

## Izolace DNA ze stěru bukální sliznice - stručný návod

Izolační kit MACHEREY-NAGEL

### Postup:

1. Mnohokrát přejedeme odběrovou tyčinkou po sliznici pravé i levé tváře, **cca 2-3 min.**
2. Přeneseme do **1,5ml eppendorfky** a pomocí víčka a stěny zkumavky odломíme část s vatičkou.
3. Přidáme **100  $\mu$ l PBS, 15  $\mu$ l proteinázy K, 100  $\mu$ l roztoku B3**. Vortexujeme **60s**.
4. Vložíme do termobloku a inkubujeme **10 min** při **56°C**. Vortexujeme **30s**.
5. Vložíme do termobloku a inkubujeme **5 min** při **70°C**. Vortexujeme **30s**.
6. Přidáme **100  $\mu$ l 96% ethanolu** a vortexujeme **10s**. Lehce stočíme.
7. Přeneseme **lyzát** (bez vatičky) pipetou na **kolonku** a centrifugujeme **12000 ot/min, 1min**.
8. Vložíme kolonku do nové zkumavky a přidáme **400  $\mu$ l roztoku BW**, centrifugujeme **12000 ot/min**, po dobu **1 min**.
9. Vložíme kolonku do nové zkumavky a přidáme **400  $\mu$ l roztoku B5**, centrifugujeme **12000 ot/min**, po dobu **1 min**.
10. Slijeme promývací roztok ze spodní zkumavky, vložíme kolonku zpět do zkumavky a centrifugujeme **12000 ot/min** po dobu **3 min**.
11. Vložíme kolonku do 1,5ml eppendorfky, na dno kolonky opatrně napipetujeme **50  $\mu$ l roztoku BE** předeřátého na **70°C**. Necháme stát **1 min** při pokojové teplotě.
12. Centrifugujeme **12000 ot/min** po dobu **1 min**.

### Změření koncentrace DNA, kontrola čistoty

## Polymerázová řetězová reakce - stručný návod

V tomto praktiku budeme amplifikovat pomocí PCR vybraný úsek genu pro Faktor V (úsek, který obsahuje SNP našeho zájmu, tj. oblast obsahující místo, kde může být "Leidenská mutace").

*Pracujte v rukavicích (powder-free)! Některé kroky se budou provádět na ledu.*

### Příprava master mixu

Jedna jednotlivá PCR reakce se provádí ve velmi malém objemu (20  $\mu$ l). Bylo by příliš pracné a nakonec i technicky obtížně proveditelné pipetovat jednotlivé složky do každé zkumavčičky zvlášť. Proto se vše, co je společné, se napipetuje nejdříve dohromady pro všechny zamýšlené PCR reakce. Takto připravenému pracovnímu roztoku se říká "master mix".

Do **1,5 ml eppendorfky** si připravíte master mix pro 10 PCR reakcí, každá bude o celkovém objemu reakční směsi 20  $\mu$ l (19  $\mu$ l master mixu + 1  $\mu$ l vzorku DNA)

	$\mu$ l	
voda	155 + 4	
PCR pufr (10x)	20	
Mg <sup>2+</sup>	5	
dNTP	4	
forward primer (F)	2	
reverse primer (R)	2	
Taq polymeráza	2	enzym – skladuje se v mrazáku !
vzorek DNA	10	vzorek se bude přidávat později, až do jednotlivých PCR zkumavek
-----		
	200 + 4	

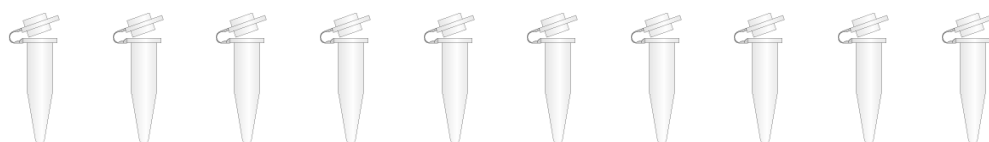
Eppendorfku s mastermixem lehce zvertexujte a následně dejte krátce zcentrifugovat. Držte na ledu.

### Příprava PCR - vzorky

Z mrazáku si můžete přinést vzorek DNA, nechte ho při pokojové teplotě pomalu roztát.

Do patička (destičky) si připravte **10 PCR zkumavek** a rozpipetujte do nich po **19  $\mu$ l master mixu**.

Do každé zkumavky se k 19  $\mu$ l mastermixu přidá po **1  $\mu$ l vzorku DNA**. Pracovat se bude v dubletech (tj. každý vzorek se bude zpracovávat 2x). Zpracujete 4 různé vzorky (DNA izolovaná v průběhu minulých praktik). Poslední dvě zkumavky budou sloužit jako pozitivní a negativní kontrola. Do zkumavky s pozitivní kontrolou napipetujete 1  $\mu$ l roztoku DNA ze zkumavky označené **+K**. Ve zkumavce s negativní kontrolou zůstane jen master mix, tuto zkumavku je vhodné zavřít hned po rozpipetování master mixu.



vzorek 1   vzorek 1   vzorek 2   vzorek 2   vzorek 3   vzorek 3   vzorek 4   vzorek 4   pozit. kontrola   neg. kontrola

Zkumavky vložte do bloku termocykleru a spusťte přednastavený program.

**Parametry PCR:**

- 1) úvodní denaturace: 95°C - 5 min
- 2) 35 cyklů: 95°C - 15 s  
60°C - 15 s  
72°C - 30 s
- 3) 72°C - 7 min
- 4) 4°C - do nekonečna

V tomto praktiku použijeme restrikční endonukleázu MnlI k analýze úseku DNA amplifikovaného PCR metodou v minulém týdnu.

*Pracujte v rukavicích (powder-free)!*

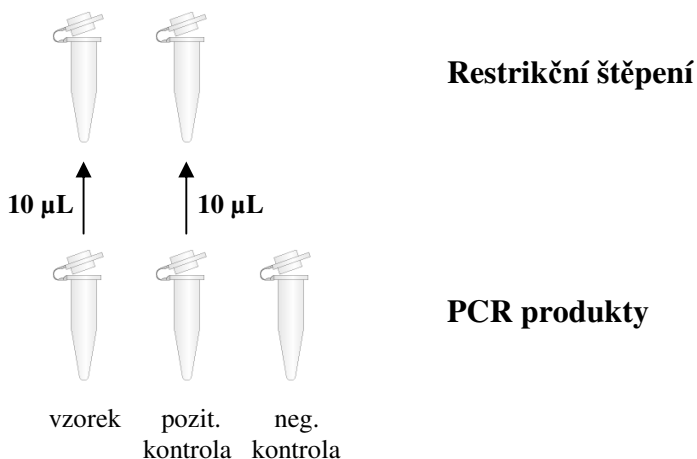
### Restrikční štěpení

Dostanete **3 PCR zkumavky** ze sady deseti PCR reakcí zpracovávaných v minulém týdnu.

V každé je 20  $\mu\text{L}$  PCR reakční směsi (doufejme že s příslušným PCR produktem).

- vzorek vaší DNA *zkumavka označená vašimi iniciálami*
- pozitivní kontrola (faktor V Leiden, heterozygot) *zkumavka označená "+K"*
- negativní kontrola *zkumavka označená "-K"*

K provedení restrikční analýzy budete potřebovat **dvě nové PCR zkumavky**. Do jedné přeneste přesně **10  $\mu\text{L}$**  PCR produktu ze zkumavky se zpracovaným vzorkem vaší DNA, do druhé ze zkumavky s pozitivní kontrolou. Označte nové zkumavky symbolem "R", tj. "*vaše iniciály R*", "+ R".



Celkový objem reakce restrikčního štěpení bude 20  $\mu\text{L}$ . Zatím máte ve zkumavkách připraveno přesně 10  $\mu\text{L}$  PCR produktů k analýze.

1. Přidejte následující v uvedeném pořadí:

PCR produkt (DNA)	10 $\mu\text{L}$
<b>voda</b>	<b>7 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>10x FastDigest Green Buffer</b>	<b>2 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>FastDigest enzym MnlI</b>	<b>1 <math>\mu\text{L}</math></b>

-----  
20  $\mu\text{L}$

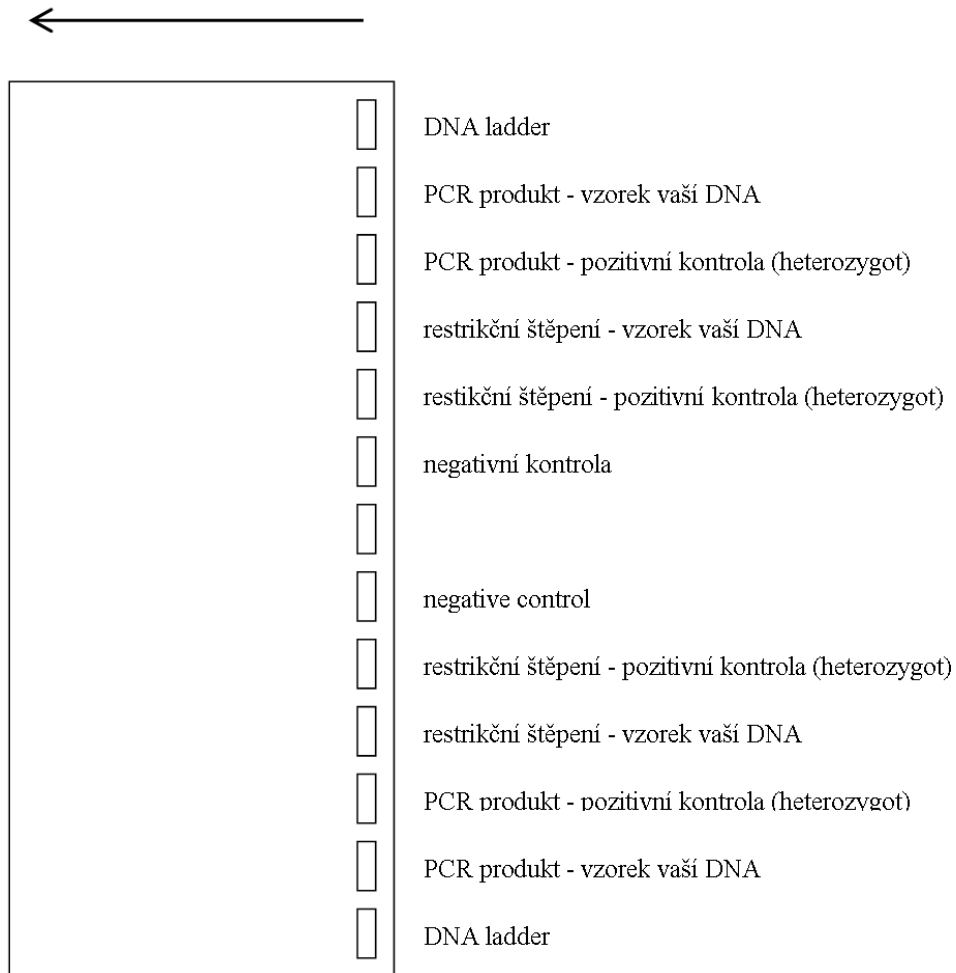
2. Lehce zvertexujte a následně dejte krátce zcentrifugovat.

3. Inkubujte při **37° C** v bloku termocykleru po dobu **10 min.**

### Gelová elektroforéza

Přidejte po **2  $\mu\text{L}$  nanášecí barvičky** do třech zkumavčiček, kde jsou PCR produkty.

Na gel se bude nanášet vždy **10  $\mu\text{L}$** , pořadí podle obrázku. V jednom gelu je 13 jamek. Každá pracovní skupinka obsadí polovinu gelu (6 jamek).



### Interpretace výsledků

délka PCR produktu: **288 bp**

restrikční štěpení:	homozygot wild type:	<b>158 bp, 93 bp, 37 bp</b>
	faktor V Leiden heterozygot:	<b>158 bp, 130 bp, 93 bp, 37 bp</b>
	faktor V Leiden homozygot:	<b>158 bp, 130 bp</b>