Laboratorijas darbs

**Polimerāzes Ķēdes Reakcija (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Darba uzdevums: Identificēt plazmīdā ieklonēta DNS fragmenta garumu ar PCR un sekojošas agarozes gēla elektroforēzes palīdzību

**1. solis: Reakcijas maisījuma pagatavošana**

PCR reakcijas maisījums (sastāvdaļas pievieno norādītajā secībā):

35 µl ūdens

10 µl 5x reakcijas buferšķīduma

1 µl 10 mM dNTP maisījuma

1 µl Fw praimera (100 pmol/µl)

1 µl Rv praimera (100 pmol/µl)

1 µl analizējamās plazmīdas DNS (10 ng/µl)

1 µl Taq DNS polimerāzes (1 u/µl)

**2. solis: PCR reakcija**

**2.1. Sastāda sekojošu programmu PCR aparātā:**

3 minūtes pie 96⁰C; *Plazmīdas DNS denaturēšana*

30 cikli: *DNS fragmenta eksponenciāla pavairošana*

30 sekundes pie 96⁰C *DNS fragmenta denaturēšana*

30 sekundes pie 55⁰C *Praimeru “uzsēdināšana” uz DNS*

2 minūtes pie 72⁰C *DNS polimerizācijas reakcija (fragmentu sintēze)*

10 minūtes pie 72⁰C *Nepabeigto fragmentu galu aizpildīšana*

Turpmāka uzglabāšana pi +4⁰C

**2.2. 0.2 ml mikromēģene ievieto PCR aparātā un palaiž sastādīto programmu**

PCR reakcija iet aptuveni 2 stundas, rezultātus agarozes gelā analizē nākošajā nodarbībā

**3. solis agarozes gēla elektroforēze**

**3.1. Agarozes gēla pagatavošana**

Saskaņā ar pasniedzēja norādēm izkausē un nedaudz atdzesē (līdz aptuveni 50-60⁰C) agarozi, gēla izlejamā ierīcē ievieto plastmasas paliktni, kurā ielej agarozi un ievieto paraugu uznesamo ķemmīti. Agarozes gēlam ļauj sacietēt aptuveni 10-15 minūtes, uzmanīgi izvelk ķemmīti un gēlu ievieto elektroforēzes aparātā.

**3.2. Paraugu sagatavošana un elektroforēze**

Iepriekšējā reizē pagatavotajiem PCR paraugiem pievieno 10 µl bromfenolzilās krāsvielas

Ar pipeti 10 µl parauga uzmanīgi ienes agarozes gēla bedrītēs

Uz katra gēla uznes arī 10 µl DNS garuma marķieri

Elektroforēzes aparātu pievieno pie strāvas un veic elektroforēzi līdz bromfenolzilā krāsviela ir aizmigrējusi aptuveni ¾ no gēla garuma

**3.3. DNS fragmentu vizualizācija**

Gēlus uzliek uz UV lampas un vizuāli pārliecinās par DNS joslu klātbūtni paraugā. Gēlus nofotografē un fotogrāfijas ielīmē darba protokolā.

Jautājumi:

1. Kāds ir PCR fragmenta garums?
2. Pārbaudāmajā plamzīdā tika ievietots cilvēka nātrija/žultsskābju transportera proteīna gēns (proteīna Pubmed reference <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003040.1>). Vai PCR fragmenta garums atbilst ievietotā gēna garumam?
3. Pielikumā esošajā hipotētiskajā DNS konstrukta sekvencē plazmīdā (ar slīpo fontu) ir ievietots DNS inserts (ar trekno fontu). DNS konstrukta izveidē inserts var (1) neievietoties plazmīdā; (2) ievietoties tiešajā orientācijā; (3) ievietoties reversajā orientācijā. Vai varat dizainēt 2 PCR praimerus, ar kuru palīdzību pēc PCR reakcijas un elektroforēzes varētu noteikt vai (1) fragments ir ievietojies plazmīdā; (2) kādā orientācijā fragments ir ievietojies? Paskaidrojiet, kā varēs noteikt atšķirības! Praimeriem jābūt ar kušanas temperatūru robežās no 55⁰C līdz 60⁰C (atcerieties – 1 A-T bāzu pāris kušanas temperatūru palielina par 2⁰, bet G-C bāzu paris – par 4⁰).