

Zajęcia są prowadzone przez pracowników Laboratorium PPNT Gdynia w budynku 1 D w dniach 16-17 listopada 2016 w godzinach od 9 do 14. Przed rozpoczęciem zajęć praktycznych odbywa się krótkie wprowadzenie teoretyczne.

## **TEMAT I**

### **Izolacja DNA oraz podstawy diagnostyki molekularnej**

- a) Opis izolacji DNA-cechy metody
- b) Zasada działania elektroforezy żelowej
- c) Wizualizacja DNA
- d) Analiza jakościowa i ilościowa materiału genetycznego
- e) Zasada działania reakcji PCR-skład mieszaniny
- f) Zasady projektowania starterów do reakcji PCR
- g) Diagnostyka molekularna z wykorzystaniem analizy restrykcyjnej. Mechanizm działania enzymów restrykcyjnych.

#### **1. Izolacja DNA z materiału pochodzącego od organizmów Procaryota i Eucaryota:**

- bakterie (DNA genomowe, plazmidowe),
- rośliny (DNA genomowe),
- człowiek—wymaz ze śluzówki (DNA genomowe).

Podczas zajęć uczniowie wykonują własnoręcznie pobór próby (wymaz) do izolacji DNA genomowego człowieka, bądź z przygotowanej hodowli bakterii lub z materiału roślinnego.

Izolacja DNA przeprowadzana jest przy użyciu tzw. zestawu do izolacji DNA firmy A&A Biotechnology. Każdy z uczniów będzie miał do dyspozycji gotowy zestaw oraz inne niezbędne materiały niezbędne do izolacji DNA.

Wizualizacja DNA (próby DNA przygotowane przez uczniów) za pomocą elektroforezy wysokonapięciowej prowadzonej w żelu agarozowym. Uczniowie wykonują żel agarozowy, a następnie przygotowane przez siebie próby DNA nanoszą na żel.

W drugiej części zajęć uczniowie poznają przykład zastosowania diagnostyki molekularnej opartej na analizie DNA. Uczestnicy przeprowadzają reakcję PCR oraz wykonują analizę restrykcyjną a następnie przeanalizują materiał genetyczny pod kątem wybranego polimorfizmu.

Po zakończeniu rozdziału uczniowie oglądają rozdzielanie elektroforetyczne DNA w żelu i dokumentują efekty swojej pracy.

## **TEMAT II**

### **Roślinne kultury *in vitro***

- a) Na czym polega i do czego służy sterylizacja materiału roślinnego
- b) Warunki zakładania hodowli roślinnych *in vitro*
- c) Skład i rodzaje pożywek hodowlanych
- d) TLC podstawy metody i jej zastosowanie

### **Zakładanie kultury tkankowej i powielanie materiału roślinnego (mikropropagacja) w warunkach *in vitro*.**

Przed wprowadzeniem materiału roślinnego do hodowli *in vitro* uczniowie wykonują sterylizację tkanek roślin: nasion bądź fragmentów tkanek roślin (eksplantatów) a następnie przygotowują pożywkę. Rośliny rosną w hodowli *in vitro* na odpowiedniej, zestalonej np. agarze pożywce, zawierającej niezbędne sole mineralne, witaminy, hormony roślinne, cukier oraz wodę.

Uczniowie wykonują również pasaż roślin w jałowych warunkach, aby nie zanieczyścić hodowli. W tym celu wszelkie prace prowadzone są w komorze z laminarnym przepływem powietrza, zaopatrzonej w odpowiednie filtry zabezpieczające przed mikroorganizmami. Dodatkowo uczniowie wykonują sztuczne nasiona, w tym celu fragmenty roślin zdolne do namnażania zostają zamknięte w alginianie wapnia.

### **2. Badanie zawartości barwników roślinnych na przykładzie chlorofilu oraz rozdzielanie barwników przy użyciu metody TLC (chromatografia cienkowarstwowa)**

Celem ćwiczenia jest izolacja chlorofilu z roślin oraz potwierdzenie przydatności chromatografii cienkowarstwowej do rozdziału i identyfikacji barwników obecnych w roślinach. Uczniowie dokonują izolacji barwników z materiału roślinnego a następnie przeprowadzają chromatografię cienkowarstwową.