

Grupa.....

Data:.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 8.

Badanie mutacji punktowej metodą PCR-RFLP oraz translokacji Bcr-Abl za pomocą multipleksowego PCR c.d.

UWAGA! Proszę przynieść na zajęcia własne rękawice.

Odczynniki:

Sterylna woda
Produkty PCR dla fragmentu *TP53* z poprzednich ćwiczeń
Bufor Green (6x stęż.)
Enzym *NspI* (Fermentas)
Bufor FastDigest 10x (Fermentas)
Marker DNA Perfect 100-1000bp
2% żel agarozowy w buforze TBE
Bufor do elektroforezy TBE

Sprzęt:

Miniwirówka
Vortex
Termoblok
Aparat do elektroforezy DNA z zasilaczem
Transiluminator

Zadanie 1.

1. Produkty PCR dla *TP53* trawić enzymem *NspI* dodając do mieszaniny reakcyjnej: 3 µl wody, 5 µl mieszaniny PCR, 1 µl buforu Fast Digest 10x, 1 µl enzymu *NspI* (10U/µl). Dokładnie wymieszać i zwirować.
2. Inkubować w temperaturze 37°C przez 1 godzinę
3. Oczekiwane produkty trawienia: allel zmutowany 204pz+113pz+109pz, allel dziki 313pz+113 pz

Zadanie 2.

1. Mieszaninę po trawieniu oraz produkty PCR (multipleksowego dla translokacji BCR-ABL i pozostałe 5 µl PCR dla *TP53*) zwirować i nakładać na dołki w żelu agarozowym (**przed tym dodać 6x Loading Buffer tam, gdzie nie był dodany bezpośrednio w odczynnikach reakcyjnych- roztwory bez zabarwienia**). Elektroforezę prowadzić przez 45-60 min przy 80-100V.
2. Po elektroforezie żel umieścić na lampie UV (transiluminator). Wyniki przedstawić graficznie poniżej. Uzupełnić legendę.

12345	LEGENDA Marker DNA Perfect 100-1000bp
--	---

Ilość fragmentów w próbce po trawieniu *NspI* o szacunkowej wielkości (pz).....

Analiza PCR_RFLP wskazuje, że próbka miała/nie miała (niewłaściwe skreśl) mutację R273H w TP53 i była heterozygotą/homozygotą (niewłaściwe skreśl)

Wielkość produktu PCR dla identyfikacji translokacji Bcr-Abl wynosiła....., co świadczy o obecności/braku translokacji w badanych komórkach, a zidentyfikowane transkrypty były typu.....

