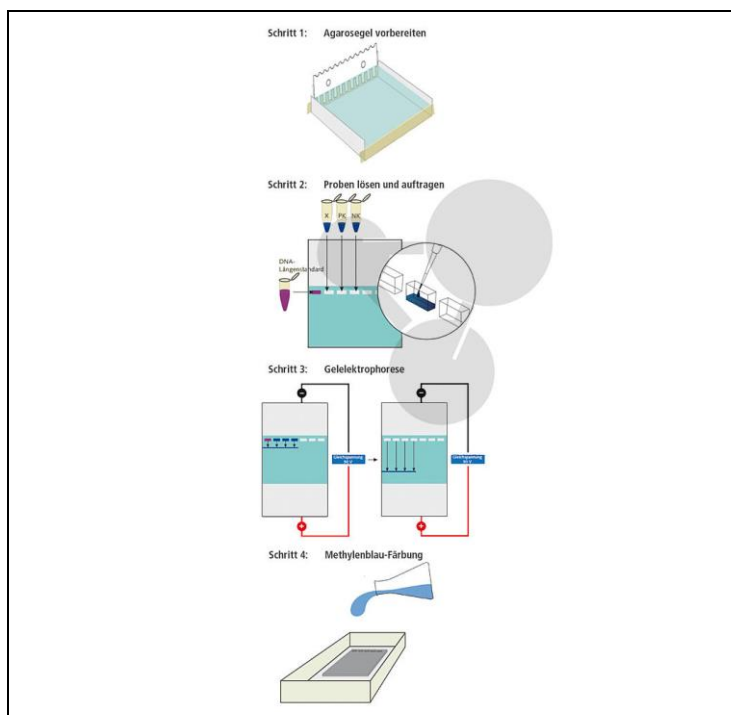


## Test otcovství pomocí polymerázové řetězové reakce

Kat. číslo 109.3131



### Cíl pokusu:

Cílem tohoto pokusného modulu je představit studentům použití mapování DNA při hypotetickém určování otcovství.

# Obsah

---

	Strana
Komponenty pro provedení pokusu	3
Požadavky na provádění pokusu	3
Základní informace	4
Postup provádění pokusu	
Popis experimentu	9
Modul I: Elektroforéza v agarózovém gelu	11
Modul II: Obarvení agarózového gelu	13
Studijní otázky	15
Návod pro učitele	16
Předlaboratorní příprava	17
Výsledky a analýza pokusu	19
Studijní otázky a odpovědi	20
Přílohy	21

Bezpečnostní listy k obsaženým materiálům je možné najít na našich internetových stránkách:  
**[www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)**

## Obsah pokusné sady

### READY-TO-LOAD™ VZORKY PRO ELEKTROFORÉZU

Všechny komponenty skladujte při pokojové teplotě.

#### Komponenty (ve formátu QuickStrip™)

- A Kalibrační genetický marker
- B Vzorek DNA matky s enzymem
- C Vzorek DNA dítěte s enzymem
- D Vzorek DNA otce č. 1 s enzymem
- E Vzorek DNA otce č. 2 s enzymem

#### Kontrola (√)

- 
- 
- 
- 
- 

Pokus č. 114 je navržen pro 8 gelů, které se obarvují barvivem FlashBlue™ nebo InstaStain® Blue (obě jsou obsažena v sadě), nebo pro 16 gelů barvených barvivem SYBR® Safe, nebo InstaStain® Ethidium Bromide (neobsaženými v sadě).

#### REAGENTY A MATERIÁLY

- UltraSpec-Agarose™
- Elektroforetický pufr (50x)
- 10x roztok k zavedení do gelu
- DNA barvivo FlashBlue™
- Karty InstaStain® Blue
- 1 ml pipeta
- Pipety s mikrošpičkou

- 
- 
- 
- 
- 
- 

Vzorky QuickStrip™ uložte do lednice ihned po dodání. Veškeré ostatní komponenty mohou být skladovány při pokojové teplotě.

## Požadavky

- Horizontální aparát pro gelovou elektroforézu
- Zdroj stejnosměrného proudu
- Automatické mikropipety se špičkami
- Váhy
- Mikrovlnná trouba, vařič, nebo kahan
- Pipetovací nástavec
- 250 ml kádinky nebo baňky
- Termoizolační rukavice
- Bezpečnostní brýle a jednorázové laboratorní rukavice
- Malé plastové tácy, nebo velká vanička (pro odbarvení gelu)
- Systém pro vizualizaci DNA (bílé světlo)
- Destilovaná, nebo deionizovaná voda

Všechny komponenty pokusné sady jsou určeny pouze pro účely vzdělávacího výzkumu. Nejsou určeny k použití pro diagnostické nebo farmaceutické účely, ani nejsou určeny pro podávání a konzumaci lidmi nebo zvířaty.

## Základní informace

Mapování genomu umožňuje určení zdroje vzorků DNA. Tato metoda se stala velmi důležitou v určování otcovství a při řešení kriminálních případů. Na rozdíl od tradičnějších metod, jako je například určení krevního typu, které jsou schopny pouze vyloučit podezřelého, je mapování genomu schopno poskytnout pozitivní identifikaci s velkou přesností.

Určování otcovství na základě analýzy DNA (mapování genomu) se stalo důležitým postupem pro určování biologických otců a matek dětí. Mezi příklad nedávných soudních případů, kde se tento postup využívá, patří únosy, incest, imigrace, spory o občanství dětí ve Spojených státech amerických a určování rodičů dětí při záměně novorozenců v porodnici. Tento typ zkoušky se také používá v případech válek, kdy jsou děti často odděleny od rodičů a následně se rodina znovu spojuje.

Při mapování genomu pro určení otcovství se analyzují vzorky získané od matky, dítěte a potencionálních otců. DNA dítěte je složeninou DNA jeho rodičů. Proto nám porovnání fragmentace DNA vzorků získaných pouze od matky a dítěte dává pouze částečnou shodu. Pruhy v genomové mapě dítěte, které nejsou přítomny v matčině mapě, musí pocházet od otce. Z důvodu alelických rozdílů musíme pruhy DNA obsažené v genomové mapě dítěte najít buď v genomové mapě otce, nebo matky.

Před objevením polymerázové řetězové reakce (PCR) zahrnovalo mapování genomu provedení elektroforetické analýzy velikostí fragmentů DNA vygenerovaných restrikčními enzymy s následným provedením Southernova přenosu. Restrikční enzymy jsou endonukleázy, které urychlují štěpení fosfátových vazeb v obou řetězcích DNA.

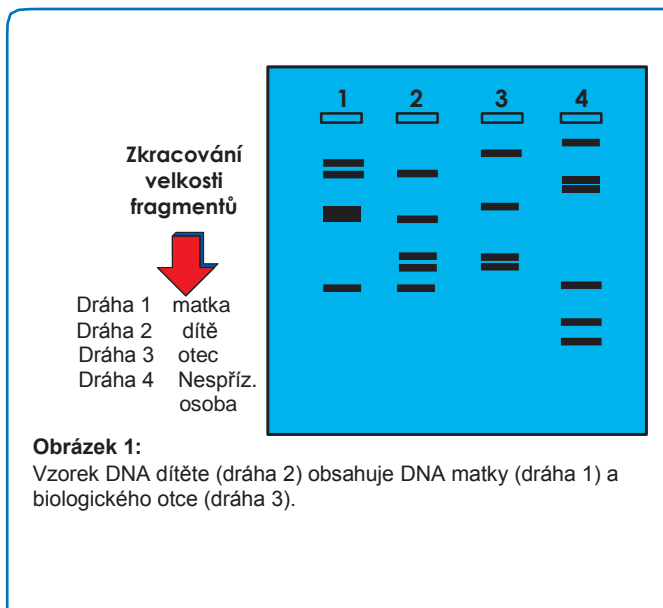
Potřebují Mg<sup>2+</sup> pro aktivitu a generují 5'-fosfát a 3'-hydroxylovou skupinu v místě štěpení.

Rozlišovací vlastností restrikčních enzymů je, že provádějí štěpení pouze ve velmi specifických sekvencích bází,

kterým se říká rozpoznávací (rekogniční) místa. Restrikční enzymy produkuje mnoho různých druhů bakterií (včetně sinic). Objevno a zkatologizováno bylo více než 3.000 restrikčních enzymů.

Názvosloví restrikčních enzymů vychází z názvů organismů, z nichž se izolují. První písmeno rodového jména následují dvě písmena druhového názvu.

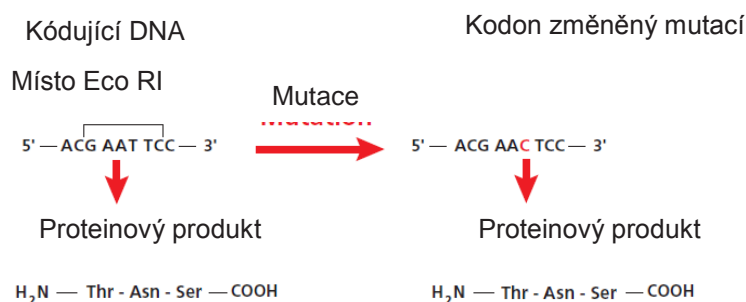
Pouze některé kmeny nebo podkmeny určitých druhů mohou být producenty restrikčních enzymů. Typ kmenu nebo podkmenu se někdy v názvu řadí za označení druhu.





Příklad zobrazený na obrázku 3 ukazuje, jak může tichá mutace vymazat rozpoznávací místo, ale nechat proteinový produkt nezměněný. Jednotlivé odchylky ve vzdálenostech mezi rozpoznávacími místy v chromozomální DNA jsou často způsobeny zasahujícími repetitivními sekvencemi bází.

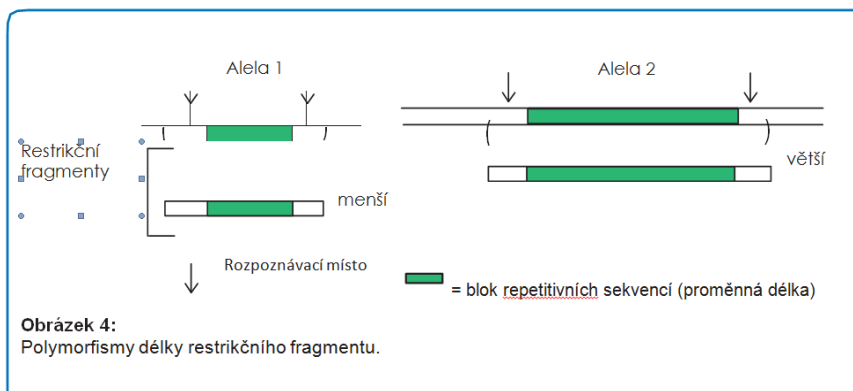
Repetitivní sekvence tvoří velkou frakci savčího genomu a nemají žádnou známou genetickou funkci. Tyto sekvence se mohou vyskytovat mezi geny, nebo k nim přiléhat. Také se vyskytují v intronech. Deset až patnáct procent DNA savců se skládá ze sad repetitivních, krátkých sekvencí bází, které jsou tandemově uspořádané v blocích. Délka těchto bloků (množství repetitivních sad) se mezi jednotlivci v různých chromozomálních lokusech liší.



**Obrázek 3:**  
Důsledek tiché mutace proteinu.

TGTTTA | TGTTTA | TGTTTA | .....proměnné číslo

Pokud jsou tyto bloky obklopené rozpoznávacími místy, potom délka repetice určuje velikost fragmentu vytvořeného restrikčním enzymem. Rozdíly v délkách těchto fragmentů mezi jednotlivci v populaci jsou známé jako polymorfismus délky restrikčního fragmentu (RFLP). U všech 23 chromozómů bylo zmapováno několik stovek RFLP. RFLP je projevem unikátního genetického profilu nebo "mapy" DNA jednotlivce. Jak je to ukázáno na obrázku 4, existuje několik typů těchto krátkých repetitivních sekvencí, které se klonovaly a čistily. V Southernově přenosu se použijí DNA sondy pro zjištění délkových rozdílů mezi těmito repetitivními sekvencemi. DNA sondy jsou krátké fragmenty jednořetězcové DNA, které jsou izotopicky nebo neizotopicky označeny. DNA sondy se doplní a hybridizují (připojí) do jednořetězcové DNA. Southernův přenos vyžaduje elektroforézu, denaturaci DNA fragmentů, přenos DNA na membránu a aplikaci sond pro zjištění mapy genomu.



**Obrázek 4:**  
Polymorfismy délky restrikčního fragmentu.

Pro genetickou identifikaci se běžně používají dva typy sond. Jedno-locusové sondy (SLP), které detekují jeden segment repetitivní DNA na specifickém místě na jednom chromozomu. Výsledkem budou jeden, nebo dva pruhy DNA odpovídající jednomu nebo oběma rozpoznávaným segmentům chromozomů. Pokud jsou segmenty na chromozomových párech stejné, výsledkem bude jeden pruh. Pokud se ale liší, objeví se jako dva pruhy. K dispozici je několik SLP a používají se méně často, protože více než jedna osoba může mít přesně stejný vzorec pro určitou SLP. Více-locusové sondy (MLP) detekují několik repetitivních segmentů DNA na mnoha chromozómech a výsledkem je 20 - 30 pruhů. Protože tento vzorec má mnoho pruhů, je pravděpodobnost, že dvě náhodně zvolené osoby budou mít stejný vzorek, enormně nízká. Například se počítá, že pravděpodobnost nalezení dvou osob, které nejsou v příbuzenském poměru, a které mají stejný vzorek DNA detekovaný MLP, je v průměru 1 ku 30 miliardám. Je nutné mít na paměti, že celá lidská populace čítá 5 až 6 miliard.

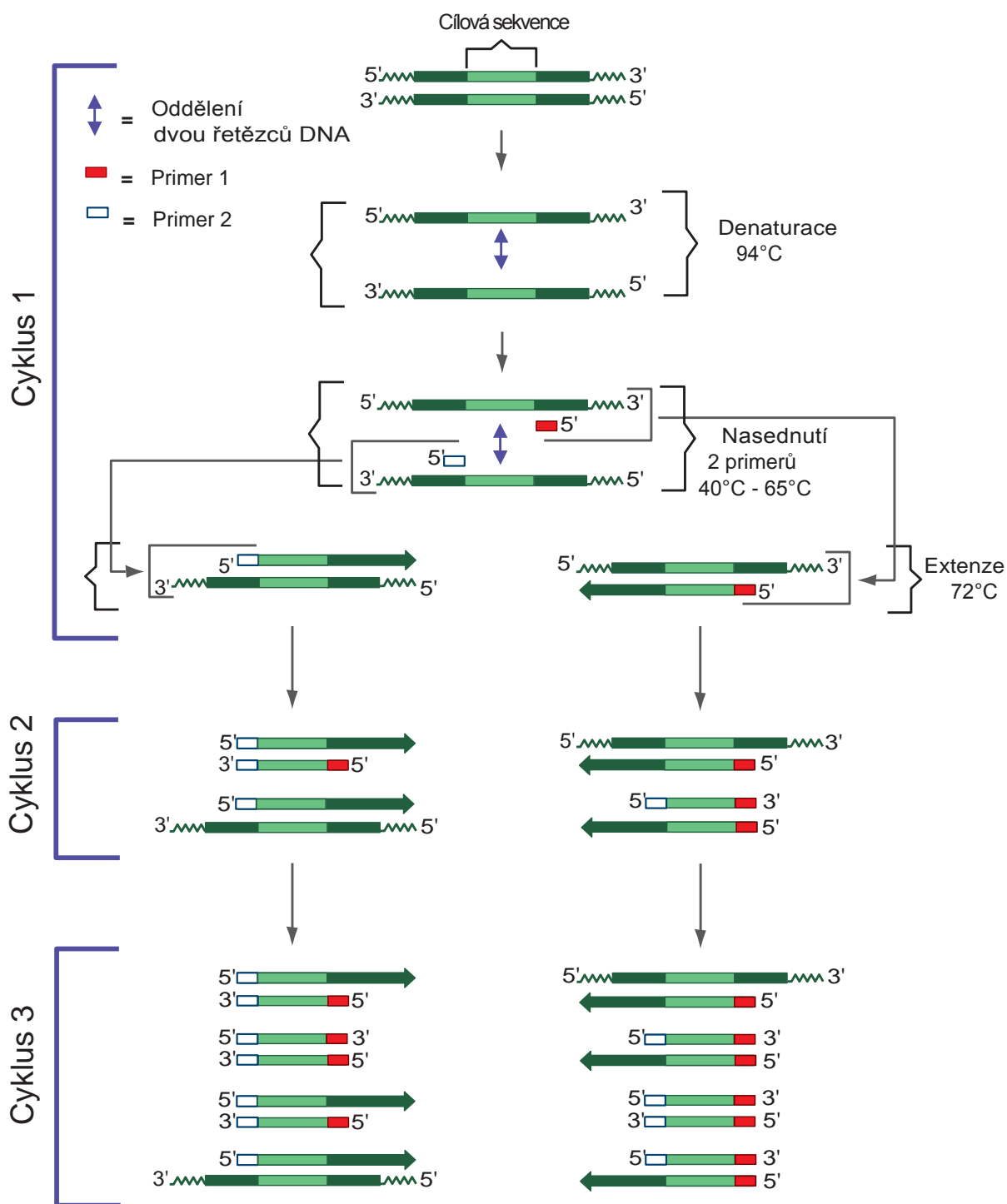
V současné době se ve forenzním lékařství pro analýzu DNA používá polymerázová řetězová reakce (PCR) (obrázek 4). Tato technika vyžaduje pětsetkrát méně DNA než Southernův přenos RFLP a není tak časově náročná. Amplifikace PCR (obrázek 5) využívá enzym známý jako Taq DNA polymeráza. Tento enzym byl původně získán z bakterie, která se vyskytuje v horkých pramenech a je stabilní za velmi vysokých teplot (téměř na bodu varu). Reakční směs PCR také obsahuje dva syntetické oligonukleotidy známé jako "primery" a extrahovanou DNA. Části DNA určené k amplifikaci se říká "cíl".

V prvním kroku reakce PCR se od sebe navzájem oddělí (denaturují) komplementární řetězce templátové DNA při teplotě 94 °C, zatímco polymeráza Taq zůstává stabilní. V druhém kroku, kterému se říká annealing (nasednutí primerů), se vzorek zchladí na 40 - 65 °C, aby mohlo dojít k hybridizaci dvou primerů, jeden ke každému ze dvou řetězců templátové DNA. Ve třetím kroku, známém jako syntéza DNA (extenze), se teplota zvýší na 72 °C a polymeráza Taq přidá nukleotidy do primerů pro syntetizaci nových komplementárních řetězců. Tyto tři kroky - denaturace, nasednutí primerů a extenze - tvoří cyklus PCR. Tento proces se typicky opakuje ve 20 až 40 cyklech a cílová sekvence v DNA se exponenciálně amplifikuje (Obrázek 5). PCR se provádí v termocykleru, což je přístroj, který je naprogramován k rychlému zahřívání, chlazení a udržování vzorků na určené teplotě po různou dobu. Produkty PCR se oddělí elektroforézou v agarózovém gelu a provede se analýza mapy genomu.

Ve forenzních oborech a při určování otcovství z DNA se metoda PCR používá pro amplifikaci a vyšetřování vysoce variabilních (polymorfních) regionů DNA. Jedná se o regiony, které se svojí délkou u jednotlivců liší a rozdělují se do dvou kategorií: 1) proměnný počet tandemových repetice (VNTR) a 2) krátké tandemové repetice (STR). VNTR je region, který se variabilně skládá ze sekvence 15-70 párů bází, s typickou repeticí 5 - 100 krát. STR se podobá VNTR, až na to, že opakované jednotky jsou dlouhé pouze 2 - 4 nukleotidy. Zkoumáním několika různých VNTR nebo STR od stejného jednotlivce vyšetřovatelé získají unikátní profil DNA daného jednotlivce, přičemž je nepravděpodobné, že by se vyskytoval u jiné osoby (kromě jednovaječných dvojčat).

Pro tento simulační experiment byla DNA získána ze vzorků odebraných od matky, potomka a dvou možných otců. Cílem experimentu je provést analýzu vzorků fragmentů DNA po elektroforéze v agarózovém gelu a určit, zda je biologickým otcem potomka Otec 1, nebo Otec 2.

TENTO EXPERIMENT NEOBSAHUJE LIDSKOU DNA.



**Obrázek 5:**  
Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí



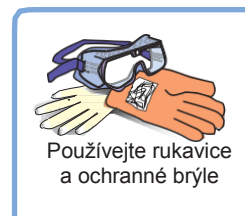
## Popis experimentu

### CÍL POKUSU:

Cílem tohoto pokusného modulu je představit studentům použití mapování DNA při hypotetickém určování otcovství.

### LABORATORNÍ BEZPEČNOST

1. Dobrou laboratorní praxí je používání ochranných rukavic a brýlí.
2. Při práci se zařízením používaným s reagenty způsobujícími zahřívání a/nebo tavení pracujte extrémně opatrně.
3. **NEPOUŽÍVEJTE ÚSTA PŘI NASÁVÁNÍ REAGENTŮ DO PIPET - POUŽIJTE PIPETOVÉ NÁSTAVCE.**
4. Při používání elektrických zařízení v laboratoři buďte opatrní.
5. Po manipulaci s reagenty nebo biologickými materiály v laboratoři si vždy pečlivě umyjte ruce mýdlem a vodou.



### LABORATORNÍ DENÍK:

Vědci dokumentují vše, co se během experimentu odehrává, včetně podmínek provádění experimentu, myšlenek a pozorování při provádění experimentu a samozřejmě jakákoli zjištěná data. Dnes budete dokumentovat váš experiment do laboratorního deníku, nebo na samostatný pracovní list.

### Než začnete s experimentem:

- Pečlivě si přečtěte úvod a protokol. Tyto informace použijte pro vypracování hypotézy pro tento experiment.
- Predikujte výsledek vašeho experimentu.

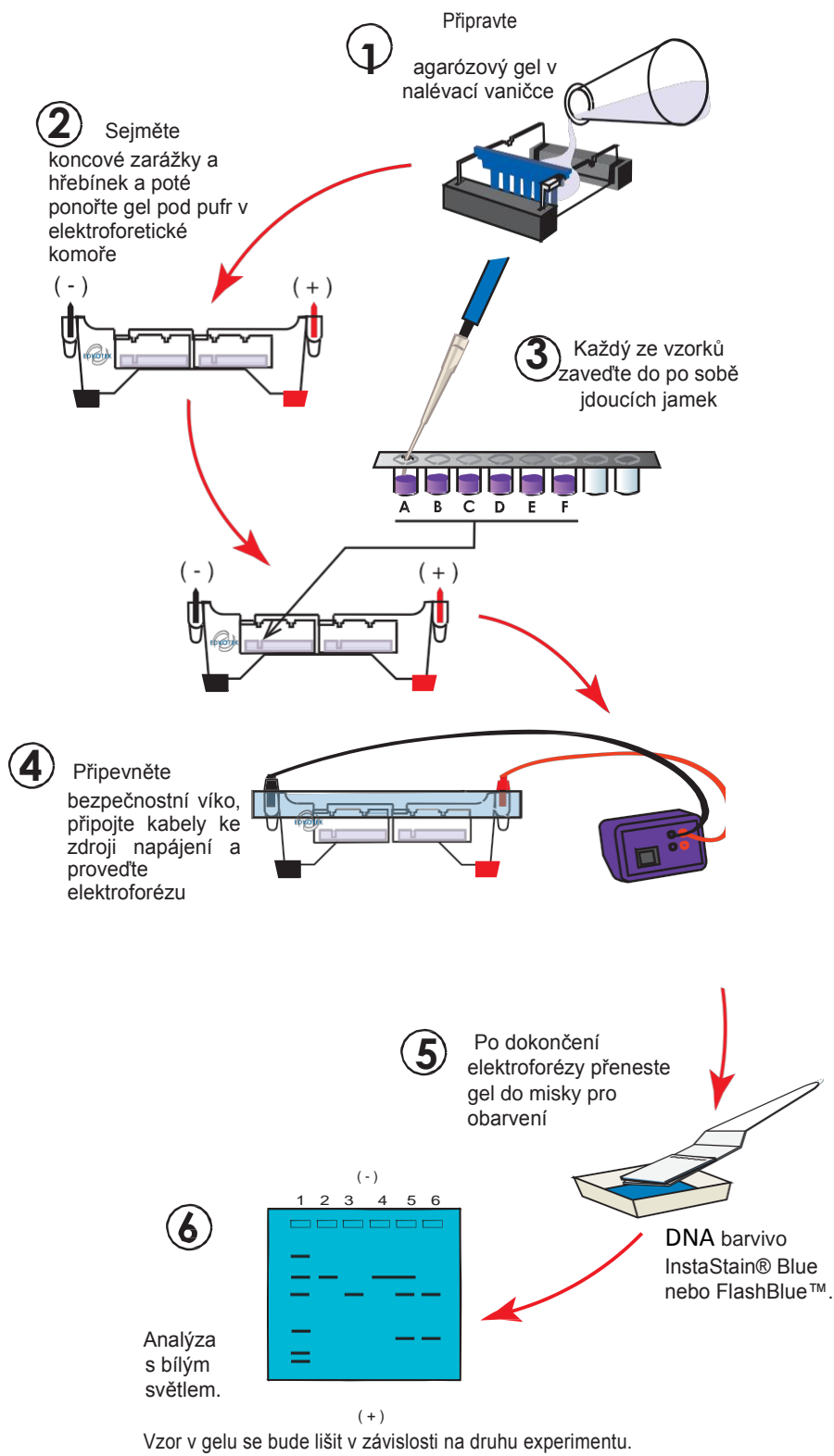
### Během experimentu:

- Zaznamenávejte si vaše pozorování.

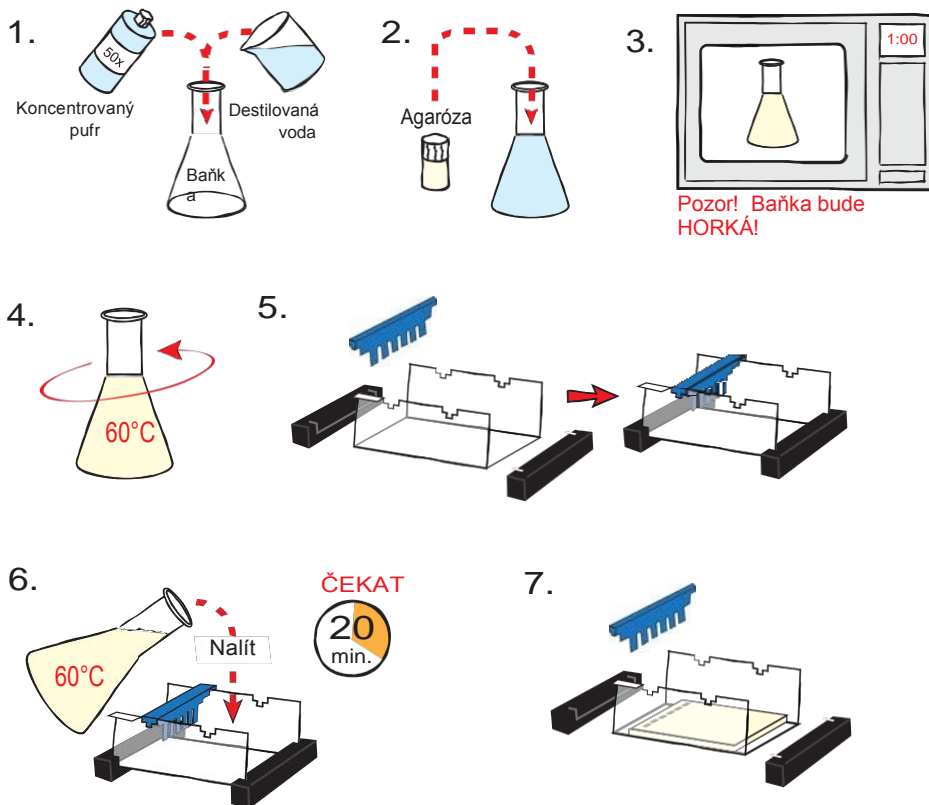
### Po dokončení experimentu:

- Proved'te výklad výsledků - podporují, nebo vyvracení získaná data vaši hypotézu?
- Kdybyste tento experiment opakovali, co byste změnili? Proved'te úpravu vaší hypotézy tak, aby odpovídala takové změně.

**Popis experimentu**



## Modul I: Elektroforéza v agarózovém gelu



### DŮLEŽITÉ:

Pokud neumíte připravit agarózový gel a provést elektroforézu, podrobné pokyny a užitečné zdroje informací najdete na stránkách [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)



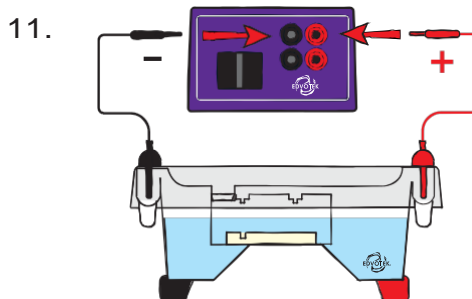
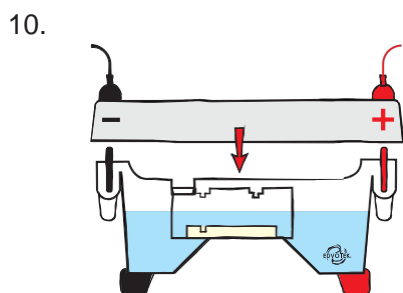
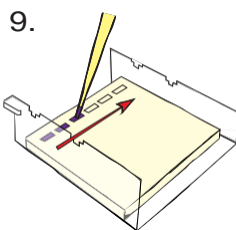
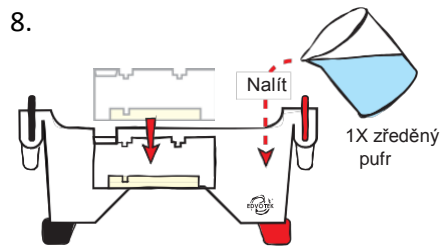
Používejte rukavice a ochranné brýle

1. **ZŘEĎTE** koncentrovaný (50X) pufr destilovanou vodou, abyste získali 1X pufr (viz Tabulka A).
2. **SMÍCHEJTE** agarózový prášek s 1X pufrům v 250 ml baňce (viz Tabulka A).
  - a. **ROZPUSŤTE** agarózový prášek vařením roztoku. Roztok **OHŘÍVEJTE V MIKROVLNNÉ TROUBĚ** na vysoký výkon po dobu 1 minuty. Opatrně **VYJMĚTE** baňku z mikrovlnné trouby a **protřepejte**. Pokračujte v **OHŘÍVÁNÍ** roztoku v 15 sekundových intervalech až do kompletního rozpuštění agarózy (roztok by měl být čirý jako voda).
3. **ZCHLAĎTE** agarózu na 60 °C. Opatrně protřepejte pro rovnoměrné ochlazování.
4. Zatímco agaróza chladne, **UTĚSNĚTE** konce nalévací vaničky pomocí koncových gumových zářezek. **UMÍSTĚTE** šablonu pro vytvoření jamek (hřebínek) do příslušné drážky.
5. **NALIJTE** zchlazenou agarózu do takto připravené nalévací vaničky. Gel by měl dobře ztuhnout do 20 minut. Gel ztuhne a při tuhnutí se stane méně průhledným.
6. **VYJMĚTE** koncové zářezky a hřebínek. Při vyjímání hřebínku buďte zvlášť opatrní, abyste nepoškodili jamky.

**ČEKAT**  
20 min.

Tabulka A	Vlastní 0,8% UltraSpec-Agarose™ Gel			
Velikost nalévací vaničky	Koncentrovaný pufr (50x)	Destilovaná voda	Množství agarózy	CELKOVÝ objem
7 x 7 cm	0,6 ml	29,4 ml	0,23 g	30 ml
7 x 10 cm	1,0 ml	49,0 ml	0,39 g	50 ml
7 x 14 cm	1,2 ml	58,8 ml	0,46 g	60 ml

**Modul I: Elektroforéza v agarózovém gelu**



**Pamatujte:**  
Před zavedením vzorků se ujistěte, že gel je správně orientovaný ve vaně přístroje.

8. **DEJTE** gel (ve vaničce) do elektroforetické vany. **POKRYJTE** gel 1X elektroforetickým pufr (doporučená množství viz Tabulka B). Gel by měl být zcela ponořen.
9. **ZAVEĎTE** celé množství vzorku (35-38  $\mu$ l) do jamky v pořadí uvedeném v Tabulce 1 napravo.
10. **UMÍSTĚTE** bezpečnostní víko. **ZKONTROLUJTE** správnou orientaci gelu. Pamatujte, že vzorky DNA budou migrovat směrem ke kladné (červené) elektrodě.
11. **PŘIPOJTE** kabely ke zdroji elektrického proudu a **PROVEĎTE** elektroforézu (pokyny k hodnotám aplikovaného napětí a časech elektroforézy najdete v tabulce C).
12. Po dokončení elektroforézy **VYJMĚTE** gel a nalévací vaničku z elektroforetické vady a přistupte k **BARVENÍ** agarózového gelu.

Tabulka 1: Zavádění vzorků do gelu		
Dráha 1	Zkumavka A	Kalibrační genetický marker
2	Zkumavka B	Vzorek DNA matky s enzymem
3	Zkumavka C	Vzorek DNA dítěte s enzymem
4	Zkumavka D	Vzorek DNA otce č. 1 s enzymem
5	Zkumavka E	Vzorek DNA otce č. 2 s enzymem

Tabulka B 1 x elektroforetický pufr (vanový pufr)			
Č. modelu -EVOTEK	Celk. objem	Ředění 50x pufr + destilovaná voda	
M6+	300 ml	6 ml	294 ml
M12	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

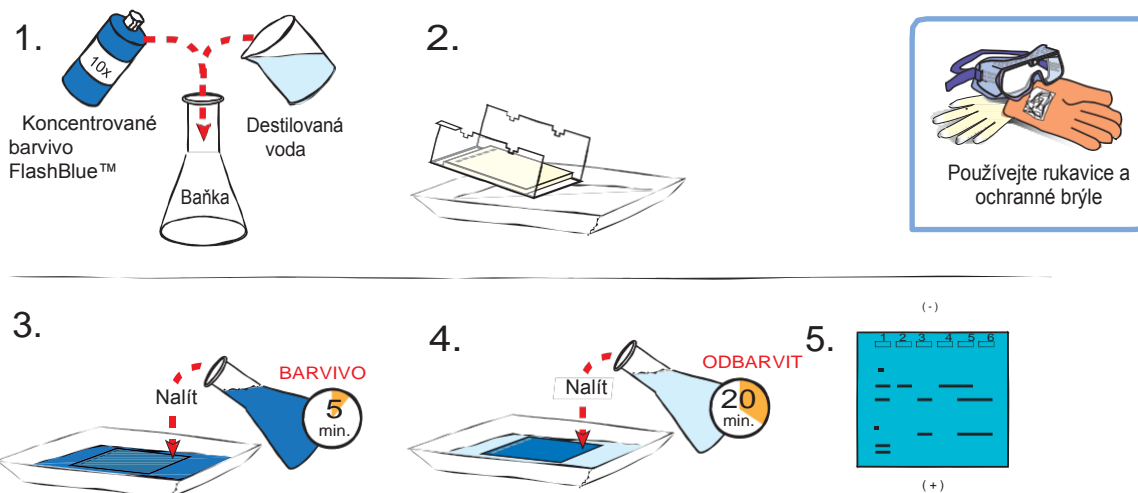
Tabulka C Aplikované napětí a časy působení (0,8% agarózový gel)		
Voltů	Elektroforetický model M6+ M12 a M36	
	Min./Max.	Min./Max.
150	15/20 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	60 / 90 min.

CONATEX – DIDACTIC UČEBNÍ POMŮCKY s.r.o. – Velvarská 31 – 160 00 Praha 6

Tel.: 224 310 671 – Tel./Fax: 224 310 676

Email: conatex@conatex.cz – http: www.conatex.cz

## Modul II-A: Obarvení agarózového gelu pomocí

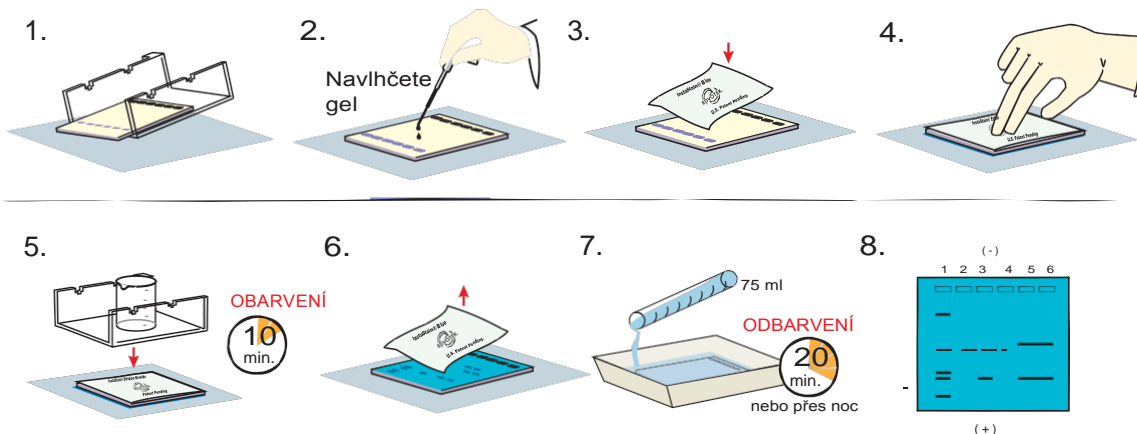


- NAŘEĎTE** 10 ml 10x koncentrovaného barviva FlashBlue™ přidáním 90 ml vody do baňky a dobře **PROMÍCHEJTE**.
- VYJMĚTE** agarózový gel a nalévací vaničku z elektroforetické vany. **VYSUŇTE** gel z nalévací vaničky do malé čisté misky pro barvení gelu.
- POKRYJTE** gel 1x roztokem barviva FlashBlue™. **BARVĚTE** gel po dobu 5 minut. Pro dosažení nejlepšího výsledku použijte orbitální míchačku (orbital shaker), která bude jemně míchat gel při barvení. **PŘI BARVENÍ GELU PO DOBU DELŠÍ NEŽ 5 MINUT BUDE NUTNÉ PRODLOUŽIT DOBU ODBARVOVÁNÍ.**
- PŘENEŠTE** gel do druhé malé misky. **ZALIJTE** gel vodou. **ODBARVUJTE** gel nejméně po dobu 20 minut při jemném třepání (čím déle budete odbarvovat, tím lepší bude výsledek). Častým vyměňováním vody odbarvování urychlíte.
- Opatrně **VYJMĚTE** gel z odbarvovací kapaliny. **VIZUALIZUJTE** výsledek pomocí vizualizačního systému s bílým světlem. DNA se zobrazí jako tmavě modré pruhy na světle modrém pozadí.

### Alternativní protokol:

- ZŘEĎTE** jeden ml koncentrovaného barviva FlashBlue™ přidáním 149 ml destilované vody.
- POKRYJTE** gel zředěným roztokem barviva FlashBlue™.
- PONECHTE** gel **namočený** v barvicí kapalině nejméně po dobu tří hodin. Pro dosažení nejlepšího výsledku nechte gel obarvovat přes noc.

## Modul II-B: Obarvení agarózového gelu pomocí barviva InstaStain®



- Opatrně **VYJMĚTE** agarózový gel a nalévací vaničku z elektroforetické vany. **VYSUŇTE** gel z nalévací vaničky na plastovou fólii umístěnou na rovném povrchu.
- NAVLHČETE** gel několika kapkami elektroforetického pufru.
- Navlékněte si rukavice a **POLOŽTE** barvicí kartu InstaStain® Blue modrou stranou na gel.
- Rukou v rukavici **VYTLAČTE** vzduchové bubliny mezi kartou a gelem pevným tahem prstů po celém povrchu karty. Pokud to neuděláte, místa s bublinami se neobarví.
- Na gel s kartou **POLOŽTE** nalévací vaničku. Na nalévací vaničku **POLOŽTE** malé závaží (např. prázdnou skleněnou kádinku). Tak bude zajištěn přímý kontakt karty InstaStain® Blue s povrchem gelu. **BARVĚTE** gel po dobu 10 minut.
- SEJMĚTE** kartu InstaStain® Blue. Pokud vám barva gelu připadá příliš světlá, vraťte kartu InstaStain® Blue na gel na dalších pět minut.
- PŘENEŠTE** gel do malé, čisté misky pro barvení gelu. **ZALIJTE** gel přibližně 75 ml destilované vody a **ODBARVUJTE** ho nejméně po dobu 20 minut. Pro dosažení nejlepšího výsledku použijte orbitální míchačku (orbital shaker), která bude jemně míchat gel při barvení. Pro urychlení odbarvení ohřejte destilovanou vodu na 37 °C a často ji vyměňujte.
- Opatrně **VYJMĚTE** gel z odbarvovací kapaliny. **VIZUALIZUJTE** výsledek pomocí vizualizačního systému s bílým světlem. DNA se zobrazí jako tmavě modré pruhy na světle modrém pozadí.



**POZNÁMKA:**  
**NIKDY NEBARVĚTE**  
**GEL V**  
**ELEKTROFORETICKÉM**  
**APARÁTU.**

### ALTERNATIVNÍ PROTOKOL:

- Opatrně **VYSUŇTE** agarózový gel do malé, čisté misky obsahující přibližně 75 ml destilované/ deionizované vody, nebo použitého elektroforetického pufru. Gel by měl být zcela ponořen.
- Jemně **POLOŽTE** kartu (karty) InstaStain® Blue na hladinu kapaliny barevnou (modrou stranou) směrem ke gelu. Každá karta InstaStain® Blue obarví 49 cm<sup>2</sup> gelu (7 x 7 cm).
- ZAKRYJTE** misku plastovou fólií, aby se zabránilo vypařování. **PONECHTE** gel **namočený** v barvicí kapalině nejméně po dobu tří hodin. Pokud je to nezbytné, může gel zůstat v kapalině přes noc.
- Opatrně **VYJMĚTE** gel z barvicí misky. **VIZUALIZUJTE** výsledek pomocí vizualizačního systému s bílým světlem. DNA se zobrazí jako tmavě modré pruhy na světle modrém pozadí.



## Studijní otázky

---

1. Proč mají různí jednotlivci, jako například sourozenci, různá rozpoznávací místa restrikčních enzymů?
2. Jakou funkci mají PCR primery používané v analýze DNA pro určení otcovství?
3. Proč se ve skutečných testech otcovství používá více než jeden lokus?
4. Proč v této simulaci testu otcovství dosáhneme výsledku, i když nepoužíváme sondy?

# Pokyny pro instruktora

## PŘÍPRAVA:

Příprava na:	Jak postupovat:	Kdy?	Potřebný čas:
Modul I: Elektroforéza v agarózovém gelu	Připravte QuickStrips™	Až jeden den před prováděním experimentu	45 min.
	Připravte zředěný TAE pufr		
	Připravte rozpuštěnou agarózu a lité gely		
Modul II: Obarvení agarózového gelu	Připravte jednotlivé komponenty na barvení	Na vyučovací hodině, nebo přes noc po vyučovací hodině	10 min.



## Předlaboratorní příprava Modul I

### ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU

Pro tento experiment potřebujete 0,8% agarózový gel pro každou skupinu studentů. Gel můžete připravit dopředu, nebo nechat studenty, aby si připravili vlastní. Na tento postup potřebujete přibližně 30 až 40 minut.

#### Vlastní příprava gelu:

Každá skupina studentů může mít na starosti lití jejich vlastního gelu před provedením experimentu. Prostudujte si Modul I v Popisu postupu experimentu pro studenty. Studenti budou potřebovat 50x koncentrovaný pufr, destilovanou vodu a agarózový prášek.

#### Hromadná příprava gelu:

Pokud chcete ušetřit čas, je možné připravit větší množství agarózového roztoku, který rozdělíte mezi studenty ve třídě. Viz příloha B.

#### Předběžná příprava gelu:

Gely je možné připravit předem a uložit na pozdější použití. Ztuhnuté gely je možné skladovat pod pufrům v lednici až dva týdny.

Gely nezmrazujte při teplotě - 20 °C, mráz by je poničil.

Gely, které byly vyjmuty z nalévacích vaniček ke skladování, by měly být "ukotveny" zpět k vaničce několika kapkami rozpuštěné agarózy aplikovanými před vložením gelu zpět do vaničky. Tím se zabrání pohybu gelu ve vaničce.

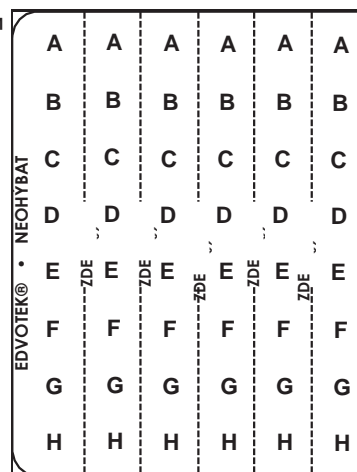
### FORMA VZORKU: PŘÍPRAVA VZORKŮ QUICKSTRIPS™

Zkumavky QuickStrip™ se skládají z mikrotitrových bloků pokrytých ochrannou vrstvou. Každá jamka obsahuje předem dělenou DNA.

Pomocí ostrých nůžek opatrně oddělte bloky zkumavek na jednotlivé pruhy tak, že je rozstříháte mezi jednotlivými řádky (viz nákres vpravo). Buďte opatrní, abyste při oddělování vzorků nepoškodili ochranné překrytí.

Každá laboratorní skupina dostane jednu sadu zkumavek. Před zavedením vzorků do gelu připomeňte studentům, aby pokleпали na zkumavky a sklepli tak vzorky na jejich dno.

Pokud pro vizualizaci DNA použijete barvivo SYBR® Safe nebo InstaStain® Ethidium Bromide, budou každý QuickStrip™ sdílet dvě skupiny. Do každé jamky se zaveďte 18 µl vzorku DNA. Přistupte k vizualizaci výsledků, jak je to specifikováno v literatuře o barvení DNA.



Opatrně stříhejte mezi každou sadou zkumavek

#### POZNÁMKA:

Pro maximalizaci výsledku experimentu je důležité přesné pipetování. Experimenty EDVOTEK Série 100 jsou navrženy pro studenty, kteří mají předchozí zkušenost s technikami mikropipetování a elektroforézou v agarózovém gelu.

Pokud studenti neumí používat mikropipety, doporučujeme provést cvičení kat. č. S-44, Základy mikropipetování, nebo kat. č. S-43, DNA DuraGel™ před uskutečněním tohoto experimentu pro pokročilou úroveň.

#### PRO MODUL I Každá skupina studentů obdrží:

- 50x koncentrovaný pufr
- Destilovanou vodu
- UltraSpec-Agarose™
- Vzorky QuickStrip™

## Předlaboratorní příprava Modul II

### Modul II-A: BARVENÍ POMOCÍ BARVIVA INSTASTAIN® BLUE

Nejsnadněji a nejpohodlněji použitelné DNA barvivo je InstaStain® Blue. InstaStain® Blue nevyžaduje přípravu, skladování a likvidaci velkých objemů kapalného barviva. Každá karta InstaStain® Blue obsahuje malé množství modrého DNA barviva. Při položení karty do vody se DNA barvivo uvolní. Tento roztok zároveň obarvuje i odbarvuje gel a zajišťuje jednotné obarvení gelu s minimálním množstvím kapalných odpadů a nečistot.

Pro vizualizaci gelů obarvených InstaStain® Blue můžete použít vizualizační systém White Light Visualization System (kat. č. 552).

### Modul II-B: BARVENÍ POMOCÍ BARVIVA FLASHBLUE™

Barvivo FlashBlue™ je optimalizované pro zkrácení doby potřebné pro kroky obarvení a odbarvení. Agarózový gel je možné obarvit zředěným barvivem FlashBlue™ za 5 minut a odbarvit za pouhých 20 minut. Pro dosažení nejlepšího výsledku nechte gel v tekutině přes noc. Tím umožníte obarvenému gelu se v odbarvovacím roztoku dostat do rovnováhy, čímž získáte kontrastní modré pruhy DNA na rovnoměrně světle modrém pozadí. Pro prohlížení gelů obarvených barvivem FlashBlue™ se doporučuje bílý světelný box (kat. č. 552).

- Obarvené gely je možné skladovat v odbarvovací tekutině několik týdnů v lednici, ale pruhy mohou časem vyblednout. Pokud se to stane, obarvěte gel znovu.
- Odbarvené gely je možné likvidovat s pevnými odpady. Odbarvovací roztoky je možné vylévat do kanalizace.

### MODUL II: FOTODOKUMENTACE DNA (volitelné)

Po obarvení gelů si můžete výsledky vyfotografovat. K dispozici je mnoho různých fotodokumentačních systémů, včetně digitálních, které mají rozhraní přímo s počítačem. Konkrétní instrukce se budou lišit podle typu používaného fotodokumentačního systému.

#### PRO MODUL II-A

obdrží každá skupina studentů:

- 1 kartu InstaStain® pro každý gel 7 x 7 cm



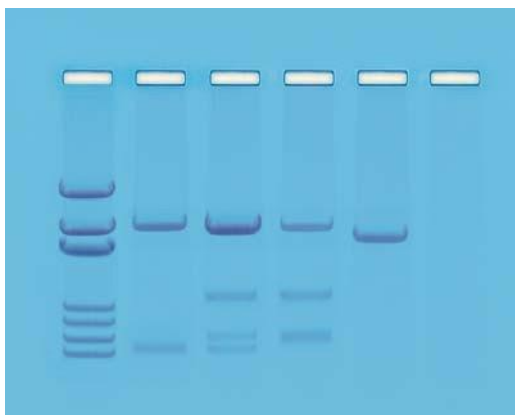
Používejte rukavice a ochranné brýle

#### PRO MODUL II-B

obdrží každá skupina studentů:

- 10 ml 10X konc. barviva FlashBlue, nebo 100 ml 1x ředěného barviva FlashBlue
- malou plastovou misku, nebo váhovou misku
- Destilovanou, nebo deionizovanou vodu

## Výsledky a analýza pokusu



Relativní pozice fragmentů DNA jsou zobrazeny v idealizovaném schématu, ale nejsou ukázány v měřítku.

Dráha	Zkumavka	Vzorek	Molekulární hmotnost (v bp)
1	A	Kalibrační DNA markery	-----
2	B	Vzorek DNA matky s enzymem	3652, 630
3	C	Vzorek DNA dítěte s enzymem	3652, 1300, 700, 630
4	D	Vzorek DNA otce č. 1 s enzymem	3652, 1300, 700
5	E	Vzorek DNA otce č. 2 s enzymem	3000

Rodičovství (tady mateřství a otcovství) je možné stanovit z profilu DNA potomka. Porovnáním profilu DNA matky a jejího potomka je možné identifikovat fragmenty DNA u dítěte, které chybí v DNA matky. Tyto polymorfismy byly zděděny po biologickém otci. V tomto případě dva pruhy v profilu DNA potomka, které nevysvětluje profil matky, nalezneme v profilu otce č. 1.



# Přílohy

---

- A Návod k řešení problémů
- B Hromadná příprava agarózového gelu
- C Analýza dat pomocí kalibrační křivky

## Příloha A

### Návod k řešení problémů

PROBLÉM:	PŘÍČINA:	ŘEŠENÍ:
<b>V gelu nejsou viditelné pruhy.</b>	Gel nebyl správně připravený.	Ujistěte se, že elektroforetický pufr je správně zředěný.
	Gel nebyl správně obarvený.	Zopakujte barvení.
	Nesprávně pracující elektroforetická jednotky, nebo zdroj elektrického proudu.	Kontaktujte výrobce elektroforetické jednotky nebo zdroje.
<b>Po obarvení gelu jsou pruhy DNA fragmentů bledé.</b>	Gel nebyl obarvován dostatečně dlouho.	Zopakujte barvení.
	Gelové pozadí je příliš tmavé.	Nechte gel odbarvovat 5 až 10 minut v destilované vodě.
<b>Pruhy DNA se nerozdělily.</b>	Barvivo by mělo migrovat nejméně 3,5 cm (při použití vaničky 7x7 cm) a nejméně 6 cm (při použití vaničky 7x14 cm) od jamek, aby byla zajištěna adekvátní separace.	Před obarvením a vizualizací DNA se ujistěte, že barvivo v gelu urazí vzdálenost nejméně 6 cm (přibližně 1 hodina při aplikaci napětí 125 V).
<b>Při uchování gelů při teplotě 4°C pruhy DNA blednou</b>	DNA obarvená barvivem FlashBlue™ může časem vyblednout.	Gel znovu obarvíte barvivem FlashBlue™
<b>Pruhy DNA se neoddělily, i když barvivo urazilo dostatečnou vzdálenost.</b>	Pro elektroforetickou separaci byl použit gel s nesprávným procentním poměrem.	Ujistěte se, že máte připravený agarózový gel ve správném procentním poměru. Pro informaci, vzorky DNA Ready-to-Load™ je nutné analyzovat v 0,8% agarózovém gelu.
<b>V mém QuickStripu není dost vzorku.</b>	QuickStrip vyschnul.	Přidejte 40 uL vody a před zaváděním do gelu jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

## Příloha B

### Hromadná příprava agarózového gelu

Pokud chcete ušetřit čas, je možné připravit větší množství elektroforetického pufru a agarózového roztoku, které rozdělíte mezi studenty ve třídě. Nepoužitý zředěný pufr můžete použít později a ztuhlý roztok agarózového gelu je možné znovu rozpustit.

#### Elektroforetický pufr

Příprava 3 litrů 1x elektroforetického pufru je popsána v tabulce B.

Tabulka D Hromadná příprava elektroforetického pufru		
50x konc. pufr	+ destilovaná voda	Celkový požadovaný objem
60 ml	2940 ml	3000 ml (3 L)

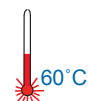
#### Agarózový gel (0,8%)

Tabulka E popisuje dávkovou přípravu 0,8% agarózového gelu.

- Pro přípravu zředěného gelového pufru použijte 500 ml baňku.
- Nalijte 3,0 gramy agarózy UltraSpec-Agarose™ do připraveného pufru. Protřepejte, aby se látka rozpůlyla.
- Na povrch baňky značkovací fixou vyznačte hladinu roztoku.
- Ohřívajte roztok agarózy, jak to bylo dříve popsáno u přípravy jednotlivých gelů. Čas zahřívání je nutné upravit z důvodu většího celkového objemu roztoku gelového pufru.
- Zchladte roztok agarózy na 60°C při protřepávání baňky, abyste podpořili uvolňování tepla. Pokud došlo k odparu, doplňte destilovanou vodu tak, aby hladina roztoku v baňce byla na původní hladině označené v kroku 3.
- Rozdělte zchlazený agarózový roztok na množství potřebné pro lití jednotlivých gelů. Pro vaničku 7 x 7 cm odměřte 30 ml, pro vaničku 7 x 10 cm odměřte 50 ml a pro vaničku 7 x 14 cm odměřte 60 ml. **Pro tento experiment se doporučuje používat gely o velikosti 7 x 7 cm.**
- Nechte gel zcela ztuhnout. Pevný a chladný na dotek bude přibližně za 20 minut. Poté pokračujte s přípravou gelu na elektroforézu.

#### Poznámka:

Komponenty sady UltraSpec-Agarose™ mají obvykle značení obsaženého množství. Pečlivě si přečtěte tato označení. Pokud množství agarózy není specifikováno, nebo pokud je plastový uzávěr lahvičky porušen, je nutné agarózu zvážit, abyste se ujistili, že používáte správné množství.



Tabulka E Hromadná příprava 0,8% UltraSpec-Agarose™			
Množství agarózy (g)	+ Koncentrovaný pufr (50X) (ml)	+ Destilovaná voda (ml)	Celk. objem (ml)
3.0	7.5	382.5	390

## Příloha C

### Analýza dat pomocí kalibrační křivky

Elektroforéza v agarózovém gelu rozděljuje biomolekuly na jednotlivé pruhy, z nich každý je tvořen molekulami stejné velikosti. Jak je možné těchto poznatků využít pro stanovení délek různých fragmentů? Pamatujte, že s rostoucí délkou biomolekuly se snižuje vzdálenost, na kterou je molekula schopná migrovat, protože velké molekuly nemohou snadno procházet kanálky v gelu. Proto je rychlost migrace nepřímo úměrná délce molekuly - konkrétněji  $\log_{10}$  délky molekuly. Abychom to předvedli, použijeme vzorek, který obsahuje pruhy známých délek, a kterému říkáme "standard". Změříme vzdálenost, kterou každý z těchto pruhů urazí, abychom vytvořili graf známý jako "kalibrační křivka", který je možné následně použít k přibližnému určení velikosti neznámých molekul.



**Obrázek 6:**  
Změřte migrační vzdálenost od spodního okraje jamky po spodní okraj každého pruhu.

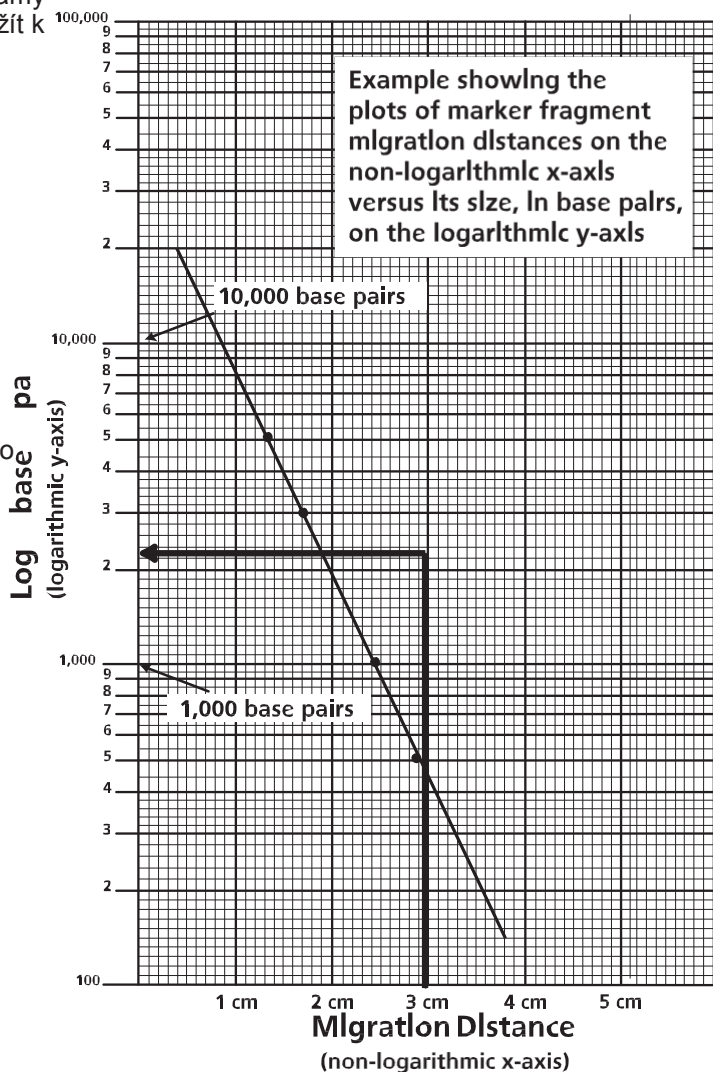
#### 1. Měření a zaznamenání migračních vzdáleností

Změřte vzdálenost, kterou urazil každý fragment kalibrační DNA od spodního okraje jamky se vzorkem ke spodnímu okraji každého pruhu. Zaznamenejte tyto vzdálenosti v centimetrech (s přesností na nejbližší milimetr) do vašeho deníku. Stejný postup opakujte pro každý fragment DNA ze standardu.

Změřte a zaznamenejte migrační vzdálenosti každého fragmentu neznámých vzorků stejným způsobem, jakým jste měřili pruhy standardu.

#### 2. Vytvoření kalibrační křivky

Protože migrační rychlost je nepřímo úměrná  $\log_{10}$  délky pruhu, zakreslení dat v podobě semilogaritmického grafu dostaneme přímou linku a tak budeme moci analyzovat exponenciální rozsah velikostí fragmentů. Uvidíte, že vertikální osa semilogaritmického grafu bude zprvu vypadat atypicky; vzdálenost mezi čísly se bude zkracovat s postupem osy od 1 do 9. Je to proto, že tato osa představuje logaritmickou stupnici. První cyklus na ose odpovídá délkám od 100 - 1000 bázových párů, druhý cyklus měří 1000 - 10000 bázových párů a tak dále. Pro vytvoření kalibrační křivky na semilogaritmickém papíře zakreslete vzdálenost, kterou migroval každý fragment kalibrační DNA na osu x (v mm), versus jeho velikost na osu y (v bázových párech). Ujistěte se, že máte osy označené!



**Obrázek 7:** Příklad semilogaritmického grafu



## Příloha C

### Analýza dat pomocí kalibrační křivky

---

Po zakreslení všech bodů použijte pravítko, nebo rovnou hranu a narýsujte co nejrovnější přímkou mezi body. Příмка by měla mít po obou stranách přibližně stejný počet rozptýlených bodů. Příмка může některými body procházet (viz příklad na obrázku 7).

#### 3. Stanovení délky každého neznámého fragmentu

- a. Najděte migrační vzdálenost neznámého fragmentu na ose x vašeho semilogaritmického grafu. Narýsujte vertikální linku od tohoto bodu, tak aby se proťala s vaší kalibrační křivkou.
- b. Od bodu protnutí kalibrační křivky narýsujte druhou linku, tentokrát horizontálně směrem k ose Y. Hodnota, kterou najdete v místě protnutí osy Y, udává přibližnou velikost fragmentu v básových párech (viz příklad na obrázku 7). Proveďte zápis do vašeho laboratorního deníku.
- c. To samé opakujte pro každý fragment vašeho neznámého vzorku.

**Příloha C**

