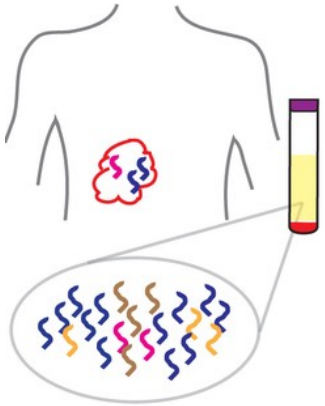
# Genetika v zubním lékařství – cvičení 2

## Metody molekulární biologie

Mgr. Jolana Lipková, Ph.D.

# Metody molekulární biologie



Práce s biologickým materiálem

PLNÁ KREV - PLAZMA, SÉRUM ,SLINY, BUŇKY, TKÁNĚ, TĚLNÍ TEKUTINY

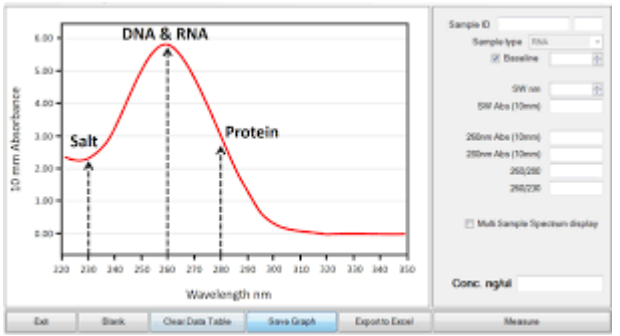
⬇

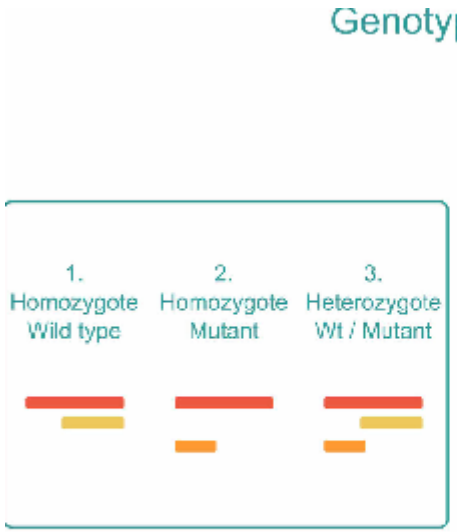
Izolace DNA, RNA, PROTEINY

⬇

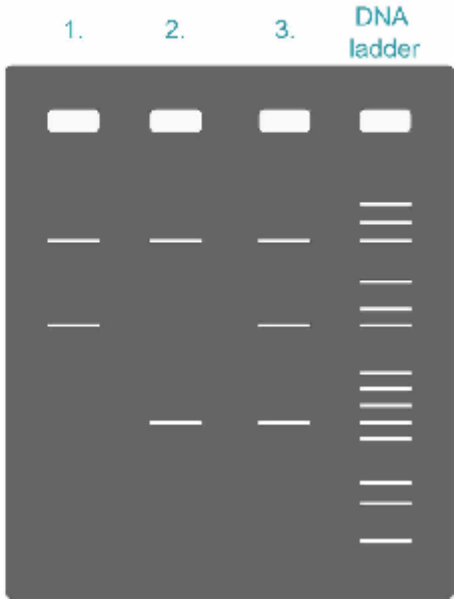
Detekce a Kvantifikace

⬇




Genotyping pattern




## DNA

## Genotypování

**detekce polymorfismu/ mutace**

- **PCR (amplifikace konkrétního fragmentu)+** RFLP (naštěpení spec. restrikčními enzymy) – detekce na ELFO
- Real-Time PCR
- Sekvenace

# Genotyp, Genotypování

- Genotyp:
- konkrétní kombinace dědičných vloh
- genetická konstituce organismu/jedince
- **soubor všech genů v konkrétních alelách**, které má organismus k dispozici pro zajištění svých biochemických, fyziologických a morfologických znaků
- soubor alel **specificky uspořádaných** v genomu - všechny molekuly DNA + soubor epigenetických faktorů

- Genotyp (v užším pojetí):
- **dvojice alel** téhož genu (maternální x paternální) – **genetický polymorfismus**
- gen pro fenylalaninhydroxylasu : 2 alelní formy: dominantní *A* a recesivní *a*
  - 3 genotypy - *AA* (dominantní homozygoti), *Aa* (heterozygoti) a *aa* (recesivní homozygoti)
- **vícealelní systémy-** krevní skupiny ABO- tří alely - 6 genotypů
  např. HLA lokus - vysoká variabilita genotypů (více než 60 alel) - sada HLA genů na jednom chromosomu tvoří haplotyp ( jedinec- dva - v každém 5 determinantů) – vazba genů (↓ rekombinace) –
  -genetický marker při populačních výzkumech, určování otcovství.

**genotyp určuje rozsah, míru fenotypových možností svého nositele**
**genotypy jedinců téhož druhu mají odlišné genomické sekvence ( genových x mimogenové oblasti)**

- geny
- počet kopií genů (rRNA geny) nebo menších či větších oblastí genomu (CNV – copy number variation)
- polymorfismy v sekvenci nukleotidů (SNP, indel – insertion or deletion)
- variabilita v délce repetitivních sekvencí

| Krevní skupina = fenotyp | Možné genotypy |
|---|---|
| A | AA, Ao |
| B | BB, Bo |
| 0 | oo |
| AB | AB |

- Genotypování - proces determinace genetických variant - **buňka**, **organismus** a/nebo **jedinec**
  PCR-polymerázová řetězová reakce , RFLP-analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů, sekvenování, DNA čipy……
- Sekvenace - metoda sloužící k určení konkrétní sekvence určité délky

# Genetická variabilita

## Genetická variabilita  vs Genetická diverzita

| Genetic Diversity | Genetic Variability |
|---|---|
| Tendency of individual genotypes to vary from one another | The amount of variation **seen** (phenotype from genotype) in a particular population |
| **Cause** | **Effect** |

- Genetická variabilita - v populacích, když se vyskytuje více než jedna alela v lokusu – čím variabilnější – rychleji se vyvíjí a lépe přežívá
- Genetická diverzita – různost mezi organismy (genet. fixovaná) –nutná podmínka života
- Vznik nových alel – mutací (spontánní x indukovaná) četnost menší než alely původní
- **Polymorfismus x fixace alely**
- **Alely s nulovým nebo negativním vlivem na fitness -** minimální šance na zachování v dostatečně velké **panmiktické populac**i
- **Výjimka** - změna okolních podmínek změní vliv jednotlivých alel na fitness -vymizení nově nevýhodných alel); v malých populacích - větší šance, fixace -genetický drift nebo efekt hrdla lahve
- **Nové alely se ve větších populacích časem zafixují**, pokud se jim podaří přestát první období, kdy je jich velmi málo a kdy jim hrozí vymizení z důvodu prosté smůly.

- U různých populací téhož druhu mohou být různé poměry zastoupení mezi jednotlivými alelami.
- U malých oddělených populací nebo kdy je vliv alely na vnější znaky u různých populací různý - výskyt alely pro srpkovitou anemii.

Home / News & Opinion

**Identical Twins Accumulate Genetic Differences in the Womb**

DNA replication errors during cell division cause monozygotic twins to diverge from each other even during the earliest stages of development, a new study finds.

Catherine Offord
Jan 7, 2021 | 4 min read

PDF VERSION

Identical twins are not as identical as previously assumed, according to a study published today (January 7) in *Nature Genetics*. Rather than having exactly the same DNA sequences, twins start accumulating genetic variation from the earliest stages of development, researchers at Iceland-based company deCODE genetics found, meaning that one twin harbors variants that aren't present in the other.

ABOVE: JON GUSTAFSSON/DECODE

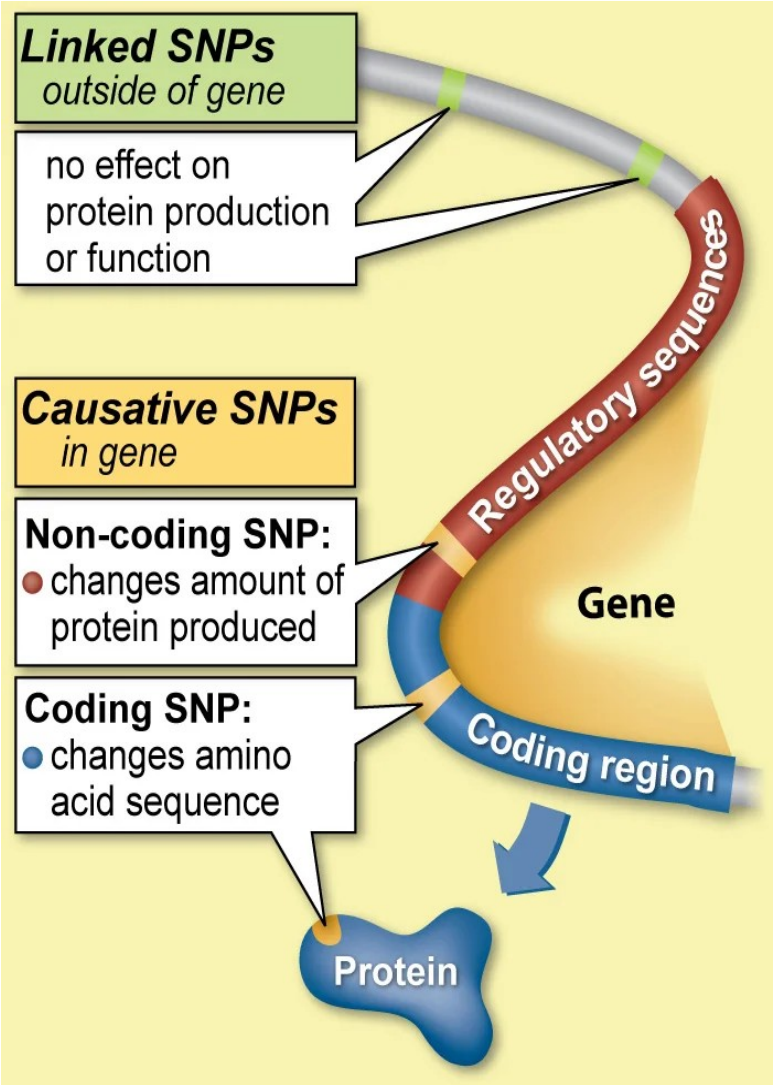
Z 381 párů: 38  geneticky identických 39 více než 100 změn

# Genetický polymorfismus, SNP

- **Polymorfní znaky**: barva očí, vlasů, kůže, ABO
- **Monomorfní znaky:** jedna alela je fixovaná, všichni jedinci exprimují stejný fenotyp pro daný znak (jsou homozygoti)
- Mezi > 20,000 genes: nejvíce polymorfní: beta haemoglobin (HBB)- 176 SNVs per kilobase (kb)

- single nucleotide polymorphisms (SNPs)
- small-scale insertions/deletions
- polymorphic repetitive elements
- microsatellite variation

- **SNP (Single nucleotide polymorphism) -** polymorfizmus jediného nukleotidu); představuje nejčastější formu polymorfizmu v lidském genomu, vyskytující se asi jedenkrát na 1000 bází,
- HUGO, 2000 - 1.5 milionu SNP, dnes 9 milionů
- SNP se vyskytují v nekódujících oblastech častěji
- **SNV- jednonukleotidová varianta** -změna v jediném nukleotidu nezávisle na frekvenci výskytu v populaci a tyto varianty mohou vzniknout v somatických buňkách. Somatické jednonukleotidové varianty (např. mutace související s rakovinou), mohou být také nazývány "single-nucleotide alterations".
- Většina genů - 4 SNVs per kilobase, ~ 97% genů má alespoň 1 SNV, 149 genů-bez SNV nebo INDEL.15



# polymorfismus vs mutace

**Mutation and polymorphism are two terms used to describe DNA variants**
**Mutation** refers to a DNA variant in a particular individual

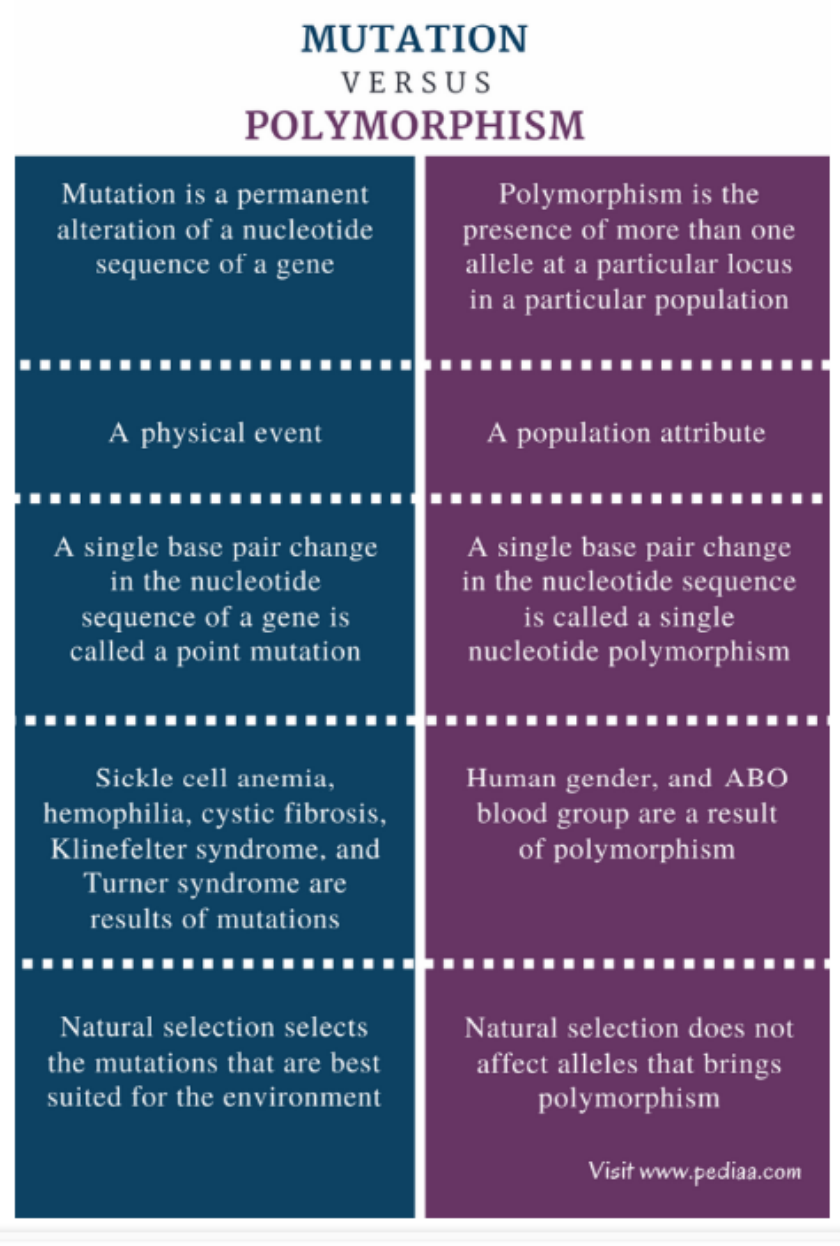
**Polymorphism** refers to DNA variants within a population.

**The main difference between mutation and polymorphism:**

**Mutation** is a change in a DNA sequence of the genome of a particular organism

**Polymorphism** **i**s a mutation that occurs in more than 1% of a particular population (minor allele frequency of a particular allele in the population is more than 1%)

**Mutation is an alteration of the nucleotide sequence of a gene. If a mutation occurs in a population with a frequency of more than 1%, the mutation is called a polymorphism.**



# Metody molekulární biologie

**Manipulace s NK**

Extrakce, Izolace a purifikace

Detekce a kvantifikace

- spektrofotometrie
- gelová alektroforéza

Amplifikace

- klonování DNA molekul v plasmidech (restrikční enzymy)
- polymerasová řetězová reakce = PCR

Přepis mRNA do cDNA (complementary DNA) - reverzní transkriptáza

Sekvenace – celogenomové studie (DNA čipy - cDNA microarrays )

**Analytické metody detekce změn (mutace, polymorfismy) v DNA, genotypování**

- Amplifikace +RFLP
- Real-time PCR
- Sekvenace
- DNA čipy - cDNA microarrays

**Analytické metody detekce exprese genů a studium transkripce**

Detekce hladin mRNA (exprese)

- Real-Time PCR
- DNA čipy - cDNA microarrays

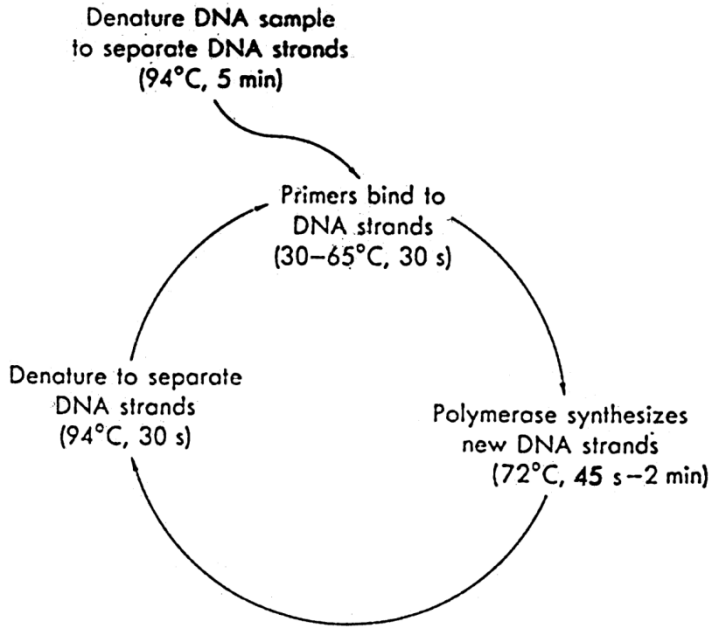
Studium interakce DNA-protein (protein-protein) -analýza vazby transkripčních faktorů

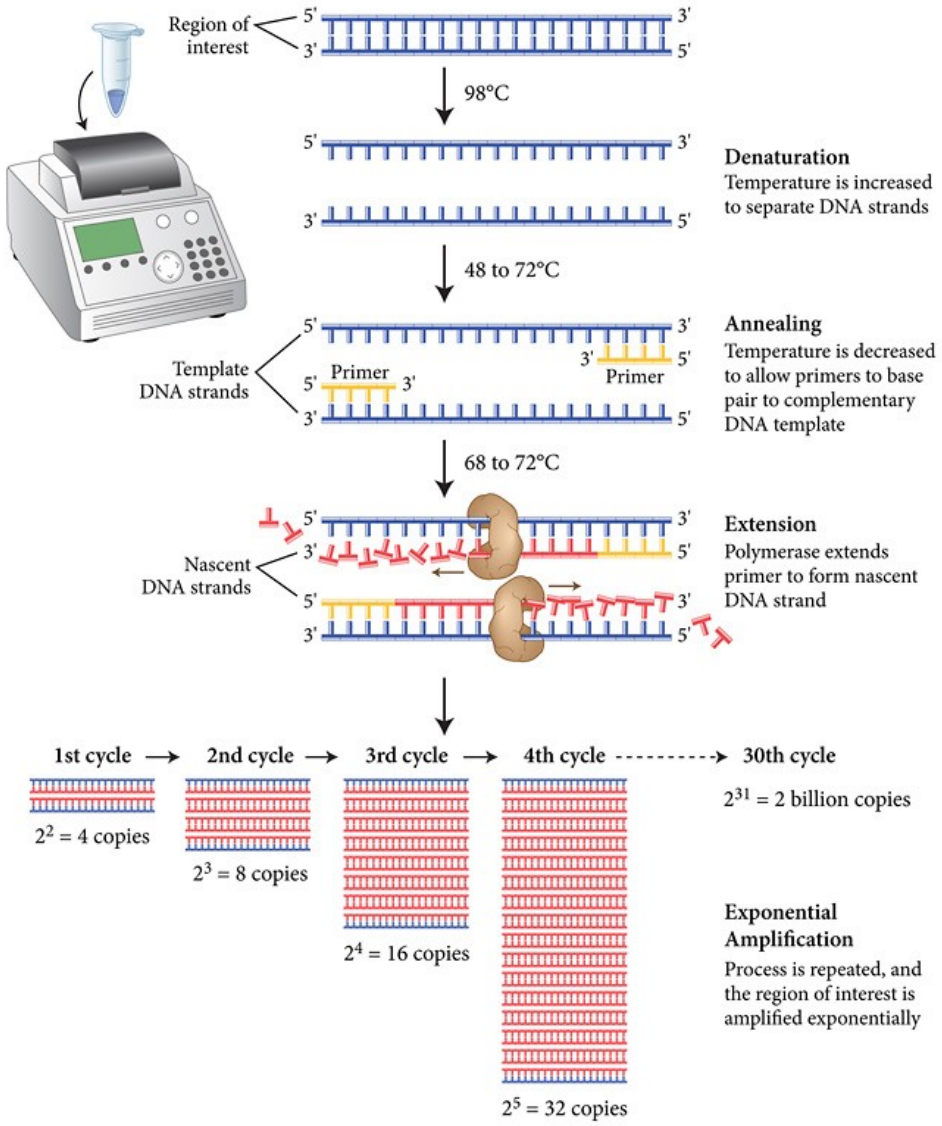
Detekce stavu modifikace chromatinu (pozice nukleozomů, stav acetylace histonu – v oblasti promotoru)

- PCR
- Real-time PCR
- Restrikční analýza
- Sekvenování

# PCR

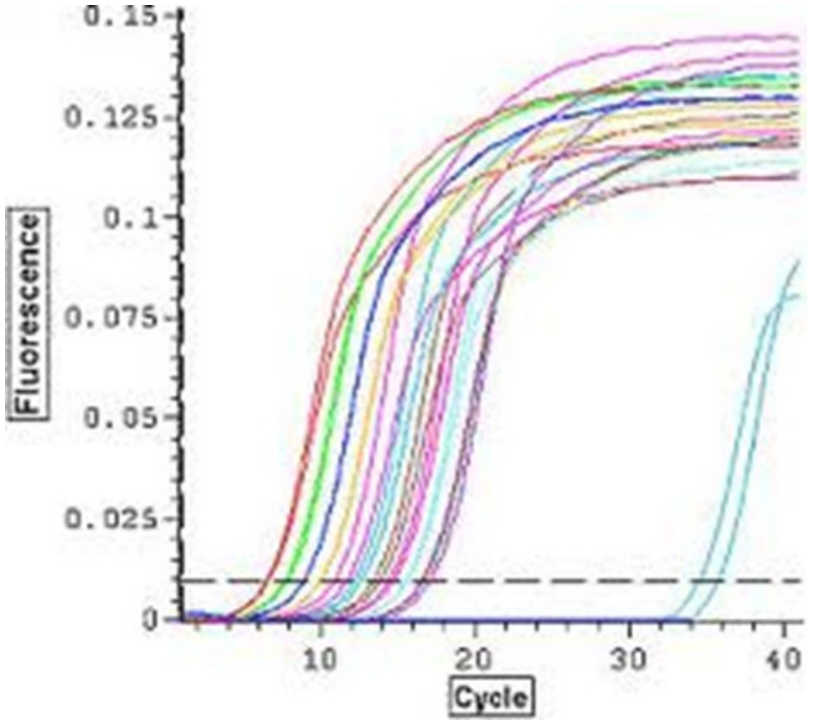
- **mnohonásobná *in vitro* replikace ve zkumavce**
- “klonování” bez bakterií, ve zkumavce
- řetězová reakce vycházející z DNA replikace
- opakování cyklů:
  - denaturace (separace dsDNA) – 96 °C
  - annealing – navázání primerů – 50–65 °C
  - elongace – syntéza nového vlákna DNA – 72 °C



# qPCR – Kvantitativní PCR
# Real-time PCR

- Polymerázová řetězová reakce  sledovaná v reálném čase
- **Kvantifikace DNA –** množství DNA je zaznamenáváno v průběhu každého cyklu
- Množství produktu, vytvořeného amplifikací, závisí v každé PCR na množství templátové DNA, která je přidána do reakce. Reakce tedy probíhá tzv. kvantitativně.
- Detekce množství DNA je umožněna přítomností **fluorescenčního substrátu**
- Provádí se ve speciálním cycleru, který umožňuje:
  - Cyklické střídání teplot
  - Detekci fluorescence
  - Monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat PCR produkty elektroforeticky
- qPCR se obvykle provádí v 96 jamkových destičkách, úroveň fluorescence je zaznamenávaná v jednotlivých jamkách
- Vysoce citlivá a vysoce specifická metoda

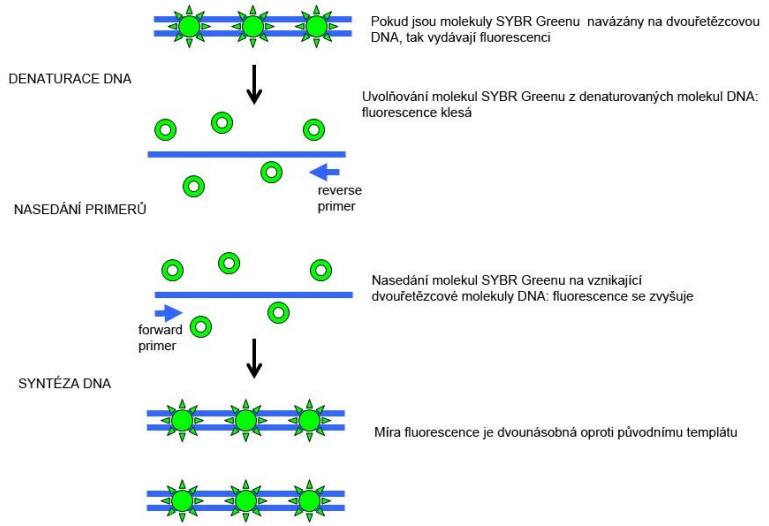


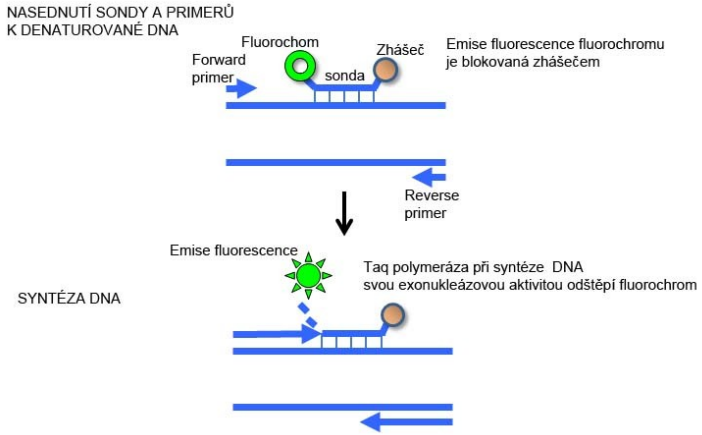
# qPCR

- Intenzita fluorescence je **přímo úměrná množství produktu, který v reakci vzniká**
  - Detekce produktu:

**1.interkalační barviva** – Sybr GREEN – nespecificky se váže na dsDNA

**2. sekvenčně specifická sonda** – krátký oligonukleotid s barvičkou a zhášečem (TaqMan) – po jeho rozpadu při syntéze DNA nárůst fluorescenčního signálu (využívá 5 -3 exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy)




**Využití:**

kvantifikace genové exprese

kvantifikace patogenů

genotypizace

Video pro názornost: https://youtu.be/YhXj5Yy4ksQ

# qPCR v Diagnostice

Monogenní onemocnění

**Detection of Thalassemia, hemophilia, Sickle cell anemia & favism*

**Cystic fibrosis*

**Phenylketonuria*

Forenzní medicína

Prenatální daignostika

**Noninvasive Prenatal Diagnosis by Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma.*

Virologie

Diagnostika patogenů

**Quantitatively measurment of Human Immunodeficiency Virus **(HIV).***

**Detection and Quantitation of Circulating Plasmodium falciparum DNA.*

**Effect of antimicrobial peptides on host cells*

Cystic fibrosis

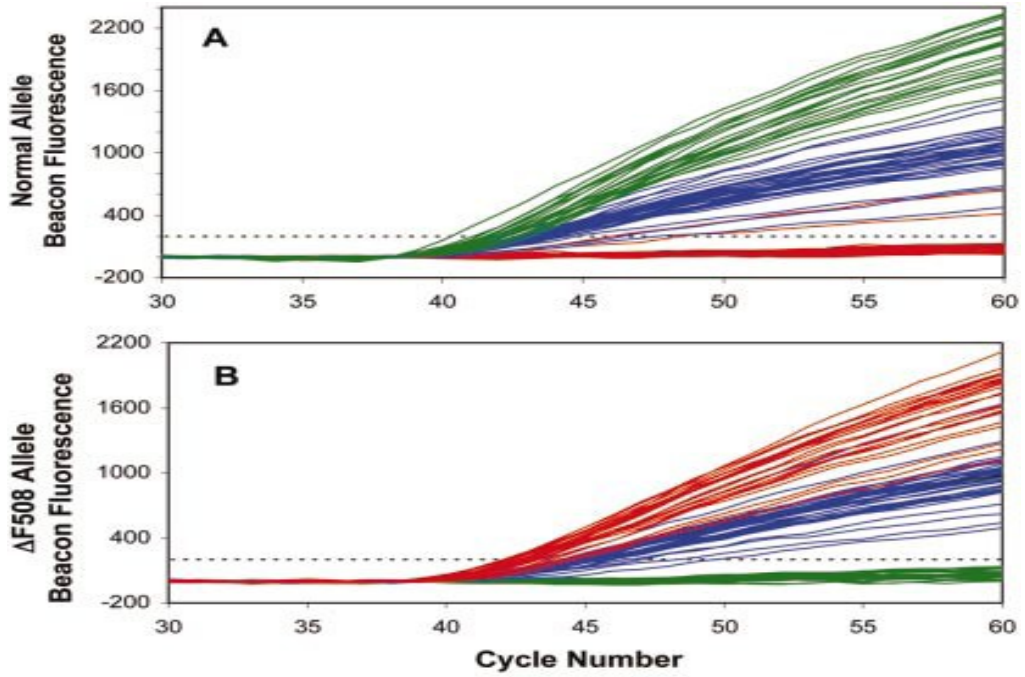


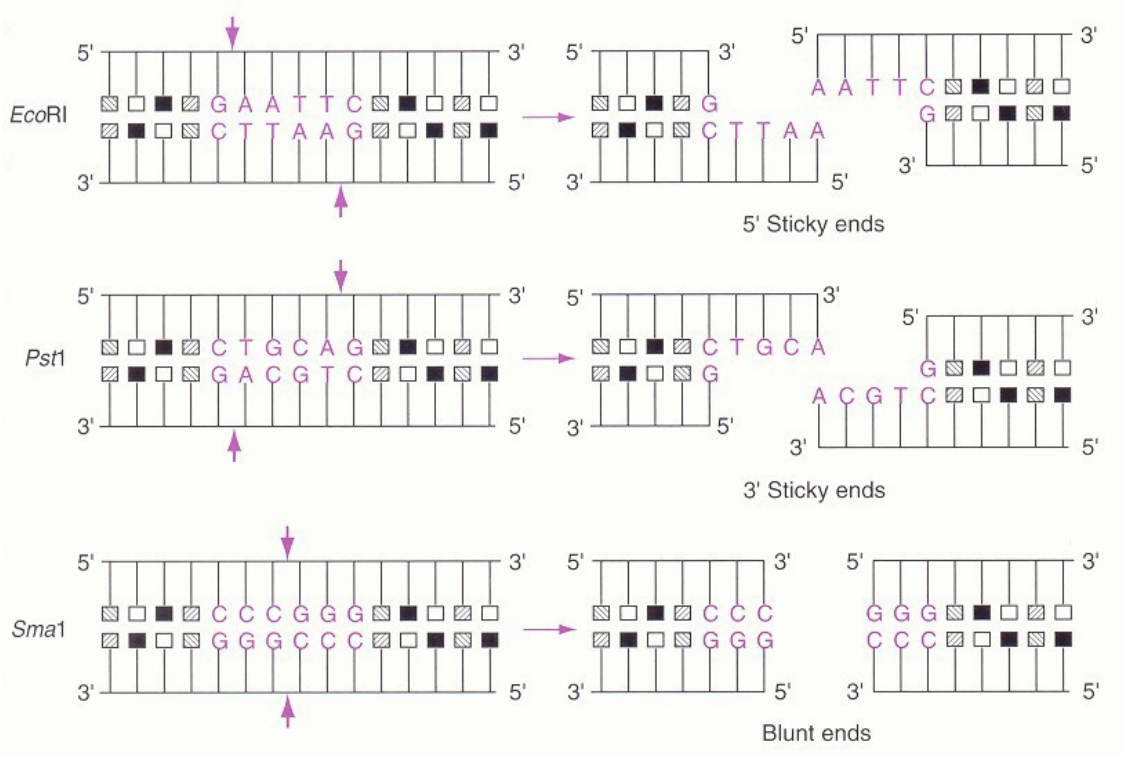

Figure 1. Examples of specific molecular beacon fluorescence increase during real-time PCR in samples containing single lymphoblasts homozygous normal for CF (green), heterozygous DF508 (blue), or homozygous DF508 (red). (A) Fluorescent signal from the molecular beacon detecting the normal allele. (B) Fluorescent signal from the molecular beacon detecting the DF508 allele. Dashed lines indicate the threshold of 200 units (~10 SD above baseline readings) used for determining CT values.

# Restrikční enzymy

- **Restrikční endonukleáza**

  ***(Meselson and Yuan 1968, Smith and Wilcox 1970)***

  - sekvenčně specifické endonukleázy (původ z bakterií)
  - EcoRI (*Escherichia coli*), HindIII (*Haemophilus influenzae*)
  - tupé/lepivé konce
  - funkce:
    - rozpoznání specifické sekvence dsDNA a následná restrikce (hydrolýza fosfodiesterových vazeb)
  - rozpoznávací místo
    - 4–8 bp dlouhé
    - charakter palindromu = stejné pořadí bází v obou směrech

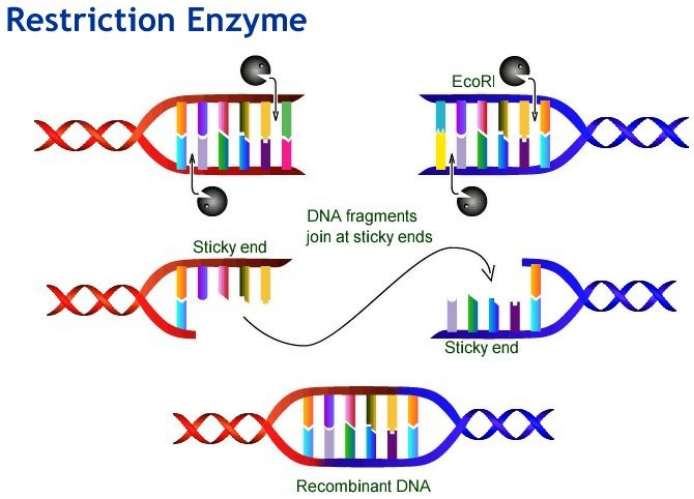


# Restrikční endonukleázy

## tvorba rekombinantních DNA

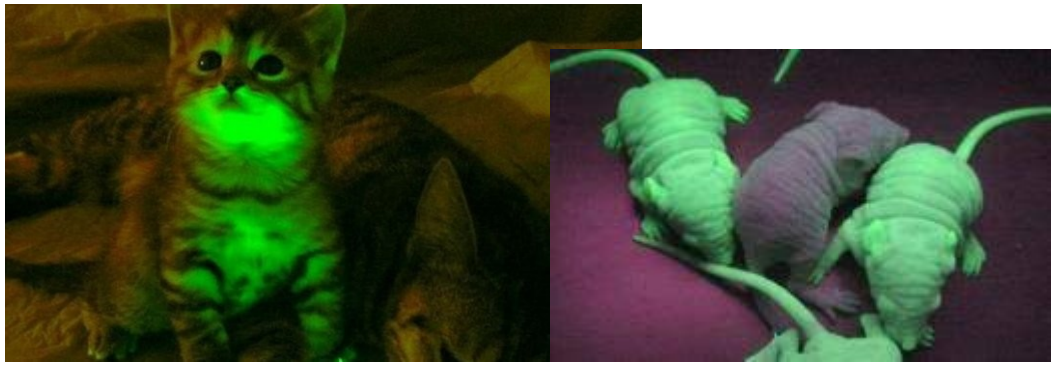
přečnívající kompatibilní konce usnadňují spojení různých fragmentů DNA

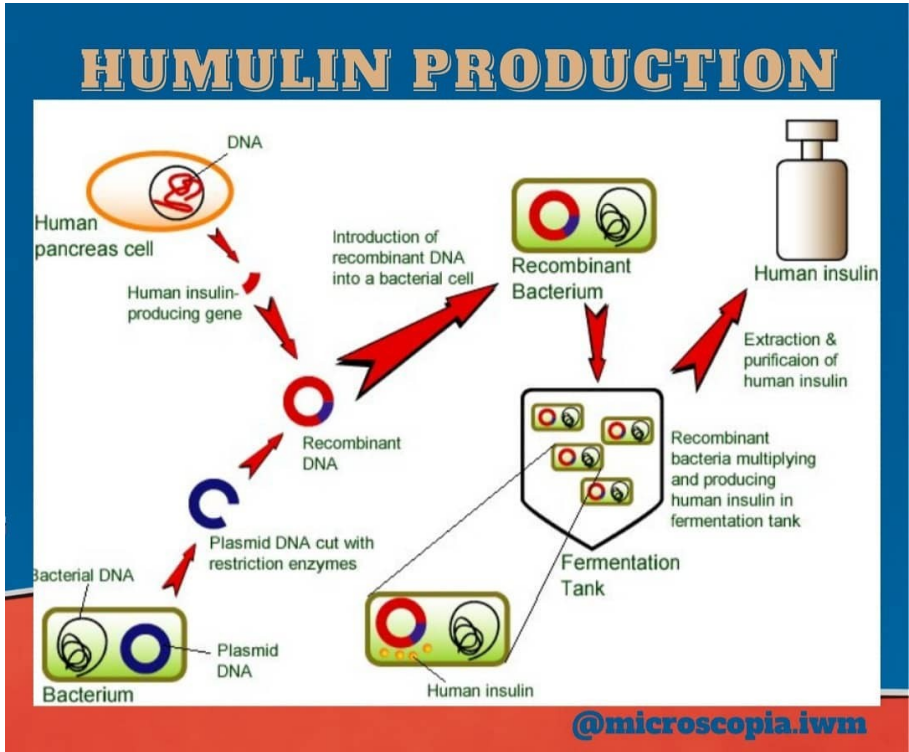
- hormon Protropin® (Genentech, 1985)
- interferon α Roferon A® (Hoffmann-La Roche, 1986)
- první rekombinantní vakcína proti hepatitidě B Recombivax® exprimovaná v kvasince Saccharomyces cerevisiae (Merck, 1986)
- první přípavek založený na monoklonální protilátce Orthoclone OKT 3 (Janssen-Ortho, 1986)(Cvak a Fusek, 2004).
- 2006 - registrováno 1452 biotechnologických firem v USA
- tetravalentní vakcína proti lidskému papilomaviru (HPV) s názvem Gargasil, Silgard , 2006




## tvorba GMO

- bakterie mění DNA (Agrobakterie) rostliny, aby ta dělala, co ony potřebují
- 1986, schválena první první transgenní rostliny – tabáku nesoucího vložený gen pro rezistenci k herbicidu. Environmental Protection Agency,c USA
- 70 % dnes pěstované bavlny je geneticky modifikovaných



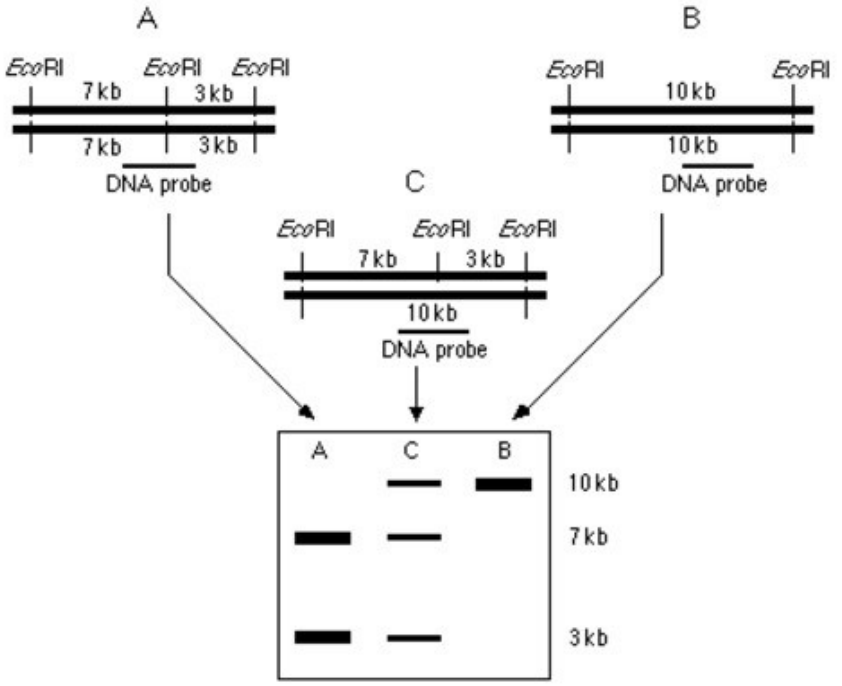


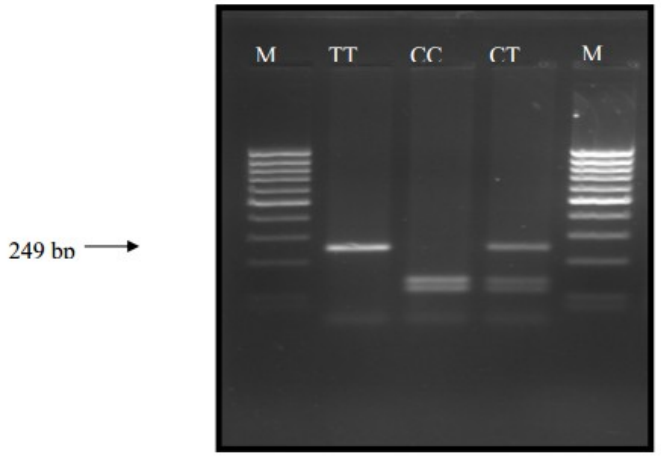
# RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

- Enzymatické štěpení DNA ve specifickém restrikčním místě
- **Restrikční endonukleázy**
- Produktem jsou fragmenty o různé délce
- Vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí gelové elektroforézy

- **Využití**:
  - mapování DNA, analýza modifikací DNA, příprava mutantů
  - na základě velikosti a počtu fragmentů lze sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, **tzv. polymorfizmy** (polymorfizmy vznikají přestavbou v řetězci, např. inzercí, delecí, substitucí bází)
  - příbuznost jedinců, určení paternity, identifikace osob

  - Neštěpená TT
  - Štěpená CC
  - Heterozygot CT



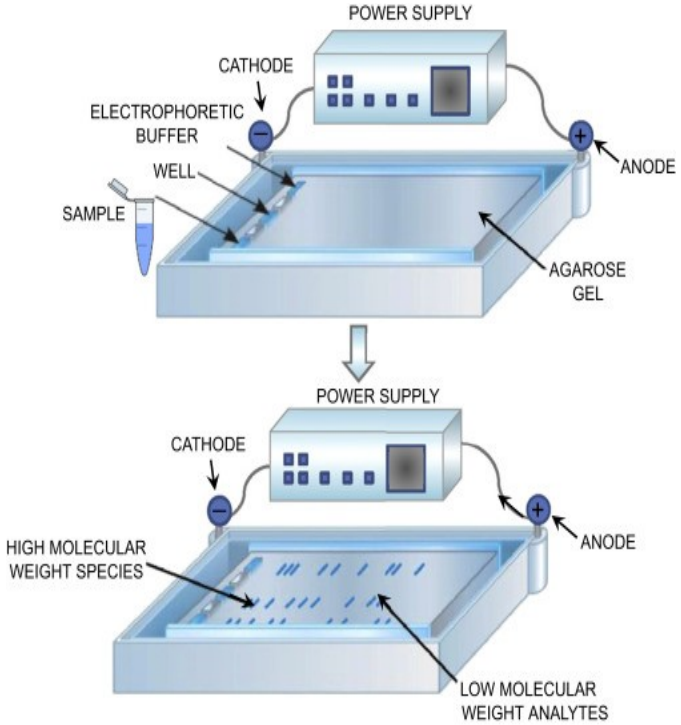



# Gelová elektroforéza - agarózová

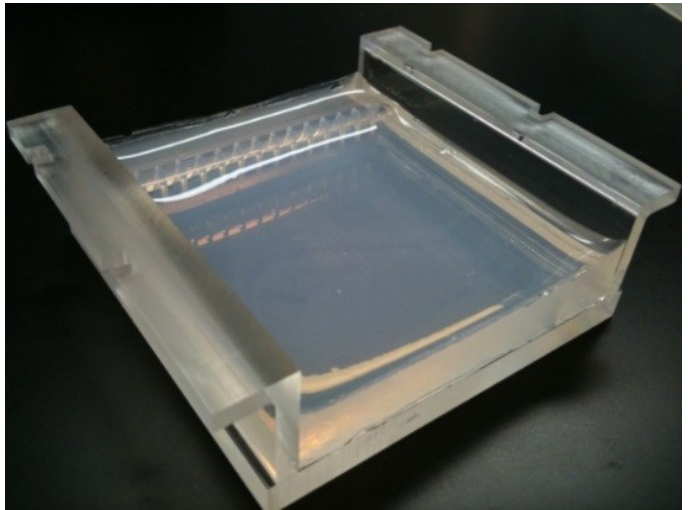
- **Separační metoda využívaná při izolaci a analýze NK (a proteinů = polyakrylamidová elfo)**
- **Izolující molekuly o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji, využívající jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli**
- **agarózová** (produkt mořských řas – agar)/polyakrylamidová

  Gely tvoří hustou síť, kterou větší molekuly procházejí pomaleji

  než menší molekuly –technika **molekulového síta**
- Rychlost pohybu je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku
- **DNA má uniformní negativní náboj** v elektrickém poli se pohybuje **od katody k anodě**

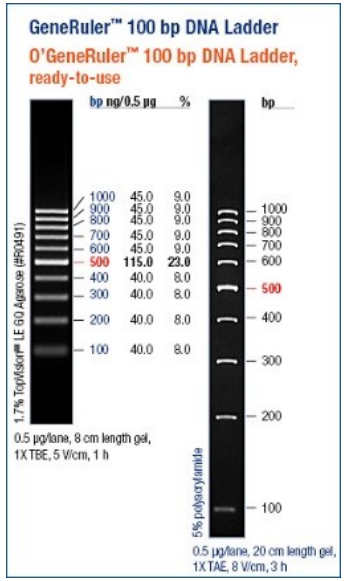


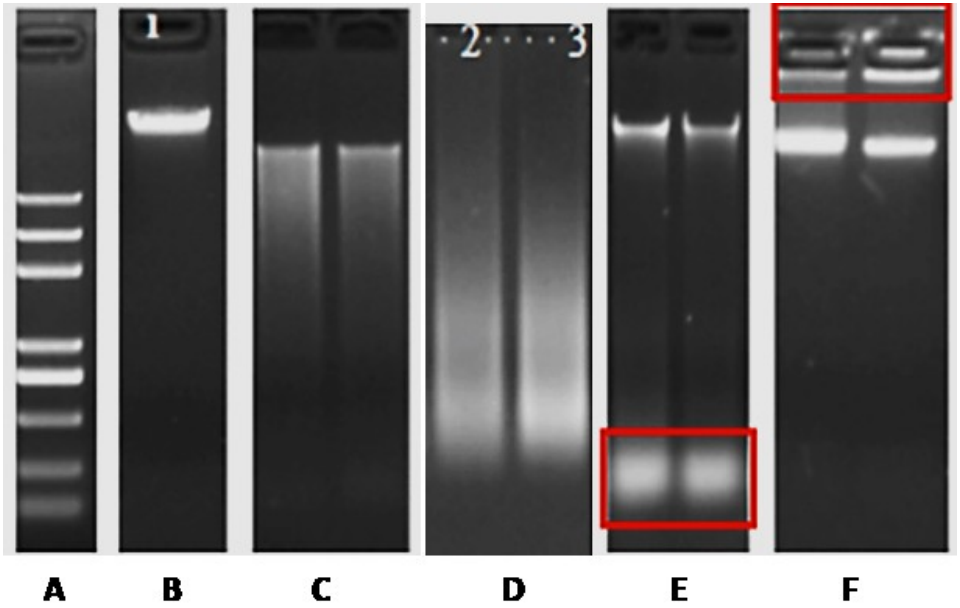

- EtBr – vmezeří se mezi báze, zviditelní DNA pod UV
  (po vazbě na DNA pod UV emituje oranžové světlo)



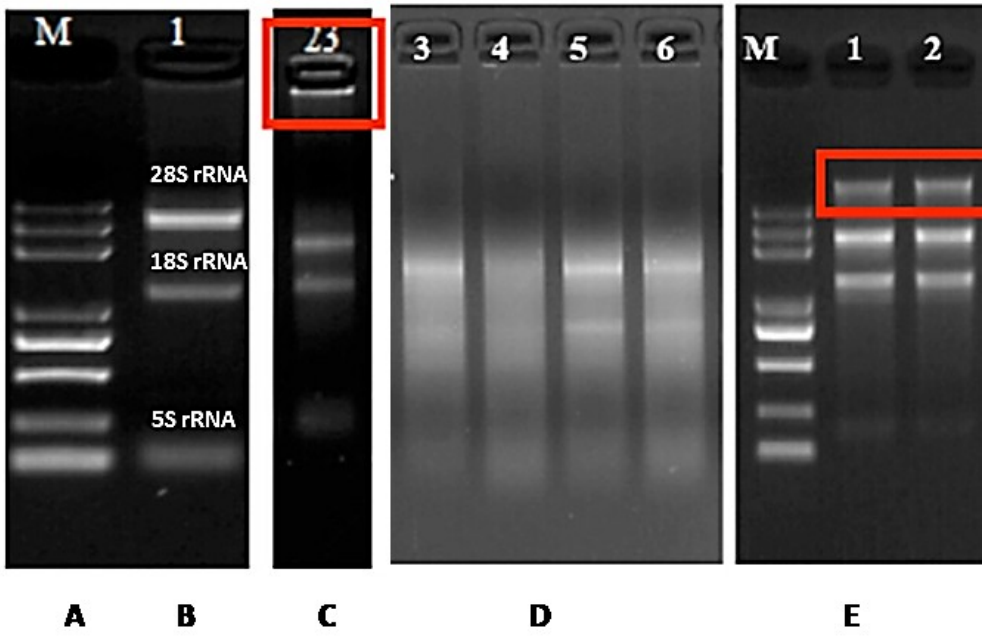
- Velikost fragmentu DNA lze stanovit dle hmotnostních standardů
  (= restrikční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů,
  jejichž velikost byla stanovena sekvenováním)

Části **aparatury**: elektroforetická vana, separační gel, pufr, zdroj stejnosměrného elektrického proudu




(B) **<u>Ideální vzorek DNA</u>**
(C) Částečně degradovaná DNA
(D) Degradovaná DNA
(E) DNA kontaminovaná RNA (degradovaná)
(F) DNA kontaminovaná proteinem




(A) Trans2K™ Plus DNA Marker (0,1 kb- 5 kb)
(B) **<u>Ideální vzorek RNA</u>**
(C) RNA kontaminovaná DNA a proteinem
(D) Degradovaná RNA
(E) RNA kontaminovaná gDNA

*Ribosomální RNA migruje v agarózovém gelu rychleji než stejně velký fragment DNA, a proto při použití DNA žebříčku nelze určit skutečnou velikost 28/18/5S rRNA

# Sekvenace DNA

- Stanovení **primární struktury DNA** (pořadí nukleotidů)

**a) chemická metoda –** dříve; degradace řetězců nukleových kyselin pomocí chemických činidel (dimethylsulfát, NaOH, hydrazin,..) – Maxam-Gilbertova metoda

**b) enzymatická metoda –** specifická inhibice enzymové syntézy DNA (ddNTP) – Sangerova metoda

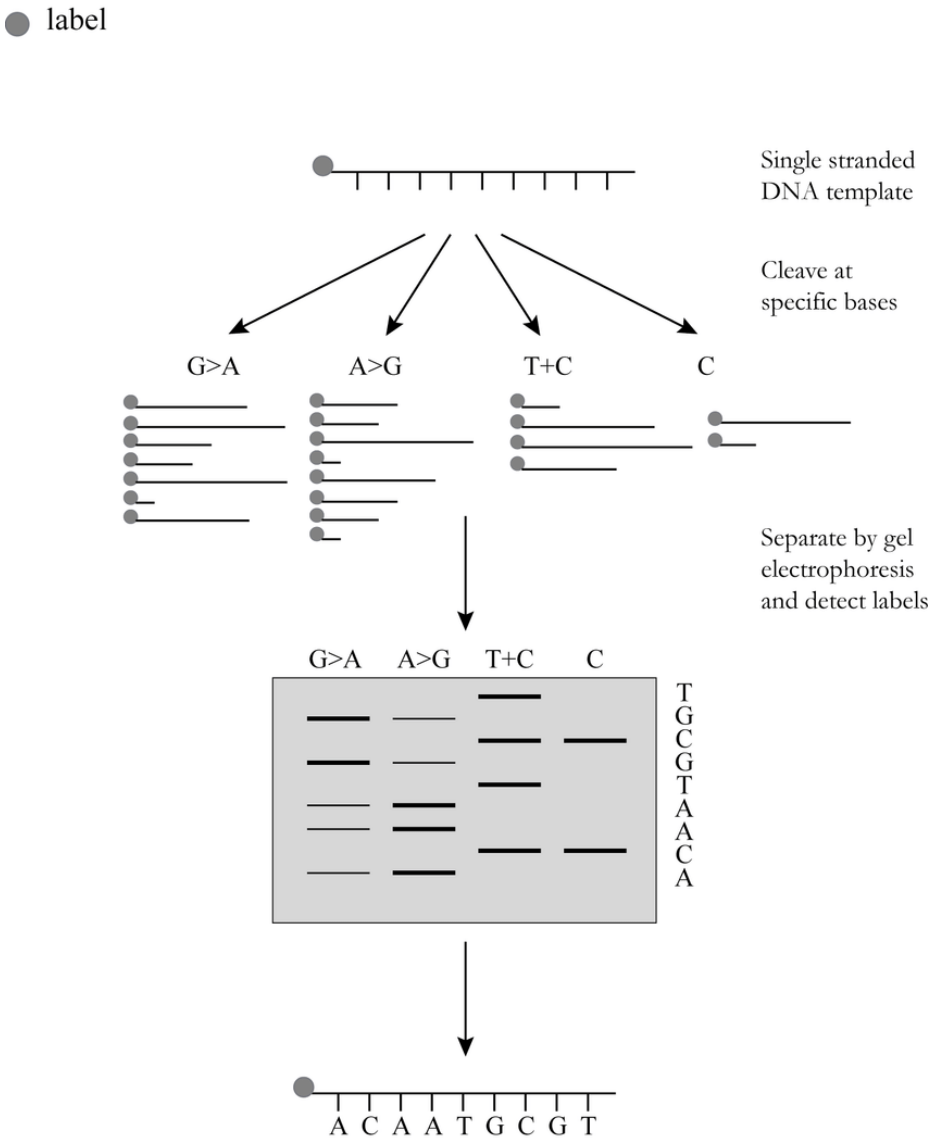
**c)** moderní velkoformátové aplikace založené např. na pyrosekvenování (**sekvenování nové generace**)

- **Produkt** – řetězce ssDNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jednu bázi (elfo rozdělení)

- **Vstupní materiál** – fragment DNA s přesně definovanými konci

# Maxam-Gilbertovo sekvenování

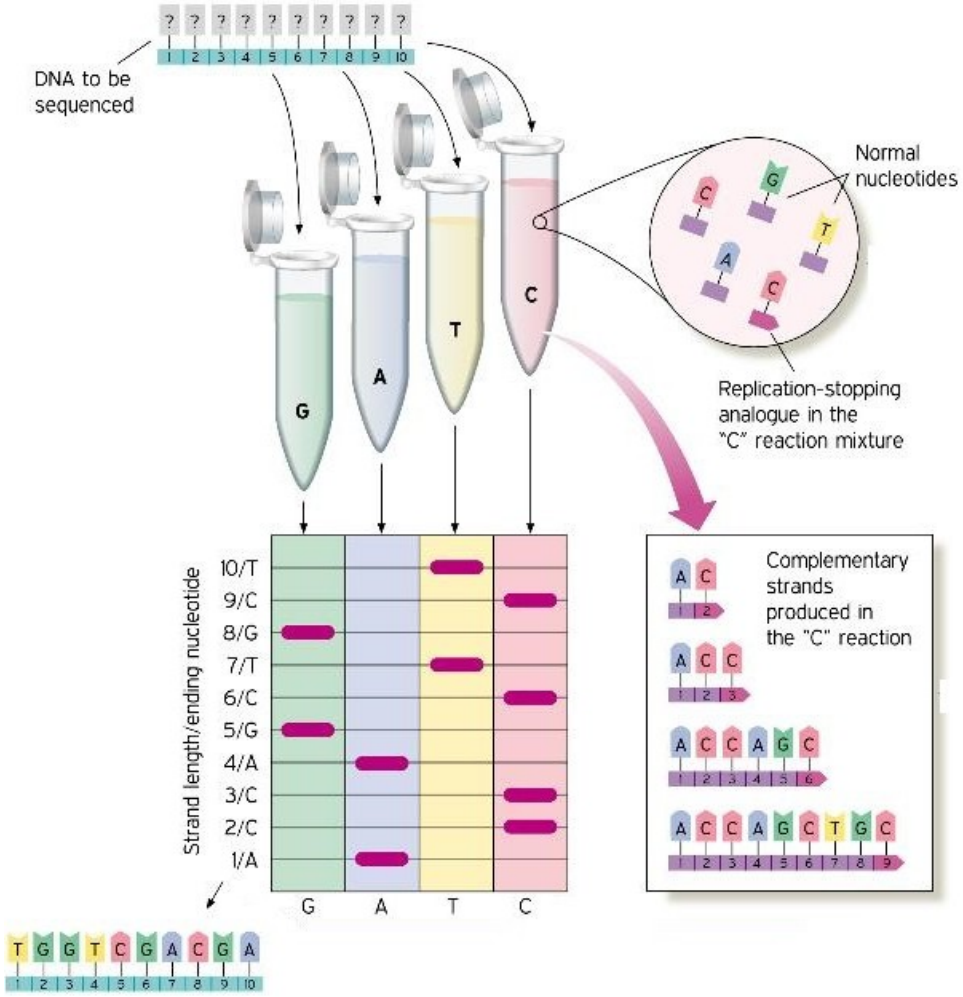
- Sekvence je odvozena z molekuly DNA, která se chemicky degraduje na fragmenty v místech, kde se vyskytuje báze určitého typu. Ty se následně separují pomocí elfo.
- **Chemická činidla** – příklad:
  - piperidin narušuje glykosidovou vazbu A a G (A + G)
  - hydrazin za přítomnosti NaCl reaguje pouze s C
  - NaOH při 90 °C způsobuje silné štěpení u A a slabé štěpení u C (A > C)
- Vyžaduje radioaktivní značení na jednom konci ssDNA.
- Reakce je prováděna ve 4 zkumavkách – v každé zkumavce jsou štěpeny pouze určité typy bazí.
- Vzniká směs různě dlouhých fragmentů končících v místě určité báze –> vyhodnocení pomocí elfo, stanovena sekvence daného úseku.




Video pro názornost: https://www.youtube.com/watch?v=_B5Dj8PL4E0

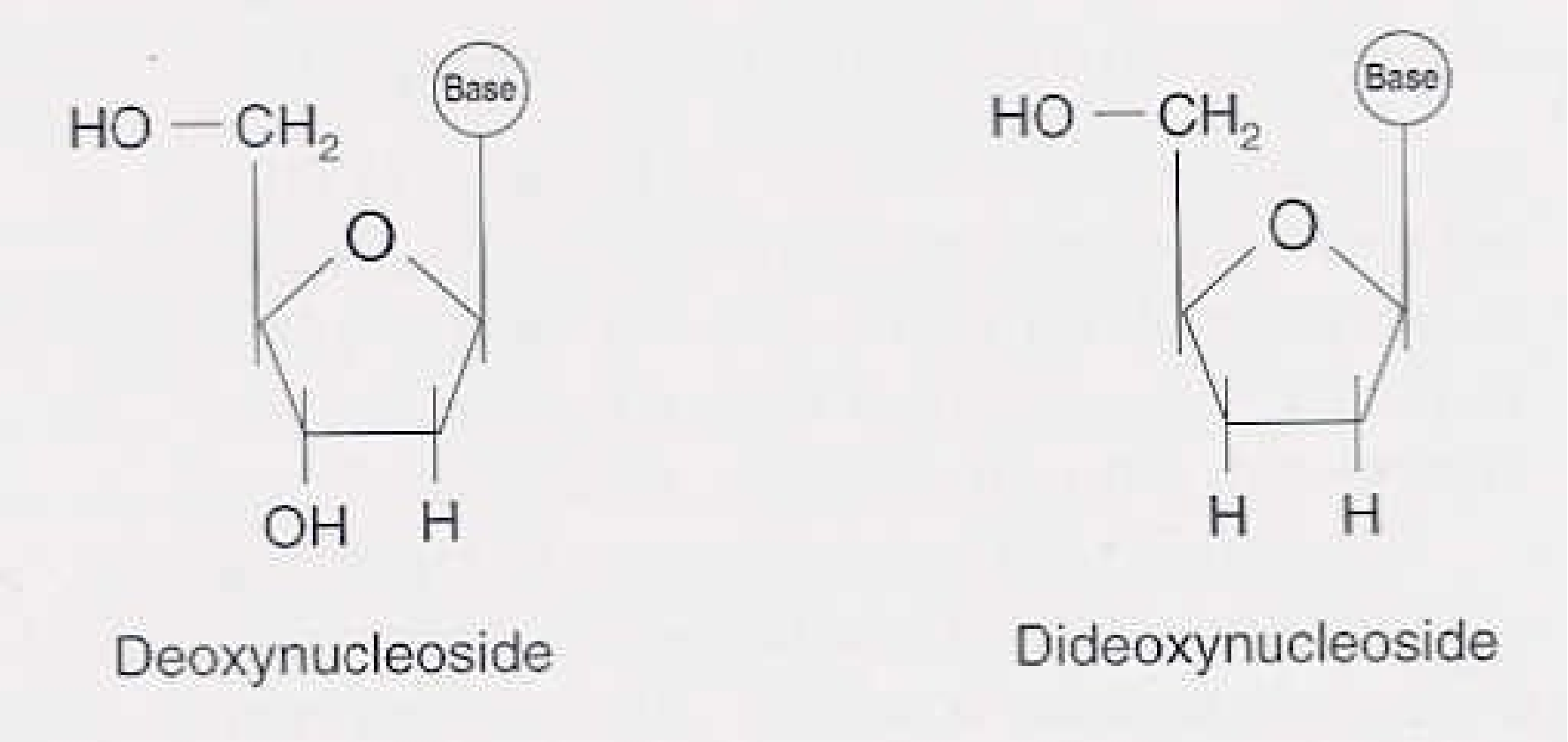
# Sangerovo sekvenování

- Enzymová metoda
- Založeno na **principu replikace** – ukončení syntézy DNA v okamžiku, kdy se ddNTP zařadí na místo dNTP
- **ddNTP** = analog dNTP, ale postrádá hydroxylovou skupinu na 3´ pozici uhlíku
- ddNTP – koncové terminátory
- **Reakční směs (4x)**
  - DNA templát
  - primer
  - ddNTP – v nízké  koncentraci
  - dNTP – v nadbytku (aby bylo možné získat fragmenty všech možných délek)
  - Taq DNA polymeráza - syntéze DNA od 5´ ke 3´ konci
  - pufr
- **Vyhodnocení** – elektroforéza
- Modifikace –> fluorescenčně značené ddNTP (4 různé barevné značky) – reakce provedena v jedné zkumavce



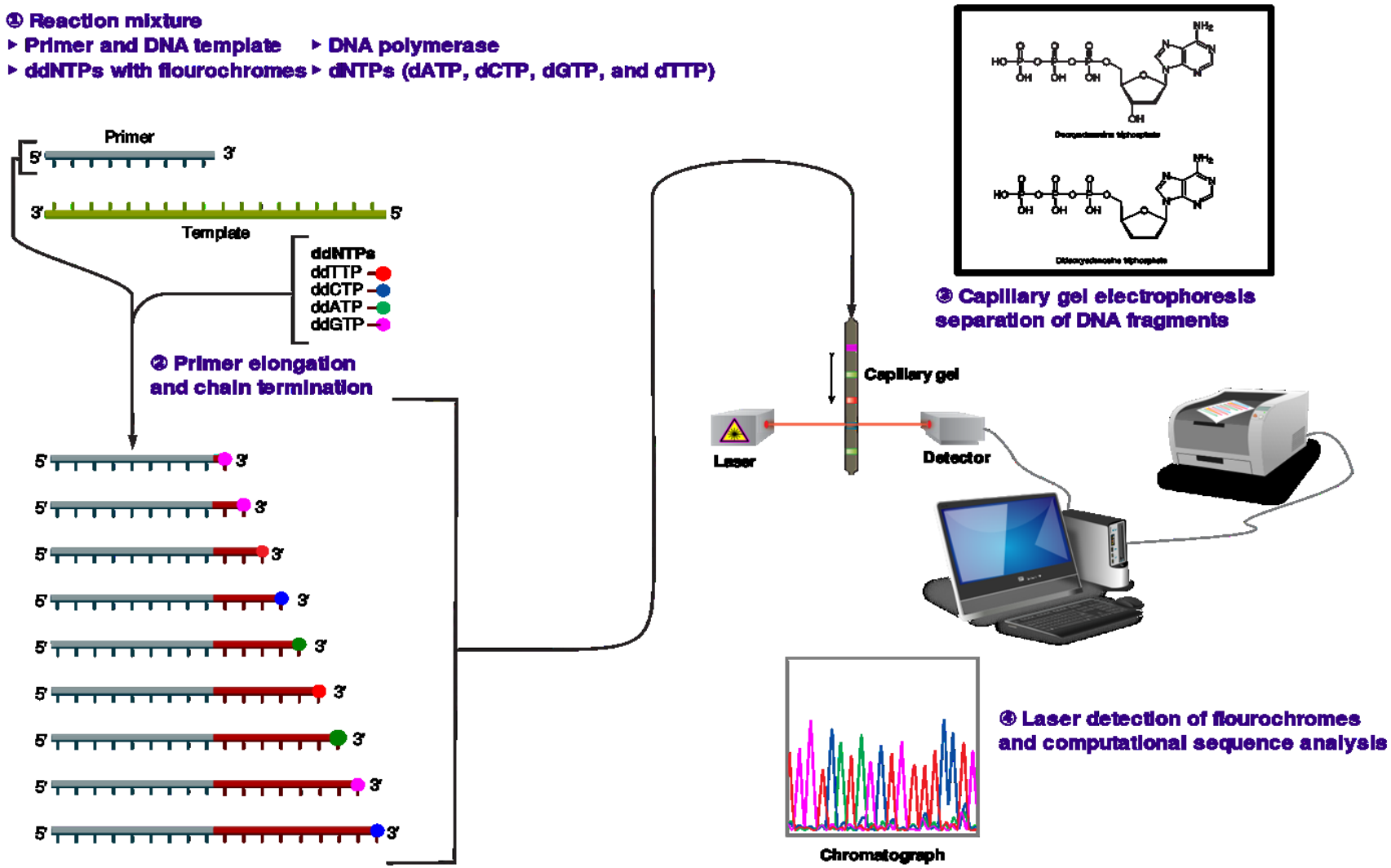

Video pro názornost: https://www.youtube.com/watch?v=wdS3j0TgbjM

# Deoxy versus dideoxy



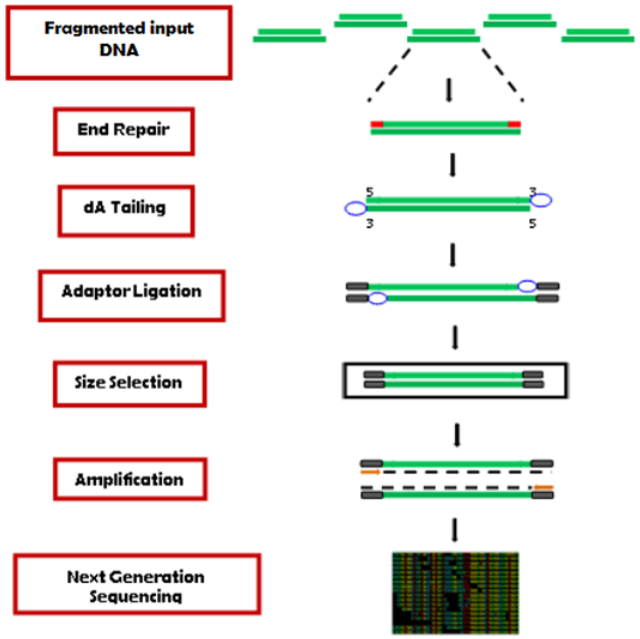
# Sangerovo sekvenování

- Kapilární sekvenace DNA s fluorescenčně značenými ddNTP

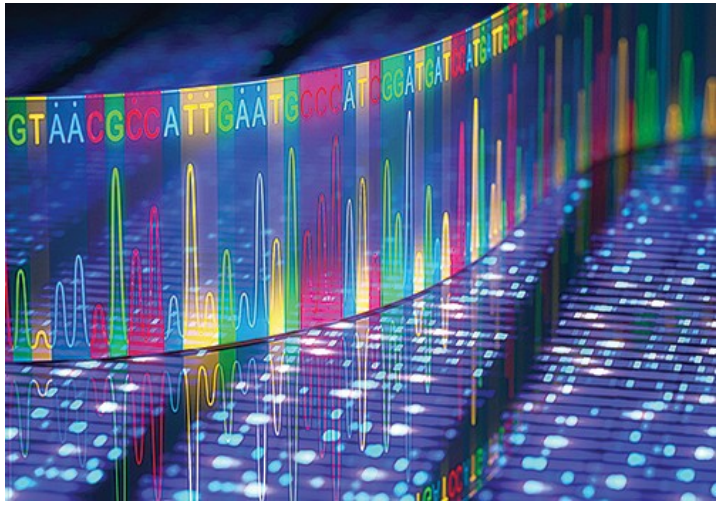


# NGS – Next Generation Sequencing

- Sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně
- Templátová DNA je fragmentována na úseky několik set bp dlouhé
- Konce fragmentů jsou enzymaticky zatupeny a napojeny k oligont určité sekvence (= adaptéry)
- Jednotlivé fragmenty jsou odděleně amplifikovány PCR a v dalším kroku paralelně sekvenovány




- Využití:
  - celogenomové sekvenování
  - sekvenování chromozomů, plazmidů, mt
  - studium genetické variability, mutační analýza
  - transkriptomová analýza



Video pro názornost:
https://www.youtube.com/watch?v=shoje_9IYWc

# Praktická část cvičení

# CO? Stanovení interleukinu IL-1beta +3953C/T (rs1143634) u pacientů s chronickou peridontitidou

Display Settings: Abstract

Send to:

J Periodontal Res. 2000 Jun;35(3):172-7.

## Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis.

Mark LL[1], Haffajee AD, Socransky SS, Kent RL Jr, Guerrero D, Kornman K, Newman M, Stashenko P.

Author information

**Abstract**

An association has been reported between polymorphisms in the genes encoding IL-1alpha (-889) and IL-1beta (+3953) (periodontitis susceptibility trait, PST), and an increased severity of periodontitis (18). In the present study, we determined if PST positive subjects with periodontitis exhibit elevated production of IL-1beta, compared to PST negative periodontitis patients. Peripheral blood monocytes were obtained from 10 PST+ and 10 PST- age- and disease-balanced subjects with adult forms of periodontitis. Monocytes were cultured with a panel of bacterial stimulants, including Escherichia coli and Porphyromonas gingivalis LPS, and whole formalinized periodontal pathogens P. gingivalis, Bacteroides forsythus and Prevotella intermedia, and health-associated organisms Veillonella parvula and Streptococcus sanguis. Our results demonstrate that monocytes from PST+ and PST- patients showed no significant differences in IL-1beta production in response to any stimulant tested. In addition, the periodontal pathogens P. gingivalis, B. forsythus and P. intermedia failed to stimulate higher IL-1beta responses compared to health-associated species V. parvula and S. sanguis. A marked interindividual variation in production of IL-1beta was seen, with high, low and intermediate responders present in both PST+ and PST- groups. We conclude that genetic loci other than the PST polymorphisms are also important regulators of monocyte IL-1 responses.

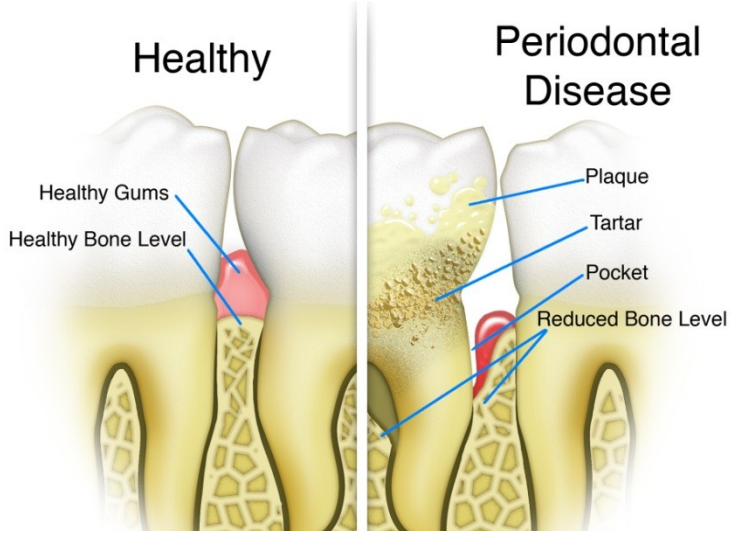
PMID: 10929872 [PubMed - indexed for MEDLINE]

# PROČ? cytokiny x onemocnění parodontu

## Zánětlivé onemocněnění parodontu

- komplexní onemocnění (endogenní a exogenní faktory)

1. Příčina zánětu-mikrobiální plak (anaerobní bakterie) – začátek imunitní odpovědi
2. Individuální predispozice




## RIZIKOVÉ A PROTEKTIVNÍ ALELY

IL-1beta – prozánětlivý cytokin – rizikové alely (Kornman, 1997)

Quintessence Int. 2010 Jun;41(6):517-25.

**Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature.**

Grigoriadou ME[1], Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR.

**Author information**

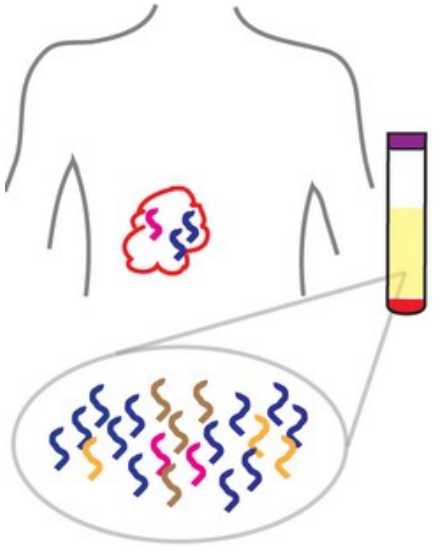
[1]Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Albert-Ludwig University, Freiburg, Germany. mariannagrigoriadou@yahoo.com

**Abstract**

Periodontitis is considered to be a multifactorial disease. Studies have indicated that part of the clinical variability in periodontitis may be explained by genetic factors. Genes can affect the immunoinflammatory host response to bacterial challenge in the periodontal tissues by means of an overproduction of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1). IL-1 plays an important role in the pathogenesis of periodontitis, through its involvement in the regulation of the host's inflammatory response and bone resorption. Therefore, the genes that encode for IL-1 production have recently received most attention as potential predictors of periodontal disease progression. Hence, the relationship between IL-1 genotype and periodontal disease has been investigated by a number of studies. This review article aimed to determine whether IL-1 could be regarded as a genetic marker for periodontitis by reviewing data concerning susceptibility, clinical parameters, and treatment strategies in relation to the IL-1 genotype. The review concluded that there is currently limited evidence to implicate a specific IL-1 genotype as a risk factor for chronic periodontitis in white populations. However, there is limited evidence that genetic variation in the IL-1B polymorphism could be a risk factor for aggressive periodontitis.

PMID: 20490394 [PubMed - indexed for MEDLINE]

# JAK? METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE



Práce z biologickým materiálem (PLNÁ KREV, PLAZMA, SÉRUM)

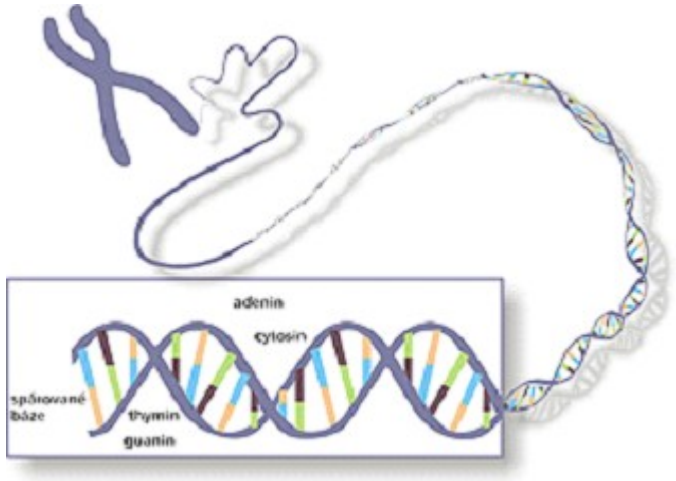
Izolace **DNA**

1. Amplifikace DNA úseku - PCR
2. Detekce polymorfního místa - Restrikční analýza
3. Vizualizace - Elektroforéza

# JAK?

1. **PCR** IL-1B +3953C/T (rs1143634) u subjektů s chronickou peridontitidou

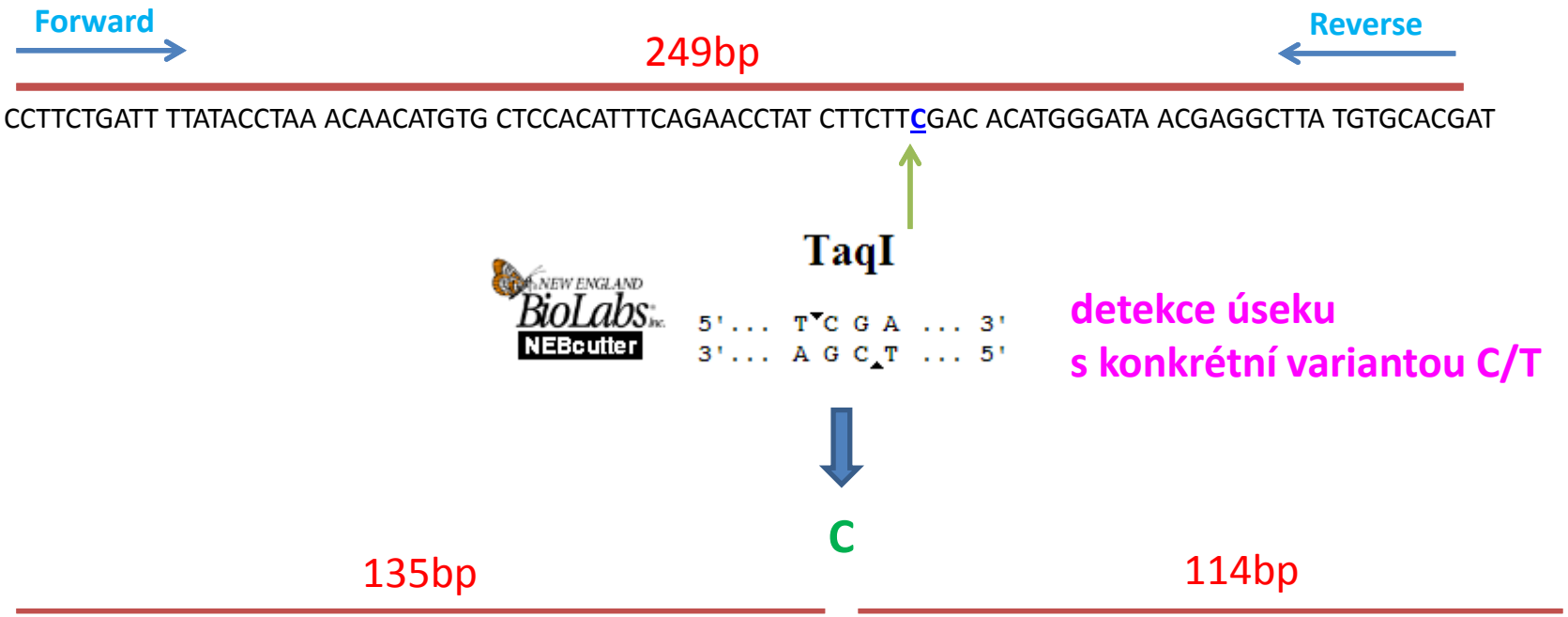
CCTTCTGATT TTATACCTAA ACAACATGTG CTCCACATTTCAGAACCTAT CTTCTTCGAC ACATGGGATA ACGAGGCTTA TGTGCACGAT




**amplifikace vybraného úseku z celkové DNA**

# JAK?

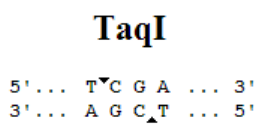
1. **RFLP** IL-1B +3953C/T (rs1143634)
   pomocí restrikční endonukleázy TaqI



# JAK?

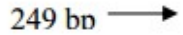
1. **ELFO** restrikčních fragmentů po štěpení TaqI (Agarózový gel)

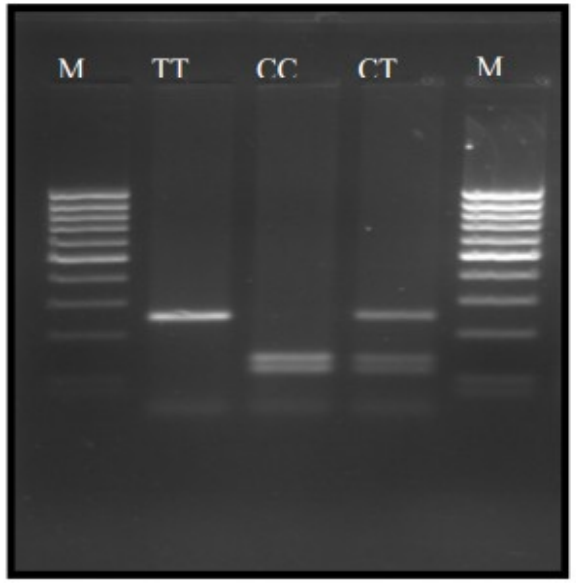
1. Neštěpená TT




2. Štěpená CC

3. Heterozygot CT – 3 pruhy

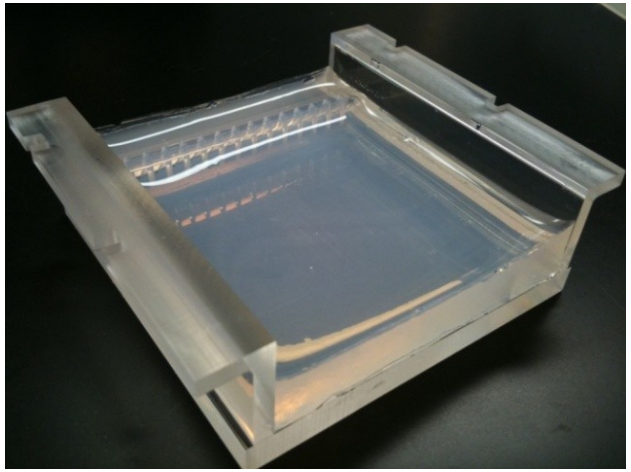



**vizualizace DNA fragmentů po restrikční analýze**

# ELFO – praktické provedení

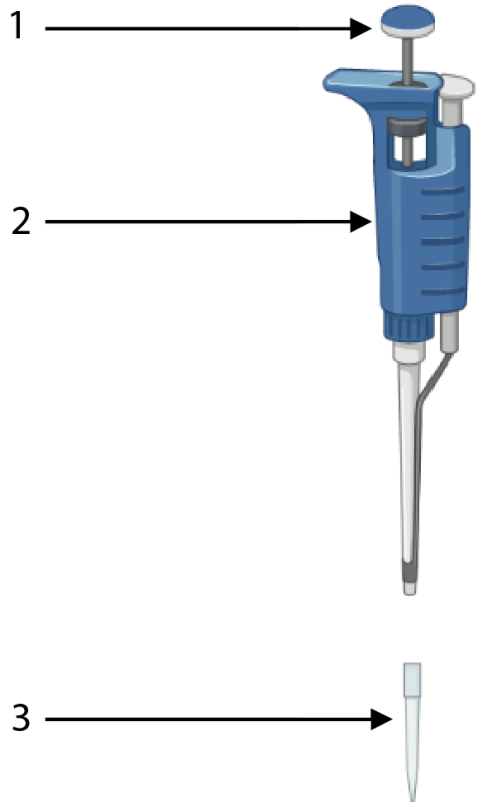
1. Připravit nalévací misku + hřebínky.
2. Připravit gel (2%): navážit agarózu a přenést do Erlenmayerovy baňky, přidat 1x TBE pufr (200 ml).
3. Zvážit a v mikrovlnce přivést k varu.
4. Po zchladnutí na cca 40 °C přidat EtBr (1 ul / 10 ml).
5. Nechat gel ztuhnout (cca 30 min).
6. Odstranit hřebínky a gel vložit do elektroforetické vany s 1x TBE pufrem (elektrolyt).



**7. Připravit kapky nanášecí barvy na parafínový papír a smíchat s vzorky DNA.**
**8. Vzorky nanést do jamek.**
**9. Zapojit do zdroje elektrického napětí.**
**10. Sledovat postup DNA gelem (20min).**

**11. Vizualizace pod UV a vyhodnocení.**

# Práce s mikropipetou




Mikropipeta
1 - dvoupolohový ovladač
2 - držák
3 - jednorázová špička

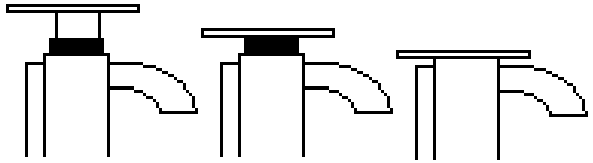
- Pipetu držím vždy **vertikálně** (špičkou dolů).
- Pipetu držím v dlani zavěšenou za ukazováček a ovládám ji palcem.
- Vyberu optimální rozsah objemu!!! Nikdy nepřekračuju rozsah pipety nahoru ani dolů!!!
- Před pipetováním musíme na pipetu nasadit příslušnou **špičku** (dle objemového rozsahu pipety).
- Vždy používám novou sterilní špičku.
- Pokud opakovaně pipetuju tentýž roztok, ponechám na pipetě po celou dobu práce tutéž špičku.
- K odhazování špiček slouží tlačítko na boční straně pipety.

# Práce s mikropipetou

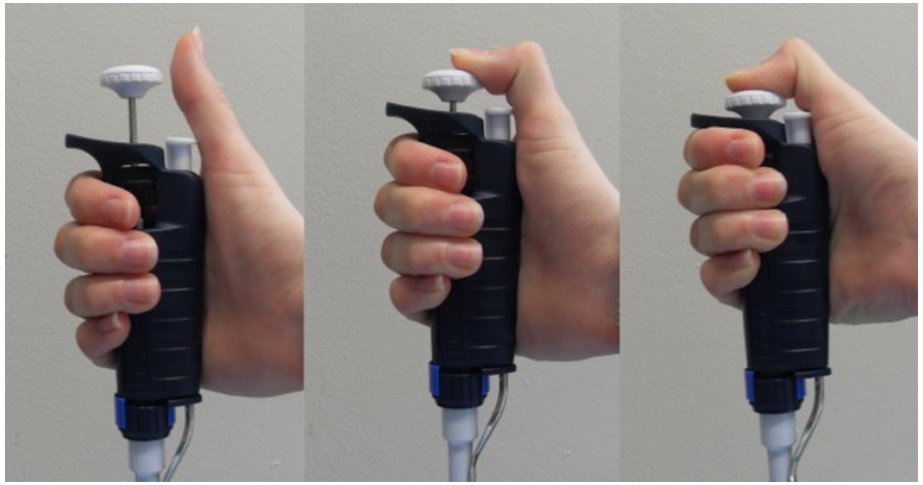
**Postup:**

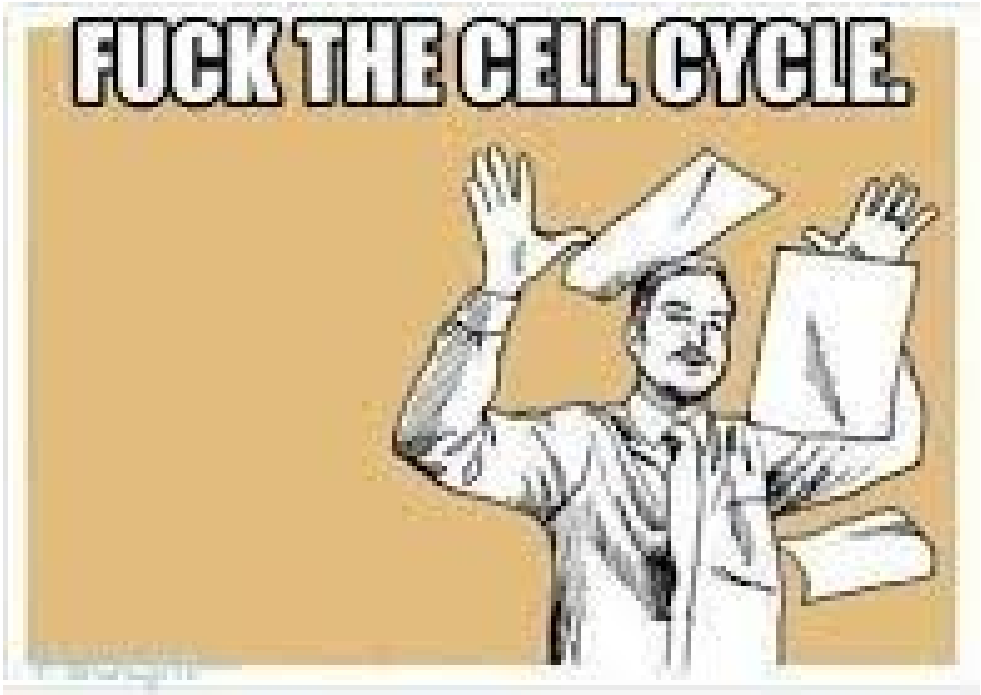
- Na pipetě nastavím požadovaný objem. Vodorovná čára na displeji značí desetinnou čárku.
- Nasadím špičku na pipetu (důkladně utěsním) – ne rukama!
- Pipetu uchopím tak, abych si o ukazováček podepřel/a držák a palcem tak mohl/a pracovat s dvoupolohovým ovladačem.
- Nasátí: ovladač stlačím do polohy „1“ (špička je ve vzduchu), ponořím do roztoku a pomalu pustím.
- Vypuštění: pipetu ponořím do roztoku, kam chci pipetovanou látku přidat. Vypustím roztok stlačením ovladače do polohy „1“, dokončím stlačením do polohy „2“ a vyjmutím špičky z roztoku (stále v poloze „2“).
- Ovladač pustím, špičku vyhodím.

*Obr. 3.2.2: Polohy ovladače:*



0 1 2




FUCK THE CELL CYCLE.

JUST KIDDING THE TEST IS NEXT WEEK...
memegenerator.net