

Bezpečnost práce při praktických cvičeních z MB

V laboratoři se:

1. pracuje v ochranném oděvu, tj. v plášti
2. na pracovních stolech jsou pouze pomůcky určené k provádění zadaných úkolů, tzn., na stolech nesmí být potraviny, nápoje apod.
3. během cvičení je zákaz kouření, konzumace poživatin a pití nápojů a rušení hlukem ostatních pracovníků
4. je třeba dbát pokynů vyučujících, aby nedošlo k poškození zařízení, pomůcek a znehodnocení chemikálií.
5. při práci s infekčním materiálem zabránit vzniku alimentární infekce, tzn., nepipetovat suspenze ústy, ale používat bezpečnostní nádstavce na pipety
6. při práci s chemikáliemi typu žiravin, hořlavin a mutagenů používat bezpečnostní nádstavce na pipety, při práci s mutageny např. s EB používat rukavice, při práci s UV zářením používat ochranné brýle
7. při práci s plynovými kahany dbát na to, aby nedošlo k požáru a k ublížení na zdraví. Po ukončení práce zamezit úniku plynu.
8. udržovat čistotu na pracovních stolech a v prostorách laboratoře, použitý materiál třídit, tzn., sklo odkládat do plastových kbelíků, zvláště odkládat kovové zátky, použité plasty tj. špičky odkládat do zvláštních nádobek.

doporučení: nosit sebou návody, poznámkové sešity, psací potřeby a kalkulačky. Podepsat formulář o školení bezpečnosti práce.

ZÁSADY PRO PRÁCI V M-B LABORATOŘI 1

- Je třeba pracovat s ohledem na vlastní bezpečnost a na prevenci kontaminace pracovních pomůcek. Důsledně separovat použité pomůcky k dekontaminaci. Jednorázové plastové pomůcky (špičky) likvidovat do plastových PVC sáčků, skleněné pipety a zkumavky odložit do dekontaminačního roztoku.
- 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.
- U zmražených vzorků zásobních roztoků (enzymy, lysozym, lysostafin, antibiotikum apod...) se musí nejprve rozpustit celý objem a pak teprve provést náběr sterilní špičkou.
- Při každém náběru enzymů ze zásobního roztoku je třeba používat vždy nové sterilní špičky!
- Některé roztoky používané pro izolace DNA je třeba připravit čerstvé a některé je třeba uchovávat při 4 °C a těsně před a během použití je chladit, nejčastěji na ledu.

ZÁSADY PRO PRÁCI V M-B LABORATOŘI 2

- Zásobní roztoky enzymů se uchovávají při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při použití je třeba je mít uložené na ledu nebo v chladícím boxu. Je třeba zkontrolovat koncentraci zásobních roztoků v pracovních návodech a postupech a není vhodné s nimi plýtvat, **jsou drahé**. 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.
- Směsný roztok fenolu a chloroformu v poměru 1:1 je převrstvený vodným roztokem (TE pufr), se kterým se nemísí. Je třeba nabrat organickou směs pod hladinou TE pufru!
- Při přípravě pracovních roztoků nemísit navzájem koncentráty, ale postupně přidávat do vodného roztoku a nakonec doplnit vodou do výsledného objemu.

Přehled úloh řešených v praktiku

- 1. Izolace plazmidové DNA, vektoru pUC 18 z *E. coli* DH5 α**
- 2. Stanovení koncentrace DNA spektrofotometricky a výpočty. Restrikční štěpení dsDNA, plazmidu
Elektroforéza +restrikční mapování genomové DNA**
- 3. Transformace *E. coli* plazmidovou DNA**
- 4. Příprava sacharózového gradientu a PCR**
- 5. Zápočtový, test a zápočet**

Jméno:

Datum:

Protokol č.

název úlohy:

Studovaný předmět/objekt...např. druh kultury + název kmene.

Materiál: ...(u použitých roztoků, pufrů, enzymů aj. uveďte přesný postup přípravy ze zásobních roztoků nebo chemikálií včetně výpočtu koncentrací a objemů).

Princip metody: ...lze stručně vyjádřit i schematicky/obrázkem.....

Výsledky: ve formě textu a tabulek a výpočtů.....

Závěr: Výstižné, logické a smysluplné vyhodnocení provedené úlohy. (diskuse o příčinách případného neúspěchu)

POSTUPY IZOLACE A PURIFIKACE NK

LYZE BUNĚK

detergenty (dodecylsulfát sodný)
enzymy (lysozym)
mechanicky
kombinace více metod

DEPROTEINACE

fenol a chloroform nebo enzymové metody
(proteináza, pronáza)
ultracentrifugace v gradientu CsCl - odstranění
kontaminací (zbytků buněk, bílkovin, RNA).
RNA lze odstranit enzymaticky pomocí RNázy

SRÁŽENÍ DNA

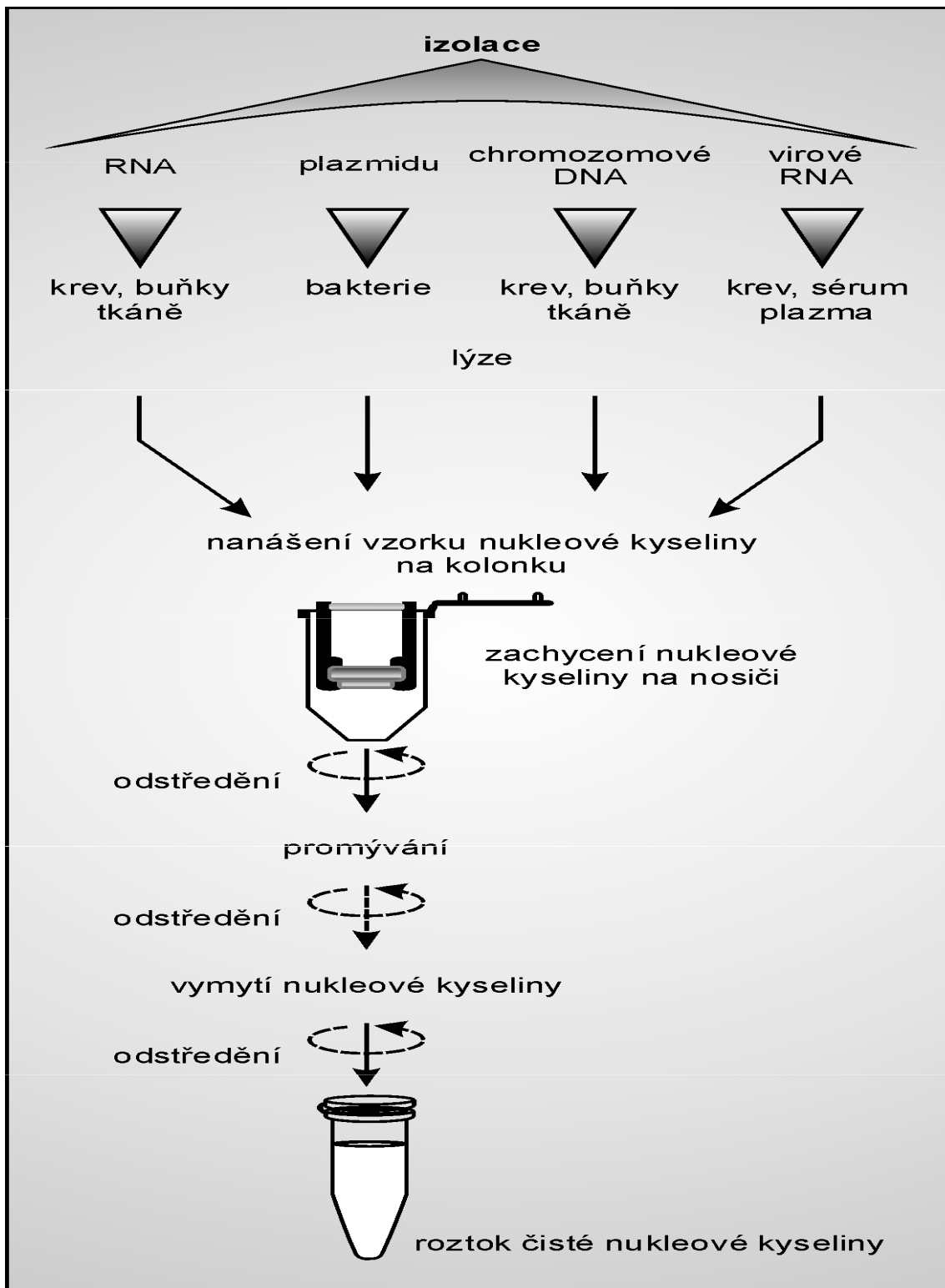
z vodného roztoku (etanol nebo izopropanol)

ROZPUŠTĚNÍ DNA

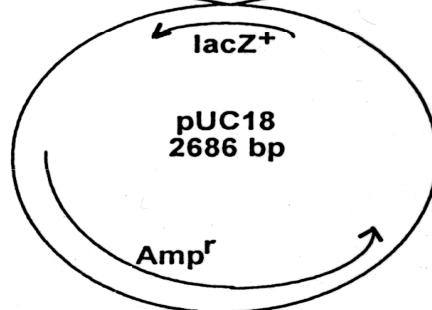
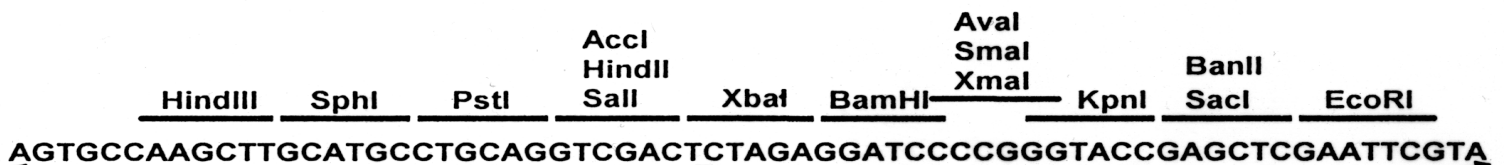
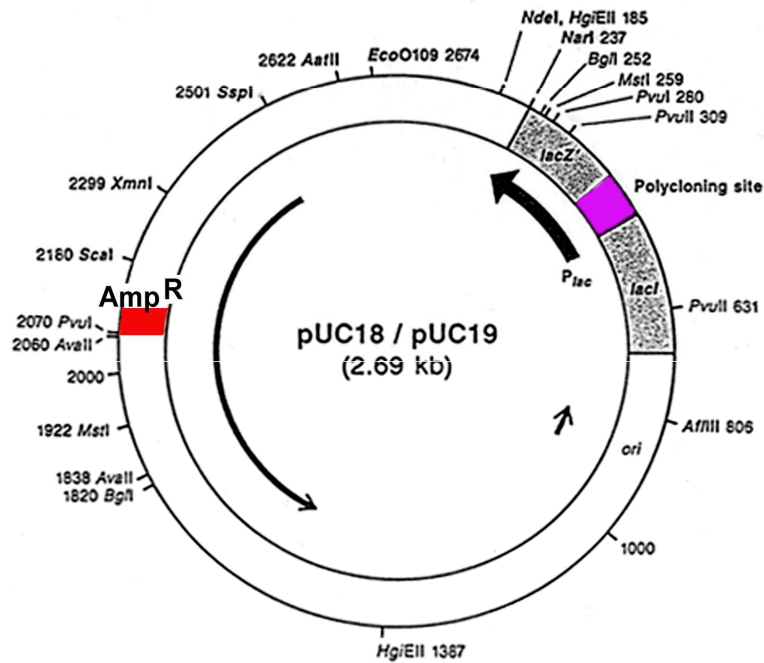
v pufru (ten musí obsahovat EDTA, která váže kationty). Eliminace rizika vyplývajícího z fyzikálních vlastností NK - (DNA je snadno lámavá)

Úchova DNA při 4°C (plazmidy i při -20 °C)

Izolace nukleových kyselin na chromatografických kolonkách



Izolace plazmidové DNA (pUC18) u *E. coli* DH5 α alkalickou lyzí



Mnohočetné klonovací místo plazmidového vektoru pUC18

Postup izolace plazmidové DNA

Z 18hod. třepané kultury *E. coli* (pUC 18) narostlé v LB bujonu s ATB - (AMP 100 µg/ml) odebrat 1,5 ml suspenze do Eppendorf. mikrozkušavky.

Centrifugujeme 12 000 rpm /3 min. Supernatant odlít pryč.

Sediment resuspendujeme ve 100 µl chlazeného roztoku A (TEGLU-puftr), na vortexu nejprve důkladně promíchat, a pak teprve přidat lysozym na výslednou koncentraci 500 µg /ml a RNázu na výslednou koncentraci 10 µg /ml a opatrně promíchat

Inkubace 5 min / 20 °C - (*vznik protoplastů*).

Přidat 200 µl roztoku B (NaOH+ SDS), opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. (*nesmí se míchat na vortexu*).

Inkubace na ledu 5 min - (*dochází k lyzi buněk a denaturaci DNA*).

Přidat 150 µl ledem vychlazeného roztoku C (K-acetát). Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky.

Inkubace na ledu 5 - 10 min – (*dochází k renaturaci plazmidové DNA*), chromozomální DNA vytváří komplex s proteiny a s SDS.

Zcentrifugovat zbytky buněk a chromozomální DNA 12 000 rpm/5 min/ 4 °C (*chlazený rotor*).

Odebereme supernatant do čisté mikrozkušavky a odstraníme proteiny extrakcí stejným objemem směsi fenol:chloroform (1:1), promíchat převrácením, centrifugovat při 12 000 rpm/5 min/ 4 °C (*chlazený rotor*), poté odebereme horní vodnou fázi a stejným způsobem ji zpracujeme chloroformem (tj. Sevageovou směsí), opět centrifugovat při 12 000 rpm /5 min/ 4 °C (*chlazený rotor*).

K horní vodné fázi přidat 1/10 objemu 3M octanu sodného, promíchat a poté přidat 2 objemy vychlazeného 96% etanolu, promíchat převrácením, nechat stát 10 min při - 70 °C).

Centrifugace 12 000 rpm / 15 min/ 4 °C. Opatrně odstranit alkohol a k peletu přidat 1 ml 70% etanolu, nechat stát 10 min při 20 °C.

Opět zcentrifugujeme při 12 000 rpm/15 min/ 4 °C a **rychle** a **opatrně** odstranit alkohol. Plazmidový pelet v mikrozkušavce otočené dnem vzhůru nechat usušit, buď při pokojové teplotě, nebo dosušit ve vakuu (2 až 3 min.).

Vysušenou DNA rozpustit v 50 µl TE puftru (pH 8,0). Uchovat při -20 °C.

Význam roztoků v procesu izolace plazmidu alkalickou lyzí

Roztok A =TEGLU s glukózou je pufr, **EDTA** je inhibitor nukleáz a vychytává (váže) dvojmocné ionty Mg^{2+} , které působí jako kofaktory nukleáz.

Roztok B s **NaOH** je lyzační, zvyšuje pH směsi na 12-12,5, denaturace LdsDNA, plazmidová CdsDNA denaturuje částečně a reverzibilně.

SDS = **aniontový detergent** dokončuje lyzi a účastní se odstranění proteinů

Roztok C = **octan draselný** neutralizuje hydroxid, zdenaturovaná DNA renaturuje, tvoří komplex s proteiny a vysráží se. Aby sraženina zůstala v sedimentu a nezvyšovala se iontová síla vlastního lyzátu (supernatantu), je nutné pracovat při nízké teplotě.

směs **fenol-chloroformu** denaturuje proteiny, chloroform pak odstraňuje zbytky fenolu (fenol se může též odstranit dialýzou)

Význam roztoků v procesu izolace plazmidu alkalickou lyzí - pokračování

96% etanol - sráží plazmidovou DNA a udrží ji vysráženou.

V 70% etanolu se ve zbytkové vodě rozpustí všechny zbytky iontů solí.

Ampicilin: 100 µg/ml (v deionizované vodě) pro použití do **LB-bujonu** (10µl/10ml).

Lysozym (muraminidáza): Navážka 10 mg/ml (rozpouští se v deionizované vodě) úchova při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (manipulace s pracovním roztokem na ledu).

RNáza: Navážka 10mg/ml (rozpouští se v deionizované vodě). Úchova při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (manipulace s pracovním roztokem na ledu).