PRACOVNÍ PROTOKOL PRO METODY MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÉ BIOLOGIE

Název úlohy: *Využití gradientového termocykleru pro stanovení optimálních podmínek PCR*

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

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

Použité chemikálie: Promega GO Taq-polymeráza s pufrem, směs dNTPs Serva, oligonukleotidy pro specifickou PCR amplifikaci vybraných oblastí jaderné a chloroplastové DNA (ITS, psbA-trnH, matK), 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 po každou ze tří oblastí (A - ITS, B – psbA-trnH a C – matK) podle tabulky. Všechny komponenty, které byly zamrazeny, vyjma polymerázy, je potřeba po rozmrazení promíchat pomocí vortexu:

14 x 15 µl	**1 reakce**	**15 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 F (10 pmol/µl)	0,6 µl	**9 µl**
Primer R (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)**

A) – oblast ITS – primery:
ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
B) – oblast psbA-trnH – primery:
psbA: GTTATGCATGAACGTAATGCTC; trnH: CGCGCATGGATTCACAATCC
C) – oblast trnC-trnF – primery:
trnC: CGAAATCGGTAGACGCTACG; trnF: ATTTGAACTGGTGACACGAG

2. Promíchat reakční směs pomocí vortexu.

3. Rozdělit reakční směs do 12 zkumavek pro PCR (0,2 ml) (použít stripy).

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***“

4. Zkumavky vložit do termocykleru a spustit program:

Cyklus č.	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas
1	1	94	3 min
2	32	94	30 sec
		Gradient step	30 sec
		72	45 sec
3	1	72	10 min
		10	∞

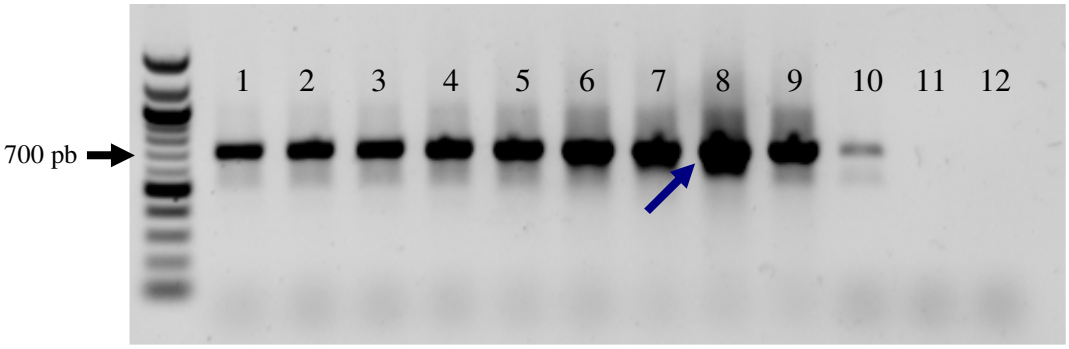
Gradient step:
rozmezí teplot 40 – 66 °C:
1) 40,0 ; 2) 40,8; 3) 42,5; 4) 45,2; 5) 48,3; 6) 51,5; 7) 54,5; 8) 57,7; 9) 60,8; 10) 63,5; 11) 65,2; 12) 66,0

5. Po skončení programu rozdělit produkty PCR pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu.

6. Gel nasnímat pomocí gelového dokumentačního systému (GDS).

Výsledky

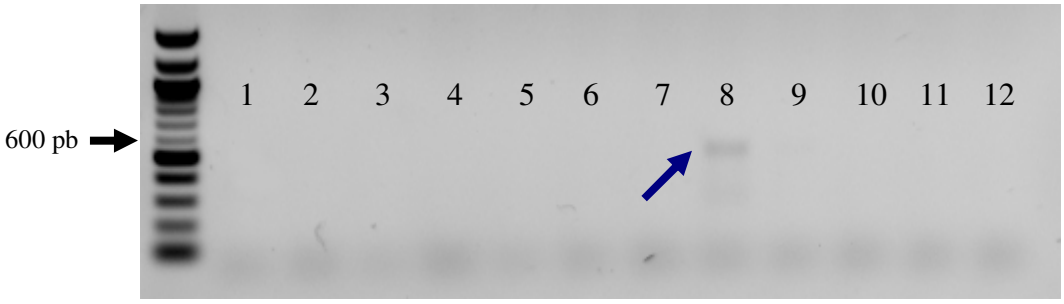
A) – oblast ITS



Na elektroforetogramu s produkty PCR oblasti ITS s primery ITS1 a ITS4 lze pozorovat optimální teplotu annealingu ve vzorku 8) – 57,7 °C (modrá šipka). Od vzorku 10) – 63,5 °C dochází k rapidnímu úbytku PCR produktu. Ve vzorcích 11) (65,2 °C) a 12) (66 °C) není pozorovatelný žádný PCR produkt.

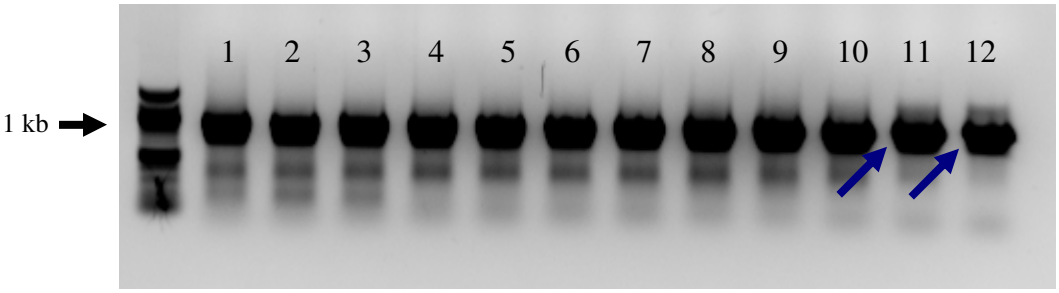
Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízená z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“

B) – oblast psbA-trnH



Teplotní optimum pro annealing s primery psbA a trnH je u vzorku 8) (57,5 °C). PCR produkt je však velmi slabý - při ostatních teplotách annealingu nedošlo k amplifikaci viditelného PCR produktu.

C) – oblast trnC-trnF



V případě amplifikace oblasti trnC-trnF došlo k robustní PCR amplifikaci u všech 12 vzorků. Se zvyšující teplotou annealingu dochází k ubývání nespecifického produktu (fragmentů menších než specifický PCR produkt). Optimum pro amplifikaci je tedy u vzorků 11) (65,2 °C) a 12) (66 °C) (modré šipky).

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***“