

Spis treści

Przedmowa	9
Wykaz stosowanych oznaczeń	11
Zasady bezpieczeństwa i higieny pracy obowiązujące w Pracowni biochemii białek	13
1. Izolacja i oczyszczanie enzymu	15
1.1. Izolacja i wstępne oczyszczanie 1,2-dioksygenazy katecholowej	15
1.1.1. WPROWADZENIE	15
1.1.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	18
1.1.3. WYKONANIE	19
1.1.3.1. Izolacja i wstępne oczyszczanie 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KB2	19
1.1.3.2. Oznaczanie aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej	21
1.1.3.3. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda	22
1.1.3.3.1. Przygotowanie krzywej wzorcowej	22
1.1.3.3.2. Oznaczenie stężenia białka w badanym materiale biologicznym	23
1.1.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	23
1.2. Wyznaczanie mas cząsteczkowych białek metodą sączenia żelowego oraz oczyszczanie białek metodą chromatografii jonowymiennej	24
1.2.1. WPROWADZENIE	24
1.2.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	25
1.2.3. WYKONANIE	26
1.2.3.1. Wyznaczenie masy cząsteczkowej 1,2-dioksygenazy katecholowej metodą sączenia żelowego	26
1.2.3.2. Oczyszczanie 1,2-dioksygenazy katecholowej metodą chromatografii jonowymiennej	28
1.2.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	29
1.3. Elektroforeza dwuwymiarowa 2-DE białek	30
1.3.1. WPROWADZENIE	30
1.3.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	32
1.3.3. WYKONANIE	32
1.3.3.1. Przygotowanie surowej frakcji enzymatycznej do elektroforezy 2-DE	32

1.3.3.2. Przygotowanie krzywej wzorcowej do oznaczania stężenia białka metodą Bradforda w obecności buforu do przygotowywania próbek 2-DE	33
1.3.3.3. Rehydratacja pasków IPG	34
1.3.3.4. Izoogniskowanie białek z zastosowaniem pasków IPG	34
1.3.3.5. Przygotowanie pasków do drugiego kierunku SDS-PAGE i rozdział elektroforetyczny	35
1.3.3.6. Detekcja białek w żelu poliakrylamidowym metodą z Coomassie Brilliant Blue	36
1.3.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	36
1.4. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	36
1.4.1. WPROWADZENIE	36
1.4.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	38
1.4.3. WYKONANIE	38
1.4.3.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego i rozdział białek	38
1.4.3.2. Detekcja białek w żelu poliakrylamidowym metodą z Coomassie Brilliant Blue oraz metodą srebrową	39
1.4.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	40
1.5. Literatura	40
2. Kinetyka reakcji enzymatycznej katalizowanej przez 1,2-dioksygenazę katecholową	43
2.1. Wyznaczanie optymalnych warunków reakcji enzymatycznej	43
2.1.1. WPROWADZENIE	43
2.1.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	44
2.1.3. WYKONANIE	45
2.1.3.1. Badanie wpływu temperatury na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	45
2.1.3.2. Badanie wpływu pH na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	46
2.1.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	47
2.2. Wyznaczanie stałych kinetycznych reakcji enzymatycznej	48
2.2.1. WPROWADZENIE	48
2.2.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	51
2.2.3. WYKONANIE	52
2.2.3.1. Badanie wpływu stężenia substratu na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	52
2.2.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	53
2.3. Inhibicja reakcji enzymatycznych	54
2.3.1. WPROWADZENIE	54
2.3.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	55
2.3.3. WYKONANIE	56
2.3.3.1. Badanie wpływu 2,4-dichlorofenolu na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	56

2.3.3.2. Badanie wpływu jonów niklu na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	57
2.3.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	58
2.4. Literatura	59
3. Immobilizacja 1,2-dioksygenazy katecholowej.	61
3.1. Wpływ immobilizacji na aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej	61
3.1.1. WPROWADZENIE	61
3.1.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	62
3.1.3. WYKONANIE	63
3.1.3.1. Immobilizacja 1,2-dioksygenazy katecholowej	63
3.1.3.2. Oznaczanie stężenia białka w kulkach alginianowych	63
3.1.3.2.1. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej dla oznaczania stężenia białka metodą Bradforda w obecności KOH	63
3.1.3.2.2. Oznaczanie stężenia białek w kulkach alginianowych metodą Bradforda w obecności KOH	64
3.1.3.3. Oznaczanie aktywności immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	64
3.1.3.4. Wpływ czasu przechowywania na aktywność wolnego i immobilizowanego enzymu	65
3.1.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	66
3.2. Badanie właściwości immobilizowanego enzymu	67
3.2.1. WPROWADZENIE	67
3.2.2. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	68
3.2.3. WYKONANIE	69
3.2.3.1. Badanie wpływu pH na aktywność wolnej i immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	69
3.2.3.2. Badanie wpływu temperatury na aktywność wolnej i immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	70
3.2.3.3. Badanie wpływu jonów metali oraz związków fenolowych na aktywność wolnej i immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej	71
3.2.3.4. Oznaczanie stężenia białka w surowej frakcji enzymatycznej i w kulkach alginianowych	72
3.2.4. OPRACOWANIE I DOKUMENTACJA WYNIKÓW	73
3.3. Literatura	74