

## ĆWICZENIA „BIOANALITYKA” -Sylabus

Przedmiotem ćwiczeń będzie przedstawienie zarówno podstawowych, jak i zaawansowanych technik analitycznych, stosowanych do ilościowego i jakościowego oznaczania materiału biologicznego.

Plan ćwiczeń :

Część pierwsza:

- Zakładanie pierwotnych hodowli glejowych z mózgów szczurów neonatalnych
- Prowadzenie hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej
- Izolacja poszczególnych frakcji komórkowych przy zastosowaniu technik sortowania magnetycznego (magnetic MicroBeads)
- Uzyskiwanie lizatów komórkowych do oznaczeń biochemicznych
- Oznaczanie i pomiar białka w próbkach (metoda Bradford, Lowry)
- Oznaczanie wybranych białek w lizatach komórkowych ultraczułymi metodami biochemicznymi (ELISA, Luminex)

Część druga: Oznaczanie ilości mitochondrialnego DNA w komórkach

Ćwiczenie pokazuje metodę oznaczenia proporcji pomiędzy mitochondrialnym a jądrowym DNA, co może być wyznacznikiem jakości/ilości mitochondriów i mtDNA w komórce. Badania tego typu wskazują zmiany w ilości mtDNA np. w chorobach mitochondrialnych, w neuropatiach z podejrzeniem zaangażowania mitochondriów, do monitorowania skutków długotrwałej terapii lekami genotoksycznymi (np. AZT) lub antybiotykami (np. ciprofloksacyna). DNA może być izolowane z każdego typu materiału biologicznego. W czasie ćwiczenia izolowane będzie całkowite DNA z komórek ustalonej linii komórkowej, oznaczone zostanie stężenie i czystość otrzymanego preparatu, pomiar ilości DNA i mtDNA metodą real time PCR oraz analiza wyników. Uczestnicy zostaną zapoznani z zasadą reakcji przy użyciu różnych sond do reakcji PCR oraz możliwościami wykorzystania tej technologii do badania mutacji DNA, ekspresji genów, modyfikacji epigenetycznych oraz epitranskryptomycznych.

Etapy ćwiczenia

1. Hodowla komórek szczura (hodowla pierwotna oraz linia ustalona) oraz komórek mysich embrionalnych fibroblastów (MEF - linia dzika oraz MEF pozbawionych mitofuzyny 1 i 2)
2. Izolacja/oczyszczenie całkowitego DNA z komórek za pomocą E.Z.N.A. MicroElute Genomic DNA Kit (Omega Bio-tek).
3. Oznaczenie stężenia i czystości DNA w aparacie DeNovix DS-11 FX
4. Przygotowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym z sondami typu TaqMan oraz SYBR green
5. Reakcje PCR w aparacie Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies)
6. Analiza wyników

W przygotowanym filmie pokazane są etapy od izolacji DNA aż po analizę wyników. Działania te mogą być zastosowane do badania DNA izolowanego z różnego materiału: tkanek zwierzęcych świeżych i mrożonych, komórek pierwotnych i linii komórkowych zwierzęcych i ludzkich hodowanych in vitro, komórek izolowanych z płynów ustrojowych.