**Molekulární biologie rostlin v praxi**

Úvod:Rychlý protokol na izolaci genomové DNA (gDNA) z rostlin, který slouží pro jejich genotypování. Dají se tak rozlišit různé genové varianty, mutace (např. T-DNA inzerce, CRISPR/Cas9 mutace, delece) i odrůdy plodin. Získaná DNA se použije jako templát v polymerázové řetězové reakci (PCR) a její výsledek se detekuje pomocí horizontální gelové elektroforézy (nebo sekvenováním DNA).

Cíl: A. Izolace gDNA z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*

B. PCR metoda

C. Analýza pomocí horizontální gelové elektroforézy DNA

Materiál: *Arabidopsis thaliana*

Pomůcky a chemikálie: pipety, špičky, eppendorfky, plastové či skleněné tyčinky, centrifuga, vortex, PCR termocykler, mikrovlnná trouba, elektroforéza, UV transmiter, DNA extrakční pufr, izopropanol, 70 % etanol, miliQ voda (sterilní), PCR Master Mix, primery (Forward a Reverse), MidoriGreen (váže se na DNA), vizualizační barvička (Loading Dye), DNA žebříček (DNA ladder), agaróza, pufr TBE

**A. Izolace genomové DNA**

1. Homogenizujte jeden malý až střední list tyčinkou v 1,5 ml zkumavce (eppendorfka).
2. Přidejte **400 μl** extrakčního pufru, vortexujte **5 s** a nechte stát při laboratorní teplotě (do **60 min**).
3. Centrifugujte při maximálních otáčkách **5 min**.
4. Přeneste **300 µl** supernatantu do nové 1,5 ml zkumavky a přidejte **300 μl** izopropanolu, 4-6x překlopte, tím se roztoky promíchají. Nechte stát při laboratorní teplotě (do **10 min**).
5. Centrifugujte **10 min** při 13000 rmp a 4˚C. Odstraňte supernatant, vysrážená DNA bude v peletu.
6. Promyjte **500** µl 70 % etanolem (vychlazeným při -20 oC). Nechte vysušit při laboratorní teplotě.
7. Pelet rozpusťte ve **100-500** μl sterilní miliQ H2O. Genomovou DNA uchovávejte na ledu nebo v 4˚C.

**DNA extrakční pufr (100 ml)**

200 mM Tris HCl pH 7.5 1 M zásobní roztok 20 ml

250 mM NaCl 5 M zásobní roztok 5 ml

25 mM EDTA pH 8 0,5 M zásobní roztok 5 ml

0,5 % SDS 10 % zásobní roztok 5 ml

Doplňte sterilní vodou do 100 ml.

**B. PCR metoda**

1. **Všechny komponenty a reakční směsi uchovávejte a připravujte v krabici s ledem.**

1. Do připravených PCR zkumavek (speciální, tenkostěnné zkumavky), napipetujte PCR reakci v následném pořadí:

12,5 l AmpliTaq Gold 360 Master Mix (2x koncentrovaný)

7 l miliQ voda (sterilní)

2 l primer F (10M koncentrace)

2 l primer R (10M koncentrace)

1,5 l gDNA (templát)

25 l celkový reakční objem

1. Promíchejte pipetou, stočte krátce na stolní centrifuze a vložte do PCR termocykleru s následným teplotním programem:

95oC / 2 min

95oC / 10 s Denaturace (*Denaturation*)

56oC / 20 s 35x Hybridizace (*Annealing*)

72oC / 30 s Elongace (*Extension*)

72oC / 5 min

1. Po proběhnutí (cca za 1h 15 min) smíchejte PCR reakci s 5 µl vizualizační barvičky (Loading Dye) a otestujte amplifikovaný DNA produkt nanesením směsi na 1,5 % agarósový gel v TBE pufru. Pro určení velikosti PCR produktu a odhadnutí jeho koncentrace naneste také standard, tedy 6 µl DNA žebříčku (DNA ladder, 100 bp) smíchaného s vizualizační barvičkou.

*Poznámka:* AmpliTaq Gold 360 Master Mix obsahuje nukleotidy (dNTPs), reakční pufr a Taq polymerázu ve potřených koncentrací.

Obvykle se také používá negativní kontrola, kdy se místo DNA přidá do reakce stejné množství vody a pozitivní kontrola, kdy se jako templát použije již ověřená gDNA.

**C. Horizontální gelové elektroforéza DNA**

1. Připravte 1,5 % agarózový gel tak, že
	1. smícháte 1,5 g agarózy se 100 ml 0,5x TBE pufru,
	2. rozpustíte v mikrovlnné troubě,
	3. po krátkém vychladnutí přidáte 5-10 l barvičky MidoriGreen, která bude sloužit k označení DNA,
	4. a nalijete do elektroforézní „*elfo“* vaničky, do které předem vložíte hřeben.
	5. Po ztuhnutí gelu (za cca 30 min) hřeben opatrně vyndejte.
2. Do horizontální elektroforézy nalijte 0,5x TBE pufr a vložte vaničku s gelem.
3. Napipetujte vzorky DNA smíchané s Loading Dye a DNA ladder do jednotlivých jamek v gelu.
4. Spusťte elektroforézu při 80 – 100 V po dobu 30 – 60 min. Vaničku napojte na přístroj, tak aby vzorky DNA difundovaly ke kladně nabitému pólu **(od – k +) !!!**
5. Pozorujte proužky DNA v procházejícím UV světle transmiteru a výsledek elektroforézy dokumentujte fotografováním.

Délkový a hmotnostní standard: **100 bp DNA ladder** (0,5 g)

Vyhodnocení: Napište úspěšnost/neúspěšnost PCR reakce a odhadnutou velikost a koncentraci amplifikované DNA. Do protokolu vložte fotografii výsledného gelu a popište ji.