## 7. gyakorlat: A vírusok tenyésztése

A vírusok csak örökítő anyagból és fehérjékből állnak. Nem sejtes szerveződésűek, önálló anyagcserére és szaporodásra nem képesek, vagyis egy gazdaszervezet szükséges a szaporodásukhoz. Ennek megfelelően nem tudjuk őket táptalajon tenyészteni. Tenyésztésükre különféle rendszerek alkalmasak:

1. Állatoltás
2. Embrionált tojás (főleg a védőoltások előállításához szükséges vírusok tenyésztése)
3. Sejtkultúrák
   a. Primer tenyészetek
      i. állati szervekből vagy emberi embriókból készítik
      ii. a feldarabolt szövetdarabot tripszinnel (enzim) emésztik, majd a sejteket tápoldatba helyezik
      iii. a sejtek kitapadnak a tenyésztőedény aljához és osztódni kezdenek, ez addig tart, amíg elérik egymást, ezek után a kontakt gátlás miatt a szaporodásuk leáll
      iv. ezt követően a sejteket tovább passzálhatjuk, ez azt jelenti, hogy pl. tripszin segítségével leemésztjük a tenyésztőedényről a sejteket és centrifugálást követően friss tápfolyadékban nagyobb területű edénybe visszük át, ahol újra osztódhatnak. Így egy folyamatosan osztódó sejtkultúrát kaptunk.
      v. amennyiben ez egy normális szövetből indult, kb. 40-50 alkalommal tudjuk passzálni: ezt követően a sejtkultúra elöregszik, nem képes további osztódásra.

   b. Immortalizált sejtvonalak, tumor eredetű sejtek, korlátlanul passzálhatók

Gyakran használt sejtvonalak:

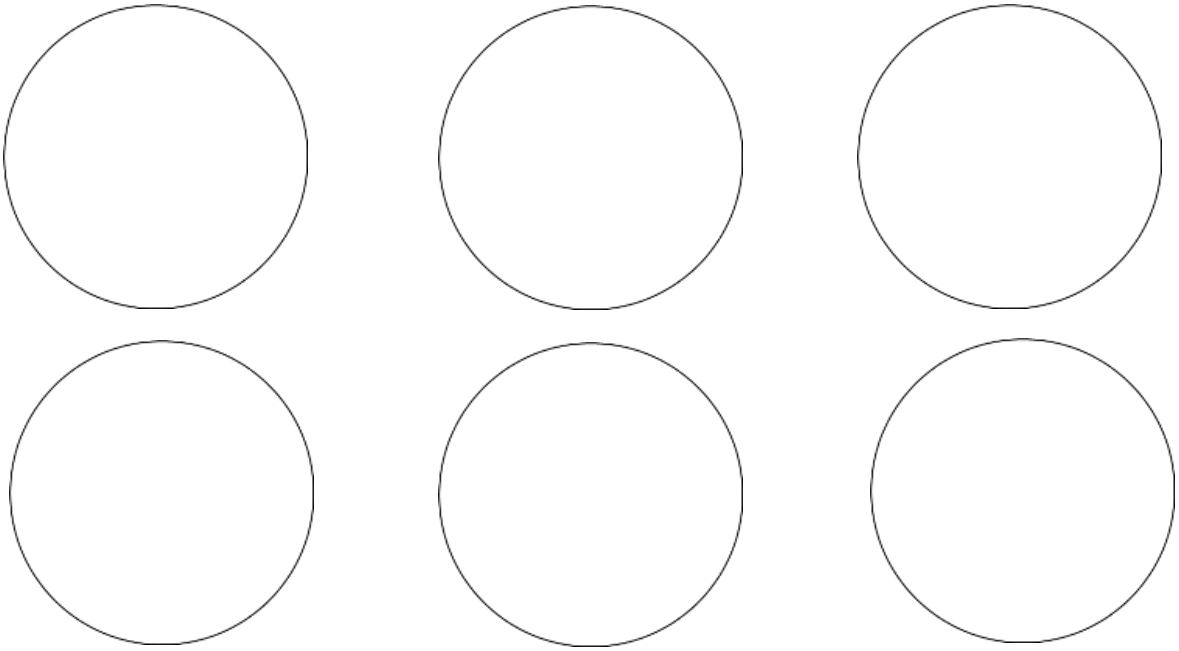
- majom-veseszövetből: Vero, BSC-1
- emberi méhnyakrákból: HeLa
- emberi gégerákból: HEp-2

**A vírusszaporodás jelei sejtkultúrában**

A sejtekben a vírusra jellemző sejtkárosító hatás alakul ki:

- a vírus hatására a sejtek zsugorodhatnak, lekerekedhetnek
- többmagvú óriássejtek jönnek létre (herpesz vírus)
- a sejtmagban szaporodó vírusok a magban hoznak létre zárványokat
  - *Herpes simplex*
  - adenovírus
- a sejtplazmában szaporodó vírusok ott hoznak létre zárványt
  - Negri testek: veszettség vírusa

***Feladat:*** **Kitapadó sejtkultúrák (epithel, fibroblaszt) vizsgálata mikroszkóp alatt. Hasonlítsd össze a különböző, fertőzetlen és fertőzött sejtkultúrák morfológiáját! Rajzold le a látottakat!**



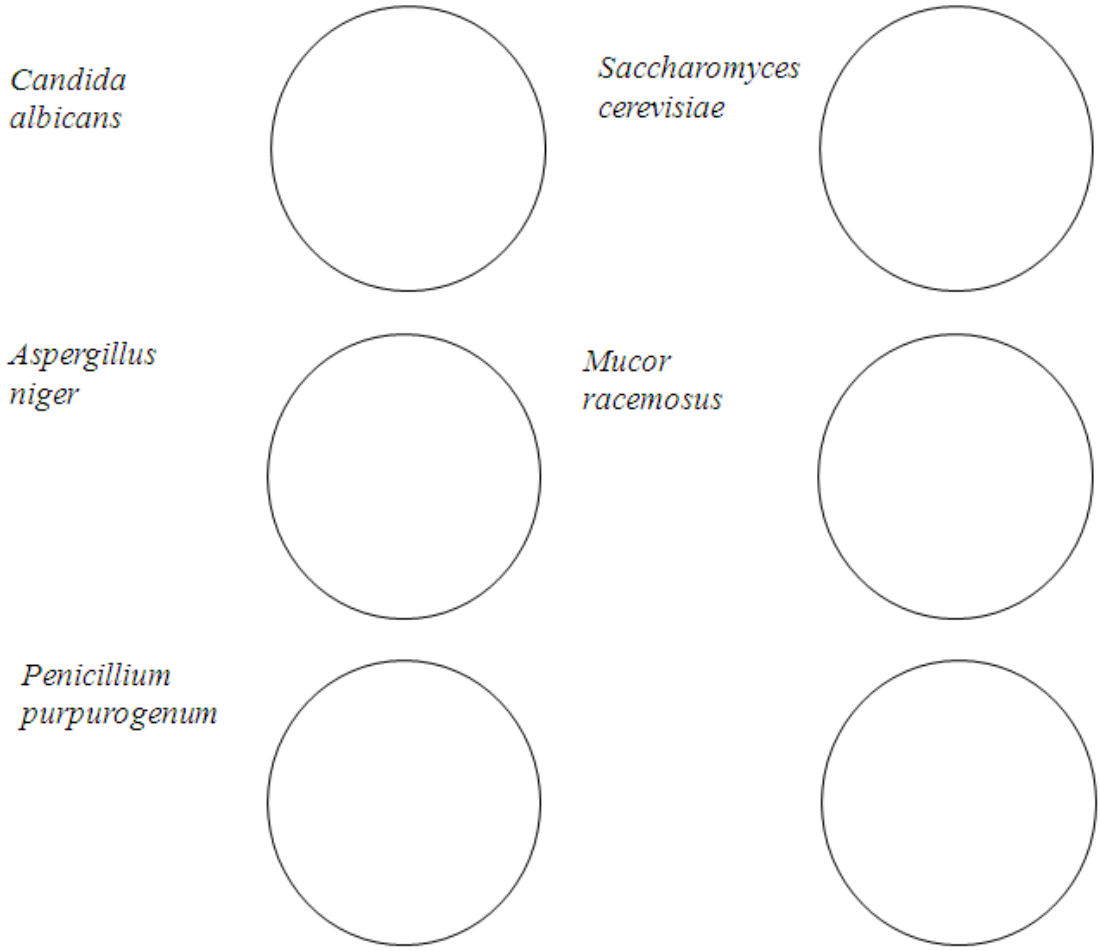
**8. gyakorlat: A gombák morfológiai vizsgálata. Mikroszkópos vizsgálatok.**

A gombák többsejtű élőlények csoportján belül külön országot alkotnak. Telepes testszerveződés jellemző rájuk, nincsenek valódi szöveteik, szerveik. Testük gombafonalak szövedékéből áll: osztatlan vagy elágazó fonalakból álló micélium. Sejtjeiknek kitinből álló sejtfaluk van, a valódi gombák heterotróf élőlények. Az élesztőgombáknál a fonalak redukálódtak, így ezek a szervezetek valódi unicelluláris eukarióta mikoroorganizmusoknak tekinthetőek.

A gombák csoportosításánál beszélhetünk:

1. élesztőszerű gombákról (például *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* fajok), agar lemezen baktériumokhoz hasonló telepeket képeznek
2. fonalas gombákról, melyeknél a telepet a gombafonalak (hifák) szövedéke, a micélium alkotja (például *Penicillium* fajok, *Aspergillus* fajok)
3. dimorf gombák, amelyek 25°C-on fonalas, 37°C-on, a fertőzött gazdaszervezetben élesztőszerű testfelépítést mutatnak (például *Sporothrix*)

***Feladat*:** **Bemutatott gombatenyészetek morfológiai jellemzése. Rajzold le a bemutatott tenyészeteket!**




**Gombák vizsgálata Gram-festéssel**

Az élesztőből és a kefirből a leégetett és zsírtalanított tárgylemezre oltókacs és fiziológiás sóoldat segítségével kenetet készítünk. Ezt követően fixálni kell a készítményeket, vagyis a szobahőmérsékleten történő száradás után a tárgylemezt a kenettel felfelé háromszor áthúzzuk a Bunsen-égő lángján. A fixálás után a kenetet a festőállványra helyezzük. A Gram-festés egy sejtfestési eljárás, gyakorlati módszer baktériumok csoportosítására. Gram-pozitív baktériumok esetén a festék nem mosható ki a sejtből, míg a Gram-negatív baktériumoknál igen. A Gram-negatív baktériumok láthatóvá tétele érdekében további fukszinos festést alkalmaznak. A Gram-pozitív baktériumok lilának látszanak, míg a Gram-negatív fajok rózsaszínűek lesznek a festés után. A festési eljárást gombák vizsgálatára is fel lehet használni.

**Anyagok:**

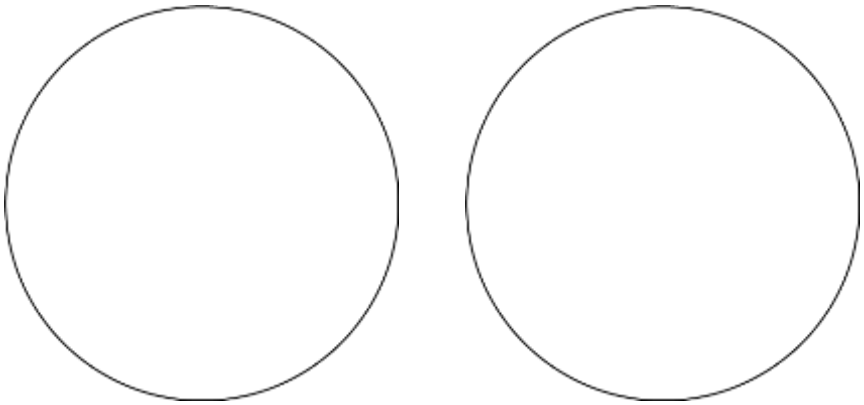
- Gram AB oldat: 2%-os kristályibolya oldat, és 1%-os ammónium-oxalát keveréke
- Lugol oldat: 1%-os káliumjodidos jódoldat
- Vizes fukszin oldat

- 96%-os alkohol

**A festés menete:**

1. A fixált kenetet Gram AB oldatba helyezzük 1 percre, majd csapvízzel öblítjük.
2. A kenetet 1 percre Lugol oldatba helyezzük, majd csapvízzel öblítjük.
3. A keneteket 96%-os alkohollal differenciáljuk, majd csapvízzel öblítjük.

***Feladat:*** **Pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) és kefir festése Gram szerint. Rajzold le a látottakat!**



## 9. gyakorlat: Bakteriális plazmid DNS izolálása

A bakteriális kromoszóma a legtöbb baktériumfaj esetében cirkuláris, dupla szálú DNS molekula, melyet nem vesz körül maghártya. A baktériumok citoplazmájában jelen lehetnek extrakromoszómális, genetikai információt hordozó DNS molekulák is. Ilyenek lehetnek a plazmidok, melyek a baktérium számára hasznos információt hordozhat. Tartalmazhatnak olyan géneket, melyeknek fontos szerepük lehet a baktérium virulenciájában. Különböző toxinokat kódolhatnak (virulencia plazmidok), illetve felelősek lehetnek a baktériumok antibiotikum rezisztenciájáért (rezisztencia plazmidok). A plazmidok jelentőségét az adja, hogy a genetikai információ horizontális terjedését segítik, ugyanis átjuthat egyik baktériumból a másikba, így a másik baktérium új genetikai információval gazdagodhat, pl.: az addig érzékeny baktérium rezisztenssé válhat az antibiotikumokkal szemben.

### Agaróz gélelektroforézis

A plazmidok egyszerűen láthatóvá tehetők agaróz gélelektroforézissel. Az agaróz egy poliszacharid, melynek vizes oldata hevítés, majd lehűtés után géllé dermed. Gélelektroforézis segítségével a makromolekulálat három fizikai tulajdonságuk, a méretük, alakjuk és a töltésük

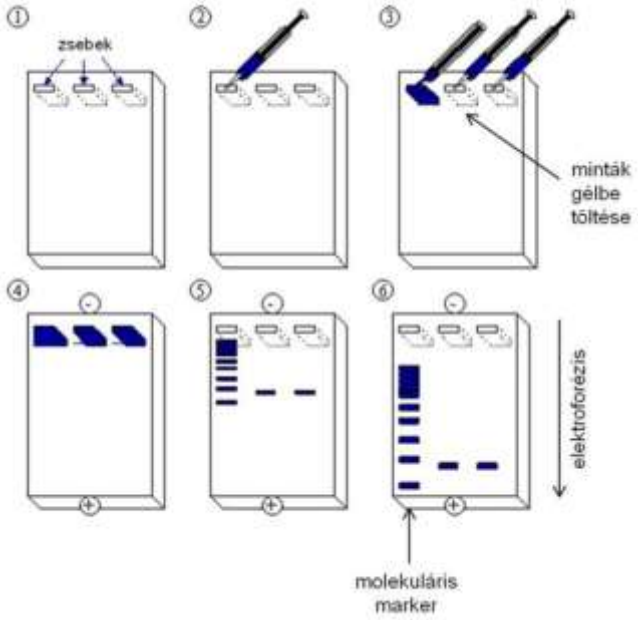
alapján tudjuk elválasztani. A nukleinsavak fajlagos (adott méretre vonatkoztatott) töltése ugyanannyi, ezért ha alakjuk is megegyezik (pl. mind lineáris), akkor az elválasztás kizárólag a méretük szerint megy végbe. Az elektromos erőtérben a molekulák méretükkel fordítottan arányos sebességgel vándorolnak és így egymástól szétválaszthatók. A nukleinsavak negatív töltésűek, mindig a pozitív pólus felé futnak. Futtatás közben a nukleinsavak nem látszanak, ezért a gélt valamilyen, a nukleinsavakhoz kötődni képes, fluoreszcens festékkel (például etídium-bromid, EtBr) kezeljük, majd az elválasztott nukleinsavakat a fluoreszcens festéket gerjeszteni képes fénnyel (etídium-bromid esetében UV-fénnyel) láthatóvá tehetjük.

### 1. Agaróz gél öntése

Az agarózból 1%-os oldatot készítünk és 100 °C-ra melegítjük. A felolvasztott agaróz gélt addig kell kevertetnünk, amíg teljesen homogén, víztiszta nem lesz. A gélhez hozzáadjuk a fluoreszcens festéket. A gélt ezután vízszintes felületre helyezett speciális tálcába öntjük. A minták felviteléhez ún. zsebek szükségesek, ezért a gél fölé, az egyik oldal közelébe csaknem a tálca aljáig leérő műanyag „fésűt” illesztünk, hogy a gél megszilárdulása után a fésű fogainak helyén üregek (zsebek) maradjanak. A gél megszilárdulása után a fésűt óvatosan kihúzzuk a zsebekből. Majd a tálcát egy ún. gélfuttató kádba helyezzük.

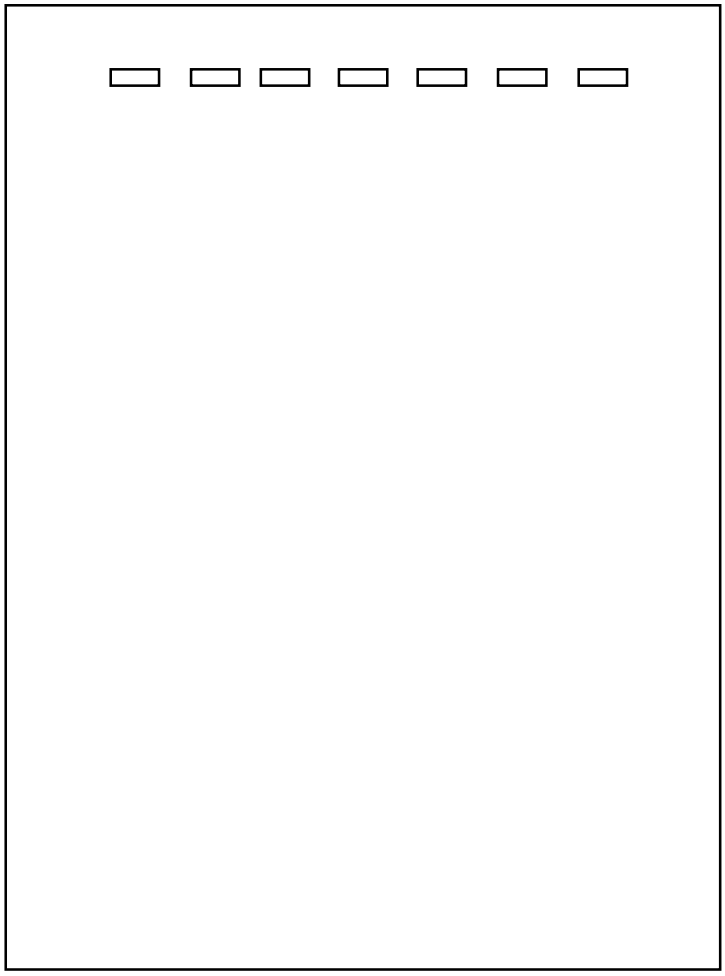
### 2. Gélelektroforézis

A kádat megfelelő ionerősségű futtató pufferrel töltjük, hogy az éppen ellepje a gélünket. A mintákhoz glicerint és brómfenolkék festéket keverünk, hogy azok lesüllyedjenek a zsebek aljába és láthatóvá tegyük őket a felvitelkor. Ezután pipettázzuk az elválasztandó mintát a gélzsebekbe. Ha minden mintát betöltöttünk, rátesszük a futtatókádra a tetejét, és elektromos áram segítségével a gélen elválasztjuk mintáinkat.




**1. ábra.** Agaróz gélelektroforézis lépései

**3. Értékelés**

A gélt kivesszük a futtatókádból és UV fény alatt értékeljük a kapott eredményt.

***Feladat*: Agaróz gél öntése. A kapott minták gélelektroforézise. Rajzold le a kapott sávokat!**