

Protokoly a návody pro praktikum

Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a
systematice

Laboratoř molekulární biologie rostlin
Přírodovědecká fakulta JU

Petr Koutecký, Jiří Košnar & Miroslava Herbstová
2012



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Předmět Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice byl zaveden ve školním roce 2008/2009 za podpory grantu FRVŠ F4a 2471/2008, inovace a doplnění v dalších letech byly podpořeny grantem Molekularizace biologických oborů Přírodovědecké fakulty JU (CZ.1.07/2.2.00/15.0364) v rámci Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost.

Tyto protokoly vznikly jako pomůcka pro praktikum. Nejsou a ani nemají být kompletní sadou protokolů používaných v naší laboratoři ani nemá jít o obecné protokoly k vybraným metodám. Jsou psány víceméně pro konkrétní materiál (konkrétní rostlinné druhy) používaný při praktiku a pro práci s jiným materiálem bude pravděpodobně nutná optimalizace metodiky.

Základní zásady práce v molekulárně biologické laboratoři

- **Při veškeré činnosti v laboratoři dbáme na to, abychom (1) neohrozili zdraví svoje i ostatních, (2) nepoškodili zařízení a přístroje v laboratoři a (3) neznehodnotili vzorky a materiál svůj i svých kolegů.**
- Do laboratoře se přezouváme.
- V laboratoři nejíme a nepijeme (o kouření a dalších neřestech ani nemluvě).
- Při práci používáme přiměřené ochranné pomůcky, zejména rukavice a vhodné laboratorní oblečení, a zvláště při práci s jedy i další ochranné pomůcky podle potřeby (laboratorní plášť určený pouze k tomuto účelu, rouška,...).
- Pro práci s GMO zásadně dodržujeme předepsané protokoly, způsob evidence a předepsané způsoby likvidace odpadního materiálu; s GMO mohou pracovat pouze osoby, které absolvovaly příslušné školení.
- Po skončení práce uvedeme pracovní místo do původního stavu, otřeme laboratorní stůl (2% savou), umyjeme použité sklo (obyčejná voda + detergent, oplach destilovanou vodou).
- Dbáme zvýšené opatrnosti při práci s elektrickým proudem (např. elektroforéza).
- S roztoky barviv SybrGreen a GelRed (nanášecí pufr označený jako „LB+SG“ nebo „GelRed“, DNA laddery, a samozřejmě zásobní roztoky obou barviv), které jsou potencionálně mutagenní, a s veškerými věcmi, které s nimi přicházejí do styku (elektroforetické vany, hřebínky, pipeta na nanášení vzorků,...) pracujeme v rukavicích, kontaminovanými rukavicemi se nedotýkáme ničeho jiného. Gely obsahující SybrGreen vyhazujeme do nádoby k tomu určené. Gely obsahující GelRed se schovávají pro recyklaci!
- Akrylamid je neurotoxin, pracujeme velmi opatrně, vždy v rukavicích a plášti, kontaminovaný materiál a gely vyhazujeme do zvláštní nádoby, zásobní roztoky uchováváme v ledničce (2–8 °C).
- S těkavými chemikáliemi (chloroform, isoamylalkohol, isopropanol, kyselina octová, TEMED, koncentrovaná kyselina chlorovodíková,...) pracujeme zásadně v digestoři se zapnutým odtahem
- Při práci s DNA pracujeme pouze se sterilními autoklávovanými špičkami a zkumavkami – v krabičkách a nádobách označených páskou s černými pruhy; kontaminovaný materiál odhazujeme do určených nádob
- Nesaháme do nádob se sterilním laboratorním plastem, pokud potřebujeme z nádoby vyndat několik eppendorfek nebo stripů, tak je vyklepneme na očištěný pracovní stůl
- Pro zpracování vzorků citlivých na kontaminaci (DNA z historických vzorků, nespecifické primery apod.) pracujeme se špičkami s filtrem.
- Pro PCR, ředění DNA a primerů používáme výhradně sterilní vodu (autoklávovaná Milli-Q voda nebo koupená voda, např. od f. Top-Bio).
- S DNA a většinou dalších biochemikálií (enzymy, primery,...) pracujeme na ledu, zvláště citlivé jsou enzymy (ligáza, polymeráza, restriční enzymy atd.) a některé pufrы.
- Pokud odcházíme z laboratoře poslední (i jen na chvíli), vždy zamkneme

Obsah

Izolace DNA	1
A) Izolace DNA rostlinného materiálu (Invisorb Spin Plant Mini Kit, INVITEK)	1
B) Izolace DNA z rostlinného materiálu – CTAB metoda.....	4
C) Izolace DNA pomocí NaOH.....	6
D) Otestování kvality DNA na agarózovém gelu.....	7
E) Měření koncentrace DNA a ředění DNA	7
Elektroforéza DNA.....	8
Příprava horizontálního agarózového gelu	8
Nanášení vzorků, elektroforéza	9
Práce s dokumentačním systémem Gel Imager a softwarem Scion VisiCapture.....	10
DNA žebříčky (ladders) používané v laboratoři.....	10
PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction).....	11
PCR protokol s využitím Plain PP Master Mixu (Top-Bio).....	13
Sekvenování DNA.....	15
A) PCR amplifikace	15
B) Enzymatické přečištění PCR produktu (Exo-SAP).....	16
C) Přečištění PCR produktu pomocí JETquick kitu (GENOMED)	16
D) Příprava vzorků pro sekvenování DNA	17
Klonování	19
A) PCR amplifikace	19
B) Ligace	20
B1) Klasický protokol podle výrobce klonovacího kitu	20
B2) Protokol pomocí vyřezávání PCR produktu z low-melting agarosového gelu	21
C) Transformace	22
D) Kultivace	22
E) Přímá PCR	23
F) Likvidace GMO, archivace o nakládání s GMO.....	23
ISSR, Inter-simple sequence repeat.....	24
A) PCR amplifikace	24
B) Elektroforéza a <i>post-staining</i> barvení.....	25
Analýza mikrosatelitů	26
A) PCR amplifikace	26
B) Příprava na fragmentační analýzu	27
PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	28
A) PCR amplifikace	28
B) Restrikce	28
C) Elektroforéza a <i>post-staining</i> barvení.....	29

T-RFLP	30
A) PCR amplifikace	30
B) Přečištění PCR produktu pomocí JETquick kitu (GENOMED)	30
C) Restrikce	31
D) Příprava na fragmentační analýzu	31
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	32
A) Protokol s využitím AFLP kitů od firmy Invitrogen	32
B) Přesrážení octanem sodným	35
C) Příprava pro fragmentační analýzu	35
Isozymy (allozymy).....	36
A) Extrakce vzorků.....	36
B) Příprava aparatury a skel pro elektroforézu.....	37
C) Nanášení vzorků a elektroforéza	39
D) Detekce izozymů (barvení).....	40
E) Vyšnění a uchovávání gelů	42
F) Jednotlivé enzymové systémy.....	42
Obsluha přístrojů	49
Měření koncentrace DNA pomocí spektrofotometru Biowave II	49
Zacházení s gradientovým termocyclerem TC-XP Bioerg.....	50
Zacházení s termocyclerem Biometra T3000 se třemi bloky	51
Měření na pH-metru Hanna pH 211	52
Roztoky a pufry	53
1) Obecné roztoky	53
2) Izolace, ředění a srážení DNA.....	54
3) Elektroforéza DNA	55
4a) Isozymy – izolace	57
4b) Isozymy – elektroforéza	58
4c) Isozymy – barvení	59

Izolace DNA

A) Izolace DNA rostlinného materiálu s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

Metoda využívá patentované technologie Invisorb[®]. Umožňuje rychlou a účinnou izolaci kvalitní genomické DNA z čerstvého, mraženého nebo suchého rostlinného materiálu. Podstatou je interakce mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA a pozitivně nabitými skupinami na povrchu membrány v kolonce, kde se DNA váže a po přečištění se uvolní vhodným elučním pufrům. Vazba nebo naopak uvolnění DNA z kolonky závisí na koncentraci solí a pH použitých pufrů.

Protokol pro izolaci vysušeného materiálu (např. v silikagelu)

→ jiné varianty na konci protokolu, str. 3

Obecné

- Protokol představuje nejčastěji používaný postup. Podle studovaného materiálu a požadavků na množství a čistotu DNA může být nutné optimalizovat některé kroky (např. vstupní množství materiálu, množství RNasy a izolačních pufrů, přidání promývacích kroků, apod.)
- Před použitím promývacích pufrů (Wash Buffer I a II) zkontrolujeme přidání ethanolu (zaškrtnutí příslušného políčka na láhvi, příp. doplnění ethanolu).
- Odpadní filtráty vzniklé během izolace vyléváme do připravené kádinky.
- Použité homogenizační pomůcky po skončení práce očistíme: wolframové kuličky dáme do 1,5 ml zkumavky s čistou vodou a třepeme na mlýnku po dobu ca 2 min, celý postup zopakujeme aspoň 3× (pokud nemůžeme kuličky ihned omýt, nenecháváme je ve vodě, korodují!). Homogenizátory necháme odmočit v jarové vodě a koncentrovaném roztoku Sava. Po skončení práce vše umyjeme, opláchneme destilovanou vodou, osušíme buničinou a připravíme pro sterilizaci v autoklávu.
- Proteinasa K je součástí kitu. Dodává se v lyofilizovaném stavu. Před prvním použitím přidáme 1 ml sterilní vody a rozpustíme proklepáním zkumavky, krátce stočíme.
- Před vlastní prací odpipetujeme do sterilní 1,5 ml eppendorfky potřebné množství elučního pufru (Elution buffer D) a předehejeme v termobloku na 65°C.

Postup izolace

- 1) Do 1,5 ml eppendorfky s rovným (!) víčkem vložíme vhodné množství suché tkáně (obvykle 5-15 mg, max. ale 60 mg) a dvě wolframové kuličky.
! *Množství tkáně závisí na taxonomické skupině a požadované koncentraci DNA a mělo by být u všech vzorků přibližně stejné. Nesmí být ale zbytečně vysoké (ucpávání kolonek a nižší celkový výtěžek DNA)! Pro drcení tvrdších tkání je vhodné použít více wolframových kuliček.*
- 2) Eppendorfky upneme do nástavců mlýnku Retsch 400MM, tak, abychom vyváženě využili obě ramena. Nastavíme základní dobu homogenizace: 1 min. na maximální rychlost. Podle tuhosti materiálu dobu homogenizace případně prodloužíme.
- 3) K rozdrčenému materiálu přidáme 400 µl lyzačního pufru (Lysis buffer P) a 20 µl proteinázy K.
- 4) Vortexujeme a necháme 30 min nebo déle inkubovat při 65°C. Během inkubace 2–3× promícháme.

- 5) Připravíme si kolonky (Spin Filter) do 2,0 ml sběrných zkumavek (Receiver Tube, součást kitu).
- 6) Lyzační směs (roztok i rozdrcenou tkáň) přeneseme na kolonku, např. pomocí sterilní špičky nebo přepipetování špičkou s uříznutým koncem. Vyjmeme wolframové kuličky.
- 7) Centrifugujeme 1 min při 12 000 rpm (dle potřeby déle). Kolonky vyhodíme. DNA zůstává ve filtrátu!
- 8) Přidáme 1–10 µl RNasy A (Promega; 10mg/ml; není součástí kitu). Množství závisí na výchozí navážce a typu materiálu a účelu studia. Promícháme proklepáním prstem a necháme 5 min inkubovat při pokojové teplotě.
Pokud není odstranění RNA potřeba, lze tento krok vynechat.
- 9) Přidáme 200 µl Binding Buffer P a vortexujeme.
- 10) Umístíme nové kolonky do 2,0 ml sběrných zkumavek. Suspenzi přeneseme na kolonku a inkubujeme nejméně 1 min.
! *V tomto kroku dochází k navázání DNA na membránu, minimální dobu inkubace je nutno dodržet (příp. prodloužit), jinak dochází ke ztrátám DNA.*
- 11) Centrifugujeme 1 min při 12 000 rpm, odstraníme filtrát a kolonky umístíme zpět do 2,0 ml sběrných zkumavek.
- 12) Přidáme 550 µl promývacího pufru I (Wash Buffer I)
- 13) Centrifugujeme 1 min při 12 000 rpm, odstraníme filtrát a kolonku umístíme zpět do 2,0 ml sběrné zkumavky.
- 14) Přidáme 550 µl promývacího pufru II (Wash Buffer II)
- 15) Centrifugujeme 1 min při 12 000 rpm, odstraníme filtrát a kolonku umístíme zpět do 2,0 ml sběrné zkumavky.
- 16) Kroky 14 a 15 opakujeme ještě jednou.
- 17) Pro odstranění zbytků promývacího pufru centrifugujeme 2 min při 12 000 rpm.
- 18) Kolonky umístíme do sterilních 1,5 ml eppendorfek (nejsou součástí kitu; pro dlouhodobé skladování lze použít tzv. safe-lock eppendorfky).
- 19) Přidáme 50 µl elučního pufru (Elution Buffer D) předehřátého na 65°C na střed kolonky. Inkubujeme 10 min při pokojové teplotě.
! *V tomto kroku dochází k uvolnění DNA z membrány. Použitím menšího množství elučního pufru (např. 30 ul) se získá koncentrovanější DNA, ale zároveň mírně klesá celkový výtěžek DNA.*
- 20) Centrifugujeme 1 min při 10 000 rpm.
Při centrifugaci nelze zavřít víčka. Eppendorfky v centrifuze orientujeme víčky ve směru otáčení rotoru, abychom zabránili jejich ulámání při centrifugaci.
- 21) Pro zvýšení koncentrace přepipetujeme filtrát zpět na kolonku a inkubujeme 10 min při pokojové teplotě, opakujeme centrifugaci (krok 20).
Alternativně, pro získání maximálního výtěžku DNA, je možné v kroku 21) použít dalších 50 µl čistého elučního pufru, získáme 2 eluáty (2. s nižší koncentrací).
- 22) Kvalitu a koncentraci vyizolované DNA ověříme spektrofotometricky nebo elektroforézou na agarózovém gelu.
- 23) Pokud nepokračujeme dalšími kroky (ředění, PCR,...), skladujeme DNA krátkodobě v ledničce (dny až několik týdnů); pro dlouhodobé skladování DNA zamrazíme (-20°C).

Varianty a doplňkové kroky

- DNA lze izolovat i z čerstvého materiálu - jeho množství by nemělo přesáhnout 100 mg. U sušeného materiálu by nemělo být použito více než 60 mg..
- Pro homogenizaci vzorků fixovaných zamražením v čerstvém stavu nebo i pro zcela čerstvý materiál lze použít i tekutý dusík:
 - V tekutém dusíku vymrazíme 1,5 ml eppendorfku s materiálem a vloženým homogenizátorkem. Krouživými pohyby drtíme vzorek ve vymražené eppendorfce.
 - Jinou možností je drtit vzorek ve vymražené třecí misce. Rozdrcený materiál vymraženým skalpelem převedeme do připravené eppendorfky.
 - U čerstvého materiálu je nutné přidat lyzační pufr a proteinasu K (krok 3 standardního protokolu) ke vzorku dříve než zcela rozmrzne!
- Pro izolaci malých vzorků, které nelze rozdrtit pomocí mlýnku, lze využít drcení v 1,5 ml zkumavkách pomocí homogenizátorků a sterilního písku. Vzorek drtíme v malém množství lyzačního pufru (10-20 μ l) za přidání malého množství sterilního písku. Po homogenizaci přidáme zbývající objem lyzačního pufru a dále postupujeme podle obvyklého protokolu.
- DNA je možno po izolaci přechistit pomocí některého z komerčních kitů (např. MoBio PowerClean DNA Clean-up Kit) nebo přesrážením octanem sodným.

B) Izolace DNA z rostlinného materiálu – CTAB metoda

Metoda je původně založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniombromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí (0,7M NaCl) rozpustný, ale při snížené koncentraci (0,45M NaCl) vytváří sraženinu. CTAB zároveň působí jako detergent, který uvolňuje DNA z membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti v CTAB lze DNA selektivně vysrážet a přečišťovat. Metoda dosahuje obvykle vyšších výtěžků DNA než komerční kity a je výrazně levnější. Čistota DNA ale naopak bývá nižší. Níže uvedená modifikace protokolu využívá isopropanolové vysrážení DNA.

Protokol pro izolaci vysušeného materiálu (např. v silikagelu)

→ jiné varianty analogicky izolací kitem, str. 3

Postup izolace

- 1) Do 1,5 ml eppendorfky s rovným (!) víčkem vložíme vhodné množství suché tkáně (obvykle 5-15 mg) a dvě wolframové kuličky (pro drcení tvrdších tkání je vhodné použít více wolframových kuliček).
- 2) Eppendorfky upneme do nástavců mlýnku Retsch 400MM, tak, abychom vyváženě využili obě ramena. Nastavíme základní dobu homogenizace: 1 min. na maximální rychlost. Podle tuhosti materiálu dobu homogenizace případně prodloužíme.
- 3) K rozdrcenému materiálu přidáme 700 μ l zásobního roztoku CTAB a 10 μ l 2-merkaptóethanolu. Pracujeme v digestoři.
- 4) Zkumavky uzavřeme, krátce promícháme proklepáním a inkubujeme 30 min v termobloku při 60 °C. Během prvních minut inkubace přidáme ke každému vzorku „na špičku špachtle“ polyvinylpyrolidonu (PVP). Pracujeme v digestoři.
- 5) Přidáme 1–10 μ l RNasy A (Promega; 10 mg / μ l) a inkubujeme 15 min na termobloku při 37°C. Pracujeme v digestoři.

Pokud není odstranění RNA potřeba, lze tento krok vynechat.

- 6) U vzorků s větším výchozím množstvím materiálu lze oddělit zbytky tkání centrifugací 3 min při 13800 rpm. Supernatant odebereme do nových označených 1,5 ml zkumavek. Pracujeme v digestoři.
- 7) Přidáme 500 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol (24:1). Pracujeme v digestoři.
- 8) Dobře uzavřené zkumavky 2–3× převrátíme a necháme cca 5 min stát.
- 9) Centrifugujeme 10 min při 13 800 rpm.

Centrifugací vznikne rozhraní mezi nerozpustnou vodní a chloroformovou složkou směsi.

- 10) Supernatant (cca 500 μ l) opatrně přepipetujeme do nových označených 1,5 ml eppendorfek. Je třeba dát pozor, abychom pipetovali jen průhlednou horní fázi. Pracujeme stále v digestoři. Použité špičky vyhazujeme do nádoby na nebezpečný odpad, stejně tak použité eppendorfky, ze kterých před vyhozením slijeme chloroform do příslušné lahve na nebezpečný odpad (označena „odpad – chloroform“).

! *Horní, vodní fáze supernatantu obashuje DNA, spodní chloroformová fáze obsahuje hydrofobní odpadní látky (mastné kyseliny, proteiny, apod.). Je nutné vyhýbat se spodní chloroformové fázi, která by znehodnotila DNA a snížila výtěžek. Pokud dojde ke kontaminaci chloroformovou fází, odebraný supernatant znovu centrifugujeme a do nové zkumavky znovu odebereme pouze horní fázi. Postup s přidáním směsi chloroform : isoamylalkohol a odebráním horní vodní fáze (kroky 7–10) je možné několikrát zopakovat.*

- 11) Přidáme 500 µl vychlazeného isopropanolu (z mrazáku).
- 12) 1–2 × převrátíme (netřepeme) a necháme cca 30 min stát v –20 °C.
- 13) Centrifugujeme 5 min při 13 800 rpm.
- 14) Supernatant opatrně odpipetujeme do kádinky na odpad (v digestoři, použijeme špičky na 200 µl). Na dně eppendorfky by měl být vidět drobný matně bílý až mírně zabarvený pelet DNA. Po skončení práce vylijeme obsah kádinky do příslušné lahve na nebezpečný odpad (označena „odpad – isopropanol“).
- 15) Přidáme 400 µl vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku).
- 16) Inkubujeme 15 min v termobloku při 37 °C.
- 17) Centrifugujeme 5 min při 13 800 rpm.
- 18) Supernatant opět opatrně odpipetujeme do kádinky na odpad (už není nutné v digestoři).
- 19) Přidáme 200 µl vychlazeného 70% ethanolu (z mrazáku) a necháme cca 5 min stát.
- 20) Centrifugujeme 5 min při 13 800 rpm.
- 21) Supernatant opět opatrně odpipetujeme do kádinky a eppendorfky necháme 10–15 min stát a vyschnout.
- 22) Přibližně 1–2 min vysušíme pelet v otevřených eppendorfkách na termobloku při 37°C. Sušení ukončíme ve chvíli, kdy jsou stěny eppendorfky suché a pelet neobsahuje viditelné kapky ethanolu, případně lze pelet poklepem (cvrnknutím) v uzavřené (!) eppendorfce oddělit od stěny.
- 23) K vysušenému peletu přidáme 30(–200) µl TE pufru nebo sterilní vody.
Objem kapaliny je vhodné přizpůsobit výtěžku izolace. U vzorků s velkými DNA pelety je možné použít větší objem, u vzorků s malými pelety je vhodné použít menší množství, aby se DNA zbytečně neředila.
- 24) Pro úplné rozpuštění DNA necháme vzorky stát přes noc v ledničce, případně je ještě inkubujeme 30 min na termobloku při 37 °C..
- 25) Před použitím vzorky promícháme proklepnutím a krátce stočíme na stolní centrifuze. Kvalitu a koncentraci vyizolované DNA ověříme spektrofotometricky nebo elektroforézou na agarózovém gelu.
- 26) Pokud nepokračujeme dalšími kroky, krátkodobě (dny až pár týdnů) můžeme DNA skladovat v ledničce, pro dlouhodobé uchovávání DNA zamrazíme (-20°C).

C) Izolace DNA pomocí NaOH

Izolace pomocí NaOH je velmi levnou a rychlou metodou přípravy DNA. Hojně se používá pro extrakci DNA z malých vstupních množství materiálu.. Hydroxid sodný působí denuraci buněčných enzymů a naruší buněčné stěny (DNA se uvolní do roztoku). Získaná DNA je denaturovaná, řetězce jsou separované. Takto izolovanou DNA lze použít pro PCR amplifikaci pro sekvenování nebo PCR-RFLP, nelze ji ale použít pro náročnější metody (např. AFLP) a obecně není vhodná pro organismy obsahující velké množství inhibitorů. DNA také nelze po izolaci vizualizovat běžnými postupy na agarózovém gelu ani nelze stanovovat koncentraci spektrofotometricky. Takto získanou DNA někdy není možné dlouhodobě skladovat (degraduje).

Postup izolace

- 1) Ke vzorku tkáně (< cca 0.5 cm²) přidáme 10-20 µl 0,5M NaOH (objem roztoku upravíme podle množství materiálu). Drtíme pomocí homogenizátorku a sterilního písku (případně lze použít tekutý dusík - viz kapitola izolace kitem, str. 3)
- 2) Přidáme dalších 20 µl 0,5M NaOH a podle potřeby pokračujeme v drcení další 1–2 min.
- 3) Centrifugujeme 2 min 13 800 rpm.
- 4) Supernatant přepipetujeme do nové eppendorfky nebo PCR stripu a ředíme 1:10 roztokem 100mM Tris-HCl, pH 8,3 (příklad: odebereme 2 µl supernatantu a přeneseme ho do zkumavky s 20 µl roztoku).
- 5) Podle potřeby dál ředíme roztokem 100mM Tris-HCl pufru.
- 6) Skladujeme v mrazáku při –20°C.

D) Otestování kvality DNA na agarózovém gelu

- Připravíme 0,7 % agarosový gel (příp. použijeme recyklovaný), viz str. 8.
- Používáme špičky s filtrem; na parafilm nebo do destičky připravíme kapky po 0.8 μ l nanášecího pufru (označený 'GelRed', případně 'LD+SG') a přidáme po 2 μ l DNA, promícháme pipetováním a nanese na gel
- Jako žebříček nanese 3 μ l λ DNA-HindIII
- Na gelu by měl být vidět 1 výrazný pruh DNA o hmotnosti několika kbp, přítomnost menších fragmentů (resp. *smear*) indikuje fragmentovanou (degradovanou) DNA nebo nedostatečně odstraněnou RNA

E) Měření koncentrace DNA a ředění DNA

Měření koncentrace DNA

Koncentraci DNA měříme pomocí spektrofotometru Biowave II (Biochrom) – návod viz str. 49. Koncentraci DNA stanovujeme na základě absorbance v UV oblasti při 260 nm (maximum pro DNA). Zaznamenáváme i absorbance při 230 nm a 280 nm, které vypovídají o znečištění DNA nízkomolekulárními látkami (polyfenoly, sacharidy, aj.), resp. proteiny.

Zaznamenáváme:

- koncentraci DNA, obvykle v ng/ μ l
- poměry absorbancí A_{260} / A_{280} a A_{260} / A_{230}
 - ! *Oba poměry by se pro čistou DNA měly pohybovat v rozmezí 1,8–2,0(–2,2). Nižší hodnoty indikují ne zcela čistou DNA, což může způsobovat problémy v některých aplikacích (např. restriční metody, kde různé látky mohou ovlivnit aktivitu / specifitu restriktáz). Zároveň kontaminující látky mají nenulovou absorbanci při 260 nm, čili stanovená koncentrace DNA bude s největší pravděpodobností **nadhodnocená**, velikost odchylky ale neznáme!*
- skutečné hodnoty všech absorbancí (260 nm, 280 nm, 230 nm)
 - ! *Pro absorbance <0.01 již není měření přesné a vypočtené hodnoty jsou velmi nespolehlivé. Pro přesné měření je pak nutné použít menší ředění vzorku.*

Odhad koncentrace DNA z gelu

Koncentraci DNA lze **přibližně** odhadnout z agarózového gelu. Porovnáme intenzitu proužku DNA s proužky žebříčku (*ladder*), u kterých je známa koncentrace (viz str. 10). Vybereme proužek s podobnou intenzitou a vypočteme množství (hmotnost) DNA (koncentrace * nanášený objem). Proužek izolované DNA obsahuje podobné množství DNA, koncentraci získáme dělením nanášeným objemem vzorku. Pozor ale, je třeba brát v úvahu, že intenzita proužku obecně klesá s klesající délkou fragmentu!

Ředění DNA

- Lze použít následující 2 vzorce (jednoduchá trojčlenka)

$$V_{\text{vzorek}} = c_{\text{final}} / c_{\text{vzorek}} * V_{\text{final}} \quad V_{\text{voda}} = V_{\text{final}} - V_{\text{vzorek}} \quad , \text{ kde}$$

$$V_{\text{vzorek}} \text{ je objem původního (neředěného) vzorku, } c_{\text{vzorek}} \text{ je koncentrace původního vzorku, } c_{\text{final}} \text{ je požadovaná koncentrace a } V_{\text{final}} \text{ je požadovaný konečný objem.}$$
- Například chceme 50 μ l DNA o koncentraci 50 ng/ μ l a máme k dispozici DNA o koncentraci 215 ng/ μ l. Množství vzorku a sterilní vody spočteme takto:

$$V_{\text{vzorek}} = 50 / 215 * 50 = 11,63 \mu\text{l} \quad V_{\text{voda}} = 50 - 11,63 = 38,37 \mu\text{l}$$

Elektroforéza DNA

Příprava horizontálního agarózového gelu

Pro ušetření nákladů je vhodné recyklovat použité agarosové gely (obvykle se nachází v lednici v Erlenmeyerově baňce). Tyto gely nejsou použitelné pro přípravu kvalitnějších gelů pro *post-staining* barvení – pro tyto účely je nutné připravit gel z nové, nepoužité agarosy.

- 1) Podle počtu nanášených vzorků a požadované velikosti jamek zvolíme velikost vaničky a hřebenu. Od velikosti vaničky je odvozen objem gelu.
- 2) Vaničku položíme na nalévací stůl, uzavřeme příslušnými zarážkami („kšandy“) nebo zalepíme volné strany pomocí izolepy. Do středu vaničky vložíme vodováhu a stůl vyrovnáme pomocí koleček v rozích stolu.
- 3) Pokud recyklujeme agarosové gely, vybereme dostatečné množství použitých gelů a pokračujeme krokem 5. Pokud připravujeme gel z nové agarosy, do Erlenmeyerovy baňky přiměřeně velkého objemu navážíme na předvážkách agarosu (nejčastější navážky viz tabulka).

Pro vizualizaci genomové DNA je nejvhodnější 0,7 % gel (ostatní koncentrace také fungují, ale zbytečně se plýtvá agarosou); pro PCR produkty o délce 400-2000 bp je nejvhodnější 1,0–1,3 % gel (nižší koncentrace způsobí horší rozlišení kratších produktů).

koncentrace %	agarosa [g] pro gel o objemu [ml]				
	30	50	60	120	200
0,7	0,21	0,35	0,42	0,84	1,40
0,8	0,24	0,40	0,48	0,96	1,60
1,0	0,30	0,50	0,60	1,20	2,00
1,3	0,39	0,65	0,78	1,56	2,60
1,5	0,45	0,75	0,90	1,80	3,00

- 4) Přidáme příslušné množství 1×TBE pufru (odměříme odměrným válcem). Ideální je nechat ještě směs několik minut stát při pokojové teplotě (agarosa se hydratuje a lépe se rozváří).

1×TBE pufr je k dispozici v kanystru nad elektroforézami. Zásobní 10× koncentrovaný roztok je v ledničce.

- 5) Vložíme do mikrovlnky na 550-700W a necháme chvíli vařit – kontrolujeme, aby var nebyl příliš prudký a agarosa nevytekla ven! Občas kroužením promícháme (pro rozpuštění agarosy je důležitější spíše občasné promíchávání než dlouhodobý var). Opakujeme tak dlouho, aby byl roztok čirý, nesmí v něm být viditelné krystalky agarosy.
- 6) Uvařený gel ochladíme kroužením baňkou pod pomalu tekoucí vodou na teplotu cca 50°C (odhadneme tak, že udržíme ruku na dně baňky).
- 7) Gel opatrně nalijeme do vaničky, nasadíme do něj hřebínky a špičkou odstraníme případné bublinky v gelu. Necháme tuhnout cca 30 minut.
- 8) Po ztuhnutí vaničky s gelem sundáme zarážky, vložíme ji do elektroforetické vany a zalijeme 1×TBE puftrem tak, aby celý gel byl těsně pod hladinou. Opatrně vyjmeme hřebínky.

Nanášení vzorků, elektroforéza

- 1) Do mikrotitrační destičky nebo na kousek parafilmu (pro malé objemy lepší) rozpipetujeme modrý nanášecí pufr s barvivem GelRed (zkumavka označena „GelRed“) pro plánovaný počet vzorků. Poměr objemů vzorek:pufr by měl být asi 2:1–3:1. Používáme špičku s filtrem, není třeba pokaždé měnit.
- 2) Do jamky s pufrům / do kapky pufru na parafilmu pipetujeme DNA (nezapomeneme vzorek vždy před pipetováním opatrně promíchat!). Na každý vzorek bereme novou špičku s filtrem.
- 3) Krajní jamky na gelu necháváme pokud možno prázdné (deformace proužků). Druhou jamku vynecháme pro žebříček, u větších gelů může být vhodné nanášet žebříček z obou stran, příp. doprostřed mezi vzorky (pak vynecháme příslušnou jamku).
- 4) Do dalších jamek pipetujeme celý objem směsi DNA + nanášecí pufr. Používáme špičku s filtrem, mezi vzorky propláchneme pufrům ve vaně, není třeba mezi vzorky měnit.
! Nesmíme propíchnout dno jamky! Špičku pipety stačí umístit i lehce nad jamku (vzorek zapadne dovnitř vlastní vahou). Přiměřeně rychle vypouštíme vzorek do jamky, snažíme se nedělat bubliny. Pokud ve špičce zbývá malé množství vzorku, vypláchneme jej do jamky opatrným propipetováním. Po vypuštění celého objemu špičku plynule vytáhneme z jamky (ne trhnutím – strhli bychom s sebou i část vzorku). Snažíme se pracovat rychle (ale v klidu!), modrá barva ze vzorků po nanesení do jamek pomalu difunduje do gelu („rozpíjí se“).
- 5) Do druhé jamky (příp. dalších) pipetujeme žebříček (*ladder*), volíme obvykle stejný objem jako je součet DNA + nanášecí pufr. Pro velké fragmenty (např. po izolaci DNA) používáme λ DNA / Hind III, pro menší fragmenty (např. PCR produkty) 100 bp ladder (viz str. 10).
- 6) Po nanesení všech vzorků na gel přiklopíme víko s přívodními kabely, připojíme elektroforézu ke zdroji; napětí nastavíme v modu „SET“ – u nejmenší elektroforézy nepoužíváme více než 60 V, u větších elektroforéz lze napětí zvýšit na cca 120 V. Pro spuštění elektroforézy vypneme mod „SET“. Použitou mikrotitrační destičku opáchneme Savem, důkladně umyjeme detergentem a opláchneme destilovanou vodou.
- 7) Ve chvíli, kdy čelo (nejrychlejší barvička) dojíždí ke konci gelu, vypneme proud (nastavit do módu „SET“), vypneme zdroj, sejme víko elektroforetické aparatury, vyndáme vaničku s gelem a gel umístíme do komory UV transluminátoru.

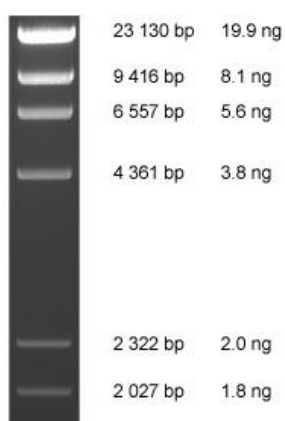
Práce s dokumentačním systémem Gel Imager a softwarem Scion VisiCapture

- 1) Do komory fotodokumentačního zařízení umístíte samotný gel (bez vaničky) a otočíte ho tak, aby horní strana s jamkami byla podél levé strany komory transluminátoru. Opatrným přejížděním prstem po povrchu gelu se zbavíme případných vzduchových bublin pod gelem, gel srovnáme.
- 2) Bez rukavic spustíme program Scion VisiCapture.
 - ! *Na ovládání dokumentačního zařízení, fotoaparát, klávesnici a myš počítače atd. nesaháme v rukavicích!*
- 3) Klikneme na „Image“ a vybereme „Start Live Capturing“.
- 4) Při otevřených dvířkách komory si gel připravíme k focení, přímo na objektivu kamery můžeme vyladit zoom (velikost gelu nebo jeho části; prostřední, nejužší kroužek objektivu) a zaostření gelu (spodní široký kroužek objektivu).
- 5) Zavřeme dvířka a zapneme UV světlo, expozici upravíme clonou (horní kroužek na objektivu), příp. obraz doostříme; expozici lze vyladit také volbou „Image“ – „Properties“, kde nastavíme délku expozice a míru elektronického zesílení signálu (gain).
- 6) Klikneme na „Image“ a gel vyfotíme tlačítkem „Snap“.
- 7) Obrázek uložíme vybráním „File“ a „Save As“ do příslušné složky. Ukládáme vždy ve formátu .tif. Pro pozdější práci je vhodné vytvořit výřez a uložit v úspornějších formátech (.png, .jpg, apod.), na počítači je k tomuto účelu např. program Irfan View. Popis čísel vzorků a jiné sofistikované grafické úpravy provedeme později v jakýchkoliv dalších grafických programech.
- 8) Vypneme zdroj UV světla, otevřeme dvířka, gel v rukavicích vyhodíme do nádoby k tomu určené – gely se v laboratoři recyklují!. Očistíme plochu UV transluminátoru ethanolem.
 - ! *Recyklují se pouze gely zpracované pomocí modrého pufru s GelRed. Pokud jsme výjimečně pro barvení DNA použili SybrGreen (zkumavka označena „LD+SG“), nevhazujeme gel do stejné nádoby jako gely barvené (snad) netoxickým barvivem GelRed, ale vyhodíme je do zvláštní nádoby na gely se SybrGreen. Gely barvené v lázni s roztokem GelRed (tzv. post-staining, viz dále) se vyhazují do směsného odpadu.*

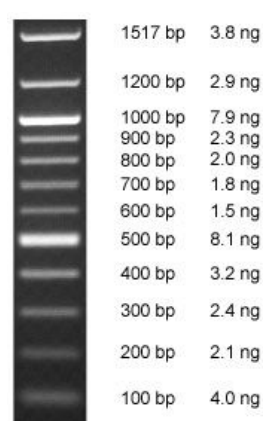
DNA žebříčky (ladders) používané v laboratoři

Množství DNA uvedené u jednotlivých fragmentů odpovídá 1 μ l žebříčku ve standardním ředění používaném v naší laboratoři.

λ DNA / Hind III Digest (NEB)



100 bp DNA ladder (NEB)



PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

Princip

Polymerázová řetězová reakce umožňuje zmnožení (amplifikaci) určité části DNA *in vitro*. Základní uspořádání PCR vyžaduje vytvoření směsi reagensů a následné cyklické střídání teplot.

Složky PCR směsi (PCR mix)

- **templátová DNA** – naše studovaná DNA, jejíž část chceme namnožit (gen, část genu nebo nekódující sekvence)
- **DNA polymeráza** – enzym, který buduje nový řetězec DNA podle vzoru templátu; obvykle se používá *Taq* polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, pro speciální aplikace máme v laboratoři několik dalších polymeráz (přesnějších, ale dražších)
- **PCR pufr** – udržuje stabilní pH a obsahuje chemikálie pro optimální aktivitu a stabilitu DNA polymerázy
- **MgCl₂** – Mg²⁺ ionty slouží jako kofaktor DNA polymerázy
- **nukleotidy (dNTP)** – směs deoxyribonukleosid trifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), základních stavebních jednotek DNA
- **primery** – oligonukleotidy (krátké úseky jednořetězcové DNA), zpravidla o délce 10–25 bází párující se s komplementární sekvencí v templátové DNA a sloužící jako počáteční místo replikace DNA, bez kterého by DNA polymeráza nemohla začít syntézu nového řetězce; k extenzi primeru dochází ve směru 5'→3' nově vznikajícího vlákna; sekvence primerů definuje úsek, který se bude amplifikovat

PCR teplotní program

Cyklické střídání teplot umožňuje přístroj zvaný termocykler. Typický PCR program zahrnuje 1–2 počáteční kroky, dále vlastní cyklus (zde kroky 3a, 3b, 3c), při kterém dochází k amplifikaci DNA a který se opakuje 30–40×, a 1–2 závěrečné kroky:

- 1) **zahřátí bloku cyklu:** 80°C, cca 30 s – vzorky nejsou v přístroji od začátku, vložíme je během této fáze
tento krok není nezbytný, ale může zvýšit specifitu PCR a zlepšit výsledky
- 2) **počáteční denaturace:** 94–98°C, 1–5 min – dochází k oddělení komplementárních řetězců DNA
- 3a) (cyklová) **denaturace:** 94–98°C, 20 s–1 min
- 3b) **nasednutí (annealing) primerů:** 45–60°C, 20–60 s – primery se specificky párují s komplementární oblastí na templátové DNA
- 3c) **syntéza DNA (elongace, extenze):** 72 °C, 1–2 min – optimální teplota pro činnost DNA polymerázy; na tvorbu 1 000 bází je potřeba cca 1 min
- 4) **konečná elongace:** 72°C, 5–15 min – dokončení syntézy částečných produktů
- 5) **zchlazení PCR reakce;** 15°C

Některé publikované protokoly uvádějí 4°C, takto nízká teplota ale většinou není nutná a zbytečně zatěžuje přístroje

Při střídání tří teplot dochází k exponenciálnímu množení požadovaného úseku DNA vymezeného dvojicí použitých primerů, vzniká 2ⁿ kopií z každé molekuly templátu.

Optimalizace PCR

Cílem optimalizace je specifický průběh PCR reakce, tj. aby vznikal pouze jediný produkt odpovídající amplifikovanému úseku. V případě, že produkt PCR reakce nevzniká v dostatečném množství nebo je výsledkem více produktů odlišné délky (nespecifické produkty), reakce neproběhla optimálně. Je nutné změnit reakční podmínky tak, aby PCR proběhla úspěšně. Je možné měnit koncentrace jednotlivých složek PCR směsi nebo modifikovat teplotní cyklus, optimální variantu je třeba pro konkrétní materiál (taxonomická skupina, studovaný úsek DNA) vyzkoušet. Nejčastější modifikace jsou:

- **Změna koncentrace DNA.** Snížením koncentrace DNA snížíme i koncentraci případných inhibitorů PCR, které mohou být přítomny ve vzorku. PCR může úspěšně proběhnout i s množstvím DNA menším než 1 ng
Někdy naopak pomůže zvýšit koncentraci DNA až na 50 ng
- **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; Mg^{2+} ionty se ale váží na dNTP, proto přílišné zvýšení koncentrace může snížit dostupnost dNTP a snížit výtěžek reakce (příp. je nutno kompenzovat zvýšením koncentrace dNTP).
- **Přidání aditiv.** Některé látky (DMSO, formamid, betaine, glycerol, BSA, $(NH_4)_2SO_4$) mohou zvyšovat stabilitu polymerázy a specifčnost vazby primerů; obvykle jsou (některé z nich) součástí komerčních PCR pufrů a mixů.
- **Modifikace PCR cyklu.** Prodloužení / zkrácení doby annealingu a elongace, zvýšení počtu cyklů (pokud PCR neprobíhá), prodloužení doby denaturace (nutné u templátů bohatých na GC báze). Nejčastější – změna teploty annealingu – viz následující bod.
- **Změna teploty nasednutí primeru** (annealingu). Teplota nasedání primerů by měla být o 5°C nižší než teplota tání (denaturace), tzv. melting temperature (T_m) primerů. Pro primery kratší než 25 bp se T_m vypočítá podle zastoupení bází: $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$. Příliš vysoká teplota annealingu způsobuje nestabilitu vazby primerů na templát a snížení výtěžku PCR. Snížením teploty annealingu umožníme lepší vazbu primerů na templátovou DNA, přílišné snížení však může vést k tvorbě nespecifických produktů. Ideální je provést gradientový pokus a následně vybrat nejvhodnější teplotu.
- **Touch-down protokol.** Do teplotního programu se na počátek amplifikace zařadí několik cyklů s vyšší teplotou nasedání primerů, která se postupně snižuje. V prvních cyklech (za vyšší teploty) vznikají jen specifické produkty, i když v menším množství. Nižší teplota v dalších cyklech zajistí dostatečný výtěžek, přičemž specifické produkty díky „náskoku“ z prvních cyklů zcela převládají.
- **Úprava *ramping time*** (rychlosti přechodu z jedné teploty na druhou). Při rychlém zahřívání z teploty annealingu na teplotu elongace může část primerů odpadnout od templátu, čímž se snižuje výtěžek reakce. Pro dostatečný výtěžek je pak nutné snížit *ramping time* (standardně bývá 3°C/s, u novějších cykleru i více, snižuje se na 1–2°C/s). Úprava *ramping time* je standardí součástí např. u metody AFLP.

PCR protokol s využitím Plain PP Master Mixu (Top-Bio)

- Plain PP Master Mix již obsahuje PCR pufr, MgCl₂, nukleotidy, DNA polymerázu a některá aditiva. Jeho použitím se výrazně snižuje čas nutný pro přípravu PCR reakce. Snižením počtu pipetovacích kroků je eliminována chybovost při přípravě PCR směsi.
- Stejným protokolem lze použít rovněž pro 2× koncentrovaný mix od firmy Fermentas (odlišuje se hlavně menším množstvím polymerázy – je proto levnější).
- Pro speciální aplikace jsou v laboratoři k dispozici i chemikálie umožňující namíchat PCR mix samostatně po jednotlivých složkách (např. pokud je požadována odlišná koncentrace MgCl₂ nebo polymerázy).
- PCR reakce lze provádět v různých objemech, s ohledem na naše zkušenosti (s malými objemy se hůře pracuje) a plánované použití PCR produktu. Objem reakce obecně volíme co nejmenší (ušetření nákladů); množství jednotlivých složek udává následující tabulka:

reagencie	objem (μl)				výsledná koncentrace
	25 μl reakce	20 μl reakce	15 μl reakce	10 μl reakce	
PCR voda	5,5	4,4	3,3	2,2	
5' primer (2,5 pmol / μl)*	3,0	2,4	1,8	1,2	0,3 μM*
3' primer (2,5 pmol / μl)*	3,0	2,4	1,8	1,2	0,3 μM*
2× Plain PP Master Mix**	12,5	10,0	7,5	5,0	1 ×
<i>celkem</i>	<i>24 μl</i>	<i>19,2 μl</i>	<i>14,4 μl</i>	<i>9,6 μl</i>	
DNA	1 μl	0,8 μl	0,6 μl	0,4 μl	

* Platí pro v laboratoři nejčastěji používanou koncentraci zásobního roztoku primerů 2,5 pmol/μl (= 2,5 μM) a nejčastější finální koncentraci 0,3 μM. Při použití jiné koncentrace primerů / jiné požadované finální koncentrace je nutno složení směsi upravit, změna objemu primerů se kompenzuje ekvivalentní úpravou množství vody.

** Plain PP Master Mix ve finální koncentraci obsahuje 75mM Tris-HCl pH 8,8; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween20; 2,5mM MgCl₂; 200 μM dNTP každého typu; Taq DNA polymerázu (0,05 U / μl); stabilizátory a aditiva.

- 1) Po celou dobu pracujeme na ledu. Všechny potřebné reagenty necháme dopředu rozmrznout, promícháme proklepnutím prstem a krátce stočíme na stolní centrifuzě. Mezitím si označíme PCR zkumavky nebo stripy nebo destičky.
- 2) Do sterilní eppendorfky připravíme PCR směs pro příslušný počet vzorků + negativní kontrola + 1 vzorek (rezerva pro pipetovací chybu). Např. máme 10 vzorků, PCR směs připravíme pro 12 vzorků.
- 3) Jednotlivé složky pipetujeme v pořadí: voda, primery a Plain PP Master Mix. Směs promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuzě.
- 4) Příslušný objem PCR směsi (řádek *celkem*) rozpipetujeme do 0,2 ml PCR zkumavek, stripů nebo jamek destičky a přidáme DNA v množství odpovídajícímu objemu reakce. DNA nepřidáváme do negativní kontroly! Promícháme, krátce stočíme v centrifuzě. Vzorky jsou připraveny k vložení do termocyklu.

- 5) Spustíme odpovídající teplotní program. Po zahřátí bloku termocykleru na ca 80°C vložíme stripy do přístroje a dotáhneme jeho víko pomocí šroubovacího kolečka..

Příklad PCR teplotního profilu:

1×	94°C	3 min	(počáteční denaturace)
35×	94°C	0,5 min	(cyklová denaturace)
	[Ta]°C	1 min	(nasedání primerů; specifické pro daný primerový pár)
	72°C	1 min	(cyklová elongace)
1×	72°C	10 min	(finální elongace)
1×	15°C	hold	(ochlazení směsi pro proběhnutí PCR)

- 6) Po proběhnutí reakci zkontrolujeme výsledek elektroforézou na agarózovém gelu. Smísíme 2 µl produktu s 0,8 µl nanášecího pufru a nanese na běžný 1,0-1,5 % agarózový gel v TBE pufru, dobře lze použít recyklované gely. Jako standard nanese 3 µl 100bp ladderu. Na gelu by měl být vidět jediný pruh DNA ± očekávané velikosti. Ve slepé kontrole nesmí být vidět žádný produkt (obvykle se vyskytuje pouze neostrý proužek dimerů primerů <100 bp), pozitivní výsledek značí nežádoucí kontaminaci PCR směsí!

Sekvenování DNA

Princip

Sekvenováním zjistíme pořadí bází (A,C,T,G) v konkrétním úseku DNA. Postup můžeme rozdělit do několika kroků:

1. PCR a příprava směsi pro sekvenační reakci. Pomocí dvojice primerů amplifikujeme vybraný úsek DNA. U slabých proužků indikujících nepřiliš efektivní PCR amplifikaci je před sekvenováním nutné purifikací odstranit zbylé primery a neinkorporované nukleotidy (dNTP). Pro následnou sekvenační reakci je přidán pouze jeden primer (také koncentrace všech složek, včetně templátu a dNTP, musí být poměrně přesně vybalancována).

2. Cyklické sekvenování (cycle sequencing). Modifikovaná PCR reakce, při které jsou kromě dNTP v sekvenační směsi přítomny i fluorescenčně značené ddNTP (2',3'-dideoxynukleotidtrifosfáty). Při inkorporaci ddNTP do vznikajícího řetězce DNA je zamezeno jeho dalšímu prodlužování. Výsledkem sekvenační reakce je tak směs různě dlouhých řetězců DNA a každý je fluorescenčně označen barvou podle toho, kterou bází končí.

3. Purifikace produktů sekvenační reakce. Před analýzou na automatickém sekvenátoru je třeba produkty cyklického sekvenování přechistit, např. na Sephadexu.

4. Sekvenační analýza na automatickém sekvenátoru. Používáme sekvenátor ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky, která je společným pracovištěm PřF JU a Biologického centra AVČR a najdete ji v přízemí ÚMBR. V sekvenátoru jsou produkty sekvenační PCR rozděleny kapilární elektroforézou a je možno přechistit posloupnost jednotlivých bází. Sekvenátor umožní obvykle spolehlivě číst cca 600-800 bází (záleží na kvalitě původního PCR produktu a na konkrétní sekvenci). Pokud chceme sekvenovat delší úsek, je obvykle třeba provést dvě sekvenační reakce s tzv. forward a reverse primerem, PCR produkt bude osekvenován z obou stran. Získané dílčí sekvence se potom spojí dohromady v počítači pomocí speciálových programů.

V naší laboratoři provádíme pouze přípravu sekvenační reakce. Další kroky provádí již samostatně Laboratoř genomiky jako součást služeb, které jsou v ceně sekvence.

A) PCR amplifikace

Viz obecný protokol k PCR, str. 13. Pro kvalitu sekvenování je nutné, aby vzorek obsahoval pouze jediný specifický PCR produkt, příp. aby byl specifický produkt alespoň výrazně intenzivnější než nespecifické produkty.

PCR produkt přechistíme, nejčastěji používáme enzymatické přechištění („ExoSAP“, protokol B), příp. lze použít komerční kity (protokol C).

B) Enzymatické přečištění PCR produktu (Exo-SAP)

Využíváme kombinace 2 enzymů: Exo I (exonukleáza I) štěpí jednovláknovou DNA (neinkorporované primery), SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) odstraní neinkorporované dNTP.

Postup

- 1) Do nové PCR zkumavky / PCR stripu přepipetujeme 1,4 µl PCR produktu.
- 2) Přidáme 0,4 µl směsi Exo-SAP, promícháme proklepnutím prstem a krátce stočíme na stolní centrifuze.
- 3) Vzorky umístíme do cykleru a spustíme program s názvem 'Exosap', který zahrnuje následující kroky: 37°C – 15 min (pro aktivitu enzymů), 85°C – 15 min (inaktivace enzymů), 15°C – hold.

C) Přečištění PCR produktu pomocí JETquick kitu (GENOMED)

GENOMED Jetquick PCR Purification Spin Kit využívá tzv. „spin column technique“, tj. kolonky s membránou, na kterou se váže DNA.

Obecné

- Před započítím práce zkontrolujeme přidání ethanolu (zaškrtnutí políčka na lahvičce) do pufru H2, příp. ethanol doplníme podle pokynů výrobce.
- Do 1,5 ml eppendorfky odpipetujeme potřebný objem TE pufru (viz bod 9) a předehejeme na 65°C v termobloku.
- Pokud jsou k dispozici, používáme recyklované kolonky (nižší cena, jsou uloženy v označených sáčcích).

Postup

- 1) K PCR produktu přidáme roztok H1 v poměru 1:4 (např. k 10 µl PCR produktu přidáme 40 µl H1) a důkladně promícháme na vortexu.
- 2) Kolonku s membránou vložíme do označené 1,5 ml nebo 2 ml eppendorfky bez víčka (součást kitu), na kolonky přepipetujeme směs z předchozího bodu.
- 3) Centrifugujeme 1 minutu při 12 000 rpm.
- 4) Filtrát (to, co protéklo kolonkou) vylijeme do kádinky, DNA zůstala vázána na membráně.
- 5) Vložíme kolonku zpět do 2 ml eppendorfky a přidáme 200 µl roztoku H2.
Pro purifikaci PCR reakce o objemu >25 µl je vhodnější použít 500 µl roztoku H2.
- 6) Centrifugujeme 1 minutu při 12 000 rpm.
- 7) Filtrát vylijeme do kádinky (DNA vázaná na membráně je promyta).
- 8) Vložíme kolonku zpět do 2 ml eppendorfky a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách (13 800 rpm), abychom důkladně odstranili roztok H2 z kolonky.
- 9) Vložíme kolonku do nové označené 1,5 ml eppendorfky (není součástí kitu) a přímo na střed membrány pipetujeme 30 µl TE pufru předehejtého na 65°C.
- 10) Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
- 11) Centrifugujeme 2 min při 12 000 rpm (DNA je uvolněna z membrány do roztoku).
- 12) DNA krátkodobě skladujeme v ledničce, dlouhodobě při -20 °C.
- 13) Kolonky z kitu po skončení práce nevyhazujeme, vložíme je do lahve s 1M HCl pro recyklaci.

D) Příprava vzorků pro sekvenování DNA

Pro optimální průběh sekvenační reakce je potřeba dodat optimální množství PCR produktu a zvolit správný poměr koncentrace primeru ku PCR produktu. Zejména množství DNA je důležitý parametr, přičemž nepříznivé jsou větší odchylky oběma směry, tedy málo / moc DNA (způsobují méně kvalitní až nečitelné nebo příliš krátké nekompletní sekvence).

Nepurifikované vzorky nebo vzorky purifikované enzymatickým přečištěním PCR produktu (Exo-SAP)

- Purifikovat není nutné vzorky, které měly na PCR gelu velmi silné proužky. PCR produkt můžeme rovnou použít pro přípravu sekvenace. Pro úseky o délce <1000 bp použijeme 0,5 μ l PCR produktu.
- Pro vzorky purifikované enzymatickým přečištěním (Exo-SAP) použijeme u silných proužků 0,5 μ l PCR produktu, u slabších proužků použijeme více, např. 2 μ l nebo 4 μ l.

Postup

- 1) Spočítáme potřebné množství sekvenačního primeru (v závislosti na koncentraci jeho zásobního roztoku), do reakce dáváme 2,5 pmol primeru.

Například při standardní koncentraci 2,5 pmol/ μ l použijeme na reakci 1 μ l primeru, při 5 pmol/ μ l použijeme 0,5 μ l.

- 2) Dopočteme potřebné množství sterilní vody tak, aby **celkový objem** reakce byl **7,5 μ l**.
- 3) Do 0,2 ml eppendorfek pipetujeme vzorky pro sekvenování, v pořadí sterilní voda – primer – DNA.
- 4) Poklepem na eppendorfku prsty promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuze. Spolu s vyplněným sekvenačním protokolem (<http://www.bc.cas.cz/img/laboratore/laborator-genomiky-pozadavkovy-formular-pro-sekvenaci.doc>) odneseme do sekvenčního centra v přízemí UMBR AV ČR.

Vzorky purifikované pomocí PCR purifikačního kitu – např. JETquick kitu (GENOMED)

viz následující strana

Vzorky purifikované pomocí PCR purifikačního kitu – např. JETquick kitu (GENOMED)

- Pro vzorky purifikované pomocí PCR kitu udává požadované množství DNA následující tabulka. Potřebné množství závisí na použitém sekvenačním kitu a očekávané velikosti (délce) sekvenovaného úseku.
- Sekvenční centrum používá 2 sekvenační kity. Standardně používáme k sekvenaci 3.1 Cycle Sequencing Kit, jehož nevýhodou ale je, že není možné přečíst prvních cca 30 pozic sekvence. Naopak 1.1 Cycle Sequencing Kit je lepší použít, pokud je pro nás důležitý počátek sekvence studovaného úseku, ale nehodí se k sekvenování delších úseků DNA (což je v případě botanických aplikací většina).

Templát	Množství (Kit 3.1)
100-200 bp	0,5-1,5 ng
200-500 bp	1,5-5 ng
500-1000 bp	2,5-10 ng
1000-2000 bp	5-20 ng
>2000 bp	10-25 ng

Postup

- 1) Změříme koncentraci přečištěné DNA pomocí spektrofotometru (viz str. 49)
- 2) Spočítáme, jaký objem daného vzorku potřebujeme, aby obsahoval dostatečné množství DNA. Držíme se spíše na horní hranici rozmezí uvedených v tabulce.

Například máme vzorek o koncentraci 16 ng/μl a potřebujeme do reakce 10 ng DNA. Potřebujeme tedy 0,63 μl (= 10/16) z daného vzorku.

! *Dosavadní zkušenosti ukazují, že koncentrace naměřené spektrofotometrem bývají nadhodnocené (jde často o malé koncentrace, které se měří špatně). Do reakce proto může být výhodné dát i 2–3× větší množství než by odpovídalo naměřeným koncentracím, přesnou hodnotu je třeba empiricky vyzkoušet. Při rutinním používání určitého postupu a neproblematických vzorcích lze dokonce měření koncentrace zcela vynechat a používat vyzkoušené objemy vzorků.*

- 3) Spočítáme potřebné množství sekvenačního primeru (v závislosti na koncentraci jeho zásobního roztoku), do reakce dááme 2,5 pmol primeru.

Například při standardní koncentraci 2,5 pmol/μl použijeme 1 μl primeru, při 5 pmol/μl použijeme 0,5 μl.

- 4) Dopočteme potřebné množství sterilní vody tak, aby celkový objem reakce byl **7,5 μl**.
- 5) Do 0,2 ml eppendorfek pipetujeme vzorky pro sekvenování, v pořadí sterilní voda – primer – DNA.
- 6) Poklepem na eppendorfku prsty promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuze a spolu s vyplněným sekvenačním protokolem (<http://www.bc.cas.cz/img/laboratore/laborator-genomiky-pozadavkovy-formular-pro-sekvenaci.doc>) odneseme do sekvenčního centra v přízemí UMBR AV ČR.

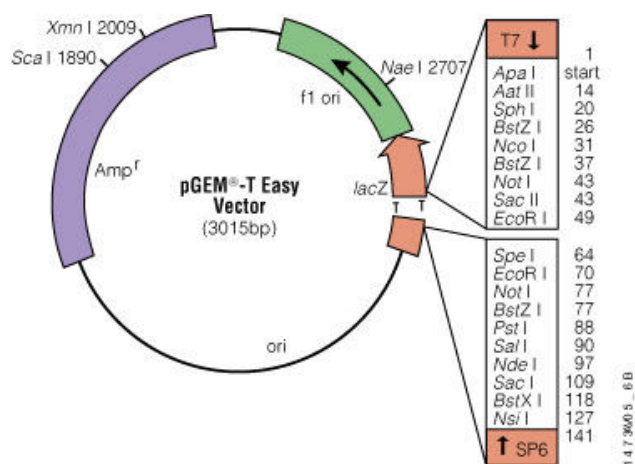
Klonování

Princip

Klonování je klasická metoda genového inženýrství, pomocí které se vytváří rekombinantní molekula vnesením fragmentu DNA do vektoru (plazmidu). Jedním z možných použití je namnožení a separace molekul heterogenního PCR produktu, např. u multi-copy úseků resp. vzorků s vnitrogenomovou variabilitou, nebo u produktů kontaminovaných nežádoucím produktem amplifikace.

Pro klonování PCR produktů lze použít např. pGEM-T Vector System I od firmy Promega (obsahující plazmid pGEM-T (viz obr.), T4 DNA ligázu, ligační pufr a kontrolní inzert). Tento vektor obsahuje poly-T přesahy v klonovacím místě, které jsou kompatibilní vůči A-přesahům vytvářeným většinou termostabilních polymeráz během PCR. Zvyšuje se tak účinnost ligace PCR produktu do plazmidu. Vlastní 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. Vložení PCR produktu do této oblasti, tzv. inzerční inaktivací LacZ α -peptidu, je porušena produkce α -peptidu a β -Gal se stává neaktivní. To umožňuje barevnou selekci rekombinantních klonů (tzv. modro-bílá selekce). Na miskách ampicilinem vyrostou pouze bakterie transformované plazmidem s rezistencí, v médiu je dále přítomen substrát pro β -Gal (označovaný X-Gal), který je v případě aktivní β -Gal (nedošlo k inzerci PCR produktu do plazmidu) přeměněn na nerozpustný modrý produkt (modré kolonie), pokud není metabolizován (došlo k inzerci PCR produktu), zůstává kolonie bílá.

Obr. pGEM-T Vector. Inzert je vkládán do tzv. mnohonásobné klonovací oblasti (MCS). Ta nese množství restrikčních míst, které rovněž umožňují vnesení insertu vytvořeného štěpením pomocí daného restrikčního enzymu, a také následné uvolnění insertu pomocí vyštěpení daným restrikčním enzymem.



A) PCR amplifikace

Viz obecný protokol k PCR. Pro omezení výskytu artefaktů je vhodné minimalizovat počet PCR cyklů, použít 2× delší čas cyklové elongace, a případně použít speciální polymerázy (*proofreading* apod.).

B) Ligace

B1) Klasický protokol podle výrobce klonovacího kitu

Tento postup nebývá pro některé typy inzertů účinný. Před ligací je nutné PCR produkt purifikovat PCR kitem.

Purifikace (JETquick Purification Kit, Genomed)

- Před započítím práce zkontrolujeme přidání ethanolu (zaškrtnutí políčka na lahvičce) do pufru H2, příp. ethanol doplníme podle pokynů výrobce.
 - Do 1,5 ml eppendorfky odpipetujeme potřebný objem TE pufru (viz bod 9) a předehejeme na 65°C v termobloku.
- 1) K PCR produktu přidáme roztok H1 v poměru 1:4 (např. k 10 µl PCR produktu přidáme 40 µl H1) a důkladně promícháme na vortexu.
 - 2) Kolonku s membránou vložíme do označené 1,5 ml nebo 2 ml eppendorfky bez víčka (součást kitu), přepipetujeme do ní směs z předchozího bodu.
 - 3) Centrifugujeme 1 minutu při 12 000 rpm.
 - 4) Filtrát (to, co protéklo kolonkou) vylijeme do kádinky, DNA zůstala vázána na membráně.
 - 5) Vložíme kolonku zpět do 2 ml eppendorfky a přidáme 200 µl roztoku H2.
Pro purifikaci PCR reakce o objemu >25 µl je vhodnější použít 500 µl roztoku H2.
 - 6) Centrifugujeme 1 minutu při 12 000 rpm.
 - 7) Filtrát vylijeme do kádinky (DNA vázaná na membráně je promyta).
 - 8) Vložíme kolonku zpět do 2 ml eppendorfky a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách (13 800 rpm), abychom důkladně odstranili roztok H2 z kolonky.
 - 9) Vložíme kolonku do nové označené 1,5 ml eppendorfky (není součástí kitu) a přímo na střed membrány pipetujeme 30 µl TE pufru předehejeme na 65°C.
 - 10) Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
 - 11) Centrifugujeme 2 min při 12 000 rpm (DNA je uvolněna z membrány do roztoku).
 - 12) Roztok s DNA nanese zpět na kolonku.
 - 13) Inkubujeme 10–15 min.
 - 14) Centrifugujeme 2 min při 12 000 rpm.

Měření koncentrace DNA

Viz obecný protokol k spektrofotometru Biowave II.

Výpočet množství DNA do ligační reakce.

$$\text{hmotnost inzertu [ng]} = \frac{\text{hmotnost vektoru [ng]} \times \text{velikost inzertu [kbp]}}{\text{velikost vektoru [kbp]}} \times \text{poměr množství (molar ratio) inzert : vektor}$$

Například: máme 800 bp dlouhý klonovaný úsek, standardní protokol udává na 1 reakci 50 ng pGEM-T Easy Vector (Promega) o velikosti 3 kbp, požadovaný poměr inzert:vektor je 3:1.

$$\text{hmotnost inzertu [ng]} = \frac{50 \text{ ng} \times 0.8 \text{ kbp}}{3.0 \text{ kbp}} \times \frac{3}{1} = 40 \text{ ng}$$

Používáme reakce o sníženém objemu (pro ušetření), adekvátně upravíme objem inzertu, tedy pro 1/4 reakci 10 ng, pro 1/2 reakci 20 ng.

Příprava ligační směsi

chemikálie	1/4 reakce	1/2 reakce
2× ligační pufr (zvortexovaný!)	1,25 µl	2,5 µl
pGEM-T Vector	0,25 µl	0,5 µl
T4 ligáza (nevyndávat z ledu!)	0,25 µl	0,5 µl
Inzert (PCR produkt)	nutné spočítat – viz výše	nutné spočítat – viz výše
Sterilní H ₂ O	doplnit do 2,5 µl	doplnit do 5 µl
celkem	2,5 µl	5 µl

- Pracujeme ve Flow Boxu.

- 1) Připravíme ligační směs podle tabulky pro příslušný počet vzorků + 1 rezerva. Ligační pufr je v alikvotech pro jednorázové použití – nespotřebované zbytky pufru vyhodíme (obsahuje ATP, které degraduje opakovaným rozmrazováním/zamrazováním).
- 2) Směs jemně promícháme špičkou, stočíme a rozpipetujeme.
- 3) Přidáme PCR produkt (inzert).
- 4) Inkubujeme přes noc v ledničce při 4°C (možno i 1h při pokojové teplotě, ale je pak nižší účinnost ligace).

B2) Protokol pomocí vyřezávání PCR produktu z low-melting agarosového gelu

Tento protokol bez problémů funguje na většinu inzertů. Je účinný i u vzorků s nižší koncentrací PCR produktu (slabé proužky) a vyžaduje pouze relativně malé množství PCR produktu. U vzorků s více (příp. nespecifickými) PCR produkty také umožňuje samostatnou ligaci vybraného konkrétního proužku. Nevýhodou je pouze relativně vysoká cena low-melting agarosy.

- 1) Z nové, nepoužité *low-melting* agarosy připravíme 1,5 % gel v 1× TAE pufru (místo obvyklého TBE). Po nalití necháme gel asi 45 min tuhnout. Po ztuhnutí gel přemístíme do elektroforézy a zalijeme 1× TAE pufrem.
- 2) Smícháme 6 µl PCR produktu s 2 µl nanášecího pufru s barvivem Sybr Green – označeno „LD+SG“, a necháme 10 min inkubovat. Naneseme na gel a spustíme elektroforézu.
- 3) Připravíme a popíšeme sterilní 0,5 ml zkumavky.
- 4) Během elektroforézy vytemperujeme termoblok na 65°C.
- 5) Gel v nalévací vaničce opatrně přeneseme na modré světlo. Pomocí skalpelu vyřízneme cílové proužky PCR produktu a opatrně je přemístíme do připravených 0,5 ml zkumavek. Pracujeme s oranžovými brýlemi. Mezi jednotlivými vzorky otíráme skalpel lihem!
- 6) Zkumavky s vyřízlými proužky inkubujeme na termobloku 10 min při 65°C (roztavení agarosy).
- 7) Pracujeme ve flow boxu. Připravíme a popíšeme novou sadu sterilních 0,5 ml zkumavek. Do každé zkumavky napipetujeme „*melted gel mixture*“:

sterilní voda 1,75 µl
pGEM-T Vector 0,25 µl
vzorek – roztavená agarosa 1,25 µl

Směs ihned promícháme a inkubujeme na termobloku dalších 10 min při 65°C.

- 8) Pracujeme ve flow boxu a na ledu. Ve sterilní zkumavce připravíme ligační směs pro příslušný počet vzorků (není nutné počítat s rezervou):

2× ligační pufr (zvortexovaný!) 2,5 µl

T4 ligáza (nevynadávat z ledu!)..... 0,25 µl

Rozpipetujeme do PCR zkumavek nebo stripů po 2,5 µl.

- 9) K ligační směsi přidáme 2,5 µl „melted gel mixture“. Při pipetování roztavené směsi počkáme po nabrání vzorku do špičky pipety asi 3 sekundy, a teprve poté smícháme s ligační směsí (ochladnutí zabrání poškození T4 ligázy). Ihned promícháme pipetováním.
- 10) Spustíme program „ligace16“: 12-14 h při 16°C. Po ochlazení bloku umístíme zkumavky do cykleru. Zbytky vzorků vyřízlé z agarosy lze zamrazit pro případné opakování.
- 11) Před transformací zkumavky rozehrějeme 15 min při 65°C (v cykleru nebo na termobloku) a poté naředíme 20 µl sterilní vody (zabrání gelovatění vzorku).

C) Transformace

- 1) Na ledu rozmrazíme alikvot 100 µl kompetentních buněk *E. coli*, kmen K12, mod. DHα – jeden alikvot vystačí na 2 klonované vzorky.
- 2) Pracujeme ve flow boxu a na ledu. Pro každý vzorek odpipetujeme do sterilní 1,5 ml zkumavky 50 µl kompetentních buněk. U vzorků ligovaných klasickým protokolem přidáme 2,5 µl ligační směsi; u vzorků ligovaných pomocí low-melting agarosy přidáme 12,5 µl ligační směsi.
- Pokud při klasickém postupu použijeme ligační směs o objemu 5 µl, je možné zbývající část zamrazit a použít na případné opakování.*
- 3) Lehce proklepneme a krátce stočíme na stolní centrifuze. Inkubujeme 20 min na ledu (dochází ke stabilizaci směsi).
- 4) Během inkubace vytemperujeme termoblok na 42°C.
- 5) Transformujeme pomocí teplotního šoku: zkumavky inkubujeme 45 s při 42°C na termobloku, poté ihned umístíme na led po dobu minimálně 2 min. Netřepat!

D) Kultivace

- 1) Ke vzorku přidáme 300 µl SOC média (pokojová teplota).
- 2) Zkumavky inkubujeme ve vodorovné poloze na třepačce 45 min při 37°C, 150 rpm (obnova buněčné stěny, aktivace fyziologických pochodů, aktivace exprese genů).
- 3) Připravíme kultivační misky s LB/Amp/IPTG/X-Gal. Tuhé LB médium rozehrějeme na míchačce a ochladíme pod tekoucí vodou - teplota média nesmí být vyšší 65°C. Do 250 ml LB média ve flow boxu přidáme ve 250 µl zásobního roztoku Amp (0,1g/ml). Před ztuhnutím médium rozlijeme do misek – použijeme množství, které pokryje celé dno misky.
- 4) V 1,5 ml sterilní eppendorfci smícháme 64 µl X-Gal (12,5 mg/ml) a 3,5 µl IPTG (240 mg/ml) ze zásobního roztoku, promícháme a nanese na povrch tuhého média a pomocí sterilní skleněné kultivační kličky rovnoměrně rozetřeme na povrchu média v misce.

- 5) Na misku nanese 100 μ l suspenzí kultury transformovaných bakteriálních buněk a rovněž rozetřeme. Mezi jednotlivými vzorky klíčku sterilizujeme namočením do lihu a opálením nad kahanem.

Eventuelně zakoncentrujeme centrifugací po dobu 2 min při 3980 rpm (= 1500 \times g). Odpipetujeme cca 250 μ l supernatantu, sediment pipetováním resuspendujeme ve zbytku SOC média (cca 50 μ l) a nanese na misky.

- 6) Inkubujeme při 37°C přes noc v termostatu (misky obrácené dnem vzhůru). Následující den vyhodnotíme kolonie.
- 7) Bakterie narostlé na povrchu LB/Amp média je možné uchovávat po dobu několika týdnů při teplotě 4°C. Jsou vhodné pro přípravu tzv. bakteriálních konzerv nebo pro další manipulace a analýzy, především pak izolaci plazmidu či přímou PCR.

E) Přímá PCR

- 1) Do PCR stripů rozpipetujeme 40 μ l zklávané destilované vody.
- 2) Odebereme vzorky jednotlivých kolonií. Pracujeme ve flow boxu. Sterilním párátkem pícháme do samostatné kolonie a párátko smočíme ve sterilní destilované vodě ve stripu. Použitá párátko odhazujeme do kádinky s koncentrovaným Savem.
- 3) Stripy inkubujeme při 94°C 5 minut v cykleru (program „Denatur“) – plazmidy se z bakterií uvolní teplotní denaturací.
- 4) Připravíme směs pro PCR podle obvyklého protokolu. Pro amplifikaci použijeme primery SP6 a T7, které nasedají na plazmid v těsném okolí vkládaného inzertu:

PCR voda	1,3 μ l
primer SP6 (5 pmol/ μ l).....	0,4 μ l
primer T7 (5 pmol/ μ l).....	0,4 μ l
2 \times Plain PP Master Mix	2,5 μ l

- 5) Promícháme, krátce stočíme v centrifuze a po 4,6 μ l rozpipetujeme do nových PCR stripů.
- 6) Do PCR reakce přidáme 0,4 μ l vzorku denaturované DNA z bakterií, zbytek zamrazíme pro případné další použití. Promícháme proklepnutím prstem, krátce stočíme na stolní centrifuze.
- 7) Spustíme teplotní program „SP6_T7“. Po zahřátí bloku termocykleru na ca 80°C vložíme stripy do přístroje a dotáhneme jeho víko. Teplotní profil:

1 \times	94°C	3 min
45 \times	94°C	30 s
	50°C	1 min
	72°C	1 min
1 \times	72°C	10 min
1 \times	15°C	hold

- 8) Výsledek PCR ověříme na běžném 1-1,5% agarosovém gelu.

F) Likvidace GMO, archivace o nakládání s GMO

Použitá párátko vhazujeme do roztoku Sava. Párátko, použité špičky, zbylé suspenzí bakteriální kultury a misky s koloniemi klávuujeme v klávacích pytlích. Vyplníme formulář a protokol o průběhu zaznamenávaného experimentu. Tyto dokumenty uchováváme po dobu 10 let jak v elektronické, tak papírové podobě.

ISSR, Inter-simple sequence repeat

Princip

Jde o metodu založenou na PCR, která využívá mikrosatelitové sekvence jako primery (16-25 bp). Mikrosatelity (*simple sequence repeat*, SSR) jsou sekvence opakující jednoduchý motiv několika nukleotidů (1–6 báze) několikrát za sebou. Tyto repetitivní jednotky se vyskytují často a náhodně v celém genomu eukaryot. Při ISSR metodě dochází k amplifikaci úseků DNA mezi dvěma stejnými mikrosatelitovými sekvencemi, které jsou umístěny v řetězci DNA v opačném směru. Výsledkem jsou různě dlouhé fragmenty DNA. ISSR primery mají sekvenci komplementární k sekvenci mikrosatelitů. Na jejich konci bývá často připojena „kotva“, tzv. *anchor* motiv, což jsou nejčastěji 1–3 báze odlišné od repetitivní mikrosatelitní sekvence, které při PCR amplifikaci zajistí specifické nasednutí primeru na konec mikrosatelitního motivu. Produkty PCR amplifikace jsou vizualizovány na agarózovém gelu nebo v sekvenátoru. Výsledná sada fragmentů odráží variabilitu v distribuci a délce mikrosatelitů v genomu. Obvykle testujeme více primerů a pro finální analýzu všech vzorků volíme několik, které poskytují dostatečně variabilní a dobře hodnotitelné výsledky. Analýzu každého vzorku je nutné provést ve dvou nezávislých bězích (ideálně včetně opakované izolace DNA), při větších sadách dat je nutné toto provést alespoň u reprezentativní části vzorků (min. 10% a min. několik desítek vz.). Do statistického zpracování se pak zahrnují pouze „proužky“, které se objeví v obou těchto nezávislých opakováních.

A) PCR amplifikace

- 1) Připravíme PCR směs pro příslušný počet vzorků + negativní kontrola + 1. Pracujeme stále na ledu. Pro reakci o objemu 7,5 µl je složení pro jeden vzorek následující:

PCR voda	1,55 µl
primer (2,5 pmol/µl)	1,8 µl
2× Plain PP Master Mix	3,75 µl

- 2) Promícháme, krátce stočíme na stolní centrifuze a rozpipetujeme po 7,1 µl do PCR stripů.
- 3) Přidáme po 0,4 µl DNA vzorku. Promícháme poklepnutím prstem na strip a krátce stočíme na stolní centrifuze.
- 4) Spustíme odpovídající teplotní program s použitím tzv. *touchdown* protokolu. Po zahřátí bloku termocykleru na ca 80°C vložíme stripy do přístroje a dotáhneme jeho víko.

Příklad programu pro vzorky použité na praktiku (Spergularia, primery I1, I2 a OW3):

1×	94°C	3 min	
5×	94°C	1 min	
	[$T_a + 5$ až $+1$]°C	1 min	pokles o 1°C / cyklus
	72°C	2 min	
33×	94°C	1 min	
	[T_a]°C	1 min	
	72°C	2 min	
1×	72°C	10 min	
1×	15°C	hold	

T_a je teplota *annealingu*, která je optimalizovaná pro daný primer. Při *touchdown* protokolu se prvním cyklu začíná na teplotě $T_a + 5^\circ\text{C}$, v následujících 4 cyklech je teplota snížena vždy o 1°C. Po prvních 5 cyklech teplota ustálí na hodnotě T_a , která je použita pro zbývajících 33 cyklů.

- 5) Po skončení programu stripy vyndáme z cykleru a krátce centrifugujeme.

B) Elektroforéza a *post-staining* barvení

Pro gely s dostatečně kvalitním rozlišením je nutné použít nerecyklovanou agarózu a *post-staining* (barvení gelu po skončení elektroforézy). Ke vzorkům se před nanesením přidává pouze modrý nanášecí pufr (v naší laboratoři ozn. jako „LD“), tj. bez barviva GelRed nebo Sybr Green! Také žebříček použijeme ve variantě bez barviva (zkumavka označená jako „JK ladder“). Vlastní obarvení DNA se provádí až po skončení elektroforézy v barvicím roztoku 1×GelRed v 1M NaCl. S barvicím roztokem zacházíme opatrně – je relativně drahý a nelze vyloučit případné mutagenní účinky barviva GelRed.

Pouze pro první testy primerů postačuje recyklovaný gel a klasické barvení vzorků pomocí modrého nanášecího pufru obsahujícího barvivo pro vizualizaci DNA (označeného jako „GelRed“).

Postup

- 1) Připravíme velký 1,2 % agarózový gel z nové, nerecyklované agarózy.
- 2) Smícháme 1 μ l modrého nanášecího pufru bez DNA barviva (označen „LD“) s 3 μ l PCR produktu, promícháme a naneseme na gel.
- 4) Jako žebříček použijeme 4 μ l 100 bp ladderu bez DNA barviva („JK ladder“) na obou stranách gelu, před a za vzorky.
- 5) Napětí nastavíme na 80 V, elektroforézu necháme běžet přes noc (cca 12-14 h).
- 6) Po skončení elektroforézy gel přemístíme do příslušné vaničky označené jako „GelRed poststaining“, zalijeme barvicím roztokem (1× GelRed v 1M NaCl) a necháme mírně třepat na třepačce 20–45 min.
- 7) Pořizujeme dvě fotky gelu, první na obvyklou expozici a druhou přeexponovanou (vyniknou i slabší, tj. méně amplifikované produkty).
- 8) Barvicí roztok slijeme zpět do lahvičky a uschováme pro další použití (lze použít několikrát opakovaně). Vaničky na poststaining opláchneme destilovanou vodou. Gely po vyfocení vyhodíme do směsného odpadu.

Analýza mikrosatelitů

Princip

Mikrosatelitní DNA neboli mikrosatelity, také nazývané **STR** (*short tandem repeats*) nebo **SSR** (*simple sequence repeats*), jsou krátké segmenty DNA, ve kterých se mnohokrát opakují specifické motivy nukleotidových sekvencí, např. (A)_n, (AT)_n, (ATA)_n. Počet opakování v konkrétním místě DNA – lokusu – definuje alelu. Možný počet alel závisí na ploidním stupni jedince (každá sada chromozómů nese jednu alelu). Délku alel(y) zjistíme PCR amplifikací daného lokusu pomocí primerů přiléhajících k mikrosatelitní sekvenci. Mikrosatelity v jaderné DNA (resp. jejich okolní sekvence a tedy primery) jsou často druhově specifické, naopak chloroplastové mikrosatelity se vyskytují v místech mezi konzervovanými sekvencemi a lze je amplifikovat pomocí tzv. konsenzuálních (univerzálních) primerů. PCR fragmenty pak rozdělíme podle délky na gelu (denaturující polyakrylamidový gel) nebo v automatickém sekvenátoru tzv. fragmentační analýzou.

Jaderné mikrosatelity jsou považovány za jedny z nejvhodnějších genetických markerů díky jejich hojnému výskytu v celém genomu, velké variabilitě (polymorfismu), kodominantní dědičnosti a celkové spolehlivosti metody. V populační biologii nachází využití při identifikaci příbuzných jedinců, analýzách rodičovství, až po odvozování demografických parametrů.

A) PCR amplifikace

Pro amplifikaci konkrétního úseku DNA, který obsahuje mikrosatelitovou sekvenci, použijeme dva specifické primery, z nichž jeden je fluorescenčně značený. V PCR cyklech se často používají relativně krátké časy elongace a denaturace (kratší časy jsou dostačující pro amplifikaci obvykle krátkých SSR lokusů; zkrácení kroků urychlí program). Pokud je třeba analyzovat více mikrosatelitových lokusů (často se analyzuje 8–10), je výhodné pokusit se sestavit tzv. multiplex PCR. Je to v podstatě běžná PCR reakce, do které přidáme více primerových páru najednou a amplifikujeme tak více lokusů v jedné PCR reakci. Můžeme tak výrazně snížit finanční i časové náklady. Musíme však najít takové kombinace lokusů, aby (1) primery měly přibližně stejnou teplotu annealingu, (2) všechny primery v jedné PCR reakci nevytvářely dimery, (3) lokusy s překrývajícím se rozsahem délek fragmentů byly označeny jinou fluorescenční barvou.

Postup

1) Připravíme PCR směs pro příslušný počet vzorků + negativní kontrola + 1. Pracujeme stále na ledu. Zkumavky s fluorescenčně značeným primerem obalujeme alobalem (chráníme před světlem). Pro reakci o objemu 15 µl je složení pro 1 vzorek následující:

PCR voda	3,3 µl
forward primer (2,5 pmol/µl, fluor. značený)	1,6 µl
reverse primer (2,5 pmol/µl)	1,6 µl
2× Plain PP Master Mix (Top-Bio).....	7,5 µl

2) Promícháme, krátce stočíme v centrifuze a po 14 µl rozpipetujeme do PCR zkumavek nebo stripů.

3) Přidáme 1 µl DNA, promícháme proklepnutím prstem, krátce stočíme na stolní centrifuze.

- 4) Spustíme odpovídající teplotní program. Po zahřátí bloku termocykleru na cca 80°C vložíme stripy do přístroje a dotáhneme jeho víko.

Příklad programu pro vzorky použité na praktiku (Euphrasia, primerové páry Ene1-Ene5):

1×	95°C	12 min	
35×	95°C	15 s	
	[T _a]°C	15 s	(teplota je specifiká pro daný primerový pár)
	72°C	15 s	
1×	72°C	10 min	
1×	15°C	hold	

- 5) Po proběhnutí reakce otestujeme úspěšnost amplifikace na běžném (1.2–1.5%) agarosovém gelu v TBE pufru.

B) Příprava na fragmentační analýzu

- 1) Do 0,2 ml eppendorfky nebo stripu smícháme produkty z jednoho původního vzorku značené různými fluorescenčními barvami, po 1 µl od každého. Promícháme, krátce stočíme na stolní centrifuze.

Jednotlivé barvy mohou mít různou průměrnou intenzitu fluorescence, pak je vhodné poměry ve směsi optimalizovat (např. 2 µl pro slaběji svítící barvu, příp. ubrat výrazně intenzivnější barvy).

- 2) Připravíme si mix pro patřičný počet vzorků + 1. Formamid je v laboratoři k dispozici v alikvotech pro přípravu 17 vzorků; pracujeme v digestoři, formamid je těkavý a jedovatý! Pro jeden vzorek:

Hi-Di formamid 10 µl
GeneScan 600LIZ Size standrad.....0,25 µl

- 3) Směs důkladně promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuze. Rozpipetujeme po 10,25 µl do označených 0,2 ml eppendorfek.
- 4) Přidáme 1 µl DNA (směsi PCR produktů), příp. jiné optimalizované množství. Promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuze. Takto připravené vzorky odneseme do laboratoře genomiky.

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Princip

Metoda využívá tzv. restrikčních endonukleáz (restriktáz), které specificky štěpí řetězec DNA v určité, tzv. cílové sekvenci. Postup se skládá z PCR amplifikace určitého úseku DNA a jeho štěpení vybranou restriktázou. Restriktivní fragmenty dělíme elektroforézou podle velikosti. Pokud PCR produkt obsahuje jedno štěpné místo, získáme dva kratší fragmenty, pokud je štěpných míst více, vzniká více fragmentů. Restriktivní místa mohou mutacemi zanikat i vznikat. Hledáme polymorfismus ve štěpných místech a ten pak interpretujeme jako genetickou podobnost studovaných organismů. PCR-RFLP se nejčastěji používá v případech, kdy se studované skupiny organismů („haplotypy“ v rámci druhu, blízké příbuzné druhy, apod.) liší přítomností restriktivního místa, ale jinak jsou sekvence v rámci skupiny ± homogenní. V takovém případě přítomnost restriktivního místa indikuje určitý typ sekvence, a zároveň je metoda technicky jednodušší, rychlejší a levnější než sekvenování. Předpoklad sekvenční homogenity je klíčový, protože mutace mimo sledované restriktivní místo při PCR-RFLP „nevidíme“.

A) PCR amplifikace

- Viz protokol pro PCR (podle studovaného úseku).
- Úspěšnost amplifikace ověříme na běžném 1–1,5% agarosovém gelu. Pro PCR-RFLP je důležité, aby byl na gelu pouze jeden specifický pruh (nespecifické produkty mohou ztěžovat interpretaci restriktivních fragmentů).

B) Restrikce

Obecné

- Při přípravě restrikce vycházíme z návodu výrobce daného restriktivního enzymu, ve kterém je vždy uvedeno doporučené složení restriktivní směsi. Každá restriktáza má svůj specifický restriktivní pufr, ve kterém vykazuje optimální aktivitu. Restriktivní pufr jsou dodávány s příslušným enzymem a zajišťují stálé a optimální pH během restrikce. Stálou optimální teplotu pro restriktivní reakci pak zajistíme v termostatu nebo termocykleru.
- Pracujeme stále na ledu, příp. s enzymy v mrazícím stojánku. Enzymy vyjímáme z chladného prostředí pouze na dobu nezbytně nutnou a ihned vracíme zpět.

Postup

- 1) Do sterilní eppendorfky připravíme restriktivní směs, tj. sterilní voda, restriktivní pufr a restriktivní enzym pro příslušný počet vzorků + 1.

Příklad restriktivní směsi a postupu pro vzorky použité na praktiku (Spergularia, chloroplastový úsek rpoC1, restrikce enzymem PdmI, firma Fermentas):

sterilní voda.....	2,88 µl
restr. pufr Tango (10× koncentrovaný).....	0,27 µl
PdmI (10 U / µl).....	0,135 µl

- 2) Promícháme proklepnutím prstem a krátce stočíme na stolní centrifuze.
- 3) Do jednotlivých PCR zkumavek nebo stripů rozpipetujeme po 3,285 µl.
- 4) Přidáme 0,9 µl PCR produktu, zkumavky promícháme proklepáním prstem, krátce stočíme na stolní centrifuze a vložíme na 8 h do termocykleru nastaveného na teplotu 37 °C.

C) Elektroforéza a *post-staining* barvení

Pro gely s dostatečně kvalitním rozlišením je nutné použít nerecyklovanou agarózu a *post-staining* (barvení gelu po dojetí elektroforézy).

Postup

- 1) Připravíme 1,2 % agarózový gel z nové, nerecyklované agarózy.
- 2) Smícháme 1,5 μ l modrého nanášecího pufru bez DNA barviva (označen „LD“) s 3 μ l PCR produktu, promícháme a nanese na gel.
- 4) Jako žebříček použijeme 4 μ l 100 bp ladderu bez DNA barviva („JK ladder“) na obou stranách gelu, před a za vzorky.
- 5) Napětí nastavíme na 80 V, po vyjetí z jamek zvýšíme na 120 V, elektroforézu necháme běžet cca 3 h.
- 6) Po skončení elektroforézy gel přemístíme do příslušné vaničky označené jako „GelRed *poststaining*“, zalijeme barvicím roztokem (1 \times GelRed v 1M NaCl) a necháme mírně třepat na třepačce 20–45 min.
- 7) Pořizujeme dvě fotky gelu, první na obvyklou expozici a druhou přeexponovanou (vyniknou i slabší, tj. méně amplifikované produkty).
- 8) Barvicí roztok slijeme zpět do lahvičky a uschováme pro další použití (lze použít několikrát opakovaně). Vaničky na *poststaining* opláchneme destilovanou vodou. Gely po vyfocení vyhodíme do směsného odpadu.

Uvedený postup ELFO umožňuje rozlišit pouze výrazně odlišné fragmenty, rozdíl musí být nejméně několik desítek bp. Neumožňuje také detekovat fragmenty kratší než cca 100 bp. Pro větší rozlišení je možné použít speciální agarózu (v ideálním případě se takto lze dostat na rozlišení cca 20 bp) nebo denaturační polyakrylamidové gely (v ideálním případě umožňují odlišit i jednotky bp, v naší laboratoři je ale prozatím nepoužíváme).

T-RFLP

Princip

Jedná se o metodu vhodnou zejména pro analýzu společenstev. Pomocí fluorescenčně značených primerů specifických pro danou studovanou skupinu organismů se naamplifikuje dostatečně variabilní úsek DNA. Produkt amplifikace je štěpen jedním nebo více restrikními enzymy. Výsledné délkově variabilní fragmenty (TRFs) jsou separovány a vizualizovány fragmentační analýzou, a hodnotí se jejich přítomnost / nepřítomnost. Při použití dvou značených primerů vznikají z každé dílčí molekuly DNA dva fragmenty.

A) PCR amplifikace

- Viz obecný protokol. Zkumavky s fluorescenčně značeným primerem obalujeme alobalem (chráníme před světlem). Je vhodné minimalizovat počet PCR cyklů.
- Úspěšnost amplifikace ověříme na běžném 1–1,5% agarózovém gelu.

B) Přečištění PCR produktu pomocí JETquick kitu (GENOMED)

GENOMED Jetquick PCR Purification Spin Kit využívá tzv. „spin column technique“, tj. kolonky s membránou, na kterou se váže DNA.

Obecné

- Před započítím práce zkontrolujeme přidání ethanolu (zaškrtnutí políčka na lahvičce) do pufru H2, příp. ethanol doplníme podle pokynů výrobce.
- Do 1,5 ml eppendorfky odpipetujeme potřebný objem TE pufru (viz bod 9) a předehejeme na 65°C v termobloku.
- Pokud jsou k dispozici, používáme recyklované kolonky (nižší cena, jsou uložené v označených sáčcích).

Postup

- 1) K PCR produktu přidáme roztok H1 v poměru 1:4 (např. k 10 µl PCR produktu přidáme 40 µl H1) a důkladně promícháme na vortexu.
- 2) Kolonku s membránou vložíme do označené 1,5 ml nebo 2 ml eppendorfky bez víčka (součást kitu), přepipetujeme do ní směs z předchozího bodu.
- 3) Centrifugujeme 1 minutu při 12 000 rpm.
- 4) Filtrát (to, co protéklo kolonkou) vylijeme do kádinky, DNA zůstala vázána na membráně.
- 5) Vložíme kolonku zpět do 2 ml eppendorfky a přidáme 200 µl roztoku H2.
Pro purifikaci PCR reakce o objemu >25 µl je vhodnější použít 500 µl roztoku H2.
- 6) Centrifugujeme 1 minutu při 12 000 rpm.
- 7) Filtrát vylijeme do kádinky (DNA vázaná na membráně je promyta).
- 8) Vložíme kolonku zpět do 2 ml eppendorfky a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách (13 800 rpm), abychom důkladně odstranili roztok H2 z kolonky.
- 9) Vložíme kolonku do nové označené 1,5 ml eppendorfky (není součástí kitu) a přímo na střed membrány pipetujeme 30 µl TE pufru předehejtého na 65°C.
- 10) Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
- 11) Centrifugujeme 2 min při 12 000 rpm (DNA je uvolněna z membrány do roztoku).
- 12) Kolonky z kitu po skončení práce nevyhazujeme, vložíme je do lahve s 1M HCl pro recyklaci.

C) Restrikce

Obecné

- Při přípravě restrikce vycházíme z návodu výrobce restrikčního enzymu, ve kterém je vždy uvedeno doporučené složení restrikční směsi.
- Pracujeme stále na ledu, příp. s enzymy v mrazícím stojánku. Enzymy vyjímáme z chladného prostředí pouze na dobu nezbytně nutnou a ihned vracíme zpět.

Postup

- 1) Do sterilní eppendorfky připravíme restrikční směs, promícháme proklepnutím prstem a krátce stočíme na stolní centrifuze.

Příklad restrikční směsi pro enzym AluI (firma Fermentas):

restr. pufr Tango (10× koncentrovaný)..... 0,5 µl
AluI (10 U / µl) 0,25 µl

- 2) Do PCR zkumavek nebo stripů pipetujeme 4,5 µl purifikovaného PCR produktu.
- 3) Přidáme ke vzorku 0,75 µl restrikční směsi (celkový objem reakce je 5,25 µl). Promícháme proklepnutím prstem a krátce stočíme na stolní centrifuze.
- 4) Zkumavky vložíme do cykleru a spustíme program („rflp37st“: 37°C – 4 h, 65°C – 20 min).

D) Příprava na fragmentační analýzu

- 1) Do 0,2 ml eppendorfky nebo stripu smícháme produkty z jednoho původního vzorku značené různými fluorescenčními barvami, po 1 µl od každého. Promícháme, krátce stočíme na stolní centrifuze.

Jednotlivé barvy mohou mít různou průměrnou intenzitu fluorescence, pak je vhodné poměry ve směsi optimalizovat (např. 2 µl pro slaběji svítící barvu, příp. ubrat výrazně intenzivnější barvy).

- 2) Připravíme si mix pro patřičný počet vzorků + 1. Formamid je v laboratoři k dispozici v alikvotech pro přípravu 17 vzorků; pracujeme v digestoři, formamid je těkavý a jedovatý! Pro jeden vzorek:

Hi-Di formamid 9,25 µl
GeneScan 600LIZ Size standrad.....0,25 µl

- 3) Směs důkladně promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuze. Rozpipetujeme po 9,5 µl do označených 0,2 ml eppendorfek.
- 4) Přidáme 0,5 µl DNA (směsi restrikčních produktů), příp. jiné optimalizované množství. Promícháme a krátce stočíme na stolní centrifuze. Takto připravené vzorky odneseme do laboratoře genomiky.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Princip

Jde o restriční metodu, která umožňuje analýzu polymorfismu v celkové genomové DNA a nevyžaduje znalosti o struktuře genomu. DNA je specificky štěpena dvěma různými restričními enzymy (restrikce; většina protokolů využívá restriktázy *MseI* a *EcoRI*). Na konce fragmentů jsou připojeny umělé úseky DNA o známe frekvence, tzv. adaptory (ligace). Pomocí primerů komplementárních k sekvenci adaptorů je pak z velkého množství vzniklých fragmentů pomocí dvou následných PCR (preselektivní a selektivní PCR amplifikace) namnožena jen část, teoreticky 1/4096, obvykle to znamená desítky až stovky fragmentů na jeden pár primerů. Fragmentsy jsou pak rozděleny podle délky. V současnosti se pro druhou PCR obvykle používají fluorescenčně značené primery, což umožňuje rozdělení fragmentů v automatickém sekvenátoru. Sleduje se přítomnost nebo nepřítomnost fragmentu určité délky (konkrétní délka se považuje za „lokus“, přítomnost / nepřítomnost pak za „alely“).

Metoda poskytuje dost vysokou míru variability na nízkých taxonomických úrovních (vnitrodruhová, blízce příbuzné druhy) a je dosti spolehlivá. Používá se zejména pro studium procesů v populacích, fylogeografii a odlišení blízkých taxonů. Nevýhodou je poměrně vysoká cena a náročnost metody na kvalitu a množství DNA a také dominantní charakter dat.

A) Protokol s využitím AFLP kitů od firmy Invitrogen

Obecné poznámky:

- Naše Laboratoř genomiky používá 16 kapilárový sekvenátor, proto musí být výsledný počet vzorků pro fragmentační analýzu v násobcích 16.
- Je možné analyzovat až 4 fluorescenční barvy najednou (za stejnou cenu), a to 6-FAM, VIC, NED a PET. Ke všem analýzám se přidává velikostní standard 600LIZ.
- Během celého postupu pracujeme stále na ledu. Enzymy vyndáváme z mrazáku až těsně před jejich použitím a ihned poté vracíme zpět.
- Fluorescenčně značené primery chráníme před světlem (zkumavky obalujeme alobalem a ihned po použití vracíme do mrazáku do tmy). Pro práci používáme alikvoty.

Postup

- 1) Pro restriční vyřídíme AFLP[®] Core Reagent Kit I. Připravíme si restriční směs pro patřičný počet vzorků + 1. Výsledný objem směsi je 2,5 µl na vzorek.

sterilní H₂O 1,1 µl
 5× Reaction buffer 1,0 µl
 EcoRI/MseI enzyme mixture 0,4 µl

- 2) Směs promícháme, krátce centrifugujeme a rozpipetujeme po 2,5 µl do PCR stripů nebo 0,2 ml PCR zkumavek.
- 3) Přidáme 2,5 µl DNA naředěné na koncentraci cca 100 ng/µl; výsledný objem 5 µl. Promícháme, krátce centrifugujeme na stolní centrifuze.

Uvedená koncentrace DNA platí pro pouze pro materiál použitý na praktiku. Je nutno optimalizovat, do reakce obvykle vstupuje 50–250 ng DNA.

- 4) Vložíme do termocyklu a inkubujeme 3 hodiny při teplotě 37°. Do termocyklu vložíme vždy i zbytek restriční směsi jako samostatný „vzorek“, slouží jako slepá kontrola.

- 5) Pro ligaci využijeme AFLP[®] Core Reagent Kit I. Připravíme si ligační směs pro patřičný počet vzorků + 1. Výsledný objem směsi je 5 µl na vzorek.
- Adaptor/Ligation Solution 4,8 µl
T4 DNA ligase 0,2 µl
- 6) Směs promícháme, krátce centrifugujeme a přidáme po 5 µl ke vzorkům po restrikci (včetně slepé kontroly); výsledný objem 10 µl.
- 7) Vložíme do termocykleru a spustíme program pro ligaci: 12 hodin při teplotě 37°.
- Je ideální, aby restrikční a legační krok na sebe bezprostředně navazovaly. kvůli úspoře času se snažíme ligaci spustit odpoledne a nechat proběhnout přes noc, aby bylo možné ráno pokračovat preselektivní amplifikací. Délku restrikce a ligace je někdy nutné optimalizovat pro konkrétní studovaný materiál.*
- 8) Po proběhnutí reakce otestujeme úspěšnost restrikce / ligace na 1,5 % agarosovém gelu (lze použít i recyklovaný). Nanášíme 2 µl směsi po ligaci spolu s 0,8 µl modrého nanášecího pufru („GelRed“) a 3 µl 100 bp ladderu. Na gelu by měl být vidět *smear* restrikčních fragmentů (zejména v oblasti 50–1000 bp) a neměly by zde výrazně svítit nenaligované adaptory. Na gel vždy nanášíme i slepou kontrolu, která by obsahovat pouze nevyužité adaptory.
- 9) Pro preselektivní amplifikaci využijeme AFLP[®] Pre-amp Primer Mix I (obsahuje primery a dNTP). Připravíme si směs pro patřičný počet vzorků + 1. Výsledný objem směsi je 4,6 µl na vzorek.
- PA mix 4 µl
PCR buffer (10×) 0,5 µl
DNA polymerasa (Sigma JumpStart REDTaq) (1 U/µl) 0,1 µl
- 10) Směs promícháme, krátce centrifugujeme, a rozpipetujeme po 4,6 µl do PCR stripů nebo 0,2 ml PCR zkumavek. Zbytek preamplifikační směsi použijeme jako slepou kontrolu.
- 11) Přidáme 0,4 µl DNA po ligaci; výsledný objem 5 µl.
- 12) Zbytek ligační reakce zamrazíme při -20°C pro případná opakování.
- 13) Vložíme do termocykleru a spustíme program pro preselektivní amplifikaci:
- | | | | |
|-----|------|--------|---------------|
| 1× | 72°C | 2 min | |
| 20× | 94°C | 1 s | |
| | 56°C | 30 s | |
| | 72°C | 2 min | ramping 2°C/s |
| 1× | 60°C | 30 min | |
| 1× | 10°C | hold | |
- 14) Směs po preselektivní amplifikaci naředíme 10× (2 µl preamplifikační směsi + 18 µl sterilní H₂O).
- 15) Úspěšnost preselektivní amplifikace ověříme na 1,5 % agarosovém gelu (lze použít i recyklovaný). Nanášíme 2 µl (neředěné) preamplifikační směsi spolu s 0,8 µl modrého nanášecího pufru („GelRed“) a 3 µl 100 bp ladderu. Na gelu by měl být vidět *smear* preamplifikačních fragmentů, na několika místech intenzivnější, slepá kontrola by měla být bez PCR produktů.

16) Připravíme si mix pro odpovídající počet vzorků + 1. Obvykle děláme pro každý vzorek 4 varianty, které se liší použitými primery (neznačený *MseI* a čtyři různé fluorescenčně značené *EcoRI*). Výsledný objem směsi je 7,5 µl na jeden vzorek v jedné variantě.

Sterilní H ₂ O	5,1 µl
PCR buffer (10x)	1 µl
dNTP (10 mM)	0,2 µl
<i>EcoRI</i> primer (1 pmol/µl)	0,5 µl
<i>MseI</i> primer (5 pmol/µl)	0,5 µl
DNA polymerasa (Sigma JumpStart REDTaq) (1 U/µl)	0,2 µl

17) Směs promícháme, krátce centrifugujeme a rozpipetujeme po 7,5 µl do PCR stripů nebo 0,2 ml PCR zkumavek. Nevyužitý zbytek každého mixu použijeme jako slepou kontrolu.

18) Přidáme 2,5 µl ředěné DNA po preselektivní amplifikaci, výsledný objem směsi 10 µl. Promícháme, krátce centrifugujeme.

19) Vložíme do cykleru a spustíme program pro selektivní amplifikaci:

1×	94°C	2 min	
	65°C	30 s	
	72°C	2 min s	ramping 2°C/s
8×	94°C	1 s	
	64-56°C	30 s	touch-down by 1°C
	72°C	2 min	ramping 2°C/s
23×	94°C	1 s	
	56°C	30 s	
	72°C	2 min	ramping 2°C/s
1×	60°C	30 min	
1×	10°C	hold	

20) Úspěšnost selektivní amplifikace ověříme na 1,5 % agarosovém gelu (lze použít i recyklovaný). Nanášíme 2 µl (neředěné) preamplifikační směsi spolu s 0,8 µl modrého nanášecího pufru („GelRed“) a 3 µl 100 bp ladderu. Na gelu by měl být vidět *smear* fragmentů, příp. několik intenzivnějších zón, slepá kontrola by měla být bez PCR produktů.

21) Pokud budeme ihned pokračovat přesrážením vzorku a přípravou pro fragmentární analýzu, přejdeme k následujícímu kroku (doporučeno). Pokud nelze ihned pokračovat, zamrazíme selektivní amplifikaci při -20°C.

22) Do 0,2 ml eppendorfky nebo stripu smícháme produkty z jednoho původního vzorku značené různými fluorescenčními barvami, po 1 µl od každého.

Jednotlivé barvy mohou mít různou průměrnou intenzitu fluorescence, pak je vhodné poměry ve směsi optimalizovat (např. 2 µl pro slaběji svítící barvu, příp. ubrat výrazně intenzivnější barvy).

23) Pokračujeme přesrážením vzorku octanem sodným (protokol B) a přípravou na fragmentační analýzu (C).

B) Přesrážení octanem sodným

Obecné poznámky:

- Pracujeme na ledu. Všechny centrifugační kroky probíhají při 4°C v předem vychlazené centrifuze.
- Přesrážení před fragmentační analýzou lze u některého materiálu vynechat, to je ale třeba vyzkoušet. Podle dosavadních zkušeností v naší laboratoři ale v případě AFLP bývají výsledky s přesrážením lepší.

Postup

- 1) Na stěnu 1,5 ml eppendorfky (do spodní části, ale ne zcela na dno) pipetujeme 1 µl 3M octanu sodného.
- 2) Do kapky octanu sodného přidáme 3 µl směsi DNA po selektivní amplifikaci.
- 3) Přidáme 25 µl 96% ethanolu (čistého, nedenaturovaného!).
- 4) Promícháme na vortexu, krátce stočíme na stolní centrifuze.
- 5) Necháme stát 20 min v mrazáku při -20°C.
- 6) Centrifigujeme 30 min při maximálních otáčkách (13800 rpm). Eppendorfky v centrifuze orientujeme do stejné pozice, abychom měli DNA usazenou vždy na stejném místě.
- 7) Pomalu a opatrně slijeme supernatant, DNA zůstává usazená na stěně eppendorfky.
 - ! *Při prudkém slití by mohlo dojít k odloupení usazené DNA a tedy ztrátě vzorku. Pracujeme proto pomalu a vyléváme opačnou stranou eppendorfky než na které je usazen vzorek. Totéž v bodě 10.*
- 8) Přidáme 100 µl 70% ethanolu.
- 9) Centrifigujeme 5 min při maximálních otáčkách (13800 rpm).
- 10) Pomalu a opatrně slijeme supernatant, DNA zůstává na stěně eppendorfky.
- 11) Otevřené eppendorfky necháme stát ve stojánku 5 min při laboratorní teplotě a následně dosušíme 10 min v termobloku při 65°C. Ve vzorcích nesmí zůstat žádný ethanol.
- 12) V tomto stavu lze vzorky skladovat až několik dnů v lednici při 4°C. Obvykle ale ihned pokračujeme přípravou na fragmentační analýzu (protokol C).

C) Příprava pro fragmentační analýzu

- 1) Připravíme si mix pro patřičný počet vzorků + 1. Formamid je v laboratoři k dispozici v alikvotech pro přípravu 17 vzorků; pozor, je těkavý a jedovatý! Pro jeden vzorek:
 - Hi-Di formamid 10,25 µl
 - GeneScan 600LIZ Size standrad.....0,25 µl
- 2) Směs rozpipetujeme po 10,5 µl do eppendorfek s přesráženými vzorky
- 3) Promícháme, krátce stočíme a přepipetujeme vzorky do označených 0,2 ml eppendorfek. Takto připravené vzorky odneseme do laboratoře genomiky

Při vynechání přesrážení rozpipetujeme směs rovnou po 10,5 µl do 0,2 ml eppendorfek a přidáme po 1 µl vzorku (směsi PCR produktů).

Isozymy (allozymy)

Princip

Analýza izozymů sleduje variabilitu na úrovni proteinů, konkrétně určitých enzymů, které jsme schopni specificky detekovat. Ačkoliv se v molekule proteinu díky degeneraci genetického kódu neprojeví všechny změny ve struktuře DNA, lze obvykle najít enzymy, které: (a) jsou u studovaných organismů v různých jedincích/populacích/taxonech zastoupeny různými formami, které se liší pohyblivostí při elektroforéze a (b) a tyto rozdíly jsou dědičné. K detekci využíváme tzv. histochemické barvení, při kterém nedetekujeme přímo molekuly proteinu, ale detekujeme projevy reakce katalyzované zkoumaným enzymem – v místě aktivity enzymu vzniká barevná zóna. Většina používaných enzymů patří mezi enzymy základního metabolismu, které jsou zastoupeny u široké škály organismů. Tyto enzymy (resp. geny je kódující) pod velkým selekčním tlakem (musí v organismu fungovat), proto lze předpokládat, že případné různé jejich formy enzymů jsou ± selekčně neutrální. To je ideální stav pro výpočet populačně-genetických parametrů, což je spolu s identifikací klonů základní použití této metody v botanice.

A) Extrakce vzorků

Odběr vzorků v terénu:

- Isozymy izolujeme z čerstvého živého materiálu, obvykle z listů (většinou několik málo cm²). Tkáň by měla být byla zdravá, bez parazitů, a v dobrém fyziologickém stavu (nezvadnutá, nepřemrzlá, apod.).
- Ihned po odběru ukládáme vzorky do plastických sáčků (zip-lock), podle potřeby navlhčíme, uchováváme pokud možno v chladu (přenosná lednice, termoska s ledem apod.) Vzorky co nejrychleji dopravíme do laboratoře k dalšímu zpracování

Obecné poznámky k izolaci:

- Izolačních pufrů (slouží ke stabilizaci pH a obvykle obsahují antioxidanty a další stabilizující látky) je mnoho, vhodný pufr je třeba pro daný materiál vyzkoušet. Předpisy pro 4 nejčastěji používané v naší laboratoři viz Roztoky a pufry, str. 57 .
- Většinou je vhodné přidat ke vzorku malé množství Dowex-Cl, optimální množství je třeba vyzkoušet (snižuje intenzitu pozadí na gelech, ale může snižovat i aktivitu enzymů).
- Předem si označíme čísla vzorků 1 sérii 1,5 ml eppendorfek a 3 série 0,5 ml eppendorfek.
- Izolace vyžaduje důkladné chlazení. Pracujeme na ledu, před začátkem izolace dáme vychladit centrifugu na 4°C a průběžně chladíme třecí misky a tloučky.

Postup:

- 1) Do vychlazené třecí misky v ledu vložíme cca 0,05 g rostlinné tkáně (obvykle několik málo cm² listu)
- 2) Přidáme 500 µl vychlazeného izolačního pufru (uchováváme v kádince v ledu) a případně špetku Dowex-Cl.
- 3) Tloučkem homogenizujeme rostlinný materiál, tuhé listy dopředu nastříháme na malé kousky.
- 4) Homogenát přepipetujeme (špičky s ustríženým koncem) do 1,5 ml eppendorfky.
- 5) Centrifugujeme v centrifuze vychlazené na 4°C, 10 minut při 13800 rpm.

- 6) Supernatant rozpipetujeme do 0,5 ml eppendorfek po 100 μ l, obvykle vychází 2 série přesně a třetí s proměnlivým objemem (zbytek).
- 7) Vzorky skladujeme v -80°C (v tomto stavu lze uchovávat rok i déle; pro krátkodobé skladování lze použít i -20°C).

B) Příprava aparatury a skel pro elektroforézu

obecné poznámky

! *Akrylamid je před zpolymerováním velmi jedovatý (neurotoxin). Při manipulaci s ním a s předměty, které s ním přišly do styku (skla, stojánek, apod.) dbáme zvýšené opatrnosti a pracujeme zásadně v rukavicích a plášti. Veškeré kontaminované předměty co nejdříve oplachujeme větším množstvím vody. Odpadní roztoky obsahující akrylamid (např. nezpolymerovaný zbytek roztoku pro přípravu gelu) musí být skladovány ve zvláštní láhvi a zlikvidovány jako nebezpečný odpad, nikdy je nevyléváme do běžného odpadu. Polyakrylamid je netoxický, ale protože polymerace nikdy neproběhne dokonale, mohou být na gelech i aparatuře být zbytky nezpolymerovaného akrylamidu a proto i se ztuhlými gely pracujeme zásadně v plášti a v rukavicích.*

- Aparatura v laboratoři (Hoefer 600SE) umožňuje používat najednou 1, 2 nebo 4 gely, standardně 28 jamek / gel.
- Standardně používáme diskontinuální gely složené ze spodního 8,16% separačního gelu a 4% zaostřovacího (koncentračního) gelu.
- Gely (nebo alespoň separační gel) je pro úsporu času doporučeno připravit odpoledne před analýzou a vychladit přes noc v lednici.

sestavení skel

- 1) Do nalévacího stojánku umístíme těsnicí vložky („gumovou“ stranou nahoru), stojánek umístíme do misky, která by zachytila akrylamid v případě netěsnosti.
- 2) Skla zkontrolujeme, pokud jsou znečištěná, omyjeme destilovanou vodou a lihem a necháme oschnout. Spacery a hřebeny omyjeme lihem, necháme uschnout.
- 3) Na kratší strany vnějšího skla (bez výřezu) položíme pár spacerů, na ně položíme vnitřní sklo (tenčí, s výřezem), na něj opět pár spacerů a na ně druhé vnější sklo.

Tento postup platí pro 4 gely, připravujeme 2 „sendviče“. Při analýze 2 gelů připravujeme rovněž 2 „sendviče“ (bez vnitřních skel), nikoliv jeden „sendvič“ pro dvojici gelů najednou. Při analýze 1 gelu nahrazujem v aparatuře druhý „sendvič“ skleněnou deskou, která je součástí vybavení.

- 4) Nasadíme na připravený „sendvič“ upínací nástavce a krajní šrouby lehce dotáhneme.
- 5) Zvedneme „sendvič“ do vertikální polohy, postavíme na spodní stranu, povolíme šrouby a srovnáme skla a spacery do krajních poloh. Lehce přitáhneme krajní šrouby, skla otočíme a postup opakujeme s horní hranou. Opakujeme tak dlouho, než jsou spacery zcela na kraji a spodní a horní hrany skel a spacerů zcela v rovině.

! *Důkladně zkontrolujeme, nepřesné sestavení skel by mohlo vést k netěsnosti aparatury a vytékání akrylamidu nebo elektrodového pufu.*

- 6) Přiměřeně dotáhneme boční šrouby a spodní hranu skel namažeme vazelínou (při rutinním zvládnutí postupu lze vynechat). Skla postavíme zpět do stojánku.
- 7) Do otvorů na stojánku vložíme utahovací kolíky, delším koncem dolů. Plynulým pohybem utáhneme oba kolíky najednou stejným směrem o 180° , skla se mírně zaboří do podložky.

příprava gelů

- 8) Na skla uděláme fixem značku 2,2 cm od horního okraje
 9) Do 1,5 ml eppendorfky si připravíme 10% roztok APS (ammonium persulfate), který nelze dlouhodobě skladovat. Vážíme na analytických vahách.

	<u>1 gel</u>	<u>2 gely</u>	<u>4 gely</u>
APS	0,022 g	0,033 g	0,067 g
destilovaná voda	200 µl	300 µl	600 µl

- 10) Do vysoké 250 ml kádinky připravíme následující směs podle množství gelů:

Pufr pro separační gel	6,75 ml	13,5 ml	27 ml
Zásobní roztok Akrylamid + BIS	4,75 ml	9,5 ml	19 ml
destilovaná voda	11,5 ml	23 ml	46 ml

Roztok akrylamidu přidáváme opatrně pipetou (např. 4× po 4.75 ml).

- 11) Opatrně mícháme kroužením (nedělat bubliny, kyslík brzdí polymeraci), dokud roztok nebude homogenní (nebudou v něm viditelná „vlákna“ akrylamidu).

- 12) Přidáme poslední dvě látky, které spouští a katalyzují polymeraci:

10% APS	108 µl	215 µl	430 µl
10% TEMED	108 µl	215 µl	430 µl

- 12) Opatrně promícháme a ihned naléváme gel po značku. Nabereme roztok do stříkačky, přiložíme na okraj skel a spustíme jednu větší kapku po spaceru. Až dosáhne dna skel, plynulým proudem naléváme roztok až po značku. Kontrolujeme, jestli nevznikají bubliny (příp. je vyženeme na hladinu a necháme prasknout).

- 13) Po nalití všech gelů ihned převrstvíme roztok akrylamidu destilovanou vodou. Nabereme vodu do 5 ml špičky a pomalu vypouštíme po jednom spaceru. Voda se nemísí s roztokem akrylamidu a vytváří „klín“ na hladině, přestaneme přidávat, až špička klínu dosáhne asi 1–2 cm od druhého spaceru.

- 14) Necháme gel i zbytek roztoku v kádince cca 1 hodinu polymerovat. Během této doby připravíme elektrodový pufr a aparaturu (viz níže)

- 15) Po zpolymerování gelu odsajeme injekční stříkačkou vodu nad ním. Obsahuje i zbytky nezpolymerovaného akrylamidu, zacházíme s ní jako s nebezpečným odpadem a sléváme do zvláštní láhve! Stejně zacházíme s nezpolymerovaným zbytkem v kádince!

- 16) Do vysoké 100 ml kádinky připravíme následující směs pro koncentrační gel:

	<u>1 gel</u>	<u>2 gely</u>	<u>4 gely</u>
Pufr pro koncentrační gel	4,5 ml	9 ml	18 ml
Zásobní roztok akrylamid + BIS	0,5 ml	1 ml	2 ml

- 17) Opatrně promícháme kroužením, přidáme poslední dvě látky, které katalyzují polymeraci:

10% APS	30 µl	60 µl	120 µl
10% TEMED	30 µl	60 µl	120 µl

- 18) Opatrně promícháme a ihned naléváme gel do úrovně výřezů ve vnitřním skle (resp. asi 5 mm pod okraj skel při nalévání jediného gelu v sendviči)

- 19) Mezi skla zastrčíme hřebeny. Při použití čtyř gelů srovnáme hřebeny tak, aby jamky v rámci jednoho sendviče byly přesně za sebou (usnadní to nanášení vzorků). Zkontrolujeme, jestli nezůstaly bubliny pod zuby hřebenu.

- 20) Necháme gel a zbytek v kádince nejméně 1 hodinu polymerovat. Během této doby dokončíme přípravu aparatur a pufrů.
- 21) Po zpolymerování gelu opatrně vyjmeme hřebínky (pozor na poškození jamek!). Zbytky roztoku co nejrychleji odsajeme injekční stříkačkou. Roztok obsahuje zbytky neopolymerovaného akrylamidu, zacházíme s ním jako s nebezpečným odpadem, vypouštíme do kádinky a slejeme do zvláštní láhve!
- 22) Jamky ihned naplníme elektrodovým pufrém.
- 23) Injekční stříkačkou vysajeme pufr z jamek (nyní již s ním zacházíme jako s běžným odpadem) a jamky znovu naplníme elektrodovým pufrém.
- 24) Pokud ihned nenanášíme vzorky, překryjeme horní hranu gelů alobalem, aby nevysychaly, a dáme chladit do lednice.

příprava aparatury

- 25) Připravíme elektrodový pufr (viz Roztoky a pufrы, str. 58)
- 26) Naplníme spodní vanu elektroforézy:

elektrodový pufr	2,4 l
destilovaná H ₂ O.....	1,8 l
- 27) Vanu elektroforézy umístíme do větší plastové vany a vložíme do lednice pro elektroforézu. Do vany zasuneme skleněný výměník tepla a vložíme magnerické míchadlo. Necháme vychladit přes noc (v lednici, při vypnutém dodatečném chlazení).

C) Nanášení vzorků a elektroforéza

- 1) Zapneme vnější chlazení (spínač na boku pro chlazení + zapojení kabelu pumpy do elektrické sítě) a zapneme magnetické míchadlo.
- 2) Aparaturu elektroforézy v lednici obsypeme ledem.
- 3) Dáme rozmrazit vzorky (trvá asi 15–20 minut), rozmrazujeme pomalu, volně položené na ledu, občas promícháme. Po rozmrznutí uchováváme na ledu!
- 4) Těsně před nanášením vzorků vyndáme z lednice stojánek s gely, doplníme do jamek vychlazený elektrodový pufr až po okraj, obložíme chladítky.
- 5) Mikrostríkačkou („Hamiltonkou“) nanášíme 10 μ l vzorku (příp. optimalizovaný objem). Mezi vzorky mikrostríkačku propláchneme destilovanou vodou z kádinky.

! *Pracujeme co nejrychleji, aby se vzorky co nejméně ohřály. Obvykle nanášíme na všechny gely stejné vzorky ve stejném pořadí – nabere tedy objem vzorku najednou pro všechny gely (obvykle 40 μ l) a nanese postupně na všechny gely.*
- 6) Do výřezů na spodní straně horní vany elektroforézy vložíme těsnící vložky. Výřezy nejprve postříkáme malým množstvím destilované vody, kapky rozetřeme do plochy a na ně těsnění „přilepíme“.
- 7) Na horní hranu skel nasadíme horní vanu elektroforézy. Povolíme šrouby držící gely ve stojánku (plynulým pohybem k sobě oba šrouby najednou o 180°; delší konec bude nakonec mířit dolů) a vyjmeme je z otvorů. Šrouby vložíme do otvorů v horní vaně delším koncem nahoru a přitáhneme plynulým pohybem o 180° (delší konce dolů).
- 8) Horní vanu s gely vložíme do spodní vany, výměník tepla zůstane mezi gely.
- 9) Nalijeme elektrodový pufr do horní vany. Pufr naléváme nejprve do středu vany a pomalu zaplavujeme šterbiny spojující vanu s gely. Pufr naléváme do výšky asi 1 cm nad drátek (elektrodu) vprostřed vany.

- 10) Vanu přikryjeme víkem, otvory ve víku musí dosednout přesně na konce elektrod.
- 11) Připojíme elektroforézu na zdroj elektrického proudu, dbáme na správnou polaritu.
- 12) Zapneme elektroforézu na konstantní proud 80 mA, po ustálení (cca po 1 min.) zaznamenáme do protokolu hodnotu proudu, napětí a výkonu.
- 13) Pravidelně kontrolujeme průběh elektroforézy (čelo, množství pufru v horní vaně).
- 14) V průběhu elektroforézy si připravíme pufrы a barvicí roztoky pro detekci izozymů.
- 15) Ve chvíli, kdy zbarvené čelo elektroforézy dosáhne asi 0,5–1 cm od spodního okraje (asi 4:30–5 hod.), vypneme zdroj elektriny a odpojíme elektroforézu od zdroje. Do protokolu zaznamenáme celkovou dobu elektroforézy a koncové hodnoty proudu, napětí a výkonu.

D) Detekce izozymů (barvení)

obecné poznámky

- Některé chemikálie používané k histochemickému barvení jsou jedovaté, pracujeme zásadně v rukavicích a plášti a přiměřeně opatrně
- Barvení je poměrně citlivé na dodržení reakčních podmínek. Pufrы proto používáme čerstvé a kontrolujeme pH, chemikálie vážíme na analytických vahách.
- Část chemikálií se uchovává při snížené teplotě (4°C nebo -20°C). Tyto chemikálie vyndáme dostatečně dlouho před vážením a před otevřením necháme vytemperovat na pokojovou teplotu (aby se v nic nesrážela vzdušná vlhkost a neznehodnotily se)!
- Barviva a meziproductы barvicích reakcí jsou většinou citlivé na světlo. Všechny zásobní chemikálie vystavujeme světlu co nejméně, ihned po vážení je uklízíme zpět do skříně nebo lednice. Navážené směsi uchováváme v kádince obalené alobalem, ihned po vážení je odneseme do temné komory. S hotovými roztoky manipulujeme vždy po tmě.

příprava barvení

- 1) V průběhu elektroforézy připravíme barvicí roztoky.
- 2) Na analytických vahách navážíme do 100 ml kádinek obalených alobalem látky podle receptů pro jednotlivé enzymové systémy (viz str. 42. Pokud je součástí postupu přidání enzymu (glucose-6-phosphate dehydrogenase), nepřidáváme jej nikdy během vážení, ale až do roztoku těsně před aplikací roztoku na gel. Navážené směsi skladujeme v temné komoře.
- 3) Odměříme si příslušné objemy pufrů. Používáme připravené zásobní roztoky dané koncentrace, kde je potřeba, upravíme pH.
- 4) Asi 10 minut před koncem elektroforézy důkladně rozmícháme navážená barviva v příslušných pufrách (někdy to několik minut trvá, např. pro Fast Black K salt). Pracujeme ve tmě, po rozpuštění pečlivě zakryjeme alobalem a uschováme do skřínky, v místnosti nerozsvěčíme a dveře otvíráme na co nejkratší dobu.
- 5) Těsně před skončením elektroforézy připravíme barvicí misky, do kterých dáme vychlazenou destilovanou vodu nebo vychlazený pufr pro opláchnutí gelů (podle enzymového systému).

vyjmutí gelů

- 6) Vytáhneme gely z aparatury, pufr z horní vany vylijeme, gely umístíme do stojánku a odstraníme horní vanu.
- 7) Ze sendviče sundáme upínací nástavce.

- 8) Tenkým koncem plastové špachtle na gely nebo nožem zatlačíme na spodní stranu spacerů horního z dvojice gelů a postupně je vysuneme.
- 9) Širší konec plastové špachtle vložíme asi do poloviny boční strany skel do mezery po spaceru, druhou stranu skla přidržujeme prsty a opatrně zapáčíme, dokud se skla neodlepí od sebe. Pokud gel zůstane přilepený na horním skle, rychle sklo otočíme gelem nahoru a položíme na stůl.
- 10) Odřízneme koncentrační gel a šikmým ukrojením pravého spodního rohu označíme pozici posledního vzorku, tj. pravý dolní roh (pozor na opačnou orientaci gelu, pokud zůstal na horním skle!), příp. seřízneme horní nebo dolní okraj gelu (pokud je vyzkoušeno, že v této oblasti se studované enzymy nebarví).
- 11) Navlhčíme si rukavice, nožem nebo špachtlí opatrně nadzvedneme jeden okraj gelu, uchopíme do prstů a plynulým pohybem zvedneme ze skla a přeneseme do připravené barvicí misky s vychlazenou vodou nebo pufrem.
 - ! *Je důležité pracovat s vlhkými rukavicemi, na suché se gel lepí a trhá se. Pracujeme pomalu a plynule, aby se gel nepotrhal. Při roztržení přeneseme postupně všechny části a rozprostřeme do misky.*
- 12) Podobně pokračujeme se spodním gelem v sendviči.

barvení

- 13) Gel v barvicí misce krátce oplachujeme (během práce s dalšími gely). Poté slijeme vodu nebo pufr, gel v misce přeneseme do temné komory a po tmě nalijeme do misky barvicí roztok. Pokud je součástí postupu přidání enzymu, přidáme jej do barvicího roztoku těsně před nalitím roztoku na gel.
- 14) Promícháme a vložíme do termostatu nastaveného na 35°C.
- 15) Podobně pokračujeme s dalšími gely.
- 16) Po tmě průběžně promícháváme barvicí roztoky, příp. přidáváme substrát (pokud to postup vyžaduje), za minimálního osvětlení kontrolujeme stav barvení
 - ! *Délka barvení je specifická pro každý enzymový systém a organismus. Nejkratší doby se pohybují okolo 20 minut, nejdelší i několik hodin (nebo přes noc). Je třeba vyvarovat se zbytečně dlouhého barvení – může dojít k přebarvení, kdy jsou proužky příliš intenzivní, široké a neostré nebo se může zvýšit zabarvení pozadí gelu a proužky jsou pak málo zřetelné.*
- 17) Po skončení barvení slijeme barvicí roztok do k tomu určené nádoby. Gel oplachujeme v destilované vodě nebo ve fixačním roztoku. Pokud používáme fixační roztok, po skončení fixace jej vylejeme do nádoby na nebezpečný odpad, nikdy do běžného odpadu!
- 18) Gel necháme oplachovat v destilované vodě, kterou podle potřeby měníme, dokud se z gelu nevymyjí zbytky barvicího (příp. fixačního) roztoku (minimálně 2 hodiny, ideálně přes noc).

E) Vyšení a uchovávání gelů

- 1) Do plastové vany nalejeme 1-2 cm vody.
- 2) Do misky s vodovodní vodou vložíme patřičný počet listů celofánu, 2 na každý gel. Celofán necháme minimálně několik minut oplachovat. Alternativně lze oplachovat jednotlivé listy pod pomalu tekoucí vodou v umyvadle.
- 3) Do vany z vodou vložíme jeden plastový rámeček.
- 4) Rozprostřeme list celofánu na rámeček tak, aby pod ním ani nad ním nezbyly žádné bubliny (případné bubliny vyženeme na hladinu a necháme prasknout).
- 5) Na celofán položíme fixovaný a opláchnutý gel, který předtím případně ještě upravíme (seříznutí prázdných okrajů apod.).
- 6) Druhý list celofánu a opatrně přiložíme na spodní celofán a gel. Mezi oběma vrstvami celofánu ani okolo gelu nesmí zůstat žádné bubliny
- 7) Přiložíme druhý plastový rámeček.
- 8) Srovnáme gel do středu rámečků a obě vrstvy celofánu tak, aby vyčnívaly z rámečků na všechny strany přibližně stejně.
- 9) Ohneme obě vrstvy celofánu přes jednu delší stranu horního rámečku, vyženeme bubliny (mohly by při vysychání potřhat gel) a přichytíme celofán k rámečkům kolíčky na prádlo. Napneme celofán a pokračujeme s dalšími dvěma stranami.
- 10) Srovnáme gel do středu rámečků, podepřeme jej prsty a zvedneme rámečky tak, aby poslední volná strana zůstala dole. Vypustíme přebytečnou vodu. Vratíme rámečky zpět do misky a přichytíme kolíčky i poslední stranu.
- 11) K rámečkům připneme popisek (enzymový systém, datum zpracování) a necháme gel vyschnout. Při použití tenkých rámečků je ještě musíme po asi 30 min. až 1 hodině přepnout na pevnou podložku, aby je vysychající celofán nezkroutil.
- 12) Po cca 2 dnech můžeme vysušený gel vyjmout z rámečků. Ostříhneme celofán tak, aby zbyl okolo gelu asi 1 cm široký pruh, na který napíšeme čísla vzorků a studovaný druh, datum a enzymový systém.
- 13) Gel necháme několik dnů lisovat. Gely dále uchováváme v suchu a zbytečně nevystavujeme světlu (pokud s gelem zrovna nepracujeme, uchováváme jej v neprůhledných deskách ve tmě). Takto vysušené gely lze dlouhodobě skladovat.

F) Jednotlivé enzymové systémy

V této části jsou uvedeny detaily o jednotlivých enzymových systémech, které jsme schopni v naší laboratoři barvit, a návody na barvení. Uvádíme (pokud jsou informace v literatuře dostupné):

- zkratku enzymu a název (v angličtině, české názvy jsou analogické)
- oddělené pomlčkami: E.C. číslo, kvarterní strukturu, lokalizaci v buňce (c – cytoplasma, m – mitochondrie, p – plastidy) a počet lokusů
- praktické poznámky, upozornění na možné komplikace, apod.
- složení barvicích roztoků (názvy chemikálií z praktických důvodů anglicky); návody na puřry viz Roztoky a puřry, str. 59.
- informace k barvení (odchylky od standardního postupu, apod.)

ACP – acid phosphatase

E.C. 3.1.3.2 – monomer, dimer – c, m, p – 1 až 4

<u>0,05M sodium acetate buffer, pH = 5.0</u>	<u>30 ml</u> (+ asi <u>50 ml</u> na oplachování)
1-naphthylphosphate	50 mg
Fast Black K salt	5 mg

Po skončení elektroforézy neoplachujeme kvůli pH v destilované vodě, ale v předem vychlazeném pufru (je proto třeba proto připravit asi 100 ml pufru).

ADH – alcohol dehydrogenase

E.C. 1.1.1.1 – dimer – c – 1 až 3

často variabilní; dosti citlivý na teplotu; někdy se na gelu negativně barví také SOD

Roztok A:

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH = 7.5</u>	<u>40 ml</u>
NAD ⁺	15 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg

Roztok B:

<u>ethanol (čistý)</u>	<u>10 ml</u>
------------------------	--------------

Přidat ke gelu barvicí roztok A, inkubovat v termostatu, po 2–3 minutách přidat (ve tmě!) ethanol. V případě, že se gel barví slabě, přidávat další dávky ethanolu vždy po cca 1 hodině; možné je i prodloužit úvodní inkubaci bez ethanolu až na 10 minut.

AAT – aspartate aminotransferase (= GOT – glutamate oxalacetate transaminase)

E.C. 2.6.1.1 – dimer – c, m, p – 1 až 4

často variabilní; častý výskyt sekundárních proužků, které mohou komplikovat alelické vyhodnocení; poměrně citlivý na teplotu

Roztok A:

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH = 8.4</u>	<u>20 ml</u>
aspartic acid	240 mg
α -ketoglutaric acid	40 mg

Roztok B:

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH = 8.4</u>	<u>20 ml</u>
pyrodoxal-5-phosphate	25 mg
Fast Blue BB salt	50 mg
Fast Violet B salt	50 mg

Roztok A připravovat (na světle) min. 15 minut předem, při rozpouštění nutno zahřát na cca 50°C, poté nechat zchladnout na pokojovou teplotu. Roztoky A a B smícháme těsně před inkubací ve tmě (!) a ihned nalijeme na gel. Po inkubaci slijeme barvicí směs, krátce gel opláchneme destilovanou dobou a fixujeme fixačním roztokem. Dobu fixace je nutno vyzkoušet, u některého materiálu možno přes noc, někdy ale začínají proužky po určité době (někdy jen 15 min.) slábnout, v té chvíli je nutno fixaci ukončit. Po skončení fixace slijeme fixační roztok (obsahuje methanol – nebezpečný odpad!) a gel oplachujeme v destilované vodě, průběžně měníme (dokud je z gelu zřetelně cítit kys. octová).

DIA – diaphorase

E.C. 1.6.-.- – monomer, dimer, tetramer – c, m – 1 až 4

barví se většinou poměrně rychle, pozor na přebarvení; obvykle alespoň jeden dobře čitelný monomerní lokus + nějaké další, čtení ale někdy komplikováno sekundárními pruhy

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH = 8.0</u>	<u>50 ml</u>
NADH (reduced)	13 mg
MTT	5 mg
2,6 dichlorindophenol	2 mg (sodium salt hydrate)

ENP – endopeptidase

E.C. 3.4.23.6 – monomer – ? – 1

barví se většinou dosti slabě

<u>0,2M Tris–maleic acid buffer, pH = 5.5</u>	<u>50 ml (+ asi 50 ml na oplachování)</u>
BANA (β -N-benzoyl-DL-arginine- α -naphthylamide.HCl)	25 mg rozp. v 2 ml N,N'-dimethylformamidu
Fast Black K salt	20 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	50 mg

Po skončení elektroforézy neoplachujeme kvůli pH v destilované vodě, ale v předem vychlazeném pufru (je proto třeba proto připravit asi 100 ml pufru).

EST – esterases

E.C. 3.1.1.- – monomer, dimer – c – 2 až 10

poměrně nespecifické barvení, vždy více lokusů; dosti variabilní, vhodný např. pro identifikaci klonů, ale alelická interpretace většinou obtížná (prolínání lokusů, apod.); poměrně citlivý na teplotu

<u>Esterase buffer, pH = 6.45</u>	<u>60 ml (+ asi 50 ml na oplachování)</u>
1-naphthyl acetate	25 mg předem rozpustit v 2,5 ml 50% acetonu
2-naphthyl phosphate	25 mg předem rozpustit v 2,5 ml 50% acetonu
Fast Blue BB Salt	50 mg

Gel po skončení elektroforézy neoplachujeme v dest. vodě, ale v esterarovém pufru (kvůli pH), je tedy potřeba připravit min. 100 ml pufru.

G6PDH (= G6PD) – glucose-6-phosphate dehydrogenase

E.C. 1.1.1.49 – dimer – c, p – 2

někdy poměrně rychlé barvení, proto pozor na přebarvení

<u>0,05M Tris–HCl buffer, pH = 8,0</u>	<u>50 ml</u>
glucose-6-phosphate	50 mg (disodium salt)
MgCl ₂ .6H ₂ O	50 mg
MTT	10 mg (možno nahradit NBT)
NADP ⁺	6 mg
PMS	2 mg

GLU – β -D-glucosidase (= β -D-glucoside glucohydrolase)

E.C. 3.2.1.21 – dimer – c – 1

<u>0,05M potassium phosphate buff., pH=6,5</u>	<u>50 ml</u>	(+ asi <u>50 ml</u> na oplachování)
6-bromo-2-naphthyl- β -D-glucoside	50 mg	(rozpustit v 5 ml N,N'-dimethylformamidu)
PVP-40	1 g	
Fast Blue BB salt	50 mg	

Po skončení elektroforézy neoplachujeme kvůli pH v destilované vodě, ale v předem vychlazeném pufru (je proto třeba proto připravit asi 100 ml pufru). Inkubace v termostatu 60 minut a potom při pokojové teplotě přes noc (stále ve tmě!).

GDH – glutamate dehydrogenase

E.C. 1.4.1.2 – hexamer, monomer (?) – c – 1

<u>0,05M Tris-HCl buffer, pH=8,0</u>	<u>50 ml</u>
Na-glutamate	200 mg
CaCl ₂ (anhydrous)	50 mg
NAD ⁺	10 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg

HEX – hexokinase (= glucokinase)

E.C. 2.7.1.1 – monomer – c, m, p – 2 až 3

<u>0,1M Tris-HCl buffer, pH=7,1</u>	<u>50 ml</u>
glucose	45 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	50 mg
ATP (disodium salt)	12,5 mg
NADP ⁺	12,5 mg
NBT	10 mg
PMS	1,5 mg
glucose-6-phosphate dehydrogenase	40 μ l (= 40 U, zásobní roztok 1 U / μ l)

Dehydrogenasu přidáváme až jako poslední těsně do již hotového roztoku před aplikací na gel, promícháme. Existují více alternativních barvení (vyšší pH, náhrada některých složek).

IDH – isocitrate dehydrogenase

E.C. 1.1.1.42 – dimer – c – 1

<u>0,1M Tris-HCl buffer, pH=8,0</u>	<u>50 ml</u>
isocitric acid	50 mg (trisodium salt)
MgCl ₂ .6H ₂ O	80 mg
NADP ⁺	10 mg
MTT	8 mg
NBT	8 mg
PMS	2 mg

LAP – leucine aminopeptidase (= AMP – aminopeptidase)

E.C. 3.4.11.- – monomer – c – 2 až 3

obvykle dosti variabilní; velmi citlivý na teplotu a kvalitu vzorku; obvykle se barví slabě

Roztok A:

<u>0,2M Tris–maleate buffer, pH = 6.0</u>	<u>30 ml</u>	(+ asi 50 ml na oplachování)
MgCl ₂ .6H ₂ O	60 mg	
L-leucyl-β-naphthylamide hydrochloride	35 mg	rozpustit v 2,5 ml 50% acetonu, ve tmě

Roztok B:

<u>0,2M Tris–maleate buffer, pH = 6.0</u>	<u>30 ml</u>
Fast Black K salt	25 mg

Gel po skončení elektroforézy neoplachujeme v dest. vodě, ale v pufru (kvůli pH), je tedy potřeba připravit min. 100 ml pufru. Gel inkubujeme v termostatu nejprve pouze v roztoku A, po 10 min. přidáme roztok B.

MDH – malate dehydrogenase

E.C. 1.1.1.37 – dimer – c, m – 3

Roztok A:

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH=7,5</u>	<u>20 ml</u>	
malic acid	150 mg	po rozpuštění upravit pH pomocí Na ₂ CO ₃ na 7,5

Roztok B:

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH=7,5</u>	<u>30 ml</u>	
NAD ⁺	15 mg	
NBT	15 mg	možno nahradit 10 mg MTT
PMS	2 mg	

Smísíme roztoky a aplikujeme na gel..

ME – malic enzyme

E.C. 1.1.1.40 – tetramer – c – 1

<u>0,05M Tris–HCl buffer, pH=8,0</u>	<u>50 ml</u>
malic acid	150 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	50 mg
NADP ⁺	5 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg

NADHDH (= NDH) – NADH dehydrogenase

E.C. 1.6.99.- – monomer, dimer, tetramer (?) – c, m, p – 1-4 (?)

většinou je tento název používán i pro DIA, resp. nejsou oba enzymové systémy odlišovány (katalyzují téměř totéž, někdy se oběma barvenímí barví stejné enzymy, ale někdy ne)

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH=8,4</u>	<u>30 ml</u>	
menadion	15 mg	rozpustit v 2,5 ml 50% acetonu
NADH (reduced)	17,5 mg	
MTT	20 mg	

PRX – peroxidase

E.C. 1.11.1.7 – monomer – c – 2-13

<u>0,05M sodium acetate buffer, pH=5,0</u>	<u>50 ml</u> (+ asi <u>50 ml</u> na oplachování)
CaCl ₂	11 mg (anhydrous)
3% H ₂ O ₂	250 µl
3-amino-9-ethyl carbazole	25 mg rozpustit v 5 ml N,N'-dimethylformamidu

Gel po skončení elektroforézy neoplachujeme v dest. vodě, ale v pufru, je tedy potřeba připravit min. 100 ml pufru. Inkubace v lednici. Fixace proužků ve fixačním roztoku.

PGI – phosphoglucoisomerase (= GPI – glucosephosphate isomerase, phosphohexose isomerase)

E.C. 5.1.3.9 – dimer – c, p – 2

někdy se spolu s PGI barví další enzymy, které následují v kaskádě za ním (6PGDH nebo G6PDH), ale interpretace je možná, pokud se lokusy nepřekrývají

<u>0,05M Tris–HCl buffer, pH=8,0</u>	<u>50 ml</u>
fructose-6-phosphate	20 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	24 mg
NADP ⁺	10 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg
glucose-6-phosphate dehydrogenase	7 µl (= 7 U, zásobní roztok 1 U / µl)

Dehydrogenasu přidáváme až jako poslední těsně do již hotového roztoku před aplikací na gel, promícháme..

PGM – phosphoglucomutase

E.C. 2.7.5.1 – monomer – c, p – 2

někdy se spolu s PGM barví další enzymy (které následují v kaskádě za ním, 6PGDH nebo G6PDH), ale interpretace je možná, pokud se lokusy nepřekrývají; proužky světla modré a obvykle „rozmázlé“

<u>0,05M Tris–HCl buffer, pH=8,5</u>	<u>50 ml</u>
glucose-1-phosphate	50 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	24 mg
NADP ⁺	10 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg
glucose-6-phosphate dehydrogenase	7 µl (= 7 U, zásobní roztok 1 U / µl)

Dehydrogenasu přidáváme až jako poslední těsně do již hotového roztoku před aplikací na gel, promícháme.

6-PGDH (= 6-PGD, PGD) – 6-phosphogluconate dehydrogenase

E.C. 1.1.1.44 – dimer – c, p – 2

obvykle se barví rychle (pozor na přebarvení); málo citlivý na teplotu; někdy se zároveň negativně barví SOD

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH=8,4</u>	<u>30 ml</u>
6-phosphogluconic acid	10 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	30 mg
NADP ⁺	5 mg
MTT	5 mg
PMS	1 mg

SKDH (= SKD) – shikimate dehydrogenase

E.C. 1.1.1.25 – monomer – c, p – 1,2

obvykle se barví rychle (pozor na přebarvení); málo citlivý na teplotu; někdy se zároveň negativně barví SOD; poměrně často vytváří sekundární proužky

<u>0,1M Tris–HCl buffer, pH=8,4</u>	<u>30 ml</u>
shikimic acid	30 mg
NADP ⁺	5 mg
MTT	6 mg
PMS	1 mg

SOD – superoxide dismutase (= TO – tetrazolium oxidase)

E.C. 1.15.1.1 – dimer, tetramer – c, p – 2 až 3

negativní barvení; málo citlivý na teplotu

<u>0,05M Tris–HCl buffer, pH=8,2</u>	<u>50 ml</u>
NBT	5 mg
EDTA	4,5 mg
riboflavine	1,5 mg

Inkubace ve tmě při 35°C po dobu 20 min a potom na světle (ideálně pod lampou) za laboratorní teploty až do objevení světlých proužků na tmavém pozadí. Nenechávat na světle zbytečně dlouho, po čase (třeba vyzkoušet) proužky začínají slábnout (pozadí se barví i do nich).

Obsluha přístrojů

Měření koncentrace DNA pomocí spektrofotometru Biowave II

ovládání přístroje

- Přístroj se zapíná/vypíná černým tlačítkem vlevo na přední straně přístroje.
- K pohybu po displeji a výběru požadované volby slouží šipkové klávesy.
- Číselná tlačítka vpravo na přístroji slouží k psaní textu a čísel; opakovaným stiskem se přepíná mezi malými a velkými písmeny; klávesa 1 slouží k vkládání mezery; klávesa „C“ = backspace.
- Červené tlačítko (*Escape/Cancel*) slouží k návratu do předchozího kroku nebo zastavení měření.
- Modré tlačítko (*0A/100%T*) slouží k nastavení referenčního vzorku (blank).
- Zelené tlačítko (*Enter*) slouží k potvrzení výběru a k provedení měření

postup měření

- 1) Pro měření koncentrace DNA zvolíme stisknutím příslušného čísla funkci „Life Science“ → „Nucleic Acid“ → „DNA“
- 2) DNA měříme zředěnou (koncentrace by mohla být mimo škálu přístroje a hlavně – nemusíme svojí DNA plýtvat); minimální celkový objem roztoku v kyvetě je 70 μ l
- 3) Zadáme ředění vzorku („Dilution Factor“), tj. podíl objem neředěné DNA / celkový objem, např. pro časté ředění 5 μ l DNA + 65 μ l vody = 70 μ l celkem je ředící faktor 14 (=70/5); zvolíme jednotky (ng/ μ l) a potvrdíme nastavení (ostatní parametry necháme v původním nastavení)
- 4) Připravíme si referenční vzorek (blank). Bude jím buď voda nebo roztok, ve kterém je DNA skladována (Elution Buffer D z kitu, TE pufr, apod.). Ve druhém případě tento roztok ředíme vodou stejným způsobem jako měřenou DNA.
- 5) Vložíme kyvetu s referenčním vzorkem a stiskneme modré tlačítko pro nastavení blanku, přístroj ukáže nulovou absorbanci
- 6) Kyvetu několikrát vypláchneme destilovanou vodou ze stříčky, kapky vody z kyvety vyklepeme na buničinu, příp. vysajeme zbytek vody ze dna kyvety pipetou. Kyvetu opakovaně proplachujeme také mezi jednotlivými vzorky.
- 7) Do kyvety pipetujeme zvolené množství vody a DNA, důkladně promícháme pipetováním, vložíme kyvetu se vzorkem do přístroje a stiskneme zelené tlačítko pro měření; přístroj ukáže vypočítanou koncentraci našeho originálního vzorku DNA (nikoliv koncentraci v kyvetě!)

! *Je nutné dodržovat stále stejnou orientaci kyvety, jako byla při měření referenčního vzorku. Obrácení o 180° dává odlišné výsledky. Jedna ze stran kyvety je proto označena šipkou.*
- 8) Zaznamenané hodnoty koncentrace DNA, změřených absorbancí a jejich poměrů vypovídajících o čistotě DNA (viz str. 7).
- 9) Po skončení měření přístroj vypneme. Kyvetu necháme odmočit v jarové vodě, vypláchneme destilovanou vodou a necháme vyschnout na kousku buničiny

Zacházení s gradientovým termocyclerem TC-XP Bioerg

ovládání přístroje

- přístroj se zapíná v zadní části přístroje vedle přívodní šňůry
- přístroj ovládáme pomocí tlačítek F1–F5 dole pod displejem; pohybujeme se pomocí šipek vlevo na přístroji, potvrzujeme Entrem
- po spuštění se na základní obrazovce objeví tři ikony:
 - *File* – po stisknutí se zobrazí seznam uživatelů (*Users*), názvy souborů (*File name*) datum vytvoření programu (*Save date*)
 - *System* – systémová nastavení, např.: nastavení teploty víka, zapnutí/vypnutí zvukového signálu po skončení programu
 - *Run*
- u dvoublokové verze přístroje se mezi ovládáním jednotlivých bloků přepíná stiskem tlačítka Shift

vytvoření nového programu

- Pokud chceme měnit parametry stávajícího programu označeného kurzorem, stiskneme klávesu Edit
- Pro vytvoření nového programu stiskneme klávesu F2 (New File)
- Stiskem klávesy F1 (+Seg) zadáváme parametry jednotlivých kroků (tzv. segmentů) jako teplotu (Temp), čas (Time), rychlost nárůstu/poklesu teploty (Ramp – tzv. ramping rate, přednastavená hodnota „#. #“ ve sloupci Ramp značí nejvyšší možnou rychlost nárůstu/poklesu teplot, pro většinu PCR cyklů neměníme)
- Stiskem klávesy F2 (+Cycle) nastavíme počet cyklů a průběh cyklu, např. from 02 to 04
- Pro tzv. *touchdown* PCR využijeme sloupec +Temp a +Time
- Sloupec Grad slouží pro vytvoření parametrů teplotního gradientu, např. číslice 12 znázorňuje gradient 12 stupňů mezi první a poslední pozicí bloku; teplota mezi jednotlivými pozicemi se nastaví automaticky, její nárůst od první k poslední pozici je progresivní
- Po vytvoření programu stiskneme klávesu F5 (Save), zadáme jméno uživatele a název vytvořeného programu a potvrdíme klávesou F3 (Save)

spuštění programu

- Vložíme PCR zkumavky, stripy nebo destičku se vzorky.
- Zaklapneme víko bloku a dotáhneme (ne silou!)
- Stiskneme klávesu F1 (*File*), vyhledáme požadovaný profil a program a stiskneme klávesu F5 (*Run*)
- Po spuštění programu se na displeji zobrazí jméno uživatele, název programu, celkový čas, zbývající čas, číslo a grafický průběh právě probíhajícího cyklu, počet cyklů, teplota víka apod.
- Po doběhnutí programu ukončíme stiskem klávesy Stop a opětovným potvrzením stiskem F1 (*Stop*).

Zacházení s termocyclerem Biometra T3000 se třemi bloky

ovládání přístroje

- Přístroj se zapíná/vypíná na přední straně vpravo dole tlačítkem „*Power*“
- Přístroj ovládáme pomocí tlačítek dole pod displejem a na pravé straně, pohybujeme se pomocí šipek, potvrzujeme *Entrem*, mažeme tlačítkem *Cancel*
- Základní obrazovka ukazuje v dolní části displeje několik ikon:
 - Ikona *Info*: zobrazení informací o blocích – právě činný (*active*) nebo volný (*inactive*)
 - Ikona *Systém* – informace o typu přístroje, nastavení signalizace konce programu, navolení požadovaného jazyka, nastavení kontrastu na displeji apod.
 - Ikona *Start/stop* – zapnutí/vypnutí programu
 - Ikona *Edit* – vytvoření nového programu nebo změna parametrů již uloženého programu

vytvoření nového programu, editace programu

- Stiskneme klávesu *Edit*.
- Vybereme adresář, do kterého chceme program uložit, stiskneme *Enter*.
- Vybereme podadresář a stiskneme *Edit* (pro nový prázdný program) nebo vybereme existující program a stiskneme *Edit*
- Po zobrazení abecedy vložíme název programu a potvrdíme stiskem *Name OK*.
- Nastavíme teplotu víka (*Lid Temperature*) na 99°C a zapneme funkci předehřívání (*Preheating ON*), potvrdíme stiskem *Enter*.
- Nastavíme teplotní program – teplotu (*Temp*) vkládáme čísla, čas (*Time*) zadáváme v sekundách, minuty, příp. hodiny musíme oddělit tečkou („90“ znamená 90 s, „3.30“ znamená 3 min 30 s, „1.5.0“ znamená 1 hod 5 min 0 s,); pro nastavení „nekonečného“ kroku (zchlazení na 10°C po doběhnutí cyklu) zadáme čas „0“, objeví se „*Pause*“
- Pro nastavení cyklování najedeme na konec řádku posledního kroku cyklování a do sloupce „←“ vložíme číslo, které odkazuje na počáteční krok cyklování (k tomuto kroku, např. 2, se bude přístroj po každém dokončeném základním cyklu vracet a opakovat cyklus od tohoto kroku); do sloupce „#“ vložíme počet cyklů zmenšený o 1 (= počet opakování, první proběhnutí počítá přístroj zvlášť)
- program uložíme „*Save pgm*“

Spuštění programu

- Vložíme PCR zkumavky, stripy nebo destičku.
- Zaklapneme víko bloku a dotáhneme (ne silou!)
- Stiskneme *Start/Stop*, vybereme blok a po rozbalení adresáře program, který chceme spustit, a stiskneme *Start*.
- Po spuštění programu se začne zahřívát víko, displej zobrazuje teplotu a čas právě probíhajícího kroku, teplotu víka; čas do konce programu se objeví po stisknutí „*Info*“.
- Ve chvíli, kdy víko dosáhne zadané teploty (standardně 99 °C), je automaticky přitlačeno na zkumavky, začíná vlastní reakce a na displeji je znázorňován průběh reakce.
- Po ukončení programu se zapne zvukový signál; vypneme jej stiskem kterékoliv klávesy, povolíme víko a můžeme vyndat produkty PCR reakce, ukončíme běžící program (*Stop*).
- V průběhu PCR reakce je možné vytvářet či editovat jiné programy.

Měření na pH-metru Hanna pH 211

Kalibrace

- Doporučuje se provádět vždy po delším stání a při běžné práci nejméně 1× týdně, pro velmi přesné měření 1× denně.
- Pro kalibraci použijeme vždy pufr pH = 7,01 a druhý (pH = 4,01 nebo 10,01) zvolíme podle toho, jestli plánujeme měření v kyselé nebo v zásadité oblasti.
- Elektrodu i teploměr důkladně opláchneme destilovanou vodou ze stříčky, opatrně osušíme buničinou.
- Vložíme elektrodu i teploměr do kalibračního pufru pH = 7,01. Otvor na spodní části kyvety (nad baničkou) musí být pod hladinou pufru.
- Zapneme přístroj tlačítkem vpravo pod displejem, ukáže se hodnota pH a teplota.
- Necháme chvíli ustálit, spustíme kalibraci tlačítkem „CAL“.
- Přístroj začne kalibrovat, vlevo bliká „Not ready“. Počkáme, dokud se nápis nezmění na „Ready CFM“, potvrdíme stiskem tlačítka „CFM“.
- Šipkami (označeny ▲°C / ▼°C) vybereme hodnotu pH druhého kalibračního pufru (zobrazuje se na displeji úplně vpravo).
- Vyjmeme elektrodu i teploměr z pufru, opláchneme destilovanou vodou, osušíme a vložíme do druhého kalibračního pufru.
- Bliká „Not ready“, počkáme, dokud se nápis nezmění na „Ready CFM“, dokončíme kalibraci stiskem tlačítka „CFM“.
- Pokud ihned nepokračujeme měřením, vypneme přístroj.
- Vyjmeme elektrodu i teploměr, opláchneme destilovanou vodou, osušíme buničinou a vložíme do čepičky s uchovávacím pufrem (Storage solution; pokud v něm nebude ponořená celá banička elektrody, doplníme ze zásobní láhve ve skřínce pod přístrojem).

Měření pH

- Opláchneme elektrodu i teploměr destilovanou vodou, opatrně osušíme buničinou.
- Vložíme elektrodu i teploměr do roztoku, otvor na spodní části kyvety (nad baničkou) musí být pod hladinou.
- Zapneme přístroj.
- Na displeji se zobrazuje teplota a hodnota pH. Počkáme, než se hodnota pH ustálí.
- Po skončení měření, pokud nepokračujeme dalším roztokem, vypneme přístroj.
- Vyjmeme elektrodu i teploměr, opláchneme destilovanou vodou, osušíme buničinou a vložíme do čepičky s uchovávacím pufrem.

Roztoky a pufrý

1) Obecné roztoky

1M HCl

	100 ml	250 ml	500 ml
dest. H ₂ O	~ 70 ml	~ 200 ml	~ 400 ml
konc. HCl (35%)	8,83 ml	22,07 ml	44,14 ml
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>

1M H₃PO₄

	100 ml	250 ml	500 ml
dest. H ₂ O	~ 70 ml	~ 200 ml	~ 400 ml
konc. H ₃ PO ₄ (85%)	6,74 ml	16,86 ml	33,71 ml
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>

1M kys. octová

	100 ml	250 ml	500 ml
dest. H ₂ O	~ 70 ml	~ 200 ml	~ 400 ml
kys. octová (čistá)	5,72 ml	14,30 ml	28,60 ml
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>

Roztoky NaOH

	0,5M NaOH		1M NaOH		10M NaOH	
	100 ml	250 ml	100 ml	250 ml	100 ml	250 ml
dest. H ₂ O	~ 70 ml	~ 220 ml	~ 70 ml	~ 220 ml	~ 70 ml	~ 200 ml
NaOH (bezvodý)	2 g	5 g	4 g	10 g	40 g	100 g
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>

Při přípravě 0,5M NaOH pro izolaci DNA použít místo destilované vody Milli-Q vodu, vysterilizovat v autoklávu.

2) Izolace, ředění a srážení DNA**2% CTAB**

	100 ml	250 ml	500 ml	(konc.)
CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide)	2,0 g	5,0 g	10,0 g	(2% w/v)
Tris-base	1,21 g	3,03 g	6,06 g	(0,1M)
Na ₂ -EDTA	0,74 g	1,86 g	3,72 g	(0,02M)
NaCl	8,18 g	20,45	40,91 g	(1,4M)
dest. H ₂ O	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 450 ml	
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>	

100mM Tris-HCl pufr, pH = 8,3

	50 ml	100 ml	250 ml
Tris-base	0,61 g	1,21 g	3,03 g
dest. H ₂ O	~ 35 ml	~ 80 ml	~ 220 ml
<i>úprava pH pomocí 1M HCl</i>		<i>pH = 8,3</i>	
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>50 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>

TE pufr (10× koncentrovaný zásobní roztok)

	50 ml	100 ml	250 ml	1000 ml	(konc.)
Tris-base	0,61 g	1,21 g	3,03 g	12,11 g	(0,1M)
Na ₂ -EDTA	0,19 g	0,37 g	0,93 g	3,72 g	(0,01M)
dest. H ₂ O	~ 35 ml	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 900 ml	
<i>úprava pH pomocí HCl / NaOH</i>			<i>pH = 8,0</i>		
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>50 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>1000 ml</i>	

Před použitím naředit 10×, finální koncentrace jsou 10 mM Tris, 1 mM EDTA

Sodium acetate

	3M	0,05M, pH = 5,0		
	100 ml	100 ml	200 ml	500 ml
Sodium acetate (anhydrous)	24,61 g	0,41 g	0,82 g	2,05 g
dest. H ₂ O	-	~ 80 ml	~ 180 ml	~ 450 ml
<i>úprava pH pomocí kys. octové</i>	-		<i>pH = 5,0</i>	
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>	<i>500 ml</i>

0.5M NaOH

viz část 1) Obecné roztoky

3) Elektroforéza DNA

TBE pufr (zásobní roztok)

	10× konc.	20× konc.
Tris-base	108 g	216 g
Boric acid	55 g	110 g
Na ₂ -EDTA	9,3 g	18,6 g
<i>rozpustit v dest. H₂O, doplnit do</i>	<i>1000 ml</i>	<i>1000 ml</i>

Ředění na konc. 1× (elektroforéza, příprava gelů):

	10× konc.		20× konc.	
	1 l	5 l	1 l	5 l
TBE	100 ml	500 ml	50 ml	250 ml
dest. H ₂ O	900 ml	4500 ml	950 ml	4750 ml

TAE pufr (zásobní roztok)

	10× konc.	20× konc.
Tris-base	48,46 g	96,92 g
Na ₂ -EDTA	3,72 g	7,44 g
Glacial acetic acid	11,42 ml	22,84 g
<i>rozpustit v dest. H₂O, doplnit do</i>	<i>1000 ml</i>	<i>1000 ml</i>

Ředění na konc. 1× (elektroforéza, příprava gelů):

	10× konc.		20× konc.	
	1 l	5 l	1 l	5 l
TBE	100 ml	500 ml	50 ml	250 ml
dest. H ₂ O	900 ml	4500 ml	950 ml	4750 ml

Modrý nanášecí pufr bez DNA barviva – „LD“

Bromphenol Blue	0,025 g
Xylene Cyanol FF	0,025 g
Glycerol	3 ml
<i>doplnit sterilní dest. H₂O do objemu</i>	<i>10 ml</i>

rozpipetovat po 1 ml, uchovávat v –20°C.

Modrý nanášecí pufr s barvivem Sybg Green („LD+SG“) nebo GelRed („GelRed“)

Bromphenol Blue	0,025 g
Xylene Cyanol FF	0,025 g
Glycerol	3 ml
SYBR Green I nebo GelRed	20 µl
<i>doplnit sterilní dest. H₂O do objemu</i>	<i>10 ml</i>

rozpipetovat po 1 ml, uchovávat ve tmě v –20°C.

Roztoky a puřry

100 bp Ladder

100 bp ladder (500 µg / ml)	20 µl
sterilní dest. H ₂ O	180 µl
LD+SG	40 µl

pracovní alikvoty uchovávat v lednici, zásobní ve tmě v -20°C.

λ DNA Hind III digest

λ DNA Hind III digest (500 µg / ml)	20 µl
sterilní dest. H ₂ O	180 µl
LD+SG	40 µl

pracovní alikvoty uchovávat v lednici, zásobní ve tmě v -20°C.

4a) Isozomy – izolace**Izolační pufr „Viola“** (podle izozymové laboratoře BÚ AVČR, Průhonice)

	30 ml	50 ml	100 ml	(konc.)
Tris-base	0,36 g	0,61 g	1,21 g	(0,1M)
ascorbic acid	58 mg	97 mg	194 mg	(11mM)
sodium metabisulfite	148 mg	247 mg	494 mg	(26 mM)
2-mercaptoethanol	148 μ l	246 μ l	492 μ l	(70 mM)
<i>úprava pH pomocí HCl</i>	<i>pH = 8,0 (před přidáním PVP!)</i>			
PVP40	1,2 g	2 g	4 g	(4% w/v)

Nelze dlouhodobě uchovávat, krátkodobě v lednici

Izolační pufr „Gentiana“ (podle izozymové laboratoře BÚ AVČR, Průhonice)

	30 ml	50 ml	100 ml	(konc.)
Tris-base	0,36 g	0,61 g	1,21 g	(0,1M)
L-glutathione reduced	0,3 g	0,5 g	1 g	(1% w/v)
MgCl ₂ .6H ₂ O	60 mg	100 mg	200 mg	(10 mM)
<i>úprava pH pomocí HCl</i>	<i>pH = 8,0 (před přidáním sacharózy)</i>			
2-mercaptoethanol	30 μ l	50 μ l	100 μ l	(0,1% v/v)
sucrose	1,5 g	2,5 g	5 g	(5% w/v)

Nelze dlouhodobě uchovávat, krátkodobě v lednici

Izolační pufr „Luzula“ (podle izozymové laboratoře BÚ AVČR, Průhonice)

	30 ml	50 ml	100 ml	(konc.)
75mM Tris-H ₃ PO ₄ pufr, pH = 7,5	0,27 g	0,45 g	0,91 g	(75mM)
ascorbic acid	15 mg	25 mg	50 mg	(3 mM)
1,4-Dithioerythritol (DTE)	36 mg	60 mg	120 mg	(7,8 mM)
<i>úprava pH pomocí H₃PO₄</i>	<i>pH = 7,5 (před přidáním PVP!)</i>			
2-mercaptoethanol	30 μ l	50 μ l	100 μ l	(0,1% v/v)
PVP	1,2 g	2 g	4 g	(4% w/v)

Nelze dlouhodobě uchovávat, krátkodobě v lednici

Izolační pufr Soltis 1983 (varianta c)

	30 ml	50 ml	100 ml	(konc.)
Tris-base	0,36 g	0,61 g	1,21 g	(0,1M)
MgCl ₂ .6H ₂ O	61mg	101,7 mg	203,3 mg	(10 mM)
KCl	22,4 mg	37,3 mg	74,6 mg	(10 mM)
Na ₂ EDTA	11,2 mg	18,6 mg	37,2 mg	(1 mM)
<i>úprava pH pomocí HCl</i>	<i>pH = 7,5 (před přidáním PVP!)</i>			
2-mercaptoethanol	30 μ l	50 μ l	100 μ l	(0,1% v/v)
PVP40	1,2 g	2 g	4 g	(4% w/v)

Nelze dlouhodobě uchovávat, krátkodobě v lednici

4b) Isozymy – elektroforéza**Tris-glycine (elektrodový pufr)**

	1 l	3 l
Tris-base	2,5 g	7,5 g
Glycine	18 g	54 g
dest. H ₂ O	~ 900 ml	~ 2700 ml
<i>úprava pH pomocí HCl</i>	<i>pH = 8,3</i>	
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>1 l</i>	<i>3 l</i>

Ředění do spodní vany elektroforézy: Tris-glycine buffer 2400 ml + dest. H₂O 1800 ml

Pufr pro separační gel – isozymy (1,82M Tris-HCl, pH = 8,9)

	30 ml	50 ml	100 ml	200 ml
Tris-base	6,61 g	11,05 g	22,1 g	44,2 g
dest. H ₂ O	~ 23 ml	~ 35 ml	~ 80 ml	~ 170 ml
<i>úprava pH pomocí HCl</i>	<i>pH = 8,9</i>			
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>30 ml</i>	<i>50 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>

Pufr pro zaostřovací gel – isozymy (69mM Tris-H₃PO₄, pH = 6,9)

	30 ml	50 ml	100 ml	200 ml
Tris-base	0,25 g	0,42 g	0,83 g	1,66 g
dest. H ₂ O	~ 23 ml	~ 35 ml	~ 80 ml	~ 170 ml
<i>úprava pH pomocí H₃PO₄</i>	<i>pH = 6,9</i>			
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>30 ml</i>	<i>50 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>

Zásobní roztok akrylamidu

	100 ml	200 ml
Acrylamide	40 g	80 g
N,N'-Methylenebisacrylamide (BIS)	1 g	2 g
<i>rozpusťit v dest. H₂O, doplnit do:</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>

Pozor! Obě látky jsou velmi jedovaté, pracujeme v plášti, rukavicích a při vážení v roušce!

4c) Isozomy – barvení

Tris-HCl pufry

	0,1M Tris-HCl			0,05M Tris-HCl		
	100 ml	250 ml	500 ml	100 ml	250 ml	500 ml
Tris-base	1,21 g	3,03 g	6,06 g	0,61 g	1,51 g	3,03 g
dest. H ₂ O	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 450 ml	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 450 ml
<i>úprava pH pomocí HCl</i>		<i>pH = 8,4</i>			<i>pH = 8,5</i>	
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>

Návod platí zásobní roztoky s nejvyšším používaným pH, pufry stejných koncentrací s nižším pH připravíme z těchto zásobních roztoků úpravou pH pomocí HCl.

Tris-Maleate (Tris-Maleic acid)

	0,1M Tris-Maleate, pH = 5,5			0,2M Tris-Maleate, pH = 6,0		
	100 ml	200 ml	500 ml	100 ml	200 ml	500 ml
Tris-base	1,21 g	2,42 g	6,06 g	2,42 g	4,84 g	12,12 g
Maleic acid	1,16 g	2,32 g	5,80 g	2,32 g	4,64 g	11,61 g
dest. H ₂ O	~ 80 ml	~ 180 ml	~ 450 ml	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 450 ml
<i>úprava pH pomocí NaOH</i>		<i>pH = 5,5</i>			<i>pH = 6,0</i>	
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>	<i>500 ml</i>

Esterasový pufr (Esterases buffer, pH = 6,45)

	100 ml	200 ml	500 ml	(konc.)
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	1,56 g	3,12 g	7,80 g	(0,1M)
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	0,72 g	1,43 g	3,59 g	(0,02M)
dest. H ₂ O	~ 80 ml	~ 180 ml	~ 450 ml	
<i>úprava pH pomocí NaOH</i>		<i>pH = 6,45</i>		
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>200 ml</i>	<i>500 ml</i>	

Potassium phosphate buffer

a) zásobní 0,1M K₂HPO₄

	100 ml	250 ml	500 ml
K ₂ HPO ₄ (bezv.)	1,74 g	4,35 g	8,71 g
dest. H ₂ O	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 450 ml
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>

b) zásobní 0,1M KH₂PO₄

	100 ml	250 ml	500 ml
KH ₂ PO ₄ (bezv.)	1,36 g	3,40 g	6,80 g
dest. H ₂ O	~ 80 ml	~ 220 ml	~ 450 ml
<i>doplnit dest. H₂O do objemu</i>	<i>100 ml</i>	<i>250 ml</i>	<i>500 ml</i>

roztok o finální koncentraci 0,05M připravíme naředěním hotového 0,1M roztoku daného pH, upravíme pH pomocí K₂HPO₄ (zvýšení) nebo KH₂PO₄ (snížení)

c) smíchání zás. roztoků

pH	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
5,8	8,5 ml	91,5 ml
6,0	13,2 ml	86,8 ml
6,2	19,2 ml	80,8 ml
6,4	27,8 ml	72,2 ml
6,5	32,95 ml	67,05 ml
6,6	38,1 ml	61,9 ml
6,8	49,7 ml	50,3 ml
7,0	61,5 ml	38,5 ml
7,2	71,7 ml	28,3 ml
7,4	80,2 ml	19,8 ml
7,6	86,6 ml	13,4 ml
7,8	90,8 ml	9,2 ml
8,0	94 ml	6 ml

Fixační roztok (podle isozymové laboratoře BÚ AVČR, Průhonice)

	500 ml	1000 ml
Kys. octová	50 ml	100 ml
Glycerol	50 ml	100 ml
dest. H ₂ O	150 ml	300 ml
Methanol	250 ml	500 ml