

PROVOZ A BEZPEČNOST PRÁCE PŘI PRAKTICKÝCH CVIČENÍCH Z MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

V laboratoři se:

1. pracuje v ochranném oděvu, tj. v plášti + přezuvky
2. Na pracovních stolech jsou pouze pomůcky určené k provádění zadaných úkolů + návody + kalkulačka
3. Během cvičení je zákaz kouření, konzumace potravin a pití nápojů
4. Je třeba dbát pokynů vyučujících, aby nedošlo k poškození zařízení, pomůcek a znehodnocení chemikálií
5. Při práci s chemikáliemi typu žíravín, hořlavin a mutagenů používat rukavice, při práci s UV zářením používat ochranné brýle, při práci s horkým roztokem v kádince používat ochranné rukavice
6. Udržovat čistotu na pracovních stolech a v prostorách laboratoře, **důsledně třídit** použitý materiál
7. JAKÝKOLI ÚRAZ IHNEDE NAHLÁSIT VYUČUJÍCÍMU

ZÁSADY PRO PRÁCI V MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ LABORATOŘI

1. Je třeba pracovat s ohledem na vlastní bezpečnost a na prevenci kontaminace pracovních pomůcek.
2. Při práci s nastavitelnými automatickými pipetami je třeba dbát toho, aby byly nastaveny v rozmezí povolených hodnot objemů (nepřetáčet nad ani pod limitní rozsah objemu). Ke každé pipetě použít vhodnou plastovou špičku.
3. U zmražených vzorků zásobních roztoků se musí nejprve rozpustit celý objem a pak teprve provést náběr sterilní špičkou.
4. Při každém náběru enzymů (roztoků) ze zásobního roztoku je třeba používat vždy nové sterilní špičky! Špičky po použití vyhazujeme do určených odpadních nádobek.
5. Zásobní roztoky enzymů se uchovávají při -20 °C a při použití je třeba je mít uložené na ledu. Po náběru lehce otřít špičku o vnitřní stěnu zkumavky (takto se zbaví přebytečného enzymu zachyceného vně špičky). Zkumavky s enzymy a zásobními roztoky po odebrání ihned uzavřít.

Přehled úloh řešených v praktiku

- **Izolace plazmidové DNA**
- **Stanovení koncentrace DNA spektrofotometricky**
Restrikční štěpení plazmidové DNA
- **Elektroforéza + restrikční mapování genomové DNA**
- **Transformace *E. coli* plazmidovou DNA**
- **Příprava sacharózového gradientu a PCR**
- **Izolace genomové DNA**
- **Zápočtový test a zápočet**

Kritéria pro zápočet

Absolvování všech úloh

Úspěch u malých testů během jednotlivých cvičení

Odevzdané správné protokoly

- jméno, datum, název úlohy, stručně princip, „postup“, výsledek, závěr

Zápočtový test

Příklady

- Příprava roztoků
- Ředění roztoků
- Procenta versus molarita
- Počítání nejen roztoků

Jak připravíte 50 ml 2M roztoku NaCl (MW-58)?

Jak z tohoto 2M roztoku připravíte 100ml 0,5M?

Kolika procentní (w/v) je 2M roztok NaCl?

Určete jaké množství zásobního roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml, se musí přidat do 100 ml LB bujonu, aby byla jeho výsledná koncentrace 100 μ g /ml.

V mikrozkuhavce máte krev s 8 miliony leukocyty/1ml. Kolik ul krve použijete pro reakci, ve které musíte pracovat s 1 milionem leukocytů?

Plazmidy

Extrachromozomální molekuly dsDNA

Replikace nezávisle na bakteriálním chromozomu

Pro replikaci potřebují enzymy a proteiny hostitelské buňky

Udržují se v bakteriích v určitém počtu (1 až mnoho)

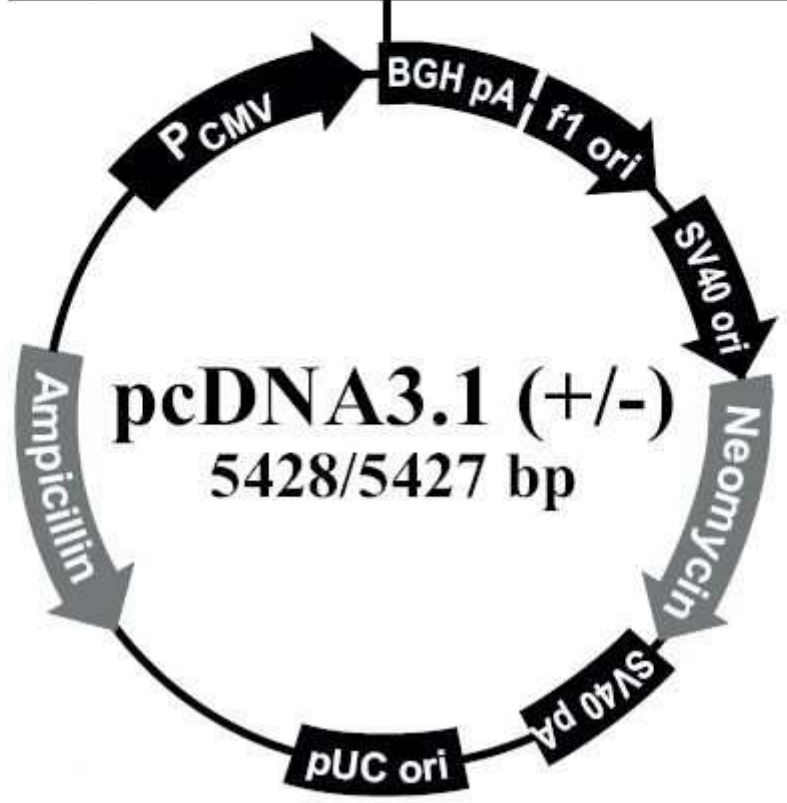
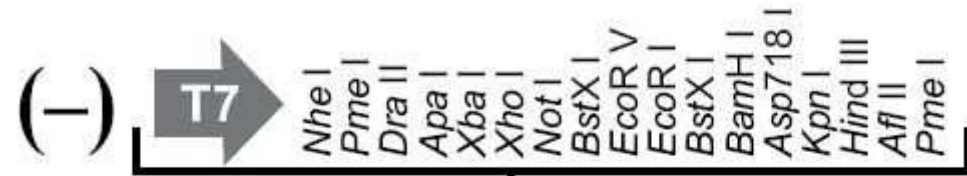
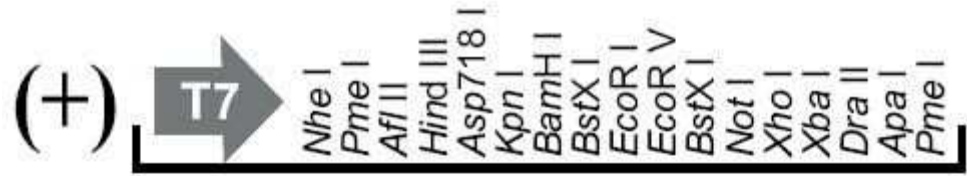
Při buněčném dělení přechází nezávisle do dceřiných buněk

Nesou geny poskytující bakteriím nějakou selekční výhodu (rezistence)

ori – počátek replikace

inc – připojení na membránu

Využití – přenos dědičné informace – ovlivnění genové exprese
- konstrukce mutantů



Izolace a purifikace NK

Růst buněk – vhodné médium

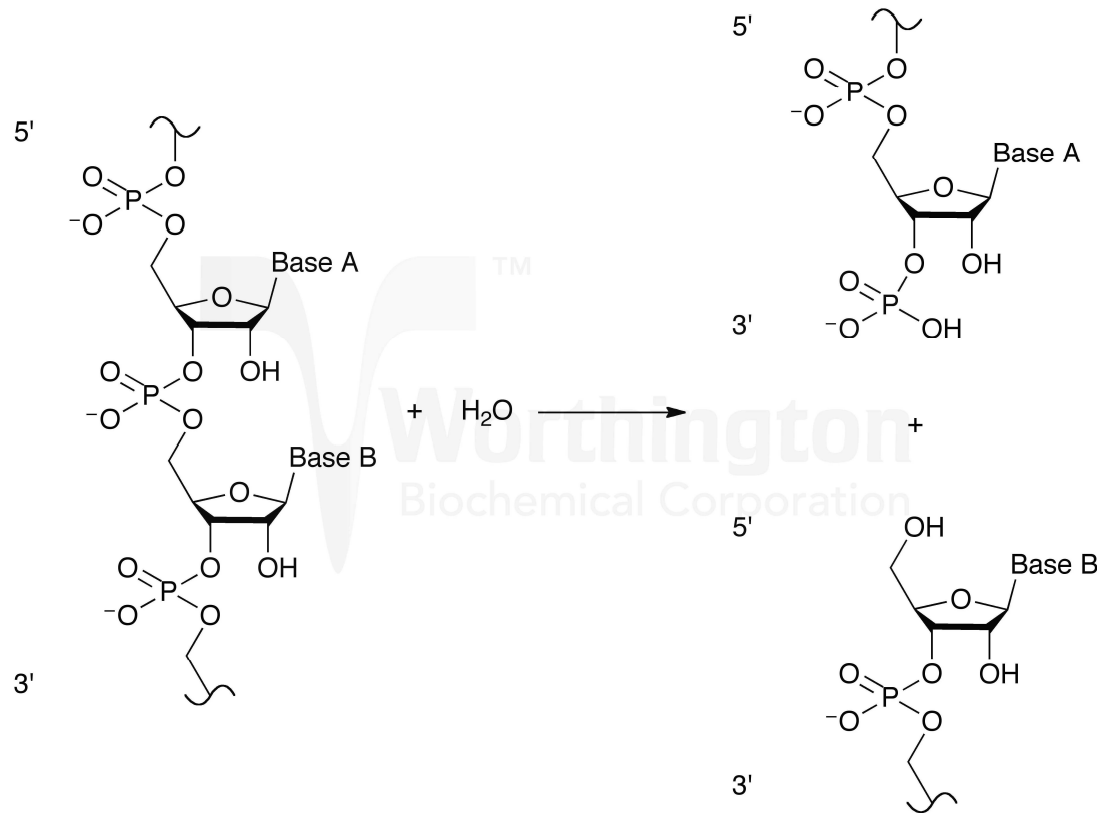
- event. odběr tkáně, rostlinky, ...
- izolace plazmidové DNA - **ANTIBIOTIKUM**

Lyze buněk - detergenty (dodecylsulfát sodný)

- enzymy (lysozym)
- mechanicky (drtiče, homogenizátory)
- sonikace
- varem
- opakované zamražení/zmražení
- kombinace více metod

Izolace a purifikace NK

Odstranění RNA – RNáza



Ribonucleic Acid

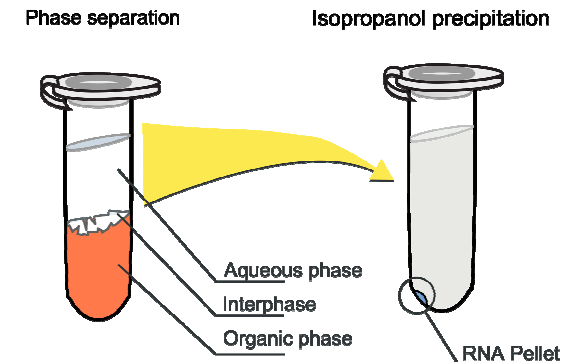
Base A = Cytosine or Uracil

3'-Phosphate nucleotides

Izolace a purifikace NK

Deproteinace - fenol a chloroform

- enzymy (proteináza K)
- chromatografie
- ultracentrifugace v gradientu CsCl



„Srážení DNA“ – vychlazené roztoky alkoholů – etanol

- izopropanol

Rozpuštění (případně eluce) DNA

- 10 mM Tris, pH=8
- TE pufr, pH=8 (10 mM Tris, 1mM EDTA)

Izolace plazmidové DNA - postup

- Naočkovat jednu bakteriální kolonii do LB média s ampicilinem (100 µg/ml). Inkubovat přes noc při 37°C.
- Přenést bakteriální kulturu do mikrocentrifugační zkumavky a centrifugovat při 5 000 RPM/5 min/4 °C.
- Odpipetovat supernatant a sediment resuspendovat ve 200 µl pufru P1 s přísávkem RNAzy ve výsledné koncentraci 100 µg/ml a lysozymu 500 µg/ml.
- Přidat 200 µl roztoku P2. Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. Inkubovat 5 minut (ne déle) při pokojové teplotě.
- Přidat 200 µl vychlazeného roztoku P3. Promíchat několikerým převrácením zkumavky. Zkumavku umístit na led na 10 minut. Centrifugovat při 10 000 RPM/10 min/4 °C.
- Supernatant přenést do čisté mikrocentrifugační zkumavky, přidat 1/10 objemu 3M octanu sodného, promíchat a DNA srážet 2 objemy vychlazeného 96% etanolu 10 minut při teplotě -80 °C. Centrifugovat při 10 000 RPM/10 min/4 °C.
- Opláchnout sediment 1ml 70% etanolu, inkubovat 5 minut
- Odstranit roztok etanolu, sediment osušit a rozpustit ve 40 µl TE pufru

Složení a funkce roztoků

Ampicilin - 100 mg/ml, penicilinové antibiotikum, blokuje syntézu buněčné stěny

Lysozym - 10 mg/ml, enzym - manipulace na ledu, rozklad polysacharidů buněčné stěny bakterií

RNáza - 10mg/ml, *enzym* - manipulace na ledu, degradace RNA

P1 - 50mM glukóza, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA

- pufr, EDTA je inhibitor nukleáz, váže dvojmocné ionty Mg^{2+} , které působí jako kofaktory nukleáz

P2 - 0,2M NaOH, 1% SDS

- lyzační, zvyšuje pH, denaturace chr. ldsDNA, plazmidová cdsDNA denaturuje částečně a reverzibilně

P3 - 5M octan draselný, pH = 5,2

- neutralizuje hydroxid, renaturace DNA, srážení proteinů

3M octan sodný – zvyšuje iontovou sílu roztoku, usnadňuje srážení DNA

96% etanol – sráží DNA

70% etanol – odstraňuje soli ze sedimentu DNA (přecházejí do vodné fáze 70% etanolu)

Izolace pomocí chromatografických kolonek

- komerční kolonky – různé objemy (ml až stovky ml)
- membrána z materiálu schopného vázat NK (silica, DEAE, ...)
- vazba ovlivněna podmínkami (pH pufru, konc. solí)

Postup:

1. Lyze
2. Srážení proteinů + genomové DNA
3. Odstranění sraženiny
4. Vazba DNA na kolonce
5. Promytí
6. Eluce čisté DNA

