

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

.....

Ćwiczenie nr 7 i 8

„Identyfikacja organizmów modyfikowanych genetycznie”

cz.1- izolacja DNA z żywności i PCR

cz.2- elektroforeza fragmentów PCR i interpretacja wyników.

cz.1- izolacja DNA z żywności i PCR

Zadanie 1. Izolacja DNA z produktów spożywczych (soja, kotlety sojowe, mąka kukurydziana, kaszka kukurydziana, płatki kukurydziane, kakao), zestaw Genomic mini AX Food.

1. Przygotuj 100 mg materiału, w zależności od rodzaju wybranego materiału użyj moździerza.
2. Maksymalnie 100mg rozdrobnionego materiału pochodzenia roślinnego umieścić w probówkach 2ml.
3. Dodać po 1.5ml zawiesiny lizującego roztworu **Proteinazy K**.
4. Całość wymieszać i inkubować przez 30 min w temp. 50°C. Probówki należy mieszać od czasu do czasu przez odwracanie.
5. Po inkubacji próbki intensywnie worteksować przez **15 s**, a następnie wirować **5 min** przy **10 000-14 000 RPM**.
6. W trakcie wirowania przygotować kolumny umieszczone w probówkach 15ml i nanieść po **800 µl** roztworu równoważącego **K1**. Poczekać aż roztwór wypłynie z kolumny.
7. Po wirowaniu pobrać supernatant i nanieść go na zrównoważone uprzednio kolumny (na dnie powinien znajdować się zwarty osad stanowiący mieszaninę niezlizowanego materiału oraz drobinek pochodzących z mieszaniny lizującej) . Poczekać aż lizat przejdzie przez kolumny (kolumna pracuje grawitacyjnie).
8. Płukać kolumny przez dodanie po **1.5 ml** roztworu płuczącego **K2**. Poczekać aż roztwór wypłynie z kolumny.
9. Powtórzyć płukanie przez ponowne naniesienie na kolumnę po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2**. Poczekać aż roztwór wypłynie z kolumny.

10. Dodać **250 µl** roztworu elucyjnego **K3** (ten krok ma na celu zmniejszenie objętości eluatu gdyż martwa objętość kolumny wynosi 250 µl).
 11. Przenieść kolumny do **2ml** probówek do precypitacji (kolumna z zestawu, z żeberkami do umieszczenia probówki). Eluować DNA przez dodanie do kolumn po **1ml** roztworu elucyjnego **K3**.
 12. Do eluatów zawierających DNA dodać **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**, wymieszać i wirować **10 min** przy **10 000 RPM**.
 13. Ostrożnie usunąć supernatant i dodać do probówek do precypitacji **500 µl** 70% etanolu.
- (Uwaga: na dnie probówki strącającej powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA) Wymieszać próbki i wirować przez **3 minuty** przy **10000 obr./min**.
14. Ostrożnie usunąć supernatant i osuszyć na powietrzu osad DNA przez **5 minut** w pozycji „do góry nogami” w probówkach do strącania w temperaturze pokojowej.
 15. Wyizolowane DNA rozpuścić w **50 µl** sterylnej wody wolnej od nukleaz albo Tris buffer (10 mM, pH 8.5)albo buforze TE.
 - 16.

Zadanie 2. Przygotowanie reakcji PCR

1. Przygotuj mieszaninę reakcyjną w sterylnych opisanych probówkach o pojemności 0,2 ml ze starterami namnażającymi promotor 35S CaMV wirusa mozaiki kalafiora (silny promotor obecny w większości roślin transgenicznych
2. Przygotuj roztwory zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli poniżej.

odczynnik	Stężenie końcowe	Objętość/ 45 µl	NC (kontrola negatywna)
Woda	-	oblicz µl	oblicz
Bufor dla polimerazy 10x stężony	1x	1µl	1µl
Starter FOR (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
Starter REV (5µM)	0,25 µM	0.5 µl	0.5 µl
Mieszanina dNTP (2mM)	0,2mM	1 µl	1 µl
DNA		1 µl	-
Polimeraza 0,5U/ µl	0,25	0,5 µl	0,5 µl

Program reakcji PCR:

Krok	Temp. [°C]	Czas trwania
1	94	5 min
2	94	30s
3	54	30s
4	72	30s
5	Do kroku 2-29 razy	
6	72	3 min
7	10	

Cz. 2 - elektroforeza fragmentów PCR i interpretacja wyników, zadania

Zadanie 3. Elektroforeza

Elektroforeza uzyskanych fragmentów DNA prowadzone jest w 1% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advanced DNA Stain (4 µl/100ml) w buforze TAE (40mM octan, Tris, 1 mM EDTA pH 8). Próbkę DNA wymieszać z odpowiednią ilością 6x stężonego buforu obciążającego i nałożyć na żel. Do jednej ze studzienek nałożyć marker masy. Elektroforezę prowadzić przy napięciu 75V przez 45 min. Obserwować układ prążków pod transiluminatorem i zinterpretować wyniki.

Narysuj obserwowany obraz prążków:

Zadania do opracowania:

- 1) Wymień jakimi technikami można przeprowadzić transfekcję w celu dokonania modyfikacji genetycznych :
- 2) Jaki jest cel modyfikacji genetycznych? Wymień co najmniej 4 przykłady.
-
-
-
-
3) Jakie produkty GMO można znaleźć w obrocie handlowym i w uprawie?
-