PRACOVNÍ PROTOKOL PRO METODY MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÉ BIOLOGIE

Název úlohy: *Demostrace a srovnání zvyšování koncentrace DNA produktu během jednotlivých cyklů PCR*

Použité přístroje: horizontální elektroforéza se zdrojem
Proffesional Basic Gradient Termocycler (Biometra)
gelový dokumentační systém (GDS)

Pracovní pomůcky: jednokanálové pipety Nichiryo
spotřební plast – špičky, mikrozkumavky pro PCR

Použité chemikálie: Promega GO Taq-polymeráza s pufrem, směs dNTPs Serva, oligonukleotidy pro specifickou PCR amplifikaci jaderné DNA (ITS), genomová DNA *Nicotiana benthamiana* izolovaná kitem DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen), protřeby pro agarózovou elektroforézu (agaróza, TAE pufr, roztok ethidium bromidu

Pracovní postup:

1. Namíchat reakční směs podle tabulky. Všechny komponenty, které byly zamrazeny (vyjma polymerázy), je potřeba po rozmrazení promíchat pomocí vortexu:

14 x 15 µl	**1 reakce**	**14 reakcí**
Ultračistá voda	10,1 µl	**151,5 µl**
Pufr pro Green *Taq* (Promega)	3,0 µl	**45 µl**
dNTPs (12,5 mM)	0,1 µl	**1,5 µl**
Primer ITS1 (10 pmol/µl)	0,6 µl	**9 µl**
Primer ITS4 (10 pmol/µl)	0,6 µl	**9 µl**
Taq DNA-polymeráza (5U/µl) (Promega)	0,1 µl	**1,5 µl**
Templátová DNA	0,5 µl	**7,5 µl**
Rozpipetovat 12 x 15 µl	**15 µl (součet)**	**225 µl (součet)**

2. Promíchat reakční směs pomocí vortexu.
3. Rozdělit reakční směs po 15 µl do 12 zkumavek pro PCR (0,2 ml) označených 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 a 33.
4. Zkumavky vložit do termocykleru a spustit program:

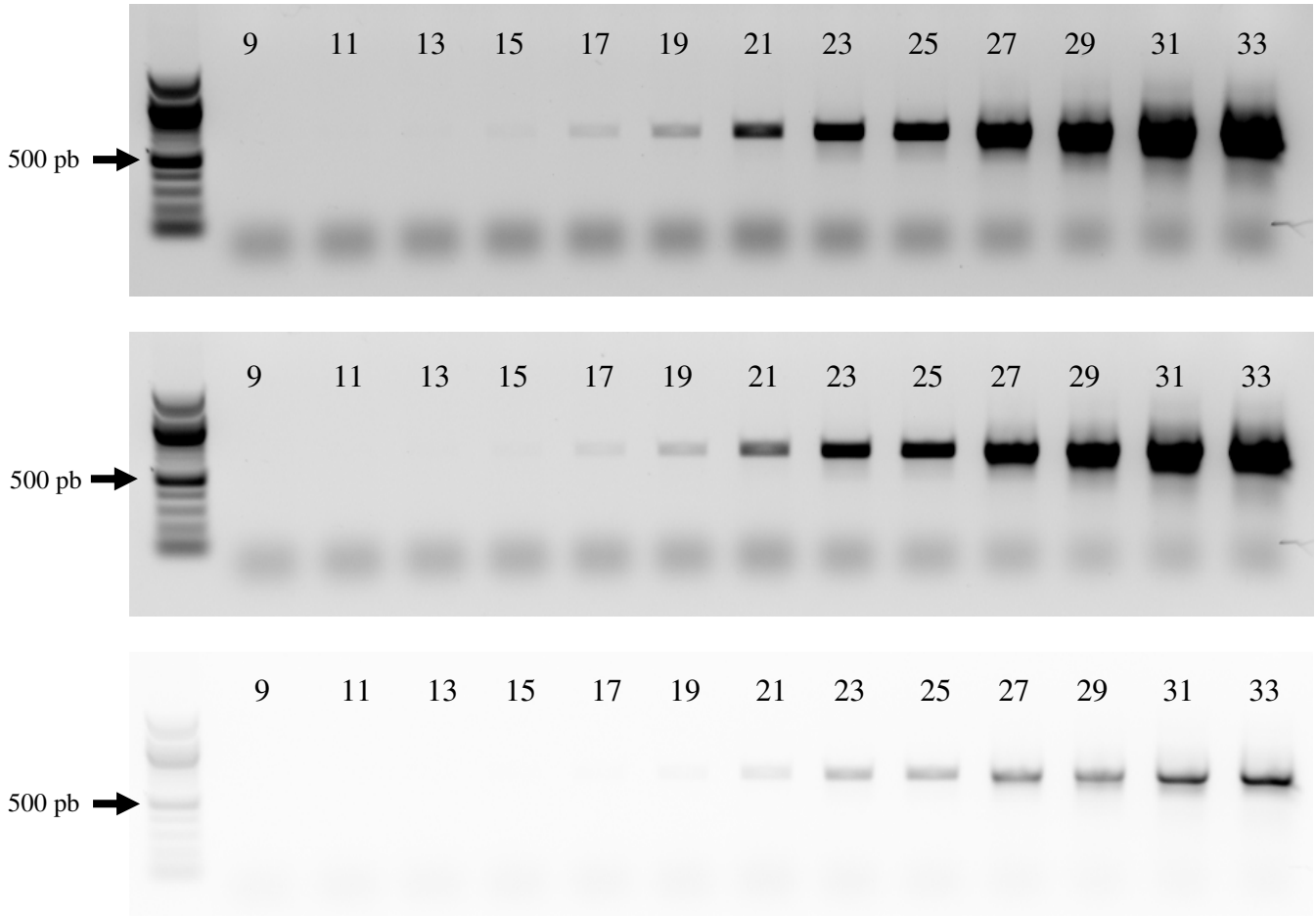
Cyklus č.	**Počet opakování**	**Teplota (°C)**	**Čas**
1	1	94	3 min
2	35	94	30 sec
		57	30 sec
		72	30 sec
3		16	∞

Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízená z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“

5. V průběhu PCR reakce odebírat zkumavky po cyklech 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 a 33.
6. Odebrané PCR zkumavky uchovávat v chladničce.
7. Po skončení programu rozdělit produkty PCR pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu obarveného ethidium bromidem.
8. Gel nasnímat pomocí gelového dokumentačního systému (GDS).
9. Produkty PCR kvantifikovat pomocí software. Vyhodnotit úspěšnost semikvantitativní PCR.

Výsledky

Gel byl nasnímán při třech různých expozičních podmínkách



Na elektroforetogramu s produkty PCR oblasti ITS s primery ITS1 a ITS4 lze pozorovat nárůst amplifikovaného produktu PCR. První náznaky amplifikovaného produktu na elektroforetogramu jsou po 15 cyklu PCR v případě snímku s nejvyšší expozicí. Stoupající koncentraci DNA, která je přímo úměrná fluorescenci ethidium bromidu v UV záření, můžeme pozorovat až do konce PCR (cyklus 33), v konečných cyklech je patrná kulminace nárůstu amplifikovaného produktu PCR.

Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízená z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“