

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 inserce, 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 transmitter, 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 rpm a 4°C. Odstraňte supernatant, vysrážená DNA bude v peletu.
6. Promyjte **500 µl** 70 % etanolem (vychlazeným při -20 °C). 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.**
2. Do připravených PCR zkumavek (speciální, tenkostěnné zkumavky), napipetujte PCR reakci v následném pořadí:

12,5 μ l	AmpliTaq Gold 360 Master Mix (2x koncentrovaný)
7 μ l	miliQ voda (sterilní)
2 μ l	primer F (10 μ M koncentrace)
2 μ l	primer R (10 μ M koncentrace)
<u>1,5 μl</u>	<u>gDNA (templát)</u>
25 μ l	celkový reakční objem

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

95°C / 2 min

95°C / 10 s } 35x Denaturace (*Denaturation*)

56°C / 20 s } Hybridizace (*Annealing*)

72°C / 30 s } Elongace (*Extension*)

72°C / 5 min

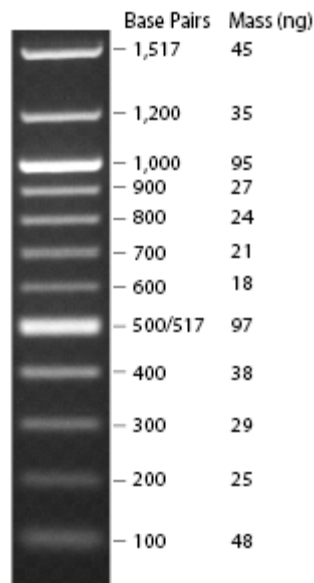
4. Po proběhnutí (cca za 1h 15 min) smíchejte PCR reakci s 5 μ l vizualizační barvičky (Loading Dye) a otestujte amplifikovaný DNA produkt nanesením směsi na 1,5 % agarósový gel v TBE pufru. Pro určení velikosti PCR produktu a odhadnutí jeho koncentrace naneste také standard, tedy 6 μ l DNA žebříčku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

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

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
 - a. smícháte 1,5 g agarózy se 100 ml 0,5x TBE pufru,
 - b. rozpustíte v mikrovlnné troubě,
 - c. po krátkém vychladnutí přidáte 5-10 μ l barvičky MidoriGreen, která bude sloužit k označení DNA,
 - d. a nalijete do elektroforézni „elfo“ vaničky, do které předem vložíte hřeben.
 - e. 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 transmitteru a výsledek elektroforézy dokumentujte fotografováním.



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

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