

Úloha 5 : Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) a elektroforéza DNA v agarosovém gelu

Teorie:

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, **PCR**) je v současnosti jednou z nejčastěji používaných molekulárně biologických metod. K jejím výhodám patří mj. malá časová náročnost (i méně než 2 hodiny), schopnost mnohonásobné amplifikace DNA úseků a možnost pracovat se značně heterogenním vstupním materiálem (amplifikace jediného genu z několika tisíc přítomných ve směsi spolu s proteiny a dalším materiálem). Nevýhodou je často potřeba optimalizace postupu a limitace některými faktory, jako je přítomnost solí ve vzorku či délka cílového úseku DNA. Pro optimální průběh reakce je mimo nastavení vlastních parametrů klíčové navržení použitých primerů a to s ohledem na cíl celé práce.

Elektroforéza DNA v agarosovém gelu je jednou ze základních technik k rozdělení směsi DNA fragmentů na základě jejich mobility (pohyblivosti) v elektrickém poli. Lze ji použít jak pro detekci jednotlivých fragmentů (jejich počtu, velikosti), tak pro jejich následnou izolaci a další použití. Slouží tak jako analytická i preparativní technika.

Materiál:

vstupní vzorek DNA (templát), dvojice primerů, směs dNTP, reakční pufr (10x koncentrovaný), DNA polymerasa, sterilní voda, 1x koncentrovaný TBE pufr, agarosa, barvivo GelRed, DNA standard pro elektroforézu
mikropipety a plastové špičky (sterilní), PCR zkumavky, termocykler, elektroforetická souprava

Postup – PCR:

1. Roztoky obsahující vámi navržené primery, směs dNTP, reakční pufr (příp. též vstupní DNA) necháme pomalu rozmraznout na ledu.
2. Do PCR zkumavky pipetujeme roztoky v pořadí a objemech dle tabulky. DNA polymerasu přidáváme jako poslední, z mrazicího boxu (-20°C) ji vytahujeme až těsně před použitím (i pod bodem mrazu se jedná o roztok) a ihned poté vracíme.
3. Směs v PCR zkumavce dobře ale opatrně promícháme opakovaným pipetováním a zkumavku dobře uzavřeme.
4. Zkumavku/zkumavky vložíme do termocykleru, ten uzavřeme a víčko utěsníme otáčením šroubu v naznačeném směru.
5. Vybereme vhodný program a spustíme.
6. Pokud získaný produkt nepoužijeme ihned pro další práci, krátkodobě jej můžeme uchovat při 4°C, dlouhodobě při -20°C.
7. Příprava pro elektroforézu: k 50 ul PCR směsi přidáme 5 ul 10x vzorkového pufru a promícháme na vortexu.

Složení směsi pro PCR:

Složka	Objem [ul]
sterilní voda	39,5
reakční pufr (10x koncentrovaný)	5
vstupní DNA	2
upper primer	1
lower primer	1
směs dNTP	1
DNA polymerasa	0,5

Tvorba programu pro termocykler:

Typický program pro PCR je tvořen cykly při nichž dochází opakovaně k denuraci DNA, nasednutí primerů (annealing) a syntéze komplementárního vlákna (elongace). Zvolené doby jednotlivých kroků, použití teploty a počet cyklů se liší v závislosti na použité PCR směsi a účelu PCR.

Teplota [°C]	Doba [s]	
94 – 95	180	
94 – 95	20 – 45	25 – 35 x
55 – 65	30 – 90	
72 – 75	45 – 90	
72 – 75	420	

Postup – elektroforéza:

1. Do baňky odvážíme 0,5 g agarosu, přilijeme 50 ml TBE pufru a zahřejeme v mikrovlné troubě k varu (Pozor, roztok velmi snadno vzkypí. Ihned po objevení prvních bublin je třeba zahřívání zastavit.), zamícháme a znovu zahřejeme k varu. Po úplném rozpuštění agarosu nalijeme mezi plastové zářky zasunuté do formy pro přípravu agarosového gelu a necháme ztuhnout.
2. Po dokonalém ztuhnutí gelu (cca 20 – 30 min) převrstvíme gel elektrodovým (TBE) pufrem a vytáhneme hřebínek.
3. Do vzniklých otvorů nanese vzorky a standard. Pořadí vzorků si poznačíme do protokolu.
4. Soupravu pro elektroforézu uzavřeme, připojíme ke zdroji el. napětí a spustíme ($U = 120 \text{ V}$).
5. Poté, co modrá barva dosáhne druhého konce gelu (cca 30 – 40 min), odpojíme zdroj el. napětí.
6. Gel přeneseme na transiluminátor a vyhodnotíme.

Otázky:

- 1) Kolik různých PCR produktů lze očekávat při použití jednoho páru primerů – zvažte možnou přítomnost různých variant genu ve vstupní DNA?
- 2) Jaké programy lze využít pro návrh primerů?
- 3) Jaký efekt by mělo použití jediného primeru namísto jejich dvojice?
- 4) Ke které elektrodě se budou pohybovat fragmenty DNA při elektroforéze?
- 5) Jaký standard byl použit při elektroforéze DNA v agarosovém gelu?
- 6) Jaký konkrétní program byl použit pro PCR (teploty a časy)?

Teplota [°C]	Doba [s]

Fotografie gelu po elektroforéze.

Uveďte číslo svého vzorku, vyznačte na fotografii a okomentujte výsledek.