1. Pribor i kemikalije
2. Recepti
3. Postupak
   1. Izolacija DNA
   2. PCR
   3. Elektroforeza
4. **Pribor i kemikalije**
   1. Za uzorkovanje repova
      1. Plastične mikroepruvete (tubice / epice) volumena 1,5 do 2 mL
      2. Stalak za epice
      3. Škare
      4. Pinceta
      5. 70 %-tni alkohol
      6. Ubrusi
   2. Za izolaciju DNA
      1. 50 mM NaOH
      2. 70 %-tni alkohol
         1. Može se koristiti umjesto alkohola i natrijev hipoklorit (varikina) i dH2O za detaljnije čišćenje pribora.
      3. Termoblok
      4. Centrifuga
      5. TE ili AE pufer za čuvanje DNA
   3. Za PCR
      1. Polimeraza kit koji uključuje pufer, MgCl2, enzim DNA-polimerazu
      2. Voda visoke čistoće prikladna za PCR
      3. Početnice
      4. Plastične mikroepruvete (tubice / epice) volumena 1,5 do 2 mL
      5. Plastične mikroepruvete (PCR tubice / PCR epice) volumena 0,2 mL
      6. PCR uređaj (thermocycler)
   4. Za elektroforezu
      1. Agaroza
      2. 1x TBE pufer
      3. SYBR safe boja za gel
      4. Standardna otopina s DNA odsječcima poznate veličine
      5. Kadica za elektroforezu s pripadajućim priborom za izlijevanje gela (kalup i češljići)
      6. Erlenmayerova tikvica ili staklena bočica volumena 100 mL
      7. Izvor struje
      8. UV iluminator (uređaj ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories, Inc.)
5. **Recepti**
6. **Otopina za kemijsku lizu stanica – 50 mM NaOH** 
   * 1. Najprije pripremiti 5M otopinu NaOH: 2g NaOH + 10 mL dH2O
     2. Razrjediti 5M NaoH na 50 mM
        1. Za pripremu 10 mL 50 mM otopine: 100 μL 5M NaOH + 9900 μL dH2O
        2. Razrjeđuje se 100x, dakle u omjeru 1:99
7. **Pufer za čuvanje DNA**

AE pufer je kupovni (iz Quiagen pribora za izolaciju DNA).

TE pufer pripremamo prema receptu:

* + 1. 10x TE pufer

|  |  |
| --- | --- |
| količina za 100 mL | kemikalija |
| 10 mL | 1 M Tris pH=8,0 |
| 2 mL | 0,5 M EDTA pH=8,0 |
| Dopuniti do 100 mL s | dH2O |
| \*prije upotrebe razrijediti s dH2O u omjeru 1:9 | |

* + 1. 1M Tris pH=8,0, 500 mL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 60.57 | g | Tris |
| 450 | mL | dH2O |
| Umjeri pH na 8,0 s HCl | | |
| Dopuni s dH2O do 500 mL | | |

* + 1. 0,5M EDTA pH=8,0, 100 mL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 18.6 | g | EDTA |
| 70 | mL | dH2O |
| Umjeri pH na 8,0 s NaOH | | |
| Dopuni s dH2O do 100 mL | | |

1. **Pufer za elektroforezu nukleinskih kiselina**
   * 1. 10x TBE

|  |  |
| --- | --- |
| količina za 500 mL | kemikalija |
| **54 g** | **Tris baze** |
| **27,5 g** | **borna kiselina, H3BO3** |
| **3,75 g** | **EDTA (=kompleksal)** |
| Dopuniti do 500 mL | dH2O |
| \*prije upotrebe razrijediti s dH2O u omjeru 1:9 | |

1. **Gel za elektroforezu**

Agarozu pomiješati s 1x TBE puferom i dodati SYBR safe boju. Boja je fluorescentna, pa gel treba ostaviti da se ohladi i stvrdne u mraku.

* + - 1. 60 mL (za veliku kadicu; 16 bunarića u 1 redu)

**1,02 g agaroze + 60 mL 1x TBE pufer + 6 do 10 μL SYBR safe boje**

* + - 1. 30 mL (za malu kadicu; 8 bunarića u 1 redu)

**0,51 g agaroze + 30 mL 1x TBE pufer + 3-5 μL SYBR safe boje**

1. **PCR master mix**

Recept za pripremu master mix-a s kemikalijama “Dream Taq Green PCR master mix (2x)” (Thermo Scientific, kat. br. K1081)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Master mix**  **za 1 reakciju od 25 μL** | **V / μL** | **x broj uzoraka x 1,1** |
| Dream Taq master mix (2x) | 12.5 |  |
| Forward primer | 1 |  |
| Reverse primer | 1 |  |
| dH2O | 10 |  |

* + 1. Po 24,5 μL pripremljenog master mixa staviti u PCR epice i dodati 0,5 μL uzorka DNA.
    2. Napomena:

Pripremiti master mix s početnicama za WT (1) kao jednu reakcijsku smjesu i master mix s početnicama za KO (2) kao drugu reakcijsku smjesu, iz razloga što PCR nema dobar rezultat kada se sve početnice zajedno stave u jedan master mix.

* + 1. Početnice (sljedovi baza)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Galgt1** | | |
| **KO** | 4 | “GM 738 3' “ Neo null 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3' |
| 5 | “GM 739 5' “ Neo null 5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3' |
| **WT** | 6 | “GM 742“ WT sense 5'-TGC CTC AGC CAA CAG CTT CC-3' |
| 7 | “GM 743” WT antisense 5'-CGC CCT ATC GAA ACA CAC AGG-3' |
| **St8sia1** | | |
| **WT** | 12 | “SA 269 common to” 5'-GCA AGA CGT TGT CAT AGT AGT-3' |
| 13 | “SA 270 WT primer” 5'-CAC AGT TAC ATC TAC ATG CCT-3' |
| **KO** | 12 | “SA 269 common to” 5'-GCA AGA CGT TGT CAT AGT AGT-3' |
| 14 | “SA 271 Target prim” 5'-TCG CCT TCT TGA CGA GTT CTT CTG AG-3' |

\*\*\*Napomena: Kad naručujem početnice (opaska 20.10.2020.: trenutno naručujem od tvrtke Gorea plus) tražim početnice sljedećih specifikacija:

Nemodificirane DNA-početnice (Unmodified DNA-oligos);

Purification: Desalted; Shipping condition: Dry;

Skala sinteze 0.04 μmol (Scale 0.04 μmol);

**Resuspendiranje početnica (primera) prije upotrebe**.

1. Kratko centrifugirati sadržaj u dostavljenim mikroepruvetama
2. Dodati TE pufer – koliko ćeš dodati vidi sljedeće:
   * Pročitaj navedenu množinu početnice (izražena je u nmol = nanomolima).
   * Taj broj pomnoži s 10.
   * Rezultat je volumen TE pufera u μL koji se doda početnicama.
   * Nakon dodanog volumena TE, koncentracija početnica je 100 μM. To je stock otopina, a radna mora imati koncentraciju 10 μM, pa se razrjeđuju s PCR vodom u omjeru 1:9.
   * Primjer: početnica ima množinu 26.90 nmol. 26,90 x 10 = 269

Dodaj u mikroepruvetu 269 μL TE pufera.

1. Vortexirati pa staviti na tresilicu (shaker) na 2 h pri 410 rpm (kako bi se dobro otopili).
2. **Postupak**
   1. **Izolacija DNA „brzom i prljavom“ metodom** prema Truett GE et al. 2000. Biotechniques 29(1):52-54
      1. U epicu staviti komadić repa
      2. Dodati 100 μL 50 mM NaOH
      3. Kuhati smjesu 30 min pri 95 °C
      4. Centrifugirati epice 5 min pri 3500 rpm (oko 1000 x g)
      5. Otpipetirati i baciti NaOH
      6. Dodati 50 μL AE ili TE pufera
      7. Kratko vortexirati
      8. Pohraniti na 4 °C ili na -20 °C ako DNA treba u dužem periodu
   2. **PCR**
      1. Pripremiti PCR prema protokolu
      2. Pokrenuti PCR uređaj – user „neuro“ > program „Galgt“ ili „Siat“ > volumen „25 uL“ > start
   3. **Određivanje veličine odsječaka DNA elektroforezom**
      1. Dream Taq Green PCR master mix je već pomiješan s puferom za nanošenje uzoraka u jažice agaroznog gela, stoga 5-15 μL PCR produkta direktno nanijeti na gel (dodam 7 μL)
         1. Ako je korišten bezbojni pufer uzorke treba pomiješati s bojom – Loading Buffer ili Loading Dye
      2. Uvjeti elektroforeze: 100 V, 30 min (20-30 min)

**PCR master mix**

**Recept za pripremu master mix-a s kemikalijama DNA-polymerase kit, TaKaRa, #R001(A) (250 U)**

Kit sadrži:

i-TaqTM DNA Polymerase (5U/㎕)

10X PCR Buffer\* (w/20mM MgCl2 )

10X MgCl2 free PCR Buffer

10mM dNTPs (2.5mM/each)

25mM MgCl2

Nama je potrebno:

i-TaqTM DNA Polymerase (5U/㎕)

10X PCR Buffer (bez Mg)

10mM dNTPs (2.5mM/each)

25mM MgCl2

Još dodamo svoje početnice (primere) i vodu, čistoće prikladne za PCR.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Master mix**  **za 1 reakciju od 25 μL** | **V / μL** | **x broj uzoraka x 1,1**  *(za WT reakciju koristimo primere 6 i 7)* | **x broj uzoraka x 1,1**  *(za KO reakciju koristimo primere 4 i 5)* |
| PCR pufer (10x) (bez Mg) | 2,5 |  |  |
| MgCl2, 25 mM | 1,5 |  |  |
| dNTP | 2 |  |  |
| Forward primer | 0,25 |  |  |
| Reverse primer | 0,25 |  |  |
| dH2O | 18,125 |  |  |
| iTaq DNA-polimeraza | 0,125 |  |  |

U svaku PCR tubicu staviti: 24,7 μL master mix + 0,3 μL DNA uzorak

\*Recept je za oba genotipa (B4Galnt1 i St8sia1).

Nakon PCR-a, a prije nanošenja uzorka na gel, uzorak se mora pomiješati s bojom kako bismo ih uopće vidjeli na gelu. Boja koju koristimo je **DNA Loading Buffer (6x)** (Lonza, #50655): dodaje se 1 dio boje i 5 dijelova uzorka, odnosno 5 μL boje + 25 μL uzorka.

Imamo još i boju **TrackIt, Cyan/Yellow Loading Buffer (6x)** (Invitrogen, #10482-035). Jednako se dodaje kao i prethodni opisan od Lonza-e.