

S1 KOZ 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: S1 KOZ 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

Recenzent: 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

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

COBISS.SI-ID 226433027

ISBN 978-961-7231-02-1 (PDF)

VSEBINA

UVOD V LABORATORIJSKE VAJE	1
OSNOVE MIKROSKOPIRANJA IN CELIČNA ZGRADBA	11
CELIČNI CIKEL	27
CELIČNE KULTURE	38
IZOLACIJA DNK IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	51
ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV	66
BIOINFORMATIKA IN VIRTUALNI CELIČNI PROCESI	75

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

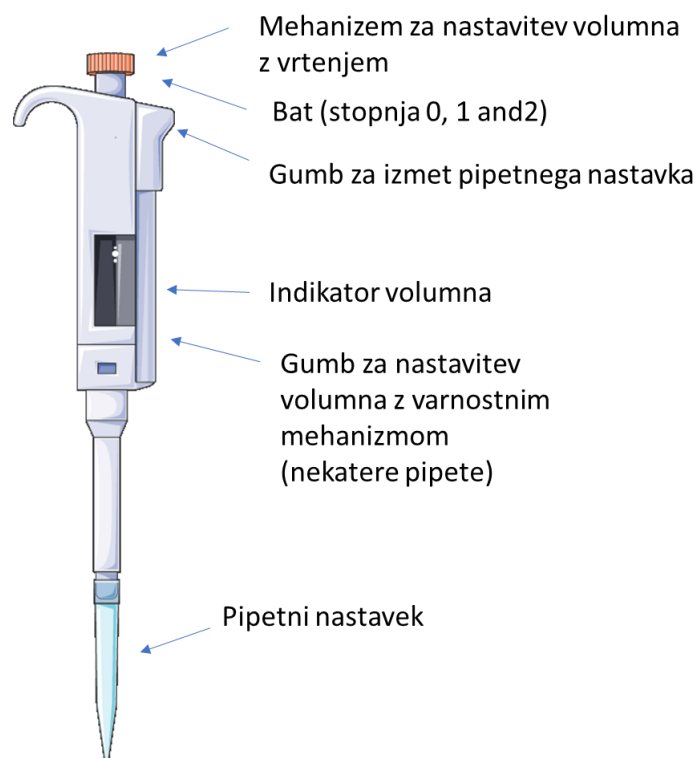
PIPETE

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

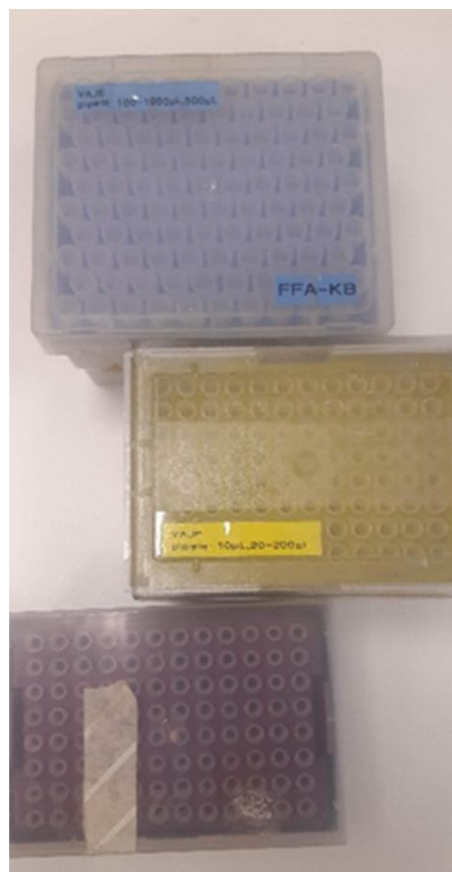
Na pipeti nastavimo ustrezen volumen, kar storimo s premikanjem gumba za nastavitev volumna (Slika 2). Gumb vrtimo dokler se v okencu ne pojavi želen volumen. Pri tem pazimo, da nikoli ne nastavimo volumna izven merilnega območja pipete, saj v tem primeru odmerjeni volumen ne bo pravilen, lahko pa tudi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

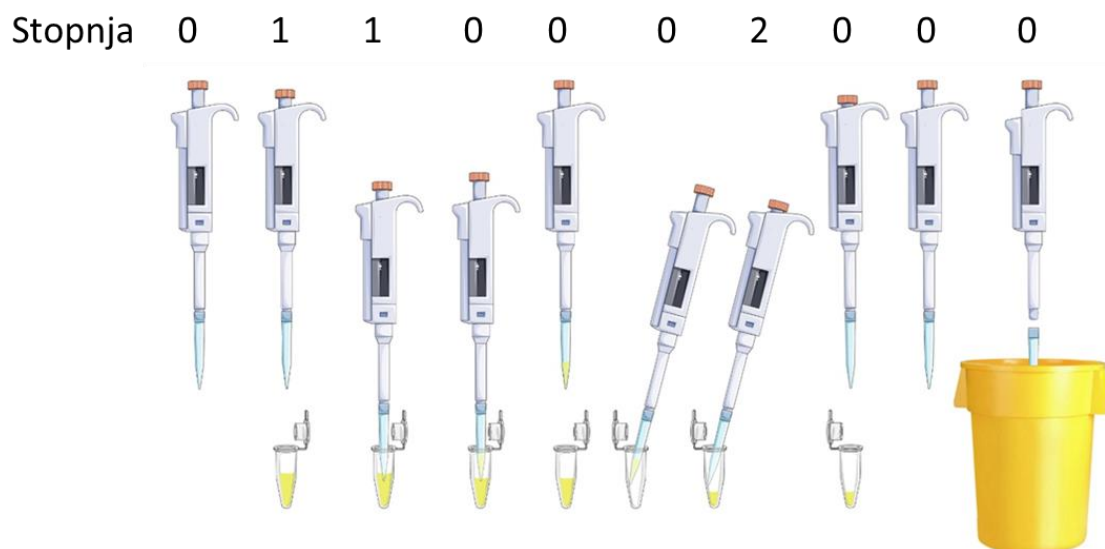


Slika 3. Stojalo za pipete z različnimi volumni in škatle v katerih hranimo nastavke za pipete.

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

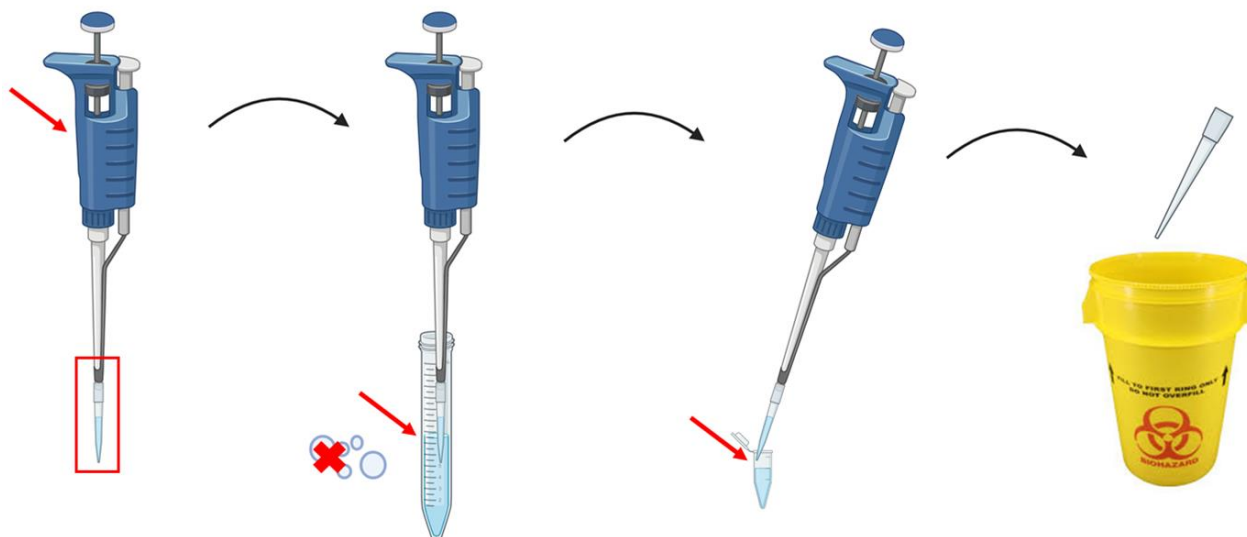
tekočine. Po končanem pipetiranju zavržemo nastavek v koš za biološke odpadke s pritiskom na gumb za odstranitev nastavka.



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:

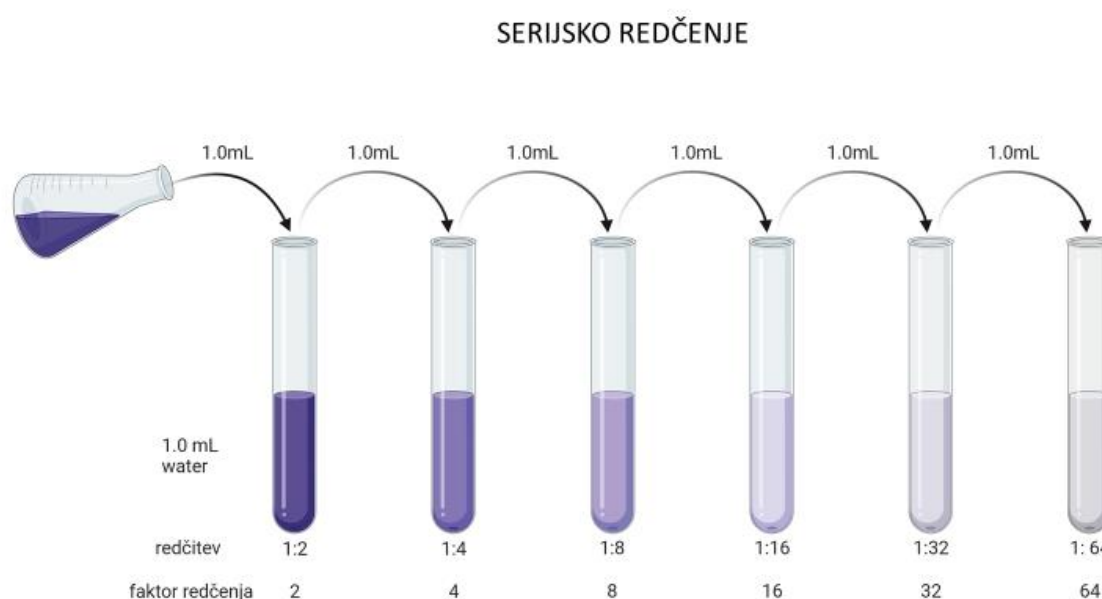
1. Gumb na pipeti nastavimo na stopnjo 2, potopimo v raztopino in počasi spustimo do nevtralnega položaja 0, da zajamemo volumen tekočine.
2. Nastavek pipete naslonimo pod kotom 20°- 45° na steno vsebnika, v katerega bomo pipetirali.
3. Gumb spustimo do položaja 1 in s tem odmerimo volumen tekočine. 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

- Naštete 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.

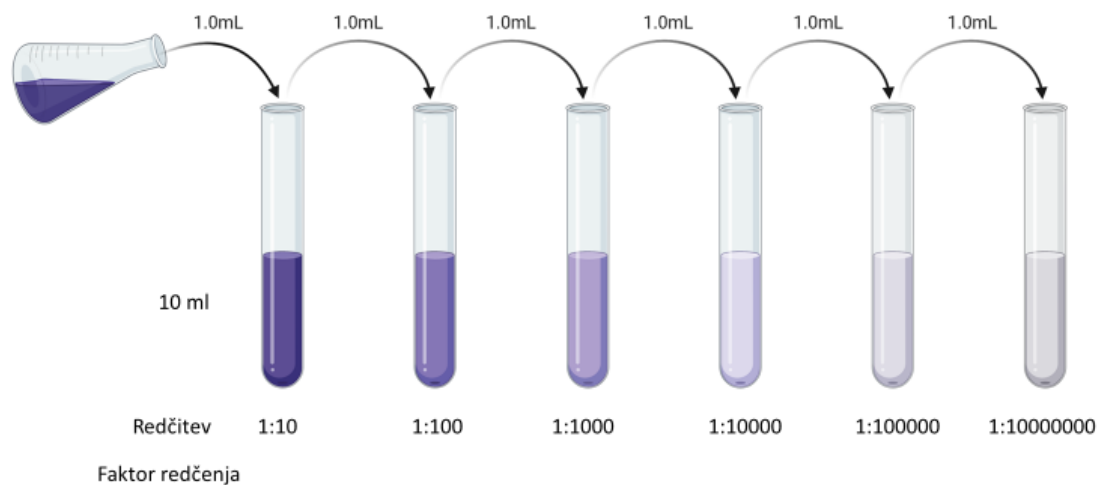
Izbor pipet			
		_____	9,4 µL
1	0,1 µL – 3 µL	_____	21,4 µL
2	0,5 µL – 10 µL	_____	1,856 µL
3	2 µL – 20 µL	_____	62 µL
4	10 µL – 100 µL	_____	155 µL
5	20 µL – 200 µL	_____	14 µL
6	100 µL – 1000 µL	_____	1600 µL
7	1 mL – 5 mL	_____	0,3 mL

- 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

OSNOVE MIKROSKOPIRANJA IN CELIČNA ZGRADBA

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

UVOD

Na vaji se bomo seznanili z osnovami mikroskopiranja, enim najpomembnejših orodij v bioloških raziskavah. Spoznali bomo pripravo mikroskopskih preparatov in delovanje svetlobnega mikroskopa ter opazovanje različne vrste celic s pomočjo mikroskopa. V okviru vaje bomo za namen mikroskopiranja pripravili preparate bakterijskih kultur, kvasovk, rastlinskih celic in celic ustne sluznice, kar bo omogočilo razumevanje osnovnih razlik v zgradbi prokariontskih in različnih evkariontskih celic.

CELICA

Celica je osnovna gradbena in funkcionalna enota vseh živih organizmov. Celice so najmanjši deli organizmov, ki jih obravnavamo kot žive, zato jim pogosto pravimo tudi gradbeni elementi življenja. Vse življenjske funkcije, kot so metabolizem, rast in razmnoževanje, potekajo na ravni celice. Celice so lahko zelo raznolike, vendar jih delimo na dve glavni skupini: prokariontske in evkariontske celice.

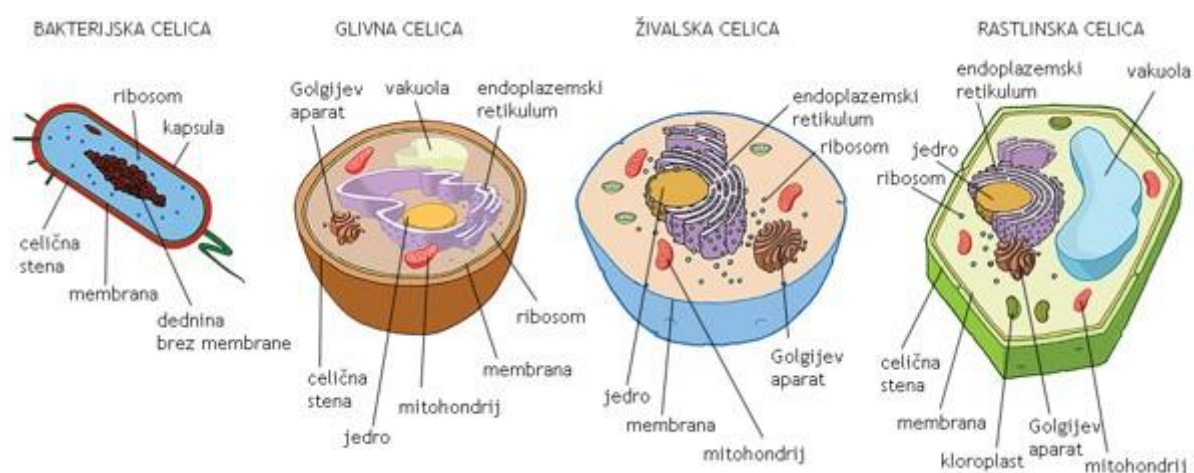
Prokariontska celica

Prokarionti (*Prokaryota*) so skupina enoceličnih organizmov z značilno celično zgradbo, ki je preprostejša od evkariontske celice. Filogenetsko prokarionte delimo v dve veliki skupini: bakterije (*Bacteria*) in arheje (*Archaea*). Genetski material prokariontskih celic se nahaja v citoplazmi in ni obdan z jedrno membrano, ki je ena glavnih značilnosti evkariontskih celic, kot so živalske in rastlinske celice. Prokarionska celica nima celičnih organelov in je precej manjša od evkariontske celice. Tipična bakterijska celica je velika približno 1 μm , medtem ko so evkariontske celice velike od 10 do 100 μm . Bakterije in arheje imajo podobno celično zgradbo, vendar si med seboj niso nič bolj sorodne, kot so evkariontom. Bakterije imajo tako kot rastline in glive praviloma celično steno, a je ta zgrajena drugače (tj. iz peptidoglikana). Številne se premikajo z bičkom, ki pa se po strukturi razlikuje od bičkov drugih skupin (slika 1). Prokarionti so najbolj številčna oblika življenja na Zemlji, tako v smislu biomase kot v številu vrst. V morju predstavljajo kar 90 % skupne teže vseh organizmov, v enem samem gramu plodne zemlje pa je lahko več kot 10 milijard bakterijskih celic.

Evkariontska celica

Evkarionti (*Eukaryota*) so organizmi, ki jih gradijo evkariontske celice. Življenje evkariontov in prokariontov temelji na istih molekularno bioloških osnovah, in sicer v obeh primerih je osnovna enota življenja celica, ki jo sestavlja enaka skupina organskih makromolekul (proteini, sladkorji, lipidi in nukleinske kisline) in v njej potekajo podobni osnovni biokemični procesi.

Evkariontska celica je večja in kompleksnejša od prokariontske in lahko gradi tudi večcelične organizme, kot so glive, živali in rastline, ki se v celični zgradbi nekoliko razlikujejo (slika 1). Rastlinska celica ima okrog membrane dodaten zaščitni sloj, tako imenovano celično steno iz celuloze, glivna celica pa iz hitina. V notranjosti evkariontske celice ali citosolu so številni celični organeli. To so specializirane strukture obdane z lastno membrano, ki opravljajo pomembne celične funkcije. Večina organelov je skupna tako rastlinski, živalski kot tudi glivni celici. Rastlinske celice pa imajo dva dodatna organela, ki jih živalske nimajo, in sicer kloroplaste in velike vakuole. Poleg organelov se v citoplazmi prosto nahajajo številni encimi in druge beljakovine, ki so udeleženi v celičnih procesih, kot sta sinteza in razgradnja beljakovin.

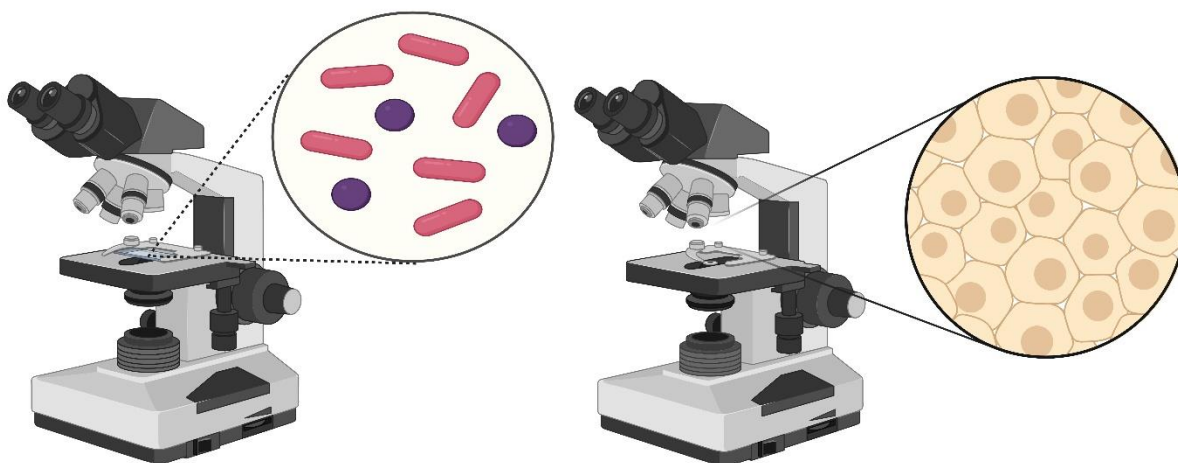


Slika 1: Razvrščanje organizmov na osnovi razlik v zgradbi celice. Povzeto po <https://eucbeniki.sio.si>.

MIKROSKOPIRANJE

Celična biologija je veda, ki raziskuje ultrastrukturno in molekulsko zgradbo ter delovanje celic. Celice so v povprečju velike med 10 in 20 μm , kar je petina velikosti najmanjšega delca, ki ga še lahko vidimo s prostim očesom. Celice pa niso samo zelo majhne, temveč tudi brezbarvne in prosojne, zato je njihovo opazovanje odvisno od razvoja mikroskopov in razvoja različnih tehnik za pripravo mikroskopskih preparatov.

Mikroskopiranje je tehnika priprave in opazovanja mikroskopskih predmetov z mikroskopom. Mikroskop je naprava za opazovanje objektov, ki so premajhni, da bi jih lahko videli s prostim očesom. Je optični instrument, sestavljen iz sistema leč, ki so v isti optični osi nameščene v primerni medsebojni razdalji in nam omogočajo, da opazujemo drobne predmete pod večjim zornim kotom, kot z golim očesom (slika 2).

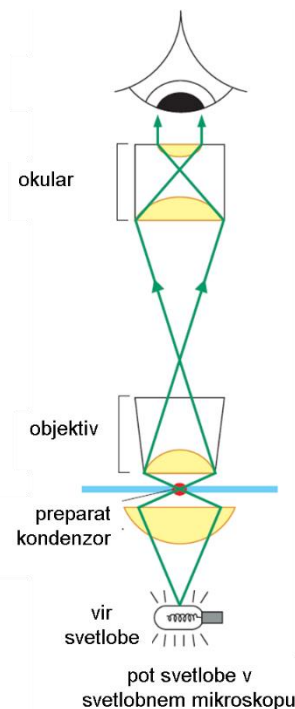


Slika 2: Shematski prikaz mikroskopiranja preparatov prokariotskih (*levo*) in evkariotskih celic (*desno*).

Mikroskop

Glede na osnovni princip delovanja delimo mikroskope v tri razrede: optični svetlobni mikroskopi, elektronski mikroskopi (presevni ali vrstični) in vrstični preiskovalni mikroskopi (*scanning probe microscope*). S slednjimi vzorcev ne gledamo več s pomočjo elektromagnetnega valovanja (svetlobni, elektronski mikroskop), ampak »tipljemo« površino vzorca z ostro konico nanometrskih dimenzij.

Na vaji bomo uporabljali svetlobni mikroskop. Pri mikroskopu s presevno svetlobo (slika 3) svetloba iz žarnice potuje skozi kondenzor, pritrjen pod mizico; nato skozi prosojen objekt, ki leži na stekelcu nad odprtino v mizici; nato skozi leče objektiva in v notranjosti cevastega tubusa ustvari realno, povečano in obrnjeno sliko objekta. To sliko nato dodatno povečajo leče v okularju in jo posredujejo v opazovalčevo oko. Opazovalec tako vidi dvakratno povečano navidezno sliko v oddaljenosti približno 25 cm od očesa.

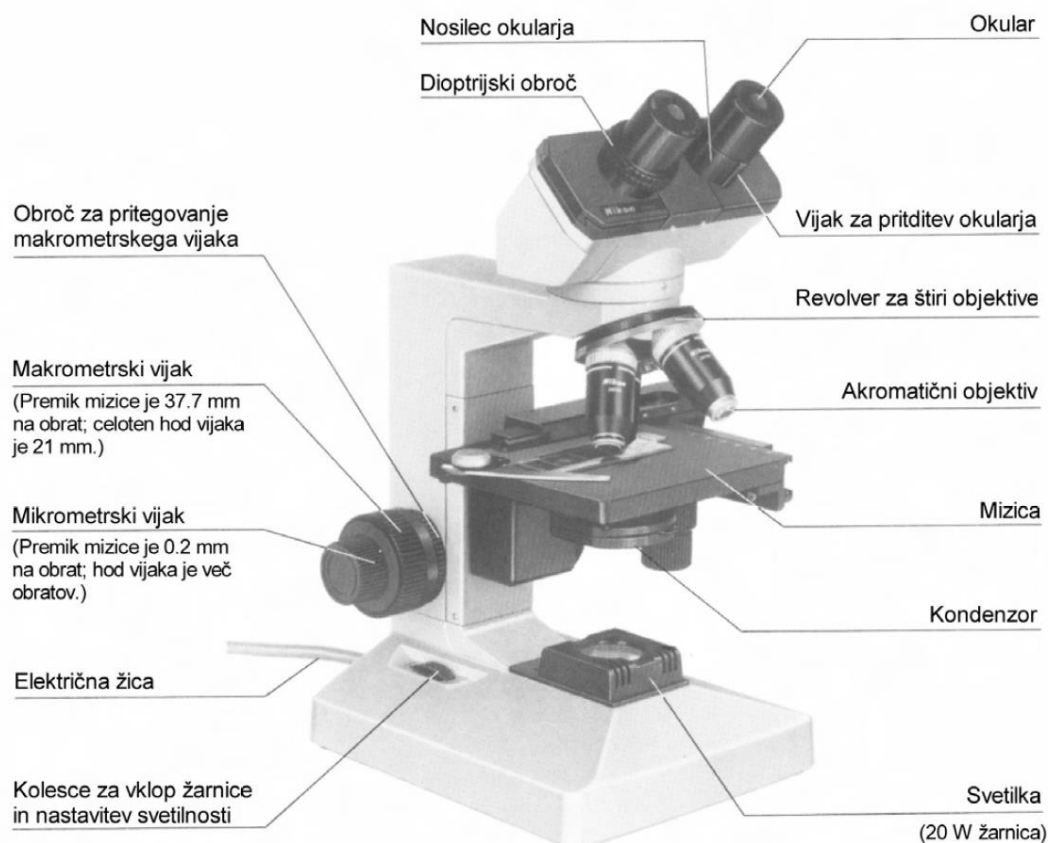


Slika 3: Pot svetlobe v svetlobnem mikroskopu.

Izboljševanje preprostih osnov je pripeljalo do današnjih izjemno zapletenih in izpopolnjenih naprav. Današnji mikroskopi so pogosto narejeni iz posameznih sklopov, ki jih je moč zamenjevati in tako mikroskop prilagajati različnim tehnikam mikroskopiranja, njihova optika pa omogoča velike povečave ob izjemni jasnosti in kontrastnosti slike.

Zgradba mikroskopa

V mikroskopu (slika 4) sta dve vrsti povečevalnih leč: leča objektiva in leča okularja. Leča objektiva na spodnji strani tubusa, ki ima majhno goriščno razdaljo in je precej blizu objekta, projicira povečano realno sliko objekta v notranjost tubusa. Ta slika je obrnjena in projicirana na natančno določeno razdaljo v notranjosti tubusa (kar imenujemo optična dolžina tubusa). Če bi v tubus potisnili prosojen zaslon (npr. iz jedkanega stekla), bi to realno sliko lahko videli. Objektiv vsebuje najpomembnejše leče v mikroskopu, saj morajo dati jasno sliko visoke ločljivosti. Če je objektiv nekvaliteten in nima odpravljenih napak (aberracij), bo tudi slika slaba. Na vsakem objektivu je vgravirana povečava (npr. 20× ali 10×), dolžina tubusa, za katero je bil objektiv izdelan (običajno 160 mm), ter debelina krovnega stekelca, ki pokriva objekt in so jo upoštevali pri načrtovanju korekcije sferične aberacije (običajno 0,17 mm). Če je objektiv načrtovan za opazovanje s kapljico imerzijskega olja med čelno lečo in krovnim stekelcem, ima vgravirano oznako OIL ali OEL ali HI (homogena imerzija). Če takih oznak na objektivu ni, je namenjen "suhemu" opazovanju. To pomeni, da je med njegovo čelno lečo in krovnim stekelcem zrak. Stojalo ali okvir mikroskopa nosi objekte na spodnjem koncu tubusa, ki je obrnjen proti objektu. Običajno je na stojalo pritrjen revolver, v katerem je privitih več objektivov. Z obračanjem revolverja lahko v optično os mikroskopa preprosto namestimo poljuben objektiv.



Slika 4: Zgradba mikroskopa.

Okularna leča se nahaja v okularju, ki je vstavljen v tubus na njegovi zgornji strani. Okular ima rob, s katerim je zataknen v rob tubusa in mu preprečuje, da bi zdrknil vanj. Položaj okularja je tak, da njegova zgornja leča dodatno poveča realno sliko, ki jo projicira objektiv. Oko opazovalca vidi sekundarno povečano sliko, kot bi bila oddaljena 25 cm. Torej je slika navidezno nekje pri dnu mikroskopa. Pri tej oddaljenosti je namreč ločljivost povprečnega človeškega očesa najboljša. Razdalja od vrha tubusa do roba objektiva, s katerim je ta pritrjen v revolver, je običajno 160 mm. To razdaljo imenujemo mehanska dolžina tubusa.

V okular lahko vstavimo tudi merilca ali druge oznake na tak način, da je njihova slika vidna istočasno s sliko objekta. Pri monokularnem mikroskopu je okular le eden. Pri binokularnem mikroskopu sliko, ki jo projicira objektiv, steklena prizma razcepi v dve smeri in vsaka od slik pade na enega od dveh okularjev. Pri trinokularnem mikroskopu lahko opazovalec s premično prizmo usmeri sliko v okularja ali pa v tubus, na katerega lahko pritrdimo fotoaparatus ali kamero. Sodobni binokularni tubusi so narejeni pod kotom (običajno 30°), kar olajša opazovanje. Horizontalno razdaljo med okularjema je mogoče uravnavati glede na razdaljo med opazovalčevima zenicama. Pri tem se ohranja mehanska dolžina tubusa 160 mm. Na enem od okularjev je nameščen zobat obroč, s katerim okular priredimo dioptriji opazovalčevih oči.

Slika objekta je povečana dvakrat, najprej z objektivom in nato še z okularjem. Taka razporeditev lečja ustvari povečano sliko, katere velikost je zmnožek povečave objektiva in povečave okularja. Objektiv, ki poveča na primer 20 $\times$, in okular, ki poveča 10 $\times$, dajeta sliko, ki je povečana 200 $\times$. Večje ali manjše povečave dosežemo z različnimi kombinacijami objektivov in okularjev.

Da bi bile motnje zaradi tresljajev čim manjše, je spodnji del stojala mikroskopa tog in težak. Na obeh straneh stojala sta dve kolesci namenjeni ostrenju slike. Večji, makrometrski vijak je namenjen grobi izostritvi slike in ga uporabljamo le pri najmanjši povečavi. Manjši se imenuje mikrometrski vijak in je namenjen natančnemu ostrenju slike pri vseh povečavah. Z vrtenjem vijakov objekt približujemo ali oddaljujemo od objektiva. Občutljivost mikrometrskega vijaka se nanaša na velikost premika mizice, ko mikrometrski vijak zavrtimo v eno ali drugo smer. Pri dobrih mikroskopih je premik običajno 2 μm , pri vrhunskih raziskovalnih pa 1 μm . Pri večini mikroskopov z vijakoma dvigamo ali spuščamo mizico, pri nekaterih pa se dviga ali spušča objektiv.

Objekt leži na mizici, pravokotni ali okrogli, z odprtino na sredini, skozi katero prehaja svetloba, ki nadaljuje pot skozi objekt in v objektiv. Mizica je pogosto opremljena z vilicami, v katere vpnemo preparat in ga nato premikamo z vijakoma pod mizico. Pod mizico je pritrjen kondenzor. Leče v kondenzorju zberejo svetlobo žarnice v ravnini objekta. Kondenzor je pritrjen v okvirju, ki ga je pri nekaterih mikroskopih z vijakom kondenzorja mogoče dvigati ali spuščati. Kondenzor ima pogosto še vijake za centriranje, s katerimi leče naravnamo v optično os mikroskopa. Del kondenzorja je tudi lamelna zaslonka, ki se imenuje aperturna zaslonka, in jo lahko odpiramo ali zapiramo z ročico na sprednji strani kondenzorja. Aperturna zaslonka in kondenzor sta bistvena za dobro osvetljenost objekta.

Pod kondenzorjem je lahko pritrjeno zrcalce, ki svetlobo iz svetlobnega vira usmerja v kondenzor in naprej skozi objekt. Pogosto ima mikroskop namesto zrcalca v spodnjem delu stojala vgrajeno žarnico, ki poskrbi za osvetlitev.

Povečava

Povečavo pri svetlobnem mikroskopu dosežemo s pomočjo dveh sistemov leč (okularja in objektiva). Večina svetlobnih mikroskopov ima 4 objektivne s 4-, 10-, 40- in 100-kratno (imerzijski objektiv!) povečavo. Leče objektiva v notranjosti tubusa ustvarijo realno, povečano in obrnjeno sliko objekta, ki jo nato dodatno 10-krat povečajo leče v okularju in jo posredujejo v opazovalčevo oko. Celokupno povečavo določimo tako, da pomnožimo povečavo okularja in objektiva. Ustrezno povečavo izberemo tako, da na sliki še lahko razločimo posamezne podrobnosti objekta.

Ločljivost

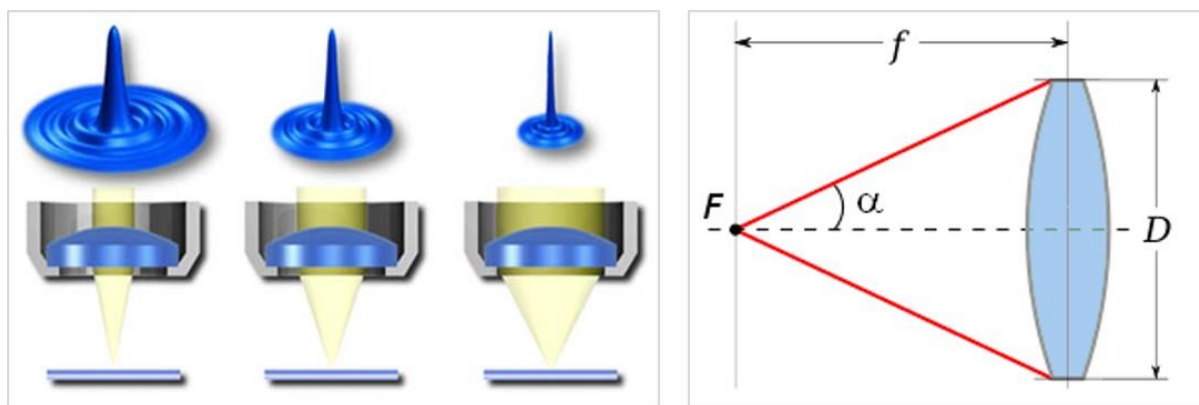
Velikost uporabne povečave omejuje uklon (difrakcija) svetlobe. Svetloba, ki izvira iz različnih točk na objektu, potuje skozi objektiv in ustvari sliko objekta, posameznih točk ne ponazori kot točke, temveč kot majhne razmazane kroge, ki jih imenujemo Airyjevi diski. Zaradi uklona

se točka ne preslika v točko, ampak v nekoliko večjo liso z zabrisanimi robovi. Če se lisi dveh sosednjih točk prekrivata, iz slike ne moremo več ugotoviti, ali gre za sliko ene same točke, ali pa za prekrivajoči se slike dveh ali več točk. Najmanjša razdalja med točkama, ki ju v idealnih pogojih še razločimo kot dve točki, se imenuje ločljivost mikroskopa (oznaka d). Za uklon na okrogli odprtini je ločljivost podana kot:

$d = 0,61 \times \lambda / NA$. Pri tem je λ valovna dolžina svetlobe, NA pa numerična odprtina leče (objektiva). Konstanta 0,61 je povezana z razdaljo med dvema točkama, ki ju človeško oko še loči. Uklon je tem bolj opazen, čim večja je valovna dolžina v primerjavi z velikostjo odprtine. Objektivi z večjo numerično odprtino ustvarjajo manjše Airyjeve diske in lahko razlikujejo manjše podrobnosti na objektu (slika 5). Numerična odprtina je merilo za količino žarkov, ki jih zbere objektiv, in je definirana kot:

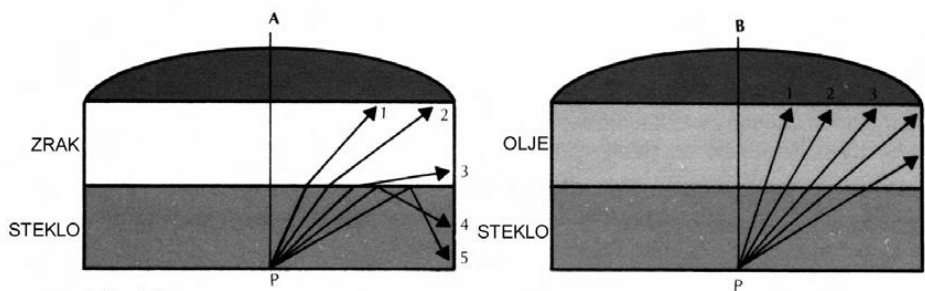
$$NA = n \times \sin \alpha,$$

kjer je n lomni količnik sredstva med objektom in lečo objektiva, α pa kot med optično osjo in zveznico, ki povezuje gorišče in rob leče objektiva (polovica kotne odprtine objektiva; slika 5). Sposobnost objektiva, da ujame različne svetlobne žarke, ki izvirajo iz različnih delov osvetljenega objekta, je neposredno povezana s kotno odprtino objektiva. Objektivi z manjšo kotno odprtino lahko zajamejo le ozek stožec svetlobe v primerjavi z objektivi z velikimi kotnimi odprtinami. Za doseganje dobre ločljivosti moramo torej uporabiti objektiv s čim večjo numerično odprtino oziroma vzorec opazovati s svetlobo s čim krajšo valovno dolžino. Kot α , in s tem tudi numerična odprtina, je tem večji, čim večji je radij leče objektiva in čim manjša je njegova goriščna razdalja.



Slika 5: Shematski prikaz Airyjevih diskov glede na numerično odprtino (levo) in prikaz kotne odprtine objektiva (desno; f – goriščna razdalja, α – polovica kotne odprtine, D – premer leče objektiva).

Običajno vzamemo za valovno dolžino vrednost 550 nm, kar ustreza zeleni svetlobi, lomni količnik pa je od 1 (zrak) do 1,5 za oljno imerzijske objektivne. V praksi lahko dosežemo najmanjše vrednosti resolucije okoli 0,2 μm . Pri dani kotni odprtini imajo objektivi, ki jih uporabljamo z imerzijskim oljem, večjo numerično odprtino in s tem boljšo ločljivost (slika 6).



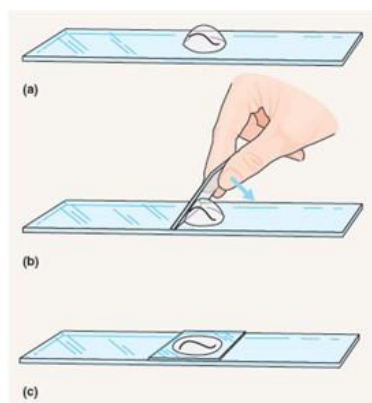
Slika 6: Pomen oljne imerzije.

Na sliki 6 je v primeru A označenih pet žarkov, ki potujejo iz točke P na objektu skozi krovno stekelce v zrak med njim in sprednjo lečo objektiv. Le žarka 1 in 2 lahko vstopita v objektiv. Žarka 4 in 5 se popolnoma odbijeta. V primeru B je med stekelcem in lečo olje, ki ima enak lomni količnik kot steklo. Žarki sedaj potujejo brez loma, zato v objektiv vstopijo žarki 1, 2, 3 in 4. Numerična odprtina je torej povečana za faktor n , ki je lomni količnik olja.

Ločljivosti mikroskopa ne smemo zamenjevati z najmanjšo velikostjo predmeta, ki ga še lahko opazimo, saj lahko opazimo tudi od ločljivosti dosti manjši predmet, če se le dovolj loči od okolice.

PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV

Za opazovanje bakterij, kvaskov, rastlinskih celic in drugih celic moramo pripraviti ustrezen mikroskopski preparat. Mikroskopski preparati služijo za opazovanje oblik, strukture in drugih značilnosti posameznih organizmov. Preparat sestoji iz objektnega stekla, na katerega položimo objekt, ki ga bomo opazovali (npr. del rastline). Na opazovani objekt kanemo kapljico vode in ga nato prekrijemo s krovnim stekelcem (slika 7). Poznamo več vrst mikroskopskih preparatov. Sveži ali mokri preparat pripravimo sami in ga po opazovanju običajno zavržemo, ker ni obstojen. Trajni ali suhi preparat pripravijo v laboratorijih. Opazovani objekt s posebnimi barvili obarvajo tako, da so dobro vidne strukture. Obstojnost preparata zagotovijo z ustreznimi snovmi. Tak preparat lahko uporabljamo več let.

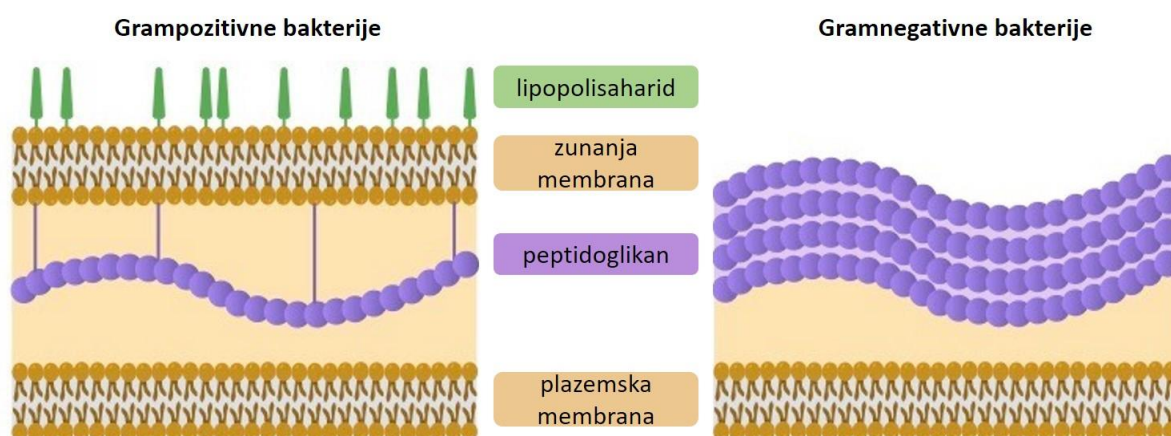


Slika 7: Shematski prikaz priprave mikroskopskega preparata, ki je sestavljen iz objektnega stekelca (a), vzorca (b) in krovnega stekelca (c).

Večina nebarvanih preparatov je nekontrastnih ali slabo kontrastnih, zato so celice slabo opazne. Z obarvanjem preparata povečamo kontrast med celicami in njihovim ozadjem, zato celice lažje vidimo. Opazujemo njihovo obliko, velikost, zunanjo in notranjo strukturo. Z ustreznimi barvili lahko selektivno obarvamo določene celične strukture (bičke, granule, kapsule). Pred barvanjem preparata običajno pripravimo razmaz in ga fiksiramo. Na ta način preprečimo izgubo biološkega vzorca med postopkom barvanja. Pri enostavnem barvanju uporabljamo barvila, ki dobro absorbirajo v vidnem delu svetlobnega spektra in se vežejo na biološke makromolekule (npr. metilensko modrilo, kristal vijolično, safranin...). Kisla barvila obarvajo predvsem bazične sestavine celice, predvsem citoplazmo, bazična barvila pa se vežejo z nukleinskimi kislinami in tako obarvajo predvsem celična jedra. Identifikacijo in taksonomsko razvrščanje omogoča diferencialno barvanje, ki je sestavljeno iz več stopenj (več barvil). Omogoča ločevanje na osnovi strukturnih ali biokemijskih razlik, zaradi katerih se pojavijo razlike v afiniteti do posameznih barvil.

Barvanje po Gramu

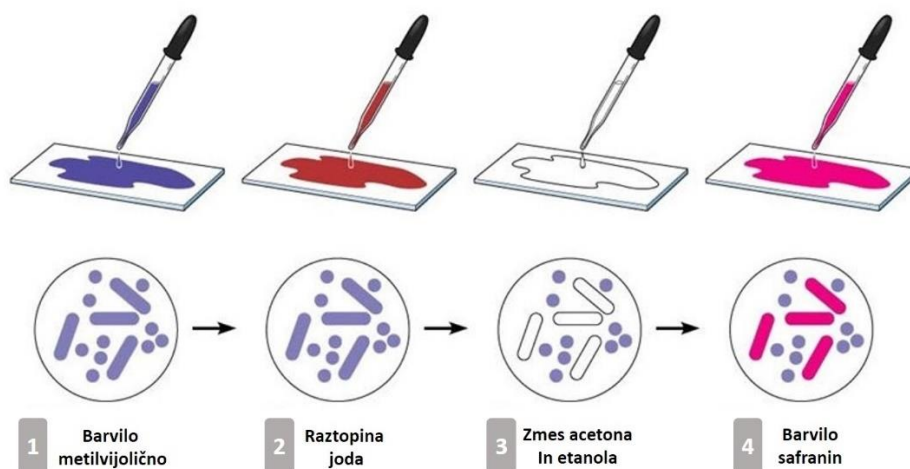
Metoda diferencialnega barvanja po Gramu se imenuje po izumitelju, danskemu bakteriologu Hansu Christianu Gramu, in je ena najpomembnejših metod barvanja v mikrobiologiji, ki je pri identifikaciji bakterij običajno prva na vrsti. Zgradba bakterijske stene je pomembna za lastnosti bakterij, zato barvanje po Gramu daje pomembno informacijo o fizioloških, medicinskih in ekoloških aspektih bakterij. Barvanje po Gramu je empirična metoda za diferenciacijo bakterij v dve veliki skupini: grampozitivne in gramnegativne bakterije. Prve se obarvajo vijolično, druge pa roza, kar je posledica razlik v zgradbi bakterijske celične stene (slika 8).



Slika 8: Celična stena po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij.

Celice najprej obarvamo z barvilom metilvijoličnim oz. kristal vijoličnim in jih nato obdelamo z raztopino joda, ki z barvilom tvori temen kompleks. Zaradi razlik v zgradbi celične stene lahko pri eni skupini bakterij v določenem času barvilo speremo iz celic z etanolom ali zmesjo etanola in acetona, druga skupina bakterij pa ostane obarvana. Prva skupina se imenuje po Gramu pozitivne (grampozitivne), druga po Gramu negativne bakterije (gramnegativne).

bakterije. Razbarvane po Gramu negativne bakterije lahko v naslednjem koraku rožnato obarvamo s safraninom (slika 9).



Slika 9: Shematska predstavitev barvanja po Gramu.

Test je zasnovan na spoznanju, da majhna molekula barvila kristal vijolično prodre skozi polprepustno celično steno bakterije. Po dodatku joda postane kompleks barvilo-jod prevelik in težje prehaja peptidoglikansko steno grampozitivnih bakterij. Pri gramnegativnih bakterijah celična stena vsebuje le tanko plast peptidoglikana (Slika 8). Organska topila, kot sta etanol in aceton, zrahljajo zunanjo in notranjo lipidno membrano, skozi katero nato kompleks lažje zapušča bakterijske celice.

VIR

- Jezernik, K., Veranič, P., Sterle, M. (2012). *Celična biologija : učbenik za študente Medicinske fakultete*. DZS.
- Fundamental Techniques in Cell Culture. A Laboratory Handbook. ECACC (European Collection of Cell Cultures) Handbook. Sigma
- <https://app.jove.com/ru/v/10513/microscopy-and-staining-techniques-in-bacteria>
- https://oer.galileo.usg.edu/context/biologytextbooks/article/1016/filename/0/type/additional/viewcontent/1_Microscopy_and_Staining.pdf

DODATNO GRADIVO

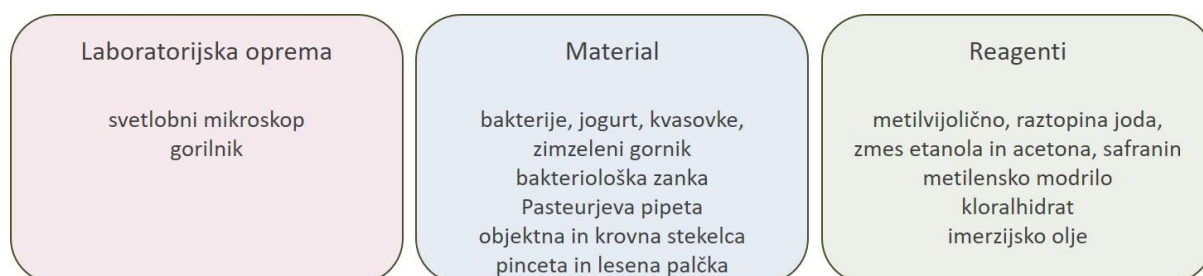
Oglejte si dodatno gradivo in videoposnetke, ki nazorno prikažejo potek celičnega cikla in posamezne stopnje mitoze in mejoze:

- Priprava mikroskopskih preparatov: <https://www.wikihow.com/Prepare-Microscope-Slides>
- Barvanje po Gramu: <https://www.youtube.com/watch?v=sxa46xKfIOY>
- Uporaba svetlobnega mikroskopa: <https://www.youtube.com/watch?v=SUo2fHZaZCU>

IZVEDBA VAJE - POSTOPEK

Na vaji se bomo seznanili z različnimi tehnikami barvanja in priprave preparatov z namenom opazovanja različnih celic in njihovih struktur pod mikroskopom. Pri tem bomo uporabili tehniko barvanja po Gramu, s katero bomo obarvali bakterije *Escherichia coli* in *Lactococcus lactis* ter mlečnokislinske bakterije iz jogurta. Z metilenskim modrilom bomo obarvali kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in epitelne celice ustne sluznice, s pomočjo raztopine kloralhidrata pa bomo opazovali celice lista zimzelenega gornika. V okviru vaje se bomo tako seznanili z osnovami mikroskopiranja in osnovnimi značilnostmi prokariotskih in evkariotskih celic.

Za izvedbo vaje se boste uporabili laboratorijsko opremo, material in reagente, ki so navedeni na sliki 10.



Slika 10: Laboratorijska oprema, materiali in reagenti, potrebni za izvedbo vaje.

Navodila za delo z mikroskopom

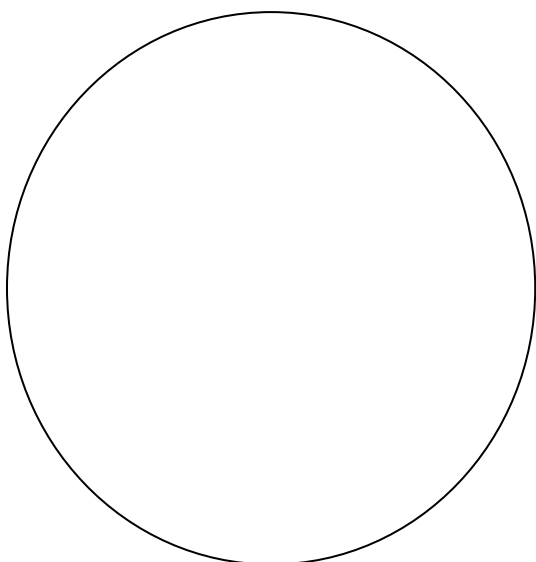
- Odkrijte mikroskop in ga postavite na sredino delovnega prostora. Če je le mogoče, si naravnajte višino stola, ki vam omogoča udobno opazovanje.
- Prižgite svetilko. S kolescem za uravnavanje svetlosti naravnajte jakost svetilke malo manj kot na največjo svetilnost.
- Nastavite objektiv z najmanjšo 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 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.
- Z razmikanjem ali primikanjem okularjev nastavite razdaljo, ki ustreza razdalji med očesoma.
- Z desnim očesom pogledajte v desni okular in z mikrometrskim vijakom natančno izostrite izbrani detajl na sliki. Z levim očesom pogledajte v levi okular in z vijakom na okularju natančno izostrite isti detajl. Ponovno preverite in po potrebi naravnajte razmik med okularjema.

- Zapirajte in odpirajte aperturno zaslonko pod kondenzorjem, dokler ne dobite kontrastne slike z dobro ločljivostjo. Pazite, da zaslonka ni odprta bolj, kot je potrebno za pridobitev kontrastov, in ne preveč, ker se zmanjša ločljivost.
- Če želite uporabljati večjo povečavo, 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.
- Na enak način kot v točki 7. ponovno prilagodite zaslonko.
- Pri zamenjavi preparata ponovite točke 3, 4 in 7.
- Pri uporabi imerzijskega objektiva na krovno stekelce nanesite kapljico imerzijskega olja in za izostrenje slike uporabljajte le mikrometrski vijak.
- Po končanem mikroskopiranju zavrtite revolver na najmanjšo povečavo, z makrometrskim vijakom spustite mizico, odstranite objekt, s staničevino dobro obrišite imerzijski objektiv in druge dele mikroskopa, če so med delom prišli v stik z imerzijskim oljem ali drugimi tekočinami. Ugasnite svetilko in mikroskop pokrijte.

Barvanje vzorcev in opazovanje z mikroskopom

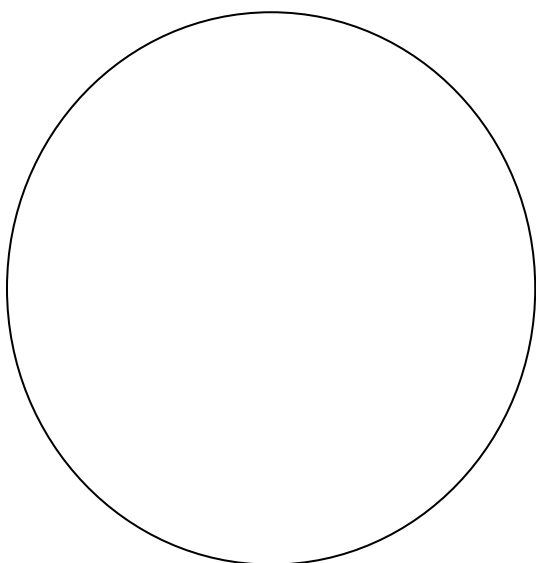
A. Barvanje po Gramu in opazovanje bakterije *Escherichia coli*

1. Priprava razmaza: Suspenzijo bakterijske kulture *E. coli* s pomočjo bakteriološke zanke v tanki plasti namažite na objektno stekelce. Razmaz posušite na zraku ob plamenu gorilnika (do 40 °C). Posušeni razmaz fiksirajte tako, da objektno stekelce z razmazom obrnjenim navzgor trikrat povlečete skozi plamen gorilnika.
2. Barvanje po Gramu: Preparat na objektnem stekelcu s Pasteurjevo pipeto prelijte (5 kapljic) s kristal vijoličnim, ki naj učinkuje 1 minuto. Med barvanjem držite objektno stekelce s pomočjo pincete ali lesene ščipalke, da se izognete pobarvani koži na prstih. Odvečno barvilo odlijte v čašo za tekoči odpad in previdno sperite z vodo iz puhalke (ne z direktnim curkom), da ne odstranite tudi fiksiranih bakterij. Dodajte približno 5 kapljic raztopine joda (toliko, da prekrije celoten razmaz) in počakajte eno minuto. Odlijte raztopino joda in sperite z vodo, odvečno vodo previdno popivnajete s staničevino. S Pasteurjevo pipeto po kapljicah dodajajte raztopino za razbarvanje (95 % etanol), tako da sproti odteka v čašo za odpad 15 do 60 sekund, odvisno od debeline razmaza. Sperite še z vodo (5 sekund). Dodajte nekaj kapljic safranina in počakajte eno minuto, nato sperite z vodo. Preparat posušite na zraku in pazljivo popivnajete s staničevino.
3. Mikroskopiranje: Pobarvan razmaz bakterij na objektnem stekelcu prekrijte s krovnim stekelcem in nanj dodajte kapljico imerzijskega olja. Preparat opazujte pod mikroskopom z imerzijskim objektivom (1000-kratna povečava) in brez. Bodite pozorni na strukturo in barvo preparata.
4. Poročilo: Skicirajte in opišite morfološke značilnosti (velikost, obliko) opazovanih po Gramu negativnih bakterij.



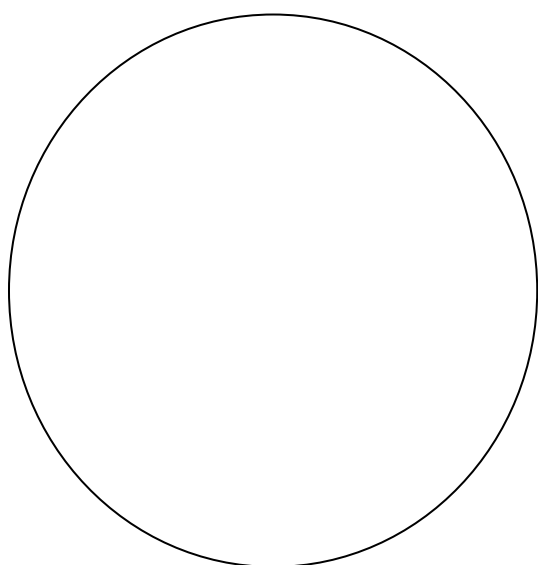
B. Barvanje po Gramu in opazovanje bakterije *Lactococcus lactis*

1. Priprava razmaza: Suspenzijo bakterijske kulture *L. lactis* s pomočjo bakteriološke zanke v tanki plasti namažite na objektno stekelce in posušite na zraku ter fiksirajte, kot je opisano zgoraj.
2. Barvanje po Gramu: Fiksiran preparat pobarvajte, kot je opisano zgoraj.
3. Mikroskopiranje: Pobarvan preparat pripravite za mikroskopiranje kot je opisano zgoraj in opazujte preparat pod mikroskopom z imerzijskim objektivom in brez. Bodite pozorni na strukturo in barvo preparata.
4. Poročilo: Skicirajte in opišite morfološke značilnosti opazovanih po Gramu pozitivnih bakterij.



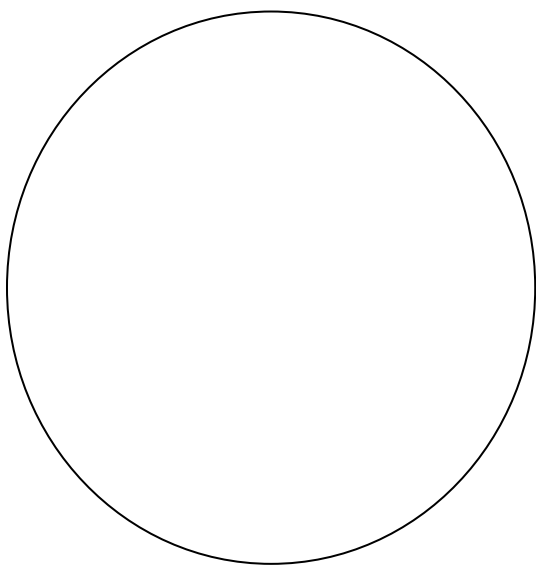
C. Barvanje po Gramu in opazovanje mlečnokislinskih bakterij iz jogurta (*Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus bulgaricus*)

1. Priprava razmaza: Jogurt s pomočjo bakteriološke zanke v tanki plasti namažite na objektno stekelce in posušite na zraku ter fiksirajte, kot je opisano zgoraj.
2. Barvanje po Gramu: Fiksiran preparat pobarvajte, kot je opisano zgoraj.
3. Mikroskopiranje: Pobarvan preparat pripravite za mikroskopiranje, kot je opisano zgoraj, in opazujte preparat pod mikroskopom z imerzijskim objektivom in brez. Bodite pozorni na strukturo in barvo preparata.
4. Poročilo: Skicirajte in opišite morfološke značilnosti opazovanih mikroorganizmov v jogurtu.



D. Barvanje in opazovanje kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

1. Priprava razmaza: Suspenzijo pekovskega kvasa s pomočjo bakteriološke zanke v tanki plasti namažite na objektno stekelce. Razmaz posušite na zraku ob plamenu gorilnika (do 40 °C). Posušeni razmaz fiksirajte tako, da objektno stekelce z razmazom obrnjenim navzgor trikrat povlečete skozi plamen gorilnika.
2. Barvanje z metilenskim modrilom: Fiksiran razmaz s Pasteurjevo pipeto prelijte z metilenskim modrilom. Počakajte eno minuto, višek barvila na preparatu zlijte v čašo za tekoči odpad in sperite z vodo iz puhalke. Posušite na zraku ob plamenu gorilnika (popivnajte s staničevino)
3. Mikroskopiranje: Pobarvan preparat pripravite za mikroskopiranje, kot je opisano zgoraj, in opazujte preparat pod mikroskopom z imerzijskim objektivom in brez. Bodite pozorni na strukturo in barvo preparata.
4. Poročilo: Skicirajte in opišite morfološke značilnosti opazovanih mikroorganizmov v pekovskem kvasu. Opazujte brstenje kvasovk.

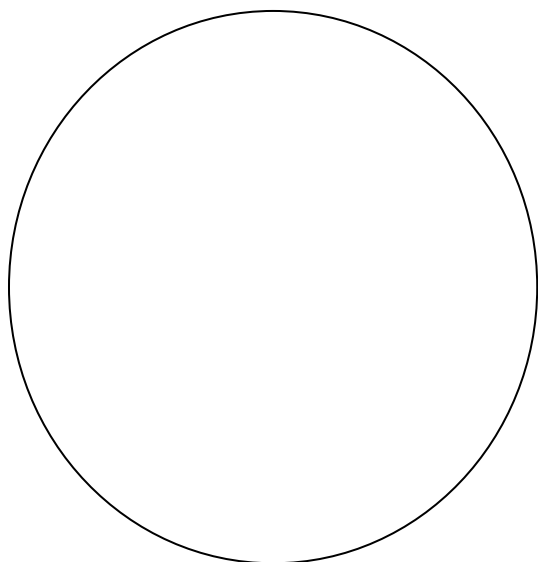


E. Opazovanje celic lista zimzelenega gornika

1. Priprava: List zimzelenega gornika vstavite v režo v kocki stiroporja. Stiropor s preparatom stisnite in z rezilom previdno odrežite več čim tanjših prečnih rezin lista.
2. Barvanje s kloralhidratom: Več rezin s pinceto ali preparirno iglo prenesite na objektno steklo, dodajte kapljico kloralhidrata in pokrijte s krovnim stekelcem.
3. Mikroskopiranje: Opazujte pri različnih povečavah mikroskopa (brez imerzije).
4. Poročilo: Skicirajte preparat in označite posamezne strukture v rastlinski celici, ki jih prepoznate.

F. Barvanje in opazovanje epitelnih celic ustne sluznice

1. Odvzem vzorca in priprava preparata: Z notranje strani lica si postrgajte sluznico z leseno palčko. Postrgane celice nanesite na objektno stekelce in fiksirajte razmaz kot je opisano zgoraj.
2. Barvanje z metilenskim modrilom: Fiksiran razmaz s Pasteurjevo pipeto prelijte z metilenskim modrilom. Počakajte eno minuto, višek barvila na preparatu zlijte v čašo za odpad in sperite z vodo iz pihalke. Posušite na zraku ob plamenu gorilnika (popivnajete s staničevino).
3. Mikroskopiranje: Pobarvan preparat pripravite za mikroskopiranje, kot je opisano zgoraj, in opazujte preparat pod mikroskopom z imerzijskim objektivom in brez. Bodite pozorni na strukturo in barvo preparata
4. Poročilo: Skicirajte in opišite opazovane celice ustne sluznice.



Poročilo izdelal:

Datum:

Pregledal:

CELIČNI CIKEL

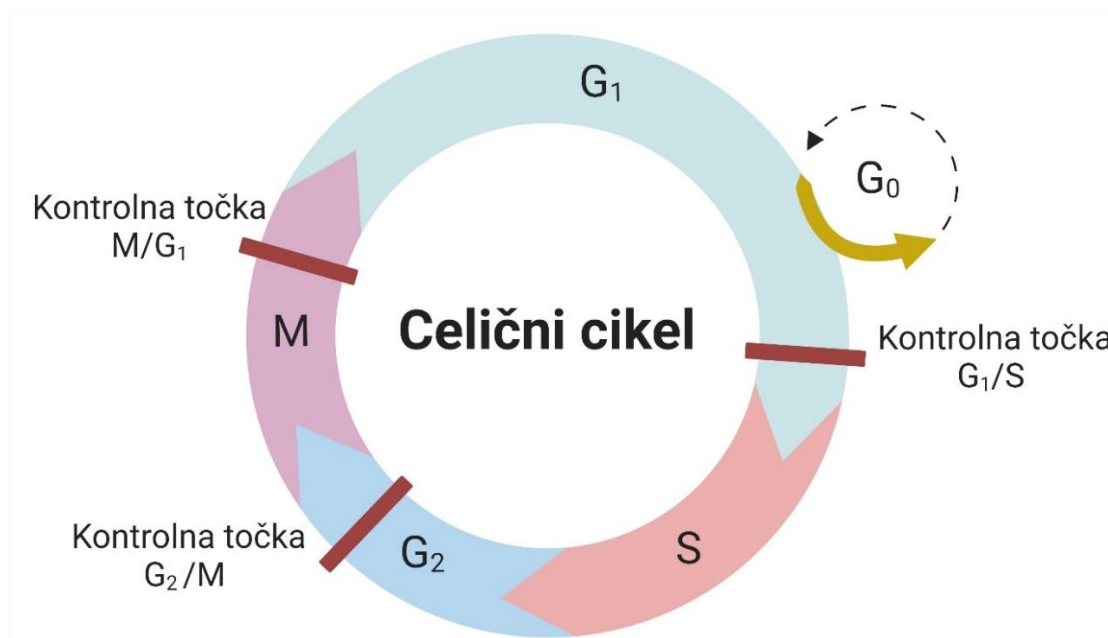
Izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

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 mitozna oziroma faza M, med katero poteka razdelitev v dve hčerinski celici (slika 1). Celice lahko začasno izstopijo iz celičnega cikla in vstopijo v mirujočo fazo, imenovano G_0 . Prokariotske celice nimajo jedra in se delijo s cepitvijo. Pri njih je celični cikel manj zapleten.

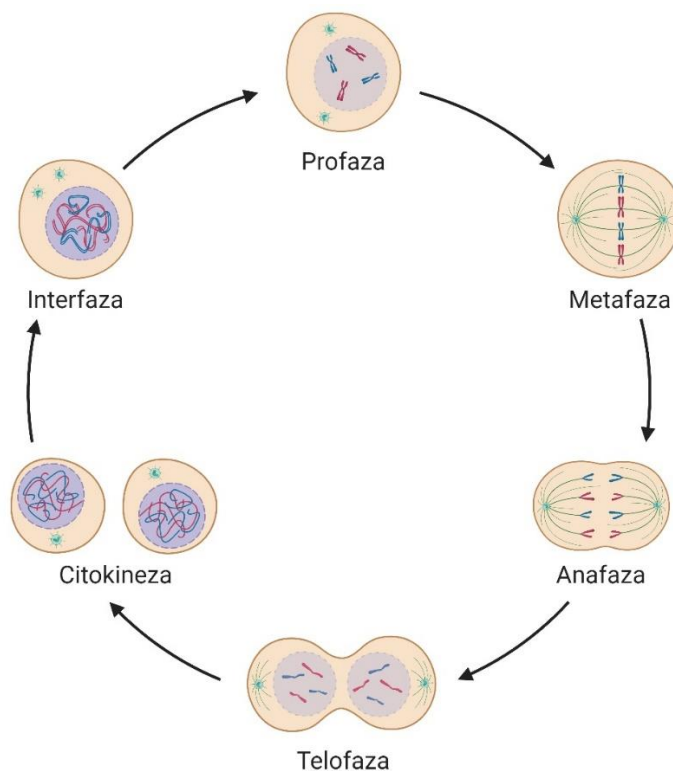


Slika 1: Prikaz celičnega cikla, ki obsega interfazo (faze G_1 , S in G_2) in mitozo (faza M).

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 genomsko 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.

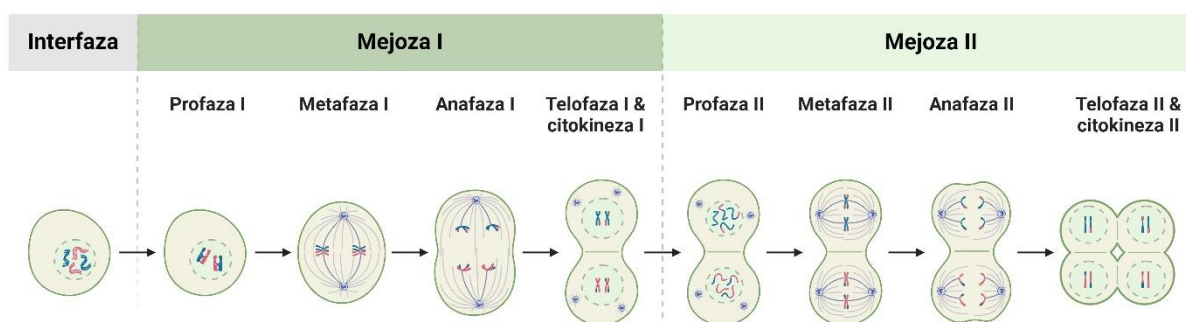
Anafaza preide v zadnjo, četrto fazo mitoze - telofazo, ko kromosomi dosežejo pol. Delitveno vreteno postopoma izgine, začne se oblikovati jedrni ovoj in kromosomi se razvijejo do svoje funkcionalne oblike. Temu praviloma sledi delitev citoplazme (citogeneza) v dva enaka dela.

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.

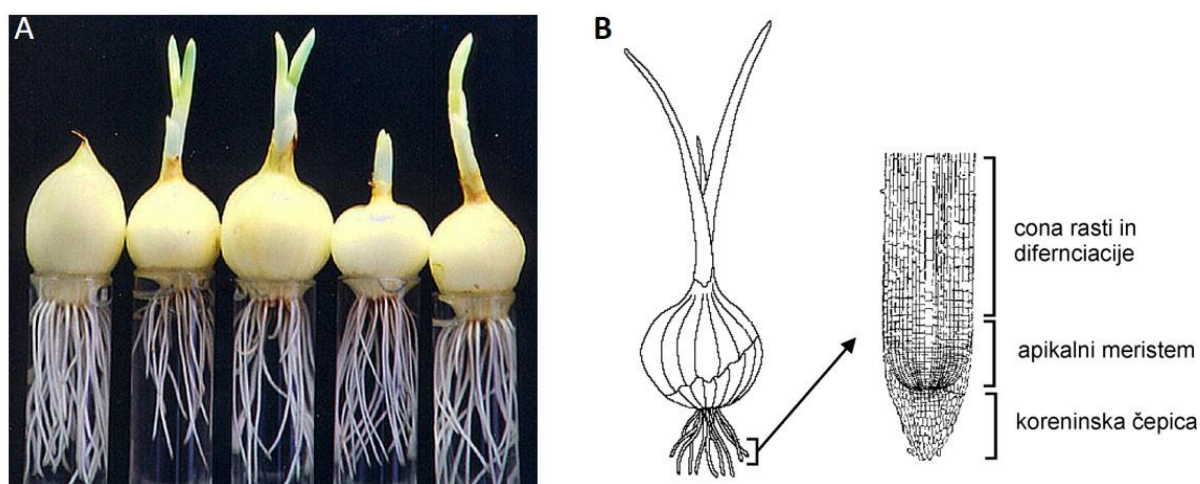
DODATNO GRADIVO

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.



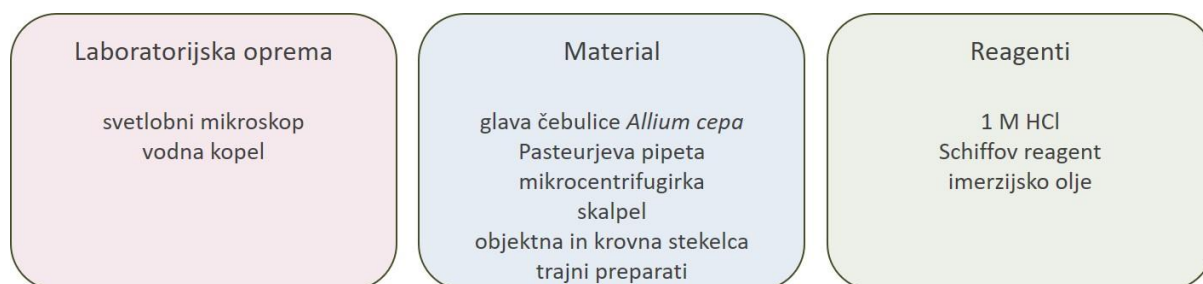
Slika 4: Rast koreninskih laskov čebule (A) in prečni prerez vršička koreninskega laska čebule (B).

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.

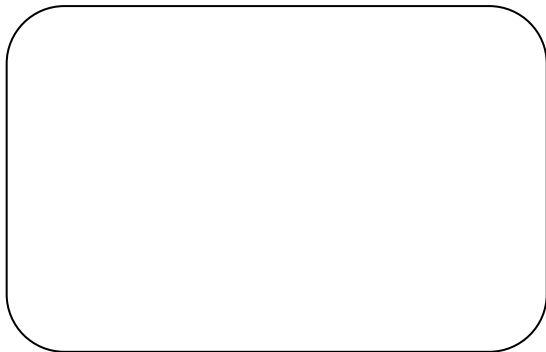
POROČILO:

Materiali in aparature:

Rezultati:

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

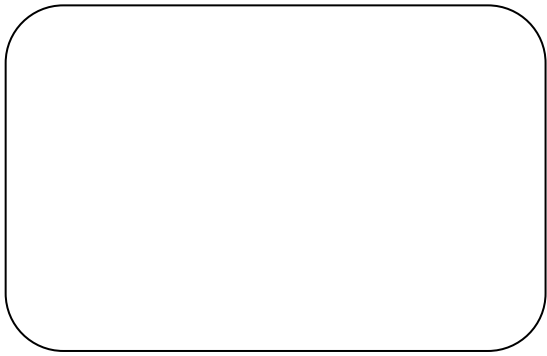
Profaza



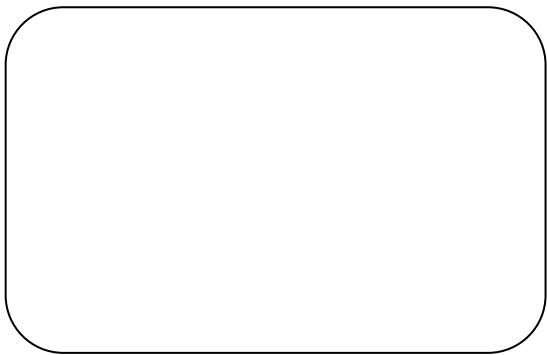
Metafaza



Anafaza

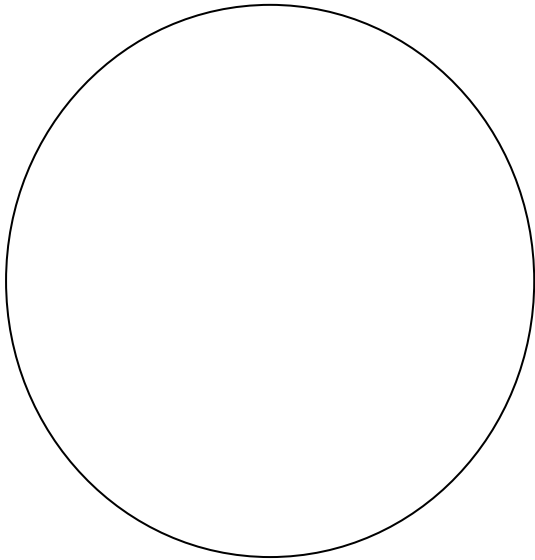


Telofaza

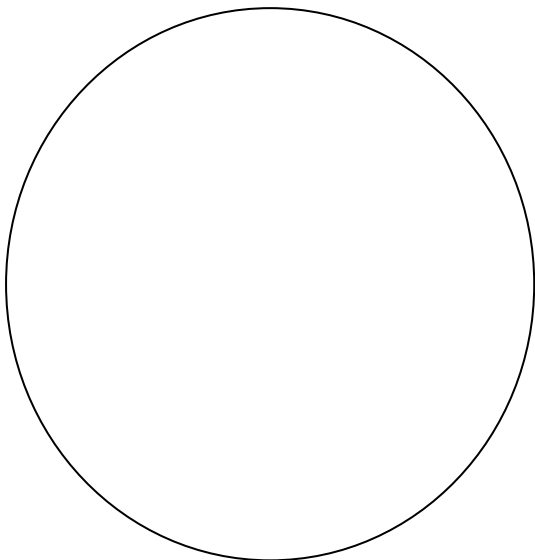


2. Skicirajte celice med mitozo ali mejozo v različnih tkivih s pomočjo opazovanja trajnih preparatov. Opišite vidne značilnosti posameznega preparata.

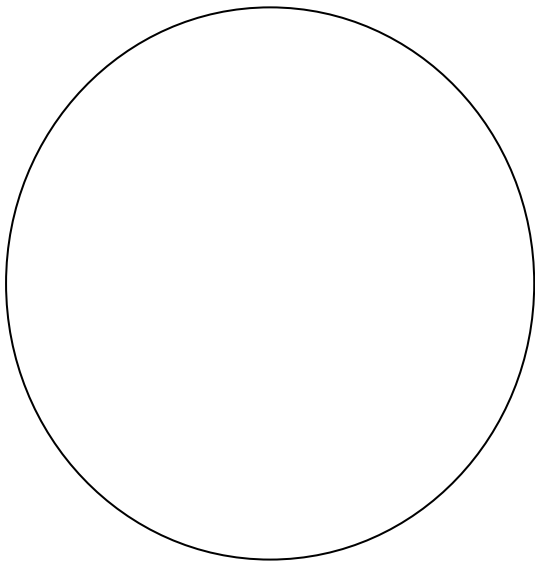
Trajni preparat:



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

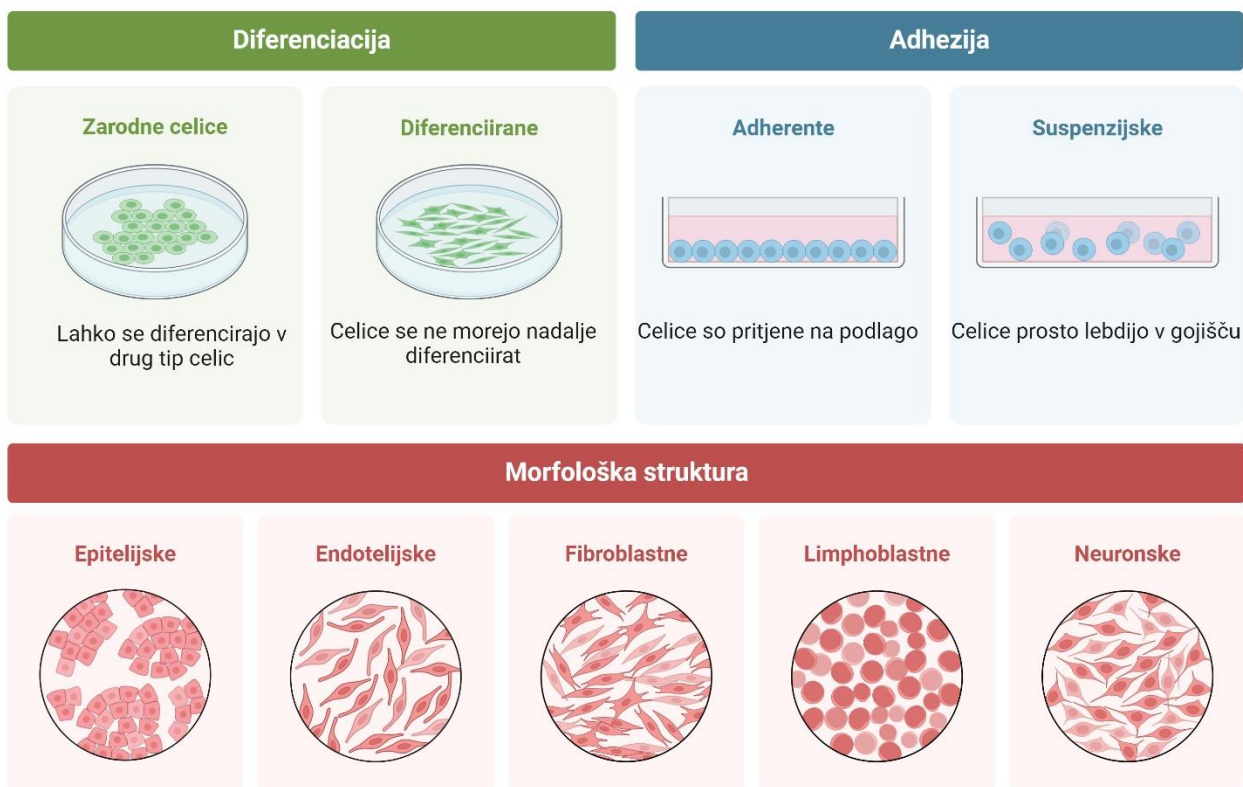
Poznamo več vrst celičnih kultur (Slika 1).

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.

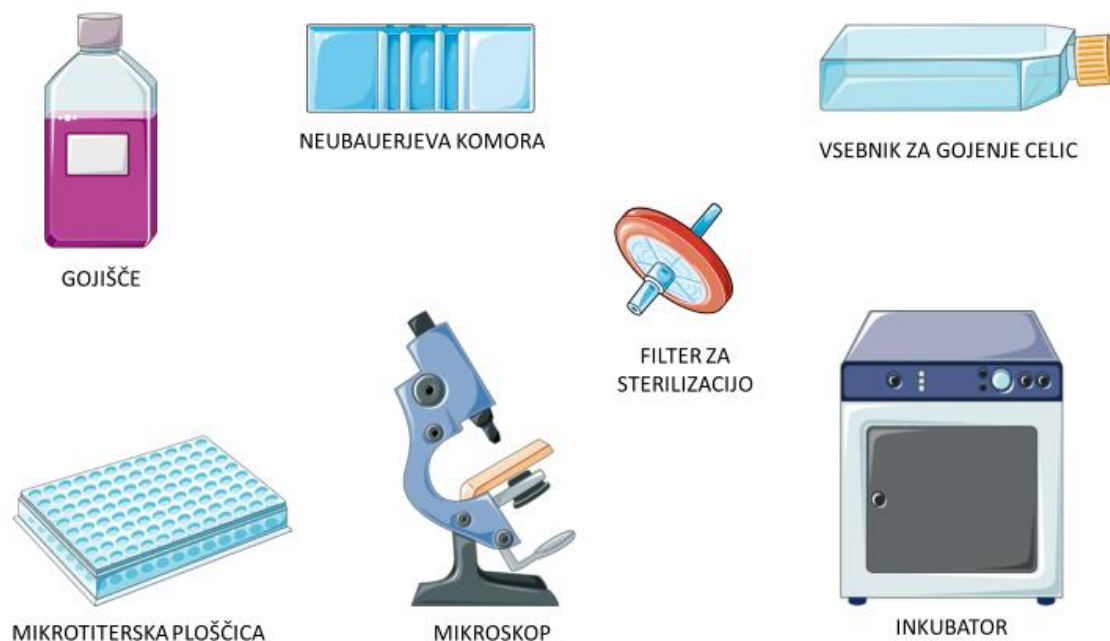


Slika 1. Klasifikacija celic. Slika je bila narejena s programom Biorender.

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):

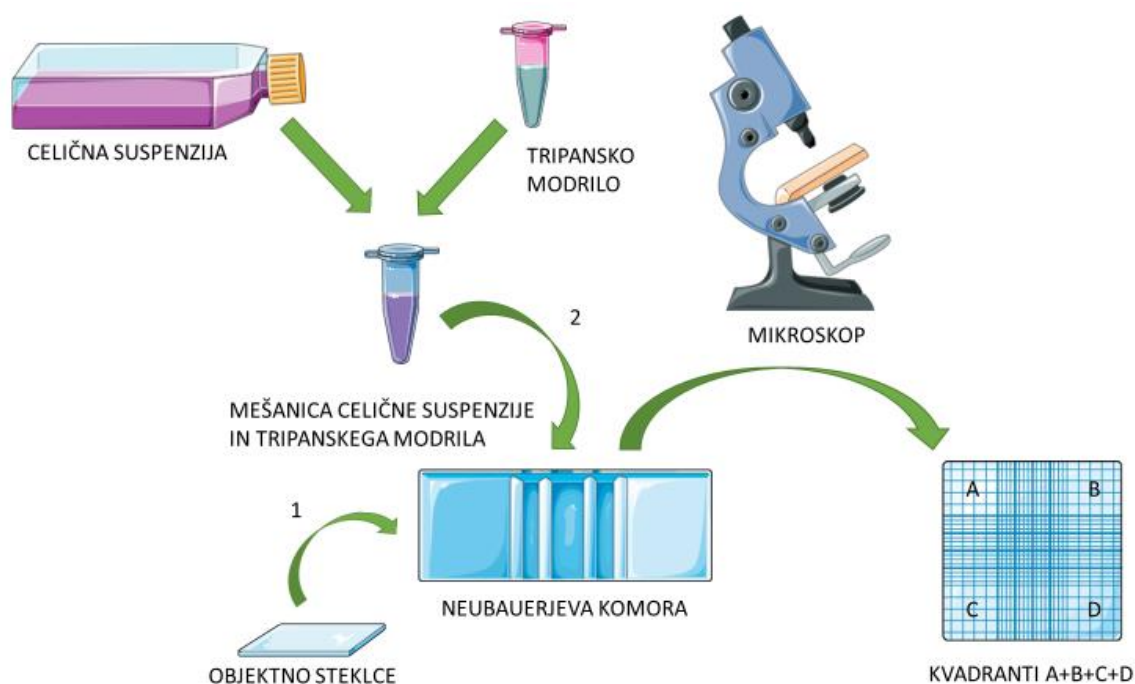
- Gojišče ali medij, ki oskrbuje celično kulturo z vodo in hranili (aminokisline, ogljikovi hidrati, vitamini in minerali)
- Rasne dejavnike (serum govejega zarodka, rastni hormoni)
- Regulirano fizikalno kemijsko okolje: plini (O_2 , CO_2), pH, osmotski tlak, temperatura, vlaga
- Sterilno okolje – vsebniki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



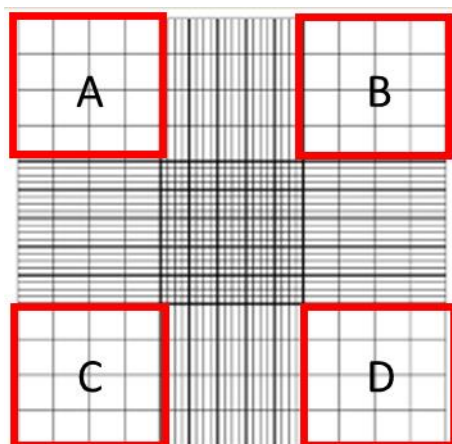
Slika 2. Laboratorijska oprema in material v celičnem laboratoriju. Slika je narejena z uporabo SMART - Servier Medical ART 3000. Vir: <https://smart.servier.com/>; dostopano: 6.7.2022

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 preštujemo 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

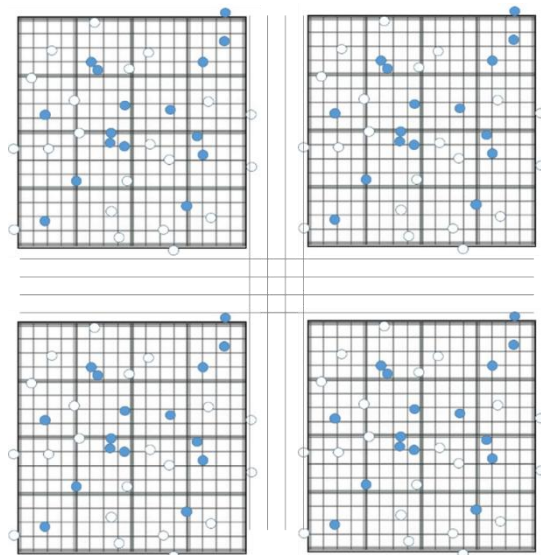
R = faktor redčenja zaradi dodatka tripanskega modrila

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:

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

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

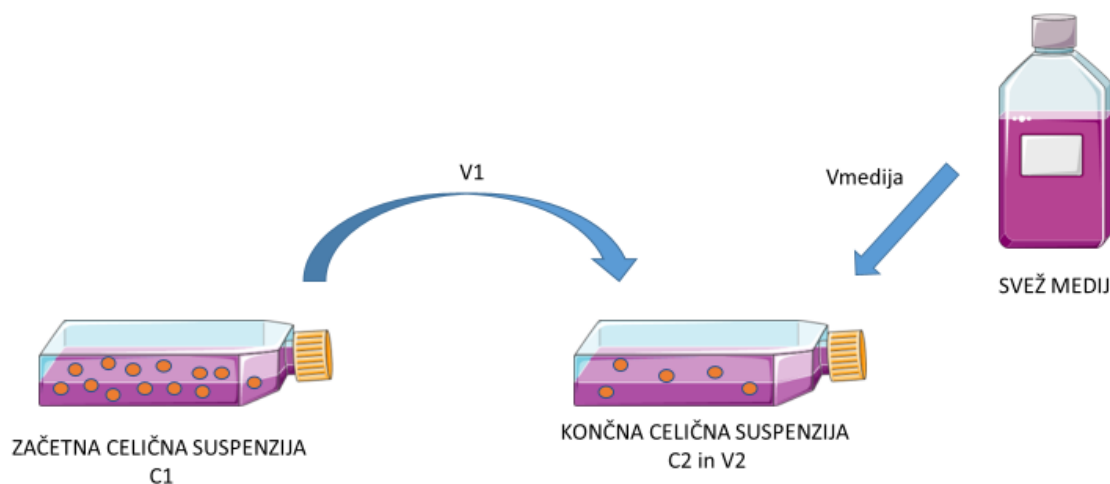
SUBKULTIVIRANJE CELIČNE KULTURE

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 lebdiijo 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?

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

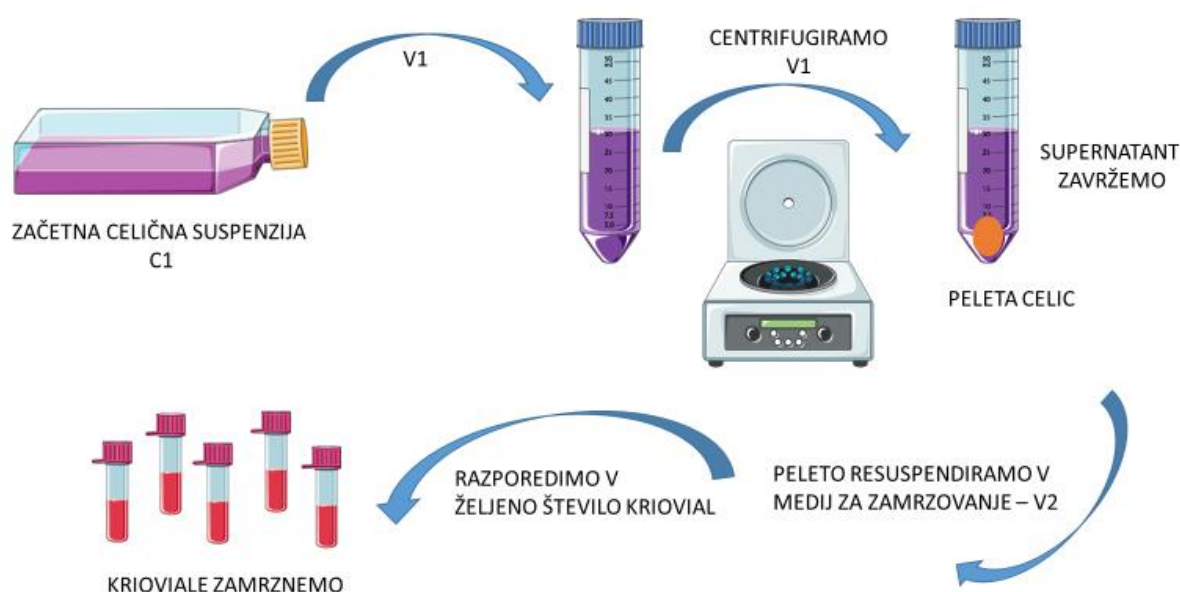
Dodati moramo 8,97 ml svežega medija.

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 prikazujejo 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-LL1zu64BHvxv>

- Subkultiviranje

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

- Štetje celic

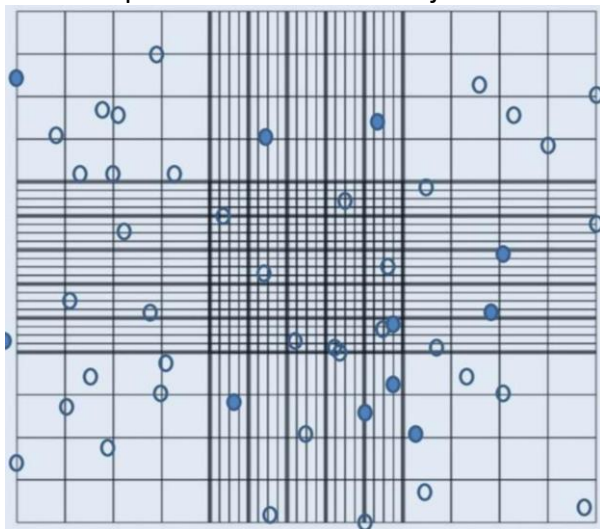
<https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>

- 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 odvzamemo 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 krovno steklo hemocitometra in preštujemo žive in mrtve celice.

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

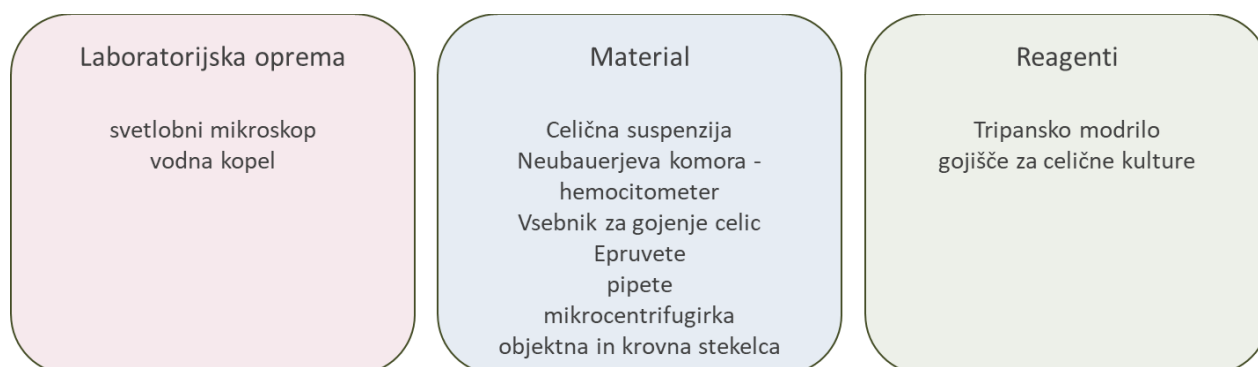
2) Subkultiviranje

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/ μ L dvovijačne DNK z uporabo ustreznega standarda ali z upoštevanjem, da ima DNK s koncentracijo 50 ng/ μ L vrednost absorbance 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 μ L ter na ta način prihranimo dragoceni vzorec za nadaljnje aplikacije. Poleg absorbance 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

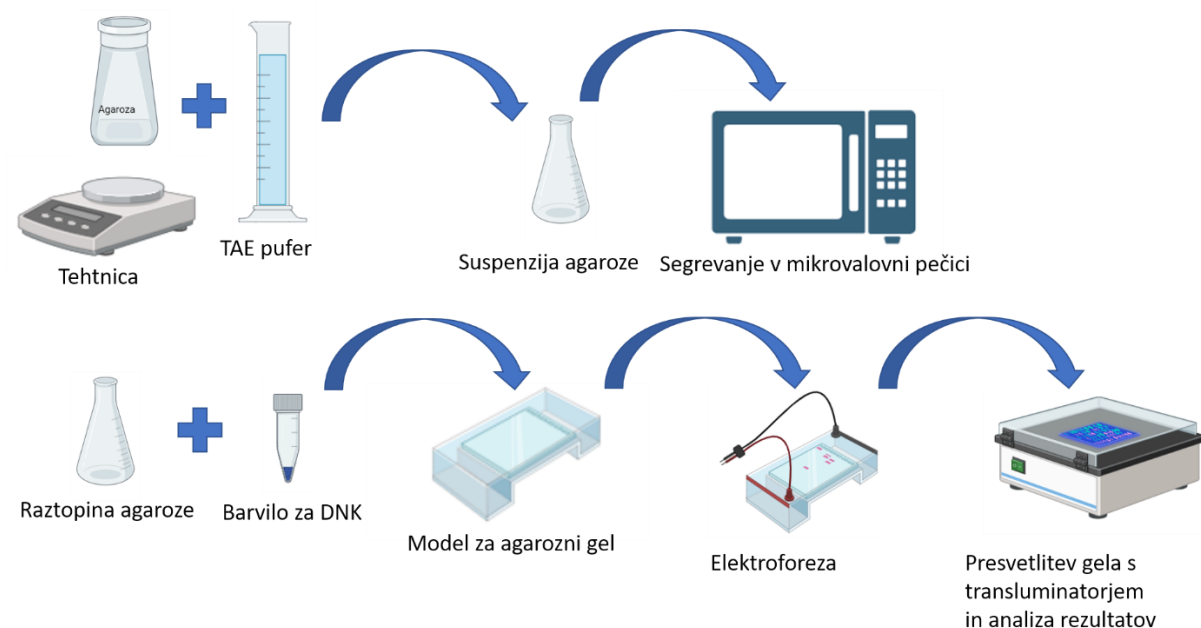


Mikrovolumski spektrofotometer

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

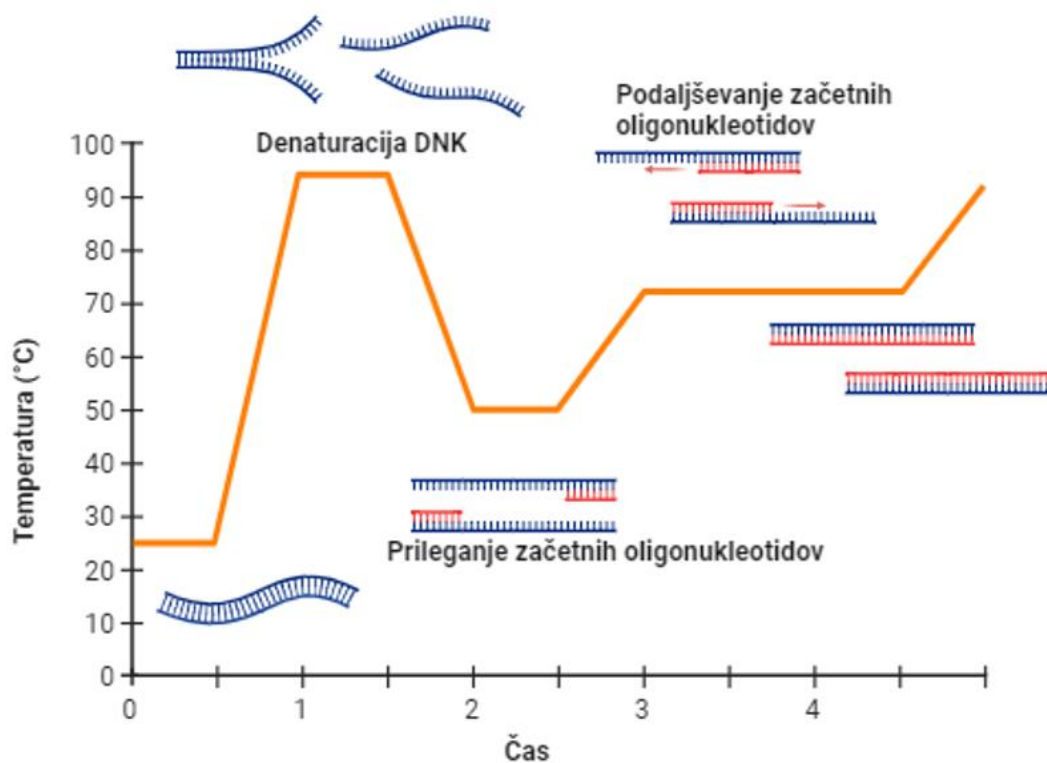
Izolirano DNK preverimo s pomočjo agarozne elektroforeze. Elektroforeza je separacijska metoda, ki nam poda informacijo o velikosti izolirane DNK. Za primerjavo velikosti na agarozni gel vedno nanesemo označevalec velikosti ali marker. Le-ta predstavlja niz fragmentov DNK z znano velikostjo, zato lahko 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 DNA. 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=W3OC3FUSEyLxCe9>

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 pufra 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 pufu 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

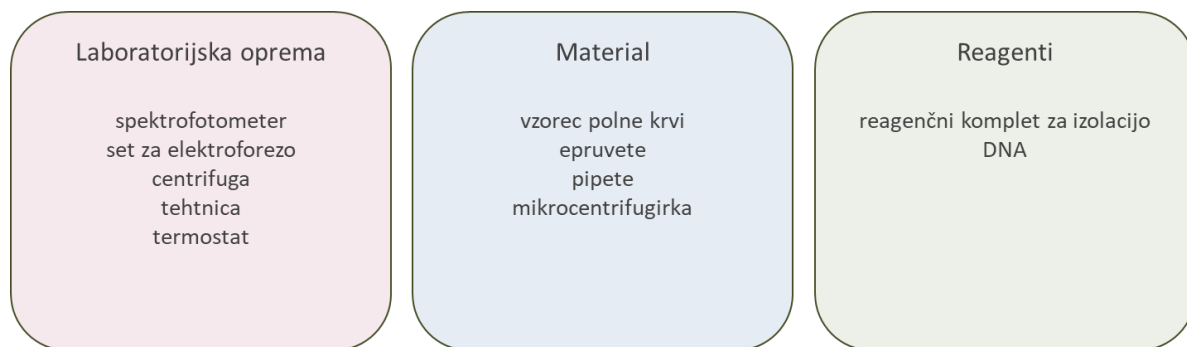
- V 1,5 mL epice napipetiramo reagente po spodnji shemi:

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

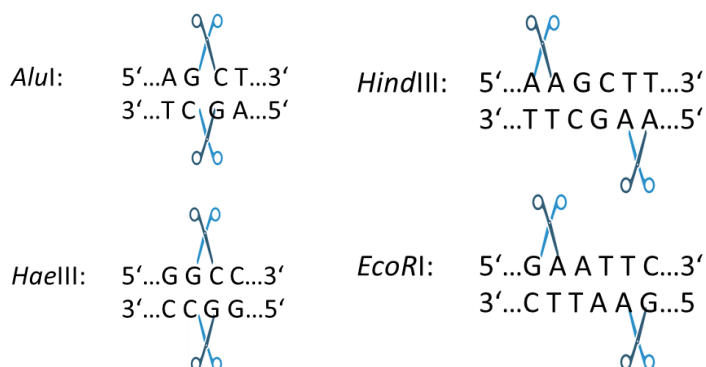
RESTRIKCIJSKE ENDONUKLEAZE

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 restirksijskih 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.



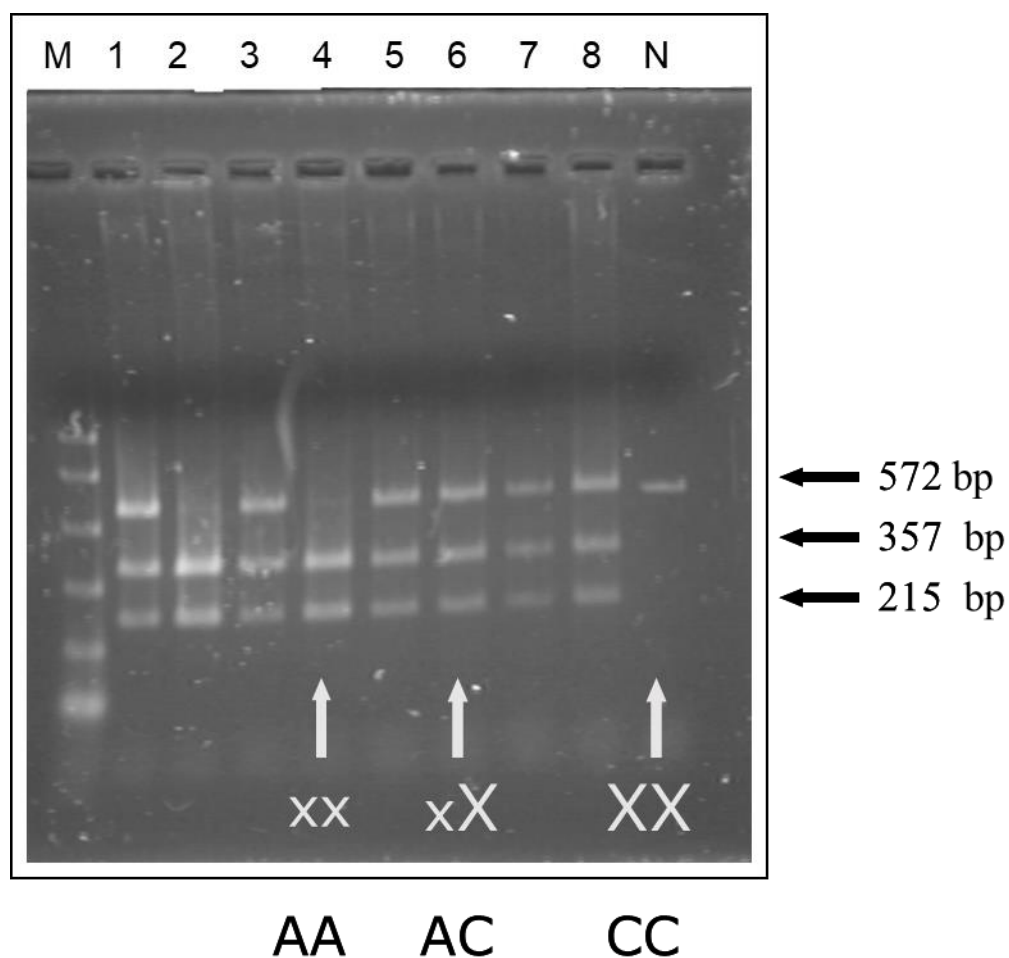
Slika 3. Encima *SmaI* in *XmaI* sta izoshizomeri.

ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (RFLP)

Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov ali krajše RFLP temelji na delovanju restrikcijskih 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 restrikcijsko 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 restrikcijsko 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 restrikcijsko 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

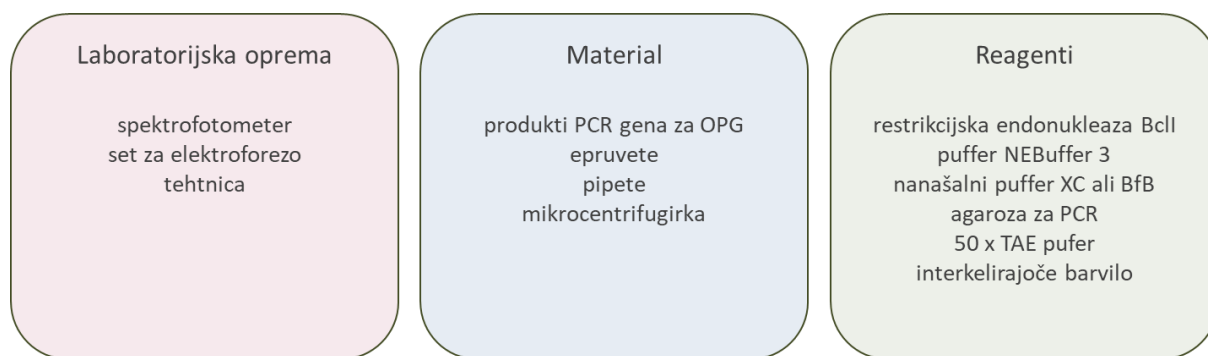
Sestavimo model za gel in vstavimo glavničke za 15 vzorcev. Gel pripravimo tako, da v erlenmajerico natehtamo 2,25 g agaroze, dolijemo 75 mL 1x TAE pufra in ponovno stehtamo. Pokrijemo z urnim steklom in pustimo 5 minut. Nato erlenmajerico postavimo v mikrovalovno pečico in segrevamo toliko časa, da 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:

BIOINFORMATIKA IN VIRTUALNI CELIČNI PROCESI

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

V prvem delu vaje boste spoznali nekatere prosto dostopne spletne podatkovne baze in bioinformacijska orodja, ki jih pogosto uporabljamo za iskanje ali analiziranje podatkov o bioloških molekulah. Naučili se boste, kje iskati specifične informacije, in se tudi sami preizkusili v brskanju za podatki na reprezentativnih primerih. Pri tem boste obnovili svoje znanje o strukturi genov, o posttranskripcijskih modifikacijah RNA in posttranslacijskih modifikacijah polipeptidov, o nivojih zgradbe proteinov in o strukturi celice. Skozi bioinformatično vajo vas bo vodil hipotetični scenarij. S pomočjo internetnih virov boste odgovarjali na zastavljena vprašanja.

V drugem delu vaje si boste ogledali animacije celičnih komponent (strukturo proteinov, DNA, kromosomov in plazmaleme), organelov in njihovih funkcij ter nekaterih celičnih procesov (mitoze, mejoze, replikacije DNA, transkripcije in translacije). Sproti boste odgovarjali na zastavljena vprašanja.

Prvi del

Kot bodoči kozmetologi/kozmetologinje vselej z zanimanjem preberete sestavo kozmetičnega izdelka na embalaži. Tako naletite na **retinol** kot biološko aktivno snov v kremi za pomlajevanje kože. Poiščete podatke o kemizmu retinola.

A. Poiskali boste zapis za spojino **retinol** v krovni podatkovni zbirki PubChem. Zbirka med drugim združuje podatke o proučenih čistih spojinah (PubMed Compound), o zmeseh, izvlečkih, kompleksih in neproučenih substancah (PubMed Substance) ter o bioloških aktivnostih spojin in substanc, pridobljenih z visokozmogljivimi presejalnimi testi (PubMed BioAssay). PubChem skupno vsebuje preko 300 milijonov vnosov za substance in spojine, ki so sestavljene iz manj kot 100 atomov oziroma imajo manj kot 1000 vezi. Zbirko vzdržuje Nacionalni center biotehnoških informacij (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), ki deluje v okviru Nacionalne medicinske knjižnice (NLM, *National Library of Medicine*) pod okriljem ameriškega Nacionalnega inštituta za zdravje (NIH, *National Institute of Health*). Iskanje je mogoče z uporabo ključnih besed (npr. *vitamin*, *antioxidant*), imen spojin (npr. *retinol*), stekturnih formul ali fragmentov le-teh, empiričnih formul, molske mase in drugih molekulskih deskriptorjev.

Spletni brskalnik usmerite na podatkovno zbirko PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). V iskalno vrstico vnesite **retinol** in zaženite iskanje. V zavihku *Compounds* med zadetki izberite zapis, označen s CID (*Chemical Identifier*)-številko 445354. Oglejte si strukturo datoteke.

V datoteki in drugih podatkovnih bazah poiščite:

1) trivialno ime za retinol: _____

2) ime po IUPAC: _____

3) biološko funkcijo retinola: _____

4) molsko maso retinola: _____

5) molekulsko formulo retinola: _____

6) podatke o topnosti v vodi in organskih topilih: _____

7) klasifikacijo retinola glede na tarčni receptor, na katerega deluje (najdete jo pod *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): Target-based Classification of Compounds*):

8) primer klinične raziskave, v okviru katere vrednotijo/so vrednotili učinkovitost retinola za izboljšanje kliničnih znakov staranja kože, s sledenjem povezavi *ClinicalTrials.gov* → vpišite termina: *Condition or disease*: **skin ageing**; *Other terms*: **retinol**:

9) encime, ki katalizirajo pretvorbo retinola v retinojsko kislino (retinoat) – najdete jih pod *Metabolism/Metabolites*:

retinol → retinal: _____

retinal → retinoat: _____

10) Kakšen je mehanizem delovanja retinojske kisline? _____

11) Kako lahko dostopate do literaturnih virov o metabolizmu retinola neposredno iz baze PubChem? _____

Zdaj veste že precej o retinolu, še vedno pa ne poznate mehanizma delovanja, ki ob topikalni aplikaciji vodi do revitalizacije kože. Radovednost potešite z brskanjem po znanstveni literaturi.

B. V bibliografski zbirki PubMed boste poiskali znanstvene članke na temo vloge **retinola** kot učinkovine, ki spodbuja **obnavljanje kože**. Zbirka pokriva področje naravoslovnih in biomedicinskih ved in vsebuje navedke z (večinoma) povzetki člankov ali (redkeje) celotnimi članki, v številnih primerih pa so prisotne tudi povezave do publikacij na spletnih straneh založb, ki izdajajo določene revije. Vzdržuje jo ameriška Nacionalna medicinska knjižnica. Posebnost zbirke PubMed je, da omogoča iskanje s pomočjo posebnega sistema besednjaka, imenovanega MeSH (*MEDical Subject Headings*). MeSH sestavljajo skupine sinonimov (tezaver), ki hierarhično zajemajo gesla in tako dovoljujejo iskanje bolj ali manj podrobnih informacij (primer je podan v prilogi 1 na strani 9). Seveda je mogoče iskati članke tudi po besedah v naslovu ali povzetku, imenih avtorjev in podobno. Pri iskanju si lahko pomagamo z logičnimi (Boolovimi) iskalnimi operatorji (AND, OR in NOT), z označevalci (*tags*), ki sledijo geslu (npr. [Author], [Publication date], [Journal] ipd.), ali tako, da iskanje omejimo oziroma usmerimo s funkcijo *Limits*. Z uporabo narekovajev dosežemo, da PubMed obravnava dve ali več besed kot besedno zvezo.

Spletni brskalnik usmerite na podatkovno zbirko PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Najprej vnesite v iskalno vrstico le geslo **retinol** in kliknite *Search*. Dobljeno število zadetkov: _____

Veliko število zadetkov zahteva omejitve iskanja s primerno izbiro gesel. Pregledni članki so odličen začetek, ko se želite informirati o določeni problematiki. Ponovite iskanje z gesloma **retinol** in **skin** ter hkrati omejite rezultate na pregledne članke (*review*) v angleškem jeziku. Dobljeno število zadetkov: _____

Med zadetki izberite članek avtorjev Babamirija in Nassaba (uporabite funkcijo *[Author]* oz. *[AU]* za priimkom avtorja; vzemite si trenutek, da preberete povzetek), s povezavo *Similar articles* pa si oglejte še tematsko sorodne publikacije. Dobljeno število zadetkov: _____

Odstranite omejitve iskanja in v iskalno vrstico vnesite **retinol AND (skin OR epithelium) AND "anti ageing"**. Dobljeno število zadetkov: _____

Preberite povzetek članka Rosettija in sodelavcev iz leta 2011. Izpišite imena treh proteinov, katerih sintezo spodbuja retinol. _____

Sama imena proteinov vam ne povedo veliko, zato preverite še nekaj podrobnosti o njihovi lokalizaciji, biološki funkciji in strukturi.

C. V podatkovni bazi UniProt boste odprli datoteke o posameznih proteinih, katerih izražanje spodbuja retinol in ki vzdržujejo strukturo kože, ter se poučili o lastnostih teh proteinov. UniProt (*UNiversal PROTein resource*) je centralna proteinska podatkovna baza, ki združuje informacije iz treh zbirk: Swiss Prot Švicarskega bioinformatičnega inštituta (SIB, *Swiss Institute of Bioinformatics*), TrEMBL Evropskega bioinformatičnega inštituta (EBI, *European Bioinformatics Institute*) in PIR-PSD Proteinskih informacijskih virov (PIR, *Protein Information Resource*), ki deluje pod okriljem ameriške Nacionalne fundacije za biomedicinske raziskave (NBRF, *National Biomedical Research Foundation*). V zbirki UniProt najdemo informacije o imenu proteina in gena, ki ga zapisuje, o funkciji proteina, o njegovi znotrajcelični lokalizaciji, o izraženosti proteina v različnih tkivih/organih, o domenski sestavi proteina (in vlogi posameznih domen), o vezavnih mestih za substrate in kofaktorje, o drugih proteinskih partnerjih ter o različicah proteina, ki so posledica naravne genetske variabilnosti, posttranskripcijskih modifikacij mRNA, alternativnega povezovanja eksonov, proteolitičnega procesiranja ali posttranslacijskih modifikacij.

Spletni brskalnik usmerite na strežnik ExPASy (EXpert Protein Analysis System; <http://www.expasy.ch/>) in izberite iskanje po zbirki UniProtKB. V iskalno vrstico vnesite **sapiens** (da omejite zadetke na človeške proteine) in angleško ime enega od treh proteinov iz naloge pod točko B. Med zadetki iskanja poiščite relevantne(ga).

Za izbrani protein izpišite:

- 1) polno ime proteina: _____
- 2) alternativno/-a ime(na) proteina: _____
- 3) ime gena, ki kodira izbrani protein: _____
- 4) koliko aminokislin gradi polipeptidno verigo: _____; od tega aminokislin v zrelem peptidu (po proteolitičnem procesiranju): _____ (od AK št. _____ do AK št. _____)
- 5) imena proteinov, s katerimi interagira: _____

- 6) v katerih tkivih je izražen: _____
- 7) subcelično lokalizacijo: _____

8) vrste posttranslacijskih modifikacij: _____

9) lokalizacijo posameznih domen in regij polipeptidne verige:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

10) kateri encimi in kje (na katerem mestu) cepijo prekurzorsko polipeptidno verigo:

_____	_____
_____	_____
_____	_____

11) tri primere modifikacij aminokislinskih ostankov:

_____	_____
_____	_____
_____	_____

12) število različnih proteinskih produktov kot posledice alternativnega spajanja eksonov:

Zgolj za vajo si oglejte še subcelično lokalizacijo spodaj navedenih proteinov (za hitrejši dostop do datotek posameznih proteinov lahko uporabite kar možnost iskanja po kodah UniProt, ki so navedene v tabeli I). Pri razumevanju si lahko pomagata z definicijami, do katerih pridete, če sledite povezavam.

Tabela I: Primeri proteinov z različnimi subceličnimi lokalizacijami. Z uporabo podatkovne zbirke UniProt dopolnite skrajno desni stolpec tabele.

<i>protein</i>	<i>koda iz UniProt</i>	<i>subcelična lokalizacija</i>
kalmodulin	P62158	
citokrom c1	P08574	
albumin	P02768	
adrenergični receptor β 1	P08588	
alkohol dehidrogenaza 1B	P00325	
bistin	Q13895	

Na dnu datotek posameznih proteinov pod rubriko *Cross-references* opazite povezave do podatkovnih baz nukleotidnih zaporedij genov, ki jih kodirajo. Sklenete si ogledati še, kakšne informacije vključujejo tovrstne zbirke.

D. Lahko bi sicer iz zapisa v bazi UniProtKB sledili povezavam na različne zbirke nukleotidnih zaporedij, a si boste ogledali le bazo Entrez Gene, ki jo vzdržuje NCBI. V zbirki najdemo osnovne informacije, kot so nukleotidna zaporedja gena, pripadajoče mRNA ter kodirajočega odseka znotraj mRNA (CDS, *coding sequence*), alternativna zaporedja mRNA in opis funkcije gena oz. njegovega produkta. Dodatno so v bazo vključeni podatki o tem, s

katerimi geni/proteini določen gen interagira, ter številne povezave do drugih podatkovnih zbirk (npr. PubMed), kjer lahko pridobimo zelo specifične informacije o genu in njegovem produktu.

Spletni brskalnik usmerite na zbirko Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) in v iskalno vrstico vnesite **sapiens** (da omejite zadetke na človeške proteine) in angleško ime enega od treh proteinov iz naloge pod točko B. Med zadetki iskanja poiščite relevantne(ga). Oglejte si strukturo datoteke!

Drugi del

Pozorno si oglejte animacije strukture evkariontske celice in celičnih procesov na spletni strani <https://www.youtube.com/user/ndsuvirtualcell/> in odgovorite na vprašanja.

A. Sprehod po celici (*Through the Virtual Cell*)

1) Katera organela igra osrednjo vlogo pri razpošiljanju proteinov na ustrezna mesta (npr. v endosome, celično membrano ali zunajcelični prostor) z vezikularnim transportom?

2) Kakšnih modifikacij so deležni proteini v Golgijevem aparatu? Kakšna je vloga teh modifikacij? _____

3) Na kakšen način potujejo proteini v mitohondrij (vrsta transporta)?

B. Transkripcija (*Transcription*)

1) Kakšna je vloga transkripcijskih dejavnikov?

2) Kako imenujemo odsek DNA, ki se prepiše v (m)RNA?

3) Kateri encim katalizira sintezo RNA na osnovi DNA kot matrice?

C. Zorenje mRNA (*mRNA Processing*) & Povezovanje eksonov (*mRNA Splicing*)

1) Katere so tri osrednje posttranskripcijske modifikacije mRNA?

2) Kako imenujemo dinamični ribonukleoproteinski kompleks, ki katalizira izrezovanje intronov in povezovanje eksonov?

3) Kaj je intron?

D. Translacija (*Translation*)

1) Naštejte tri faze translacijskega procesa.

2) Navedite nukleotidni zaporedji začetnega kodona (na mRNA) in pripadajočega antikodona (na tRNA). Kateri aminokislinski ostanek je vezan na iniciatorsko tRNA?

3) Kaj ustavi proces translacije?

E. Transport in razvrščanje proteinov (*Protein Trafficking*)

1) Opišite strukturo Golgijevega aparata.

2) Kakšna je funkcija Golgijevega aparata?

3) Kam potujejo proteini iz Golgijevega aparata?

F. Razvrščanje proteinov (*Protein Trafficking*) & Posttranslacijske modifikacije (*Protein Modification*)

1) Opišite strukturo Golgijevega aparata.

2) Kakšna je funkcija Golgijevega aparata?

3) Kam potujejo proteini iz Golgijevega aparata?

4) Kaj je glikozilacija?

G. Mitoza (*Mitosis*) & Mejoza (*Meiosis*)

1) Zapišite, kaj se dogaja med posameznimi fazami mitoze:

profaza: _____

metafaza: _____

prometafaza: _____

anafaza: _____

telofaza: _____

2) Kaj je posebnost prve profaze mejoze?

3) Ali so celice, nastale s prvo mejotično delitvijo, že haploidne ali še vedno diploidne?

4) Kaj je končni »produkt« mitoze in kaj mejoze?

H. Energijska poraba (*Energy Consumption*) & Fotosinteza (*Photosynthesis (Light Reactions)*) & Glikoliza (*Glycolysis (Overview)*) & Krebsov cikel (*Citric Acid Cycle (Overview)*) & Dihalna veriga (*Electron Transport Chain*)

1) Zapišite poenostavljeno kemijsko reakcijo, ki poteka v okviru zapletenega procesa fotosinteze. Za kakšno vrsto reakcije gre (oksidacijo ali redukcijo)?

2) Zakaj (kako) pri fotosintezi nastaja kisik? V kateri fazi fotosinteze se tvorijo sladkorji?

3) Zapišite poenostavljeno kemijsko reakcijo, ki poteka v okviru zapletenega procesa celičnega dihanja. Za kakšno vrsto reakcije gre (oksidacijo ali redukcijo)?

4) V katere faze razdelimo proces celičnega dihanja? Kateri so končni produkti posameznih faz?

5) Kje v celici poteka glikoliza?

6) Kje v celici poteka Krebsov cikel?

7) Zakaj (kako) pri celičnem dihanju nastaja voda?

Poročilo izdelal:

Datum:

Pregledal: