PCR, agaróz gélelektroforézis

gyakorlati protokoll diákoknak

Kulturális és Innovációs Minisztérium

Nemzeti Tehetség Program

PCR (polimerase chain reaction)

Elméleti háttér:

A polimeráz láncreakció (PCR: *polymerase chain reaction*) segítségével egyetlen vagy kisszámú DNS molekula meghatározott szakasza (célszekvencia) amplifikálható (felszaporítható) *in vitro* (élő sejten kívüli) enzimatikus reakció révén, gazdaszervezet igénybevétele nélkül. A reakció során felszaporított DNS-szakasz mérete jellemzően a 100 bázispár és 10 kilobázispár közötti tartományba esik.

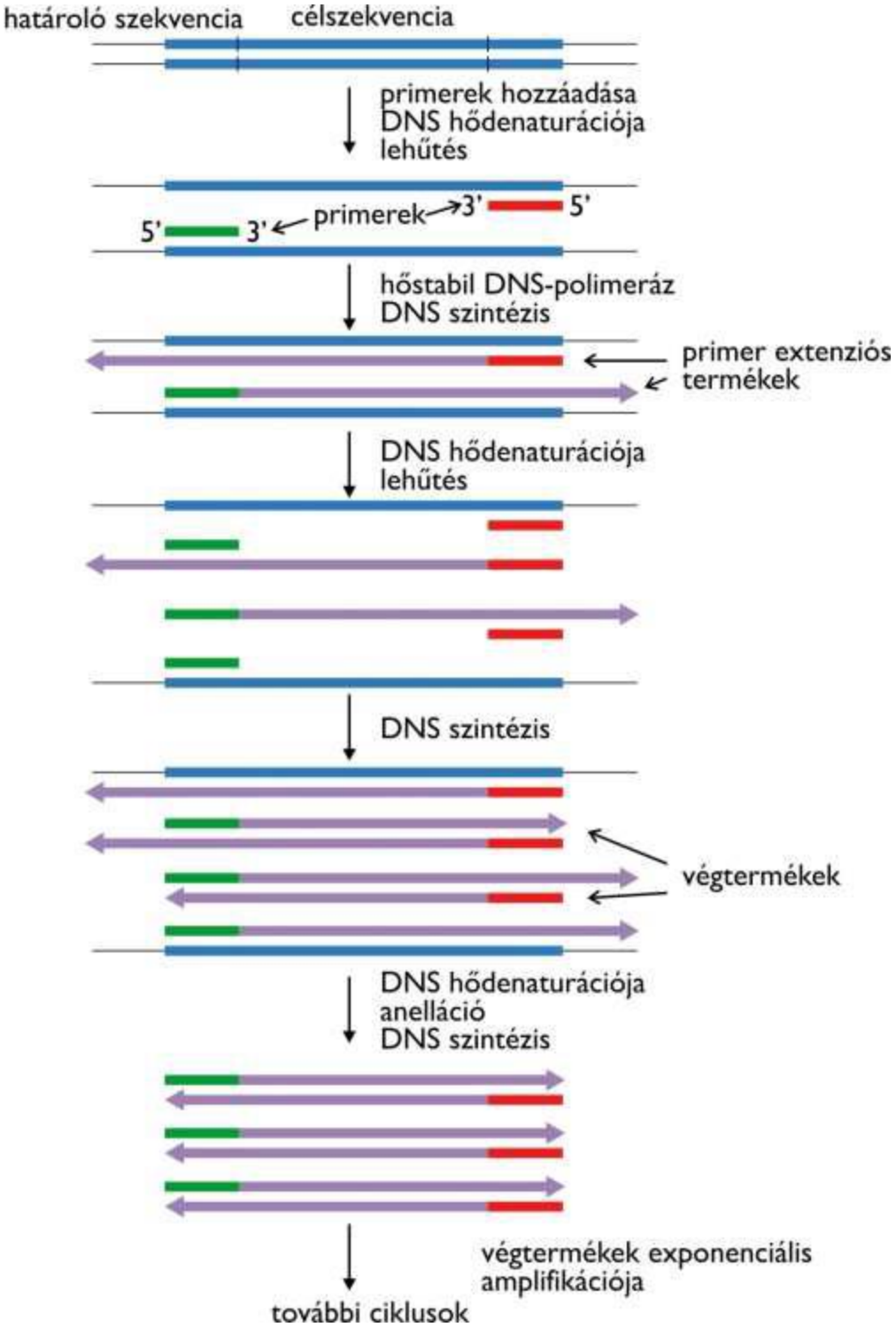
A PCR-t Kary Mullis 1983-ban fedezte fel, és Nobel díjat kapott érte (1993-ban). Az eljárás lényege: ha tökéletesen ismert egy adott DNS szekvencia, akkor a szekvencia alapján egy *in vitro* DNS-szintézisen alapuló, ciklikusan ismétlődő módszerrel „ki lehet erősíteni" az adott szekvenciájú DNS szakaszt. Két szintetikus oligonukleotidot használnak, melyek az amplifikálandó DNS komplementer szálaihoz kapcsolnak úgy, hogy 3' végeik egymás felé néznek. Ezek az oligonukleotidok primerként szolgálnak a DNS-szintézis során. (a DNS polimeráz enzim ide tud kapcsolódni és elkezdeni a szintézist.)

A PCR-t három, ciklusosan ismétlődő lépésben hajtják végre.

1. Először a templát (minta) DNS-t tartalmazó mintát 90ºC fölé melegítve a két DNS szál elválik (denaturációs fázis),
2. majd az oldatot lehűtve kb. 50ºC-ra a nagy koncentrációban alkalmazott primerek mindkét szálhoz kapcsolódnak (anellálási fázis).
3. A harmadik lépésben a mintát 72ºC-ra felmelegítve, ezen a hőmérsékleten nagy felesleg dNTP (dezoxi nukleozid trifoszfátok, azaz dATP, dTTP, dGTP, dCTP) jelenlétében egy DNS polimeráz mindkét szálra megszintetizálja az új, komplementer DNS szálat (polimerizációs fázis). A reakcióban olyan DNS-polimerázt (pl. Taq-polimeráz) használnak, mely hőforrásokban élő baktériumból (pl. *Thermus aquaticus*) származik, és hőmérsékleti optimuma 72ºC-on van, sőt, 90ºC-on sem denaturálódik.

Végül a mintát újból 90º C-ra melegítik, ahol a két kétszálú DNS négy szálra esik szét, és a ciklus kezdődik elölről. A három hőmérséklet, 90-50-72ºC ciklikus váltogatásával egy olyan DNS-termék szaporodik exponenciális ütemben, melynek két végét az alkalmazott primerek jelölik ki. 25 ciklus után kb. egymilliószor annyi adott szekvenciájú DNS molekula keletkezik, mint amennyi a templátban (mintában) volt!

A módszer hallatlanul érzékeny, mivel a kiindulási mintában elegendő egyetlen DNS molekula, az amplifikáció akkor is megtörténik.



A kísérlet kivitelezése:

A kísérlethez ***EDVOTEK „PCR amplification of DNA" kit***-et használunk

Végig viseljen kesztyűt a munkához!

1. Vegyen elő egy PCR csövet és 4 Eppendorf csövet. Az Eppendorf csöveket 0-10-20-30 számokkal lássa el.
2. A PCR csőbe tegyen 20 µl primer mix-et, 20 µl ultratiszta vizet és 5 µl DNS templátot. Gyengéden rázza össze, majd tegyen bele 1 EdvoBeads Plus gyöngyöt. Ismét rázza össze gyengéden, majd centrifugálja pár másodpercig.
3. Vegyen ki a keverékből 10 µl-t a 0 feliratú Eppendorf csőbe (tegye azonnal jégre a csövet)
4. A 0 feliratú Eppendorf csőbe tegyen 15 µl ultratiszta vizet Tegye azonnal jégre a csövet. Ez a minta már készen áll az elektroforézisre.
5. Sokszorozza a DNS-t a PCR berendezés segítségével.(WVR PCR Thermal Cycler) (összesen kb. 30 perc)

Állítsa be a készüléken a következő adatokat:

Kezdeti inkubálás94 °C, 2 perc

Ezt követi 30 ciklus:

denaturálás: 94 °C, 15 sec

anellálás: 45 °C, 15 sec

polimerizáció: 72 °C, 30 sec

majd egy végső inkubálás: 72 °C, 60 sec

6. Szakítsa meg (PAUSE) a DNS amplifikálást a 10. ciklus után. Vegye ki a PCR csövet a készülékből (Forró lehet a minta is, a készülék fűtőblokkja is!) Vegyen ki a PCR csőből 10µl-t, tegye a 10 feliratú Eppendorf csőbe, tegyen hozzá 15 µl ultratiszta vizet Tegye azonnal jégre az Eppendorf csövet.
8. Helyezze vissza a PCR csövet a készülékbe, folytassa a DNS amplifikálást!
9. Szakítsa meg (PAUSE) a DNS amplifikálást a 20. ciklus után Vegye ki a PCR csövet a készülékből (Forró lehet a minta is, a készülék fűtőblokkja is!) Vegyen ki a PCR csőből 10µl-t, tegye a 20 feliratú Eppendorf csőbe, tegyen hozzá 15 µl ultratiszta vizet Tegye azonnal jégre az Eppendorf csövet.
10. Helyezze vissza a PCR csövet a készülékbe, folytassa a DNS amplifikációt!

11. A 30. ciklus után vegye ki a PCR csövet a készülékből (Forró lehet a minta is, a készülék fűtőblokkja is!) Vegyen ki a PCR csőből 10µl-t, tegye a 30 feliratú Eppendorf csőbe, tegyen hozzá 15 µl ultratiszta vizet Tegye azonnal jégre az Eppendorf csövet.

Gélelektroforézis:

Mérjen ki 0,96 g agarózt. Adjon hozzá hígított TAE puffert (2,4 ml 50x TAE pufferhez adjon 117,6 ml sterilezett desztillált vizet). Melegítse fel vízfürdőn oldódásig. Adjon hozzá 120 µl hígított SyBR Safe DNS festéket (kesztyű, maszk, fülke!)

Öntse meg a gélt! (20 percen belül megszilárdul)

Szilárdulás után helyezze be a készülékbe, öntsön rá TAE puffert (20 ml 50x TAE+980 ml sterilezett desztillált víz)

Vigye fel (mindig új pipettahegyeket használva) a molekuláris létrát (15 µl) és a 0-10-20-30 mintákat (15µl) 5 egymás melletti zsebbe.

Futtatás: 100V, a futás sebességét, mértékét ellenőrizni lehet úgy, hogy a molekuláris létra kék színű festéket, a PCR minták sárga festéket tartalmaznak. A festék nem futhat le a gélről!

A minta megtekintése

Helyezze be a gélt az UV transzilluminátorba! Mindenképpen hajtsa rá a fedelet, és úgy kapcsolja be. A DNS csíkok zölden világítanak.

1. Figyelje meg az egymást követő zsebekben az amplifikált DNS mennyiségét!
2. Határozza meg a molekuláris létra segítségével a felszaporított DNS szakasz hosszát! (a molekuláris létra standard méretei 6751, 3652, 2827, 1568, 1118, 825, 630bp

PCR, agaróz gélelektroforézis

gyakorlati protokoll tanároknak

KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS MINISZTÉRIUM

Nemzeti Tehetség Program

PCR, agaróz gélelektroforézis

gyakorlati protokoll tanároknak

A gyakorlathoz szükséges eszközök, anyagok:

PCR készülék

Horizontális gélelektroforézis készülék

Mikrocentrifuga

UV transzilluminátor

Automata pipetták, pipettahegyek (sterilezett)

mikrohullámú sütő/vízfürdő

Jég és hűtési lehetőség

steril desztillált víz

kesztyűk

lombikok

EDVOTEK „PCR amplification of DNA" kit

1. Primer mix elkészítése:

1. Olvassza ki a TE puffer, keverje jól össze.

2. Győződjön meg arról, hogy a szilárd primer mix a cső alján van, ha nem, centrifugálja 20 másodpercig.

3. Adjon 1 ml TE puffert a „Lypho Primer" csőbe, oldja fel, majd helyezze jégre. Az oldat világos narancssárga és nem tartalmaz szemcséket.

4. Csoportonként 25µl-t mérjen csövenként (felirat: Primer mix)

2. A DNS templát elkészítése:

1. Olvassza ki a TE puffer, keverje jól össze.

2. Győződjön meg arról, hogy a szilárd DNS templát a cső alján van, ha nem, centrifugálja 20 másodpercig.

3. Adjon 70 µl TE puffert a „Lypho Template” csőbe, oldja fel, majd helyezze jégre. Az oldat világos piros és nem tartalmaz szemcséket.

4. Csoportonként 6 µl-t mérjen csövenként (felirat: DNS templát)

3. Mérjen ki csoportonként 100 µl ultratiszta vizet!

4. Adagoljon csoportonként 1 EdvoBead PLUS gyöngyöt.

5. Minden csoportnak szükséges 1 PCR cső és 4 Eppendorf cső

6. Programozza be a PCR készüléket.

Felhasznált irodalom:

http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/BiotechManager/!2020/2%20Polimer%C3%A1z%20l%C3%A1ncreakci%C3%B3%20szoveges.pdf