Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin

Detekce polymorfizmu DNA tritikale (X*Triticosecale* Wittmack.) mikrosatelitními markery

Metodické návody pro laboratorní cvičení z předmětu
Genetika F (GENF)
a Molekulární analýzy rostlinného genomu (MARG)
Vypracováno v rámci projektu FRVŠ MŠMT 6/2010/ F4a.

ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

2010

Předmětem praktického laboratorního cvičení z předmětu Genetika F (GENF) je seznámení studentů s jednotlivými kroky detekce mikrosatelitních (SSR – Simple Sequence Repeats) markerů u tritikale (X*Triticosecale* Wittmack.).

Při detekci variability mikrosatelitů jsou detekovány opakující se motivy, které vykazují těsnou vazbu s konkrétními geny. Tandemové repetice 1-5ti nukleotidů v počtu opakování 10-60x (GA)n, (A)n, (CAG)n, aj. jsou označovány jako mikrosatelity. Obvykle se tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech, protože by měnily čtecí rámec odpovídajícího bílkovinného produktu.

Mikrosatelitní markery se vyznačují následujícími vlastnostmi:

- vysoký stupeň polymorfizmu,
- jsou relativně rovnoměrně zastoupeny po celém genomu,
- jsou kodominantní,
- jsou založeny na PCR,
- vyžadují minimální množství analyzované DNA.

Jednotlivé kroky metodiky detekce SSR markerů zahrnují:

1) napěstování rostlinného materiálu,
2) odběr, uchování a homogenizace rostlinného materiálu,
3) izolace DNA,
4) stanovení kvality, popř. kvantity vyizolované DNA (kontrolní elektroforéza),
5) příprava mastermixu a vlastní průběh PCR (SSR),
6) elektroforetická separace produktů po proběhlé PCR (SSR),
7) dokumentace a vyhodnocení získaných výsledků,
8) statistické zpracování výsledků.

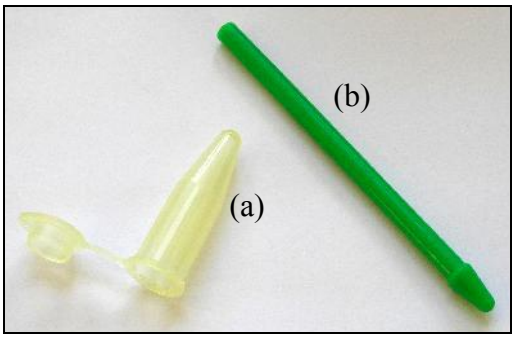
Studenti se postupně seznámí se všemi výše uvedenými kroky počínaje bodem 2. První krok, tj. napěstování rostlinného materiálu nebude součástí cvičení a bude proveden s časovým předstihem tak, aby v den cvičení byly studentům k dispozici mladé zelené rostlinky ve fázi jednoho listu. Tyto pak budou použity jako vlastní experimentální materiál pro izolaci DNA a následnou analýzu DNA markerů.

2. Odběr, uchování a homogenizace rostlinného materiálu

Množství experimentálního materiálu, jež je potřeba navážit pro izolaci DNA, značně závisí na zvolené metodice izolace DNA. V našem případě bude izolace DNA prováděna pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit od f. Qiagen. Tato metodika předpokládá navážku cca 100 mg čerstvého rostlinného materiálu.

Příslušné množství rostlinného materiálu (cca 100 mg) odvážíme na analytických vahách, nůžkami mladé rostlinky rozstříháme na menší části a přeneseme do připravené 1,5 ml mikrozkumavky typu eppendorf (obr. 1a).

Ihned po tomto kroku následuje zmrazení rostlinného materiálu. Toho dosáhneme ponořením mikrozkumavky do kapalného dusíku, který máme připraven ve speciální PVC misce. Homogenizaci zmrzlého rostlinného materiálu provedeme speciální drtičkou (obr. 1b). Cílem homogenizace je dokonale rozdrcení zmrzlého experimentálního materiálu tak, aby získal formu světle zeleného prášku. Během drcení je třeba dbát na to, aby byl rostlinný materiál neustále ve zmrzlém stavu, tzn. je nutné opakované ponořování mikrozkumavky s rostlinným materiálem do kapalného dusíku.



Obr. 1 (a) - 1,5 ml mikrozkumavka typu eppendorf, (b) - drtička

3. Izolace DNA z rostlinného materiálu

Izolace rostlinné DNA bude probíhat formou bezfenolové extrakce za pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Jedná se o poměrně časově i manuálně nenáročný postup. Cílem vlastní izolace DNA je získání DNA v dostatečném množství a dostatečné čistotě (oproštěné od příměsí jako jsou bílkoviny, polysacharidy, soli, RNA apod.).

Vlastní izolace DNA bude prováděna podle následujícího postupu:

- k dokonale zhomogenizovanému rostlinnému materiálu přidáme pomocí automatické pipety (příloha 1) 400 µl pufru AP1 (*pufr vyvolávající lyzi buněk*) a 4 µl Rnázy (*enzym degradující nežádoucí RNA*), celý obsah mikrozkumavky pak důkladně promícháme na vortexu (příloha 2),
- po té vložíme mikrozkumavky na dobu 10 minut do vodní lázně o teplotě 65°C, během inkubace zkumavky 2 – 3x protřepeme,
- následně přidáme 130µl pufru AP2, zvortexujeme a inkubujeme 5 minut na ledu,
- v mezičase si připravíme mikrozkumavky s fialovými kolonkami a po uplynutí potřebné doby přepipetujeme celý obsah původní mikrozkumavky do fialové kolonky,
- mikrozkumavky centrifugujeme 2 minuty na stolní chlazené odstředivce (příloha 5) při 18 000 ot./min.,
- po centrifugaci odstraníme fialovou kolonku a napipetujeme 400 µl tekuté frakce do nové 1,5 ml mikrozkumavky, následně přidáme 600 µl pufru AP3/E (*pro vysrážení DNA a její zachycení na membráně kolonky*) a jemně promícháme,
- 650 µl takto připravené směsi přeneseme na bílou kolonku nové mikrozkumavky (*membrána je tvořena křemičitým sklem, na které se navazuje DNA*) a centrifugujeme 1 minutu při 6 000 ot./ min.,
- po centrifugaci odstraníme tekutý podíl z mikrozkumavky (*DNA je zachycena na membráně kolonky*) a do téže mikrozkumavky napipetujeme zbylých 350µl připravené směsi,
- znovu centrifugujeme 1 minutu při 6000 ot./min. a po centrifugaci tekutý podíl odstraníme,
- bílou kolonku následně umístíme do nové mikrozkumavky a připipetujeme 500µl pufru AW (*promývací pufr*), centrifugujeme 1 minutu při 6000 ot./min.,
- po centrifugaci tekutou frakci odstraníme a znovu přidáme 500 µl pufru AW,
- provedeme centrifugaci po dobu 2 minut při 18 000 ot./min.,
- následně umístíme bílou kolonku do nové mikrozkumavky a přidáme 100 µl předehřátého pufru AE (*„uchovávací pufr“ s nízkým obsahem solí*) necháme inkubovat po dobu 5 min. při labolatorní teplotě a po té centrifugujeme 1 minutu při 6000 ot./min.,
- po centrifugaci znovu do systému přidáme 50 µl předehřátého pufru AE a centrifugujeme jednu minutu při 6000 ot./min.,
- po centrifugaci odstraníme bílou kolonku a mikrozkumavku uzavřeme víčkem.

4. Stanovení kvality, popř. kvantity vyizolované DNA

Ve cvičení bude provedeno pouze stanovení kvality vyizolované DNA, a to prostřednictvím elektroforetické separace vzorků DNA na 1 % agarózovém gelu na horizontální elektroforéze (tzv. kontrolní elektroforéza).

Stanovení kvantity DNA je možno provést spektrofotometrickým měřením při vlnové délce A_{260}= 260nm.

Prvním krokem kontrolní elektroforézy je příprava nosného média, tj. agarózového gelu. Tato bude probíhat podle následujícího postupu:

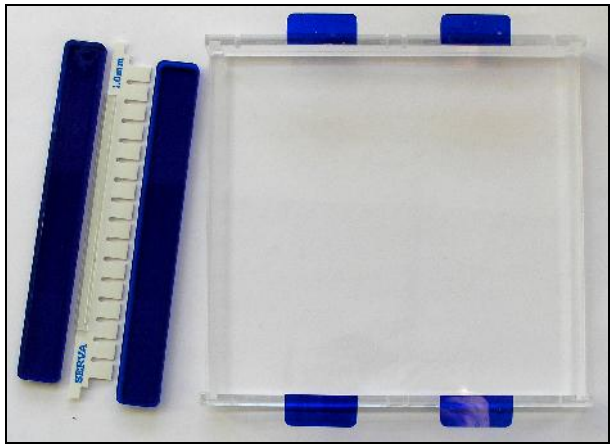
1) odměříme si 357 ml destilované vody a smísíme ji se 7 ml 10x TAE (trisacetátový pufr, pH= 8,5); směs důkladně promícháme skleněnou tyčinkou,
2) ze směsi odlejeme přesně 70 ml do připravené nádoby a přidáme 0,7 g agarózy, kterou jsme odvážili na analytických vahách; celý obsah nádoby krouživým pohybem ruky promícháme,
3) směs v nádobě dáme na dobu cca 3,5 minut povařit do mikrovlné trouby,
4) v mezičase sestavíme vaničku pro nalévání gelu a hřebínek pro tvorbu jamek, do nichž pak budeme nanášet vzorek DNA (obr. 2),
5) jakmile bude agaróza dostatečně povařená nalijeme ji do vaničky a nasadíme hřebínek; gel pak necháme tuhnout po dobu minimálně půl hodiny,
6) v době tuhnutí gelu si připravíme vzorky DNA pro nanášení na gel. Vzorek DNA v množství 12 µl smísíme s 2 µl nanášecího (loadovacího) pufru. Význam použití loadovacího pufru spočívá ve zhuštění nanášeného vzorku, díky kterému je pak samotné nanášení snazší (vzorek snadněji klesá ke dnu jamky) a zároveň umožňuje vizualizaci vzorku při jeho průchodu gelem.

   Současně s přípravou vzorků se připravuje také velikostní standard (ladder) díky němuž je po stanovení možné odvodit velikost získaných fragmentů prostým srovnáním. Velikostní standard se připravuje obdobně jako vzorky, tj. smísením 12µl deionizované vody, 2 µl loadovacího pufru a 1 µl zásobního roztoku ladderu.
7) Je–li agarózový gel dostatečně ztuhlý a jsou – li vzorky a velikostní standard připraveny, je možno začít s nanášením vzorků na gel,
8) nejprve ze ztuhlého gelu odstraníme hřeben, pak jej umístíme do elektroforetické vany a vanu naplníme elektrodovým pufrem,

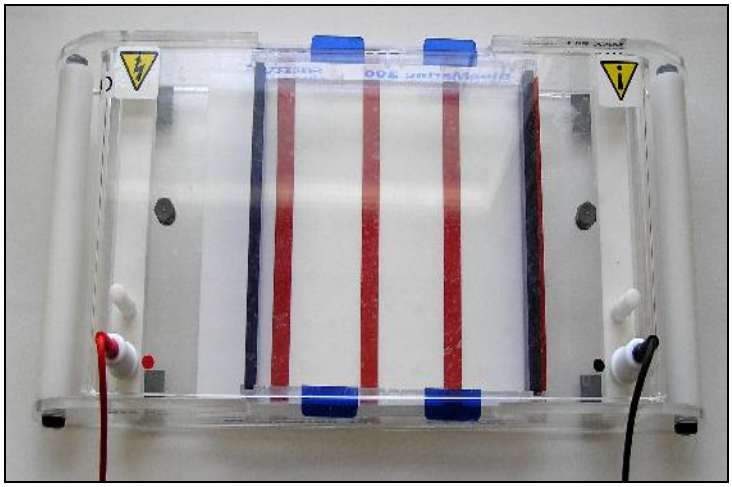
9) postupně pak do jednotlivých jamek nanášíme připravené vzorky v množství cca 14 µl. Jako prvý v řadě bývá většinou nanášen velikostní standard,

10) jsou–li všechny vzorky naneseny, nasadíme na vanu elektroforézy bezpečnostní víko a zapneme zdroj stejnosměrného napětí. Elektroforetické stanovení bude probíhat při 72 V po dobu cca 45 minut (obr. 3).

    Po uplynutí této doby zdroj napětí vypneme, sundáme bezpečnostní víko elektroforézy a gel přeneseme na transiluminátor, která nám umožní vizualizaci získaných produktů. Chceme –li výsledek analýzy zdokumentovat je možné použít fotoaparát Polaroid nebo zařízení s CCD kamerou (příloha 3).



Obr.2 Elektroforetická vanička, postranní zarážky, hřebínek



Obr. 3 Sestavená horizontální elektroforetická aparatura

5. Příprava master mixu a vlastní průběh PCR

Z níže uvedených komponent si připravíme mastermix neboli reakční směs. Mastermix se zpravidla připravuje v objemu o jeden větší než jaký je počet analyzovaných vzorků (tj. máme–li 7 vzorků, připravíme mastermix pro vzorků 8). Mastermix připravujeme postupným pipetováním a promícháváním jednotlivých komponent v 1,5 ml mikrozkumavce. Jednotlivé reagencie je potřeba před samotným použitím promíchat (zejména však primery a dNTP).

Potřebné objemy komponent pro 1 vzorek (pro více vzorků je potřeba příslušná množství reagencií vynásobit počtem vzorků + 1):

počet vzorků / složka reakce (µl)	1	2	3	4	5	6
deionizovaná H_2O	16,8	33,6	50,4	67,2	84	100,8
pufr	5	10	15	20	25	30
dNTP	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
primer začínající	1	2	3	4	5	6
primer končící	1	2	3	4	5	6
DNA *Taq* polymeráza	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6

Pro praktocké cvičení byly vybrány následující 4 SSR markery tritikale (tab. 1), které se vyznačovali nejvyšším stupněm polymorfizmu při testovacích analýzách (z 20 SSR markerů):

7 různě velikých amplionů (tzv. alel) – *Xbarc195* a *Xbarc170*,

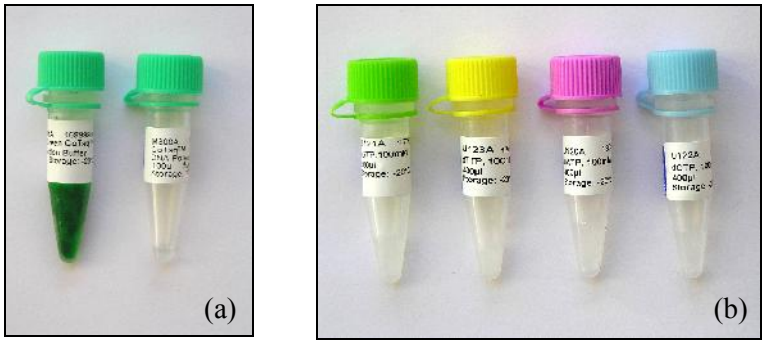
6 alel – *Xbarc004* a *Xbarc024*.

Tab. 1 Charakteristika používaných SSR markerů

SSR marker	Lokalizace	Průměrná velikost	Motiv	Primer -for (5´- 3´)	Primer -rev (5´- 3´)
Xbarc004	5B	158	(TTA)n	GCG TGT TTG TGT CTG CGT TCT A	CAC CAC ACA TGC CAC CTT CTT T
Xbarc024	6B	188	(TCA)n(TAA)n	CGC CTC TTA TGG ACC AGC CTA T	GCG GTG AGC CAT CGG GTT ACA AAG
Xbarc170	4A	231	(ATT)n	CGC TTG ACT TTG AAT GGC TGA ACA	CGC CCA CTT TTT ACC TAA TCC TTT TGA A
Xbarc195	6A	163	(TTA)n(TTAA)n	CCC ACA TGT CAT TGG CTG TTT AA	GCC CGG CCC AGA ACG ATT TAA ATG

Připravený mastermix budeme v množství 24 µl rozpipetovávat do jednotlivých 0,2 ml PCR mikrozkumavek. Do každé mikrozkumavky s mastermixem pak ještě připipetujeme 1 µl analyzovaného vzorku DNA (templátová DNA). Celkový objem v mikrozkumavce tak bude činit 25µl. Po napipetování mikrozkumavku pečlivě uzavřeme a umístíme do jamky

termocycleru (příloha 4). Jsou–li všechny analyzované vzorky umístěny v termocycleru, uzavřeme víko komory termocycleru a spustíme teplotní a časový program příslušné reakce.



Obr. 4 (a) - *Taq* polymeráza + barvený pufr (Promega, USA), (b) - zásobní roztoky jednotlivých nukleotidů (Promega, USA)

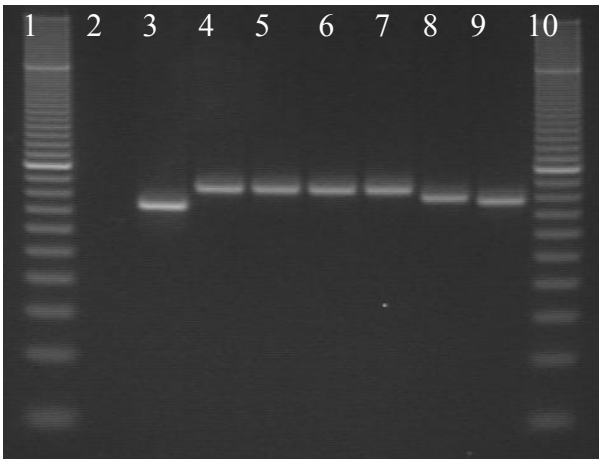
Teplotní a časový profil PCR reakce:

Iniciační denaturace	93°C	120 s.
Denaturace (*rozvolňování vláken*)	93°C	60 s.
Annealing (*nasedání primerů*)	54°C	120 s.
Elongace (*prodlužování primerů*)	72°C	120 s.

6. **Elektroforetická separace produktů po proběhlé PCR**

a) separace produktů PCR reakce pomocí agarózového gelu (kontrolní elektroforéza)

Po doběhnutí příslušného teplotního a časového programu v termocycleru se vytvořené produkty PCR podrobí horizontální elektroforetické analýze obdobného charakteru jako v případě kontrolní elektroforézy. Znovu se tedy připravuje agarózový gel o koncentraci 1%, který se barví ethidium bromidem. Elektroforéza probíhá při 70 V po dobu cca 45 minut. Na ní pak navazuje vizualizace na transiluminátoru a dokumentace na zařízení s CCD kamerou. Při prosvícení gelu UV světlem transiluminátoru by mělo být u velikostního standardu patrné ostré spektrum fragmentů a u analyzovaných vzorků DNA jeden výrazný fragment (obr.5). Analýza slouží k výběru vhodných vzorků pro separaci elektroforetických produktů pomocí polyakryamidového gelu (viz. b).



Obr. 5 Ukázka elektroforeogramu - 1,10 – velikostní standard (20bp), 2 – negativní kontrola, 3 – 9 produkty PCR reakce (*Xbarc004*) o různých velikostech (140 – 160 bp)

b) separace výsledků PCR reakce pomocí polyakrylamidového gelu (8% PAA)

Sestavení elektroforetických desek

Pro sestavení použijeme dokonale čisté elektroforetické desky (1 desku s mezerníkem, 1 desku s drážkami). Na skleněnou desku s drážkami položíme silikonové těsnění a shora přiklopíme deskou se spacerem. Sestavu po bocích sepneme malými svorkami (na každou stranu použijeme 3 ks malých svorek), spodní část sestavy sepneme velkými svorkami (příloha 6).

Příprava PAA gelu

Pro přípravu 50 ml polyakrylamidového gelového roztoku (1 soustava desek = 1 gel) smísíme:

34,65 ml	destilovaná voda
5 ml	10x TBE
10 ml	zásobní roztok akrylamidu/bisakrylamidu
334 µl	10% roztoku persíranu amonného (APS)
334,5 µl	TEMED

Směs na míchačce necháme jen velmi krátce promíchat (TEMED je iniciátorem polymerační reakce) a ihned vzniklou směs naléváme mezi skleněné desky. Pro vytvoření nanášecích jamek vložíme do prostoru mezi desky hřebem. Polymerace gelu trvá 1 hodinu. Po ztuhnutí gelu opatrně vyjmeme hřeben.

Použité chemikálie a roztoky:

10x TBE

54 g Tris báze

27,5 g kyselina boritá

20 ml 0,5M EDTA (pH=8)

- promísit a doplnit destilovanou vodou na 500 ml

Zásobní roztok akrylamidu/bisakrylamidu

Poměr akrylamidu : bisakrylamidu 19 : 1

76 g akrylamid

4 g bisakrylamid

- doplnit vodou na 300 ml (rozpouštět při 37 ^{o}C)

10% roztok persíranu amonného (APS)

1 g amonium persulfátu

- rozpustit v 10 ml destilované vody

TEMED (N, N, N, N – tetramethylethylen diamine)

komerční produkt (např. SERVA)

Nanesení vzorků na gel

Jamky gelu vytvořené hřebenem naplníme pomocí injekční stříkačky 1x TBE pufrem. Do každé jamky pak naneseme vzorek. Množství nanášeného vzorku je závislé na kvalitě PCR reakce a pohybuje se v rozmezí 5,5 – 10 µl.

Použité roztoky:

100 ml 10x TBE

- doplníme destilovanou vodou na 1000 ml a promícháme

Sestavení elektroforetické aparatury

Čerstvě připraveným roztokem 1x TBE naplníme dolní zásobník elektroforetické vany. Pak uvolníme svorky a odstraníme silikonové těsnění z prostoru mezi skleněnými deskami s nanesenými vzorky. Přebytečnou tekutinu po odstranění silikovoného těsnění odsajeme pomocí filtračního papíru. Desky opatrně ponořujeme do dolního zásobníku elektroforetické vany tak, aby se nám do prostoru mezi deskami nedostávali vzduchové bubliny. Následně skleněné desky připevníme za pomocí svorek k tělu elektroforézy (2 malé svorky na každou stranu). Upevněním dvou skel vytvoříme horní zásobník, kam naléváme 1x TBE pufr. Následně na elektroforézu umístíme bezpečností víko.

Vlastní průběh elektroforézy a její ukončení

Provedeme kontrolu sestavení elektroforetické aparatury (důraz klademe na utěsnění, které zabraňuje úniku elektrodového pufru). Následně na elektroforetickém zdroji nastavíme hodnotu 100V po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby zvýšíme napětí na 310V. Doba běhu

elektroforézy je závislá na velikosti očekávaného produktu v bp. Pohybuje se v rozpětí 2 (150 bp) až 3 hodin (300 bp). Jakmile je ukončena elektroforetická separace, vypneme zdroj napětí a opatrně sejmeme bezpečnostní víko elektroforézy. V horního zásobníku pomocí injekční stříkačky odsajeme pufr, uvolníme svorky a vytáhneme skleněné desky.

Barvení produktů PCR reakce stříbrem

PAA gel opatrně sejmeme se skleněných desek a přeneseme do nádoby s fixačním roztokem a za mírného třepání na třepačce (obr. 6) inkubujeme po dobu 3 minut. Následně gel přeneseme do nové nádoby z roztokem 0,2% dusičnanu stříbrného a za mírného třepání inkubujeme 5 minut. Následně gel opatrně promyjeme destilovanou vodou (3x) a po promytí umístíme gel do nové nádoby s vývojkou a za mírného třepání inkubujeme 15 minut. Zastavení barvení je možné promytím gelu v 10% kyselině octové. Obarvené gely zatavíme do eurofolie a vyhodnotíme nebo uchováme do vyhodnocení při teplotě 4 ^{o}C.

Použité chemikálie a roztoky:

Fixační roztok		0,2% dusičnan stříbrný	
41,6 ml	ethanol	2 g	dusičnan stříbrný
2 ml	kyselina octová	doplnit destilovanou vodou na 1000 ml	
356,4 ml	destilovaná vody		

Obr. 6 Třepačka Duomex 1030 (f. Heidolph Instruments) s nábodou na barvení gelů

Vývojka

10 ml 37% formaldehyd

22,2 g NaOH

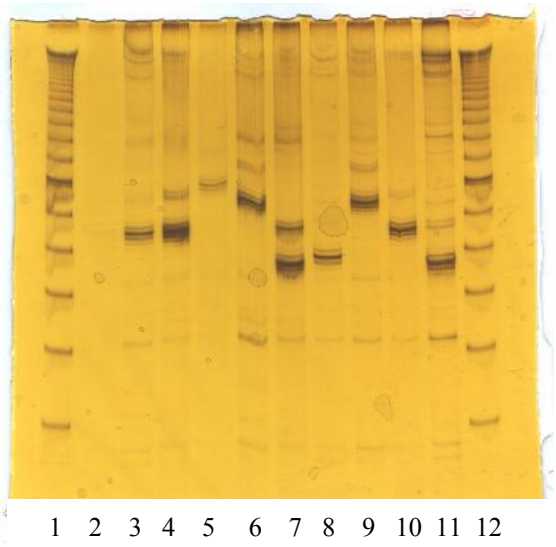
730 ml destilovaná voda

Upozornění: vývojku nutno uchovávat ve tmavých lahvích

7. Dokumentace a vyhodnocení získaných výsledků

Vyhodnocení gelů

Na obarvených a zatavených gelech vyhodnocujeme přibližně velikost získaného PCR produktu porovnáním s velikostním standardem (obr. 7). Pro vyhodnocení variability PCR produktů u různých genotypů a PCR produktů sestavujeme binomickou matici (1 – přítomnost produktu, 0 absence produktu) (tab. 2).



Obr. 7 Ukázka barveného PAA gelu stříbrem
Vysvětlivky: 1, 12 velikostní marker (20 bp), 2 – negativní kontrola, 3 – 11 produkty PCR reakce (*Xbarc004*).

Tab. 2 Binomická matice (PAA gel na obr.7)

Marker	**Dráha PAA gelu**								
	3	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***
Xbarc004	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Xbarc004	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Xbarc004	1	1	0	0	1	0	0	1	0
Xbarc004	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Xbarc004	0	0	0	0	1	0	0	0	1

8. Statistické zpracování výsledků

Matici statisticky zpracujeme pomocí softwaru FreeTree a do podoby dendrogramu zobrazíme pomocí programu FreeView (obr. 8).

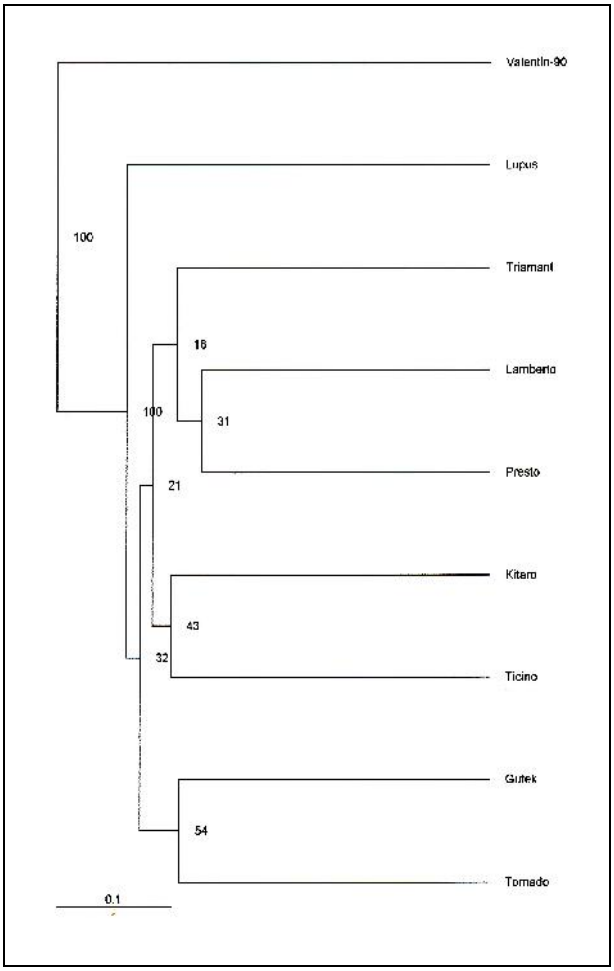
Software FreeTree je dostupný na adrese:

http://web.natur.cuni.cz/flegr/programs/freetree.htm

Software TreeView je dostupný na sdrese:

http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview/treeview_manual.html

Student bude seznámen vyučujícím s obsluhou těchto software a zároveň bude studentům ukázáno navolení statistických ukazatelů, tzn. UPGMA, koeficienty podobnosti, bootstraping apod. Na uvedených webových stránkách jsou uvedeny i návod k použití.



Obr. 8 Ukázka statistického zpracování výsledků formou dendrogramu (výstup programu FreeView)

Výpočty charakterizující míru variability jednotlivých SSR markerů budou realizovány pomocí hodnot indexu diverzity, pravděpodobnosti identity a polymorfního informačního obsahu.

Z četnosti 1 až n alely vypočítejte pro každý SSR marker následující hodnoty (tab. 3):

INDEX DIVERZITY (DI)

$$DI = 1 - \sum p_i^2$$

PRAVDĚPODOBNOST IDENTITY (I)

$$I = \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^{n} \left(2 p_i p_j\right)^2$$

POLYMORFNÍ INFORMAČNÍ OBSAH (PIC)

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^{n} p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2 p_i^2 \cdot p_j^2$$

kde, p_i a p_j jsou frekvence i-té a j-té alely ve sledovaném souboru.

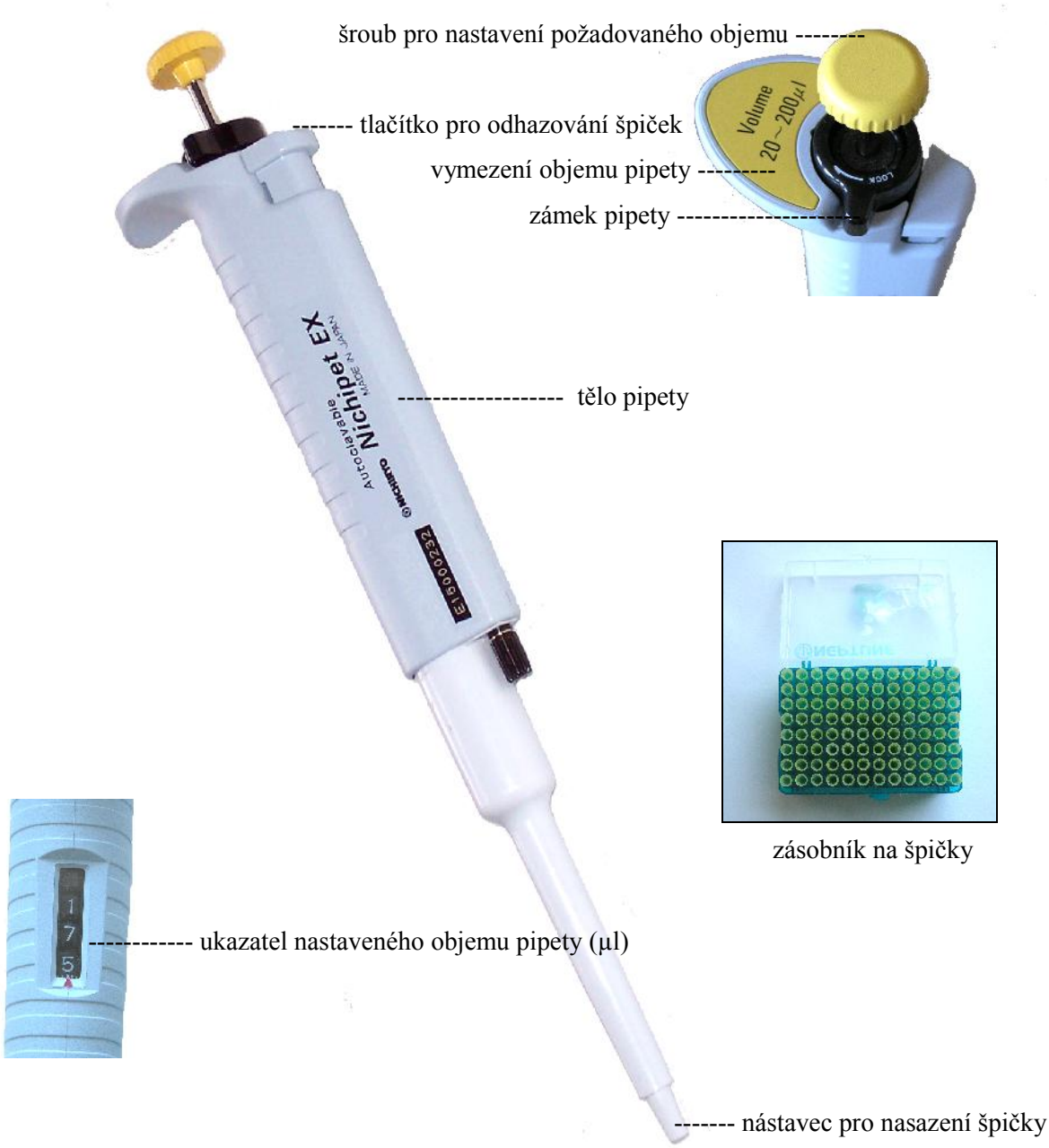
Tab. 3 Vzorová tabulka statistických hodnot pro jednotlivé SSR markery

SSR marker	Lokalizace	Počet alel	DI	I	PIC
Xbarc004	5B	6	0,80	0,02	0,79
Xbarc024	6B	6	0,79	0,03	0,78
Xbarc170	4A	7	0,84	0,01	0,83
Xbarc195	6A	7	0,78	0,04	0,77
Průměr		***6,5***	***0,80***	***0,03***	***0,79***

Poznámka: Nejvhodnějšími SSR markery pro studium genetické variability jsou ty, které mají hodnoty PIC a DI co nejbližší 1 a hodnoty I co nejbližší 0.

Příloha 1

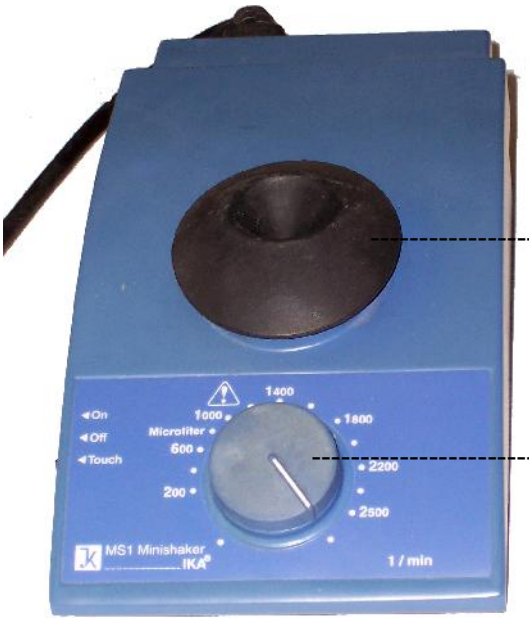
Automatická pipeta f. Nichiryo o objemu 20 - 200µl



Příloha 2

Vortex MS1 Mikroshaker

- zařízení pro promíchávání vnitřního objemu mikrozkumavek
- maximální počet otáček – 2000 ot./min.



gumový nástavec pro umístění mikrozkumavky

regulátor otáček (max. 2000 ot./min)

Příloha 3

Dokumentační systémy

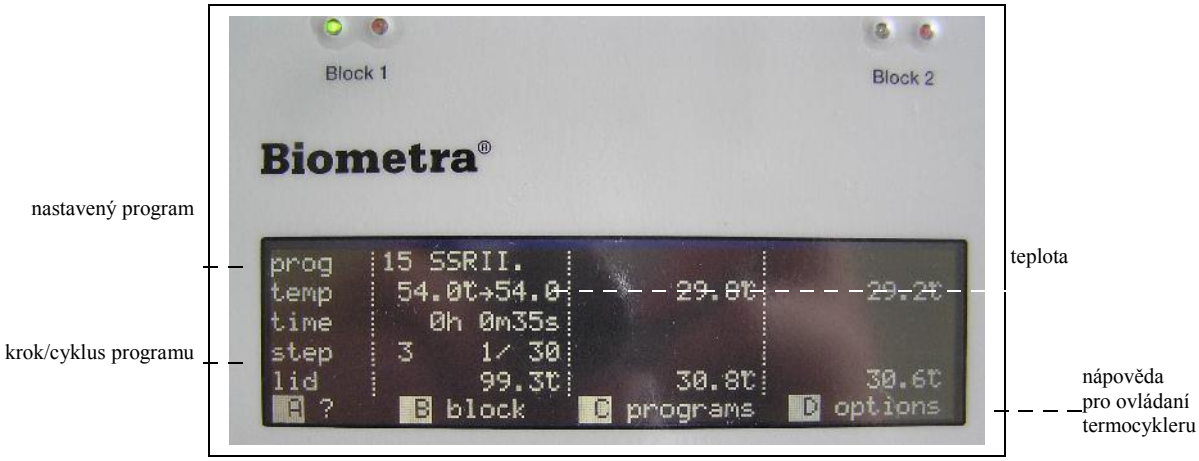
Transiluminátor Ultraviolet (f. UltraLum, Inc.) s instalovanou CCD kamerou

Transiluminátor TI4 (f. Biometra) a fotoaparát Polaroid DS-34

Příloha 4

Termocycler T3 (Biometra) se 3 nezávislými komorami (bloky)

Detail displeje termocycleru T3

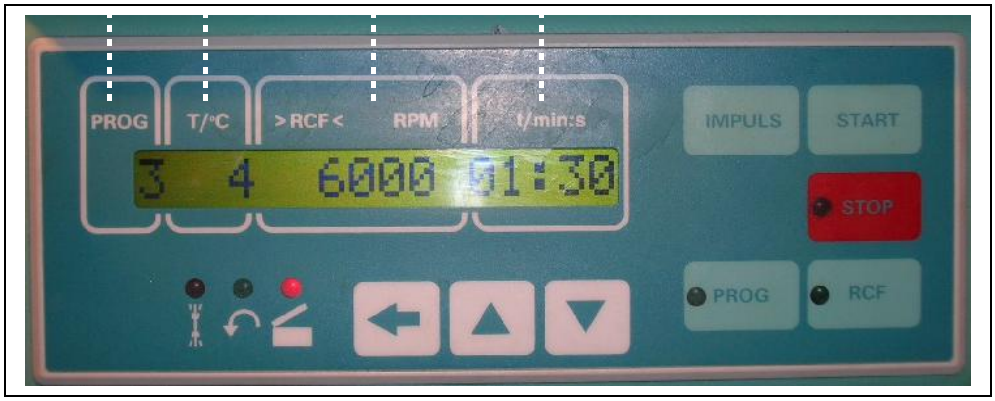


Příloha 5

Chlazená stolní odstředivka Mikro 22R (f. Hettich)

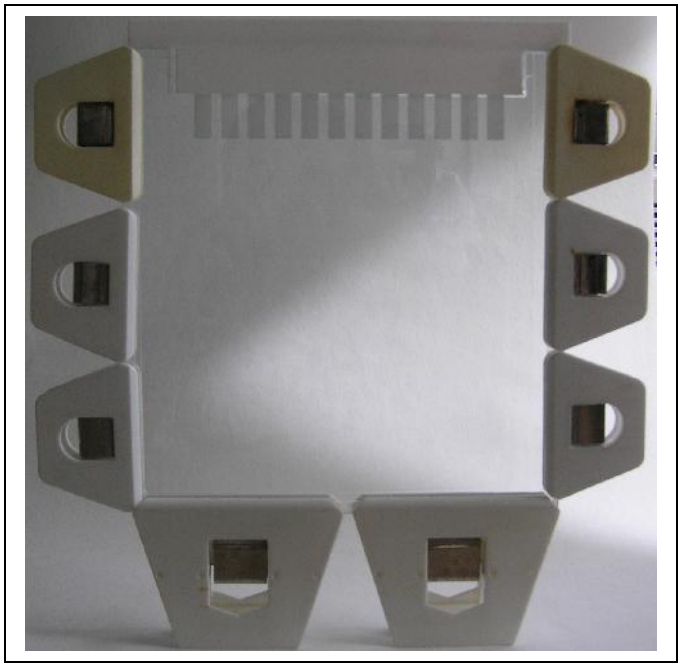
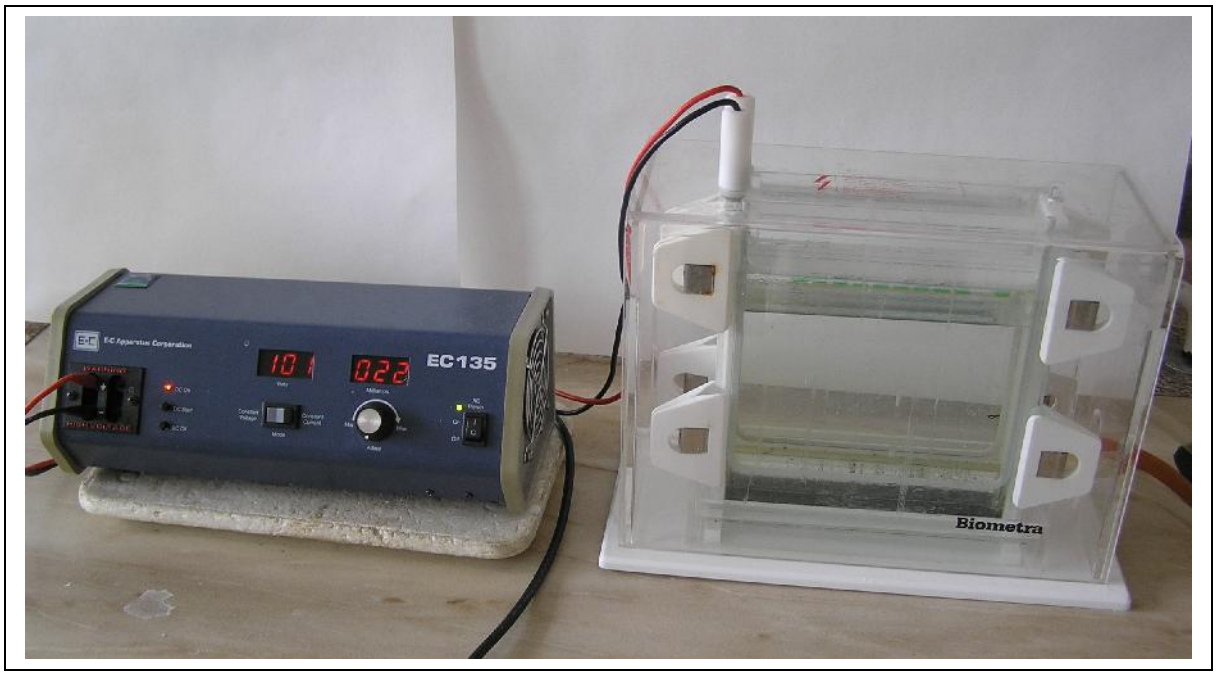
Detail displeje odstředivky Mikro 22R

program teplota otáčky čas



Příloha 6

Sestavená skla pro separaci produktů PCR na polyakrylamidovém gelu



Elektroforetická aparatura f. Biometra pro separaci produktů PCR na polyakrylamidovém gelu