

Praktikum izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů

PROTOKOLY

Realizace praktika byla umožněna díky finanční podpoře grantem
FRVŠ, kategorie F4B, č. projektu 844

Časový harmonogram praktika

1. den

- bezpečnostní předpisy, zásady práce v laboratoři, seznámení s vybavením laboratoře
- úvod do problematiky izolace mikrosatelitových primerů, doporučená literatura
- restrikce celkové DNA
- kontrola produktu na agarosovém gelu, práce s dokumentačním systémem Kodak Gel Logic 100
- ligace adaptorů, kontrola na gelu, purifikace produktu

2. den

- preamplifikace
- princip selektivní hybridizace a obohacování prostřednictvím streptavidinových kuliček, demonstrační video
- hybridizace prostřednictvím biotinylovaných mikrosatelitových oligonukleotidů
- vymytí fragmentů bez repetice za pomoci magnetických streptavidinových kuliček
- přečištění fragmentů prostřednictvím kitu

3. den

- měření koncentrace, ředění
- preamplifikace
- příprava LB média, příprava agarových ploten
- princip hybridizace kompetentních buněk
- inserce produktu do vektoru (GENE Jet Kit, Fermentas)

4. den

- transformace vektoru do kompetentních buněk tepelným šokem
- výsev produktu na selektivní agarové plotny, inkubace přes noc

5. den

- kontrola úspěšnosti transformace
- PCR z pozitivních kolonií, kontrola na gelu
- purifikace produktu, příprava vzorků k odeslání na sekvenační analýzu do Macrogeneru

přerušeni praktika na několik dní až do dodání sekvencí z Macrogeneru

6. den – 7. den

- vyhodnocování sekvenačních dat ze sekvenátoru
- návržení primerů podle sekvencí přilehlých k mikrosatelitové oblasti
- objednání primerů (SIGMA)

přerušeni praktika na několik dní až do dodání primerů (zpravidla 3-5 dnů)

8. den – 10. den

- testování variability jednotlivých mikrosatelitů
 - optimalizace PCR s nadesignovanými primery
 - PCR většího počtu vzorků, kontrola na agarosovém gelu
 - sekvenační analýza

1. den: Restrikce celkové DNA, ligace adaptorů, extrakce DNA fragmentů z gelu

Vstupní DNA

Pro práci je třeba mít relativně velké množství vstupní DNA (optimálně 6-10 µg) v co nejlepší kvalitě. Některé sekundární metabolity mohou inhibovat činnost restrikčních enzymů a T4 ligázy.

Pracovat budeme s DNA o koncentraci 500-1000 ng/µl. Pokud máme dostatečné množství DNA s nižší koncentrací, odpaříme část rozpouštědla ve vákuové centrifuze, čímž roztok zkoncentrujeme na požadovanou hodnotu. K zakoncentrování DNA je rovněž možné použít komerční kity nebo přesrážení.

1.1. Restrikce DNA

K restrikci je možné použít celou škálu enzymů. Kritériem výběru je typ štěpení – tupé nebo lepivé konce (musí být kompatibilní s použitými adaptory) a četnost štěpných míst (potřebujeme získat co nejvíce fragmentů s délkou 400-1000 bp).

My pro práci použijeme tyto tři restrikční enzymy od Fermentas:

*Hae*III (*Bsu*RI)

*Alu*I

*Rsa*I

Pro každý enzym připravíme restrikční směs zvlášť, štěpení každého vzorku bude probíhat paralelně ve třech různých mikrozkušavkách.

Restrikční směs pro 1 vzorek:

DNA (2-4 µg)	4 µl
restrikční pufr (dle enzymu)	0,9 µl
ddH ₂ O	3,1 µl
restrikční enzym	1,0 µl

Zkušavky s restrikční směsí umístíme do termocykleru s následujícím programem:

3 hodiny	37°C
10 minut	65°C

1.2. Ligace

K rozštěpené DNA připojíme adaptory se známými sekvencemi, které nám následně umožní amplifikaci DNA fragmentů.

Pro práci použijeme tyto dva oligonukleotidy:

	5'		3'
21-mer	CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA		
25-mer PO ₄	- TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A		

Nejprve je třeba z jednořetězcových oligonukleotidů připravit dvouřetězcové adaptory:

CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA
A CAC GAG AAC GAA TGC GCA CCT GAT - PO₄

Příprava adaptorů

Zásobní roztok oligonukleotidů má koncentraci 250 pmol/μl. Pro práci budeme potřebovat směsný roztok s koncentrací oligonukleotidů 10 pmol/μl:

ligační pufr	23 μl
21-mer	1 μl
25-mer	1 μl

Mikrozkumavky vložíme do termocykleru s následujícím programem:

5 minut	95°C
1 hodina	35°C (ramp. 0,03°C/s)

Ligace

Ligační směs pro 1 vzorek:

rozštěpená DNA	27 μl	(všechny tři restrikční produkty se smíchají dohromady)
10× ligační pufr	1 μl	
adaporty (10pmol/μl)	3 μl	
ATP (10mM)	2,5 μl	
50% PEG 4000	3,5 μl	
T4 ligáza (5U/μl) Fermentas	3 μl	

Mikrozkumavky s ligační směsí necháme inkubovat 3-4 hodiny při 22°C (lze nechat volně při pokojové teplotě, ale máme-li možnost využít termocykleru, použijeme ho).

1.3. Extrakce DNA fragmentů z gelu

Horizontální agarozová elektroforéza (podrobný návod viz. str.14)

Připravíme si 1,5% TBE gel s dostatečně velkými jamkami. Gel vložíme do elektroforetické vany s dosud nepoužitým TBE pufrem.

Ligační reakci smícháme s nanášecí barvičkou LoadingDye a nanese na gel. Mezi jednotlivými vzorky necháváme vždy 1 jamku volnou. Vedle vzorků nanese rovněž žebříček (100 bp). Elektroforézu nastavíme na 100 V.

Během doby, po kterou probíhá elektroforetická separace si nadepíšeme a zvážíme zkumavky (2 ml).

Když se čelo elektroforézy přiblíží okraji gelu, elektroforézu ukončíme. Prostřednictvím přístroje Kodak Gel Logic 100 rychle uděláme snímek gelu (je třeba minimalizovat dobu expozice UV záření). Podrobný návod viz. str.15.

Nasadíme si **ochranné brýle s UV filtrem** a rukavice. Rozsvítíme UV světlo a prostřednictvím čistého skalpelu rychle vyřízneme fragmenty s délkou 400 – 1000 bp (pracujeme rychle, aby doba osvětlení UV zářením byla minimální). Vyříznuté části gelu vložíme do předem zvážených a označených zkumavek. Opět zvážíme a určíme objem vyříznutého gelu.

Extrakce DNA z gelu, měření koncentrace

DNA z gelu vyextrahujeme prostřednictvím kitu DNA mini elute (QIA) podle originálního návodu.

K eluci použijeme 20 μ l AE pufru předehřátého na 65°C a necháme inkubovat 10-20 minut při pokojové teplotě. Teprve potom centrifugujeme. Filtry nevyhazujeme, dokud se měřením koncentrace nepřesvědčíme, že máme uspokojivý výtěžek. V opačném případě provedeme ještě druhé vymývání 15 μ l předehřátého AE pufru.

Koncentraci přečištěného produktu změříme na NanoDropu. Vzorky s koncentrací 40-100 ng/ μ l použijeme přímo. Vzorky s vyšší koncentrací naředíme.

2. den: Preamplifikace, purifikace PCR produktu. hybridizace biotinylovaných oligonukleotidů, magnetická separace fragmentů s mikrosatelity

2.1. Preamplifikace

K amplifikaci fragmentů využijeme primeru komplementárního k sekvenci adaptorů – 21mer. Vyzkoušíme 3 různé teploty anealingu a 2 koncentrace DNA.

Preamplifikační směs pro 1 vzorek:

ddH ₂ O	17,4 µl
10× pufr	2,1 µl
dNTP	0,4 µl
primer 21mer	0,3 µl
<u>JSRT polymeráza</u>	<u>0,5 µl</u>
	20,7 µl
DNA	0,5/1 µl

Mikrozkumavky umístíme do termocykleru s následujícím programem:

1 minuta	94°C	} 30×
50 sekund	94°C	
1 minuta	53-57°C	
2 minuty	72°C	
10 minut	72°C	

Výsledek zkontrolujeme prostřednictvím elektroforézy na 1% TAE gelu (naneseme 3 µl). Produkt by měl být vidět jako šmouha v rozmezí 400-1000 bp.

Úspěšně amplifikované produkty smícháme a přečistíme kitem Jet-Quick PCR product purification kit (Genomed). Pro eluci použijeme 50 µl TE pufru předehřátého na 65°C a necháme inkubovat 10-20 minut při pokojové teplotě. Podrobný postup purifikace je popsán na str. 15.

Na nanodropu změříme koncentraci produktu. Pro další práci budeme potřebovat DNA s koncentrací v rozmezí 50-80 ng/µl.

2.2. Hybridizace biotinylovaných oligonukleotidů s DNA fragmenty

DNA fragmenty budeme hybridizovat s mikrosatelitovými oligonukleotidy nesoucími na 5' konci biotin, který se váže na streptavidin, čehož využijeme pro selekci v následujícím kroku. Pro hybridizaci budeme používat tyto mikrosatelitové oligonukleotidy:

	5'	3'
BIO-(GAA)₈	Biotin - GAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA	
BIO-(GA)₁₁	Biotin - GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	
BIO-(CA)₁₀	Biotin - CACACACACACACACACACA	

Pro optimalizace výtěžku hybridizace by se měl dodržovat poměr zhruba 100 ng DNA na 200 ng každého oligonukleotidu.

Hybridizační směs pro 1 vzorek:

6xSSC/0,1%SDS	100 µl
oligonukleotidy	1,5 µl (každého)
purifikované DNA fragmenty	2 µl

Mikrozkušavky s hybridizační směsí umístíme do termocykleru s následujícím programem.

5 minut	95°C
1 hodina	60°C (ramping time 0,05°C/s)

Během inkubace vzorky občas promícháme, proto je třeba zvolit **cykler, který lze průběžně otvírat!**

2.3. Magnetická separace fragmentů s mikrosatelitovými oblastmi

Příprava magnetických kuliček Streptavidin MagneSpher Paramagnetic Particles (Promega) pro použití

Během hybridizace si připravíme kuličky pro magnetickou separaci. Proces je třeba **načasovat tak, aby připravované kuličky byly co nejdříve použity!** (Trvá to zhruba 10-15 minut.)

Kuličky jsou v originálních zkumavkách rozpipetovány po 600 µl. Pro každou reakci budeme potřebovat 200 µl kuliček.

Termomixer předehejeme na teplotu 60°C!

Kuličky v originální zkumavce resuspendujeme jemným obracením zkumavky (to může trvat několik minut). Pro každou reakci přepipetujeme do jedné označené 1,5 ml zkumavky 200 µl suspenze.

*Otevřenou zkumavku umístíme do magnetického stojánu (kuličky se seskupí na boční stěně zkumavky na straně přivrácené ke stojánu). Pipetou odstraníme supernatant a co nejrychleji přidáme 300 µl 0,5×SSC. Kuličky resuspendujeme jemným promícháváním.

*Celý proces dvakrát zopakujeme.

Po třetím promytí kuličky opět magneticky oddělíme, odpipetujeme supernatant a přidáme 200 µl 6×SSC. Nyní jsou kuličky připravené pro použití.

Separace biotinylovaných fragmentů prostřednictvím streptavidinových magnetických kuliček

Ke směsi kuliček rozpuštěných v 6×SSC přidáme hybridizovanou denaturovanou směs. Zkumavky umístíme do termobloku předeheřátého na 60°C a 15 minut inkubujeme za mírného třepání (600-800 rpm).

Rychle: Zkumavky umístíme do magnetického stojánu, supernatant přepipetujeme do označených zkumavek a uschováme. Ke kuličkám **ihned** přidáme 300 µl 6×SSC/0,1% SDS. Zkumavky vložíme do termobloku a 15 minut inkubujeme při pokojové teplotě za mírného třepání (600-800 rpm).

Opakujeme magnetickou separaci, opět odstraníme supernatant a přidáme 300 µl 6×SSC/0,1% SDS. Zkumavky vložíme do termobloku a 15 minut inkubujeme při 60°C, necháme třepat. Zároveň můžeme do bloku vložit i zkumavku s 0,1M NaOH, který potřebujeme předehřát na 60°C.

Kuličky dvakrát za sebou **rychle** promyjeme 300 µl 6×SSC. Odstraníme supernatant a neprodleně pokračujeme dalším krokem.

Vymytí fragmentů s mikrosatelity – přerušení vazby mezi biotinem a streptavidinem

Varianta A – denaturace vysokou teplotou

Ke kuličkám přidáme 50 µl 10% TE bufferu (například z kitu Jet Quick) a 10 min inkubujeme při 98°C za mírného třepání. (Aby nedocházelo k otvírání zkumavek, je vhodné víčko přelepit izolepou).

Kuličky magneticky odseparujeme a supernatant s požadovanými fragmenty rychle přepipetujeme do předem označené zkumavky.

Kuličky nevyhazujeme a okamžitě zopakujeme eluci s dalšími 50 µl 10% TE bufferu. Supernatant přepipetujeme do další označené zkumavky.

Varianta B – denaturace NaOH

Ke kuličkám přidáme 100 µl 0,1M NaOH (předehřátý na 60°C) a 5 min inkubujeme při 60°C za mírného třepání.

Přidáme 100 µl Tris-HCl (pH 7,5), rychle a krátce zcentrifugujeme (nepoužíváme stolní minifugu, která nedosáhne dostatečné rychlosti). Supernatant ihned přepipetujeme do označené zkumavky.

Kuličky nevyhazujeme – přidáme dalších 100 µl Tris-HCl, kuličky resuspendujeme třepáním a opět rychle a krátce zcentrifugujeme. Supernatant přepipetujeme do další označené zkumavky.

Zkumavku s kuličkami nevyhazujeme, ale uschováme ji v lednici (pokud bychom zjistili, že eluce neproběhla úspěšně, budeme je moci ještě použít).

Získaný eluát můžeme použít do následující PCR reakce přímo, nebo jej můžeme přečistit prostřednictvím kitu pro purifikaci PCR produktu (doporučeno po eluci prostřednictvím NaOH). Pro purifikaci použijeme kit Jet Quick PCR product purification spin kit (GENOMED). Změříme koncentraci získaného produktu (Nanodropem). Měla by se pohybovat v rozmezí 5-30 ng/ µl.

3. den: Amplifikace obohaceného produktu, ligace do vektoru.

3.1. Amplifikace produktu obohaceného o mikrosatelitové oblasti

Opět budeme amplifikovat DNA prostřednictvím primeru 21-mer. Pro amplifikaci produktu použijeme tři různé teploty.

Preamplifikační směs pro 1 vzorek:

ddH ₂ O	17,4 µl	
10× pufr	2,1 µl	
dNTP	0,4 µl	
primer 21mer	0,4 µl	
<u>JSRT polymeráza</u>	<u>0,5 µl</u>	
	20,8 µl	
DNA	1 µl	(má-li vstupní DNA koncentraci >15 ng/ µl, použijeme pouze 0,5 µl, nebo DNA naředíme)

Mikrozkumavky umístíme do termocykleru s následujícím programem:

<u>1 minuta</u>	<u>94°C</u>	} 30×
50 sekund	94°C	
1 minuta	53-57°C	
<u>2 minuty</u>	<u>72°C</u>	
10 minut	72°C	

3 µl produktu nanese na 1% TAE gel.

Úspěšně amplifikované produkty smícháme a přečistíme prostřednictvím purifikačního kitu Jet Quick - PCR product purification kit (Genomed).

Na nanodropu změříme koncentraci produktu. Pro klonování použijeme vzorky s koncentrací 5-20 ng/ µl. Vzorky s vyšší koncentrací je třeba naředit na zhruba 15 ng/ µl. Vzorky s nižší koncentrací nejsou pro použití vhodné

3.2. Ligace amplifikovaných fragmentů do pGEM-T easy vektoru

P-GEM-T Easy Vector firmy Promega obsahuje poly-T přesahy v klonovacím místě. Tyto přesahy jsou kompatibilní vůči A-přesahům, které vytváří většina termostabilních polymeráz během PCR. Zvyšuje se tak účinnost ligace PCR produktu do plazmidu a je umožněno klonování PCR produktů.

Ligace do vektoru

Flow-box vysterilizujeme UV světlem. V předem vysvíceném flow-boxu si připravíme ligační směs (pracujeme na ledu):

Ligační směs pro 1 vzorek:

2× ligační pufr	1,66 µl
pGEM-T vektor	0,33 µl
<u>T4 ligáza</u>	<u>0,33 µl</u>
	2,32 µl
DNA	1,0 µl

Varianta A – rychlá – chceme-li pokračovat v dalším kroku tentýž den

Zkumavky umístíme do termocykleru a necháme inkubovat 1-2 hod při 22-24°C.

Varianta B – pomalejší – chceme-li pokračovat v dalším kroku následující den

Do polystyrenové krabice nalijeme vodu o teplotě 22°C. Zkumavky s ligační směsí vložíme do plastového stojánku a stojánek vložíme do krabice s vodou. Krabici uzavřeme a vložíme do lednice. Necháme inkubovat přes noc.

4. den: Transformace do kompetentních buněk, výsev na plotny.

4.1. Transformace do kompetentních buněk

Před započítím práce flow-box vysterilizujeme UV světlem!

Kompetentní buňky jsou uloženy v hlubokomrazicím boxu (-80°C). V jedné zkumavce je 200 μ l buněk (obvykle o trochu víc), **po rozmražení již nelze buňky znovu zamrazit a použít**, proto si vždy předem naplánujeme práci tak, abychom spotřebovali veškerý obsah rozmražené zkumavky!

Buňky je třeba **rozmrazovat velice pomalu** – zkumavku z mrazáku vložíme rovnou do ledu. Rozmražení trvá zhruba 10-15 minut.

Ve vysvíceném flow-boxu přepipetujeme do označených 1,5 ml zkumavek 1 μ l ligační směsi (pracujeme na ledu). Kapku umístíme na dno zkumavky.

Přímo ke kapce přidáme 20-24 μ l kompetentních buněk (množství stanovíme podle počtu vzorků). Zlehka v ruce protřepeme (bez použití vortexu!) a necháme 20 minut inkubovat na ledu. Mezitím si předehřejeme termomixér na 43°C.

Zkumavky vložíme do předehřátého termomixéru. Při 42°C je inkubujeme 45-50 s. **Důležité! Současně se vzorky vkládáme i 1 zkumavku s vodou, do které umístíme teploměr. Množství vody ve zkumavce musí stačit na ponoření spodní části teploměru, ve které je ampulka s lihem nebo rtutí. Sledujeme narůstání teploty ve zkumavce. Teprve po dosažení 42°C odpočítáme 45-50 s.**

Vzorky ihned přendáme na led. Necháme je inkubovat 2 minuty.

Ve flow-boxu přidáme 470 μ l LB média (o pokojové teplotě, nebo ho můžeme předehřát na 37°C).

Zkumavky položíme ve vertikální poloze do inkubátoru a upevníme je izolepou nebo klávací páskou. Zavřeme víko, nastavíme 37°C a 150 rpm a spustíme. Vzorky necháme inkubovat 60-80 minut.

4.2. Příprava ploten pro výsev

LB ampicilinové plotny pro výsev je vhodné připravit několik dní předem. Postupujeme podle návodu na str. 18.

Během inkubace nanese na LB ampicilinové plotny IPTG (10mM) a X-Gal (2% roztok v dimethylformamidu), což je důležité pro modrobílou selekci pozitivních kolonií.

pGEM-T vektor nese gen rezistence vůči ampicilinu (Amp), který umožňuje přímou selekci transformovaných bakterií. V klonovacím místě leží gen kódující část enzymu β -galaktosidasy (β -Gal), LacZ α -peptid. Vložením PCR produktu do této oblasti, tzv. inzerční inaktivací LacZ α -peptidu je porušena produkce α -peptidu a β -Gal se stává neaktivní. To umožňuje přímou selekci rekombinantních klonů na selekčních miskách (tzv. modro-bílá

selekce). Na miskách je přítomen substrát pro β -Gal, X-Gal, který je v případě aktivní β -Gal (nedošlo k inzerci PCR produktu) přeměněn na nerozpustný modrý produkt (modré kolonie).

Kromě dodání substrátu X-gal do média je také potřeba dodat induktor exprese lacZ, IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid).

Pro každý vzorek budeme potřebovat 6 ploten. Opět pracujeme ve vysvíceném flow boxu:

Ohnutou skleněnou tyčinku – tzv. hokejku nejprve ponoříme do lihu a potom ji přemístíme nad plamen – líh shoří a sterilní hokejka bude zhruba půl minuty chladnout. Nedotýkáme se jí, ani ji nikam nepokládáme.

Na agarovou plotnu nanese 80 μ l IPTG a pomocí zchladlé sterilní hokejky rozetřeme po celé ploše.

Totéž opakujeme s roztokem X-Galu. Dobu, po kterou je plotna odkrytá se snažíme snížit na minimum.

Před výsevem si plotny můžeme ze spodní strany popsat kompatibilně s čísly vzorků.

4.3. Vysévání buněk na plotny

Hokejku sterilizujeme nad plamenem. Na plotnu nanese 70 μ l kompetentních buněk a zchladlou hokejkou je **jemně** rozetřeme po celé ploše. Ihned zakryjeme víčkem.

Každý vzorek rozpipetujeme na 6 ploten.

Plotny vložíme dnem vzhůru do inkubátoru a necháme při 37°C inkubovat přes noc (minimálně 12 hodin, optimálně 16-18 hodin).

5. den: Kontrola výsledku klonování, PCR z kolonií, odeslání vzorků k přečištění a sekvenační analýze, konzervace kolonií pro pozdější využití.

5.1. Kontrola úspěšnosti klonování

Byl-li proces klonování úspěšný, vyrostly na plotnách přes noc kolonie, z nichž je většina bílých (obsahují insert) a některé jsou modré (buňky bez insertu). Bílé kolonie nám poslouží jako templát do další PCR reakce. Vybíráme samostatné kolonie, které jsou zřetelně oddělené od ostatních. Kolonie, které budeme používat si předem jednoznačně označíme na spodní straně ploten.

5.2. PCR z kolonií, sekvenační analýza

Při PCR budeme používat primery M13F a M13R nasedající na sekvenci vektoru v blízkosti insertu. Produktem tedy bude fragment, který bude začínat krátkým úsekem vektorové DNA, ve středu bude námi hledaný úsek DNA, kterou jsme vnesli do vektoru a na konci bude opět krátký úsek vektorové DNA.

Směs pro 1 vzorek:

ddH ₂ O	17,4 µl
10× pufr	2,1 µl
dNTP	0,4 µl
primery M13F/M13R	0,2 µl
JSRT polymeráza	0,5 µl
	20,8 µl
DNA	část kolonie

Směs rozpipetujeme do označených mikrozkušavek. Ve flow-boxu přeneseme pomocí sterilního párátka část bílé kolonie do zkumavky s amplifikační směsí.

Mikrozkušavky umístíme do termocykleru s následujícím programem:

1 minuta	94°C	} 35×
50 sekund	94°C	
1 minuta	56°C	
1 minuta 30 sekund	72°C	
10 minut	72°C	

2 µl produktu nanese na 1% TAE gel a zkontrolujeme výsledek amplifikace. Produkty s délkou 400-1100 bp přepipetujeme do platíčka a spolu s vyplněným průvodním listem odešleme k přečištění a sekvenaci do Macro genu.

5.3. Konzervace kolonií pro budoucí využití – dlouhodobá knihovna

Do 0,2 ml mikrozkušavek rozpipetujeme po 20 µl vodu nebo TE pufr. (Budeme-li uchovávat velké množství kolonií, je lepší použít platíčko.)

Sterilním párátkem nabereme kolonii a přeneseme ji do zkumavky.

Zkumavky umístíme do termocyklu a 10 minut denaturujeme při 95°C.

Vzorky zamrazíme. V mrazáku je můžeme uchovávat po dobu několika měsíců (optimálně při -80°C).

Základní návody

Horizontální agarozová elektroforéza

- pracujeme v rukavicích, protože všechny věci mohou být kontaminovány ethidiumbromidem (známý karcinogen)
- do erlenky na předvážkách navážíme agarosu I podle tabulky (podle toho jak velký a jak hustý gel chceme připravit):

		g agarosy	
% gel	malá krátká	malá dlouhá	velká
0.8	0.24	0.4	0.8
1.0	0.30	0.5	1.0
1.8	0.54	0.9	1.8
ml pufru	30	50	100

- přidáme příslušné množství 1×TAE-bufferu (odměříme označeným odměrným válcem), lehce kroužením promícháme
- vložíme na 1-2 min. do mikrovlnky, v uvařeném gelu nesmí být krystalky
- mezitím si připravíme komůrku na nalití gelu, vložíme ji do nalévacího zařízení (komůrka s gumovým těsněním) nebo ukončíme oblepíme konce 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 1 kapku ethidiumbromidu (z kapátka obaleného alobalem)
- gel pomalu naléváme do komůrky s instalovanými hřebínky, tuhne cca 30 minut
- po utuhnutí opatrně vyjmeme hřebínky a plíšky, komůrku vložíme do elektroforetické vany a zalijeme 1x TAE bufferem tak, aby celý gel byl těsně pod hladinou a všechny jamky byly zality pufrem
- do první jamky pipetujeme cca 3 µl markeru (žebříčku), do dalších jamek pak 5-7 µl 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 nastavíme na 100 V otáčením knoflíku
- ve chvíli, kdy čelo (nejrychlejší barvička) dojíždí ke konci gelu, vypneme proud, sejmemé víko vany, vyndáme komůrku a gel umístíme doprostřed plochy UV transiluminátoru dokumentačního systému Kodak Gel Logic 100

Práce s dokumentačním systémem Kodak Gel Logic 100

- doprostřed plochy UV transiluminátoru dokumentačního 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)
- 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 pod stolem a plochu UV transiluminátoru očistíme ubrouskem, případně trochou ethanolu
- obrázek gelu v počítači můžeme upravovat a analyzovat pomocí KODAK 1D Image Analysis Software
- pro prohlížení obrázku gelu na jiných počítačích je třeba obrázek vyexportovat, např. ve formátu JPEG

Přečištění PCR produktu pomocí GENOMED Jetquick kitu

- k 15 µl PCR produktu přidáme 60 µl „H1 solution“ a důkladně promícháme na vortexu
- vložíme kolonku do označené (!) 2 ml eppendorfky bez víčka (z kitu), přepipetujeme do ní směs z předchozího bodu
- centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách
- vylijeme to, co protéklo kolonkou (DNA zůstala navázána na membráně)
- vložíme kolonku zpátky do 2 ml eppendorfky a přidáme 500 µl „H2 solution“
- centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách
- vylijeme to, co protéklo kolonkou (DNA navázaná na membráně se promyla)
- vložíme kolonku zpátky do 2 ml eppendorfky a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách
- vložíme kolonku do nové (a označené!) 1.5 ml eppendorfky a přímo do středu membrány napipetujeme 30 µl 1× TE bufferu předehřátého na 60 °C
- necháme stát 5 minut
- centrifugujeme 2 minuty při maximálních otáčkách
- změříme koncentraci DNA pomocí fotometru

Pro podrobnější návod a další poznámky k přečištění PCR fragmentů viz návod ke kitu. Také je možné použít [QIAquick PCR Purification Kit](#) (případně vyříznout PCR fragment z gelu a přečistit pomocí [QIAquick Gel Extraction Kit](#))

Práce 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
 - o ikona Eppendorf (základní menu) nabízí např. vypnutí přístroje („Shutdown“)
– přístroj VŽDY vypínáme tímto příkazem
 - o následují ikony uživatelů, po jejich rozbalení je možno vidět jednotlivé složky a PCR programy v nich uložené
- *vytvoření nového programu*
 - o najedeme na příslušnou složku a stiskneme tlačítko „New“
 - o napíšeme jméno programu (8 znaků), stisknutím „Keybd“ je možno zobrazit klávesnici
 - o stiskneme OK a program se objeví v příslušné složce
 - o stiskneme „Edit“ a můžeme v našem programu měnit teploty a délky jednotlivých kroků a počet cyklů
 - o po stisknutí „Header“ je možno zadat přehřívání a teplotu víka před vlastní reakcí (ESP heated lid), zvolit typ Mastercycler ep gradient S a zadat typ kontroly (block nebo simulated tube)
 - o gradient, time a/nebo temperature increment a ramping time v libovolném kroku nastavíme po stisknutí tlačítka „Option“
 - o teploty na gradientu v jednotlivých sloupcích bloku se zobrazí stiskem „ShowGrad“, maximální rozpětí gradientu je 24 °C
 - o program je třeba uložit stiskem „Save“ (tato možnost se zobrazí po stisku „>>“ v pravé dolní části)
- *spuštění vybraného programu*
 - o vložíme PCR zkumavky, stripy nebo destičku
 - o přitáhneme víko směrem k sobě na doraz
 - o najedeme na příslušný program, případně ho ještě překontrolujeme po stisku „Edit“
 - o stiskneme start, pokud byla v programu zadána metoda kontroly „sim. tube“, je třeba zadat počet vložených zkumavek a objem PCR reakce (v µl)
 - o po stisku „OK“ se začne zahřívát víko, displej zobrazuje dobu do konce reakce, čas startu i konce, teplotu bloku i víka a status
 - o 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
 - o po ukončení programu je třeba stisknout „Enter“, víko je odjištěno a můžeme vyndat případné produkty PCR reakce
 - o 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“

Práce 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 program			Off
	Initial denaturation		02m00s	94.0 °C
	Hot start			Disabled
	Number cycles 35			
	seg	MAX °C/s	01m00s	94 °C
	seg	MAX °C/s	00m45s	54 °C
	seg	MAX °C/s	02m00s	72 °C
	Final extension		10m00s	72 °C
	Final hold			10 °C

- stiskem „Exit“ se vrátíme zpět na výběr programů
- *stiskem „Run“ spustíme vybraný program*
 - o objeví se dotaz na logování průběhu programu
 - o před potvrzením nebo odmítnutím je třeba vložit PCR zkumavky, zkontrolovat uzavření a zavřít víko (kolíčku v horní části víka přitáhneme směrem k sobě, uzavřeme víko a odtáhnutím kolíčky od sebe víko zajistíme), otočením kolečka směrem doleva lehce utáhneme (zbytečně nepřetahovat !)
 - o 4 min se bude předehtřívát víko (pokud je zadáno v programu) a spustí se program
 - o na obrazovce je graficky znázorňován průběh programu
 - o pro přerušení nebo po skončení stiskneme 2x „Stop“ a „Exit“
- *stiskem „Edit“ můžeme editovat vybraný program a měnit veškeré jeho parametry*
 - o stiskem „Ins“ vložíme další segment nebo cyklus
 - o stiskem „Del“ ho naopak vymažeme
 - o 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“)
 - o je třeba zadat „Temperature“, což bude teplota uprostřed bloku
 - o a „Gradient“, což je rozpětí gradientu ve °C

Příprava některých roztoků a médií

Příprava LB agarových ploten s ampicilinem

Navážíme: 5,0 g Tryptonu
2,5 g Yeast Extraktu
5,0 g NaCl
10,0 g agaru

Nasypeme do klávovatelné lahve se šroubovacím uzávěrem, doplníme MiliQ vodou do 500 ml a sterilizujeme klávováním.

Po ochlazení na 50-60°C přidáme roztok ampicilínu (0,025 g v 5 ml MiliQ vody). Jemně promícháme, aby se nevytvořily bubliny a ve vysvíceném flow-boxu rozlijeme do sterilních Petriho misek. Ihned překryjeme druhou miskou a necháme zatuhnout.

Misky uchováváme v ledničce. Připravené plotny lze používat po dobu 3 týdnů.

Příprava LB média

Navážíme: 5,0 g Tryptonu
2,5 g Yeast Extraktu
5,0 g NaCl

Nasypeme do klávovatelné lahve se šroubovacím uzávěrem, doplníme MiliQ vodou do 500 ml a sterilizujeme klávováním.

Uchováváme v ledničce.

Příprava 20× SSC

Navážíme: 17,53 g NaCl
8,82 g Trisodium Citrate

Nasypeme do klávovatelné lahve se šroubovacím uzávěrem, doplníme MiliQ vodou do 100 ml a sterilizujeme klávováním.

Uchováváme v ledničce. Používáme pro přípravu 6×, 2× a 0,5× SSC.

Příprava 10% SDS

Navážíme 2 g SDS.

Nasypeme do klávovatelné lahve se šroubovacím uzávěrem, doplníme MiliQ vodou do 20 ml a sterilizujeme klávováním.