

ПРОГРАМА
на лекционния курс

”Инфекциозни болести и лекарствена резистентност”
(продължение)

Курсът се води по проект
„Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на
молекулярната биология ”
ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 7 учебни часа.

Лектор: акад. Ангел Гълъбов, Институт по микробиология, БАН

Местоположение: в заседателната зала на блок 21, 2.ет.

Дати:

31.05.2011г. 9.00-11.00 ч.

03.06.2011г. 9.00-11.00 ч.

17.06.2011г. 9.00-11.00ч.

СЪДЪРЖАНИЕ

Дата	Лекция
31.05.2011 9.00-11.00 ч	Вируси-въведение
03.06.2011г. 9.00-11.00 ч	Грип
17.06.2011г. 9.00-11.00ч.	Ентеровируси

ПРОГРАМА

На упражнения по

„Кометен анализ за оценка за ДНК повреди”

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражнението: доц. Георги Милошев

Местоположение: в Институт по Молекулярна Биология „Акад. Румен Цанев”
лаборатории 523 и 524

Дати: От 13.06.2011 г. до 16.06.2011 г.

От 20.06.2011 г. до 23.06.2011 г.

Програма на упражнението:

1. Кратко въведение в теорията на Кометния тест.
2. Демонстрация на принципа на Кометния тест в лабораторни условия.
3. Флуоресцентна микроскопия за разглеждане на получените резултати от Кометния тест.
4. Анализ и обсъждане на получените резултати.

ПРОГРАМА

На упражнения по

"Детектиране на мутации с помощта на метода на ДНК денатурация с висока разделителна способност"

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 часа

Водещ управнението: гл. ас. д-р Стойно Стефанов Стойнов

Местоположение: Библиотеката на ИМБ, бл.21, ет.4 и лаборатория по микроскопия, ет.4 и 5, лаб. 415, 521

Дати: 3.10-6.10.2011г.

Програма на упражнението:

1. Теоретична част: Термодинамичната стабилност на ДНК/ДНК и ДНК/РНК дуплекси, методи за изчисляване, методи за измерване и практическо приложение за детектиране на мутации с помощта на ДНК денатурация с висока разделителна способност.
2. Практическа част
 - 2.1. Измерване на термодинамичната стабилност на ДНК/ДНК дуплекси.
 - 2.2. Детектиране на мутации с помощта на метода на ДНК денатурация с висока разделителна способност.
 - 2.3. Анализирание на резултатите

ПРОГРАМА

На упражнения по

„Изолиране и анализ на геномна ДНК”

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражнението: доц. Румяна Миронова

Местоположение: в Институт по молекулярна биология, БАН в лаб. 502 на секция „Регулация на генната активност”, бл.21, 4 ет.

Дати: 11.10-20.10.2011г.

Програма на упражнението:

Демонстрира се изолиране на геномна ДНК от бактерии *E.coli* щам DH-5 α по методика разработена от доц. Миронова, както следва:

1. Култивират се бактерии щам DH-5 α на 37 $^{\circ}$ C до оптична плътност 2 .
2. Суспензията от микроорганизми се центрофугира 20 мин. на 4000 об/мин. Супернатантата се отделя, а утайката се суспендира в 10 мл разтвор I (Tris, EDTA, NaCl и глюкоза) и към всяка проба се прибавят по 1 мл 10% SDS и 1 мл разтвор на Проназа E.
3. Така обработените проби се инкубират 40 мин. на 37 $^{\circ}$ C. След инкубирането полученият лизат се прекарва няколкократно през игла със спринцовка.
4. Пробите се екстрахират с фенол:хлороформ (1:1) и ДНК се утаява като към пробите се прибавя 1/ 10 от обема 3M CH₃COONa (pH= 5,2) и абсолютен алкохол до крайна концентрация 70% .
5. Пробите престояват 12 часа на -20 $^{\circ}$ C, след което ДНК се утаява чрез центрофугиране 20 мин. на 5000 об/мин. Пробите се разтварят в 800 мкл TE 10-1 и към тях се добавят 100 ед. РНаза T1 и РНаза A до крайна

концентрация 100 мкг/мкл. Инкубират се 40 мин. на 37° С. Остатъчните белтъци се екстрахират с фенол: хлороформ (1:1) и ДНК се утаява, както е описано по-горе.

6. Утайката от ДНК се разтваря в 1 мл ТЕ буфер и се обработва с ултразвук 3 пъти по 30 сек. с интервал от 30 сек. между отделните озвучавания. Концентрацията на получената ДНК се определя спектрофотометрично. Като критерий за чистотата на изолираната ДНК използвахме отношението A_{260}/A_{280} ,
7. Изолираната ДНК се нанася на 0,7% агарозен гел за визуализация и определяне степента на накъсване ѝ.

ПРОГРАМА
На упражнения по

„Молекулярно-биологични методи за белтъчен анализ (ELISA, Western blot)“

**По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в
областта на молекулярната биология"**
ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражнението: доц. Маргарита Апостолова

Местоположение: в лаб.427 лаб. на ИМБ, бл.21, 5 ет.

Дати:24.10-27.10.2011г.; 11.11.-16.11.2011г.

Програма на упражнение:

1. Кратко описание и въведение в същността на методиките;
2. Провеждане на Western blot анализ;
3. Провеждане на ELISA тест

Методът ELISA е тест, който се използва за детектиране на антитела и антигени. Съкращението ELISA идва от enzyme-linked immunosorbent assay. При този метод се използват антитела, свързани (белязани) с ензими за да се определят резултатите от теста. Има два основни вида ELISA: най- често срещания е индиректната ELISA и вторият - сандвичева ELISA.

Western blot анализът (понякога наричан протеинов имуоблот) е широко използвана техника за детектиране на специфични протеини в дадена проба от тъканен хомогенат или екстракт. Използва се гел електрофореза за разделяне на нативни протеини по 3-D структура или денатурирани протеини по дължина на полипептида. След това протеините се трансферират на мембрана (най-често нитроцелулоза или PVDF), където се детектират чрез антитела, специфични за дадения таргетен протеин.

План за провеждане на упражнението:

1. Приготвяне на 12 и 15 % акриламидни гелове за провеждане на SDS електрофореза по Laemmli.
2. Нанасяне на предварително приготвени протеинови проби и готови закупени стандарти.

3. Провеждане на електрофореза.
4. Полусух трансфер на протеините от гелове върху PVDF мембрани.
5. Блокиране на мембраните с блокиращ буфер
6. Инкубиране с първично антитяло за 1 ч на стайна температура
7. Промиване
8. Инкубиране с вторично антитяло за 1 ч на стайна температура
9. Промиване
10. Регистриране на сигналите

11.

За Western Blot анализа ще бъдат използвани следните консумативи,

1. Предварително оцветен белтъчен маркер с точна молекулна маса определена за всяка ивица
2. Блокиращ разтвор за Western blot
3. Мембрана за Western blot
4. Анти-бета тубулин –мише моноклонално антитяло
5. Анти-мише антитяло (IgG) – конюгирано с алкална фосфатаза
6. 5-бромо-4-хлоро-3-индол фосфат теразолово синьо (BCIP/NBT)
7. Вторични антитела белязани с флуоресцентни багрила.
8. Отчитане на резултатите – Odissey система за регистрация

Протокола за провеждане на ELISA теста е подробно описан в препоръките на производителя към съответния набор с които ще работите.

За ELISA ще бъдат използвани следните консумативи, закупени по договор BG051PO001- 3.3.04/58: Набори ELISA за определяне на човешки гама-интерферон

ПРОГРАМА

На упражнения по

"Real time RT-PCR-анализ на гена транскрипция в клетки от мишки"

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражненията: д-р Филип Де Мендонса

Местоположение: ИМБ, бл.21, лаборатория 521, ет.5.

Дати: 28.10-31.10.2011 г.

1.11-2.11. 2011г.

5.12-8.12. 2011г.

Програма на упражнението:

1. Теоретична част какво представлява термалния профил.
2. Обясняване ролята на fluorophores.
3. Демонстрация на кривите на разреждане и калибрация (Dilution curves and calibration).
4. Демонстрация на Hardware и Software на PCR апарата.
5. Интерпретация на резултатите (Data analysis).
6. Демонстрация на Melting curve analysis.

ПРОГРАМА

На упражнения по

„Пулсова гел-електрофореза”

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражнението: доц. Георги Милошев

Местоположение: в Институт по Молекулярна Биология „Акад. Румен Цанев”
лаборатории 523

Дати: От 07.11.2011 г. до 10.11.2011 г.

От 29.11.2011 г. до 30.11.2011 г.

От 01.12.2011 г. до 02.12.2011 г.

Програма на упражнението:

1. Кратко въведение в теорията на пулсовата електрофореза.
2. Демонстрация на принципите на електрофорезата от сътрудника на лабораторията.
3. Пулсова електрофореза за разделяне на хромозоми от дрожди *S. cerevisiae* и *K. lactis* и на хромозоми от миши фибробласти.
4. Анализ и обсъждане на получените резултати.

ПРОГРАМА

На упражнения по

„Техники за геномен и хромозомен анализ (AFLP, IRAR, SSRs). Геномна и флуоресцентна *in situ* хибридизация (GFISH; FISH)“

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражнението: доц. Маргарита Апостолова

**Местоположение: в Лаборатория по медико-биологични изследвания,
Институт по Молекулярна биология, БАН.**

Дати: 17.11-28.11. 2011г.

Програма на упражнение:

А) Техники за геномен и хромозомен анализ (AFLP, IRAR, SSRs):

1. Провеждане на полимеразна верижна реакция (PCR) с матрица-геномна ДНК, изолирана от пациенти с атеросклероза и специфична двойка праймери за гена Е селектин.
2. Тестване на получените продукти от PCR реакцията на агарозна електрофореза.
3. RFLP реакция със специфичен рестрикционен ензим за получения ген Е селектин.
4. Тестване на продуктите от RFLP реакцията на агарозна електрофореза.

Б) Геномна и флуоресцентна *in situ* хибридизация (GFISH; FISH):

1. Култивиране на клетки – клетъчна линия HepG2.

2. Третиране на клетките с Colcemid, за деполимеризация на микротубулите и задържане на клетките в метафаза.
3. Събиране на клетките и фиксиране.
3. Накапване на фиксираните клетки върху предметни стъкла.
4. Обработване на накапаните предметни стъкла.
5. Денатурация на ДНК на клетките.
6. Хибридизация на денатуриралата ДНК със сонда POSEIDON FISH DNA PROBES, специфична за центромерните области на всички хромозоми-инкубиране за една нощ.
7. Промиване на стъклата.
8. Оцветяване.
9. Отчитане на резултата на флуоресцентен микроскоп.

За упражнението ще бъдат използвани следните консумативи, закупени по проект **BG051PO 001-3.3.04/58** "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология":

А) Техники за геномен и хромозомен анализ (AFLP, IRAR, SSRs):

1. Ултра чиста агароза за DNA/RNA електрофореза
2. ДНК маркер – широк диапазон, 1 kb от 50/100 до 10000 bp. –

Б) Геномна и флуоресцентна in situ хибридизация (GFISH; FISH)

1. Набор за инситу хибридизация на човешки Centromer alpha
2. Система за трансфекция на еукариотни клетки базирана на липозоми
3. Набор за определяне на ДНК, чрез флуоресцентно белязване на крайни TdT – посредством dUTP nick end labeling (TUNEL)
4. Набор за определяне на апоптоза, чрез флуоресцентно белязване ДНК накъсвания и тотална ДНК с проточна цитометрия

ПРОГРАМА

На упражнения по

"Мултиканална флуоресцентна микроскопия"

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 часа

Водещ управнението: гл.ас. д-р Стойно Стефанов Стойнов

Местоположение: Библиотеката на ИМБ, бл.21, ет.4 и лаборатория по микроскопия, ет.4, лаб. 418

Дати: 9.12.-14.12.2011 г.

Програма на упражнението:

1. Въвеждаща теоретична част относно явлението флуоресценция, физичните му характеристики, флуорохроми и спектрални характеристики на флуорохромите, устройството на флуоресцентен микроскоп, филтри и спектрални характеристики на филтрите; основни положения за работа с програмите AxioVision release, Zeiss и ImageJ.
2. Работа с придобити флуоресцентни проби на дрождите *Saccaromyces cerevisiae* и човешки клетъчни линии. Получаване на едно, дву- и триканално изображение посредством инвертен флуоресцентен микроскоп Axiovert 200M, Carl Zeiss и AxioCam MRm CCD камера на програма AxioVision release, Zeiss.
3. Получаване и наслагване на флуоресцентни изображения в дълбочина на изследвания материал („Z – Stack”)

ПРОГРАМА

На упражнения по

„Електрофоретично разделяне на ДНК и РНК. Техники за идентифициране на микроорганизми на базата на рибозомалните гени (ARDRA и RISA)“

По проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Хорариум: 28 учебни часа

Водещ упражнението: доц. Галина Радева

Местоположение: в 417 лаб. на ИМБ, бл.21, 3 ет.

Дати: 15.12-20.12. 2011г.

Програма на упражнение:

1. Основни принципи на електрофоретичното разделяне на ДНК и РНК.
2. Използването на 16S рРНК гените като молекулен маркер за детекция на биоразнообразието на микробни съобщества.
3. Принципитите на двата молекулярни метода за идентифициране на микроорганизмите **Amplified Ribosomal DNA Restriction enzyme Analysis (ARDRA)** и **Ribosomal Intergenic Spacer Amplification (RISA)**.
4. Демонстрация на двата метода:
 - PCR на тотални ДНКи на микробни съобщества с праймери за 16S рРНК и 23S рРНК гените;
 - Рестрикция на PCR продукта на 16S рРНК гена с често режещи ендонуклеази;
 - Електрофоретично разделяне на получените профили на агарозна гел-електофореза.