

**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE**

**ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE**

**KURZ BI 4035 PRAKTIKUM Z MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE**

**Vyučující: Mgr. TIBOR BOTKA, Ph.D.**

**tibor.botka@mail.muni.cz**

**Výuka je povinná a probíhá v jarním semestru akademického roku**

## **ÚVODNÍ KURZ PRAKTIKA.**

1. PROVOZ A BEZPEČNOST PRÁCE
2. ZÁSADY PRO PRÁCI V MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ  
LABORATOŘI

## **PŘEDPOKLÁDANÉ PRAKTICKÉ ZNALOSTI POSLUCHAČŮ**

1. MANIPULACE S PIPETMANY
2. NALÉVÁNÍ MISEK, ROZTĚRY KULTUR KLIČKOU A HOKEJKOU  
KULTIVACE MISEK
3. KONTROLA STERILITY KULTURY KŘÍŽOVÝM ROZTĚREM
4. HODNOCENÍ KULTIVACE MIKROORGANISMŮ CPM

## **PŘEDPOKLÁDANÉ TEORETICKÉ ZNALOSTI POSLUCHAČŮ**

1. MOLÁRNÍ ROZTOKY- PŘEVODY 1M na 1mM
2. OBJEMY 1 ml na 1  $\mu$ l
3. KONCENTRACE (% ní W/V ) ROZTOKY
4. KONCENTRACE (% ní V/V) ROZTOKY
5. SMĚŠOVACÍ PRAVIDLO

**Nosit sebou plášť, protokoly, poznámkový sešit, psací potřeby a kalkulačku.**

**Podepsat formulář o školení bezpečnosti práce.**

# PROVOZ A BEZPEČNOST PRÁCE PŘI PRAKTICKÝCH CVIČENÍCH Z MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

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 potravin a pití nápojů a rušení hlukem ostatních pracovníků a diplomantů na katedře.
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 nástavce na pipety.
6. Při práci s chemikáliemi typu žíravín, hořlavin a mutagenů používat bezpečnostní nástavce 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.
8. Udržovat čistotu na pracovních stolech a v prostorách laboratoře, **důsledně třídit** použitý materiál třídit, tzn., sklo odkládat do plastových kbelíků s dekontaminačním roztokem, zvláště odkládat kovové zátky, použité plasty tj. špičky odkládat do zvláštních nádobek a PVC sáčků.
9. Je třeba pracovat s ohledem na vlastní bezpečnost a na prevenci kontaminace pracovních pomůcek.

10. 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.
11. U zmražených vzorků zásobních roztoků (enzymy, lysozym, lysostafin, antibiotikum apod...) se musí nejprve rozpustit celý objem a pak teprve provést náběr sterilní špičkou.
12. Při každém náběru enzymů ze zásobního roztoku je třeba používat vždy nové sterilní špičky!
13. Zásobní roztoky enzymů se uchovávají při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a při použití je třeba je mít uložené na ledu. Množství enzymů je určeno 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.
14. 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!
15. Některé roztoky používané pro izolace DNA je třeba připravit čerstvé a některé je třeba uchovávat při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a těsně před a během použití je chladit, nejčastěji na ledu.
16. Při přípravě pracovních roztoků nemísit navzájem koncentráty, ale postupně přidávat do vodného roztoku a nakonec doplnit vodou do výsledného objemu.

# PŘEHLED KURZŮ A ÚLOH ZÁKLADNÍHO PRAKTICKÉHO CVIČENÍ Z MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

1. Bezpečnost práce + **podpisy studentů** , zásady práce v laboratoři molekulární biologie, přehled základních pomůcek a roztoků, výpočty a příprava roztoků. Teorie k izolaci plazmidové dsDNA.
2. Izolace plazmidové DNA, vektoru pUC 18 z *E. coli* DH5 $\alpha$
3. Stanovení koncentrace DNA spektrofotometricky, restriční štěpení dsDNA a PCR
4. Elektroforéza (ELFO) a restriční mapování
5. Transformace *E. coli* plazmidovou DNA
6. Příprava sacharózového gradientu a zápočtový test
7. Vyhodnocení protokolů a zápočet.

Úloha	02_1	02_2
<b>Bezpečnost práce</b>	(13 <sup>00</sup> -14 <sup>30</sup> ) 21.2. (15 <sup>00</sup> -16 <sup>30</sup> )	
1a) Izolace plazmidu	28.2.	7.3.
1b) Měření koncentrace pDNA 2a) Štěpení plazmidu a PCR	14.3.	21.3.
2b) ELFO a restriční mapování	28.3.	4.4.
3) Transformace	11.4.	18.4.
4) Ultracentrifugace Zápočtový test	25.4.	2.5.
<b>Zápočet</b>	(13 <sup>00</sup> -14 <sup>30</sup> ) 9.5. (15 <sup>00</sup> -16 <sup>30</sup> )	

# Protokol

- **Nově k dispozici v IS (na praktikum si přinést vytištěný protokol)**
- **Název úlohy**
- **Princip metody**
- **Materiál**
- **Postup**
- **K doplnění:**
  - **jméno, skupina, datum a číslo vzorku**
  - **význam roztoků a jednotlivých kroků v postupu**
  - **výpočty**
  - **odpovědi na otázky**
  - **závěr** (výstižné, logické a smysluplné vyhodnocení provedené úlohy)
- **K příloze:**
  - **Graf absorbance vzorku DNA ze spektrofotometrického měření**  
(bude vyučujícím vložen do IS, není třeba tisknout)
  - **SPRÁVNĚ popsané elektroforetogramy**  
(fotografie vložené vyučujícím do IS upravit, popsat, vytisknout a přiložit k protokolu č. 2)

**Vytištěný protokol s přílohami odevzdat vyučujícímu na konci cvičení, příp. následující praktikum.**