

UWAGA: Materiały teoretyczne do ćwiczeń znajdują się na stronie internetowej Katedry Farmakologii:
https://www.pum.edu.pl/studia_iii_stopnia/informacje_z_jednostek/wmis/katedra_farmakologii/

Biotechnologia Farmaceutyczna - Ćwiczenia

Ćwiczenie 1 – Izolacja genomowego DNA z drożdży metodą kolumnkową za pomocą GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit

Organizacja pracy: grupa odbywająca ćwiczenie zostaje podzielona na zespoły. Każda osoba w zespole wykonuje izolację DNA z drożdży, oznacza stężenie uzyskanego materiału genetycznego. Do reakcji PCR każdy zespół szykuje jeden „strip” ze swoimi próbkami i próbą negatywną.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.

Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały:

- płynna hodowla drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*);
- jednorazowe probówki 1,5 ml,
- jednorazowe probówki 2,0 ml,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- wytrząsarka laboratoryjna,
- termo-blok,
- wirówka laboratoryjna.

Odczynniki:

Zestaw do izolacji GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit zawiera: bufor do zawieszania materiału do izolacji (bufor Lyse BG), odczynniki lizujące (Sol BG, bufor Lyse BG + β -merkaptobetanol), enzymy (RNase A, proteinaza K, litykaza), roztwory płuczące DNA (roztwór Wash BGX), bufor elucyjny (Elution buffer), kolumnki ze złożem krzemionkowym, probówki do płukania kolumnek/probówki odbieralnikowe. PBS do przepłukania zawiesiny drożdży.

Względy bezpieczeństwa: bufor płuczący działa drażniąco oczy, jest łatwopalny; bufor lizujący: mogą powodować poważne oparzenia skóry i oczu; nie wdychać, nie spożywać, nie przecierać oczu, nie dotykać twarzy podczas pracy z odczynnikiem! Z karty charakterystyki: po połknięciu podać dużą ilość wody do picia (1-2 szklanki), u osoby przytomnej spowodować wymioty lub zastosować płukanie żołądka, przy poważniejszym zatruciu wezwać lekarza.

Zasada działania zestawu do izolacji DNA:

Zawiesina komórkowa poddawana jest lizie w obecności buforu zawierającego duże stężenia soli chaotropowych i proteinazy K. Litykaza degraduje ścianę komórkową drożdży. β -merkaptobetanol usuwa mostki dwusiarczkowe obecne w ścianie komórkowej. Proteinaza K całkowicie degraduje białka

komórkowe, w tym białka wiążące DNA i nukleazy. RNasa A degradowuje jednoniciowy RNA. Zanieczyszczenia są skutecznie usuwane ze złoża w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolny. Oczyszczony preparat DNA jest gotowy do bezpośredniego użytku zaraz po izolacji.

1. Przygotować probówkę 2,0 ml oraz minikolumny, ustawione na 2 ml probówkach odbierających. Odpowiednio podpisać kolumnkę oraz probówki:

Oznaczenie mojej próby:.....

2. Do probówki 2,0 ml dodać 1 ml płynnej hodowli drożdży, zwirować przy prędkości 11 000 rcf przez 2 min.

3. Usunąć supernatant, dodać 1 ml PBS, osad przepipetować, zwirować przy prędkości 11 000 rcf przez 2 min.

4. Usunąć supernatant, drożdże zawiesić w 300 μ l roztworu lizującego Lyse BG.

5. Wirować przy prędkości 11 000 rcf przez 2 min.

6. Dokładnie usunąć supernatant, drożdże zawiesić w 250 μ l roztworu lizującego Lyse BG.

7. Dodać 2 μ l enzymu litykazy oraz 2 μ l enzymu RNase A.

8. Całość dokładnie wymieszać (worteksować) i inkubować w temperaturze 30°C przez 20 min.

9. Po inkubacji dodać 15 μ l enzymu proteinaza K do zawiesiny komórek i worteksować przez 10 sekund.

10. Inkubować w temperaturze 55°C przez 20 min.

11. Po inkubacji dodać 350 μ l buforu Sol BG, próbki worteksować i inkubować 5 min w temp. 55 °C.

12. Po inkubacji próbki intensywnie worteksować przez 1 min.

13. Następnie próbkę wirować 2 min przy prędkości 11 000 rcf.

14. Po wirowaniu odciągnąć pipetą do 750 μ l supernatantu i przenieść go na kolumnkę wiążącą znajdujące się w 2 ml probówkach.
15. Następnie próbkę wirować 1 min przy prędkości 11 000 rcf.
16. Wylać przesącz i umieścić kolumnę z powrotem na probówkę odbieralnikową.
17. Nanieść na kolumnę 600 μ l roztworu płuczącego Wash BGX.
18. Próbkę wirować 1 min przy prędkości 11 000 rcf.
19. Wylać przesącz i umieścić kolumnę z powrotem na probówkę odbieralnikową.
20. Nanieść na kolumny 300 μ l roztworu płuczącego Wash BGX.
21. Próbkę wirować 2 min przy prędkości 11 000 rcf.
22. Kolumnę umieścić na probówce do 1,5 ml elucji (podpisanej), dodać 50 μ l buforu elucyjnego ogrzanego do 80°C i inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 min.
23. Próbkę wirować 1 min przy prędkości 11 000 rcf.
24. Usunąć kolumnę, zamknąć probówkę zawierającą próbę DNA.

Pojemność wiązania DNA pojedynczej kolumnki wynosi 15-20 μ g DNA.
DNA po izolacji przechowywać do dalszych analiz w lodówce (+4 do +8 °C). Nie zamrażać.

Ćwiczenie 2. Określenie jakości i stężenia DNA metodą spektrofotometryczną.

Materiały:

- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- wytrząsarka laboratoryjna,
- wirówka laboratoryjna,
- woda wolna od DNaz/RNaz,
- spektrofotometr DeNovix DS-11 FX+,
- izolat DNA z poprzedniego ćwiczenia.

Spektrofotometr DeNovix DS-11 FX+ jest obsługiwany przez ekran dotykowy.

Przeprowadzenie pomiaru stężenia DNA:

1. Przetrzeć stół roboczy płynem do dezynfekcji, a cokoliki spektrofotometru – w razie potrzeby bezpyłową ściereczką laboratoryjną.
2. Upewnić się, że spektrofotometr jest podłączony do sieci.
3. Włączyć aparat DeNovix DS-11 FX+ przyciskiem znajdującym się z tyłu urządzenia.
4. Z menu głównego wybrać opcję dsDNA.
5. Jako pierwszy pomiar należy przeprowadzić pomiar absorbancji dla próby ślepej. W tym celu należy nałożyć na cokolik 1,2 μ l wody, opuścić ramię spektrofotometru i nacisnąć przycisk „Próba ślepa”. Aparat wykona pomiar próby ślepej, przycisk pomiaru stanie się aktywny.
6. Przed naniesieniem każdej próby do pomiaru, należy dokładnie przetrzeć dolny i górny cokolik spektrofotometru bezpyłową chusteczką oraz opisać oznaczenie danej próbki. Następnie należy przycisnąć przycisk „Pomiar”.
7. Zanotować wyniki pomiarów (stężenie DNA w ng/ μ l i wskaźnik czystości $A=260/280$ dla każdej z prób).
8. Po zakończeniu pomiarów wykonać ostatni pomiar dla wody sterylnej (próbkę oznaczyć jako H₂O).

Uwaga: przed przystąpieniem do pomiaru należy zworteksować i zwirować badaną próbkę.

Oznaczenie mojej próby:

Stężenie DNA (ng/ μ L):

Stosunek absorbancji 260/280:.....

Ćwiczenie 3 Reakcja PCR – dehydrogenaza alkoholowa

Materiał:

- genomowe DNA (gDNA) z ćwiczenia 1
- polimeraza DNA
- bufor reakcyjny x10
- mieszanina deoksynukleotydów (dNTP Mix, 5 mM)
- para starterów (A+B, 25 μ M)
- woda wolna od nukleaz
- jednorazowe probówki 1,5 ml,
- jednorazowe probówki 2,0 ml,

- jednorazowe probówki 8 x 0,2ml (tzw. „strip”),
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- termocykler,

Względy bezpieczeństwa:

Żaden ze stosowanych odczynników nie został oznaczony jako niebezpieczny dla zdrowia, z wszelkimi odczynnikami należy jednak postępować z ostrożnością, w szczególności nie spożywać, nie dopuszczać do kontaktu ze skórą i oczami.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

Skład mieszaniny	Objętość [μl]	x (ilość prób+1)
polimeraza (1U/μl)	1,0
bufor 10x	1,5
dNTPs (10mMol)	0,4
Primer 1F (25μM)	0,6
Primer 1R (25μM)	0,6
woda	8,9
	13,0	
DNA	2,0	

Delikatnie wymieszaj, zwiruj i rozpipetuj mieszaninę po 13,0 μl do każdej probówki. Następnie dodaj matrycę - 2,0 μl DNA. Tak przygotowane próby należy wstawić do termocyklera.

Profil termiczny reakcji

ETAP	TEMPERATURA [°C]	CZAS	
Denaturacja wstępna	94	4min	} x35
Denaturacja właściwa	94	30s	
Wiązanie primerów	59	30s	
Wydłużanie	72	45s	
Końcowe wydłużanie	72	5 min	
Przechowywanie	4		