

PCR

Princip metody: (Co je PCR. Jakým způsobem je dosaženo, že dochází k amplifikaci jen krátkého specifického úseku DNA.)

Pracovní postup:

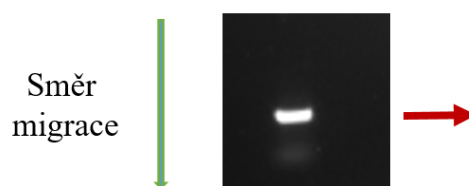
A/ Vypsat složky reakční směsi plus stručně jejich funkci.

B/ Popsat kroky amplifikační reakce a typické teploty, při kterých probíhají.

C/ Po dokončení amplifikace je obsah zkumavky nanesen na agarózový gel, následovala agarózová ELFO, prosvícení gelu transluminátorem a vyfocení finálního produktu PCR.

Výsledek: Na gel jste nanесли výsledek PCR a provedli elektroforézu.

Detekovali jste jeden jasný proužek, je tedy jasné, že při PCR vznikl jeden produkt o určité délce. Popište výsledný produkt. Jedná se o celou plazmidovou DNA, nebo jde o krátký amplifikovaný úsek ohraničený místy navázání primerů?



Doplňující otázky:

1. Jak se nazývá teplota, při které dochází k navázání primerů?
2. Jeden primer má vyšší obsah GC ve srovnání s druhým primerem, který obsahuje více bází AT. Který z nich má vyšší annealingovou teplotu?
3. Pokud by na gelu bylo vidět více proužků, tj. více produktů PCR reakce, čím by to mohlo být způsobené? Jak by jste tuto situaci řešili?
4. Proč je nutné, aby Taq polymeráza byla termostabilní?

5. Pokud byste měli levý primer o délce 21 bází a pravý primer o délce 22 bází a mezi těmito primery by se nacházelo na templátové molekule dalších 207 bází, jak velký produkt byste očekávali, že při PCR bude vznikat – tj. kolik by měl výsledný produkt PCR bází?