

Plan ćwiczeń z Genotoksykologii.

Rok akademicki 2017/2018

Ćwiczenie 1

Czas trwania: 4 godz.

Wstęp do hodowli komórkowych

Teoria

- ✓ zapoznanie z zasadami BHP obowiązującymi podczas zajęć
- ✓ organizacja i wyposażenie pracowni hodowli komórkowych
- ✓ charakterystyka kultur komórkowych i środowisko hodowlane (klasyfikacja hodowli, typy pożywek, surowice)
- ✓ techniki hodowlane

Praktyka

- ✓ zakładanie hodowli z zamrożonych linii komórkowych
- ✓ pasażowanie komórek
- ✓ mrożenie i przechowywanie komórek

Ćwiczenie 2

Czas trwania: 4 godz.

Ocena genotoksyczności czynników chemicznych na podstawie przeżywalności komórek ssaków

Teoria

Podstawy analizy i oceny toksyczności różnych czynników chemicznych na strukturę DNA.

Praktyka

1. Wykonanie testu przeżywalności komórek hodowanych w obecności mitomycyny C (MMC).
 - ✓ Liczenie komórek w komorze Brükera i wysiewanie ich na szalki z medium hodowlanym.
 - ✓ Przygotowanie odpowiednich rozcieńczeń MMC.
 - ✓ Ekspozycja na MMC.
 - ✓ Hodowla komórek.
 - ✓ Barwienie komórek rosnących w koloniach.
 - ✓ Liczenie kolonii.
2. Analiza uzyskanych wyników. Określenie wrażliwości linii referencyjnej V-79 i mutantu VC-8 na MMC i wykonanie krzywych przeżywalności
3. Określenie wrażliwości komórek na inne niż MMC czynniki uszkadzające DNA.
 - ✓ Analiza wyników doświadczeń przeprowadzonych na liniach komórkowych z użyciem bleomycyny, cis-platyny, 4NQO i nadtlenu wodoru.
4. Wykonanie sprawozdań z przeprowadzonych doświadczeń i analiz.

Ćwiczenie 3

Czas trwania: 4 godz.

Wykrywanie uszkodzeń DNA metodą elektroforezy pojedynczych komórek z żelu agarozowym - test kometowy (Comet Assay)

Teoria:

Omówienie metody testu kometowego i jej zastosowanie do analizy wykrywania pojedynczych i dwuniciowych pęknięć DNA

Praktyka

- ✓ Zawieszenie przygotowanych wcześniej komórek w agarozie LMP i nakładanie na szkiełka podstawowe
- ✓ Liza komórek
- ✓ Denaturacja alkaliczna w buforze rozwijającym
- ✓ Elektroforeza
- ✓ Barwienie jąder komórkowych DAPI

Ćwiczenie 4

Czas trwania: 4 godz.

Detekcja podwójnych pęknięć DNA indukowanych mutagenami na podstawie ekspresji białka γ H2AX

Teoria:

- ✓ Funkcja białka H2AX w naprawie podwójnych pęknięć nici DNA.
- ✓ Bleomycyna w powstawaniu podwójnych pęknięć DNA.
- ✓ Omówienie zasad reakcji immunocytochemicznej (ICC) umożliwiającej wykrycie białka γ H2AX.

Praktyka

1. Przygotowanie preparatów mikroskopowych z komórkami linii referencyjnej V-79 i mutantu VC-8 wrażliwego na bleomycynę, które traktowano i niepotraktowano bleomycyną.
 - ✓ Utrwalanie komórek.
 - ✓ Dwustopniowa reakcja ICC z przeciwciałami
 - ✓ Barwienie jąder komórkowych DAPI
 - ✓ Zamykanie preparatów w medium
2. Analiza preparatów w mikroskopie fluorescencyjnym.

Ćwiczenie 5
Czas trwania: 2 godz.

Analiza ekspresji białek naprawy DNA metodą Western Blot na podstawie oceny indukcji białka RAD51 cz. 1

Teoria:

Omówienie metody Western blot i jej zastosowania do analizy odpowiedzi komórki na czynniki uszkodzające DNA.

Praktyka:

- ✓ Wykonanie żelu poliakrylamidowego
- ✓ Rozdział elektroforetyczny białek

Ćwiczenie 6
Czas trwania: 4 godz.

Analiza ekspresji białek naprawy DNA metodą Western Blot na podstawie oceny indukcji białka RAD51 cz. 2

Praktyka:

- ✓ analiza rozdziału elektroforetycznego białek
- ✓ transfer białek na membranę PVDF
- ✓ detekcja białek i analiza wyników

Ćwiczenie 7
Czas trwania: 2 godz.

Ocena mutagenności czynników genotoksycznych z wykorzystaniem testu Ames cz. 1

Teoria:

- ✓ wykorzystanie testu Ames do oceny mutagenności różnych czynników
- ✓ omówienie wykonania doświadczenia określającego mutagenność azydku sodu i 4NQO

Praktyka

- ✓ Przygotowanie podłoża do testu Ames

Ćwiczenie 8
Czas trwania: 4 godz.

Ocena mutagenności czynników genotoksycznych z wykorzystaniem testu Ames cz. 2

Praktyka

Sprawdzenie szczepu *Salmonella typhimurium* na:

- ✓ zapotrzebowanie na histydynę/biotynę,
- ✓ obecność mutacji *rfa* i *uvrB*,
- ✓ obecności plazmidu pKM101,
- ✓ wykonanie testu Ames.

Ćwiczenie 9
Czas trwania: 2 godz.

Kolokwium Zaliczeniowe