**Izolácia totálnej DNA**

Tekutú bunkovú kultúru sme centrifúgovali 10 min. v chladenej centrifúge pri 4 °C a 10 000 RPM. K peletu buniek sme pridali 1 ml SET roztoku (75 mmol.dm-3 NaCl, 25 mmol.dm-3 EDTA, 20 mmol.dm-3 Tris-HCl) s čerstvým prídavkom lyzozýmu. Obsah ependorfnej skúmavky sme dôkladne premiešali pipetovaním a prípadne aj pomocou vortexu. Parafilmom obalené ependorfné skúmavky boli následne 30 min. inkubované v rotátore pri teplote 37 °C. Bunkový lyzát bol po tomto kroku inkubovaný 15 min v termobloku pri teplote 55 °C s prídavkom 1/5 objemu 10% SDS. Nasledovala inkubácia 30 min. s 1 μl RNAzy. Po nej sme ku vzorkám pridali 1/3 objemu 5 mol.dm-3 NaCl a chloroform v pomere 1:1. Parafilmom obalené ependorfné skúmavky sme inkubovali v rotátore 30 min. pri laboratórnej teplote. Po 10 min. centrifugácii (10 000 RPM) sme pomocou pipety s odrezanou špičkou prepipetovali prečistenú vrchnú fázu do novej ependorfnej skúmavky a pripadli k nej chloroform opät v pomere 1:1. Skúmavky sme opatrne premiešali kývaním. Vzorky sme následne centrifugovali 10 min. 10 000 RPM a vrchnú fázu sme ako v predchádzajúcom kroku preniesli do čistej skúmavky. Nasledovala 15 min inkubácia s izopropanolom v pomere 1:1. Po inkubácii boli vzorky 10 min. centrifugované v chladenej centrifúce (4 °C a 10 000 RPM). K sedimentu DNA sme pridali 70% etanol (200 μl ) a centrifugovali 10 min pri 4 °C a 10 000 RPM. Po odstránení prebytočného etanolu sme sediment DNA dosušili v termostate. Na záver sme DNA nechali rozpúšťať v 50 μl roztoku TE (10 mmol.dm-3 Tris-HCl a 1mmol.dm-3 EDTA).

**Agarózová elektroforéza**

1% agarózový gél sme pripravili rozpustením 1 g agarózy v 100 ml tlmivého roztoku TAE (40 mmol.dm-3 Tris-HCl, 20 mmol.dm-3 EDTA, 20 mmol.dm-3 octan draselný) zahrievaním v mikrovlnej rúre. Gél sme zafarbili pomocou etídium bromidu (0,5 μg/ml). Pripravený roztok agarózy sme opatrne naliali na plastový podnos s hrebeňmi. Po stuhnutí gélu sme podnos vložili do elektroforetickej aparatúry, v ktorej sa nachádzal tlmivý roztorok TAE. Do jednotlivých jamiek gélu sme pomocou pipety naniesli pripravené vzorky DNA premiešané so Stop roztokom (0,05% Bromfenolová modrá, 0,1 mmol.dm-3 EDTA, 50% glycerol). Pripravenú aparatúru sme pripojili na zdroj napätia (90 V). Po prebehnutí elektroforetického delenia sme výsledok sledovali pod UV svetlom a zaznamenali ho dokumentačným zariadnením Gel Logic 212 PRO Imaging System.

**PCR (Polymerázová reťazová reakcia)**

PCR box a všetky využívané pomôcky sme si pred prácou vysterilizovali UV svetlom po dobu 20 min. V PCR boxe sme pracovali celý čas na ľade. Najskôr sme si pripravili roztok všetkých komponentov (Master Mix) na amplifikáciu podľa schémy, do objemu 50 μl:

* 5 μl tlmivého roztoku MgCl2; 2 mol.l-1
* 1 μl dNTP mix; 250 μmol.l-1
* 0,5 μl fD1 primeru; 1 μmol.l-1
* 0,5 μl rP2 primeru; 1 μmol.l-1
* 0,25 μl TAQ polymeráza
* doplniť do 50 μl - sterilná voda
* 1 μl totálna DNA

Po napipetovaní v PCR boxe sme pridali DNA v druhom laboratóriu aby sa zamedzilo kontaminácii. Následne sme pripravené mikroskúmavky vložili do termocykléra a spustili pripravený program:

* Počiatočná denaturácia – 95 °C, 5 min.

30 cyklov:

* Denaturácia – 95 °C, 1 min.
* Nasadenie – 52 °C, 1 min.
* Extenzia – 72 °C, 3 min.
* Finálna extenzia – 72 °C, 15 min.
* Chladenie – 10 °C, 20 min.

**RFLP analýza (Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov)**

Na sterilnú platničku sme si postupne napipetovali jednotlivé zložky reštrikčnej zmesi a nakoniec sme pridali našu vzorku. Reštrikčná zmes sa skladala z 1 μl BsuRI enzýmu, 2 μl reštrikčného tlmivého roztoku Buffer R, 16s rRNA amplikónu podľa koncentrácie a bola doplnená sterilnou vodou do 20 μl. Platničku sme prelepili lepiacou páskou, aby sme zabránili odpareniu vzoriek a vložili do termostatu pri 37 °C na 1 hodinu. Po ukončení reakcie sme pridali STOP roztok.