

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 (typicky 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.

Zadání:

V předchozím cvičení jste si vyzkoušeli návrh primerů. Během praktické úlohy otestujete funkčnost některých těchto primerů, a to praktickým provedením PCR s následnou detekcí vzniklých produktů pomocí gelové elektroforézy. Na základě výsledků posuďte, nakolik byly navrhované primery vhodné pro namnožení cílového úseku DNA. Za předpokladu, že použité primery byly optimální zvažte možné složení vstupní DNA.

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 navrhované 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 označeném 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 vzorku pro elektroforézu: k 50 ul PCR směsi přidáme 5 ul 10x koncentrovaného 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 záložky zasunuté do formy pro přípravu agarosového gelu a necháme ztuhnout.
2. Po dokonalém ztuhnutí gelu (cca 20 – 30 min) převrstvíme gel elektrodovým (TBE) puftrem a poté vytáhneme hřebínek.
3. Do vzniklých otvorů naneseeme vzorky a standard. Pořadí vzorků si poznačíme do protokolu.
4. Soupravu pro elektroforézu uzavřeme, připojíme ke zdroji el. napětí a spustíme ($U = 80 \text{ V}$).
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.