

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

Ćwiczenie nr 3.

Detekcja genów oporności na ampicylinę- elektroforeza i analiza produktów PCR

Izotermalna amplifikacja DNA-detekcja *Mycoplasma* przy użyciu zestawu firmy Vazyme.

Odczynniki:

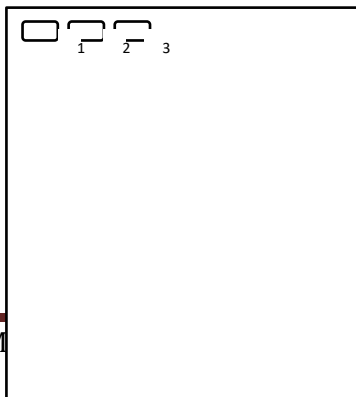
Bufor Green (6x stęż.)
Marker DNA Perfect 100-1000bp
1% żel agarozowy w buforze TBE lub TAE
Bufor do elektroforezy MycoBlue Buffer
MycoBlueEnzyme
Positive Control
Woda (DEPC)- wolna od nukleaz

Sprzęt:

Miniwirówka
Aparat do elektroforezy DNA z zasilaczem
Transiluminator
Termocykler lub termoblok

Zadanie 1. Elektroforeza produktów PCR z ćwiczenia 2

1. Odebrać własne probówki z produktami PCR z pokoju przygotowawczego
2. Probówki zwirować i nakładać na dołki w żelu agarozowym. Pamiętać, aby do pierwszego dołka nałożyć marker długości fragmentów DNA (drabinka DNA). Elektroforezę prowadzić przez 45-60 min przy 80-100V.
3. Po elektroforezie żel umieścić na lampie UV (transiluminator). Wyniki przedstawić graficznie poniżej na schemacie



Marker DNA Perfect 100-1000bp
Próbka PCR
Próbka NC

Szacunkowa wielkość produktu wynosiła.....

Analizowane plazmidowe DNA zawierało/nie zawierało gen oporności na ampicylinę (skreśl błędne).

Oporność na ampicylinę bakterie nabywają dzięki.....(wpisz nazwę genu),
kodującego enzym....., odpowiadający za
.....

Zadanie 2. Izotermalna amplifikacja DNA

1. Przepisać opis próbówki z medium hodowlanym:.....
2. Przygotować sterylną próbówkę o objętości 0,2 ml i podpisać.
3. Do próbówki dodać 12 μ l MycoBlue, a następnie 0,5 μ l MycoBlue Enzyme (zgodnie z tabelą poniżej). Składniki dokładnie wymieszać przez pipetowanie.
4. Do próbówki dodać 1 μ l przygotowanego medium z hodowli, dokładnie wymieszać przez pipetowanie i zwirować tak, aby całość roztworu znalazła się na dnie próbówki.
5. Wyznaczone przez prowadzących zespoły zamiast próby badanej przygotowują próbę z kontrolą negatywną i pozytywną zgodnie z tabelą poniżej.
6. Probówkę umieścić w termocyklerze i prowadzić reakcję w 60°C przez 1 godzinę.
(UWAGA: Reakcję można prowadzić w termobloku, pamiętając o doborze probówek odpowiadających wielkościowo używanemu blokowi oraz co bardzo ważne, nakropić olej parafinowy na powierzchnię mieszaniny reakcyjnej, aby przeciwdziałać parowaniu roztworu)
7. Porównać zabarwienie mieszaniny reakcyjnej z kontrolą negatywną i pozytywną, po czym zanotować wyniki.

Odczynnik	Próbka badana	Kontrola negatywna	Kontrola pozytywna
MycoBlue Buffer	12 μ l	12 μ l	12 μ l
MycoBlue Enzyme	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Medium z hodowli	1 μ l	-	-
Positive control	-	-	1 μ l
Woda (DEPC)	-	1 μ l	-

Wyniki analizy:

Barwa kontroli pozytywnej.....

Barwa kontroli negatywnej.....

Barwa roztworu po reakcji..... świadczy, że w próbce znajdowało się/ nie znajdowało się* DNA Mykoplazmy.

Zastosowany test na Mykoplazmę wykrywa rodzajów *Mycoplasma*, bez/z * ich różnicowaniem.

(* właściwe podkreślić)

Uzupełnij tabelę porównującą technikę PCR z izotermalną amplifikacją

	<i>Jakościowy PCR</i>	<i>Izotermalna amplifikacja</i>
<i>Bezpośrednia detekcja cząsteczek (bez dodatkowych reakcji)</i>		
<i>Enzym (nazwa i aktywność)</i>		
<i>Ilość starterów</i>		
<i>Konieczność użycia termocyklera</i>		
<i>dNTPs</i>		
<i>Temperatura (zmienna/stała)</i>		
<i>Wymagana denaturacja matrycy</i>		
<i>Konieczność stosowania elektroforezy</i>		
<i>Ilość produktów</i>		
<i>Produkty o zdefiniowanej ilości</i>		
<i>Użycie jako metody detekcji</i>		
<i>Użycie produktów do dalszych analiz, klonowania, sekwencjonowania</i>		
<i>Możliwość skrócenia czasu reakcji</i>		
<i>Możliwość użycia poza laboratorium</i>		
<i>Możliwość automatyzacji</i>		