



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

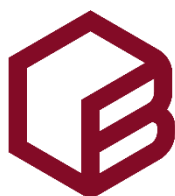


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00

INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII

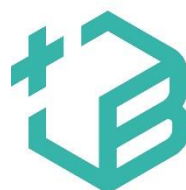
*dla kierunku lekarskiego
Politechniki Bydgoskiej
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Technologii
i Inżynierii Chemicznej



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Medyczny



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

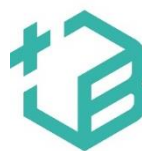
KWASY NUKLEINOWE



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Technologii
i Inżynierii Chemicznej



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
Wydział Medyczny



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Materiał do przygotowania przez studenta na zajęcia

- Zasady heterocykliczne i aldopentozy wchodzące w skład kwasów nukleinowych, wzory strukturalne
- Nukleotydy i nukloozydy, budowa, wzory strukturalne, funkcje biologiczne nukleotydów
- DNA – budowa, komplementarne parowanie zasad, funkcje, właściwości DNA, denaturacja DNA
- RNA – budowa, rodzaje, funkcje biologiczne RNA.
- Histony, nukleosom, chromatosomal – budowa i funkcje
- Pojęcia genu i genomu
- Struktura i organizacja chromatyny (budowa kwasów nukleinowych, struktura przestrzenna kwasów nukleinowych, białka chromatynowe)
- Replikacja DNA (mechanizm, enzymy uczestniczące w tym procesie, miejsca inicjacji i terminacji, kierunki replikacji, fragmenty Okazaki, telomery, uszkodzenie, naprawa i rekombinacja DNA)
- Transkrypcja (transkrypcja mRNA, przetwarzanie postranskrypcyjne, hnRNA, splicing, regulacja transkrypcji, inhibitory transkrypcji)
- Translacja (budowa mRNA, cechy kodu aminokwasowego, kodon, kody genetyczne mRNA, odcinki strukturalne i funkcjonalne mRNA, budowa tRNA, antykodony, oddziaływanie kodon-anty kodon, aktywacja aminokwasów, struktura rybosomów, poszczególne etapy procesu translacji, regulacja translacji, inhibitory translacji, modyfikacja białek)
- Hamowanie syntezy białek
- Czynniki mutagenne, mutacje punktowe
- Wirusy, retrowirusy mechanizm działania



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 1. Preparatyka kwasów nukleinowych z drożdży

Wykonanie ćwiczenia: (GRUPY 4 OSOBOWE)

Okolo 25 g drożdży piekarskich zawiesić w **30 ml 10% NaCl** w kolbie stożkowej. Rozetrzeć zatopionym końcem bagietki, a następnie zawiesinę zobojętnić, najpierw **3 kroplami 10% NaOH**, potem **2-3 kroplami 0,1 M NaOH** do uzyskania na papierku lakmusowym pH 7-8. Zawiesinę ogrzewać we wrzacej łaźni wodnej przez **30 minut**, okresowo mieszając. Kwasy nukleinowe przechodzą do roztworu. Po ochłodzeniu mieszaninę odwirować lub odsączyć. Kwasy nukleinowe pozostają w przesączu (w przypadku sączenia) lub w supernatancie (w przypadku wirowania). nierozpuszczalne składniki (osady) należy odrzucić. Do tak otrzymanego roztworu kwasów nukleinowych dodać **trzykrotną objętość etanolu** i odstawić na **15 minut**. Kwasy nukleinowe wypadają wówczas z roztworu w postaci osadu, który należy odwirować (3 min. 3000RPM), roztwór zlać, a osad ponownie rozpuścić w **15 ml 0,1M NaOH**. Następnie roztwór przesączyć do próbówki.

Otrzymany w ten sposób preparat kwasów nukleinowych - **nukleinian sodowy** - **należy używać do dalszych doświadczeń !!!**.

Odczynniki

- 10% roztwór chlorku sodu (NaCl)
- Drożdże piekarskie
- 10% roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- Etanol (C₂H₅OH)
- 0,1M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Kolba 200 ml – 1 szt.
- Cylinder miarowy – 1 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 4 szt.
- Kolba 100ml – 1 szt.
- Lejek
- Bibuła filtracyjna
- Wrząca łaźnia wodna
- Próbówki typu falcon
- Wirówka



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 2. Oszacowanie zawartości kwasów nukleinowych i białek

Zasada:

Zawartość RNA i białek można oszacować wykorzystując charakterystyczne dla tych grup związków pasma absorpcji w ultrafiolecie. Kwasy nukleinowe wykazują maksimum absorpcji przy 260 nm. Empirycznie stwierdzono, że $A_{260} = 1$ odpowiada stężeniu około 50 $\mu\text{g/mL}$. Podobnie dla białek, wykorzystując ich charakterystyczne pasma absorpcji w ultrafiolecie, wyznaczono empirycznie kilka wzorów, pozwalających na oszacowanie ich stężenia. Kilka z nich przedstawiono poniżej:

$$C \text{ (mg/mL)} = 0,4 (A_{235} - A_{280})$$

$$C \text{ (mg/mL)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

$$C \text{ (mg/mL)} = 0,144 (A_{215} - A_{225})$$

Wykonanie ćwiczenia:

Na podstawie pomiarów absorpcji charakterystycznych pasm dla białek i kwasów nukleinowych oszacować zawartość obydwu grup związków w wyizolowanym preparacie.

Do pomiarów absorbancji roztworów białek przy 280 nm, czy też DNA przy 260 nm stosuje się kuwety kwarcowe. Do kalibracji spektrofotometru użyć tego samego buforu, w którym wcześniej rozcieńczono preparaty (10% NaCl).

Odczynniki

- Roztworu nukleinianu sodu (Ćw. 1)
- Woda destylowana
- 10% roztwór chlorku sodu (NaCl)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Kuwety kwarcowe
- Spektrofotometr



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 3. Rozpuszczalność kwasów nukleinowych

Wykonanie ćwiczenia:

- a.** Do próbek odmierzyć 1 ml **roztworu nukleinianu sodu** (otrzymanego w 1 ćwiczeniu) dodawać kroplami (3-5) 2M **HCl**. Wypada osad kwasu nukleinowego – płyn opalizuje. Do tej samej próbki dodawać kroplami (3-5) 2M **NaOH**. Osad ulega rozpuszczeniu.
- b.** Do próbki odmierzyć 1 ml **roztworu nukleinianu sodu** dodać 2 ml **etanolu**. Wytrąca się osad.

Odczynniki

- Roztworu nukleinianu sodu (Ćw. 1)
- 2M kwas solny (HCl)
- 2M wodorotlenek sodu (NaOH)
- Etanol (C₂H₅OH)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka krótka – 2 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 4 szt.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 4. Wykrywanie składników cukrowych kwasów nukleinowych

a. ogólny odczyn na cukry - próba z α -naftolem

Wykonanie ćwiczenia

Do 1 ml **nukleinianu sodu** dodać kroplę **10% alkoholowego roztworu α -naftolu**, a następnie dodać ostrożnie pod dygestorium, po ściance pochylonej probówki (kąt 45°), 0,5 ml stężonego **H₂SO₄** tak, aby „podwarstwić” nim płyn. Na granicy faz powstaje czerwono-fioletowa warstwa, rozszerzająca się na cały roztwór po delikatnym wymieszaniu.

Odczynniki

- Roztworu nukleinianu sodu (Ćw. 1)
- 10% alkoholowy roztworu α -naftolu
- Kwas siarkowy (H₂SO₄)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka długa – 1 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 3 szt.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



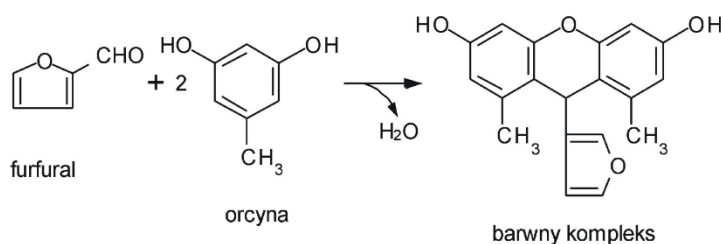
	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 4. Wykrywanie składników cukrowych kwasów nukleinowych

b. wykrywanie rybozy - próba z orcyą (Reakcja Biała)

Zasada

W reakcji Biała pentozy połączone z zasadami purynowymi występujące w nukleotydach podczas ogrzewania z odczynnikiem Biała przekształcają się w furfural. Powstały furfural tworzy z orcyą w obecności jonów Fe^{3+} kompleks o trwałej barwie zielonej. W tych warunkach β -D-2-deoksyryboza reaguje 10-krotnie słabiej od rybozy.



Wykonanie ćwiczenia

Do pierwszej próbowki odmierzyć 0,5 ml **nukleinianu sodu**, dodać 2,5 ml **odczynnika Biała** (orcyna z $FeCl_3$ w stężonym HCl), wymieszać i wstawić na 10-20 minut do wrzącej łąźni wodnej. Powstaje zielone zabarwienie.

Do drugiej próbowki odmierzyć 0,1 M NaOH, 2,5 ml odczynnika Biała (próba odczynnikowa).

Odczynniki

- Roztworu nukleinianu sodu (Ćw. 1)
- **Odczynnik Biała:** w 100 ml stężonego kwasu solnego rozpuścić 0,5 g orcyny i dodać kilka kropel 10% roztworu chlorku żelaza (III).
- 0,1M roztwór wodorotlenku sodu NaOH

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka długa – 2 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 2 szt.
- Łąźnia wodna



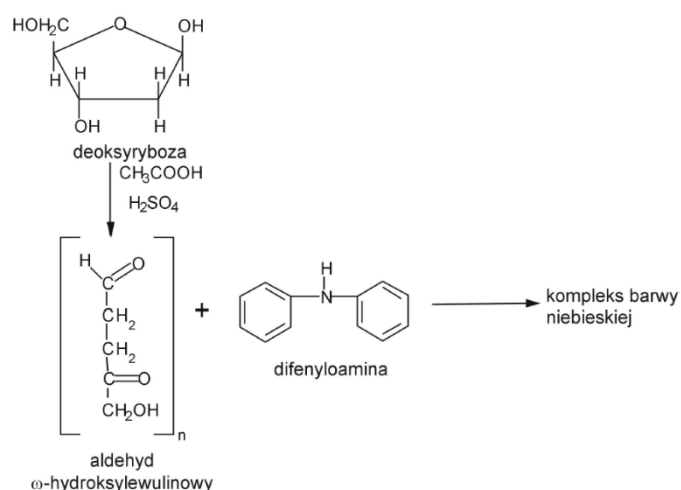
	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 4. Wykrywanie składników cukrowych kwasów nukleinowych

c. wykrywanie deoksyrybozy - próba z difenylaminą (Reakcja Dischego)

Zasada

Reakcja Dischego pozwala odróżnić dwa typy kwasów nukleinowych (DNA i RNA). W środowisku kwaśnym deoksyryboza tworzy z difenylaminą produkt kondensacji o barwie niebieskiej. Ta reakcja barwna jest konsekwencją powstania aldehydu ω-hydroksylewulinowego z β-D-2-deoksyrybozy pod wpływem działania kwasu siarkowego i octowego.



Wykonanie ćwiczenia

Do jednej probówki odmierzyć 0,5 ml rozcieńczonego **preparatu kwasów nukleinowych** (próba pełna), do drugiej probówki 0,5 ml 0,1 M **NaOH** (próba odczynnikowa). Następnie do obu probówek dodać po 2 ml 1%-owego roztworu **difenylaminy**, dokładnie wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10-15 min. Zaobserwować pojawienie się lekko niebieskiego zabarwienia.

Odczynniki

- Roztworu kwasów nukleinowych
- 0,1M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

- 1%-owy roztwór difenyloaminy
($C_{12}H_{11}N$) / (1g difenyloaminy rozpuścić w 100 ml lod. CH_3COOH z dodatkiem 2,75 ml st. H_2SO_4)
- Probówka długa – 2 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 3 szt.
- Łażnia wodna

Sprzęt/szkło laboratoryjne



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 5. Wykrywanie fosforanu

Zasada

Reakcja charakterystyczna dla fosforanów polega na łączeniu się molibdenianu amonu z jonem fosforanowym, w wyniku czego powstaje żółty osad fosfomolibdenianu amonu.

Wykonanie ćwiczenia

Do próbówki dodać 3 krople **nukleinianu sodu**, 2 ml **wody destylowanej**, 1,5 ml 10% **TCA**, 0,5 ml 10 % **odczynnika molibdenowego** i dokładnie wymieszać (próbka pełna).

Do drugiej próbówki dodać 2 ml **wody destylowanej**, 1,5 ml 10% **TCA**, 0,5 ml 10 % **odczynnika molibdenowego** i dokładnie wymieszać (próbka odczynnikowa). Zaobserwować pojawienie się lekkiego zabarwienia (osadu), charakterystycznego dla obecności anionów fosforanowych.

Odczynniki

- Roztworu nukleinianu sodu (Ćw. 1)
- Wody destylowana
- 10% roztwór TCA
(Kwas trichlorooctowy $C_2HCl_3O_2$)
- 10% wodny roztwór Molibdenianu amonu ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka długa – 2 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 4 szt.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 6. Wykrywanie zasad purynowych i pirymidynowych w hydrolizatach kwasów nukleinowych

a. hydroliza kwasów nukleinowych

Pobrać do probówki 4 ml nukleinianu sodu, dodać 1 ml 2,5M roztworu H_2SO_4 i wymieszać. Wstawić do **wrzącej łaźni wodnej na 30 min.** Hydrolizat ochłodzić i ostrożnie zobojętnić (pod kontrolą papierka lakmusowego) dodając kroplami ok 1,5-2ml 2M roztwór NaOH, do oddziaływania słabo kwaśnego (pH-3)

Otrzymany hydrolizat wykorzystać do dalszej części ćwiczenia punkt b i c.

Odczynniki

- Roztworu nukleinianu sodu (Ćw. 1)
- 2,5M roztworu kwasu siarkowego (H_2SO_4)
- 2M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka długa – 1 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 3 szt.
- Łaźnia wodna



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

b. wykrywanie zasad purynowych

Zasada

W środowisku wodorosiarczynu(IV) sodu NaHSO_3 kationy miedzi Cu^{2+} ulegają redukcji do kationów Cu^+ , które wytrącają żółtobiały osad nierozpuszczalnych soli miedzi (I) zasad purynowych.

Wykonanie ćwiczenia

Pobrać do probówki 1 ml hydrolizatu i ogrzać do wrzenia. Dodać kilka kropli roztworu 10% CuSO_4 (niebieski), a następnie dodawać kroplami nasycony roztwór NaHSO_3 (redukujący jon Cu^{2+} do jonu Cu^+). Wytrąca się żółto-biały osad nierozpuszczalnego kompleksu puryn z miedzią. Powtórzyć doświadczenie używając wody zamiast hydrolizatu kwasu nukleinowego. Zaobserwować różnice.

Odczynniki

- Hydrolizat kw. nukleinowych (punkt a)
- 10% roztwór siarczynu miedzi (CuSO_4)
- Nasycony roztwór wodorosiarczynu (IV) sodu (NaHSO_3)

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka długa – 2 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 3 szt.
- Palnik



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Ćwiczenie 6. Wykrywanie zasad purynowych i pirymidynowych w hydrolizatach kwasów nukleinowych

c. wykrywanie zasad purynowych

Wykonanie:

Pobrać do probówki 1 ml hydrolizatu i dodać 1 ml ODCZYNNIKA TOLLENSA (amoniakalny roztworu AgNO_3). Po **5-10 min** wypada lekko biały (zmętniały) osad będący kompleksem puryn z jonami Ag^+ . Powtórzyć doświadczenie używając wody zamiast hydrolizatu kwasu nukleinowego (próba odczynnikowa). Osad nie powstanie.

Odczynniki

- Hydrolizat kw. nukleinowych (punkt a)
- Odczynnik Tollensa

Sprzęt/szkło laboratoryjne

- Probówka długa – 2 szt.
- Pipeta/zakraplacz – 3 szt.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

