

Protokoly a návody pro praktikum

**Molekulární markery v systematice a populační
biologii rostlin**

(B120C44)

v DNA laboratoři Katedry botaniky PřF UK, Benátská 2, Praha

Obsah

Obsah.....	2
Časový harmonogram praktika	3
Základní zásady práce v laboratoři.....	4
A. PROTOKOLY	
<i>protokol A:</i> Extrakce DNA ze sušeného rostlinného materiálu	5
Měření koncentrace DNA a ředění DNA na koncentraci potřebnou pro PCR	7
Otestování kvality DNA na 0.8 % agarosovém gelu	7
<i>protokol B1:</i> Extrakce DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).....	8
<i>protokol B2:</i> Extrakce DNA pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek)	9
PCR (Polymerase Chain Reaction)	10
<i>Protokol C:</i> PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	12
C1. protokol na amplifikaci	12
C2. protokol na restrikci	14
B. NÁVODY	
1. Měření koncentrace DNA pomocí Nanodropu	15
2. Horizontální agarosová elektroforéza	15
3. Práce s dokumentačním systémem Kodak Gel Logic 100	17
4. Práce se softwarem pro analýzu gelů KODAK 1D Image Analysis Software	18
5. Zacházení s termocyclerem Techne Touchgene	19
6. Zacházení s termocyclerem Mastercycler ep gradient S	20
Přílohy	
DNA žebříčky (ladders) používané v laboratoři (od f. Fermentas).....	22
Univerzální primery pro amplifikaci některých úseků cpDNA	23
Návody na přípravu některých roztoků	24

Molekulární markery v systematice a populační biologii rostlin

1. den – extrakce DNA, měření koncentrace

- úvod, přístupy ke studiu DNA, seznámení s laboratoří – přístroje, zásady práce
- extrakce DNA z rostlinného materiálu (CTAB metoda) – *protokol A*
- extrakce DNA pomocí komerčního kitu – *protokol B1* nebo *B2*
- stanovení koncentrace DNA pomocí UV spektrofotometru – *návod 1*
- ředění DNA na příslušnou koncentraci

2. den – PCR

- princip PCR amplifikace, příprava směsi pro reakci, optimalizace reakčních podmínek
- zacházení s termocyclerem Techne Touchgene a Mastercycler ep S – *návod 5 a 6*
- PCR amplifikace některých úseků cpDNA pomocí universálních primerových párů (gradientový pokus) – *protokol C1*
- elektroforéza, horizontální agarosový gel, DNA žebříčky – *návod 2*
- práce s dokumentačním systémem Kodak Gel Logic 100 – *návod 3*
- porovnávání získaných pattern (KODAK 1D Image Analysis Software) – *návod 4*
- PCR amplifikace dalších vzorků s optimalizovaným protokolem
- test amplifikace na gelu

3. den – PCR-RFLP (II)

- štěpení získaných PCR produktů několika restrikčními enzymy – *protokol C2*
- příprava velkého agarosového gelu
- vizualizace restrikčních fragmentů dokumentačním systémem Kodak Gel Logic 100
- porovnávání restrikčních pattern (KODAK 1D Image Analysis Software)

4.+5. den – vyhodnocování dat

- příprava dat pro další biosystematické a populačně-genetické analýzy
- práce se cvičnými gely
- formátování vstupních dat pro software
- využití specializovaného software – indexy diverzity a podobnosti (POPGEN), tvorba stromů, PCoA, AMOVA (FAMD, Arlequin), AFLPdat (diversita, rarity, klonální diversita), STRUCTURE+Distrupt...

Základní zásady práce v laboratoři

- laboratoř č. 15 (menší) je určena pro izolaci DNA a její vyhrazená část pro elektroforézu a fotografování gelů
- laboratoř č. 16 (pre-PCR) slouží k práci s již izolovanou DNA a k jejímu pipetování
- laboratoř č. 14 (post-PCR) slouží k práci s PCR produkty a ke klonování
- v žádném případě nepřenášíme pipety ani další vybavení mezi laboratořemi
- do laboratoře nevstupujeme bez přezutí
- v laboratoři nejíme
- při pipetování pracujeme pouze se *sterilními autoklávovanými špičkami a zkumavkami* (v krabičkách a kádinkách označených páskou s černými pruhy), kontaminovaný materiál odhazujeme do určených nádob
- pro PCR používáme výhradně sterilní vodu (autoklávovaná Milli-Q voda zamražená v lednici), pro přípravu roztoků a gelů vodu z přístroje Milli-Q Synthesis
- pro omývání laboratorního nádobí používáme destilovanou vodu ze zásobního tanku
- s *ethidiumbromidem* a s veškerými věcmi, které s ním přicházejí do styku (elektroforetické vany, hřebínky, pipeta na nanášení vzorků...) pracujeme zásadně v rukavicích (je to karcinogen!), kontaminovanými rukavicemi se nedotýkáme ničeho jiného, gely vyhazujeme do zvláštní nádoby
- nepřenášíme špičky ani pipety mezi stolem určeným k práci s *ethidiumbromidem* a zbytkem laboratoře
- dbáme zvýšené opatrnosti při práci s *elektrickým proudem* (elektroforéza apod.)
- s *těkavými chemikáliemi* (chloroform, isoamylalkohol, isopropanol, kyselina octová) pracujeme zásadně v digestoři se zapnutým odtahem
- s DNA a většinou dalších biochemikálií (enzymy, primery...) pracujeme výhradně na ledu, zvláště citlivé jsou proteiny (polymeráza, restriční enzymy ad.) a některé pufry
- pokud odcházíme z laboratoře poslední (i jen na chvíli), vždy *zamkneme*, večer potom i petlici a vypneme větrák
- více o DNA laboratoři, metodách a protokolech: <http://botany.natur.cuni.cz/dna/>

A. PROTOKOLY

protokol A: Extrakce DNA ze sušeného rostlinného materiálu

příprava vzorků před extrakcí

- cca 0.5 g suchého materiálu (ze silikagelu) vložíme do 2 ml eppendorfek (s kulatým dnem) a přidáme 2 wolframkarbidové kuličky
- vždy 5+5 zkumavek vložíme do plastových držáků mlýnku Retsch Mixer Mill 200, upevníme a utáhneme pojistku, přiklopíme plastový kryt, nastavíme čas 3 min a frekvenci 30ot./s a zmáčkneme „start“
- po nastaveném čase se mlýnek sám zastaví, zkontrolujeme zkumavky. Drcení je hotovo, pokud jsou veškerá listová pletiva rozmělněna na prach, v opačném případě drtíme dalších 3-5min

vlastní extrakce DNA

- připravíme si potřebné množství roztoku CTAB a přidáme 2% merkaptoethanol, pracujeme v digestoři
- k rozdrčenému materiálu přidáme špetku PVP a 700 µl roztoku CTAB
- přidáme 5 µl RNasy A
- zkumavky uzavřeme, krátce promícháme na vortexu a inkubujeme 30 min. na termomixeru při 60 °C a 1,400 rpm
- centrifugujeme (se zavřeným víčkem centrifugy!) 6 min. při 13,200 rpm
- supernatant přepipetujeme do nových eppendorfek
- původní zkumavky ponecháme uzavřené ve stojánku v digestoři (po skončení práce je třeba vyjmout kuličky, očistit a nechat vykládvovat)
- v digestoři přidáme 500 µl směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1)
- dobře uzavřené zkumavky 2-3× převrátíme a necháme cca 5 min stát
- centrifugujeme 6 min. při 13,200 rpm
- supernatant (cca 500 µl) opatrně přepipetujeme do nových popsaných eppendorfek (1.5 ml), je třeba dát pozor, abychom pipetovali jen průhledný supernatant (!), pracujeme stále v digestoři a kontaminované špičky a eppendorfky vyhazujeme do zvláštní nádoby

- přidáme 500 µl vychlazeného isopropanolu (z mrazáku)
- 1-2× převrátíme a necháme cca 30 min. stát v -20 °C
- centrifugujeme 3 min. při 13,200 rpm
- supernatant opatrně slijeme do kádinky (v digestoři), na dně eppendorfky lze vidět drobný matně bílý pellet DNA, otevřené eppendorfky převrátíme dnem nahoru na filtrační papír (ubrousek)
- přidáme 400 µl vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku)
- inkubujeme 3 min. na termobloku při 37 °C a 1,200 rpm
- centrifugujeme 5 min. při 13,200 rpm
- supernatant opět opatrně slijeme do kádinky (už nemusíme v digestoři)
- přidáme 200 µl vychlazeného 70% ethanolu (z mrazáku) a necháme cca 5 min. stát
- centrifugujeme 3 min. při 13,200rpm
- supernatant opět opatrně slijeme do kádinky a eppendorfky necháme na ubrousku dnem vzhůru- aby stekl zbytek ethanolu
- pelet vysušíme v otevřených eppendorfkách na termobloku při 65°C cca.6-10min, sušení ukončíme ve chvíli, kdy lze pellet poklepem (cvrnknutím) na uzavřenou (!) eppendorfku oddělit od stěny
- vysušený pelet rozpustíme v 50µl TE pufru
- uzavřené eppendorfky inkubujeme 10 min. na termobloku při 60 °C a 600 rpm
- krátce promícháme na vortexu a krátce zcentrifugujeme
- DNA uchováváme v ledničce nebo dlouhodobě při -20 (-86) °C

Měření koncentrace DNA a ředění DNA na koncentraci potřebnou pro PCR

- změříme koncentraci DNA pomocí Nanodropu (viz návod B1)
- zaznamenejme koncentraci DNA (v ng/μl) a poměr A260/A280 (u čisté DNA je mezi 1.8 a 2.0)
- smícháme příslušné množství DNA (d) a sterilní Milli-Q vody (v) podle vzorečku:

$$d = (x \times y) / z \qquad v = x - d$$

x požadované množství naředěné DNA (μl)

y požadovaná koncentrace DNA (ng)

z naměřená koncentrace DNA (ng/μl)

- např. chceme 100 μl DNA (x) o koncentraci 30 ng (y) a máme k dispozici DNA o koncentraci 215 ng/μl (z)
- smícháme $(100 \times 30) / 215 = 13.95$ μl koncentrované DNA a $(100 - 13.95) = 86.05$ μl vody
- pro potřeby praktika izolovanou DNA naředíme do 0.2 μl PCR zkumavek na 5 ng/μl a popíšeme

Otestování kvality DNA na 0.8 % agarosovém gelu

- připravíme 0.8 % agarosový gel (viz návod B2)
- cca 4 μl nenaředěné DNA smícháme s 1 μl loading dye (např. na kousku parafilmu) a těchto 5 μl nanese na gel
- jako žebříček nanese 3 μl Lambda/HindIII

protokol B1: Extrakce DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN)

- cca 20 mg suchého materiálu nadrtíme (s využitím 2 wolframkarbidových kuliček) ve 2 ml eppendorfce
- ke vzorku přidáme 400 μ l bufferu AP1 a 4 μ l RNasy
- promícháme na vortexu, inkubujeme 10 min. na termobloku při 65 °C a 1,400 rpm
- přidáme 130 μ l bufferu AP2, promícháme na vortexu, necháme stát 5 min. na ledu
- centrifugujeme 5 min. při 13,200 rpm
- supernatant přepipetujeme do fialové kolonky
- centrifugujeme 2 min. při 13,200 rpm
- proteklou frakci přepipetujeme do 1.5 ml eppendorfky (cca 450 μ l), přidáme 1.5 objemu bufferu AP3
- třikrát promícháme převrácením
- 650 μ l přepipetujeme do bílé kolonky
- centrifugujeme 1 min. při 8,000 rpm
- vylijeme proteklou frakci
- do kolonky napipetujeme 500 μ l bufferu AW
- centrifugujeme 1 min. při 8,000 rpm
- vylijeme proteklou frakci
- opakujeme předchozí tři body
- centrifugujeme 2 min. při 13,200 rpm
- minikolonku vložíme do 1.5 ml eppendorfky, do kolonky napipetujeme 50 μ l bufferu AE (předehřátý na 60 °C, např. v eppendorfci na termobloku)
- necháme stát 10 min. (případně déle)
- centrifugujeme 2 min. při 8,000 rpm
- opakujeme předchozí tři body (minikolonku vložíme do nové 1.5 ml eppendorfky, získáváme druhou frakci (eluát))
- koncentraci DNA v obou eluátech změříme pomocí Nanodropu (viz návod B1)
- pro další podrobnosti a případné úpravy protokolu viz brožurky ke Kitu

protokol B2: Extrakce DNA pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex)

- cca 20 mg suchého materiálu nadrtíme (s využitím 2 wolframkarbidových kuliček) ve 2 ml eppendorfci
- přidáme 400 µl Lysis Bufferu P
- přidáme 20 µl Proteinase K
- promícháme na vortexu, inkubujeme 30 min na termobloku při 65 °C a 1,400 rpm
- centrifugujeme 30 s při 13,200 rpm
- supernatant přepipetujeme do Prefilter kolonky (zelená)
- centrifugujeme 1 min při 12,000 rpm, kolonku vyhodíme
- k filtrátu přidáme 5 µl RNase A, krátce promícháme na vortexu
- necháme 5 min stát
- přidáme 200 µl Binding Bufferu P, krátce promícháme na vortexu
- do 2ml Reciever Tube dáme Spin Filter kolonku a do ní přelijeme nebo přepipetujeme suspenzi a necháme 1 min. stát
- centrifugujeme 1 min. při 12,000 rpm
- filtrát vyhodíme, kolonku vložíme do nové 2 ml eppendorfky
- do kolonky přidáme 550 µl Wash Bufferu I
- centrifugujeme 1 min při 12,000 rpm
- filtrát vyhodíme, kolonku vložíme do té samé 2 ml eppendorfky
- do kolonky přidáme 550 µl Wash Bufferu II
- centrifugujeme 1 min. při 12,000 rpm
- filtrát vyhodíme, kolonku vložíme zpět do té samé 2 ml eppendorfky
- centrifugujeme 1 min. při 12,000 rpm
- kolonku vložíme do 1.5 ml eppendorfky
- přidáme 50 µl Elution Bufferu D (předehřátého na 65 °C)
- necháme 15 min. stát
- centrifugujeme 1 min. při 10,000 rpm
- filtrát obsahuje požadovanou DNA
- koncentraci DNA změříme pomocí Nanodropu (viz návod B1)
- pro další podrobnosti a případné úpravy protokolu viz brožurky ke Kitu

PCR (Polymerase Chain Reaction)

není nic jiného než „in vitro“ amplifikace části DNA. Pro správné fungování PCR reakce je třeba dodržet dvě základní podmínky: (1) v PCR zkumavce shromáždit nezbytné enzymy a další chemikálie, (2) podle určitého klíče cyklicky střídát teploty této směsi.

1. PCR mix

- *templátová DNA* – naše studovaná DNA nebo její část, kterou chceme studovat
- *DNA polymeráza* – enzym, který buduje nový řetězec DNA podle vzoru templátu
- *PCR buffer* – udržuje stabilní pH a obsahuje některé chemikálie, které jsou nezbytné pro správné fungování DNA polymerázy
- *MgCl₂* – často již obsažen v PCR bufferu
- *dNTP* – směs deoxyribonukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), základních stavebních kamenů DNA, ze kterých DNA polymeráza buduje nový řetězec
- *primer(y)* – oligonukleotid(y), zpravidla o délce 10-25 bazí, který se páruje s komplementární sekvencí v templátové DNA a na něj navazuje DNA polymeráza při budování nového řetězce

2. PCR teplotní program

Základním principem PCR je „pouhé“ rychlé střídání tří základních teplot. To je umožněno pomocí přístroje zvaného termocykler.

- *denaturace* (okolo 95 °C, cca 1 min) – dvoušroubovice DNA se rozplétá na dva řetězce
- *annealing* (35-60 °C, cca 45 s) – primery se více či méně specificky párují s komplementární oblastí na templátové DNA, nasedají na DNA
- *elongace* (většinou 72 °C) – optimální teplota pro činnost DNA polymerázy, dochází k budování nového řetězce DNA, na tvorbu 1 000 bazí je potřeba 1 min

Střídáním těchto tří teplot dochází k exponenciálnímu množení konkrétního úseku DNA ohraničeného právě dvojicí primerů. Počet cyklů u běžné PCR se pohybuje od 25 do 40. Výsledkem PCR je pak 2^{25} - 2^{40} kopií příslušného úseku DNA z každé molekuly templátové DNA. Takové množství již lze vidět (na DNA se selektivně váže např. ethidiumbromid, komplex DNA-ethidiumbromid v UV světle oranžově fluoreskuje) a dále s ním pracovat.

Optimalizace PCR

Pokud není produkt PCR reakce jasně zřetelný (případně žádný nebo je naopak více produktů odlišné délky), reakce pravděpodobně neproběhla optimálně, ale přesto se můžeme pokusit nějakým způsobem změnit reakční podmínky tak, aby PCR proběhla úspěšně. Je několik možností:

- *změna koncentrace DNA* – snížením koncentrace DNA snížíme i koncentraci případných inhibitorů PCR, které jsou přítomny ve vzorku, PCR může úspěšně proběhnout i s množstvím DNA menším než 1 ng DNA. Někdy naopak pomůže zvýšit koncentraci DNA až na 50 ng.
- *změna teploty annealingu* – snížením umožníme lepší vazbu primerů na templátovou DNA, přílišné snížení však může vést k tvorbě nespecifických produktů. Ideální je provést gradientový pokus a porovnat výsledné produkty.
- *zvýšení koncentrace $MgCl_2$* – hořčík stabilizuje komplex DNA-polymeráza, zvýšení koncentrace na 2.5 – 6.0 mM (standardní koncentrace je 1.5-2.0 mM) může přinést úspěch, příliš velká koncentrace ale také vede k tvorbě nespecifických produktů. Mg^{2+} se ekvimolárně váže na dNTP, změna koncentrace dNTP tedy přímo ovlivní i koncentraci volných Mg^{2+} iontů dostupných pro Taq polymerázu.
- *přidání aditiv* – některé látky (DMSO, betaine, BSA, NH_4SO_4) mohou zvyšovat stabilitu polymerázy, specifčnost vazby primerů...
- *modifikace cyklu* – prodloužení (zkrácení) doby elongace, zvýšení počtu cyklů, použití tzv. touchdown protokolu (teplota annealingu je v každém kroku snižována), úprava tzv. ramping time (rychlost změn teplot) apod.

Protokol C: PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Tato metoda se skládá ze dvou kroků:

1. *amplifikace* konkrétního úseku DNA (například intergenických oblastí v chloroplastové DNA) pomocí dvojice známých primerů. Často se využívá primerů, které jsou komplementární k začátkům a koncům kódujících genů okolo nekódující intergenické oblasti. Tyto primery pak bývají využitelné u většiny rostlinných druhů. Sekvence, teplotu annealingu a dobu elongace pro cpDNA primery, které jsou k dispozici, najdeme v tabulce.
2. *restrikce* (naštípání) namnoženého úseku pomocí enzymů zvaných restrikční endonukleázy, které specificky štěpí DNA. Například enzym zvaný *EcoRI* rozštěpí DNA vždy, pokud nalezne sekvenci 3'-GAATTC-5'. Pokud je takovéto místo v našem studovaném úseku DNA právě jednou, uvidíme pak po elektroforéze místo jednoho proužku dva. Pokud ale bylo místo změněno, např. mutací, k rozštěpení nedojde a proužek bude stále jeden. Pomocí této metody tedy hledáme polymorfismus v restrikčních místech nejrozličnějších endonukleáz a následně ho interpretujeme jako příbuznost či nepříbuznost organismů. Jakou sekvenci štěpí příslušná restrikční endonukleáza (od f. Fermentas) a jejich další vlastnosti najdeme na plakátě na ledniče.

C1. protokol na amplifikaci

příklad PCR mix pro PCR-RFLP cpDNA

- sterilní Milli-Q voda..... 17.30 μ l
- 10x PCR buffer (Sigma)..... 2.00 μ l
- dNTP (10 mM) 0.40 μ l
- primer 1 (25 pmol/ μ l)..... 0.25 μ l
- primer 2 (25 pmol/ μ l)..... 0.25 μ l
- (JumpStart) RedTaq DNA Polymerase (Sigma) (1U/ μ l) 0.50 μ l
- + studovaná DNA (5 ng/ μ l)..... 1.00 μ l

Se všemi chemikáliemi pracujeme na ledu. Polymerázu vyndáme z mrazáku až těsně před pipetováním a pak ji ihned vracíme zpátky. Jako primery použijeme jednu dvojici z těch, které jsou k dispozici (viz tabulka). Rozpipetujeme do jednotlivých zkumavek příslušný objem směsi (v tomto případě 20.7 μ l) a přidáme 1 μ l DNA.

Zkumavky vložíme do termocykleru s následujícím programem:

94 °C	1 min	
94 °C.....	45 sec	} 35x
52-62 °C	45 sec	
72 °C.....	2-4 min	
72 °C.....	10 min	
10 °C.....	hold	

Teplotu annealingu a dobu elongace nastavíme podle tabulky na str. 34.

Po proběhnuté reakci otestujeme amplifikovaný produkt nanesením cca 5 µl na 1% agarosový gel v TAE bufferu. Do první jamky na gelu nanese 1,5 µl žebříčku (O'GeneRuler 100bp Ladder Plus nebo O'GeneRuler Ladder Mix). Na gelu by měl být vidět jeden proužek v délce zhruba odpovídající očekávané dle tabulky. Jeho délku odhadneme pomocí softwaru KODAK 1D Image Analysis Software porovnáním s proužky žebříčku.

Pokud je na gelu viditelný jeden jasný proužek v délce zhruba odpovídající délce fragmentu dle tabulky, povedlo se nám namnožit studovaný úsek a můžeme přistoupit k jeho štěpení.

C2. protokol na restrikci

Restrikce musí probíhat za stálého optimálního pH a teploty. Stálé pH je zaručeno přidáním restrikčního pufru do reakční směsi, stálou teplotu zajistí inkubátor nebo příslušně nastavený termocykler. Maximální aktivita restrikčních endonukleáz od f. Fermentas je zajišťována jedním z pětice pufrů dodávaných s příslušným enzymem (viz barevně označené enzymy na plakátě na ledničce). Zvolíme tedy jeden z dostupných enzymů a k němu vybereme příslušný pufr.

Příklad směsi pro restrikci fragmentu:

- sterilní Milli-Q voda..... 11.1 μ l
- restrikční pufr 2.0 μ l
- restrikční enzym 0.3 μ l

Opět si do 1.5 ml eppendorfky napipetujeme směs jednotlivých složek pro příslušný počet vzorků+1 (v tomto pořadí). Stále pracujeme na ledu. Enzym opět uchováváme v mrazáku až do doby těsně před jeho pipetováním. Rozpipetujeme do jednotlivých PCR zkumavek příslušný objem směsi (v tomto případě 13.4 μ l) a přidáme 3 μ l amplifikované DNA. Zkumavky vložíme na 4h nebo přes noc do termocykleru nastaveného tak, aby držel teplotu 37 °C. Po inkubaci smícháme obsah každé zkumavky se 3 μ l 6x loading dye a můžeme nanášet na gel (buď horizontální agarosový nebo pro větší rozlišení na vertikální polyakrylamidový).

B. NÁVODY

1. Měření koncentrace DNA pomocí Nanodropu

- zapneme Nanodrop a spustíme program ND1000
- v tabulce vybereme typ měření – *Nucleic Acid*
- aktivujeme Nanodrop – napipetujeme 2 μ l ddH₂O, stiskneme *OK*, po změření otřeme kapičku speciálním ubrouskem
- napipetujeme 2 μ l roztoku ve kterém máme rozpuštěnou DNA (TE buffer, voda....) a stiskneme *Blank*, po změření otřeme kapičku speciálním ubrouskem
- napipetujeme 2 μ l vzorku a stiskneme *Measure*, po změření vždy otřeme kapičku speciálním ubrouskem. Tento krok opakujeme při měření všech vzorků.
- při každém měření můžeme do pravého okénka (*Sample ID*) vpisovat název vzorku – tyto údaje se ukládají do tabulky, kterou si po ukončení měření můžeme uložit
- na obrazovce jsou zobrazeny hodnoty: 260/230 (optimální je hodnota 1,8-2,2), 260/280 (tento poměr udává čistotu DNA, optimální je v rozmezí 1,8-2). Pokud je tato hodnota nižší, je vzorek znečištěn proteiny, polyfenoly nebo jinými látkami.
- naměřené výsledky si můžeme uložit – postupně zmáčkeme: *Show report, Reports, Save report, Export report table only*

2. Horizontální agarosová elektroforéza

- pracujeme v rukavicích, protože všechny věci mohou být kontaminovány ethidiumbromidem (známý karcinogen)
- do erlenky na předvážkách navážíme příslušné množství agarosy I (podle velikosti gelu, viz tabulka na další straně)
- přidáme příslušné množství 1×TAE nebo 1×TBE bufferu (odměříme označeným odměrným válcem), lehce kroužením promícháme
- vložíme na 1-2 min. do mikrovlnky, v uvařeném gelu nesmí být krystalky

- mezitím si připravíme příslušně velkou komůrku na nalití gelu, vložíme ji do nalévacího zařízení (komůrka s gumovým těsněním) nebo ukončíme kovovými plíšky (komůrka s bočními držátky), případně olepíme páskou
- do zářezů umístíme hřebínky s příslušným počtem zubů (tloušťka: bílé 1 mm, červené 1.5 mm)
- uvařený gel ochladíme kroužením erlenkou pod tekoucí vodou (držíme gumovou chňapkou, abychom se nespálili)
- přidáme příslušný počet kapek ethidiumbromidu z kapátka
- gel pomalu naléváme do komůrky s instalovanými hřebínky, tuhne cca 30 minut
- po ztuhnutí gelu opatrně vyjmeme hřebínky a plíšky, případně odstraníme pásku, komůrku vložíme do elektroforetické vany a zalijeme příslušným bufferem (1×TAE nebo 1×TBE) tak, aby celý gel byl těsně pod hladinou a všechny jamky byly zality
- do první jamky pipetujeme cca 1,5 μ l markeru (žebříčku), do dalších jamek pak 4-5 μ l DNA po PCR
- po napipetování všech vzorků přiklopíme víko s přívodními kabely (musí být na pravé straně elektroforetické vany!) a zapneme proud na zdroji
- napětí (V) nastavíme otáčením knoflíku na příslušnou hodnotu
- ve chvíli, kdy čelo (nejrychlejší barvička) dojíždí ke konci gelu, vypneme proud, sejmeme víko vany, vyndáme komůrku a gel umístíme doprostřed plochy UV transiluminátoru dokumentačního systému Kodak Gel Logic 100

	<i>g</i> agarosy				
% gel	malá krátká	malá dlouhá	střední (menší)	střední	velká
0.8	0.24	0.32	0.5	0.8	1.6
1.0	0.30	0.4	0.6	1.0	12.0
1.8	0.54	0.72	1.1	1.8	3.6
<i>ml</i> pufru	30	40	60	100	200
kapek EtBr	1	1	1	2	4
napětí (V)	100	100	120	120	150

3. Práce s dokumentačním systémem Kodak Gel Logic 100

- doprostřed plochy UV transiluminátoru umístíme gel, opatrným posouváním po ploše se zbavíme případných vzduchových bublin pod gelem, gel srovnáme
- zavřeme dvířka a zapneme zdroj UV světla
- bez rukavic (!) spustíme program Kodak 1D, v menu „New“ vybereme „New digital camera capture“
- otevře se okno, kde potvrdíme Gel Logic 100 a připojení FireWire
- v dalším otevřeném okně klikneme na „Preview“, kamera během 3s sejme obraz gelu a zobrazí ho na obrazovce
- přímo na objektivu kamery můžeme vyladit *zoom* (velikost gelu nebo jeho části) a *clonu* (jas)
- stiskneme „Stop preview“ a do počítače obraz gelu přeneseme stiskem „Capture“
- obraz gelu je v počítači, vytisknout ho můžeme stiskem ikony tiskárny a potvrzením „Print“ (termotiskárna Mitsubishi se zapíná zepředu vlevo nahoře)
- vypneme zdroj UV světla, otevřeme dvířka, gel vyhodíme do určené nádoby a plochu UV transiluminátoru očistíme ubrouskem, případně trochou ethanolu

4. Práce se softwarem pro analýzu gelů KODAK 1D Image Analysis Software

- program umožňuje automatické vyhledání drah a proužků, po jejich srovnání se žebříčkem i určení velikosti proužků a koncentrace DNA v nich
- nejprve tlačítkem  vybereme oblast gelu, kterou chceme analyzovat
- potom stiskneme „Find Lanes“, přes proužky příslušných drah se nakreslí čáry
- pokud není automatické nalezení přesné, je možné udělat úpravy manuálně (pomocí tlačítka )
- vybereme dráhu s žebříčkem a po dvojkliku na ní se objeví okno, ve kterém zadáme „Lane Type“ jako *Standard*, klikneme na „Select“ a vybereme příslušný žebříček
- stiskneme „Find Bands“, objeví se čáry v místech, kde jsou proužky, citlivost vyhledávání proužků lze ovlivnit stiskem „Adjust Bands“
- přebytečné proužky lze smazat po jejich vybrání tlačítkem 
- přidat proužky lze po stisku tlačítka 
- na velikosti proužků se můžeme podívat po stisku „Lane Analysis Data“ z menu „Options“, je možno vybrat zobrazení různých charakteristik proužků, důležitá je především délka proužku (*MW – molecular weight* udávaná v bp, tj. base pairs, počet párů bází) a množství DNA (*Mass* v ng)
- pro další funkce programu viz User's Guide

5. Zacházení s termocyclerem Techne Touchgene

- přístroj se zapíná v zadní části přístroje nad přívodní šňůrou, po zapnutí po několika sekundách naskočí základní obrazovka
- přístroj má dotykový displej, pozor na jeho poškození, např. nehtem
- stiskneme „System User“ a dostaneme se do nabídky uložených programů
- v další nabídce stiskneme „Programs“ a můžeme vybrat program, který chceme spustit – prostě se ho dotkneme, šipkami můžeme rolovat nahoru a dolů
- struktura typického programu může vypadat následovně
 - Heated lid..... 105.0 °C
 - Heated lid before program..... On
 - Pause before programOff
 - Initial denaturation..... 02m00s94.0 °C
 - Hot start Disabled
 - Number cycles 35
 - seg..... MAX °C/s..... 01m00s94 °C
 - seg..... MAX °C/s..... 00m45s54 °C
 - seg..... MAX °C/s..... 02m00s72 °C
 - Final extension..... 10m00s72 °C
 - Final hold..... 10 °C
- stiskem „Exit“ se vrátíme zpět na výběr programů
- *stiskem „Run“ spustíme vybraný program*
 - objeví se dotaz na logování průběhu programu
 - před potvrzením nebo odmítnutím je třeba vložit PCR zkumavky, zkontrolovat uzavření a zavřít víko (kolíbkou v horní části víka přitáhneme směrem k sobě, uzavřeme víko a odtáhnutím kolíbkou od sebe víko zajistíme), otočením kolečka směrem doleva lehce utáhneme (zbytečně nepřetahovat!)
 - 4 min se bude předehřívat víko (pokud je zadáno v programu) a spustí se program
 - na obrazovce je graficky znázorňován průběh programu
 - pro přerušení nebo po skončení stiskneme 2x „Stop“ a „Exit“
- *stiskem „Edit“ můžeme editovat vybraný program a měnit veškeré jeho parametry*
 - stiskem „Ins“ vložíme další segment nebo cyklus
 - stiskem „Del“ ho naopak vymažeme

- program je třeba uložit stiskem „Save“, případně „Save As“ (a potvrdit „Yes“)
- pokud chceme zadat gradient, je třeba se podívat na rozložení teplot stiskem „Gradient calculator“ (na stejné obrazovce, kde jsme vybírali „Programs“)
- je třeba zadat „Temperature“, což bude teplota uprostřed bloku
- a „Gradient“, což je rozpětí gradientu ve °C

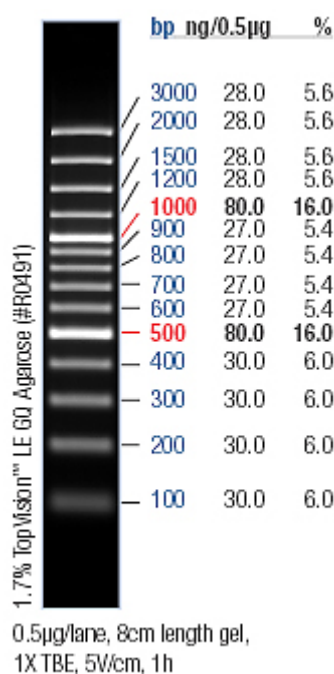
6. Zacházení s termocyclerem Mastercycler ep gradient S

- přístroj se zapíná v zadní části vpravo od přívodního kabelu
- přístroj ovládáme pomocí klávesnice v pravé a dolní části kontrolního panelu nebo pomocí myši
- po zapnutí je třeba se přihlásit, případně zadat PIN
- základní obrazovka ukazuje několik ikon
 - ikona Eppendorf (základní menu) nabízí např. vypnutí přístroje („Shutdown“) – přístroj VŽDY vypínáme tímto příkazem
 - následují ikony uživatelů, po jejich rozbalení je možno vidět jednotlivé složky a PCR programy v nich uložené
- *vytvoření nového programu*
 - najedeme na příslušnou složku a stiskneme tlačítko „New“
 - napíšeme jméno programu (8 znaků), stisknutím „Keybd“ je možno zobrazit klávesnici
 - stiskneme OK a program se objeví v příslušné složce
 - stiskneme „Edit“ a můžeme v našem programu měnit teploty a délky jednotlivých kroků a počet cyklů
 - po stisknutí „Header“ je možno zadat předehřívání a teplotu víka před vlastní reakcí (ESP heated lid), zvolit typ Mastercycler ep gradient S a zadat typ kontroly (block nebo simulated tube)
 - gradient, time a/nebo temperature increment a ramping time v libovolném kroku nastavíme po stisknutí tlačítka „Option“
 - teploty na gradientu v jednotlivých sloupcích bloku se zobrazí stiskem „ShowGrad“, maximální rozpětí gradientu je 24 °C
 - program je třeba uložit stiskem „Save“ (tato možnost se zobrazí po stisku „>>“ v pravé dolní části)

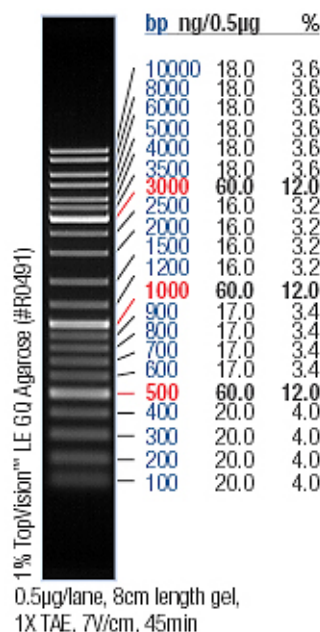
- *spuštění vybraného programu*
 - vložíme PCR zkumavky, stripy nebo destičku
 - přitáhneme víko směrem k sobě na doraz
 - najedeme na příslušný program, případně ho ještě překontrolujeme po stisku „Edit“
 - stiskneme start, pokud byla v programu zadána metoda kontroly „sim. tube“, je třeba zadat počet vložených zkumavek a objem PCR reakce (v μ l)
 - po stisku „OK“ se začne zahřívat víko, displej zobrazuje dobu do konce reakce, čas startu i konce, teplotu bloku i víka a status
 - ve chvíli, kdy víko dosáhne zadané teploty (standardně 105 °C), je automaticky přitlačeno na zkumavky, začíná vlastní reakce a na displeji je graficky znázorňován průběh reakce
 - po ukončení programu je třeba stisknout „Enter“, víko je odjištěno a můžeme vyndat případné produkty PCR reakce
 - v průběhu PCR reakce je možné vytvářet či editovat další programy, na údaje o průběhu reakce se dostaneme po najetí na ikonu „Cycler1“ (je zelená, pokud právě probíhá reakce) v hlavním menu a stiskem „Status“

DNA žebříčky (ladders) používané v laboratoři (od f. Fermentas)

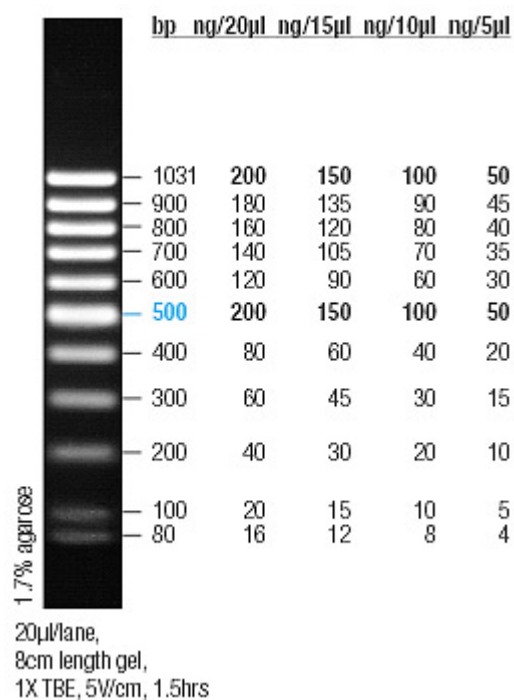
O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use



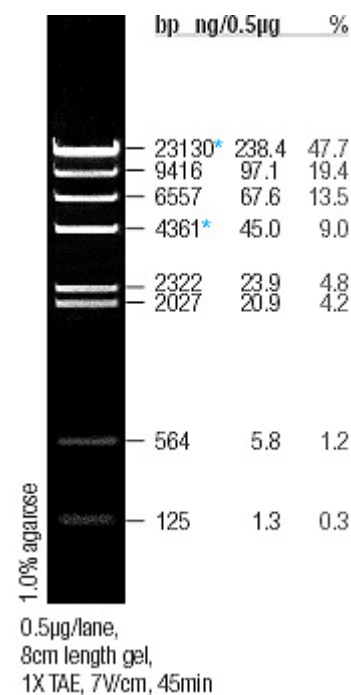
O'RangeRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use



MassRuler™ DNA Ladder, Low Range



Lambda DNA/HindIII Marker

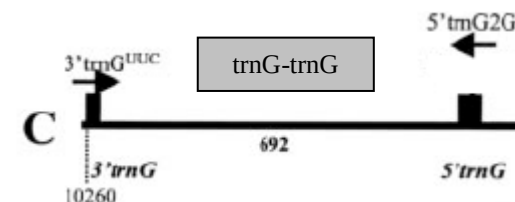
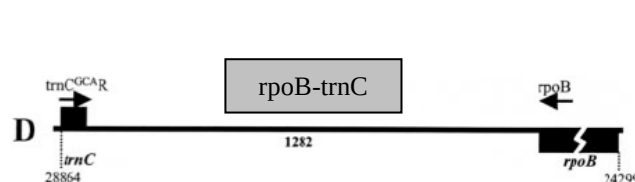
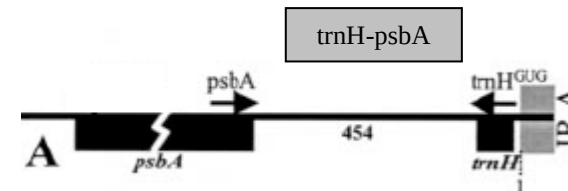
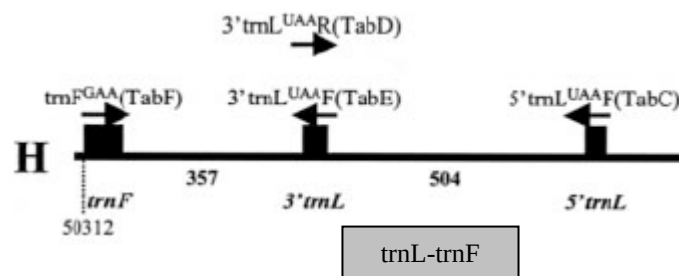


Univerzální primery pro amplifikaci některých úseků cpDNA

jméno	Forward primer (5' - 3')	Sekvence	Reverse primer (5' - 3')	Sekvence	Velikost (bp)	T _a	Elongace (min)	Reference
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-c</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	<i>trnF-f</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	602–1076	50	1-2	a
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH</i>	CGCGCATGGATTACACAATCC	<i>psbA</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	198–1077	50-56	1-2	b, c
<i>rpoB-trnC</i>	<i>rpoB</i>	CKACAAAAYCCYTCAATTG	<i>trnC</i>	CACCCRGATTYGAACGGGG	914–1309	50-57	1-2	d
<i>trnG-trnG</i>	<i>trnG2G</i>	GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAA	<i>trnG</i>	GTAGCGGGAATCGGACCCGCATC	697–1008	50	1-2	d, e
<i>trnK-matK</i>	ANU_cp001-L	GGACTCGAACCCGGAACCTA	ANU_cp002-R	TTGGGTTTCGGTATTTTTAGAAGA		55-61		f
<i>trnR-atpA</i>	ANU_cp019-L	CAGAGGTCTTCTAAACCTTTGGT	ANU_cp020-R	CCTTTTGAAGGAAGCTATTCAGG		55-61		f
<i>rpoC1</i>	ANU_cp033-L	TTCGAATTAAACCTCGTAATCG	ANU_cp034-R	CATGTGTGGTATTTGAAACGTC		55-61		f
<i>psaA-ycf3ex3</i>	ANU_cp051-L	GTTCCGGCGAACGAATAAT	ANU_cp052-R	GTCGGATCAAGCTGCTGAG		55-61		f

Reference:

- a Taberlet et al. (1991)
- b Tate & Simpson (2003)
- c Sang et al. (1997)
- d Shaw et al. (2005)
- e Ohsako & Ohnishi (2000)
- f Ebert & Peakall (2009)



Návody na přípravu některých roztoků

10x TAE - Tris-Acetate-EDTA (do 1000 ml)

Tris-base48,46 g

Na₂-EDTA3,72 g

glacial acetic acid12,01 g

10x TBE - Tris-Borate-EDTA (do 1000 ml)

Tris-base108,00 g

boric acid55,00 g

Na₂-EDTA9,30 g

100x TE - Tris-EDTA (do 1000 ml)

Tris-base121,14 g

Na₂-EDTA37,22 g

CTAB - Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (do 500 ml)

CTAB10,00 g

Tris-base6,06 g

NaCl40,95 g

EDTA2,92 g

merkaptoethanol0,20 %

dNTP (10 mM)

každý z dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)..... po 20 µl

sterilní Milli-Q voda..... 120 µl