



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

MOLEKULÁRNÍ METODY V EKOLOGII MIKROORGANISMŮ (EKO/MMEM)

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE A GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Detekce molekul NK pomocí gelu

Izolaci NK ze vzorku nemusí být vždy úspěšná, proto je vhodné provést kontrolu před dalším pracováním. Ověření úspěšné izolace NK (přítomnost nebo nepřítomnost určitého fragmentu) se obvykle provádí pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Princip třídění molekul nukleových kyselin

Třídění molekul nukleových kyselin získaných izolací, je založeno na odlišnosti jejich velikosti (tj. počtu nukleotidů v řetězci). Samotný princip můžeme přirovnat ke třídění lidí různé velikosti pomocí průchodu hustým houštím. Pokud zajistíme pro všechny na startu stejné podmínky („stejně husté křoví“) i motivaci dostat se na druhou stranu houštiny, pak zjistíme, že první se prodrali nejmenší a nejštíhlejší jedinci. Naopak vysocí, případně obézní jedinci se houštím proderou nejpomaleji. Je to proto, že mezi nimi a křovím budou působit větší třecí síly, které budou brzdit jejich pohyb. Analogicky lze vytvořit takové prostředí také pro molekuly nukleových kyselin.

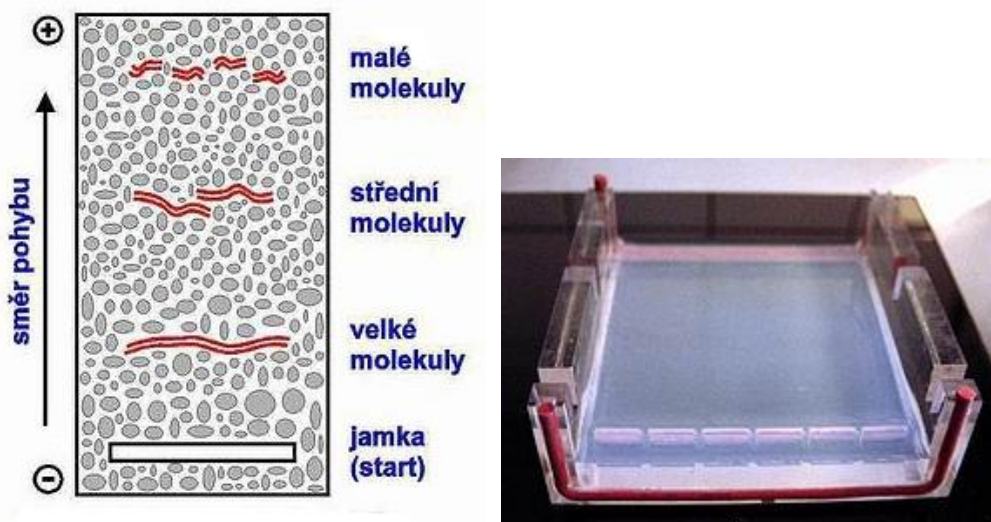
„Křoví“ vytvoříme pro nukleové kyseliny pomocí gelu. Gel je želatině podobná hmota, tvořená prostorovou sítí vláken určitého polymeru. Vytváří se tak určitý druh „molekulárního křoví“, volný prostor mezi vlákny polymeru je vyplněn vodným roztokem, ve kterém se rozpouští nukleové kyseliny. Motivaci pro pohyb molekul nukleových kyselin „křovím“ zajistíme pomocí tzv. elektroforézy - gel umístíme do elektrického pole mezi dvě elektrody - kladně a záporně nabitou. Protože jsou nukleové kyseliny *záporně* nabité, tak na ně v elektrickém poli působí síla, která je přitahuje ke *kladně* nabitě elektrodě. Dají se tedy do pohybu tímto směrem a „prodírají“ se přitom „molekulárním křovím“ gelu. Při průchodu

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

gelem dochází mezi molekulami a sítí polymerů ke tření, které je větší u velkých molekul a menší u malých molekul, jinými slovy, malé molekuly se pohybují rychleji, větší zaostávají. Od jamky na startu se molekuly pohybují přímým směrem ke kladné elektrodě (viz Obr. 1).



Obr. 1 Směr pohybu molekul NK v agarózovém gelu

Příprava gelu

Ke třídění molekul DNA se používá nejčastěji agarózový gel, pro menší molekuly pak také polyakrylamidový gel. Agarózový gel připravíme smícháním agarózy a TAE nebo TBE puftru. Takovouto směs zahřejeme a po zchladnutí na požadovanou teplotu nalijeme do připravené formy s hřebínkem. Po ochlazení a gelifikaci agarózy je hřebínek vyjmut z gelu a gel vyjmut z formičky, takže zůstává plátek gelu s jamkami po vyjmutém hřebínku. Tento gel je umístěn do elektroforetické vany s elektroforetickým pufrem (TAE, TBE). Do takto připraveného gelu můžeme vložit vzorky DNA. Koncentrace agarózy se volí v závislosti na velikosti fragmentů.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Nanášení vzorků na gel

Agarózový gel je umístěn vodorovně v elektroforetické vaně pod hladinou elektroforetického pufru (pozor na orientaci gelu vůči elektrodám, molekuly vždy putují ke kladné elektrodě).

Vzorky, obsahující nukleové kyseliny, je potřeba vpravit do jamek v gelu pipetováním. Nelze ovšem nanášet prostý vodný roztok NK, neboť velká část molekul by tak z jamek v gelu „vyplavala“ dřív, než bychom naplnili všechny jamky a spustili elektroforézu. Proto je nutné nukleové kyseliny nejdříve smístit s tzv. nanášecím pufrem, který je těžší než voda, takže v jamce klesne i s nukleovými kyselinami ke dnu a výrazně zpomaluje difúzi. Nejčastěji se používá roztok sacharózy - klesá ke dnu podobně, jako sirup lité do vody, kromě sacharózy obsahuje nanášecí pufr také tzv. sledovací barvivo. Toto barvivo umožňuje sledovat průběh elektroforézy, neboť se pohybuje podobně jako záporně nabitě molekuly nukleových kyselin směrem ke kladné elektrodě. Nejčastěji se jako sledovací barviva používají bromfenolová modř a xylen cyanol.

Po smísení můžeme vzorek pomalu vytlačit do jamky pod hladinou pufru. Pak je možné uzavřít elektrický okruh připojením ke stabilizovanému zdroji napětí - od té chvíle probíhá elektroforéza a molekuly DNA se pohybují rozdílnou rychlostí podle své velikosti. Elektroforézu je nutné vypnout v okamžiku, kdy jsou molekuly nukleových kyselin přiměřeně roztrženy. Pokud by elektrické pole působilo příliš dlouho, molekuly by z gelu vycestovaly až ke kladně nabitě elektrodě, kde by došlo k jejich degradaci.

Protože v některých případech neznáme velikost molekul, které třídíme, můžeme ji proto zjistit pouze srovnáním s velikostí známých molekul, které budou vystaveny stejným podmínkám třídění. Proto se při gelové elektroforéze používají tzv. markery molekulové hmotnosti - tzn. velikosti fragmentů. Tyto markery, nazývané také „ladder“ – žebřík, představují kalibrační škálu pro tříděné molekuly NK. Nejčastěji se používá krokový žebříček (*Step ladder*), jehož jednotlivé stupně mohou představovat 50 nebo 100 bp. Tento žebřík se zpravidla nanáší do první jamky v gelu.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Barvení gelu

Molekuly NK je možno po skončení elektroforézy nabarvit ponořením gelu v lázni s fluorescenčním barvivem, např. ethidium bromidem (EtBr). EtBr je fluorescenční barvivo, které se váže velmi intenzivně a specificky na nukleové kyseliny tak, že svou plochou molekulou interkaluje mezi ploché páry bází v molekule DNA, případně v dvouvláknových úsecích molekul RNA. Protože je EtBr potenciální kancerogen je nutné při práci s ním dodržovat bezpečnostní pravidla. Pokud takto nabarvený gel položíme do komory UV-transiluminátoru, který je plochým zdrojem UV-záření, molekuly DNA v gelu září.

Jestliže nemáme z předchozí zkušenosti odhad, kdy elektroforézu vypnout, je možné přidat ethidium bromid do tekutého roztoku gelu ještě před jeho vylitím do formičky. Barvivo je pak přítomné všude v gelu a DNA je nabarvená od začátku elektroforézy. Elektroforézu je pak možné kdykoli přerušit, vyjmout gel, prohlédnout na UV-transiluminátoru, zda jsou již molekuly DNA dostatečně rozděleny a případně gel vrátit do elektroforetické vany a pokračovat v elektroforéze. Koncentrace agarózy se volí v závislosti na velikosti fragmentů.

PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR = **P**olymerase **C**hain **R**eaction) = biochemická reakce, která využívá enzym DNA-polymerázu ke kopírování DNA takovým způsobem, že se produkt hromadí podobnou geometrickou řadou, jakou dochází k šíření rozpadu atomů při výbuchu atomové bomby. Je to metoda molekulární biologie pro enzymatickou replikaci DNA *in vitro* bez použití živých organismů. Metoda PCR se obvykle využívá v lékařských a biologických výzkumných laboratořích a příbuzných oborech pro diagnostiku dědičných onemocnění, infekčních onemocnění, určení otcovství, identifikaci osob v kriminalistice, klonování genu a další. Metoda PCR byla vynalezena americkým biochemikem Kary Banks Mullisem, který byl za tento objev v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

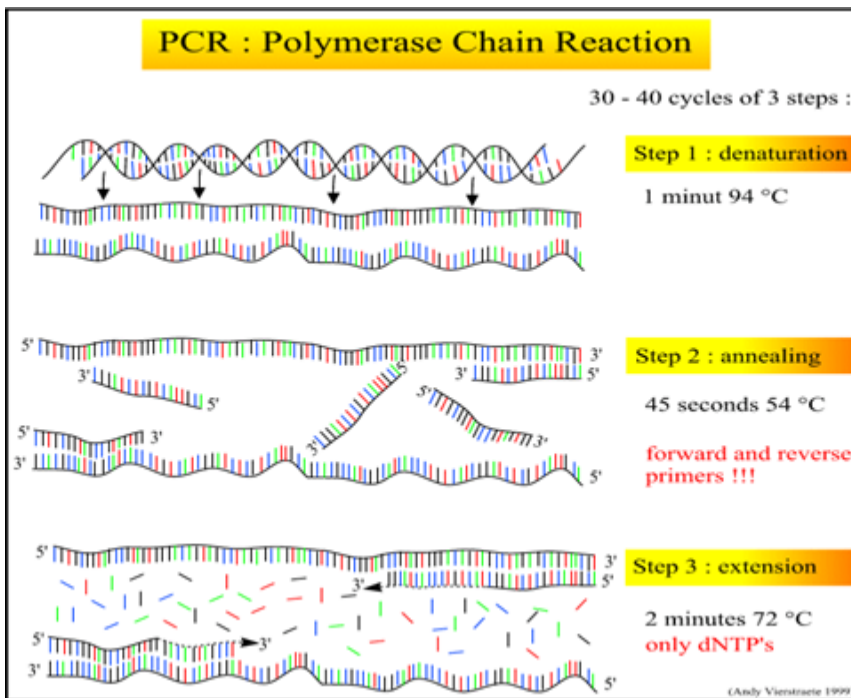
„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Princip PCR

PCR se používá na amplifikaci specifického úseku DNA. Mohou to být jednotlivé geny, části genu nebo nekódující oblasti, jejichž délka obvykle nepřesahuje 10 kb. Za určitých podmínek mohou být touto metodou amplifikovány fragmenty dlouhé až 3000 Mb (lidská chromozomální DNA).

Obr. 2 Schéma PCR



Reakce je založena na schopnosti DNA-polymerázy syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA. Polymeráza přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' > 3'. K syntéze je kromě templátového vlákna a nukleotidtrifosfátů potřeba také krátkého úseku druhého vlákna, tzv.

primeru. Primer tvoří za vhodných teplotních podmínek vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákne, dochází tedy k tzv. nasedání primeru. Poloha primeru v podstatě určuje DNA-polymeráze místo od kterého a kterým směrem (od 3'- konce primeru) má začít syntetizovat komplementární vlákno. Po nasednutí primeru tak dochází k tzv. extenzi primeru, tedy prodlužování primeru přidáváním dalších nukleotidů na jeho 3'- konci. Podle jednoho templátového vlákna tímto způsobem vznikne jen jedna kopie. Při PCR



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

však dochází k řetězovému hromadění produktu, což je zajištěno použitím dvou primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Máme-li tedy teoreticky na začátku k dispozici dvě templátová vlákna (jednu dvojevláknovou molekulu), pak vzniknou v prvním cyklu dvě kopie. Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou 4 kopie. Celkem osm templátových vláken slouží v dalším cyklu k syntéze dalších osmi vláken, takže se produkt hromadí geometrickou řadou. Ze 2 vláken získáme po 30 cyklech teoreticky celkem $2^{30} = 107\,370\,000$ kopií (tj. 107 milionů kopií ; viz Obr. 2).

Vlastnosti DNA-polymerázy a primeru

Protože na začátku každého cyklu je nutné denaturovat templátovou DNA vysokou teplotou, která ničí normální DNA-polymerázy, musíme při PCR používat tzv. termostabilní polymerázy. Tyto enzymy pocházejí z bakterií, adaptovaných na extrémní podmínky (např. hluboká moře poblíž ústí podmořských sopek) a jejich proteinová struktura je evolucí uzpůsobena tak, že odolává po určitou dobu i teplotám kolem 95 °C. Nejčastěji se používá tzv. Taq-polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*. Dnes používané termostabilní polymerázy jsou dále vylepšeny metodami genové manipulace tak, aby byly ještě odolnější a lépe vyhovovaly svému použití v PCR.

Pro každou PCR, která má za cíl amplifikovat konkrétní úsek templátové DNA, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu primerů musíme zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě jen na přesně komplementární sekvenci v templátové DNA. Kdyby nasedaly nejen na přesně komplementární sekvence, tedy i jinde v templátové DNA, nedošlo by k efektivní amplifikaci zvoleného úseku. Proto musejí mít oba primery shodnou, nebo téměř shodnou teplotu tání. Ta závisí na délce molekuly (delší molekula = více vodíkových můstků



evropský
sociální
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

= větší energie nutná k denaturaci) a na její sekvenci, přesněji řečeno na poměru G-C párů a A-T párů v sekvenci (mezi G-C jsou tři vodíkové můstky, mezi A-T jen dva, proto čím více G-T párů, tím vyšší teplota tání). Vlastní teplota nasedání primerů musí pak být o něco nižší, než teplota tání - pokud bychom použili přímo teplotu tání, bylo by nasednutí příliš nestabilní. Primery nesmí také tvořit tzv. dimery a vlásenky, které vznikají spárováním dvou primerů navzájem a PCR tak neproběhne.

PCR v praxi

Proces PCR reakce probíhá v termocycleru, v přístroji, který dokáže přesně střídat jednotlivé teplotní kroky reakce. Z důvodu možného odpaření reakčního mixu (obvyklý objem je v rozmezí 15-100 μ l v 1 mikrozkuhavce) se používají termocyclery s vyhříváním víkem. Obvykle se sestavuje reakční směs tzv. „na ledu“, tzn. že mikrozkuhavka je stále chlazená na teplotu mírně nad 0 $^{\circ}$ C, aby se zabránilo předčasné aktivitě Taq-polymerázy. Při laboratorní teplotě totiž mohou primery nespecificky nasednout na místa, která neodpovídají zcela jejich sekvenci a Taq-polymeráza by mohla zahájit jejich extenzi. Reakční směs by tak mohla být hned zpočátku obohacena o nespecifické produkty, které by v pozdějších krocích snižovaly účinnost reakce, příp. by vedly ke vzniku zcela chybných produktů. Dokonale lze toto riziko eliminovat jen tzv. horkým startem reakce. Protože Taq-polymeráza nefunguje bezchybně a může se někdy z templátového vlákna předčasně uvolnit a mohou tak vznikat neúplné produkty, provádí se na závěr ještě tzv. konečná extenze.

Komponenty reakční směsi:

1. **DNA templát** - dvouvláknová genomová či komplementární DNA
2. **dva oligonukleotidové primery** - ohraničují začátek a konec amplifikované oblasti
3. **Taq - polymeráza** (nebo jiná tepelně odolná polymeráza) - DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' > 3'



evropský
sociální
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

4. **deoxynukleotid-trifosfáty** – za účasti DNA polymerázy jsou zabudovány do nového DNA řetězce

5. **pufr** - poskytuje stálé chemické prostředí pro DNA polymerázu

Schéma reakce:

Každý cyklus obsahuje tři kroky:

1. **denaturaci** (94 - 98°C) po dobu 10 s – 2 min.
2. **naedání primeru** – annealing (přibližně o 5°C nižší než T_m) po dobu 15 s – 1 min.
3. **prodlužování vláken** – elongace (teplota je závislá na použité DNA polymeráze, rozmezí 68 - 72°C), doba je také závislá na použité polymeráze a na délce amplifikovaného fragmentu (20 s – 1 min.). PCR reakce je zakončena koncovou elongací, která slouží k dokončení syntézy neúplných řetězců (3 – 15 min., někdy i déle).

Výsledek PCR amplifikace lze opět detekovat na gelu, tzn. že se vzorek reakční směsi nanese na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a podrobí se elektroforéze (viz kapitola elektroforéza). Pokud primery nasedaly jen na vybraná protisměrně umístěná místa, vznikly jako produkt reakce molekuly stejné sekvence a délky, dané vzdáleností míst, na které nasedaly primery. Při dělení v gelu budou všechny tyto molekuly putovat stejnou rychlostí a po obarvení a zobrazení uvidíme jen jeden pruh, jehož molekulová hmotnost odpovídá při srovnání se standardem předpokládané délce molekuly. Pokud není zobrazen žádný pruh, polymerázová řetězová reakce neproběhla, pokud je zobrazeno více pruhů, tak sice PCR proběhla, ale primery nasedaly na více místech, které byly shodou okolností také orientovány protisměrně, takže došlo k amplifikaci více produktů. V takovém případě je nutné optimalizovat podmínky reakce.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR)

Principem real-time PCR je rychlé a přesné zaznamenávání množství produktu PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu reakce. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Tato metoda se od klasické metody PCR liší přesným určením množství produktu měřením nárůstu fluorescence během vlastní PCR reakce. Vzrůstající množství DNA ve vzorku je přímo úměrné narůstající fluorescenci. K měření fluorescence se využívají specificky značené sondy – próby (TaqMan sonda) nebo nespecifická (SYBR Green, LC Green) fluorescenční barviva. Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozařovat vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně - v reálném čase - množství uvolněné fluorescence, odpovídající množství vzniklého produktu.

POSTUP: Polymerázová řetězová reakce (PCR)

1. Připravíme si a popíšeme 0,2 ml mikrozkušavku pro každý vzorek + mikrozkušavku pro pozitivní a negativní kontrolu.
2. Mikrozkušavky vložíme do chladicího stojánu a do každé zkušavky napipetujeme 23,5 μ l nebo 47 μ l směsi „master mix“ (viz níže).
3. Do každé mikrozkušavky přidáme k master mixu 3 μ l patřičného vzorku templátové (vyextrahované) DNA; v případě *negativní* kontroly použijeme místo vzorku deionizovanou ultračistou vodu, pro *pozitivní* kontrolu používáme zpravidla vzorek vyextrahované DNA, o níž víme, že bude detekovatelná připraveným párem primerů.
4. Směs ve zkušavkách jemně promícháme poklepáním prstů a poté centrifugujeme 15 s při 10 000 x g (*Minispin* s adaptérem pro 0,2 ml zkušavky).
5. Poté mikrozkušavky vložíme do termocykleru (cycler s vyhříváním nastavitelným víkem), víko přiklopíme a uzavřeme šroubem.
6. Na cycleru nastavíme požadovaný program (viz níže). cca 30 cyklů (denaturace 94°C - 1 min; anelace 55°C - 1 min; extenze 72°C - 2 min; závěrečný cyklus 72°C - 20 min; chlazení 10 min).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

7. Po cca 3 hodinách mikrozkušky vyjmeme a provedeme kontrolu PCR produktů pomocí gelové elektroforézy (viz postup elektroforéza), přičemž použijeme cca 5-10 μ l vzorku.
8. PCR produkty uchováváme při teplotě -20°C a je možné je použít pro další analýzy.

Příprava „master mix“		
	1 x 25 μ l	1 x 50 μ l
H₂O	18,7	37,4
puf	2,5	5
F primer	0,6	1,2
R primer	0,6	1,2
dNTP	0,6	1,2
Taq - polymerase	0,5	1
Mater mix	23,5	47
	+ 1,5 μ l DNA	+ 3 μ l DNA
celkem	25 μ l	50 μ l

Při přípravě master mix je třeba dbát na sterilit prostředí, pracujeme proto ve sterilním PCR-boxu a v rukavicích

Primery pro PCR:

Byly použity primery pro detekci domény *Bacteria*

Forward-primer 968-gc:

5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC
GAA GAA CCT TAC-3'

Reverse-primer 1378: 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'

Celková délka PCR produktu je cca 400 bp

Pozn. zeleně je označena GC-kotva, nezbytná u primerů používaných pro denaturační gradientovou gelovou elektroforézu (DGGE)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Nastavení PCR cyklu			
krok	doba	teplota	počet cyklů
počáteční denaturace	4 min	95°C	1 cyklus
denaturace	1 min	95°C	35 cyklů
annealing	1 min	55°C	
elongace	2 min	72°C	
závěrečná elongace	20 min	72°C	1 cyklus
chlazení	nekonečno	4°C	

Gelová elektroforéza

1. Do skleněné kádinky odvážíme 1 g agarózy a doplníme do 75 ml 1x TAE pufrem. Získáme tak 1,5% agarózu.
2. Promícháme, kádinku pokryjeme potravinovou folií, kterou propícháme.
3. Poté umístíme kádinku do mikrovlnné trouby na 2-5 min při středním výkonu, mezitím několikrát promícháme. Roztok povaříme. Jakmile dojde k varu, rychle vytáhneme, zamícháme a opakujeme, dokud roztok není čirý.
4. Po zchladnutí na požadovanou teplotu (cca 50°C), přidáme ke gelu 50 µl roztoku EtBr (výchozí konc. 500 µg/ml)
Pozn. EtBr je potenciální karcinogen a mutagen. Přidávání tohoto barviva do gelu je tedy nutno provádět v digestoři a v ochranných nitrilových rukavicích.
5. Gel nalijeme do gelových forem s hřebeny.
6. Jakmile gel ztuhne, vyjmeme hřeben a gel vložíme do elektroforetické vany naplněné pufrem 1x TAE až po značku MAX. Je také třeba dodržet správnou orientaci gelu vůči elektrodám!
7. Připravíme si pruh parafilmu, na nějž nanese kapky nanášecího pufru (loading dye), jedna kapka ~ cca 2-3 µl barviva. Každou kapku barviva poté pipetou smícháme s 5 µl vzorku.
8. Takto připravené vzorky nanášíme pomocí pipety do jamek v gelu, přičemž prvním naneseným vzorkem je 5 µl markeru (1Kb DNA step ladder; nanášené množství závisí na koncentraci od výrobce)
9. Nasuneme víko s koncovkami a zapneme zdroj napětí. Necháme běžet elektroforézu 45 minut/95 V power
10. Po skončení elektroforézy přeneseme gel do komory transiluminátoru (*Elettrofor – Photo Gel System*) a vyfotíme.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Příprava Buffer TAE (50x) stock solution

Tris base.....121 g
0,5 M EDTA; pH 8.....50 ml
ledová kyselina octová.....28,55 ml
množství ~ 0,5 l pufru; všechny složky odvážit a odměřit, rozpustit
v cca 200 ml a pak doplnit do 500 ml
u ledové kys. octové upravit pH na 7,8 pomocí kys. octové

Buffer TAE (1x) working solution

50x TAE stock buffer => 1x TAE buffer
Ředění 1:50 => 1 díl 50x TAE + 49 dílů vody

např. na 2 l 1x TAE => 2 000 ml : 50 = 40 ml ~ 1 díl
tzn: 40 ml 50x TAE + 1960 ml vody

Lze použít také TBE buffer (obsahující kys. boritou), který se používá zpravidla pro delší fragmenty.

Potřebný materiál:

pracovní rukavice
pracovní nitrilové rukavice
skleněná kádinka
potravinová folie
parafilm
mikrozkumavky 0,2 ml
chladicí stojánek
pipeta 20-200 μ l + špičky
pipeta 2-20 μ l + špičky
pipeta 0,2-2 μ l + špičky
stopky
pomůcky k vážení

Chemikálie:

agaróza
roztok EtBr
6x loading dye
step ladder (marker)
1 M tris base
0,5 M EDTA (pH 8)
ledová kys. octová příp. boritá
FastStart Taq Polymerase dNTPack
primer 968F-gc
primer 1378R
templátová DNA
ultračistá voda pro PCR



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Použité zdroje a literatura:

- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellinton EMH (1997) Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. Appl Environ Microb 63(8): 3233–3241
- Sborník textů: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Kolektiv autorů, 2008. Ústav dědičných metabolických poruch VFN Praha.
- <http://biologie.upol.cz/metody/>
- <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa7.htm>