



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

**Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00**

Przedmiot: **Mikrobiologia**

Forma zajęć: **ćwiczenia**

**Ćwiczenia 6 i 7**

**Molekularne (PCR) metody identyfikacji i różnicowania gatunkowego mikroorganizmów**

## **Wprowadzenie**

Metody oparte na analizie kwasów nukleinowych należą obecnie do powszechnie stosowanych narzędzi umożliwiających szybką i precyzyjną detekcję oraz identyfikację grzybów chorobotwórczych dla człowieka. Dotyczy to zarówno grzybów drożdżopodobnych, jak i strzępkowych powodujących grzybicę czy alergię. Duży problem stanowią grzyby powodujące zakażenia w przypadku pacjentów po przeszczepach narządów, przyjmujących leki immunosupresyjne. Leczenie immunosupresyjne predysponuje do rozwoju infekcji grzybiczych, które są przyczyną nie tylko niepowodzeń transplantacyjnych, lecz także zgonów wśród biorców przeszczepów. Nietypowy obraz kliniczny wywołany immunosupresją utrudnia rozpoznanie grzybic. Dlatego tak ważne są metody pozwalające na precyzyjną diagnostykę. Umożliwiają to badania oparte na technice PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Celem ćwiczeń jest poznanie możliwości identyfikacji grzybów z zastosowaniem techniki PCR na przykładzie izolatów rodzaju *Fusarium* mogących stanowić zagrożenie dla człowieka w przypadku obniżonej odporności organizmu.

## **Aparatura i wyposażenie**

Homogenizator do rozdrobnienia materiału biologicznego, pipety automatyczne, wirówka laboratoryjna, wirówko-worteks, worteks, fluorymetr Quantus (Promega), termocykler (Eppendorf), zestaw do elektroforezy (kuweta, transiluminator, zestaw do archiwizacji danych), jednorazowe materiały laboratoryjne, odzież ochronna.



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

### Ćwiczenie 3

#### 1. Zasady BHP w pracowni molekularnej

Zaznajomienie studentów z aparaturą, odczynnikami oraz zasadami pracy metodami opartymi na DNA.

#### 2. Izolacja DNA z próbek zawierających grzyby potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka

Przeprowadzić ekstrakcję DNA przy użyciu zestawu komercyjnego właściwego dla tego typu materiału. Po rozdrobnieniu przygotowanych próbek w homogenizatorze, postępować zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

Dokonać fluorymetrycznego pomiaru ilości uzyskanego DNA. Odpowiednią ilość  $\mu\text{L}$  DNA zmieszać z barwnikiem zawieszonym w buforze w probówce o pojemności 0,5 mL, inkubować 5 min. w ciemności, umieścić w urządzeniu Quantus i na wyświetlaczu odczytać wynik pomiaru. W razie potrzeby część DNA rozcieńczyć w ddH<sub>2</sub>O do stężenia roboczego, czyli 20 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}$ , właściwego do reakcji PCR. Wyizolowane DNA zamrozić w temp. -80°C, a rozcieńczone próbki przechowywać do następnych ćwiczeń w temp. -20°C.

### Ćwiczenie 4

#### 1. Reakcja PCR pod kątem obecności grzybów rodzaju *Fusarium* w badanych próbach

Po rozmrożeniu próbek DNA przygotowanych na poprzednich ćwiczeniach, rozpipetować odpowiednią objętość do probówek o pojemności 0,2 mL. Na bazie odczynników z komercyjnego zestawu do PCR, po dokonaniu obliczeń dotyczących objętości i stężeń, przygotować mieszaninę reakcyjną zawierającą 2 $\times$ stężony Mix, wodę ultraczystą oraz rozcieńczone do odpowiedniego stężenia startery zaprojektowane do specyficznej detekcji grzybów rodzaju *Fusarium* w krwi i tkankach. Rozpipetować odpowiednią objętość mieszaniny do probówek z wcześniej umieszczonym w nich DNA. Probówki dokładnie zworteksować i umieścić w termocyklerze zaprogramowanym w sposób umożliwiający amplifikację fragmentów DNA charakterystycznych dla badanego organizmu.

#### 2. Elektroforeza

W trakcie trwania reakcji przygotować żel do elektroforezy: naważyć agarozę, rozpuścić w buforze TBE, po schłodzeniu dodać barwnik DNA, wylać do kuwety elektroforetycznej i umieścić grzebień. Po zakończeniu reakcji, wyjąć probówki z termocyklera i nanieść ich zawartość do kieszonek w żelu agarozowym umieszczonym w kuwecie elektroforetycznej w buforze TBE. Ustawić napięcie na zasilaczu i włączyć elektroforezę. Po upływie 1 godziny



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

wyłączyć zasilacz, przenieść żel na transiluminator, zamknąć komorę i obserwować wynik na ekranie komputera.

### **Dokumentacja ćwiczeń**

Sprawozdanie z poszczególnych etapów analizy i weryfikacja skażenia próbek grzybami rodzaju *Fusarium*.