

S1 LBM CELIČNA BIOLOGIJA Z GENETIKO

NAVODILA IN DNEVNIKI ZA VAJE



Univerzitetni študijski program Laboratorijska biomedicina

1. letnik

Anja Pišlar, Janja Zupan, Tijana Markovič, , Mojca Lunder, Tomaž Bratkovič

Ljubljana, 2025

Naslov: S1LBM Celična biologija z genetiko: Navodila in dnevniki za vaje

Avtorji: izr. prof. dr. Anja Pišlar, izr. prof. dr. Janja Zupan, asist. dr. Tijana Markovič, prof. dr. Mojca Lunder, prof. dr. Tomaž Bratkovič

Uredile: izr. prof. dr. Anja Pišlar, izr. prof. dr. Janja Zupan, asist. dr. Tijana Markovič

Recenzenta: izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički, prof. dr. Tomaž Bratkovič

Slika naslovnice: izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički. Slika je bila ustvarjena z orodjem Bing Image Creator.

Izdala: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Kraj in leto izida: Ljubljana, 2025

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 228572931

ISBN 978-961-7231-03-8 (PDF)

VSEBINA

UVOD V LABORATORIJSKE VAJE	1
CELIČNI CIKEL	11
CELIČNE KULTURE	22
IZOLACIJA DNK IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	35
ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV	50

UVOD V LABORATORIJSKE VAJE

Asist. dr. Tijana Marković, mag. farm.

VARNOST PRI DELU V BIOKEMIJSKEM LABORATORIJU

OSEBNA VAROVALNA OPREMA

Pri delu v laboratoriju je obvezna uporaba laboratorijske halje, ki naj bo zapeta. Prav tako pri delu z biološkimi vzorci vedno uporabljamo lateksne ali nitrilne zaščitne rokavice. Kadar delamo z nevarnimi snovmi, vedno uporabljamo zaščitna očala.

PRAVILA DELA V LABORATORIJU

- V laboratoriju je prepovedano uživanje pijače in hrane.
- Jakne in torbe pospravimo v za to namenjene omare/predale.
- Pri delu v laboratoriju je obvezna uporaba laboratorijske halje.
- Pri delu z biološkimi vzorci vedno uporabljamo lateksne ali nitrilne zaščitne rokavice.
- Pri delu z nevarnimi snovmi vedno uporabljamo digestorij.
- Po zaključenem laboratorijskem delu ustrezno pospravimo delovno površino (Slika 1).



Slika 1: Delovna površina v laboratoriju.

Pri delu v laboratoriju je potrebno upoštevati pravila, saj s tem poskrbimo za svojo varnost in za varnost vseh, ki delajo v laboratoriju. Pomembno je, da upoštevamo navodila asistenta, ki vodi laboratorijske vaje. Z namenom zagotavljanja varnosti vseh prisotnih v laboratoriju, lahko asistent študentu, ki pravil ne upošteva, prepreči nadaljnje opravljanje laboratorijskih vaj.

PIKTOGRAMI

Piktogram za nevarnost je slika na etiketi posameznih reagentov, ki vključuje opozorilno oznako in posebne barve, namenjene zagotavljanju informacij o škodi, ki jo lahko določena snov ali zmes pomeni za naše zdravje ali okolje (Slika 2, 3).



Slika 2: Reagenti, označeni s prikazanimi piktogrami, so lahko nevarni, če se z njimi ne ravna pravilno. Za zagotovitev varne uporabe si zapomnimo pomen oznak in preberemo navodila. Prirejeno po: (1)

Posamezni piktogrami in ravnanja s kemikalijami, ki so označena s piktogrami so pojasnjena v sliki 3.

Jedko 	Razlaga piktograma: Lahko je jedko za kovine, povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Hranimo v originalni embalaži. Nosimo zaščitne rokavice, zaščitna oblačila, zaščito za oči in obraz	Vnetljivo 	Razlaga piktograma: Lahko ali zelo vnetljivi plini, aerosoli, tekočine ali hlapi. Ne segrevamo ali pršimo proti odprtem ognju. Uporabimo orodje, ki ne povzroča isker, hranimo v tesno zaprti posodi.
Resne nevarnosti za zdravje 	Razlaga piktograma: Lahko škoduje plodnosti ali nerojenemu otroku, povzroča raka, simptome alergije ali astme, škoduje organom. Pred uporabo se seznanimo z varnostnimi ukrepi. Ne vdihavamo prahu ali dimov. Hranimo zaklenjeno. Pri respiratornih simptomih pokličemo center za zastrupitve ali zdravnika.	Akutna strupenost 	Razlaga piktograma: Pri zaužitju, vdihavanju ali v stiku s kožo je lahko zdravju škodljivo ali smrtno. Ravnamo previdno. Ne jemo, pijemo ali kadimo med uporabo. Uporabljamo zaščitno opremo. Preprečimo stik s kožo in z očmi. Hranimo zaklenjeno.

Slika 3. Prikaz izbranih piktogramov in razlaga. Prirejeno po (2)

PIPETIRANJE

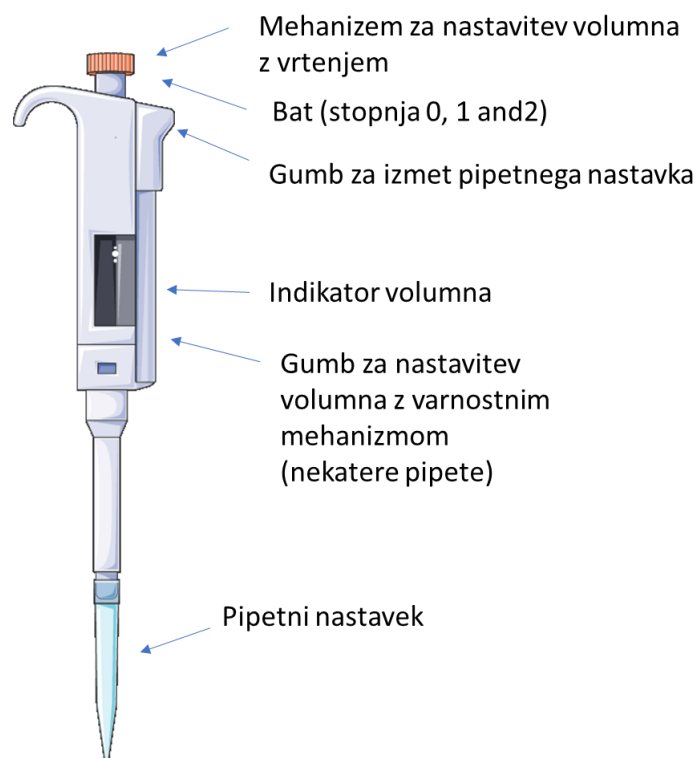
PIPETE

Pipete se uporabljajo za natančno odmerjanje volumnov raztopin. Poznamo polnilne, merilne pipete in birete. Najprej moramo izbrati ustrezno pipeto. Za pipetiranje uporabljamo pipete, ki se med seboj razlikujejo glede na volumen, ki ga želimo pipetirati. Najprej poiščemo pipeto, ki ustreza volumnu, ki ga želimo pipetirati. Vsaka pipeta ima predpisan ustrezen volumen, na katerega je kalibrirana in se lahko uporablja le za pipetiranje znotraj merilnega območja pipete.

Običajna merilna območja pipet so:

- 0,5 μL – 10 μL
- 0,5 μL – 20 μL
- 10 μL - 100 μL
- 20 μL – 200 μL
- 100 μL – 1000 μL
- 1 ml -5 ml

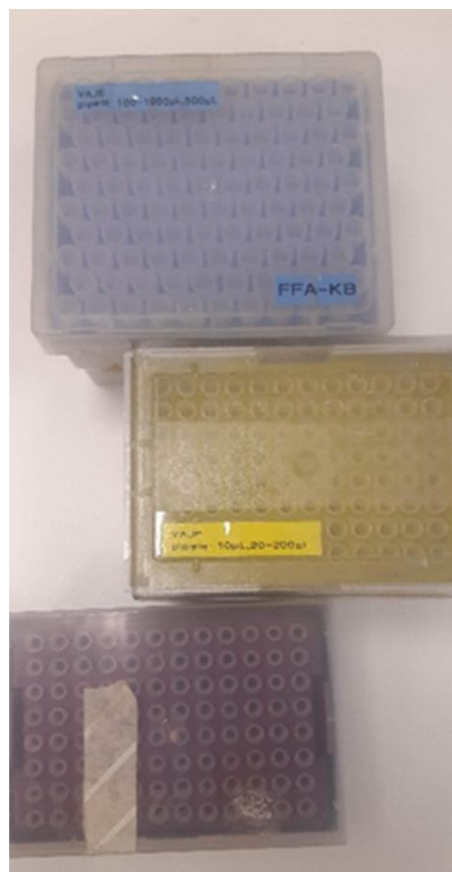
Na pipeti nastavimo ustrezen volumen, kar storimo s premikanjem gumba za nastavitev volumna (Slika 2). Gumb vrtimo dokler se v okencu ne pojavi želen volumen. Pri tem pazimo, da nikoli ne nastavimo volumna izven merilnega območja pipete, saj v tem primeru odmerjeni volumen ne bo pravilen, lahko pa tudi pokvarimo pipeto.



Slika 2: Pipeta. Shema je bila pripravljena z uporabo Servier Medical ART 3000.

NASTAVKI ZA PIPETE

Nastavki za pipete se med seboj razlikujejo glede na volumen, ki ga lahko pipetiramo (Slika 3). Vedno poiščemo ustrezen nastavek glede na merilno območje pipete ter preverimo, da nastavek dobro tesni. Nastavek zamenjamo vedno, ko pipetiramo drugo tekočino, da preprečimo kontaminacijo reagentov, vzorcev... Po zaključenem pipetiranju nastavek zavržemo v koš za biološke odpadke s pritiskom na gumb za odstranitev nastavka.

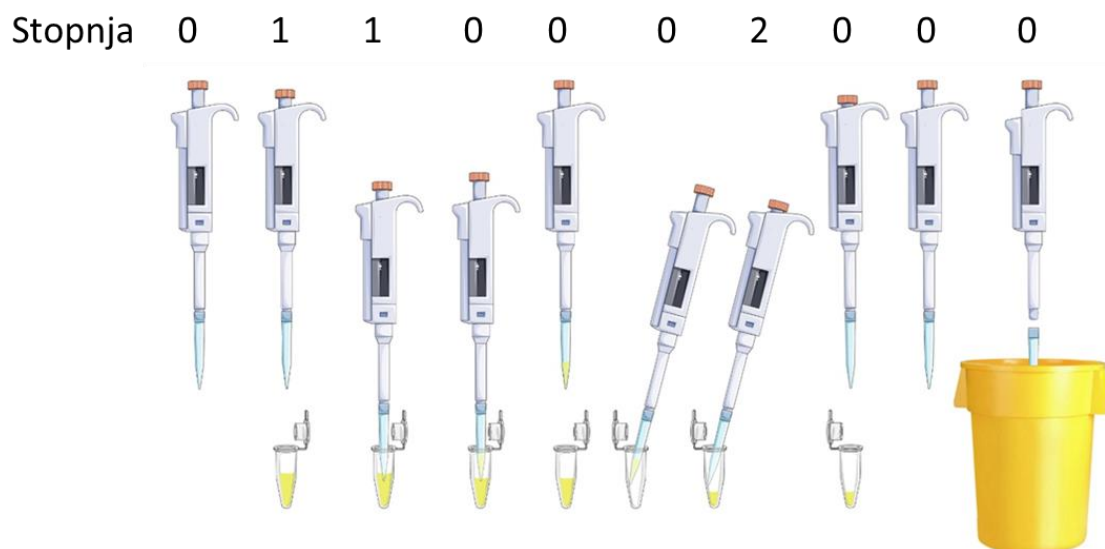


Slika 3. Stojalo za pipete z različnimi volumni in škatle v katerih hranimo nastavke za pipete.

POSTOPEK PIPETIRANJA

Pred začetkom pipetiranja izberemo ustrezno pipeto glede na volumen, ki ga želimo pipetirati ter nastavimo ustrezen volumen. Pipeta ima 3 stopnje (nevtralno 0, 1. in 2. stopnjo). Na pipeti preizkusimo gumb za vse 3 stopnje, da dobimo občutek za delo z izbrano pipeto. Nato izberemo ustrezen nastavek in ga namestimo na pipeto ter se prepričamo, da nastavek dobro tesni. Pipeto postavimo v vertikalni položaj nad tekočino in počasi pritisnemo gumb do stopnje 1. Nato pipeto potopimo v raztopino tako, da je konica nastavka nekaj mm pod gladino tekočine. Volumen tekočine zajamemo tako, da gumb počasi spustimo v nevtralen položaj (torej iz stopnje 1 v stopnjo 0) in počakamo vsaj 1 sekundo. Pred izpustom tekočine naslonimo nastavek na steno posode pod kotom 20°- 45°. Ko je nastavek pod kotom, počasi stisnemo gumb do stopnje 2 in počakamo vsaj 1 sekundo, da prenesemo ves volumen

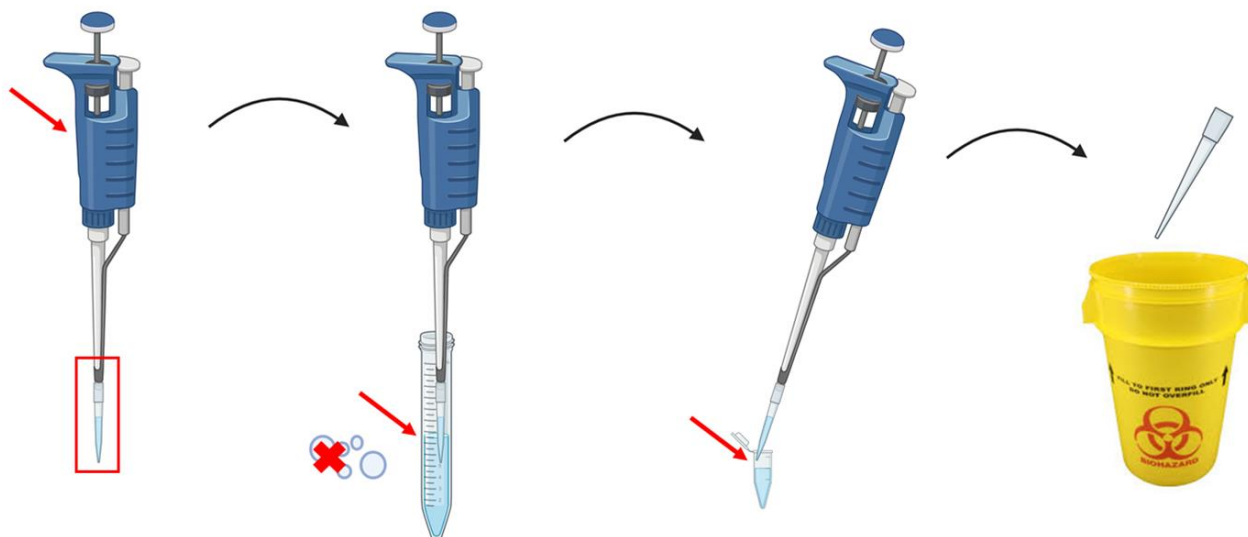
tekočine. Po končanem pipetiranju zavržemo nastavek v koš za biološke odpadke s pritiskom na gumb za odstranitev nastavka.



Slika 4. Shematski prikaz pipetiranja. Shema je bila pripravljena z uporabo Servier Medical ART 3000.

NA KAJ MORAMO BITI POZORNI PRI PIPETIRANJU?

Vedno preverimo merilno območje pipete in pazimo, da pipete nikoli ne nastavimo izven merilnega območja, saj je sicer potrebna ponovna kalibracija pipete. Pred pipetiranjem preizkusimo stopnje na pipeti (0, 1, 2) s pritiskom na gumb, da dobimo občutek za posamezno pipeto. Pred vsakim pipetiranjem moramo dati na pipeto nov nastavek, da ne pride do kontaminacije reagentov in vzorcev. Preden potopimo pipeto v raztopino, se vedno prepričajmo, da smo stisnili gumb na stopnjo 1. Pomembno je, da pipete pri zajemanju vzorca ne potopimo pregloboko, ker lahko zaradi kapilarnega efekta zajamemo večji volumen. Če pa nastavka ne potopimo dovolj globoko, lahko zajamemo zračne mehurčke (Slika 5). Pipeto torej potopimo do takšne globine, kot je nujno potrebno, da ob koncu pipetiranja zaradi znižanja gladine ne bi v pipeto namesto raztopine potegnili zraka. Pomembno je tudi, da je pipeta pri zajemanju tekočine v vertikalnem položaju, saj lahko v nasprotnem primeru zajamemo napačen volumen. Pri pipetiranju gumb stisnemo počasi in nato počakamo 1 sekundo, da ne pride do nastanka mehurčkov ali razlitja tekočine. Pri izpustu moramo upoštevati, da prislonimo pipeto na steno pod kotom 20°- 45°, da zagotovimo optimalen pretok tekočine.



Slika 5. Shematski prikaz posameznih korakov, na katere moramo biti pozorni pri pipetiranju. Shema je bila pripravljena z uporabo programa BioRender.

POGOSTE NAPAKE PRI PIPETIRANJU

- Nepravilno nastavljen volumen – npr. želeli smo odpipetirati 100 μL raztopine, izbrali pa smo pipeto, ki ima merilno območje 2 μL -20 μL . Volumen na pipeti smo nastavili na 10,0 (μL) - odpipetiran volumen bo tako 10 x prenizek.
- Nepravilno nameščen nastavek na pipeto - če nastavka nismo čvrsto pritrdili, lahko pade s pipete ali odpipetiramo napačen volumen.
- Vdor tekočine v pipeto - če ne držimo pipete obrnjene navzdol.
- Zajetje mehurčkov - v primeru, da ob zajetju volumna spustimo gumb iz stopnje 1 do nevtralnega položaja prehitro. Odpipetiran volumen bo napačen.
- Odvzem prevelikega volumna - če nimamo občutka za stopnje na pipeti in stisnemo gumb na stopnjo 2 namesto na stopnjo 1. Odpipetiran volumen bo napačen.

REVERZNO PIPETIRANJE

Reverzno pipetiranje uporabljamo za viskozne tekočine ter z namenom, da preprečimo nastanek mehurčkov.

Postopek reverznega pipetiranja:

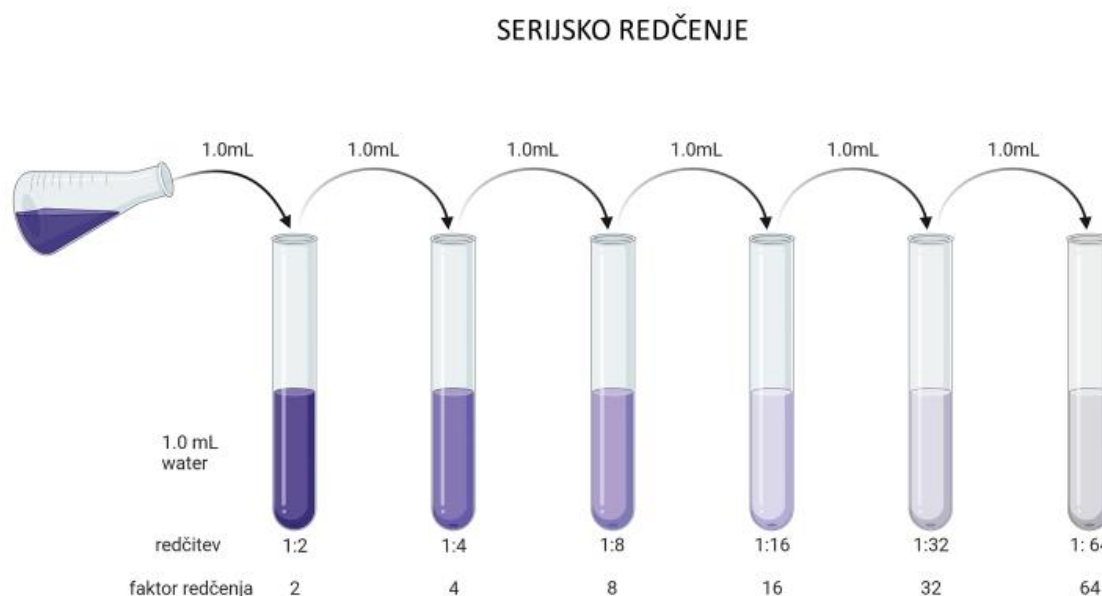
1. Gumb na pipeti nastavimo na stopnjo 2, potopimo v raztopino in počasi spustimo do nevtralnega položaja 0, da zajamemo volumen tekočine.
2. Nastavek pipete naslonimo pod kotom 20°- 45° na steno vsebnika, v katerega bomo pipetirali.
3. Gumb spustimo do položaja 1 in s tem odmerimo volumen tekočine. Pomembno je, da se zavedamo, da pri reverznem načinu pipetiranja vedno ostane nekaj tekočine v nastavku.
4. Na koncu spustimo gumb do stopnje 2 in s tem preostanek tekočine v nastavku zavržemo v ustrezen vsebnik, ki ga po končanem delu zaprtega zavržemo v biološke odpadke.

VIRI:

1. Pictograms, <https://echa.europa.eu/sl/pictograms-infographic>, dostopano: 21.2.2024
2. ECHA Regulations CLP Quiz, <https://echa.europa.eu/sl/regulations/clp/clp-quiz>; dostopano: 6.7.2022

SERIJSKO REDČENJE IN FAKTOR REDČENJA

Pri delu v laboratoriju moramo pogosto pripraviti redčitve osnovnih raztopin (Slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz serijskega redčenja. Slika je narejena z uporabo programa Biorender.

DODATNO GRADIVO

Oglejte si naslednje videoposnetke, ki nazorno prikažejo pravilno tehniko pipetiranja ter opozorijo na pogoste napake pri pipetiranju.

Pravilno pipetiranje: <https://www.youtube.com/watch?v=QGx490kuKjg>

<https://www.youtube.com/watch?v=OOQWsCMQuRw>

<https://www.youtube.com/watch?v=nPjt1ZUNkFQ>

Pipete: <https://www.youtube.com/watch?v=wIO4zJLR8R8>

Pogoste napake pri pipetiranju: https://www.youtube.com/watch?v=05oolv_y4Pk

Reverzno pipetiranje: <https://www.youtube.com/watch?v=1Y0U9jf5Zbl>

VPRAŠANJA

- Naštejte osebno varovalno opremo v laboratoriju.
- Preverite znanje o piktogramih v naslednjem kvizu: [Kviz o CLP - ECHA \(europa.eu\)](https://www.echa.europa.eu/kviz)
- Opišite postopek pipetiranja.
- Izberite s katero pipeto bi najbolj natančno odpipetirali želene volumne. To naredite tako, da k zapisanemu volumnu pripišete številko pred ustrezno pipeto.

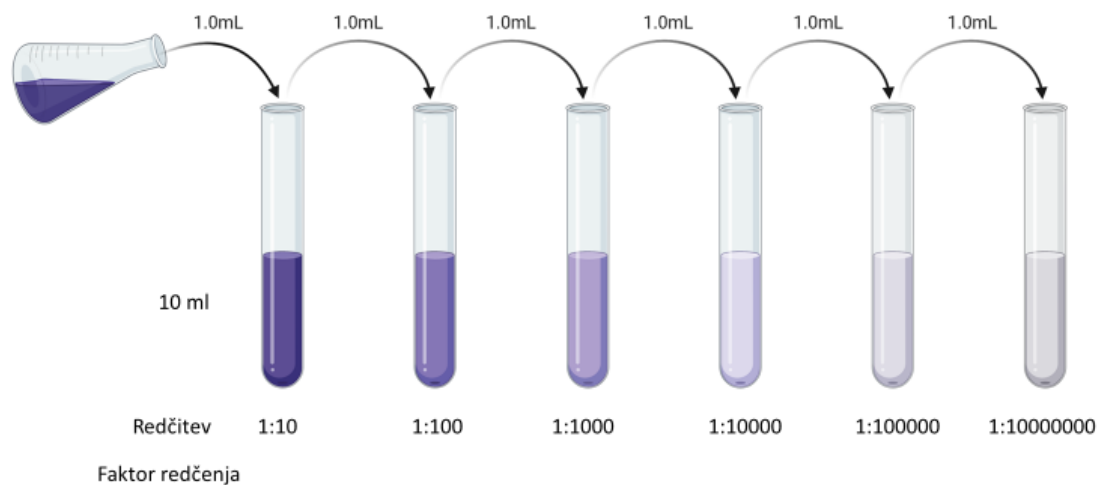
Izbor pipet			
		_____	9,4 μ L
1	0,1 μ L – 3 μ L	_____	21,4 μ L
2	0,5 μ L – 10 μ L	_____	1,856 μ L
3	2 μ L – 20 μ L	_____	62 μ L
4	10 μ L – 100 μ L	_____	155 μ L
5	20 μ L – 200 μ L	_____	14 μ L
6	100 μ L – 1000 μ L	_____	1600 μ L
7	1 mL – 5 mL	_____	0,3 mL

- Odpipetirali smo vzorec, nato bomo pipetirali reagent. Katera trditev je PRAVILNA?

A) Nastavek po pipetiranju vzorca zavržemo in za pipetiranje reagenta uporabimo nov nastavek.

B) Za pipetiranje vzorca in reagenta lahko uporabimo enak pipetni nastavek.

- Shematsko prikažite postopek pipetiranja. Označite, na kaj moramo biti pri pipetiranju pozorni.
- Naštete 5 pogostih napak pri pipetiranju.
- Opišite postopek reverznega pipetiranja.
- Ob ogledu video vsebin izpišite 5 pomembnih ugotovitev za vsak posnetek.
- Navedite faktor redčenja za raztopine pripravljene s serijskim redčenjem.



Video vsebine

- Navajanje virov in literature ter uporaba programa Zotero: https://www.youtube.com/watch?v=-l_hfvpeN0g
- How to Present Better with PowerPoint Presentation Coach: <https://www.youtube.com/watch?v=GZWT1VxTxAA>
- The surprising secret to speaking with confidence, TEDxBrixton <https://www.youtube.com/watch?v=a2MR5XbJtXU>

Viri

1. Pubmed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>; dostopano: 21.2.2024
2. Rahul M, Tewari N, Mathur V, Goel S, Jain G. Evidence mapping and quality analysis of published dental literature on COVID-19 – A systematic review. Natl J Maxillofac Surg 2021; 12 (2): 139-161.
3. Gobec M, Omersel J, Bratkovič T, Cedilnik-Gorup E, Učakar V, Fafangel M, Kos M, Paulino E, Messerli M, Čebren Lipovec N, Markovič T, Vrščaj L A, Jurković Mlakar, S, Karas Kuželički N, Kerec Kos M, Nabergoj Makovec Urška. Izzivi, priložnosti in izkušnje cepljenja v lekarniški dejavnosti : strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije. 2022; 107.
4. https://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/referat/navodila/navodila_za_izdelavo_in_pisanje_diplomske_magistrske_naloge.pdf?sfvrsn=2; dostopano: 21.2.2024
5. https://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Dekanat/Studij/2016_Smernice_za_seminar.pdf; dostopano: 21.2.2024
6. https://www.uni-lj.si/o_univerzi_v_ljubljani/organizacija__pravilniki_in_porocila/predpisi_statut_ul_in_pravilniki/2023092013503987/ ; dostopano: 20.2.2024.
7. <https://www.euronews.com/next/2024/01/20/best-ai-tools-academic-research-chatgpt-consensus-chatpdf-elicite-research-rabbit-scite>; dostopano: 20.2.2024
8. http://www.sbd.si/datoteke/dokumenti/SBD_BiokemijskiSlovar2012a.pdf; dostopano: 20.2.2024

CELIČNI CIKEL

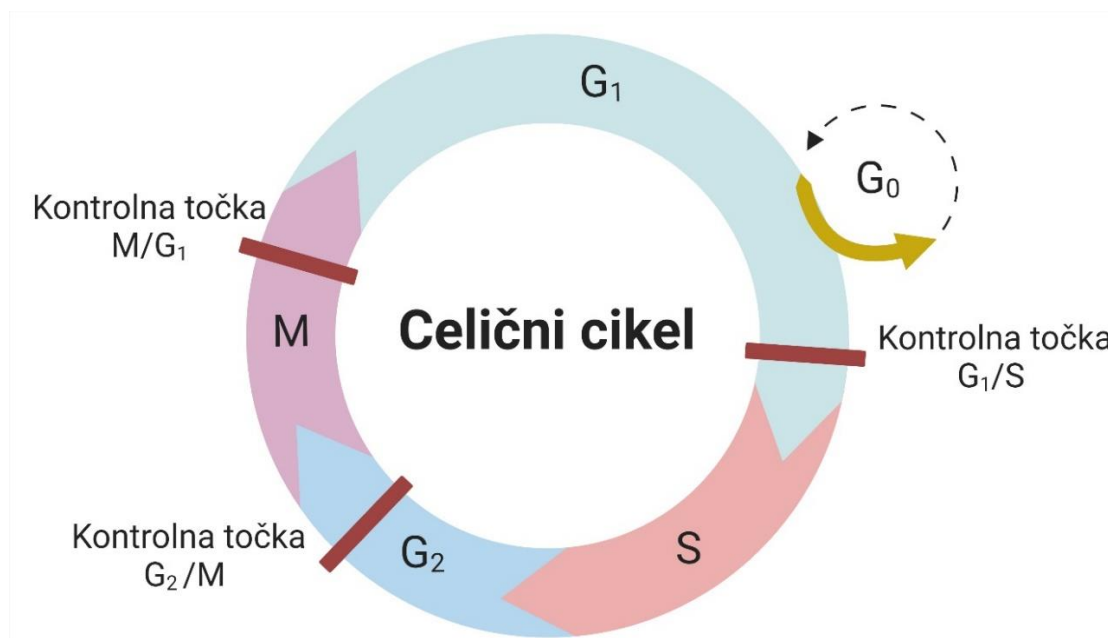
Izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

UVOD

Na vaji se bomo seznanili s postopkom barvanja kromosomov v koreninskih laskih čebule. Pri tem bomo spoznali način označevanja kromosomov in priprave preparata na objektnem stekelcu ter tehniko mikroskopiranja s pomočjo svetlobnega mikroskopa, kar nam bo omogočilo opazovanje stopenj mitoze delečih se celic v apikalnem meristemu koreninskega laska čebule. S pomočjo trajnih preparatov si bomo podrobneje pogledali posamezne stopnje mitoze in mejoze v različnih tkivih.

CELIČNI CIKEL

Celični cikel je zaporedje dogodkov v celici, ki vodijo v njeno delitev. Pri evkariontskih celicah je celični cikel sestavljen iz štirih faz. Faze G_1 , S in G_2 imenujemo s skupnim imenom interfaza. Četrta faza je mitoz oziroma faza M, med katero poteče razdelitev v dve hčerinski celici (slika 1). Celice lahko začasno izstopijo iz celičnega cikla in vstopijo v mirujočo fazo, imenovano G_0 . Prokariontske celice nimajo jedra in se delijo s cepitvijo. Pri njih je celični cikel manj zapleten.

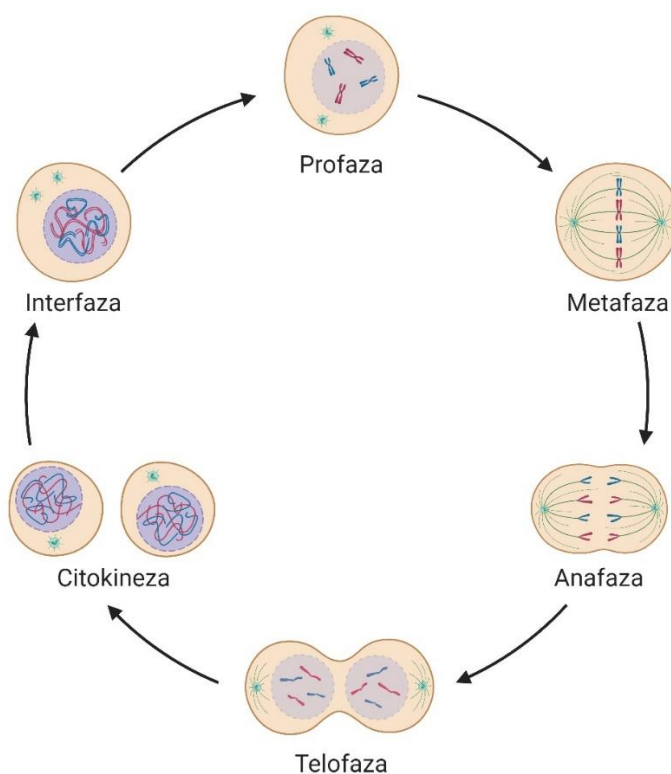


Slika 1: Prikaz celičnega cikla, ki obsega interfazo (faze G_1 , S in G_2) in mitozo (faza M).

V fazi G_1 celičnega cikla celica raste in se pripravlja na podvajanje DNA. Nastajajo informacijske RNA za histonske proteine in encimi, ki sodelujejo pri podvajanju DNA. Podvoji se centrosom. V celici poraste koncentracija nukleozidov. Ta faza traja v povprečju tri ure. Kromosomi se nahajajo v obliki razvitega kromatina. Prehodi med posameznimi fazami celičnega cikla so nadzorovani v tako imenovanih kontrolnih točkah, v katerih se ugotavlja stanje molekule DNA in stanje okolja. Na prehodu iz faze G_1 je prva kontrolna točka in celica preide v fazo S le, če je »pripravljena« na sintezo DNA (slika 1). V fazi S poteka podvajanje DNA in traja okoli 7 ur. Kromosomi so po tej fazi sestavljeni iz dveh kromatid. V fazi G_2 celica ponovno raste in se pripravlja na mitozo. V tkivu se celice sprostijo celičnih stikov s sosednjimi celicami, se zaokrožijo in zaradi privzema vode povečajo. Poteka pospešeno nastajanje proteinov, potrebnih za celično delitev. Povprečno traja 3 do 4 ure. Pred vstopom v fazo M je druga kontrolna točka, kjer celica »preveri«, ali je genomska DNA podvojena (slika 1). Celična rast se zaustavi in energija se preusmeri v delitev v dve hčerinski celici. Najprej pride do segregacije kromosomov – delitve jedra (kariokineza) – in naposled se razdeli še celotna celica (citokineza). Traja od pol do ene ure. Tekom mitoze nastopi tretja kontrolna točka, kjer celica »preveri«, ali so kromosomi dokončno pripravljeni na delitev (slika 1). Nekatere celice se lahko ustavijo in po končani mitози celičnega cikla ne nadaljujejo (tj. ne vstopijo v nadaljnje delitve). To obdobje je lahko začasno ali trajno in ga označujemo s fazo G_0 (slika 1). Začasno so v fazi G_0 na primer matične celice, ki so zadolžene za obnovo celic, medtem ko so končno diferencirane celice trajno v fazi G_0 .

MITOZA

Mitoza je celična delitev, pri kateri nastaneta dve identični, diploidni hčerinski celici, ki imata enako število istovrstnih kromosomov kot njuna materinska celica. Mitoza omogoča rast in obnavljanje tkiv mnogoceličnim organizmom in nespolno razmnoževanje enoceličnih organizmov. Mitoza poteka v več stopnjah, ki prehajajo ena v drugo: profaza, metafaza, anafaza in telofaza (slika 2). V obdobju med dvema mitotskima delitvama je celica v interfazi. Morfološki dogodki mitoze so odraz molekularnih sprememb v vsaki izmed stopenj mitoze.



Slika 2: Shematski prikaz stopenj mitoze.

Prva faza mitoze je profaza. V zgodnji profazi se oblikujejo kromosomi. Vsak kromosom je sestavljen iz dveh enakih podolgovatih kromatid. Kromatidi sta med seboj združeni v področju centromere. V citoplazmi iz centrosoma prično izhajati mikrotubuli delitvenega vretena, ki omogočijo potovanje kromosomov na nasprotna pola celice. V pozni profazi razpade jedrni ovoj in centrosoma dosežeta pola. Niti delitvenega vretena se podaljšajo in pritrdijo na posamezen kromosom v območju centromer.

Druga faza mitoze je metafaza, v kateri niti delitvenega vretena povlečejo kromosome na ekvatorialno ravnino celice. Delitveno vreteno je pritrjeno na centromere kromosomov tako, da je po ena kromatida vsakega kromosoma na vsaki strani ekvatorialne ravnine. V tej fazi so kromosomi najkrajši in najdebelejši in jih je najlažje opazovati.

Tretja faza mitoze je anafaza in je najkrajše obdobje mitoze. V anafazi se kromatidi ločita, pri čemer se vsak dvokromatidni kromosom razdeli na dva hčerinska enokromatidna kromosoma, ki ju niti delitvenega vretena potegnejo proti nasprotnim polom.

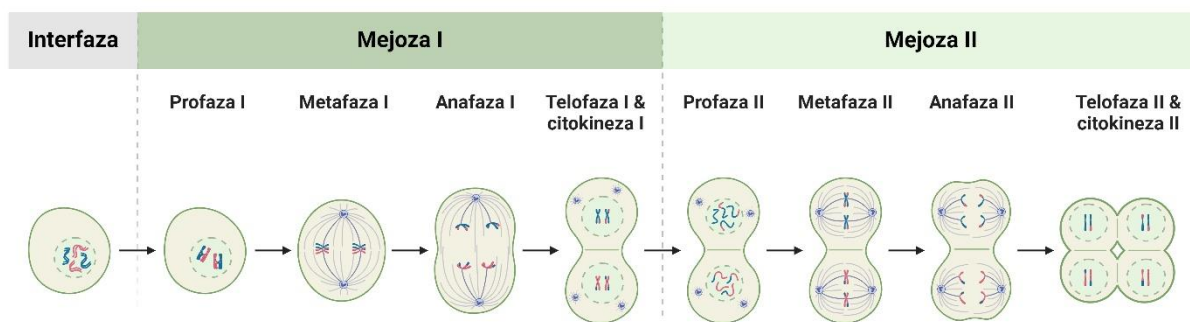
Anafaza preide v zadnjo, četrto fazo mitoze - telofazo, ko kromosomi dosežejo pol. Delitveno vreteno postopoma izgine, začne se oblikovati jedrni ovoj in kromosomi se razvijejo do svoje funkcionalne oblike. Temu praviloma sledi delitev citoplazme (citogeneza) v dva enaka dela.

Celice, ki vstopajo v mitozo so pri mnogoceličnih živalih in rastlinah različno razporejene. Pri višjih rastlinah poteka mitoza večinoma v rastnih tkivih oziroma meristemih, ki se nahajajo na vršičkih stebel in korenin. Pri živalih pa mitoza poteka skoraj povsod, ko nastajajo nove celice in organizem raste, in ko nove celice nadomeščajo stare, odmrle.

MEJOZA

Mejoza ali zoritvena delitev je posebna oblika delitve jedra, s katero iz ene diploidne celice nastanejo štiri dedno različne haploidne celice in predstavlja osnovo za spolno razmnoževanje pri vseh evkariontih. Mejoza je pomembna pri nastanku spolnih celic oziroma gamet (pri živalih) in spor (pri rastlinah). Gamete (jajčne celice ali spermiji) se pri oploditvi združijo v diploidno zigoto, iz katere se razvije nov organizem. Za mejozo je značilen proces homologne rekombinacije (t.i. *crossing-over*), pri čemer se z izmenjavo delov nesesterskih kromatid med homolognimi kromosomi dodatno poveča genetska variabilnost.

Mejoza poteka v dveh zaporednih delitvah, pri čemer se med I. in II. delitvijo DNA ne podvoji. Zaradi slednjega so nastale hčerinske celice haploidne. Posebna je prva mejotska delitev ali mejoza I, ki je redukcijska delitev (zmanjša število kromosomov na polovico) ter vključuje povezovanje homologov in rekombinacije. Druga delitev ali mejoza II je mitotska delitev s poglavitnim namenom segregacijesestrskih kromatid (slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz stopenj mejoze.

VIR

- Jezernik, K., Veranič, P., Sterle, M. (2012). *Celična biologija : učbenik za študente Medicinske fakultete*. DZS.

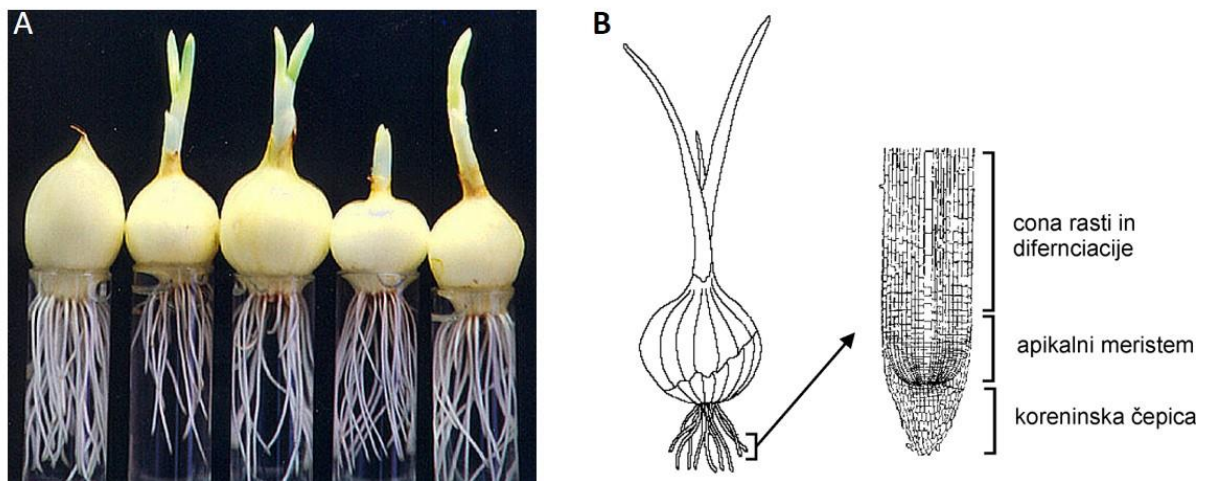
DODATNO GRADIVO

Oglejte si naslednje videoposnetke, ki nazorno prikažejo potek celičnega cikla in posamezne stopnje mitoze in mejoze:

- Celični cikel: <https://www.youtube.com/watch?v=g7iAVCLZWuM>
- Mitoza: <https://www.youtube.com/watch?v=7ybxaYhRplA>
- Mejoza: <https://www.youtube.com/watch?v=ijEcHra3484>

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji se bomo seznanili s postopkom barvanja komosomov s Schiffovim reagentom in opazovali stopnje mitoze v apikalnem rastnem tkivu koreninskih laskov čebule s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Pri čebuli (*Allium cepa*) je genska informacija zapisana na osmih kromosomih, katere bomo opazovali v apikalnem meristemu koreninskih laskov čebule, saj se v tem predelu koreninskih laskov celice aktivno delijo in je veliko celic v fazi mitoze. V nedelečih celicah ne moremo opazovati kromosov, saj se DNA zvije in zloži v kromosome šele v procesu mitoze. Na samem vrhu koreninskega laska, pred rastnim tkivom je koreninska čepica (slika 4). To je plast celic, ki omogoča fizično in kemijsko zaščito apikalnega meristema. Nad rastnim tkivom je cona rasti in diferenciacije. Celice tega dela sprejemajo vodo in se podaljšujejo, a se ne delijo. To podaljševanje potiska vrh korenine naprej v zemljo.



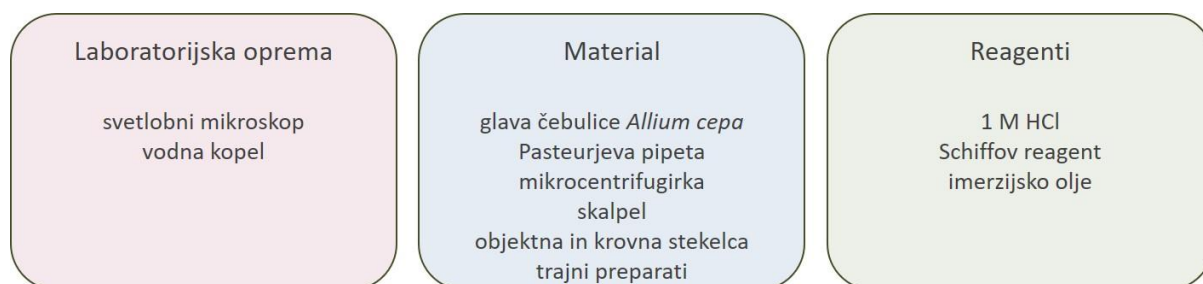
Slika 4: Rast koreninskih laskov čebule (A) in prečni prerez vršička koreninskega laska čebule (B).

Na vaji se bomo seznanili tudi z opazovanjem trajnih preparatov, in sicer boste opazovali celice med mitozo in mejozo v različnih tkivih s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Stopnje mitoze boste pogledali tudi na trajnem preparatu prečnega prereza vršička koreninskih laskov čebule, hkrati pa si boste izbrali še po dva preparate med spodaj navedenimi ter jih skicirali in označili značilnosti posameznega preparata.

Trajni preparati:

- Prečni prerez vršička koreninskih laskov čebule
- Prečni prerez vršička korenin pri hijacinti
- Nastajanje spor v prečnem prerezu prašnikov lilije
- Mitoza v celicah blastule ribe belice
- Človeški kromosomi v razmazu iz krvi pri ženski
- Človeški kromosomi v razmazu iz krvi pri moškem
- Orjaški kromosomi v razmazu žleze slinavke ličinke trzače (*Chironomus sp.*)

Za izvedbo vaje boste uporabili laboratorijsko opremo, material in reagente, ki so navedni na sliki 5.



Slika 5: Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, potrebni za izvedbo vaje.

1. Barvanje kromosomov koreninskih laskov čebule s Schiffovim reagentom

Navodila za izvedbo vaje:

- Površino, na kateri boste delali, zaščitite z nekaj plastmi papirnatih brisač.
- Pri spiranju in barvanju iz mikrocentrifugirke odstranite vso tekočino.
- Vse odpadne tekočine pri spiranju in barvanju zavržite v posodo za tekoči odpad.
- Uporabljajte eno Pasteurjevo pipeto za vodo, eno za HCl in eno za Schiffov reagent. Ne menjujte jih med seboj.
- Pri rokovanju s HCl bodite previdni, saj je močna kislina.
- Pri rokovanju s Schiffovim reagentom pazite, da ne pride na roke in oblačila, saj se bodo močno obarvala.
- Med postopkom barvanja in spiranja se čim manj dotikajte spodnjega dela koreninskih laskov.
- Schiffov reagent shranjujemo pri 4 - 8°C, vendar mora biti pred barvanjem segret na sobno temperaturo.

Potek vaje:

- Glave čebulic namestite na ozke čaše ali merilne valje napolnjene z vodo, tako da se spodnji del (kjer poganjajo koreninski laske) dotika vode. Sveži koreninski laske, ki poženejo iz čebulice, naj bodo stari 2 do 5 dni (pripravljeno s strani asistenta).
- Odrežite približno 1 cm spodnjega dela dveh koreninskih laskov. Laske prenesite v plastično mikrocentrifugirko.
- S Pasteurjevo pipeto dodajte približno 1 mL 1 M HCl. Mikrocentrifugirko prenesite v vodno kopel in inkubirajte 12 min pri 60 °C.
- S Pasteurjevo pipeto previdno odstranite HCl iz mikrocentrifugirke in jo zavržite v steklenico za odpad. Koreninske laske trikrat sperite z destilirano vodo, tako da v mikrocentrifugirko s Pasteurjevo pipeto dodate približno 1 mL destilirane vode, zaprete, rahlo premešate in vodo previdno odstranite.

- Ko odstranite še preostanek vode po spiranju, v mikrocentrifugirko dodajte Schiffov reagent – toliko, da sta koreninska laska prekrita. Inkubirajte 12 min na sobni temperaturi. V tem času bosta vrha koreninskih laskov postajala vse bolj rdeče barve.
- S Pasteurjevo pipeto previdno odstranite Schiffov reagent in ga zavržite v steklenico za odpad. Koreninska laska trikrat sperite z destilirano vodo, tako da v mikrocentrifugirko s Pasteurjevo pipeto dodate približno 1 ml destilirane vode, zaprete, rahlo premešate in vodo previdno odstranite.
- S pinceto prenesite koreninska laska na objektno stekelce. S skalpelom ali rezilom britvice odrežite spodnja 2 mm laska (najbolj obarvan del). Preostanek zavržite. Preparatu dodajte kapljico vode in ga pokrijte s krovnim stekelcem.
- Košček laska močno, a previdno stisnite med krovnim in objektnim stekelcem. Pri tem si lahko pomagate z lesenim držalom secirne igle ali svinčnika. Pritisnite močno, vendar pri tem ne vrtite ali premikate krovnega stekelca. Zmečkan košček laska naj se pri tem raztegne v liso od pol do enega centimetra v premeru.

2. Opazovanje stopenj mitoze v apikalnem meristmeu čebule pripravljenega preparata

- Odkrijte mikroskop in ga postavite na sredino delovnega prostora.
- Prižgite svetilko. S kolescem za uravnavanje svetlosti naravnajte jakost svetilke malo manj kot na največjo svetilnost.
- Nastavite objektiv z najmanjšo povečavo (4×). Z makrometrskim vijakom spustite mizico v najnižji položaj. Objekt postavite na objektno mizico. Pazite, da je krovno stekelce zgoraj! Z makrometrskim vijakom dvignite mizico v najvišji možni položaj.
- Opazujte skozi mikroskop in počasi spuščajte mizico tako, da vrtite makrometrski vijak proti sebi, dokler se ne pojavi slika. Z mikrometrskim vijakom sliko lahko natančno izostrite.
- Za opazovanje pri večji povečavi, postavite izbran del objekta na sredino vidnega polja. Zavrtite revolver na naslednjo povečavo in z mikrometrskim vijakom izostrite sliko, tako da opazujete skozi mikroskop in vijak vrtite proti sebi ali od sebe.
- Nato preparat opazujte pod mikroskopom z objektivom največjo povečavo (100×), pri čemer dodajte imerzijsko olje.
- Pri uporabi imerzijskega objektiva na krovno stekelce nanosite kapljico imerzijskega olja in za izostrenje slike uporabljajte le mikrometrski vijak.
- Poiščite vse stopnje mitoze v apikalnem meristemu koreninskega laska in jih skicirajte.

3. Opazovanje stopenj mitoze in mejoze s pomočjo trajnih preparatov

- Na trajnem preparatu prečnega prereza vršička koreninskih laskov čebule s pomočjo svetlobnega mikroskopa poiščite vse stopnje mitoze in jih skicirajte.
- Poljubno si izberite še dva trajna preparate in s pomočjo svetlobnega mikroskopa skicirajte značilnosti posameznega preparata.

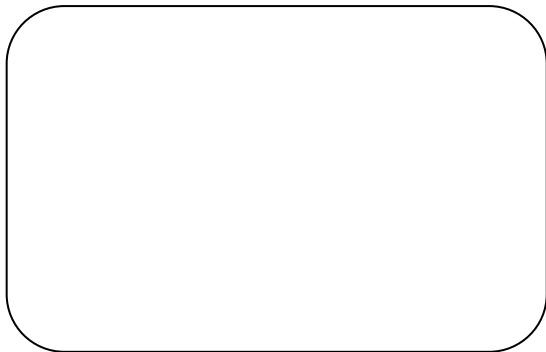
POROČILO:

Materiali in aparature:

Rezultati:

1. Poiščite in skicirajte celice v različnih stopnjah mitoze z opazovanjem pripravljenega preparata. Opišite vidne značilnosti posameznih faz.

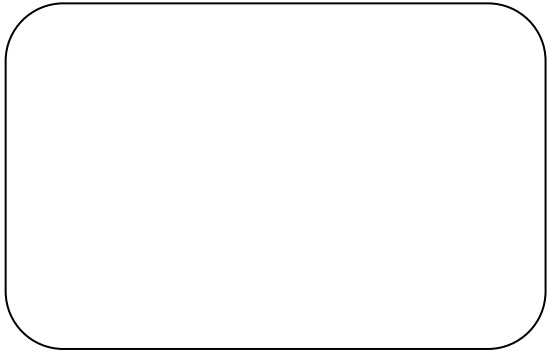
Profaza



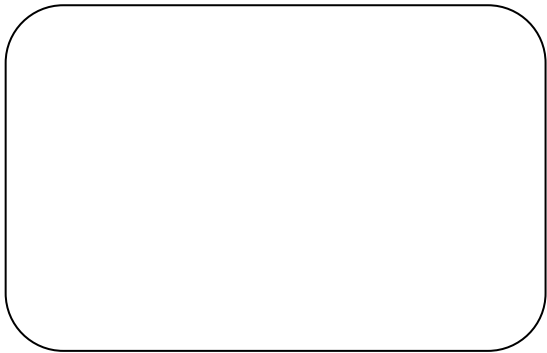
Metafaza



Anafaza

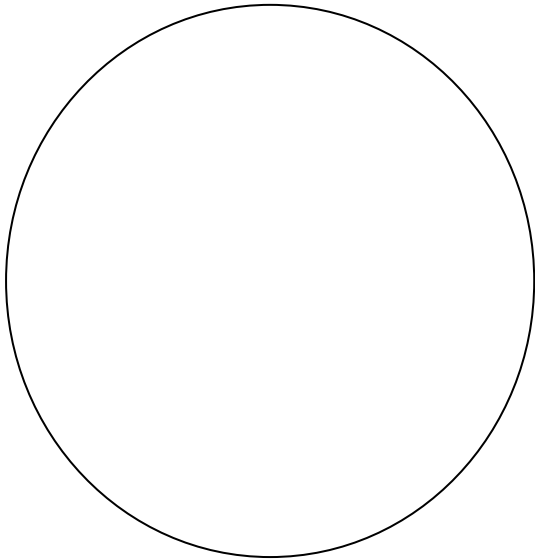


Telofaza

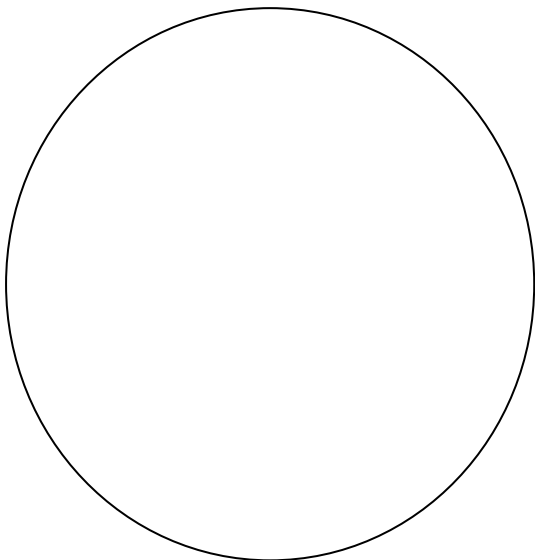


2. Skicirajte celice med mitozo ali mejozo v različnih tkivih s pomočjo opazovanja trajnih preparatov. Opišite vidne značilnosti posameznega preparata.

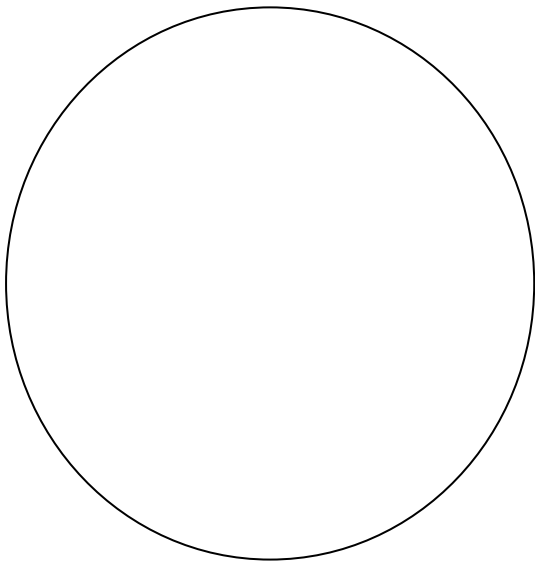
Trajni preparat:



Trajni preparat:



Trajni preparat:



Vprašanja

1. V kateri fazi najbolj razločno vidimo kromosome in zakaj?
2. Zakaj se celice, ki so v fazi mitoze, nahajajo na vrhu koreninskih laskov?
3. V kateri fazi se nahaja največ celic rastnega tkiva?

Poročilo izdelal:

Datum:

Pregledal:

CELIČNE KULTURE

Asist. dr. Tijana Marković, mag. farm.

UVOD

Na vaji se bomo spoznali z osnovnimi postopki pri delu s celičnimi kulturami. Ogledali si bomo laboratorij ter osnovne aparature, ki jih pri delu s celičnimi kulturami potrebujemo. Pri praktičnem delu se boste naučili štetja celic, določanja viabilnosti ter pripravili načrt za subkultiviranje in zamrzovanje celičnih kultur. Na vaji bomo delali s perifernimi mononuklearnimi celicami.

CELIČNA KULTURA

Celične kulture so eno glavnih orodij, ki se uporablja v celični in molekularni biologiji, saj zagotavljajo odlične modelne sisteme za preučevanje fiziologije in biokemije celic (npr. procese v celicah, staranje), vpliva zdravil in toksičnih spojin na celice ter mutageneze in karcinogeneze. Uporabljajo se tudi pri testiranju in razvoju zdravil ter v proizvodnji bioloških zdravil (npr. cepiv, terapevtskih proteinov).

Celične kulture pridobimo po odvzemu celic ali tkiva iz človeka, živali ali rastlin. Celice se lahko odstranijo neposredno iz tkiva, ki ga pred gojenjem razgradimo encimsko ali mehansko, ali pa izhajajo iz celične linije ali celičnega seva, ki je že uveljavljen.

VRSTE CELIČNIH KULTUR

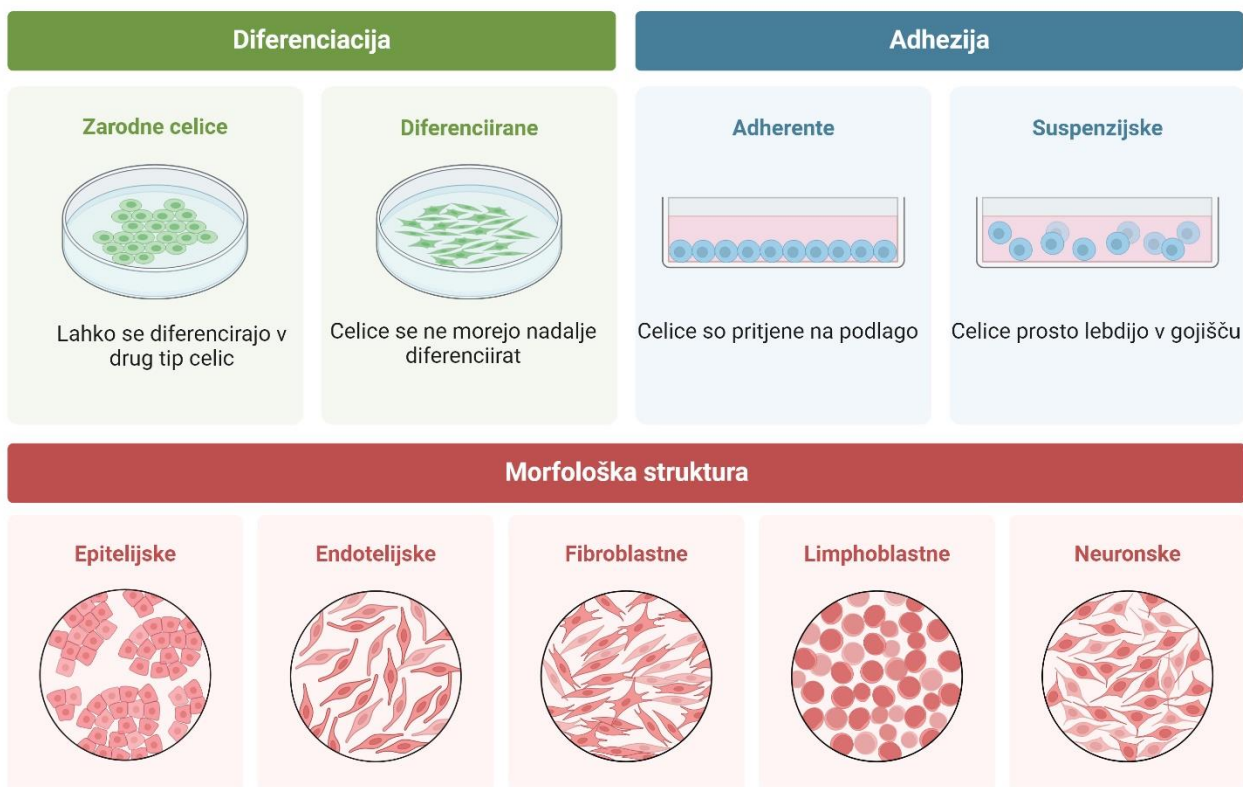
Poznamo več vrst celičnih kultur (Slika 1).

Morfološka delitev

- **Adherentne celične kulture** so pridobljene iz trdnih tkiv ali organov, celice pa so pritjene na podlago.
- **Suspenzijske celične kulture** so pridobljene iz krvnih celic, ne potrebujejo podlage in lebdiijo v gojišču.

Primarne in kontinuirane celične kulture

- **Primarne celične kulture** so izolirane neposredno iz tkiva. Celice ohranijo diferenciacijske značilnosti celic *in vivo*. V *in vitro* pogojih jih lahko gojimo le določen čas, saj se celice običajno delijo le v omejenem obsegu, preden izgubijo sposobnost razmnoževanja.
- **Kontinuirane celične linije** postanejo nesmrtnne s procesom, imenovanim transformacija. Ta se lahko pojavi spontano ali pa je kemično ali virusno inducirana. Ko se celična linija transformira in pridobi sposobnost neomejene delitve, postane kontinuirana celična linija.

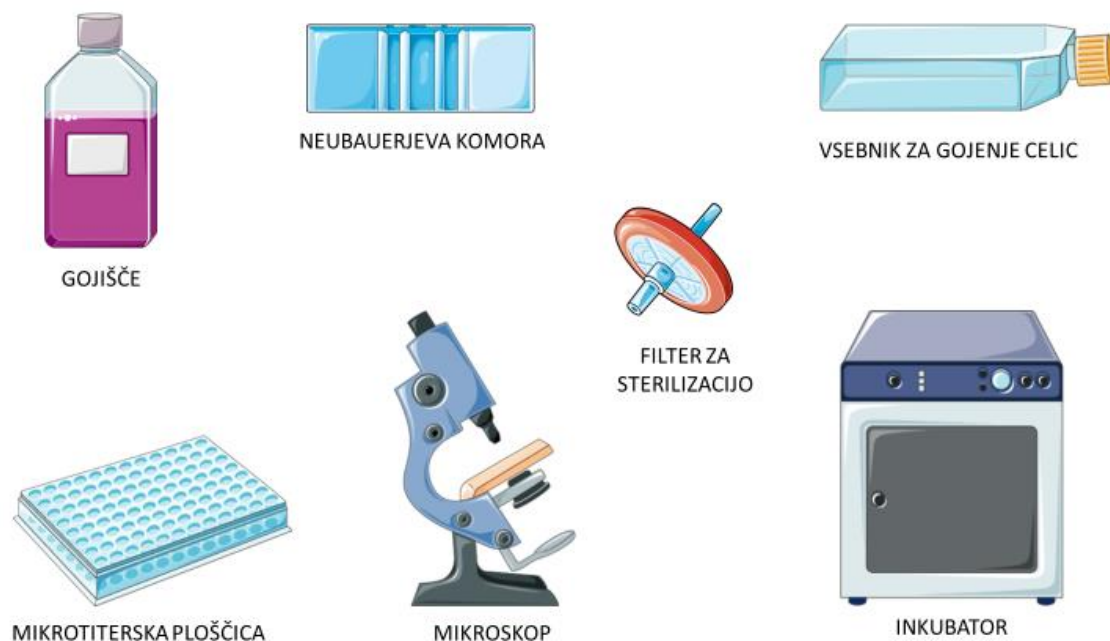


Slika 1. Klasifikacija celic. Slika je bila narejena s programom Biorender.

GOJENJE CELIČNIH KULTUR

Pogoji gojenja se zelo razlikujejo za vsako vrsto celic, vendar je za rast v kulturi vsem celičnim kulturam skupno, da potrebujejo (Slika 2):

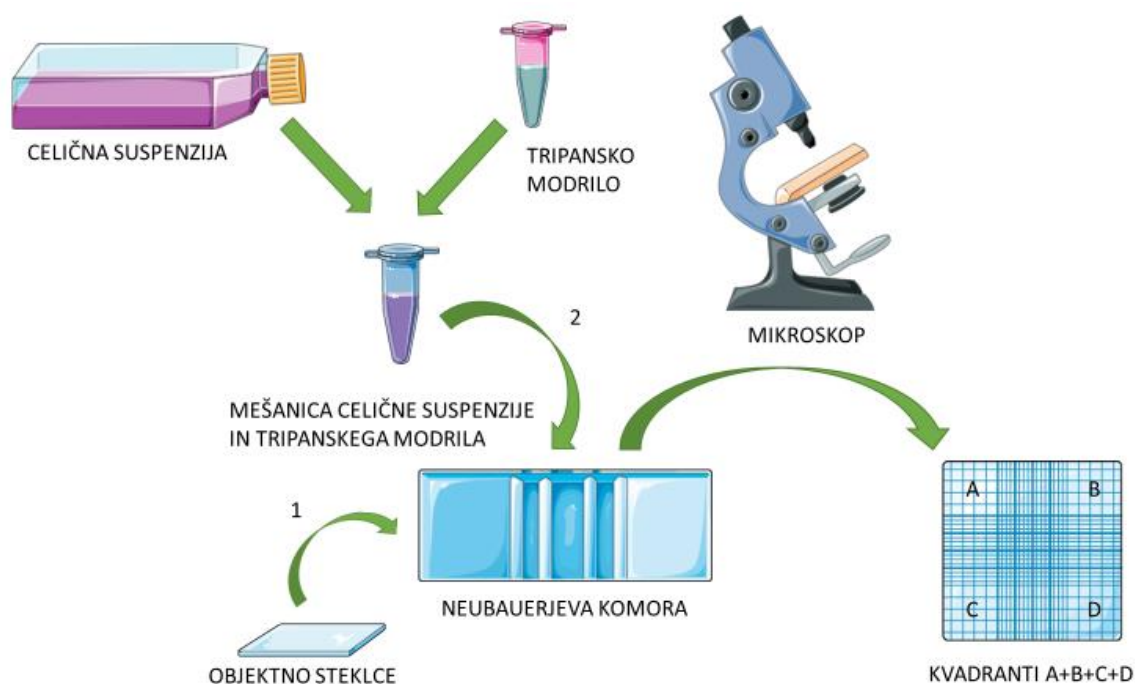
- Gojišče ali medij, ki oskrbuje celično kulturo z vodo in hranili (aminokisline, ogljikovi hidrati, vitamini in minerali)
- Rasne dejavnike (serum govejega zarodka, rastni hormoni)
- Regulirano fizikalno kemijsko okolje: plini (O_2 , CO_2), pH, osmotski tlak, temperatura, vlaga
- Sterilno okolje – vsebniki za gojenje celic, pipete in nastavki za pipetiranje celičnih kultur, fitri za sterilizacijo, konične epruvete in male epruvetke, avtoklav, komora z laminarnim pretokom zraka



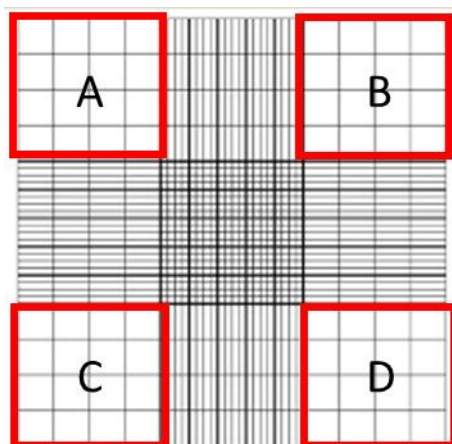
Slika 2. Laboratorijska oprema in material v celičnem laboratoriju. Slika je narejena z uporabo SMART - Servier Medical ART 3000. Vir: <https://smart.servier.com/>; dostopano: 6.7.2022

ŠTETJE CELIC

Za štetje celic uporabimo Neubauerjevo komoro – hemocitometer in tripansko modrilo (Slika 3). Žive celice imajo intaktno membrano, ki je tripansko modrilo ne prehaja. Tripansko modrilo vstopa samo v mrtve celice, ki imajo poškodovano membrano in se zato obarvajo modro. Mrtve celice tako ločimo od živih celic, ki ostanejo neobarvane. Mešanico celične suspenzije in Tripanskega modrila s pipeto prenesemo pod krovno steklo hemocitometra in preštejemo žive in mrtve celice (Slika 4).



Slika 3. Shematski prikaz postopka štetja celic. Slika je narejena z uporabo SMART - Servier Medical ART 3000. Vir: <https://smart.servier.com/>; dostopano: 6.7.2022



Slika 4. Mreža na hemocitometru.

Celice štejemo v poljih A, B, C in D. Celice na črti štejemo le na enem zunanem in na enem notranjem robu. **Koncentracijo živih celic** nato izračunamo po sledeči enačbi:

$$\frac{(A + B + C + D)}{4} \times R \times 10^4 \text{ celic/mL}$$

A, B, C, D = število celic v posameznem polju

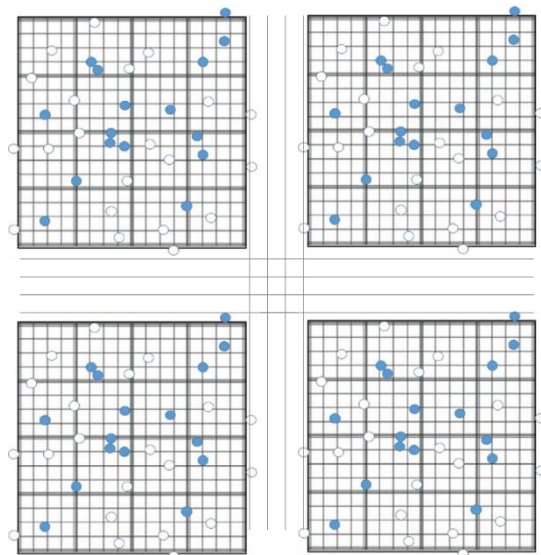
R = faktor redčenja zaradi dodatka tripanskega modrila

Izračunamo koncentracijo živih, mrtvih, s
Slednje izračunamo po spodnji enačbi:

$$\% \text{ živih celic} = \frac{\text{Število živih celic}}{\text{Celokupno število celic}} \times 100$$

Primer: Štetje celic

Iz suspenzije celic odvzamemo 10 μl vzorca in mu dodamo enak volumen tripanskega modrila. Suspenzijo smo nanесли na hemocitometer. Pod mikroskopom smo prešteli žive in mrtve celice (Slika 5).



Slika 5. Štetje celic z hemocitometrom. Bele celice so žive, modre celice so mrtve. Celice na črti štejemo le na enem zunanjem in na enem notranjem robu.

- Koliko živih in koliko mrtvih celic smo prešteli v teh štirih kvadrantih (A + B + C + D)?

$$\text{Žive} = (19 + 19 + 19 + 19) = 76$$

$$\text{Mrtve} = (15 + 15 + 15 + 15) = 60$$

V primeru, da štejemo celice, ki so na levem in spodnjem robu.

- Izračunajte je živost celic:

$$\text{Živost} = N_{\text{živih celic}} / N_{\text{vseh celic}} \times 100 (\%) = 76 / (60 + 76) \times 100\% = 55,9\%$$

- Izračunajte faktor redčenja R:

Celično suspenzijo (10 μl) smo redčili s tripanskim modrilom (10 μl).

Celokupni volumen celične suspenzije je 10 μl + 10 μl = 20 μl

Redčenje je torej bilo v razmerju: volumen celične suspenzije/celokupni volumen = 10 μl / (10 μl + 10 μl) = 10/20 = 1:2.

Torej je faktor redčenja R = 2.

- Izračunajte koncentracijo celic:

$$\frac{(A + B + C + D)}{4} \times R \times 10^4 \text{ celic/mL} = C_{\text{celic}}$$

$$C_{\text{celic}} = 76/4 \times 2 \times 10^4 \text{ celic/mL} = 3,8 \times 10^5 \text{ celic/mL}$$

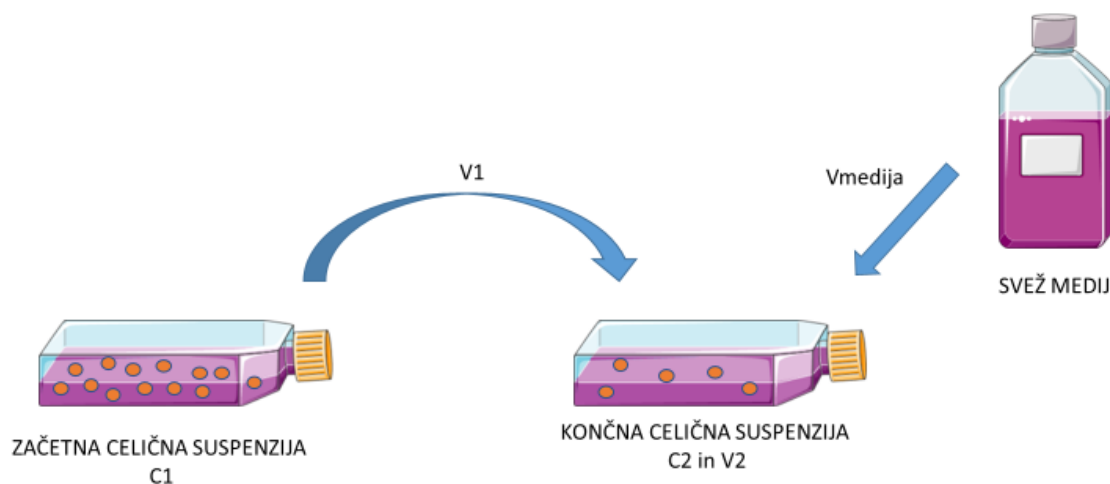
SUBKULTIVIRANJE CELIČNE KULTURE

Za optimalno rast in gojenje celične kulture, moramo celično gostoto v kulturi vzdrževati v določenem koncentracijskem območju in celicam dodati sveže gojišče. Celice, ki se množijo in rastejo, je zato potrebno subkultivirati/redčiti (Slika 6).

- **Adherentne celične kulture** so pritjene na podlago. **Konfluenta** je delež površine plastenke celične kulture, ki je prekrita s celicami. Adherentne celice moramo pred subkultiviranjem odlepiti od podlage, za kar uporabimo **encim tripsin**, ki cepi vezi med adherentnimi celicami in podlago.
- **Suspenzijske celične kulture** ne potrebujejo podlage in lebdijo v gojišču, zato celice pred redčenjem ni potrebno odlepiti od podlage.

Primer: Redčenje celic

Celična suspenzija ima koncentracijo $1,95 \times 10^6$ živih celic/ml. Želimo jo redčiti na koncentracijo 2×10^5 živih celic/ml. Želimo, da je končni volumen celične suspenzije 10 ml.



Slika 6. Shematski prikaz redčenja celične suspenzije. Slika je narejena z uporabo SMART - Servier Medical ART 3000. Vir: <https://smart.servier.com/>; dostopano: 6.7.2022

Izračunajte volumen začetne celične suspenzije, ki ga potrebujemo.

$$\begin{aligned} V_1 &= C_2 \times V_2 / C_1 \\ &= (2 \times 10^5 \text{ celic/ml} \times 10 \text{ ml}) / 1,95 \times 10^6 \text{ celic/ml} \\ &= (2 \times 10^5 \text{ celic/ml} \times 10 \text{ ml}) / 19,5 \times 10^5 \text{ celic/ml} \\ &= (2 \times \cancel{10^5} \text{ celic/ml} \times 10 \text{ ml}) / 19,5 \times \cancel{10^5} \text{ celic/ml} \\ &= 2 \times 10 \text{ ml} / 19,5 = 1,03 \text{ ml} \end{aligned}$$

Potrebujemo 1,03 ml začetne celične suspenzije.

Koliko svežega medija moramo dodati?

$$V_{\text{medija}} = 10 \text{ ml} - 1,03 \text{ ml} = 8,97 \text{ ml}$$

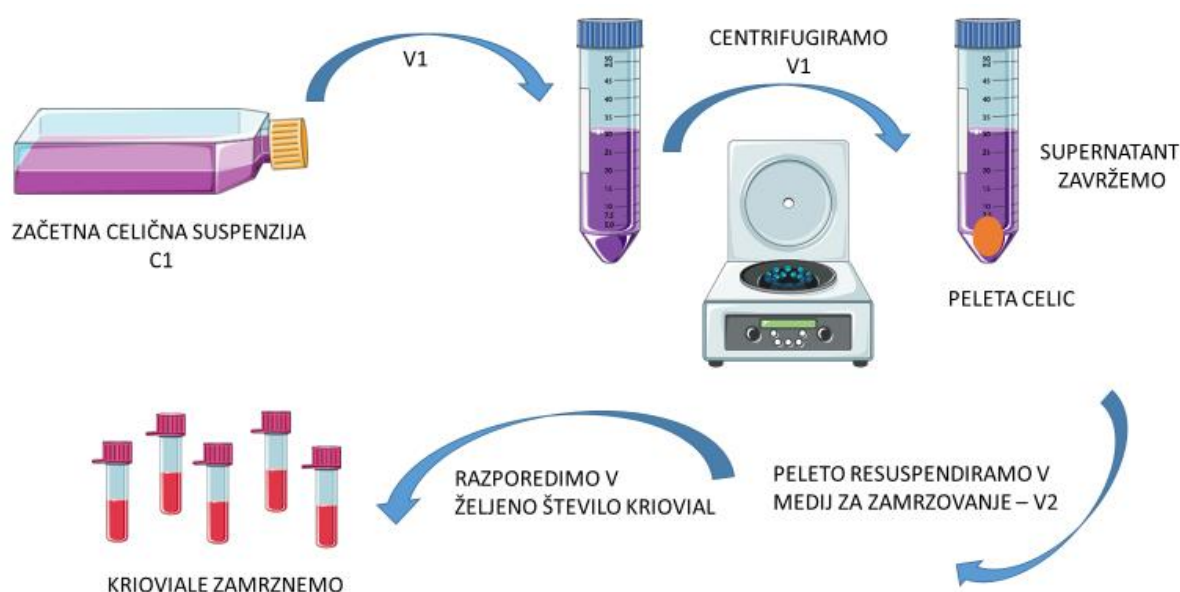
Dodati moramo 8,97 ml svežega medija.

ZAMRZOVANJE CELIC - KRIOPREZERVACIJA

Krioprezervacija je postopek shranjevanja celic in drugega biološkega materiala pri izjemno nizkih temperaturah in omogoča dolgotrajno shranjevanje v tekočem dušiku, saj pride do zaustavitve biokemijskih procesov, kar povzroči stabilizacijo celic (Slika 7). Ker med zamrzovanjem lahko pride do tvorbe kristalov, ki usodno poškodujejo celico, zamrzovalnemu mediju dodamo krioprotektant (DMSO) in sicer v 5% koncentraciji (zamrzovalni medij = 95% gojitveni medij, 5% DMSO). Optimalna gostota celic je 10^6 - 10^7 celic/mL zamrzovalnega medija.

Primer: Zamrzovanje celic

Želimo zamrzniti 5 kriovial, ki vsebujejo vsaka po 1 ml živih celic v koncentraciji 10^7 celic/mL. Začetna celična suspenzija ima koncentracijo $1,55 \times 10^6$ živih celic/ml.



Slika 7. Shematski prikaz zamrzovanja celične suspenzije. Slika je narejena z uporabo SMART - Servier Medical ART 3000. Vir: <https://smart.servier.com/>; dostopano: 6.7.2022

Izračunajte volumen začetne celične suspenzije, ki ga potrebujemo.

$$V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

$$V_2 = 5 \times 1 \text{ ml} = 5 \text{ ml (5 kriovial po 1 ml)}$$

$$C_2 = 10^7 \text{ celic/mL} = 10 \times 10^6 \text{ celic/mL}$$

$$C_1 = 1,55 \times 10^6 \text{ celic/ml}$$

$$V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

$$V_1 = 10 \times 10^6 \text{ celic/mL} \times 5 \text{ ml} / 1,55 \times 10^6 \text{ celic/ml}$$

$$V_1 = 10 \times 10^6 \text{ celic/mL} \times 5 \text{ ml} / 1,55 \times 10^6 \text{ celic/ml}$$

$$V_1 = 10 \times 5 \text{ ml} / 1,55$$

$$V_1 = 50 \text{ ml} / 1,55$$

$$V_1 = 32,3 \text{ ml}$$

Potrebujemo 32,3 ml začetne celične suspenzije.

VIRI

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149418/>
2. <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>, dostopano: 5.8.2024

DODATNO GRADIVO

Oglejte si naslednje videoposnetke, ki nazorno prikažejo delo s celičnimi kulturami – aseptično tehniko, odmrzovanje celic, štetje celic, subkultiviranje in zamrzovanje celic.

- Celične kulture – osnove

<https://www.youtube.com/watch?v=RpDke-Sadzo>

- Aseptična tehnika

https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk

- Odmrzovanje celic

<https://www.youtube.com/watch?v=4HxqQOHifkU&list=PLGlVFEwL2wDGAFJFFFi-LL1zu64BHvxy>

- Subkultiviranje

<https://www.youtube.com/watch?v=CMRKKI9XSDU>

- Štetje celic

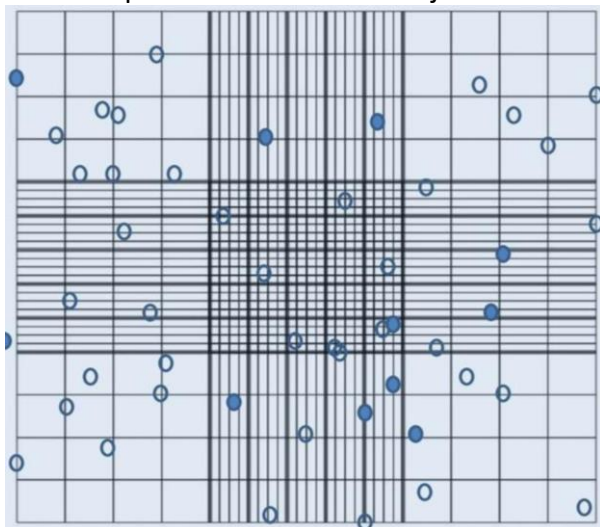
<https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>

- Zamrzovanje

<https://www.youtube.com/watch?v=tCNtKrxlZPs>

VPRAŠANJA

- Shematsko prikažite postopek odmrzovanja celic.
- Shematsko prikažite postopek subkultiviranja celic.
- Opišite postopek zamrzovanja celic.
- Izračunajte koncentracijo živih celic in viabilnost celic. 20 μ l celične suspenzije smo dodali 20 μ l tripanskega modrila in raztopino nanesli na hemocitometer. Pod mikroskopom smo videli naslednjo sliko.



- Ob ogledu video vsebin izpišite 5 pomembnih ugotovitev za vsak posnetek.

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji bomo spoznali delo s primarnimi suspenzijskimi celicami. Ogledali si bomo celični laboratorij. Nato bomo celice prešteli s hemocitometrom ter avtomatskim števcem Countess. Izračunali bomo živost in koncentracijo živih celic ter pripravili načrt za subkultiviranje in zamrzovanje celic.

1) Štetje celic s hemocitometrom ter avtomatskim števcem Countess

Iz suspenzije celic odvezamemo 10 μ l vzorca in mu dodamo 10 μ l tripanskega modrila. Tripansko modrilo vstopa samo v mrtve celice, ki se zato obarvajo modro, tako jih lahko ločimo od živih celic, ki ostanejo neobarvane. Nato 10 μ l mešanice s pipeto prenesemo pod krovnosteklo hemocitometra in preštujemo žive in mrtve celice.

Iz iste celične suspenzije nato ponovno odvezamemo 10 μ l vzorca, dodamo 10 μ l tripanskega modrila ter celice preštujemo še na avtomatskem števcu Countess.

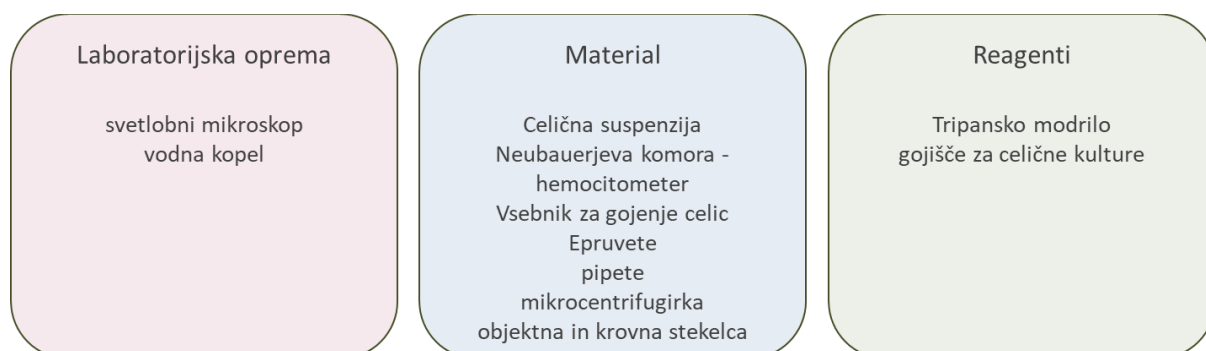
2) Subkultiviranje

Za optimalno rast in gojenje celične kulture, moramo celično gostoto v kulturi vzdrževati v koncentraciji med 2×10^5 in 1×10^6 živih celic/mL. Celično kulturo trenutno gojimo v vsebniku s površino rasti 75 cm², trenutni volumen suspenzije pa je 10 mL.

Glede na izračunano koncentracijo celic ter viabilnost po štetju celic pripravimo načrt za subkultiviranje celic. Celice želimo razredčiti na koncentracijo 2×10^5 živih celic/mL z volumnom celične suspenzije po redčenju 10 mL. Koliko svežega medija za gojenje moramo dodati?

3) Krioprezervacija - zamrzovanje celic

Celice želimo shraniti v 1 mL zamrzovalnega medija pri koncentraciji 10^7 celic/mL. Glede na število celic ter viabilnost v suspenziji, ki smo jih izračunali po štetju celic, izračunamo kakšen volumen začetne suspenzije moramo odvzeti. Kolikšen volumen začetne suspenzije potrebujemo, če želimo zamrzniti 4 krioviale?



Slika 8. Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, potrebni za izvedbo vaje.

POROČILO:

Materiali in aparature:

Rezultati:

1. Preštejte celice s **hemocitometrom** in **avtomatskim števcem** Countess.

2. Izračunajte **viabilnost in koncentracijo števila celic v suspenziji** (glejte navodila: Izvedba vaje – postopek):

- Viabilnost celic
- Faktor redčenja (R)
- Koncentracijo števila celic v suspenziji

3. Primerjajte koncentracijo celic, ki ste jo prešteli s hemocitometrom in izmerili z avtomatskim števcem Countess.

4. Pripravite načrt za subkultiviranje celične kulture.

Shematsko prikažite postopek subkultiviranja celic.

Izračunajte volumen medija in volumen začetne suspenzije celične kulture (glejte navodila: Izvedba vaje – postopek):

5. Pripravite načrt za krioprezervacijo celične kulture.

Shematsko prikažite postopek zamrzovanja celic.

Izračunajte volumen medija za zamrzovanje in volumen začetne suspenzije celične kulture (glejte navodila: Izvedba vaje – postopek):.

Opombe:
Pregledal/a:

IZOLACIJA DNK IZ POLNE KRVİ IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Izr. prof. dr. Janja Zupan, mag. farm.

UVOD

Na vaji se bomo spoznali princip izolacije molekule DNK z uporabo komercialno dostopnih reagenčnih kompletov, ki temeljijo na principu selektivne adsorpcije molekule DNK na silikatno membrano. Spoznali bomo osnovne aparature, ki jih potrebujemo za izolacijo DNK ter vrednotenje izoliranega vzorca DNK. Pri praktičnem delu se boste naučili postopati po navodilih proizvajalca reagenčnih kompletov za izolacijo DNK iz specifičnih tkivnih vzorcev ter ovrednotiti izolirano DNK spektrofotometrično ter s pomočjo agarozne elektroforeze. Izolirano DNK ustrezne kvalitete bomo uporabili za pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo. Na vaji bomo delali s polno vensko krvjo.

GENOMSKA DNK

Genomska DNK predstavlja celotno genetsko informacijo nekega organizma. Ker gre za velike molekule, so pri večini organizmov organizirane v komplekse DNK-protein, imenovane kromosomi. Le-ti se pri evkariontskih celicah nahajajo v jedru celic, pa tudi v mitohondrijih. Velikost, število kromosomov in narava genomske DNK se med organizmi razlikuje, genomska DNK za *Homo sapiens* na primer, ima $3,3 \times 10^9$ baznih parov na haploidni genom, kar predstavlja molekulsko maso $2,1 \times 10^{12}$ daltonov in je razdeljena v 46 kromosomov. Pri bakteriji *Escherichia coli* vsebuje DNK $4,7 \times 10^6$ baznih parov, kar predstavlja $3,1 \times 10^9$ daltonov in je shranjena le v 1 kromosomu, kar je značilno za bakterije.

Genomska DNK virusov je relativno majhna in je lahko eno- ali dvo-verižna, linearna ali krožna. Vsi drugi organizmi imajo genome z dvovijačno DNK. Genomska DNK vsebuje gene, ki kodirajo protein ali RNA. Poleg kodirnih zaporedij pa gen obsega tudi regulatorne elemente, ki nadzorujejo izražanje genov, ter nekodirajoče regije, imenovane introni. Kodirajoča DNK predstavlja le majhen del evkariontske genomske DNK, večina je nekodirajoča.

Število genov se med organizmi zelo razlikuje. Število kopij vsakega genetskega lokusa, prisotnega v celici, t.i. ploidija, se prav tako razlikuje med organizmi. Somatske (telesne) celice organizmov, ki se razmnožujejo spolno, so običajno diploidne, kar pomeni, da imajo dva niza homolognih kromosomov ter s tem dve kopiji vsakega genetskega lokusa. Zarodne (reproduktivne) celice pa so haploidne, kar pomeni, da imajo samo eno kopijo vsakega kromosoma.

NAČINI IZOLACIJE DNK

Genomsko DNK lahko izoliramo iz različnih celic različnih tkiv in organizmov. Sam postopek izolacije je pomemben za čistost izolirane DNK, ki je pomembna za njeno nadaljnjo uporabo. Pri postopku izolacije DNK je pomembno, da popolnoma razgradimo in liziramo celične stene ter plazemske membrane celic in organelov, da sprostimo DNK iz teh struktur in povečamo učinkovitost izolacije DNK. V glavnem ločimo tri načine izolacije DNK:

- anionsko-izmenjevalna kromatografija
- selektivna adsorpcija DNK na silikatno membrano
- vezava DNK na magnetne silikatne delce



Slika 1. Laboratorijska oprema in material, ki ga potrebujemo pri izolaciji DNK iz polne venske krvi. Slika je narejena z uporabo BioRender. Vir: [BioRender.com](https://www.biorender.com); dostopano: 22.8.2024

IZOLACIJA DNK Z UPORABO REAGENČNEGA KOMPLETA

Na voljo so številni komercialno dostopni reagenčni kompleti različnih proizvajalcev za izolacijo DNK iz različnih vzorcev. Na teh vajah boste uporabili reagenčni komplet QIAamp® DNK Mini Kit proizvajalca Qiagen za izolacijo genomske DNK iz vzorca polne venske krvi. Spodnja shema prikazuje osnovne korake pri izolaciji DNK z uporabo tega reagenčnega kompleta.



Slika 2. Shema korakov izolacije DNK pri uporabi reagenčnega kompleta Qiagen. Slika je prirejena po <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/DNK-rna-purification/DNK-purification/genomic-DNK/qiaamp-DNK-kits/>

Navodila za ta reagenčni komplet so dostopna tu:

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/DNK-rna-purification/DNK-purification/genomic-DNK/qiaamp-DNK-kits>

SPEKTROFOTOMETRIČNA ANALIZA IZOLIRANE DNK

Spektrofotometrično določimo tako kvantiteto kot tudi kvaliteto, torej čistost izolirane DNK. Molekula DNK, natančneje obroči purinskih in pirimidinskih baz v njeni strukturi absorbirajo svetlobo valovne dolžine 260nm. Količina absorbirane svetlobe je sorazmerna koncentraciji DNK v raztopini. Izmerjeno absorbanco pretvorimo v koncentracijo v ng/μL dvovijačne DNK z uporabo ustreznega standarda ali z upoštevanjem, da ima DNK s koncentracijo 50 ng/μL vrednost absorbanco 1 pri 260 nm. Uporabimo lahko klasični spektrofotometer, kjer nastavimo želeno valovno dolžino ali izberemo program analize DNK, kjer je že nastavljena ustrezna valovna dolžina. Vedno več pa se za analizo nukleinskih uporabljajo t.i. mikrovolumski spektrofotometri, kjer lahko ovrednotimo DNK iz zelo majhnega volumna, npr. 1 do 2 μL ter na ta način prihranimo dragoceni vzorec za nadaljnje aplikacije. Poleg absorbanco pri 260nm, preverimo tudi razmerje absorbanco pri 260nm in 280nm, kjer absorbirajo fenolni obroči, ki izvirajo pretežno iz proteinov. Čista DNK ima razmerje A260/A280 1,8–2,0 v 10 mM pufri Tris HCl, pH 8,5.



Spektrofotometer s kiveto

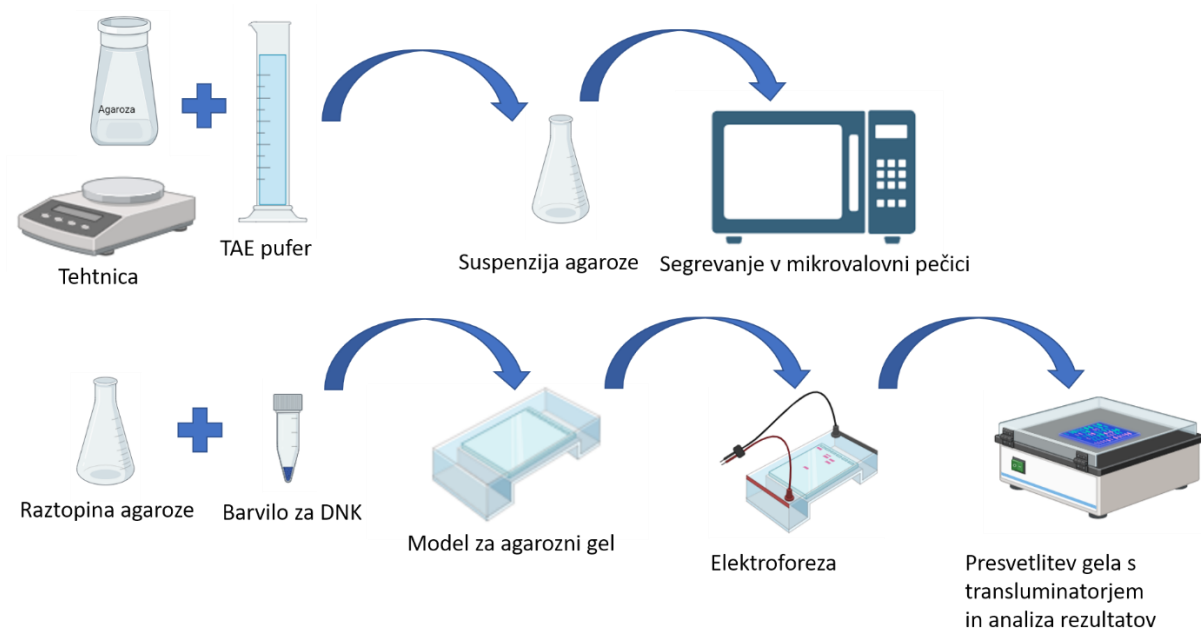


Mikrovolumski spektrofotometer

Slika 3. Spektrofotometri za vrednotenje izolirane DNK. Slika je narejena z uporabo BioRender. Vir: [BioRender.com](https://www.biorender.com); dostopano: 22.8.2024

ELEKTROFOREZA IZOLIRANE DNK

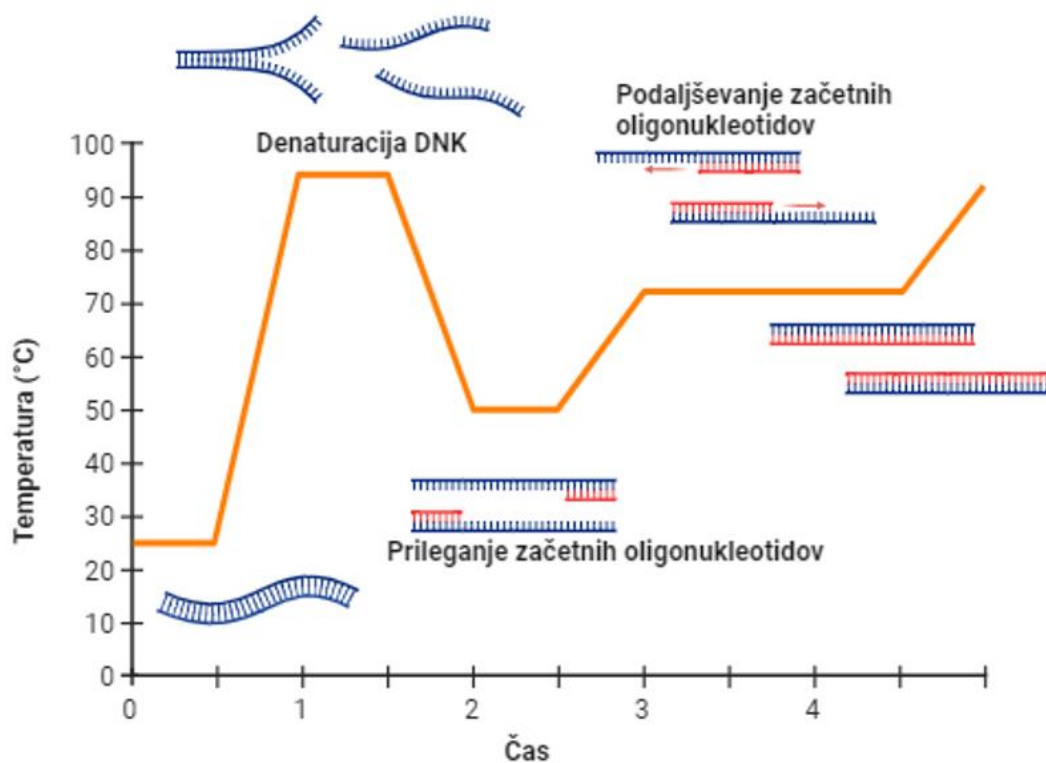
Izolirano DNK preverimo s pomočjo agarozne elektroforeze. Elektroforeza je separacijska metoda, ki nam poda informacijo o velikosti izolirane DNK. Za primerjavo velikosti na agarozni gel vedno nanesemo označevalec velikosti ali marker. Le-ta predstavlja niz fragmentov DNK z znano velikostjo, zato lahko ocenimo velikost našega vzorca DNK.



Slika 4. Shematski prikaz priprave in izvedbe agarozne elektroforeze za vrednotenje izolirane DNK. Slika je narejena z uporabo BioRender. Vir: BioRender.com; dostopano: 22.8.2024

VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) je ena najpogostejše uporabljenih metod v molekularni biologiji. Gre za metodo pomnoževanja tarčne DNK ali njenega odseka v pogojih *in vitro*, s katerim je mogoče v kratkem času pomnožiti eno samo molekulo DNK v milijone kopij. Pomnoževanje se doseže s serijo treh korakov: (1) denaturacija, pri kateri se dvovijačne DNK segrevajo do razcepitve v enovijačnice; (2) prileganje začetnih oligonukleotidov, to so kratke molekule DNK, ki se vežejo odsek DNK, ki ga želimo pomnožiti; in (3) podaljševanje, kjer encim DNK polimeraza podaljšuje 3' konec vsakega začetnega oligonukleotida vzdolž enovijačne matrice. Ti koraki se ponovijo (»ciklirajo») 25–35-krat, pri čemer se eksponentno proizvedejo natančne kopije matrične DNK. Metodo PCR je v prakso uvedel Kary Mullis leta 1983, ki je za to dosežek prejel tudi Nobelovo nagrado za kemijo. Od takrat je PCR postal nepogrešljivi del molekularne biologije, zlasti na področju diagnostike bolezni ter forenzičnih preiskav.



Slika 5. Shematski prikaz poteka reakcije PCR. Slika je narejena z uporabo BioRender. Vir: [BioRender.com](https://www.biorender.com/); dostopano: 22.8.2024

VIRI

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Structure and Function of DNK. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/> dostopano: 22.8.2024
- <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis> dostopano: 22.8.2024
- Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/> dostopano: 22.8.2024

DODATNO GRADIVO

Oglejte si naslednje videoposnetke, ki nazorno prikažejo sestavo in organizacijo molekule DNK, postopek izolacije DNK ter izvedbo elektroforezne ločbe izolirane DNK.

- Molekula DNK – osnove

<https://www.britannica.com/video/22236/DNK-molecule-structure-deoxyribose-sugar-molecules-Pairs>

- Izolacija DNK

https://youtu.be/tcPgDR9_t64?si=k1cgzX1GkPv4MeKT

- Elektroforeza DNK

<https://youtu.be/TIZRGt3YAug?si=W3OC3FUSEAyLxCe9>

VPRAŠANJA

1. Iz katerih vzorcev lahko izoliramo DNK? Navedite vsaj 3.
2. Opišite princip izolacije DNK s kolonami.
3. Kakšna je vloga proteinaze K in etanola pri postopku izolacije DNK?
4. Na kakšen način preverjamo kvaliteto DNK?

5. Raziskovalka je za namen PCR izolirala DNK iz 200 μ L polne krvi. Pri tem je uporabila postopek izolacije s kolonami. V zadnjem koraku izolacije je dodala 200 μ L elucijskega pufra in tej raztopini pomerila absorbance pri različnih valovnih dolžinah.

Vrednosti so bile:

$A_{260}=0,696$

$A_{280}=0,575$

$A_{230}=0,7$.

- Izračunajte koncentracijo DNK v končni raztopini, če je pri koncentraciji 50 μ g/ml $A_{260}=1$.
- Ocenite kvaliteto DNK.
- Ali bi to DNK lahko uporabili za PCR?

6. Kakšne velikosti DNK lahko ločimo z uporabo agarozne elektroforeze?

7. V kateri smeri potuje DNK tekom elektroforeze?

8. Od katerih dejavnikov je odvisna ločba DNK na agaroznem gelu?

9. Na kakšen način vizualiziramo DNK pri oceni integritete izolirane DNK s postopkom gelske elektroforeze?

10. Opišite princip PCR (stopnje in približno T).

11. Kakšna je vloga Mg^{2+} ionov pri PCR?

12. Zakaj pri PCR po denaturaciji DNK (95 °C) znižamo temperaturo na 40-60 °C, nato pa povečamo na 72 °C?

13. Obkrožite napačno trditev:

a) Razmerje A260/A230 nam služi za oceno kontaminacije z reagenti uporabljenimi pri izolaciji.

b) Razmerje A260/A280 nam služi za oceno kontaminacije vzorca s proteini.

c) Razmerje A260/A280 za čisto raztopino DNK je $\leq 1,8$.

d) Kvaliteto DNK ocenimo z elektroforezo na 2% agaroznem gelu

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji bomo spoznali postopek izolacije DNK iz vzorca polne venske krvi. Uporabili bomo enega od številnih komercialno dostopnih reagenčnih kompletov in sledili navodilom proizvajalca. Izolirano DNK bomo vrednotili spektrofotometrično ter z elektroforezo. Vzorce DNK ustrezne kvalitete bomo uporabili za pripravo reakcijske zmesi za pomnoževanje določenega odseka DNK z metodo verižno reakcijo s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR)

1) Priprava vzorcev in reagentov za izolacijo DNK

- a. Pripravimo vodno kopel oziroma termo blok (nastavimo temperaturo na 70°C).
- b. Pufrom dodamo navedeno količino absolutnega etanola, liofilizirani proteazi dodamo priloženo topilo.
- c. Vsem reagentom omogočimo, da se segrejejo na sobno temperaturo.

2) Priprava 2% agaroznega gela za elektroforezo

- a. V erlenmajerico natehtamo 1,5 g agaroze.
- b. Dodamo 75 mL pufra TAE, postavimo na tehtnico in stariramo.
- c. Pokrijemo z urnim steklom in v mikrovalovni pečici segrevamo toliko časa, da dobimo prozorno raztopino.
- d. Pustimo 5 minut, da se raztopina nekoliko ohladi; med tem pripravimo model za gel. Na model vstavimo nosilec, t.i. glavniček, ki bo v gelu ustvaril luknjice za nanos vzorcev.
- e. Ohlajeni raztopini agaroze dodamo 4 µL barvila za vizualizacijo DNK in dobro premešamo in prelijemo v model.
- f. Po 30 minutah vzamemo gel iz modela.

3) Izolacija DNK iz vzorca polne krvi z uporabo reagenčnega kompleta

- a. V epruveto, ki vsebuje 200 μ L polne krvi, dodamo 200 μ L pufra Binding Buffer.
- b. V isto epruveto dodamo 40 μ L proteinaze K in premešamo na vibracijskem mešalniku.
- c. Inkubiramo v vodni kopeli/termo bloku 10 minut pri 70°C.
- d. Dodamo 100 μ L izopropanola. Premešamo na vibracijskem mešalniku (15 s).
- e. Vsebino previdno prenesemo v kolono, ki smo jo vstavili v zbirno epruveto.
- f. Centrifugiramo 1 minuto pri 8000 g. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
- g. V kolono odmerimo 500 μ L pufra za odstranitev inhibitorjev in centrifugiramo 1 minuto pri 8000 g. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
- h. V kolono odmerimo 500 μ L pufra za spiranje in centrifugiramo 1 minuto pri 8000.
- i. Kolono nato prenesemo v novo zbirno epruveto, filtrat zavržemo.
- j. V kolono ponovno odmerimo 500 μ L pufra za spiranje in centrifugiramo 1 minuto pri 8000.
- k. Filtrat odlijemo, kolono ponovno vstavimo v zbirno epruveto in centrifugiramo 10 sekund pri 14000 g.
- l. Kolono nato prenesemo v 1,5 mL epruveto, filtrat zavržemo.
- m. V kolono odmerimo 200 μ L elucijskega pufra ali prečiščene vode. Inkubiramo pri sobni temperaturi 1 minuto, nato centrifugiramo 1 minuto pri 8000 g. Kolono zavržemo, izolat DNK je v filtratu.

4) Spektrofotometrična analiza izolirane DNK

- a. Uporabimo kivete iz kvarčnega materiala, ker merimo pri valovnih dolžinah v UV območju. Valovno dolžino nastavimo na 260nm.
- b. Najprej izmerimo slepo, ki je enaka raztopini, ki smo jo uporabili za elucijo DNK iz kolona v zadnji fazi izolacije.
- c. Izmerimo vzorec izolirane DNK in izračunamo količino izolirane DNK.
- d. Čistoto izolirane DNK ocenimo z meritvijo razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm.

5) Elektroforeza izolirane DNK

- Gel prenesemo v elektroforezno kadičko z TAE pufrom.
- Na gel nanesemo 2 μL vzorca izolirane DNK in 2 μL nanašalnega pufru z bromfenol modrim.
- Na prvo luknjico nanesemo označevalec velikosti z definiranim številom in velikostjo fragmentov na podlagi katerega bomo ocenili velikost našega vzorca.
- Elektroforeza poteka v 1x TAE pufru 30 minut pri stalni napetosti 100 V.
- Po končani elektroforezi gel presvetlimo z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in ga fotografiramo ter analiziramo velikost našega vzorca DNK.

6) Verižna reakcija s polimerazo (PCR) z vzorcem izolirane DNK

- V 1,5 mL epice napipetiramo reagente po spodnji shemi:

Reagent	Volumen (μL)
Ultra čista voda	13,9
Pufer za PCR	2,5
Raztopina dNTP	2,5
Raztopina MgCl_2	2,0
Začetni oligonukleotid F	1,0
Začetni oligonukleotid R	1,0
Encim DNK polimeraza	0,1

- Tej reakcijski zmesi dodamo 2 μL vzorca izolirane DNK.
- Epico z vzorcem vstavimo v ciklični pomnoževalnik in nastavimo spodnji program:

Temperatura (°C)	čas	Število ciklov
95	12 min	1
94	30 s	36
56	30 s	
72	1 min	
4	> 6 min	1

- Po končani reakciji PCR bomo vzorce shranili in uporabili na naslednji vaji za določitev prisotnosti mutacije oz. spremembe nukleotidnega zaporedja.



Slika 6. Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, potrebni za izvedbo vaje.

POROČILO:

Materiali in aparature:

Rezultati:

6. Spektrofotometrično vrednotenje izolirane DNK.

7. Analiza izolirane DNK z agarozno elektroforezo. Dopolnite spodnjo shemo agaroznega gela z oznakami vzorcev ter rezultati elektroforezne ločbe. Komentirajte rezultat elektroforeze vašega vzorca DNK.



Opombe:

Pregledal/a:

ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV

Izr. prof. dr. Janja Zupan, mag. farm.

UVOD

Na vaji bomo spoznali enostavno metodo za odkrivanje znanih sprememb nukleotidnega zaporedja DNA t.i. analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. *Restriction Fragments Length Polymorphism*, RFLP). Uporabna je za diagnozo prirojenih bolezni in v sodni medicini, čeprav so jo dandanes večinoma že izpodrinile napredne metode sekvenciranja. Pri praktičnem delu bomo kot biološki vzorec uporabili produkt reakcije PCR iz predhodne vaje. Naučili pa se bomo tudi načrtovati in odčitavati rezultate te metod RFLP za odkrivanje drugih točkastih sprememb.

SPREMEMBE V GENIH

Spremembe v genih delimo na mutacije in polimorfizme.

- **Mutacija** je sprememba gena, ki prepreči nastanek proteina, ki ga ta gen kodira, ali povzroči nastanek spremenjenega ali nefunkcionalnega proteina. Rezultat je značilna klinična slika, npr. hemofilija zaradi mutacije v genu za faktor strjevanja krvi VIII, cistična fibroza zaradi mutacije v genu *CFTR*.
- **Polimorfizem** (angl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) je prav tako genetska sprememba, vendar običajno ni povezana z značilno klinično sliko in lahko pomeni smo višjo nagnjenost za pojav določene bolezni, npr. osteoporoze.

Polimorfizem se pojavlja z višjo frekvenco (višjo od 1 %) v populaciji kot mutacija.

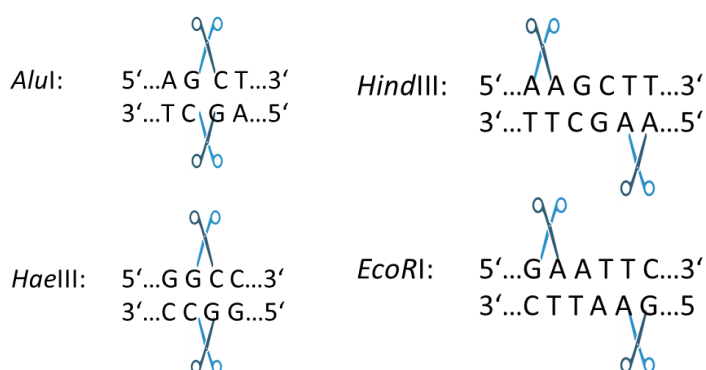
RESTRIKCIJSKE ENDONUKLEAZE

Restrikcijske endonukleaze (restriktaze, molekularne škarje) so bakterijski encimi, ki cepijo dvovijačno DNA na točno določenem mestu. Ti encimi prepoznajo 4-8 bp dolga, običajno palindromna zaporedja v dvovijačni DNA, kamor se vežejo in razrežejo DNA na dva dela (Slika 1). Palindromno zaporedje pomeni, da enako zaporedje v smeri 5'→3' na obeh verigah DNA. Restriktaze na ta način varujejo bakterije, saj v bakterijah razgradijo tujo DNA, npr. virusno, bakterijska DNA je zaščitena pred cepitvijo z modifikacijo baz (metilacijo) v prepoznavnem mestu.



Slika 1. Restrikcija dvovijačne DNA na dva fragmenta z restriksijsko endonukleazo.

Imena restriktaz (Smith & Nathans 1973) se začnejo s poševno tričrkovno kratico, ki nam pove iz katerega bakterijskega seva je bil encim izoliran. Temu sledi rimska številka, ki označuje kronologijo identifikacije. Na primer, *HindIII* je bil tretji od štirih encimov izoliranih iz *Haemophilus influenza* serotipa d. Aktivnost restriksijskih nukleaz se meri v U/ μ L. 1 enota je količina encima, ki v 50 μ L zmesi pri optimalnih pogojih (T, pufer, dodatki) v 60 min popolnoma razcepi 1 g specifičnega DNA substrata. Primer restriksijskih endonukleaz ter njihovega delovanja je prikazan na sliki 2.



Slika 2. Pri restrikciji DNA z *AluI* in *HaeIII* dobimo tope konce, pri restrikciji z *HindIII* in *EcoRI* pa lepljive konce fragmentov.

Izoshizomere so encimi iz različnih bakterij z enakim prepoznavnim mestom, ki pa imajo lahko različno cepitveno mesto kot je prikazano na sliki 3.



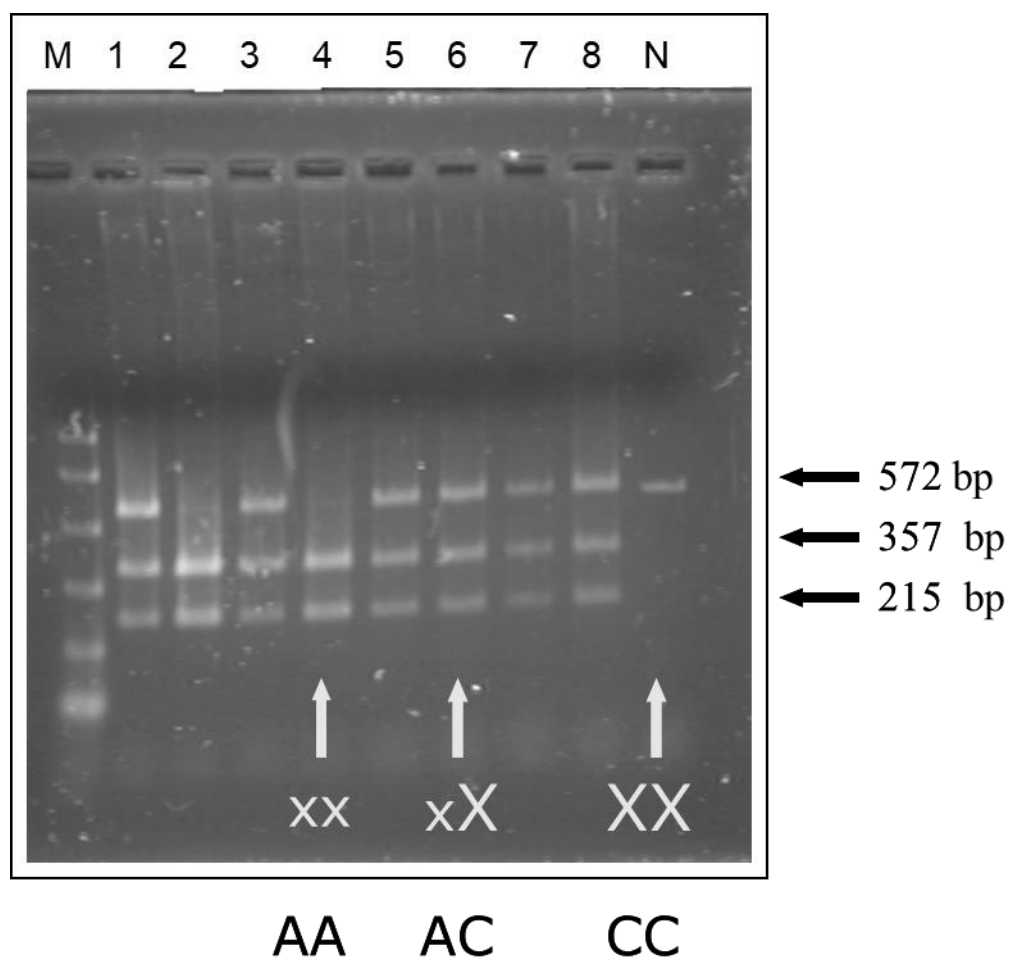
Slika 3. Encima *SmaI* in *XmaI* sta izoshizomeri.

ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (RFLP)

Analiza polimorfizmov dolžin restriksijskih fragmentov ali krajše RFLP temelji na delovanju restriksijskih encimov, ki prepoznajo in cepijo specifično zaporedje DNA. Prisotnost oziroma odsotnost spremembe ugotovimo na osnovi elektroforezne ločbe fragmentov, ki nastanejo pri inkubaciji vzorcev DNA s specifično restriksijsko endonukleazo.

Vzemimo primer, kjer z metodo RFLP ugotavljamo prisotnost polimorfizma v genu XYZ. V ta namen z metodo PCR pomnožimo 572 bp dolg odsek tega gena, znotraj katerega se nahaja sprememba nukleotida C>A, ki jo želimo analizirati. Normalno je na tem mestu prisoten C, sprememba pa spremeni nukleotid C v A. Vzorec PCR inkubiramo v reakcijski zmesi z restriksijsko endonukleazo *Xba*I, ki prepozna in cepi preučevan produkt PCR, če je prisoten nukleotid A. Pri tem nastaneta dva krajša fragmenta, 357 bp in 215 bp.

Na sliki 5 je prikazana fotografija agaroznega gela, kamor so bili nanešeni vzorci po inkubaciji z restriksijsko endonukleazo *Xba*I.



Slika 4. Fotografija agaroznega gela po presvetlitvi z svetlobo 302 nm.

Odgovorite na spodnja vprašanja:

1. Kaj predstavlja vzorec nanešen na prvo mesto na gelu (skrajno levo) označen kot M?
2. Kaj predstavlja vzorec nanešen na zadnje mesto na gelu (skrajno desno) označen kot N?
3. Naštete vse možne genotipe označene na oba načina (s črko nukleotida in s prvo črko encima).
4. Določite genotip na oba načina označevanja vsem 8 vzorcem nanešenim na gel.

DODATNO GRADIVO

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrfp/>

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp-analysis.html>

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji bomo z metodo RFLP ugotavljali prisotnost polimorfizma v genu za osteoprotegerin (*OPG*). Polimorfizem A>C bomo določili v 323 bp dolgem odseku, ki ste ga v prejšnji vaji namnožili z reakcijo PCR. Uporabili bomo restrikcijsko endonukleazo *Bcl*I, ki prepozna in cepi zaporedje: 5' T ~~AG~~ GATCA 3'. Pri tem dobimo dva krajša fragmenta DNA, in sicer 69 bp in 254 bp. Če je namesto C prisoten A, torej je zaporedje sledeče: 5' TGATAA 3', encim *Bcl*I tega odseka ne prepozna in ohranimo izhodiščen 323 bp dolg odsek DNA.

1) Priprava zmesi za restrikcijo in inkubacija

Dopolnite spodnjo tabelo z volumni glede na število vzorcev, ki jih boste analizirali v skupini. Upoštevajte tudi 10% pribitek zaradi izgub pri pipetiranju.

Nato posamezne komponente reakcijske zmesi napipetirajte v 1,5 mL epico.

	zmes za restrikcijo z <i>Bcl</i> I	
	V (μL)	V (μL)
Število vzorcev	1	
Bidestilirana voda	8,37	
<i>Bcl</i> I (15 U/μL)	0,13	
NEBuffer 3 (10x)	1,5	
Vzorec PCR	5,0	

Na ta način boste pripravili reakcijsko zmes za vse preiskovane vzorce. 10 μL reakcijske zmesi dodate svojemu vzorcu PCR v 0,5 mL epico. Vzorce inkubiramo na vodni kopeli 60 min pri 50 °C.

2) Priprava 3% (m/V) agaroznega gela

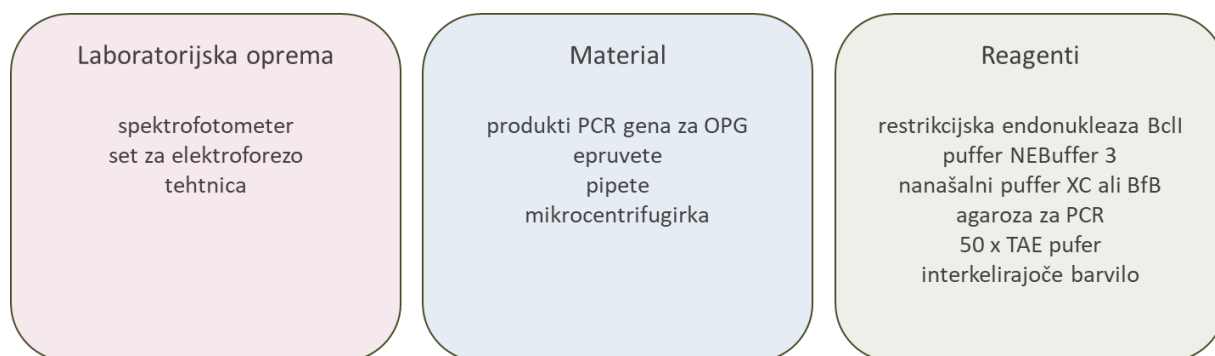
Sestavimo model za gel in vstavimo glavničke za 15 vzorcev. Gel pripravimo tako, da v erlenmajerico natehtamo 2,25 g agaroze, dolijemo 75 mL 1x TAE pufru in ponovno stehtamo. Pokrijemo z urnim steklom in pustimo 5 minut. Nato erlenmajerico postavimo v mikrovalovno pečico in segrevamo toliko časa, da dobimo prozorno raztopino. Počakamo 5 minut, dodamo 6 μL barvila za detekcijo dvovijačne DNA (SyberGreen®, SyberSafe® idr.), premešamo in vlijemo gel v pripravljen model. Po 30 minutah vzamemo gel iz modela.

3) Elektroforezna ločba

Po končani inkubaciji restrikcijske zmesi dodamo v vsako epico 2,5 μ L nanašalnega pufra in ločimo fragmente z elektroforezo. Elektroforeza bo potekala 45 min v 1x TAE pufu in pri stalni napetosti 90 V. Poleg vzorcev naneseemo na gel tudi označevalec velikosti fragmentov (2,5 μ L) in nerestringiran produkt PCR (5 μ L) kot negativno kontrolo.

4) Odčitavanje rezultatov

Po končani elektroforezi gele presvetlimo z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in gel fotografiramo.



Slika 5. Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, potrebni za izvedbo vaje.

POROČILO:

Materiali in aparature:

Rezultati:

8. Slika gela in oznake lis.



9. Komentár rezultatov.

Opombe:

Pregledal: