

Triplet



Kwartalnik Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Numer specjalny 1 (12)

Wydanie specjalne poświęcone projektowi „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”

Kilka słów wstępu o projekcie „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”

Realizowany na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego projekt pn. „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” (POIG.02.01.00-12-064/08) jest finansowany ze środków Unii Europejskiej: z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego

(EFRR), Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka (POIG) na lata 2007-2013. Przyznana kwota dofinansowania to 28 197 842,44 zł. Realizacja projektu rozpoczęła się we wrześniu 2008 roku. Planowany termin zakończenia wyznaczono na marzec 2012 roku. **cd. s. 2 ▶**

Warsztaty na temat nowoczesnych metod badawczych, Kraków, 4-5 października 2010

W dniach 4-5 października 2010 r. zostały zorganizowane warsztaty poświęcone nowoczesnym metodom badawczym z zastosowaniem urządzeń zakupionych w ramach projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”. Ponad 90 osób z całej Polski (studenci i pracownicy naukowi), które wzięły udział w warsztatach, miało możliwość wysłuchania szeregu wykładów dotyczących funkcjonowania i wykorzystania w badaniach naukowych takich urządzeń jak: mikroskopy konfokalne FCS/FLIM i STED, spektrometr masowy, urządzenie do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem zmian powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR), system do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej, magnetyczny sorter komórek, prowadzonych przez m. in.: prof. Alicję Józkowicz, prof. Jerzego Dobruckiego, prof. Halinę Gabryś i dr Katarzynę Banaś, prof. Andrzeja Kozika, dr Sylwię Kędracką-Krok (która przedstawiła jedno z urządzeń do analiz proteomicznych zakupione z projektu „Małopolskie Centrum Biotechnologii”), dr Marię Rapałę-Kozik, dr Agnieszkę Łobodę, dr Joannę Cichy, dra Krzysztofa Pycia, prof. Zbigniewa Madeję i dr Justynę Dru-



kałę. Ogólne informacje na temat samego projektu i jego realizacji zostały przedstawione na wstępie przez jego kierownika prof. Józefa Dulaka. Zainteresowanie częścią teoretyczną przeszło najśmielsze oczekiwania organizatorów. Sala pękała w szwach.

Bardzo dużym zainteresowaniem cieszyła się również część praktyczna warsztatów, podczas której uczestnicy mogli osobiście przekonać się, jak funkcjonują zakupione w ramach projektu urządzenia. Zajęcia prowadzone w mniejszych grupach dały możliwość nie tylko zobaczenia sprzętu, ale również wykonania prostych doświadczeń. Wzbudziło to wiele entuzjazmu wśród uczestników, którzy zadeklarowali swoją obecność podczas kolejnej edycji warsztatów już na wiosnę 2011 r.!

Joanna Uchto

SPIS TREŚCI

Kilka słów wstępu o projekcie „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”

Warsztaty na temat nowoczesnych metod badawczych 2010

Zwierzętarńia

Pracownia Cytometrii Obrazowej

Pracownia Proteomiki i Transkryptomiki

Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej

Pracownia Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej

Pracownia Biotechnologii Roślin

Bank Komórek

Podsumowanie kosztów projektu

Zespół koordynujący projekt

Kontakt

cd. s. 2 ▶



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

Projekt Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia (POIG.02.01.00-12-064/08) jest współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



► Kilka słów... cd. ze s. 1

Projekt ma charakter inwestycyjny. Jego celem bezpośrednim jest poprawa infrastruktury badawczej na Wydziale, w tym zakup światowej klasy urządzeń pozwalających na wdrożenie nowoczesnych metod badawczych w biologii molekularnej, biochemii, biotechnologii i biofizyce, a także rozbudowa i wyposażenie zwierzętarni. Na projekt składa się siedem zadań, koordynowanych przez pracowników naukowych Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. W ramach zadań powstaną nowe pracownie:

- Zwierzętarnia (koordynator: Prof. dr hab. Alicja Józkowicz);
- Pracownia Cytometrii Obrazowej (koordynator: Prof. dr hab. Jerzy Dobrucki);
- Pracownia Proteomiki i Transkryptomiki (koordynator: Prof. dr hab. Andrzej Kozik);
- Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej (koordynator: dr Justyna Drukała);
- Pracownia Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej (koordynator: dr Krzysztof Pyrc);
- Pracownia Biotechnologii Roślin (koordynatorzy: Prof. dr hab. Halina Gabryś, dr hab. Leszek Fiedor);
- Bank Komórek (koordynator: dr Justyna Drukała).

Rozbudowa infrastruktury badawczej przyczyni się do realizacji celów badawczych (pośrednich) projektu, do których należą m.in.:

- Opracowanie i zastosowanie nowych zwierzęcych modeli chorób i testowanie terapii eksperymentalnych;
- Opracowanie nowych metod analizy struktury komórek i interakcji badanych substancji z komórkami;
- Stworzenie kompleksowego systemu analizy ekspresji genów na poziomie transkryptomu i proteomu;
- Rozwój metod hodowli tkankowej skóry w celu ich zastosowania w warunkach klinicznych;
- Opracowanie i rozwój metod pozwalających na identyfikację i kwantyfikację wirusów ludzkich i zwierzęcych pod kątem ich zastosowania w warunkach klinicznych i badawczych;
- Opracowanie i badania pochodnych metabolitów roślinnych oraz pochodnych barwników fotosyntetycznych, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

Zakupiona aparatura będzie wykorzystywana przez pracowników naukowych, doktorantów i studentów Wydziału BBiB UJ, a także innych wydziałów Uniwersytetu Jagiellońskiego i ośrodków badawczych w całej Polsce. Dzięki nowej aparaturze możliwe będzie również rozszerzenie współpracy Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ z zespołami zagranicznymi. Ponadto, sprzęt zostanie udostępniony na potrzeby szpitali, jak również projektów realizowanych wspólnie z podmiotami należącymi do sektora komercyjnego (m.in. przedsiębiorstwa z branży farmaceutycznej, biotechnologicznej i medycznej), zainteresowanymi prowadzeniem projektów badawczych z wykorzystaniem narzędzi opracowanych na WBBiB UJ.

Do listopada 2010 roku wydano niemal 60% przyznanej dotacji. Zakupiono większość urządzeń do Pracowni Cytometrii Obrazowej, Pracowni Proteomiki i Transkryptomiki, Pracowni Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej. Ponadto, wyposażono Pracownię Inżynierii Komórkowej i Tkankowej oraz Bank Komórek. W ramach realizowanego projektu budowy zwierzętarni (zadanie 1), we wrześniu podpisano umowę na zarządzanie kontraktem (w tym na pełnienie funkcji nadzoru inwestorskiego) z firmą Raciborskie Przedsiębiorstwo Inwestycyjne, a w listopadzie – z Przedsiębiorstwem Budowlanym Kompleks na wykonanie robót budowlano-montażowych.

Na Wydziale realizowane są także inne projekty finansowane ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, które mają charakter komplementarny wobec projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”. Należą do nich: projekt „Małopolskie Centrum Biotechnologii” (działanie 2.1), strategiczny projekt badawczy pn. „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” (działanie 1.1.2), trzy projekty badawcze TEAM finansowane przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej oraz projekt LL-DER, finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Zespoły naukowe Wydziału uczestniczą także w realizacji projektu inwestycyjnego „Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków” (działanie 2.2) i związanego z nim strategicznego projektu badawczego „Śródbłonek naczyń w chorobach cywilizacyjnych” (działanie 1.1.2).

Zwierzętarnia (Zadanie nr 1)



Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania

- Zakład Biotechnologii Medycznej,
- Pełnomocnik Dziekana ds. Inwestycji, dr hab. Ryszard J. Gurbiel

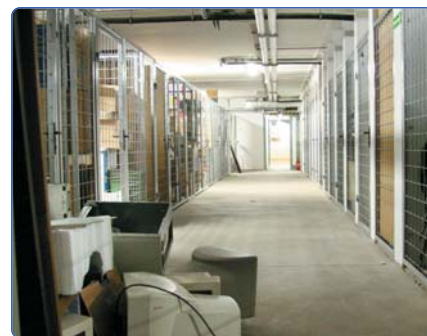
Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

Budowa zwierzętarni rozpoczyna się w grudniu 2010 roku i jej zakończenie jest planowane na połowę roku 2011. Zakupy aparatury do zwierzętarni właśnie się rozpoczynają – w grudniu zakupiono nowoczesny ultrasonograf VEVO2100 do badania zwierząt.

Najbliższe plany związane z realizacją projektu

W roku 2010 został opracowany program budowlany zwierzętarni, przygotowany przez firmę architektoniczną D44 Architektura. Na jego podstawie Wydział Architektury Urzędu Miasta Krakowa udzielił w dniu 12 kwietnia 2010 roku pozwolenia na budowę. Umożliwiło to zakończenie prac nad projektem wykonawczym oraz ogłoszenie przetargu na nadzór budowlany oraz wykonawcę. Nadzór budowlany sprawować będzie Raciborskie Przedsiębiorstwo Inwestycyjne sp. z o. o, natomiast budowę zwierzętarni realizować będzie Przedsiębiorstwo Budowlane KOMPLEKS. W listopadzie rozpoczęły się prace budowlane.

Prof. dr hab. Alicja Józkowicz



Pomieszczenia magazynowe WBBiB UJ, w których zostanie utworzona nowa zwierzętarnia

Pracownia Cytometrii Obrazowej (Zadanie nr 2)

Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania

- Zadanie badawcze 1: Badania roli białek heterochromatynowych 1 (HP1) w naprawie uszkodzeń chromatyny – Pracownia Biofizyki Komórki;
Zadanie badawcze 2: Badania wpływu leków wykazujących powinowactwo do DNA na strukturę i funkcje chromatyny – Pracownia Biofizyki Komórki;
Zadanie badawcze 3: Badania sondy fluorescencyjnej do wizualizacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej in vivo – Pracownia Biofizyki Komórki.

Inne grupy badawcze korzystające regularnie z mikroskopów Leica zakupionych z grantu BMZ: Zakład Biochemii Fizycznej, Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Zakład Biotechnologii Medycznej, Zakład Biotechnologii Roślin.

Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

- Mikroskop konfokalny Leica SP5 z przystawką STED,
- Mikroskop konfokalny Leica SMD (FLIM, FCS)

Opis wybranych urządzeń

Mikroskopy Leica STED i Leica SMD służą m. in. do typowych pomiarów struktury komórki (obrazy 3-wymiarowe) i procesów metabolicznych (obrazowanie żywych komórek w czasie, 3D, 4D, etc.) zaawansowanych, wysokorozdzielczych badań struktury (technika STED) zaawansowanych badań ruchliwości, wymiany dynamicznej i dyfuzji znakowanych fluorescencyjnie białek (technika FRAP, FLIP, FCS) i oddziaływań między białkami in situ w komórce (technika FRET, wykorzystująca czas trwania fluorescencji akceptora i donora).

Najbliższe plany związane z realizacją projektu

- Badania oddziaływania białek heterochromatynowych 1 (HP1) z PCNA w procesie rozpoznawania i naprawy uszkodzeń chromatyny;
- Badania wpływu adriamycyny, daunomycyny i barwników wykazujących powinowactwo do DNA na strukturę chromatyny oraz badanie wiązania tych leków do dwuniciowego RNA;
- Badania mechanizmu wiązania sondy fluorescencyjnej Col-F do kolagenów i elastyny w żywych tkankach zwierzęcych.

Prof. dr hab. Jerzy Dobrucki



Pracownia Proteomiki i Transkryptomiki (Zadanie nr 3)

Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania

- Zakład Biochemii Analitycznej,
- Zakład Biotechnologii Medycznej,
- Zakład Immunologii,
- Zakład Biochemii Fizycznej

Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

- Zestaw do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej,
- Urządzenie do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem pomiaru zmian powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) – model BIACORE 3000 (HVD Holding AG),
- Spektrometr masowy ze źródłem jonów typu ESI i analizatorem typu pułapka jonowa – model HCTUltra (Bruker),
- Magnetyczny sorter komórek autoMACS pro, Miltenyi Biotec,
- Czytnik płytek,
- Wytrząsarka do hodowli komórek owadzych Unimax 1010/Incubator 1000, Heidolph,
- Wytrząsarka do hodowli bakteryjnych, Innova 43, New Brunswick Scientific,
- Ultrawirówka Sorvall WX Ultra Series, Thermo Scientific,
- Wirówka szybkoobrotowa, Thermo Scientific.

Opis wybranych urządzeń

Zestaw do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej (Laser Microdissection System, LMD 7000, Leica)

Aparat do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej (mikrodysekcji laserowej) służy do precyzyjnej izolacji komórek/struktur komórkowych z preparatów zamrożonych lub skrawków tkanek utrwalonych formaliną i zatopionych w parafinie. System umożliwia również separację i transport żywych komórek. Metoda ta jest szczególnie przeznaczona do wycinania małej liczby komórek, cechuje się bardzo dużą dokładnością. Uzyskane wycinki są wolne od zanieczyszczeń i na wyciętym materiale możliwe są dalsze analizy, takie jak izolacja RNA/DNA czy białek. System ten stanowi unikatowe narzędzie w takich dziedzinach jak biologia molekularna, patologia, mikrobiologia, cytogenetyka oraz biologia rozrodu.

Urządzenie do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem pomiaru zmian powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) – model BIACORE 3000 (HVD Holding AG)

Biosensorowy system BIACORE 3000 umożliwia badanie oddziaływań makromolekularnych pomiędzy cząsteczkami biologicznie aktywnymi. Analiza polega na pomiarze zmian powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR), jaki zachodzi na powierzchni mikrochipu pokrytego złotem, oświetlanego światłem spolaryzowanym, będącego w kontakcie z cząsteczkami zdolnymi do wiązania ligandów. Na podstawie tych pomiarów można dokonać charakterystyki oddziaływań zachodzących między cząsteczkami uwzględniając moc i specyficzność tych oddziaływań oraz ich kinetyczną i termodynamiczną charakterystykę. Wszystkie oznaczenia przebiegają bardzo szybko, co pozwala na badanie zjawisk biologicznych w czasie rzeczywistym i jest to jedna z podstawowych zalet stosowania tej metodyki. Dzięki temu możliwe jest wykorzystanie tych badań w śledzeniu przebiegu zarówno procesów fizjologicznych jak i stanów patologicznych. Oprócz tego zaletą tej metodyki jest możliwość badania oddziaływań z ligandami o zróżnicowanej masie cząsteczkowej, bez konieczności ich dodatkowego znakowania i przy minimalnym zapotrzebowaniu na ilość i stężenie analizowanej próbki.



Sorter komórek



Zestaw do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej



Urządzenie do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym



Spektrometr masowy

Spektrometr masowy ze źródłem jonów typu ESI i analizatorem typu pułapka jonowa – model HCTUltra (Bruker)

Spektrometr masowy HCTUltra, z pułapką jonową, jako analizatorem i źródłem jonów typu ESI służy do rutynowych analiz jakościowych (identyfikacji) szerokiego spektrum związków biologicznych na podstawie precyzyjnego wyznaczenia ich masy. W sposób bezpośredni identyfikować można występujące naturalnie związki o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej (peptydy, lipidy etc.). Związki wielocząsteczkowe, przede wszystkim białka, identyfikuje się poprzez dokładne wyznaczenie mas ich fragmentów, otrzymywanych np. na drodze proteolizy. Ponieważ w obu typach zastosowań analizowane związki występują w skomplikowanych mieszaninach, wyznaczenie ich mas często odbywa się wspólnie z ich rozdziałem za pomocą wysokosprawnego chromatografu ciekłego.

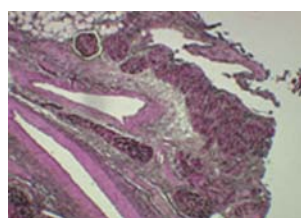
Najbliższe plany związane z realizacją projektu

Zakład Biotechnologii Medycznej

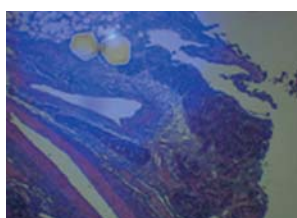
- izolacja komórek macierzystych i określenie ich niszy w mózgu/szpiku kostnym itd.;



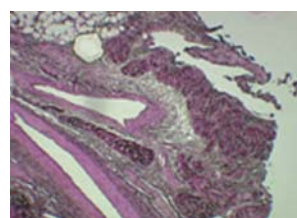
Ultradźwiękowa wiertarka Sorvall WX Ultra Series, Thermo Scientific



Przed wycięciem



Podczas wycinania



Po wycięciu

- określenie fenotypu transplantowanych komórek macierzystych w obrębie mięśnia sercowego po zawale u świni;
- testowanie różnych zestawów do izolacji RNA z wyciętego materiału (z bardzo małych ilości materiału) oraz dalszych analiz, np., RT-PCR z jednej komórki (AmpliSpeed);
- dalsza optymalizacja metod pracy z żywymi komórkami.

Zakład Biochemii Analitycznej

Urządzenie BIACORE wykorzystane zostanie w badaniach nad kinetyką oddziaływania białek układu generacji bioaktywnych peptydów – kinin w dwóch modelach:

- charakterystyce wpływu warunków panujących w układach komórkowych, poddanych czynnikom generującym stan zapalny, na wzajemne oddziaływanie kininogenu i prekalikreiny (m. in. wpływ czynników utleniających),
- rozpoznania możliwości oddziaływania tych białek z adhezynami występującymi na powierzchni patogenów bakteryjnych i drożdżowych, będących jednym z głównych czynników wirulencji tych mikroorganizmów.

Spektrometr masowy umożliwi identyfikację peptydów kininopodobnych generowanych przez proteiny drożdżowe ulegające intensywnej ekspresji w infekcjach wywołanych różnymi szczepami *Candida*. Urządzenie to posłuży także do identyfikacji specyficzności substratowej tych enzymów w odniesieniu do wybranych białek osocza.

*Prof. dr hab. Andrzej Kozik,
Dr Agnieszka Łoboda*

Ryc. 1 Przykład zastosowania systemu LMD 7000 do wycięcia fragmentu tkanki z preparatu parafinowego serca świni, barwienie hematoksyliną-eozyną.



Czytnik płytek

Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej (Zadanie nr 4)

Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania

- Zakład Biologii Komórki

Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

- 2 komory laminarne II klasy czystości,
- 2 inkubatory CO₂ do hodowli komórek,
- 2 wirówki,
- suszarka-sterylizator,
- autoklaw,
- mikroskop odwrócony kontrastowo-fazowy,
- mikroskop fluorescencyjny,
- zamrażarka niskotemperaturowa.

Opis wybranych urządzeń

Mikroskop fluorescencyjny

Zakupiony mikroskop jest urządzeniem specjalnie zaprojektowanym do przyżyciowej wizualizacji komórek z zastosowaniem różnych technik mikroskopii optycznej (epifluorescencja, kontrast różnicowy Nomarskiego NIC, kontrast modulacyjny IMC, kontrast fazowy). Wyposażenie mikroskopu umożliwia obserwacje komórek w zadanej temperaturze i przy określonym stężeniu CO₂. Dodatkowo wysokoczuła chłodzona kamera CCD pozwala na ograniczenie do minimum intensywności światła wzbudzenia. Mikroskop daje możliwość rejestracji i badania wielu procesów zachodzących w żywej komórce w trakcie prowadzenia doświadczenia.

Najbliższe plany związane z realizacją projektu

W Pracowni Inżynierii Komórkowej i Tkankowej, w ramach dwóch realizowanych obecnie projektów naukowych, kontynuowane będą prace w zakresie klinicznej aplikacji uzyskanych wyników. Mikroskop fluorescencyjny będzie wykorzystywany w licznych projektach naukowych prowadzonych zarówno w Zakładzie Biologii Komórki jak i w innych zakładach i pracowniach Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii. Ponieważ jest to urządzenie unikatowe, zostanie ono udostępnione innym ośrodkom krajowym (np. Instytut Zoologii, Uniwersytet Wrocławski). Mikroskop jest również narzędziem niezbędnym dla realizacji innych projektów strukturalnych, w które jest zaangażowany Zakład Biologii Komórki. W ramach projektu strategicznego "Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie" (działanie 1.1.2), w najbliższym czasie planowana jest m. in. dalsza rozbudowa mikroskopu, pozwalająca m. in. na zastosowanie technik FURA, FRET oraz TIRF.

dr Justyna Drukała



Komora laminarna



Zamrażarka

Mikroskop fluorescencyjny



Autoklaw



Inkubator CO₂



Pracownia Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej (Zadanie nr 5)

Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania:

- Zakład Mikrobiologii

Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

- Cytometr przepływowy (Becton Dickinson; FACSCalibur z modułem sortującym i przystawką HTS),
- Aparat real-time PCR (Applied Biosystems, 7500fast),
- 4 termocyklery (Applied Biosystems, Verity),
- Komora laminarna II klasy bezpieczeństwa biologicznego (Thermo Scientific, KSP18),
- Ciepłarka CO₂ (Heraeus, 150i Duo),
- Mikroskop odwrócony z opcją fluorescencji (Leica),
- Wirówka laboratoryjna do wirowania małych objętości (Eppendorf; 5415R),
- Wirówka laboratoryjna do wirowania średnich objętości (Eppendorf; 5804R),
- Zestaw do elektroforezy (Zasilacz do elektroforezy; 2 pojemniki do elektroforezy) (Biorad),
- Dwie komory do pracy z kwasami nukleinowymi (UVP, PCR workstation),
- Dwie chłodziarki-zamrażarki (Liebherr),
- Termomikser (Eppendorf; Comfort),
- Mieszadło magnetyczne (IKA; RH Basic 2),
- Komputer z urządzeniem wielofunkcyjnym.

Opis wybranych urządzeń

Aparat Real-time PCR

Aparat służy do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym w formie płytki 96-dołkowej. Sprzęt jest wyposażony w filtry: FAM/SYBR Green, VIC/JOE, NED/TAMRA/Cy3, ROX/TEXAS RED, Cy5, pozwalające na równoczesny pomiar 5 markerów. Dzięki opcji 'Fast' możliwe jest przeprowadzenie reakcji real-time PCR w czasie <40 minut, w związku z czym można znacznie zwiększyć liczbę analizowanych próbek. Oprogramowanie urządzenia pozwala nie tylko na analizę poziomu ekspresji danego genu w odniesieniu do krzywej standardowej, ale również na analizy mikrobiologiczne (+/-, relatywna i absolutna), automatyczne genotypowanie SNP, badania populacyjne i inne. Dodatkowo aparat wyposażony jest w oprogramowanie HRM (High Resolution Melting Curve), pozwalające na analizę polimorfizmów i identyfikację fragmentów DNA różniących się długością, zawartością par GC lub sekwencją na podstawie krzywej denaturacji DNA bez stosowania specyficznych sond.

Cytometr przepływowy

Cytometr przepływowy jest wyposażony w dwa lasery (488 nm oraz 635 nm). Wyposażenie aparatu umożliwia równoczesną rejestrację 6 markerów. Dzięki wyposażeniu w przystawkę umożliwiającą automatyczne pobieranie próbek z płytki 96- lub 384- dołkowej (moduł HTS), sprzęt pozwala na szybką analizę dużej liczby próbek, co może być niezwykle przydatne przy badaniach przesiewowych, służących np. do poszukiwania nowych leków. Dodatkowo, aparat wyposażony jest w moduł sortujący, zmieniający sprzęt w prosty sorter komórkowy, umożliwiając przeprowadzanie preparatyki badanych próbek.

Komory do pracy czystej DNA/RNA

Komory są wykorzystywane do pracy w warunkach sterylnych z RNA oraz DNA. Dzięki zastosowaniu czteroetapowej filtracji powietrza, poprzez filtry mecha-



Komora do pracy z RNA i DNA z oczyszczaniem powietrza poprzez filtrację HEPA oraz lampy UV, UVP, PCR workstation



4 termocyklery płytkowe



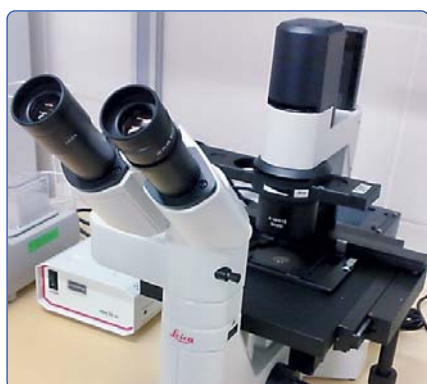
Aparat Real-time PCR



Cytometr przepływowy



Wirówka szybkoobrotowa do małych objętości z chłodzeniem



Mikroskop kontrastowo-fazowy z fluorescencją

niczne, filtry węglowe, filtr HEPA oraz filtr ozonu w połączeniu z filtrem UV, sprzęt zapewnia idealne warunki do pracy z kwasami nukleinowymi. Aparatura pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych wyników i zapobiega zanieczyszczeniom, co jest szczególnie ważne w analizie zakażeń wirusowych.

Wyposażenie pracowni komórkowej

W ramach projektu została w pełni wyposażona pracownia komórkowa, pozwalająca na pracę z patogenami klasy 2 bezpieczeństwa biologicznego. W skład wyposażenia pracowni wchodzi: komora z przepływem laminarnym z filtrami HEPA H14 oraz dodatkowym, segmentowanym filtrem (klasa bezpieczeństwa pozwalająca na pracę z cytostatykami), ciepłarki CO₂ do pracy z komórkami eukariotycznymi oraz patogenami wirusowymi, zestaw wirówek laboratoryjnych oraz mikroskop pozwalający na obserwację w systemie jasnego pola, z kontrastem fazowym oraz fluorescencją.

Najbliższe plany związane z realizacją projektu

- Kontynuacja prac nad zakażeniami wirusowymi u pacjentów z astmą (diagnostyka chorób układu oddechowego) we współpracy z Collegium Medicum UJ (prof. dr hab. Andrzej Szczeklik);
- Kontynuacja prac nad zakażeniami wirusowymi u pacjentów po przeszczepach płuc (diagnostyka chorób układu oddechowego) we współpracy ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu (prof. dr hab. Marian Zemba);
- Wdrożenie metodyki diagnostyki zakażeń wirusowych u zwierząt laboratoryjnych, w związku z organizacją zwierzętarni w ramach WBBiB;
- Kontynuacja prac nad hodowlami tkankowymi układu oddechowego;
- Kontynuacja prac nad identyfikacją nowych wirusów w próbkach od pacjentów ze schorzeniami o nieznannej etiologii.

dr Krzysztof Pyrc

Pracownia Biotechnologii Roślin (Zadanie nr 6)



Aparat do izoogniskowania



Autoklaw poziomy

Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania

- Zakład Biotechnologii Roślin,
- Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin

Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

Wyposażenie podstawowe:

- meble laboratoryjne,
- zamrażarka -20°C,
- wytrząsarki typu Wortex,
- wirówka stołowa MiniSpin Eppendorf,
- mieszadła magnetyczne,
- pH-metr,
- wirówka z chłodzeniem MPW 350R,
- komory laminarne z poziomym przepływem powietrza POLON KL-21,
- termocykler gradientowy 48 dołkowy MJ Mini, BioRad,
- układy do pomiaru stężenia tlenu,
- wytrząsarki z oświetlaczami do hodowli zawiesinowych,
- waga analityczna,
- aparat do elektroforezy pionowej MiniProtean tetra System, BioRad,
- aparat do elektroforezy pionowej Protean II xi Cell, BioRad,
- aparat do izoogniskowania, Protein IEF Cell, BioRad,
- aparat do elektroforezy poziomej Mini Subcell, BioRad,

- spektrofotometr NanoPhotometer, Implen,
- autoklaw poziomy Tuttnauer 5075EL.

Urządzenia specjalistyczne:

- fluorymetr do pomiaru fluorescencji chlorofilu in vivo z zestawem do obrazowania FluorCam 701 MF,
- potencjostat do anodowej woltamperometrii inwersyjnej (anodic stripping voltammetry, ASV),
- detektor wyładowań koronowych w aerozolu Corona CAD (charged aerosol detector)
- spektrofotometr dwuwiązkowy UV-VIS V650 JASCO,
- spektrofotometr dwuwiązkowy o wysokiej rozdzielczości UV-VIS-NIR Cary 5000, z rozszerzonym zakresem pomiarowym od 175 do 3300 nm,
- detektor radioaktywności α -RAM 4 IN/US sprzężony z systemem HPLC, przeznaczony do detekcji promieniowania α oraz miękkiego promieniowania β ,
- rozbudowa chromatografu gazowego Varian GC3800 o drugi kanał detekcji wraz z detektorem masowym EI Varian 220MS, wyposażonego w pompę turbomolekularną,
- przenośna strzelba genowa Helios Gene Gun System BioRad,
- system do dokumentacji obrazu z zestawem filtrów, BioSpectrum, UVP.

Opis wybranych urządzeń

Potencjostat do anodowej woltamperometrii inwersyjnej (anodic stripping voltammetry, ASV)

Woltamperometria jest elektrochemiczną metodą analizy, opierającą się na pomiarze prądu związanego z przebiegiem reakcji elektrodowej. Procesy będące przedmiotem pomiaru przebiegają na polaryzowalnej elektrodzie pracującej na niewielkiej powierzchni. Potencjał elektrody pracującej jest zmieniany w trakcie pomiaru zgodnie z programem wynikającym ze stosowanej techniki, a mierzony prąd jest rejestrowany w postaci zależności od przyłożonego napięcia tworząc krzywą o kształcie piku nazywaną woltamogramem. Położenie maksimum na krzywej prąd-napięcie charakteryzuje jakościowo badaną substancję, zaś natężenie prądu jest proporcjonalne do stężenia tej substancji w badanej próbce. System do automatycznych analiz woltamperometrycznych śladowych ilości metali oraz innych substancji składa się ze stacji roboczej (generator potencjału liniowo-zmiennego), naczynia pomiarowego zaopatrzonego w polaryzowalną elektrodę grafitową oraz układu do akwizycji danych (komputer PC z oprogramowaniem). Urządzenie umożliwia identyfikację i precyzyjny pomiar stężeń śladowych ilości (w zakresie stężeń poniżej 1 ppm) metali ciężkich oraz niektórych innych substancji. Precyzyjny pomiar zawartości metali w próbkach pochodzenia biologicznego wymaga ich uprzedniej całkowitej mineralizacji w kontrolowanych warunkach.

Urządzenie wykorzystywane będzie do analizy pobierania i akumulacji metali ciężkich w materiale roślinnym celem: 1) oceny poziomów bioakumulacji niektórych zanieczyszczeń w roślinach wodnych pod kątem wytypowania gatunków wskaźnikowych (bioindykatory) oraz potencjalnie użytecznych w biotechnologicznych metodach usuwania skażeń środowiska wywołanych przez podwyższone stężenia metali ciężkich (fitoremediacja); 2) charakterystyki mechanizmów tolerancji poprzez analizę różnic w dystrybucji wybranych metali w roślinach pochodzących z populacji podlegających presji selekcyjnej związanej z siedliskami o różnej zawartości metali ciężkich.

Detektor wyładowań koronowych w aerozolu Corona CAD (charged aerosol detector)

Urządzenie jest uniwersalnym detektorem o wysokiej czułości do HPLC. Specyficzna metoda detekcji pozwala na stosowanie go do wszystkich aplikacji, po-



Chromatograf gazowy



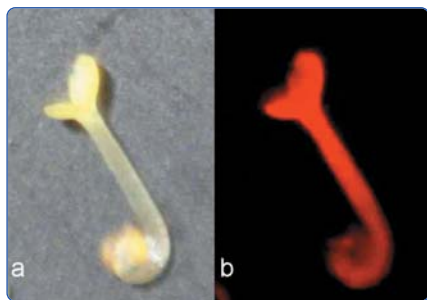
Detektor radioaktywności



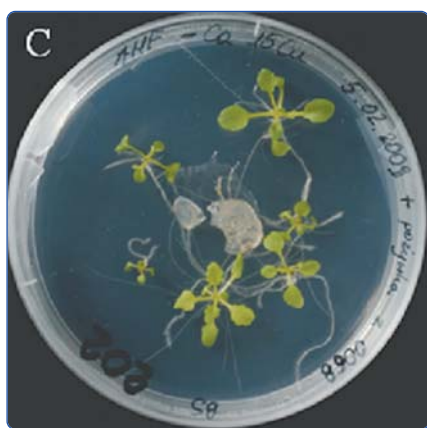
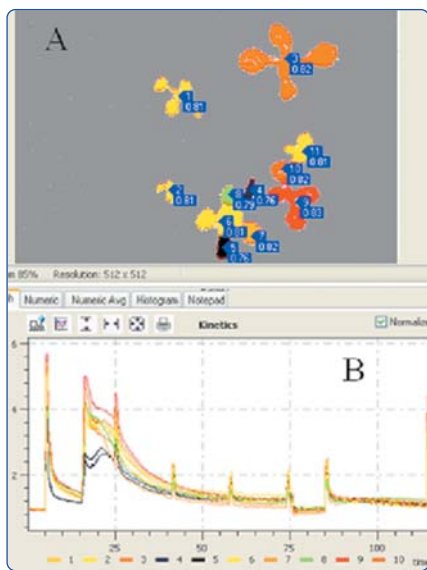
Fluorymetr do pomiarów fluorescencji chlorofilu in vivo z wyposażeniem do obrazowania (PAM)



Urządzenie do anodowej woltamperometrii inwersyjnej (ASV)



Ryc. 1. Rosnąca w ciemności (etiolowana) 5-dniowa siewka mutanta linii cop1 Arabidopsis: (a) zdjęcie w świetle dziennym; (b) czerwona fluorescencja uwidacznia nadmiarową akumulację prekursorów chlorofilu.



Ryc. 2. Rozkład przestrzenny potencjalnej maksymalnej wydajności fotosyntezy (A) i przebieg kinetyk fluorescencji chlorofilu (B) dla roślin Arabidopsis arenosa hodowanych in vitro w obecności jonów Cd (C). Dane A i B uzyskane za pomocą fluorymetru obrazującego Open FluorCam (Photon System Instr.).

nieważ odpowiedź detektora nie zależy od budowy chemicznej rozdzielanych substancji, a sygnał, w bardzo szerokim zakresie, jest liniowo proporcjonalny do stężenia analitu w eluacie. Wyływający z kolumny eluat poddawany jest ciśnieniowej nebulizacji (wytworzeniu aerozolu) oraz osuszaniu w strumieniu azotu. Wytworzony w ten sposób strumień cząsteczek analitu otrzymuje następnie ładunek dodatni, przenoszony przez płynący w przeciwnym kierunku drugi strumień gazu naładowany dodatnio przez elektrodę koronową pod wysokim napięciem. Ładunek oddany przez cząsteczki jest mierzony przez elektrometr, a sygnał jest wprost proporcjonalny do ilości analitu w próbce. Corona CAD charakteryzuje się wysoką czułością, szerokim zakresem pomiarowym, powtarzalnością i łatwością obsługi. Detektor ten może być wykorzystany do jakościowej i ilościowej analizy substancji, nie wykazujących (bądź o słabej) aktywności optycznej w zakresie UV/Vis (lipidy, cukry, glikozydy, niektóre alkaloidy itp.), oraz substancji występujących na ogół w niewielkich ilościach w próbkach pochodzenia biologicznego (np. prekursorzy ważnych metabolitów, fitohormony).

W ostatnich latach obserwuje się w Polsce znaczące zainteresowanie uprawami roślin w warunkach sztucznych, wymagających dodatkowego wspomaganie (np. doświetlanie, nawożenie CO₂ itp.). Konieczne zatem staje się opracowanie technologii pozwalających uzyskać jak najwyższe plony bez zwiększania powierzchni upraw. Jest to szczególnie ważne w przypadku roślin hodowanych w warunkach zamkniętych dla celów badawczych i/lub biotechnologicznych, m. in. biomedycznych. Poznanie molekularnych mechanizmów regulacji biosyntezy chlorofilu przez białka sterujące fotomorfogenezą będzie stanowić istotny krok ku w/w technologiom. Aktualnie, przy użyciu detektora w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin WBBiB UJ realizowany będzie projekt badawczy poświęcony roli białkowych regulatorów fotomorfogenezы roślin w kontroli procesu biosyntezy chlorofilu.

Fluorymetr do pomiaru fluorescencji chlorofilu in vivo z zestawem do obrazowania FluorCam 701 MF

Open Fluor Cam czeskiej firmy Photon Systems Instruments służy do dwuwymiarowego obrazowania i analizy aktywności fotosyntetycznej. Jego działanie opiera się na porównaniu wydajności fluorescencji wypromieniowywanej przez układ w stanie nieaktywnym i aktywnym fotosyntetycznie – różnica stanowi wydajność energetyczną fotosyntezy. Przebieg zmian tej wydajności przy zmianie warunków świetlnych dostarcza dodatkowych informacji o strukturze i funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego. Pomiar, jako nieniszczące i bezkontaktowe, można przeprowadzać wielokrotnie na tej samej próbce, np. na grupie roślin, a otrzymane obrazy analizować statystycznie. Możliwe jest badanie roślin rosnących w gruncie lub hodowanych w warunkach in vitro (Ryc. 2). Przyrząd jest wykorzystywany m. in. do badań mikroewolucyjnych adaptacji Arabidopsis arenosa w populacjach długotrwale narażonych na stres środowiskowy.

Strzelba genowa Helios Gene Gun System BioRad

Strzelba genowa umożliwia transformację roślin metodą biolistyczną. Opłaszczony DNA/RNA kulki złota lub wolframu są rozpędzane do dużych prędkości z użyciem sprężonego helu i wstrzeliwane do komórek roślinnych. Dzięki temu można dostarczać kwasy nukleinowe bezpośrednio do komórek, bez konieczności usuwania ściany komórkowej. Metoda biolistyczna jest szeroko stosowana w badaniach podstawowych (m. in. do badania lokalizacji, roli oraz oddziaływań między białkami) i aplikacyjnych (m. in. celem wprowadzania nowych, użytecznych cech do modyfikowanych gatunków). Stanowi ona istotną alternatywę transformacji gatunków, zwłaszcza roślin jednoliściennych, dla których inne metody transformacji nie zostały do tej pory opracowane lub nie są wystarczająco wydajne. Używana jest także do dostarczania szczepionek DNA do komórek naskórka myszy. Szczegółne zastosowanie strzelby genowej znalazła w transformacji chloroplastów. Uzyskane

w ten sposób rośliny transgeniczne charakteryzują się wysoką akumulacją prawidłowo sfałdowanych i glikozylowanych białek heterologicznych. Stosowane wcześniej działa genowe wymagają zastosowania komór próżniowych, których rozmiar znacząco ogranicza wybór materiału do transformacji. Helios Gene Gun jest urządzeniem przenośnym, co umożliwi wykorzystanie do transformacji in vivo np. liści pozostających na roślinie. W najbliższym półroczu w Zakładzie Biotechnologii Roślin planowane jest opracowanie protokołów transformacji przejściowej i stałej transformacji *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* oraz rośliny wodnej *Lemna trisulca*.



Strzelba genowa

Najbliższe plany związane z realizacją projektu

Planowane zakupy:

- Analityczno-preparatywny system chromatografii wysokociśnieniowej wyposażony w detektory typu diode-array (absorpcyjny i fluorescencyjny), umożliwiające rejestrację widm absorpcji i emisyjnych frakcji w czasie rzeczywistym podczas rozdzielania chromatograficznego,
- Detektor zakresu NIR z układem chłodzenia ciekłym azotem, pozwalający na rejestrację emisji w zakresie od 400 do 1300 nm,
- Układ spektrofluorymetryczny do rozdzielczych w czasie pomiarów widm absorpcji i emisji, umożliwiający rejestrację zmian widmowych z rozdzielczością w zakresie pikosekundowym,
- Dwuwiązkowy fotometr do pomiarów aktywności motorycznej chloroplastów.

*Pracownicy Zakładu Biotechnologii Roślin
i Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin*

Bank komórek (Zadanie nr 7)

Zakłady i/lub Pracownie WBBiB UJ zaangażowane w realizację zadania

- Zakład Biologii Komórki,
- Pozostałe Zakłady Wydziału

Urządzenia zakupione w ramach projektu BMZ

- 2 zbiorniki na ciekły azot,
- zamrażarka programowalna.

Opis wybranych urządzeń

Bank komórek

System programowanego mrożenia i przechowywania komórek w ciekłym azocie umożliwia bezpieczne bankowanie cennych i unikatowych linii komórkowych, które są wykorzystywane w badaniach naukowych. System posiada właściwe certyfikaty umożliwiające bankowanie komórek ludzkich, wykorzystywanych klinicznie, hodowanych w Pracowni Inżynierii Komórkowej i Tkankowej. Pracownia, ubiegająca się obecnie o certyfikat GLP, jest w pełni wyposażona w aparaturę konieczną do prowadzenia hodowli komórkowych. Prowadzone w pracowni hodowle ludzkich komórek są wykorzystywane klinicznie i w badaniach podstawowych.

Najbliższe plany związane z realizacją projektu

W banku komórek będą przechowywane komórki pacjentów, które będą wykorzystywane w trakcie wieloetapowego leczenia oparzeń.

dr Justyna Drukała



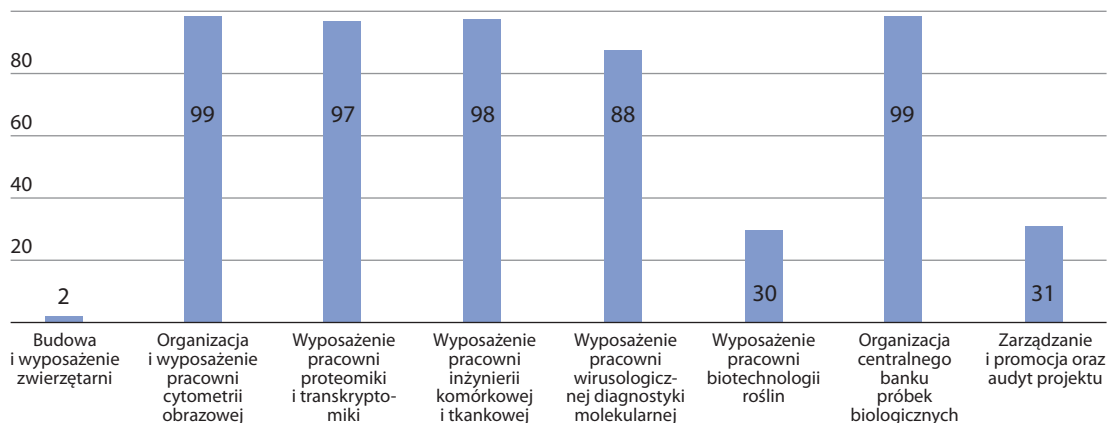
Bank komórek



Zamrażarka niskotemperaturowa

Podsumowanie kosztów

Do listopada 2010 roku w ramach projektu wydano 16 384 718, 66 zł, tj. 58% całości przyznanej dotacji. Procent wykorzystanych środków według zadań przedstawiono na wykresie.



Nr zadania	Nazwa zadania	Kwota zaplanowana (PLN)	Kwota wydana (PLN)
1	Budowa i wyposażenie zwierzętarni	6 868 963,00	119 741,06
2	Organizacja i wyposażenie pracowni cytometrii obrazowej	7 011 686,00	6 929 753,53
3	Wyposażenie pracowni proteomiki i transkryptomiki	5 215 030,00	5 036 675,60
4	Wyposażenie pracowni inżynierii komórkowej i tkankowej	864 842,00	846 900,73
5	Wyposażenie pracowni wirusologicznej diagnostyki molekularnej	1 009 402,00	889 698,28
6	Wyposażenie pracowni biotechnologii roślin	4 892 754,00	1 473 524,69
7	Organizacja centralnego banku przechowywania próbek biologicznych	549 117,00	541 263,95
8	Zarządzanie i promocja oraz audyt projektu	1 786 048,00	547 160,82
	RAZEM	28 197 842,00	16 384 718,66

W tabeli przedstawiono stopień realizacji zadań z uwzględnieniem zaplanowanych i wydanych kwot.

Redakcja:

Martyna Elas,
Józef Dulak,
Magdalena
Tworzydło

Kontakt:

martyna.elas@uj.edu.pl

Redakcja zastrzega sobie prawo skracania i adiestacji tekstów. Teksty nie podpisane pochodzą od Redakcji.

Logo:

Sebastian Szytuła

Projekt graficzny:

Klemens Knap

Skład i druk:

Quartis

Nakład: 200 egz.

egz. bezpłatny

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet
Jagielloński
Ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

Zespół koordynujący

prof. dr hab. **Józef Dulak** – kierownik projektu

prof. dr hab. **Alicja Józkowicz** – koordynator ds. budowy i wyposażenia zwierzętarni

dr **Krzysztof Pyrc** – koordynator ds. naukowych

mgr **Piotr Widerski** – koordynator ds. finansowych

mgr **Aneta Pazik** – specjalista ds. administracyjnych

dr hab. **Ryszard Gurbiel** – pełnomocnik Dziekana WBBiB UJ ds. inwestycji

Zapraszamy do odwiedzenia strony internetowej:

www.wbbib.uj.edu.pl/bmz

Kontakt: Prof. dr hab. Józef Dulak

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

ul. Gronostajowa 7,

30-387 Kraków

Tel. 012 664 63 75

Email: jozef.dulak@uj.edu.pl



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

