



GOZDARSKI INŠTITUT SLOVENIJE

Laboratorij za gozdno fiziologijo in genetiko

Molekularna analiza bioloških vzorcev

SOP FIGE MET 001

Velja od 01.03.2004

Tine Grebenc, Hojka Kraigher

Ljubljana, 01.03.2004

GOZDARSKA KNJIZNICA

GIS K E

II 601



12011000017

COBISS o

0400 JB 115
0420

Molekularna analiza bioloških vzorcev

Dokument sestavil: Tine Grebenc

Dokument odobril: Hojka Kraigher

1. Namen raziskave

Predstavljeni postopek opisuje molekularno metodo pridobivanja molekularnih markerjev iz DNK in možnost identifikacije poljubnega biološkega materiala (glive, ektomikoriza, rastline, bakterije, živali). Metoda omogoča pridobivanje molekularnih markerjev ter njihovo analizo na različnih nivojih: na nivoju PCR produkta, RFLP vzorca ali zaporedja nukleotidov (sekvence). Markerji so lahko sami po sebi rezultat (npr. prisotnost nekega organizma v preiskovanem vzorcu) oziroma jih lahko primerjamo z referenčnimi bazami podatkov, z namenom identifikacije organizma, izključitve, iskanja podobnost, filogenetskih študij in drugo.

2. Definicije

vzorec – vzorec je kakršen koli biološki material, iz katerega lahko ekstrahiramo (pridobimo) zadostno količino DNK za nadaljnje analize. Teoretično je to lahko že ena sama celica.

DNK (DNA) (deoksiribonukleinska kislina) – osnovna biološka molekula, ki nosi informacijo. Informacija je primarno zapisana v obliki zaporedja nukleotidov v DNK

PCR (Polymerase chain reaction – verižna reakcija s polimerazo) – je ciklična *in vitro* (biokemijska) reakcija, s katero iz izhodne DNK (template) ob uporabi ustreznih začetnih oligonukleotidov, ki imajo vezavna mesta na izhodni enoverižni DNK z biološko aktivnostjo encima polimeraze (= encim ki izgraja DNK z dodajanjem nukleotidov na komplementarno verigo DNK) pridobivamo nove verige dvoverižne DNK. V PCR si sledijo faze denaturacije DNK, faza naleganja začetnih oligonukleotidov in faza podaljševanja verige DNK. Faze se med seboj ločijo po temperaturi in trajanju.

RFLP (Restriction fragment length polymorphism – polimorfizem dolžine fragmentov DNK po cepljenju z endonukleazami) – postopek, pri katerem (v PCR pomnoženo) DNK cepimo z restrikcijskimi endonukleazami, ki specifično prepoznavajo krajša zaporedja (ponavadi 4 bazne pare) v DNK, se na njih vežejo in tam dvoverižno DNK cepijo v obeh verigah. Zaradi različne lege in različnega števila prepoznavnih mest v preiskovani DNK lahko pri različnih vzorcih (populacijah, vrstah organizmov) pridobimo različne vzorce fragmentov DNK po ločevanju.

restrikcijske endonukleaze – encimi, ki specifično prepoznavajo 4-8 baznih parov dolga zaporedja v DNK, se na njih vežejo in na prepoznanem mestu cepijo dvoverižno DNK v obeh verigah. Restrikcijske endonukleaze so encimi, izolirani iz različnih organizmov, pretežno bakterij, od koder tudi izvira njihovo označevanje (npr. *Hinf* I = encim izoliran in bakterije *Haemophilus influenzae*, prvi (I) od odkritih. Pri restrikcijskih endonukleazah srečujemo tudi pojem **izoshizomer**. Gre za to, da lahko encimi izolirani iz različnih organizmov (in posledično z različnimi oznakami) prepoznavajo isto tarčno zaporedje in so zato lahko do neke mere zamenljivi, pozorni pa moramo biti na to, da so različni izoshizomeri lahko različno občutljivi na metilacije in druge spremembe DNK, torej niso absolutno zamenljivi!

Sekvenciranje – je postopek, pri katerem s kemijskim (zastarel) ali encimskim postopkom (z ddNTPji) izbrano zaporedje DNK sekvenciramo, torej ugotavljamo zaporedje nukleotidov. Sekvenciranje nam da največ informacij o določeni DNK in je trenutno najpomembnejši postopek v molekularni biologiji z velikim izkupičkom informacij o enem samem vzorcu.

Molekularni marker – je kateri koli podatek, ki ga lahko vežemo na neko lastnost preiskovanega organizma. Teoretično je število molekularnih markerjev neomejeno (oziroma vezano na velikost genoma).

Začetni oligonukleotid (primer) – je krajše zaporedje DNK (praviloma dolgo med 15 in 30bp), ki je komplementarno delu DNK v preiskovanem vzorcu. Začetni oligonukleotid v fazi naleganja primerjev v PCR prepozna tarčno zaporedje na osnovi komplementarnosti z izhodno enoverižno DNK (pri tem temperatura naleganja določa specifičnost vezave), se nanjo veže in tako tvori krajši odsek na DNK, kjer je DNK dvoverižna. Ta del dvoverižne DNK predstavlja v naslednji fazi cikla (podaljševanje) substrat, ki ga prepozna polimeraza, ki od tu naprej prične s sintezo komplementarne verige DNK k enoverižni DNK.

Elektroforeza - je postopek ločevanja DNK ali proteinov v električnem polju. Pri ločevanju se DNK giblje skozi agarozni/poliakrilamidni gel. Hitrost določata napetost in velikost DNK ter velikost por gela. DNK je negativno nabita in potuje od anode (-) proti katodi (+)! Postopku ločevanja v elektroforezi sledijo barvanje DNK, spiranje gela, vizualizacija (glede na uporabljeno barvilo) ter dokumentacija položaja fragmentov DNK na gelu po ločevanju.

Pufer – je katera koli raztopina, ki jo uporabljamo pri molekularni analizi in zagotavlja ustrezne pogoje (ionska jakost, pH,...) za reakcijo, potovanje DNK, ...

3. Postopek preiskave

3.1 Princip

Metoda temelji na zaporedju postopkov:

ekstrakcija DNK -----> PCR -----<
RFLP
sekvenciranje

Pri tem postopku je vsaka stopnja (razen ekstrakcije) lahko sama po sebi rezultat, glede na zastavljen problem in cilje raziskave. Ključno omejitev metode predstavlja poznavanje in izbira začetnih oligonukleotidov, s katerimi zastavimo mejo v DNK zaporedju (jedrna, kloroplastna ali mitohondrijska), znotraj katere bomo po PCR ugotavljali razlike. Vsaka od izbranih stopenj nam pove določeno količino informacij:

- PCR – s pozitivno PCR ugotovimo, da je v analiziranem vzorcu prisotno zaporedje, katerega prepozna/ta začetni/a oligonukleotid/a.
- RFLP – nam pove ali, ter kolikokrat in kje v (pomnoženi) DNK se pojavlja tarčno zaporedje restrikcijskega encima
- sekvenca – rezultat je točno zaporedje nukleotidov v analizirani DNK znotraj z začetnimi oligonukleotidi omejenega dela genoma, predhodno pomnoženega v sekvenčni PCR.

Glavno omejitev metode predstavlja pravilna izdelava (v smislu izbire pravega zaporedja, ki temelji na nekih znanih informacijah – zaporedjih DNK ali aminokislin) in izbira začetnih oligonukleotidov ter njihova specifičnost. Količina vzorca praviloma ne predstavlja večjih težav,

lahko pa se pojavlja inhibicija PCR predvsem s sekundarnimi substancami iz izhodnega materiala, pretežno iz rastlin in gliv.

3.2 Vrste preiskovanih vzorcev

tipi ektomikorize iz vzorcev zemlje/in vitro kulture (ektomikorizne korenine):

Tip ektomikorize za molekularno analizo pred analizo očistimo vseh delcev zemlje (če je to mogoče). Do ekstrakcije vzorce shranjujemo v vodi (petrijevka, tubica po eppendorfu) na 2-4°C, praviloma ne več kot en teden. Pred pričetkom ekstrakcije (pri daljšem shranjevanju) preverimo prisotnost morebitne rasti saprofitov. Prerastlih ali kako drugače okuženih vzorcev zaradi občutljivosti metode ne moremo uporabiti. Pri vzorcih, kjer je okužba verjetna, a je z pregledom pod lupo ne moremo ugotoviti, lahko le-to potrdimo z analizo sekvence pridobljene iz vzorca s primerjavo z bazo podatkov. Za nadaljnjo analizo niso primerni t.i. stari tipi ektomikorize.

trošnjaki gliv

Praviloma (razen v izjemnih primerih kjer predvidevamo, da bomo trosnjak identificirali s primerjavo RFLP vzorcev ali sekvenc) analiziramo le trosnjake, ki imajo razvitih dovolj morfoloških znakov za zanesljivo identifikacijo. Uporabljamo lahko sveže ali posušene (herbarizirane) trosnjake, pri čemer poteka postopek sušenja pri temperaturi do 40°C v sušilniku ali v liofilizatorju. Starost herbarijskega materiala v principu ni omejena, velja pa, da je DNK v starejših vzorcih bolj poškodovana, zato so pogosto potrebni dodatni oziroma drugi postopki ekstrakcije in pomnoževanja (kiti za ekstrakcijo, kloniranje, pomnoževanje krajših delov DNK,...). Za molekularne analize odvezemo le manjše dele trosnjaka, praviloma himenija, tik pred ekstrakcijo DNA. Z materialom delamo po principu sterilne tehnike (najbolje v laminariju ali ob gorilniku) ter tako zmanjšamo možnost navzkrižnih okužb vzorcev. Pri izbiri smo pozorni na morebitne saprofite ali parazite na trosnjaku.

mešani vzorci fitopatološkega laboratorija (z namenom analize gliv)

Vzorci fitopatološkega laboratorija praviloma pripravijo delavci tega laboratorija, po navodilih delavcev molekularnega laboratorija. Vzorci fitopatološkega laboratorija so potencialno nevarni in z njimi delamo v skladu z varnostnimi ukrepi in zakonodajo (glej navodila za delo v fitopatološkem laboratoriju). Ostali postopki se ne razlikujejo od vzorcev trosnjakov gliv.

drugi mešani vzorci (rizosfera, endofiti, simbiotske strukture)

Postopki pri ostalih mešanih vzorcih se ne razlikujejo bistveno od vzorcev ektomikorize ali fitopatoloških vzorcev. Glavna ovira pri delu z mešanimi vzorci je prisotnost inhibitorjev PCR. Specifičnost analize zagotovimo z izbiro ustreznih začetnih oligonukleotidov v PCR.

rastlinski material

Pri analizah rastlinskega materiala lahko uporabimo kateri koli del rastline, pri čemer moramo biti pozorni, da je material v gametofitu in pelodu haploiden, drugje pa di- ali več ploiden, kar lahko vpliva na analize kodominantnih markerjev. Uporabljamo lahko svež, zamrznjen ali posušen (herbariziran) rastlinski material, pri čemer naj poteka postopek sušenja po ustaljenih protokolih za herbariziranje. Starost herbarijskega materiala v principu ni omejena, velja pa, da je DNK v starejših vzorcih bolj poškodovana, zato so pogosto potrebni dodatni oziroma drugi postopki ekstrakcije in pomnoževanja (kiti za ekstrakcijo, kloniranje, pomnoževanje krajših delov DNK,...).

Za molekularne analize odvezemamo manjši del rastline, pri čemer izbiramo del, kjer je možnost okužbe minimalna, ravno tako pa je zaželeno, da je v vzorcu čim manj sekundarnih substanc (barvil, višjih sladkorjev,..) rastline. Praviloma uporabljamo necvetoče poganjke/brste. Z materialom delamo po principu sterilne tehnike (najbolje v laminariju ali ob gorilniku) ter tako zmanjšamo možnost navzkrižnih okužb vzorcev. Pri izbiri smo pozorni na morebitne saprofitne ali parazite na materialu.

bakterijske kulture (mešane in čiste)

Za analizo je primerna katera koli kultura (čista ali mešana) bakterij. Omejitve so glede na delo s posameznimi skupinami bakterij, ki so potencialno ali dejansko nevarne za ljudi, za delo s katerimi laboratorij nima primerne opreme (glej Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu, Ur. l. RS 03/2002, 18/01/2002 ter 59/99, 64/01)

živalski material

Delo z živalskim materialom je šele v fazi priprav, zato bodo natančni podatki o vzorcih in delu z njimi dodani naknadno.

3.3 Oprema, reagenti, testni komplet

Pri izvedbi metode potrebujemo naslednjo opremo:

- Avtoklav (Kambič) A – 21 V
- BioCane Cryobiological Storage Vessel (Denver posoda za tekoči dušik) – CK50900
- Centrifuga 5417 C (z rotorjem in adapterji)
- Direct Q 5, sistem za pripravi milliQ bidestilirane vode
- Ductless fume enclosures (mobilni digestorij)
- Električni stresalnik Vibromix 204 EV (»vortex«)
- GelDoc sistem z računalnikom in programom Quantity One (Q1)
- GeneAmp PCR System 9700
- Hladilno zamrzovalna omara H20S 303-H20 30.5D
- Mikrovalovna pečica Goldstar, MS-1715
- Mini-Transilluminator (UV transiluminator)
- Neavtomatska tehtnica – analitska – elektronska, AC 210 P
- Polaroid GELCam kamera
- Power Pac 1000 (usmernik za elektroforezo)
- Power Pac 300 (usmernik za elektroforezo)
- ProfiCool hladilnik za elektroforezo
- Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System, ser.no. 61S 04479
- Sub-Cell GT BASIC Agarose Gel Electrophoresis System (kad za elektroforezo)
- Sub-Cell Model 96 Agarose Gel Electrophoresis
- Submarine/horizontal gel electrophoresis units, dual mode
- Vodna kopel Memmert (WB/OB 7)
- Zamrzovalna skrinja ZS 1401, model FH13G (inv.št. 3881)
- Zamrzovalna skrinja, ZS 1401, model FH 13, inv.št. 3578
- Zamrzovalna skrinja, ZS 1401, model FH 13, inv.št. 3579
- Zamrzovalna skrinja, ZS 1401, model FH 13, inv.št. 3580
- Zamrzovalna skrinja, ZS 1401, model FH13G, inv. št. 3880
- Zamrzovalna skrinja, ZS1401, model FH13G, inv.št. 3882
- Zaščitna brezprašna vertikalna komora, LFVP 12

3.4 Postopek metode

1. Ekstrakcija DNA (Priloga 1b - Obr. E04(1))

Metoda z 2% CTAB (za glive, ektomikorizo, rastlinski material, bakterije)

Postopek:

- vzorcu dodaj 200µl 2% CTAB pufru za lizo celic in homogeniziraj z malimi batki (pestli) (uporabi originalne Eppendorfke)
- dodaj dodatnih 400µl 2% CTAB v mešanico in dodatno homogeniziraj z malimi batki (opcija je da vzorec zamrzneš v tekočem dušiku pred homogenizacijo)
- inkubiraj na termobloku ali vodni kopeli na 65°C za cca 40 min (največ do 1 h)
- dodaj 1x volumen (600µl) mešanice kloroform-izoamil alkohola (24:1)
- dobro premešaj (z roko in/ali vorteksiraj min. 2 sek.)
- centrifugiraj na 13000 rpm 15 min
- previdno odpipetiraj zgornjo (vodno) fazo v novo, označeno ependorfko. Pazi da ne preneseš precipitata proteinov!!
- precipitiraj DNA (vodna faza iz točke 7) z cca 1.5x volumnom (ponavadi 750µl) ohlajenega izopropanola (vsaj -18°C) previdno zmešaj z obračanjem tubice. Precipitacijsko mešanico shrani v zmrzovalniku (vsaj -18°C) za 30 min.*
- centrifugiraj na 13000 rpm 30 min
- zavrzi zgornjo fazo (odliješ ali odpipetiraš. Pazi da ne izgubiš peleta)
- spera pelet s cca 200µl ohlajenega (vsaj -18°C) 70% etanola
- centrifugiraj 5 min na 7000 rpm
- zavrzi zgornjo (tekočo) fazo s pipetiranjem. Pazi da ne izgubiš peleta.
- posuši pelet na zraku (priporočljivo v laminariju pri nižji hitrosti za cca 15 min oz. dokler ne odpari ves preostali etanol)
- resuspendiraj pelet v 30-200µl sterilne distilirane vode (Fluka, Sigma, milli Q grad. Water ali v TE pufru)

(opcija: izmeri količino DNA s spektrofotometrom – trenutno v laboratoriju ni izvedljivo)

Shrani raztopljeno DNA v hladilniku na cca 4°C preko noči, da se DNA popolnoma raztopi

Ekstrahirano DNA lahko za krajši čas (do enega tedna) shranjuješ v hladilniku na cca 4°C. Dolgoročno shranjevanje raztopine na min.-18°C (ali na -80°C če imaš možnost)

*Nekateri strokovnjaki svetujejo naj precipitacija v zmrzovalniku ne traja več kot 30 min (po nekaterih protokolih traja preko noči) saj naj bi se z daljšanjem časa precipitacije povečeval tudi delež nekaterih drugih substanc ki v nadaljnjih postopkih (PCR) lahko ovirajo reakcije. Možno odstopanje je tudi precipitacija na 4°C a je v našem laboratoriju ne prakticiramo.

Vsaka ekstrakcija vključuje en vzorec brez dodanega biološkega materiala kot negativna kontrola. Pozitivne kontrole ne uporabljamo. V primeru da potrebujemo pozitivno kontrolo, za to izberemo ekvivalenten material/vzorec, ki je v eni od prejšnjih ekstraktij dal uspešno ekstrakcijo (pri ECM kot pozitivno kontrolo uporabimo himenij glive in ne star vzorec ECM)

Metoda ekstrakcije DNA s Plant DNeasy Mini Kit (ekstrakcija iz zmrznjenega ali svežega rastlinskega materiala)

Postopek ekstrakcije s Plant Dneasy Mini Kitom je opisan v shemi in navodilih, ki so priloženi vsaki škatli kita ter so dodani k postopku kot Priloga 7 (samo v angleškem jeziku, brez prevoda v slovenščino). Postopek je dostopen tudi na internetni strani www.qiagen.com.

2. PCR splošni postopek – priprava mešanic (s seznamom primerjev, ki jih uporabljamo) (Priloga 1c - Obr A04(1))

PCR splošno

Katerikoli fragment DNK lahko pomnožujemo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) ter produkt pomnoževanja uporabljamo v nadaljnjih analizah (ločevanje na gelu in ugotavljanje velikosti, RFLP, sekvenciranje, kloniranje, DGGE in drugo) pod pogojem da :

- je vsaj del zaporedja - tarčno zaporedje - dovolj ohranjeno, da lahko nanj nalegajo začetni oligonukleotidi (primerji) prirejeni za različne taksonomske ali funkcionalne skupine organizmov ali genov
- v primeru iskanja razlik zaporedje vsebuje zadostno število razlik, da jih z izbrano metodo lahko ugotovimo

PCR mešanica (za primer 40 µl reakcijske mešanice)

Razmerja individualnih reakcij, izbor začetnih oligonukleotidov ter program so vpisana na obrazcu Obr. A04(1)

sd H ₂ O	25.4µl
10x PCR pufer	4.0µl
dNTPs	4.0µl
primer (forward)	0.8µl
primer (reverse)	0.8µl
Mg ²⁺ ioni	4.0µl
polimeraza	0.2µl
DNA vzorec	0.8µl

(glej navodila proizvajalca – Mapa s tehničnimi podatki o kemikalijah/kitih/proizvodih)

PCR mešanico pripravimo tik pred pripravo reakcije tako, da zamešamo vse sestavine in na koncu pred pipetiranjem v tubico mešanici za PCR dodamo polimerazo. Mešanico shranjujemo na ledu do porazdelitve po vzorcih. Vzorce DNA pripravimo v 0.2 ali 0.5 ml tubicah prirejenih za uporabljeni cycler. Vzorce ves čas priprave hranimo na ledu (pri uporabi hot start polimeraze to ni potrebno, a zaželeno). Pred prenosom tubic v cycler poskrbimo da so vsi vzorci pravilno odpipetirani, da po stenah tubic ni kapljic in da so tubice pravilno zaprte. Tubice pred (ali takoj po) PCR označimo in na ustreznem nosilcu prenesemo v cycler ter sprožimo program. Programi so shranjeni v cyclerju, ločeni po uporabnikih/projektih. Vsi programi so tudi zapisani v papirni obliki kot priloga metod (Priloga 8). Pri uporabi programa na obrazec A04(1) napišemo uporabnika in ime programa.

Pri modelu cyclerja GenaAmp9700 z gretim pokrovom moramo stroj prižgati vsaj 10 minut preden sprožimo postopek, da se pokrov segreje na delovno temperaturo ter tik pred začetkom določimo volumen reakcije. Med PCR se držimo navodil proizvajalca cyclerja (vroče površine!)

Vse reagente in reakcije pipetiramo s steriliziranimi ali »DNase & RNase free« označenimi tipsi primernih volumnov.

Priporočljivo je pripravljanje reakcij v laminariju.

3. Ločevanje DNA v električnem polju (elektroforeza)

1. gelska (za PCR produkte, RFLP produkte in čiščenje z gela)

Priprava gela (pufer TBE/TAE in njegovo jakost (0.5-1%) izbiramo glede na specifičnost elektroforeze, pričakovano velikost DNA fragmentov in ekonomičnost; najpogosteje v laboratoriju FIGE uporabljamo 2% agarozo v 1% TBE puftru, kar zadostuje za potrebe ločevanja DNA fragmentov po PCR in RFLP, za framente >100 bp)

- zmešaj željeno količino pufta (mali nosilec ca 90ml / veliki nosilec ca 150ml / široki nosilec ca 170ml) in zatehtane agaroze za željeno gostoto agaroze
- premešaj na roke, da se agarozna razpusti
- raztopi mešanico v mikrovalovni pečici. Pazi da mešanica ne prekipi! Med segrevanjem večkrat premešaj
- ohladi raztopino na cca 50-60°C. Pazi da v agarozni zaradi mešanja in premikanja ne nastanejo mehurji zraka (v tem primeru ponovi točko 3)
- v nosilec vstavi glavnik in previdno razlij agarozo (ne razlivaj še vrele agaroze!; glej točko 4)
- počakaj, da se gel strdi in ohladi (20-30 min), odstrani glavnik in pazi, da pri tem ne poškoduješ jamic

Nanašanje na gel, ločevanje v elektročnem polju in vizualizacija DNA

- zmešaj željeno količino DNA (ponavadi 3-5 μ l za PCR produkt in 5-8 μ l za RFLP produkte) z barvilom za nanašanje. Idealno razmerje med DNA in barvilom je 1:5; v laboratoriju FIGE največkrat uporabljamo enoten volumen barvila 2 μ l ne glede na volumen DNA
- mešaj s pipeto, na parafilmu ali alu-foliji; vzorec takoj naneseš na gel.
- nanašaj na gel po »suhem« ali »mokrem« postopku pri čemer na gel naneseš celotno mešanico DNA in barvila.
- na vsakem gelu vsaj v eno linijo nanesemo DNA molekularni marker (marker izbereš glede na pričakovano velikost DNA tako, da je DNA po ločevanju znotraj območja potovanja fragmentov markerja. Količina nanesenega markerja je priporočena v navodilih proizvajalca)
- prenesi naložen gel v banjico za elektroforezo, ki je napolnjena z enakim pufrom kot smo ga uporabili za pripravo gela (za »suh« nanašanje – pri »mokrem« nanašanju je gel že v banjici s pufrom, in ga tako tudi nanašamo) (pazi na polariteto!)
- zapri pokrov banjice
- prižgi usmernik, preveri če je inštalacija pravilno priklopljena, izberi napetost in/ali tok in/ali čas trajanja ločevanja (izbira glede na velikost gela, izbiro pufra, specifičnost vzorcev, ki jih ločujemo) in poženi elektroforezo
- elektroforeza naj poteka glede na specifičnost in cilje ločevanja. Pazi da ne "izgubiš" DNA z gela – sledi potovanje barvila!)
- po končani elektroforezi izklopi električni tok
- prenesi gel v barvilo – etidijev bromid. Upoštevaj varnostna opozorila in priporočila za delo z etidijevim bromidom (glej mapo s seznamom kemikalij in varnostnimi listi). Čas barvanja prilagodi velikosti in debelini gela. Barvanje daljše od 7-10 minut lahko prekomerno obarva gel in povzroči težave pri fotografiranju. Etidijev bromid na svetlobi razpada, zato delaj v temnici in barvila po nepotrebem ne izpostavljalj svetlobi.
- spiraj obarvan gel pod tekočo vodo vsaj 15 min. Spiranje do 30(45) minut lahko izboljša kvaliteto fotografije gela, če je bil le-ta predolgo barvan. Med spiranjem lahko preveriš uspešnost ločevanja in barvanja na UV luči (ne izpostavljalj gela predolgo UV svetlobi, saj etidijev bromid na svetlobi, tudi UV – hitro razpada.

- Gel za fotografiranje prenesi na UV luč in jo prižgi šele tik pred fotografiranjem. Pazi na varnostne ukrepe pri delu z močnim virom UV svetlobe (zaščitna očala/steklo, rokavice, obleka)
- Fotografiraj gel (Polaroid kamera) ali z digitalno kamero v GelDoc sistemu. GelDoc sistem in računalnik pravočasno prižgi!
- Jasno označi fotografijo/dokument digitalizirano sliko z datumom, kodo reakcije - amplifikacija, RFLP,...glede na oznako na obrazcu, lastnostni gela ter čas in pogoje ločevanja

4. RFLP splošni postopek – priprava mešanic, potek in ustavljanje s shranjevanjem (s seznamom encimov in njihovimi temperaturami za restrikcijo) (Priloga 1d -Obr R04(1))

RFLP je postopek, pri katerem pomnožene dele DNA ali celotno DNA cepimo z restrikcijskimi encimi - endonukleazami.

Seznam restrikcijskih encimov z tarčnim zaporedjem in optimalno temperaturo cepljenja je v prilogi in v seznamu kemikalij.

Postopek priprave restrikcije:

- razdeli vzorce PCR produktov v tubice (za temperature višje od 60°C uporabi tubice, ki dobro zapirajo, npr. originalne Eppendorfove 1.5ml Safe-Lock tubice)
- pripravi založno raztopino restrikcijske mešanice tik pred začetkom reakcije za toliko reakcij, kolikor je vzorcev plus eno dodatno na vsakih 10 reakcij. Encim dodaj na koncu, premešaj in s centrifugiranjem zberi na dnu tubice. Restrikcijsko mešanico pripravljaj in shranjuj na ledu.
- dodaj izračunan volumen mešanice k vzorcu (za lažje delo nanašaj mešanico v pokrovček tubice), zmešaj s kratkim centrifugiranjem
- inkubiraj na vodni kopeli pri optimalni temperaturi za delovanje encima. Reakcija naj poteka vsaj eno uro na enoto dodanega encima v reakciji (glej navodila proizvajalca – Mapa s tehničnimi podatki o kemikalijah/kitih/proizvodih)
- ustavi reakcijo z dodatkom barvila za nanos na gel (1µl / 5µl restrikcijske mešanice – FBB, 6x Orange Dye, DYEMIX,...)
- nanesi mešanico na gel in ločuj z elektroforezo ali shrani vzorce na 4°C (kratkotrajno – nekaj dni) ali na -18°C (dolgotrajno) do ločevanja na gelu. Velikost dobljenih fragmentov po ločevanju določiš glede na relativno potovanje fragmentov DNKv primerjavi z markerjem/i.

Za posamezno reakcijo so proizvajalci kemikalij in številka serije zbrani v Obr R04(1).

5. Analiza zaporedja DNA (Obr. P04(1))

Priprave za sekvenciranje

Sekvenciranje je postopek kjer ugotavljamo zaporedje nukleotidov v izbranem ali naključnem delu DNA. Vir DNA je v našem primeru pomnoženi del genomske, kloroplastne ali mitohondrijske DNA, ki jo najprej namnožimo v klasični PCR, nato očistimo PCR produkt (iz gela ali neposredno iz PCR) in sekvenciramo v sekvenčni reakciji ter ločujemo s kapilarno elektroforezo (vsaj zadnji dve stopnji opravi izbrani servis, ki nudi storitve sekvenciranja. Podatke o servisu vneseš v Obr. P04(1))

priprava DNA

- DNA namnožimo v PCR in preverimo uspešnost pomnoževanja z gelsko elektroforezo

- pomnoženo DNA neposredno čistimo iz PCR reakcijske mešanice, če smo pri pomnoževanju dobili en sam produkt (glej točko 2);
v primeru da je v reakciji nastalo več produktov, ki jih lahko ločimo z gelsko elektroforezo, očistimo izbrani pomnoženi fragment neposredno iz agaroze po ločevanju z izrezovanjem fragmenta iz gela pod UV lučjo. Pri izrezovanju pazimo, da koščka za čiščenje ne »okužimo« z drugimi pomnožki z gela

čiščenje DNA (Wizard kit)

Glej Prilogo 10.

Pri delu vedno uporabljamo negativne in po potrebi pozitivne kontrole pri ekstrakciji DNK (razen pri ekstrakciji s kiti) ter v PCR. Negativno kontrolo predstavlja vzorec ekstrakcije brez dodanega materiala ter reakcija v PCR brez dodanega vzorca ekstrahirane DNK. Kot pozitivno kontrolo uporabljamo enega od vzorcev iz prejšnjih serij, ki je pri enakem postopku dal zadovoljiv pozitiven rezultat.

3.5 Referenčne in kritične vrednosti

Opisani postopki ne potrebujejo referenčnih vrednosti.

3.6 Kontrolni postopki in njihova pogostost

Kontrolni postopek metode predvideva obvezno izvedbo ekstrakcije DNK iz izbranega vzorca (praviloma krožno: trosnjak – ektomikoriza – mešan vzorec) ter PCR z enim od uporabljenih (splošnih) parov začetnih oligonukleotidov. Nadaljevanje postopka kontroliramo dogovorno glede na trenutne analize, ki jih opravljamo v laboratoriju mi in zunanji partnerji, s katerimi smo dogovorjeni za kontrolo. Predvidoma bo kontrola izmenična – 1x RFLP, 1x sekvenciranje oziroma glede na razpoložljiva finančna sredstva.

Vsaka serija ekstrakcije in PCR ima vsaj eno negativno kontrolo.

Pri delu moramo uporabljati redno servisitrane in kalibrirane aparate:

PCR cycler (GeneAmp PCR System 9700)

pipete (različni proizvajalci)

vodna kopel (Mettler (WB/OB 7))

laminarij (Zaščitna brezprašna vertikalna komora, LFVP 12)

tehnica (Neavtomatska tehnica – analitska – elektronska, AC 210 P)

avtoklav (Kambič, A – 21 V)

Postopki so določeni v dokumentaciji aparatov.

3.7 Vrednotenje rezultatov

Rezultate analiziramo z računalniškimi programi (Taxotron, BioRad Q1), pri čemer podajamo identičnost s z referenčnimi vzorci iz baze podatkov oziroma odstopanja glede na vrednosti, ki jih uporablja program. Pri analizi slike restrikcijskega vzorca je napaka – odstopanje v rangi 4-7%

glede na dolžino fragmenta na gelu. Pri primerjavi sekvenc podajamo vrednost – podobnost z zaporedji iz baze podatkov, ki nam jo posreduje program za vzporeditve nukleotidnih zaporedij (Blast)

3.8 Podajanja rezultatov

Rezultate podajamo v obliki poročila (Obrazci A04(1), A04(1b), R04(1) in R04(1b)), ki je hkrati tudi spremni list za vzorce tekom postopka v laboratoriju. Poročila izdajamo za PCR ali PCR-RFLP analiza ter za vzporeditve z bazami nukleotidnih zaporedij.

3.9 Varnostni ukrepi

Glej navodila proizvajalcev električnih aparatov in varnostne liste kemikalij

4. Referenčni dokumenti

- Karen, O. & Martin, M.P. Pre-conference workshop, Uppsala June 29-July 4 1998. DNA based methods for identification of ectomycorrhizae
- Martín, M. P. (Ed.). Methods in root-soil interactions research protocols. Slovenian Forestry Institute, Ljubljana, Slovenia
- Methods used in the Laboratory for Forest physiology and genetics at Slovenian Forestry Institute, Ljubljana, Slovenia 2003.
- Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu, Ur. l. RS 03/2002, 18/01/2002 ter 59/99, 64/01

5. Zapisi (kot priloge 1-5)

Ime zapisa	Izpolni	Prejemnik	Mesto arhiva	Čas hranjenja
NAPOTNICA / NOTE - Obr. N04(1)	Naročnik in prejemnik v laboratoriju	Laboratorij	Laboratorij FIGE, soba S-R51(rastlinjak soba 5 1.nad.)	Najmanj 5 let po končanju projekta oz. prevzemu vzorca v laboratorij
EKSTRAKCIJA DNK / DNA EXTRACTION - Obr. E04(1)	Izvajalec preiskave ali vodja laboratorija	Laboratorij	Laboratorij FIGE, soba S-R51(rastlinjak soba 5 1.nad.)	Najmanj 5 let po končanju projekta oz. prevzemu vzorca v laboratorij
POMNOŽEVANJE DNK / DNA AMPLIFICATION - Obr. A04(1)&A04(1b)	Izvajalec preiskave ali vodja laboratorija	Laboratorij in naročnik (kopija – delno ali v celoti)	Laboratorij FIGE, soba S-R51(rastlinjak soba 5 1.nad.)	Najmanj 5 let po končanju projekta oz. prevzemu vzorca v laboratorij
RESTRIKCIJA / RESTRICTION - Obr. R04(1)&R04(1b)	Izvajalec preiskave ali vodja laboratorija	Laboratorij in naročnik (kopija – delno ali v celoti)	Laboratorij FIGE, soba S-R51(rastlinjak soba 5 1.nad.)	Najmanj 5 let po končanju projekta oz. prevzemu vzorca v laboratorij
ČIŠČENJE PCR PRODUKTA / PURIFICATION OF PCR PRODUCT - Obr. P04(1)	Izvajalec preiskave ali vodja laboratorija	Laboratorij in servis za sekvenciranje (kopija – delno ali v celoti)	Laboratorij FIGE, soba S-R51(rastlinjak soba 5 1.nad.)	Najmanj 5 let po končanju projekta oz. prevzemu vzorca v laboratorij

Priloga 1 - Napotnica / Note

Zap. št. / No: _____

Vzorčenje / Sampling

Naročnik (Projekt) / Orderer (Project):		KODA SERIJE / CODE *:	
Prevel / Accepted:		Tip vzorca / Sample type*:	
Datum prevzema vzorca v laboratoriju / Receiving date in lab:			
Način hranjenja do obdelave / Storage:			
Podpis / Signature:			

Št. vz. / No.	Predhodne oznake / Orderer's code	Koda vzorca v laboratoriju / Code of sample in lab.*	Država porekla / Country of origin of sample	Lokacija / Location	Mikrolokacija (koordinata) / Microlocation (coordinates)	Datum vzorčenja / Date of sampling	Metoda vzorčenja / Method of sampling	Opombe / Comments
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								

Št. vz. / No.	Predhodne oznake /	Koda v Laboratoriju / Code in lab.*	Država / Country	Lokacija / Location	Mikrolokacija / Microlocation	Datum / Date	Metoda / Method
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							

*Tip vzorca, kodo serije in kodo vzorca v laboratoriju izpolni oseba, ki prevzame vzorce

* Sample type, code and code of sample in lab is given by person accepting samples in the lab.

Priloga 5 - ČIŠČENJE PCR PRODUKTA / PURIFICATION OF PCR PRODUCT

DATUM /
DATE:

KODA /
CODE:

P10/

Projekt, naloga/ Project, task: _____

	Šifra vzorca* / Sample code*	Vzorec iz gela / Sample from gel	Vzorec iz PCR / Sample from PCR	Kvantifikacija / Quantification	Opombe / Remarks
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

* Šifra kot na napotnici Obr. N04(1) / Coda as given in Obr N04(1)

Metoda čiščenja PCR produkta / Method of purification:

Preverjanje uspeha čiščenja PCR produkta z gelsko elektroforezo (Priloga 1 – izpis fotografije gela z opisom ali originalni Polaroid posnetek gela na strani 3/3):
Gel electrophoresys of PCR (Priloga 1 – printout of gel photo or original Polaroid photo on page 3/3):

	Vrednost / Value	Proizvajalec / Manufacturer	Številka serije / Lot number
Agaroz / Agarose			
Pufer / Buffer			
Marker			
Loading Buffer & [μl]			
Napetost / Voltage [V]			
Čas / Time [min]			
Vol. vzorca / Sample vol. [μl]			

Izvajalec / Person conducting purification:

Opombe / Remarks:

Težave (opis) / Problems (description):

Rešitev težav, ukrepi / Solutions, measurements taken:

Drugo:

POROČILO / REPORT

Zap. št. / No: _____

Priloga 4 - RESTRIKCIJA / RESTRICTION

DATUM / DATE | KODA / CODE

Naročnik (Projekt) - ime in naslov /
 Orderer (Project) - name and address: _____

Datum prevzema vzorca / Receiving date: _____

Restriksijski encim / Restriction enzyme: _____

	1x	___X	Št. serije/ Lot No.	Proizvajalec / Manufacturer
sd H ₂ O	μl	μl		
10x PCR buffer	μl	μl		
encim / enzyme	μl	μl		
DNK / DNA	μl	μl		
V_{skupni}	μl	μl		

Temperatura / Temperature [°C]	Trajanje / Duration [min]	Opombe / Remarks

Šifra vzorca (po Obr N04(1)) / Sam. code(as in Obr. N04(1))	Opombe / Comments	Šifra vzorca (po Obr N04(1)) / Sam. code(as in Obr. N04(1))	Opombe / Comments
1		26	
2		27	
3		28	
4		29	
5		30	
6		31	
7		32	
8		33	
9		34	
10		35	
11		36	
12		37	
13		38	
14		39	
15		40	
16		41	
17		42	
18		43	
19		44	
20		45	
21		46	
22		47	
23		48	
24		49	
25		50	

Rezultati se nanašajo samo na preizkušene vzorce. Poročila o poskusu se brez pisnega dovoljenja laboratorija ne sme reproducirati, razen v celoti.

	Vrednost / value	Proizvajalec / Manufacturer	Številka serije / Lot number
Agaroz / Agarose			
Pufer / Buffer			
Marker			
Loading Buffer & [μ l]			
Napetost / Voltage [V]			
Čas / Time [min]			
Vol. vzorca / Sample vol. [μ l]			

Opombe / Remarks:

Izvajalec / Person conducting RFLP:

Odgovorna oseba / Person in charge:

Datum izdaje poročila / Date: _____

Mnenje o rezultatih (po naročilu) / Comment of results (if ordered):

Težave (opis) / Problems (description):

Rešitev težav, ukrepi / Solutions, measurements taken:

POROČILO / REPORT

Zap. št. / No: _____

Priloga 3 - POMNOŽEVANJE DNK / DNA AMPLIFICATION

DATUM / DATE | KODA / CODE

A11/

Naročnik (Projekt) - ime in naslov/ Orderer
 (Project) – name and address

Začetna oligonukleotida / Primers:

F: _____

R: _____

Prog. pomnoževanja / Amplification prog.:

	A		B		C		Beads
	1x	x	1x	x	1x	x	
10x PCR buffer	µl	µl	µl	µl	µl	µl	
dNTP	µl	µl	µl	µl	µl	µl	
Primer F	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
primer R	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
Mg ²⁺	µl	µl	µl	µl	µl	µl	
sd H ₂ O	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
Taq – polimeraza	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
DNK ekstrakt	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
V _{skupni}	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl

A	Šifra vzorca (po Obr N04(1)) / Sam. code(as in Obr. N04(1))	Uspeh / Success	Šifra vzorca (po Obr N04(1)) / Sam. code(as in Obr. N04(1))	Uspeh / Success
1			25	
2			26	
3			27	
4			28	
5			29	
6			30	
7			31	
8			32	
9			33	
10			34	
11			35	
12			36	
13			37	
14			38	
15			39	
16			40	
17			41	
18			42	
19			43	
20			44	
21			45	
22			46	
23			47	

Rezultati se nanašajo samo na preizkušene vzorce. Poročila o poskusu se brez pisnega dovoljenja laboratorija ne sme reproducirati, razen v celoti.

24		48	
----	--	----	--

Uporabljeni reagenti / Used reagents	Proizvajalec / Manufacturer	Številka serije / Lot number
Polimeraza – tip:		
10x PCR buffer		
Mg ²⁺		
dNTP		
sd H ₂ O		

Preverjanje uspeha pomnoževanja z gelsko elektroforezo (Priloga 1 – izpis fotografije gela z opisom ali originalni Polaroid posnetek gela na strani 3/3):

Gel electrophoresis of PCR (Priloga 1 – printout of gel photo or original Polaroid photo on page 3/3):

	Vrednost / Value	Proizvajalec / Manufacturer	Številka serije / Lot number
Agarosa / Agarose			
Pufer / Buffer			
Marker			
Loading Buffer & [μl]			
Napetost / Voltage [V]			
Čas / Time [min]			
Vol. vzorca / Sample vol. [μl]			

Izvajalec / Person conducting PCR:

Odgovorna oseba / Person in charge:

Datum izdaje poročila / Date: _____

Mnenje o rezultatih (po naročilu) / Comment of results (if ordered):

Težave (opis) / Problems (description):

Rešitev težav, ukrepi / Solutions, measurements taken:

Priloga 2 - EKSTRAKCIJA DNK

DATUM / DATE: _____
KODA / CODE: _____

Projekt, naloga / Project, task: _____

	Šifra vzorca z opisom (opcija)* / Sample code*	Kvantifikacija / Quantification	Opombe / Remarks
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

* Šifra kot na napotnici Obr. N04(1) / Coda as given in Obr N04(1)

Metoda ekstrakcije / Extraction method:

Volumen resuspendirane DNK / Volume of
resuspended DNA:

Izvajalec / Person conducting extraction:

Opombe / Remarks:

Uporabljene kemikalije / Chemicals	Proizvajalec / Manufacturer	Št. serije / Lot No.
sd H ₂ O		
CTAB		
EDTA		
NaCl		
TRIS HCl		
2- merkaptoetanol		
kloroform-izoamil alkohol		
izopropanol		
etanol		
Plant DNeasy Mini Kit		

Težave (opis) / Problems (description):

Rešitev težav, ukrepi / Solutions, measurements taken:

Drugo: