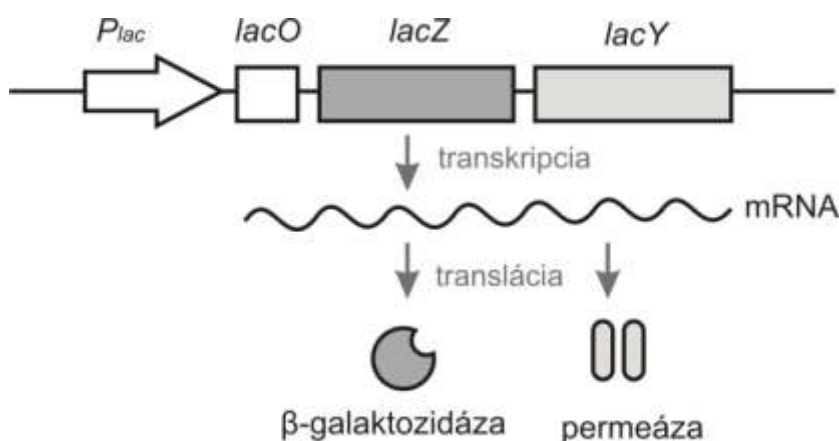


Téma: Molekulárna biológia – Expresia génov u prokaryotov

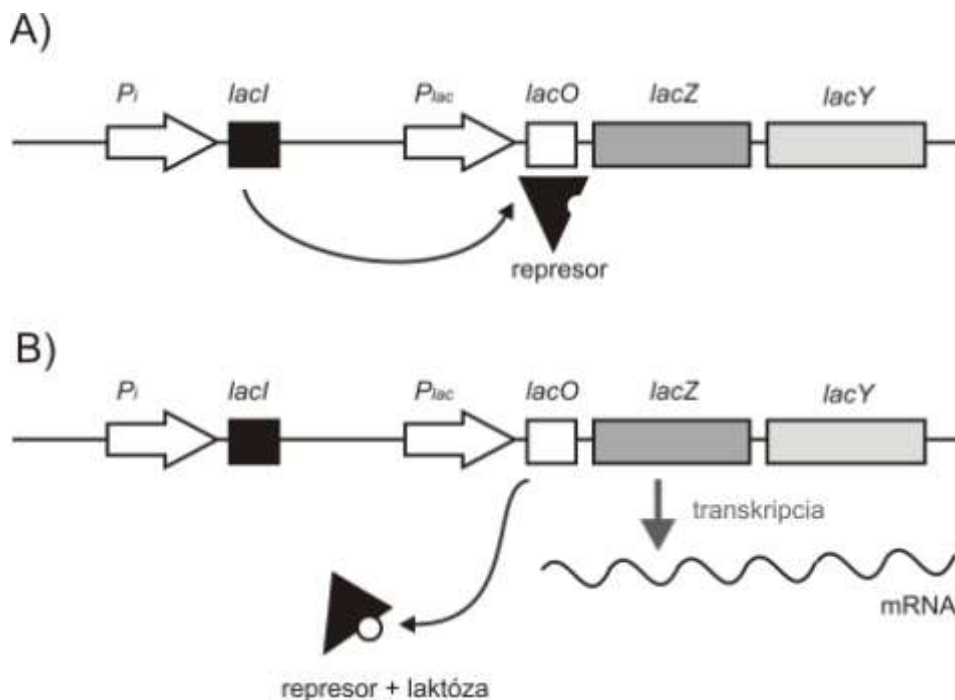
Baktérie druhu *Escherichia coli*, ktoré sa bežne vyskytujú v ľudskom tráviacom trakte, sú často vystavené zmenám v chemickom zložení prostredia. Tieto zmeny, spôsobené výkyvmi v zložení potravy prijímanej ich hostiteľom, vyžadujú aby sa bakteriálny metabolizmus dokázal rýchlo prispôbiť aktuálnym podmienkam.

Preferovaným zdrojom energie je pre *E. coli* glukóza. Ak sa však bunky dostanú do kontaktu s potravou, ktorá obsahuje málo glukózy, ale je bohatá napríklad na laktózu (mlieko), je potrebné začať syntetizovať enzým nevyhnutný pre jej metabolizmus (β -galaktozidáza). Navyše je potrebné vytvoriť aj prenášačový proteín zodpovedný za transport laktózy do buniek (β -galaktozid permeáza). Gény, kódujúce tieto proteíny (*lacZ*, *lacY*), sa v genóme nachádzajú vedľa seba a ich expresia je regulovaná rovnakými regulačnými oblasťami – vytvárajú operón. Ak je v prostredí prítomná laktóza, RNA-polymeráza sa viaže na oblasť promótoru (P_{lac}) tohto operónu a prepíše nasledujúce sekvencie do mRNA. Transláciou tejto mRNA potom vznikajú oba proteíny, čo zabezpečuje ich súčasnú produkciu (pozri obrázok).



Ako je však zabezpečené, že gény laktózového operónu sú exprimované (vytvárajú sa z nich proteíny) iba v prítomnosti laktózy? Na prechádzajúcom obrázku ste si možno všimli aj oblasť označenú *lacO*, ktorú nazývame operátor. Sem sa v neprítomnosti laktózy viaže proteín označovaný ako represor, ktorý je kódovaný mimo operónu a konštitutívne (neustále) produkovaný. Ak je represor naviazaný na operátor, zabraňuje transkripcii operónu RNA-polymerázou a tým aj produkcii proteínov nevyhnutných pre metabolizmus laktózy (Obr. 2A).

Ak sa však v prostredí objaví laktóza, naviaže sa na represor a spôsobí jeho odpadnutie z operátora, čo má za následok expresiu génov *lac* operónu (Obr. 2B). Laktóza teda pôsobí ako induktor *lac* operónu.



Meranie aktivity β -galaktozidázy

Predstavte si, že chcete využiť regulačné oblasti *lac* operónu (promótor a operátor) tak, že za ne, namiesto génov pre β -galaktozidázu a permeázu, zaradíte gén, ktorý kóduje produkt využiteľný v biotechnológiách (napr. lipázu aktívnu pri nízkej teplote, ktorú chcete potom izolovať a pridávať do pracích práškov).

Vo vidine rýchleho zbohatnutia ste teda požiadali kamaráta organického chemika aby vám pripravil rôzne analógy laktózy a dúfate, že medzi nimi nájdete taký, ktorý je schopný indukovať vysokú expresiu génov *lac* operónu aj v podstatne nižších koncentráciách ako laktóza. Vášmu kamarátovi sa ale veľmi nedarilo, keďže všetky analógy, ktoré doteraz pripravil, boli okrem jedného pre *E. coli* toxické. Netoxický analóg ste nazvali ignóza*. Vašou úlohou bude otestovať, či dokáže ignóza pri rovnakej koncentrácii (0.05 mol.l^{-1}) indukovať *lac* operón efektívnejšie ako laktóza. Aby ste dokázali stanoviť intenzitu indukcie, budete merať aktivitu β -galaktozidázy s využitím substrátu ONPG (o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozid). Ak je ONPG poštiepené β -galaktozidázou, vzniká žltý produkt, ktorého množstvo vieme stanoviť spektrofotometricky.

*

* Ignóza je fiktívna látka

Pomôcky:

- skontrolujte, či máte k dispozícii všetky uvedené pomôcky, ak nie, kontaktujte vedúceho úlohy
- 2 mikroskúmavky s bakteriálnou kultúrou označené LAC a IGN (indukované laktózou a ignózou)
- 2 prázdne mikroskúmavky označené LAC a IGN
- 2 skúmavky označené S (obsahujú roztok substrátu ONPG)
- 2 skúmavky označené SDS (obsahujú 0.1% roztok detergentu SDS)
- 2 skúmavky označené STOP (obsahujú 1 mol.l⁻¹ roztok uhličitanu sodného)
- plastová Pasteurova pipeta
- plastové špičky
- kadička s destilovanou vodou na preplachovanie pipety
- nádoba na odpad
- centrofixka
- hárok označený “Spektrofotometrické merania”

Postup:

- pracujte v rukaviciach
 - všetky roztoky, ktoré používate sú pripravené v presných objemoch, preto prenášajte pipetou celý objem roztoku ak nie je v postupe uvedené inak
 - po každom použití prepláchnite pipetu destilovanou vodou
 - pri prenášaní malých objemov si môžete pomôcť plastovou špičkou, nasadenou na koniec pipety
- 1) Označte skúmavky s bakteriálnymi kultúrami LAC a IGN, prázdne skúmavky LAC a IGN a hárok na výsledky spektrofotometrických meraní svojím súťažným číslom.
 - 2) K obom bakteriálnym kultúram v skúmavkách LAC (indukované laktózou) aj IGN (indukované ignózou) pridajte roztok detergentu SDS, skúmavku zatvorte a premiešajte prevrátením.
 - 3) Inkubujte v termostate pri teplote 28 °C, 5 minút.
 - 4) Ku kultúram potom rýchlo pridajte roztok substrátu (S) a premiešajte.
 - 5) Inkubujte v termostate pri teplote 28 °C, 5 minút.
 - 6) Zastavte reakciu rýchlym pridaním roztoku STOP a premiešajte.
 - 7) Privolajte vedúceho úlohy a odovzajte mu skúmavky so zastavenou reakciou na centrifugáciu
 - 8) Vedúci úlohy vám vráti scentrifugované reakcie. Dávajte pozor aby ste obsah skúmavky opäť nepremiešali.
 - 10) Pipetou opatrne odoberte asi 1 – 1.5 ml žltého roztoku nad sedimentom do zodpovedajúcej prázdnej mikroskúmavky (LAC a IGN) označenej vaším súťažným číslom. Roztok odoberajte opatrne, aby ste nenabrali aj sediment.
 - 11) Takto pripravené vzorky odovzdajte vedúcemu úlohy spolu s hárkom “Spektrofotometrické merania” a počkajte, kým vám vráti výsledky meraní (tento hárok neskôr odovzdáte spolu

s riešením). Medzičasom môžete riešiť doplňujúce úlohy.

Výsledky

1) Do nasledujúcej tabuľky opíšte výsledné hodnoty spektrofotometrických meraní

použitý induktor	laktóza	ignóza
OD ₆₀₀ 10x zriedenej kultúry		
A ₄₂₀		
A ₅₅₀		

2) Aby ste mohli porovnať aktivitu β-galaktózidázy vo vašich vzorkách, potrebujete ju teraz vyjadriť v tzv. Millerových jednotkách (MU). Aktivita sa vypočíta podľa vzorca:

$$\text{MU} = 1000 \times \frac{A_{420} - (1,75 \cdot A_{550})}{t \cdot v \cdot \text{OD}_{600}}$$

Dosaďte do vzorca výsledky meraní (OD₆₀₀ pre pôvodnú kultúru, nie pre zriedenú), čas reakcie v minútach (t) a objem kultúry v reakcii (100 μl) v mililitroch (v). Vypočítajte aktivitu β-galaktózidázy v Millerových jednotkách a výsledky uveďte ako celé čísla.

Aktivita β-Gal v kultúre indukovanej laktózou bola _____ MU

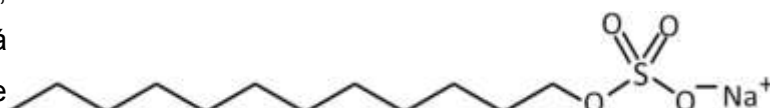
Aktivita β-Gal v kultúre indukovanej ignózou bola _____ MU

3) Na základe získaných výsledkov napíšte, či je ignóza pri indukcii *lac* operónu účinnejšia ako laktóza a svoju odpoveď vysvetlite.

Doplňujúce úlohy

4) Enzým β-galaktózidáza sa vyskytuje vo vnútri buniek. Aby sme mohli merať jej aktivitu, potrebujeme bunky rozrušiť a zabezpečiť, že sa proteín dostane do reakčnej zmesi. Roztok detergentu SDS (dodecylsírán sodný),

ktorý ste k reakčnej zmesi pridávali má práve takúto úlohu. Na obrázku nižšie

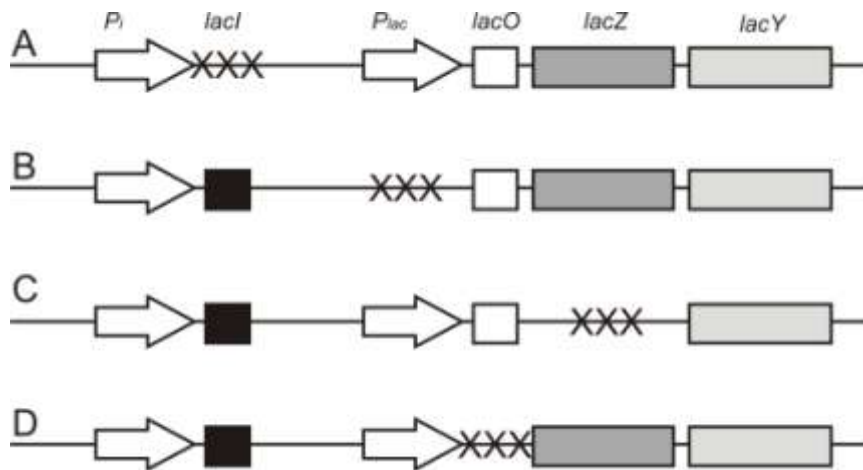


vidíte štruktúru SDS. Pokúste sa vysvetliť, prečo dokáže SDS rozrušiť bunkové membrány.

5) Laktózový operón je príkladom transkripčnej regulácie génovej expresie, čiže systému, pri ktorom sa o vytvorení / nevytvorení proteínu rozhoduje už na úrovni zapínania a vypínania transkripcie génu, ktorý ho kóduje. Okrem toho však bunky využívajú aj iné typy regulácie, napríklad degradáciu už transkribovanej mRNA, znemožnenie translácie mRNA, či degradáciu proteínu až po translácii. Napíšte a vysvetlite, ktorý zo štyroch spomenutých regulačných mechanizmov je pre bunky najmenej nákladný z hľadiska energie a zdrojov, ktoré musia využiť.

6) Je zaujímavé, že minimálna expresia génov *lac* operónu prebieha aj v neprítomnosti laktózy. Vedeli by ste vysvetliť, aký význam má tento jav? Pomôcka – na to, aby sa laktóza naviazala na represor, musí sa dostať do bunky.

7) Jedna z možností ako študovať funkciu jednotlivých sekvencií v genóme je príprava delečných mutantov, ktorým konkrétne sekvencie chýbajú. Pripravili ste štyroch delečných mutantov (A – D), pričom každému z nich chýba niektorá súčasť *lac* operónu. Keď ste ich ďalej analyzovali, zistili ste, že niektoré z nich produkujú veľké množstvá β -galaktozidázy aj bez prítomnosti laktózy. Tiež ste medzi nimi našli také, ktoré β -galaktozidázu neprodukujú ani keď im do média pridáte laktózu. Určte, ako sa budú správať jednotlivé mutanty a vysvetlite svoje tvrdenie. Na obrázku nižšie sú deletované úseky označené krížikmi.



Mutanty _____ produkujú β -galaktozidázu aj bez prítomnosti laktózy, pretože:

Mutanty _____ neprodukujú β -galaktozidázu ani v prítomnosti laktózy, pretože:

Autor: Bc. Jaroslav Ferenc
 Recenzia: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.
 Redakčná úprava: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.
 Slovenská komisia Biologickej olympiády
 Vydal: IUVENTA Slovenský inštitút mládeže, Bratislava 2015