlenskim obročem imenujemo piranoze, tiste s petčlenskim pa furanoze.



Slika 4. Linearna in ciklični obliki sladkorja D-glukoze.

Hidroksilna skupina (OH), ki je nastala iz aldehydnega ali ketonskega kisika na C1, je glikozidna hidroksilna skupina. Je reaktivnejša od ostalih hidroksilnih skupin in rada tvori glikozidno vez z drugo hidroksilno skupino. Pri tem se odcepi molekula vode. Glikozidna hidroksilna skupina se lahko nahaja v položaju α ali β (Slika 8). Položaj OH skupine na tem atomu vpliva na fizikalne lastnosti nastale spojine kot so topnost, tališče, optična rotacija. Prosta, torej nesubstituirana glikozidna hidroksilna skupina, daje sladkorjem lastnosti reducenta. Reducirajoči sladkorji lahko namreč reducirajo rahlo oksidirajoče snovi.

Polisaharidi

Polisaharidi so sestavljeni iz monosaharidov, med seboj povezanih z glikozidnimi vezmi. Sladkorje, ki so sestavljeni le iz nekaj (3-10) monosaharidnih enot, imenujemo oligosaharide. Homopolisaharidi so polisaharidi, sestavljeni iz ene same vrste monosaharidov. Primer homoglikana so celuloza, škrob in glikogen, saj so polimeri glukoze. Polisaharide, sestavljene iz več

vrst monosaharidov imenujemo heteropolisaharidi. Heteroglikani so npr. glikozaminoglikani, ki vsebujejo izmenjujoče se uronske kisline in heksozaminske ostanke, proteoglikani, kjer so povezani proteini in glikozaminoglikani ter peptidoglikani, ki vsebujejo ponavljajoča se N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminsko kislino. Polisaharidi lahko tvorijo linearne ali razvejane polimere saj se lahko glikozidna vez tvori med katerokoli hidroksilno skupino v monosaharidu. Vendar pa je večina polisaharidov linearnih, tisti razvejani pa se vedno razvejajo le na nekaj natančno določenih načinov.

Polisaharidi, ki jih uvrščamo med reducirajoče sladkorje, imajo navadno le en ostanek, ki je brez glikozidne vezi (t. i. reducirajoči konec), vmesne monosaharidne enote pa so med seboj povezane z glikozidno vezjo.

1.1.2 Metode za določevanje reducirajočih sladkorjev

Reducirajoče sladkorje lahko določamo s kemijskimi ali encimskimi metodami:

- **Kemijske metode** temeljijo na redukciji kovinskega iona s sladkorjem. Najpogosteje uporabljamo Cu^{2+} (Fehlingova reakcija, Benedictova reakcija), Fe^{3+} v železovem (III) heksacianatu, Ag^+ pri nastanku srebrovega zrcala.
- **Encimske metode** so specifične za določen sladkor, saj temeljijo na encimski pretvorbi specifičnega sladkorja v produkt, ki ga lahko spektrofotometrično določimo. Tak tip testov uporabljamo tudi za določanje sladkorja v krvi. Pri hitrih testih za določanje glukoze v krvi uporabljamo papirnate trakove, ki so prepojeni z encimi in vsemi potrebnimi reagenti, na trak pa kanemo kapljico krvi. Barvo testnega traku nato primerjamo z barvo kontrolnega oz. standardnega vzorca.

Reakcije sladkorjev z aromatskimi fenoli

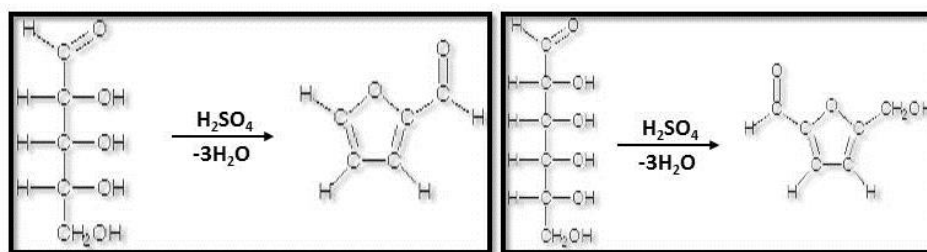
Koncentrirana žveplova (VI) kislina hidrolizira glikozidne vezi v polisaharidu, iz monosaharidnih enot pa po odcepu vode nastanejo furfural in njegovi derivati, ki dajejo z aromatskimi fenoli (kot so fenol, α -naftol, anthron, resorcinol,...) intenzivno obarvane produkte. Ketoze se dehidrirajo hitreje kot aldoze.

Reakcije sladkorjev z aromatskimi amini

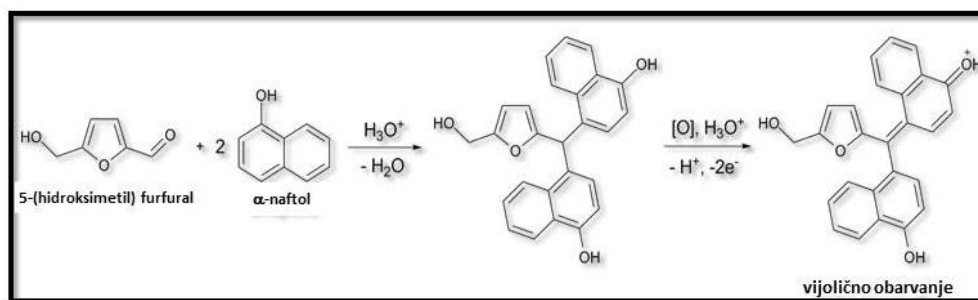
Pri reakciji aldoze z aromatskimi amini pride najprej do adicije amina na karbonilno skupino, nastane *N*-glukozamin, po eliminaciji vode pa Schiffova baza. Koncentracijo nastalega produkta lahko določimo spektrofotometrično.

Kvalitativno določanje ogljikovih hidratov

Molischeva reakcija: temelji na dehidraciji proste glikozidne $-\text{OH}$ skupine z žveplovo kislino, zaradi česar preidejo pentoze v furfural, heksoze pa v 5-hidroksimetil furfural (slika 5). Z Molishevimi reagentom se ti produkti obarvajo škrlatno (slika 6). Meja detekcije je 0,001 % glukoze.

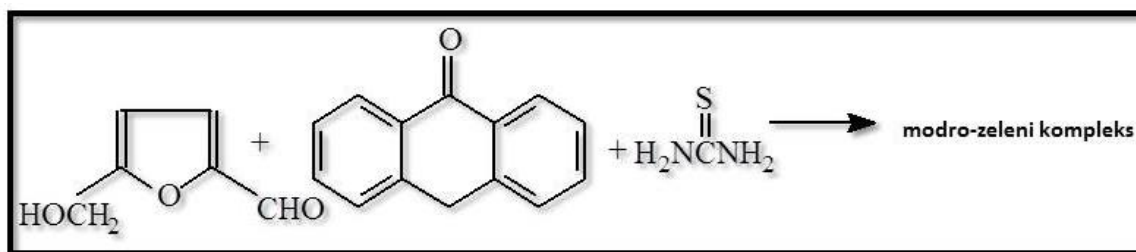


Slika 5: Nastanek furfurala (levo) in 5-hidroksimetil furfarala (desno).



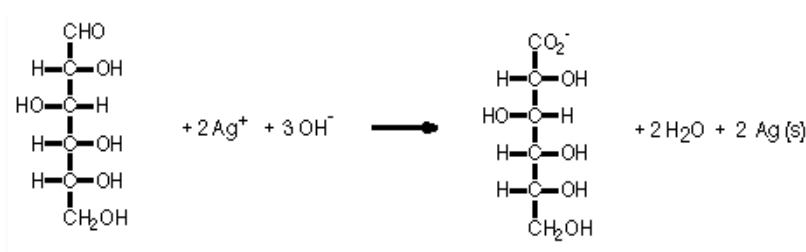
Slika 6: Reakcija 5-hidroksimetilfurfurala z alfa-naftolom.

Antronska reakcija: furfural, ki nastane zaradi reakcije z žveplovo kislino daje z anthronskim reagentom modro-zeleno obarvan kompleks (Slika 7).



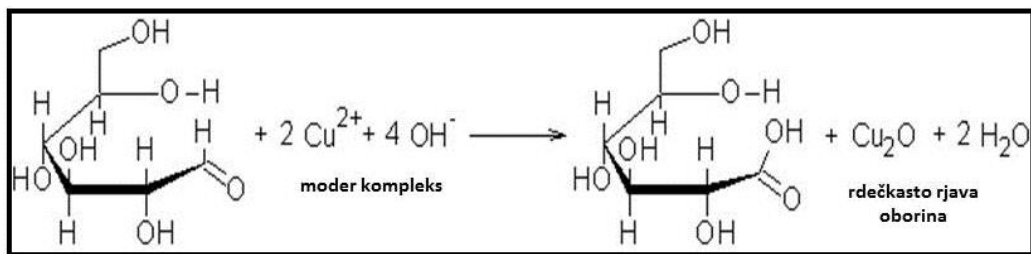
Slika 7: Nastanek modro-zelenega kompleksa pri Anthronski reakciji.

Nastanek srebrovega ogledala: reducirajoči sladkorji v alkalni raztopini srebrovega nitrata reducirajo srebro v elementarno obliko, ki se izloči na steni epruvete (Slika 8).



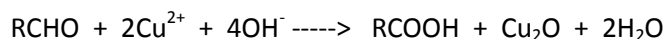
Slika 8: Nastanek srebrovega ogledala – Tollensova reakcija za aldehyde.

Fehlingova reakcija: temelji na redukciji dvovalentnega bakra, pri čemer nastane v alkalni raztopini bakrov (I) oksid (Slika 9).

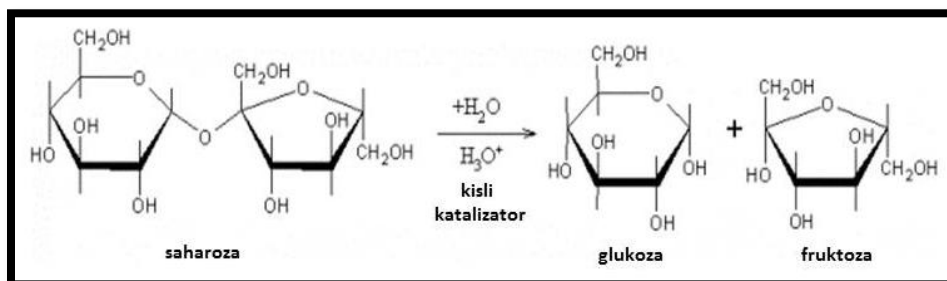


Slika 9: Enačba reakcija za Fehlingov test glukoze.

Benedictova reakcija: je modifikacija Fehlingove reakcije. Pripravimo samo eno raztopino, ki je stabilnejša od originalnega Fehlingovega reagenta.



Inverzija saharoze: saharoza je nereducirajoči disaharid, sestavljen iz α -D-glukoze in β -D-fruktoze. Določimo jo lahko tako, da jo hidroliziramo do monosaharidov in določimo le-te. Pri hidrolizi saharoze pride do spremembe v optični rotaciji iz D v L, od tod ime inverzija (Slika 10).



Slika 10: Hidroliza saharoze

1.2 IZVEDBA VAJE

1.2.1 Barvne reakcije za določanje reducirajočih sladkorjev

Molisheva reakcija z α -naftolom

Potrebščine: konc. H_2SO_4 , α -naftol (50 g/L v etanolu), vzorec: raztopina glukoze (10 mg/mL destilirane vode).

1. 2 mL vzorca dodaj 2 kapljici Molishevega reagenta.
2. Ob robu epruvete prilij 1 mL žveplove kisline, da nastane škrlaten obroč!

Antronska reakcija

Potrebščine: anthron (2 g/L v konc. H_2SO_4), vzorec: raztopina glukoze (10 mg/mL destilirane vode).

1. 2 mL antronskega reagenta dodaj 5 kapljic vzorca, zmešaj in opazuj spremembo barve!

Benedictova reakcija

Potrebščine:

reagent A: 173 g Na-citrata in 100 g Na-karbonata raztopimo v 800 mL tople destilirane vode

reagent B: 17,3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 100 mL tople destilirane vode

Benedictov reagent: raztopini B počasi dodajamo raztopino A, vzorec: raztopina glukoze (10 mg/mL destilirane vode), vrela vodna kopel.

1. 1 mL Benedictovega reagenta dodaj 5 kapljic vzorca.
2. Segrevaj 5 minut na 100 °C (vrela vodna kopel). Opazuj spremembo barve!

Inverzija saharoze

Potrebščine: konc. HCl, 5 M NaOH, Benedictov reagent, vzorec: raztopina saharoze (5 mg/mL destilirane vode), vrela vodna kopel.

Saharoza je disaharid, sestavljen iz α -D-glukoze in β -D-fruktoze. Ker v glikozidni vezi sodeluje tudi karbonilna skupina, raztopina saharoze ni reducirajoča in je zato ne moremo določiti s pomočjo

reakcij, ki temeljijo na oksidaciji sladkorja. Določimo jo lahko tako, da jo hidroliziramo do monosaharidov (t. i. inverzija) in nato določimo le-te.

a) Hidroliza saharoze:

1. 5 mL raztopine saharoze dodaj 5 kapljic konc. HCl in segrevaj 10 minut v vreli vodni kopeli.

2. Ohladi in dodaj 5 kapljic NaOH.

b) Dokazovanje reducirajočih sladkorjev z Benedictovo reakcijo

Kot vzorec uporabi: saharozo in hidrolizirano saharozo.

Določanje polisaharidov

Potrebščine: konc. HCl, 5 M NaOH, raztopina jodovice (7 g I₂ + 5 g KI/100 mL destilirane vode), Benedictov reagent, vzorec: raztopina škroba (10 g/L destilirane vode), vrela vodna kopel.

Polisaharidi niso reducirajoči sladkorji, saj vsebujejo eno reducirajočo skupino na več sto monosaharidnih preostankov. Kot reducirajoče monosaharide jih lahko dokažemo le po hidrolizi s kislino ali amilazo. Hidrolizo lahko spremljajo z raztopino jodovice, saj le intaktni polisaharidi z J₂/I dajejo modro obarvan kompleks.

a) Hidroliza škroba

1. 5 mL raztopine škroba dodaj 5 kapljic konc. HCl in segrevaj v vreli vodni kopeli 10 minut.

2. Na začetku, po 5 minutah in po 10 minutah odvzemi kapljico vzorca in jo na steklu zmešaj s kapljico jodovice. Opazuj spremembo barve!

3. Ohladi in dodaj 1 mL NaOH.

b) Dokazovanje reducirajočih sladkorjev z Benedictovo reakcijo

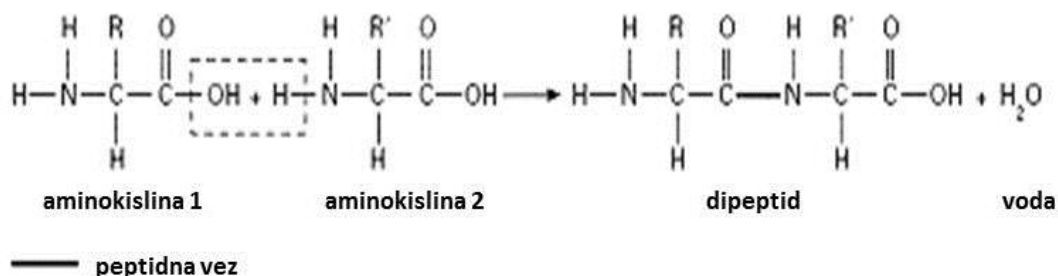
Kot vzorec uporabi raztopino škroba in hidroliziran škrob.

2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

2.1 TEORETIČNE OSNOVE

2.1.1 Proteini

Proteini sestavljajo celice, tkiva, organe živali in rastlin. Pri tem vršijo širok spekter strukturnih in dinamičnih funkcij. Encimi so dinamični proteini, ki katalizirajo kemične reakcije, tako da se substrat pretvori v produkt. Večina kemičnih reakcij, ki tečejo v živih organizmih, potrebuje encime-biokatalizatorje, ki zagotovijo da reakcija teče na nivoju, ki je kompatibilen za življenje. Takšne reakcije so kemične transformacije, transport, kontrola metabolizma, gibanje, zaščitne reakcije. Strukturni proteini pa nudijo podporno funkcijo, so gradniki mišičja, kosti, vezivnega tkiva (velike multimerne strukture) ter sestavljajo različne receptorje (monomeri ali oligomeri). Kemično so proteini polimeri sestavljeni iz različnega števila aminokislin, med seboj povezanih z kovalentno peptidno vezjo. Nastajajo v celicah v procesu translacije, tj. ko se mRNA prevede na ribosomih v proteine. Vsaka aminokislina je kodirana z vsaj enim tričrkovnim kodonom. V naravi se pojavlja 20 različnih aminokislin ter njihovi derivati. Le-ti nastanejo z encimsko modifikacijo po vgradnji v protein.

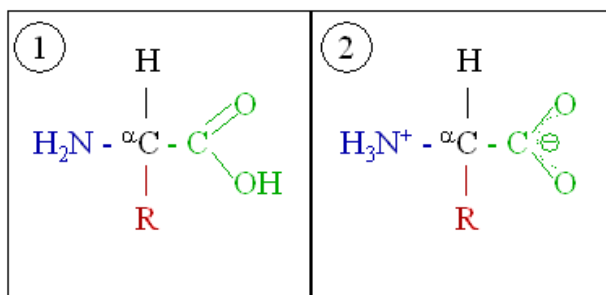


Slika 11: Levo splošna strukturna formula aminokisline (1), ki vključuje centralni C atom (α), ter kovalentno vezane: amino skupino, karboksilno skupino, vodikov atom, R pa je stranska veriga, ki so kemično različne (Tabela 1), desno (2) splošna strukturna formula aminokisline pri fiziološkem pH=7, kot zwitterion, amino skupina je protonirana kot amonijev ion, karboksilna skupina pa je neprotonirana kot karboksilatni ion (Povzeto po Devlin, Textbook of Biochemistry, 6th ed., Wiley and sons, public., New York).

Kot je prikazano na Sliki 17 imajo aminokisline asimetrični center: alfa-C atom ima štiri različne skupine kovalentno vezane in v tetraedrični konfiguraciji predstavlja asimetrični center molekule.

Za vse aminokisline razen glicina ($R=H$) je značilna optična izomerizacija in nastopajo v dveh izomernih oblikah; če je amino skupina na levi je to L absolutna konfiguracija, če pa je na desni pa D absolutna konfiguracija. Pri sesalcih so vse aminokisline v L konfiguraciji, medtem ko se npr. pri bakterijah (prokarionti) pojavljajo tudi D aminokisline (op. L, D konfiguracija pomeni možnost rotacije polarizirane svetlobe levo ali desno od ravnine polarizacije).

Splošna struktura aminokisline je prikazana na Sliki 12 in vsebuje amino, karboksi skupino, vodikov atom ter t.i. stransko verigo (R). Kemično so stranske verige (R) različne in kot je prikazano v Tabeli 1 lahko na tej osnovi delimo aminokisline na več podskupin.



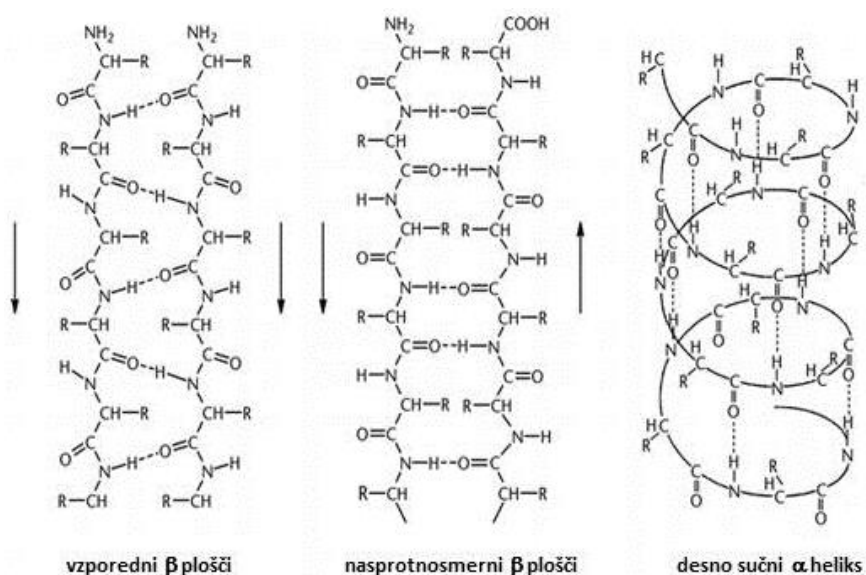
Slika 12: Levo splošna strukturna formula aminokisline (1), ki vključuje centralni C atom (α), ter kovalentno vezane amino skupino, karboksilno skupino, vodikov atom, R pa je stranska veriga, ki so kemično različne (Tabela 1), desno (2) splošna strukturna formula aminokisline pri fiziološkem pH=7, kot zwitterion, amino skupina je protonirana kot amonijev ion, karboksilna skupina pa je neprotonirana kot karboksilatni ion (Povzeto po Devlin, Textbook of Biochemistry, 6th ed., Wiley and sons, public., New York).

Komponente aminokislin, ki ionizirajo, so ključne za biološko funkcijo proteina. Disociacija kisline je karakterizirana s konstanto disociacije K_a in njeno pK_a vrednostjo ($pK_a = \log_{10} (1/K_a)$). Vrednost pK_a je odvisna od okolja, kjer se nahaja kislinski ostanek; npr. če je v bližini druga ionska skupina z nasprotnim nabojem, je vrednost pK_a večja, saj se nasprotna naboja stabilizirata. Nadalje vpliva na pK_a polarnost okolja, prisotnost vode, potencial za tvorbo vodikove vezi. Nekatere aminokisline, npr. lizin ali arginin so bazične, saj vsebujejo na R mestu aminoskupine, tu je pK_a visok, zopet druge, ki vsebujejo karboksilno skupino na R mestu, pa so kisle in imajo nizek pK_a . Ionska oblika proteina se spreminja v odvisnosti od pH, ker se spreminja naboj aminokislin v proteinih. To je pomembno saj se s tem spreminja struktura proteina in tako njegove biološke funkcije.

Za preučevanje funkcij proteina je pomembna določitev izoelektrične točke, tj. tiste pH vrednosti (imenujemo jo pI vrednost), pri kateri je skupni naboj proteina enak 0. Če je pH večji od pI je neto naboj proteina negativen in obratno, če je pH manjši od pI je neto naboj proteina pozitiven. Ker so v praksi proteini kompleksni polielektroliti s številnimi ionskimi skupinami, je izračun pI s pomočjo K_a vrednosti za vsako aminokislino težak, zato pI določimo eksperimentalno tako da določimo pH

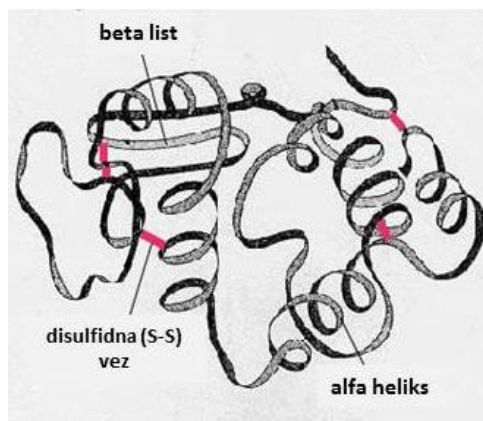
vrednost ko se preučevani protein ne premika v električnem polju. Ta koncept je pomemben saj lahko ločimo različne proteine na osnovi njihove pI vrednosti.

Za biološko funkcijo proteina je pomembna njihova nativna (naravna) struktura oz. konformacija. Za višje strukture proteina je pomembno okolje (pH , voda, potencial za tvorbo vodikovih vezi in drugih nekovalentnih vezi), kot tudi primarna struktura proteina tj. aminokislinsko zaporedje. Višje strukture proteina so odvisne od nekovalentnih vezi. Sekundarna struktura je odvisna od medsebojnih interakcij sosednjih aminokislin, predvsem njihovih stranskih ostankov in je lahko pravi α -heliks ali pa naključno konformacijo. Pogosto se vzporedno lahko veže več peptidnih verig in ti tvorijo β -ploščo (Slika 13).



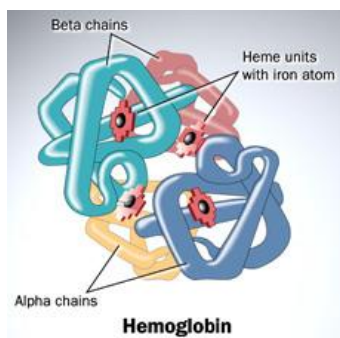
Slika 13: Sekundarne strukture proteinov: β -plošči in α -heliks.

Terciarna struktura proteina predstavlja lokacijo vsakega atoma proteina v prostoru. Gre za geometrijske povezave med oddaljenimi segmenti primarne strukture in medsebojno pozicijo stranskih verig. Slika 14 prikazuje primer terciarne strukture z nižjimi strukturami (sekundarno in primarno).



Slika 14: Primer terciarne strukture proteina z različnimi sekundarnimi strukturami (beta plošča, alfa veriga,) ter disulfidna vez kot značilnost primarne strukture.

Mnogi proteini so urejeni kot multimeri, predvsem strukturni, njihova zgradba je iz ene ali več peptidnih verig, ki se ponavljajo. Peptidne verige so lahko povezane s kovalentnimi vezmi (disulfidna vez) ali pa z nekovalentnimi vezmi. Na sliki 15 je prikazan primer hemoglobina, ki je sestavljen iz več peptidnih verig ter hema, ki vsebuje železov ion za vezavo kisika.



Slika 15: Kvartarna struktura hemoglobina. Sestavljena je iz dveh alfa in dveh beta verig ter štirih hemov. (povzeto po www.biomed.brown.edu).

Končna konformacija proteina, tj. terciarna ali kvartarna struktura, nastaneta s postopnim zvitjem peptida (ov). Pri tem pogosto sodelujejo posebni pomočniški peptidi, *chaperoni*, ki poskrbijo da pride do tvorbe ustrezne konformacije šele v predelu celice, kjer protein deluje oz. poskrbijo, da se protein ne zviije v določeno konformacijo, če se izloči iz celice. Pomembni za tvorbo vezi, ki zagotovijo nativno strukturo proteina in s tem njegovo biološko funkcijo, so pomembni tudi fizikalno kemijski pogoji (redoks, pH, vodni potencial).

2.1.2 Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov

Poznamo več metod za določanje koncentracije proteinov v raztopinah. Večina metod je relativnih, kar pomeni, da zahtevajo uporabo ustreznega standarda. Koncentracijo albuminov in globulinov določili z direktno spektrofotometrično metodo.

Spektroskopske metode

Spektroskopske metode so v biokemijo pogosto uporabljene fizikalne analitske metode. Izkoriščajo razliko v optičnih lastnostih molekul (absorpcijo, sipanje svetlobe) v različnih področjih elektromagnetnega spektra.

Najbolj uporabna in razširjena je UV/VIS spektroskopija, s katero merimo absorpcijo neke čiste snovi v področju ultravijoličnega (UV) valovne dolžine med 190 in 335 nm in vidnega dela svetlobe (VIS) med 336 in 800nm. Veliko bioloških molekul vsebuje kemijske skupine, ki absorbirajo svetlobo – kromofore. Ob absorpciji fotonov preidejo elektronu v kromoforu iz nižjega energetskega nivoja v višji (preskok iz ene orbitale v drugo). Vrnitev elektronov na osnovni nivo je hitra in sledi jih absorpcija novega fotona. Različni kromofori absorbirajo svetlobo različnih valovnih dolžin. Valovno dolžino pri kateri je absorpcija svetlobe največja imenujemo absorpcijski maksimum. Absorpcijski maksimum večine proteinov je pri 280nm, DNA in RNA absorbirata pri 260nm.

Za merjenje absorpcije uporabljamo spektrofotometre. Vzorec katerega absorpcijo želimo izmeriti raztopimo v ustreznem topilu in ga nalijemo v posodico iz plastike, navadnega ali kvarčnega stekla – kiveto. Spektrofotometer ima svetlobni vir. Svetloba iz vira potuje na monokromator, ki naravna želeno valovno dolžino, potem pa skozi režo in vzorec. Kromofori absorbirajo določeno količino svetlobe, zato je intenziteta žarka, ki zapusti kiveto manjša od intenzitete žarka, ki je vstopil vanjo. Razmerje intenzitet (I/I_0) imenujemo transmittenca (T). Številčna vrednost, ki nam jo poda spektrofotometer pa predstavlja negativni logaritem transmittence in jo imenujemo absorbanca (A).

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} (I/I_0)$$

Absorbanca je premo sorazmerna s koncentracijo snovi in dolžini kivete (Lambert-Beerov zakon):

$$A = c * l * \epsilon$$

c = koncentracija snovi (mol/L *tudi* g/L); l = dolžina kivete oz. pot žarka skozi vzorec (cm)
 ϵ = molarni ekstinkcijski koeficient ($l/mol\ cm$) *tudi* ($l/g\ cm$))

Uporabnost UV/VIS spektroskopije je zelo široka. Lahko jo uporabljamo za kvantitativno analizo, tako da s pomočjo Lambert-Beerovega zakona določimo koncentracijo snovi, ali pa tudi za kvalitativno analizo oz. določanje vrste snovi v vzorcu.

Pri direktni spektrofotometrični metodi gre za najenostavnejši pristop kvantifikacije proteinov v raztopini. Metoda izkorišča dejstvo, da proteini v raztopini absorbirajo svetlobo valovne dolžine 280nm. Prednost te metode je enostavnost, slabost pa slaba točnost, saj lahko metodo moti prisotnost površinsko aktivnih snovi, nukleinskih kislin in drugih delcev.

Ker je absorbanca premo sorazmerna koncentraciji snovi, lahko enostavno izračunamo koncentracijo proteinov v neznanem vzorcu z uporabo standardnega vzorca.

$$A_S = c_S * l * \epsilon \quad \text{in} \quad A_V = c_V * l * \epsilon$$

$$l = \text{konst} \rightarrow l * \epsilon = k$$

$$A_S/A_V = (c_S * k)/(c_V * k)$$

$$c_V = c_S * A_S/A_V$$

Točnost rezultatov izboljšamo z večjim številom meritev redčitev različnega vzorca.

2.2 IZVEDBA VAJE

MATERIALI

spektrofotometer, kivete, epice, mikropipete, fiziološka raztopina, standardni vzorec (BSA) ($c=2\text{mg/ml}$)

POSTOPEK

- Pripravi redčitve standardnega vzorca tako da dobiš po 1 ml raztopin s koncentracijami 1,5 mg/l, 1 mg/l, 0,6 mg/l in 0,2 mg/l
- Standardom izmeri absorbanco, nariši graf $A(c)$ in izračunaj koeficient k ($A=k \cdot c$)
- Vzorcem z neznano koncentracijo izmeri absorbanco in izračunaj njihovo koncentracijo.

	c_s (mg/ml)	A_s
Čisti vzorec	2	
Redčitev 1	1,5	
Redčitev 2	1	
Redčitev 3	0,6	
Redčitev 4	0,2	

	A_v	c_v (mg/ml)
V1		
V2		
V3		
V4		
V5		
V6		
V7		
V8		
V9		
V10		
V11		
V12		

3 HOMOGENIZACIJA IN EKSTRAKCIJA LIPIDOV IZ SVINJSKIH JETER TER DOKAZ PRISOTNOSTI HOLESTEROLA

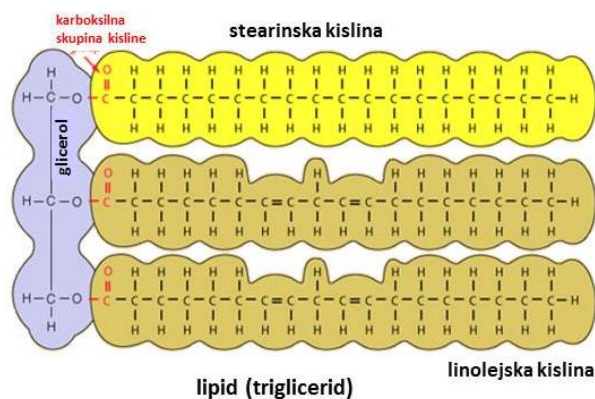
3.1 TEORETIČNE OSNOVE

3.1.1 Lipidi

Lipidi so nepolarne organske molekule, ki so netopne ali slabo topne v vodi oz. polarnih topilih in topne v nepolarnih organskih topilih (eter, kloroform, benzen). V živih organizmih so glavna komponenta celičnih membran in membran organelov. Kemično so to glicerofosfolipidi, sfingolipidi in holesterol.

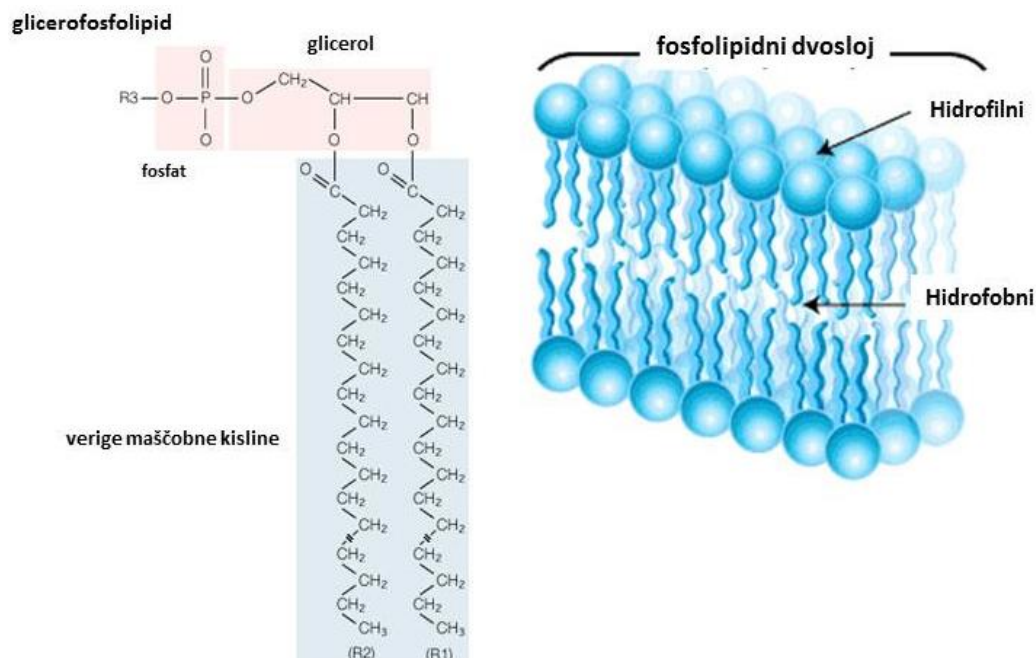
Maščobne kisline so karboksilne kisline z dolgimi hidrokarbonskimi stranskimi verigami. V naravi se običajno ne nahajajo v prosti obliki, pač pa esterificirane in v taki obliki nastopajo kot komponente biološko pomembnih lipidov. Pri živalih in rastlinah so glavne maščobne kisline s 16 do 18 C atomi v stranski verigi. Pogosto so nenasičene in vsebujejo eno ali več dvojnih vezi v stranski verigi. Fizikalne lastnosti maščobnih kislin-topnost, fluidnost, so odvisne od nasičenosti. Več je dvojnih vezi bolj fluidne so maščobne kisline.

Večina živalskih maščob je **triacilglicerolov**, imenovani tudi triacilgliceridi ali nevtralni lipidi. So nepolarne, v vodi netopne substance. Kemično so triestri maščobnih kislin in glicerola. Njihova glavna biološka funkcija je, da služijo kot *rezervoar* energije pri živalih, ne sestavljajo pa bioloških membran. Maščobna kislina je lahko na vseh treh mestih enaka ali pa so različne. Ker so maščobe zelo učinkovita oblika skladiščenja metabolne energije, specializirane celice *adipociti* sintetizirajo in skladiščijo triacilglicerole. Adipozno (maščobno) tkivo se nahaja pod kožo, največ pa ga je v trebušni votlini.



Slika 16: Struktura triacilglicerida.

Glicerofosfolipidi (ali fosfogliceridi) so glavna lipidna komponenta membran. Sestavljeni so iz glicerola, in z estersko vezjo vezane fosfatne skupine ter dveh maščobnih kislin (Slika 17). Glicerofosfolipidi so AMFIPATIČNE molekule, imajo polarno (hidrofilno) glavo (nabita fosfatna skupina) in nepolaren (hidrofoben) rep iz dolgih alifatskih verig. Preko fosfo diesterske vezi se lahko na glicerofosfolipide vežejo različne skupine; holin, etanolamin, serin, glicerol, inositol.



Slika 17. Strukturna formula glicerofosfolipida (levo); fosfolipidni dvosloj kot glavna komponenta celične membrane.

Sfingolipidi so tudi pomembne lipidne komponente membran. So derivati C_{18} amino alkoholov; sfingozina in dihidrosfingozina (Slika 18).



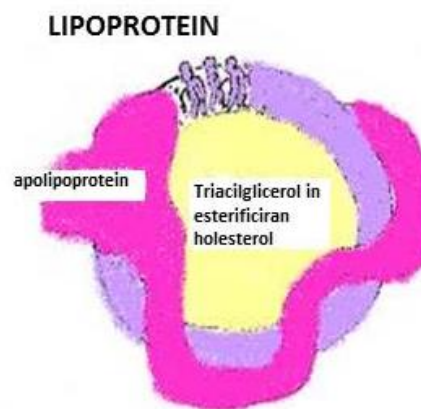
Slika 18. Struktura sfingolipidov. Na R mesto se lahko vežejo različne komponente; ceramidi imajo vezano dolgo nenasičeno maščobno kislino, glikosfingolipidi sladkorje.

Lipoproteini

Lipidi, kot so triacilgliceroli, fosfolipidi in holesterol, so v vodnem polarnem okolju slabo topni. Zato njihov transport v plazmi poteka v kompleksu s proteini. Tako nastanejo lipoproteini, to so globularne strukture, sestavljene iz nepolarne sredice (lipidne komponente) obdaja pa jih plašč amfifilnih proteinov, ki omogoča boljšo topnost (Slika 15). Na osnovi njihove biološke funkcije in fizikalnih lastnosti jih delimo v pet skupin:

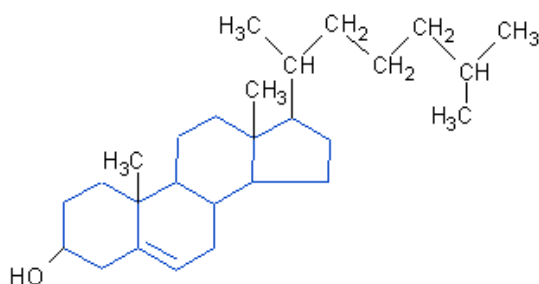
- **Hilomikroni.** Transportirajo zunanje (dietarne) lipide-triacilglicerole in holesterol iz črevesja v tkiva.
- **VLDL, IDL, LDL (angl. very low, intermediate, low density lipoproteins).** Skupina podobnih lipoproteinov, ki transportirajo endogene (v organizmu sintetizirane lipide), triacilglicerole in holesterol iz jeter v tkiva. Jetra sintetizirajo triacilglicerole iz prebitka ogljikovih hidratov.
- **HDL (angl. high density lipoproteins).** Transportirajo endogeni holesterol iz tkiv v jetra.

Proteinsko komponento tvorijo t.i. apolipoproteini oz. apoproteini (Slika 19). Vsaj devet različnih apoproteinov je opisanih pri človeku. So dobro vodotopni in tvorijo z lipidi le rahlo asociacijo. Gostota lipoproteinov raste s krajšanjem premera lipoproteina.



Slika 19: Struktura lipoproteina

Med pomembnejšimi nepolarnimi lipidi je holesterol, ki služi kot gradnik celične membrane ter prekursor za številne steroidne hormone, vitamin D in žolčne soli. Spada v skupino steroidov. Vsi steroidi imajo tri šestčlene in en petčleni obroč. Steroidi se med seboj razlikujejo po številu in položaju dvojnih vezi, stranski verigi in številu in vrsti funkcionalnih skupin. Organizem dobi holesterol iz hrane in tudi z endogeno sintezo, ki poteka predvsem v jetrih.



Slika 20: Strukturna formula molekule holesterola.

Skupna lastnost vseh lipidov, ki jih loči od ostalih treh skupin bioloških makromolekul (proteinov, nukleinskih kislin in ogljikovih hidratov), je njihova netopnost v vodi. Lipidi se raztapljajo večinoma v organskih topilih, zato je ekstrakcija s temi topili tudi osnova za njihovo izolacijo.

Pri vaji bomo spoznali postopek homogenizacije, s katerim bomo iz jeter sprostili vsebino celic. S centrifugiranjem bomo nato od vsebine celic ločili od delov celičnih membran in s pomočjo ekstrakcije izolirali lipide.

Liberman Buchardova reakcija

Liberman Buchardovo reakcijo uporabljamo za ugotavljanje prisotnosti holesterola. Pri reakciji pride do acetiliranja hidroksilne (-OH) skupine na 3. C atomu holesterola, kar obarva produkt zeleno do zeleno-modro.

3.1.2 Homogenizacija

Homogenizacija je v biokemiji proces razbitja celičnih sten in membran, s katerimi sprostimo celično vsebino. Produkt homogenizacije je homogenat, ki ga v idealnem primeru sestavljajo citoplazma, fragmenti celičnih membran in sten ter nepoškodovani organeli. Tehnike homogenizacije so lahko fizikalne ali kemijske in jih narekuje vrsta materiala, ki ga hočemo homogenizirati.

Fizikalne metode: Mehka živalska tkiva po navadi grobo homogeniziramo z električnimi mešalci in noži (palični mešalnik, multipraktik). Za bolj učinkovito homogenizacijo uporabimo Elvehjem-Potterjev homogenizer, ki je sestavljen iz vrtečega se bata, ki ga poganja elektromotor, in steklene epruvete, v katero nalijemo grobi homogenat (slika 21).



Slika 21: Elvehjem-Potterjev homogenizer.

Za homogenizacijo rastlinskih tkiv uporabimo tudi terilnico. Bakterijske celice, ki imajo zelo trde stene, moramo razbit z uporabo večje sile, bodisi z visokim pritiskom (francoska preša) ali z uporabo ultrazvoka.

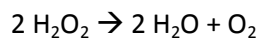
Kemijske metode: Celice lahko razgradimo tudi z uporabo različnih encimov, kot so lizocim (ki razgrajuje celično steno bakterij) in fosfolipaze (ki razgradijo celične membrane). Homogenizacija poteče tudi, če tkivo izpostavimo avtolizi.

3.1.3 Ekstrakcija

Ekstrakcija je preparativna metoda, pri kateri določeno snov izoliramo iz tekoče ali trdne zmesi tako, da jo raztopimo v drugi fazi (običajno tekoči), v kateri naj se ostale zmesi ne bi raztapljale. Za ekstrakcijo izberemo tako topilo, katerega polarnost (relativna dielektrična konstanta) je čim bolj podobna polarnosti snovi, ki jo želimo izolirati. Izračunano razmerje med koncentracijami topila in topljenca v eni in drugi fazi nam podaja porazdelitveni koeficient. Ta je večinoma večji, čim bolj podobni sta dielektrični konstanti topila in topljenca, vendar pa nikoli ne doseže vrednosti 1. Beljakovine, nukleinske kisline in ogljikovi hidrati so večinoma polarne snovi in jih najlažje izoliramo s polarnimi puforskimi raztopinami. Za izolacijo nepolarnih snovi, kot so lipidi in večina pigmentov pa uporabimo manj polarna organska topila, kot so kloroform, eter ali aceton.

Po končani ekstrakciji bomo prisotnost holesterola preverili Liberman-Burchardovo reakcijo, ki jo poznamo že iz lanskih vaj. Pri tej reakciji pride do acetiliranja –OH skupine na 3. C atomu holesterola.

Jetra med drugim vsebujejo tudi velik delež encima katalaze, ki spada med proteine in katalizira razgradnjo vodikovega peroksida na vodo in kisik.



Z dodatkom H_2O_2 k vzorcu se zato začnejo sproščati kisik, ki ga lahko opazimo v obliki mehurčkov in s tem dokažemo prisotnost katalaze. Prisotnost bomo preverjali v vseh fazah eksperimenta.

3.2 IZVEDBA VAJE

MATERIALI

Sveža jetra, H_2O_2 , fiziološka raztopina (NaCl, 9 g/L), zmes metanola in kloroforma (2:1; V:V), led, palični mešalnik, čaše

POSTOPEK

- Odrežite košček jeter (kepico s premerom 3 mm) in jo dajte v epruveto z 2 mL H_2O_2 . Hitrost reakcije ocenite z od 0 do 4 (0 = ni reakcije, 1 = počasna, 2 = zmerna, 3 – hitra, 4 = zelo hitra oz. pene dosežejo vrh epruvete).
- V čašo natoči 50 mL fiziološke raztopine ohlajene na 4 °C (dve skupini namesto fiziološke raztopne uporabita destilirano vodo), in dodaj za dve žlici nastrganega tkiva jeter.
- Čašo postavimo na led in dobro premešamo ter suspenzijo jeter homogeniziramo s paličnim mešalnikom, tako da ni več vidnih večjih delcev.
- Homogenat testiramo na katalazno aktivnost tako, da k 2 mL H_2O_2 dodamo kapljico homogenata in ocenimo hitrost reakcije.
- Homogenat prelijemo v plastične centrifugirke, jih natančno uravnovesimo in centrifugiramo 10 min pri (10 000 vrtlj / min) in 4 °C.
- Supernatante in homogenate testiramo na katalazno aktivnost.
- Supernatant shranimo v plastični epruveti s pokrovčkom v v zmrzovalniku pri 25°C, do naslednje vaje za izolacijo proteinov iz sedimentov pa ekstrahiramo lipide.
- V centrifugirko s palčko natlačimo približno 1 mL sedimenta in dodamo 3,75 mL mešanice metanola in kloroforma (2:1) ter ekstrahiramo (mešamo s palčko) 5 min.
- Centrifugiramo 5 min pri 3000 vrtlj/min in sobni temperaturi.
- Supernatant zlijemo v čisto epruveto, sediment pa še enkrat ekstrahiramo s 3,75 ml mešanice metanola in kloroforma.
- Po centrifugiranju supernatanta združimo, sediment pa zavržemo.
- K supernatantu dodamo 1 ml destilirane vode, da se pojavi dvofazni sistem.
- Spodnjo kloroformno fazo (ki vsebuje lipide) odpipetiramo.
- Obe fazi testiramo s H_2O_2 na katalazno aktivnost.

4 DOLOČANJE HOLESTEROLA Z LIEBERMAN BUCHARDOVO REAKCIJO

4.1 IZVEDBA VAJE

Potrebščine: Holesterol, kloroform, jajčni rumenjaki, konc. H_2SO_4 , acetanhidrid, spektrofotometer

1. Pripravi raztopino holesterola v kloroformu koncentracije 0,2 g/l
2. Pripravi raztopino 0,5 ml jajčnega rumenjaka v 1,5 ml kloroforma
3. K raztopini kloroforma in raztopini jajčnega rumenjaka, kot tudi kloroformski fazi iz prejšnje vaje, dodaj 15 kapljic acetanhidrida.
4. Premešaj in ohladi pod vodo
5. Dodaj 5 kapljic koncentrirane H_2SO_4 in počakaj da se razvije barva (15-20 min)
6. S spektrofotometrom izmeri absorpcijo pri 680 nm
7. Koncentracijo holesterola izračunaj po formuli iz razmerja absorbanc

$$c\left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{A_{\text{vzorca}}}{A_{\text{ss tan dard}}} \cdot c_{\text{s tan dard}}$$

5 IZOLACIJA DNA IZ VZORCEV KRV

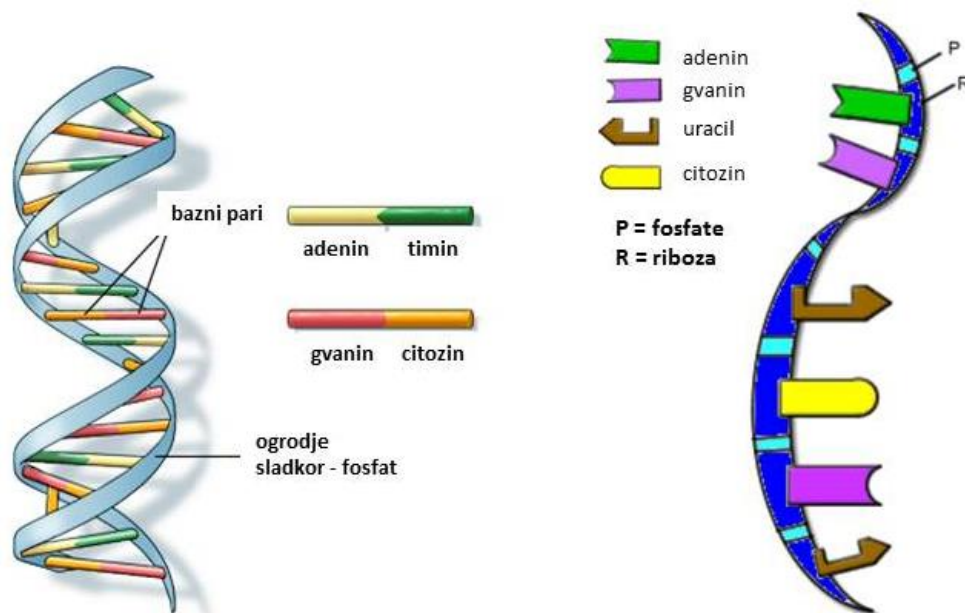
5.1 TEORETIČNE OSNOVE

5.1.1 Nukleinske kisline

Nukleinske kisline so polimerne biološke makromolekule. Poleg proteinov so nukleinske kisline najpomembnejše biološke makromolekule, ki jih najdemo v vseh živih bitjih, kjer kodirajo, prenašajo in izražajo genetsko informacijo. Niz nukleotidov nanizani skupaj v posebnem zaporedju predstavljajo mehanizem za shranjevanje in prenašanje dednosti ali genetske informacije preko sinteze proteinov.

Med nukleinske kisline spadajo **deoksiribonukleinska kislina (DNA)** in **ribonukleinska kislina (RNA)**. Sestavljeni sta iz manjših podenot, ki jih imenujemo nukleotidi. Vsak nukleotid je sestavljen iz ostanka fosforne kisline (fosfat), sladkorja riboze (RNA) ali deoksiriboze (DNA) ter organske baze.

Glavna razlika med DNA in RNA je ta, da je DNA molekula dvoverižna DNA pa enoverižna.



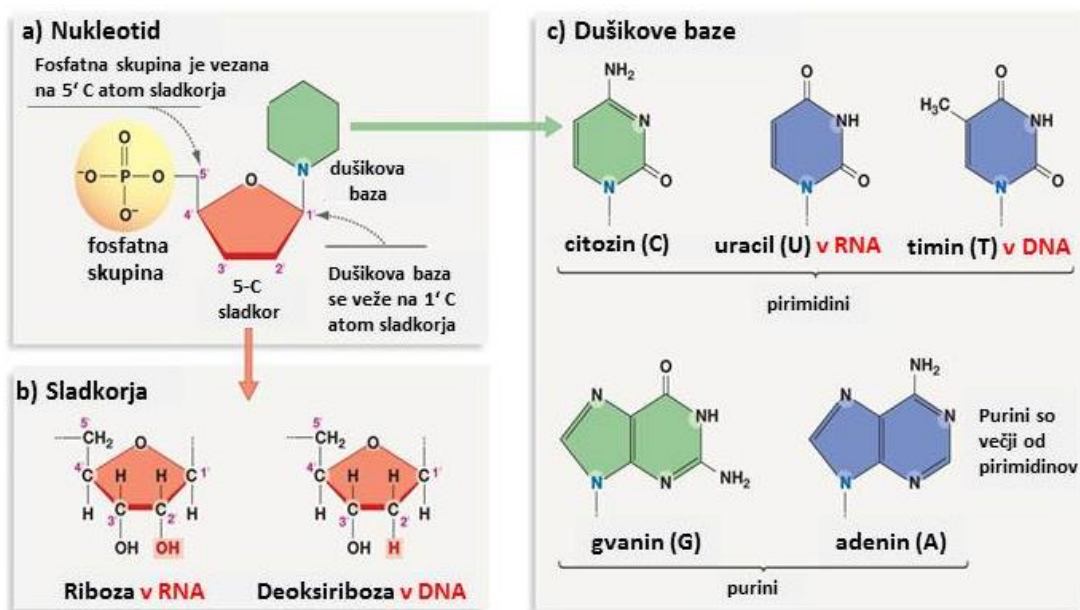
Slika 22: Zgradba DNA (levo) in RNA (desno)

Razlike med DNA in RNA so podane v spodnji tabeli:

Lastnost	DNA	RNA
Struktura	dvoverižna	enoverižna*
Baze	adenin, citozin, gvanin, timin	adenin, citozin, gvanin, uracil
Sladkor	deoksiriboza	riboza

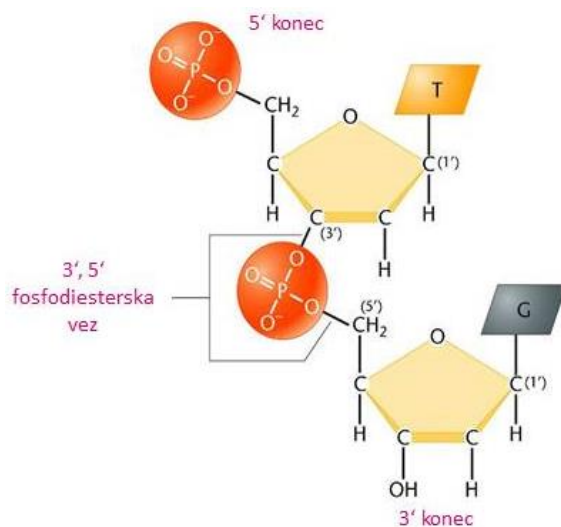
* Normalno je RNA enoverižna molekula. Obstajajo pa tudi izjeme – nekateri virusi imajo genome dvoverižne RNA, prav tako pa se lahko v nekaterih primerih pojavijo strukture nukleinskih kislin s tremi ali štirimi verigami.

Organske baze delimo na purinske (adenin, gvanin) ter pirimidinske (timin (DNA), citozin, uracil (RNA)). Baze, ki sestavljajo DNA so prikazane na spodnji sliki.



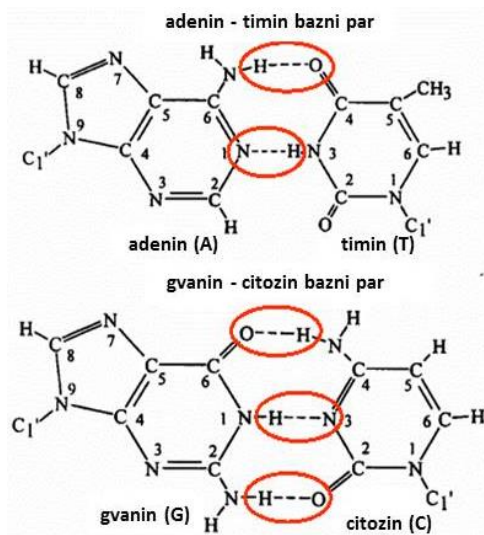
Slika 23: Organske baze, ki sestavljajo DNA.

Strukturo, sestavljeno iz baze in sladkorja, imenujemo nukleozid. Sladkorji in fosfati v nukleinskih kislinah so med seboj povezani v izmenjujoči verigi (ogrodje sladkor-fosfat) preko **3',5'-fosfodiester**skih vezi, pri čemer je fosfatna skupina povezuje 3' ogljikov atom enega sladkorja s 5' ogljikovim atomom naslednjega sladkorja.



Slika 24: 3',5'-fosfodieterska vez.

Nukleinske kisline so na splošno zelo velike molekule. DNA molekule dejansko spadajo med največje znane molekule. Njihova velikost variira od 21 nukleotidov (male interferenčne RNA) do velikih kromosomov (človeški kromosom 1 je ena sama molekula in vsebuje 247 milijonov baznih parov). Celična DNA tvori ti. dvojni heliks: dve verigi DNA sta med seboj povezani z vodikovimi vezmi in tvorita dupleks. Vodikova vez se tvori med lateralnimi (nasprotnimi) komplementarnimi baznimi pari na obeh verigah DNA dupleksa. Takšni bazni pari se tvorijo glede na pravila Watson-Crick-a: A tvori vez z T, G pa s C.



Slika 25: AT bazni par ima 2 vodikovi vezi, medtem ko se CG par povezuje s tremi vodikovimi vezmi.

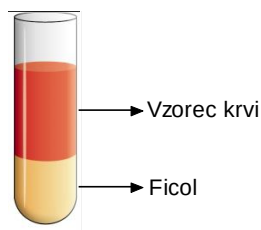
Za kakršnokoli analizo DNA (sekvenciranje, pomnoževanje določenega odseka...), je le to potrebno najprej izolirati iz vzorcev. V medicinskih raziskavah najpogosteje izoliramo DNA iz periferne krvi, natančneje iz limfocitov. V postopku izolacije je potrebno celice najprej razbiti, nato DNA oboriti, jo očistiti nečistoč in nazadnje zopet raztopiti za nadaljnjo uporabo.

5.2 IZVEDBA VAJE

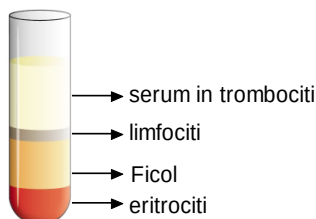
Izolacija DNA iz krvnih vzorcev po postopku s TRI reagentom

Zbiranje limfocitov

- v 1,5 mL epico odvzamemo 650 μ L krvi
- dodamo 650 μ L pufra PBS
- premešamo
- v novo sterilno 2 mL epico odmerimo 650 μ L Ficolla
- na Ficol previdno naneseemo 1300 μ L suspenzije krvi in PBS-a (kri nalivamo ob steni zelo počasi in pazimo, da se ne pomeša s Ficol-om).



- centrifugiramo pri 1800 rpm, 30 min, pri 18 °C
- prvo fazo (serum in trombociti) odsesamo
- drugo fazo z limfociti prenesemo pipeto v novo 1,5 mL sterilno epico



- dodamo 1 mL PBS-a
- centrifugiramo pri 1400 rpm, 15 min, pri 18 °C
- odsesamo supernatant
- dodamo 650 μ L PBS-a
- centrifugiramo pri 1400 rpm, 15 min
- odsesamo supernatant v celoti (pomagamo si s pipeto)

Izolacija DNK s TRI reagentom

- dodamo 260 μ L TRI reagenta celice razbijamo s pipetiranjem
- inkubiramo 5 min na sobni temperaturi
- dodamo 52 μ L kloroforma

- zapremo epice in vorteksiramo 15 s
- vzorce inkubiramo na sobni temperaturi 5 min
- mešanico centrifugiramo na 12000 x g, 15 min pri 4 °C, da se loči v tri faze
 - spodnja rdeča – proteini
 - vmesna bela – DNA
 - zgornja prozorna – vodna raztopina RNA
- vodno fazo odstranimo, preostanek uporabimo za izolacijo DNK
- po odstranitvi vodne faze za izolacijo RNA, DNA precipitiramo iz vmesne faze in organske faze tako, da dodamo 100 µL 100 % etanola
- premešamo z obračanjem in pustimo stati 2 – 3 min na sobni temperaturi
- centrifugiramo pri 2.000 x g, 5 min pri 4 °C
- odstranimo supernatant in ga uporabimo za izolacijo proteinov
- pelet DNA 2-krat speremo v 260 µL 0.1 M natrijevega citrata/10 % etanolu
- med vsakim spiranjem naj pelet DNA stoji (z občasnim mešanjem) 10 min
- centrifugiramo pri 2.000 x g, 5 min pri 4 °C.
- resuspendiramo DNA pelet v 430 µL 75 % etanola
- to naj stoji 10 – 20 min pri sobni temperaturi
- centrifugiraj pri 2.000 x g, 5 min pri 4 °C
- supernatant zavržemo, pelet DNA pa posušimo na zraku in ga raztopimo v 20 µL H₂O s ponavljajočim pipetiranjem z mikropipeto

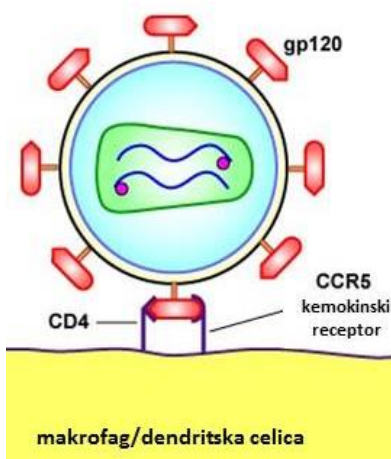
6 PCR reakcija in gelska elektroforeza (Genetski test za odpornost na AIDS)

6.1 TEORETIČNE OSNOVE

Pri tej vaji bomo izvedli molekularno genetski test za naravno odpornost na AIDS. Približno 1% ljudi ne zboli za AIDS-om kljub temu, da so HIV pozitivni, ker imajo mutacijo (delecijo 32 bp) v genu CCR5 na obeh alelih (so homozigoti). Nadaljnjih 10% ljudi ima mutacijo v genu CCR5 na enem alelu (so heterozigoti) in zato se pri njih simptomi AIDSa pojavijo kasneje in v bolj blagi obliki. Gen CCR5 kodira za membranski receptor na celicah T limfocitov in je nujno potreben za vstop virusa HIV v celico T limfocitov.

Laboratorijske tehnike molekularne biologije in mikrobiologije, ki so sestavni del genetskega testa so:

1. Izolacija DNA, RNA in proteinov iz krvi z TRI reagentom.
2. Pomnoževanje posameznega odseka DNA z uporabo verižne reakcije z encimom polimeraza (ang. PCR= Polymerase Chain Reaction).
3. Analiza PCR produktov na agaroznem gelu.



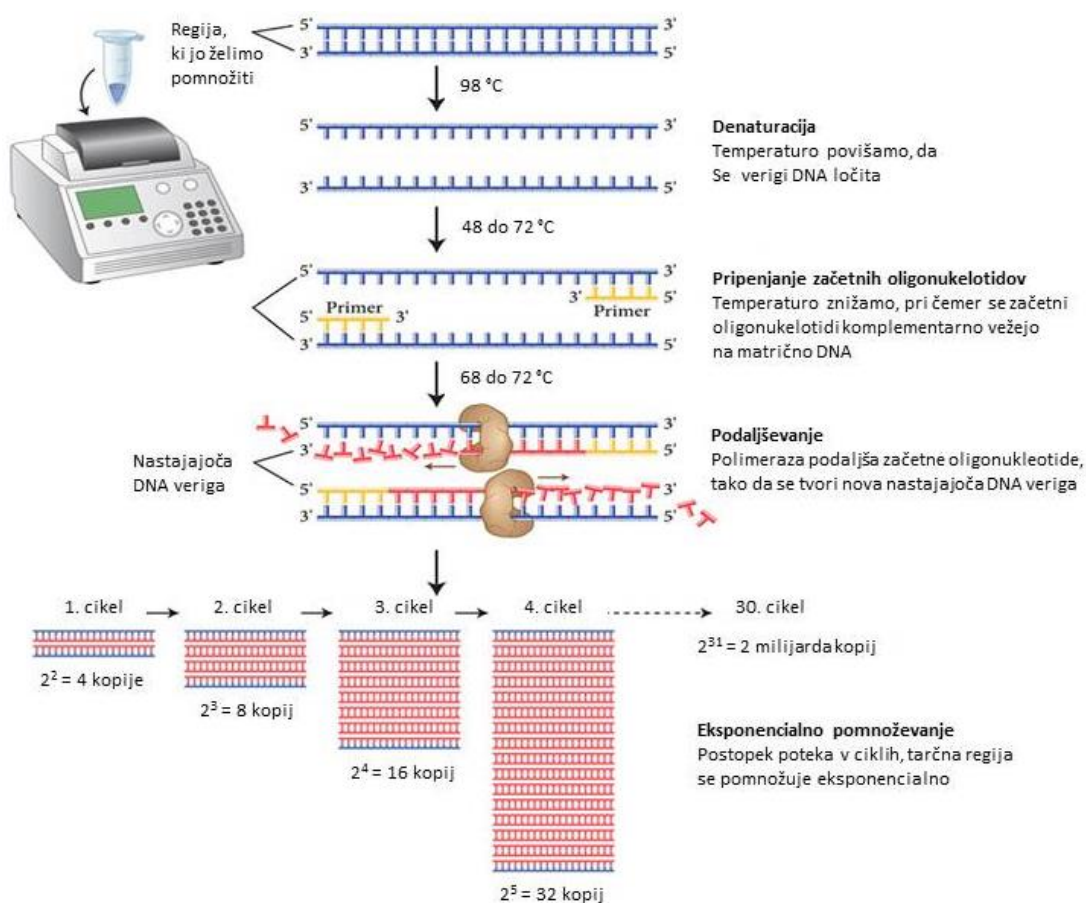
Slika 26: Receptorja CCR5 in CD14 na površini celice makrofaga ali dendritične celice.

6.1.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo, znana tudi pod angleško kratico PCR (Polymerase Chain Reaction), je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Lahko rečemo, da s to metodo kloniramo DNA, ne da bi za to potrebovali žive celice, to pa pred odkritjem PCR praktično ni bilo mogoče.

Kopiranje odsekov DNA poteka tako, da uporabimo dve kratki molekuli DNA, ki sta komplementarni začetnemu in končnemu delu segmenta, ki ga želimo kopirati, dodamo encim, raztopino soli in deoksiribonukleotide (gradnike DNA). Reakcija poteka verižno; to pomeni, da jo večkrat ponovimo. Pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji; tako lahko po 20 ponovitvah reakcije dobimo iz 1 kopije DNA teoretično več kot 1 milijon kopij. Temperatura reakcije se mora kontrolirano spreminjati. Za vezavo kratkih molekul DNA (začetnih oligonukleotidov) na matrico, ki jo želimo pomnoževati, je namreč nujno, da je matrica v enoverižni obliki, to pa dosežemo tako, da DNA za kratek čas segrejemo na 92 °C ali več (to stopnjo imenujemo denaturacija DNA). Da pride do prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico je treba temperaturo spet znižati (na 50 - 65 °C) (pripenjanje začetnih oligonukleotidov), nato pa spet prilagoditi pogojem, ki so optimalni za delovanje DNA-polimeraze – 72 °C (polimerizacija).

PCR izvajamo v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati. Določimo lahko temperature, trajanje inkubiranja, število ponovitev ciklov in podobno.



Slika 27: Shematski prikaz PCR reakcije

Ker se v vsakem ciklu število molekul podvoji, lahko število molekul želenega odsega DNA izračunamo po naslednji formuli:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

(N=št. molekul, N_0 = začetno št. molekul, n=št.ciklov)

V prvih nekaj ciklih nastajajo pridelki neposredno s pomnoževanjem matrične DNK, tu nastajajo tudi mnogi neželeni, nespecifični produkti. Kasneje je s pomnoževanjem nastalih produktov, rast števila produktov iz cikla v cikel eksponentna. Po določenem številu ciklov (običajno 35 do 45) pride do t.i. efekta PCR platoja, tj. ko novi produkti ne nastajajo več, zato ni smiselno povečevati števila ciklov v neskončnost. Vzrok za efekt platoja je verjetno ta, da zaradi prebitka pridelkov PCR, pri prilepjanju začetnih oligonukleotidov le-te izpodrinejo, se kompetitivno vežejo nazaj na drugo verigo DNK. Zato in da bi nastalo čim več produkta dajemo v reakcijo začetne oligonukleotide v prebitku.

6.1.2 Računanje količin reagentov potrebnih za uspešno PCR reakcijo

Za PCR reakcijo potrebujemo naslednje reagente:

- Vzorčno DNA
- Mononukleotide (dNTP)
- $MgCl_2$ (nekateri pufri ga že vsebujejo)
- Pufer
- Primer 1
- Primer 2
- Polimerazo

Da bo PCR reakcija uspešna in da bomo dobili produkte iz katerih bo razviden želen rezultat, moramo izbrati optimalne količine vsakega od reagentov.

Najpogosteje delamo 10 μL reakcije, kar pomeni, da je končen skupen volumen reakcijske mešanice 10 μL .

Količine potrebne vzorčne DNA, dNTP, pufra (z $MgCl_2$) in encima polimeraze so enake za vsako klasično PCR reakcijo, med tem ko moramo optimalno količino obeh primerjev določiti eksperimentalno, saj se le ta razlikuje glede na par primerjev.

Količino določenega reagenta potrebnega v neki reakciji izrazimo s koncentracijo – količino snovi v volumski enoti.

- Maska koncentracija: g/L (oz. g/mL, $\mu g/\mu L$, ng/ μL ...)
 - DNA
- Molarna koncentracija: mol/L = M (mmol/L = mM, mmol/ml = M...)

- dNTP, MgCl₂, primer-ji
- koncentracija encimov: U/L (U/μL...)

Koncentracija DNA

Eksperimente, kot so različne oblike PCR reakcije izvajamo večinoma tako, da uporabimo 50 ng vzorčne DNA.

Po izolaciji DNA vzorcem izmerimo koncentracijo s spektrofotometrično metodo in sicer tako, da izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Vse vzorce je najbolje razredčiti z vodo na isto koncentracijo – najpogosteje na 25 ng/μL, ter nato v eksperimentih uporabljati 2 μL tako razredčene DNA.

Za izračun vode in raztopine DNA, ki jo moramo dodati, uporabimo naslednjo formulo:

$$c \cdot V = c_1 \cdot V_1 + c_2 \cdot V_2 \qquad V = V_1 + V_2$$

c... končna koncentracija (25ng/μL)

V... končen volumen

c₁... koncentracija raztopine izolirane DNA

V₁... volumen raztopine izolirane DNA (ki ga moramo dodati, da dobimo želen končni volumen z želeno koncentracijo)

c₁... koncentracija DNA v vodi = 0!

V₁... volumen vode (ki ga moramo dodati, da dobimo želen končni volumen z želeno koncentracijo).

Pufer, dNTP in polimeraza

Pufer v reakcijski mešanici vzdržuje ustrezen pH v katerem encim polimeraza optimalno deluje. Nekaterim pufrom je dodan tudi MgCl₂.

dNTP-ji oz. mononukleotidi morajo biti prisotni, da se iz njih zgradijo nove verige oz. produkt. Zadostna koncentracija za klasičen PCR je 200 μM za vsak posamezen nukleotid (ATP, CTP, GTP, TTP). Za lažje delo si navadno pripravimo koncentrirano mešanico vseh štirih dNTP-jev, ki vsebuje 10mM vsakega dNTP, in jo uporabljamo za pripravo reakcijske mešanice.

Koncentracija encimov je vedno podana v enotah (U) na enoto volumna. Količina polimeraze, ki zadošča za uspešno PCR reakcijo s končnim volumnom reakcijske mešanice 10 μL je 0,5 U, oz. ustrezno večja v kolikor delamo z večjim volumnom, kar pomeni 0,05 U/μL.

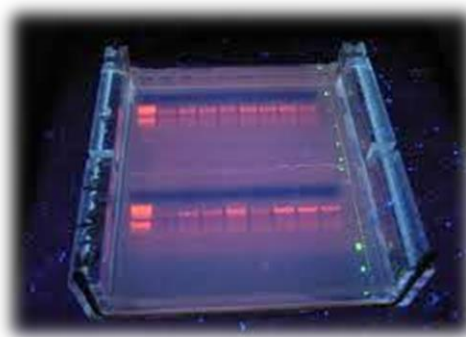
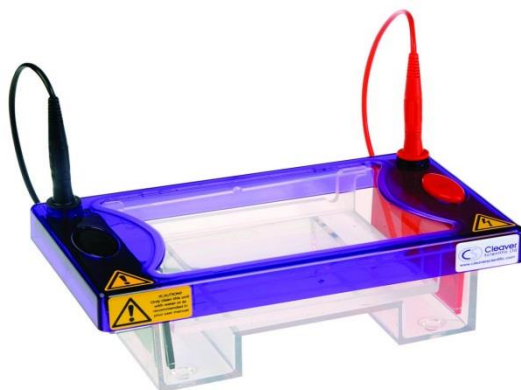
Optimizacija temperature in količine primerjev

Optimizacijo PCR začnemo z iskanjem najustreznejše temperature pripenjanja primerjev. To naredimo tako, da naredimo reakcijsko mešanico z maksimalno količino primerjev ter to mešanico dodamo 7krat k istemu vzorcu (ki je nanešen v 7 žepkov stripa oz. v 7 mikrotubic) ter tudi k vodi (negativna kontrola). Za vsako izmed 7 ponovitev izvajamo PCR pri različni temperaturi pripenjanja primerjev. Vse skupaj delamo v duplikatu (za 2 vzorca) ter na koncu na gelu preverimo, pri kateri temperaturi nastanejo najlepši produkti in najmanj oz. nič nespecifičnih produktov.

Tudi optimalno koncentracijo primerjev določimo eksperimentalno. Praviloma je PCR reakcija učinkovitejša, če je koncentracija višja, vendar pa prevelika količina primerjev privede do nespecifične vezave le teh, kar vodi v nastanek nespecifičnih produktov ter tvorbo primerskih dimerov.

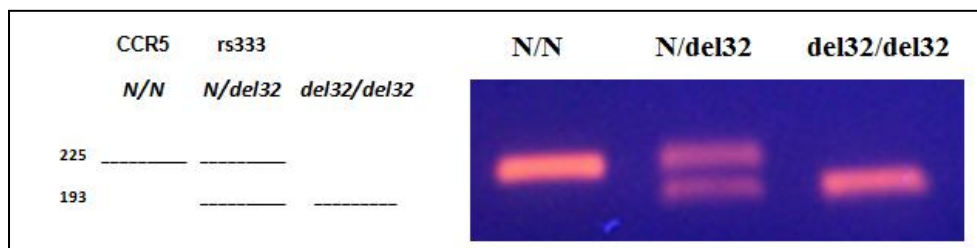
6.1.3 Gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza poteka v agaroznem ali pa poliakrilamidnem gelu, v pufru, ki omogoča stabilen pH in električno prevodnost. DNK je negativno nabita in potuje proti pozitivni elektrodi. Namen elektroforeze je preparativni ali analitski. Običajno poleg pridelka PCR ali odsekov DNK dodamo še velikostni marker, da lahko ocenimo velikost nastalih pridelkov PCR. Večje molekule DNA so namreč težje in potujejo počasneje v primerjavi z manjšimi. Na takšen način lahko ugotovimo za kateri alel DNK vsebuje določen vzorec.



Slika 28: Detekcija DNA na agaroznem gelu.

Ker gre pri mutaciji del32 na genu CCR5 za delecijo 32 baznih parov, bodo produkti PCR reakcije vzorcev z mutacijo 32 bp krajši – potovali bodo hitreje in bodo na gelu vidni nižje.



Slika 29: Shema in slika detekcije DNA na agaroznem gelu za SNP rs333 na genu CCR5

6.2 IZVEDBA VAJE

1. V žepček stripa odpipetiraj 2 μ L DNA raztopine (dodaj kontrolne vzorce in H₂O)!
2. Pripravite reakcijsko zmes v 0,5 mL epico.

št. vzorcev	1	x
DNA	2	
H ₂ O	11,3	
pufer	2	
MgCl ₂	1,2	
dNTP	0,4	
primer 1	1,5	
primer 2	1,5	
TAQ polimeraza	0,1	
	20	

3. Reakcijsko zmes premešaj na vorteksu.
4. V vsak žepček z DNA dodaj 18 μ L reakcijske zmesi
5. Strip pokrij s pokrovčkom, pazi da tesni in vlož v termociklizator (aparatus za PCR).
6. Poženi ustrezen program na aparatu PCR za 35 ciklov.
7. Po končani reakciji (reakcija traja približno 1,5 ure) vzemi vzorce iz aparata in produkte nanesi na agarozni gel.

Analiza PCR produktov na agaroznem gelu

Uporabili bomo nosilec dimenzij 7 cm x 8 cm. Za gel z želeno debelino 0,7 cm potrebujemo: 7 cm x 8 cm x 0,7 cm ~ 40 mL gelske raztopine. za 2,0 % agarozni gel zatehtamo 0,8 g agaroze (40 mL · 2/100) in jo raztopimo v 40 mL 1 x TBE pufru v erlenmajerici. Zmes segrevamo v mikrovalovni pečici tako dolgo, dokler se agaroz popolnoma ne raztopi. Zmes malo ohladimo in dodamo 3,0 μ L etidijevega bromida (kancerogen – pri odmerjanju obvezno uporabljamo rokavice). Sestavimo nosilec ter vstavimo glavniček. V nosilec vlijemo pripravljeno zmes in počakamo, da se gel strdi. Odstranimo glavniček in gel je pripravljen za nanos vzorcev

Ko je gel pripravljen, ga potopimo v 1 x TBE pufer. V žepke naneseemo vzorce in sicer tako, da 10 μ L vzorca pomešamo s 5 μ L barvila 0,25 % ksilen/cianol, 40 % saharoza. Elektroforeza naj teče pri napetosti 150 V približno 20 min.

7 LABORATORIJSKE PREISKAVE V KLINIČNI HEMATOLOGIJI

7.1 TEORETIČNE OSNOVE

Kri je gosto, tekoče, pretakajoče se notranje okolje organizma, ki je gostejše od vode. Sestavljena iz 3000 ml plazme in 2000 ml celic (slika 1). Plazma je slana tekočina , sestavljena iz 92 % vode. V plazmi so raztopljene beljakovine (albumini, globulini , fibrinogen). 60 % beljakovin v plazmi pripada albuminom. V plazmi se prenašajo plini (kisik, CO₂...), hranila, produkti presnove, hormoni, vitamini in toplota.

Krvne celice imajo različne naloge :

- eritrociti prenašajo kisik in puferirajo kri,
- levkociti skrbijo za obrambo telesa pred vdorom mikrobov,
- trombociti skupaj s koagulacijskim sistemom skrbijo, da ne izkrvavimo.

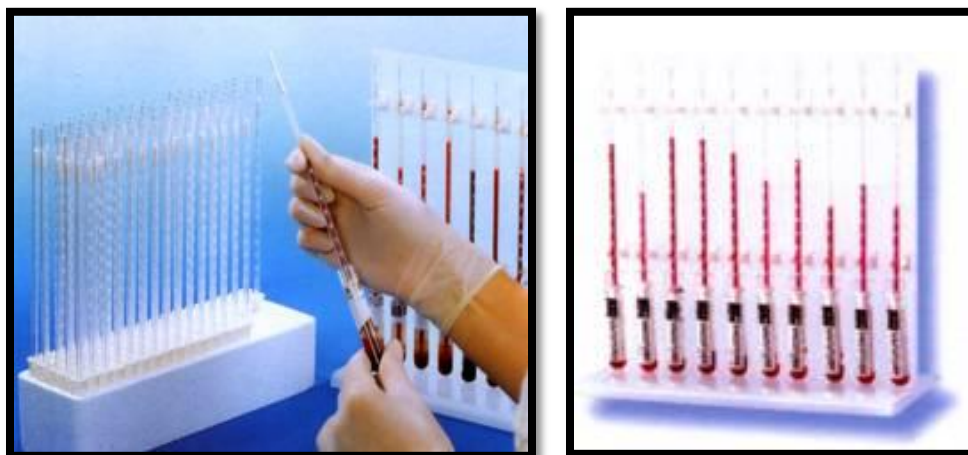
A) Ocenjevanje teže celic – določanje hitrosti sedimentacije krvi (SE)

Hitrost sesedanja eritrocitov (SE) v citrirani krvi pomeni sesedanje eritrocitov v časovni enoti.

Najpogosteje določamo hitrost SE po eni uri. Sesedanje eritrocitov je posledica sile težnosti, saj imajo eritrociti večjo specifično težo kot plazma. Kot normalna SE se vrednoti vrednost od 0 do 15 mm/h. Na hitrost zviševanja SE pa imajo vpliv številna patološka stanja :

- makromolekule, ki vežejo eritrocite: prisotnost fibrinogena, CRP, IgM
- viskoznost plazme: na spremenjeno viskoznost vpliva predvsem fibrinogen
- izguba elektrostatičnega naboja eritrocitne membrane : nastajajo gručaste eritrocitov, kar poveča težo delcev
- velikost eritrocitov: makrociti, mikrociti, sferociti

Za določanje sedimentacije se uporablja več različnih metod, najpogosteje pa metoda določevanja po Westergreen-u.



Slika 30: Izvedba določanja SE po Westergreen-u.

B) Preprečevanje krvavitve pri sesalcih – pomen trombocitov in encimov

Hemostaza ali ustavljanje kvavitve je encimski proces, katerega naloga je preprečevanje, da ne izkrvavimo. Nasproten proces je fibrinoliza ali razgrajevanje krvnega strdka, ki preprečuje nalaganje strdkov po žilah. Normalen pretok krvi je odvisen od ravnotežja med obema sistemoma. Če pride do poškodbe žile, se ta skrči in preprečuje iztekanje krvi. Na mestu poškodbe se prično nabirati trombociti, ki sproščajo energijo in receptorje za vezavo faktorjev koagulacije. Istočasno se aktivirajo koagulacijski faktorji preko notranjega ali zunanega sistema. Nastane rdeči strdek.

C) Določanje hemoglobina (Hb) s fotometrično metodo

Poznavanje koncentracije Hb je pomembno, da vemo, ali so celice dovolj oskrbljene s kisikom. Kadar se koncentracija Hb zniža, govorimo o slabokrvnosti ali anemiji. Normalne vrednosti se pri ljudeh razlikujejo glede na spol in starost. Normalna vrednost Hb je od 120 do 160 g/L.

Vrednost hemoglobina določimo s fotometrom. Kemična reakcija nastane v mikrokiveti, po 60 s pa se pokaže rezultat. V mikrokiveti je natrijev deoksiholat, ki hemolizira eritrocite in nastane methemoglobin.

D) Določanje krvnih skupin ABO

Na membrani eritrocitov se nahajajo številni antigeni, ki v stiku z neskladno krvjo povzročijo tvorbo protiteles in kasnejšo transfuzijsko (hemolitično) reakcijo. Na vajah bomo določevali 2 skupini : ABO in Rh.

ABO sistem : na membrani eritrocita najdemo *agutinogene* A, B , AB ali pa jih ni, v serumu pa protitelesa (*aglutinini*) anti A, anti B, anti AB ali pa jih ni:

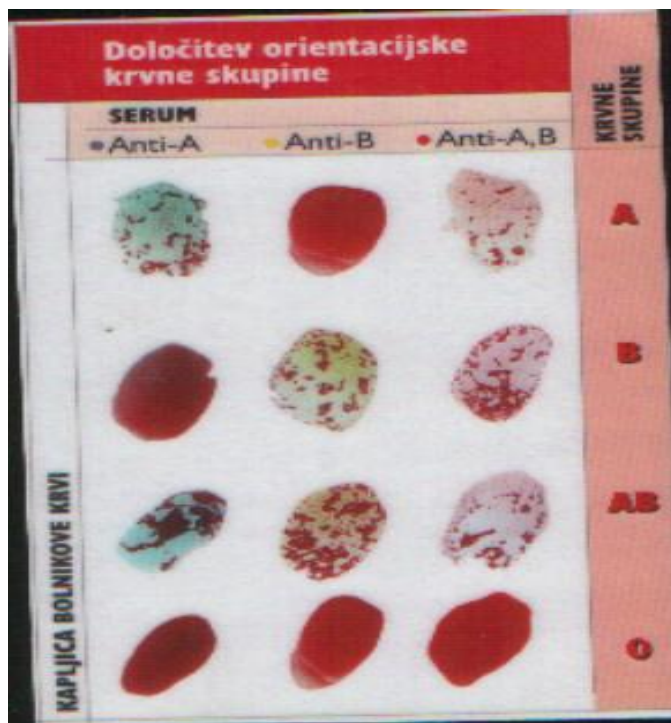
Krvna skupina	Antigen na eritrocitu	Protitelesa v plazmi
O	 brez A ali B antigena	 „anti-A“ in „anti-B“
A	 A antigeni	 „anti-B“
B	 B antigeni	 „anti-A“
AB	 A in B antigeni	Nobeno

Slika 31: Antigeni in protitelesa ABO.

Novorojenček še nima v krvi protiteles ABO. Šele v prvih mesecih po rojstvu se le ta razvijejo in to proti antigenom, ki jih lastni eritrociti nimajo. V Evropi prevladujeta krvni skupini A in O (skupaj 80%) .

Rhesus (Rh) sistem : protitelesa prot antigenom Rh se razvijejo šele po stiku neskladne krvi, kar imenujemo *senzibilizacija*. V sistemu Rh je 5 pomembnih antigenov : C, D, E , c,in e, med katerimi ima največji antigeni učinek D. Kri, ki vsebuje antigen D , označimo kot *Rh D pozitivno*, tisto, ki ji manjka ta antigen pa kot *Rh d negativno*. V Evropi je 85 % ljudi RhD pozitivnih.

Razlika med ABO sistemom in Rh sistemom je v tem, da so aglutinini sistema ABO po porodu že kmalu prisotni, medtem, ko se pojavijo protitelesa anti D šele po stiku z neskladno krvjo.

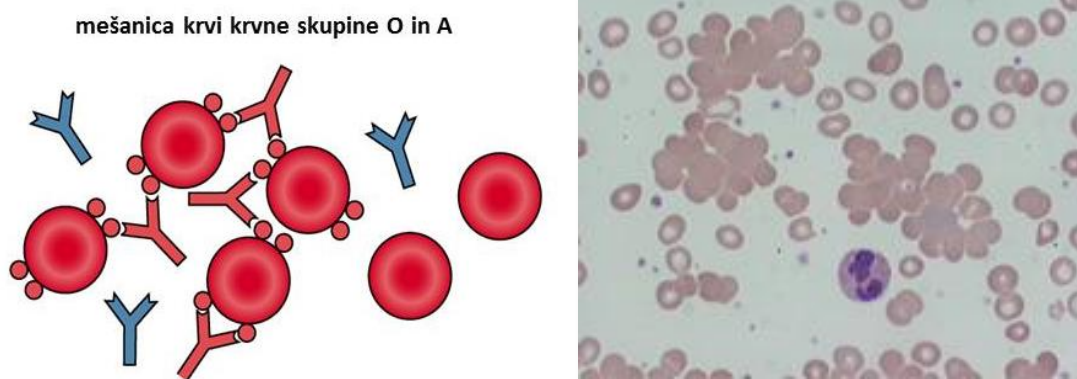


Slika 32: Določanje ABO na ploščici.

Za določanje krvne skupine uporabljamo serume, v katerih je večja količina antigenov - aglutininov. Za lažjo prepoznavo so serumi obarvani: serum z aglutinini anti B je rumen, serum z aglutinini anti A moder, serum z aglutinini anti A in anti B je brezbarven. Serum, ki vsebuje protitelesa anti D je prav tako brezbarven. Princip določanja krvne skupine je imunološki in sicer po mešanju preiskovančeve krvi s testnimi serumi ugotavljamo nastanek ali odsotnost aglutinacije. Nastanek aglutinacije pomeni reakcijo antigen protitelo.

E) Imunološka reakcija – aglutinacija eritrocitov

Aglutinacija je imunološka reakcija, ki nastane pri mešanju neskladne krvi. Vzrok aglutinacije je reakcija med antigenom in protitelesom. Na membrani eritrocitov so številni antigeni, značilni za posameznike in vsaj 30 od do sedaj znanih 400 lahko povzroči aglutinacijo in hemolitično reakcijo.



Slika 33: Princip aglutinacije in slika pod mikroskopom (levo).

F) Krvni razmaz pod mikroskopom

Krvne celice nastajajo v rdečem kostnem mozgu iz matičnih celic pod vplivom rastnih faktorjev v primernem mikrookolju. V krvni obtok prispejo le zrele, diferencirane celice. Nastajanje krvnih celic se imenuje hematopoeza.

Celice obarvamo in si jih ogledamo pod mikroskopom. Najenostavnejši način barvanja je May-Grünwald – Giemsa. Na ta način se nekatere celice obarvajo rdeče – eozinofilno, nekatere modro – bazofilno in nekatere vijoličasto – nevtralno (slika). Opazujemo velikost celic, izgled jedra, obarvanost citoplazme, vključke, zrnca. Kadar sumimo, da gre za krvne bolezni (levkemije) so potrebni še drugi načini barvanja celic.

V krvi zdravega človeka najdemo s tem načinom barvanja zrele celice:

- Eritrociti so brezjedrne celice, ki se obarvajo rdeče. Pod mikroskopom so videti včasih združene v skupinah (roleaux). Sredina eritrocita je zaradi svoje bikonkavne oblike svetlejša od periferije.
- Levkociti
 - *segmentirani nevtrofilni levkociti* so celice, ki so dobile ime po razčlenjenem (segmentiranem) jedru, ter zrnih (granulih), ki se nevtralno – vijolično obarvajo. Redkeje (ob hudih okužbah) najdemo *paličaste nevtrofilce*, ki so mlajši in še nimajo razčlenjenega, segmentiranega jedra.
 - *eozinofilni granulociti*: jedro ni tako razčlenjeno kot pri nevtrofilcih, zrnca so obarvana intenzivno rdeče. V razmazu se najdejo le ob okužbah s paraziti.
 - *bazofilni granulociti*: citoplazma ima modra velika zrnca. V razmazu zdravih jih redko najdemo.
 - *limfociti*: so srednje velike celice z velikim, vijoličastim jedrom, citoplazme je malo.
 - *monociti*: velike celice s fižolastim jedrom in svetlo, obilno citoplazmo.
- Trombociti: so majhne, vijoličaste celice v skupkih

7.2 IZVEDBA VAJE

MATERIALI

- A) Pipeta za določanje SE, stojalo, epruveta s citratom, štoparica
- B) Dve epruveti s krvjo, ploščica z vdolbinicami
- C) Kapljica krvi, mikrokiveta, fotometer za določanje Hb, štoparica
- D) Ploščica za določanje krvnih skupin, testni serumi z aglutinini, set za mešanje in redčenje krvi (jodove palčke, fiziološka raztopina)
- E) Stekelce, dve različni kapljici krvi neskladnih skupin, imerzijsko olje, mikroskop
- F) Stekelce, pripravljen krvni prapart, imerzijsko olje, mikroskop

POSTOPEK

A) Ocenjevanje teže celic – določanje hitrosti sedimentacije krvi (SE)

- Epruveto s citratom do oznake napolnimo s krvjo. Epruveto označimo (ime, priimek). Kri dobro premešamo s citratom.
- Z epruvete odstranimo pokrov in vanjo potisnemo pipeto za določanje SE, ki jo obračamo toliko časa, da stolpec krvi pride do označbe 0.
- Epruveto s pipeto vstavimo v stojalo in vklopimo štoparico.
- Zapišemo si ime in priimek preiskovanca, čas pričetka merjena SE in številko v stojalu.
- Vrednost SE v mm/h odčitamo po eni uri.

B) Preprečevanje krvavitve pri sesalcih – pomen trombocitov in encimov

- Iz vsake epruvete prilijemo nekaj kapljic krvi v vdolbinice na ploščici. Opazujemo nastajanje krvnega strdka.

C) Določanje hemoglobina (Hb) s fotometrično metodo

- H kapljici krvi približamo mikrokiveto, ki zaradi kapilarne aktivnosti vsrka 10 μ L krvi.
- Mikrokiveto vstavimo v fotometer.
- Po 45-60 s odčitamo rezultat.

D) Določanje krvnih skupin

- Na ploščici v 4 vdolbinice z označbami nakapljamo po 2 kapljici krvi
- V vdolbinice nakapljamo serume s protitelesi anti A, anti B in anti AB, v zadnjo pa anti RhD.

- Kri in serum premešamo pazljivo z jodovo palčko in opazujemo ali se pojavi aglutinacija.

E) Imunološka reakcija – aglutinacija eritrocitov

- Na stekelce kanemo dve kapljici neskladnih krvnih skupin in jih premešamo
- Vzorec si ogledamo in že s prostim očesom vidimo aglutinacijo
- Preparat si nato ogledamo še pod mikroskopom

F) Krvni razmaz pod mikroskopom

- Na pripravljeno objektno stekelce kani 1-2 kapljici olja.
- Glej pod veliko povečavo.
- Najdi vsaj 3 različne celice in jih skiciraj.

8 LITERATURA

1. William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino: Concepts of Genetics, 10. izdaja, Pearson, 2012
2. William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino: Essentials of Genetics, 8. izdaja, Pearson, 2012
3. Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott: Molecular Cell Biology, 7. izdaja, Freeman, 2012
4. Rodney Boyer: Temelji biokemije, Študentska založba, 2008
5. Thomas M. Devlin: Textbook of Biochemistry with clinical correlations, 6. izdaja, Willey-Liss, 2006
6. David L. Nelson, Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, 4. izdaja, Freeman, 2005
7. Avberšek Lužnik I, Čelhar T, Karas Kuželički N, Milek M, Pajič T. Vaje iz klinične kemije ena. Univeza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo: Ljubljana 2010
8. Bavec A, Zorko M, Stojan J. Navodila za laboratorijske vaje iz biokemije s teoretičnim dodatkom. Študentska založba: Ljubljana 2008
9. Glaser M. Navodila za vaje iz fiziologije celice: Maribor 2006
10. Senčič L. Nabodila za vaje iz Biokemije za študente Fakultete za kmetijstvo: Maribor 2001
11. Sepčič K. Biokemijski praktikum za pedagoge. Študentska založba: Ljubljana 2004