



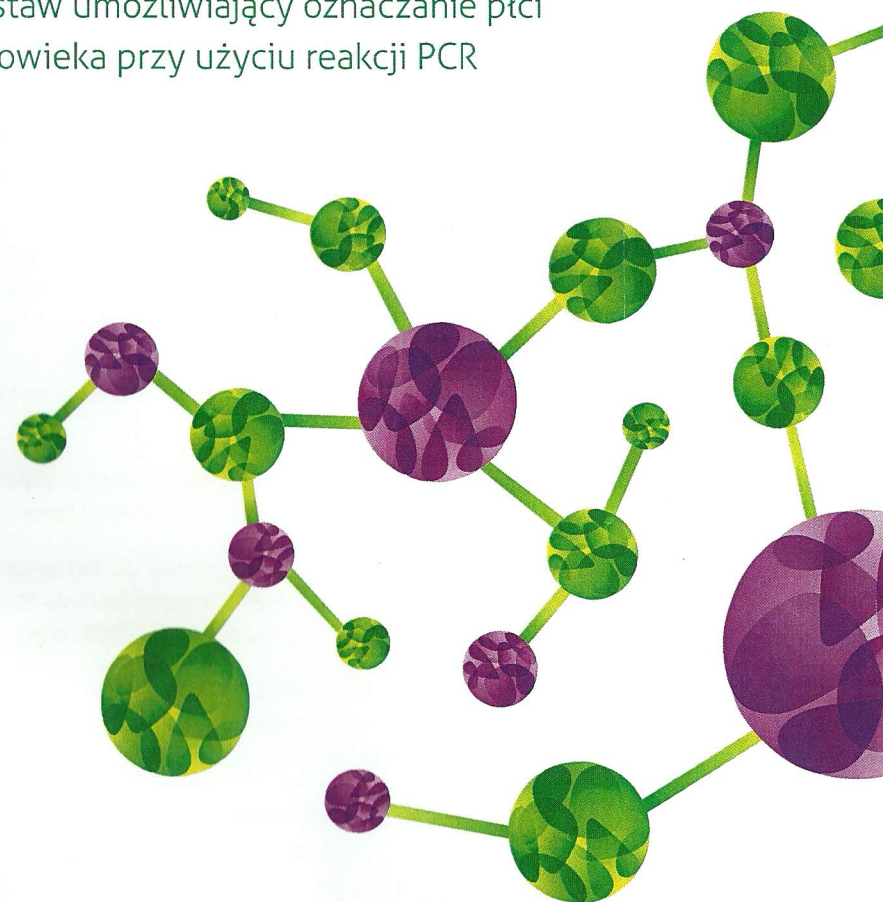
Zestaw dydaktyczny

Instrukcja dla studentów

Nr kat. DY10 / DY105
1.2017

EasyPCR XY

Zestaw umożliwiający oznaczanie płci
człowieka przy użyciu reakcji PCR



BLIRT S.A., Trzy Lipy 3/1.38, 80-172 Gdańsk, www.blirt.eu
T: +48 58 739 61 50 F: +48 58 739 61 51 E: orders@blirt.eu

blirt

www.blirt.eu

blirt

Przebieg ćwiczenia

UWAGA!!!

- ▲ Należy pamiętać o zwirowaniu probówek z odczynnikami po rozmrożeniu, tak aby całość mieszaniny znalazła się na dnie probówki!
- ▲ Przed przystąpieniem do przygotowywania reakcji PCR należy umyć ręce i przygotować stanowisko pracy (tipsy, probówki, rękawiczki). Do dezynfekcji stołu oraz innego drobnego sprzętu laboratoryjnego (np. pipety, statywy, itd.) użyć 3% wody utlenionej.
- ▲ Ze względu na dużą czułość układu z czym związana jest jego duża wrażliwość na kontaminacje należy zawsze pracować w jednorazowych rękawiczkach.
- ▲ Zaleca się każdy z trzech etapów oznaczenia: izolacja DNA ludzkiego, przygotowanie reakcji PCR, amplifikację oraz elektroforezę produktów PCR prowadzić w oddzielnych pomieszczeniach. Szczególnie należy zwrócić uwagę na produkty PCR z poprzednich oznaczeń – one stanowią najbardziej niebezpieczne źródło kontaminacji.
- ▲ Do przygotowania reakcji PCR najlepiej używać pipet, które są autoklawowalne (co pewien czas należy je autoklawować).
- ▲ Zaleca się stosować oddzielne pipety do każdego z etapów oznaczenia, czyli przygotowania i rozporcjowania Master Mix-u, dodawania matrycy, nanoszenia produktów PCR na żel.
- ▲ Należy przestrzegać zasady, że tylko jedna probówka może być otwarta w danym momencie. Dzięki temu zmniejsza się ryzyko kontaminacji.
- ▲ Należy unikać dotykania krawędzi probówek.

1. Izolacja DNA ludzkiego z wymazów

Procedura oczyszczania DNA składa się z 4 etapów i jest przeprowadzana z wykorzystaniem minikolumn wiornicznych, zawierających odpowiednie złoża wydajnie i selektywnie wiążące kwasy nukleinowe. Próbkę wymazu poddana jest lizie enzymatycznej z wykorzystaniem zoptymalizowanego buforu Lysis Buffer oraz silnej proteazy (Proteinyzy K). Na tym etapie degradacji ulegają błony oraz wszystkie białka komórkowe. Do lizatu dodawany jest roztwór soli chaotropowych, które powodują selektywne wiązanie się DNA do złoża krzemionkowego w minikolumnie. Następnie lizat nanoszony jest na minikolumnę. Dwuetapowe przemywanie DNA związanego do złoża minikolumny ma na celu usunięcie pozostałych zanieczyszczeń i/lub inhibitorów reakcji enzymatycznych. Oczyszczone DNA eluowane jest z minikolumny buforem o niskiej sile jonowej Elution Buffer.

A. Przed przystąpieniem do izolacji

1. Każdy z odczynników zestawu należy wymieszać.
2. Należy pamiętać o rozpuszczeniu liofilizatu **Proteinase K** w 200 µl buforu do proteinyzy.
 - ▲ Po zawieszeniu *Proteinazy K* w buforze, enzym należy przechowywać w -20°C.
3. W przypadku wytrącenia się osadu w roztworze SSB Buffer, butelkę z roztworem należy ogrzać do temperatury 50-60°C i inkubować, aż do całkowitego rozpuszczenia się osadu, mieszając co kilka minut, a następnie schłodzić do temp. pokojowej.
4. Nagrzać termoblok lub łaźnię wodną do temp. 56°C.
5. Można ogrzać odpowiednią ilość buforu elucyjnego do temp. 70°C.
6. Należy pamiętać, żeby wszystkie etapy izolacji przeprowadzać w temperaturze pokojowej.

B. Przygotowanie próbki

W celu pobrania wymazu np. z błon śluzowych jamy ustnej należy co najmniej 10 razy mocno potrzeć pałeczką wymazową wewnętrzną stronę policzka, a następnie końcówkę z pobranymi komórkami nabłonka umieścić w probówce 1,5 ml typu Eppendorf i odciąć wystający patyczek. Należy upewnić się, że osoba od której pobierano wymaz nie spożywała pokarmów oraz płynów przez co najmniej 30 minut.

C. Izolacja DNA

1. Końcówkę patyczka z pobranym materiałem biologicznym umieścić w 1,5 ml próbówce typu Eppendorf, a następnie odciąć wystającą część patyczka tak, aby możliwe było swobodne zamknięcie próbówki.
2. Dodać **350 µl** buforu do lizy **SSL Buffer** i **6 µl Proteinase K**, worteksować 3 sek.
3. Inkubować przez 30 minut w temperaturze 56°C.
▲ Zalecane jest aby w czasie inkubacji parokrotnie wymieszać próbkę poprzez odwracanie próbówki.
4. Dodać **350 µl** buforu wiążącego **SSB Buffer**, worteksować 3 sek.
5. Inkubować przez 6 minut w temperaturze 70°C.
6. Wycisnąć końcówkę patyczka wymazowego o ściankę próbówki wykonując palcami ruch powodujący rotację pateczki wymazowej. Odrzucić patyczek wymazowy.
▲ Możliwe jest, aby nie usuwać pateczki wymazowej z próbówki, jednak może to się wiązać z obniżeniem wydajności izolacji ze względu na niecałkowite naniesienie lizatu na kolumnę.
7. Dodać **200 µl Etanolu 96 %**, wymieszać poprzez kilkukrotne odwracanie próbówki.
8. Nanieść **700 µl lizatu** na kolumnę umieszczoną w próbówce odbierającej.
9. Wirować 1 min. przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g).
10. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
11. Nanieść całą pozostałą objętość lizatu na minikolumnę.
12. Wirować 1 min. przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g).
13. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
14. Nanieść do minikolumny **600 µl** buforu płuczącego **SSW1 Buffer** i wirować 1 min. przy 10-12 tys. rpm (11-15 tys. x g).
15. Wylać przesącz z próbówki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę.
16. Nanieść do minikolumny **400 µl** buforu płuczącego **SSW2 Buffer** i wirować 2 min przy 10-14 tys. rpm (11-21 tys. x g).
17. Ostrożnie wyjąć suchą minikolumnę z próbówki odbierającej i umieścić ją w jałowej próbówce 1,5 ml typu Eppendorf.
▲ Bufor płuczący Wash Buffer zawiera alkohol, który może powodować inhibicję niektórych reakcji enzymatycznych, dlatego istotne jest jego całkowite usunięcie przed etapem elucji. W tym celu po drugim etapie płukania można dodać etap tzw. „wirowania na sucho”. Po opróżnieniu próbówki odbierającej, należy wirować suchą kolumnę przez 1 min przy 10-14 tys. rpm (11-21 tys. x g).

18. Nanieść **50 µl** buforu elucyjnego **Elution Buffer** podgrzanego do 70°C centralnie na złożę krzemionkowe w minikolumnie.
19. Inkubować kolumnę z buforem przez 2 min w temp. pokojowej.
20. Wirować 1 min przy 10-14 tys. rpm (11-21 tys. x g).
21. Minikolumnę usunąć a wyizolowane DNA przechowywać w +4°C lub -20°C do czasu dalszych analiz.

2. Elektroforeza ludzkiego DNA

- Rozdział elektroforetyczny należy prowadzić w 1% żelu agarozowym.
 - Przed przystąpieniem do wykonania żelu należy przygotować 1x stężony bufor TAE poprzez 50-krotne rozcieńczenie buforu 50x TAE (dołączonego do zestawu). Na przykład dla przygotowania 1000 ml buforu 1x TAE należy do naczynia o odpowiedniej wielkości nalać 20 ml 50x TAE i 980 ml wody destylowanej.
 - Następnie 0,5 g agarozy należy rozpuścić w 50 ml buforu 1x TAE (kuchenka mikrofalowa, palnik).
 - Ostudzić żel do temperatury ok. 60°C.
- ▲ UWAGA! Wszystkie operacje od tego momentu należy wykonywać w rękawiczkach nitrylowych, stanowiących ochronę przed bromkiem etyldyny (czynnikiem rakotwórczym).**
- Dodać 5 µl roztworu bromku etyldyny o stężeniu 1 mg/ml.
 - Wymieszać i wylać ostrożnie żel do tacki do wylewania żeli z osadzonym odpowiednio grzebieniem lub grzebieniami. Należy zwrócić uwagę aby w żelu nie było pęcherzyków powietrza (zbyt schłodzony żel – taki żel należy rozpuścić ponownie).
 - Po zastygnięciu żelu wyjąć grzebienie w taki sposób, aby nie uszkodzić studzienek i wstawić żel do komory aparatu do elektroforezy i zalać buforem 1x TAE tak, aby całkowicie wypełnił komory elektrodowe i pokrył powierzchnię żelu.
 - Uzyskane ludzkie DNA należy nanosić za pomocą pipety do studzienek żelu, w następujący sposób: 2 µl buforu obciążającego 6x Green i 5 µl wyizolowanego genomowego DNA.
 - Rozdział należy prowadzić przez 0,5-1 h, przy napięciu ok. 5-10 V/cm.
 - Po zakończonej elektroforezie żel należy analizować w świetle UV transiluminatora.

3. Reakcja amplifikacji na matrycy ludzkiego DNA

A. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla jednej próbki

Składniki mieszaniny należy dodawać do probówki PCR (0,2 ml) w kolejności zamieszczonej w tabeli poniżej. Każda z grup poddaje analizie wyizolowane przez siebie ludzkie DNA.

Odczynnik	Ilość [μl]	MMix na ... prób	Suma [μl]	Rozporcjować po [μl]
Woda do PCR	30			
10x Bufor do r-cji PCR	5			
MgCl ₂ [50 mM]	3			
roztwór dNTPs [8 mM]	5			
Starter FORWARD [10 μM]	2			
Starter REVERSE [10 μM]	2			
Termostabilna polimeraza DNA [2 U/μl]	1			
DNA matrycowe – analizowana próbka	2			
Objętość końcowa	50			

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla analizowanej próbki

B. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla KONTROLI POZYTYWNEJ

Dla każdej serii analiz należy wykonać **Kontrolę pozytywną**, która ma na celu sprawdzenie jakości stosowanych odczynników. Skład mieszaniny reakcyjnej dla przygotowania **Kontroli pozytywnej – DNA KOBIETY** zamieszczono w tabeli 2, a dla **Kontroli pozytywnej – DNA MĘŻCZYŹNY** zamieszczono w tabeli 3 i jest on identyczny jak dla analizowanych próbek, jedynie zamiast DNA analizowanej próbki dodaje się kontrolne (wzorcowe) DNA kobiety lub mężczyzny.

Odczynnik	Ilość [μl]
Woda do PCR	30
10x Bufor do r-cji PCR	5
MgCl ₂ [50 mM]	3
roztwór dNTPs [8 mM]	5
Starter FORWARD [10 μM]	2
Starter REVERSE [10 μM]	2
Termostabilna polimeraza DNA [2 U/μl]	1
DNA Kontroli pozytywnej – DNA KOBIETY	2
Objętość końcowa	50

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla Kontroli pozytywnej – DNA KOBIETY

Odczynnik	Ilość [μl]
Woda do PCR	30
10x Bufor do r-cji PCR	5
MgCl ₂ [50 mM]	3
roztwór dNTPs [8 mM]	5
Starter FORWARD [10 μM]	2
Starter REVERSE [10 μM]	2
Termostabilna polimeraza DNA [2 U/μl]	1
DNA Kontroli pozytywnej – DNA MĘŻCZYŹNY	2
Objętość końcowa	50

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla Kontroli pozytywnej – DNA MĘŻCZYŹNY

C. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla KONTROLI NEGATYWNEJ

Dla każdej serii analiz należy również wykonać **kontrolę negatywną**, aby sprawdzić poprawność pracy i czystość odczynników, by wykluczyć ewentualne fałszywie pozytywne wyniki (tzw. artefakty). Skład mieszaniny zamieszczono w tabeli 4.

Odczynnik	Ilość [μ l]
Woda do PCR	30
10x Bufor do r-cji PCR	5
MgCl ₂ [50 mM]	3
roztwór dNTPs [8 mM]	5
Starter FORWARD [10 μ M]	2
Starter REVERSE [10 μ M]	2
Termostabilna polimeraza DNA [2 U/ μ l]	1
Woda do PCR	2
Objętość końcowa	50

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla Kontroli negatywnej

Powyższe 5 mieszanin reakcyjnych (2 próbki + kontrola negatywna + 2 kontrole pozytywne) mogą być przygotowane jednocześnie. W tym przypadku należy przygotować Master Mix (MMix) – ilości stosowanych odczynników przeznaczone dla pojedynczej próbki należy pomnożyć przez: 6 (ilość próbek + 1). W tabeli 1 zamieszczono pola potrzebne do wykonania odpowiednich obliczeń. Uzyskaną wartość dla objętości całkowitej MMix-u należy podzielić przez ilość próbek na jaką wyliczany był MMix (czyli 6). Otrzymana wartość jest objętością mieszaniny reakcyjnej jaką należy rozporcjować do poszczególnych probówek. Powinna być ona zgodna z sumą składników zliczanych do MMix-u przeznaczonych dla 1 próbki. **Przed rozporcjowaniem przygotowany MMix należy wymieszać przez delikatne pipetowanie.**

Probówki z przygotowanymi mieszaninami reakcyjnymi należy umieścić w termocyklerze i ustawić profil temperaturowo-czasowy zamieszczony w tabeli 5.

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [sek]
Wstępna denaturacja	95	120
Denaturacja	95	30
Przyłączanie starterów	60	30
Elongacja	68	60
Wydłużanie końcowe	68	300
Chłodzenie	10	∞

30 cykli

Table 5. Profil temperaturowo-czasowy dla reakcji PCR

4. Detekcja produktów reakcji PCR

- Rozdział elektroforetyczny należy prowadzić w 2% żelu agarozowym.
- Przed przystąpieniem do wykonania żelu należy przygotować 1x stężony bufor TAE poprzez 50-krotne rozcieńczenie buforu 50x TAE (dołączonego do zestawu). Na przykład dla przygotowania 1000 ml buforu 1x TAE należy do naczynia o odpowiedniej wielkości nalać 20 ml 50x TAE i 980 ml wody destylowanej.
- Następnie 1 g agarozy należy rozpuścić w 50 ml buforu 1x TAE (kuchienka mikrofalowa, palnik).
- Ostudzić żel do temperatury ok. 60°C.

▲ UWAGA! Wszystkie operacje od tego momentu należy wykonywać w rękawiczkach nитrylowych, stanowiących ochronę przed bromkiem etyldyny (czynnikiem rakotwórczym).

- Dodać 5 µl roztworu bromku etyldyny o stężeniu 1 mg/ml.
- Wymieszać i wylać ostrożnie żel do tacki do wylewania żeli z osadzonym odpowiednio grzebieniem lub grzebieniami. Należy zwrócić uwagę aby w żelu nie było pęcherzyków powietrza (zbyt schłodzony żel – taki żel należy rozpuścić ponownie).
- Po zastygnięciu żelu wyjąć grzebienie w taki sposób, aby nie uszkodzić studzienek i wstawić żel do komory aparatu do elektroforezy i zalać buforem 1x TAE tak, aby całkowicie wypełnił komory elektrodowe i pokrył powierzchnię żelu.
- Uzyskane produkty PCR należy nanosić za pomocą pipety do studzienek żelu, w następujący sposób:
 1. 10 µl markera wielkości DNA M100-1000 ready-to-use
 2. 2 µl buforu obciążającego 6x Green i 10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR **badanej próbki**
 3. 2 µl buforu obciążającego 6x Green i 10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR **Kontroli pozytywnej – DNA KOBIETY**
 4. 2 µl buforu obciążającego 6x Green i 10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR **Kontroli pozytywnej – DNA MĘŻCZYZNY**
 5. 2 µl buforu obciążającego 6x Green i 10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR **Kontroli negatywnej**

▲ UWAGA! Należy zachować dużą ostrożność podczas nanoszenia próbek na żel, aby uniknąć przelania się próbek ze studzienki do studzienki, co mogłoby zafałszować wyniki.

- Rozdział należy prowadzić przez 60-90 min, przy napięciu ok. 5-10 V/cm.
- Po zakończonej elektroforezie żel należy analizować w świetle UV transiluminatora.