



**ZÁKLADNÉ LABORATÓRNE CVIČENIA  
Z MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE**

**Zuzana Gerši, Lucia Bocánová, Dominika Vešelényiová**

# ZÁKLADNÉ LABORATÓRNE CVIČENIA Z MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE

## **Autorský kolektív:**

RNDr. Zuzana Gerši, PhD.

RNDr. Lucia Bocánová, PhD.

Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.

## **Recenzenti:**

doc. RNDr. Soňa Kucharíková, PhD.

Mgr. Vladena Bauerová – Hlinková, PhD.

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou.

Učebné texty boli schválené Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave pre študentov vysokých škôl.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© RNDr. Zuzana Gerši, PhD.

© RNDr. Lucia Bocánová, PhD.

© Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.

Všetky práva vyhradené. Bez súhlasu majiteľa práv toto dielo a ani jeho časti nemožno reprodukovať.

**Vydavateľ:** Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2023

**Vydanie:** prvé

**ISBN 978-80-572-0403-9**

## Obsah

<b>1. Bezpečnosť práce v laboratóriách.....</b>	<b>8</b>
Organizačné opatrenia .....	8
Základné bezpečnostné zásady pri práci v laboratóriu .....	8
Zásady bezpečnosti práce s látkami, ktoré môžu ohroziť ľudské zdravie .....	9
Likvidácia odpadu .....	11
<b>2. Laboratórny materiál a prístrojové vybavenie v laboratóriu molekulárnej biológie .....</b>	<b>12</b>
Laboratórny materiál .....	12
Prístrojové vybavenie laboratória molekulárnej biológie .....	13
<b>3. Praktické výpočty v molekulárnej biológii, príprava roztokov a médií .....</b>	<b>15</b>
Praktické výpočty .....	15
Príprava roztokov .....	17
<b>4. Príprava biologického materiálu pre molekulárno-biologické experimenty .....</b>	<b>27</b>
Kultivácia .....	27
Kultivácia kvasiniek .....	29
Kultivácia rias a siníc .....	30
Pestovanie rastlinného materiálu .....	30
<b>5. Objemy v molekulárnej biológii a práca s mikropipetami .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Príprava materiálu, roztokov a médií pre vlastné experimenty.....</b>	<b>37</b>
<b>7. Práca s bakteriofágmi .....</b>	<b>39</b>
Stanovenie titru bakteriofágov.....	39
<b>8. Izolácia nukleových kyselín .....</b>	<b>47</b>
Izolácia genómovej DNA .....	47
Izolácia plazmidovej DNA .....	54
Linearizácia a prečistenie plazmidovej DNA .....	55
Izolácia RNA .....	57
<b>9. Syntéza komplementárnej DNA.....</b>	<b>62</b>
<b>10. Stanovenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín .....</b>	<b>65</b>
<b>11. Polymerázová reťazová reakcia.....</b>	<b>68</b>
Princíp PCR.....	68
Reakčné zložky PCR .....	68
Reakčné kroky PCR .....	70
Aplikácie PCR.....	72
Typy PCR .....	72
<b>12. Elektroforetická separácia nukleových kyselín v agarózovom géli.....</b>	<b>83</b>
Princíp elektroforetickej separácie v agarózovom géli.....	83
Vizualizácia nukleových kyselín v agarózovom géli .....	85
<b>13. Extrakcia fragmentu DNA z agarózového gélu .....</b>	<b>87</b>
<b>14. Fragmentácia DNA pomocou restriktčných endonukleáz .....</b>	<b>91</b>

Princíp štiepenia DNA pomocou restričných enzýmov II .....	91
Podmienky štiepenia DNA pomocou restričných endonukleáz .....	93
<b>15. Techniky úpravy genetického materiálu .....</b>	<b>97</b>
Klonovanie DNA.....	98
Príprava kompetentných buniek .....	99
Ligácia DNA .....	100
Transformácia DNA .....	101
Obnova transformovaných buniek.....	102
Identifikácia transformantov a selekcia rekombinantov .....	103

## **Zoznam skratiek**

A – absorbanca

BG11 – médium BG11 (angl. *Blue-Green Medium*)

bp – báзовý pár

BSA – hovädzí sŕový albumín (angl. *Bovine Serum Albumin*)

cDNA – komplementárna DNA (angl. *complementary deoxynucleotide acid*)

CFU – počet vytvorených kolónií (angl. *Colony Forming Units*)

CM – Cramer-Mayers médium

C<sub>q</sub> – *Quantification Cycle*

C<sub>t</sub> – *Threshold Cycle*

CTAB – cetrimóniumbromid

DEPC – dietylpyrokarbonát

DMSO – dimetylsulfoxid

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfáty

dsDNA – dvojvláknová deoxyribonukleotidová kyselina (angl. *double strand DNA*)

DTT – ditiotreitol

*E. coli* – *Escherichia coli*

EB – označenie komerčného roztoku

EDTA – kyselina etyléndiamínotetraoctová

EtBr – etídiumbromid

*GAPDH* – glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza

gDNA – genómová DNA

HIV – vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (angl. *Human Immunodeficiency Virus*)

hod. – hodina

HRM – analýza topenia krivky (angl. *High Resolution Melt*)

IPTG – tzopropyl β-D-1-tiogalaktopyranozid

kb – kilobáza

KBU – karta bezpečnostných údajov

LB – Luria-Bertani médium

LBA – Luria-Bertani médium s agarom

M – molarita

MHB – Mueller-Hinton médium (angl. *Mueller-Hinton Broth*)

min. – minúta

miRNA – mikroRNA

ml – mililiter

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina (angl. *messenger ribonucleotid acid*)

MS – Murashige a Skoog médium

NK – nukleová kyselina

OD – optická denzita

OOPP – osobné ochranné pracovné pomôcky

PBS – fosfátový tlmivý roztok

PCR – polymerázová reťazová reakcia

pDNA – plazmidová deoxyribonukleotidová kyselina

PE – označenie komerčného roztoku

PFU – počet fágových častíc schopných vytvárať plaky (angl. *Plaques Forming Units*)

pH – *potentia hydrogenii*

PVP – polyvinylpirolidón

Q – „zhášač“ (angl. *Quencher*)

QG – označenie komerčného roztoku

qPCR – kvantitatívna PCR (angl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

R – reportér

$R^2$  – korelačný koeficient

RE – označenie komerčného roztoku

RMS – restriktčno-modifikačný systém

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – otáčky za minútu (angl. *round per minute*)

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR – *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

SDS – dodecylsulfát sodný

sek. – sekunda

ssDNA – jednovláknová deoxyribonukleová kyselina

TAE – Tris-acetát-EDTA médium

TBE – Tris-borát-EDTA médium

THB – *Todd Hewitt broth*

$T_m$  – teplota topenia (angl. *melting temperature*)

U – jednotka

UV – ultrafioľové svetlo (angl. *ultraviolet*)

V – volt

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galakto-pyranozid

YPD – *Yeast Extract–Peptone–Dextrose* médium

## **Predhovor**

Milí študenti,

pripravili sme pre vás v elektronickej verzii študijný materiál, ktorý vás hravým spôsobom prevedie cez prípravu a realizáciu experimentov z molekulárnej biológie vyučovaných na FPV UCM v Trnave. Naše texty sú pevne zakorenené v štruktúre prednášok, seminárov a cvičení, ktoré patria do rámca predmetov orientovaných na molekulárnu biológiu, mikrobiológiu, genetiku, genomiku, bioinformatiku a biotechnológiu. Sú výsledkom našej oddanosti a vášne pre tento fascinujúci odbor a veríme, že vám pomôžu v hlbšom pochopení a osvojení týchto dôležitých laboratórnych postupov. Rovnako je táto publikácia vhodná aj pre širšiu komunitu pedagógov a študentov s príbuzným zameraním štúdia.

Naším cieľom je urobiť váš študijný proces čo najefektívnejším a zároveň zaujímavým. Vytvorili sme preto tento študijný materiál s obsahom teoretických a praktických poznatkov s dôrazom na dôležité molekulárno-biologické postupy a experimentálne návody pre absolvovanie predmetu Laboratórne cvičenia z molekulárnej biológie. Naším zámerom bolo koncepčne vytvoriť jednu komplexnú publikáciu – skriptum a pracovný zošit v jednom. Tieto učebné texty vás budú sprevádzať krok po kroku počas realizácie experimentálnych úloh pre dosiahnutie vlastných výsledkov práce, ktoré si zaznamenáte priamo do poznámkovej časti pracovného zošita. Laboratórne postupy prinášajú ucelený komplex informácií od prípravy materiálu a roztokov, cez proces izolácie nukleových kyselín, ich kvalitatívneho a kvantitatívneho hodnotenia, techník PCR až po proces klonovania.

Dúfame, že tento študijný materiál bude pre vás cenným zdrojom informácií počas vášho štúdia a pomôže vám dosiahnuť úspech vo vašom akademickom živote.

Úprimne ďakujeme recenzentom tejto publikácie za ich odborné usmernenie a cenné rady, ktoré výrazne prispeli k opravám a odstráneniu nepresností v predloženom rukopise.

S úctou,

autorský kolektív

# 1. Bezpečnosť práce v laboratóriách



Zásady bezpečnosti práce v laboratóriách vychádzajú zo Smernice o bezpečnosti práce v laboratóriách Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave (Vnútny predpis FPV UCM v Trnave 1/2022).

## Organizačné opatrenia

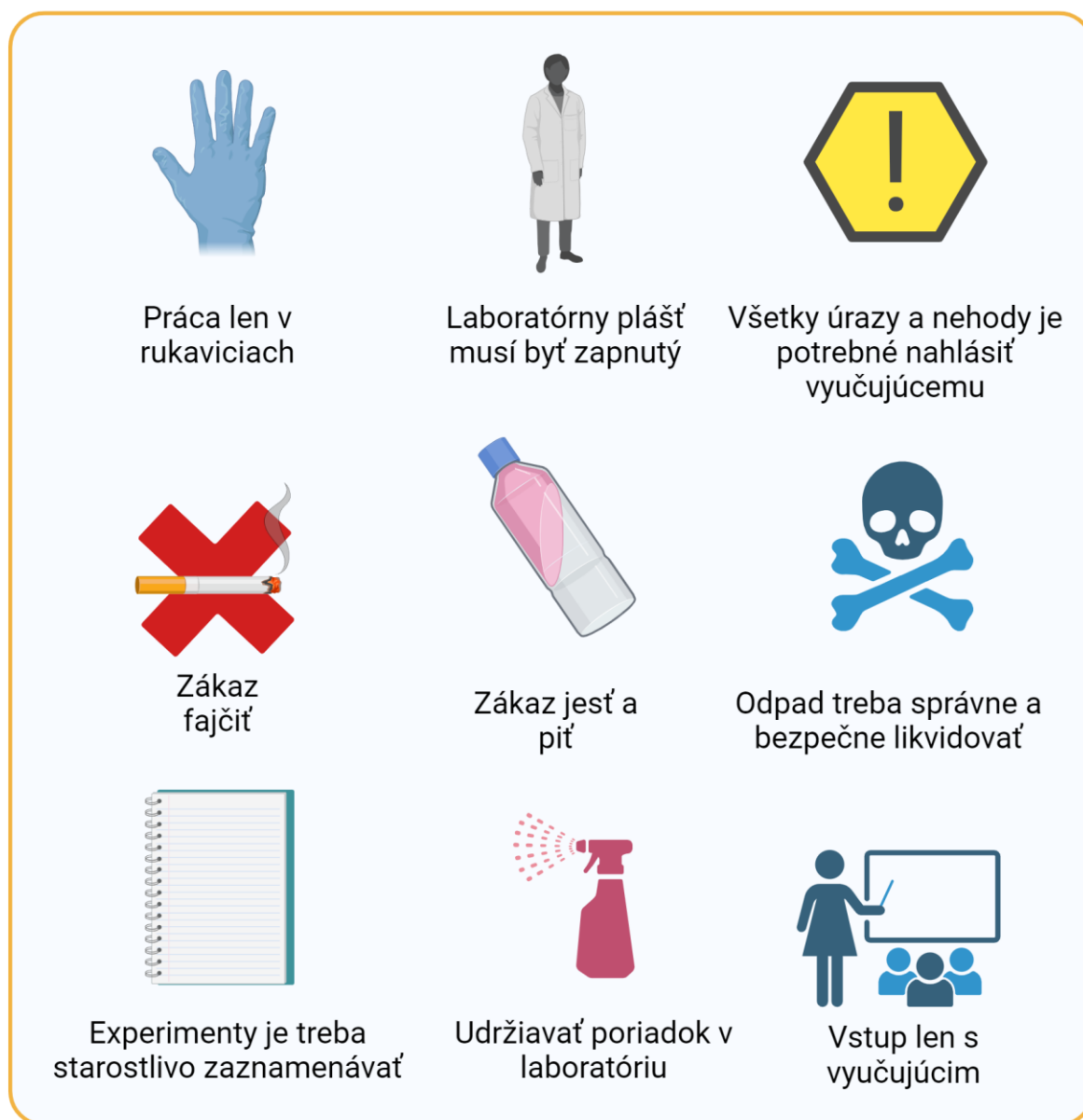
1. Do laboratórií FPV UCM vstupujú študenti pod vedením vyučujúceho v pracovnom oblečení (plášť, prezuvky – pevná obuv s pevnou podrážkou, okuliare) a so školskými potrebami.
2. Pred začiatkom cvičenia sú študenti povinní skontrolovať stav pomôcok v laboratórnych stoloch podľa evidencie. Zistené nedostatky ihneď nahlásia vyučujúcemu.
3. Počas práce v laboratóriu FPV UCM je nutné zachovávať bezpečnostné a zdravotné opatrenia pre prácu v laboratóriu, s ktorými sa študenti oboznamujú na prvých vyučovacích hodinách, správajú sa podľa pokynov vyučujúceho a neopúšťajú svoje pracovné miesto.
4. Študenti okamžite hlásia vedúcemu cvičenia všetky nezrovnalosti s postupmi laboratórnych prác, napr. rozbitie skla, nefunkčnosť ovládacích prvkov (ventily) na armatúrach, neoznačené obaly, poškodená elektroinštalácia a pod.
5. V laboratóriu možno robiť len práce povolené, s ktorými je pracovník/študent oboznámený. Je zakázané robiť svojvoľné pokusné práce pre súkromný záujem bez vedomia a dohľadu pedagóga.

## Základné bezpečnostné zásady pri práci v laboratóriu

1. V laboratóriu sa nesmie jesť, piť a fajčiť (Obrázok 1).
2. Nesmie sa nechránenými rukami manipulovať s chemikáliami.
3. S dráždivými a škodlivými látkami sa nesmie pracovať mimo digestora.
4. Na pracovnom stole sa musí udržiavať poriadok a čistota.
5. Rozliate alebo rozsypané látky/chemikálie musia byť z pracovného stola alebo dlážky ihneď odstránené.
6. Na pracovnom stole sa nesmú zhromažďovať chemikálie, po navážení či odmeraní potrebného množstva ich študenti musia vrátiť na vyhradené miesto (mimoriadne dôležité pre fľaše s horľavinami prvej triedy).
7. Každý študent musí mať čistý biely plášť, vlastné rukavice. Pri prácach, ktoré si to vyžadujú, musí nosiť nepretržite okuliare alebo štít, ktoré sú nevyhnutné pre ochranu zraku.
8. Všetci študenti musia poznať umiestnenie núdzového východu, lekárnicky a hasiacich prístrojov, ako aj spôsob ich použitia.
9. Po skončení práce musí študent sklo dôkladne umyť (odstrániť masť, zvyšky farbív), na záver opláchnuť v destilovanej vode a dať vysušiť do sušiarne.
10. Do výleviek nesmie hádzať pevný odpad, aby nedošlo k ich upchatiu.
11. Pri práci s elektrickými spotrebičmi musí skontrolovať, či nie je poškodená izolácia vodičov.
12. Pri zahrievaní na varičoch je nutné zabrániť kontaktu elektrických šnúr s vodou a elektrických šnúr a gumových hadíc s varičom.
13. Študent pracuje s prístrojmi až po jeho zaškolení.
14. Študenti v laboratóriu uskutočňujú len tie operácie, ktoré sú náplňou ich práce.
15. Svojvoľné zmeny postupov a pokusy mimo rámca cvičenej práce sú bez súhlasu pedagóga zakázané.



# BEZPEČNOSŤ V LABORATÓRIU



Obrázok 1 Základné zásady bezpečnosti pri práci v molekulárno-biologickom laboratóriu.

## Zásady bezpečnosti práce s látkami, ktoré môžu ohroziť ľudské zdravie

1. Pred prácou s chemikáliami je nutné oboznámiť sa s obsahom kariet bezpečnostných údajov a s informáciami uvedenými na etikete. Príslušné výstražné symboly (Obrázok 2) a ich definície sú uvedené v prevádzkových poriadkoch umiestnených v jednotlivých laboratóriách.
2. Pri práci s jedmi a niektorými inými látkami škodlivými zdraviu sa musí dbať na to, aby nedochádzalo k styku chemikálií s pokožkou, sliznicami, dýchacími orgánmi a zažívacím ústrojenstvom. Podľa povahy práce treba používať osobné ochranné pracovné prostriedky (OOPP). Práce s látkami, ktoré môžu ohroziť ľudské zdravie, musia byť zabezpečené tak, aby nedochádzalo k prekročeniu najvyššej prípustnej koncentrácie látky v ovzduší. Každú manipuláciu s takýmito látkami treba vykonávať len v digestore s dostatočným odsávaním.

3. Jedy musia byť uchovávané v uzamykateľnej skrinke v sklade chemikálií, príslušne označenej a podliehajú prísnej evidencii.
4. Obaly s toxikologicko-terapeutickými látkami, jedmi a žieravinami sa nesmú prenášať otvorené. Pri odlievaní alebo prelievaní týchto látok musia byť nádoby umiestnené tak, aby nedošlo k ich prevrhnutiu alebo rozbitiu. Toxikologicko-terapeutické látky, jedy a žieraviny v tuhom skupenstve sa musia naberať lopatkami, laboratórnymi lyžičkami alebo špachtľami z materiálu, ktorý s danou látkou nereaguje.
5. Rozliate kyseliny a zásady je nutné ihneď spláchnuť dostatočným množstvom vody, prípadne zneutralizovať práškovou sódou, resp. zriedeným roztokom kyseliny octovej, alebo kyseliny citrónovej a opäť spláchnuť vodou.
6. Látky uvoľňujúce pri rozpúšťaní teplo sa rozpúšťajú po častiach za súčasného chladenia.
7. Každú manipuláciu s látkami dymivými, dráždivými, zápachajúcimi, s jedovatými plynmi a parami jedovatých látok je povolené vykonávať iba v digestore s dostatočným odsávaním.
8. Pri manipulácii s otvorenými nádobami (banky, skúmavky) ústie nádob musí byť odvrátené od osoby, ktorá s nádobou manipuluje, ako aj od iných osôb.
9. Práca v laboratóriách zameraných na prácu s geneticky modifikovanými mikroorganizmami sa riadi prevádzkovým poriadkom umiestneným v zodpovedajúcich laboratóriách a je v súlade so zákonom 151/2002 Z. z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných rastlinách. Túto prácu môžu vykonávať len pracovníci, ktorí boli poučení o pravidlách, ktoré sa budú používať pri práci s geneticky modifikovanými organizmami. Je zakázané pracovať s geneticky modifikovanými organizmami mimo priestorov na to určených.

## Nebezpečné látky



Podráždenie kože



Horľavé látky



Akútna toxicita



Infekčné látky



Tlakové látky



Korozívne  
pre kovy



Oxidujúce látky



nebezpečenstvo  
vdychovania



Výbušniny



nebezpečné  
pre vodný  
ekosystém



Obrázok 2 Symboly charakterizujúce nebezpečné látky v laboratóriu.

## Likvidácia odpadu

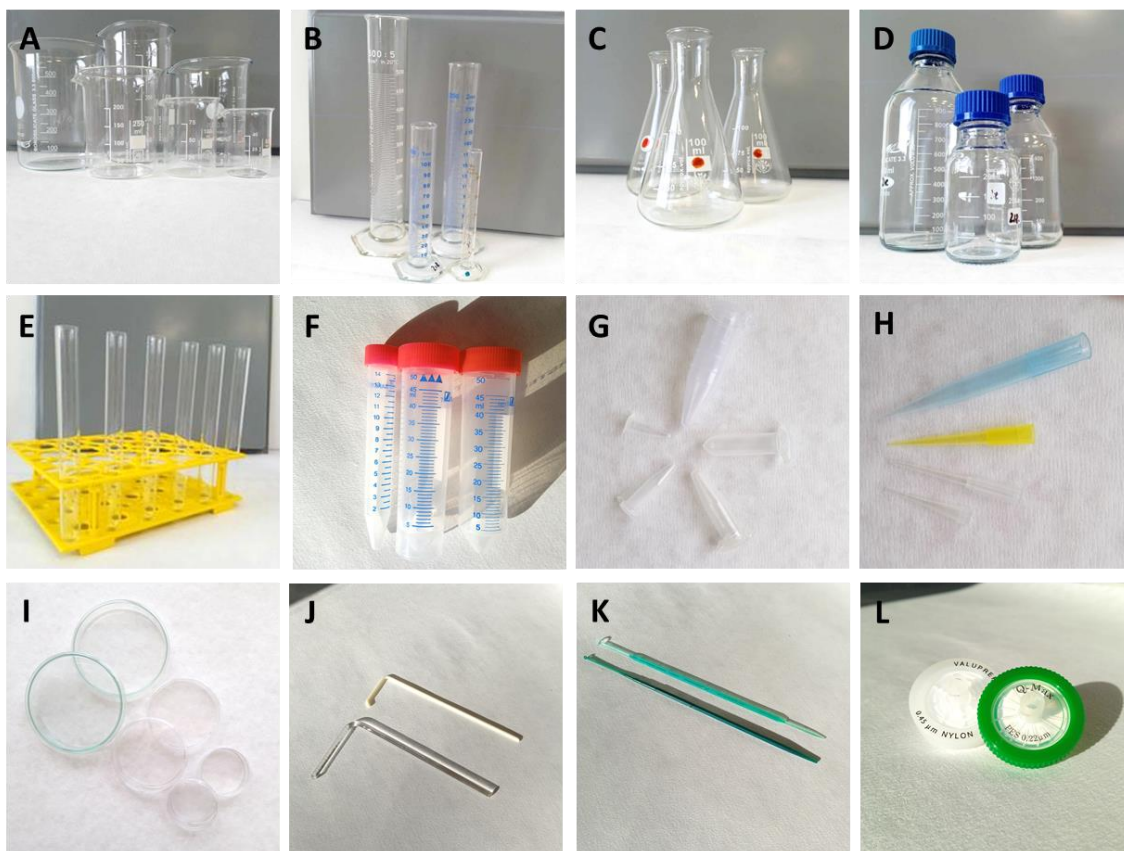
1. Jedy a obaly jedov môžu byť likvidované len postupmi, ktoré schválil príslušný orgán hygienickej služby. Do výlevky sa môžu vylievat' len zvyšky jedov dokonale miešateľných s vodou a v takom množstve, aby nebola prekročená najvyššia prípustná koncentrácia vo vodných nádržiach podľa príslušných predpisov.
2. Do laboratórnych výleviek a iných laboratórnych odtokov sa musia vylievat' len dostatočne zriedené (1 : 10) a s vodou dokonale miešateľné rozpúšťadlá v množstve najviac 0,5 litra (jednorazovo) a zriedené vodné roztoky kyselín a hydroxidov (najmenej 1 : 30). Rozpúšťadlá, ktoré sa s vodou dokonale nemiešajú, jedy, výbušné látky, kyseliny a hydroxidy nad uvedenú koncentráciu a látky, ktoré s vodou, kyselinami alebo lúhmi uvoľňujú jedovaté alebo dráždivé plyny, sa do potrubia vylievat' nesmú.
3. Odpadové rozpúšťadlá, po dokonalom odstránení zvyškov samozápalných látok a po neutralizácii, sa zhromažďujú v nádobách na to určených.
4. Do nádob na odpadky sa nesmú vhadzovať látky, ktoré môžu spôsobiť požiar alebo samovznietenie.
5. Sklenené črepy a odpad s ostrými hranami musia byť ukladané v špeciálnej nádobe.
6. S prázdnyimi obalmi sa musí zaobchádzať, ako keby boli plné a je potrebné dodržiavať pokyny pre skladovanie podľa Karty bezpečnostných údajov (KBÚ).
7. Biologický odpad mikrobiálneho pôvodu spadajúci do kategórie (biologický faktor 1. skupiny) sa inaktivuje fyzikálne v autokláve a po jeho dekontaminácii sa s ním manipuluje ako s komunálnym odpadom, pričom do doby likvidácie je odpad hygienicky uskladnený a chránený pred vplyvmi vonkajšieho prostredia.

## 2. Laboratórny materiál a prístrojové vybavenie v laboratóriu molekulárnej biológie

### Laboratórny materiál

Laboratórne pomôcky zo skla alebo plastu (kadičky, odmerné valce, Erlenmayerové banky, varné banky, reagenčné fľaše, Petriho misky a iné; Obrázok 3) by mali byť vždy dôkladne čisté. Kontaminované sklo môže viesť k inhibícii reakcií a tiež môže zodpovedať za degradáciu nukleových kyselín. Sklo by malo byť vždy po dôkladnom umytí opláchnuté destilovanou vodou a dôkladne vysušené (najlepšie v sušičke). Pri príprave roztokov, ktoré nie je možné sterilizovať autoklávaním, je potrebné prázdne fľaše autoklávať vopred. Sklo a roztoky používané na experimenty s RNA by mali byť ošetrené dietylpyrokarbonátom (DEPC) na inhibíciu RNáz, ktoré inak môžu byť odolné voči autoklávaniu.

Spotrebný plastový materiál ako napr. špičky a skúmavky výrobca často dodáva sterilné. Pri práci s DNA a RNA je samozrejme žiaduce si tento plastový materiál (bežné špičky a mikroskúmavky) sterilizovať autoklávaním alebo je možné použiť už sterilné špičky s filtrom (neautoklávať!). Plastové Petriho misky, očkovacie slučky a ihly, hokejky a pod. (Obrázok 3) sa dodávajú sterilné. Ak používate pri práci s kultúrami sklenený materiál (sklenené Petriho misky, sklenené hokejky a pod.), je nutné ho dôkladne dekontaminovať, zabaliť do hliníkovej fólie a sterilizovať pred opakovaným použitím. Rovnako je nutné sterilizovať aj ostatné kovové pomôcky (pinzeta, skalpel), resp. tieto pomôcky spolu s očkovacími slučkami, ako aj okraje fliaš s médiom by sa mali pred prácou sterilizovať plameňom.



**Obrázok 3** Bežne používaný sklenený a plastový spotrebný materiál v molekulárno-biologickom laboratóriu. A – kadičky, B – odmerné valce, C – Erlenmayerové banky, D – reagenčné fľaše, E – sklenené skúmavky, F – centrifugačné skúmavky (s objemom 15 ml a 50 ml), G – mikroskúmavky (s objemom 5 ml; 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml; 0,2 ml), H – pipetovacie špičky (s objemom 1 000 µl, 200 µl, 10 µl), I – Petriho misky, J – hokejky, K – očká, L – bakteriologické filtre (veľkosť pórov 0,45 µm; 0,22 µm).

## Prístrojové vybavenie laboratória molekulárnej biológie

Prístrojové vybavenie laboratória molekulárnej biológie zahŕňa súbor špeciálnych prístrojov a zariadení, ktoré slúžia používateľovi pri rutinnej práci v molekulárno-biologickom laboratóriu. Nákup prístrojov pre laboratórium je finančne náročná záležitosť, preto je dôležité zvážiť aké experimenty sa v laboratóriu budú vykonávať a aké prístroje sú potrebné pre zvládnutie jednotlivých metodík.

Štandardné prístrojové vybavenie laboratória molekulárnej biológie:

- presné váhy, analytické váhy pre váženie chemikálií;
- pH meter na úpravu pH pripravovaných roztokov;
- magnetické miešadlo, vortex pre miešanie roztokov a vzoriek;
- vyhrievacia platňa s miešadlom;
- autokláv na sterilizáciu pripravených roztokov, médií a spotrebného materiálu;
- stolová mikrocentrifúga na rýchle odstredenie vzoriek;
- centrifúga pre odstredovanie vzoriek s možnosťou chladenia;
- vodný kúpeľ alebo suchý kúpeľ (termoblok) pre inkubáciu vzoriek v skúmavkách;
- biologický termostat, inkubátor pre inkubáciu buniek v tekutých médiách a na agarových platniach;
- orbitálna trepačka
- ultrazvukový homogenizátor (sonikátor) na homogenizáciu buniek pomocou ultrazvukových vĺn
- homogenizátor na homogenizáciu rastlinného a živočíšneho materiálu
- spektrofotometer/fluorometer na stanovenie kvality a kvantity nukleových kyselín
- PCR box pre ochranu citlivých komponentov pred kontamináciou z okolitého prostredia;
- termocyklér pre amplifikáciu požadovaných úsekov DNA;
- *Real Time* PCR termocyklér na detekciu kvantity DNA, cDNA;
- horizontálna/vertikálna elektroforetická aparatura pre separáciu nukleových kyselín;
- napájací zdroj;
- UV-transiluminátor na vizualizáciu nukleových kyselín po elektroforetickej separácii;
- gélový foto-dokumentačný systém pre zobrazenie a dokumentáciu gélu po separácii nukleových kyselín, resp. ich fragmentov;
- sekvenátor;
- výrobník ľadu na prípravu ľadovej drte;
- laminárny box alebo Biohazard box, ktoré zaručujú sterilné prostredie pri práci;
- digestor pre ochranu zdravia pri práci s toxickými a nebezpečnými chemickými látkami;
- chladnička (2 – 8 °C) pre uskladnenie chemikálií, zásobných a pracovných roztokov, komerčných súprav (kitov), a biologického materiálu (napr. semená rastlín, PCR produkty – len krátkodobé uskladnenie);
- mraznička (-20 °C) pre uchovanie materiálu, ktorý by mal byť držaný pri nízkych teplotách (bunky, tkanivá, a pod.), niektorých chemikálií a zásobných roztokov (enzýmy, antibiotiká) a biologického materiálu (vzorky DNA);
- hlbokomraziaci box (-80 °C) pre uskladnenie biologického materiálu (bunkové konzervy, rastlinné pletivá, RNA, proteíny a pod.);
- box pre pestovanie rastlín zabezpečujúci stabilné podmienky (teplota, svetelný režim) počas pestovania.

Základné laboratórne prístroje pre zvládnutie experimentov v rámci laboratórných cvičení z molekulárnej biológie je zobrazené na Obrázku 4.





**Obrázok 4** Prístrojové vybavenie laboratória pre realizáciu molekulárno-biologických analýz. A – presné váhy, B – analytické váhy, C – magnetické miešadlo, D – pH meter, E – vortex, F – trepačka, G – stolová centrifúga, H – centrifúga (s možnosťou chladenia), I – suchý kúpeľ (termoblok), J – inkubátor (mikrobiologický), K – fluorometer, L – spektrofotometer, M – PCR termocyklér, N – *Real-Time* PCR prístroj, O – elektroforetická aparátúra so zdrojom elektrického napätia, P – UV-transiluminátor, R – fotodokumentačné zariadenie, S – autokláv, T – výrobnik ľadovej drte, U – hlbokomraziaci box (-80 °C).

#### Otázky:

1. Vymenujte základné laboratórne pomôcky a prístroje, ktoré využijete pri príprave roztokov.
2. Aký laboratórny prístroj by ste využili, ak by ste mali inkubovať vzorky v 1,5 ml mikroskúmavkách pri teplote 50 °C po dobu 30 min.?
3. Prečo je nevyhnutnou súčasťou laboratória aj chladnička, resp. mraznička?
4. Aké vzorky je vhodné uskladňovať pri ultra nízkej teplote (-80 °C)?

### 3. Praktické výpočty v molekulárnej biológii, príprava roztokov a médií

V molekulárno-biologických analýzach sa často využívajú bežné, ako aj špecifické zásobné a pracovné roztoky. Pri príprave roztokov je potrebné používať deionizovanú, destilovanú vodu a reagenty s vysokou čistotou. Sterilizácia roztokov je odporúčaná pre väčšinu roztokov, a to buď autoklávaním pri špecifických podmienkach (15 psi, 121 °C, 20 min.) alebo filtráciou (cez 0,22 µm filter), v prípade, že príslušná chemikália by bola autoklávaním degradovaná (napr. SDS). Mnoho roztokov si vyžaduje pri príprave úpravu pH.

Pri príprave roztokov pre molekulárne experimenty sa často používajú chemikálie, ktoré sú pre zdravie človeka nebezpečné. Nebezpečnou chemickou látkou je látka, ktorá spĺňa aspoň jednu z nasledovných vlastností - výbušná, oxidujúca, horľavá, veľmi horľavá, mimoriadne horľavá, toxická, veľmi toxická, škodlivá, žieravá, dráždivá, senzibilizujúca, karcinogénna, mutagénna, teratogénna, nebezpečná pre životné prostredie.

#### Praktické výpočty

##### Látkové množstvo (n):

je určené podielom hmotnosti látky (m) a jej molovej hmotnosti (M)

$$n = m/M \quad [\text{g/mol}]$$

alebo ho môžeme vyjadriť ako podiel objemu látky (V) a molárneho objemu ( $V_m$ )

$$n = V/V_m \quad [\text{mol}]$$

##### Koncentrácia látkového množstva ( $c_A$ ):

je určená podielom látkového množstva rozpustenej látky ( $n_A$ ) a objemu roztoku ( $V_R$ )

$$c_A = n_A/V_R \quad [\text{mol/l}]$$

##### Molárna koncentrácia (molarita; $c_A$ ):

je určená podielom látkového množstva rozpustenej látky ( $n_A$ ) a hmotnosti rozpúšťadla ( $m_r$ ).

$$c_A = n_A/m_r \quad [\text{mol/kg}]$$

Príklad: 1 M roztok obsahuje 1 g molekulovej hmotnosti rozpustenej látky v rozpúšťadle za vzniku 1 litra konečného roztoku.

Napríklad, 100 ml 5 M roztoku NaCl obsahuje  $58,456 \text{ (} M_w \text{ NaCl) g/mol} \times 5 \text{ mol/l} \times 0,1 \text{ l} = 29,29 \text{ g NaCl}$ .

##### Hmotnostná koncentrácia ( $c_A$ ):

je podielom hmotnosti rozpustenej látky ( $m_A$ ) a objemu roztoku (V).

$$c_A = m_A/V \quad [\text{mol/kg}]$$

##### Percento:

V návodoch pre prípravu roztokov sa v praxi používa vyjadrenie hmotnostného alebo objemového percenta kvapaliny. Objemové percento je vyjadrené ako objem podielu/objem celku (v/v, angl. *volume/volume*) a hmotnostné percento vyjadrujúce hmotnosť

podielu/hmotnosť celku (w/w, angl. weight/weight). Vyjadrenie konkrétnej hmotnosti pevnej látky obsiahnutej v určitom objeme roztoku sa vyjadruje ich podielom (w/v, angl. weight/volume).

Príklad: Percento roztoku (w/v) označuje hmotnosť (g) rozpustenej látky v 100 ml konečného roztoku.

Napríklad 0,7 % roztok agarózy v Tris-borátovom-EDTA (TBE) elektrolytickom roztoku, bude obsahovať 0,7 g agarózy v konečnom objeme 100 ml 1x TBE roztoku.

### Príprava pracovných roztokov zriedňovaním z koncentrovaných zásobných roztokov:

Príprava zásobného roztoku pre tlmivé roztoky (pufre, angl. *buffers*) je užitočná z dôvodu, aby sa zabránilo príprave tlmivých roztokov pred každým jedným experimentom. Napríklad 100 ml TE tlmivého roztoku (10 mM Tris, 1 mM EDTA) sa pripraví zmiešaním 1 ml 1 M roztoku Tris, 0,2 ml 0,5 M EDTA a 98,8 ml sterilnej destilovanej vody. Pre výpočty požadovaných zásob riešenia, možno použiť nasledujúci vzorec:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

kde  $c_1$  = počiatočná koncentrácia alebo koncentrácia zásobného roztoku;  $V_1$  = počiatočný objem, alebo množstvo potrebného zásobného roztoku;  $c_2$  = konečná koncentrácia alebo koncentrácia požadovaného roztoku; a  $V_2$  = konečný objem alebo objem požadovaného roztoku.

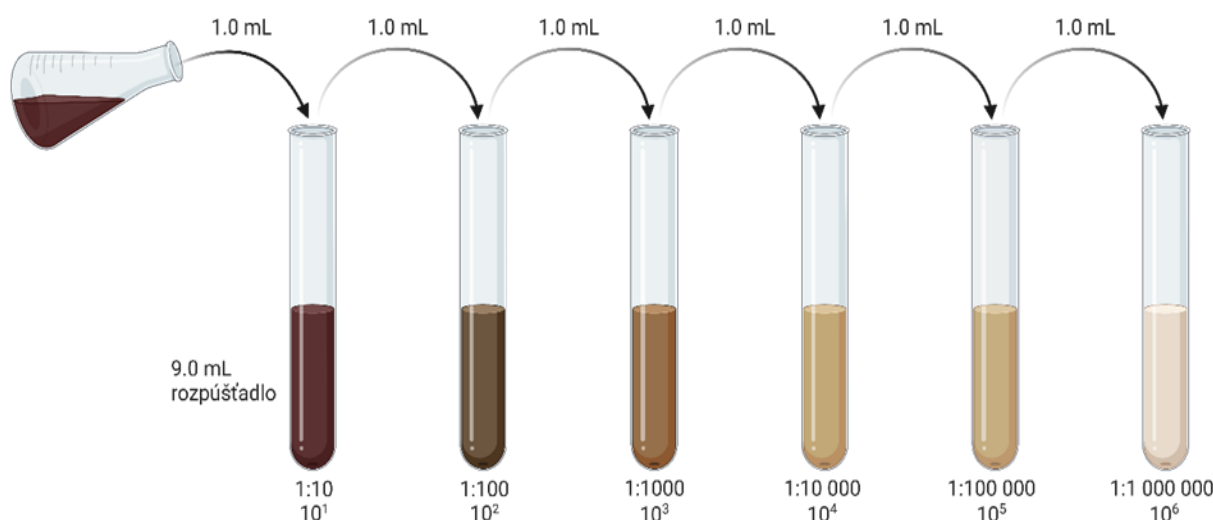
### Zmiešavacie pravidlo pre výpočet výslednej hmotnostnej koncentrácií pri miešaní roztokov:

$$m_1 \cdot w_1 + m_2 \cdot w_2 + \dots + m_n \cdot w_n = (m_1 + m_2 + \dots + m_n) \cdot w$$

kde  $m$  = hmotnosť;  $w$  = hmotnostný zlomok

### Desiatkové riedenie:

Vzorku riedime základným riedením 1 : 9 (teda 10 krát riedime = riedenie  $10^{-1}$ , 1/10), čo znamená, že k 1 ml vzorky pridáme 9 ml rozpúšťadla. Z takto pripraveného základného riedenia (1/10) pripravíme sadu riedení, a to odobratím vždy 1 ml nariedeného roztoku a pridaním 9 ml rozpúšťadla. Každá nasledovná vzorka má 10-krát menšiu koncentráciu ako je znázornené na Obrázku 5.

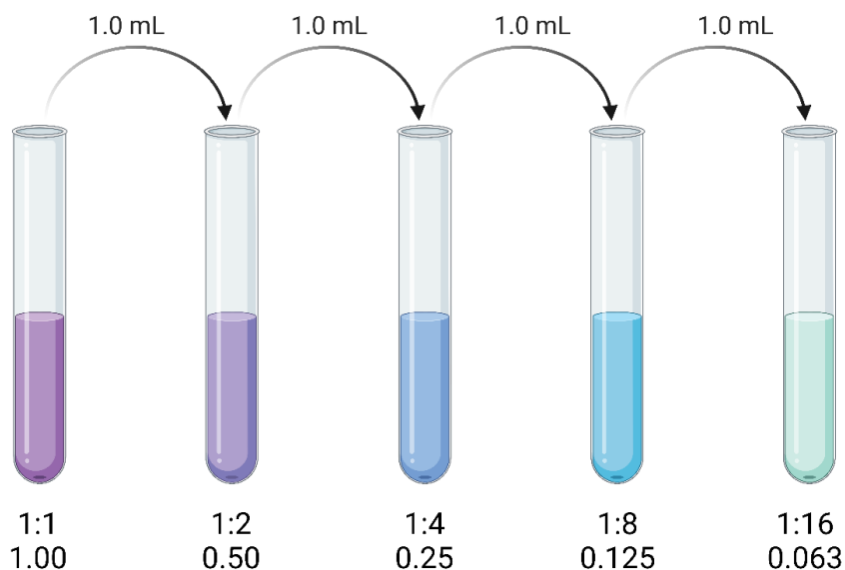


Obrázok 5 Princíp desiatkového riedenia.



### Dvojkové riedenie:

Vzorku riedime základným riedením 1 : 1 (teda 2 krát riedime = riedenie  $2^{-1}$ ), čo znamená, že k 1 ml vzorky pridáme 1 ml rozpúšťadla. Z takto pripraveného základného riedenia si ďalej pripravíme sadu riedení odobratím vždy 1 ml nariedeného roztoku a pridaním 1 ml rozpúšťadla (Obrázok 6).



Obrázok 6 Princíp dvojkového riedenia.

Mnoho enzýmových roztokov je potrebné pripraviť ako koncentrované roztoky, napr., 10x alebo 5x (10-násobok alebo 5-koncentrácie pracovného roztoku), ktoré sú neskôr zriedené tak, aby konečná koncentrácia roztoku v reakcii bola 1x (alebo podľa potreby).

### Príprava roztokov

1. Požadované množstvo chemikálií by sa malo odvážiť pomocou presných, resp. analytických váh.
2. Roztoky by sa mali uchovávať v reagenčných fľašiach.
3. Na prípravu roztokov je potrebné používať destilovanú, deionizovanú vodu, resp. je potrebné riadiť sa pokynmi pre prípravu daného roztoku (použiť priamo sterilnú vodu v prípade, ak roztok nie je možné sterilizovať autoklávaním, napr. SDS roztok). Nepridávajte hneď plný objem vody! V prípade úpravy pH budete objem roztoku navyšovať pridávaním roztoku kyseliny/zásady.
4. Rozpustená chemikália v menšom objeme (pomocou sklenenej tyčinky alebo magnetického miešadielka) by sa mala preniesť do odmerného valca a doplniť zvyšným objemom rozpúšťadla do celkového objemu.
5. Roztoky je potrebné autoklávať alebo sterilizovať filtráciou. Médiá pre bakteriálne kultúry sa musia autoklávať hneď po príprave.
6. Pripravené roztoky je potrebné skontrolovať na prítomnosť kontaminácie podržaním fľaše obsahujúcej roztok vo výške očí a jemne ním krúžiť pred uskladnením pri izbovej teplote alebo v chladničke.
7. Pripravené tuhé médiá obsahujúce agar pre bakteriálne kultúry, môžu byť rozpustené vo vodnom kúpeli, antibiotiká sa v takomto prípade pridávajú podľa potreby až po vychladnutí rozpusteného média ( $\sim 40^\circ\text{C}$ ).

## a) Roztoky na úpravu pH

Na úpravu pH v závislosti od pôvodného a cieľového pH roztoku používame slabé alebo koncentrované roztoky kyselín, resp. zásad.

**Pripravíme 1 liter 1 M HCl ( $M_w = 36,46$  g/mol)**

Výpočet:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$1.1 = 12,178 \cdot V_2$$

$$V_2 = 1.1 / 12,178 = 0,082 \text{ liter} = 82 \text{ ml}$$

1 l 1M roztoku HCl pripravíme pridaním 82 ml 37 % koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej do 1 l destilovanej vody.

**Pripravíme 100 ml 0,1 M HCl ( $M_w = 36,46$  g/mol)**

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

100 ml 0,1M roztoku HCl pripravíme pridaním ..... 37 % zásobného roztoku HCl do ..... destilovanej vody.

**Pripravíme 100 ml 1 M roztoku NaOH ( $M_w = 39,997$  g/mol)**

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

100 ml 0,1M roztoku NaOH pripravíme rozpustením ..... NaOH v ..... destilovanej vody.

**Pripravíme 100 ml 10 M NaOH ( $M_w = 39,997$  g/mol)**

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

100 ml 10M roztoku NaOH pripravíme rozpustením ..... NaOH v ..... destilovanej vody.

**Pripravíme 100 ml 1 M KOH ( $M_w = 56,11$  g/mol)**

Výpočet:

.....

.....  
.....  
.....  
.....  
100 ml 10 M roztoku KOH pripravíme rozpustením ..... KOH v ..... destilovanej  
vody.

## b) Zásobné a pracovné roztoky

**Pripravíme 100 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0),** Tris báza ( $M_W = 121,14$  g/mol)

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

100 ml 1M roztoku Tris-HCl (pH8,0) pripravíme rozpustením ..... Tris bázy v .....  
..... destilovanej vody, pH na hodnotu 8,0 upravíme pridaním ....., roztok doplníme do  
celkového objemu 100 ml destilovanou vodou. Roztok sterilizujeme autoklávaním.

**Pripravíme 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)** ( $M_W = 372,24$  g/mol)

rozpustiť 18,6 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v menšom množstve destilovanej vody (~ 70 ml) → upraviť pH  
roztoku na hodnotu 8,0 → doplniť destilovanou vodou do finálneho objemu 100 ml →  
sterilizovať autoklávaním

**Pripravíme 100 ml 70 % etanolu z 96 % etanolu** ( $M_W = 46,07$  g/mol)

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

100 ml 70 % etanolu pripravíme zmiešaním ..... 96 % etanolu s ..... sterilnej  
destilovanej vody.

**Pripravíme 50 ml 10 % roztoku dodecylsulfátu sodného (SDS)** ( $M_W = 288,38$  g/mol)

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

50 ml 10 % roztoku dodecylsulfátu sodného pripravíme rozpustením ..... SDS v .....  
..... destilovanej vody.

**Pripravíme 100 ml roztoku chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)**

Výpočet:

.....

.....  
.....  
.....  
.....  
100 ml roztoku chloroform : izoamylalkohol v pomere 24 : 1 pripravíme zmiešaním .....  
chloroformu s ..... izoamylalkoholu.

### c) Tlmivé roztoky

**Pripravíme 1 liter 10x koncentrovaného fosfátového tlmivého roztoku (PBS),** NaCl ( $M_W = 58,44$  g/mol), KCl ( $M_W = 74,5513$  g/mol),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $M_W = 268,07$  g/mol),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $M_W = 136,086$  g/mol)

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
1 liter 10x koncentrovaného roztoku PBS pripravíme rozpustením ..... NaCl, .....  
KCl, .....  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a .....  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v ..... destilovanej vody.

**Pripravíme 100 ml Tris-EDTA (TE) roztoku (pH 7,4; 7,5 alebo 8,5) = 10 mM Tris-HCl a 1 mM EDTA ,** Tris báza ( $M_W = 121,14$  g/mol), EDTA ( $M_W = 372,24$  g/mol)

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
100 ml TE roztoku pripravíme z ..... Tris bázy, ..... EDTA a .....  
sterilnej destilovanej vody.

### d) Elektrolytické roztoky

**Pripravíme 1 liter 50x koncentrovaného Tris-acetát-EDTA (TAE),** Tris báza ( $M_W = 121,14$  g/mol), EDTA ( $M_W = 372,24$  g/mol), ľadová kyselina octová ( $M_W = 60,05$  g/mol)

Výpočet:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
1 liter 50x koncentrovaného TAE elektrolytického roztoku pripravíme rozpustením .....  
Tris bázy, .....  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a ..... ľadovej kyseliny octovej v .....  
destilovanej vody.

**Pripravíme 1 liter 10x koncentrovaného Tris-borát-EDTA (TBE) ,** Tris báza ( $M_W = 121,14$  g/mol), EDTA ( $M_W = 372,24$  g/mol), kyselina boritá ( $M_W = 61,83$  g/mol)

[illegible]

**Pripravíme 1 liter 1x koncentrovaného Tris-borát-EDTA (TBE) (zo zásobného 10x TBE)**

[illegible]

### e) DNA nanášacie farbičky

- Výpočet:**

[illegible]

## f) Základné kultivačné média

Nutričné zloženie kultivačných médií závisí od nárokov pestovaného druhu biologického materiálu určeného pre experimenty. Všeobecne tieto média obsahujú peptidy, peptóny (tryptóny), vitamíny a niektoré stopové prvky a soli v rôznych koncentráciách (prispôsobené pre optimálny rast testovaného kmeňa). V procese prípravy tekutých kultivačných médií je vhodné niektoré komponenty sterilizovať filtráciou alebo autoklávaním samostatne a pridávajú sa do média až po jeho ochladení na teplotu 45 – 50 °C (napr. sacharóza, glukóza, antibiotiká (do kultivačných médií), MgCl<sub>2</sub> a iné) alebo až priamo pred naočkovaním bakteriálneho kmeňa. Kultivačné média je nutné používať sterilné. Tuhé kultivačné média = pevné pôdy na kultiváciu buniek v Petriho miskách, ktoré obsahujú okrem základných nutričných komponentov aj agar.

Tekuté aj tuhé kultivačné média je možné po príprave, sterilizácii a vychladnutí uchovávať v chlade dlhodobo. Pred použitím sa médium rozvarí (vo vodnom kúpeli) a po ochladnutí je možné pridať potrebné antibiotiká.

Najčastejšie používané média v molekulárno-biologickom výskume baktérií, kvasiniek, siníc, rias a rastlín sú uvedené v Tabuľke 1 – 7).

Bežne používané kultivačné médium LB (Luria-Bertani 1951) pre kultiváciu baktérií pripravíme zmiešaním zložiek v menšom objeme (max. 900 ml) destilovanej vody. Následne zmeriame pH kultivačného média a upravíme na požadované pH (7,0 – 7,4). Po upravení pH doplníme do média zvyšok destilovanej vody do konečného objemu (1 liter). Pôdu si rozalíkovujeme do menších nádob a dáme autoklávať. Pôdu uchováваме v tme a chlade na ďalšie použitie. Pred použitím si pôdu vždy skontrolujeme a vytemperujeme na požadovanú kultivačnú teplotu podľa požiadaviek mikroorganizmu, ktorý budeme v danom médiu kultivovať (najčastejšie 37 °C).

**Tabuľka 1** Prehľad základných médií na kultivovanie bakteriálnych modelových organizmov.

Kultivačné médium	Zloženie	
Tekuté LB (Luria-Bertani ) médium (na 1 liter)	10 g NaCl	15 g NaCl
	10 g tryptón	10 g peptón
	5 g kvasničný extrakt	5 g kvasničný extrakt
	destilovaná voda	destilovaná voda
	pH 7,0 - 7,4	pH 7,0
Tuhé LB médium = LBA** médium (na 1 liter)	1 l LB médium	1 l LB médium
	15 g agar	15 g agar
Vrchný LB agar (na 1 liter)	1 l LB médium	
	0,6 % agar	
Tekuté TB médium (na 1 liter) (expresia proteínov)	12 g trypton	
	24 g kvasničný extrakt	
	2,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	9,4 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	8 ml glycerol	
	destilovaná voda	
	pH 7,0	
Tekuté THB médium (na 1 liter)	36,4 g THB	
	destilovaná voda	
	pH 7,8	
Tuhé THB médium (na 1 liter)	1 l THB médium	
	15 g agar	
Vrchný THB agar (Soft agar) (na 1 liter)	1 l THB médium	
	0,6 % agar	
	pH 7,8	

**Tabuľka 1** Prehľad základných médií na kultivovanie bakteriálnych modelových organizmov (pokračovanie).

Tekuté MHB médium (na 1 liter)	21 g MHB destilovaná voda pH 7,3
Tuhé MHB médium (na 1 liter)	1 l MHB médium 15 g agar
M9 soľ (na 1 liter)	64 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 g NaCl 5 g NH <sub>4</sub> Cl destilovaná voda
M9 kultivačné médium (na 1 liter)	200 ml M9 soľ (sterilná) 2 ml 1M MgSO <sub>4</sub> (sterilné) 20 ml 20 % glukóza (w/v) (sterilné) – prípadne iný zdroj uhlíka 100 µl 1M CaCl <sub>2</sub> (sterilné) destilovaná voda (sterilná)
SOB médium (na liter)	20 g trypton 5 g kvasničný extrakt 0,5 g NaCl destilovaná voda pH 6,8 - 7,0
SOC médium (na 1 liter)	SOC médium 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 20 mM glukóza

\*Kultivačné média hneď po príprave sterilizujeme v autokláve.

Základné kultivačné médiá pre kultiváciu kvasiniek *Pichia pastoris*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida spp.* (Tabuľka 2).

**Tabuľka 2** Základné kultivačné médiá používané na kultiváciu kvasiniek.

Kultivačné médium	Zloženie
2 x YT médium (na 1 liter)	16 g trypton 10 g kvasničný extrakt 5 g NaCl destilovaná voda
Tekuté YPD médium (na 1 liter)	10 g kvasničný extrakt 20 g peptón destilovaná voda 2 % glukóza (sterilná až po sterilizácii média)
Tuhé YPD médium (na 1 liter)	1 l YPD média 15 g agar
Sabouraudov agar (na 1 liter)	65 g média destilovaná voda pH 5,5 – 5,6

\*Kultivačné média hneď po príprave sterilizujeme v autokláve.

Tekuté kultivačné médium CM (Cramer a Myers 1952) pre kultiváciu rias pripravíme zmiešaním 10 ml CM-1 roztoku (pH 6,9), 10 ml CM-2 roztoku, 10 ml CM-3 roztoku, 1 ml CM-4 roztoku

a doplníme do 1 l sterilnou destilovanou vodou. Médium HUT podľa Hutner a kol. (1966) používame pre dlhodobé uchovanie kultivovaných rias. Toto médium si pripravíme rozpustením glukózy v deionizovanej vode, kde postupne pridávame uvedené objemy ostatných zásobných roztokov solí a 2 ml z roztoku 2. Po úprave pH (na hodnotu 3,5), doplníme vodu do celkového objemu a sterilizujeme autoklávaním. Zloženie zásobných roztokov je uvedené v Tabuľke 3. Do médií pre kultiváciu rias sa po sterilizácii pridávajú vitamín B<sub>1</sub> (5 µl/ml) a B<sub>12</sub> (0,2 µl/ml).

**Tabuľka 3** Média pre kultiváciu rias.

Kultivačné médium	Zloženie
CM (na 1 liter)	CM-1: 100 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 100 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 64,5 g/l citrát trisodný → filtrovať CM-2: 2,65 g/l CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O → autoklávať CM-3: 20 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O → autoklávať CM-4: 3 g/l FeSO <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 1,8 g/l MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O; 1,3 g/l CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O; 0,4 g/l ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 0,2 g/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 0,02 g/l CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O → autoklávať
HUT (na 1 liter)	roztok 1: 19,8 g glukózy rozpustiť v 900 ml dH <sub>2</sub> O a pridáme 2 ml 20 mM ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1 ml 10 mM FeSO <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,9 ml 10 mM MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0,1 ml 1M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1,6 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2 ml 1 M KCl 2 ml 1M kyseliny DL-jablčnej 20,4 ml 1M kyseliny L-glutámovej pH 7,0 roztok 2: 8,68 ml 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,32 ml 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,0

Kultivačné médium BG11 (Stainer a kol. 1971) pre kultiváciu siníc pripravíme zmiešaním 100 ml sterilného zásobného roztoku č. 1, 10 ml každého zo sterilných zásobných roztokov č. 2 – 8, 1 ml zásobného roztoku č. 9 a doplníme destilovanou vodou do celkového objemu. Zloženie zásobných roztokov je uvedené v Tabuľke 4.

**Tabuľka 4** Zloženie BG11 média pre kultiváciu siníc.

Kultivačné médium	Zloženie
BG11 (na 1 l)	roztok 1: 15 g/l NaNO <sub>3</sub> roztok 2: 4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> roztok 3: 7,5 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O roztok 4: 3,6 g/l CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O roztok 5: 0,6 g/l kyselina citrónová roztok 6: 0,6 g/l citrát železito-amónny zelený roztok 7: 0,1 g/l EDTA-Na <sub>2</sub> roztok 8: 2 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> roztok 9: 2,86 g/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 1,81 g/l MnCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O; 0,22 g/l ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 0,39 g/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 0,08 g/l CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O; 0,05 g/l Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O



Univerzálne médium Z pre kultiváciu rias a siníc (Staub 1961) pripravíme zmiešaním 10 ml zásobných sterilných roztokov č. 1 – 5; 0,5 ml roztoku č. 6; 0,08 ml roztoku č. 7 a doplníme destilovanou vodou do celkového objemu. Zloženie zásobných roztokov je uvedené v Tabuľke 5.

**Tabuľka 5** Univerzálne médium Z vhodné na kultiváciu niektorých druhov rias a siníc.

Kultivačné médium	Zloženie
Z (na 1 liter)	roztok 1: 46,7 g/l NaNO <sub>3</sub> roztok 2: 5,9 g/l Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O roztok 3: 3,1 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> roztok 4: 2,5 g/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O roztok 5: 2,1 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> roztok 6: Fe-EDTA (2,2 ml 35 % HCl; 250 ml H <sub>2</sub> O; 4,5 g FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O; 4,65 g Na <sub>2</sub> EDTA) roztok 7 (mikroprvky) do 100 ml: 0,31 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,223 g MgSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O 0,003 g Na <sub>2</sub> WO <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,0088 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O 0,0119 g KBr 0,0083 g KI 0,0287 g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,0154 g Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 0,0146 g Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0,0125 g CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0,0198 g NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0,0037 g Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,0035 g V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) 0,0474 g Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O

Nutričné médium (Hoagland 1920) pre kultiváciu rastlín v hydroponickom experimente pripravíme podľa Tabuľky 6.

**Tabuľka 6** Zloženie kultivačného média pre hydroponiu rastlín.

Kultivačné médium	Zloženie
Hoagland (na 10 litrov)	Makroprvky: 3,697 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 4,044 g KNO <sub>3</sub> 4,439 g CaCl <sub>2</sub> 2,917 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,179 g FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 3,399 g NaNO <sub>3</sub> 2,139 g NH <sub>4</sub> Cl 1,604 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> Mikroprvky: 0,0850 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,0006 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,05 g MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0,0066 g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,008 g CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O

Kultivačné médium MS (Murashige a Skoog 1962) pre kultiváciu rastlín pripravíme podľa Tabuľky 7.

**Tabuľka 7** Zloženie MS média pre kultiváciu rastlín.

Kultivačné médium	Zloženie
MS (na 1 liter)	4,405 g MS 30 g sacharóza destilovaná voda pH 5,7 – 5,8 10 g agar pre rastliny

\*Kultivačné médium hneď po pridaní agaru sterilizujeme v autokláve.

### g) Roztoky antibiotík

Roztoky antibiotík (Tabuľka 8) pripravujeme ako zásobné sterilné roztoky, ktoré sa uchovávajú zmrazené pri teplote -20 °C, ďalej sa na pracovnú koncentráciu nariedujú tesne pred pridaním do kultivačného média. Pri rovnakých podmienkach uchovávame aj zásobné roztoky IPTG a X-Gal (Tabuľka 8).

**Tabuľka 8** Zásobné roztoky antibiotík a roztoky pre selekciu bakteriálnych buniek *E. coli* transformácii.

Antibiotikum	Zloženie
Ampicilín	0,1 g 10 ml sterilnej destilovanej vody filtrovať
Kanamycín	1 g 10 ml sterilnej destilovanej vody filtrovať
Tetracyklín	0,1 g 10 ml sterilnej destilovanej vody filtrovať
Streptomycín	0,25 g 10 ml sterilnej destilovanej vody filtrovať
Nomycín	0,5 g 10 ml sterilnej destilovanej vody filtrovať
Zeocín	1 mg 10 ml sterilnej destilovanej vody filtrovať
IPTG	100 mM IPTG*
X-gal	20 mg/ml**

\*do LBA média pridať 10 µl IPTG (100 mM) na 1 ml média (finálna koncentrácia IPTG = 1mM)

\*\* do LBA média pridať 10 µl X-Gal (20 mg/ml) na 1 ml média.

### Otázky:

1. Prečo je potrebné upravovať pH pripravovaného roztoku skôr ako doplníte roztok do finálneho objemu?
2. Akými roztokmi sa najčastejšie upravuje pH pripravovaných roztokov?
3. Akými spôsobmi je možné sterilizovať roztoky?
4. Prečo niektoré roztoky nemôžu byť sterilizované autoklávaním?
5. Pri akých podmienkach prebieha sterilizácia v autokláve?
6. Prečo je dôležité pred každým použitím skontrolovať médium?
7. Aký význam má temperovanie média pred použitím?
8. Aký je rozdiel medzi zásobným a pracovným roztokom?
9. Aký je rozdiel v zložení a využití LB a LBA média?

## 4. Príprava biologického materiálu pre molekulárno-biologické experimenty

### Kultivácia

Kultivácia označuje laboratórne metódy, ktoré umožňujú rast eukaryotických alebo prokaryotických buniek vo fyziologických podmienkach v laboratórnom prostredí. Pôvod kultivácie buniek možno datovať na začiatok 20. storočia s cieľom študovať rast a maturáciu (dozrievanie) buniek tkaniva či biológiu vírusov. Tento proces zohral významnú úlohu aj v oblasti vývoja vakcín, neskôr v štúdiu génov zodpovedných za rôzne ochorenia, vo výrobe biofarmaceutík a pod. Experimentálne aplikácie kultivovaných buniek sú také rozmanité ako typy buniek, ktoré možno pestovať v podmienkach *in vitro*. V klinickom kontexte je však bunková kultúra najčastejšie spojená s vytváraním modelových systémov, v ktorých sa študuje základná bunková biológia, replikačné mechanizmy, atď. Jednou z výhod použitia bunkovej kultúry na tieto aplikácie je možnosť manipulovať s génmi a molekulárnymi dráhami. Okrem toho, homogenita tzv. klonálnych bunkových populácií alebo špecifických typov buniek a dobre definovaných kultivačných systémov odstraňuje interferujúce genetické alebo environmentálne premenné, a preto umožňuje generovanie údajov s vysokou reprodukovateľnosťou a konzistentnosťou, ktorú nemožno zaručiť pri štúdiu celých orgánových systémov. Zjednodušene, kultivácia zahŕňa pestovanie mikroorganizmov v kontrolovanom prostredí a pozorovanie ich rastových vzorcov, ako aj testovanie ich náchylnosti na rôzne spôsoby opracovania a liečby.

### Kultivácia bakteriálnych kmeňov

Rôzne druhy bakteriálnych kmeňov uchováваме na pevných agarových pôdach na Petriho miskách, alebo vo forme lyofilizovaných bunkových kultúr. Pri ich oživovaní, preočkovaní alebo pomnožovaní používame vyššie popísané tekuté kultivačné médiá (Tabuľka 1), ktoré vyberáme podľa fenotypu príslušného bakteriálneho kmeňa.

### Rastová krivka

Dynamiku rastu bakteriálnej populácie môžeme znázorniť vynesím absorpcie meranej pri určitej vlnovej dĺžke alebo logaritmu počtu viabilných buniek v závislosti od času inkubácie. Takto získaná krivka má sigmoidný tvar a nazýva sa rastová krivka. Zvýšenie bunkovej hmoty sa meria pomocou spektrofotometra, ktorý zaznamenáva zákal alebo optickú hustotu (OD, angl. *Optical Density*) ako faktor množstva svetla absorbovaného bakteriálnou suspenziou. Stupeň zákalu priamo súvisí s počtom prítomných mikroorganizmov. Množstvo prechádzajúceho svetla zakaleným prostredím klesá, čo sa prejaví následným zvýšením absorpcie. Táto metóda merania rýchlosti rastu buniek sa využíva hlavne kvôli svojej pohodlnosti a rýchlosti.

Rastová krivka zahŕňa štyri rôzne fázy (Obrázok 7):

1. **Lag-fáza:** obdobie, kedy sa bunky prispôbujú novému prostrediu a pripravujú sa na delenie buniek. Bunky sa zväčšujú, ale nie sú schopné replikácie a tak nedochádza k výraznému nárastu ich počtu. Dĺžka lag-fázy priamo závisí na predchádzajúcom stave mikroorganizmu. V prípade, že bakteriálne bunky (mikroorganizmus) rástli v médiu bohatom na živiny a my ich naočkujeme do nutrične chudobnejšieho prostredia, adaptácia daného bakteriálneho kmeňa (mikroorganizmu), na toto nové prostredie, mu zaberie viac času. V chudobnejších podmienkach mikroorganizmus začne syntetizovať nevyhnutné proteíny, koenzýmy a vitamíny potrebné pre svoj rast a teda dôjde k následnému nárastu v lag-fáze. Naopak v prípade, keď je mikroorganizmus z nutrične

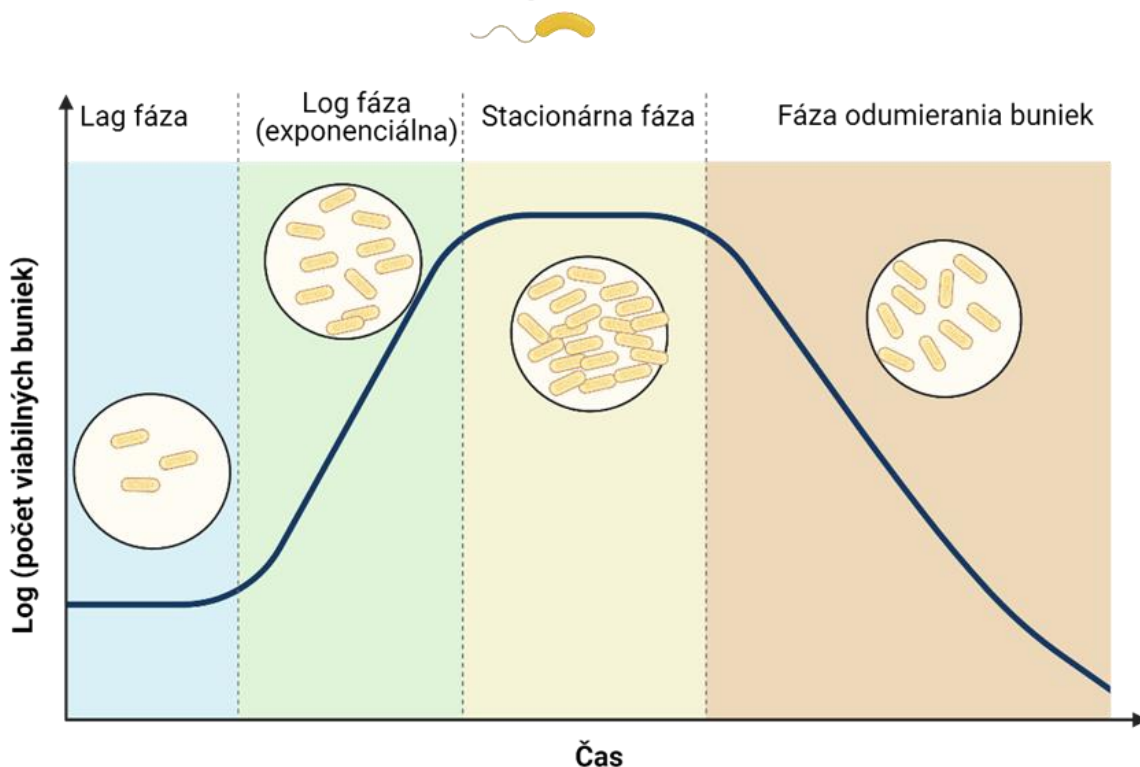
chudobnejšieho média prenesený na bohatšie médium, rýchlo sa prispôsobí tejto zmene a spustí sa delenie bez akéhokoľvek oneskorenia, a preto môže lag-fáza v krivke úplne chýbať.

2. **Logaritmická fáza (exponenciálna fáza):** kultúra dosahuje maximálnu a konštantnú rýchlosť rastu a počet buniek rastie s časom exponenciálne. V tejto fáze sa dá vypočítať generačná doba, nakoľko sa počet buniek neustále zdvojnásobuje. Hodnota generačnej doby je pre každý organizmus individuálna. Napríklad *E. coli* sa delí každých 20 min., preto je jej generačná doba 20 min. (napr. u *Vibrio cholerae* je to 10 min. a u *Staphylococcus aureus* je to 30 min.).

3. **Stacionárna fáza:** populácia rastie, čím sa znižuje koncentrácia živín a zvyšuje koncentrácia metabolitov. To vyústi do hromadenia odpadu, toxických metabolitov a inhibičných zlúčenín. Začnú sa meniť podmienky média ako je teplota či pH, a tým sa vytvára nepriaznivé prostredie pre rast baktérií. V určitom bode sa počet nových buniek rovná počtu mŕtvych, bunky ktoré zaniknú sú nahradené novými v približne rovnakom počte. Počas tejto fázy sa tvoria u niektorých baktérií endospóry.

4. **Fáza odumierania buniek (fáza poklesu):** vyčerpanie živín a nahromadenie toxických produktov metabolizmu v médiu vedie k zrýchľujúcemu sa úbytku buniek (poklesu životaschopných buniek). Počas tejto fázy baktéria úplne stráca schopnosť reprodukcie a počet mŕtvych buniek začne prevládať nad počtom živých. Niektoré organizmy sú voči tejto podmienke odolné a prežívajú pomocou tvorby tzv. endospór. Takéto prežívanie môže trvať rôzne dlho v rozmedzí týždňov až mesiacov.

## Rastová krivka pre bakteriálne kmene

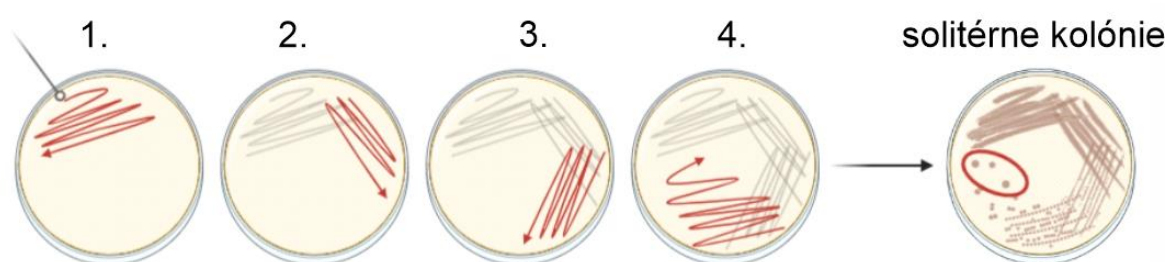


**Obrázok 7** Rastová krivka pre modelový mikroorganizmus, ktorá zahŕňa jednotlivé fázy rastu daného bakteriálneho kmeňa.

### Pestovanie bakteriálneho materiálu na pevnom médiu

Pri očkovaní bakteriálnych kmeňov na pevné kultivačné média na Petriho misky pracujeme v sterilnom prostredí (očkovacia miestnosť, laminárny box, Biohazard) a postupujeme nasledovne:

- Otvorené misky s čerstvo naliatym pevným agarom necháme stuhnúť a následne dostatočne presušíme v termostate alebo laminárnom boxe, aby zaschol vrchný vodný film. Takto zamedzíme difúzii buniek na vodnej vrstve na miske s agarom,
- bunkovú kultúru preočkujeme (prenášame) z jednej misky na druhú v blízkosti plameňa pomocou sterilného jednorázového očka alebo očkovacej tyčinky, prípadne pomocou vypálenej a ochladenej očkovacej ihly,
- pri preočkovaní pomocou očkovacej ihly jemne zachytíme jednu kolóniu na miske a prenesieme ju na druhú miskú jemným roztieraním po povrchu novej misky s naliatym a presušeným agarovým médiom podľa Obrázku 8.
- Petriho miskú po preočkovaní uzavrieme a prenesieme do termostatu a necháme rozrásť pri potrebnej teplote (teplota závisí od požiadaviek príslušného bakteriálneho kmeňa). Pre *E. coli* je optimálna kultivácia na pevnej živnej pôde v termostate pri 28 °C – 37 °C. Pre každú nasledujúcu prácu používame jednu solitérnu kolóniu z príslušných buniek (na Obrázku 8 v červenom ovále).



**Obrázok 8** Ilustračné znázornenie postupu pri inokulácii a preočkovaní bakteriálnych buniek na Petriho miskú s tuhým médiom, pre získanie jednej samostatnej (solitérnej) kolónie. Suspenziu buniek alebo solitérnu bakteriálnu kolóniu rozotierame pomocou inokulačného očka zľava do prava postupne ako je na obrázku, od 1. po 4. Na poslednej miske sú označené solitérne kolónie (červený ovál).

## Uchovávanie bakteriálnych buniek

Bakteriálne kmene na LBA platniach je možné uchovávať pri teplote okolo 4 °C aj niekoľko týždňov. V prípade dlhodobiejšieho uskladňovania bakteriálnych kmeňov je vhodné pripraviť glycerolové konzervy s bakteriálnou kultúrou.

Bunkovú konzervu pripravíme zmiešaním 0,5 ml bakteriálnej kultúry s 0,5 ml sterilného 80 % glycerolu v sterilnej 1,5 ml alebo 2 ml kryo-mikroskúmavke. Glycerol stabilizuje zmrazené baktérie a bráni poškodeniu bunkových membrán. Konzervu zamrazíme v tekutom dusíku (ponorením) a uchováme na -70 až -80 °C aj podobu niekoľkých rokov.

## Kultivácia kvasiniek

Kvasinky sú jednobunkové eukaryotické mikroorganizmy patriace medzi huby. Pre laboratórne využitie sú vynikajúcim genetickým modelom, nielen kvôli jednoduchej kultivácii v laboratóriu. Pre svoj rast a rozmnožovanie vyžadujú konkrétne podmienky taktiež vo forme živného média (pôdy). Pre rutinnú kultiváciu kvasiniek sa v laboratóriu obvykle používajú bohaté médiá (napr. YPD), ktoré im poskytujú všetky živiny pre ich rast. Pri raste buniek kvasiniek dochádza k zväčšovaniu objemu aj veľkosti buniek. Tvorba biomasy sa prejavuje rastom kultúry, kedy narastá živá hmota kvasiniek i s počtom buniek.

Všeobecne optimálna teplota sa pre takmer všetky laboratórne i priemyselne využívané kvasinky pohybuje v rozmedzí od 20 do 30 °C, čo znamená, že vo vzťahu k teplote patria medzi mezofilné mikroorganizmy.

Okrem teploty má na rast kvasiniek výrazný vplyv aj hodnota pH prostredia. Rozpätie hodnôt pH optimálnych pre rast kvasiniek, ale aj baktérií je relatívne malé. Kvasinky vo všeobecnosti vyžadujú kyslé prostredie v rozpätí pH od 3,5 do 5,0. Konkrétne u druhu *Saccharomyces cerevisiae* sa optimálne hodnoty pohybujú od pH 4 až 5, avšak u niektorých kmeňov sa môžu vyskytovať odchýlky (komenzálné kvasinky *Candida* spp. majú optimálne podmienky na rast 35 – 37 °C približne 48 hod., resp. 7 dní pri 25 °C (aeróbne)). Ak sa kvasinky vyskytnú v nevhodnom prostredí pomerne rýchlo si pH upravujú k optimálnym hodnotám, ale už mierne zásadité pH (okolo 7,5) zastavuje ich rast.

## Kultivácia rias a siníc

Sinice alebo cyanobaktérie (Cyanophyceae) sú nepohyblivé, planktónne gramnegatívne mikroorganizmy patriace do ríše eubaktérií a do oddelenia siníc. Sú veľkou a morfológicky rôznorodou skupinou. a ich prirodzeným prostredím sú bežné i niektoré extrémne prostredia. Biotopy a ekologické požiadavky cyanobaktérií sú rôznorodé (obývajú bežné vodné i niektoré extrémne prostredia) a závisia od rodov a dokonca aj od kmeňa. Napríklad *Spirulina platensis* vykazuje rast pri pH 9 – 10, zatiaľ čo *Anabaena* sp. vykazuje optimálny rast pri pH 7,4 – 8,4 a produktivita výrazne klesá pri hodnotách pH vyšších ako 9.

Pri pestovaní kultúr v podmienkach *in vitro* treba brať do úvahy rôzne environmentálne a prevádzkové faktory, ktoré ovplyvňujú biológiu organizmov. Tieto faktory ovplyvňujú produktivitu biomasy cyanobaktérií, ako aj jej zloženie. Najdôležitejšie faktory sú živiny, pH, svetlo a hustota kultúrnych buniek, teplota a kontaminácia inými mikroorganizmami. Rutinne používané médiá na kultiváciu rias a siníc sú uvedené v Tabuľke 3 – 5.

## Pestovanie rastlinného materiálu

Rastlinný materiál pre molekulárno-biologické analýzy je možné pestovať z kvalitného osiva výsevom na navlhčený filtračný papier alebo buničinu v Petriho miskách alebo na Murashige and Skoog (MS) médiu pre získanie klíčencov. V prípade, že pre experiment potrebujeme staršie rastliny ako niekoľkodňové klíčence, je vhodné sterilizované osivo vysiať priamo do pôdneho substrátu alebo klíčence z Petriho misky preniesť do pôdy alebo hydroponickej sústavy (pestovanie rastlín v nutričnom roztoku).

Pre zamedzenie vzniku kontaminácií počas rastu je potrebné vopred osivo sterilizovať. Na sterilizáciu osiva sa najčastejšie používajú roztoky 75 % etanolu, roztok NaClO (zriedený roztok z komerčného prípravku SAVO), HgCl<sub>2</sub> a iné. V závislosti od druhu osiva je potrebné zvoliť si vhodný prístup sterilizácie. Napr. zvolený počet semien obilnín je treba opakovane (2 – 3 krát) počas 10 – 15 min. sterilizovať za občasného miešania v 5 – 10 % roztoku s obsahom chlórnanu sodného pripraveného z komerčného prípravku SAVO. Sterilizované osivo je ďalej potrebné viackrát prepláchnuť v sterilnej destilovanej vode.

V prípade pestovania klíčencov je potrebné si vopred pripraviť filtračný papier, buničinu, resp. MS médium a ostatný materiál (pinzety, sklenené Petriho misky, atď.) Tento materiál vrátane média je treba sterilizovať autoklávaním. Pomocou sterilnej pinzety sa jednotlivé semená umiestňujú na filtračný papier/buničinu v Petriho miske alebo stuhnuté MS médium (Obrázok 9A) v Petriho miskách (rovno/šikmo)/skúmavkách/kultivačných nádobách). V čase klíčenia si niektoré rastliny nevyžadujú svetlo, je preto vhodné ich mať prikryté a umiestnené v kultivačnej miestnosti pri optimálnej teplote. Po vyklíčení je potrebné mladé klíčence pestovať pri optimálnom osvetlení a teplote (podmienky závisia od nárokov rastlinného druhu).

Pri hydroponickom experimente (Obrázok 9B) je vhodné si najskôr vyprodukovať zdravé klíčence (na filtračnom papieri/buničine/pevnom médiu) a následne ich opatrne preniesť do hydroponických podmienok. Pri tomto type pestovania rastlina čerpá živiny z vodného nutričného roztoku (napr. Hoaglandovo médium), v ktorom má ponorený koreňový systém. Médium by v hydroponickom

systeme malo byť okysličované a pravidelne dopĺňané (obnova nutrientov). V súčasnosti sú na trhu dostupné k zakúpeniu rôzne hydroponické systémy.

Pri pestovaní rastlín v pôdnom substráte (Obrázok 9C) je takisto vhodné substrát pred použitím sterilizovať vyhriatím pri teplote nad 100 °C (zničenie baktérií, húb a iných škodcov). V závislosti od dĺžky experimentu (ako staré rastliny pre experiment potrebujeme), je potrebné zvoliť vhodný črepník (priemer, veľkosť) pre zabezpečenie dostatočného priestoru pre rast a vývin rastliny. Sterilizované osivo v závislosti od nárokov pestovaného druhu a odrody rastliny je možné pestovať v črepníkoch umiestnených v kultivačnej miestnosti s regulovateľnými podmienkami (svetlo/tma, teplota pri simulácii dňa/noci), resp. v skleníkoch.



**Obrázok 9** Pestovanie rastlín na MS médiu (A), v hydroponickej sústave (B), v pôdnom substráte (C).

Po vypestovaní rastlín je dôležité vedieť na aký účel tento materiál bude slúžiť, koľko rastlinného pletiva, a z ktorej časti rastliny budete potrebovať ako vstupný materiál do experimentu. Taktiež je dôležité si uvedomiť, že pri každom experimente je potrebné urobiť aspoň 3 biologické opakovania (teda 3 rastliny pestované v rovnakých podmienkach) s čím treba počítať už pred vysievaním osiva a zakladaním experimentu.

Rastlinné pletivo (korene, stonky, listy, kvety) je možné oddeliť sterilným skalpelom, odvážiť hmotnosť (napr. 200 mg pre izoláciu DNA) pomocou presných váh a umiestniť do mikroskúmavky. Takéto čerstvé pletivo je možné použiť na analýzu okamžite (optimálne vzorky pletiva uchováваме na ľade alebo zamrazíme v tekutom dusíku a ďalej podľa protokolu homogenizujeme v príslušnom extrakčnom roztoku) alebo pre neskoršie analýzy môžeme takto navážene pletivo v mikroskúmavke zamraziť v tekutom dusíku a uchovávať pri -80 °C. V prípade potreby pletivo z hlbokomraziaceho boxu preniesieme do tekutého dusíka a potom homogenizujeme.

#### **Otázky:**

1. Definujte pojem kultivácia a pojem „in vitro“ pestovanie.
2. Popíšte spôsob merania dynamiky rastu bakteriálnych buniek.
3. Z akých fáz pozostáva rastová krivka, v ktorej z nich dosahujú bunky najvyššiu rýchlosť rastu?
4. Od čoho závisí teplota kultivácie bakteriálnych buniek?
5. Akými spôsobmi je možné uchovávať bakteriálne kmene v krátkodobom a dlhodobom časovom horizonte?
6. Vysvetlite čo je to bunková konzerva.
7. Akú úlohu zohráva glycerol pri príprave bunkovej konzervy?



## 5. Objemy v molekulárnej biológii a práca s mikropipetami

Práca v oblasti molekulárnej biológie zahŕňa finančne veľmi náročné analýzy. Z tohto dôvodu sú analýzy prispôbené extrémne malým objemom. Presný prenos malých objemov kvapalín, a to bez kontaminácie, je v tejto oblasti výskumu nevyhnutný pre prípravu reakčných zmesí. K tomuto bola vyvinutá široká škála pomôcok – automatické pipety (Obrázok 10).

Pre experimenty so zameraním na prácu s nukleovými kyselinami v mikroobjemoch je nevyhnutné dodržiavať podmienky prenosu sterilných roztokov. Pre túto prácu sú najvhodnejšie kalibrovateľné automatické mikropipety, práve pre ich rýchlosť a presnosť. V súčasnosti sú k dispozícii na trhu automatické pipety manuálne alebo elektronické od mnohých výrobcov, ktoré dokážu napipetovať objemy od 0,2  $\mu$ l do 10 ml. Mikropipety je takisto možné autoklávať, čím sa zabezpečí ich sterilita a spoľahlivosť pri práci s nimi.



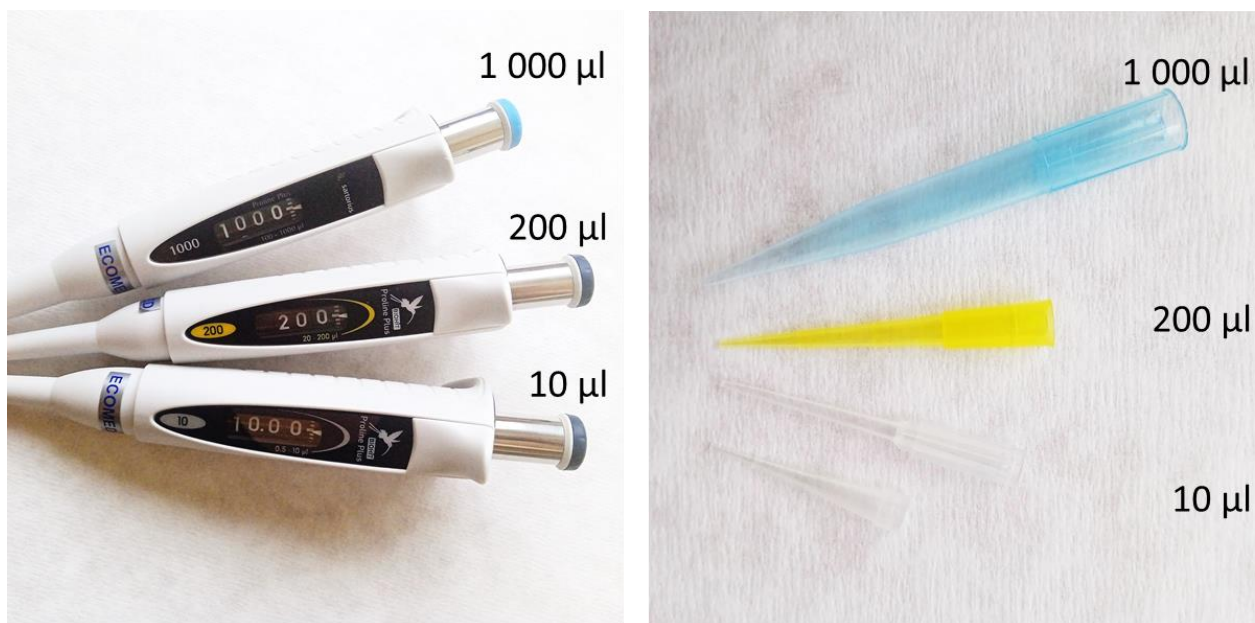
**Obrázok 10** Automatická jednokanálová mikropipeta s popisom jednotlivých častí.

Tieto tzv. „air-displacement“ pipety využívajú z mechanického hľadiska princíp „vzduchového vankúša“, keďže medzi piestom a kvapalinou vždy zostáva určitý objem vzduchu. Podľa prevedenia rozlišujeme jednokanálové (určené pre pipetovanie jedného objemu danej kvapaliny v čase) alebo multikanálové (najčastejšie 8-kanálové alebo 12-kanálové) určené pre súčasné pipetovanie rovnakého objemu danej kvapaliny do viac mikroskúmaviek (0,1 – 0,2 ml) alebo jamiek mikroplatničky.

Automatické pipety sú konštruované buď ako fixné (fixný objem) alebo nastaviteľné, kde je možné manuálne nastaviť objem v rozmedzí danej pipety pomocou nastavovacieho tlačidla.

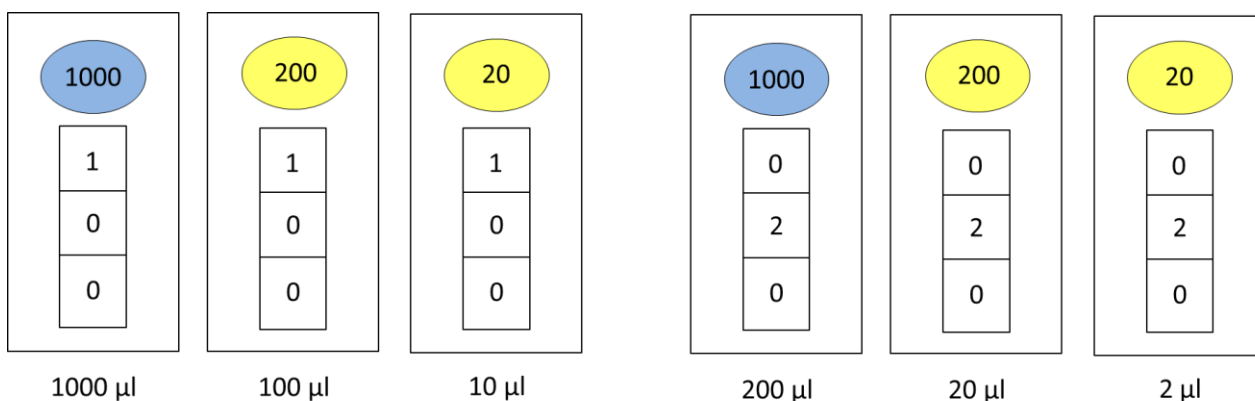
Pri prenose malých objemov kvapalín pomocou automatickej pipety je potrebné pracovať precízne a vyvarovať sa technickým chybám (nesprávna voľba pipety, špičky, chybné nastavenie objemu na displeji pipety a pod.) ešte pred začatím pipetovania. Je tiež potrebné uvedomiť si správne premeny jednotiek (1  $\mu$ l = 0,001 ml; 10  $\mu$ l = 0,01 ml; 100  $\mu$ l = 0,1 ml; 1000  $\mu$ l = 1 ml). Dôležité je začať správnym výberom pipety pre požadovaný objem a kompatibilnej špičky k pipete (Obrázok 11).





**Obrázok 11** Jednokanálové automatické mikropipety s objemom 100 – 1000 µl, 20 – 200 µl a 0,5 – 10 µl s príslušnými špičkami.

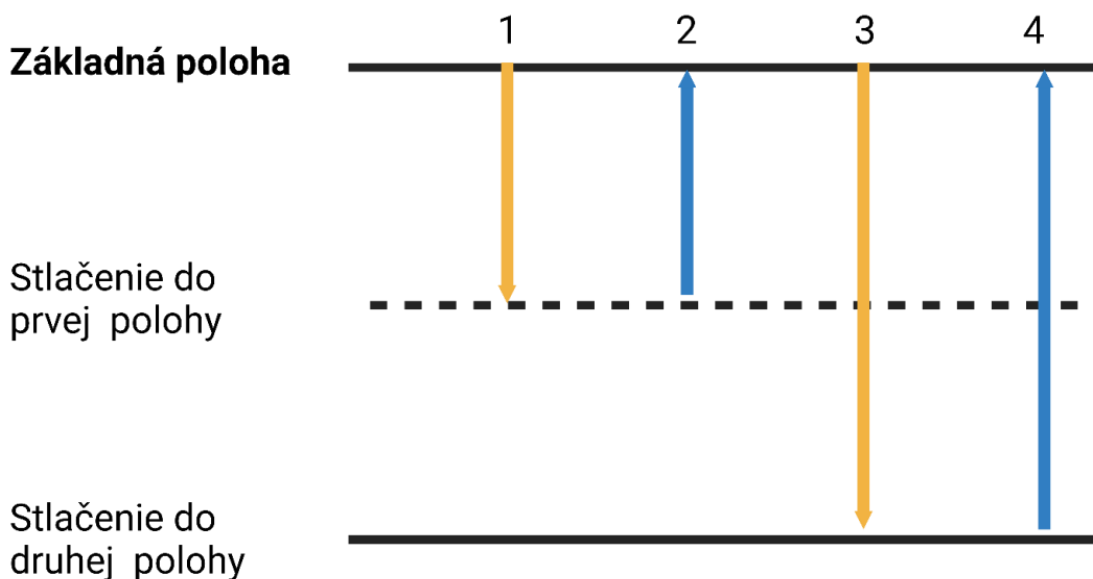
Ďalej je dôležité správne a presné nastavenie požadovaného objemu na displeji príslušnej pipety (Obrázok 12). Je nutné vyvarovať sa pretočeniu pipety pod, resp. nad hranicu jej rozsahu. Automatické pipety ponúkajú možnosť presnosti nastavenia objemu až na desatinné miesta (napr. objem 2,4 µl; 26,8 µl; 156,2 µl).



**Obrázok 12** Nastavenie správneho objemu na displeji príslušnej automatickej pipety.

Po správnom nastavení požadovaného objemu pre prenos kvapaliny sú dôležité správne zásady práce s mikropipetou a samotná technika pipetovania. Rozlišujeme 2 základné spôsoby pipetovania:

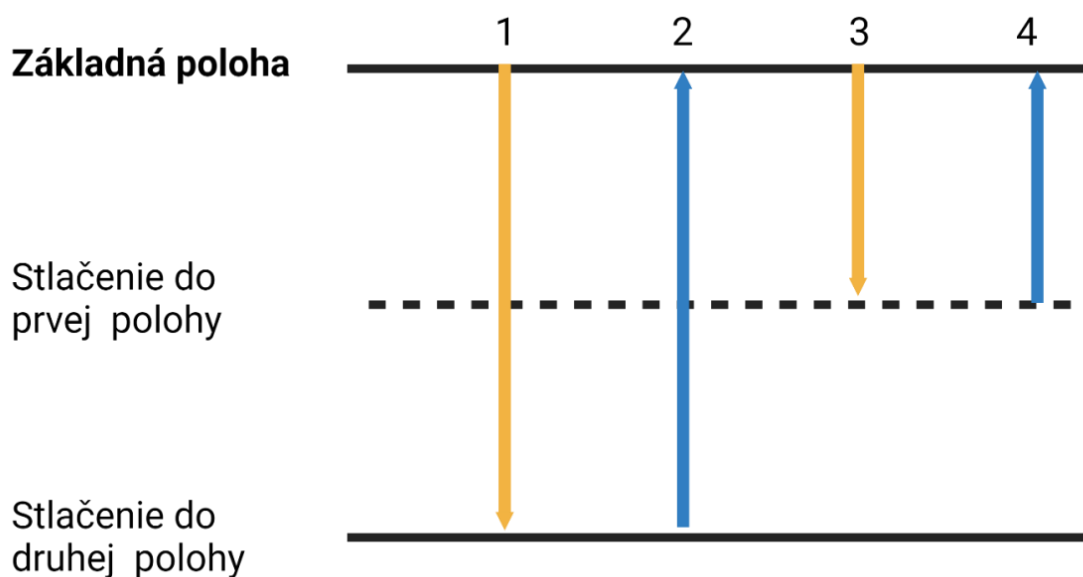
- Priame pipetovanie:** je najčastejšou technikou pipetovania, kedy sa do špičky nasaje presne nastavený objem kvapaliny a v ďalšom kroku sa zo špičky tento objem úplne vytlačí do zvolenej nádoby/skúmavky (Obrázok 13). Keďže určité množstvo kvapaliny zostáva na vnútornom povrchu špičky ako tenký film, pred pipetovaním vzoriek je potrebné nasť a vypustiť roztok, aby nedochádzalo k chybe pri pipetovaní. Priama technika pipetovania sa používa na meranie a transport väčšiny vodných roztokov či zriedených kyselín a zásad.



**Obrázok 13** Schéma techniky priameho pipetovania.

Postup priameho pipetovania:

1. Nasadíte si adekvátnu špičku na dávkovač pipety. Stlačte palcom piest do prvej pozície, pričom je potrebné prekonať slabý odpor pri stlačení. Dĺžka dráhy piestu pri stlačení závisí od objemu, ktorý ste nastavili na pipete (príklad: pri práci s pipetou v rozmedzí 20 – 200  $\mu\text{l}$ , bude pri pipetovaní minimálneho objemu 20  $\mu\text{l}$  dráha pri stláčaní piestu kratšia ako pri pipetovaní maximálneho objemu 200  $\mu\text{l}$ ).
  2. Ponorte vertikálne špičku dostatočne pod hladinu roztoku a pomaly povolujte stlačený piest do pôvodnej pozície čím zabezpečíte nasatie roztoku v nastavenom objeme do špičky. Pomalým nasávaním kvapaliny do špičky sa obmedzí možný vznik turbulencie, ktorá vedie k vzniku aerosólu a tiež takto zabránite nežiadúcemu vniknutiu bubliniek vzduchu. Optimálna rýchlosť nasávania závisí od vlastností kvapaliny (hustota a viskozita a pod.). Pomaly vytiahnite špičku z kvapaliny (pri rýchlom vytiahnutí sa môže stratiť časť obsahu v špičke).
  3. Pri vytlačaní kvapaliny držte špičku v miernom uhle proti stene nádoby (10 – 45°) a plynule stlačte piest palcom do prvej polohy a následne do druhej polohy. V prípade citlivých reagensí (komponenty pre PCR reakcie, enzýmy a pod.) je potrebné objemy týchto roztokov nanášať priamo do vopred napipetovaného objemu tlmivého roztoku alebo vody v skúmavke.
  4. Po vypustení objemu podržte piest stále stlačený a vytiahnite špičku von z nádoby/skúmavky. Povoľte piest a odstráňte špičku z pipety.
- b) **Reverzné pipetovanie:** pri tejto technike do špičky nasajeme väčší objem kvapaliny, ako ten ktorý sme chceli odmerať a v ďalšom kroku vytlačíme zo špičky objem nastavený na displeji pipety (Obrázok 14). Tento spôsob pipetovania poskytuje lepšie výsledky pri práci s viskóznymi (Triton X-100), penivými (roztok s obsahom dodecylsulfátu sodného) alebo vysoko tečúcimi (etanol, izopropanol) roztokmi a hodí sa pri meraní veľmi malých objemov. Po pipetovaní touto technikou zostane v špičke vždy zvyšok kvapaliny, ktorú je možné vytlačiť späť do zásobnej nádoby alebo do odpadu pred samotným odstránením špičky.



**Obrázok 14** Schéma techniky reverzného pipetovania.

Postup reverzného pipetovania:

1. Stlačte palcom piest až do druhej polohy.
2. Ponorte špičku pipety pod hladinu roztoku a pomaly povoľujte piest za súčasného nasávania vzorky do špičky.
3. Pomaly vytiahnite špičku z kvapaliny a odstráňte kvapky na vonkajšej stene špičky dotykom špičky o okraj nádoby. Pri vytlačaní daného objemu kvapaliny držte špičku v miernom uhle a pomaly plynule stlačte palcom piest do prvej polohy.
4. Držte piest stlačený v tejto polohe a vytiahnite špičku z nádoby von.
5. Časť kvapaliny, ktorá zostane v špičke, vytlačte stlačením piestu do druhej polohy späť do pôvodnej nádoby alebo do odpadu. Podržte piest stlačený a vytiahnite špičku z kvapaliny von, potom povoľte piest a odstráňte špičku z pipety.

**Úloha:**.....

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:**.....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....

**Tabuľka 9** Objemy roztokov A – D a dH<sub>2</sub>O pre prípravu roztokov 1 a 2.

1. skupina	dH <sub>2</sub> O	roztok A	roztok B	roztok C	roztok D	Celkový objem
roztok 1	500 µl	-	150 µl	110 µl	990 µl	
roztok 2	85 µl	25 µl	190 µl	50 µl	-	
roztok 3	5 µl	2,5 µl	0,5 µl	-	2 µl	

2. skupina	dH <sub>2</sub> O	roztok A	roztok B	roztok C	roztok D	Celkový objem
roztok 1	1000 µl	200 µl	-	350 µl	750 µl	
roztok 2	50 µl	125 µl	100	-	25 µl	
roztok 3	6,5 µl	-	1 µl	0,75 µl	1,75 µl	

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Otázky:**

1. Akým spôsobom si pomocou pipety overíte presnosť napipetovaného celkového objemu 800 µl roztoku, ktorý ste v mikroskúmavke zmiešali z 3 roztokov?
2. V akom prípade a prečo je možné pri pipetovaní viacerých vzoriek v experimente použiť jednu špičku opakovane?
3. Akú/é pipetu/y si zvolíte a akým spôsobom prenesiete z fľaše zásobný roztok o objeme 1 500 µl do mikroskúmavky, ak máte k dispozícii pipety P200 a P1000?
4. Aký je princíp pipetovania s „air-displacement“ pipetou?
5. Aký je rozdiel medzi priamym a reverzným typom pipetovania?

## 6.Príprava materiálu, roztokov a médií pre vlastné experimenty

Študent si podľa harmonogramu cvičení a pracovných protokolov pre cvičenia spíše zoznam potrebného laboratórneho skla, plastového materiálu, pomôcok, chemikálií a iných komponentov, ktoré bude potrebovať pri ďalšej práci.

Podľa metodík (nižšie) a po konzultácii s vyučujúcim si študent zadováži všetky potrebné chemikálie a ostatné zložky pre proces váženia chemikálií, miešania roztokov, filtrácie, úpravy pH a pod. Následne si študent pripraví potrebné roztoky a média v stanovených objemoch, vysterilizuje ich a správne uskladní.

V prípade potreby sterilného plastového a skleneného materiálu (mikroskúmvky, špičky, Petriho misky, hokejky, kadičky a iné), si študent pripraví tento materiál v dostatočnom množstve a vysterilizuje v autokláve.

**Poznámky:** .....

[illegible]

This image shows a full page of a handwriting practice worksheet. It consists of approximately 20 horizontal rows. Each row is defined by two parallel dotted lines, creating a series of uniform gaps for letter height. The lines are evenly spaced across the entire page, providing a guide for consistent letter formation. There is no text or other markings on the page.

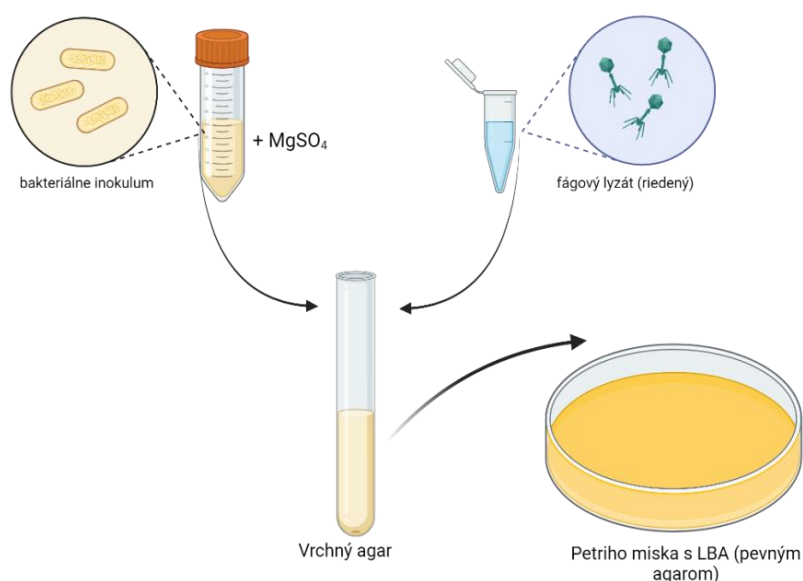
## 7. Práca s bakteriofágmi

Bakteriofágy (skrátene fág) patria do samostatnej skupiny vírusov. Sú to vírusy prokaryotických buniek, ktoré infikujú baktérie. Ide o obligátne intracelulárne parazity, ktoré sa množia v baktériách a využívajú niektoré alebo aj všetky biosyntetické mechanizmy baktérií. Fágy sú v prírode najpočetnejšou komunitou v tesnom kontakte s baktériami. Sú široko rozšírené v pôde, mori, exkrementoch a ďalších zložkách životného prostredia. Bakteriofágy úzko súvisia aj s prenosom genetického materiálu medzi baktériami. Ich využitie je nielen v základnom výskume, ale aj medicínskom a potravinárskom priemysle.

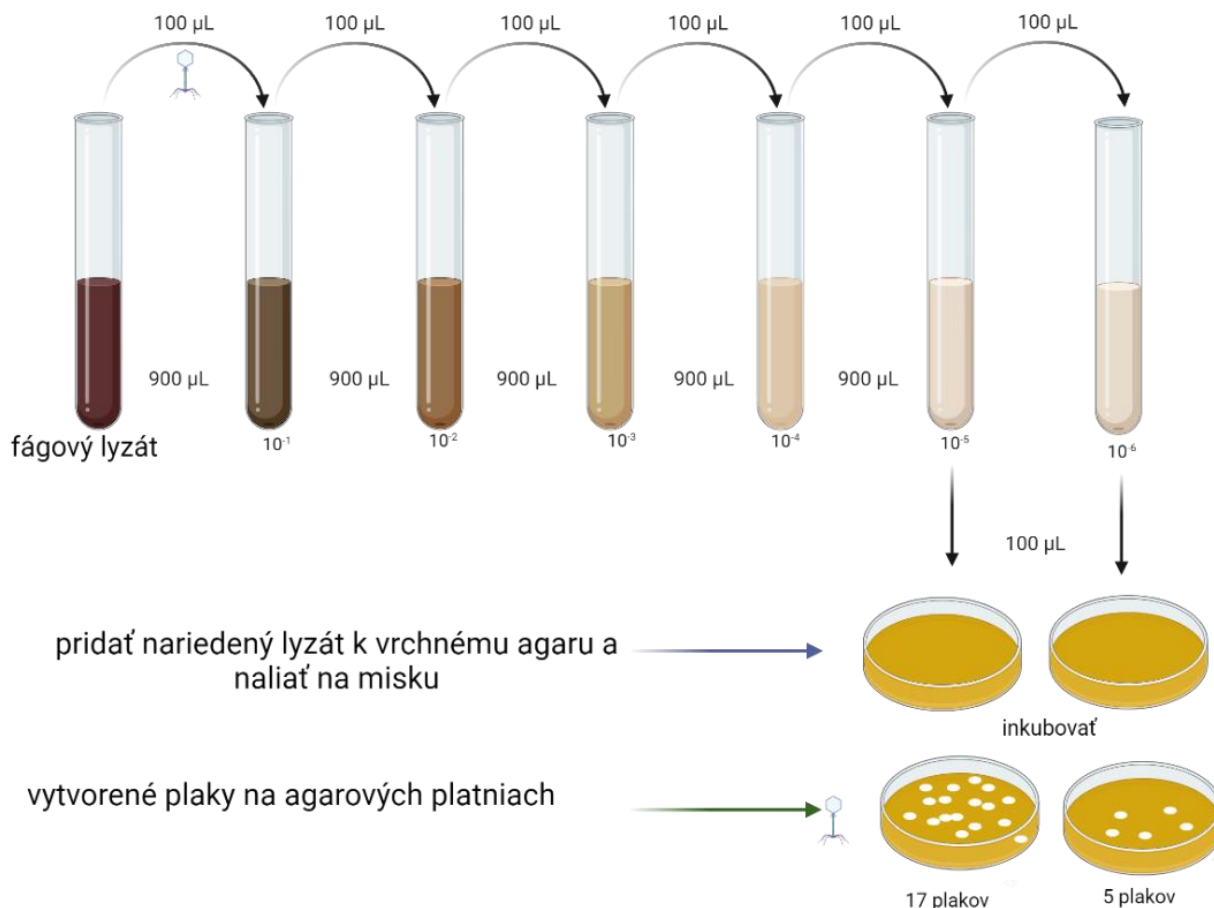
Virión (častica) bakteriofága sa skladá z dvoch základných zložiek, z proteínového obalu (kapsid) a nukleovej kyseliny (DNA alebo RNA). Proteínová hlavička chráni nukleovú kyselinu a vychádza z nej chvostík, na ktorého konci sú chvostíkové vlákna (nožičky, prípadne iný druh ozdôb), ktorými fág priľne na povrch hostiteľskej bunky. Do bakteriálnej bunky vstupuje len nukleová kyselina. Zvyšné časti bakteriofága sa dosyntetizujú priamo v infikovanej bunke, ktorá slúži fágovi ako výrobná továreň. Hotové virióny sú následne z bunky uvoľnené a bakteriálna bunka je usmrtená následkom lýzy (lytický cyklus). Reprodukčný cyklus fága môže prebiehať tromi spôsobmi: lýza, lyzogénia a pseudolyzogénia.

### Stanovenie titru bakteriofágov

Táto metóda je známa aj ako metóda dvojvrstvového agaru a používa sa v mikrobiológii na stanovenie počtu fágových častíc, ktoré sú schopné vytvárať plaky. Plaky sú jasné (prejasnené) zóny na pevnom agare, ktorý je súvisle prerastený hostiteľskými (indikátorovými) bakteriálnymi kmeňmi. Vznikajú v mieste, kde sa v okamihu očkovania nachádzala aktívna fágová častica, ktorá ako prvá infikovala daný kmeň a dala po infekcii vznik ďalším novým viriónom. Tie opäť napadli okolité citlivé bunky a takto postupne v niekoľkých za sebou opakujúcich sa lytických cykloch dochádza k lýze susedných hostiteľských buniek a vzniká plak. Plak predstavuje potomstvo fágov, ktoré vznikli z jednej fágovej častice. Stanovenie titru fága (Obrázok 15) pozostáva z nasledujúcich 3 hlavných častí: príprava fágového lyzátu, analýza tvorby plaku a stanovenie počtu viriónových častíc (Obrázok 16, 17). Základným predpokladom analýzy tvorby plakov je, že počet hostiteľských buniek musí byť niekoľkokrát vyšší ako počet fágových častíc.



**Obrázok 15** Inokulum s indikátorovou bakteriálnou kultúrou, riedený fágový lyzát, vrchný agar a Petriho miska s LBA potrebné na stanovenie titru bakteriofága.



**Obrázok 16** Názorný príklad na stanovenie počtu a tvorby plakov z fágového lyzátu na Petriho miskách pevným agarom. Vzorka fágového lyzátu sa najprv zriedi do požadovaného riedenia. 100  $\mu$ l fágoveho riedeného lyzátu pridáme spolu s inokulum (indikátorový bakteriálny kmeň a MgSO<sub>4</sub>) do vytemperovaného vrchného agaru a rovnomerne vylejeme na Petriho misky s tuhým agarom. Bakteriálne bunky sú pokryté agarózovou vrstvou. Bakteriofág produkovaný infikovanou bunkou môže infikovať okolité bunky. Ak sú infikované bunky usmrtené, vytvorí sa oblasť bez buniek (plak – priesvitná zóna).

**Úloha:** Príprava fágového lyzátu: zo vzorky .....  
a indikátorovej bakteriálnej kultúry.....

**Materiál:** indikátorová bakteriálna kultúra ....., vzorka

**Pomôcky:** bakteriologický filter,.....

**Prístroje:** .....

**Chemikálie:**

- chloroform
- 2x koncentrovaná LB živná pôda



**Pracovný postup I.:**

1. vzorku (trus, potravina, voda, ...) prefiltrujeme cez bakteriologický filter
2. k vzorke pridáme 20 µl chloroformu a vortexujeme 5 min., vzorku centrifugujeme pri 12 000 rpm počas 10 min. pri laboratórnej teplote a supernatant prepipetujeme do novej mikroskúmavky s 20 µl chloroformu
3. pripravený lyzát priamo (bez riedenia) kvapkáme na indikátorové bakteriálne kmene

**Pracovný postup II.:**

1. vzorku (trus, potravina, voda,...) prefiltrujeme cez bakteriologický filter
2. do 50 ml centrifugačnej skúmavky napipetujeme 1 ml 2x koncentrovanej LB, 1 ml prefiltrovanej vzorky a 100 µl nočnej bakteriálnej kultúry (poprípade aj zmes bakteriálnych kmeňov)
3. indukujeme stacionárne pri teplote 37 °C (30 °C) počas 48 hod.
4. po 48 hod. pridáme k vzorke chloroform (5 – 10 kvapiek na 10 ml lyzátu) a vzorku vortexujeme 5 min.
5. vzorku scentrifugujeme pri 12000 rpm počas 10 min. pri laboratórnej teplote
6. supernatant prenesieme do novej mikroskúmavky a pridáme 1 – 2 µl chloroformu
7. pripravený hotový fágový lyzát je možné priamo použiť pre ďalšie analýzy

**Poznámky:** .....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Úloha:** Analýza tvorby plakov bakteriofága ..... na  
indikátorovej bunkovej kultúre .....

**Materiál:** indikátorova nočná kultúra ....., fágový lyzát  
.....

**Pomôcky:** sklenené skúmavky vytemperované na 45 – 50 °C,.....  
.....

**Prístroje:** .....  
.....

**Chemikálie:**

- LBA
- vrchný agar 0,7 % LBA

**Pracovný postup:**

1. pracujeme v sterilnom laminárnom boxe, kde si pripravíme fágový lyzát a indikátorový (hostiteľský) bakteriálny kmeň – nočnú kultúru, Petriho misky s LBA a poriadne presušíme (ak už máme naliat LBA platne, vytemperujeme ich na laboratórnu teplotu)
2. zohrejeme vrchný agar a rozalíkvotujeme do sterilných skúmaviek po 3,5 ml a necháme temperovať na 45 – 50 °C

3. do vytemperovaných skúmaviek s vrchným agarom napipetujem 100 – 150 µl nočnej indikátorovej bakteriálnej kultúry, jemne premiešame a vylejeme na LBA platne v Petriho miskách, necháme presušiť 5 min.
4. pripravíme si nasledovné riedenia fágového lyzátu:  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$
5. na presušené misky nakvapkáme 10 – 20 µl fágového lyzátu z jednotlivých riedení a počkáme kým jednotlivé kvapky (spoty) nevsiaknu do LBA platní
6. opatrne prenesieme misky do termostatu na 37 °C a necháme inkubovať cez noc (misky obrátíme hore dnom)

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha: Stanovenie titru bakteriofága ..... infikujúceho bakteriálny kmeň .....**

**Materiál:** fágový lyzát, idikátorova bakteriálna kultúra,.....

.....

.....

**Pomôcky:**.....

.....

**Prístroje:** .....

.....

#### **Chemikálie:**

- 1x PBS alebo 25 mM Tris-HCl
- 0,9 % NaCl tlmivý roztok (pH 7,5)
- $\text{MgSO}_4$

#### **Pracovný postup:**

1. pripravíme si nasledovné riedenia fágového lyzátu:  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  v 1x PBS (alebo Tris-HCl tlmivom roztoku), rovnako ako pri predchádzajúcej metóde (analýza tvorby plakov). Sterilne pipetujeme 0,1 ml lyzátu alebo predchádzajúceho riedenia do 0,9 ml 1x PBS roztoku
2. pripravíme si sterilné skúmavky, ktoré budú obsahovať 3,5 ml 0,7 % vrchného agaru (LBA), rozvareného a temperovaného na 45 °C
3. k 20 ml hostiteľských (indikátorových) bakteriálnych buniek sterilne napipetujeme  $\text{MgSO}_4$  do výslednej koncentrácie 10 mM = inokulum
4. 300 µl inokula pridáme k 3,5 ml vrchného agaru
5. 0,1 ml z riedenia fágového lyzátu napipetujeme do skúmavky s vytemperovaným vrchným agarom a inokulum
6. celý obsah skúmavky vylejeme na Petriho misky s LBA a jemný krúživým pohybom sa vrchný agar rozleje po celej miske

7. misky po preschnutí dáme inkubovať do termostatu s teplotou 37 °C po dobu 12 – 16 hod. (resp. cez noc)

### Vyhodnotenie:

Spočítame počet plakov na miskách s najvhodnejším riedením, t.j., také riedenie, kde sa na miske nachádza okolo 100 plakov (misky, na ktorých je menej ako 10 plakov neberieme do úvahy). Výsledok vyjadrujeme v jednotkách PFU/ml. Tento výsledok v skutočnosti vyjadruje počet fágových častíc schopných vytvárať plak, nie absolútny počet vioriónov. Preto sa výsledok uvádza v tzv. PFU (angl. *Plaques Forming Units*).

### Príklad výpočtu:

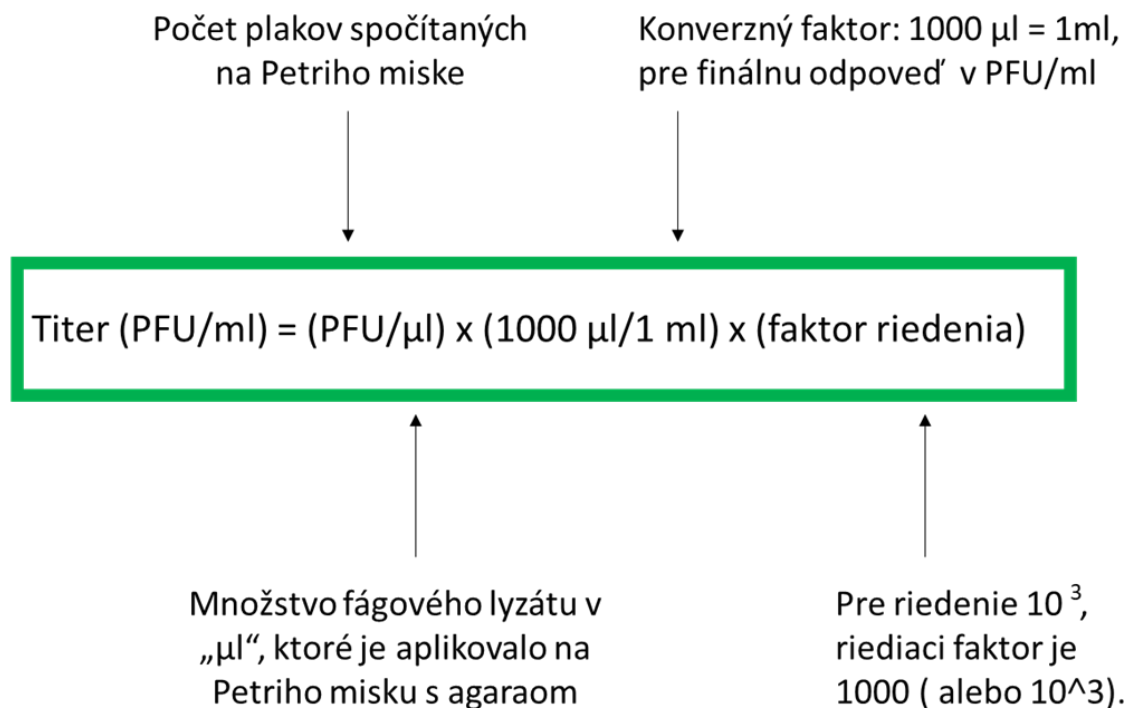
Na troch Petriho miskách naočkovaných s 0,1 ml fágovej vzorky riedenej  $10^6$  sa vytvoril nasledujúci počet plakov (Tabuľka 10):

**Tabuľka 10** Príklad pre zaznamenanie výsledkov pre vyhodnotenie počtu získaných plakov.

Miska (poradie)	Počet plakov
1.	112
2.	120
3.	119
priemer	117

Titer lyzátu fága:  $117 \times 10^6 = 1,17 \times 10^8$  v 0,1 ml ....teda.....  $1,17 \times 10^9$  v 1 ml v neriedenej vzorke.

Na výpočet PFU/ml môžeme použiť vzorec:



**Obrázok 17** Vzorec pre výpočet PFU.

Prípadne: (Počet plakov/objem vzorky) x  $1000 \mu\text{l}$  x faktor riedenia fágových častíc (lyzátu) = PFU/ml vzorky.

**Poznámky:** .....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Úloha: Izolácia fágovej DNA z bakteriofága ..... pomocou fenolu a chloroformu .....**

**Materiál:** 100 ml fágový lyzát.....  
.....

**Pomôcky:** sterilná sklenená tyčinka; .....  
.....

**Prístroje:** .....  
.....

**Chemikálie:**

- RNáza A
- DNáza I
- NaCl
- PEG 6000
- proteínáza K
- fenol
- chloroform
- zmes chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)
- 3 M octan sodný (pH 7,0)
- 96 % etanol
- TE roztok (10 mM Tris-HCl a 1 mM EDTA (pH 8,0))

**Pracovný postup:**

1. do 100 ml fágového lyzátu pridáme 2 mg RNázy A a 1 mg DNázy I a inkubujeme pri laboratórnej teplote 1 hod.
2. do vzorky pridáme postupne NaCl (práškový) do výslednej koncentrácie 1M a inkubujeme na ľade 1 hod. za stáleho miešania (používame miešadlo)
3. postupne začneme pridávať 9,5 g PEG 6000 a necháme vyzrážať 16 hod. v chlade (cez noc na ľade)
4. po vyzrážaní centrifugujeme na 4000 rpm počas 20 min. pri teplote 4 °C
5. sediment rozsuspendujeme v 3 ml sterilnej destilovanej vody
6. pridáme RNázu A (2 µg/ml) a DNázu I (100 µg/ml) a vzorku inkubujeme 1 hod. pri 37 °C
7. pridáme proteínázu K (100 µg/ml) a inkubujeme 1 hod. pri 37 °C
8. po inkubácii začneme extrahovať DNA pridaním 1x fenolu (1 : 1), 2x zmesi fenol : chloroform (1 : 1), 2x zmesi chloroformu
9. odmeriame objem extrahovanej zmesi DNA
10. pripravíme si sklenenú tyčinku a postupne pridávame 1/10 objemu 3 M octan sodný a 2x V (dvojnásobný objem) 96 % etanolu k DNA, ktorú natáčame opatrne na sklenenú tyčinku

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Materiál:** fágový lyzát.....  
.....

**Pomôcky:**.....  
.....

**Pristroje:** .....

**Chemikálie:**.....  
.....

[illegible]

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Otázky:**

1. *Charakterizujte pojem bakteriofág.*
2. *Čo je to virión?*
3. *Aký je rozdiel medzi lytickým a lyzogénym cyklom bakteriofága?*
4. *Čo je to titer fága? Akým spôsobom je možné ho stanoviť?*
5. *Čo sú to plaky?*
6. *Aký význam má temperovanie médií pred samotnou prácou?*
7. *Prečo je dôležité pracovať v sterilnom prostredí pri práci s baktériami, fágmi a pod.?*

## 8. Izolácia nukleových kyselín

Pre molekulárno-biologické analýzy je možné nukleové kyseliny izolovať z rôznych zdrojov: bunkové kultúry (baktérie, kvasinky a pod.), živočíšne tkanivá (kosti, bunky sliznice ústnej dutiny, sval, atď.), telesné tekutiny (krv, moč, atď.), rastlinné pletivá (stonka, kvet, listy, atď.). DNA môže byť izolovaná aj z extrémnych zdrojov (pôda, úžitková/odpadová voda, potraviny a iné).

V prípade bunkových kultúr je možné pre rýchlu detekciu klonov pomocou PCR použiť priamo bunkový lyzát bez procesu izolácie nukleovej kyseliny.

### Úloha: Príprava bunkového lyzátu

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:**.....

.....

**Prístroje:** .....

.....

#### Chemikálie:

- 1 % Triton X-100 (pracovný roztok)

#### Pracovný postup:

1. do sterilnej mikroskúmavky napipetujeme 200 µl roztoku 1 % Triton X-100
2. jemne odpichneme (zoškrabneme) pomocou sterilného špáradla časť vzorky z LBA misky (1 kolóniu)
3. zoškrabnutú kolóniu dáme do mikroskúmavky a poriadne premiešame/zvortexujeme v roztoku s roztokom 1 % Triton X-100
4. vzorku inkubujeme 10 min. pri teplote 95 °C
5. po inkubácii vzorku centrifugujeme pri 12000 rpm počas 10 min. pri laboratórnej teplote
6. supernatant použijeme priamo ako templát DNA do PCR reakcie

Pri metódach izolácie nukleových kyselín je potrebné použiť najlepšie čerstvý materiál (pletivo, tkanivo, bunková kultúra) alebo čerstvo zmrazený, aby sa zabránilo novej degradácii nukleových kyselín prítomnými nukleázami (DNáza, RNáza). V súčasnej dobe je k dispozícii viacero protokolov pre klasické izolačné postupy, ako aj postupy pre extrakciu nukleových kyselín (genómovej, chromozomálnej či plazmidovej DNA, celkovej RNA, mRNA či miRNA) s využitím komerčne dostupných extrakčných súprav. Pomocou takýchto súprav je možné izolovať nukleové kyseliny vo vysokej kvalite z rôznych biologických zdrojov (napr. bunkové kultúry siníc, rias, baktérií, vírusov, rastlinných pletív a živočíšnych tkanív), dokonca aj z degradovaného alebo starého materiálu (kostrové pozostatky a pod.).

### Izolácia genómovej DNA

Genómová DNA alebo gDNA je chromozomálna DNA, na rozdiel od extrachromozomálnej DNA, ako je plazmidová DNA. Genómová DNA obsahuje všetky biologické informácie, ktoré sa majú odovzdať ďalšej generácii. Väčšina organizmov má rovnakú genómovú DNA vo všetkých svojich bunkách, avšak v každej bunke sú aktívne iba určité gény. Genómová DNA obsahuje tzv. kódujúce aj nekódujúce oblasti, známe ako exóny a intróny. Intróny sú fragmenty génov, ktoré nemajú kódujúce sekvencie. Vo všeobecnosti sú intróny zostrihané alebo "odstránené" z RNA počas

procesu transkripcie pred syntézou proteínov. To je možné len u eukaryotov, prokaryoty nie sú schopné spájať intróny. Exóny sú nevyhnutnou súčasťou kódovacieho systému a sú zachované po zostrihu intrónov.

Izolácia genómovej DNA je počiatočným krokom pri molekulárnej charakterizácii organizmu. V tomto procese zohráva najdôležitejšiu úlohu čistota (bez tzv. kontaminantov – prímеси RNA, proteínov, polysacharidov a pod.) a kvalita izolovanej gDNA (v dostatočnom množstve). Čistota je určená rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami jednotlivých biologických makromolekúl.

Po izolovaní sa gDNA môže použiť na vytvorenie genómových knižníc na sekvenovanie DNA, odtlačky prstov, diferenciáciu a ďalšie klinické a výskumné aplikácie.

Metódy izolácie genómovej DNA sú zvyčajne založené na troch základných krokoch:

1. dezintegrácia biomembrán a lýza buniek; 2. precipitácia gDNA; 3. zakoncentrovanie gDNA.

Konkrétny postup izolácie DNA obyčajne závisí od organizmu, z ktorého pri izolácii vychádzame. Extrakcia DNA z rastlinných pletív je náročnejšia vzhľadom na prítomnosť pevnej bunkovej steny, ktorá chráni rastlinné bunky.

V prvom kroku izolácie lýze buniek v mnohých prípadoch predbieha krok, v ktorom sa zabezpečí lepší prístup k bunkám. Predpokladom uvoľnenia gDNA z buniek je rozrušenie (dezintegrácia) bunkovej steny (v prípade rastlinného pletiva) a biomembrány bunky. Na rozrušenie bunkovej steny sa používa kombinácia fyzikálnych a chemických postupov (zamrazením materiálu v tekutom dusíku a následné mechanické rozdrvenie v homogenizátore/trecej miske). Tekutý dusík zároveň udržiava potenciálne prítomné DNázy a RNázy za nízkej teploty inaktívne, čo eliminuje degradáciu nukleových kyselín. V prípade bunkovej kultúry (kvasinky, baktérie, riasy, sinice) pestovanej v tekutom médiu, je dôležité oddelenie buniek od média centrifugáciou. Po dezintegrácii biomembrán pomocou pôsobenia detergentov (rozrušujú membrány), enzýmov (inhibítory nukleáz), chelatačných činidiel a povrchovo aktívnych látok sa pristupuje k lýze buniek.

Lýzu buniek je možné dosiahnuť použitím detergentov (zabezpečujú solubilizáciu bunkovej membrány) a enzýmov (štiepenie glykoproteínov a inaktivácia DNáz). Živočíšne bunky sú obalené len cytoplazmatickou membránou, a preto je možné dosiahnuť ich lýzu jemnejšími prostriedkami, napr. pôsobením slabých neionogénnych detergentov (Triton X-100) v kombinácii s proteolytickými enzýmami – proteázami. Buková stena kvasiniek sa svojim zložením a tiež odolnosťou líši od bunkovej steny baktérií, preto je potrebné pri procese izolácie vhodne použiť kombináciu postupov mechanickej dezintegrácie buniek. Pomerne často sa využívajú na tento účel degradačné enzýmy, ako je glukoronidáza.

Akonáhle je bunková stena narušená dochádza k uvoľňovaniu všetkých vnútorných bunkových komponentov do vonkajšieho prostredia (roztoku). Táto zmes sa nazýva hrubý lyzát, ktorý obsahuje okrem RNA a gDNA aj ďalšie komponenty, ako polysacharidy, lipidy, bielkoviny a nízkomolekulový uhl'ovodík. Z hrubého lyzátu je potom možné ďalej izolovať DNA po odstránení vyššie uvedených nežiadúcich komponentov.

V ďalšom kroku sú odstránené proteíny a ostatné vysokomolekulové zložky bunky (okrem gDNA). Aby v tejto fáze nedošlo k degradácii cieľovej nukleovej kyseliny je potrebné použiť čo najmiernejšie podmienky lýzy, uskutočňovať ju v prostredí príslušného extrakčného roztoku (prípadne aj v chlade). Dôležitým faktorom je aj prítomnosť chelatačných činidiel v lyzačnom roztoku (napr. EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová), ktoré z roztoku "vychytávajú" dvojmočné kationy ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), čím sa odvráti pôsobenie nukleáz, ktoré by mohli degradovať DNA uvoľnenú z buniek.

Z deproteinizačných prostriedkov sa na izoláciu nukleových kyselín používajú nasýtené roztoky solí, napr. NaCl alebo octan sodný, ktoré sú veľmi účinné vo fáze precipitácie (zrážania) gDNA. Aj detergenty SDS alebo sodná soľ N-lauroylsarkozínu pomáhajú deproteinizácii, pretože účinne uvoľňujú nukleové kyseliny z ich väzby na bielkoviny.

Posledným krokom v procese izolácie gDNA je prevedenie čistej formy gDNA do roztoku, použiteľného pre ďalšie analýzy. Na prečistenie nukleových kyselín od nízkomolekulových látok (zvyšky solí, fenolu a pod.) a na skoncentrovanie vzorky sa používa alkoholové zrážanie (precipitácia). Čistú gDNA môžeme získať zrážaním pomocou etanolu alebo izopropanolu.



Zrážanie sa robí často pri nízkej teplote (-20 °C), kedy je výťažok kvantitatívny aj pri nízkej koncentrácii gDNA. Na druhej strane, zrážanie pri laboratórnej teplote je výhodné, ak chceme vyzrážať gDNA bez súčasného vyzrážania ("oživenia") kontaminujúcej RNA. Vyzrážanú nukleovú kyselinu, tzv. precipitát oddelíme centrifugáciou a prečistíme 70 % etanolom pre odstránenie zvyškov solí prítomných v zrazenine DNA.

Na záver precipitát rozpustíme vo vodnom roztoku, ktorý obsahuje Tris-HCl (pH 7,5 – 8,0) s EDTA (zabraňuje degradácii gDNA deoxyribonukleázami).

Takto izolovaná gDNA je pripravená na ďalšie molekulárno-biologické analýzy. Vzorky gDNA sa skladujú pri teplote 4 °C krátkodobo (do pár hodín) a dlhodobo pri -20 °C.

V závislosti od vstupného materiálu (rastlinné pletivo, živočíšne tkanivo, bunková kultúra a pod.), nárokov na čistotu a kvalitu gDNA, ako aj následného využitia gDNA v ďalších analýzach je možné gDNA izolovať viacerými metódami:

**Organická extrakcia (fenol-chloroformová extrakcia)** využíva princíp hydrofobicity zmesi fenolu a chloroformu. Vďaka týmto vlastnostiam sa pomerne jednoducho oddeľujú od vodnej fázy. Keď sa vrstvy navzájom premiešajú, dochádza k denaturácii proteínov, ktoré sa vyzrážajú v organickej fáze. Následnou centrifugáciou zmesi sa docielia oddelenie dvoch vrstiev, organickej fázy obsahujúcej kontaminanty (zvyšky proteínov) a vodnej fázy s obsahom gDNA a RNA (ak je pH fenolu príliš kyslé, vo vodnej fáze zostáva len RNA, preto by malo byť pH fenolu skôr alkalické až neutrálne, aby zostala vo vodnej fáze zachovaná práve gDNA). Po fenol-chloroformovej extrakcii je potrebné extrahovanú gDNA precipitovať v etanole za prítomnosti jednomocných iónov, vďaka čomu sa odstránia nežiadúce soli a fenol. Nakoľko je fenol denaturačné činidlo a jeho zvyšky by mohli denaturovať enzýmy potrebné pre ďalšie analýzy, ako napr. PCR, sekvenovanie. Po precipitácii nasleduje rozpustenie gDNA (agregátov DNA).

Metóda organickej extrakcie DNA je časovo náročná a v súčasnosti menej používaná, pretože extrahovaná DNA môže obsahovať zvyšky fenolu a chloroformu, ktoré inhibujú enzymatické reakcie.

**DNA extrakčná metóda CTAB** (cetrimóniumbromid) je základnou metódou izolácie gDNA z čerstvých aj sušených listov rastlín. Táto metóda zvyčajne zahŕňa počiatočnú fázu dezintegrácie bunkových stien rastlinného materiálu, ktorá umožní prístup k gDNA. Rozdrvené pletivo sa rozsuspenderuje v CTAB lyzačnom roztoku. Vzorka sa následne mieša so zmesou chloroformu a izoamylalkoholu. gDNA sa potom vyzráža z vodnej fázy a dôkladne sa premyje etanolom, aby sa odstránili kontaminujúce soli. Purifikovaná gDNA sa potom resuspenderuje a uchováva v TE roztoku.

**Minikolónová extrakčná metóda** je populárna metóda na izoláciu nukleových kyselín s využitím komerčnej sady (kit) s obsahom príslušných roztokov a centrifugačných kolóniek. Trh ponúka kity optimalizované na rôzne množstvo výťažkov (desiatky µg DNA). Výhodou tejto extrakčnej metódy je, že je veľmi jednoduchá, časovo nenáročná (30 – 60 min.), zabezpečuje vysokú väzbovú kapacitu kolónky (cca 50 µg) a tiež čistotu výťažku (výrobcovia udávajú cca 1,6 – 1,9 pri A260/280).

V tejto metodike sa využíva schopnosť adsorbovať gDNA za špecifických podmienok (koncentrácia solí, pH, a pod.) vďaka materiálu v minikolóne (matica).

Lyzát získaný po rozrušení buniek, tkaniva alebo pletiva a pôsobení proteáz sa nanesie do špeciálnych izolačných minikolóniek. Po lýze vstupného materiálu sa upraví väzbové podmienky tak, aby sa na membránu viazal len požadovaný druh nukleovej kyseliny. Vo vnútri takejto kolónky je umiestnená špeciálna matica (silikagélová membrána, matrix), na ktorú sa naviaže prítomná nukleová kyselina, napr. DNA. Zvyšný roztok a v ňom prítomné polysacharidy a proteíny sa nenaviažu na membránu, ale centrifugáciou kolónky sa odstránia z matrice (samozrejme bez DNA). Matica s naviazanou DNA sa opakovane premyje premývacím roztokom obsahujúcim alkohol, aby sa odstránili prebytočné soli a nasledujúcou centrifugáciou je premývací roztok opäť odstránený. Po premytí sa DNA z matrice eluuje – vyviaže sa pomocou vody alebo elučného roztoku s nízkym

obsahom solí a centrifugácie do zbernej čistej mikroskúmavky. Takáto DNA je čistá a v dostatočnej kvalite a kvantite pripravená na ďalšie analýzy ako sú restriktčné štiepenie, PCR, či sekvenovanie.

## **Úloha: Izolácia genómovej DNA z bunkovej kultúry kvasiek**

**Materiál:** .....

**Pomôcky:**.....

**Prístroje:** .....

### **Chemikálie:**

- YPD médium
- SCED rozok (pH 7,5)
- zymoláza (100 mg/ml)
- 10 % SDS
- 5 mM roztok octanu draselného (pH 8,9)
- izopropanol
- RNáza (10 mg/ml)
- TE roztok (pH 7,5)
- 1 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 96 % etanol

### **Pracovný postup:**

1. naočkujeme si do 3 ml YPD tekutého média kvasinkový kmeň a inkubujeme pri teplote 37 °C cez noc v trepačke pri 250 rpm
2. nočnú kvasinkovú kultúru prepipetujeme do sterilnej mikroskúmavky a centrifugujeme pri 12100 × g počas 3 min. pri laboratórnej teplote
3. zmes intenzívne zvortexujeme alebo rozsuspendujeme v 200 µl deionizovanej sterilnej vody
4. opätovne centrifugujeme pri rovnakých podmienkach ako v bode 2
5. bunky nariedime pomocou 400 µl SCED roztoku (pH 7,5)
6. k suspenzii pridáme 5 – 10 µl zymolázy a inkubujeme 1 hod. pri 37 °C a 750 rpm
7. pridáme 40 µl 10 %) SDS, zmes jemne premiešame a následne inkubujeme 5 min. na ľade
8. ďalej do vzorky pridáme 300 µl 5 M octanu draselného (pH 8,9) a vzorku centrifugujeme pri 12100 × g počas 3 min. pri teplote 4 °C
9. odoberieme supernatant do sterilnej mikroskúmavky a pridáme izopropanol v pomere 1 : 1 a precipituje DNA pri teplote -20 °C po dobu 15 min.
10. vzorku centrifugujeme pri 12100 × g počas 5 min. pri teplote 4 °C
11. supernatant vylejeme a zvyšok alkoholu necháme odpariť
12. pelet rozsuspendujeme v 500 µl TE roztoku (pH 7,5) a pridáme 10 µl RNázy (10mg/ml)
13. vzorku inkubujeme po dobu 20 min. pri 37 °C
14. pridáme 1 ml etanolu (aby sme zo zmesi vyzrážali DNA) a inkubujeme 30 min. pri teplote -20 °C
15. vzorku centrifugujeme pri 12100 × g počas 5 min. pri teplote 4 °C
16. pelet vysušíme pri laboratórnej teplote a rozpustíme v 20 µl v 1mM TrisHCl (pH 7,5)
17. získanú gDNA uchováваме pri -20 °C až -80 °C

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha: Izolácia genómovej DNA CTAB metódou z rastlinného pletiva podľa Békésiová a kol. (1999)**

**Material:** .....

**Pomôcky:** .....

**Pristroje:** .....

### Chemikálie:

- precipitačná zmes: 8 V (objemov) 96 % etanolu a 2 V 1 M acetátu sodného (pH 5,2)
- roztok 1: 0,35 M sorbitol; 0,1 M Tris (pH 8,0); 5 mM EDTA → upraviť pH na 7,5 → sterilizovať v autokláve
- roztok 2: 0,2 M Tris (pH 7,5); 50 mM EDTA (pH 7,5); 2 M NaCl; 2 % CTAB → sterilizovať v autokláve
- 5 % sodná soľ N-lauroylsarkozínu
- chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)
- TE roztok (pH 8,0)

**Priprava roztokov:**

### Pracovní postup:

1. keramický mažiar zmrazíme tekutým dusíkom a pridáme 0,5 g čerstvého rastlinného pletiva
2. pletivo dobre a rýchlo!!! rozdrvíme na jemný prášok
3. ku vzorke pridáme 300 µl roztoku 1 a 300 µl roztoku 2, vzorku rýchlo zvortexujeme a uložíme na ľad
4. pridáme 120 µl 5 % N-lauroyl sarkozínu sodného a znovu dobre premiešame, vzorku necháme stáť niekoľko sek. pri laboratórnej teplote
5. vzorku inkubujeme 15 – 20 min. pri teplote 65 °C vo vodnom kúpeli, ďalej necháme vychladnúť pri laboratórnej teplote 5 – 10 min. (v tomto kroku musí byť lyzát číry, mierne viskózný)
6. k lyzátu pridáme 700 µl roztoku chloroform: izoamylalkohol (24 : 1), vzorku pretrepeme a scentrifugujeme pri 13000 rpm, teplote 4 °C počas 10 min.
7. vodnú fázu preniesieme do novej mikroskúmavky (ak nie je vodná fáza číra, opakovane pridáme 700 µ chloroform: izoamylalkohol (24 : 1), pretrepeme a opäť scentrifugujeme)
8. DNA vyzrážame pridaním 800 µl precipitačnej zmesi, jemne poprevraciame a ešte necháme zrážať 15 min. pri -20 °C
9. vzorku scentrifugujeme pri 14 000 rpm počas 10 min. pri teplote 4 °C
10. kvapalnú zmes odsajeme a ku vyzrážanej DNA pridáme 1 ml 70 % etanolu
11. vzorku dôkladne premiešame (aby DNA bola obmytá etanolom zo všetkých strán), krátko scentrifugujeme pri 10 000 rpm počas 3 min. pri teplote 4 °C a etanol odpipetujeme
12. premývanie opakujeme 2-krát, po premývaní etanol dobre odpipetujeme a vzorku DNA dáme vysušiť pri teplote max. 60 °C
13. prečistenú DNA rozpustíme v 100 µl TE roztoku miešaním pomocou vortexu
14. takto získame 100 µl DNA, ktorú uchováваме dlhodobo pri v -20 °C

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha:** Izolácia genómovej DNA z .....  
 minikolónovou extrakčnou metódou pomocou komerčnej súpravy  
 .....

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....

**Pracovný postup:** .....

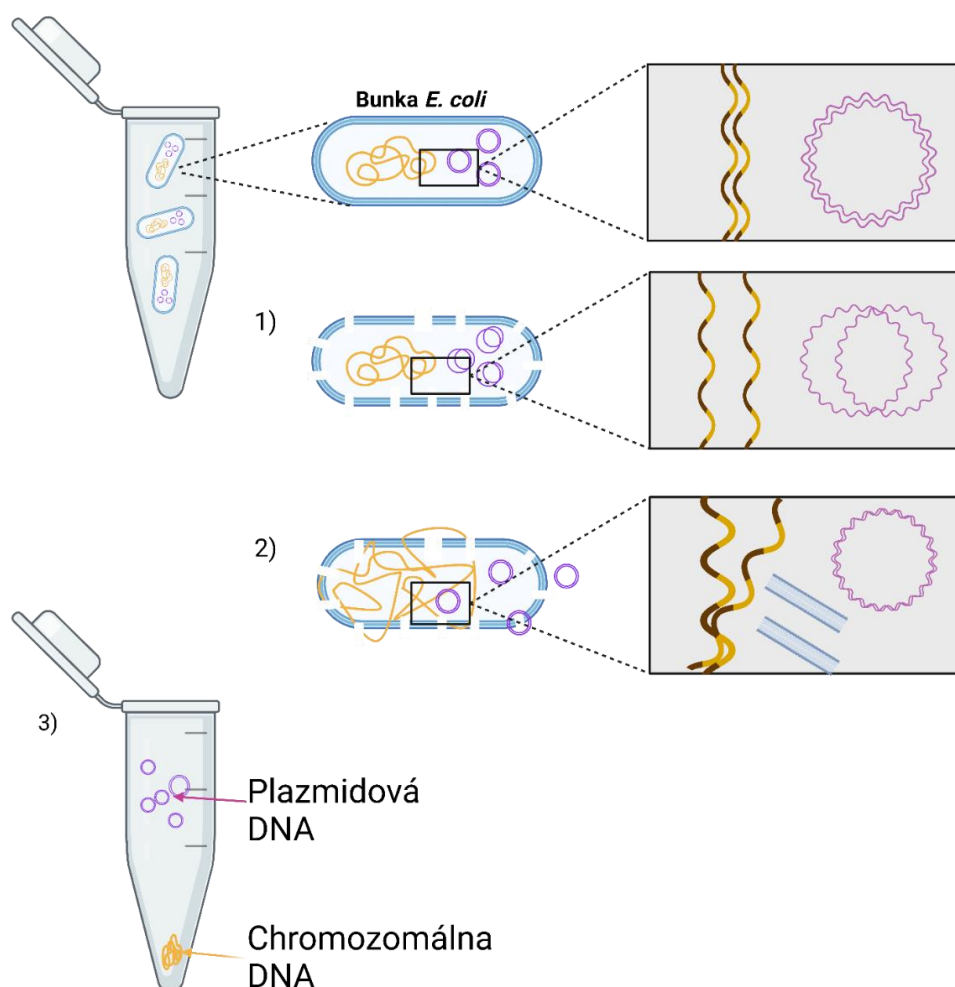
.....



## Izolácia plazmidovej DNA

Plazmidy sú malé, kruhové, dvojvláknové, samoreplikujúce sa DNA molekuly, ktoré sa prirodzene vyskytujú v mnohých prokaryotických a eukaryotických organizmoch ako baktérie, huby, sinice atď. Ich veľkosť sa pohybuje od 1 kb do viac ako 300 kb. Existujú tri formy plazmidov: lineárne, nadzávitnicové a uzavreté.

**Metóda alkalickej lýzy** na izoláciu plazmidovej DNA využíva fyzikálny rozdiel medzi lineárnou, uzavretou a nadzávitnicovou plazmidovou DNA a gDNA. Pri tejto metóde sa bakteriálne bunky, ako sú bunky *E. coli* najskôr resuspendujú, následne lyzujú s použitím NaOH a detergentu SDS (Obrázok 18 – fáza 1). Tieto činidlá oslabujú bakteriálnu bunkovú stenu a tiež inaktivujú enzýmy, ktoré štiepia DNA. Bakteriálne proteíny sú po aplikácii SDS denaturované, čo pomáha rozrušiť bunkovú stenu uvoľnením hyperlytickej osmózy na molekuly DNA (chromozomálna a plazmidová), proteíny a ďalší obsah. Po pridaní hydroxidu sodného a zvýšení pH, chromozomálne a plazmidové molekuly DNA podliehajú denaturácii. So znížením pH roztoku vo fáze neutralizácie (Obrázok 18 – fáza 2) pomocou roztoku octanu draselného (KAc) sa plazmidová DNA renaturuje rýchlejšie ako genómová DNA, pretože má malú veľkosť a je v nadzávitnicovej konformácii. Chromozomálna DNA a bakteriálne proteíny sa vyzrážajú a po odstredení sa odstraňujú. Plazmidová DNA sa vyzráža izopropanolom/etanolom a následne sa ostatné kontaminanty soli odstraňujú použitím 70 % etanolu.



**Obrázok 18** Schéma a princíp izolácie plazmidovej DNA.

**Minikolónová metóda** na izoláciu plazmidovej DNA je efektívna metóda pre získanie veľkého množstva (až 20 µg) plazmidovej DNA s vysokou čistotou. Táto technika je rýchla (menej ako 2 hod.), vyvinutá tak aby proces prebehol v niekoľkých centrifugačných krokoch v mikrokolónach s využitím dodaných roztokov, bez použitia akýchkoľvek organických rozpúšťadiel alebo chloridu cézneho.

## Linearizácia a prečistenie plazmidovej DNA

Pri kvasinkách ako napr. *P. pastoris* sa na elektroporáciu DNA (plazmidovej DNA) do buniek používa linearizovaný plazmid, ktorý si pripravíme nasledovne. Plazmidovú DNA (5 – 10 µg) poštiepime pomocou 10 U restriktívnej endonukleázy *BlnI* v reakčnom objeme 50 µl. Štiepenie prebieha 3 hod. pri 37 °C v termostate. Takto poštiepenú plazmidovú DNA prečistíme od kontaminujúcich zložiek pomocou komerčnej sady na prečisťovanie z gélu alebo PCR. Postupujeme vždy podľa inštrukcií výrobcu ale, namiesto elučného roztoku (EB) použijeme deionizovanú vodu s nízkou vodivosťou (5,6 µS/m). Takto pripravenú linearizovanú a prečistenú plazmidovú DNA použijeme na elektroporáciu buniek.

## Úloha: Izolácia plazmidovej DNA (.....) z bakteriálnej kultúry *E. coli* alkalickou metódou

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

### Chemikálie:

- resuspenzačný roztok (roztok 1):
  - 5 ml 1M roztoku glukózy (zabezpečí izotonické prostredie)
  - 2 ml 0,5 M roztoku EDTA (udržiava stabilné pH)
  - 2,5 ml 1M roztoku Tris-HCl (chelácia = vychytávanie iónov kovov ( $Mg^{2+}$  ióny), inaktivuje DNázy a zabraňuje ich degradácii)
  - doplníme do 100 ml destilovanou sterilnou vodou a preniesieme do vopred vysterilizovanej fľaše, uchovávať v chladničke!
- alkalický lyzačný roztok (roztok 2): vždy zarobiť čerstvý tesne pred použitím!!!
  - 1) najskôr si pripravíme zvlášť 2M roztok NaOH (zabezpečuje alkalické prostredie pre lýzu a denaturáciu DNA; 1 g NaOH do 12,5 ml  $H_2O$ ) a zvlášť 10 % roztok SDS (pomáha lyzovať bunky; 1 g SDS do 10 ml  $H_2O$ )
  - 2) následne v sterilnej centrifugačnej skúmavne (15 ml) zmiešame 8 ml  $H_2O$  (sterilná), 1 ml 2M NaOH a 1 ml 10 % SDS
- neutralizačný roztok (roztok 3):
  - 29,4 g KAc (octanu draselného,  $CH_3COOK$ ; poskytuje  $K^+$  ióny, ktoré sa viažu na fosfátovú skupinu na DNA a redukovávajú odpudivú negatívnu silu medzi dvoma DNA vláknami, čím pomáha ľahkej renaturácii vlákien)
  - a 4,5 ml kyseliny mravčej ( $HCOOH$ ; znižuje pH, čo je dôležité pre začatie renaturácie DNA);
  - doplníme do 100 ml redestilovanou sterilnou vodou a preniesieme do vyautoklávovanej fľaše, uchovávať v chladničke!

- izopropanol
- 70 % etanol
- TE roztok (Tris-EDTA):  
1 mM EDTA (chelatuje ióny kovov a pomáha chrániť DNA pred nukleázami)  
10 mM Tris-HCl (pH 8,0; udržiava pH a zabezpečuje dlhodobú stabilitu DNA pri jej uskladnení pri teplote -20 °C)

#### Pracovný postup:

1. do mikroskúmavky napipetujeme 1,5 ml nočnej bakteriálnej kultúry *E. coli*
2. vzorku scentrifugujeme pri 5000 rpm počas 5 min. pri laboratórnej teplote a supernatant zlejeme (3x opakujeme)
3. pridáme 200 µl resuspenzačného roztoku, dobre zvortexujeme a dáme chladiť na 5 min. na ľad
4. pridáme 400 µl alkalického lyzačného roztoku a premiešame (roztok sa musí vyčíriť) a mikroskúmavky znova uložíme na 5 min. na ľad
5. pridáme 400 µl neutralizačného roztoku, vzorku premiešame prevracaním, potom scentrifugujeme pri 12000 rpm po dobu 10 min. pri teplote 4 °C,
6. odoberieme 900 µl supernatantu do novej mikroskúmavky, pridáme 600 µl izopropanolu, zvortexujeme a necháme stáť 10 min. pri laboratórnej teplote
7. vzorku centrifugujeme pri 12000 rpm počas 10 min. pri laboratórnej teplote
8. supernatant zlejeme a vzorku premyjeme pridaním 200 µl 70 % etanolu, krátko zvortexujeme, necháme chvíľu odstáť a centrifugujeme pri 10000 rpm počas 5 min. pri laboratórnej teplote
9. etanol odsajeme a vysušíme pri 60 °C asi 5 – 10 min. (pelet sa musí odlepiť z dna skúmavky)
10. vzorku plazmidovej DNA rozpustíme pridaním 40 µl TE tlmivého roztoku

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha: Izolácia plazmidovej DNA (.....) z bakteriálnej kultúry *E. coli* pomocou komerčnej súpravy .....**

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:**.....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....



[illegible]

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

## Izolácia RNA

Metóda extrakcie RNA (celkovej RNA) je veľmi kritickým bodom v rámci molekulárno-biologických analýz. Vysoká kvalita a čistota RNA predstavuje východiskový bod pre získanie relevantných výsledkov získaných molekulárnymi technikami ako je kvantifikácia expresie záujmového génu pomocou *Real-Time* PCR, analýza RNA profilu mikročipmi, sekvenovanie (NGS, angl. *Next Generation Sequencing*), Northern analýzy a iné.

Klasická izolácia RNA prebieha väčšinou v prítomnosti inhibítorov ribonukleáz (RNáz), čo sú bunkové enzýmy degradujúce RNA. K inhibítorom RNáz patria silné denaturanty (guanidínové soli, dodecylsulfát sodný (SDS), chemikálie obsahujúce fenol a pod.), ktoré vo vzorke znižujú riziko RNA degradácie.

RNA je možné jednoducho a spoľahlivo izolovať pomocou:

**Organickej extrakčnej metódy**, ktorá predstavuje tzv. zlatý štandard izolácie RNA. Vzorka sa najskôr homogenizuje v roztoku s obsahom fenolu (komerčné roztoky s obsahom fenolu, ktoré je možné si zakúpiť alebo sú súčasťou komerčných extrakčných súprav sú TRIzol®, RNAzol®, RT). Počas centrifugácie dochádza vo vzorke k separácii troch vrstiev: spodnej organickej fázy, strednej fázy obsahujúcej denaturované proteíny a genómovú DNA a vrchnej vodnej fázy s obsahom RNA. Po odobratí vrchnej fázy sa RNA z nej precipituje alkoholom a následne rehydratuje v TE roztoku a uskladní v alikvótoch (-80 °C).

**Minikolónovej metódy**, ktorá je vlastne filtračná metóda založená na niekoľkých krokoch centrifugácie vzorky v špecifických roztokoch. Vzorka je lyzovaná v lyzačnom roztoku s obsahom inhibítorov RNáz, nukleové kyseliny sa počas centrifugácie (keď lyzát prechádza membránou) zachytávajú na membránu kolóny. Membrána s naviazanými molekulami RNA je opakovane premývaná etanolovým roztokom a čistá RNA sa získa po uvoľnení molekúl RNA z membrány do elučného roztoku.

Izolácia kvalitnej RNA z rastlinných pletív je pomerne náročná úloha, keďže RNA je bohatá na sekundárne metabolity, ako sú fenolové zlúčeniny a polysacharidy, ktoré sa spolu precipitujú s nukleovými kyselinami. Tieto fenolové zlúčeniny vedú k oxidácii a degradácii RNA, takže nie sú vhodné na uskutočnenie ďalších experimentov. Pri tejto technike sa RNA izoluje z listov rastlín. Tu sa do extrakčného roztoku pridáva polyvinylpyrolidón (PVP), aby sa mohol viazať na zlúčeniny fenolu, ktoré sa neskôr eliminujú zrážaním etanolom.

### Úloha: Izolácia celkovej RNA z rastlinného pletiva s vysokým obsahom fenolových zlúčenín a polysacharidov

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**

- tekutý dusík

- extrakčný roztok (0,25 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5))
- 20 mM EDTA
- 1 % SDS
- 4 % polyvinylpyrolidón (PVP)
- chloroform : izoamylalkohol (24 : 1 )
- chloroform : izoamylalkohol (1 : 1)
- 3 M acetát sodný (NaAc) (pH 5,2)
- chladený 70 % etanol
- chladený 96 % etanol
- voda ošetrovaná dietylpýrokarbonátom (DEPC)
- 10 M LiCl

#### **Pracovný postup:**

1. 1 g mrazenej vzorky rastlinných listov rozomelieme na jemný prášok v trecej miske za prítomnosti tekutého dusíka
2. chladený prášok z rastlinného materiálu preniesieme do skúmavky s vopred pripravenou zmesou (7,5 ml extrakčného roztoku a 7,5 ml chloroform : izoamylalkohol)
3. zmes intenzívne vortexujeme počas 2 min. pri laboratórnej teplote
4. supernatant preniesieme do novej skúmavky a pridáme 1/10 objemu 3M acetátu sodného (pH 5,2) a 2,5 objemu 96 % etanolu, vzorku dobre premiešame a inkubujeme 30 min. pri 4 °C
5. vzorku centrifugujeme pri  $12857 \times g$  počas 20 min. pri teplote 4 °C
6. pelet premyjeme 70 % etanolom, zvyšky etanolu vysušíme a v 200 µl DEPC-vody rozpustíme očistený pelet
7. supernatant preniesiem do novej 1,5 ml skúmavky a pridáme 10 M LiCl do konečnej koncentrácie 2 M a vzorku necháme inkubovať 1 hod. na ľade
8. vzorku centrifugujeme pri  $18514 \times g$  po dobu 20 min. a pri teplote 4 °C
9. supernatant odstránime a pelet očistíme 70 % etanolom, zvyšky etanolu odparíme a pelet rozpustíme v 20 µl DEPC-vody.
10. vzorku centrifugujeme pri  $18514 \times g$  počas 10 min. pri teplote 4 °C
11. 0,1 objemu acetátu sodného (pH 5,2) a 2,5 objemu chladeného čistého etanolu pridáme do vzorky, dobre premiešame a vzorku RNA uchováваме v alikvótach pri -80 °C

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha: Izolácia celkovej RNA z ..... pomocou komerčnej súpravy.....**

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:**.....

.....

.....

.....

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Otázky:**

1. *Z akých krokov pozostáva proces extrakcie genómovej DNA?*
2. *Aké chemikálie alebo roztoky sú vhodné na vyzrážanie nukleových kyselín?*
3. *V čom spočíva rozdiel na začiatku extrakcie nukleových kyselín z rastlinného pletiva a živočíšneho tkaniva?*
4. *Akú úlohu zohrávajú deproteiniizačné činidlá v extrakčnom roztoku pri izolácii DNA?*
5. *Aký význam má prítomnosť EDTA v extrakčnom roztoku?*
6. *Z akého dôvodu je dôležité rozpúšťať a uchovávať DNA v slabo zásaditom prostredí?*
7. *Aké výhody má použitie minikolónovej extrakcie nukleových kyselín?*
8. *V akých ďalších analýzach je možné použiť izolovanú celkovú RNA?*

## 9. Syntéza komplementárnej DNA

Reverzná transkripcia je technika používaná na vytvorenie komplementárneho reťazca DNA (cDNA) z RNA. Technológia je založená na retrovírusovom mechanizme, pomocou ktorého dokáže enzým reverzná transkriptáza reverzne (späťne) prepisovať RNA do molekuly DNA. Reverzné transkriptázy používané v molekulárnej biológii sú rekombinantné RNA-závislé DNA polymerázy, ktoré katalyzujú premenu (konverziu) RNA na DNA v reakcii syntézy prvého vlákna cDNA.

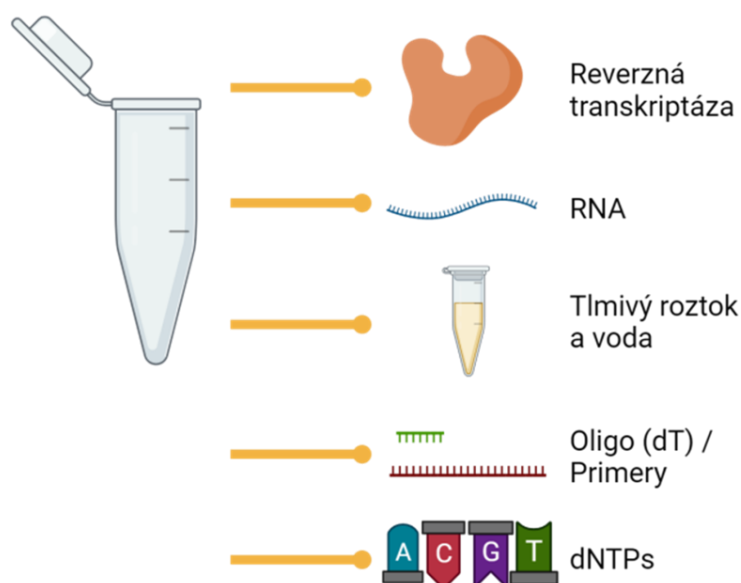
Syntéza prvého vlákna cDNA využíva buď oligo (dT), náhodné primery alebo kombináciu oboch na spustenie reakcie reverznej transkripcie. Pridanie oligo (dT) do reakcie iniciuje syntézu prednostne na 3' konci fragmentu RNA. Ak fragment RNA obsahuje značné množstvo sekundárnej štruktúry, reakcia môže byť predčasne ukončená, čo vedie k menšiemu počtu transkriptov plnej dĺžky a nedostatočnému zastúpeniu 5'-konca fragmentu.

Náhodné primery sú oligonukleotidové sekvencie šiestich alebo viacerých báz. Každý náhodný primer má iné usporiadanie báz, čo mu dáva potenciál hybridizácie v mnohých náhodných bodoch na transkripte RNA, čím sa zabezpečí úplné pokrytie transkriptu. Zmenou dĺžky primeru namiesto použitia iba hexamérov sa možno vyhnúť tendencii vytvárať kratšie fragmenty cDNA a odchýlke od 3'- do 5'-konca. Potenciálnou nevýhodou náhodných primerov je to, že môžu viesť k nadhodnoteniu počtu kópií v štandardnej qPCR.

Kombinácia náhodných primerov a oligo (dT) prekonáva nevýhody predošlých mechanizmov syntézy cDNA, pretože využíva naviazanie primerov z 3'-konca na transkripty cDNA s väčšou dĺžkou a náhodné naviazanie na úplné pokrytie RNA bez skreslenia v smere 3'- do 5'- konca.

Výber vhodnej metódy a súpravy na syntézu cDNA závisí od jej ďalšieho využitia. Celková RNA sa rutinne používa pre syntézu cDNA a jej následnú aplikáciu v RT-PCR alebo RT-qPCR analýzach, zatiaľ čo špecifické typy RNA (mRNA a miRNA) môžu byť použité aj pre konštrukciu cDNA knižníc alebo profilovanie miRNA. Výber enzýmu ovplyvňuje rýchlosť syntézy a presnosť reakcie.

V súčasnosti je na trhu dostupných niekoľko súprav, ktoré obsahujú reverznú transkriptázu vhodnú pre jednokrokové a dvojkrokové procesy reverznej transkripcie RNA do cDNA spolu s ostatnými komponentami pre reakciu (Obrázok 19).



**Obrázok 19** Reakčné zložky pre proces reverzného prepisu RNA do komplementárnej DNA.

Štandardný reakčný proces reverznej transkripcie RNA do cDNA je zložený z nasledovných fáz:

1. denaturácia RNA: RNA je pri teplote 65 °C denaturovaná z dôvodu odstránenia zvyškov genómovej DNA a sekundárnych štruktúr, ktoré sa môžu formovať vzhľadom k jednoreťazcovej štruktúre RNA;
2. syntéza prvého reťazca cDNA: syntéza prebieha podľa templátu RNA za pomoci reverznej transkriptázy. K iniciácii syntézy sú použité zvolené priméry (oligo dT, náhodné, hexaméry a pod.) a syntéza je zabezpečená dodaním dNTP v reakčnej zmesi. Výsledkom reakcie je DNA-RNA molekulový komplex;
3. odstránenie reťazca RNA z komplexu DNA-RNA: pre odstránenie molekuly RNA po vytvorení jednovláknovej cDNA používa RNáza H.

**Úloha: Syntéza cDNA z celkovej RNA pomocou komerčnej súpravy.....**

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....

**Pracovný postup:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

This image shows a full page of a document template designed for handwritten notes or essays. It features approximately 20 evenly spaced horizontal lines across the entire width of the page. The lines are thin and black, providing a guide for writing without being distracting. There are no margins, headers, footers, or other markings present on the page.

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Otázky:**

1. Z akých krokov pozostáva proces prepisu RNA do cDNA?
2. Aké komponenty sa používajú pre syntézu prvého vlákna cDNA?
3. Aký enzým zohráva dôležitú úlohu v procese syntézy cDNA z RNA?
4. Aký enzým je potrebný pre odstránenie molekuly RNA po vytvorení jednovláknovej cDNA ?
5. Prečo sú v reakcii syntézy cDNA dôležité primery?
6. Aké sú možnosti ďalšieho experimentálneho využitia získanej cDNA?



## 10. Stanovenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín

Stanovenie kvantity (koncentrácie) a kvality (čistoty) izolovaných nukleových kyselín (DNA, cDNA, RNA) je dôležitým krokom pred vstupom do ďalších analýz (PCR, sekvenovanie, a iné), kde je potrebné vychádzať z presného množstva templátu.

Okrem spektrofotometrického stanovenia koncentrácie nukleových kyselín v kyvetách (Obrázok 20) alebo na platničke, je možné nukleové kyseliny kvantitatívne a kvalitatívne zmerať pomocou UV fluorescenčného zariadenia za prítomnosti fluorescenčnej farbičky pridanej do vzorky (Obrázok 21). V súčasnosti sa používajú mikroobjemové spektrofotometre/fluorometre, ktorých použitie minimalizuje objem detegovanej vzorky (vyžaduje iba 1 µl vzorky).



**Obrázok 20** Spektrofotometer (Genesys 10UV) na meranie absorbancie nukleových kyselín v kyvete (vľavo), typy kyvety s rôznymi objemami (vpravo).



**Obrázok 21** Proces merania koncentrácie dsDNA pomocou fluorometra (Quantus™, Promega).

Na vyhodnotenie koncentrácie nukleových kyselín sa využíva spektrofotometrické meranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 260 nm, keďže purínové a pyrimidínové bázy absorbujú UV svetlo s maximálnou vlnovou dĺžkou 260 nm. Množstvo absorbovaného svetla je priamo úmerné koncentrácii nukleových kyselín vo vzorke. Výpočet koncentrácie nukleových kyselín závisí od toho, či sa jedná

o vzorku jednovláknovú DNA (ssDNA akou je cDNA), dvojvláknovú DNA (ds DNA akou je gDNA) alebo RNA (Tabuľka 11).

**Tabuľka 11** Prepočet koncentrácie nukleových kyselín.

Vzorka nukleovej kyseliny	Koncentrácia [µg/ml]
ssDNA	A260 / 0,027
dsDNA	A260 / 0,02
RNA	A260 / 0,025

V prípade ak absorbancia vzorky dsDNA je 1, na základe výpočtu (A260 / 0,02) pre túto vzorku vyplýva výpočet  $1 / 0,02 = 50 \mu\text{g/ml}$  (koncentrácia DNA vo vzorke).

Čistota, resp. odhalenie prítomnosti kontaminantov vo vzorke nukleových kyselín sa určuje na základe absorbančných pomerov pri 260 a 280 nm (nakol'ko proteíny absorbujú UV svetlo pri vlnovej dĺžke 280 nm). Čistá DNA má pomer absorbancií pri OD260 / OD280 približne 1,8 a čistá RNA okolo 2. Nakol'ko vzorky nukleových kyselín nemusia byť striktne kontaminované len proteínmi (absorbancia nižšia ako 1,8), ale aj zvyškami fenolu, chloroformu po izolácii nukleových kyselín (absorbancia vyššia ako 2,0). Ostatné kontaminanty vo vzorke je možné odhaliť spektrofotometrickým meraním pri vlnovej dĺžke 230 a 330 nm.

## Úloha: Stanovenie množstva a čistoty izolovanej vzorky .....

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....

### Pracovný postup I.:

1. v kyvete pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm zmeriame najskôr absorbanciu 3 ml roztoku (elučný roztok, v ktorom bola DNA/RNA rozpustená v poslednom kroku izolačného procesu) = blank (slepá vzorka)
2. zmiešame 50 µl vzorky DNA s 2950 ml elučného roztoku a dobre premiešame a zmeriame absorbanciu pri vlnových dĺžkach 260 a 280 nm
3. zaznamenáme si hodnoty OD260 a OD280 na spektrofotometri
4. vypočítame množstvo DNA pomocou nasledujúceho vzorca

$$\text{DNA koncentrácia} = \frac{\text{OD}_{260} \times 60 \text{ (zried'ovací faktor – uvedený vyššie)} \times 50}{1000} \quad (\text{mg/ml})$$

5. vypočítame pomer OD260 / OD280

## Pracovný postup II.:

1. pripravíme si vopred 1x TE tlmivý roztok zriedením 20x TE roztoku (20-krát riediť sterilnou vodou bez nukleáz) a pracovný roztok zriedením farbiva QuantiFluor® dsDNA v pomere 1 : 400 s 1x TE zásobným roztok
2. slepú vzorku (blank) si pripravíme zmiešaním 2 µl tlmivého roztoku 1x TE s 200 µl pracovného roztoku QuantiFluor® dsDNA Dye v 0,5 ml mikroskúmavke, zmes dôkladne zvortexujeme (mikroskúmavku obalíme hliníkovou fóliou, aby sme farbivo chránili pred svetlom)
3. pripravíme si štandard zmiešaním 2 µl dodaného štandardu DNA (100 ng/µl) s 200 µl pracovného roztoku QuantiFluor® dsDNA Dye v 0,5 ml mikroskúmavke
4. vzorky pre stanovenie kvantity dsDNA pripravíme zmiešaním 1 – 20 µl dsDNA vzorky s 200 µl pracovného roztoku QuantiFluor® dsDNA Dye v 0,5 ml mikro skúmavke. Vzorku dobre premiešame pomocou vortexu a chránime pred svetlom
5. pripravené vzorky inkubujeme pri izbovej teplote počas 5 min.
6. ak je potrebné, nakalibrujeme fluorometer Quantus™ odčítaním slepej vzorky a štandardných vzoriek
7. vložíme mikroskúmavku so vzorkou meranej dsDNA do fluorometra a zadáme objem neznámej vzorky (1 – 20 µl použitých v kroku 4) a požadované koncentračné jednotky
8. zmeriame fluorescenciu neznámej vzorky a zaznamenáme výsledky konečnej koncentrácie vzorky

\* pri meraní koncentrácie ssDNA, resp. RNA postupujeme technicky rovnako ako je uvedené v pracovnom postupe vyššie, s tým rozdielom, že pre stanovenie kvantity ssDNA si pripravíme roztoky a vzorky podľa inštrukcií použitej komerčnej súpravy QuantiFluor® ssDNA System, resp. QuantiFluor® RNA System.

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

## Otázky:

1. *Prečo je dôležité mať vedomosť o koncentrácii a čistote izolovaných nukleových kyselín?*
2. *Pri akej vlnovej dĺžke sa pomocou spektrofotometra vyhodnocuje kvalita nukleových kyselín?*
3. *Prečo je potrebné pri stanovovaní koncentrácie nukleových kyselín zmerať najskôr tzv. slepú vzorku?*
4. *Aký je rozdiel pri stanovovaní množstva nukleových kyselín pomocou bežného spektrofotometra a fluorometra?*

## 11. Polymerázová reťazová reakcia

Keďže gény sú príliš malé a nie sú viditeľné voľným okom, bolo potrebné vyvinúť vhodnú detekčnú metódu, aby bolo možné vidieť tieto drobné fragmenty DNA. Najčastejšie používanou metódou na detekciu génov je metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR, angl. *Polymerase Chain Reaction*). Princíp metódy amplifikácie fragmentov DNA polymerázovou reťazovou reakciou navrhol v roku 1983 biochemik Kary Mullis, za čo neskôr získal Nobelovu cenu. V roku 1989 bola metodika odbornou verejnosťou prehlásená za najvýznamnejší vedecký objav roka a enzým *Taq* DNA polymerázy za "molekulu roka."

Metóda PCR sa vyznačuje vysokou špecifickosťou, citlivosťou a robustnosťou. V súčasnej dobe je preto štandardne používaná v molekulárnej biológii, genetike, mikrobiológii, fyziológii, medicíne, ako aj mnohých iných oblastiach biologického výskumu. Aplikácie PCR sú v mnohých prípadoch rýchlejšou a lacnejšou náhradou klasických molekulárno-biologických metód akými sú klonovanie a Northernova hybridizácia.

### Princíp PCR

PCR je biochemická reakcia umožňujúca veľmi efektívne namnoženie špecifických úsekov DNA ohraničených dvomi oligonukleotidovými primermi v podmienkach *in vitro*. Táto metóda napodobňuje replikačný systém, ktorý existuje v každej bunke a realizuje sa pred bunkovým delením (v čase zdvojenia genetického materiálu), pričom využíva vlastnosti DNA polymerázy, a to schopnosť syntetizovať komplementárne vlákno podľa jednovláknového templátu a potrebu prítomnosti páru primerov na inicializáciu procesu polymerizácie nového vlákna DNA. PCR preto závisí od rovnováhy všetkých komponentov (koncentrácia a objem) pridaných do reakcie (Obrázok 22). Reakčné zložky sa miešajú v reakčnom tlmivom roztoku, ktorý zabezpečuje optimálne prostredie pre pridávané molekuly. V procese polymerázovej reťazovej reakcie sú východiskovými molekulami priméry, zmes nukleotidov a enzým na syntézu polynukleotidu komplementárneho k templátovej DNA. Enzým použitý v PCR je DNA polymeráza, ktorá dokáže syntetizovať nový reťazec DNA v prítomnosti iónov horčíka.

### Reakčné zložky PCR

#### Templátová DNA

Ako templát je možné použiť neporušenú dvojitú vlákennú DNA (dsDNA) alebo jednovláknovú DNA (ssDNA), ktorá neobsahuje inhibítory DNA polymerázy (detergenty, organické rozpúšťadlá, proteázy, nukleázy, nadbytok RNA, a pod.). PCR je robustná metóda, a preto je možné používať ako templát nielen purifikovanú DNA, ale aj menej prečistené preparáty.

Množstvo templátovej DNA potrebnej pre amplifikáciu sa pohybuje od ng – µg množstvá. Čistota DNA zvyšuje špecifitu reakcie, avšak PCR nevyžaduje absolútne čistú DNA, čo predstavuje výhodu najmä v klinickej diagnostike, kriminalistike, či pri detekcii historickej DNA. Rovnako je tiež možné ako templát použiť priamo suspenziu bakteriálnych buniek pripravenú z bakteriálnej kolónie bez priamej izolácie DNA.

#### Nukleotidy

Nukleotidy, tiež nazývané dNTP (deoxynukleotidtrifosfáty), bázy alebo bázy DNA, sú jednotlivé jednotky adenínu, tymínu, cytozínu a guanínu. V PCR reakcii slúžia ako „stavebné bloky“ v procese syntézy nového vlákna DNA. Optimálna koncentrácia nukleotidov sa pohybuje v rozmedzí 50 – 200 µM/l, pričom ich nadbytok v reakčnej zmesi vedie k vyššej miere chybných zaradených nukleotidov. Avšak 50 % dNTP v reakcii zostáva nezaradených aj po 50 amplifikačných cykloch.

## Primery

Priamy (angl. *Forward*) a spätný (angl. *Reverse*) primer je syntetický jednovláknový oligonukleotid s dĺžkou 17 – 30 báz. Ich úlohou je napojiť sa (hybridizovať) na špecifické miesto templátového vlákna DNA na základe komplementarity báz. Svojou polohou po hybridizácii vymedzujú požadovaný úsek na molekule DNA, ktorý chceme cielene amplifikovať. Prvý primer sa viaže na jedno vlákno DNA, druhý sa viaže na druhé komplementárne vlákno denaturovanej DNA. V PCR sa najčastejšie používajú rovnaké koncentrácie oboch primerov v rozsahu 0,1 – 2  $\mu\text{mol/l}$  (v závislosti od podmienok, ktoré vyhovujú DNA polymeráze).

## DNA polymeráza

Je to enzým, ktorý katalyzuje syntézu druhého vlákna DNA v smere 5'-3' využitím molekúl dNTP (deoxynukleotidtrifosfáty). Pre svoju úlohu potrebuje templát a primery. DNA polymeráza I (holoenzým) izolovaná z buniek *E. coli* má 5'-3' polymerizačnú aktivitu a okrem toho obsahuje 5'-3' a 3'-5' exonukleázovú a RNáza H aktivitu. Používa sa na značenie DNA metódou nick-translácie.

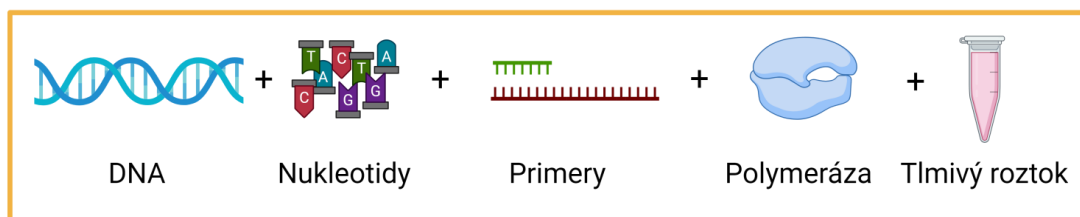
V súčasnosti sa používa Taq DNA polymeráza (izolovaná z baktérie *Thermus aquaticus* (*Taq*), ktorá žije v horúcich prameňoch Yellowstoneského národného parku). Je to termostabilný enzým, ktorý dokáže syntetizovať nové vlákno DNA. Aktivačná teplota tohto enzýmu je medzi 70 až 80 °C a v čase polymerizácie nového vlákna sa Taq polymeráza aktivuje pri teplote 72 °C. Taq DNA polymeráza má 5'-3' polymerizačnú a 5'-3' exonukleázovú aktivitu, nemá však 3'-5' opravnú exonukleázovú aktivitu (angl. *proof reading*), čo vedie k chybám pri polymerizácii, pričom najčastejšie ide o jednobázové substitúcie. Vzhľadom na tepelnú odolnosť sa používa v PCR a pri sekvenovaní. Optimálna koncentrácia na 100  $\mu\text{l}$  reakčnej zmesi sa pohybuje medzi 1 – 2,5 U (jednotiek, angl. *Units*). Príliš vysoká koncentrácia enzýmu vedie k akumulácii nešpecifických produktov, naopak pri nízkej koncentrácii nezískame dostatočné množstvo požadovaného produktu. Okrem Taq DNA polymerázy sa v PCR používajú aj iné termostabilné polymerázy, ktoré sa líšia najmä prítomnosťou 5'-3' a 3'-5' exonukleázovej aktivity, schopnosťou reverznej transkripcie a tvorbou tupých alebo 3'-prečnievajúcich koncov obsahujúcich jeden adenosínový nukleotid.

## Reakčný tlmivý roztok

Reakčný roztok je potrebný pre úpravu a stabilizáciu optimálnej hodnoty pH v reakcii. Štandardne obsahuje KCl a Tris-HCl a jeho optimálne pH je mierne zásadité pre zabezpečenie integrity DNA (pH 8,0).

## Ióny horčíka ( $\text{Mg}^{2+}$ )

Horečnaté ióny sú kofaktorom DNA polymerázy a zabezpečujú jej aktiváciu. Koncentrácia  $\text{Mg}^{2+}$  ovplyvňuje niektoré parametre PCR, so zvyšovaním koncentrácie  $\text{Mg}^{2+}$  sa zvyšuje výťažok PCR a zároveň sa znižuje špecificita reakcie. Pri optimalizácii podmienok PCR je nutné brať do úvahy skutočnosť, že mnohé zložky reakcie viažu horečnaté ióny (DNA, dNTP, EDTA prítomné v niektorých roztokoch, proteíny). Koncentrácia  $\text{MgCl}_2$  v reakčnej zmesi sa pohybuje v rozmedzí 1,5 – 5 mM/l, najčastejšie používaná koncentrácia je 1,5 mM/l.



**Obrázok 22** Dôležité komponenty pre správny priebeh PCR.

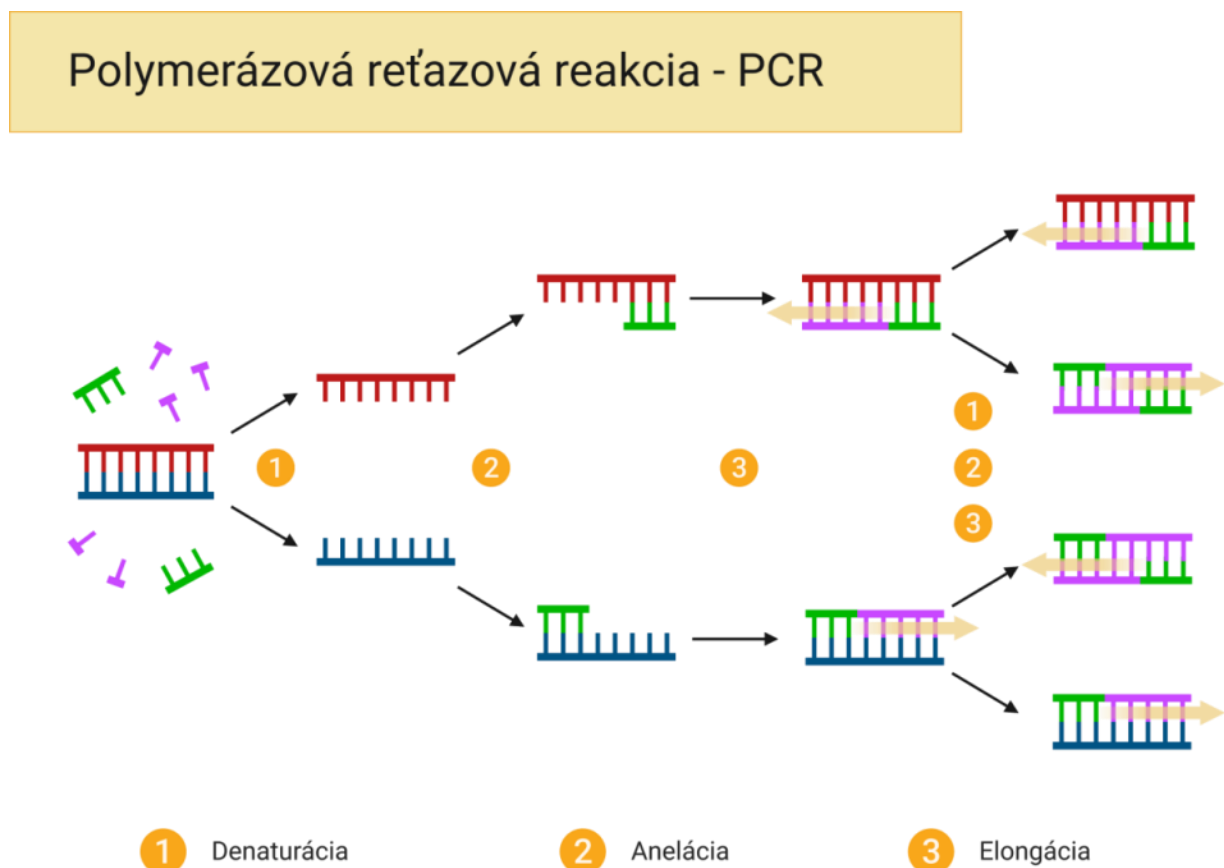
Z praktického hľadiska sa dnes používa komerčne dostupný Mastermix. Je to roztok, v ktorom sú prítomné všetky komponenty (*Taq* DNA polymeráza, tlmivý roztok,  $\text{MgCl}_2$  a všetky

deoxyribonukleotidy trifosfáty) v optimálnej koncentrácii pre priebeh PCR reakcie. Osobitne sa do reakčnej zmesi pridajú primery a templátová DNA, prípadne PCR voda pre doplnenie finálneho objemu PCR reakčnej zmesi. Vzhľadom k tomu, že sa v laboratóriu bežne testuje viac vzoriek naraz, v takomto prípade je vhodné vopred si pripraviť tzv. premix (t.j. PCR reakčná zmes pre viac vzoriek pripravená v jednej skúmavke, ktorá sa následne rozpipetuje do skúmaviek a až potom sa k nim pridá templát).

## Reakčné kroky PCR

Amplifikácia DNA metódou PCR prebieha cyklickým procesom, pričom každý cyklus pozostáva z troch základných krokov (Obrázok 23):

1. **Denaturácia:** prvým krokom je tepelná denaturácia templátovej DNA zohriatím reakčnej zmesi na teplotu 92 – 95 °C. V tomto kroku sa uvoľňuje a rozdeľuje dvojvláknová molekula templátovej DNA na 2 jednovlákná.
2. **Hybridizácia primerov** (angl. *annealing*): v druhom kroku sa zníži teplota na 50 – 60 °C, čo umožní hybridizáciu (naviazanie) dvoch oligonukleotidových primerov na komplementárne úseky jednovláknovej DNA. Priamy a spätný primer sú orientované na protiľahlé DNA templátové vlákna. Špecifická teplota hybridizácie sa líši v závislosti od poradia nukleotidov a dĺžky primerov.
3. **Polymerizácia (elongácia):** v tejto poslednej, tzv. predlžovacej fáze sa teplota zvýši, aby sa aktivovala DNA polymeráza, ktorej úlohou je syntetizovať druhé (nové) vlákno DNA pripájaním nukleotidov (substrátom sú deoxynukleozid trifosfáty, dNTP) na 3'-koniec primerov. Optimálna teplota pre DNA polymerázu v tomto kroku je 72 °C.

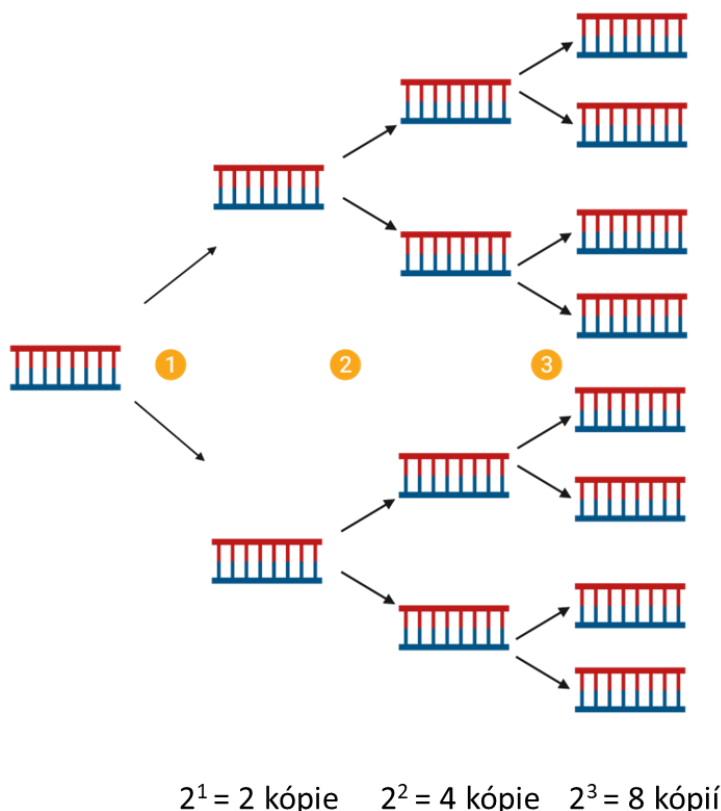


**Obrázok 23** Cyklický proces amplifikácie DNA pomocou PCR.

Tieto tri kroky sa cyklicky opakujú 20 – 40 krát. Pri každom cykle sa zdvojnásobí počet molekúl, to znamená, že ak bola na začiatku reakcie jedna dvojvláknová molekula DNA a počet cyklov je  $n$ , tak výsledný počet kópií je  $2^{n+1}$  (Obrázok 24).

Zvyšujúcim sa počtom cyklov stúpa citlivosť, zároveň sa však zvyšuje riziko falošne pozitívnych výsledkov, spôsobených kontamináciou vzorky.

Množstvo PCR produktu v jednej reakcii môže dosiahnuť hodnoty 0,2 – 1 µg DNA, čo postačuje na analýzu štandardnými metódami molekulárnej biológie ako je elektroforéza v agarózovom géli.



**Obrázok 24** Počet vznikajúcich kópií v priebehu PCR.

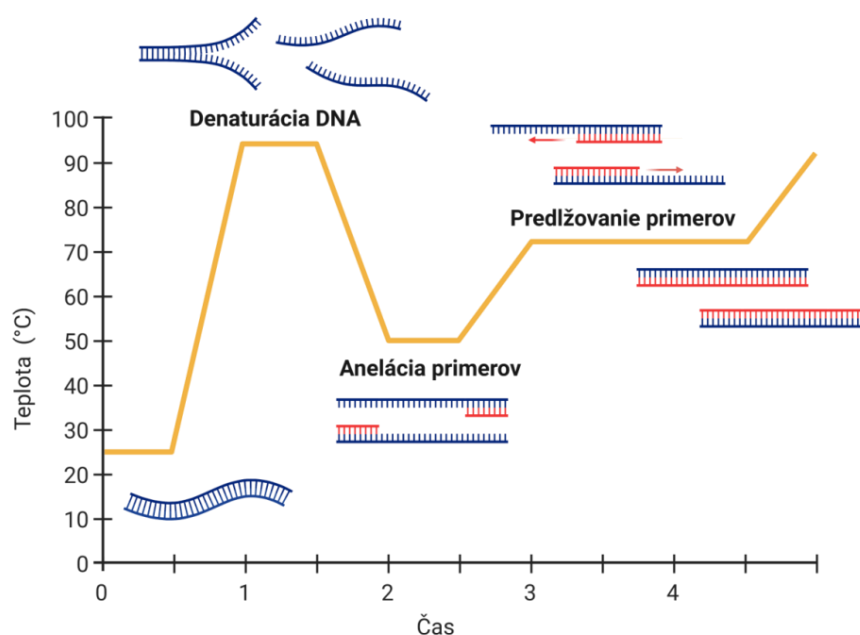
Teplotný režim (Obrázok 25) sa pred začatím PCR reakcie nastaví do automatického programovateľného prístroja – termocyklér, ktorý zabezpečí striedanie teplôt v krátkych časových úsekoch. Nastavenie teplotného a časového režimu vychádza z odporúčaní výrobcu Taq DNA polymerázy použitej v reakcii.

V hybridizačnom kroku sa používa teplota zhruba o 5 °C nižšia ako je  $T_m$  (teplota topenia, ang. *Melting Temperature*) primerov. Zníženie teploty v tejto fáze zvýši výťažok reakcie, ale môže viesť aj k tvorbe nešpecifických produktov. Nastavenie časového intervalu v tomto kroku závisí od dĺžky použitých primerov. Optimálna teplota pre polymerizáciu je 72 °C, doba polymerizácie je závislá od dĺžky očakávaného produktu (amplifikovaný úsek DNA), používajú sa inkubácie približne 1 min. na každých 1000 bp produktu.

Vysoká citlivosť PCR metódy môže viesť aj k nežiaducemu javu, a to vzniku kontaminácie, keďže na amplifikáciu produktu stačí prítomnosť jedinej molekuly cudzej DNA. Riziko kontaminácie je možné eliminovať sterilizáciou priestorov UV svetlom alebo využitím špeciálnych DNA boxov pri príprave PCR reakčnej zmesi. Ďalej je potrebné pracovať v jednorázových sterilných rukaviciach, používať sterilný jednorázový plastový materiál (mikroskúmavky, špičky), PCR reagenty uchovávať v alikvótnych objemoch (najlepšie na jedno použitie). Pri práci je nutné vyhýbať sa tvorbe aerosólov (skúmavky pred otvorením krátko centrifugovať), pridávať DNA a polymerázu do reakcie až na záver a v experimente používať negatívnu kontrolu (vzorka bez DNA), ktorá slúži na monitorovanie prípadnej kontaminácie.



## PCR cyklus



Obrázok 25 Teplotný režim PCR reakcie.

## Aplikácie PCR

Medicínske aplikácie: genetické testovanie na prítomnosť mutácií genetických chorôb, typizácia tkaniva, životne dôležitá pre transplantáciu orgánov, detekcia onkogénov (mnohé formy rakoviny zahŕňajú zmeny v onkogénoch); atď.

Aplikácie v oblasti infektológie: včasná identifikácia vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV), tuberkulózy, šírenia chorobného organizmu v populácii domácich alebo voľne žijúcich zvierat, ktoré boli zodpovedné za epidémie, atď.

Forenzné aplikácie: *DNA profiling*, *DNA typing*, *DNA fingerprinting* – jednoznačné odlišenie akejkoľvek osoby od celej populácie sveta; parentálne testovanie (testovanie príbuzenstva), atď.

Vedecké aplikácie: príprava produktov pre ďalšiu analýzu sekvenovaním, restričným štiepením, hybridizáciou. K ďalším využitiam patrí produkcia rekombinantnej DNA s cieľom pripraviť rekombinantný proteín, zisťovanie rozdielov vo vnútornej sekvencii PCR produktov v odlišných vzorkách s cieľom identifikovať mutácie v alelách napr. pri genetických ochoreniach, fylogénna analýza DNA, genetické mapovanie štúdiou chromozomálnych krížení po meióze, atď.

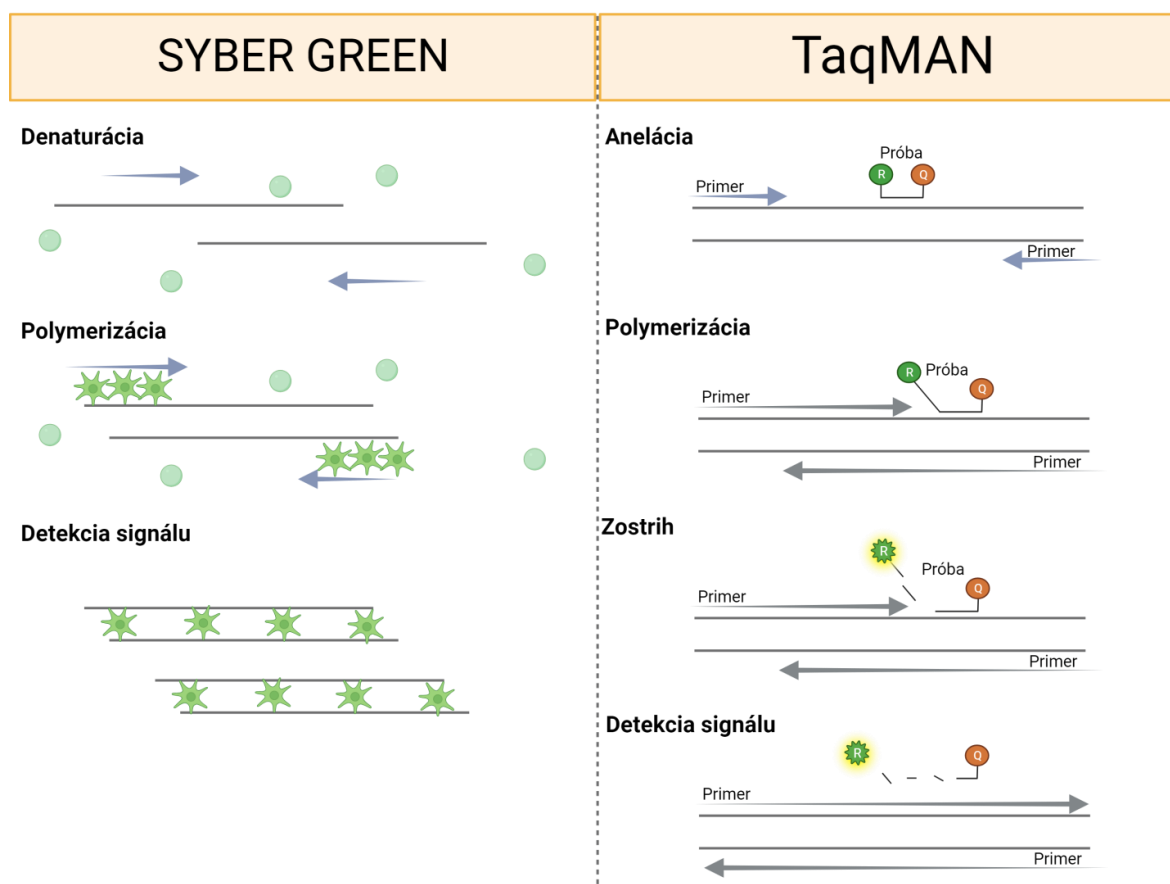
## Typy PCR

**Multiplex PCR:** využívajú sa viaceré páry primerov v jednej reakcii s cieľom identifikovať viac cieľových DNA naraz.

**RT-PCR:** je typ PCR, ktorá umožňuje amplifikovať DNA sekvencie z východiskovej RNA sekvencie. Tejto PCR reakcii musí najskôr predbehať prepis RNA do jednovláknovej komplementárnej DNA (cDNA) metódou reverznej transkripcie s využitím enzýmu reverzná transkriptáza. Na základe použitých primerov v tomto procese môžeme prepísať buď celkovú RNA pomocou random hexamérov alebo len mRNA, kedy použijeme oligo (dT) primery.



**Kvantitatívna PCR v reálnom čase (RT-qPCR, *Real-Time quantitative PCR*):** využíva sa na kvantitatívne meranie amplifikovanej DNA značenej pomocou fluorescenčných farbív alebo naviazaním sondy, vďaka čomu je možné vidieť množstvo pribúdajúcej DNA reálne v čase. Okrem kvantifikácie sa používa aj na určovanie genotypov. V RT-qPCR sa využívajú na značenie fluorescenčné chemikálie (farbivá viažu sa na DNA alebo fluorescenčne značené próby), ktorých emitovanú fluorescenciu zaznamenáva optický systém počas každého PCR cyklu, zaznamenaná fluorescencia je následne softvérovo spracovaná a vyhodnotená. Farbivá (SYBR Green, Eva green a iné), ktoré sa viažu na molekuly DNA emitujú fluorescenciu v prípade, ak sú naviazané na dvojvláknovú DNA, zatiaľ čo próby fluoreskujú v prípade, keď molekula „zhášača“ (Q, angl. *Quencher*) sa nenachádza v blízkosti molekuly reportéra (R) (napr. hydrolyzujúce próby fluoreskujú, keď je molekula reportéra (R) prostredníctvom 5' exonukleázovej aktivity DNA polymerázy odstránená z blízkosti molekuly zhášača (Q); Obrázok 26).



**Obrázok 26** Princíp využitia Syber Green farbiva a TaqMan próby pre detekciu kvantity PCR produktu.

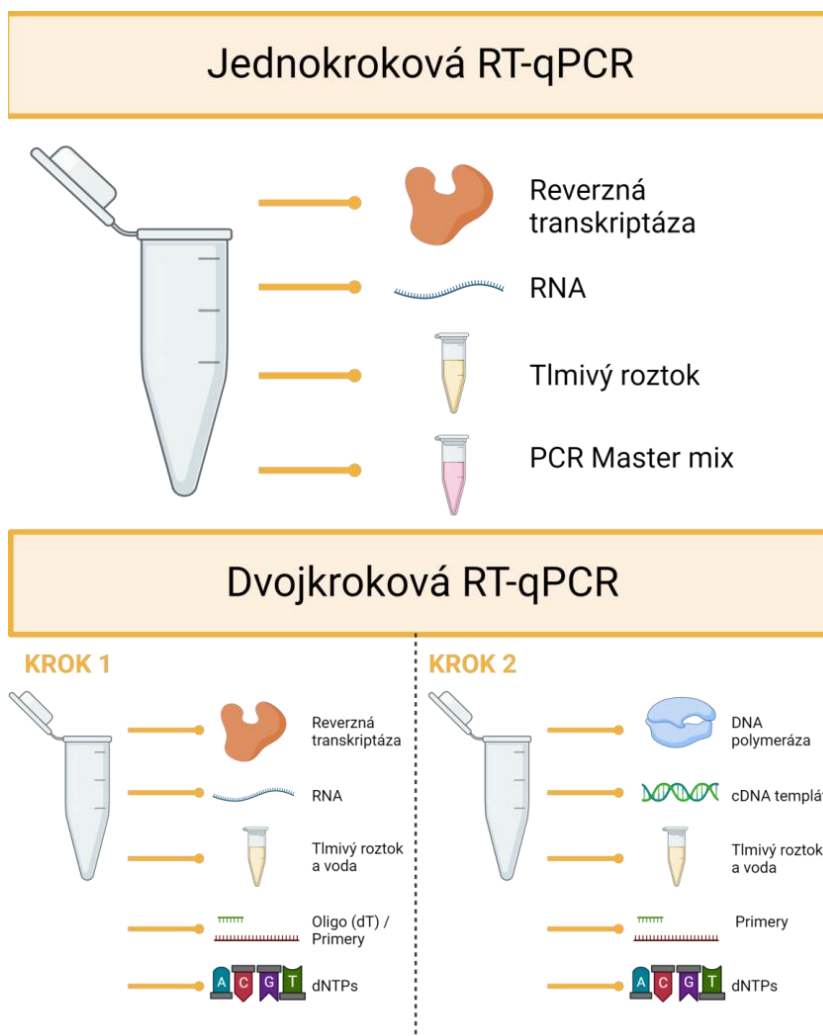
Reakčné komponenty RT-qPCR sú DNA polymeráza, dNTPs, primery (resp. primery/próby), reakčný roztok, dvojmocné ióny horčička a templát DNA. Dnes sú už na trhu dostupné súpravy, tzv. kity využívajúce TaqMan próby alebo kity s fluorescenčnými farbami. Tieto kity obsahujú komplexný mastermix, ku ktorému sa pridajú už len primery a templát v požadovanej koncentrácii. Reakčný priebeh RT-qPCR je rovnaký ako u štandardnej PCR, a teda pozostáva z cyklicky opakujúcich sa krokov denaturácie DNA, hybridizácie primerov a polymerizácie.

RT-qPCR analýzy prebieha v špeciálnom termálnom cykléri s fluorescenčným detektorom. Takýto detektor dokáže odhaliť aj najmenšie množstvo vyžarovaného svetla (fluorescencia). Termocyklér pre RT-qPCR je pripojený k počítaču s príslušným softvérom (Obrázok 27), ktorý z detektora konvertuje signály do grafického znázornenia. Fluorescencia sa zvyšuje úmerne s množstvom produktov PCR. Ak je vzorka negatívna (bez templátu), čiara zostane rovná. Fluorescenčný signál je meraný raz za cyklus.



**Obrázok 27** Real-Time PCR prístroj s prislúchajúcim počítačom so softvérom (vľavo) a získané amplifikačné krivky.

Kvantitatívna RT-PCR môže byť dvojkroková alebo jednokroková (Obrázok 28). Pri dvojkrokovej RT-qPCR treba pred cyklickou PCR reakciou najskôr syntetizovať cDNA vlákno z RNA pomocou reverznej transkriptázy a v druhom kroku bude prebiehať samotná PCR reakcia (amplifikácia produktu a zaznamenávanie jeho prírastku v reálnom čase). Jednokroková RT-qPCR umožňuje uskutočniť obidve reakcie (reverznú transkripciu RNA do cDNA a amplifikáciu produktu) v jednej skúmavke, čo zjednodušuje celý proces a zároveň redukuje možnosť kontaminácie.



**Obrázok 28** Rozdiel v procese 1-krokovej a 2-krokovej RT-qPCR.

Grafický priebeh Real-Time PCR znázorňuje amplifikačná krivka (angl. *amplification plot*) a pozostáva zo 4 fáz:

1. fáza: dochádza k zdvojnásobeniu množstva amplikónu po každom cykle, ale nárast fluorescence je pod detekčným limitom. Zaznamenávaná fluorescence (tzv. *baseline*) zodpovedá základnej fluorescence pozadia tzv. šumu;

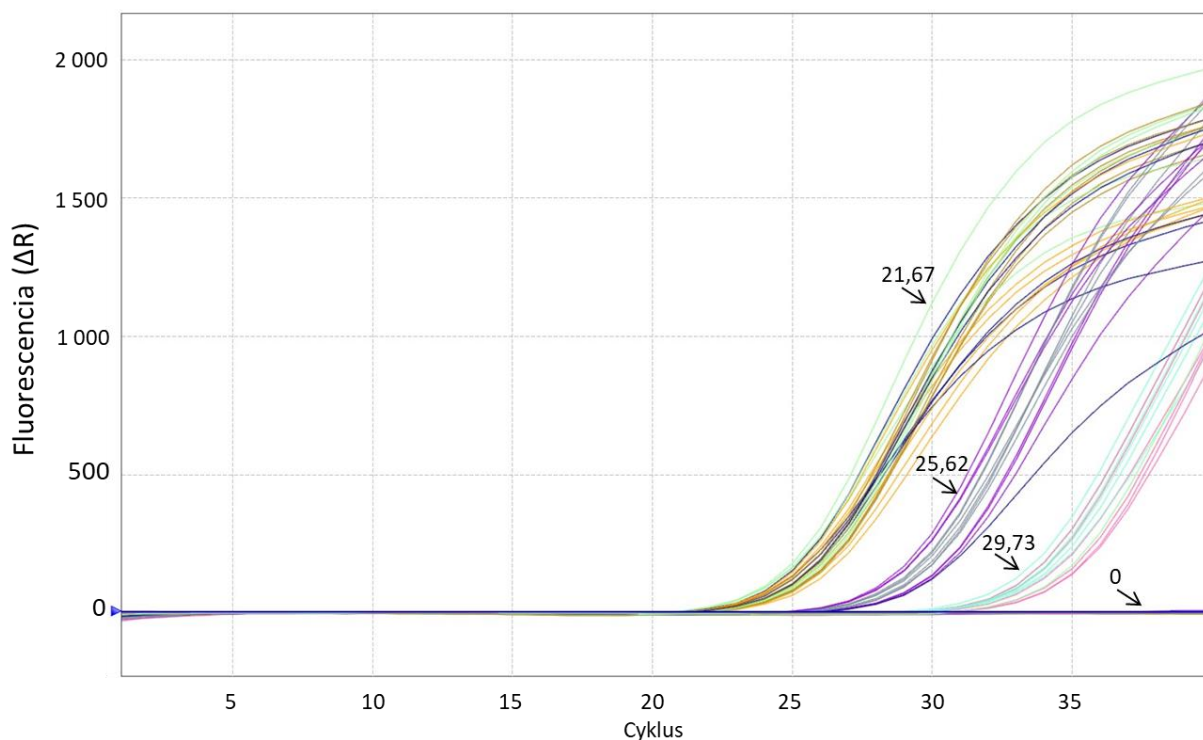
2. fáza = exponenciálna fáza: fluorescence sa zvýši na úroveň optickej detekcie. Bod, resp. cyklus, kedy začína exponenciálna fáza je kľúčový na určenie kvantity vstupného množstva templátovej DNA, nazýva sa prahový cyklus, označuje sa Ct (angl. *Threshold Cycle*) alebo Cq (*Quantification Cycle*). Čím nižšie je Ct (Cq), tým väčší počet kópií templátovej DNA bolo v reakcii. Ct hodnota je teda hlavný údaj, s ktorým sa pracuje vo výpočtoch, fluorescence v tomto mieste sa nazýva prahová (angl. *threshold*).

Príklad: na Obrázku 29 sú detegované viaceré gény. Najnižšiu hodnotu Ct (21,67) vykazuje zelená krivka, zatiaľ čo modrá krivka dosahuje Ct 29,73. Tieto hodnoty zodpovedajú cyklu, v ktorom bola prekročená prahová hodnota fluorescence a použijeme ich pri výpočte. Tmavomodrá krivka reprezentuje vzorku bez templátu, kde teda nie je zaznamenaná expresia, čomu zodpovedá hodnota Ct 0.

3. fáza = lineárna fáza: je charakterizovaná postupným spotrebovávaním komponentov reakcie na narastajúce množstvo produktu;

4. fáza = plateau (čítaj plató) množstvo amplikónu sa v dôsledku vyčerpania zložiek reakčnej zmesi už nezvyšuje.

Dĺžka PCR produktu pri RT-qPCR by nemala presiahnuť 400 bp, pričom kratšie amplikóny dávajú lepšie výsledky, pretože PCR je efektívnejšia (optimálna dĺžka skúmaného fragmentu je 50 – 150 bp).

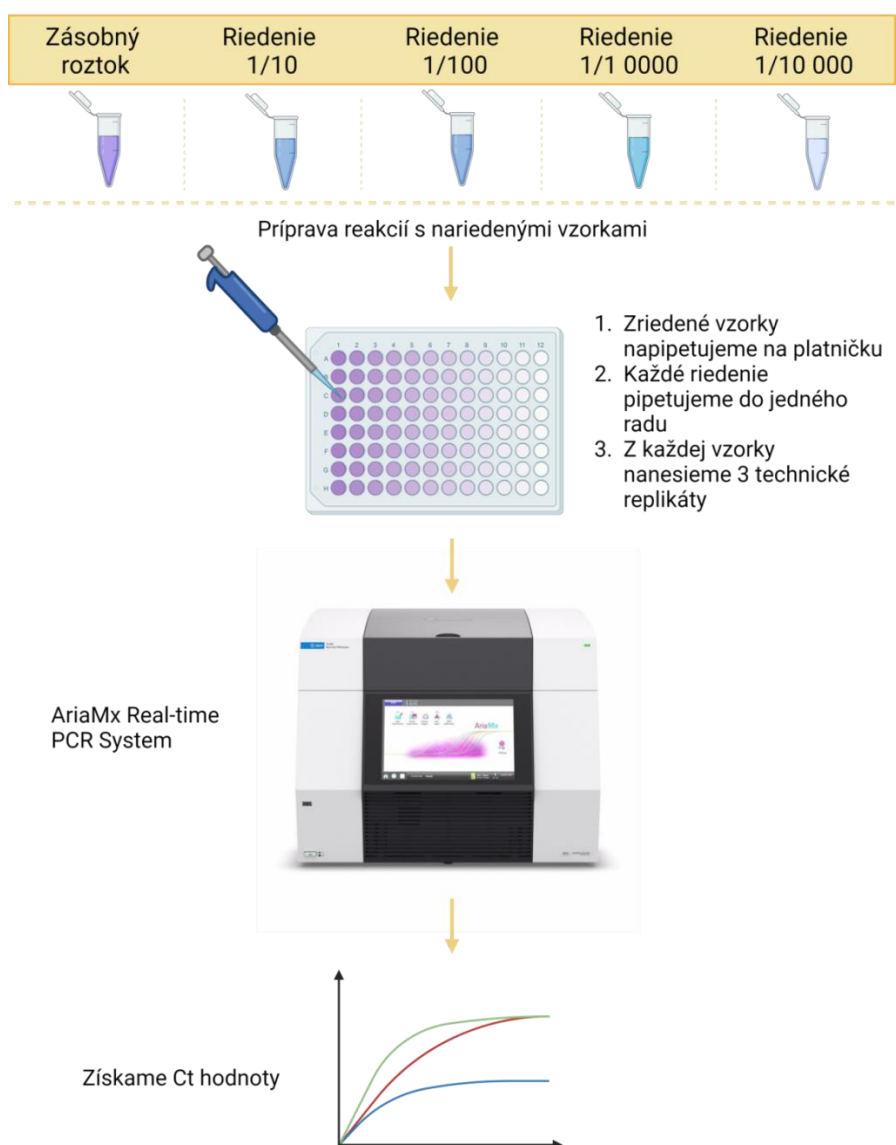


**Obrázok 29** Výsledok amplifikácie pomocou Real-Time qPCR z naznačenými hodnotami Ct pre vybrané krivky reprezentujúce vzorky cDNA.

Kvantifikovať DNA pomocou RT-qPCR analýzy je možné 2 spôsobmi, a to absolútnou kvantifikáciou a relatívnou kvantifikáciou.

**Absolútna kvantifikácia** vychádza z prirovnania Ct hodnôt testovaných vzoriek k Ct hodnotám tzv. štandardov (vstupné množstvo je presne známe). Štandard je sériovo nariadená vzorka DNA (Obrázok 30) so známou koncentráciou alebo počtom kópií. Z Ct hodnôt štandardov softvér zostrojí kalibračnú krivku (angl. *standard curve*), ktorá znázorňuje závislosť Ct hodnôt (na osi y) od koncentrácie DNA, vyjadrenej v logaritmickom meradle (os x). Z dôvodu logaritmického meradla koncentrácie štandardov je kalibračná krivka vlastne priamka. Kalibračná krivka by mala obsahovať aspoň 5 bodov, teda 5 vzoriek s rôznou koncentráciou štandardu. Dôležitým parametrom kalibračnej krivky je sklon krivky (angl. *slope*), ktorý je mierou účinnosti (efektivity) RT-qPCR reakcie. Hodnota sklonu medzi -3,1 a -3,6 sa považujú za prijateľné, nakoľko vyjadruje 90 % až 110 % účinnosť. 100 % účinnosť je vyjadrená hodnotou sklonu -3,32. Korelačný koeficient ( $R^2$ ) vyjadruje linearitu bodov kalibračnej krivky, čiže presnosť, s akou namerané Ct hodnoty štandardu korelujú s lineárnym priebehom krivky. Optimálne  $R^2$  je v rozmedzí 0,99 až 1.

Jednotky množstva sú definované riedeniami použitými na vytvorenie štandardnej krivky. V neznámych vzorkách (pre detekciu exprese cieľového génu) softvér automaticky vypočíta ich množstvo/koncentráciu na štandardnej krivke. Údaje kvantity sa zvyčajne zobrazujú buď ako hmotnostné množstvo (napr. ng, pg), koncentrácia (napr. ng/μl, pg/μl) alebo ako „kópie“ daného génu.



**Obrázok 30** Ilustračné znázornenie prípravy sériových riedení pre RT-qPCR. Hodnoty Ct sa potom použijú na výpočet účinnosti PCR.

**Relatívna kvantifikácia** porovnáva úroveň expresie určitého cieľového génu vo vzorke k expresii toho istého génu v referenčnej (kontrolnej) vzorke alebo množstvo cieľového génu (počet kópií) vo vzorke porovnaním s množstvom génu v kontrolných vzorkách. V rámci každej vzorky musí pred relatívnou kvantifikáciou dôjsť k tzv. normalizácii, t. j. porovnanie expresie sledovaného génu k expresii referenčného génu (najčastejšie ním býva tzv. „housekeeping“ gén, napr. *GAPDH*, aktín, tubulín, atď.). Na vyjadrenie expresie cieľového génu možno použiť výpočet pomocou Livak alebo Pfaffl metódy.

**Livak metóda:** na relatívnu kvantifikáciu predpokladá, že účinnosť PCR cieľových a referenčných génov by mala byť medzi 90 – 100 %. V opačnom prípade by sme mali použiť metódu Pfaffl opísanú nižšie. Po získaní Ct hodnôt pre všetky testované vzorky a výpočte priemerných hodnôt (Tabuľka 12) pristúpime k použitiu vzorcov pre každý krok výpočtu hodnôt Ct.

**Tabuľka 12** Priemerné Ct hodnoty pre testované vzorky pomocou referenčného génu a záujmového génu.

Vzorka DNA	Ct (referenčný gén)	Ct (cieľový gén)
rastlina pestovaná v kontrolných podmienkach	19,4	18
rastlina pestovaná v podmienkach stresu (NaCl)	16,2	13

**Krok 1.** Vypočítame  $\Delta Ct$  (zmenu Ct) pre rastliny pestované v oboch podmienkach s použitím cieľových a referenčných génov.

$$\Delta Ct (\text{NaCl}) = Ct (\text{cieľový gén}) - Ct (\text{referenčný gén})$$

$$\Delta Ct (\text{NaCl}) = 13 - 16,2 = \Delta -3,2$$

$$\Delta Ct (\text{kontrola}) = Ct (\text{cieľový gén}) - Ct (\text{referenčný gén})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrola}) = 18 - 19,4 = \Delta -1,4$$

**Krok 2.** Vypočítame  $\Delta\Delta Ct$  pre kontrolné a neznáme vzorky (stresované pomocou NaCl).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{NaCl}) - \Delta Ct (\text{kontrola})$$

$$\Delta\Delta Ct = -3,2 - (-1,4) = -1,8$$

**Krok 3.** Vypočítame  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  na výpočet pomeru relatívnej expresie (pomer expresie je vzťah v génovej expresii, ktorý existuje medzi referenčným a cieľovým génom).

$$\text{Pomer expresie} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{Pomer výrazov} = 2^{-(-1,8)} = 3,4$$

\*Majte na pamäti, že ide o zápornú hodnotu  $\Delta\Delta Ct$ . A keďže naša hodnota  $\Delta\Delta Ct$  je už záporné číslo, použijú sa dva záporné symboly.

Hodnotenie výsledku: Rastliny vystavené pôsobeniu NaCl ako stresového faktora majú 3,4-krát vyššiu expresiu cieľového génu v porovnaní s rastlinami, ktoré boli pestované bez pôsobenia NaCl (v kontrolných podmienkach).

**Pfaffl metóda:** predpokladá rôzne účinnosti reakcie pre referenčné a cieľové gény, pričom zohľadňuje účinnosť PCR.

Nástroj vo forme kalkulačky na priamy výpočet expresie cieľového génu, ktorý vám pomôže analyzovať výsledky RT-qPCR pomocou metódy Livak alebo Pfaffl je dostupný aj online ([qPCR and RTqPCR Analysis Tool | GoldBio](#)).

Real-Time qPCR má široké využitie vo vedeckej, biomedicínskej či diagnostickej praxi:

- kvantifikácia expresie génov, určenie počtu kópií génov;
- genotypovanie (určenie genotypu) alelovou diskrimináciou alebo analýzou topenia krivky (HRM, angl. *High Resolution Melt*);
- detekcie viacerých génov naraz multiplexnou Real-Time PCR.

**Úloha: Rýchla detekcia rekombinantných klonov z bakteriálneho lyzátu**  
**..... pomocou PCR metódy**

**Materiál:** bunkový lyzát, .....

**Pomôcky:** .....

**Prístroje:** .....

**Chemikálie:**.....

### Pracovní postup:

Tabuľka 13 Zložky PCR reakčnej zmesi pre detekciu génu .....

Zložka PCR (koncentrácia)	Objem [ $\mu$ l] 1x	Objem [ $\mu$ l] .... x (premix)
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
<b>Celkový objem</b>	.....	.....

Tabuľka 14 Teplotný program PCR reakcie.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Denaturácia	..... °C	..... min.	1 x
1. Denaturácia	..... °C	..... sek.	} ..... x
2. Hybridizácia	..... °C	..... sek.	
3. Polymerizácia	..... °C	..... min.	
Ukončenie	..... °C	..... min.	1 x

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha :** Detekcia génu ..... pomocou PCR metódy

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:** .....

.....

**Pracovný postup:**

1. objem reakčnej zmesi zmiešame v 0,2 ml PCR mikroskúmavke s templátovou DNA podľa Tabuľky 15
2. obsah mikroskúmaviek jemne premiešame, krátko odstredíme pomocou mikrocentrifúgy a vložíme do termocykléra
3. spustíme PCR program podľa odporúčaní výrobcu *Taq* polymerázy (Tabuľka 16)
4. po ukončení cyklov produkty PCR reakcie elektroforeticky separujeme v agarózovom géli

**Tabuľka 15** Zložky PCR reakčnej zmesi pre detekciu génu .....

Zložka PCR (koncentrácia)	Objem [μl] 1x	Objem [μl] ... x (premix)
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
<b>Celkový objem</b>	.....	.....

**Tabuľka 16** Teplotný program PCR reakcie.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Denaturácia	..... °C	..... min.	1 x
1. Denaturácia	..... °C	..... sek.	} ..... x
2. Hybridizácia	..... °C	..... sek.	
3. Polymerizácia	..... °C	..... min.	
Ukončenie	..... °C	..... min.	1 x

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Úloha :** Kvantitatívne stanovenie expresie génu ..... pomocou RT-qPCR analýzy

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....



.....  
**Prístroje:** .....

.....  
**Chemikálie:**.....

**Pracovný postup:**

1. objem reakčnej zmesi zmiešame v 0,2 ml PCR mikroskúmavke s templátovou cDNA (podľa Tabuľky 17)
2. obsah mikroskúmaviek jemne premiešame, krátko odstredíme pomocou mikrocentrifúgy a vložíme do Real-Time termocykléra
3. spustíme PCR program podľa odporúčaní výrobcu (Tabuľka 18) pre relatívnu alebo absolútnu kvantifikáciu
4. po ukončení reakcie produkty PCR reakcie elektroforeticky separujeme v agarózovom géli

**Tabuľka 17** Zložky qRT-PCR reakčnej zmesi pre detekciu exprese génu .....

<b>Zložka PCR (koncentrácia)</b>	<b>Objem [μl] 1x</b>	<b>Objem [μl] ... x (premix)</b>
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
<b>Celkový objem</b>	.....	.....

**Tabuľka 18** Teplotný program RT-qPCR reakcie.

<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklov</b>
Denaturácia	..... °C	..... min.	1
1. Denaturácia	..... °C	..... sek.	} ..... x
2. Hybridizácia	..... °C	..... sek.	
3. Polymerizácia	..... °C	..... min.	
Ukončenie	..... °C	..... min.	1

**Poznámky:** .....

.....

.....

.....

.....

**Otázky:**

1. *Popíšte princíp a využitie polymerázovej reťazovej reakcie.*
2. *Z akých krokov pozostáva PCR?*
3. *Vymenujte variácie PCR.*
4. *Aké komponenty tvoria reakčnú zmes PCR?*
5. *Aká je funkcia  $Mg^{2+}$  v PCR reakcii?*
6. *Aká je úloha primerov v PCR?*
7. *Od čoho závisí čas polymerizácie PCR?*
8. *Ako sa nazýva prístroj pre amplifikáciu DNA fragmentov?*
9. *Popíšte niektoré zlyhania PCR.*
10. *Čo by sa stalo, keby ste zabudli v experimente použiť negatívnu kontrolu PCR?*
11. *Prečo ste si pri príprave PCR reakčnej zmesi medzi jednotlivými krokmi menili špičku na pipete?*
12. *Aký templát sa využíva pri štandardnej PCR a RT PCR?*
13. *Aký je rozdiel medzi štandardnou PCR a Real-Time qPCR?*
14. *V čom spočíva rozdiel medzi štandardnou PCR a RT-qPCR analýzou v zmysle použitých komponentov?*
15. *Aké metódy značenia sa používajú pri Real-Time qPCR?*
16. *Akými spôsobmi je možné kvantifikovať DNA?*
17. *Čo je to a načo slúži kalibračná krivka pri Real-Time qPCR?*
18. *Akými metódami sa vyhodnocuje relatívna kvantifikácia PCR produktu?*

## 12. Elektroforetická separácia nukleových kyselín v agarózovom géli

### Princíp elektroforetickej separácie v agarózovom géli

Elektroforéza je fyzikálno-chemická metóda separácie nabitých molekúl vplyvom elektrického poľa. Je to jednoduchý a najčastejšie používaný spôsob separácie a analýzy DNA a iných makromolekúl s veľmi vysokou molekulovou hmotnosťou. Elektricky nabité molekuly nukleových kyselín (DNA, RNA) sú udržiavané v elektrickom poli, kde migrujú v závislosti od ich náboja, ale aj veľkosti elektrického poľa, tvaru, veľkosti z hľadiska ich molekulovej hmotnosti a teploty média. Agarózový gél je viac porézny ako polyakrylamidový gél a má charakter molekulového sita, čo umožňuje, aby sa pri elektroforéze rozdelili aj také látky, ktoré majú rovnaký náboj, ale rozličnú veľkosť molekúl.

Touto metódou je možné deliť fragmenty DNA s veľkosťou približne 20 – 20000 bp s rozlíšením približne 5 bp (špeciálne typy agarózy), vo väčšine prípadov je rozlíšenie nižšie, t.j. viac bp.

Počas elektroforézy sa molekuly nukleovej kyseliny pohybujú v elektrickom poli (DNA je záporne nabitá) v agarózovom géli a separujú sa na základe ich veľkosti (bázových párov) – malé molekuly sa pohybujú rýchlejšie, zatiaľ čo veľké molekuly migrujú pomalšie. Rýchlosť pohybu jednotlivých foriem DNA v agarózovom géli je závislá od viacerých faktorov:

- veľkosť molekuly DNA: molekuly lineárnej dvojvláknovej DNA sa pohybujú rýchlosťou, ktorá je závislá od prevrátenej hodnoty logaritmu molekulovej hmotnosti. Na základe tejto vlastnosti je možné určiť veľkosť neznámych fragmentov DNA porovnaním s pohyblivosťou štandardov molekulovej hmotnosti (tzv. marker alebo DNA ladder). Pretože všetky molekuly DNA majú rovnaký náboj na jednotku hmotnosti, rýchlosť pohybu nezávisí od náboja;
- tvar molekuly DNA: pri delení plazmidov má najväčšiu pohyblivosť superspiralizovaná forma DNA, lineárna a otvorená kruhová forma sa pohybujú o niečo pomalšie;
- koncentrácia agarózového gélu: polysacharidové vlákna agarózy (polymér disacharidu agarobiózy) vytvárajú v agarózových géloch sieť, medzi vláknami zostávajú póry, ktoré umožňujú prechod molekúl DNA počas separácie. Veľkosť pórov je závislá od koncentrácie agarózy, čím je koncentrácia vyššia, tým je gél vhodnejší na delenie menších molekúl DNA. V experimentoch molekulárnej biológie sa na rutinné separácie DNA typicky používa 0,7 – 1 % agarózový gél, ktorý ponúka dobrú a jasnú diferenciáciu fragmentov v rozsahu 0,2 – 10 kb;
- elektrické napätie: čím je napätie vyššie, tým rýchlejšie prebieha separácia, zároveň sa uvoľňuje viac tepla, ktoré zahrieva aparáturu a môže interferovať s delením. Optimálny potenciálový spád v horizontálnej elektroforetickej aparátуре je približne 5 V/cm.

Horizontálna elektroforetická separácia prebieha v elektroforetickej komore, ktorá má katódový a anódový priestor s elektrolytom (elektrolytický tlmivý roztok) a priestor na umiestnenie nosiča (agarózový gél) (Obrázok 31). Elektroforetická aparátúra sa napája na zdroj elektrického napätia.

Pri príprave agarózového gélu sa agaróza rozpúšťa v horúcich elektroforetických tlmivých roztokoch (Tabuľka 19), ktoré zabezpečujú prítomnosť iónov pre vedenie elektrického prúdu pri elektroforéze.

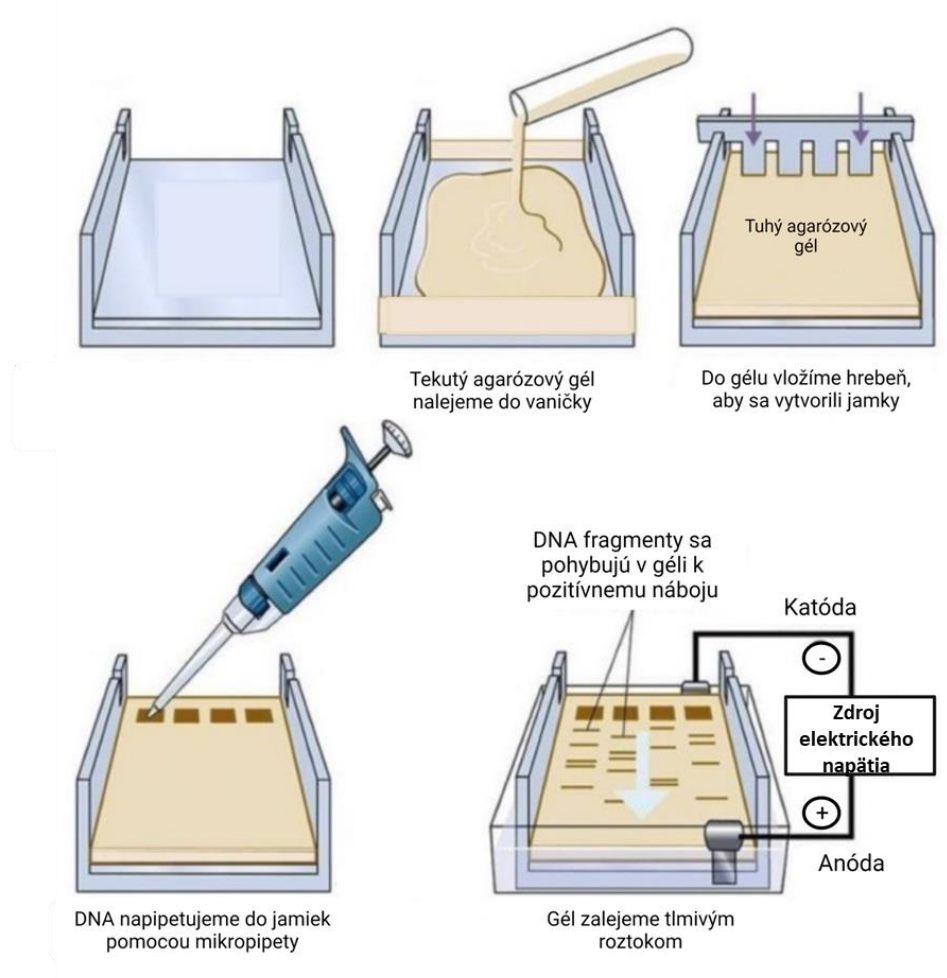
Vzorka DNA sa do gélu nanáša zmiešaná s nanášacou zmesou (nanášací tlmivý roztok, nanášacia farbička) (Obrázok 31). Nanášací tlmivý roztok zabezpečuje zvýšenie hustoty roztoku (vd'aka glycerolu), aby sa pri nanášaní vzorka nerozplývala do elektroforetického roztoku, ale usadila sa na dno jamky v géli. Nanášací roztok obsahuje farbivá (brómfenolová modrá, xylén cyanol, orange, a iné), ktoré sa pri elektroforéze pohybujú podobne ako DNA a umožňujú sledovať priebeh migrácie vzoriek v géli. Niektoré roztoky obsahujú látky (EDTA, SDS), ktoré inaktivujú enzýmy (napr. restričné endonukleázy) pred spustením separácie. Nanášacia zmes pre zriedenie môže obsahovať

aj vodu. Veľkosť separovaných fragmentov sa zisťuje porovnaním so štandardom molekulových hmotností. V súčasnosti je komerčne dostupných mnoho rozličných markerov, výber toho vhodného závisí od konkrétnej aplikácie (očakávanej veľkosti fragmentov, ktoré detegujeme).

**Tabuľka 19** Návod na prípravu tlmivých elektrolytických roztokov pre elektroforézu v agarózovom géli.

Tlmivý roztok	Zásobný roztok (1 l)
Tris-acetát (TAE)	50x: 242 g Tris báza 57,1 ml ľadová kyselina octová 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Tris-borát (TBE)	5x: 54 g Tris báza 27,5 g kyselina boritá 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Alkalický (BBE)	1x: 5 ml 10 M NaOH 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	10x: 40 g kyselina boritá 11 g tetraboritan sodný 9,3 g EDTA (pH 8,0)
	*Pridávaním 4 M NaOH sa začne rozpúšťať celý obsah

## Agarózová gélová elektroforéza



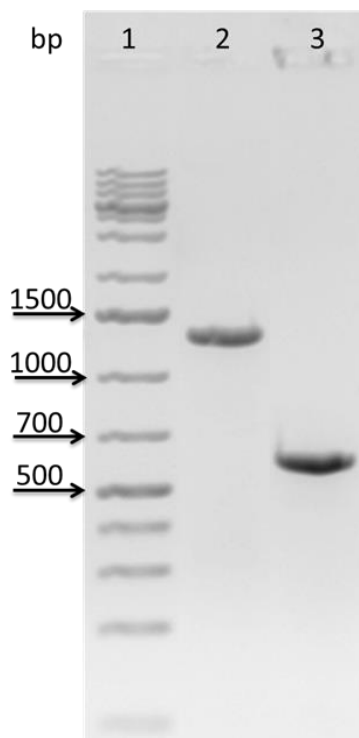
**Obrázok 31** Proces prípravy agarózového gélu pre elektroforetickú separáciu nukleových kyselín.

## Vizualizácia nukleových kyselín v agarózovom géli

Najjednoduchšou metódou vizualizácie DNA v agarózových géloch je vyfarbovanie interkalačným činidlom – etídium bromid (EtBr). Etídium bromid sa viaže na dvojvláknovú nukleovú kyselinu interkaláciou medzi navrstvenými párami báz. Komplexy EtBr s DNA po ožiarení UV lúčmi s vlnovou dĺžkou 302 nm oranžovo fluoreskujú. Najlepšie výsledky farbenia začlenením etídiumbromidu do gélu sú pri koncentrácii 0,5 µg/ml. Keďže etídium bromid je vysoko toxická, karcinogénna a mutagénna látka, v súčasnosti sa na farbenie a vizualizáciu nukleových kyselín preferujú farbivá s nižšou toxicitou, ako je SYBR Green I, DsRed, GelRed a iné.

Po príprave agarózového gélu sa gél umiestni do elektroforetickej aparatury a zaleje elektrolytickým roztokom (vrátane jamiek), následne je potrebné do jednotlivých jamiek naniest vzorky (DNA zmiešaná s vodou a nanášacím roztokom s obsahom farbiva). Do jednej z jamiek v géli sa nanáša vhodný objem štandardu molekulových hmotností (podľa odporúčaní výrobcu). Na záver sa uzavrie aparátúra vekom a správne sa napoja a elektródy zdroja elektrického napätia.

Po separácii vzoriek sa gél opatrne preniesie a umiestni na UV-transiluminátor (Obrázok 4P) v tmavej miestnosti (chráňte si oči pre UV). Gél sa presvieti UV svetlom s vlnovou dĺžkou 302 nm, čo umožní vidieť oranžovo fluoreskujúce fragmenty. Vo fotodokumentačnom zariadení s integrovaným UV svetelným zdrojom (Obrázok 4R) je možné fotograficky zdokumentovať výsledok experimentu vo forme obrázku (Obrázok 32). Interpretácia výsledkov sa uskutočňuje na základe použitého štandardu molekulových hmotností, keďže pod UV svetlom je možné určiť, resp. odčítať veľkosť detegovaných fragmentov DNA.



**Obrázok 32** Fotodokumentácia fragmentov DNA po separácii v agarózovom géli. Dráha 1 – 1kb DNA štandard (SM1331); dráha 2 – PCR fragment ABC (1 450 bp); dráha 3 – PCR fragment LT (590 bp).

**Úloha: Elektroforetická separácia .....**

**Materiál: .....**

**Pomôcky: .....**

.....  
**Prístroje:** .....

.....  
**Chemikálie:**

- roztok 1x TBE (pH 8,3)
- etídium bromid (0,5 µg/ml) – silný karcinogén a mutagén!!!
- agaróza
- nanášací roztok.....
- DNA štandard molekulových hmotností .....

**Pracovný postup:**

1. .... g agarózy rozpustíme v ..... ml 1x TBE tlmivom elektrolytickom roztoku, zmes rozvaríme v mikrovlnnej rúre a po vychladnutí asi na 50 – 60 °C pridáme ..... µl etídiumbromidu. opatrne premiešame ručne rotačným pohybom fľaše
2. roztok vylejeme do utesnenej vaničky s hrebeňom a necháme polymerizovať pri laboratórnej teplote min. 30 min., po stuhnutí gélu opatrne odstránime hrebeň, gél vložíme do elektroforetickej aparatury a zalejeme 1x TBE tlmivým roztokom tak, aby hladina presahovala nad gél
3. k ..... µl vzorky (PCR zmes) pridáme ..... µl nanášacieho farbiaceho roztoku ..... a dôkladne premiešame
4. zmes opatrne nanesieme do jamky v pripravenom géli
5. na záver do prvej jamky nanesieme ..... µl štandardu molekulových hmotností .....
6. po nanesení všetkých vzoriek do gélu uzatvoríme elektroforetickú aparaturu, pripojíme k zdroju napätia a spustíme proces separácie pri konštantnom napätí .....V počas ..... min.
7. fragmenty DNA vizualizujeme pod UV svetlom pomocou UV transiluminátora a veľkosť fragmentov určujeme porovnávaním s veľkosťou molekulových hmotností štandardu .....

**Poznámky:** .....

.....  
.....  
.....  
.....

**Otázky:**

1. *Popíšte princíp a význam metódy elektroforetickej separácie.*
2. *Aké faktory ovplyvňujú rýchlosť pohybu nukleových kyselín v géli?*
3. *Vymenujte 2 príklady elektroforetických tlmivých roztokov.*
4. *Z akých zložiek pripravíte agarózový gél?*
5. *Aký význam má elektroforetický tlmivý roztok v procese separácie nukleových kyselín v agarózovom géli?*
6. *Na základe čoho sú v agarózovom géli separované molekuly nukleových kyselín?*
7. *Aké farbivá je možné pridať do agarózového gélu s cieľom vizualizovať získané fragmenty?*
8. *Za akým účelom sa nanáša vzorka nukleových kyselín spolu s nanášacou farbičkou do gélu?*
9. *Akú má úlohu glycerol v nanášacej farbičke?*
10. *Definujte pojem štandard molekulových hmotností (marker).*
11. *Pomocou akého prístroja budete schopní vidieť po zafarbení gélu skúmané fragmenty?*
12. *Pri akej vlnovej dĺžke sú najlepšie detegovateľné fragmenty?*

## 13. Extrakcia fragmentu DNA z agarózového gélu

DNA, ktorá sa elektroforeticky separuje pomocou agarózových gélov, sa často používa ako primárny alebo reamplifikačný templát pre polymerázovú reťazovú reakciu, ako aj pre hybridizáciu, sekvenovanie, ligácie a mnoho ďalších molekulárnych techník.

Na obnovenie DNA je nutné záujmový fragment (Obrázok 33) vyrezať pomocou sterilného skalpela a následne sa DNA extrahuje z gélu rôznymi spôsobmi.

Bežné postupy zahŕňajú organickú extrakciu fenolom a chloroformom, použitie elektro-elučných zariadení, niekoľko rôznych spinových techník a iné.



**Obrázok 33** Oranžovo fluoreskujúce fragmenty vyrezané z agarózového gélu farbeného pomocou etídium bromidu.

### „Freeze 'N Squeeze“ metóda

Technika zmrazovania a stláčania zahŕňa zmrazenie gélu v kvapalnom dusíku v mikropipetovej špičke alebo mikroskúmavke a odstred'ovanie kvapaliny centrifugáciou, resp. centrifugáciou cez sklenú vatú, zatiaľ čo iná modifikácia „Freeze 'N Squeeze“ metódy zahŕňa aj pridanie tlmivého roztoku k vyzeranej vzorke.

Tieto rýchle metódy znižujú prevádzkový čas a náklady na technológiu rekombinantnej DNA, pri ktorej je čistenie PCR produktov opakovaným procesom. Nie je potrebná príprava roztokov a zaobídeme sa bez nákladného a zložitého technického vybavenia a prípravy (školenia). Na druhej strane tieto metódy nie sú tak čisté a výťažok extrahovanej DNA sa pohybuje v koncentrácii do 70 %.

### Úloha: Extrakcia fragmentu DNA z agarózového gélu pomocou „Freeze'N Squeeze“

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....

**Postup:**

1. vyrežeme fragment z agarózového gélu, uložíme ho do 1,5 ml mikroskúmavky
2. vzorku zmrazíme pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. fragment následne rozpustíme (medzi dvomi prstami alebo v dlani)
4. po rozpustení vzorku centrifugujeme počas 5 min.
5. supernatant prepipetujeme do čistej mikroskúmavky a DNA prečistíme fenolo-chloroformom a následne etanolom
6. vzorku môžeme použiť priamo do reakcie alebo skladujeme pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do ďalšieho použitia

**Úloha: Extrakcia fragmentu DNA z agarózového pomocou „New-freeze“ metódy (Yang a kol. 2010)**

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

.....

**Pracovný postup:**

1. vyrežeme fragment z agarózového gélu a vložíme ho do 1,5 ml mikroskúmavky
2. vzorku rýchlo zamrazíme v tekutom dusíku počas 60 sek.
3. následne vzorku rozmrazíme pri teplote  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  počas 2 min.
4. rozmrazenú vzorku centrifugujeme 3 min.
5. extrahovanú DNA v supernatante prepipetujeme do čistej mikroskúmavky
6. vzorku môžeme použiť priamo do reakcie alebo skladujeme pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do ďalšieho použitia

**Úloha: Extrakcia fragmentu DNA z agarózového pomocou „Freeze'n Squeeze“ centrifugačnej metódy**

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

**Chemikálie:**.....

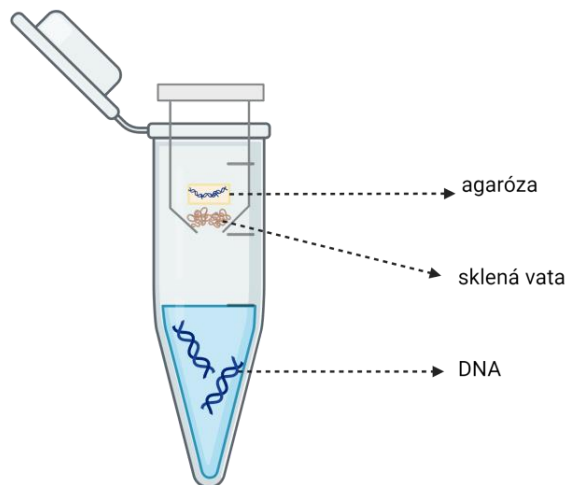
.....

**Pracovný postup:**

1. na dno 0,5 ml mikroskúmavky s dierkou uložíme sklenú vatu (maximálne do 1/4 mikroskúmavky!!!)
2. vyrežeme fragment z agarózového gélu a položíme ho na sklenú vatu (podľa Obrázku 34)



3. 0,5 ml mikroskúmavku uzavrieme a vložíme do otvorenej 1,5 ml mikroskúmavky
4. vzorku centrifugujeme pri 8000 rpm počas 5 min.
5. efektivitu metódy si overíme použitím UV svetla
6. extrahovanú DNA môžeme použiť priamo do reakcie alebo ju ešte prečistíme etanolom, skladujeme pri -20 °C až do ďalšieho použitia



**Obrázok 34** Demonštračný obrázok prípravy vzorky pre Freeze'n Squeeze centrifugačnú metódu.

**Úloha: Extrakcia fragmentu DNA z agarózového gélu pomocou komerčnej súpravy .....**

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

#### **Chemikálie:**

- QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)
- etanol 96 %
- TE roztok (10 mM Tris-HCl
- 1mM EDTA (pH8,0)
- 100 % izopropanol

#### **Pracovný postup:**

1. vyrežeme opatrne DNA fragment z agarózového gélu pomocou skalpela
2. vložíme fragment do 1,5 ml mikroskúmavky a odvážíme hmotnosť gélu
3. Pridáme 3 objemy QG roztoku do 1 objemu gélu (100 µl gélu ~ 100 µl)  
max. množstvo gélu je 400 mg!!!  
pre >2 % gél pridať 6 objemov QG roztoku
4. vzorku inkubujeme vo vodnom kúpeli pri 50 °C počas 10 min. (pokiaľ sa gél nerozpustí), počas inkubácie vzorku každé 2 – 3 min. vortexujeme

5. po úplnom rozpustení fragmentu skontrolujeme sfarbenie roztoku (žltá). Ak je sfarbenie oranžové/fialové pridáme 10 µl 3 M acetátu sodného (pH 5,0) pre zníženie pH
6. k vzorke pridáme 1 objem izopropanolu a premiešame pomalým prevracaním mikroskúmavky
7. kolónku umiestnime do 2 ml zbernej skúmavky
8. obsah vzorky prepipetujeme do kolónky (na membránu) a centrifugujeme pri 13000 rpm počas 1 min.
9. zvyšnú kvapalinu vylejeme do zbernej nádoby (kadička)
10. kolónku umiestnime späť do tej istej 2 ml zbernej tuby
11. do kolónky naniesieme 500 µl QG roztoku a vzorku centrifugujeme pri 13000 rpm počas 1 min. pri laboratórnej teplote
12. vylejeme zvyšnú kvapalinu do zbernej nádoby, kolónku umiestnime späť do tej istej 2 ml zbernej skúmavky
13. do kolónky pridáme 750 µl PE roztoku s obsahom etanolu a centrifugujeme pri 13000 rpm počas 1 min.  
! Ak bude DNA použitá na analýzy citlivé na soli (priame sekvenovanie, ligácia cez tupé konce), je nutné vzorku inkubovať 2 – 5 min po pridaní PE roztoku
14. vylejeme zvyšnú kvapalinu do zbernej nádoby a kolónku umiestnime späť do tej istej 2 ml zbernej skúmavky
15. zopakujeme ešte raz centrifugáciu „na sucho“ pre odstránenie zvyškov etanolu
16. kolónku premiestnime do čistej 1,5 ml mikroskúmavky a priamo na membránu kolónky opatrne naniesieme 10 µl EB roztoku (10 mM Tris-HCl (pH 8,5)) alebo vody
17. vzorku necháme postáť (rozpušenie DNA v elučnom roztoku) 1 min. a centrifugujeme pri 13000 rpm po dobu 1 min.
18. pre overenie DNA v agarózovom géli pridáme 1 V nanášacej farbičky k 5 V DNA vzorky, zmes premiešame pri pipetovaní pred nanesením do gélu, vzorku separujeme v agarózovom géli a vizualizujeme pod UV svetlom

**Poznámky:**.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....

### **Otázky:**

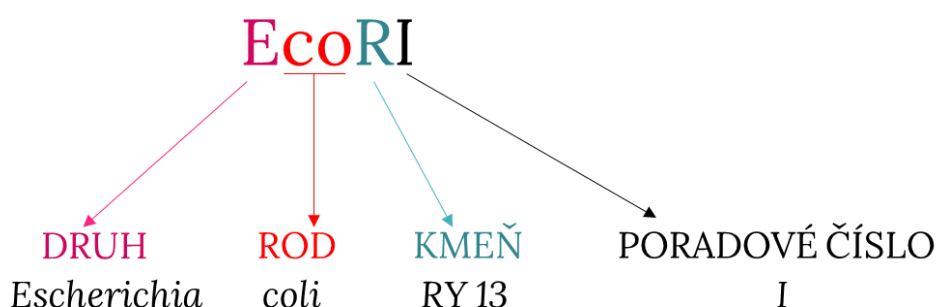
1. Aký má význam extrakcia fragmentu z agarózového gélu?
2. Ktorou metódou by ste najrýchlejšie extrahovali fragment z agarózového gélu?
3. Ktorou metódou by ste najkvalitnejšie extrahovali fragment z agarózového gélu

## 14. Fragmentácia DNA pomocou restričných endonukleáz

Restričné endonukleázy (RE) špecificky štiepia dvojvláknovú DNA v presne definovanej lokalite, tzv. restričnom mieste. Tieto enzýmy sú izolované z baktérií. U baktérií sú bežnou súčasťou restrično-modifikačného systému (RMS), kde je ich úlohou ochrániť bunku hostiteľa pred inváziou a vstupom cudzej DNA.

Rozpoznávacía sekvencia má vo všeobecnosti dĺžku od 4 do 8 nukleotidov (resp. báz) a je významná tým, že je palindromická (poradie báz v jednom smere (5' → 3') na jednom vlákne je zhodné s poradím báz na druhom vlákne v opačnom smere).

Keďže sú tieto enzýmy izolované z baktérií, ich názvy sú odvodené od konkrétneho kmeňa, z ktorého je enzým izolovaný (napr. enzým EcoRI, bežne používaná restričná endonukleáza, ktorá je izolovaná z baktérie *Escherichia coli* kmeň RY13) (Obrázok 35).



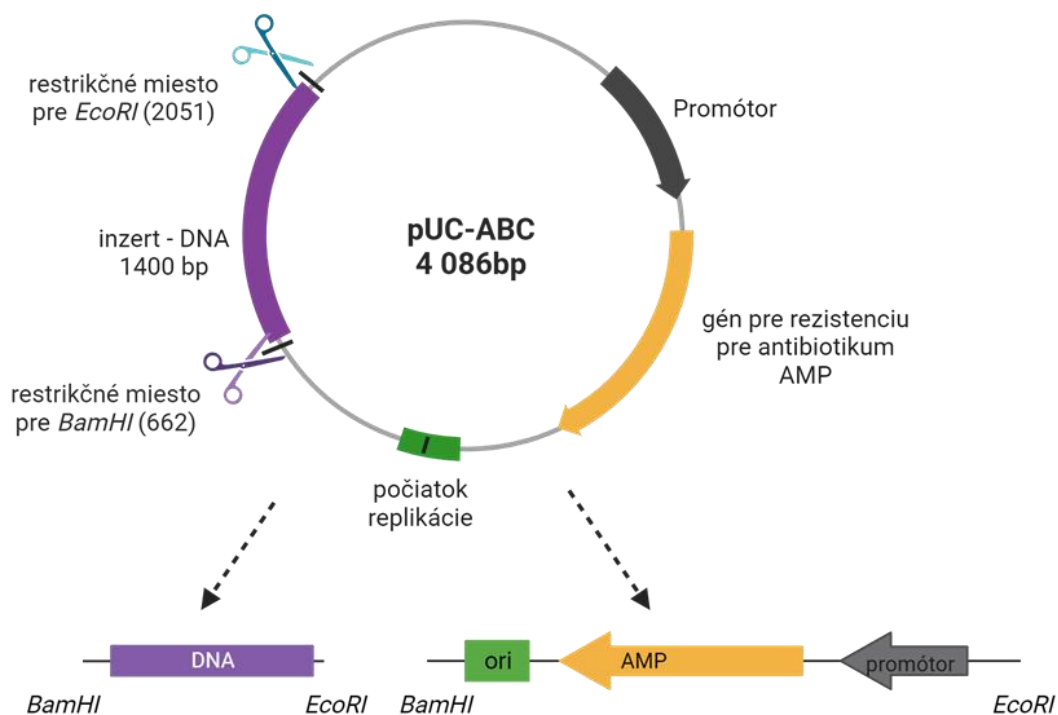
**Obrázok 35** Názorný príklad priradenia názvu pre restričnú endonukleázu EcoRI.

Typy systému restričných enzýmov:

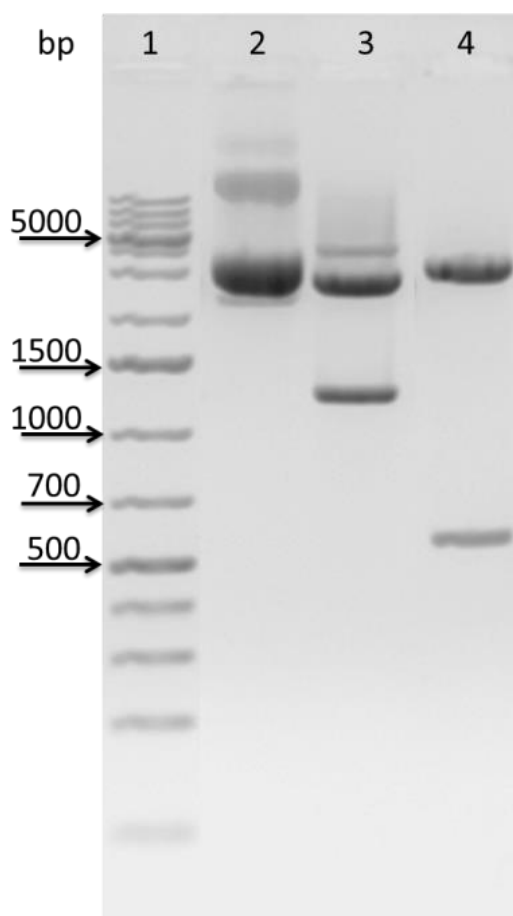
1. **Typ restričných enzýmov I:** tieto endonukleázy vykazujú restrikciju aj DNA modifikačné činnosti. Pre svoju aktivitu potrebujú kofaktory ako  $Mg^{2+}$  ióny, S- adenozylnmetionín (SAM) a ATP. Rozpoznávacie sekvencie sú dosť dlhé bez rozpoznateľných znakov, ako je symetria. Obmedzením týchto nukleáz je, že štiepia DNA na nešpecifických miestach, ktoré môžu mať 1 000 párov báz alebo aj viac z rozpoznávacej sekvencie.
2. **Typ restričných enzýmov II:** enzýmy tohto typu a ich zodpovedajúce modifikácie metyltransferázy pôsobia ako dva samostatné proteíny. Majú množstvo výhod v porovnaní so systémami typu I a III. Výhodou tohto systému je, že restričné aktivity nevyžadujú kofaktory, ako je ATP alebo SAM, čo uľahčuje ich použitie. Ako kofaktory si vyžadujú len ióny horčíka. Ďalšou výhodou je, že tieto enzýmy sú špecifické pre rozpoznávacie miesto, keďže hydrolyzujú špecificky fosfodiesterové väzby v oboch reťazcoch DNA. Restričné endonukleázy triedy II sa všeobecne používajú ako kľúčový materiál v molekulárnej biológii a rekombinantných technikách DNA vrátane mapovania genómu, analýzy RFLP, sekvenovania DNA a klonovania.
3. **Typ restričných enzýmov III:** podobne ako enzýmy typu I majú obmedzené modifikačné schopnosti. Tieto enzýmy štiepia vo vzdialenosti 24 – 26 párov báz od rozpoznávacej sekvencie a pre ich činnosť sú potrebné kofaktory  $Mg^{2+}$  aj ATP, dokonca v niektorých prípadoch aj SAM.

### Princíp štiepenia DNA pomocou restričných enzýmov II

Tieto restričné endonukleázy štiepia reťazec DNA medzi deoxyribózou a fosfátovou skupinou, pričom fosfátovú skupinu zanechávajú na 5' konci. Princíp a výsledok štiepenia je znázornený na Obrázku 36 a 37.



**Obrázok 36** Princíp štiepenia plazmidu pUC-ABC kombináciami restriktčných endonukleáz.

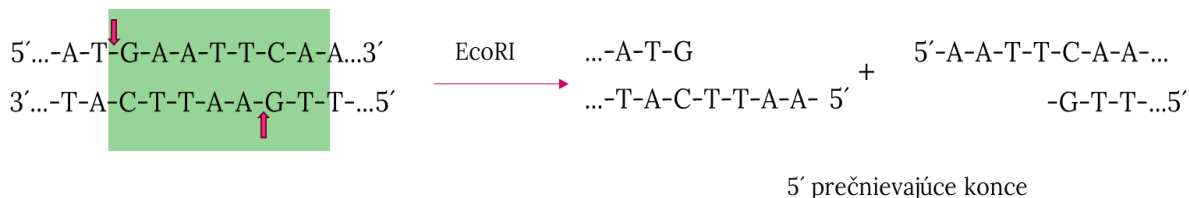


**Obrázok 37** Fotodokumentácia elektroforetickej separácie plazmidov v agarózom géli. Dráha 1 – 1 kb DNA štandard (SM1331); dráha 2 – neštiepný plazmid pUC-ABC (4086 bp); dráha 3 – plazmid pUC-ABC štiepený restriktčnými endonukleázami *EcoRI* a *BamHI* (2686 bp + 1400 bp); dráha 4 – plazmid pUC-ABC štiepený restriktčnými endonukleázami *BamHI* a *HindIII* (2686 bp + 560 bp).

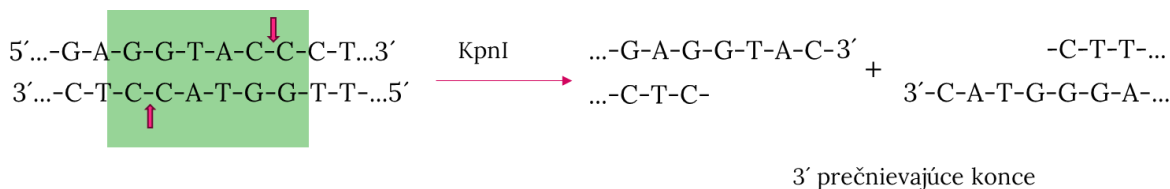
Podľa spôsobu štiepenia vo vnútri rozpoznávacej sekvencie sa restriktčné endonukleázy typu II delia na tri skupiny.

Enzýmy, ktoré štiepa DNA asymetricky zabezpečujú vznik prečnievajúcich koncov (5'-prečnievajúce konce alebo 3'-prečnievajúce konce), ktoré nazývame ako lepivé alebo kohézne konce; 1. a 2. skupina na Obrázoku 38).

1. skupina – enzýmy štiepiace DNA za vzniku jednovláknových 5'-prečnievajúcich koncov, napr. enzým EcoRI, Hind III, BamHI a iné.

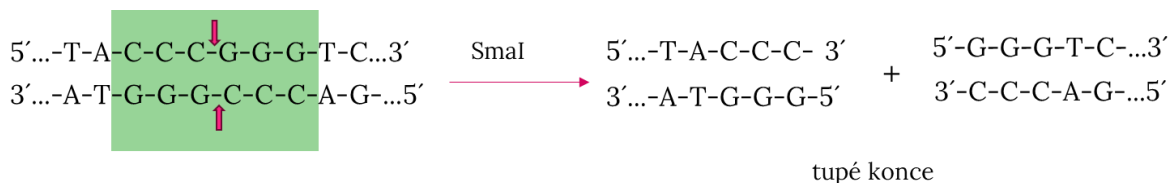


2. skupina – enzýmy, ktoré štiepia DNA tak, že vznikajú jednovláknové 3' prečnievajúce konce napr. enzým KpnI:



V prípade symetrického štiepenia sú obe vlákna rozštiepené v strede rozpoznávanej sekvencie, čím vznikajú tzv. tupé konce.

3. skupina – enzýmy, ktoré pri štiepení DNA zanechávajú zarovnané dvojvláknové fragmenty tzv. tupé konce, napr. enzým SmaI:



**Obrázok 38** Vzory štiepenia niektorých bežných restriktčných endonukleáz.

## Podmienky štiepenia DNA pomocou restriktčných endonukleáz

Každá restriktčná endonukleáza si vyžaduje pre optimálnu aktivitu (štiepenie dsDNA) vhodné špecifické reakčné podmienky (reakčné komponenty a optimálna teplota pre priebeh reakcie).

Súčasťou reakčnej zmesi musí byť vhodný tlmivý roztok Tris-HCl pre zabezpečenie optimálneho pH prostredia (7,6 – 8,0). Súčasťou tlmivého roztoku je aj 50 – 150 mM NaCl alebo KCl z dôvodu zachovania iónovej sily. Pre zabezpečenie prítomnosti kofaktora sa pridáva MgCl<sub>2</sub> (osobitne alebo býva súčasťou tlmivého roztoku). Ako stabilizátory sa využívajú napr. hovädzí sérový albumín (BSA, angl. *Bovine Serum Albumin*), ditiotritol (DDT) alebo Triton X-100. Významným faktorom pre optimálny proces štiepenia je tiež teplota, a to 25 – 65 °C, v závislosti od typu použitého enzýmu. Mnoho restriktčných endonukleáz je aktívnych pri teplote 37 °C.

Množstvo enzýmu sa určuje v enzýmových jednotkách (napr. jedna jednotka (1U) restriktčnej endonukleázy je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré úplne poštiepi 1 µg DNA pri teplote 37 °C (optimálnej teplote) za 1 hod. v 50 µl optimálnej reakčnej zmesi). Restriktčné endonukleázy sú dodávané ako riedené v rôznych koncentráciách, preto je pri ich používaní podstatným údajom

počet jednotiek enzýmu na 1 µl preparátu. Restrikčné endonukleázy sa uchovávajú pri teplote -20 °C, pridávajú sa do reakcie ako posledná zložka, pričom je dôležité ich uchovávať na ľade a chrániť pred kontamináciou. Pri príprave reakčnej štiepnej zmesi je dôležité pracovať podľa odporúčaní výrobcu použitej endonukleázy alebo kombinácie enzýmov, zachovať stanovené koncentrácie jednotlivých komponentov, teplotu aj čas (15 min. – 2 hod.) pre reakciu.

Po skončení reakcie sa pridá zastavovacia zmes a výsledok štiepenia sa vyhodnotí na základe elektroforetickej separácie štiepnej zmesi v agarózovom géli. V prípade, ak sa fragmenty používajú v ďalších experimentoch (napr. v ligácii), je potrebné restrikčnú endonukleázu po skončení štiepenia inaktivovať. Tepelná inaktivácia sa robí zahriatím štiepnej zmesi na teplotu 60 – 80 °C počas 5 – 15 min., pričom podmienky závisia od stability restrikčnej endonukleázy. V niektorých prípadoch je nutné odstrániť enzým z reakčnej zmesi (fenolovou extrakciou alebo purifikáciou cez kolónku).

Proces restrikčného štiepenia DNA sa využíva ako nástroj pri modifikáciach genetického materiálu, klonovaní génov, amplifikácii záujmového úseku DNA a pod.

## Úloha: Štiepenie izolovanej plazmidovej DNA (.....) restrikčnými endonukleázami .....

**Materiál:** .....

.....

**Pomôcky:** .....

.....

**Prístroje:** .....

.....

### Chemikálie:

- 10x tlmivý roztok
- restrikčný enzým .....
- RNáza
- DNA .....
- sterilná dH<sub>2</sub>O

### Postup:

1. v 1,5 ml mikroskúmavke si pripravíme štiepnu zmes podľa nasledovného postupu (udáva výrobca.....):
2. obsah skúmavky jemne premiešame, krátko odstredíme v mikrocentrifúge počas 5 sek.
3. restrikčnú zmes inkubujeme ..... min. pri ..... °C v termostate
4. efektívnosť restrikčného štiepenia a správnosť získaných fragmentov štiepenej DNA overíme pomocou agarózovej elektroforézy

**Tabuľka 20** Reakčná zmes pre štiepenie plazmidu.

Reakčná štiepna zmes	
Zložka	Objem
10x tlmivý roztok	..... µl
restrikčný enzým .....	..... µl
RNáza	..... µl
plazmidová DNA .....	..... µl
sterilná H <sub>2</sub> O	..... µl
celkový objem	..... µl

**Poznámky:**.....

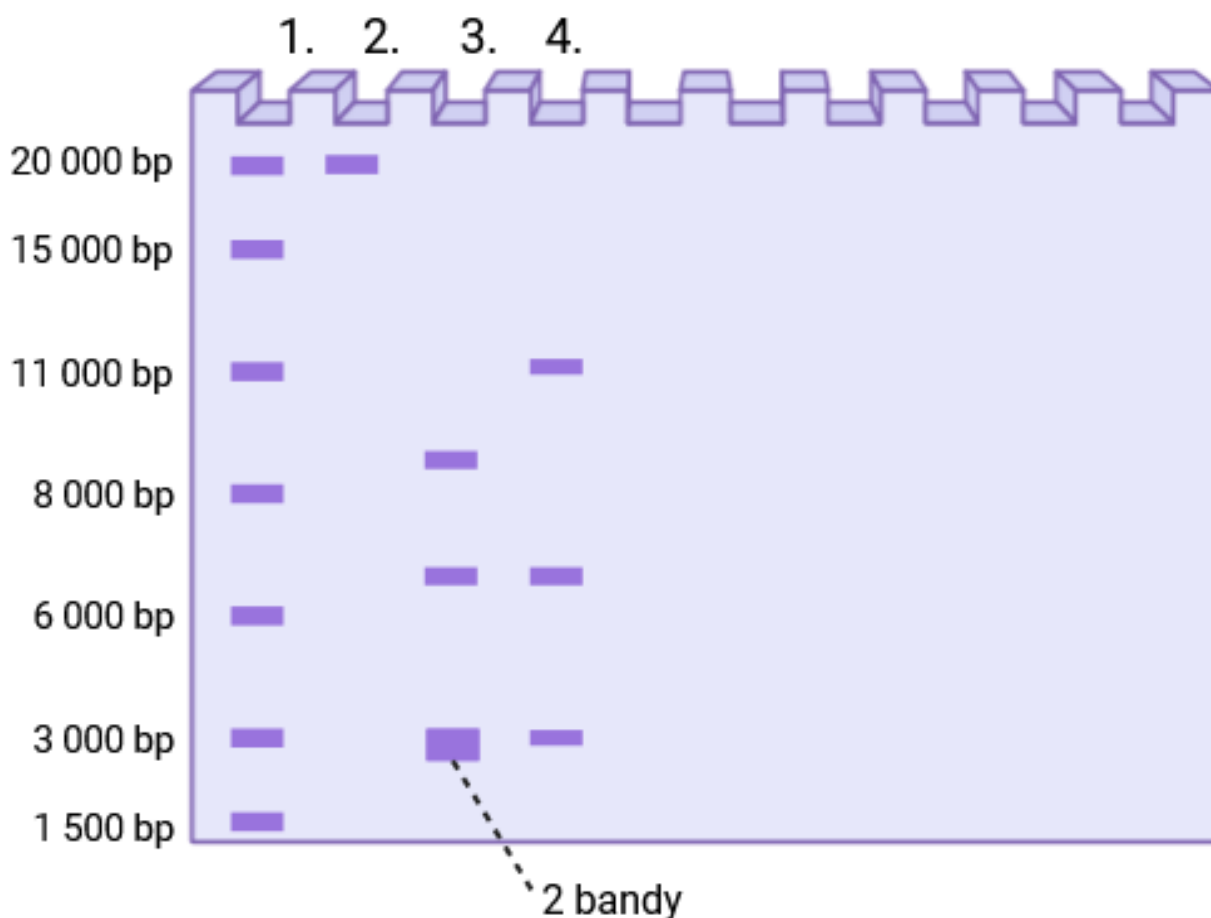
.....

.....

.....

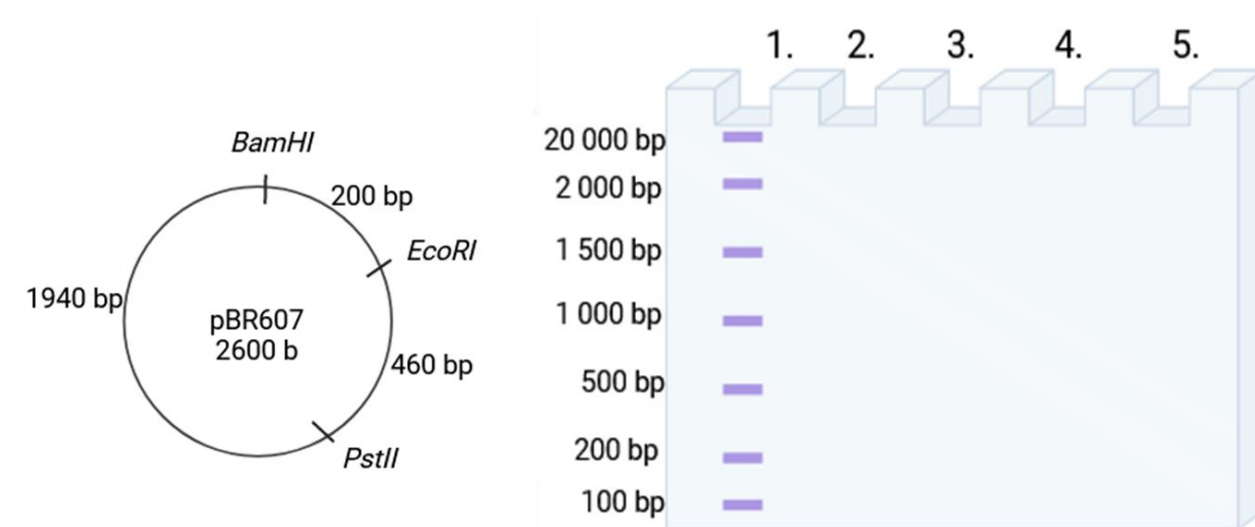
**Otázky:**

1. Popíšte úlohu restričných endonukleáz v molekulárnej biológii.
2. Aká je veľkosť rozpoznávacej sekvencie pre restričné endonukleázy?
3. Vymenujte typy systému restričných endonukleáz.
4. Čo majú spoločné a v čom sa naopak líšia restričné endonukleázy typu I. a II.?
5. Akými spôsobmi štiepia DNA restričné endonukleázy typu II.?
6. Vymenujte 3 restričné endonukleázy.
7. Aká je optimálne teplota pre aktivitu restričných endonukleáz?
8. Vymenujte zložky reakčnej štiepnej zmesi.
9. Akým spôsobom je možné overiť správnosť štiepenia?
10. Na elektroforeograme (Obrázok 39) agarózového gélu sú analyzované jednotlivé štiepne reakcie s DNA fragmentmi (dráha 1 – štandard molekulových hmotností, dráha 2 – štiepenie DNA pomocou EcoRI, dráha 3 – štiepenie DNA pomocou BamHI, dráha 4 – dvojité štiepenie enzýmami EcoRI+BamHI). Z týchto informácií zostavte restričnú mapu pUC23, ktorý bol štiepený restričnými enzýmami EcoRI a BamHI (jednotlivo) aj spolu.



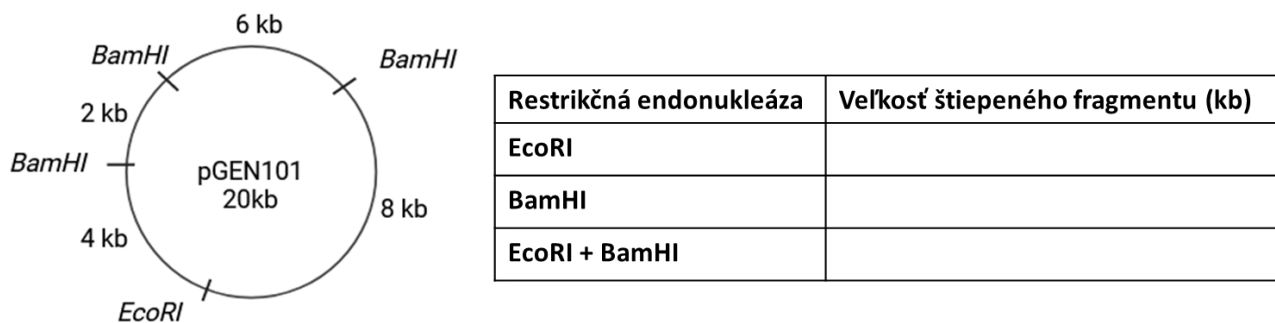
**Obrázok 39** Príklad pre zostavenie restričnej mapy plazmidu pUC23.

11. Plazmid pBR607 (veľkosť 2,6 kb) obsahujúci naznačené reštrikčné miesta pre reštrikčné enzýmy *EcoRI*, *BamHI* a *PstI*. Vzhľadom na reštrikčnú mapu pre pBR607 (vľavo) znázorníte na obrázku (Obrázok 40) agarózového gélu (vpravo) za pomoci štandardu molekulových hmotností (1. dráha), kde sú približné polohy vzniknutých DNA fragmentov po štiepení reštrikčnými enzýmami *EcoRI*+*PstI*, *EcoRI*+*BamHI* a *EcoRI*+*PstI*+*BamHI*.



**Obrázok 40** Príklad pre znázornenie veľkosti získaných fragmentov po reštrikčnom štiepení plazmidu pBR607.

12. Pomocou reštrikčnej mapy pGEN101 (20 kb) uveďte do tabuľky počet reštrikčných fragmentov spolu s ich priradenými veľkosťami, ktoré by boli výsledkom štiepenia pGEN101 reštrikčnými enzýmami *EcoRI*, *BamHI* a *EcoRI* + *BamHI* (Obrázok 41).



**Obrázok 41** Príklad pre zistenie veľkosti získaných fragmentov po reštrikčnom štiepení plazmidu pGEN101.



## 15. Techniky úpravy genetického materiálu

Proces vytvárania viacerých identických kópií konkrétneho génu alebo časti DNA (tzv. klony) využívajúce techniky génového inžinierstva sú známe ako génové klonovanie = techniky klonovania DNA = molekulárne klonovanie = príprava rekombinantnej DNA. Táto metóda sa používa najmä na izoláciu záujmového génu → zámernú úpravu genetického materiálu (predovšetkým DNA) s cieľom zmeniť, opraviť alebo zlepšiť formu alebo funkciu organizmu → amplifikáciu takto upraveného génu.

Fragment DNA, ktorý obsahuje požadovaný gén (cudzorodá DNA = klonovaná DNA = inzert), sa vloží do vhodného vektora = plazmidu, aby sa vytvorila rekombinantná molekula DNA. Gén je transportovaný cez vektor do hostiteľskej bunky (recipientná bunka, napr. baktéria *E. coli*). Tento vektor sa v nej replikuje a vytvára množstvo identických kópií seba samého, vrátane záujmového génu, ktorý je jeho súčasťou. Po delení hostiteľských buniek prechádzajú kópie rekombinantnej molekuly DNA do ďalšej generácie a prebieha ďalšia replikácia vektorov. Výsledkom delenia buniek je produkcia klonov = skupiny identických buniek. Pojmom klonovanie sa označuje proces tvorby klonov.

Plazmidy sa replikujú s využitím replikačných enzýmov hostiteľa, nezávisle od bakteriálneho chromozómu, tj. každý plazmid je samostatný replikón. Replikón, najdôležitejšia oblasť v expresnom systéme založenom na plazmide, pozostáva z počiatku replikácie (ori) a všetkých jeho riadiacich prvkov. Replikón je miesto iniciácie replikácie DNA, ktoré umožňuje plazmidu reprodukovať sa a prežiť v hostiteľskej bunke.

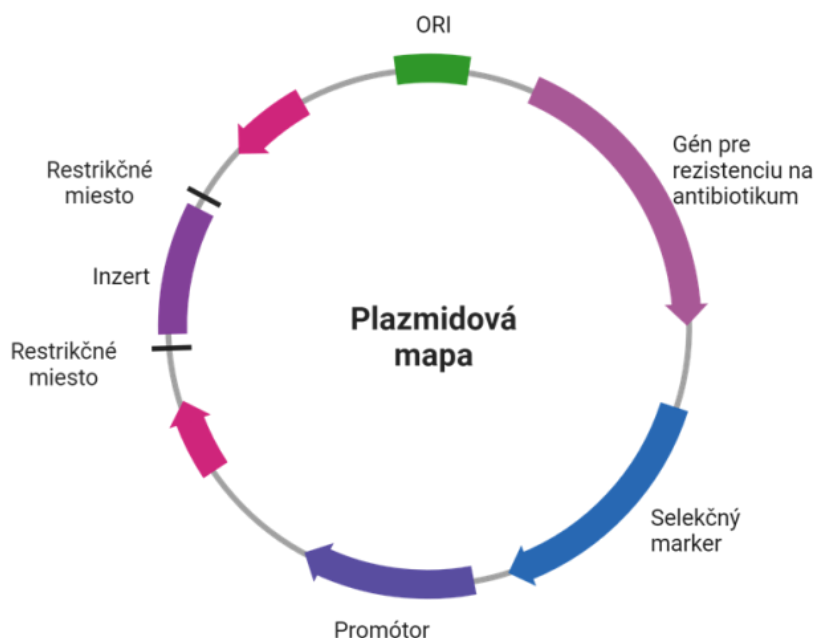
Ideálny vektor na klonovanie by mal obsahovať (Obrázok 42):

- gén selekcie pre antibiotikum – pomáha rozlíšiť bunky obsahujúce vektor (rekombinanty) od iných buniek, ktoré záujmový vektor nenesú. Pomáha teda pri identifikácii a eliminácii transformantov, ktoré nenesú daný gén rezistencie voči antibiotiku a selektívne umožňuje rast transformantov v prítomnosti vhodného selektívneho tlaku;
- počiatok replikácie (origin, ori) – miesto, v ktorom začína replikácia DNA. Toto miesto je zvyčajne bohaté na nukleotidy A a T a obsahuje špecifické reštrikčné miesta;
- klonovacie miesto = polylinker (MCS, angl. *Multiple Clonning Site*) – oblasť DNA v plazmide obsahujúce viaceré špecifické miesta (rozpoznávacie sekvencie) pre reštrikčné enzýmy za účelom štiepenia plazmidu;
- marker pre rekombináciu – pomáha pri modro-bielom skríningu (výbere požadovaných klonov, napr. gén lac Z v *E. coli*).

Vektor by mal tiež spĺňať ďalšie požiadavky pre úspešné klonovanie. Jeho veľkosť by mala byť v rozmedzí (2 – 15 kb), čím je vektor menší, tým je jeho klonovacia kapacita (množstvo cudzorodej DNA, ktoré je možné klonovať) vyššia. Pri použití príliš veľkých plazmidov klesá účinnosť. Malá veľkosť vektora uľahčuje reštrikčnú analýzu rekombinantov. Klonovacia kapacita (maximálna veľkosť klonovanej DNA) plazmidových vektorov je 10 – 20 kb.

V súčasnosti existujú stovky syntetických plazmidových vektorov špecificky pripravených podľa požiadaviek klonovacích resp. transformačno-selekčných techník.

# Plazmidová mapa



**Obrázok 42** Plazmidová mapa so všeobecným znázornením dôležitých úsekov vektora.

## Klonovanie DNA

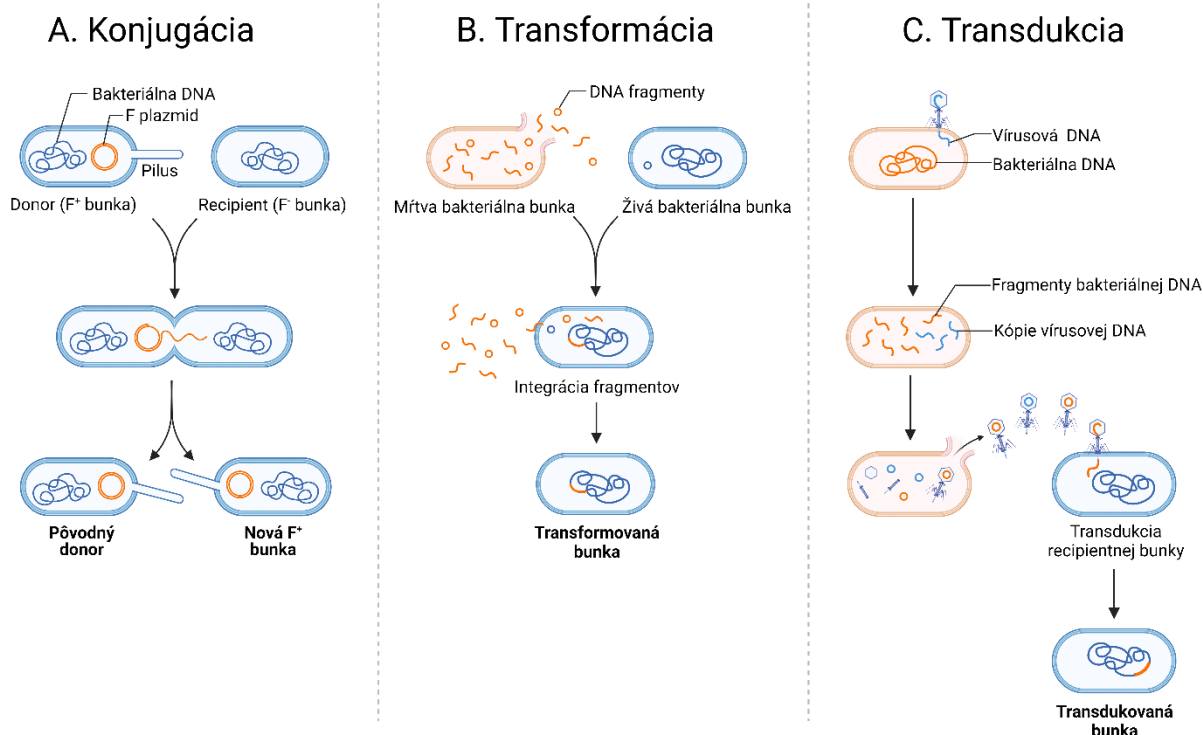
Proces klonovania DNA pozostáva z nasledujúcich krokov:

1. Príprava kompetentných buniek,
2. Príprava rekombinantnej DNA (ligácia),
3. Prenos rekombinantnej DNA do hostiteľskej bunky (transformácia),
4. Obnova transformovaných buniek,
5. Identifikácia transformantov a selekcia rekombinantov.

Transformácia v molekulárnej biológii je definovaná ako proces prijímania exogénnej alebo cudzej DNA hostiteľskou bunkou (recipientná bunka). Takto transformovaným bunkám sa následne menia jej fenotypové prejavy. Pred prijatím DNA sa tieto hostiteľské bunky stanú priepustnými pre DNA a ich účinnosť prijímať cudziu DNA sa zvýši. Tento stav sa nazýva kompetencia.

Transformovať je možné veľké množstvo organizmov vrátane baktérií, kvasiniek, rastlinných a živočíšnych buniek.

Pri baktériách je možné zaviesť novú genetickú informáciu procesom transformácie, transdukcie či transfekcie (Obrázok 43). V procese transformácie bakteriálnych buniek sa priamo zavádza plazmidová DNA. Transdukcia je spôsob prenosu DNA pomocou vírusov, pričom rekombinantné bakteriofágy je možné využiť ako vektory na prenos cudzorodej DNA do buniek baktérií. Zvláštnym typom transformácie je transfekcia, pri ktorej sa transformuje bunka purifikovanou DNA izolovanou z vírusov alebo bakteriofágov a v tomto procese sa obnoví ich virulencia (vytvoria sa plne funkčné vírusové častice).



**Obrázok 43** Možnosti prenosu DNA u bakteriálnych buniek.

Bakteriálna transformácia je kľúčovým krokom v molekulárnom klonovaní alebo génovom inžinierstve, ktorého cieľom je vytvoriť viacero kópií rekombinantnej molekuly DNA. Pri transformácii sa DNA (zvyčajne vo forme plazmidu = vektor) zavedie do kompetentného kmeňa baktérií (kompetentné bunky), takže baktérie potom môžu replikovať požadovanú sekvenciu v množstvách vhodných na ďalšiu analýzu a manipuláciu.

## Príprava kompetentných buniek

Niektoré druhy baktérií (*Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, a iné) sú prirodzene kompetentné v niektorých častiach svojho životného cyklu, iné zasa nedisponujú touto schopnosťou, alebo ju stratili v dôsledku environmentálnych stresov. Transformačný potenciál sa však u nich môže zvýšiť pôsobením tepelného šoku alebo ošetrovaním chloridovými soľami kovových kationov (napr.  $\text{Ca}^{2+}$ ). Tieto ošetrovania menia štruktúru a priepustnosť bunkovej membrány bakteriálnej bunky, takže DNA môže ľahko prechádzať cez membrány a zabudovať sa do bunky.

Protokoly na prípravu kompetentných buniek sa líšia podľa toho, či sa má transformácia dosiahnuť tepelným šokom alebo elektroporáciou.

Kompetentné bunky sa chemicky pripravujú inkubáciou buniek v chloride vápenatom ( $\text{CaCl}_2$ ), aby sa bunková membrána stala priepustnejšou. Na ďalšie zlepšenie kompetencie môže byť  $\text{Ca}^{2+}$  doplnený alebo nahradený inými kationmi kovov (napr.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ,  $(\text{Rb}^+)$ ) alebo činidlami dimetylsulfoxid (DMSO) či ditiotritol (DTT).

Pri metóde prípravy kompetentných buniek elektroporáciou sa bunky najskôr niekoľkokrát premyjú ľadovo studenou deionizovanou vodou opakovaným resuspendovaním, aby sa odstránili soli a iné zložky, ktoré môžu interferovať s elektroporáciou. Po 3 až 4 premytiach sú bunky nakoniec suspendované v 10 % glycerole na uskladnenie.

V oboch scenároch (transformácia elektroporáciou aj tepelným šokom) sa jedna čerstvá kolónia požadovaného bakteriálneho kmeňa odoberie z agarovej platne a naočkuje sa do tekutého média pre štartovaciu kultúru. Táto štartovacia kultúra a pripravovaná kultúra sú testované na aktívny rast kontinuálnym meraním optickej hustoty pri vlnovej dĺžke 600 nm. Na dosiahnutie vysokej účinnosti

transformácie je rozhodujúce, aby bol rast buniek v čase zberu v strednej logaritmickej fáze – čo sa vo všeobecnosti vyskytuje pri OD600 medzi 0,4 a 0,9 (pričom optimálna hodnota závisí od objemu kultúry, použitého kmeňa a protokolu). Pre životaschopnosť buniek a zachovanie vysokej účinnosti transformácie sa pracuje pri teplote 0 – 4 °C.

Po príprave by sa kompetentné bunky mali vyhodnotiť z hľadiska účinnosti transformácie, rozdeliť na malé objemy (aliquóty), skladovať pri vhodnej teplote (-80 °C), aby sa zachovala ich životaschopnosť. Výsledky sú vyjadrené ako počet vytvorených kolónií (transformantov) vzniknutých z 1 µg DNA, teda CFU/µg (CFU, angl. *Colony Forming Units*, počet kolónií na mikrogram použitej plazmidovej DNA). Táto hodnota závisí od typu buniek použitých na transformáciu, donorovej DNA (čistota, kompaktnosť, veľkosť), spôsobu prípravy buniek (CaCl<sub>2</sub>, DMSO, atď.) a od niektorých iných faktorov. Optimálna účinnosť na 1 µg DNA sa pohybuje medzi  $1 \times 10^4$  až  $1 \times 10^7$  CFU/µg DNA pridanej k obsahu. Maximálna účinnosť transformácie bakteriálnych kmeňov *E. coli* dosahuje hodnoty  $10^6$  –  $10^7$  CFU/µg.

Pre konzistentnosť a úsporu času sú vopred pripravené kompetentné bunky dostupné k zakúpeniu z komerčných zdrojov.

## Ligácia DNA

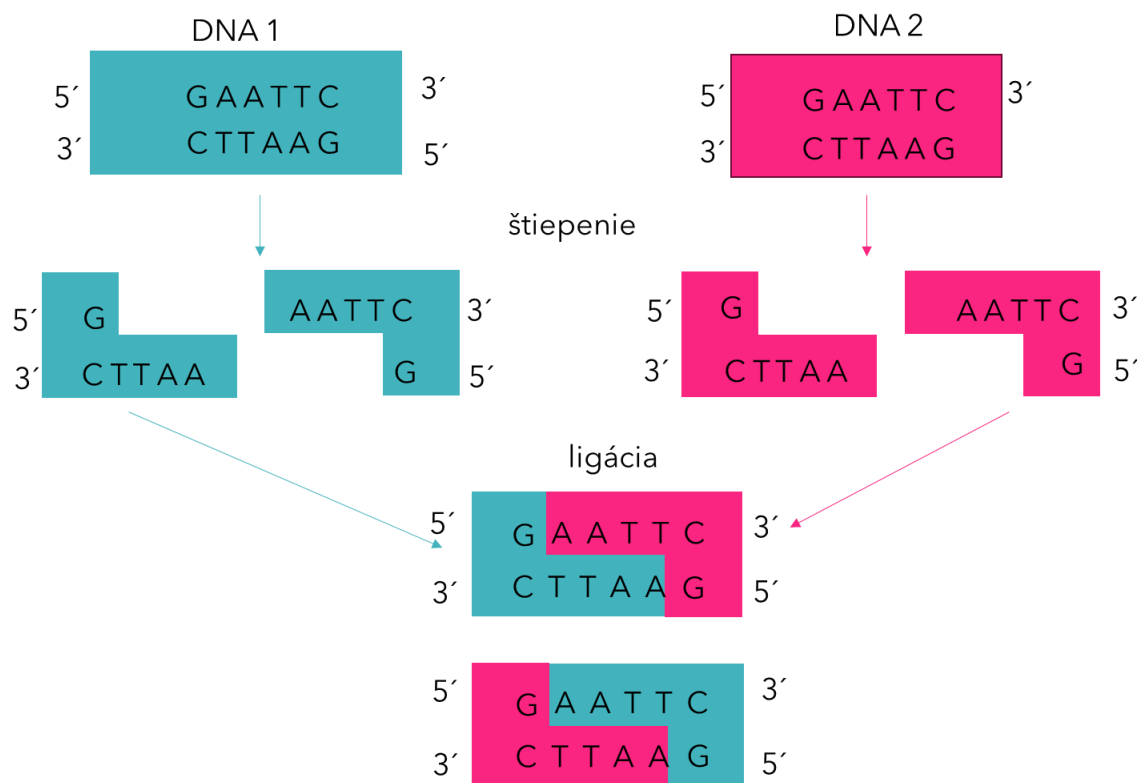
Jedným z najdôležitejších krokov v procese klonovania je ligácia lineárnej DNA do klonovacieho vektora (Obrázok 44). Táto schopnosť spájať fragmenty DNA pomocou rekombinantnej technológie je nevyhnutná pre mnohé základné experimenty v biotechnológii (expresia proteínu, mutagenéza, analýza génov a vzťahy medzi štruktúrou a funkciou génov).

Komerčne dostupné súpravy na ligáciu DNA obsahujú činidlá potrebné na zvýšenie konzistencie ligácie. Tieto súpravy obsahujú T4 DNA ligázu (izolovaná z buniek *E. coli* infikovaných bakteriofágom T4), enzým pre prakticky všetky klonovacie účely, pretože má schopnosť ligovať kohézne aj tupo zakončené vlákna DNA. Súprava tiež obsahuje tlmivý reakčný roztok s obsahom Mg<sup>2+</sup> iónov, sterilnú vodu, kofaktor ATP. Súčasťou súpravy je aj ligačná kontrolná DNA, ktorá slúži ako kontrola ligačného procesu. Optimálna teplota ligácie je 16 °C. Je možné ligovať komplementárne kohézne konce ako aj tupé konce. V druhom prípade je nutné použiť 100-násobné množstvo ligázy.

Ligácia DNA sa prakticky uskutočňuje inkubáciou fragmentu DNA (po štiepení restriktčnými endonukleázami) s vhodne linearizovaným klonovacím vektorom v tlmivom roztoku a ostatných vyššie spomenutých komponentov vrátane DNA T4 ligázy.

Pri tvorbe rekombinantných molekúl DNA je potrebné postupovať tak, aby počas ligácie vektorov s inzertovou DNA vznikalo v reakcii čo najviac rekombinantných molekúl (vektor + inzert) a čo najmenej samotných vektorov (vznikajúcich recirkuláciou lineálneho vektora). Množstvo rekombinantných molekúl v ligačnej reakcii je možné zvýšiť pomocou viacerých postupov:

1. Zvýšením koncentrácie donorovej DNA oproti koncentrácii vektora (optimálny pomer molekúl vektora a inzertu v ligácii je 1 : 3);
2. Opracovaním linearizovaného vektora alkalickou fosfatázou, čím sa odstránia fosfátové skupiny na 5' konci DNA. Pri ligovaní sú 5' fosfátové skupiny potrebné na vytvorenie kovalentnej väzby medzi dvoma molekulami DNA. Pri ligácii vektora s cudzorodou DNA sa kovalentná väzba vytvorí len na jednom vlákne, ale takáto väzba plne postačuje na transformáciu. Samotný defosforylovaný vektor však nemôže ligovať (vytvoriť kruhovú molekulu) a účinnosť transformácie lineárneho vektora je oproti kruhovej molekule nízka;
3. Štiepením vektora a klonovanej DNA dvoma restriktčnými endonukleázami s nekomplementárnymi prečnievajúcimi koncami. Vektor a inzert majú preto na každom konci unikátny vzájomne komplementárny koniec a je možné ich spojiť. Ligácia vzájomne nekomplementárnych koncov v rámci molekuly vektora však nie je možná.



**Obrázok 44** Schéma vzniku rekombinantnej molekuly DNA procesom ligácie.

## Transformácia DNA

DNA použité k transformácii musia byť vo forme nepoškodených dvojvláknových fragmentov o molekulovej hmotnosti  $0,3 - 8 \times 10^6$ .

Dve najpopulárnejšie metódy bakteriálnej transformácie sú transformácia teplotným šokom (chemická transformácia) pre chemicky pripravené kompetentné bunky a transformácia elektroporáciou elektro-kompetentných buniek. Výber transformačného prístupu závisí od požadovanej účinnosti transformácie, experimentálnych cieľov a dostupných zdrojov kompetentných buniek.

Pred začatím samotnej transformácie by sa mali kompetentné bunky rozmraziť na ľade a malo by sa s nimi zaobchádzať opatrne, aby sa zachovala ich životaschopnosť. Bunky je možné premiešať jemným pretrepávaním, poklepávaním alebo pipetovaním, ale treba sa vyhnúť miešaniu vortexom.

- Pri chemickej transformácii sa kompetentné bunky zmiešajú s plazmidovou DNA a inkubujú na ľade počas 5 až 30 min. (max. 1 hod.). Pre úspešnú chemickú transformáciu sa odporúča 50 – 100  $\mu$ l kompetentných buniek a 1 – 10 ng DNA. Ak sa ako transformujúca DNA použije ligačná zmes (často postačuje 1 – 5  $\mu$ l), čistenie pred chemickou transformáciou sa vo všeobecnosti nevyžaduje. Je dôležité poznamenať, že ligačné zmesi môžu viesť k účinnosti transformácie len 1 – 10 % v porovnaní s transformáciou s intaktnou plazmidovou DNA v superšpirále. V ďalšom kroku sa transformačná zmes (kompetentné bunky a DNA) krátko vystaví zvýšenej teplote, čo je proces známy ako teplotný šok, proces dôležitý pre otvorenie pórov bunkovej membrány kompetentných buniek pre prijatie DNA. Teplotný šok sa vykonáva pri teplote 37 – 42 °C počas 25 – 45 sek. (podľa požiadaviek pre použitý bakteriálny kmeň a DNA). Teplom šokované bunky sa potom vrátia na ľad na  $\geq 2$  min. pred ďalším krokom.
- Elektroporácia zahŕňa použitie elektroporátora na vystavenie kompetentných buniek a DNA krátkemu impulzu vysokonapäťového elektrického poľa ( $\sim 10$  kV/cm), čo indukuje sprechodnenie pórov v bunkových membránach pre vstup DNA do buniek. Elektroporácia

prebieha v špeciálnych kyvetách (1 mm) určených na takýto typ transformácie (Obrázok 45). pre každý mikroorganizmus sa určujú špecifické podmienky elektroporácie. Používaná DNA by mala byť rozpustená v nízkovodivej deionizovanej vode ( $5,6 \mu\text{S/m}$ ).

Pre úspešnú elektroporáciu baktérií *E. coli* sa odporúča 80 – 100  $\mu\text{l}$  elektrokompetentných buniek a 5 – 10 ng DNA. Nastavenie parametrov prístroja je nasledovné: elektrická kapacita je  $C = 25 \mu\text{F}$ , odpor  $R = 200 \Omega$ , napätie  $V = 2,5 \text{ kV}$ . Po elektroporácii sa k bunkám pridá kvapalné LB médium (alebo SOC) bez antibiotika a vzorka sa inkubuje 1 hod. pri teplote  $37^\circ\text{C}$  (prípadne 2 – 3 hod. pri  $30^\circ\text{C}$ ) na trepačke pri 250 rpm. Po inkubácii sa na Petriho misky s LBA a príslušným antibiotikom a vyseje pripravená zmes a platne sa inkubujú v termostate cez noc pri teplote  $37^\circ\text{C}$ , prípadne počas 24 hod. pri teplote  $30^\circ\text{C}$ .

Pre kvasinky *P. pastoris* je postup podobný ako pri baktériách s menšími obmenami, hlavne pri nastavení parametrov elektroporačného zariadenia, ktoré sú nasledovné: elektrická kapacita  $C = 25 \mu\text{F}$ , odpor  $R = 600 \Omega$ , napätie  $V = 2,0 \text{ kV}$ . Plazmidová DNA kvasiniek sa po linearizácii a prečistení (postup v časti „Nukleové kyseliny“) pridá k elektrokompetentným bunkám v množstve 5 – 10  $\mu\text{g}$ . Po elektroporácii sa k bunkám pridá 500  $\mu\text{l}$  1 M sorbitolu a bunky sa nechajú kultivovať počas 1,5 hod. pri  $28^\circ\text{C}$  na trepačke pri 250 rpm. Následne sa zmes vyseje na Petriho misky s tuhým YPD médiom a obsahom antibiotika (zeocínu 0,1 mg/ml) a misky sa nechajú inkubovať v termostate pri  $28^\circ\text{C}$  počas 3 – 5 dní.

Pred elektroporáciou je vhodné dať si vychladiť (vymraziť) elektroporačnú doštičku a elektroporačné kyvety do ľadu alebo mrazničky na  $-20^\circ\text{C}$ . Pri elektroporácii je potrebné sledovať a zapisovať konštantný čas (časovú konštantu, ktorá závisí od celkovej vodivosti vzorky). Ideálne hodnoty sú pre *E. coli* 4 – 5 msek a pre *P. pastoris* 4 – 6 msek.



**Obrázok 45** Elektroporačné kyvety.

## Obnova transformovaných buniek

Po teplotnom šoku alebo elektroporácii sa transformované bunky krátkodobo kultivujú v tekutom médiu bez antibiotík, aby sa umožnila expresia génu(ov) antibiotickej rezistencie zo získaného plazmidu. V tejto fáze dochádza k zlepšeniu životaschopnosti a pomnoženiu bakteriálnych buniek a zároveň sa zvyšuje účinnosť klonovania.

V prípade elektroporovaných buniek sa odporúča pestovanie buniek čo najskôr, pretože elektroporačné roztoky nie sú dizajnované na dlhodobé prežitie buniek. V kroku obnovy sa transformované bunky kultivujú v max. 1 ml predhriateho kultivačného média (LB médium, SOC a iné) pri teplote  $37^\circ\text{C}$ . Kultivačné médium SOC s obsahom glukózy a  $\text{MgCl}_2$  sa odporúča pre maximalizáciu účinnosti transformácie, pričom môže zvýšiť tvorbu transformovaných kolónií 2- až 3-násobne v porovnaní s LB médiom.

## Identifikácia transformantov a selekcia rekombinantov

Po vytvorení rekombinantných molekúl a ich transformácii od donora do hostiteľských buniek (recipient, napr. *E. coli*) je potrebné identifikovať klony obsahujúce správne molekuly DNA. Proces selekcie transformantov využíva to, že v hostiteľskej bunke sa replikujú a zároveň exprimujú nielen gén/y záujmu (inzert/y), ale zároveň aj gény pre rezistenciu na antibiotikum. Z tohto dôvodu sa transformované bunky najčastejšie selektujú (selekcia transformantov od netransformantov) na rastových pôdach (pevných médiách) s pridaním antibiotika, prípadne kombináciou antibiotík (výber antibiotika závisí od toho, aké gény rezistencie plazmid nesie). Najbežnejšie sa uskutočňuje selekčný tlak pridaním antibiotík: ampicilín, kanamycín, streptomycín, a pod.. Identifikácia klonov s plazmidovou DNA je zabezpečená tak, že na médiách obsahujúcich príslušné antibiotikum vyrastú len tie baktérie, ktoré obsahujú plazmid kódujúci gén rezistencie voči tomuto antibiotiku.

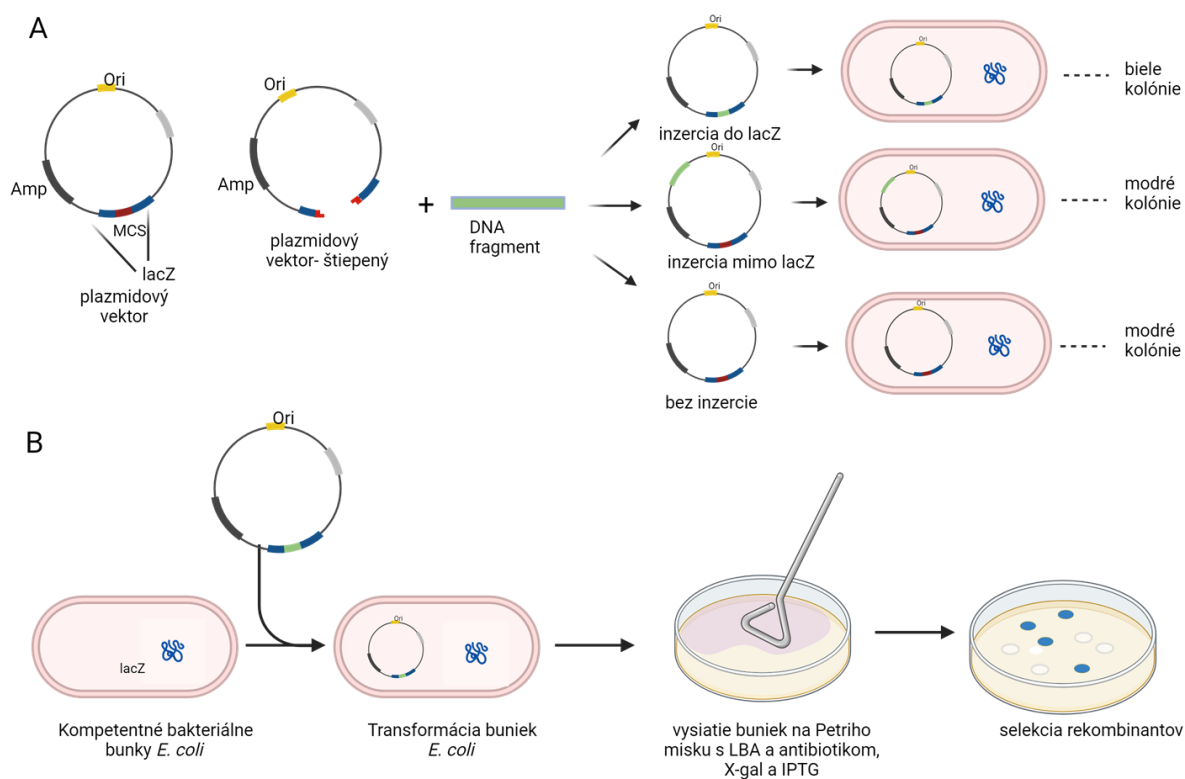
Ďalším krokom pri práci s rekombinantnou DNA je odlíšenie klonov obsahujúcich rekombinanty (plazmid zložený z vektora a inzertovanej cudzorodej DNA) od kolónií s pôvodným vektorom. Na selekciu rekombinantov sa používajú fenotypové metódy, ktoré umožňujú vizuálne odlíšiť tieto dva typy transformantov. Selekcia rekombinantov môže byť negatívna, pozitívna, neutrálna.

Oblíbenou vizualizačno-identifikačnou metódou je tzv. modro-biely skrining, ktorý využíva enzymatickú aktivitu enzýmu  $\beta$ -galaktozidázy (Obrázok 46). Na selektívne agarové médium sa pridávajú roztoky dvoch chemických látok IPTG a X-gal. IPTG (izopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosid) je syntetický derivát laktózy, ktorý je, podobne ako laktóza, induktorom exprese  $\beta$ -galaktozidázy. Na rozdiel od laktózy ho však bunka nevie metabolizovať na glukózu, čo spôsobí permanentnú expresiu  $\beta$ -galaktozidázy (keby sa použil ako induktor laktóza, časom dôjde ku katabolickej represii). X-Gal je zase iná syntetická zlúčenina (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranosid), ktorá sa účinkom  $\beta$ -galaktozidázy rozkladá na produkt farbiaci kolóniu do modra. Z uvedeného vyplýva, že bunky obsahujúce tvz. prázdny plazmid exprimujú funkčnú  $\beta$ -galaktozidázu a budú tvoriť na miskách s médiom obsahujúcim IPTG a X-Gal modré kolónie, zatiaľ čo bunky obsahujúce rekombinantný vektor s inzertom s prerušeným čítacím rámcom lacZ budú tvoriť biele kolónie, ktoré nás zaujímajú.

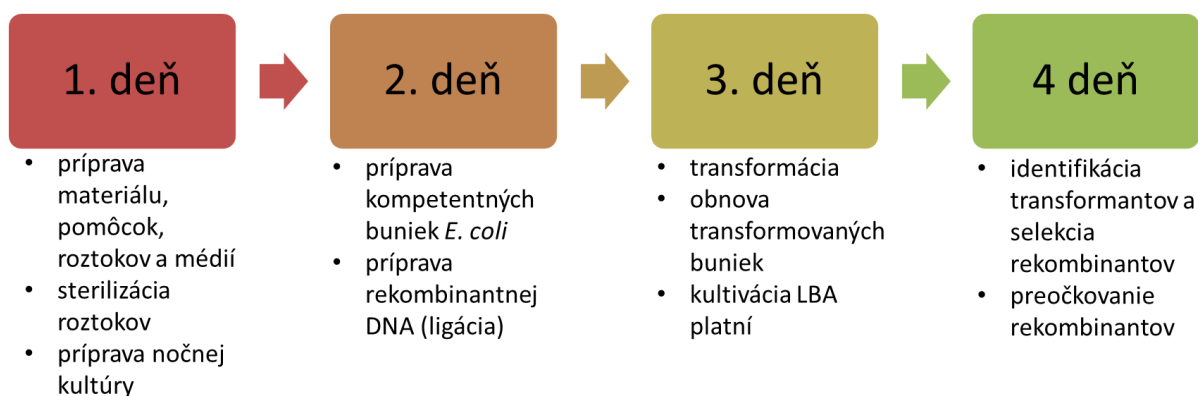
Z praktického hľadiska sa bunky po namnožení v tekutom médiu naniesú na tuhé LB médium s obsahom agaru (LBA) s vhodným antibiotikom/antibiotikami alebo inými činidlami na identifikáciu a získanie úspešných transformantov. V prípade modro-bieleho skriningu do agarovej platne pridávame aj X-Gal a IPTG.

Pred nanesením buniek (bunkovej suspenzie) by sa platne mali predhriať na priaznivú rastovú teplotu (37 °C pre *E. coli*) a mali by byť bez kondenzácie, aby sa zabránilo kontaminácii a vzniku zmiešaných kolónií. Bunkovú suspenziu nanášame priamo na stred platne s tuhým médiom a pomocou sterilnej hokejky rozortujeme po povrchu média. Petriho misky uzavrieme, utesníme parafilmom (pre elimináciu vniku kontaminantov) a pri optimálnej teplote pre príslušné baktérie (37 °C pre *E. coli*) staticky kultivujeme v inkubátore alebo termostate cez noc.

Po selekcii klonov s prítomnou rekombinantnou DNA od prázdnych vektorov, je ďalším krokom výber rekombinantov so správnym inzertom. V závislosti od cieľa experimentu je možné vybrať si vhodný prístup k analýze klonov z metód restriktívnej analýzy, sekvenovania, hybridizácie DNA sondami so známou sekvenciou, detekcie fenotypových znakov alebo imunochemických metód detekcie prítomnosti klonovaných proteínov.



**Obrázok 46** A – princíp inzerie cudzorodej DNA (inzertu) v procese transformácie bakteriálnej bunky *E. coli*, B – schématický postup pri prevedení modro-bielej selekcie rekombinantov.



**Obrázok 47** Znázornenie časovej návaznosti metodík pre proces klonovania.

**Úloha: Príprava kompetentných buniek *E. coli* pre transformáciu teplotným šokom**

**Materiál:** .....

**Pomôcky:** .....

**Prístroje:** .....



.....

**Chemikálie:**

- 1 M CaCl<sub>2</sub> (zásobný roztok filtrovať)
- 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (pracovný roztok)
- 0,1 M CaCl<sub>2</sub> a 15 % glycerol (pracovný roztok)

**Pracovný postup:**

1. nočnú kultúru si pripravíme inokulovaním 100 µl bakteriálnej glycerolovej konzervy do 5 ml tekutého LB média alebo odpichnutím jednej kolónie z pevného LBA média v Petriho miske pomocou sterilného špáradla, ktoré umiestnime do tekutého LB média (5 ml)
2. inokulum necháme rozrásť v rotačnom inkubátore pri 200 rpm a teplote 37 °C cez noc (12 – 16 hod.), vznikne nám tzv. nočná kultúra
3. 1 ml z nočnej kultúry preniesieme do Erlenmayerovej banky s obsahom 50 ml LB média a opäť inkubujeme pri 200 rpm a teplote 37 °C
4. bunky *E. coli* necháme rozrásť pri OD600 v rozmedzí 0,4 – 0,6, počas približne 2 hod.
5. preniesieme Erlenmayerovú banku do ľadu a ochladíme počas 10 min.
6. v 50 ml centrifugačnej skúmavke odtredíme 40 ml ochladenej kultúry pri 4 000 rpm, teplote 4 °C počas 10 min.
7. odstránime supernatant a bunky jemne rozsuspendujeme v 20 ml ľadovo vychladeného roztoku 0,1 M CaCl<sub>2</sub>
8. vzorku centrifugujeme pri 4000 rpm, teplote 4 °C počas 10 min.
9. odstránime supernatant a bunky necháme inkubovať počas 2 hod. na ľade
10. bunky rozsuspendujeme v 5 ml ľadovo vychladeného roztoku 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s 15 % glycerolom, dôkladne premiešame a rozdelíme na alikvóty (100 µl)
11. kompetentné bunky môžeme použiť priamo na transformáciu alebo uskladniť pri -80 °C

**Poznámky:**.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Úloha: Príprava rekombinantnej DNA pomocou T4 DNA ligázy pomocou komerčne dostupnej súpravy.....**

**Materiál:** .....

**Pomôcky:** .....

**Prístroje:** .....

**Chemikálie:** .....

**Pracovný postup:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**Tabuľka 21** Ligačná zmes.

Ligačná zmes	
Zložka	Objem
ligačný tlmivý roztok	..... µl
restrikčný enzým .....	..... µl
DNA inzert	..... µl
linearizovaný vektor (DNA)	..... µl
sterilná dH <sub>2</sub> O	..... µl
celkový objem	..... µl

**Poznámky:**.....

.....

.....

.....

.....

**Úloha: Transformácia kompetentných buniek *E. coli* plazmidovou DNA .....****Materiál:** .....**Pomôcky:** .....**Prístroje:** .....**Chemikálie:** .....

## Pracovný postup:

### Príprava médií a LBA platní

1. po príprave tekutého LB média s upraveným pH (7,0), z jeho časti pripravíme LBA médium pridaním agaru
2. LB aj LBA média rozlejeme nasledovne:  
po 20 ml LB do Erlemayerových baniek  
po 100 ml LBA bez antibiotika do reagenčných fliaš
3. kultivačné média sterilizujeme autoklávaním (po vychladnutí uchováваме v chladničke)
4. pred samotnou prácou v mikrovlnke alebo vo vodnom kúpeli rozvaríme 100 ml pevného média LBA vo fľaši s pootvoreným vrchnákom, kým sa nerozpustí agar, médium necháme otvorené vychladnúť na ~ 50 °C v laminárnom boxe/Biohazarde
5. do 100 ml vychladnutého (nie stuhnutého) LBA média pridáme príslušné antibiotikum/kombináciu antibiotík.....
6. pre selekciu transformantov, v prípadne modro-bielej selekcii pridáme aj 100 µM IPTG a 40 mg/ml X-Gal
7. zmes dôkladne premiešame a rovnomerne rozlejeme do štyroch Petriho misiek
8. v pootvorených Petriho miskách necháme tuhnúť LBA
9. pred transformáciou si do boxu pripravíme sterilné hokejky, očka, špáradlá a iné pomôcky a z chladničky si vyberieme tekuté LB médium, ktoré necháme temperovať na laboratórnu teplotu

### Transformácia kompetentných buniek:

1. mikroskúmavku (aliquót) s obsahom 100 µl kompetentných buniek (*E. coli*) vytiahneme z hlbokomraziaceho boxu (-80 °C) a uchováваме na ľade pre pomalé rozmrazenie!!! Pracujeme v laminárnom boxe/Biohazarde
2. ku 100 µl kompetentných buniek pridáme 0,5 – 1 µl plazmidovej DNA ....., jemne špičkou premiešame a transformačnú zmes uložíme na ľad podobu max. 60 min.
3. mikroskúmavku s transformačnou zmesou vložíme do vodného alebo suchého kúpeľa (inkubátor) a inkubujeme pri teplote 42 °C počas 40 sek. = „teplotný šok“
4. transformačnú zmes následne opäť premiestnime do ľadovej drte a inkubujeme 2 min.

Poznámky:.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## Úloha: Obnova transformovaných buniek *E. coli*

Materiál: .....  
.....

Pomôcky: .....  
.....

Prístroje: .....  
.....

Chemikálie: .....

.....

**Pracovný postup:**

1. k transformačnej zmesi pridáme 900 µl kvapalného LB média, dôkladne premiešame
2. vzorku inkubujeme pri teplote 37 °C počas 1 hod. (bunky *E. coli* necháme rozrásť) v termostate spolu s Petriho miskami s rozliatym LBA s príslušnými antibiotikami (je vhodné keď transformačná zmes a LBA platne budú mať rovnakú teplotu)
3. po namnožení buniek nanesieme transformačnú zmes na Petriho misky s pevným LBA médiom s príslušným antibiotikom/kombináciou antibiotík v rôznych objemoch 25 µl, 50 µl, 150 µl a 250 µl
4. zmes v učennom objeme opatrne rozotrieme po povrchu LBA média pomocou sterilnej hokejky
5. Petriho misky s popísanými informáciami (dátum, hostiteľský kmeň, plazmidová DNA) uzavrieme, utesníme parafilmom
6. platne kultivujeme v prevrátenej polohe cez noc pri teplote 37 °C

**Poznámky:**.....  
.....  
.....  
.....**Úloha: Identifikácia transformantov a selekcia rekombinantov****Materiál:** .....  
.....**Pomôcky:** .....  
.....**Prístroje:** .....  
.....**Chemikálie:** .....  
.....**Pracovný postup:**

1. nasledujúci deň vyberieme misky z termostatu a vyhodnotíme úspešnosť transformácie
2. zvýrazníme si tie kolónie buniek (kolónie transformantov), ktoré chceme naočkovať do tekutého LB média (pre namnoženie a ďalšiu izoláciu plazmidovej DNA)
3. vopred si vytiahneme z chladničky 20 ml kvapalného LB média do sterilného boxu, po prirodzenom ohriatí pridáme príslušné antibiotikum ..... a zmes dôkladne premiešame
4. zmes rozpipetujeme po 4 ml do viacerých sterilných sklenených skúmaviek
5. sterilným špáradlom otrieme vybranú kolóniu transformantov a vhodíme do LB média v skúmavke
6. vzorku inkubujeme na trepačke s termostatom pri 140 rpm a teplote 37 °C cez noc, takto vytvoríme čerstvú „nočnú kultúru“

**Poznámky:**.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Otázky:**

1. *Definujte pojem vektor.*
2. *Vymenujte najdôležitejšie časti vektora.*
3. *Čo pomenúva pojem inzert?*
4. *Aký má význam gén selekcie pre antibiotikum, ktorý nesie plazmid v technikách klonovania DNA?*
5. *Aká je vhodná veľkosť vektora pre klonovanie DNA?*
6. *Vymenujte kroky procesu klonovania DNA.*
7. *Popíšte čo sú to kompetentné bunky a akými spôsobmi je možné ich pripraviť.*
8. *Definujte pojem transformácia.*
9. *V čom sa vyjadruje účinnosť transformácie a aká je jej optimálna hodnota?*
10. *Čo sa deje pri teplotnom šoku počas transformácie?*
11. *Aké poznáte metódy transformácie kompetentných buniek?*
12. *Popíšte princíp chemickej transformácie.*
13. *Aký má význam fáza obnovy transformovaných buniek . Čo sa deje v tomto kroku?*
14. *Akým spôsobom sa selektujú transformanty od netransformantov na LBA médiu?*
15. *Akou metódou je možné jednoducho odlíšiť rekombinantov of transformovaných buniek, ktoré neprijali cieľovú DNA?*
16. *Popíšte princíp selekcie rekombinantov po pridání IPTG a X-Gal.*

## LABORATÓRNY PROTOKOL (pokyny)

elektronický protokol vypracováva každý študent samostatne a odovzdá ho na e-mailovú adresu vyučujúceho .....@..... podľa templátu (viď nižšie). Protokol má byť stručný, vecný odborný a prehľadný s významným dôrazom na výsledky práce a diskusiu.

Názov (Times New Roman, 14, tučné), text (Times New Roman, 12, riadkovanie 1,5)

Laboratórny protokol obsahuje nasledovné časti:

- **Titulná strana:** podľa vzoru (na konci dokumentu)
- **Názov laboratórneho cvičenia:** výstižný názov daného cvičenia
- **Cieľ práce:** jednotlivých cvičení/metodík je definícia toho čo študent pomocou danej metodiky chce dosiahnuť/zistiť
- **Metodika:** študent popíše (autorský plurál, teda minulý čas v množnom čísle) postup jednotlivých krokov, ktoré presne (vrátane odchýlok a modifikácii od pracovného návodu) vykonával v laboratóriu na dosiahnutie stanoveného cieľa. Metodika je členená na časti - použitý materiál (biologický materiál, plasty, sklo a pod.) → pomôcky → prístroje → chemikálie/roztoky → výpočty → pracovný postup.
- **Výsledky:** študent popíše slovne dosiahnuté výsledky vlastnej práce spolu s odkazmi na použité (vlastné) obrázky, grafy, tabuľky.  
Grafy a obrázky (zarovnanie na stred, názov a popis sa uvádza pod grafom/obrázkom, zarovnanie na stred, písmo Times New Roman, veľkosť 12).



**Obrázok 1.** Kolónie transformovaných buniek *Escherichia coli* na pevnom LBA médiu po 24 kultivácii pri teplote 37 °C.

Tabuľka (zarovnanie na stred, názov a popis sa uvádza nad tabuľkou, zarovnanie na stred, písmo Times New Roman, veľkosť 12).

**Tabuľka 4.** Teplotný režim pre PCR reakciu detekcie referenčného génu  $\beta$ -tubulín v jačmeni.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	3 min	1
1. Denaturácia	95 °C	30 s	30
2. Hybridizácia	58 °C	30 s	
3. Polymerizácia	72 °C	45 min	
Ukončenie	72 °C	10 min	1

- **Diskusia:** študent zhodnotí dosiahnuté výsledky a vysvetlí čo z uvedených výsledkov vyplýva. Do diskusie študent zahrnie konfrontáciu očakávaných a reálnych výsledkov práce (odôvodní z akých príčin (vlastné chyby pri práci, prístrojové poruchy a pod.) neboli dosiahnuté očakávané výsledky).
- **Záver:** študent stručne zhrnie význam výsledkov a odpovie na naplnenie stanovených cieľo

**Univerzita Sv. Cyrila a Metoda v Trnave**

**Fakulta prírodných vied**

**Ústav biológie a biotechnológie**

**Oddelenie biológie**



## **NÁZOV PROTOKOLU**

**Predmet**

**Vypracoval/a:**

Študijný program:

Ročník:

Semester:

Akademický rok:

Dátum vypracovania:

## Použitá literatúra

- Ableitner O (2017) Introduction to molecular biology: Working with DNA and RNA (Essentials). Springer. ISBN-13: 987-3-65-833919-7.
- Allison LA (2007) Fundamental Molecular Biology. Blackwell Publishing Ltd. 748 s.
- Barsanti L, Gualtieri P (2006) Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Taylor & Francis, New York.
- Bekesiova I, Nap J-P, Mlynarova L (1999) Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. Plant Molecular Biology Reporter. 17: 269-277.
- Brody JR, Scott EK (2004) History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Analytical Biochemistry 33 [online]. Roč. 33, č. 1, s. 1-13 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1016/j.ab.2004.05.054. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269704004932>
- Buzás Z, Dallmann K, Szajáni B (1988) Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biotechnology and Bioengineering 34: 882-884.
- Connelly A (2017) Practical pipetting: a guide. Laboratory Techniques, Science.
- Cramer M and Mayers J (1952) Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis* medium. Archiv für Mikrobiologie. 17: 384-402.
- Current Protocols in Cell Biology (1998) A.2C.1-A.2C.2 Copyright © 1998 by John Wiley & Sons, Inc.
- Darley WM (1982) Algal biology: a physical approach Blackwell Scientific Publications, London.
- d'Hérelle F (1917) An invisible antagonist microbe of dysentery bacillus. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences. 165: 373-375.
- Drahovska H (2020) Základné cvičenia z molekulárnej biológie. Univerzita Komenského v Bratislave, s. 74. ISBN 978-80-223-4997-0.
- Dulbecco R (1952) Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 38:747-752.
- Fontes AG, Angeles Vargas M, Moreno J, Guerrero MG, Losada M (1987) Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture Biomass, 13: 33-43.
- Hutner SH, Zahalsky AC, Aaronson S, Baker H, Frank O (1966) Culture media for *Euglena gracilis*. In: Prescott DM (ed) Methods in cell physiology, vol 2. Academic Press, New York London, pp. 217-228.
- Cho SW, Yim J, Seo SW (2020) Engineering Tools for the Development of Recombinant Lactic Acid Bacteria. Biotechnology Journal. 15: e1900344.
- Löoke M (2011) Extraction of genomic dna from yeasts for pcr-based applications. Extraction of genomic dna from yeasts for pcr-based applications [online]. s. - [cit. 2013-04-22]. DOI 10.2144/000113672
- Masoodi KZ, Lone SM, Rasool RS (2021) Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology: A Practical Lab Manual, Academic Press, Elsevier, ISBN: 978-0-12-824449-4
- Mullis KB (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American. 262: 56-65. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Murashige T and Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Plant Physiology. 15: 473-497.
- Nora LC, Westmann CA, Martins-Santana L, de Fátima Alves L, Monteiro LMO, Guazzaroni M.E.; Silva-Rocha R (2019) The Art of Vector Engineering: Towards the Construction of Next-generation Genetic Tools. Microbial Biotechnology. 12: 125.
- Payne S (2017). Viruses: From Understanding to Investigation. Academic Press. pp. 338.
- Prakriti K (2022) Pipette- principle, parts, types, procedure, uses, example. Microbe Notes.
- Robert JS, Baylis F (2008) Genetic Engineering. International Encyclopedia of Public Health.
- Sandmeier H, Meyer J (1993) Bacteriophages. In: Rehm HJ (Eds.) Biotechnology. vol. 1.: Biological fundamentals. Weinheim, VCH, 544-575.
- Segeritz C-P, Vallier L (2017) Cell culture: Growing cells as model system *in vitro*. Basic Science Methods for Clinical Researchers. 2017: 151-172.
- Sherman F (2002) Getting started with yeast. Methods in Enzymology. 350: 3-41.



- Sherman F (2002) Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*. 350: 3-41.
- Staub R (1961) Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an *Oscillatoria rubescens* D. C. – Schweiz. Z. Hydrol. 23: 82-198.
- Steiner RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*. 35: 171-205.
- Supelco (1998) Bulletin 910: Guide to Solid Phase Extraction. Dostupné na: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- Thajuddin N, Subramanian G. (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*. 89: 47-57.
- Tuite AJPM, Brown AJP (1999) Yeast gene analysis. San Diego: Academic. ISBN 978-012-1366-551.
- Twort F (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*. 18: 1241-1243.
- Vnútorný predpis FPV UCM - 01\_2022 - Smernica o práci v laboratóriách FPV UCM
- Walker GM. (2009) Yeasts. In: Schaechter M. (Eds.), *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press: Londýn. 478-491.
- Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 57: 383-401.
- Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 57: 383-401.
- Yang JL, Yang R, Cheng AC, Jia RY, Wang MS, Zhang SH (2010) Five-minute purification of PCR products by new-freeze-squeeze method. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 8:32-33.
- [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2014/Bi5710c/um/um/51374257/Stanoveni\\_titru\\_faga.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2014/Bi5710c/um/um/51374257/Stanoveni_titru_faga.pdf)
- [Syntéza cDNA - LabGuide.cz](#)
- [Home Farming Boxes : mini-farm grow box \(trendhunter.com\)](#)
- [Seeds Germinating In A Plate Of Gel Ms With Antibiotics Petri Dish With Arabidopsis Mutant Seedlings Spain High-Res Stock Photo - Getty Images](#)

# **ZÁKLADNÉ LABORATÓRNE CVIČENIA Z MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE**

(vysokoškolský učebný text)

## **Autori:**

RNDr. Zuzana Gerši, PhD. (5AH)

RNDr. Lucia Bocánová, PhD. (3AH)

Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD. (3AH)

## **Recenzenti:**

doc. RNDr. Soňa Kucharíková, PhD.

Mgr. Vladena Bauerová – Hlinková, PhD.

**Návrh obálky:** RNDr. Zuzana Gerši, PhD.

**Vydavateľ:** Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2023

**Vydanie:** prvé

**Rozsah:** 114 strán (11 AH)

**ISBN 978-80-572-0403-9**

online: [https://www.ucm.sk/download/Zakladne\\_labor\\_cv\\_z\\_molek\\_biologie.pdf?s=NTk6NjVmNjBkZTk6ZDoxOjc1NDBlMyAg](https://www.ucm.sk/download/Zakladne_labor_cv_z_molek_biologie.pdf?s=NTk6NjVmNjBkZTk6ZDoxOjc1NDBlMyAg)