

DNA otisk prstu, žákovská sada

Kat. číslo: 109.3127

PCR amplifikace DNA za účelem identifikace pomocí genetického otisku prstu

Všechny součásti sady jsou určeny výhradně pro pedagogické pokusy. Nesmí se používat k diagnostickým účelům – u lidí ani u zvířat.

Tato sada neobsahuje žádné lidské DNS vzorky ani jiné komponenty pocházející z lidských zdrojů!

Co sada obsahuje?

Co je dále zapotřebí?

Vysvětlující informace

Návod k provedení pokusu

Sestavení rodinných rodokmenů

Shrnutí pokusu

Všeobecné pokyny

Elektroforéza

Příprava gelu

Provedení elektroforézy

Barvení a vizualizace DNS

Metoda 1: jednofázové barvení a odbarvení s použitím metylénové modři InstaStain®

Metoda 2: barvení pomocí metylénové modři InstaStain®

Metoda 3: kapalinové barvení pomocí metylénové modři Plus™

Dotazy

Pokyny pro učitele

Vysvětlivky

Příprava

Příprava provedení gelové elektroforézy v agaróze

Výsledky a rozbor

Dotazy a odpovědi

Bezpečnostní listy

Obsah sady

Ready-to-Load™ DNS vzorky pro gelovou elektroforézu

- A Standardní fragmenty DNA
- B Zkušební vzorek z místa činu
- C Podezřelý, zkušební vzorek 1
- D Podezřelý, zkušební vzorek 2
- E Podezřelý, zkušební vzorek 3

Potřebné příslušenství (součást sady)

- Prášek UltraSpec-Agarose™
- Koncentrovaný ústojný roztok pro elektroforézu
- Metylénová modř InstaStain®
- Metylénové modř Plus™
- Ústojný roztok gelu
- Pipeta o objemu 1 ml
- Odměrný válec o objemu 100 ml (balení pro vzorky)
- Přenášecí pipety

Potřebné příslušenství (není součástí sady)

- Horizontální aparatura pro gelovou elektroforézu
- Síťový zdroj stejnosměrného proudu
- Automatické mikropipety s impulsy
- Váhy
- Mikrovlnná trouba, topná deska nebo hořák
- Pipetovací balónek
- Lahvičky nebo kelímky o objemu 250 ml
- Rukavice stabilní za tepla
- Ochranné brýle a jednorázové laboratorní rukavice
- Plastové barvicí nádoby
- DNS zobrazovací systém (optimálně: bílé světlo s Bernsteinovým filtrem)
- Destilovaná nebo deionizovaná voda

DNS vzorky obsažené v sadě je možné skladovat při pokojové teplotě až po dobu jednoho měsíce. Pokud chcete pokus provést až později, doporučujeme skladovat vzorky a ústojné roztoky při teplotě -4°C. V chladu můžete roztoky a vzorky skladovat až po dobu 2 let.

Výukové cíle

Při tomto pokusu se účastníci kurzu naučí připravovat DNS vzorky a provádět následnou gelovou elektroforézu v agaróze. Závěrečný rozbor pokusu pak umožní konkrétně vysvětlit stanovený abstraktní problém.

Časová náročnost

Příprava gelu: Pro přípravu gelu (nezávisle na tom, zda lijete gel sami nebo žáci) byste si měli vyhradit asi 30-40 minut. Dalších 20 minut je zapotřebí pro úplné ztuhnutí gelu.

Odlité gely můžete až do vlastního použití skladovat v lednici po dobu jednoho až dvou týdnů. V tom případě zabalte gely do potravinářské fólie nebo je vložte do plastového sáčku s tlakovým uzávěrem. Předtím pokropte gel trochou ústojného roztoku – tím zabráníte vysychání gelu.

Zbude-li vám na konci vyučovací jednotky nespotřebovaná, ztuhnutá agaróza (gely), můžete ji vrátit do láhve a příště zahřát/roztavit a znovu použít. Agarózu můžete uchovávat v laboratorní láhvi a bez problémů podle potřeby zahřívát/tavit.

Průběh pokusu: Gelová elektroforéza v agaróze trvá asi 40 minut. Barvení můžete provést buď přes noc, nebo během 3 hodin.

Vysvětlující informace

Genetickým otiskem prstu se nazývá DNA profil jednotlivce, který je pro něj vysoce charakteristický. DNA se získává z buněk pocházejících z částí tkáně, např. spermatu, kožních buněk nebo slin. V molekulární biologii se tento postup nazývá také genetický Genetic Fingerprinting nebo DNA Fingerprinting. Na tento postup narazil náhodou v roce 1984 Alec Jeffreys. V Německu byl jako soudně uznáný důkaz v trestním procesu poprvé použit v roce 1988.

V současné době se pro genetický otisk prstu používá 8 a 15 úseků DNA, reprodukováných pomocí metody PCR. Nezkoumají se geny samy o sobě - tedy relativně málo úseků lidské DNA (jedno až dvě procenta), které kódují bílkoviny a udávají fenotyp – nýbrž malé, opakující se úseky v genotypu, minisatelity VNTR (variable number tandem repeats) nebo STRs (Short tandem repeats). U těchto úseků DNA se jedná o tandemové opakování určité sekvence (Reapets), která se vyskytuje v genomu všech savců. Variabilní je přitom počet opakování. Tento počet se zkoumá při genetickém otisku prstu. Podle počtu opakování má tedy reprodukováný úsek určitou délku, která se dá pomocí gelové elektroforézy v agaróze zobrazit jako jednotlivý band. Je-li člověk u jedné lokalizace genů heterozygotní (má tedy například jednu alelu s deseti opakováními a jednu s patnácti), vznikají dva bandy rozdílné délky. Přitom se nejedná o sekvencování, ale o čistou analýzu délky fragmentu (podobně jako u RFLP).

U VNTRs je opakující se část delší (10 až 150 základních párů) než u STR (2 až 7 základních párů).

Pravděpodobnost, že dva jednotlivci budou mít na jednom VNTR nebo na jednom místě STR různý počet opakování, je velmi vysoká. Při prozkoumání více těchto regionů tak vznikne profil bandu, který je v celkové populaci zastoupen s určitou četností. Díky tomu se dá statisticky vyvodit, kolik lidí je třeba prozkoumat, aby se náhodně narazilo na jednoho, který vykazuje přesně tento vzorek. U výše uvedených 8 až 15 zkoumaných systémů VNTR se tento počet často pohybuje v řádu několika miliard. Získané informace se převedou do matematického modelu, který se digitálně zpracuje a dá se tak automatizovaně porovnávat. Matematický model je čistý agregovaný číselný kód.

Na rozdíl od jiných analýz DNA, u nichž se pomocí sekvencování zkoumají geny z kódovaných oblastí DNA, které umožní vyvodit závěry ohledně případných nemocí jednotlivce, nedají se z číselného kódu analýzy délky fragmentu odvodit žádné vlastnosti jednotlivce. Podle dodatečné lokalizace se však dá určit pohlaví. Rovněž se zjistí určité odchylky v počtu chromozomů, např. odchylky způsobující Downův syndrom.

Další metodou je RFLP: zde se DNA rozřeže pomocí restriktivních enzymů. Tyto restriktivní enzymy rozpoznají specifické úseky v DNA. Podle toho, jak často se takový úsek v chromozomu vyskytuje, vznikne různě mnoho různě dlouhých fragmentů DNA. Ty se poté mohou pomocí gelové elektroforézy atd. opět zviditelnit.

Genetický otisk prstu se v Německu smí používat pouze na základě soudního příkazu. Přitom jsou možná dvě různá využití:

* Zkoumání stop a tělesných buněk obviněného v rámci vyšetřování konkrétního trestného činu (§ 81a trestního řádu společně s § 81e trestního řádu).

* Analýza DNA za účelem stanovení totožnosti pro případ budoucích trestných činů (§ 81g trestního řádu).

Posledně uvedené zkoumání smí soudce nařídít jen tehdy, je-li splněn významný předpoklad spáchání trestného činu ve smyslu trestního zákoníku, při jehož opakování by genetický otisk prstu mohl významně pomoci při určení pachatele (soudní příkaz je zásadně možný i při podněcování nebo podvodu).

Zkoumání je zahájeno, pokud existuje důvod k domněnce, že proti obviněnému bude i v budoucnu vedeno trestní řízení. U prvopachatelů se proto genetický otisk prstu často nesnímá. Soud obecně musí pro takové rozhodnutí konkrétní případ obsáhle a důkladně přezkoumat a zohlednit právo na informační sebeurčení (čl. 2, odst. 1 Ústavy Spolkové republiky Německo). [1][2] To musí vyplývat i z odůvodnění. [1][2] Vysoké nároky na odůvodnění jsou kladeny zejména tehdy, když je zároveň stanoven podmíněný trest odnětí svobody, protože předpokladem pro uložení tohoto trestu je příznivá prognóza. [1][2]

Buňky pro genetický otisk prstu smí po nařízení zkoumání odebrat lékař (§ 81a, odstavec 1, věta 2 trestního řádu). V některých spolkových zemích může policie vyzvat k dobrovolnému poskytnutí genetického otisku prstu (např. v Bavorsku, Severním Porýní-Vestfálsku a Hamburgu). V ostatní spolkových zemích je i k tomu zapotřebí soudního povolení.

V policejním sektoru jsou vyfiltrováním částí důležitých pro určení totožnosti ze vzorků DNA pověřovány laboratoře (obvykle státní); tyto části jsou pak předány do policejní databáze DNA při BKA, která poté porovnává neznámé profily DNA (např. stopy z místa činu nebo neznámých mrtvol) s uloženými profily DNA známých osob. Známé profily pochází od pachatelů trestných činů, u nichž byl biologický vzorek odebrán výtěrem ústní dutiny (dobrovolným) nebo stěrem kůže (pokud daná osoba odmítá zásah do tělesného otvoru). Z důvodu ochrany osobních údajů nedostávají pověřené laboratoře v Německu žádné osobní údaje; vzorky (stopy) jsou pouze jednoznačně označeny. Díky tomuto oddělení mohou pouze policejní orgány určit příčinnou souvislost mezi výsledky zkoumání a osobami.

Předpokladem pro odběr daktyloskopického otisku prstu a genetického otisku prstu je spáchání trestného činu podle trestního řádu.

* Odběr genetického otisku prstu je dovolen pouze v případě závažných trestných činů a na základě soudního příkazu (§ 81g, odst. 1, č. 1 a 2, odst. 3, věta 1 společně s § 81f, odst. 1, str. 1 trestního řádu).

* Daktyloskopický otisk prstu odebírá policista tehdy, když se domnívá, že se jedná o trestný čin, tedy o přestupek vůči zákonu, u něhož se předpokládá, že pravděpodobnost opětovného spáchání je vyšší, než že tento trestný čin spáchá doposud netrestaná osoba.

V souvislosti s vraždou módního návrháře Rudolpha Moshammera se v Německu diskutovalo o rozšíření možností využití genetického otisku prstu. Návrh zákona podaný více spolkovými zeměmi, který byl Spolkové radě přednesen 18. února 2005, předpokládal mimo jiné zrušení soudního příkazu a rozšíření seznamu trestných činů.

Subjekty vystupující na ochranu dat a občanskoprávní organizace se vyslovily proti změně zákona. Konference subjektů pověřených ochranou v Německu a jednotlivých spolkových zemích považuje rovnoprávné postavení klasického a genetického otisku prstu, tak jak ho požadují spolkové země, za pochybné.

Samotný výsledek testu DNA, otisku prstu nebo jiné stopy nemůže rozhodnout o vině nebo nevině podezřelého. Hodnotí se pouze jako indicie, která musí být doplněna dalšími. Mnoho podezřelých však učiní přiznání, jsou-li konfrontováni s výsledkem. Pokud se tak nestane, musí být výsledek interpretován, přičemž nelze vyloučit chybné závěry.

Známým příkladem falešně pozitivního výsledku je mimo jiné případ 28-letého dělníka, který půl roku nevině seděl ve vězení za vraždu. Při analýze vzorků v Humboldtově ústavu v Berlíně došlo k jejich znečištění; státní zástupce se písemně omluvil. Psycholog Jonathan Koehler odhaduje podíl falešně pozitivních výsledků, ke kterým v laboratoři DNA dojde, v řádu 1:100 (ledabylost, zavádějící vzorky DNA, nesprávné označení vzorků). Důkazní řetězec se kvůli falešně pozitivnímu výsledku naruší už v bodě 1 a zbytek řetězce je neplatný. Trestně procesní opatření na základě výsledků DNA je zpravidla dovoleno pouze po přesném přezkoumání. Je předepsána verifikace prvního zkušební vzorku druhým.

U pacientů, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně, se při rozboru krve zpravidla najde genetický otisk prstu dárce, v ojedinělých případech i kombinovaná chiméra. V případě výtěru ústní dutiny se zpravidla objeví kombinovaná chiméra, zatímco ve vlasových kořínkách zůstává zachována původní genetická informace. [3][4]

Jednovaječná dvojčata mají s výjimkou V(D)J regionů v paměťových buňkách imunitního systému (B lymfocyty) přesně stejný genetický kód. Při „pozitivním“ výsledku tedy nemusí stopa z místa činu nutně pocházet od testovaného dvojčete, pokud genetický otisk prstu nezahrnuje také uvedené regiony. [5]

V březnu 2009 muselo být propuštěno na svobodu dvojče, které bylo podezřelé, že se 25. ledna 2009 vloupalo do nákupního domu Kaufhaus des Westens a odneslo si několikamilionovou kořist. Analýza stop na rukavici nalezené na místě činu prokázala shodu s DNA obou dvou dvojčat. Ačkoliv je jisté, že minimálně jedno z nich bylo na místě činu, nemohla být účast na trestném činu prokázána žádnému z nich, protože stopa mohla pocházet od druhého dvojčete.

Reference (zdroj Wiki)

1. ↑ a b c Spolkový ústavní soud (tiskové středisko): Tisková zpráva č. 62/2009. Spolkový ústavní soud, 17. června 2009, zveřejněno 17. června 2009.
2. ↑ a b c Spolkový ústavní soud: 2 BvR 287/09 (a 2 BvR 400/09). 22. května 2009, zveřejněno dne 17. června 2009 (rozhodnutí 2. komory druhého senátu Spolkového ústavního soudu).
3. ↑ Y.C. Hong, H.M. Liu, P.S. Chen, Y.J. Chen, J.Y. Lyou, H.Y. Hu, M.F. Yi, J.S. Lin, C.H. Tzeng.: Hair follicle: a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: Nature Publishing Group (Hrsg.): Bone Marrow Transplantation. 40, str. 871–874. doi:doi:10.1038/sj.bmt.1705823.
4. ↑ Objevena mrtvola s mužskou i ženskou DNA, Focus Online, 19. října 2008
5. ↑ Mark Benecke: Genetický otisk prstu / Typizace DNA. F.A. Brockhaus, Lipsko 2005/2006, str. 449-454.

Stanovení cíle:

Jaké podezřelé předměty byly skutečně nalezeny na místě činu?



BEZPEČNOST V LABORATOŘI:

1. Noste rukavice a ochranné brýle
2. Při manipulaci s topnými tělesy postupujte nanejvýš opatrně
3. K pipetování nepoužívejte ústa
4. Při používání elektrických provozních prostředků v laboratoři postupujte opatrně
5. Po manipulaci s reagenčními činidly a biologickými materiály si vždy důkladně umyjte ruce.

Laboratorní deník:

V laboratorním deníku musí být bezpodmínečně zaznamenány následující pracovní kroky a postupy:

Před provedením pokusu:

- Zapište si hypotézu, která pokus charakterizuje!
- Jaké výsledky očekáváte?

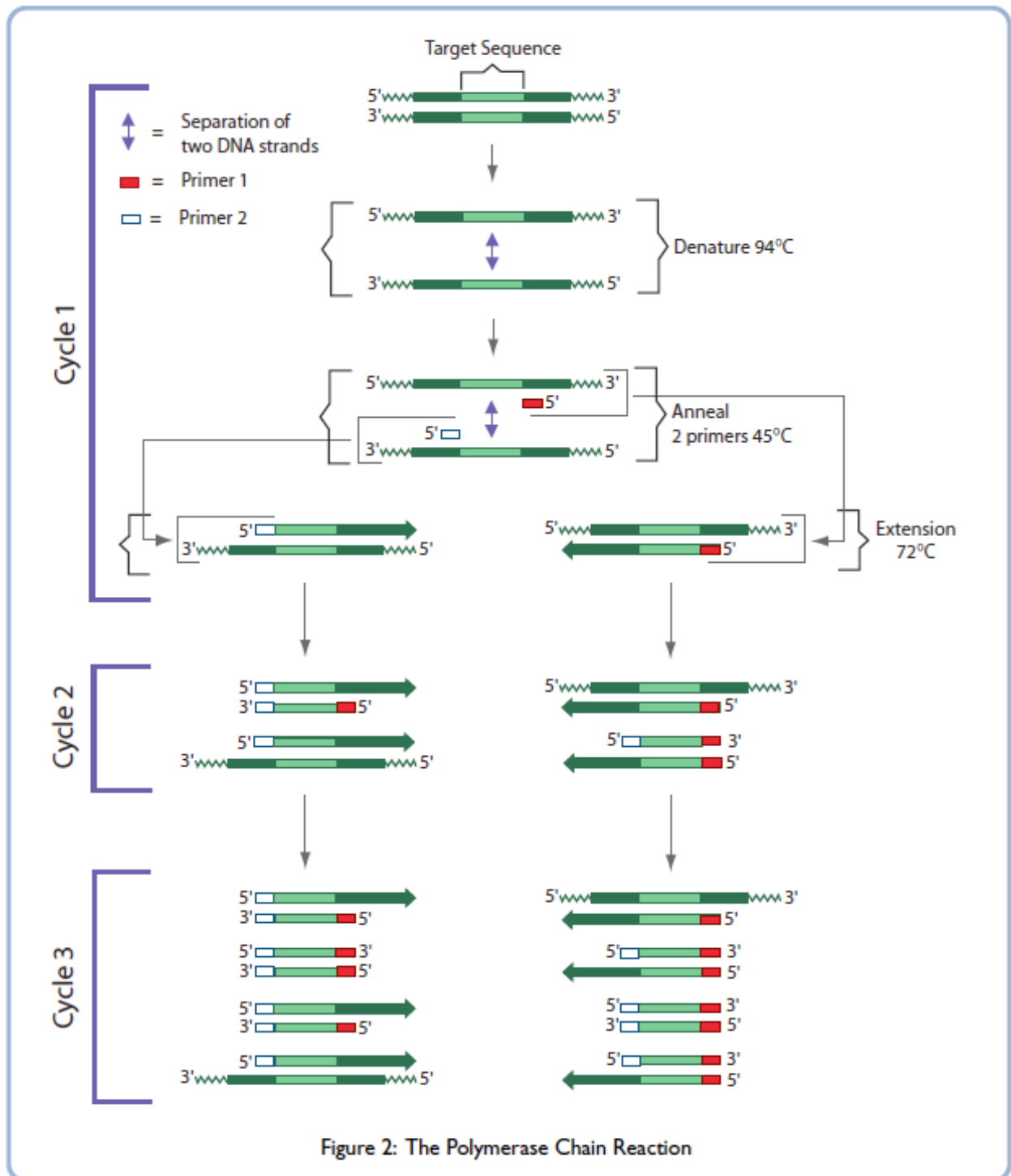
- Poznamenejte si postřehy a/nebo vyfotografujte výsledky!

Po provedení pokusu:

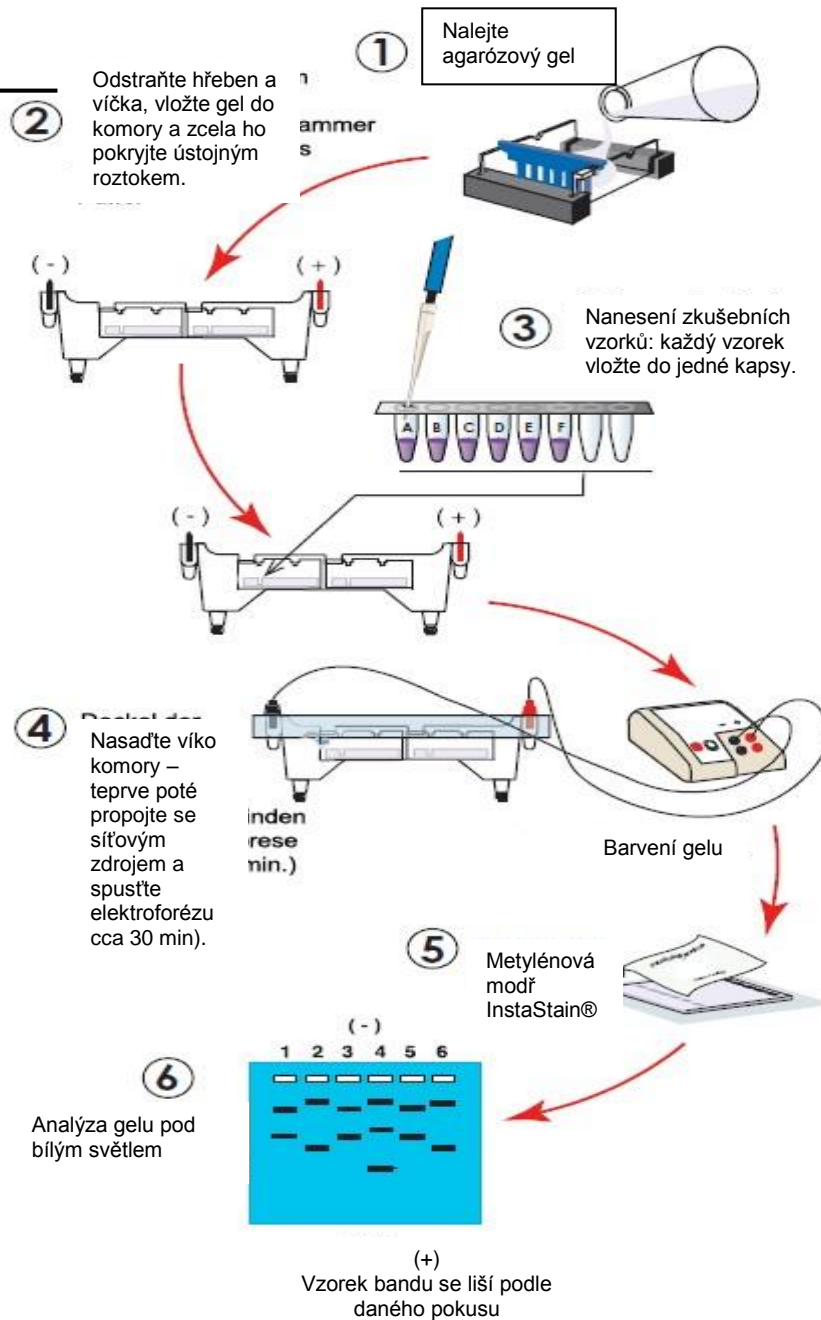
- Formulujte výsledky.
- Byly v průběhu procesu provedeny nějaké změny?



Schématické zobrazení PCR reakce:



Pokus



Shrnutí pokusu a všeobecné informace

Příprava zkušebních vzorků

Zkušební vzorky pro naše sady jsou k dostání buď jako předem alikvotované zkumavky QuickStrip™ nebo v Eppendorfových zkumavkách o objemu 1,5 ml nebo 0,5 ml:

Předem alikvotované zkumavky QuickStrip™



Každá sada QuickStrip™ obsahuje několik zkumavek s předem přesně alikvotovaným množstvím zkušebních vzorků „Ready-to-load“ pro gel. Zkumavky jsou uzavřeny ochrannou fólií; je třeba je jen otevřít a nanést. Před otevřením zlehka poklepejte zkušebními vzorky o stůl, aby bylo zaručeno, že se tekutina shromáždí na dně Eppendorfovy zkumavky.

Odstříhnete jednu řadu alikvotovaných vzorků QuickStrip pro každou laboratorní skupinu. Při práci s reakčními zkumavkami nechte zkumavky se vzorky kolovat nebo pro každou laboratorní skupinu odeberte pipetou 50 µl od každého zkušební vzorku do reakční zkumavky. Každá laboratorní skupina dostane 6 zkušebních vzorků.

Jednotlivé zkumavky o objemu 1,5ml nebo 0,5ml

Alikvotování zkušebních vzorků proveďte pro žáky sami, nebo nechte žáky, aby zkušební vzorky z příslušných zkumavek odebrali sami.



Zkontrolujte objem zkušební vzorku. Někdy zůstane malé množství nanášeného vzorku na stěně zkumavky.

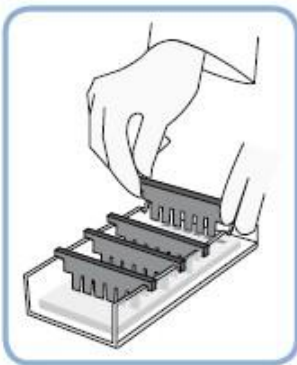
Zajistěte, že celý zkušební vzorek bude nanesen, a před nanesením proveďte krátké odstředění zkumavek se vzorky.

Každá laboratorní skupina potřebuje:

- 1 gel
- 1 sadu vzorků DNA

- 1 mikropipetu (pevný objem 40 µl nebo nastavitelný objem 5 až 50 µl nebo přenášeč pipetu s mikro špičkou)
- 1 barvicí papír s metylénovou modří InstaStain
- 1 kádinku s teplou vodou z vodovodu (37°C)

Praktické pokyny k naplnění gelu



Nejllepších možných výsledků v gelu se dosáhne jen při pečlivém zpracování vzorků. Chyby při pipetování mohou způsobit, že se vzorek rozmočí nebo znečistí ústojným roztokem. Proto musíte při nanášení dávat pozor, abyste na každý vzorek použili novou špičku pipety. Kromě toho se špička pipety NIKDY nesmí zasouvat do kapsy v gelu tak hluboko, aby poškodila gel. Nechte žáky, aby si techniku plnění nejdříve nacvičili na „zkušebním gelu“.

1. Nejdříve vytvořte gel s maximálním počtem kapes
2. Po ztuhnutí gelu ho ponořte do ústojného roztoku v barvicí nádobě.
3. Naneste vzorek – důležité je, abyste vzorek nechali „vklouznout“ do kapsy v gelu pomalu, aniž byste gel nebo kapsu propíchnuli špičkou pipety nebo jinak poškodili.

→ Cílem cvičení je, aby se žáci naučili pipetování v kapalině!

Nanesení vzorků:

Pipetování s mini pipetou o objemu 40 µl:

- Zkumavkami QuickStrip™ opatrně poklepejte o laboratorní stůl, aby bylo zajištěno, že se vzorky shromáždí dole ve zkumavce.
- Opatrně propíchněte ochrannou fólii zkumavky novou špičkou pinzety. Zmáčkněte píst pipety až po první doraz, ponořte špičku do vzorku a píst opatrně uvolněte (do špičky se nabere vzorek).
- Špičku pipety se vzorkem ponořte do kapsy v gelu a opatrným stlačením pístu pipety nechte vzorek POMALU vtékat do kapsy.
- Vyměňte špičku pipety.
- Zopakujte tyto kroky s novou špičkou pipety pro každý vzorek.

Pipetování s nastavitelnou mikro pipetou:

- Tyto pipety jsou vybaveny dvěma tlakovými body: prvním měkkým tlakovým bodem a druhým pevným tlakovým bodem.
- Nasaďte čistou žlutou špičku mikro pipety na konec své pipety.
- Mikro pipetu nastavte na 40 μ l (v případě potřeby si znovu přečtete návod k použití pipety).
- Ze zkumavky se cvičným ústojným roztokem odstraňte víčko.
- Zatlačte píst až po první tlakový bod a teprve poté ponořte špičku do kapaliny.
- Konec špičky mikro pipety ponořte do cvičného ústojného roztoku a pomalým uvolňováním/povolováním pístu natáhněte do špičky pipety 40 μ l tmavě modré kapaliny.
- Naplňte jí jednu z kapes v gelu („naplnění za sucha“): přitom zatlačte píst po druhý pevný tlakový bod. Po vytlačení veškeré kapaliny ze špičky pipety vytáhněte pipetu se zatlačeným pístem z kapsy ven.

Přenášecí pipeta s jemnou špičkou:

Opatrné zatlačení trubice pipety oproti nasávacímu balónku umožní lepší kontrolu při pipetování.

Příslušenství potřebné pro provedení tohoto pokusu

- Agarózový gel o velikosti: 7 x 7 cm nebo 7 x 14 cm
- Počet kapes: 5
- Koncentrace agarózového gelu: 0,8%

Příprava agarózového gelu

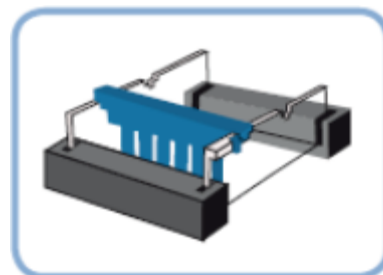
Otevřené konce čistého a suchého suportu pro gel uzavřete pryžovými čepičkami nebo lepicí páskou.

A. Použití pryžových čepiček:

Na každý konec suportu pro gel nasaďte jednu pryžovou čepičku a zajistěte, aby čepičky byly pevně spojeny se suportem.

B. Zalepení pomocí TESA pásky nebo lepicí pásky:

Konce suportu pro gel uzavřete páskou Tesa a pásku vedte dále přes boční strany a spodní okraj místa uložení. Přesahující okraje pásky zahněte.



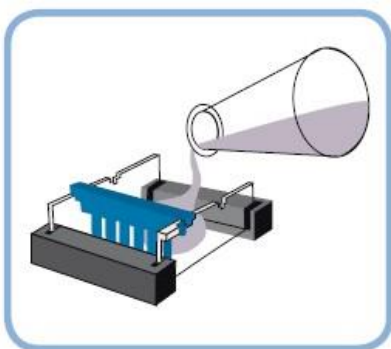
Hřeben zasuňte do připravených zářezů a dávejte pozor, aby byl dobře usazen.

Agarózu promíchejte v láhvi vhodné pro použití v mikrovlnné troubě:

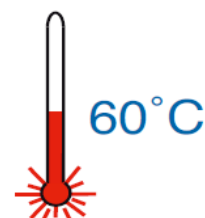
- 3 g agarózy UltraSpec
- 375 ml zředěného ústojného roztoku pro elektroforézu

Láhev obraťte, aby se složky promíchaly.

Láhev po několik minut zahřívejte v mikrovlnné troubě, poté ji znovu obraťte a celý postup opakujte, dokud se agaróza v ústojném roztoku nerozpustí. Pokud nemáte k dispozici mikrovlnnou troubu, můžete použít také autokláv nebo topnou desku.



POZOR – Agaróza je nyní horká a může přetéci (přehřátí kapaliny)! Před litím musíte nechat agarózový roztok ochladit na 60°C, jinak hrozí nebezpečí nevratného poškození gelové komory.



Agarózový roztok nechejte pomalu a opatrně vtéci do uzavřené gelové komory. Gel je hotový, jakmile je zcela vychlazený a mléčně kalný. Teprve nyní se odstraní pryžové čepičky (páska Tesa) a hřeben (opatrně: při tomto kroku může gel velice rychle vyklouznout ze suportu a je nutné začít znovu!)

Plnění vzorků

Tip: Pracujete-li na pracovním stole se světlým povrchem, měli byste si kvůli snazšímu naplnění gelu položit pod gel/kapsy tmavý papír.

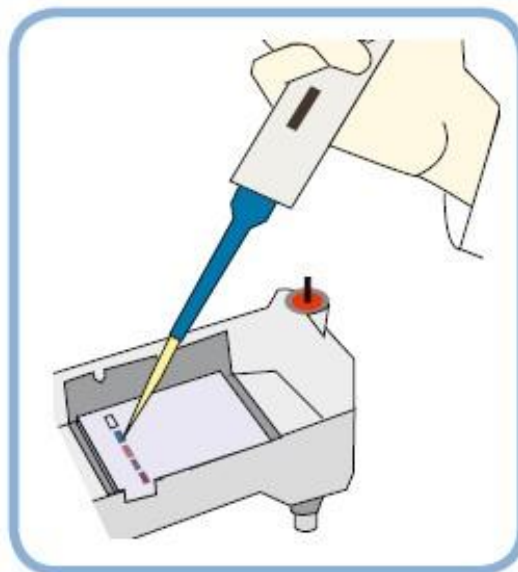
Plnění gelu za sucha

- Při použití Quickstrips musíte nejdříve čistou špičkou pinzety propíchnout fóliový kryt vzorku. Poklepejte na reakční zkumavku, aby se vzorek shromáždil dole ve zkumavce. Při práci s reakčními zkumavkami natáhněte vzorek mikro pipetou. Poklepejte na reakční zkumavku nebo proveďte několika sekundové odstředění zkumavky, tak aby se vzorek shromáždil dole v reakční zkumavce.
- Napiňte 40 µl vzorku A do gelové kapsy 1.

- Vyměňte špičku mikro pipety (nebo pipetu s mikro špičkou propláchněte v kádince s teplou vodou).
- Pokračujte s plněním vzorku do další gelové kapsy.
- Gel vložte do elektroforézní komory.
- Gel vkládejte do komory opatrně. Dávejte pozor, aby se gelové kapsy nacházely na záporném konci (černá elektroda (anoda)).
- OPATRNĚ a POMALU pokryjte gel zředěným ústojným roztokem pro elektroforézu. Dávejte pozor, aby se vzorky nevyplavily z gelových kapes.

Plnění gelu za mokra

- Opatrně vložte gel do komory. Dávejte pozor, aby se gelové kapsy nacházely na záporném konci (černá elektroda (anoda)).
- Gel pokryjte zředěným ústojným roztokem pro elektroforézu. Dávejte pozor, aby byl gel kompletně pokryt roztokem.
- Při použití Quickstrips musíte nejdříve čistou špičkou pinzety propíchnout fóliový kryt vzorku.
- Do gelové kapsy 1 naplňte 40 μ l vzorku A.
- Vyměňte špičku mikro pipety (nebo pipetu s mikro špičkou propláchněte v kádince s teplou vodou)
- Pokračujte s plněním vzorků do dalších gelových kapes.

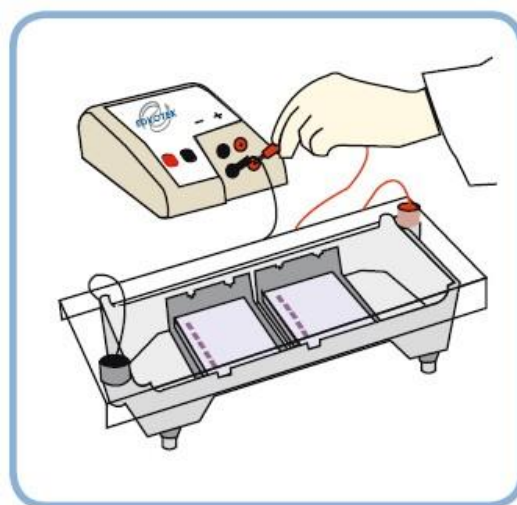


Tečení gelu

Nasadte víko na elektroforézní komoru a připojte ji na síťový zdroj. Příklad zapněte.

Zkontrolujte, zda se u červené kladné elektrody (katody) tvoří bubliny.

Tip: Pokud se bubliny netvoří, zkontrolujte spojovací kabel a ověřte, zda je přístroj připojen na síť. Gel nechte téci tak dlouho, dokud nebudou vzorky dobře oddělené.



Příslušné směrnice najdete níže. Nechte gel téci tak dlouho, dokud modré barvivo neproteče o něco více než polovinou gelu. Řiďte se přitom následujícími údaji:

Volt	M6 komora	M12 & HexaGel komora
150	15-20 minut	25-35 minut
125	20-30 minut	35-45 minut
75	35-40 minut	55-85 minut

Barvení gelu

S gelem nyní manipulujte maximálně opatrně, neboť je mimořádně kluzký. Na tuto pracovní operaci si vezměte rukavice!

Metoda 1: Jednofázové barvení a odbarvení pomocí papírků s metylénovou modří InstaStain®

Agarózové gely je možné jednoduše zbarvit a odbarvit pomocí InstaStain. Tento jednofázový postup se dá provést přes noc nebo během 3 hodin:

- Odstraňte 7x7 cm agarózového gelu ze suportu a ponořte ho do nádoby naplněné 75 ml destilované nebo deionizované vody nebo ústojným roztokem pro elektroforézu. Agarózový gel by měl být zcela ponořen do kapaliny.
- 7 x 7 cm papírku s metylénovou modří InstaStain® vložte do roztoku, tak aby modrá strana směřovala dolů.
- Gel ponechejte v klidu v kapalině po cca 3 hodiny. Gel se může zbarvit i přes noc, barvicí nádobu byste však měli zakrýt fólií, abyste zabránili vysychání.
- Po zbarvení a odbarvení je gel připraven pro zobrazení.



Uskladnění a likvidace papírků s metylénovou modří InstaStain® a gelů:

Gely se mohou skladovat v lednici po dobu několika týdnů. Vložte gel do uzavíratelného plastového sáčku s odbarvovací kapalinou. NEZMRAZUJTE! Použité papírky InstaStain® a odbarvené gely se likvidují společně s odpadem.

Tip: Pokud nejsou bandy po 30 minutách vidět, měli byste proces barvení zopakovat s novým barvicím papírkem. V tomto případě provádějte barvení přes noc (viz metoda 1)!

Metoda 2: Kapalinové barvení pomocí metylénové modři Plus™

Základní roztok 10x zřeďte smícháním 1 dílu roztoku s 9 díly destilované nebo deionizované vody.

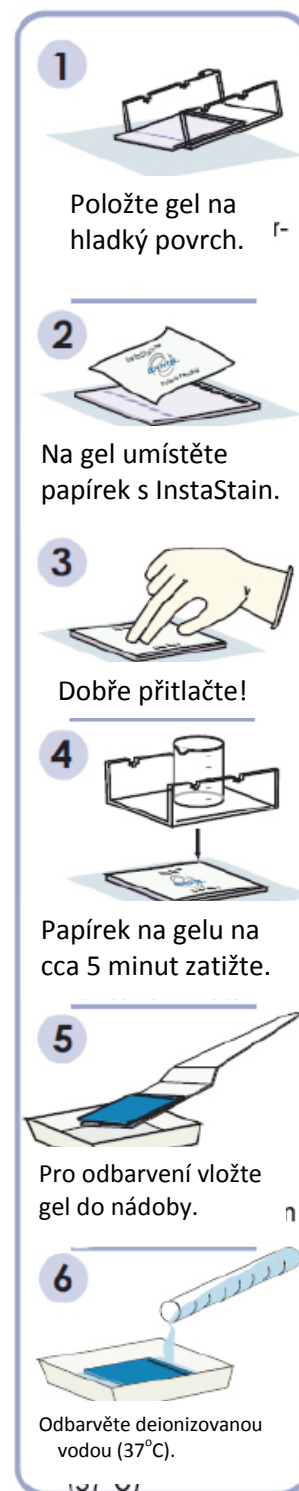
Odstraňte gel ze suportu a v barvicí nádobě ho při lehkém protřepání pokryjte na minimálně 30 minut směsí tvořenou 600 ml zředěného roztoku metylénové modři Plus™ a 600 ml destilované vody, kterou jste zahřáli na 37°C.

Poté roztok odstraňte a gel znovu na 15 minut pokryjte 600 ml destilované vody přehřáté na 37°C. Poté roztok vylijte a tento krok zopakujte ještě dvakrát.

Po druhém mytí by už měly být vidět první bandy. Gel můžete nechat odbarvit také přes noc, hrozí však větší nebezpečí, že bandy příliš vyblednou a bude nutné znovu zopakovat barvení.

Metoda 3: Barvení pomocí papírků s metylénovou modří Instastain®

- Vyjměte gel z lící formy.
- Papírek InstaStain položte na povrch gelu, tak aby modrá strana směřovala dolů.
- Prsty silně přejeďte přes povrch barvicího papírku, abyste vytlačili pryč případné bubliny mezi gelem a papírkem.
- Na papírek a gel položte lehké závaží (např. prázdnou kádinku).
- Počkejte 5 až 10 minut.
- Sejměte barvicí papírek z gelu a promývejte gel ve 100 ml teplé vody (37°C) tak dlouho, dokud nebudou vidět bandy (10 až 15 minut).



Odbarvení a zobrazení DNA

Vložte gel do barvicí nádoby.

V asi 100 ml destilované vody proveďte při občasném míchání odbarvení a podle potřeby vyměňujte vodu.

Větší DNA bandy se nejdříve zobrazí jako tmavě modré bandy oproti patrnému, světle modrému pozadí. Pokud je gel zcela odbarvený, zobrazí se celé pozadí ve velmi slabém, světle modrém odstínu a bandy budou nenápadnější a větší.

Opatrně odstraňte gel z roztoku a pozorujte ho na zobrazovacím systému s Bernsteinovým filtrem (rovněž je možné použít světelný panel s bílým světlem nebo projektor, bandy se však dají rozpoznat hůře).

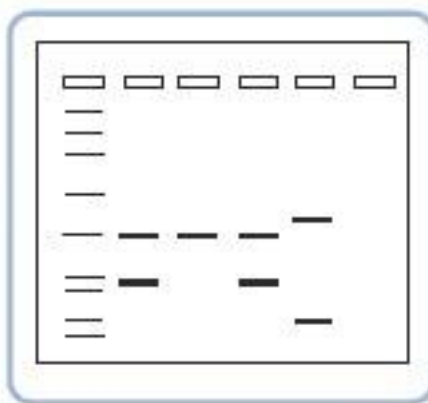
POZOR! Je-li gel příliš odbarvený, mizí menší bandy. V tom případě doporučujeme udělat dva snímky gelu (jeden snímek po prvním mytí, druhý po druhém mytí).

Výsledky

Na gelu byste měli vidět toto:



Photo of gel result



Schématické znázornění vpravo ukazuje polohu idealizovaných bandů – ve skutečnosti se může vzorek bandu zobrazit výrazně deformovaný.

Dotazy a řešení

1. Co je polymorfní DNA? Proč se používá pro zjištění totožnosti?
Termín polymorfní DNA se vztahuje k délce chromozomových regionů, které se člověk od člověka velmi liší. Pomocí rozboru řady těchto regionů je možné přiřadit k místům činu pohřešované osoby, lidské ostatky nebo vhodné podezřelé.
2. Co jsou CODIS?
CODIS je akronym počítačové databáze s DNA otisky prstů. V této databázi se nachází DNA profily osob odsouzených za těžké zločiny, které mohou být použity pro porovnání.
3. Co je STR? VNTR? Jaké (STR nebo VNTR) se převážně používají při trestním stíhání? Proč?
STR je akronym pro short tandem repeat, sekvenci DNA se 2-4 základními páry, které se variabilně opakují člověk od člověka. VNTR mají více opakujících se základních párů (15-70). STR se používají přednostně, protože je pro amplifikaci zapotřebí méně vzorků DNA.