



**Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta**

Ústav experimentální biologie

**Laboratorní cvičení
z molekulární biologie**

Vyučující: Mgr. Lucie Kuntová, Ph.D.



Harmonogram výuky

čtvrtek 13:00 – 16:50 D36/216

07.04.2022		BOZP a teorie k izolaci plazmidové DNA
14.04.2022		1. izolace plazmidové DNA
21.04.2022	01_2	2. stanovení čistoty a koncentrace pDNA, RE štěpení, PCR
28.04.2022	(L. Kuntová)	3. horizontální gelová elektroforéza, příprava sacharózového gradientu
05.05.2022		4. klonování, přenos pDNA pomocí transformace
12.05.2022		5. vyhodnocení modro-bílého testu a zápočet



1. příprava vektoru
- izolace pUC18
- restriční štěpení

2. příprava inzertu
- PCR

3. ligace

4. transformace

5. selekce
- modro-bílý test

ověření
- ELFO

Vyhodnocení a vypracování protokolu

Organizace praktického cvičení

Ve **studijních materiálech** budou **pracovní protokoly s postupy** a základními principy

- do protokolů si studenti zapisují výsledky a poznámky z výkladu vyučujícího
- je potřeba **projít si protokoly a teorii před cvičením**
- pracovní protokoly neodevzdáváte, ale použijete pro zpracování souhrnného protokolu pro zápočet

Zápočet

- aktivní účast na experimentech
- absolvování všech úloh (1 absence - omluvená!)
- vypracování souhrnného protokolu vč. správně zodpovězených otázek

Bezpečnost práce při praktických cvičeních z MB

- pracuje se v plášti a v přezůvkách. Na pracovních stolech jsou pouze pomůcky určené k provádění zadaných úkolů, bez potravin, nápojů apod. (pracujeme s infekčním materiálem!)
- před a po cvičení desinfikovat pracovní povrchy!
- během cvičení je zákaz kouření, konzumace poživatin, pití a rušení hlukem ostatních spolupracovníků (vypnout vyzvánění mobilu).
- je třeba dbát pokynů vyučujícího, aby nedošlo ke kontaminaci a poškození pomůcek a zařízení a znehodnocení chemikálií.


- při práci s žíravinami a mutageny používat rukavice
- při práci s UV zářením používat ochranné brýle/štít s UV filtrem.
- při práci s hořlavinami dbát na to, aby nedošlo k požáru a ublížení na zdraví. Po ukončení práce s kahanem zamezit úniku plynu.
- použitý materiál důsledně třídit a likvidovat dle pokynů vyučujícího.
- po ukončení pokusu uklidit pracovní stoly a pomůcky uložit do skříní v prostorách laboratoře.
- je třeba pracovat s ohledem na vlastní bezpečnost a na prevenci kontaminace pracovních pomůcek.

První pomoc při úrazech v laboratoři

- ▶ **Poleptání oka** - ihned provést výplach vodou (**od vnitřního koutku k vnějšímu**) a zajistit odbornou pomoc.


- ▶ **Poleptání kůže** - odstranit potřísněný oděv, poleptaná místa ihned omýt dlouhodobě prudkým proudem vody. Pak možno neutralizovat:
 - a. při poleptání kyselinou cca 5% roztokem uhličitanu sodného
 - b. při poleptání zásadami 3% roztokem kyseliny citronové nebo octové.Poleptanou kůži je třeba krýt sterilním obvazem.

- ▶ **Popálení** - postižené místo je třeba co nejrychleji ochladit studenou vodou. Na popálenou plochu se nic neaplikuje. Po ochlazení se kryje postižená plocha sterilním obvazem.

- 
- ▶ **Otevřené poranění** - zastavit krvácení a zabránit infekci rány. Drobné rány (pořezání sklem) omyjeme proudem vody a sterilně ošetříme.
 - ▶ **Při nadýchání škodlivých látek** - postiženého je nutno přemístit na čerstvý vzduch, uvolnit oděv a v případě potřeby zahájit dýchání z plic do plic (jen pokud dostatečně nedýchá). Může být třeba omytí očí, úst a nosu. I po úspěšném ošetření je nutno zavolat lékařskou pomoc.
 - ▶ **Požítí škodlivých látek** - V tomto případě je nutno vypít cca 0,5 l vody a vyvolat zvracení. Zvracení se vyvolává do 4 hodin, pokud nebyla požitá žíravina, rozpouštědlo či pěnivá látka, a postižený je při vědomí. Při požití žíraviny vypláchneme ústa a dáme postiženému malé množství vody. Je nutno zajistit lékařské ošetření.

Práce v laboratoři

- Jednorázové plastové pomůcky (špičky) likvidovat do plastových nádob (nebo PVC sáčků), skleněné pomůcky (kádinky a zkumavky) odložit do dekontaminačního roztoku v kbelíku.
- Při práci s nastavitelnými automatickými pipetami je třeba dbát toho, aby byly nastaveny v rozmezí povolených hodnot objemů. Ke každé pipetě použít vhodnou plastovou špičku.
- Některé roztoky používané pro izolace nukleových kyselin je třeba připravit **čerstvé** (např. 70 % ethanol) a některé je třeba uchovávat při 4 °C a těsně před a **během použití je chladit, nejčastěji na ledu.**

- 
- Je třeba **zkontrolovat koncentraci zásobních roztoků a spočítat jejich spotřebu v pracovních postupech.**
 - **Zásobní roztoky enzymů se uchovávají při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při použití je třeba je mít uložené na ledu nebo v chladícím stojánku.**
 - Zmražené **zásobní roztoky** enzymů (lysozym, RNáza) se musí **nejprve rozpustit v celém objemu** a pak teprve provést náběr **vždy novou sterilní špičkou.**
 - Při přípravě pracovních roztoků nemísit navzájem koncentráty, ale **postupně přidávat do vodného roztoku a nakonec doplnit vodou** do výsledného objemu.

Pomůcky nezbytné na laboratorním stole

- Nádobka se sterilními mikrozkuvkami a špičkami
- Nádobka/sáček k odložení použitého plastového materiálu
- Nádobka k odložení nespalitelných použitých pomůcek (sklo, kovové uzávěry apod.)
- Těkavé tekutiny v digestoři
- Zmrazené enzymy a (ATB) po rozmrazení a použití ukládat k ledu či do chladícího boxu
- Rukavice použít jen v případě ohrožení kontaminací a poleptání rukou

Fyzikální veličiny, převody jednotek a výpočty

- molární roztoky - převody 1M na 1mM
- objemy 1 ml na 1 μ l

$$m = c \cdot V \cdot Mr$$

Kolik g NaCl ($Mr = 58,0$) použijete na přípravu 50 ml 2 M roztoku NaCl?

$$m = 2M \times 0,05 L \times 58$$

$$\underline{m = 5,8 \text{ g}}$$

Navážku 5,8 g NaCl rozpustit ve vodě a doplnit vodou na výsledný objem 50 ml

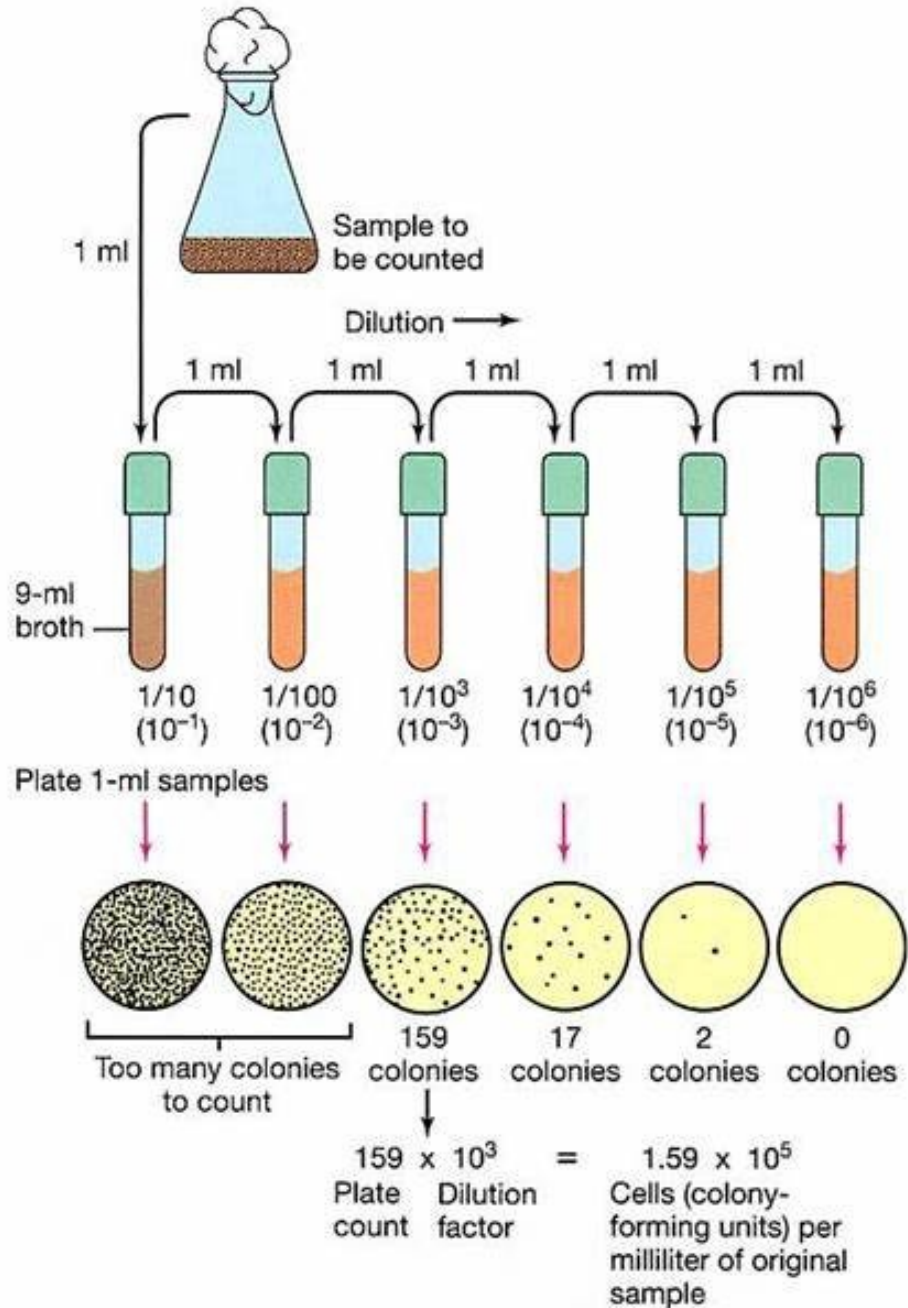
- objemy 1 ml na 1 μ l
- koncentrace (% ní w/v) roztoky
- koncentrace (% ní v/v) roztoky
- směšovací pravidlo

$$(zásobní) \quad V_1 \quad c_1 = V_2 \quad c_2 \quad (\text{výsledný})$$

**Kolik ml 5% roztoku NaCl použijete pro přípravu 100 ml
2 % roztoku NaCl?**

$$V_1 \quad 5 = 100 \quad 2$$

$V_1 = 40 \text{ ml}$ doplnit do 100 ml

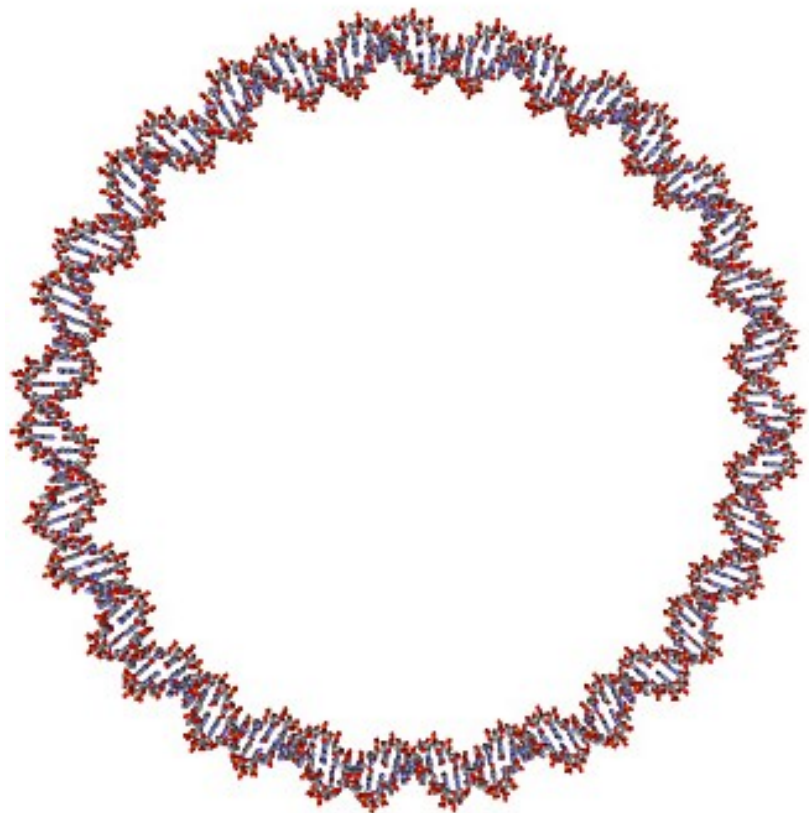


- ředění roztoků/suspenzí (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} 10^{-6})

- hodnocení kultivace:

titry buněk =

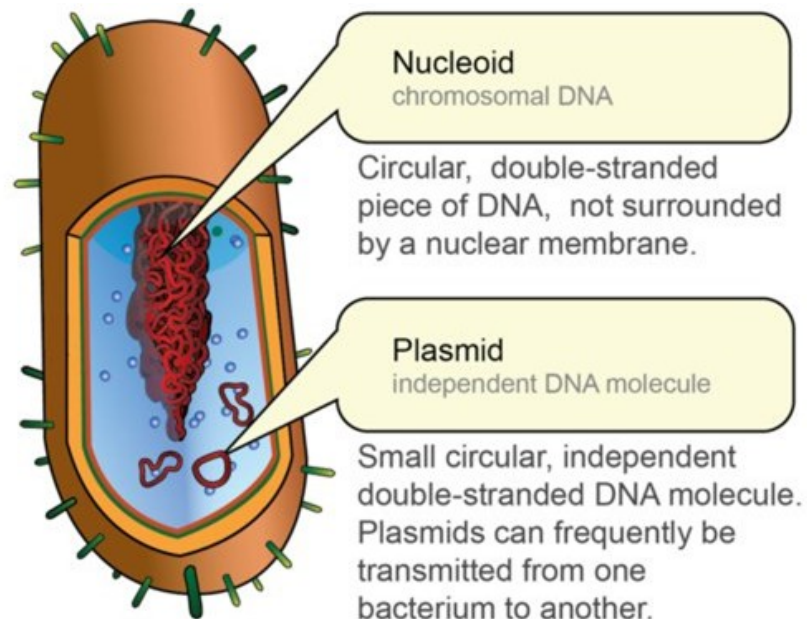
CFU (colony forming unit)/ml



1. cvičení

IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

DNA v bakteriální buňce



- ▶ DNA tvoří genom buněk typu prokaryotického, eukaryotického a některých virů.
- ▶ Izolace závisí na výchozím materiálu (bakteriální buňky, rostlinné b., atd.)
- ▶ Celogenomová DNA/
plazmidová DNA (vektory pro klonování)

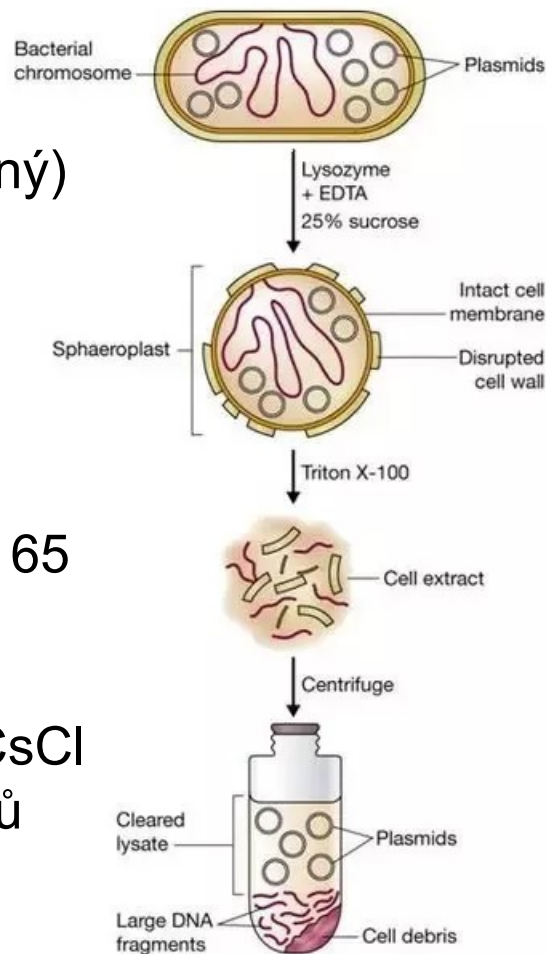
Izolace plazmidové DNA

1. LYZE BUNĚK

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

2. DEPROTEINACE

- enzymové metody (proteináza 65 C, pronáza 37 C)
- fenol a chloroform
- ultracentrifugace v gradientu CsCl
- odstranění kontaminací (zbytků buněk, bílkovin, RNA).



3. ODSTRANĚNÍ RNA

- enzymaticky (Rnázy)

4. SRÁŽENÍ DNA

- z vodného roztoku (etanol nebo izopropanol)

5. ROZPUŠTĚNÍ DNA

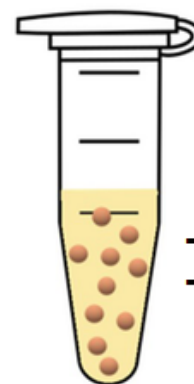
- v pufru (ten musí obsahovat EDTA, které váže kationty).
- DNA se snadno mechanicky poškodí – JEMNÉ PIPETOVÁNÍ!

1. Lyze buněk

Roztok A (TEGLU):

- ▶ 25mM Tris-HCl (pH 8,0)
- ▶ 10mM EDTA - je inhibitor nukleáz a **vychytává (váže) dvojmocné ionty** Mg²⁺, které působí jako kofaktory nukleáz
- ▶ 50mM glukóza

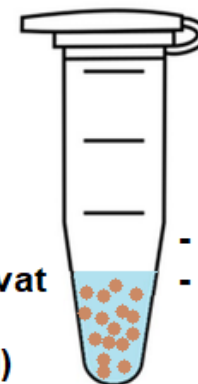
1,5 ml kultury
E. coli v LB s AMP



12000 rpm
4°C
5 min

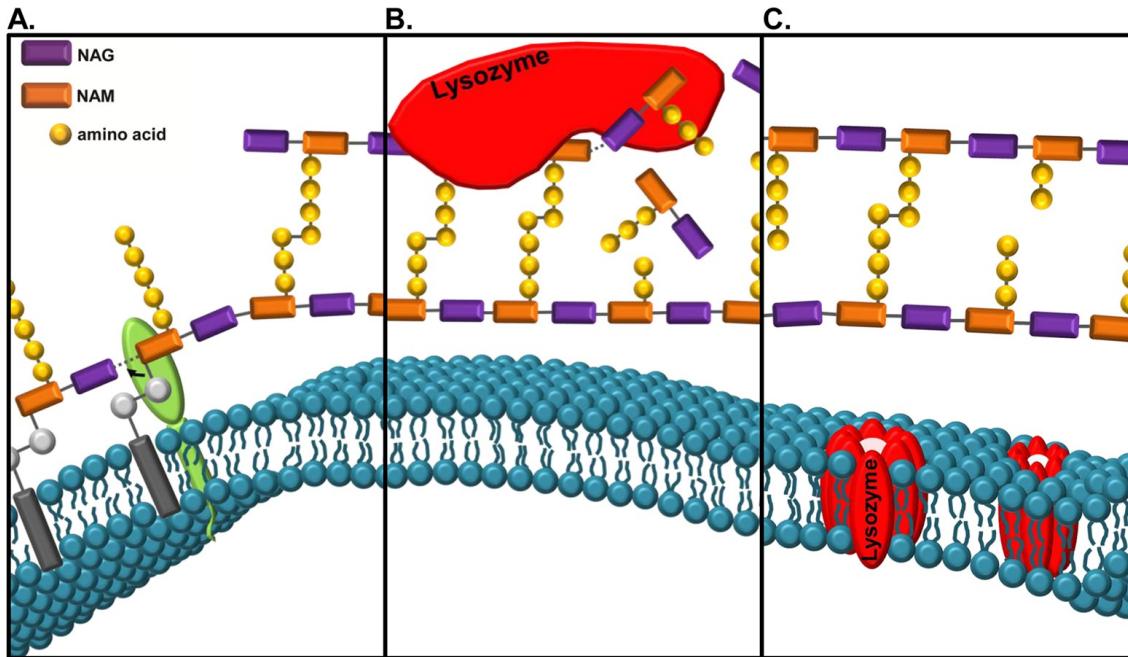
- odlít supernatant
- pelet resuspendovat v roztoku A
- + RNáza (10 µg/ml)
- + lysozym (500 µg/ml)

inkubace
37°C / 5 min

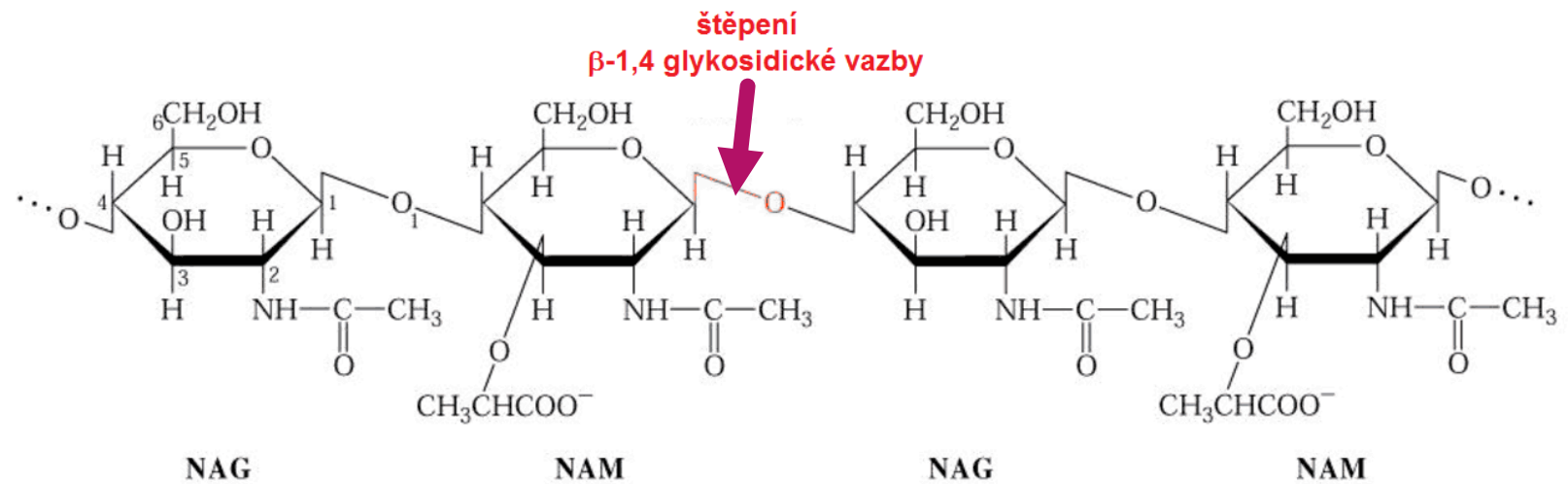


- op
- mi
- po

enzymatické ošetření



Lysozym



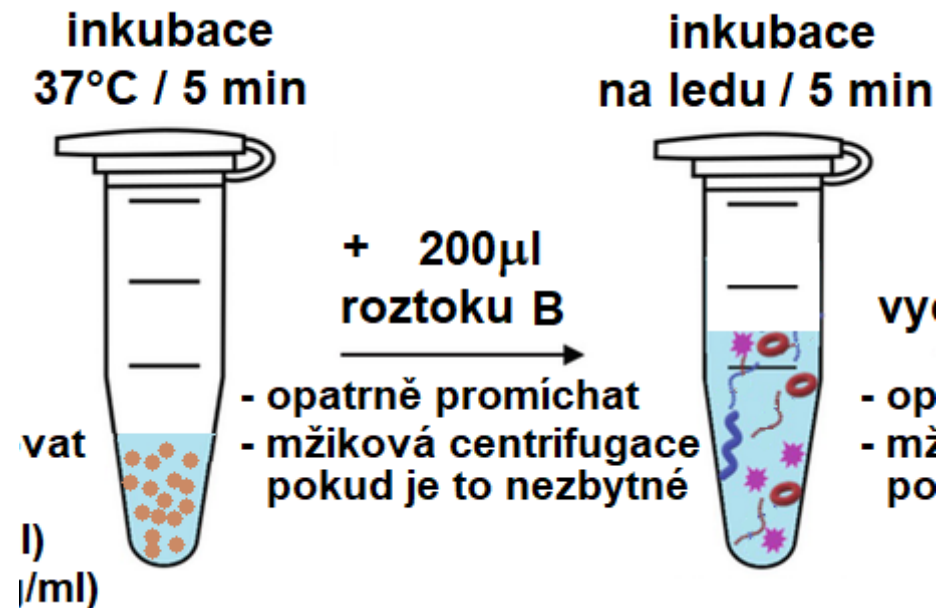
N-acetylmuramová kyselina (NAM), N-acetylglukosamin (NAG)

2. Lyze buněk a denaturace

Roztok B (lyzační):

▶ 0,2M NaOH (zvyšuje pH směsi na 12- 12,5, nevratná denaturace LdsDNA, plazmidová CdsDNA denaturuje částečně a reverzibilně.)

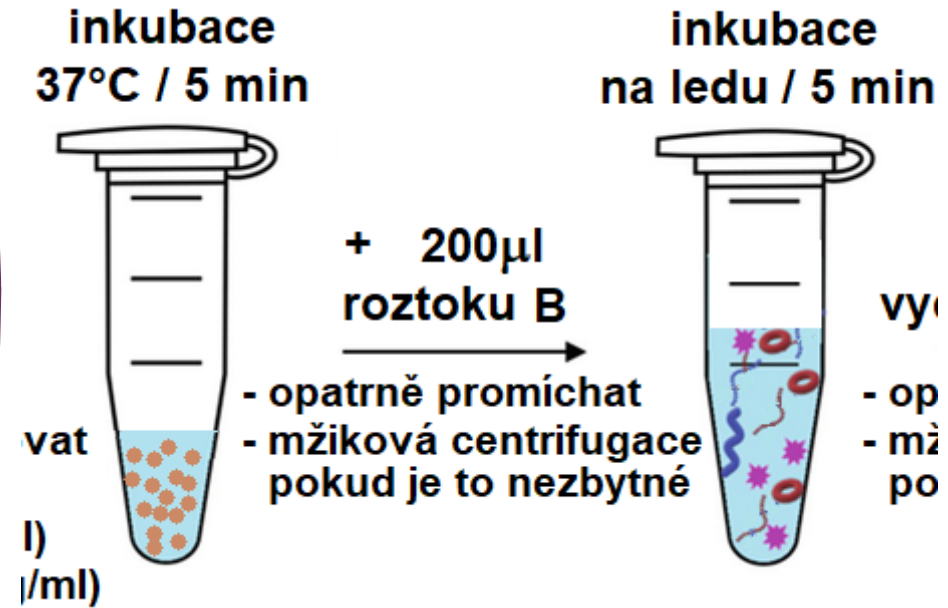
▶ 1% SDS (iontový detergent) dokončuje lyzi degradací membrán a účastní se odstranění proteinů (solubilizace membránových proteinů, rozrušení protein-proteinových vazeb) - *není vhodné pro izolaci velkých plazmidů !*



3. Renaturace

Roztok C (renaturace):

- ▶ 5M octan draselný, pH = 5,2
 - ▶ neutralizuje hydroxid, denaturovaná pDNA renaturuje, fragmentovaný bakteriální chromozom tvoří komplex s proteiny a vysráží se.



4. Odstranění proteinů

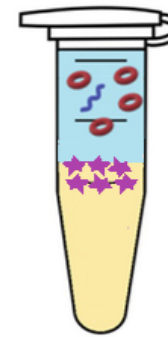
Fenol:chloroform (1:1)

- ▶ denaturace a odstranění proteinů.
- ▶ chloroform zvyšuje hustotu směsi a usnadňuje tak tvorbu fázového rozhraní.

12000 rpm
4°C
5 min

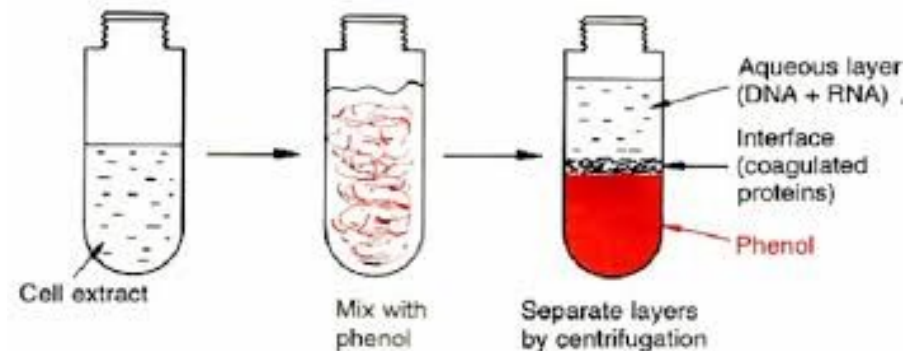
↓ přenést supernatant do nové zkumavky

přidat
fenol-chloroform (1:1)



min. 2 min promíchávat
otáčením zkumavky

12000 rpm
4°C
5 min

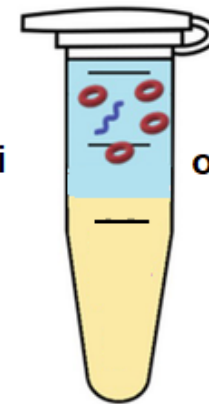


5. Odstranění lipidů a fenolu

Sevageova směs

- ▶ chloroform-izoamylalkohol 24:1
- ▶ odstraňuje lipidy a fenol.

přenést vodnou fázi
do nové zkumavky
+ chloroform 1:1



promíchat
otáčením zkumavky



12000 rpm
4°C
5 min

6. Precipitace a purifikace DNA

3M octan sodný

- ▶ sodné kationty neutralizují záporný náboj DNA => ztráta hydrofilní povahy => srážení DNA

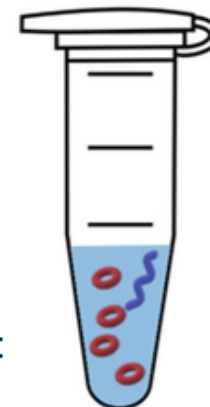
96% etanol

- ▶ DNA je v > 70% etanolu nerozpustná, udržuje vysráženou DNA.

70 - 75% etanol

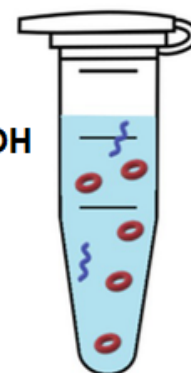
- ▶ ve zbytkové vodě se rozpustí zbytky solí

přenést vodnou fázi do nové zkumavky
+ 1/10 objemu
3M octanu sodného
a opatrně promíchat



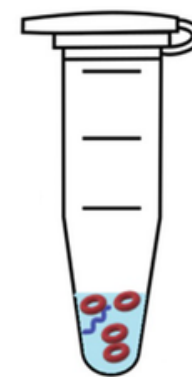
+ 2 objemy
ledového 96% EtOH

inkubace
20min / -20°C



12000 rpm
4°C
15 min

odstranit EtOH
+ 1ml 75% EtOH
nenarušit pelet!

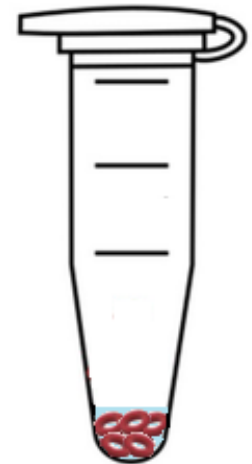


7. Rozpuštění DNA

TE puftr

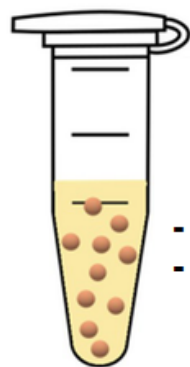
- ▶ Tris-EDTA
- ▶ 10 mM Tris-HCl (hydroxy-metyl-aminometan)
- ▶ 1mM EDTA (Disodium ethylene diamine tetraacetate)

) po 30s důkladně
odstranit EtOH
nechat odpařit
zbytky EtOH
→
přidat 40 μ l TE puftru



skladovat při 4°C / 24h

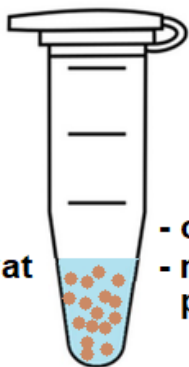
1,5 ml kultury
E. coli v LB s AMP



12000 rpm
4°C
5 min

- odlít supernatant
- pelet resuspendovat v roztoku A
- + RNáza (10 µg/ml)
- + lysozym (500 µg/ml)

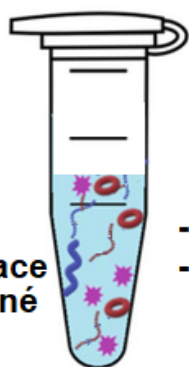
inkubace
37°C / 5 min



+ 200µl
roztoku B

- opatrně promíchat
- mžiková centrifugace pokud je to nezbytné

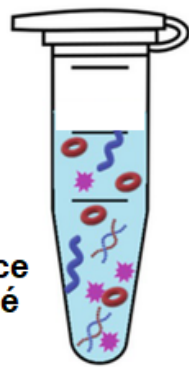
inkubace
na ledu / 5 min



+ 150µl
vychl. roztoku C

- opatrně promíchat
- mžiková centrifugace pokud je to nezbytné

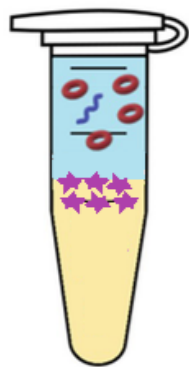
inkubace
na ledu / 5 min



12000 rpm
4°C
5 min

přenést supernatant
do nové zkumavky

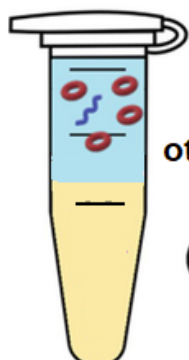
přidat
fenol-chloroform (1:1)



min. 2 min promíchat
otáčením zkumavky

12000 rpm
4°C
5 min

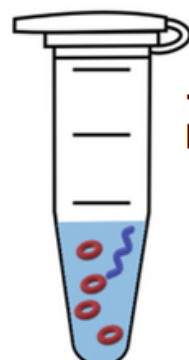
přenést vodnou fázi
do nové zkumavky
+ chloroform 1:1



promíchat
otáčením zkumavky

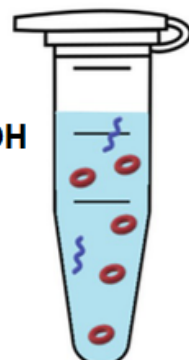
12000 rpm
4°C
5 min

přenést vodnou fázi
do nové zkumavky
+ 1/10 objemu
3M octanu sodného
a opatrně promíchat



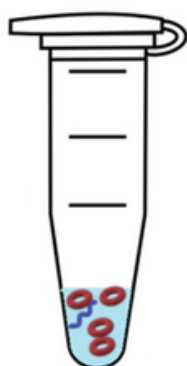
+ 2 objemy
ledového 96% EtOH

inkubace
20min / -20°C



12000 rpm
4°C
15 min

odstranit EtOH
+ 1ml 75% EtOH
nenarušit pelet!



po 30s důkladně
odstranit EtOH
nechat odpařit
zbytky EtOH

přidat 40 µl TE pufru



skladovat při 4°C / 24h
před měřením koncentrace

● buňky

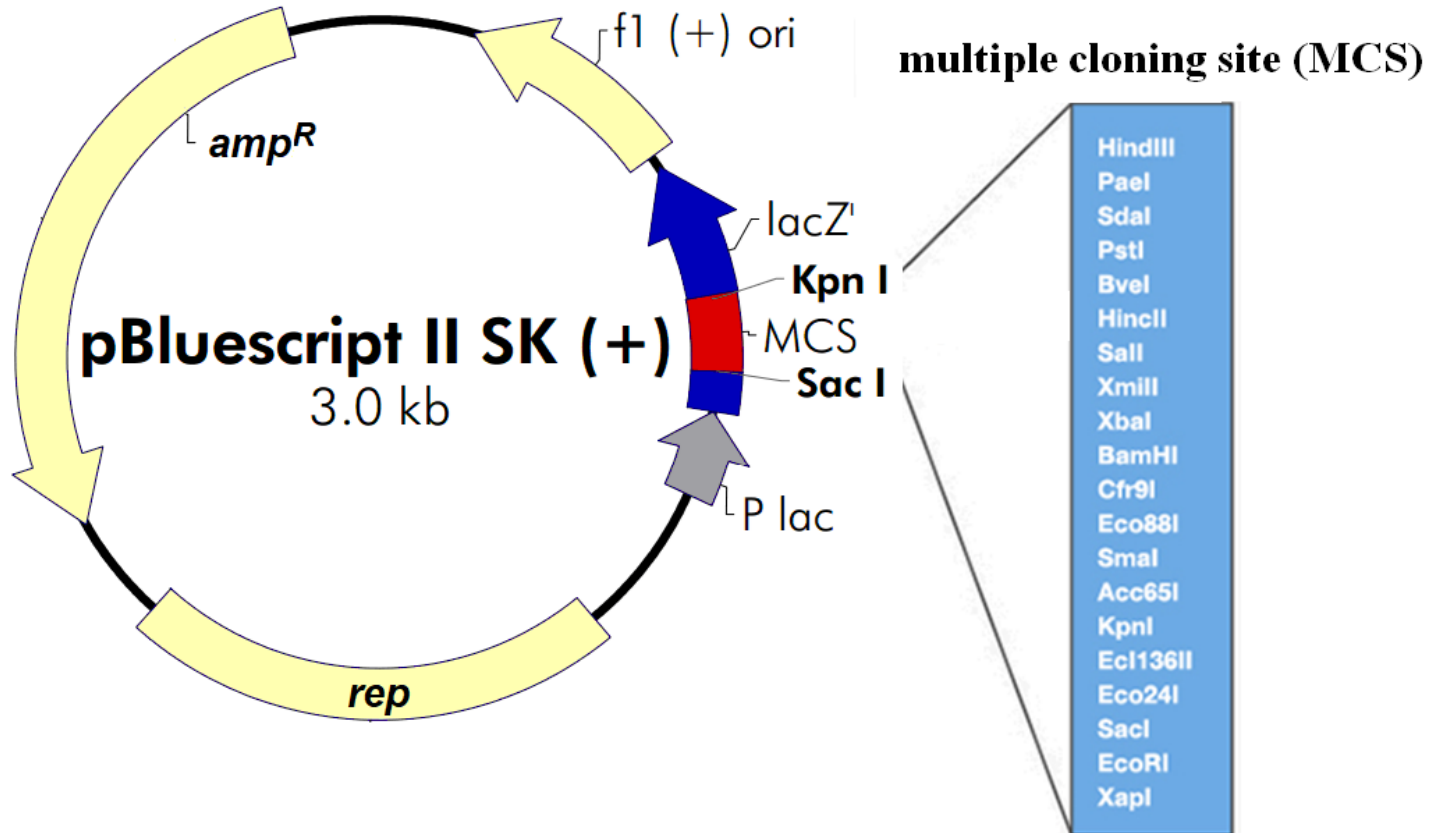
chromozomová
DNA

RNA

★ proteiny

● plazmidy

Vektor (plazmidová DNA)



Odkaz:

Addgene: Vector Database - pBlueScript II SK (+)