

Gyógyszerészi Biológia gyakorlatos jegyzőkönyv

PTE Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerészi Biológiai Tanszék

2022.

Tartalomjegyzék

Laboratóriumi munka-, baleset- és tűzvédelmi szabályok	2
Laboratóriumi rend:	2
Általános munkavédelmi és balesetvédelmi szabályok:	2
Általános tűzvédelmi szabályok:	3
1. Western Blott	6
2. RNS izolálás Trizol reagenssel	13
3. Plazmid DNS izolálása kompetens baktérium sejtekből	15
4. Agaróz gélelektroforézis	21
5. PCR gyakorlat	30
6. Sejttenyésztés	32

Laboratóriumi munka-, baleset- és tűzvédelmi szabályok

A laboratóriumban a tárasink és saját testi épségünk megóvása érdekében az alábbi rendszabályok betartása minden hallgató számára **kötelező!**

Laboratóriumi rend:

- 1) A laboratóriumban a hallgatók csak tanári engedéllyel mehetnek be, a helyiségben a gyakorlat alatt csak a gyakorlatvezető tanár, asszisztens illetve a gyakorlaton résztvevő hallgatók tartózkodhatnak.
- 2) A hallgatók a laboratóriumba csak a munkájához szükséges eszközöket hozhatják be pl. íróeszköz, jegyzőkönyv. Egyéb felszerelésüket (táskát, kabátot) a hallgatók az Tanszék által biztosított helyen tudják tárolni a gyakorlat ideje alatt.
- 3) **Köpeny viselése minden hallgató számára kötelező**, erről mindenkinek egyénileg kell gondoskodnia. Védőkesztyűt és védőszemüveget az adott munkafolyamatoknál a Tanészék biztosít. A gyakorlat ideje alatt a hosszú haj összefogása ajánlott!
- 4) **Tilos** a laboratóriumban enni, inni, rágózni, bármilyen anyagot megkóstolni!
- 5) Munka közben rendet és tisztaságot kell tartani, a kifolyt folyadékot, vegyszert azonnal töröljük fel.
- 6) **Tilos** minden egyéni kísérletezés, csak a gyakorlatvezető tanár utasításait betartva szabad dolgozni!
- 7) **Tilos** a laboratóriumi berendezések pl. tűzoltó készülék stb. nem rendeltetésszerű használata.
- 8) A laborban fontos az eszközök szakszerű használata. Csak olyan eszközt szabad használni, amelyek a gyakorlat során szükségesek.
- 9) A gyakorlat befejezésekor a munkaasztalok rendbetétele, az eszközök tisztántartása a hallgató feladat.

Általános munkavédelmi és balesetvédelmi szabályok:

- 1) Törött, repedezett üvegeszközzel dolgozni tilos!
- 2) A vágott sebet ne mossuk vízzel, kivéve, ha maró vagy mérgező anyag is került bele. Óvatosan nyomkodással, hagyjuk a jól kivéreznii a sebet és győződjünk meg arról, hogy nem maradt-e benne üvegszilánk, majd fertőtlenítsük a seb környékét. Kisebb sebre sebtapaszt, nagyobb sebre steril gézt tegyünk.
- 3) Gyúlékony, maró vagy mérgező anyagok használata során kötelező a védőkesztyű használata.

- 4) Csak felirattal ellátott üvegből vegyünk ki és csak ilyen edényben tároljunk vegyszert. A vegyszeres üvegek, edények fedelét ne cserélgessük össze, mindig a lapjával tegyük az asztalra. Így nem szennyezzük a vegyszert és az asztalt sem. A kifröccsent vagy kiszóródott vegyszert azonnal töröljük le.
- 5) A szilárd vegyszert csak tiszta vegyszeres kanállal vegyünk ki, melyet használat után mossunk el.
- 6) A kísérlet végén megmaradtoldószert tilos visszaönteni a vegyszeres üvegébe, amiből kivettük. A laborban erre kijelölt gyűjtőedénybe kell tárolni. A lefolyóba szerves oldószert tilos önteni!

Általános tűzvédelmi szabályok:

- 1) Az országos Tűzvédelmi Szabályzat tűzveszélyességi szempontból öt tűzveszélyességi osztályt, különbözetet meg, amelyet „A” „B” „C” „D” „E” betűkkel jelölnek.
„A”- Fokozottan tűz- és robbanásveszélyes
„B”- Tűz-és robbanásveszélyes
„C”- Tűzveszélyes
„D”- Mérsékelt tűzveszélyes
„E”- Nem tűzveszélyes
Mindig legyünk tisztába azzal, hogy milyen tűzveszélyességi osztályba tartozó anyaggal dolgozunk.
- 2) Tűzoltásnál az alábbi tényezők valamelyikének elvonása vagy megszüntetése szükséges:
 - éghető anyag
 - égést tápláló közeg (oxigén)
 - gyulladás hőmérséklet
- 3) A tűz oltását mindig az égő anyag tulajdonságainak és a tűz méretének figyelembevételével, a rendelkezésre álló, erre alkalmas eszközök, anyagok gyors számbavételével célszerű mielőbb, mindenre kiterjedően elkezdni.
- 4) A tűz oltását a rendelkezésre álló felszereléssel, eszközzel meg kell kísérelni.
- 5) Villamos berendezésekben, azok közelében keletkezett tűz esetén az oltás megkezdése előtt áramtalanítani kell.
- 6) Tűzoltás módjai lehetnek:
 - kisebb pl. asztali tűz esetén:* oldószergyulladás (néhány ml-nyi) esetén a tüzet nedves ruhával, pokróccal, főzőpohárral lefedjük, oxigéntől elzárjuk, esetleg vízzel oltjuk.
 - személyi tűz esetén:* Égő ruházattal gyorsan földre fekvé hempergő mozgást végezve oltjuk el. Ha szükséges használjunk biztonsági zuhanyt!
 - labortűz esetén:*

- A. Tűzoltó készülék alkalmazása: olyan eszköz, amelyből az üzembe helyezéskor az oltóanyagot a készülékben levő nyomás hatására irányíthatóan a tűz fészkére lehet kilőni. A kis, kezdődő tüzek oltásának legalkalmasabb eszközei.

A különböző típusú tüzek oltására különböző típusú tűzoltó készülékek alkalmasak. Az éghető anyagok tulajdonságai alapján az egyes tűzosztályok az alábbiak:

A tűzosztály: Szilárd szerves anyagok tüze

B tűzosztály: Folyékony vagy cseppfolyós szilárd anyagok tüze

C tűzosztály: Éghető gázok tüze

D tűzosztály: Fémek tüze

F tűzosztály: Olajok és zsírok tüzei

A tűzoltó készülék típusai:

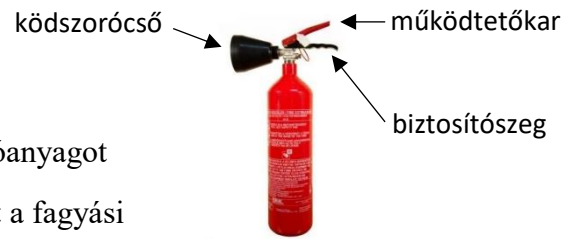
- I. Porral oltó: A tűzoltó készülék tartályában CO_2 van, a nyomás segítségével NaHCO_3 port fuvatunk ki. A NaHCO_3 a tűzben elbomlik és a fejlődő CO_2 elzárja a tüzet az oxigéntől. Felhasználását tekintve A, B és C osztályú tüzek oltására alkalmas. Elektromos készülékek oltására **nem alkalmas!**
- II. Habbal oltó: Általában A és B osztályú tüzek oltására alkalmas, viszont létezik olyan oltóteljesítményű készülék, mely használható az F osztályú tüzek oltására is. **Habbal oltani tilos elektromos áram jelenlétében**, mivel a hab vízzel kevert oltóanyag.
- III. Gázzal oltó: széndioxiddal oltó. Felhasználását tekintve általában B tűzosztály tüzei, illetve **elektromos tüzek oltására alkalmas**, hisz nem okoz károkat a berendezésben. A szén-dioxid az égő anyagra kerülve elpárolog, azt nem támadja meg, a villamos áramot nem vezeti, ezért előnyösen használható folyadékok, értékes anyagok és tárgyak, élelmiszerek, valamint tűz- és robbanásveszélyes anyagok szállításánál és tárolásánál.
- IV. Vízzel oltó: A vizet, mint oltóanyagot általában szilárd anyagok égésénél használjuk. **Vízzel oltani tilos elektromos áram jelenlétében, és szintén tilos vízzel oltani olyan szilárd halmazállapotú kémiai anyagokat melyek vízzel reagálhatnak.**

Égő személyt tűzoltó készülékkel oltani TILOS!

Szén-dioxidral oltó készülék működtetése:

1. a biztosítószeget kiszedése
2. a ködszórócsőt a tűz szélére irányítjuk
3. működtetőkar szakaszos nyomásával kijuttatjuk az oltóanyagot

A kiáramló oltóanyag alacsony hőmérséklete miatt fenn állhat a fagyási sérülés veszélye, ezért fokozott odafigyelést igényel.



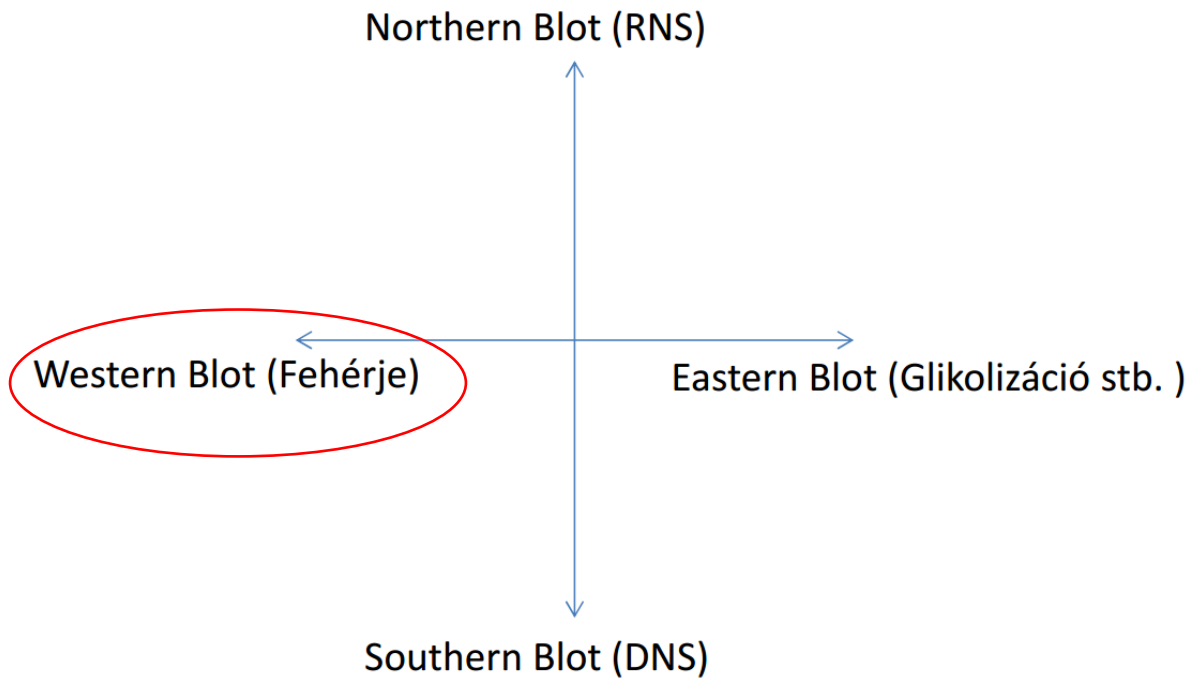
B. A fali tűzcsapok a tűz oltásához szükséges vízkivételi helyek, melyek szerelvényekkel és tartozékokkal felszerelt szekrényben találhatóak az épületekben. Elhelyezkedésüket „tűzcsap” felirat jelzi. A fali tűzcsapok nem csak a tűzoltók munkáját hivatottak támogatni, hanem elsősorban az épületben tartózkodók, a dolgozók gyors beavatkozását, tűzoltását segítik elő. **Használata csak áramtalanítás után történhet!** Vízkár keletkezése miatt a használatát mérlegelni kell.

- 7) Égett bőrfelületet azonnal bő folyóvízzel hűtsük le, majd az égésre alkalmas kenőccsel vagy spray-vel kezeljük. Súlyos esetben forduljunk orvoshoz.
- 8) Áramütés esetén először áramtalanítsunk a labor fő kapcsolóval. Eszméletvesztés esetén vigyük a sérültet friss levegőre, helyezzük stabil oldalfekvésbe és hívjunk orvost!
- 9) Mielőtt a gázvezeték fő elzáró csapját megnyitnánk, ellenőrizzük, hogy az egyes égők csapjai zárva legyenek, ezután helyezzük üzembe őket. A munka befejezésekor győződjünk meg róla, hogy az asztalokon lévő gázégő csapja és a fő elzáró csap is zárva van-e.
- 10) Ne hajoljunk munka közben a gázégő fölé!
- 11) A baleset megelőzése érdekében a használaton kívüli Bunsen-égőket oltunk el vagy állítsuk világítólámpára.
- 12) Ügyeljünk arra, hogy a munkánk befejezése után, a laboratóriumból való távozás előtt, minden gáz- és vízcsap el legyen zárva, az elektromos berendezések ki legyenek kapcsolva.

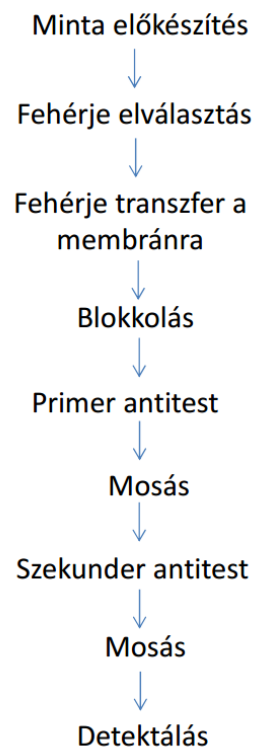
Rosszullét, sérülés vagy bármilyen baleset estén azonnal forduljon a gyakorlatvezető tanárhoz!

1. Western Blott

Specifikus fehérjék detektálási lehetősége egy mintában.

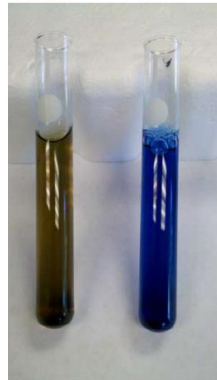


Western Blott lépései:



I. Minta előkészítés és kvantifikálás

- A lízis szövetfüggő!
 - Sejtkultúra -> sonicate (UH, Ultrasonic frequencies (>20 kHz))
 - Szövetminta -> homogenizálás
- Centrifugálni a törmelék eltávolításához
- Tartsa hidegen és használjon proteáz és foszfatáz inhibitorokat!
- Ha összevetni szeretné a mintákat, mindegyik mintában ugyanolyan mennyiségű fehérjét kell betöltenie.
- A pontos számszerűsítés fontos!
- Bradford-teszt
- BCA és Lowry vizsgálatokat. Kevésbé változó, de érzékenyebb a pH-ra, detergensre, EDTA-ra stb
- Fluorométer, A280. Pontos, de érzékeny a DNS szennyeződésre.



II. Fehérje elválasztás:

1) SDS-PAGE

A fehérjék megismeréséhez el kell különíteni őket.

- SDS-PAGE -> Fehérjék szétválasztása gélen a molekuláris tömegük alapján
- A fehérjéket denaturáljuk SDS-PAGE előtt.
- Megfelelő gél, puffer, futtatási kondíciók beállítása szükséges a méret szerinti szétválasztáshoz.
- 2D-PAGE

2) GÉLÖNTÉS

10%	Szeparáló gél /Separating
Akrilamid	3 ml
Deszt. víz	3.6 ml
Separating puffer (1.5M TRIS, pH 8.8)	2.25 ml
10% SDS	90 ul
10% APS	75 ul
TEMED	30 ul
10%	Gyűjtő gél /Stacking (felül, zsebes)
Akrilamid	0.53 ml
Deszt. víz	2.45 ml
Stacking puffer (0.5M TRIS, pH 6.8)	1 ml
10% SDS	40 ul
10% APS	50 ul
TEMED	10 ul

TEMED= tetramethylethylenediamine → katalizátor
APS= ammónium-persulfát → induktor } Polimerizáció beindul



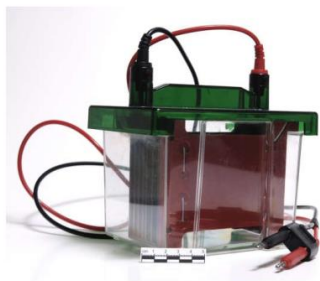
III. Fehérje transzfer a membránra

Transzferálják az elválasztott fehérjéket egy membránra, amelyet meg lehet vizsgálni az érdekelt fehérje kimutatására alkalmas antitestekkel.

Membrán lehet nitrocellulóz vagy PVDF (polivinilidén-difluorid)

Transzfer típusai:

Vizes



legjobb a proteineknek >100kDa

Félszárász

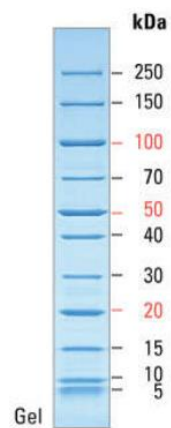
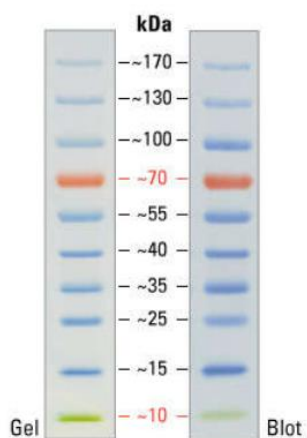


gyors

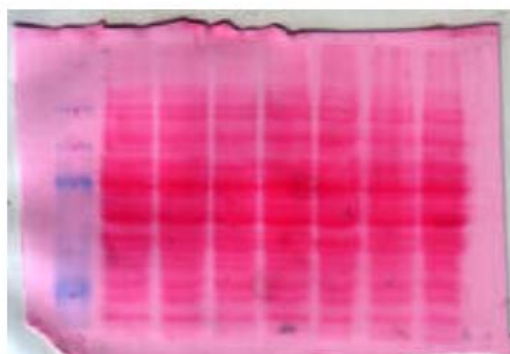
Szárász



leggyorsabb



Ponceau festés



IV. Blokkolás

Feltölti a membránon lévő helyeket a nem specifikus ellenanyag kötődésének megakadályozása érdekében. Ajánlott blokkolni > 1 órán át

Tej (tejpor, zsírtmentes)	BSA (borjú szérum albumin)
erős blokkol ágens kevesebb jel foszfoproteinekhez nem ajánlott olcsó	erős jel erős háttér

A mosáshoz használt oldatba hígítva (PBST - PBS-foszfát puffer vagy TBST - TBS-Tris puffer) Pl. 5% zsírtmentes tejpor TBST-ben.

V. Primer antitest

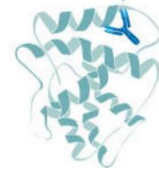
Antitest specifikus a kívánt fehérjére!

- Monoklonális
- Poliklonális

Monoklonális – egy antigén szekvencia – magas specificitás, alacsony háttér, de gyenge jel

- Átlagos m-Ab ~£200 / 100µl
- Egyedi m-Ab >£2000

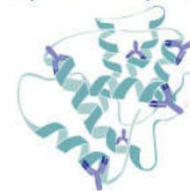
Monoclonal Antibody Binding



Poliklonális – több antigén epitóp – nagyobb háttér, erős jel

- Átlagos p-Ab £600-800

Polyclonal Antibody Binding



- Direkt HRP konjugált – kevesebb lépés, alacsonyabb jel
- Antitest mennyisége – empirikusan meghatározott (1/1000 - 1/5000)
- Inkubálás a mosópufferben vagy a blokkoló pufferben 1-2 óra szobahőn vagy O/N 4°C-on

VI. Mosás

Cél: Lemosni a nem kötődött antitestet

- Tris-Buffered Saline vagy Phosphate-Buffered Saline
- Tween-20 vagy Triton-X-100 (vagy más detergens T betűvel)
- Legtöbb esetben mindegy mit használunk, de a foszfoproteineknek a TBST talán jobb.

VII. Másodlagos antitest

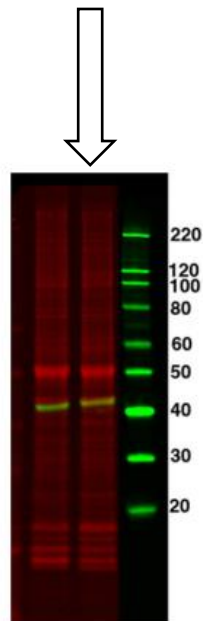
Elsődleges antitest IgG elleni antitest

- Konjugált – HRP, Alexa 488 stb.
- Hígításban 1/10000 – 1/100000 blokkoló pufferben
- Inkubáció ~2 óra szobahőn (RT)

VIII. Mosás

IX. Detektálás

- Kolorimetrikus – kevésbé érzékeny
- Radioaktív jelölés
- Fluoreszcens jelölt másodlagos antitest – erősen kvantitatív
- Kemilumineszcens – HRP vagy AP konjugált másodlagos Ab -nagyon érzékeny!



Kemilumineszcens detekció

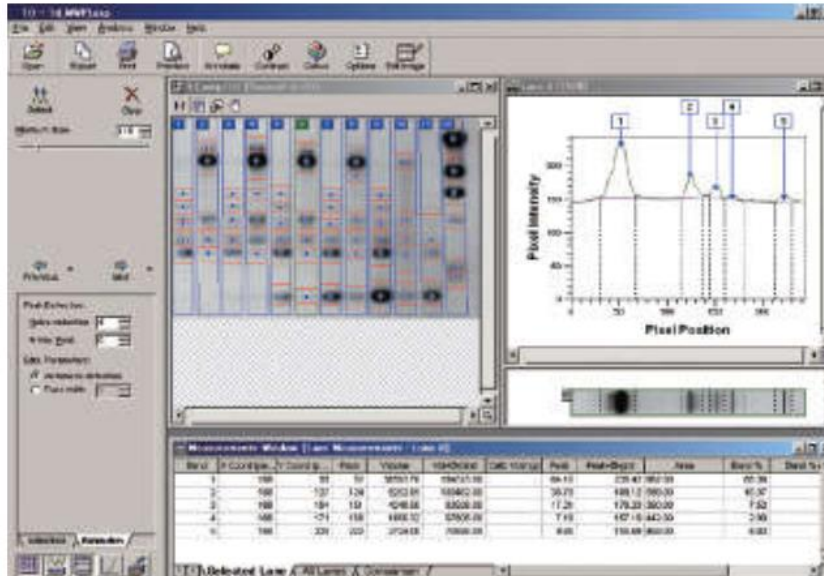
- 2 oldatot összekeverni → membránra pipettázni
- Várj 5 percet



Kvantifikálás

ImageQuant software kvantifikálja a blott eredményeket.

Fontos: a jel nem lineáris!



Kérdések:

1. Milyen problémák merülhetnek fel a módszer alkalmazása során?
2. Sorolja fel az előnyeit a Western Blott-nak?
3. Mik a hátrányai a Western Blott módszernek?
4. Mért szükséges a blokkolási lépés?
5. Milyen lehetséges alkalmazása lehet a módszernek?

2. RNS izolálás Trizol reagenssel

A Trizol egy guanidin-izotiocianátot és fenolt tartalmú reagens szövetekből való RNS izoláláshoz.

Figyelem! A Trizol reagens és a kloroform maró hatású! Bőrre, szembe kerülését kerüljük! Köpeny (begombolva) és gumikesztyű használata kötelező! Védőszemüveg használata ajánlott! Az RNS molekulák érzékenyek az RNázokra. Kesztyű és maximális koncentráció használata kötelező!

I. Protokoll lépései:

1. Homogenizálás.

- Adj 0,5 ml Trizolt 50-100mg szövethez, majd homogenizáld!

2. Fázis szeparáció.

- Inkubáld a mintát 3' @ RT (szobahőmérsékleten), hogy a nukleoprotein komplexek teljesen disszociáljanak.
- Adj 0,1 ml kloroformot a csőhöz, zárd le gondosan majd rázd 15''!
- Inkubáld 3' @ RT!
- Centrifugáld 10' @ 12 000g! A mintában három fázis fog elkülönülni: egy alsó, piros fenolkloroform fázis, egy interfázis és egy felső, színtelen vizes fázis. Az utóbbi tartalmazza az RNS-t.

3. RNS precipitáció.

- Óvatosan pipetázd át a felső fázist egy új csőbe! A középső fázishoz ne érh hozzá!
- Adj hozzá 0,5ml izopropil-alkoholt!
- Inkubáld 3' @ RT!
- Centrifugáld 7' @ 12 000g! A cső alján zselé szerűen kicsapódik az RNS.

4. Mosás.

- Távolítsd el a felülúszót pipetázással!
- Adj az üledékhez 1ml 75%-os etanolt!
- Vortexeld, majd centrifugáld 5' @ 7 500g!

5. Az RNS visszaoldása.

- Gondosan távolítsd el az etanolt pipetával!
- Száríts a mintát szobahőmérsékleten 5-10'!
- Vedd fel az RNS-t 50µl desztillált vízben!

További lépések: RNS mennyiségének és tisztaságának meghatározása. cDNS szintézis.

II. Kérdések:

1. Miért szükséges gumikesztyű viselése az izolálás során?
2. Milyen fiziológias szerepe van az RNáz enzimeknek?
3. Mi kontaminálhatja az izolált RNS mintát?
4. Miért szükséges a fázis szeparációs lépés?
5. Mi az RNS precipitáció?

3. Plazmid DNS izolálása kompetens baktérium sejtekből

Plazmidok

Feladat: DNS védelme, bejuttatása és osztódása a gazdasejtben

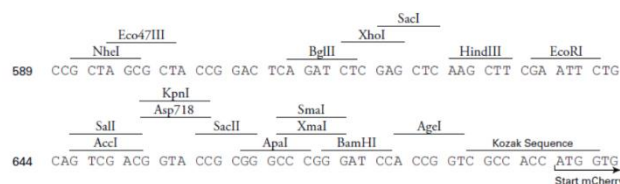
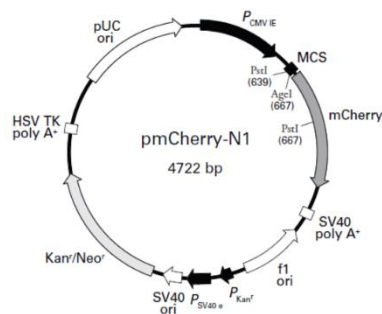
- nem esszenciális, extrakromozómális cirkuláris duplaszálú DNS molekulák
- önálló replikációra képesek
- természetben is elterjedtek

természetes plazmidok:

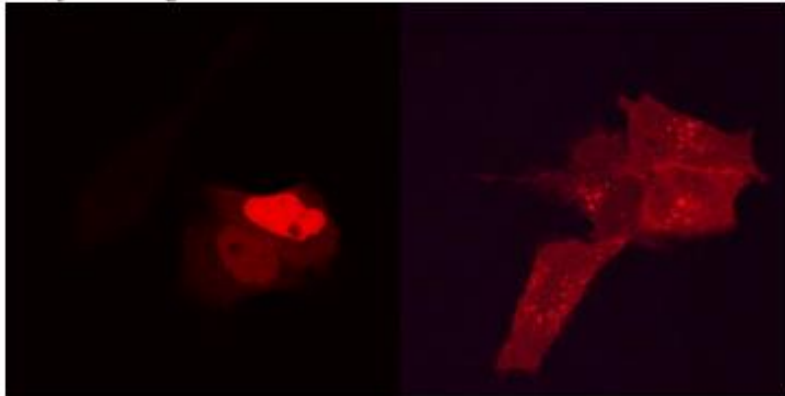
- 3-20 kb nagyságúak, általában rezisztencia/túlélést segítő gént hordoznak, melyek a környezethez való alkalmazkodást segítik
- egyik sejtől a másikba képesek átjutni

mesterséges plazmidok:

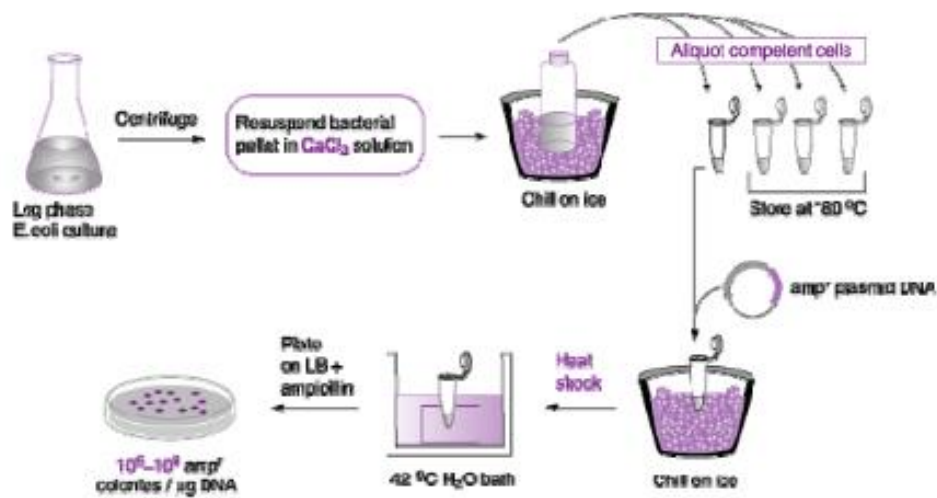
- kisebbek 3-6 kb nagyságúak, moduláris felépítésűek
- multiple cloning site-egyedi hasítási helyekkel (polilinker régió)
- szelektációs (marker) gént tartalmaznak
- mechanikus behatással szemben védett térszerkezetűek
- alacsony és magas kópiaszámúak lehetnek
- lehetnek klónozási és expressziós vektorok
- Klónozás: adott DNS szakasz bejuttatása a célsejtbe (akármekkora DNS szakasz nem építhető be a plazmidba, mivel instabillá válik, eltörhet és kihalhat az inszert)
- expresszió: a DNS szakasról mRNA majd fehérje íródik át; ehhez a plazmid promóter szekvenciája komplementer térszerkezetet kell adjon a gazdasejt mRNA-polimerázával (gyenge és erős promóter)
- ATG és STOP kodon
- fehérjeszelektáció lehetősége: tag-ek pl. RFP, GST, His, HA, Myc stb. tisztítás a tag-re specifikus ellenanyaggal
- fluoreszcens fehérje tag: in vivo is vizsgálható



fehérje+RFP tag



Kompetens baktériumok előállítása



Pufferek és oldatok

- Sol I.
- Sol II.
- Sol III.
- Abszolút alkohol
- 80%-os alkohol
- steril deszt. víz

Sol I.
25mM Tris-HCl pH 8
10mM EDTA pH 8
0,1mg/ml RNase A

Sol II.
0,2M NaOH
1% SDS

Sol III.
3M K-acetát pH 4.8
(5M K-acetát + jégcet)

pTriex-3 neo plazmid Izolálási lépései:

1. 1,5 ml baktérium kultúrát Eppendorf csőben centrifugálunk 1perc/max. fordulaton.
2. Felülúszót leöntjük.
3. A pellethez 150 μ l Sol I-et adunk, majd vortexeljük 2x30 sec-ig.
4. A szuszpenzióhoz 150 μ l Sol II-t adunk, majd 6-8-szor átforgatjuk.
5. A folyadékhoz további 200 μ l Sol III-at adunk, majd 6-8-szor átforgatjuk.
6. 10 percig max. fordulaton centrifugáljuk.
7. A felülúszót új csőbe pipetázzuk.
8. Hozzáadunk 1ml abszolút etanolt, majd 5-6-szor átforgatjuk.
9. 5 percig max. fordulaton centrifugáljuk.
10. A felülúszót leöntjük.
11. A pellethez 1 ml 80%-os etanolt adunk, majd 2 percig max. fordulaton centrifugáljuk.
12. A felülúszót óvatosan leszívjuk.
13. A pelletet 15 percig száradni hagyjuk.
14. Az etanol elpárolgása után a mintát 50 μ l steril deszt. vízben felvesszük és szuszpendáljuk.

Kromoszómális DNS izolálása E.coli sejtekből:

DiaExtract Microbial DNA Isolation Kit

A kit felhasználásával gyorsan izolálhatunk genomiális DNS-t különböző mikrobiális mintákból. A rendszer kialakítása lehetővé teszi a tradicionális lizozimmel történő lízist és a törő-homogenizáló készülékkel történő izolálást is baktériumokból, egysejtű gombákból és más mikrobákból.

A homogenizáló készülék használata lehetővé teszi a teljes homogenizációt a mikroba mátrix szétzúzásával. A mechanikai törés egy nagyon gyors, hatékony és jól reprodukálható homogenizációs eljárás, az enzimatis degradációval szemben. A mintákat 2.0 ml-es törő csövekbe tesszük, mely üveg morzsalékot és egy rozsdamentes acél golyót tartalmaz. A homogenizációt Lizis pufferben végezzük. Ha a labor nem rendelkezik törő készülékkel, akkor a tradicionális lizáló protokollt használhatjuk, a lizis puffert lizozimmel kiegészítve. A lízist követően üleptjük a sejttermelékot, majd a kötő mátrix segítségével a kettős szálú DNS molekulákat kihorgonyozzuk. A DNS ezt követően tisztítjuk és sótalanítjuk a mosó pufferrel. Végül a DNS-t eluáljuk. Az így tisztított DNS alkalmas emésztésre, PCR-hoz, elektroforézishez és további downstream felhasználáshoz.

Protokoll:

1. 1,5 ml baktérium kultúrát pipetázzunk egy eppendorf csőbe.
2. Centrifugáljuk 10000 rpm-mel 1 percig.
3. Öntsük le a felülúszót.
4. Ismételjük meg az 1-3 lépéseket ugyanazzal a csővel.
5. Adjunk 1 ml Lizis puffert a pelethez.
6. Szuszpendáljuk fel pipetázással.
7. Rakjuk át a szuszpenziót egy törő csőbe.
8. Vortexeljük 2 x 1 percig.
9. Centrifugáljuk a mintát 10000 rpm-mel 1 percig.
10. 600 µl felülúszót pipetázzunk át egy új eppendorf csőbe.
11. Adjunk 200 µl Kötő mátrixot a mintához.
12. Óvatosan keverjük össze rázással 5 percig.
13. Centrifugáljuk a csövet 3000 fordulattal 1 percig.
14. Öntsük le a felülúszót.
15. Adjunk 500 µl Mosó puffert a mátrixhoz és szuszpendáljuk pipetával.
16. Centrifugáljuk a csövet 3000 fordulattal 1 percig.
17. Öntsük le a felülúszót.
18. Ismételjük meg a 15-17. lépéseket.
19. Adjunk 50 µl PCR tisztaságú vizet a mátrixhoz és keverjük össze óvatos rázással 2 percig.

20. Centrifugáljuk a mintát 10000 rpm-mel 2 percig.

21. Pipetázzuk át a felülúszót egy új csőbe.

DNS koncentráció meghatározása spektrofotométerrel:

1. A mintából 10 µl-t 300 µl-re hígítunk steril deszt.vízzel egy eppendorf csőben.
2. A mintát pipetával szuszpendáljuk, majd kvarcküvetába/egyszer használatos UV fényt áteresztő műanyag küvetába pipetázzuk.
3. A fotométert deszt. vízre kalibráljuk (küvetába 300 µl deszt. vizet pipetázunk).
4. Ezt követően megmérjük a minta UV fény elnyelését (abszorbancia).

Meghatározás **260 nm**-en történik.

Számolás menete:

$OD \times \text{hígítás foka} \times 50 \mu\text{g/ml (dsDNS)} = \mu\text{g DNS/ml}$

50 = 50 µg/ml-es a kettős szálú DNS-t tartalmazó oldat optikai denzitása 1.

DNS koncentráció meghatározása Implen nanofotométerrel

1. A fotométert 2 µl deszt. vízzel kalibráljuk.
2. A mintából, hígítás nélkül (!) 2 µl-t a küvetára pipetázunk.
A készülék egyszerre határozza meg a minta elnyelését 260, 280, 230 és 320 nm-en.
A 260/280 arány a minta fehérjetartalmát mutatja. Akkor jó, ha az érték 1,8 fölött van.
230 nm-en az elnyelés a minta alkohol tartalmát mutatja. $260/230 > 1,5$
320 nm-en az esetleges szennyeződések/partikulumokat határozhatjuk meg.
3. A készülék közvetlenül megadja a minta DNS koncentrációját ng/µl-ben

Kérdések:

1. Mért fontos a pTriex-3 neo plazmid izolálása során a pufferoldatok alkalmazása?
2. Mi lehet a célja a DNS izolálásnak?

3. Mért szükséges a kalibráció a spektrofotométer, ill. a nanofotométer használatakor?

4. Számolás: DNS koncentráció meghatározása:

OD:

hígítási fok:

4. Agaróz gélelektroforézis

Különböző minőségű agarózok használatosak a DNS mérete alapján.

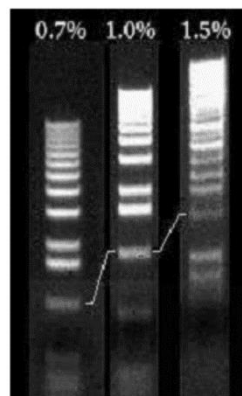
Pufferek:

- TAE- Tris-acetát-EDTA pH 7,6-7,8
- TBE-Tris-borát-EDTA pH 8,3

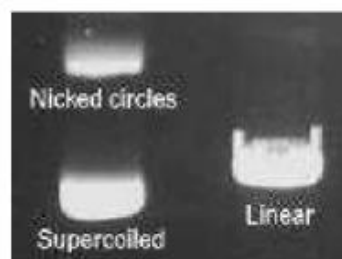
Megfelelő hígításban használandó!

DNS futását befolyásoló tényezők:

1. A DNS molekula mérete: futás sebessége fordítottan arányos a molekulásúly tízes alapú logaritmusával.
2. Az agaróz koncentrációja: a DNS elektroforetikus mobilitásának a logaritmus és a gélkonzentráció között egyenes arányosság van.



3. A DNS konformációja: az azonos molekulásúlyú zárt cirkuláris, hasított cirkuláris és lineáris DNS különböző sebességgel vándorol.



4. Az alkalmazott áramerősség: alacsony feszültségen a lineáris DNS vándorlása arányos a feszültséggel. Magas feszültségen a nagyobb fragmentumok relatíve gyorsabban vándorolnak, mint a kisebbek (5V/cm).

Loading pufferek, festékek

Szerep: a puffer tartja a DNS-t a zseb alján, nem engedi kidiffundálni.

- Negatív töltésű festék
- Brómfenol-kék, Xilén-cianol
- Glicerin vagy szukróz
- Gyári loading festék: több típusú festéket tartalmaz egyszerre

Vizualizálás

- etídium bromid: interkaláló festék, kevésbé érzékeny, rákkeltő, DNS károsító hatása van; előny: belekeverhető a loadingba, a gélbe, vagy a gél utólag is megfesthető vele; UV tartományban detektálható
- SYBR festékek (green, gold, ruby stb): interkaláló festék, nagy érzékenységgű; előny: nagyon kevés kell belőle, rákkeltő hatása nem ismert, belekeverhető a loadingba és a gélbe, látható fényel gerjeszthető
- Ezüstözés: nagyon érzékeny, drága

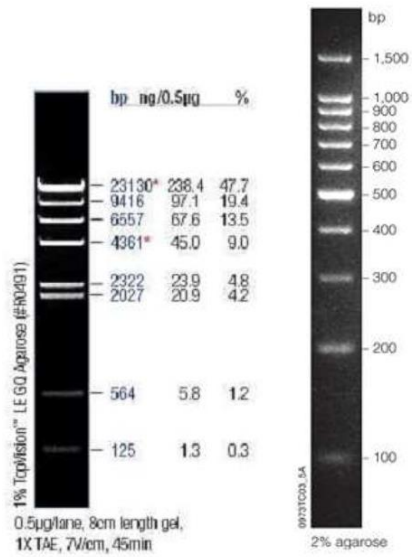
Mennyi DNS-t kell a géltre vinni?

- függ attól, mivel vizualizálunk
- kb. 20 ng DNS már jól látható
- ha túl sokat viszünk fel, a méret meghatározása nehéz

Molekulasúly markerek/DNS létrák

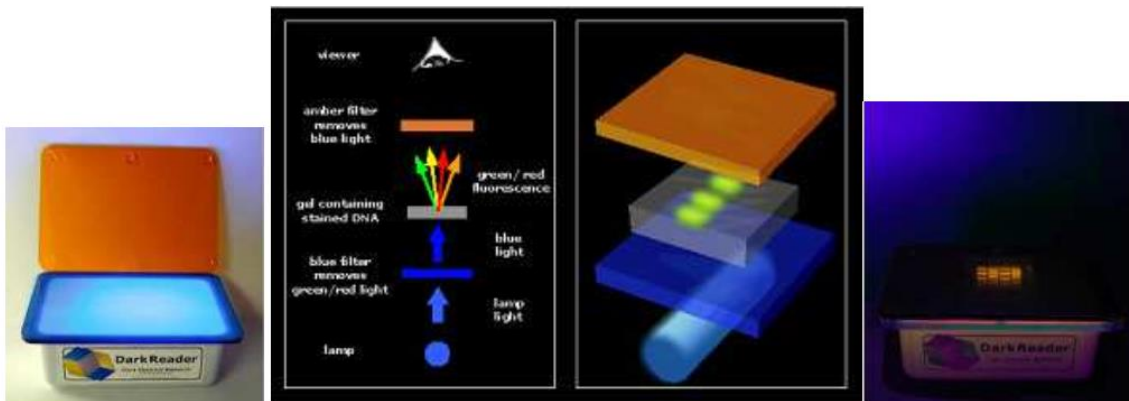
Szerep: segítségükkel meghatározhatjuk a DNS molekulák méretét.

- Pontos méret meghatározást csak hasított cirkuláris vagy lineáris DNS esetén lehet meghatározni.
- A plazmid DNS molekulák nem mindig pontosan a méretük szerint futnak. Ennek oka a cirkuláris DNS tekeredése.
- Sokféle DNS marker létezik.
- Mindig a vizsgált DNS méretének megfelelő markert kell használni.
- A létrák már tartalmazzák a loading festéket, csak a vizualizáláshoz szükséges festéket kell hozzájuk adni.
- Kis mennyiségben szükségesek, általában 1,5-3 ul elegendő egy futtatáshoz.



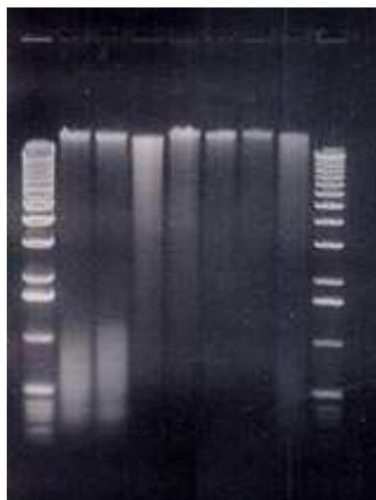
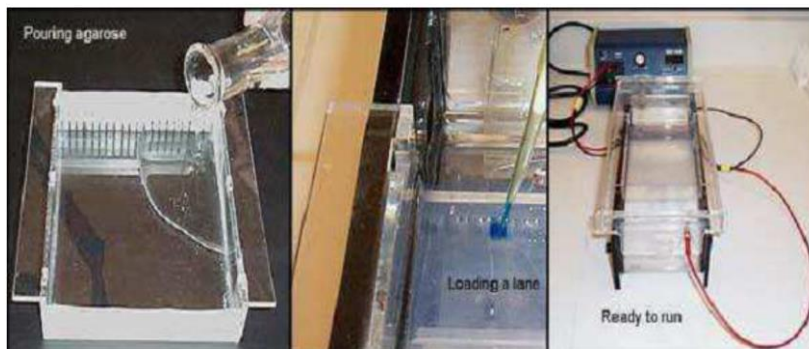
DNS detektálása

- UV transzilluminátor- UV fényel gerjeszt, UV szűrő!
- Transzilluminátor- kék fényel gerjeszt, narancssárga szűrőt használ, ami elnyeli a kék fényt
- Géldokumentációs rendszer – különböző hullámhosszúságú fényel tud gerjeszteni, emissziót detektálja, gélfotó készítés



Plazmid DNS és kromozómális DNS agaróz gélelektroforézise

1. 1%-os agaróz gél készítése: 1 g agarózhoz 100ml 1X-es TAE puffert adunk
2. Mikrohullámú sütőben feloldjuk (rövid ideig melegítjük, majd kivesszük és összelötyögtetjük, vigyázat forró és kiforhat a keverés közben!!!)
3. 15ml-t a gél kiöntőjébe öntünk.
4. Belehelyezzük a fésűt.
5. Dermedést követően a kádba helyezzük
6. Parafilmot vágunk.
7. 2 x 2 μ l 6X loading festéket cseppentünk ki a parafilmre (6 ul mintához kéne 1 ul loading festék)
8. 0,5 μ l 10X Sybr Gold festéket 10 ul mintához kell 1 ul festék) adunk a loadinghoz.
9. 5 ul plazmid és 10 μ l kromozómális DNA mintát pipetázunk a festékhez.
10. Összekeverjük pipettával, majd a gél egy-egy zsebébe pipetázzuk óvatosan.
11. Kb. 10 percig 100V-on futtatjuk.
12. Detektáljuk.



Kromozómális DNS agaróz gélelektroforézise

DNS molekulák emésztése restriktív enzimekkel

A restriktív endonukleázoknak három típusa ismert.

I-es típusú restriktív endonukleázok: pl. EcoKI

- Felismerési szekvencia: AAC(N6)GTGC
- Hasítás: nem a felismerési szekvencián belül hasít, ~1 kb a felismerési helytől
- 3 alegység: endonukleáz és metiláz

III-as típusú restriktív endonukleázok: pl. EcoPI

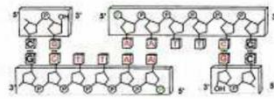
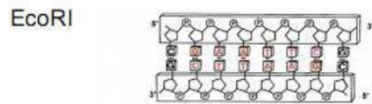
- Felismerési szekvencia: AGACC 2x
- Hasítás: nem a felismerési helyen belül hasít, 22-24 bp-ra töle
- 2 alegység: metiláz és nukleáz

II-es típusú restriktív endonukleázok:

- Meghatározott felismerési szekvenciával rendelkeznek, a szekvencián belül meghatározott helyen hasítanak, ezért specifikusak
 - 4, 6, 8 bp hosszúságú felismerési szekvenciájuk van.
 - Palindrom szerkezetűek: mindkét szálon azonos a szekvencia.
 - A DNS mindkét szálát hasítják.
 - 3' vagy 5' túlnyúló véget adhatnak- ún. ragadós vég (EcoRI, EcoRV, BamHI stb.)
 - középen hasít- tompa véget ad (SmaI, EcoRV)
 - két külön fehérje az endonukleáz és a metiláz
 - több mint 3500 típus (750 törzs)
 - elnevezésük a prokarióta nevéből adódik, számuk attól függ, hogy hányadik restriktív enzimként írták le az adott mikroorganizmusban pl EcoRI, HindIII stb.
- HindIII Haemophilus influenzae d szerotípus, 3. enzim

EcoRI G↓AATTC 5' túlnyúló vég
BamHI G↓GATCC 5' túlnyúló vég
NotI GC↓GGCCGC 5' túlnyúló vég
EcoRV GAT↓ATC tompa vég
SmaI CCC↓GGG tompa vég
KpnI GGTAC↓C 3' túlnyúló vég
BstXI CCANNNNN↓TGG megszakított palindrom

Működésükhöz optimális pH és puffer összetétel és hőmérséklet szükséges!

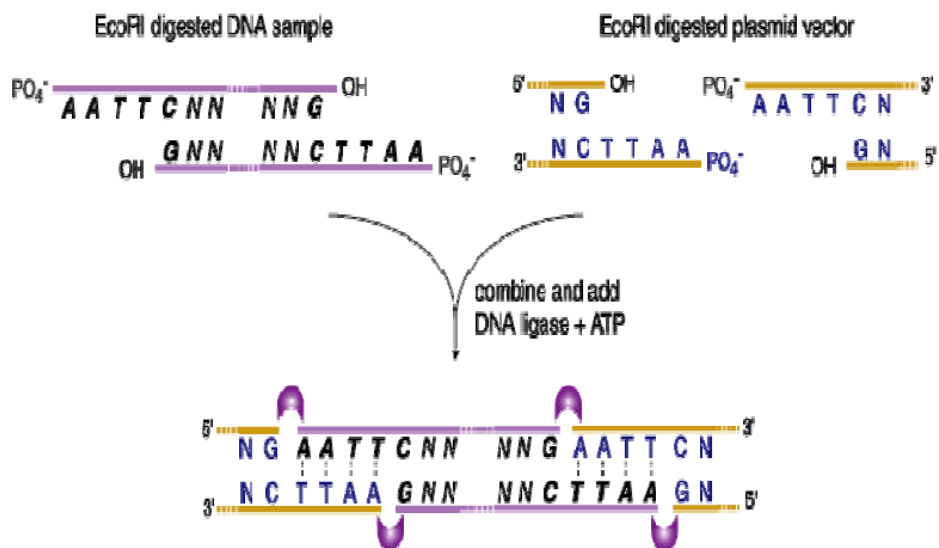


Mire használhatók?

- DNS vektorokba pl. plazmidba szakaszok, gének klónozása
- DNS szekvencia ellenőrzése, szekvenálás

Klónozás:

- meghatározott DNS szakaszt, olyan restriktációs endonukleázokkal emésztünk, melyek magát a szekvenciát nem hasítják. Az ehhez szükséges hasítási helyeket PCR segítségével építjük a DNS szakasz 3' és 5' végére.
- A kiválasztott vektort (plazmidot) ugyanezekkel az enzimekkel emésztjük (a hasítási helyek a polilinker régióban található, egyedi hasítási helyek), az emésztést követően a plazmid lineáris lesz
- Az emésztett plazmidot és DNS szakaszt T4 DNS ligáz enzim segítségével kötjük össze-

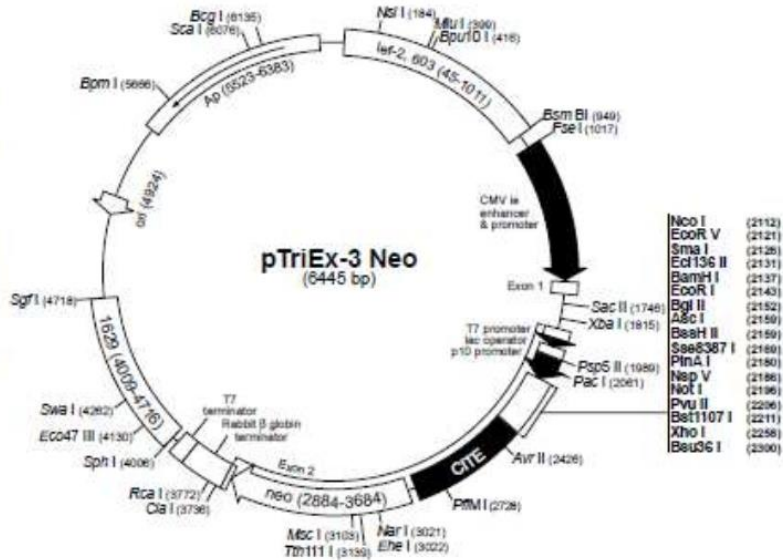


pTriEx-3 Neo sequence landmarks

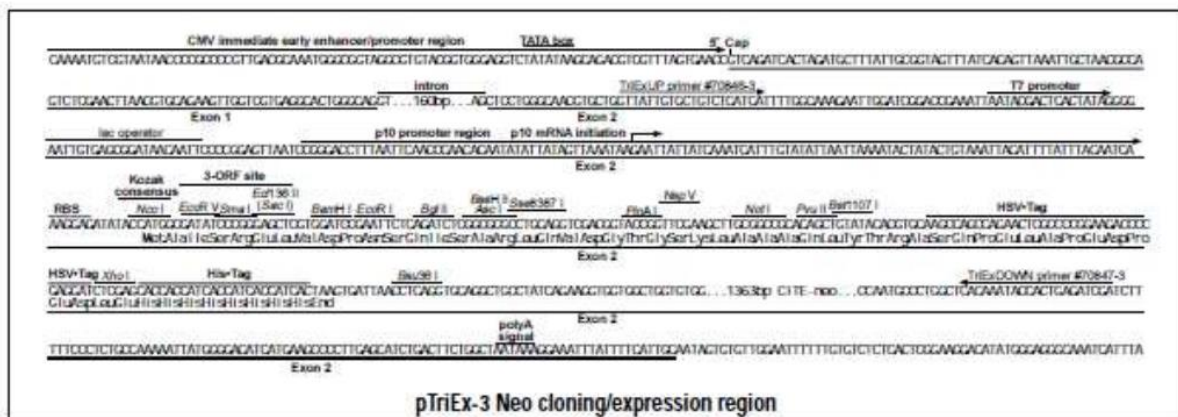
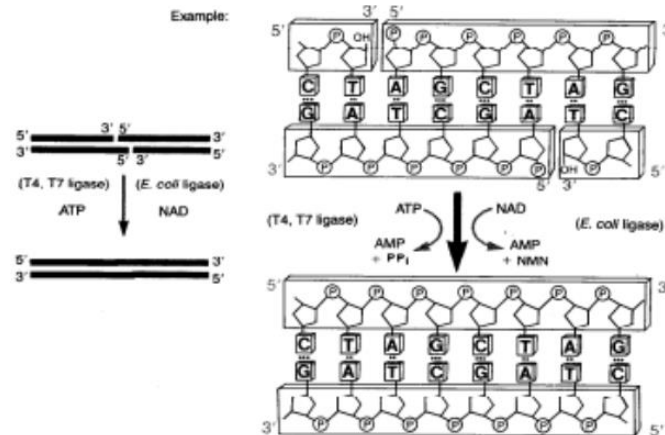
CMV ie enhancer/promoter	1021-1597
Vertebrate transcription start	1598
T7 promoter	1931-1947
T7 transcription start	1948
<i>lac</i> operator	1952-1972
p10 promoter region	1986-2099
p10 transcription start	2030-2031
Multiple cloning sites (<i>Neo</i> I- <i>Bsu</i> 36 I)	2112-2300
HSV-Tag [®] coding sequence	2222-2257
His-Tag [®] coding sequence	2264-2287
CITE sequence	2349-2848
<i>neo</i>	2884-3684
Rabbit globin terminator region	3705-3947
T7 terminator	3948-3995
pUC origin	4924
<i>bla</i> coding sequence	5523-6383

¹ patent pending

² The CMV promoter is covered by U.S. Patent nos. 5,168,062 and 5,385,839 issued to the University of Iowa Research Foundation and is licensed for research use only.



Example:



Plazmid és kromozómális DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal

Reakció összerakása:

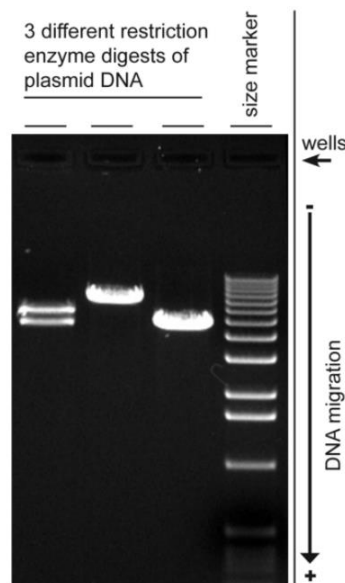
1. Egy eppendorf csőbe 11 ul steril deszt. vizet pipetázunk.
2. Hozzáadunk 2 ul 10X-es restrikciós endonukleáz zöld puffert
3. Hozzáadunk 5 ul plazmidot
4. Hozzáadunk 1-1 ul EcoRI-XhoI enzimet
5. Lepörgetjük, majd 37 °C-on 10 percig inkubáljuk.

2. Reakció összerakása:

1. Egy eppendorf csőbe 7 ul steril deszt. vizet pipetázunk.
2. Hozzáadunk 2 ul 10X-es restrikciós endonukleáz zöld puffert
3. Hozzáadunk 10 ul kromozómális DNS-t
4. Hozzáadunk 1 ul EcoRI enzimet.
5. Lepörgetjük, majd 37 °C-on 10 percig inkubáljuk.

Agaróz gélelektroforézis

1. 1%-os agaróz gélt öntünk, a korábbiakhoz hasonlóan.
2. A DNS létrából (λ /HindIII) 3 ul-t parafilmre cseppentünk.
3. Hozzáadunk 0,3 ul 10X SYBR Gold-ot, összekeverjük, majd a gél első zsebébe pipetázunk.
4. Az 1. és 2. reakcióelegyhez egyenként 2-2 ul 10X SYBR Goldot.
5. A mintákból 16-16 ul-t a következő zsebekbe pipetázunk.
6. A gélt kb. 15 percig 100V-on futtatjuk.
7. Detektáljuk a csíkokat.
8. Határozzuk meg a DNS méretét.



Kérdések:

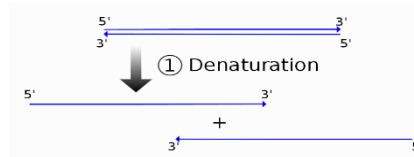
1. Mi befolyásolhatja a DNS futtatást?
2. Mi a szerepe a DNS létrának?
3. Milyen módon történhet a DNS detektálása?
4. Mire használhatóak a restrikciós endonukleázok?
5. Mi az agaróz gélelektroforézis alapelve?

5. PCR gyakorlat

A polimeráz lánreakció lépései:

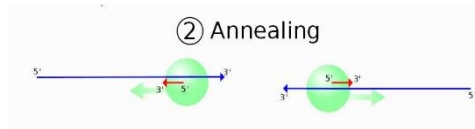
I. Denaturáció:

Magas hőmérsékleten (92-98°C) denaturálja az összes DNS



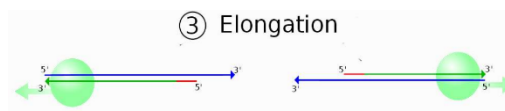
II. Primer tapadás vagy annealing

Primer specifikus hőmérséklet (50-65°C) ami, lehetővé teszi a primerek betapadását a komplementer szakaszra.



III. Elongáció

Primer megszüntetizálja a komplementer szakaszt (60-72°C)

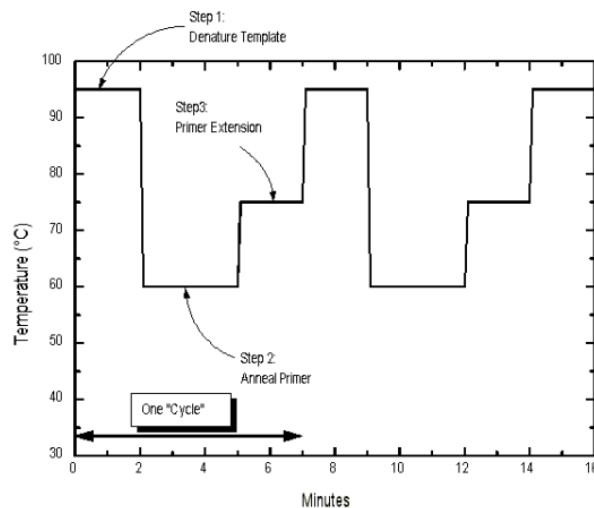


A reakció komponensei:

- DNS templát
- primerek
- dezoxiribonukleotid-trifoszfátok (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- DNS polimeráz
- Puffer (Mg^{2+})

A reakció hőprofilja:

92 °C 2'
92 °C 20'' } 35x
56 °C 30'' }
72 °C 30'' }
72 °C 5' }



Primerek:

forward primer – humán β aktin (Akt 11) 5' AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC 3'

reverse primer – humán β aktin (Akt 21) 5' GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA 3'

Minták: negatív kontroll, pozitív kontroll, minta 1 (HeLa cDNS), minta 2 (WRL68 cDNS)

Reakció összeállítása:

1 reakció	4 reakció (master mix)
6 ul desztillált víz	... ul
10 ul 2x PCR mix	... ul
2 ul primer mix (forward + reverse)	... ul
2 ul templát	- ul
Σ 20 ul	Σ Ul

A reakció hőprofilja:

92 °C 2'

92 °C 20" }
 56 °C 30" } 35x
 72 °C 30" }
 72 °C 5'

Kérdések:

1. Mit jelezhet az, ha a negatív templát kontrollban is kapunk terméket?
2. Mit jelezhet az, ha a pozitív kontrollban nem kapunk terméket?
3. Miért célszerű master mix alkalmazása?
4. Miert szüksége a többszöri ismétlés?
5. Mi a PCR alkalmazási területei?

6. Sejtenyésztés

A sejtenyésztés az a folyamat, amelynek során a sejteket szabályozott körülmények között termelik, általában természetes környezetükön kívül.

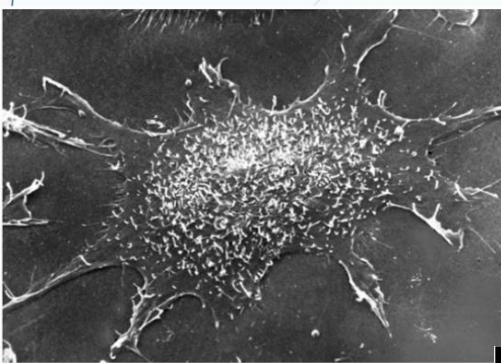
A sejtek szervezeten kívüli, in vitro (=üvegben) szaporítása.

Növekedési mód alapján:

- monolayer: letapadó
- szuszpenzió

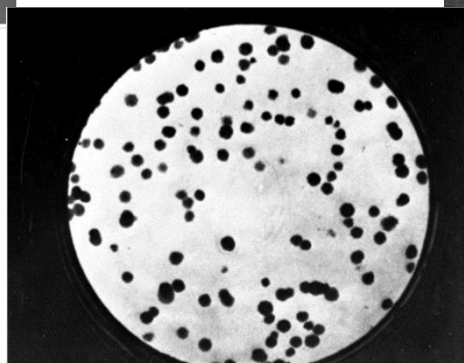
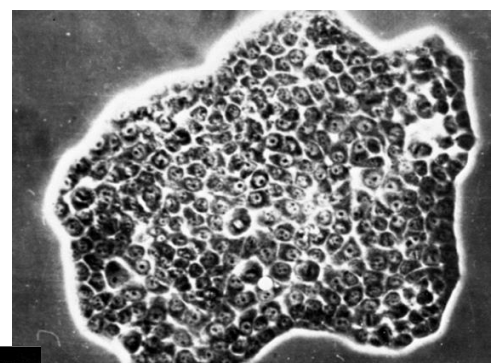
Sejtenyészetek, szövetenyészetek típusai:

- I. **Primer (elsődleges) kultúra:** az eredeti szervből, szövetből készített kultúra.
 - cél: egyféle sejtípus legyen jelen a tenyészetben
 - előny: a szervezetben előforduló adott sejtípusnak megfelelő fiziológias jellemzőket mutatja
- II. **Szekunder (másodlagos) kultúra:** a primer kultúra egyszeri átoltásával készülő kultúra.
- III. **Sejttörzs:** a primer kultúrából néhány passzálás után kialakult, véges élettartamú kultúra (40-50 passzálás).
- IV. **Sejtvonal:** a sejtek folyamatos osztódó képességgel bírnak, elméletileg korlátlan ideig fenntartható és genetikailag viszonylag homogén.
 - immortalizáció: korlátlan osztódó képesség
 - transzformáció (retrovirális onkogén transzfecció)
 - tumor sejtek (mutáció vagy vírus okozta transzformáció)
 - spontán immortalizáció
- V. **Sejtbankok:** sejttörzsüket, sejtvonalakat tárolnak speciális krioprotektív médiumban, folyékony nitrogénben.



Egyetlen sejt-SEM (0.01 mm)

Sejtkolónia (1 mm)



Pericsésze sejtkolóniákkal (100 mm)

Sejtkultúrák előnyei

- specifikus sejtek, homogén sejtpopuláció
- pontosan tervezhető és reprodukálható kísérletek
- kontrollálható körülmények
- jól definiálható, módosítható
- sejtfunkciók vizsgálata (DE! az eredményeket nem lehet egy az egyben az *in vivo* állapotokra vonatkoztatni)
- állatkísérletek egy részének kiváltása
- vizsgálhatók emberi sejtek

Sejtenyésztés korlátai

- Nem modellezi a szervezet komplexitását
- Spontán *in vitro* evolúció

Sejtenyészetek fenntartása

- STERIL munka!
- Passzáls: a sejtenyészet egy részének átvitele új tenyésztő edénybe friss tápfolyadékkal.
- *Szuszpenziós sejtek*: a sejtuszuspenziót a megfelelő arányban (kívánt sejtszámmal) kell tovább vinni
- *Letapadó sejtek*: enzimatis emésztés segítségével a sejteket szuszpenzióba visszük, majd megfelelő mennyiséget tovább oltjuk
- A passzázs szám feljegyzése fontos!

Sejtkultúra fenntartásához szükséges anyagok:

- a. Tápfolyadék (médium): biztosítja a sejtek számára a növekedéshez fontos tápanyagokat és a megfelelő környezetet.
 - ionok: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , HCO_3^-
 - glükóz: energiaforrás a szintézisfolyamatokhoz
 - esszenciális aminosavak, amelyeket a sejtek nem tudnak előállítani
 - vitaminok
 - puffer: pH 7,2-7,4 fenntartása
 - fenolvörös: piros indikátorfesték, amely jelzi a tápfolyadék pH-jának változását
 - szérum: 5-20%, foetális (magzati): FCS/FBS vagy felnőtt
 - antibiotikumok: penicillin, streptomycin, AmfB, gentamycin
- b. Steril fülke: szűrt levegő áramoltatása a munkafelület felett, a kontamináció veszélye csökken.
- c. Inkubátor, termosztát
 - optimális hőmérséklet (ált. 37°C)
 - 5%-os CO_2 tartalom
 - megfelelő páratartalom (90-100%)

- d. Mikroszkóp: inverz mikroszkóppal a sejtek közvetlenül a tenyésztő edényben vizsgálhatók.
- Bürker-kamra: sejtszámoláshoz, pontos statisztikához, az élő sejtek számának meghatározása festéssel történik: tripánkék (a halott sejtek kékek, az élők membránján a festék nem jut át)
 - Sejttenyésztő edények (flaska/palack, 6-12-24-96-os multi-well plate, Petricsésze, lombik), steril pipetták, centrifuga

A sejtek tárolása, fagyasztása

- fagyasztó ampullákban, speciális fagyasztó médiumban (jégkristályok képződésének megakadályozása)
- rövid távon -80°C -on
- hosszú távon folyékony nitrogénben -196°C -on

Kiegészítő videó: sejttenyésztés:

http://youtu.be/7d_kDu-P964

<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/global/forms/cell-culturebasics/cell-culture-basics-virtual-lab.html>

Kérdések:

1. Mit nevezünk primer sejttenyészeteknek? Mi az előnye egy szekunder kultúrával szemben?
2. Milyen tulajdonságok jellemzik a sejt vonalakat?
3. Mi jellemző az *in vitro* vizsgálatokra?
4. Miert fontos a médium a sejt kultúra fenntartásához?
5. Mit jelent a passzálás?