



Molekuláris biológiai technikák alkalmazása az élelmiszer-eredetvizsgálatban

Készítette:

Czeplédi Levente – Csikós Ádám

Készült a **TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014** azonosító számú projekt
keretében.

Debrecen

2014., korrig., 2015.

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású
egyetemi együttműködés,
DE-SZTE-EKF-NYME



A projekt az Európai Unió támogatásával,
az Európai Szociális Alap
társfinanszírozásával valósul meg.

TARTALOMJEGYZÉK

I. Vizsgálatba vont gének szekvenciái, BLAST algoritmus használata, a fajok közötti SNP eltérések azonosítása	3
II. Alapvető laboratóriumi számítások	13
III. Laboratóriumi módszerek	16
III/1. Genomi DNS izolálása tejből (Zsolnai és Orbán, 1999, által közölt módszer általunk módosított változata)	17
III/2. Genomi DNS izolálása sajtból (De és mtsai, 2011)	19
III/3. E.Z.N.A. Tissue DNA Kit – szövetből történő DNS izoláláshoz	21
III/4. Vérből DNS tisztítás (Zsolnai és Orbán, 1999).....	23
III/5. Genomi DNS izolálása szőrhagymából	25
III/6. Polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction, PCR).....	26
III/7. PCR reakció univerzális primerek alkalmazásával	27
III/8. Touchdown PCR reakció fajspecifikus primerek alkalmazásával (fragmentméret szerinti elkülönítés)	30
III/9. Hőmérséklet gradiens polimeráz lánreakció (PCR)	37
III/10. PCR-RFLP (PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)	39
III/11. PCR-heteroduplex analízis.....	42
III/12. PCR-SSCP (PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus).....	46
III/13. PCR-DGGE és PCR-TTGE	50
III/14. Agaróz gélelektroforézis	60
III/15. Poliakrilamid gélelektroforézis	61
III/16. Troubleshooting – Gélképek és magyarázatuk	64

I. Vizsgálatba vont gének szekvenciái, BLAST algoritmus használata, a fajok közötti SNP eltérések azonosítása

A fajok közötti különbségek keresése során jellemzően a mitokondriális genomban kódolt géneket használunk. Ezekre jó példa a citokróm b (cytb), a citokróm oxidáz I. alegység gén (COI), 12S rRNS, 16S rRNS gének, illetve a D-loop régió. Ezeknek jellemzői, hogy számos konzervált régiót tartalmaznak, amelyek azonos bázissorrenddel rendelkeznek különböző fajok esetében is. Ugyanakkor a konzervált régiókat jellemzően variábilis szakaszok váltják, amelyek a fajok közötti genetikai különbségeket adják, és alapot szolgáltatnak a fajok molekuláris genetikai módszerekkel történő elkülönítésére. Az ily módon kiválasztott DNS szakaszok fajon belüli variabilitással nem rendelkeznek, a fajra jellemzőek.

A fajok közötti bázissorrendbeli különbségek kimutatására alkalmas a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) bioinformatikai algoritmus. A módszer heurisztikus (véletlenszerű, rátaláló) algoritmus alapján illeszti a vizsgált nukleinsav, vagy fehérjék esetében aminosav szekvenciákat. Az így kapott eredmény megmutatja a fajok közötti szekvencia különbségeket.

The European Bioinformatics Institute
Part of the European Molecular Biology Laboratory

EMBL-EBI provides freely available data from life science experiments, performs basic research in computational biology and offers an extensive user training programme, supporting researchers in academia and industry.

Find a gene, protein or chemical:

Search

Examples: blast, keratin, bf1...

Popular

- Services
- Research
- Training
- News
- Jobs
- Visit us
- EMBL
- Contacts

Industry Programme

Science and Society 2014

What is

News from EMBL-EBI

- CTTV Centre for Therapeutic Target Validation
- ProteomeXchange
- BioJS

Where do you start when

The rise of open

BioJS collection of


```

gi |1256201|dbj|D84205.1|SHPMTCBE      CCACTTAACACTCCCCTCACATCAAACTGAATGACTTCTCTATTGCATACGCAATC
gi |1256160|dbj|D84201.1|GOTMTCBA      CCACTCAATACACCCCTCACATTAACCTGAGTGGTATTCTCTATTGCATACGCAATC
gi |516661|dbj|D34635.1|BOVMTCBA      CCACTCAACACACCTCCACATCAAGCCTGAATGGTACTTCTATTGCATACGCAATC
gi |1813366|dbj|D82894.1|              *****

gi |1256201|dbj|D84205.1|SHPMTCBE      TTACGATCAATCCCTAATAAAGTAGGAGGAGTCCTGCCCTAGTCTCTCAATCTCAAGTC
gi |1256160|dbj|D84201.1|GOTMTCBA      CTACGATCAATCCCAAACTAGGAGGAGTCCTAGCCCTAGTCTCTCAATCTCAATC
gi |516661|dbj|D34635.1|BOVMTCBA      CTACGATCAATCCCAATAAAGTAGGAGGAGTCCTAGCCCTAGTCTCTCAATCTCAATC
gi |1813366|dbj|D82894.1|              *****

gi |1256201|dbj|D84205.1|SHPMTCBE      CTAGTAATTATACCCCTCTCCATACATCAAAAGCAAGGAGCATAAATATCCGACCAATC
gi |1256160|dbj|D84201.1|GOTMTCBA      TTAGTACTTGTACCCTTCTCCACACATCTAACAACGAAGCATAAATATCCGCCCAATC
gi |516661|dbj|D34635.1|BOVMTCBA      CTTATTCTCATCTCCCTACTACACACATCCAACAAGCAAGCATAAATATCCGACTGCTC
gi |1813366|dbj|D82894.1|              CTTATTCTCATCTCCCTGCTACATACATCCAACAACGAAGTATGATCTCCGCCCAATC
* * * * *

gi |1256201|dbj|D84205.1|SHPMTCBE      AGTCAATCTATATTCTGAATCCTAGTAGCCGACCTATTAACACTCACATGAATGGAGGC
gi |1256160|dbj|D84201.1|GOTMTCBA      AGCCAATGCATATTCTGAATCCTGTAGCAGATCTATTAACTACTCACATGAATGGAGGA
gi |516661|dbj|D34635.1|BOVMTCBA      AGCCAATGCCTGTCTGAATTTAGTAGCAGACCTACTAACACTCACATGAATGGAGGA
gi |1813366|dbj|D82894.1|              AGCCAATGCCTATTCTGAATTTAGTAGCAACCTGCTAACACTCACATGGATTGGAGGA
* * * * *

gi |1256201|dbj|D84205.1|SHPMTCBE      CAGCCAGTTGAACCCCTACATCATTATTGGACAACACTAGCATCTATTATATATTTCTCT
gi |1256160|dbj|D84201.1|GOTMTCBA      CAGCCAGTGAACATCCCTACATTTATTATTGGACAACACTAGCATCTATTATATATTTCTC
gi |516661|dbj|D34635.1|BOVMTCBA      CAACAGTTGAACATCCATACATCATCTATTGGACAACACTAGCATCTATCATATACTTCTC
gi |1813366|dbj|D82894.1|              CAGCCAGTGAACATCCCTATAATTATCTATTGGACAACACTAGCATCTATATACTTCTC
* * * * *

gi |1256201|dbj|D84205.1|SHPMTCBE      ATCATTTAGTCATAATACCAGTAGCTAGCATCATCGAAAAACAACCTCTAAAATGAAGA
gi |1256160|dbj|D84201.1|GOTMTCBA      ATCATTTAGTAAATAATACCAGCAGCTAGCACCATTGAAAAACAACCTCTAAAATGAAGA
gi |516661|dbj|D34635.1|BOVMTCBA      CTCATCTTAGTGTAAATACCACAGCCGCACAGTTGAAAAACAACCTCTAAAATGAAGA
gi |1813366|dbj|D82894.1|              CTCATCTTAGTGTAAATACCACAGCCGCACAGTAAATGAAGA
* * * * *

```

*: az adott pozícióban minden faj esetében azonos nukleotid van jelen

G: az a nukleotid kerül kiemelésre, amely a fajok többségétől eltér

BLAST algoritmussal kapott szekvencia-illesztési eredmény négy faj (szarvasmarha, bivaly, juh, kecske) 12S rRNS gén szekvenciái alapján.

```

gi |261499764|gb|GQ926965.1|          CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAATAATTAATAAACAA
gi |311120200|gb|HM623881.1|          ----CTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAAATATAAAGAACAA
gi |311120201|gb|HM623882.1|          ----CTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAAATATATTAACAA
gi |311120202|gb|HM623883.1|          ----CTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAAATATATTAACAA
*****

gi |261499764|gb|GQ926965.1|          AATTATTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAGCTTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTT
gi |311120200|gb|HM623881.1|          AATTATTCGCCAGAGTACTACCAGCAACAGCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTT
gi |311120201|gb|HM623882.1|          AATTATTCGCCAGAGTACTACCAGCAATAGCCTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTT
gi |311120202|gb|HM623883.1|          AATTATTCGCCAGAGTACTACCAGCAATAGCCTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTT
*****

gi |261499764|gb|GQ926965.1|          ATATCCTTCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATTCT
gi |311120200|gb|HM623881.1|          ATACCTTCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATCCT
gi |311120201|gb|HM623882.1|          ATATCCCCCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTCACCAATTCT
gi |311120202|gb|HM623883.1|          ATATCCCCCTAGAGGAGCCTGTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTCACCGATTCT
* * * * *

gi |261499764|gb|GQ926965.1|          TGCTAATACAGTCTATATACCGCCATCTTACGCAAAACCTAAAAA-GGAAAGAAAGTAAG
gi |311120200|gb|HM623881.1|          TGCTAATACAGTCTATATACCGCCATCTTACGCAAAACCTAAAAAAGGACAAAAGTAAG
gi |311120201|gb|HM623882.1|          TGCTAATGCACTCTATATACCGCCATCTTACGCAAAACCTAAAAA-GGTACAAAAGTAAG
gi |311120202|gb|HM623883.1|          TGCTAATGCACTCTATATACCGCCATCTTACGCAAAACCTAAAAA-GGAACAAAAGTAAG
*****

gi |261499764|gb|GQ926965.1|          CCTAATTATGATACATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAAATGGGAAGAAATG
gi |311120200|gb|HM623881.1|          CTCAAATAACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAATGGGAAGAAATG
gi |311120201|gb|HM623882.1|          CGCAATCACAATGCATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAAATGGGAAGAAATG
gi |311120202|gb|HM623883.1|          CTCAATCACAACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAATGGGAAGAAATG
* * * * *

gi |261499764|gb|GQ926965.1|          GGCTACATTTCTACACCAAGAATAACAAGCAGCAAGTATTATGAAACCAATAACCA
gi |311120200|gb|HM623881.1|          GGCTACATTTCTACACCAAGAAAATTTAAT-ACGA-AAGCCATTATGAAATTAATAGCCA
gi |311120201|gb|HM623882.1|          GGCTACATTTCTACACCAAGAAATCCCAACAGCAAGTATTATGAAAGTAAATAACCA
gi |311120202|gb|HM623883.1|          GGCTACATTTCTACCTTAAGAAAATTAATACGA--AAGCCATTATGAAATTAATAGCCA
*****

```

```

gi|261499764|gb|GQ926965.1|      AAGGAGGATTTAGCAGTAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCAC
gi|311120200|gb|HM623881.1|      AAGGAGGATTTAGCAGTAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATCAGGCCATGAAGCAC
gi|311120201|gb|HM623882.1|      AAGGAGGATTTAGCAGTAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAACTAGGCCATGAAGCAC
gi|311120202|gb|HM623883.1|      AAGGAGGATTTAGTAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCAC
*****
*****

gi|261499764|gb|GQ926965.1|      GCACACACCGCCCGTCACCCTC-----
gi|311120200|gb|HM623881.1|      GCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTAAATATGATATACTTAAACCTATTTACATAT
gi|311120201|gb|HM623882.1|      GCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTAAATATAATGCATCCAACCTATTTAAATGC
gi|311120202|gb|HM623883.1|      GCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTAAATACAATGCACTCAAACCTATTAACACGC
*****

gi|261499764|gb|GQ926965.1|      -----
gi|311120200|gb|HM623881.1|      ATCAACCACACGAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTG
gi|311120201|gb|HM623882.1|      ACTAACCACATGAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTG
gi|311120202|gb|HM623883.1|      ATCAACTACATGAGAGGAGATAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTG

```

*: az adott pozícióban minden faj esetében azonos nukleotid van jelen

G: az a nukleotid kerül kiemelésre, amely a fajok többségétől eltér

Primertervezés

1. Fajspecifikus primertervezés
2. Univerzális primertervezés

Primertervezés során alkotjuk meg azokat a lánckezdő oligonukleotidokat, amelyek segítségével később polimeráz láncreakció során a vizsgálat szempontjából érdekes DNS régiókat felszaporítjuk. A felhasznált primerek lehetnek fajspecifikusak vagy univerzálisak. A fajspecifikus primerek csak az adott fajra jellemző méretű szakasz felszaporítását teszik lehetővé, míg az univerzális primerek esetében azonos méretű szakasz felszaporítása válik lehetővé, amit a későbbiekben olyan módszerek felhasználásával lehet vizsgálni, amelyek az adott szakasz bázissorrendjét vagy konformációs eltéréseit képesek kimutatni.

A primertervezéshez több program is rendelkezésre áll. Ilyenek például a Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) illetve az OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), amely online és szoftveres formában is elérhető.

A lenti szekvencia-illesztés humán fogyasztásra használt állatfajok (+ember) 12S rRNS génjének szekvenciáját tartalmazza. A BLAST algoritmus segítségével végrehajtott illesztés eredményeként megkapjuk azokat a konzervatív és variábilis DNS szakaszokat az egyes fajok esetében, amelyek figyelembevételével képesek vagyunk mind fajspecifikus, mind univerzális primerek tervezésére. Ebben az esetben univerzális primerek tervezése történt. Zölddel vannak jelölve azok a szakaszok az egyes fajok esetében, amelyek mindegyiknél megegyeznek, tehát megfelelőek univerzális primerek tapadási helyének. A zölddel jelölt

szakaszokon belül pirossal jelöltük az eltéréseket. A forward primer szekvenciája megegyezik az illesztett szekvencia egy adott részletével, míg a reverse primer annak komplementere.

ember (*Homo sapiens*) - gi|251831106|ref|NC_012920.1|
 őz (*Capreolus capreolus*) - gi|470232093|ref|NC_020684.1|
 kecske (*Capra hircus*) - gi|316926505|ref|NC_005044.2|
 bivaly (*Bubalus bubalis*) - gi|52220982|ref|NC_006295.1|
 szarvasmarha (*Bos taurus*) gi|60300051|emb|AJ885201.1|
 nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) - gi|5835526|ref|NC_001913.1|
 házi sertés (*Sus scrofa*) - gi|223976078|ref|NC_012095.1|
 sertés (*Sus scrofa*) - gi|5835862|ref|NC_000845.1|
 házi kacska (*Anser anser*) - gi|197935720|ref|NC_011196.1|
 ló (*Equus caballus*) gi|5835107|ref|NC_001640.1|
 juh (*Ovis aries*) - gi|5835554|ref|NC_001941.1|
 muflon (*Ovis aries musimon*) - gi|298110775|gb|HM236185.1|
 galamb (*Columba livia*) - gi|291612274|ref|NC_013978.1|
 dámvad (*Dama dama*) - gi|470234101|ref|NC_020700.1|
 gímszarvas (*Cervus elaphus*) - gi|294494684|ref|NC_007704.2|
 házityúk (*Gallus gallus*) - gi|5834843|ref|NC_001323.1|
 pulyka (*Meleagris gallopavo*) - gi|323690831|ref|NC_010195.2|
 pézsmaréce (*Cairina moschata*) - gi|190349328|ref|NC_010965.1|
 házi kacska (*Anas platyrhynchos*) - gi|154125702|ref|NC_009684.1|
 gyöngytyúk (*Numida meleagris*) - gi|54310668|ref|NC_006382.1|

A 12S rRNS gén bázisrendjében található egyezőségek és eltérések (piros) különböző fajok esetében.

gi 251831106 ref NC_012920.1	CAGGGTTG	GTCAAT	TCGTGCCAGCCA	CCGCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGA-
gi 470232093 ref NC_020684.1	-AGGGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAAGTTAA-----
gi 316926505 ref NC_005044.2	-AGGGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAAGCTAA-----
gi 52220982 ref NC_006295.1	AAGGGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAAGCTAA-----
gi 60300051 emb AJ885201.1	-----	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAAGCTAA-----
gi 5835526 ref NC_001913.1	TAGGGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAATTA-----
gi 223976078 ref NC_012095.1	TAGAGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAATTA-----
gi 5835862 ref NC_000845.1	TAGAGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAATTA-----
gi 197935720 ref NC_011196.1	AAGGGTTG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACAAGAAACCCAATCAACCGTC
gi 5835107 ref NC_001640.1	AAGGGTTG	GTAATCT	TCGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAATTA-----
gi 5835554 ref NC_001941.1	CAGGGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTGACCCAAGCTAA-----
gi 298110775 gb HM236185.1	CAGGGTTG	GTAATCT	CGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTGACCCAAGCTAA-----
gi 291612274 ref NC_013978.1	CAGGGTTG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCACACAAGAGACCCAAGCTAATCGT-
gi 470234101 ref NC_020700.1	TAGGGTTG	GTAATCT	TCGTGCCAGCCA	CCGCGGCCATACGATTAACCCAAGTTAA-----
gi 294494684 ref NC_007704.2	TAGGGTTG	GTAATCT	TCGTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACGATTAACCCAAGTTAA-----
gi 5834843 ref NC_001323.1	CAGGGTTG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACAAGAAACCCAATCAA-----
gi 323690831 ref NC_010195.2	TAGGGTTG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACAAGAAACCCAATCAA-----
gi 190349328 ref NC_010965.1	AAGGGCCG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACAAGAGGCCCAATCAACTGT-
gi 154125702 ref NC_009684.1	AAGGGTCG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACAAGAGACCCAATCAACTGT-
gi 54310668 ref NC_006382.1	CAGGGTTG	GTAATCT	GTGCCAGCCA	CCGCGGTCATACAAGAAACCCAAGTCAA---T-
fl-r	-----	-----	-----	-----

gi|251831106|ref|NC_012920.1|
gi|470232093|ref|NC_020684.1|
gi|316926505|ref|NC_005044.2|
gi|52220982|ref|NC_006295.1|
gi|60300051|emb|AJ885201.1|
gi|5835526|ref|NC_001913.1|
gi|223976078|ref|NC_012095.1|
gi|5835862|ref|NC_000845.1|
gi|197935720|ref|NC_011196.1|
gi|5835107|ref|NC_001640.1|
gi|5835554|ref|NC_001941.1|
gi|298110775|gb|HM236185.1|
gi|291612274|ref|NC_013978.1|
gi|470234101|ref|NC_020700.1|
gi|294494684|ref|NC_007704.2|
gi|5834843|ref|NC_001323.1|
gi|323690831|ref|NC_010195.2|
gi|190349328|ref|NC_010965.1|
gi|154125702|ref|NC_009684.1|
gi|54310668|ref|NC_006382.1|
f1-r

gi|251831106|ref|NC_012920.1|
gi|470232093|ref|NC_020684.1|
gi|316926505|ref|NC_005044.2|
gi|52220982|ref|NC_006295.1|
gi|60300051|emb|AJ885201.1|
gi|5835526|ref|NC_001913.1|
gi|223976078|ref|NC_012095.1|
gi|5835862|ref|NC_000845.1|
gi|197935720|ref|NC_011196.1|
gi|5835107|ref|NC_001640.1|
gi|5835554|ref|NC_001941.1|
gi|298110775|gb|HM236185.1|
gi|291612274|ref|NC_013978.1|
gi|470234101|ref|NC_020700.1|
gi|294494684|ref|NC_007704.2|
gi|5834843|ref|NC_001323.1|
gi|323690831|ref|NC_010195.2|
gi|190349328|ref|NC_010965.1|
gi|154125702|ref|NC_009684.1|
gi|54310668|ref|NC_006382.1|
f1-r

gi|251831106|ref|NC_012920.1|
gi|470232093|ref|NC_020684.1|
gi|316926505|ref|NC_005044.2|
gi|52220982|ref|NC_006295.1|
gi|60300051|emb|AJ885201.1|
gi|5835526|ref|NC_001913.1|
gi|223976078|ref|NC_012095.1|
gi|5835862|ref|NC_000845.1|
gi|197935720|ref|NC_011196.1|
gi|5835107|ref|NC_001640.1|
gi|5835554|ref|NC_001941.1|
gi|298110775|gb|HM236185.1|
gi|291612274|ref|NC_013978.1|
gi|470234101|ref|NC_020700.1|
gi|294494684|ref|NC_007704.2|
gi|5834843|ref|NC_001323.1|
gi|323690831|ref|NC_010195.2|
gi|190349328|ref|NC_010965.1|
gi|154125702|ref|NC_009684.1|
gi|54310668|ref|NC_006382.1|
f1-r

-----AGCCGGCGTAAAGAGTGTGTTTAGATC--ACCCCTCCC--CAATAAGCTAAAA
-TAGGCACACGGCGTAAAGCGTGTAAAA-----GCATTCTATA--AAATAAGGTTCAAT
-CAGGAATACGGCGTAAACCGTGTAAAA-----GCACATACATC--AAATAGAGTTAAAT
-CAGGAGTACGGCGTAAATGTGTTAAAA-----GCACACCGCT--AAATAGAGTTAAAT
-CAGGAGTACGGCGTAAACCGTGTAAAA-----GCACCATACC--AAATAGGTTAAAT
-TAAATATCCGGCGTAAAGCGTGATTA-----GAATAAACCAAAATAAAATCAAAAT
-TAGATCCACGGCGTAAAGAGTGTGTTAA-----GAAAAAAAATCACAATAGAGTTAAAT
-TAGATCCACGGCGTAAAGAGTGTGTTAA-----GAAAAAAAATCACAATAGAGTTAAAT
CTATTGACACGGCGTAAAGAGTGGTAA--AATGCCTATCCTAGCT--AACTAAGATCAAAA
-TAAATCTCCGGCGTAAAGCGTGTAAAA-----GACTAATACC--AAATAAAGTTAAAA
-CAGGAGTACGGCGTAAAGCGTGTAAAA-----GCATCATACT--AAATAGAGTTAAAT
-CAGGAGTACGGCGTAAAGCGTGTAAAA-----GCATCATACT--AAATAAAGTTAAAT
-----TTGCGGCGTAAAGAGTGGACT--CATGC--TATCACAAT--AATTAAGGTTCAAAA
-TAAGCACACGGCGTAAAGCGTGTAAAA-----GCACTGTACT--AAATAAAGTTAAAT
-TAGGCATACGGCGTAAAGTGTGTTAAAA-----GCATATACT--AAATAAAGTTAAAT
-TAGCTACCCGGCGTAAAGAGTGGCCA--CATGT--TATCTGCACC--AGCTAAGATTAAAA
-TAGCCATCCGGCGTAAAGAGTGGTCA--CATGC--TATCTATACC--AATTAAGATCAAAAG
CCACATAAGCGGCGTAAAGAGTGGTAAATAAATGCTTATCCTACTT--AACTAAGATCAAAA
-CCTACAAGCGGCGTAAAGAGTGGTAA--GATGCCATCCTACTT--AACTAAGATCAAAA
-AATCCATCCGGCGTAAAGAGTGGTAA--CATG--TTATCAAACC--AACTAAGATCAAAA

CTCACCTGAGTTGTAAAAAAGCCAGTTGA--CACAAAATAGACTAC--GAAAGTGGCTTTA
CCTAATTAAGCTGTAAAAAGCCATAATTAC--AATGAAAAATAGATAACGAAAGTAACTTTA
TCTAATTAAGCTGTAAAAAGCCATAATTAC--AACAAAATAGATGACGAAAGTAAACCCCTA
TTTAATTAAGCGTAAAAAAGCCATAATTTTC--AATAAAAATAGCAACGAAAGTGAACCTTA
TCTAAGTGTGTAAAAAGCCATGATTAA--AATAAAAATTAATGACGAAAGTGAACCCCTA
AACAACTAAGCTGTAGAAGTAATAGTTGCAAAACAAAATAAACACGAAAGTGAATTTTA
TATAACTAAGCTGTAAAAAGCCCTAGTTAA--AATAAAAATAACCCAC--GAAAGTGAACCTTA
TATAACTAAGCTGTAAAAAGCCCTAGTTAA--AATAAAAATAACCCAC--GAAAGTGAACCTTA
TGCAACTGAGCTGTACATAAGCCCAAGATGC--ACCTAAACACACCAT--TAAGATGATCTTTA
CCGAGTTAAGCGTAAAAAAGCTACAACCAA--AGTAAAATAGACTAC--GAAAGTGAACCTTA
TTTAATTAAGCTGTAAAAAGCCATAATTAT--AACAAAATTAATGACGAAAGTAAACCCCTA
TTTAATTAAGCTGTAAAAAGCCATAATTAT--AACAAAATTAATGACGAAAGTAAACCCCTA
CGCAACTGAGCTGTACATAAGCCATAAGATGC--ATTTAAAACCGCCCT--AAAGTGAACCTTA
TCCAAATTAAGCTGTAAAAAGCCATAATTGC--AACAAAATAAACACGAAAGTGAACCTTA
TCCAAATTAAGCTGTAAAAAGCCATAATTGT--AACAAAATATATAACGAAAGTAACTTTA
TGCAACCAAGCTGTACATAAGCCATAAGATTC--ACCTAAACCCCAACCC--AAATFCACTTTA
TGTAACTAAGCTGTACATAAGCCCAAGATTC--ACCTAAGCCAGCCTAAAAATGATCTTTA
TGCGGCTAAGCTGTGCAAGCACAGACGC--ACCTAAACACACCAT--CAAGATGATCTTTA
TGCAACTAAGCTGTGCAAGCACAGATGC--ACCTAAACACACCAT--CAAGATGATCTTTA
TGTAACTAAGCTGTACATAAGCCATAAGATTC--ACCTAAACCCCAACCT--CAAAAATCTTTA

ACATATC-----TGAACACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
AAATAGC-----TGAA--ACACGATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
CTGCAGC-----TGAT--ACACTATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
TAACAGC-----TGAC--ACACTATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
CAATAGC-----CGAC--GCACATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
TACTCTT-----CGAACTACGATAGCTAAGGCCAAACTGGGATTAGATACCC
ATAATCC-----TGAC--ACACGATAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
ATAATCC-----TGAC--ACACGATAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
GGAACTAACGACTGATTTAAAC--CCACGAAAGCCAGGGCCAAACTGGGATTAGATACCC
ATACCTC-----TGACTACAGGATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
CAATAGC-----TGAT--ACACCATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
CAATAGC-----TGAT--ACACCATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
AATTCACAAGACTTAATGAACT--CCACGAAAGCCAGGGCCAAACTGGGATTAGATACCC
TAGCCGC-----TGAA--ACACGATAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
CAACCCG-----TGAA--ACACGATAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
GCCTCAA--CGATTAATTTTAAAC--CCACGAAAGCTAGGACCCAAACTGGGATTAGATACCC
--ACTTAACGATCAATTTAAAG--CCACGAAAGCCAGGGCCAAACTGGGATTAGATACCC
GAAACTAGCGACGGATTTAAAC--CCACGAAAGCCAGGGCCAAACTGGGATTAGATACCC
GAAACTAGCGATTAATTTAAAC--CCACGAAAGCCAGGGCCAAACTGGGATTAGATACCC
GCCACCA--CGACCAATTTTAAAC--CCACGAAAGCCAGGGCCAAACTGGGATTAGATACCC

```

gi|251831106|ref|NC_012920.1|      AGGTGGATTTAGCAGTAAACTAAGAGTAGA-----GTGCTTAGTTGAACAGGGCCCT
gi|470232093|ref|NC_020684.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAAT
gi|316926505|ref|NC_005044.2|      AGGAGGATTTAGTAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|52220982|ref|NC_006295.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|60300051|emb|AJ885201.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|5835526|ref|NC_001913.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|223976078|ref|NC_012095.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|5835862|ref|NC_000845.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|197935720|ref|NC_011196.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|5835107|ref|NC_001640.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|5835554|ref|NC_001941.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|298110775|gb|HM236185.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|291612274|ref|NC_013978.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAAGAGGGATAATAT-----AAGCCCCCTTTAAGCTGGCTCT
gi|470234101|ref|NC_020700.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|294494684|ref|NC_007704.2|      AGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGA-----GTGCTTAGTTGAATTAGGCCAT
gi|5834843|ref|NC_001323.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAAGTGAGATCATACTCCCTAAGCTCACTTTAAGACGGCTCT
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      AGGAGGATTTAGCAGTAAAGTAAGACCATACTTCTCTTAAGCCTACTTTAAGACGGCCCT
gi|190349328|ref|NC_010965.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAAGTGAGGACAATA-----GAGCCTACTTTAAGCCGGCCCT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAAGCGGGACAATA-----AAGCTCGCTTTAAGCCGGCCCT
gi|54310668|ref|NC_006382.1|      AGGAGGATTTAGCAGTAAAGTGGACCATACTATCTTAAGCCATTTTAAGCCGGCTCT
f1-r
*** *****
gi|251831106|ref|NC_012920.1|      GAAGCGGTACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAA-CTA
gi|470232093|ref|NC_020684.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAATAAGCAAAAATACATTTAAAT-TAT
gi|316926505|ref|NC_005044.2|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATACAATGCATCAAGCC-TAT
gi|52220982|ref|NC_006295.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATAATGCATCAAGCC-TAT
gi|60300051|emb|AJ885201.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAATAGATTGAGTGCATCAAGCC-TAT
gi|5835526|ref|NC_001913.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTGACAAAATATTTACTTAACTAAT
gi|223976078|ref|NC_012095.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGCATGTAGTAATAAAAAAAGCCATA
gi|5835862|ref|NC_000845.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGCATGTAGTAATAAAAAAAGCCATA
gi|197935720|ref|NC_011196.1|      GGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--AAGCCACATCC-CACATAAC-TA-
gi|5835107|ref|NC_001640.1|      GAAGCGGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTTAAATATCACAAATCATAACATAACATAA
gi|5835554|ref|NC_001941.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATGATATACTTAAACC-TAT
gi|298110775|gb|HM236185.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATGATATACTTAAACC-TAT
gi|291612274|ref|NC_013978.1|      GGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--TAAGCTCTAAACTACCAATAA-AT-
gi|470234101|ref|NC_020700.1|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTAGGCACAATACACTCAAAT-TAT
gi|294494684|ref|NC_007704.2|      GAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGTAGGCACAGTCACTCAAAT-TAT
gi|5834843|ref|NC_001323.1|      GGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--CAAGCATCAACATCAATAA-TAT
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      GGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--CAAGCTATCAATTTCAATAA-TA-
gi|190349328|ref|NC_010965.1|      AGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--CAAGCCACACCCCAACATAA-TA-
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      AGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--TAAGCCACACCCCAACATAA-TA-
gi|54310668|ref|NC_006382.1|      GGGGCAGGTACATACCGCCCGTCACCCCTCCTCA--CAAGCCACCTCCACCGGATAA-TA-
f1-r
-----
gi|251831106|ref|NC_012920.1|      AAACCCCTACGCATTTATATAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|470232093|ref|NC_020684.1|      TTATACGTATAAAACCATATGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|316926505|ref|NC_005044.2|      TAACACGCATCAACTACATGAGAGGAGATAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|52220982|ref|NC_006295.1|      TTAATATGCACTAAACCATGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|60300051|emb|AJ885201.1|      TTAACCGCACTAGCTACATGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGA----
gi|5835526|ref|NC_001913.1|      TACATAAATAGACAAGCATAAAGAGGAGATAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|223976078|ref|NC_012095.1|      TTCAATTACACAACCATGCAAGAAGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|5835862|ref|NC_000845.1|      TTCAATTACACAACCATGCAAGAAGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|197935720|ref|NC_011196.1|      --ATACCTAAATACGCTGAAGATGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|5835107|ref|NC_001640.1|      AACCGTGACCCAAACATATGAAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|5835554|ref|NC_001941.1|      TTACATATATCAACCACACGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|298110775|gb|HM236185.1|      TTACATATATCAACCACACGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|291612274|ref|NC_013978.1|      --AATACTCCTACCTGCTAAAGATGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|470234101|ref|NC_020700.1|      TCATACGTATTAATACATGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|294494684|ref|NC_007704.2|      TTGCACGTATTAATACATGAGAGGAGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCATAGCTGGAAAGT
gi|5834843|ref|NC_001323.1|      ATACTTCCCCCTCCCGCTAAAGACGAGGACAAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      --ATACCCAAACCTAGCTAAAGATGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|190349328|ref|NC_010965.1|      --ATACCTAAACATGCAAAAGATGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      --ATACCCAGTAAATGCCAAAGATGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
gi|54310668|ref|NC_006382.1|      --ACACC-CTCCCGCCAAAGACGAGGTAAGTCGTAACAAGGTAAGCTAGCTGGAAAGT
f1-r
-----

```

Jelen esetben a forward és reverse primer helye is önkényesen lett kijelölve figyelembe véve azt, hogy milyen méretű fragmentumot szeretnénk a későbbiekben felszaporítani. A tervezni kívánt primerek hossza átlagosan 20 bp, ami megfelelő stabilitást és specifitást képes adni a tervezett rövid nukleotid szakasznak.

Hasonló esetekben a primertervezés lépései a következők (az OligoAnalyzer programot alapul véve):

1. Vizsgálni kívánt fajok szekvenciáinak gyűjtése nukleotid adatbázisokból (NCBI Nucleotide).
2. Az összegyűjtött szekvenciák BLAST algoritmussal történő többszörös illesztése (European Bioinformatics Institute, ClustalOmega szoftver).
3. A kapott eredmény alapján a tervezni kívánt primerek tapadási régiójának kijelölése.
4. A reverse primer szekvenciájának pontos meghatározása a Sequence Manipulation Suite oldalon található Reverse complement menüpont alkalmazásával.
5. Ismert a forward és reverse primerek 5' – 3' irányú szekvenciája.
6. Az OligoAnalyzer online felületén a szekvenciáinkat analizálhatjuk, miután pontosan megadtuk a későbbi PCR reakció során alkalmazni kívánt Mg^{2+} és dNTP koncentrációt. Az Analyze gombra kattintva a program megadja az adott primer komplementerét, hosszúságát, GC bázisok százalékos arányát, valamint a tapadási hőmérsékletet.
7. A Self-dimer gombra kattintva megkapjuk a primer saját magával alkotott lehetséges dimerjeinek kapcsolódási lehetőségeit és a hozzájuk rendelt ΔG értéket, amely -9 kcal/mól értéknél negatívabb érték esetében nem elfogadható.
8. A Hetero-dimer gombra kattintva és előzőleg beillesztve a primer másik párjának szekvenciáját is megkapjuk a lehetséges kapcsolódási variációikat, valamint szintén a hozzájuk rendelhető ΔG értékeket, amelyek szintén -9 kcal/mól értéknél negatívabb érték esetében nem elfogadhatóak.

Amennyiben a primerek egymással és önmagukkal kis valószínűséggel képeznek dimereket, illetve a primerpár két tagjának tapadási hőmérséklete jelentősen nem tér el ($\Delta T=5^{\circ}C$), akkor a megtervezett primerek megrendelhetőek a gyártótól.

II. Alapvető laboratóriumi számítások

1. Tömegszázalékos oldat

Az oldatok tömegszázalékos összetétele definíciószerűen azt jelenti, hogy 100 g tömegű oldat hány g tömegű oldott anyagot tartalmaz. Jelölése: m/m%.

Kiszámításának módja: oldott anyag tömege (m_x) (gramm) osztva az oldat tömegével (m_o) (gramm), szorozva 100-al.

Mindez képlettel kifejezve: $m_x/m_o \times 100$.

Példa: DNS izoláláshoz szükségünk van 0,75 m/m%-os KCl oldatra.

Ebben az esetben 100 g tömegű oldatban 0,75g KCl kerül feloldásra, vagyis az oldott anyag mennyisége 0,75g, míg az oldószeré 99,25g, azaz a teljes oldat 100g.

2. Térfogatszázalékos oldat

Az oldatok térfogatszázalékos összetétele definíciószerűen azt jelenti, hogy 100 ml térfogatú oldatban mennyi ml térfogatú oldott anyag található. Jelölése: v/v%, vagy V/V%.

Kiszámításának módja: oldott anyag térfogata (v_x) (milliliter) osztva az oldat térfogatával (v_o) (milliliter), szorozva 100-al.

Mindez képlettel kifejezve: $v_x/v_o \times 100$.

Példa: Poliakrilamid gél ezüsfestéséhez szükségünk van 5,75 v/v%-os etanol oldatra.

Ebben az esetben 100 ml térfogatú oldatban 5,75 ml etanol kerül feloldásra, vagyis az oldott anyag térfogata 5,75 ml, míg az oldószeré 94,25 ml, azaz a teljes oldat 100 ml.

3. Vegyesszázalékos oldat

A legtöbb esetben ilyen oldatok kerülnek összeállításra. Az oldatok vegyesszázalékos összetétele definíciószerűen azt jelenti, hogy 100 ml térfogatú oldatban hány g oldott anyag található. Jelölése: m/v%, vagy m/V%.

Kiszámításának módja: oldott anyag tömege (m_x) (gramm) osztva az oldat térfogatával (v_o) (milliliter), szorozva 100-al.

Mindez képlettel kifejezve: $m_x/v_o \times 100$.

Példa: Poliakrilamid gél ezüsfestéséhez szükségünk van 0,1 m/v%-os AgNO_3 (ezüst-nitrát) oldatra. Ebben az esetben 100 ml végtérfogatú oldatban 0,1 g AgNO_3 kerül feloldásra.

4. Mólos oldat – anyagmennyiség koncentráció - molaritás

Szintén elterjedt módja az oldat töménységének jelölésére a laboratóriumi gyakorlatban. A mólos oldat definíciószerűen azt jelenti, hogy 1000 ml végtérfogatú oldatban az adott anyag 1 móljával egyező oldott anyag van feloldva. Jelölése: M.

Kiszámításának módja: oldott anyag móltömege (n) osztva az oldat térfogatával (v_o), szorozva 100-al.

Mindez képlettel kifejezve: $n/v_o \times 100$.

Példa: Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézishez 8M urea oldatra van szükségünk. Ebben az esetben ismernünk kell az urea $((\text{NH}_2)_2\text{CO})$ móltömegét, ami 60,07 g/mól. Mivel egy mól urea tömege 60,07 g, ez azt jelenti, hogy 8M-os oldat esetében $8 \times 60,07$ g, vagyis 480,56 g ureát kell feloldani 1000 ml-ben.

Megjegyzés: Nem összekeverendő a **molalitással**, aminek mértékegysége a mol/kg. A molalitás az oldott mólok száma az oldószer tömegegységében.

5. Oldatok hígítása

Számos esetben van szükség arra, hogy egy töményebb törzsoldatból egy hígabb oldatot készítsünk a laboratóriumban. Mivel azt tudjuk, hogy milyen koncentrációjú és mennyiségű oldatra van szükségünk, illetve a kiindulási oldat koncentrációja is ismert, könnyen ki lehet számolni azt, hogy a kiindulási oldatból mekkora mennyiségre van szükségünk. Ezt legegyszerűbben a hígítási képlettel tehetjük meg: $v_1 \times c_1 = v_2 \times c_2$, ahol v_1 a kiindulási oldat térfogata, c_1 a kiindulási oldat koncentrációja, míg v_2 a hígított oldat térfogata és c_2 a koncentrációja.

Példa: rendelkezésünkre áll 200 μl 150 ng/ μl koncentrációjú DNS izolátum. Szükségünk lenne 25 μl 50 ng/ μl koncentrációjú mintára. A kiindulási oldatból mennyit kell kivenni, majd azt vízzel kiegészíteni 25 μl -re, hogy a fenti oldat elkészíthető legyen?

Képletbe behelyettesítve ez a következőképpen kalkulálható:

- $v_1 \times c_1 = v_2 \times c_2$
- $v_1 \times 150 \text{ ng}/\mu\text{l} = 25 \mu\text{l} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$, elvégezve a szorzásokat, a következőt kapjuk:
- $150 \times v_1 = 1250 \quad /:150$
- $v_1 = 8,3$

Vagyis az egyenletet megoldva azt kapjuk, hogy a 150 ng/ μ l koncentrációjú oldatból 8,3 μ l-t kell kivennünk, majd vízzel 25 μ l-re kiegészítenünk ahhoz, hogy megkapjuk az 50 ng/ μ l koncentrációjú oldatot.

III. Laboratóriumi módszerek

DNS izolálás módszerei

A DNS izolálás célja, hogy a további applikációkhoz megfelelő minőségű és mennyiségű DNS álljon a rendelkezésre. Amennyiben a különböző módszerekkel izolált DNS-t hamarosan felhasználjuk, úgy nem szükséges lefagyasztani, +4 °C-on hűtőszekrényben tarthatjuk. Ez javasolt, ha a tárolás 1-2 hétnél nem tart tovább. Hosszabb távon a -20 °C fagyasztás megfelelő, de amennyiben megoldható a mélyfagyasztás az ideális (-80 °C) mert ez a hűtési mód csökkenti leginkább a degradálódás mértékét.

A DNS károsodás elkerülése végett a fagyasztásra kerülő DNS mintát érdemes kisebb egységekbe kimérni (aliquotozni), ezzel a degradáció okozta felhasználhatósági problémákat nagyrészt kiküszöbölhetjük. Mivel a degradáció leggyakoribb forrása a fagyasztás-felolvasztás ciklusok nagyszámú ismétlődése.

Az izolálás során nyert DNS koncentrációja igen széles tartományokban változhat, jellemzően az alsó tartomány az 5-10 ng/μl DNS kinyerést jelent, a magas koncentráció a 100-200 ng/ μl DNS-t jelöl. A jelen gyakorlati jegyzet utolsó protokollként foglalkozik a szőrhagymából történő DNS kinyeréssel (mivel ez csak speciális esetekben köthető élelmiszervizsgálatokhoz). Ezen utóbbi protokollnál nem izoláljuk a DNS-t, a szöveti rész proteáz enzimmel történő kezelése után a lízis pufferben megjelenő DNS koncentrációja meghaladhatja az 1000 ng/μl koncentrációt.

A legtöbb PCR alkalmazáshoz mintánként 5-10 ng DNS jelenti a minimálisan szükséges mennyiséget.

III/1. Genomi DNS izolálása tejből (Zsolnai és Orbán, 1999, által közölt módszer általunk módosított változata)

Szükséges eszközök:

- Laboratóriumi kesztyű (vnyil vagy latex)
- 1,5 ml-es mikro tesztcsövek
- 1,5 ml-es mikro tesztcső-tartó
- fagyasztóblokk 1,5 ml-es mikro tesztcsövekhez
- spatula-mikrokanál
- papírtörő (finom szálú)
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipetta 200-1000 µl
- Pipettahegyek
- Vortex
- labor centrifuga
- vízfürdő

Szükséges vegyszerek:

- lízis puffer (10 mM KCl; 1,5 M MgCl₂; 10 mM Tris /pH7,4/)
- lízis puffer (10 mM Tris; 50 mM KCl; 0,5 v/v% Tween 20)
- Proteináz K

Szükséges minták:

mintánként 1 ml tej

A munka folyamata:

1. Fajonként 1000 µl tejmintát centrifugálunk (Heraeus, BIOFUGE pico) 7 percig, 13 000 g-n.
2. A centrifugálás után a felülúszó tetején tejsír gyűlik össze, amit spatula-mikrokanál segítségével távolítunk el.
3. A pelletről lepipettázzuk a vízfázist.
4. Ezt követően 200 µl lízis puffert (10 mM KCl; 1,5 M MgCl₂; 10 mM Tris /pH7,4/) adunk a mintákhoz, azokat vortexeljük, majd 12 000 g-n, 2 percig centrifugáljuk. Leöntjük a felülúszót.
5. A 4. lépést kétszer megismételjük.
6. A mintákat tartalmazó mikro tesztcsöveket papírtörőre helyezve szárítjuk.

7. A szárítás ideje alatt összemérjük a 100 μ l lízis puffert (10 mM Tris; 50 mM KCl; 0,5 v/v% Tween 20) és 80 μ g Proteináz K (Sigma) enzimet tartalmazó elegyet.
8. Minden mintához 104 μ l elegyet adunk, a pelletet pedig ezzel az eleggyel felfuszpendáljuk.
9. A mintákat 60 percig 56 °C-os vízfürdőbe helyezzük, majd a proteináz K inaktiválása céljából 10 percre 94 °C-os vízfürdőbe kerülnek a minták.
10. Ezután az egyes izolátumok minőségi és mennyiségi ellenőrzése következhet, végül a mintákat -20 °C-on tároljuk, amíg nem kerülnek további felhasználásra.

III/2. Genomi DNS izolálása sajtból (De és mtsai, 2011)

Szükséges eszközök:

- Laboratóriumi kesztyű (vnyil vagy latex)
- steril szike
- 2 ml-es mikro tesztsövek
- 2 ml-es mikro tesztső-tartó
- fagyasztóblokk 2 ml-es mikro tesztsövekhez
- papírtörő (finom szálú)
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipetta 200-1000 µl
- Pipettahegyek
- Dörzsmozsár
- Labor centrifuga
- Vízfürdő
- Folyékony nitrogén
- analitikai mérleg

Szükséges vegyszerek:

- extrakciós puffer (75 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 0,45 v/v% SDS)
- lízis puffer (10 mM Tris; 50 mM KCl; 0,5 v/v% Tween 20)
- Proteináz K
- Fenol (pH=8)
- kloroform
- izoamil-alkohol
- izopropanol
- etanol
- TE puffer (10 mM Tris-HCl /pH 8/; 1 mM EDTA)

Szükséges minták:

mintánként 1 g sajt

A munka folyamata:

1. Hozzávetőlegesen 1 g sajtmintát folyékony nitrogén segítségével dörzsmozsárban homogenizálunk.
2. A homogenizált mintákból analitikai mérlegen 70 mg-ot mérünk ki 2 ml-es mikro tesztsőbe, ezután 900 µl extrakciós puffert (75 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 0,45 v/v% SDS) és 120 µg Proteináz-K enzimet adunk hozzá. A mintákat a hozzáadott vegyszerekkel szuszpendáljuk.

3. Egy éjszakán keresztül, 50 °C-ra beállított vízfürdőben inkubáljuk.
4. Az inkubációt követően 900 µl fenolt (pH=8) adunk a mintákhoz, ezután néhányszor átforgatjuk őket, mikrocentrifugában centrifugáljuk (Heraeus, BIOFUGE pico) 15700 g-n 10 percig, végül a felső vizes fázisból 800 µl-t átvizünk egy másik 2 ml-es mikro tesztsőbe.
5. 800 µl 25:24:1 arányú fenol-kloroform-izoamil-alkohol elegyet adunk a mintákhoz, ezután 15 700g-n 10 percen át centrifugáljuk, végül a felső vizes fázisból 500 µl-t vizünk át egy másik 2 ml-es mikro tesztsőbe.
6. 500 µl 24:1 arányban összeállított kloroform-izoamil-alkoholt adunk a mintákhoz, majd 15700 g fordulaton centrifugáljuk, ezt követően 300 µl mennyiséget vizünk át a felülúszóból 2 ml-es mikro tesztsőbe.
7. A DNS kicsapást 0,8 térfogat arányú izopropanollal hajtjuk végre, a mintákat 5 percre 4 °C-ra helyezzük, végül 12500 g-n 10 percig centrifugáljuk, ezután a nukleinsav a cső alján pelletként jelenik meg.
8. A pelletet 70 v/v%-os etanollal mossuk, majd papírtörlőre fordítva szárítjuk a mintákat.
9. 100 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl /pH 8/; 1 mM EDTA), egy órán keresztül inkubáljuk a pelletet 65 °C-on.
10. Az inkubálást követően a mintákat felhasználásig -20 °C-on tartjuk.

III/3. E.Z.N.A. Tissue DNA Kit – szövetből történő DNS izoláláshoz

Az eszközök és a vegyszerek többségét a kit tartalmazza. Az alábbi listában azok kerülnek felsorolásra, melyeket a felhasználónak kell biztosítania.

Szükséges eszközök:

- Laboratóriumi kesztyű (vnyil vagy latex)
- steril szike
- 1,5 ml-es mikro tesztcsövek
- 1,5 ml-es mikro tesztcső-tartó
- fagyasztóblokk 1,5 ml-es mikro tesztcsövekhez
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipetta 200-1000 µl
- Pipettahegyek
- Dörzsmozsár
- Labor centrifuga
- Vízfürdő
- Folyékony nitrogén

Szükséges vegyszerek:

- etanol
- TE puffer (10 mM Tris-HCl /pH 8/; 1 mM EDTA)
- PBS puffer

Szükséges minták:

Mintánként 1 g hús/máj vagy más fogyasztásra kerülő állati szövet.

A gyártó egy speciális kit-et javasol a magas zsírtartalmú szövetekből történő DNS kinyeréshez (például szalonna, egyéb zsírrészek, agy).

A munka folyamata:

1. 20-30 mg (jelen esetben 50 mg) kiindulási mintát dörzsmozsárban felaprítunk folyékony nitrogén segítségével. (1 g körüli mennyiséget szikével levágunk a szövetekből, homogenizáljuk, majd a letárazott 1,5 ml-es mikro tesztcsőbe mérjük.)

2. Ehhez 200 µl TL puffert adunk.

3. Hozzáadunk 25 µl OB proteázt. Opcionálisan változtatható a mennyiség, a kiindulási minta tömegével arányosan. Vortexeljük a mintákat, majd 3 órára 56 °C-os vízfürdőbe tesszük, 20-30 percenként vortexeljük.
4. Centrifugáljuk 2 percig, maximum fordulatszámon. A felülúszót óvatosan átvisszük egy új mikro tesztcsőbe.
5. 220 µl BL puffert adunk a mintához, óvatosan vortexeljük. 220 µl abszolút etanolt mérünk a mintára, majd újra vortexeljük.
6. Az oszlopra 100 µl equilibráló puffert mérünk, az oszlopot egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyezzük, 1 percig maximum fordulatszámon centrifugáljuk. Az átfolyót és a gyűjtőcsövet eldobjuk.
7. Az 5. pontban összeállított teljes mintát átvisszük az oszlopra és egy új gyűjtőcsőbe helyezzük. A centrifugálás paraméterei: 10.000 g-n, 1 percig. Az átfolyót és a gyűjtőcsövet eldobjuk.
8. Új 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyezzük az oszlopot. 500 µl HB puffert mérünk hozzá. Centrifugáljuk 10000 g fordulaton, 1 percig. Az átfolyót eldobjuk, gyűjtőcsövet következő lépésben felhasználjuk.
9. 700 µl DNA Wash puffert adunk a mintára. Ismételten centrifugáljuk 10000 g-n, 1 percig. Átfolyót eldobjuk, gyűjtőcsövet következő lépésben felhasználjuk.
10. 400 µl DNA Wash puffert mérünk az oszlopra. Ismételten centrifugáljuk 10000 g-n, de ezen utolsó lépésnél hosszabban, 3 percig. Átfolyót és gyűjtőcsövet eldobjuk.
11. Az oszlopot egy steril 1,5 ml-es mikro tesztcsőbe helyezzük és 50 µl 70 °C-ra előmelegített Elution puffert adunk az oszlopra. 2 percig szobahőn állni hagyjuk.
12. A 11. lépés ismétlése. Majd a mintákat -20 °C-on tároljuk.

III/4. Vérből DNS tisztítás (Zsolnai és Orbán, 1999)

A genomiális DNS izolálása Tris-EDTA oldattal, illetve proteinázt tartalmazó lízis pufferrel történik.

Szükséges eszközök:

- Laboratóriumi kesztyű (vnyil vagy latex)
- 1,5 ml-es mikro tesztcsövek
- 1,5 ml-es mikro tesztcső-tartó
- fagyasztóblokk 1,5 ml-es mikro tesztcsövekhez
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipetta 200-1000 µl
- Pipettahegyek
- Labor centrifuga
- Vízfürdő
- Asztali vortex

Szükséges vegyszerek:

- vérmosó oldat (10 ml 1M Tris; pH 7,5 + 1ml 0,2M EDTA; pH 7,43)
- proteináz K (15mg proteinase K por-enzim + 1ml steril desztillált víz) (-20 °C-on tárolva)
- lízis puffer (10mM Tris + 50mM KCl + 0,5% Tween20) (ezeket 1000 ml-re egészítjük ki desztillált vízzel, majd autoklávban 110 °C-on sterilezzük)

Szükséges minták:

mintánként 50 µl vér

A munka folyamata:

1. 1,5 mikro tesztcsövenként 0,5 ml (500 µl) vérmosó oldatot adagolunk (a vörösvértestek eltávolítása céljából, mivel a Fe²⁺ ionok inhibitorai a PCR reakciónak), majd 50 µl vérmintát mosunk bele az oldatba.
2. Az elegyet 10 másodperces vortexelés után 2 percig centrifugáljuk (1200 fordulat/perc).
3. A centrifugálás után a felülúszó elegyet leöntjük, majd a mosás, vortexelés, centrifugálás műveletét még kétszer megismételjük.

4. A harmadik mosást követően a felülúszó elegyet ismét eltávolítjuk és a csövek aljára tapadt pelletet reszuszpendáljuk 100 µl lízis puffert és 4 µl proteináz K enzimet tartalmazó elegyben.
5. Az emésztés vízfürdőben történik 56 °C-on, 60 percig.
6. A proteináz enzim deaktiválása céljából a mintákat 10 percre áthelyezzük egy 94 °C-os vízfürdőbe.
7. Az előkészített mintákat -20 °C-on tároljuk a további vizsgálatig.

III/5. Genomi DNS izolálása szőrhagymából

Szükséges eszközök:

- Laboratóriumi kesztyű (vnyil vagy latex)
- 1,5 ml-es mikro tesztcsövek
- 1,5 ml-es mikro tesztcső-tartó
- fagyasztóblokk 1,5 ml-es mikro tesztcsövekhez
- Pipetta 20-200 µl
- Pipetta 200-1000 µl
- Pipettahegyek
- Labor centrifuga
- Vízfürdő

Szükséges vegyszerek:

- „Hair” puffer (250 µl Tween 20 + 5 ml 10xPCR puffer MgCl₂ nélkül + 5 ml MgCl₂ (25mM) + desztillált vízzel 50 ml-re kiegészítve.
- proteináz K (15mg proteinase K por-enzim + 1ml steril desztillált víz) (Promega, Medison, USA) (-20 °C-on tárolva)

Szükséges minták:

mintánként 5-10 szőrszál, melyen megtalálható a szőrhagyma

A munka folyamata:

1. 1,5 ml-es mikro tesztcsövekbe 5-10 db szőrhagymát vágunk, ügyelve arra, hogy a hagyma felett maximum 0,5 cm szőrszál legyen.
2. A levágott hagymákra rápipettázunk 100 ul lízis puffert és 5 ul proteináz K enzimet, majd asztali centrifugán 30 másodpercig, maximum fordulaton centrifugáljuk. Leellenőrizzük, hogy a szőrhagymák belekerültek-e az oldatba.
3. 60 percig 60 °C-on vízfürdőben inkubáljuk.
4. Az emésztés után az enzim inaktiválása céljából 20 percig 95 °C-os vízfürdőbe helyezzük.
5. Az így nyert genomiális DNS mintákat -20 °C-on tároljuk a további vizsgálatig.

III/6. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR)

A polimeráz láncreakció egy széles körben elterjedt molekuláris biológiai módszer, amelyet K. B. Mullis dolgozott ki 1985-ben. Az eljárást nem csak a kutatásban, de a diagnosztikában, illetve a törvényszéki vizsgálatokban is alkalmazzák. A módszerrel lehetőség nyílt bármilyen szervezetről származó, bármilyen célszekvencia felszaporítására megfelelő primerek alkalmazása mellett. A módszer egy hőstabil DNS-polimeráz enzimet igényel (Taq polimeráz) a DNS célszekvencia felszaporítására, és a ciklusokból felépülő folyamat egy a hőmérsékletet rendkívül pontosan és gyorsan szabályzó készülékben játszódik le (thermocycler).

A reakció elméleti háttere, hogy a DNS templát 5' végével komplementer oligonukleotidok megfelelő hőmérséklet mellett képesek a folyamat kezdő lépéseként egyszálúvá tett DNS láncjaihoz hibridizálni. A DNS polimeráz a primertől indulva 5'-3' irányban haladva az egyszálú DNS templáton megszintetizálja az adott szál komplementerét, ehhez dezoxiribonukleozid-5'-trifoszfátokat (dNTP) használ fel.

A reakció ciklusokból épül fel, amelyek meghatározott hőmérsékleten lejátszódó lépésekből állnak össze. Az első lépés a denaturálás, amelynek során a felszaporítandó, még kétszálú DNS-t 95 °C-on egyszálúsítjuk, a két láncot összekötő hidrogénhidak megszüntetjük. A második lépés az anellálás, amikor is az egyszálú oligonukleotid primerek a hőmérséklet csökkenésének hatására hibridizálnak az egyszálú DNS templátokkal. Az egyes primerek az esetek többségében 8-20 nukleotid hosszúságúak és szintetikusak. A harmadik lépcsőfok a polimerizáció/extenzió folyamata, amely alatt 72-75 °C-on a hőstabil enzim – Taq polimeráz – a primerek 3' végét hosszabítja meg, mindkét szálon. A ciklusok 35-40 alkalommal is ismétlődhetnek, amelyek során a Taq polimeráz az újonnan szintetizálódó DNS-szálakat is templátként hasznosíthatja, ami a DNS mennyiségének exponenciális növekedését vonja maga után.

III/7. PCR reakció univerzális primerek alkalmazásával

Mitochondriális 12S rRNS gén szekvenciája és a PCR reakcióhoz alkalmazott primerek

SZARVASMARHA	--ACAGCTTAAA <u>ACTCAAAGGACTTGGCGGTG</u> CTTTATATCCTTCTAGAG	134
KECSKE	--ACAGCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCTAGAG	134
JUH	--ACAGCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCTAGAG	417
BIVALY	--ATAGCCTAAAACACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCCCTAGAG	134
SZARVASMARHA	GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATCTTGCT	184
KECSKE	GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATCTTGCT	184
JUH	GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATCTTGCT	467
BIVALY	GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTCACCAATCTTGCT	184
SZARVASMARHA	AA-TACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTAAA-AA-GGAAAA	231
KECSKE	AA-TACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTAAA-AA-GGAACA	231
JUH	AA-TACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTAAA-AAAGGAACA	515
BIVALY	AA-TGCAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTAAA-AA-GGTACA	231
SZARVASMARHA	AAAGTAAGCGTAATTATGATACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT	281
KECSKE	AAAGTAAGCTCAATCACAACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCC	281
JUH	AAAGTAAGCTCAATAATAACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT	565
BIVALY	AAAGTAAGCGCAATCACAATGCATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT	281
SZARVASMARHA	ATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTTCTACACCAAGAG-AATCAA-G	329
KECSKE	ATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTTCTACCTTAAGAA-AATTA--	328
JUH	ATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACATTTCTACCCAAGAAA-ATTTAA--	612
BIVALY	ATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTTCTACACCAAGAATACCCA--	329
SZARVASMARHA	CACGAAAGTTATTATGAAA-CCAATAACCA <u>AAGGAGGATTTAGCAGTAAA</u>	378
KECSKE	TACGAAAGCCATTATGAAA-TTAATGACCAAAGGAGGATTTAGTAGTAAA	377
JUH	TACGAAAGCCATTATGAAA-TTAATAGCCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAA	661
BIVALY	CACGAAAGTTATTATGAAAGTTAATAACCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAA	379

Az univerzális oligok szekvenciája:

Forward: ACTCAAAGGACTTGGCGGTG

Reverse: TTTACTGCTAAATCCTCCTT *

*megjegyzés: a szekvenciáról jobbról balra leolvasva, illetve a másik DNS szál nukleotidjai egyeznek meg a reverse primerrel

A PCR reakciókhoz alkalmazott primerek láthatóak a fenti többszörös szekvencia-illesztésen, keretekben megjelölve. A négy állatfaj – szarvasmarha, kecske, juh, bivaly – esetében az ismertetett primerek alkalmazásával kapott termékek minimális méretbeli különbségeket mutatnak.

A termékméretetek a következők:

- szarvasmarha esetében: 278 bp,
- bivaly esetében: 276 bp,
- juh esetében: 279 bp,
- kecske esetében: 280 bp.

Szükséges eszközök:

- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipettahegyek
- 2 ml mikro tesztcső
- 200 µl-es PCR csövek
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 µl-es PCR csövekhez
- PCR készülék
- vortex
- asztali centrifuga
- jégkása

Szükséges vegyszerek:

- steril desztillált víz
- MgCl₂ oldat
- dNTP oldat
- 10x Taq puffer oldat
- reverse primer
- forward primer
- Taq polimeráz (Dream Taq)

Szükséges minták:

50-100 ng/ul koncentrációjú szarvasmarha, juh, kecske, bivaly DNS minták

A reakció során felhasznált elegy összetétele 20 µl-re vonatkoztatva:

- 4 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10x Dream Taq puffer (Fermentas)
- 200 µM dNTP (Fermentas)
- 2 pmol reverz primer (Sigma)
- 2 pmol forward primer (Sigma)
- 1U Dream Taq polimeráz (Fermentas)

Ezen végkoncentráció eléréséhez az alábbi mennyiségeket kell összemérni:

- 3,2 µl MgCl₂ (25mM)
- 2,0 µl puffer (10x)
- 2,0 µl dNTP (2mM)
- 0,2 µl reverz primer (10 pmol/µl)
- 0,2 µl forward primer (10 pmol/µl)
- 0,2 µl polimeráz (5 U/µl)
- 11,2 µl desztillált víz

+ 1 µl DNS minta PCR csövenként

A reakcióelegyet lamináris boxban mérjük össze. 18 µl PCR reakcióelegyhez 100 ng DNS-t adunk. A reakció körülményeit az alábbi táblázat tartalmazza.

Ciklus lépései	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5-10 (enzim típusától függően, a gyártó protokolljának megfelelően)	1
Denaturálás	95	0,5	35-40
Anellálás	60	a felszaporítandó szakasz hosszától függően 0,5-1 perc	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánchosszabbítás	72	5	1

III/8. Touchdown PCR reakció fajspecifikus primerek alkalmazásával (fragmentméret szerinti elkülönítés)

Fajspecifikus primerek alkalmazása esetén az adott faj szekvenciájának egy adott régiójára specifikus primereket terveznek, amelyek meghatározott méretű terméket sokszoroznak fel, ami azonban méretét tekintve eltérő nagyságú egy másik faj szekvenciájára tervezett primerek által adott termékhez viszonyítva.

A primerek tervezése során figyelembe kell venni azt a BLAST algoritmus által adott szekvencia-illesztési eredményben, hogy az egyes primerek 3' végei olyan DNS régióhoz tapadjanak a PCR reakció során, amely eltér a többi faj azonos pozíciójában található szekvenciájához képest.

A kiválasztott primerszekvenciákat ebben az esetben is ellenőrizni kell az Oligo analyzer programmal. Különösen figyelni kell a következőkre:

- a tervezett primerek azonos hőmérsékleti tartományban legyenek képesek tapadni a célszekvenciához ($\Delta T=5^{\circ}\text{C}$),
- az Oligoanalyzer program Self-dimer opciójánál ellenőrizni kell, hogy a primer milyen ΔG értékek mellett képez magával primer-dimert (ΔG : szabadentalpia, aminek értéke kifejezi, hogy egy reakció milyen gyorsan játszódik le, amennyiben értéke minél negatívabb, a reakció végbemenetele annál hevesebb), ha az érték -9 kcal/mól értéknél negatívabb a primert újra kell tervezni,
- szintén ebben a programban, de a Hetero-dimer opciót alkalmazva, ellenőrizhető, hogy adott primerpár tagjai milyen ΔG érték mellett képeznek egymással primer-dimert, ebben az esetben is -9 kcal/mól értéknél negatívabb eredmény esetében a primereket újra kell tervezni.

Szükséges eszközök:

- Pipetta 10-100 μl
- Pipetta 20-200 μl
- Pipettahegyek
- 2 ml mikro testcső
- 200 μl -es PCR csövek
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 μl -es PCR csövekhez
- PCR készülék
- vortex
- asztali centrifuga
- jégkása

Szükséges vegyszerek:

- steril desztillált víz
- MgCl₂ oldat
- dNTP oldat
- 10x Taq puffer oldat
- reverse primerek
- forward primerek
- Taq polimeráz (GoTaq, Promega)

Szükséges minták:

50-100 ng/ul koncentrációjú házi kacsza és pulyka, illetve ló és szarvasmarha DNS minták.

Madárfajok azonosítása (házi kacsza és pulyka) mitokondriális DNS SNP alapján

Házi kacsza: gi|154125702|ref|NC_009684.1|

Pulyka: gi|323690831|ref|NC_010195.2|

```
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      CCACCTAGGTTGAATAATCGCCATCATTATCTACGACCCCATCTTACTATCCTCACCTT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      CCACCTAGGCTGAATCGCCATCCTAGTCTACAGCCCAAGCTAGCACTACTCACCTT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      TGCATTGTATTACTAATAACAACAACCATATTCTTATCATTAAACCAGATCAAAGTCTT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      CTATCTCTACACAATCATGACATCAGCTGTATTTCATGGCCCTAAACAAGATTAAAGCTCT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      GAAACTCTCAACAATACTCATCTCATGAACAAAAACACCTATACTTAATGCAACTATAAT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      CAACCTGTCCATAATCCTAACCTCATGGACAAAGACCCCGGTACTAAACGCCACCTAAT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      ACTTGCACTCTATCTCTAGCCGGCCTTCCACCCTAACAGGCTTCATACCAAAATGACT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      GCTAGTGTCTGTCCCTGGCAGGCTCCCCCACTGACAGGTTTATACCAAAAGTACT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      TATCATTCAGAACTTACCAACAAGGAATAACTCCTACAGCCACAACCATCACCTTACT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      CATCATCAAGAGCTAATAAGCAAGAGATAACACCCGACCCATAGCAATCGCCATGCT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      ATCACTCTGGCCTGTCTTTTACCTTCGCCTTGCATACCCTCAACAATATACTCCC
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      ATCCCTACTTAGCCTATTCTTCTACCTACGCTCGCATACCCTCAACAATCACCTCCC
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      CCCTAAGTCTGCTAATCACATGAACTCTGACGCACTAACAAAGCATCAAACACCCCTAC
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      ACCAACTCGTCCAAACCACATAAAACAGTGGTACACTAGCAAACCCCAAGCAGCCAC
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      AGCCATTCTATCCACCCTGTCAATCTCCCTACTGCCATAACCCCTCTGATCACTACCAT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      CGCAATCTAGCCTACTATCAATCTCCTACTCCCTCTCCCCATAGTCCAGCCTAT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      ATTCT-AGAACTTAGGATTAAGCGCCATCCTAAACCAAAGGCCTTCAAAGCCTTAAAT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      TGCT-AGAACTTAGGATAACACCCAC-C--TAAACCGAAGGCCTTCAAAGCCTTAAAT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      AAGAGTTAACTCTCTTAGTTTCTGTT--ATACTAAGACCAGGACACTAACCTGTAT
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      AAGAGTTAAACCTCTTAGTTTCTG-C--GC--TAAGACCAACAGGACACTAACCTGTAT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      CTTCTGAGTGCAAACCAGACGCTTTAATTAAGCTAAGGCCTTA-CCTAGGCAGATGGGCC
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      CTCCTGGATGCAAACCAGACGCTTTAATTAAGCTAAGGCCTTT-CTAGACAGACGGGCT
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      TTGATCCCATATGATTCTAGTTAACAGCTAGACGCTTACCC-CTGGCTCTGCCTAC-
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      TCGATCCCGCAAAATTTTAGTTAACAGCTAAACGCCAAACCTACTGGCCTCTGCCT---
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      AAGACCCCGGCATAC-CTCGTATACATCTATGAGTTGCAACTCATCATGAA--CTTCAC
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      AAGGCCCGGTACACTCTCGTGCACATCGATGAGCTTGAACCTCAACATGAA--CTTCAC
*****
gi|323690831|ref|NC_010195.2|      TACAGGGTCGATAAGAAGGAATTAACCTCTGTAAAAGGACTACAGCCTAACGCTTC
gi|154125702|ref|NC_009684.1|      TACAGGGCCGATAAGAAGGAATTAACCTCTGTAAAAGGACTACAGCCTAACGCTTC
5' TAGTCCTTTTACAGAGTT3'
*****
```

Pulyka	
Reverz primer szekvenciája (univerzális): (BR1)	5' TAG TCC TTT TTA CAG AGG TT 3'
Reverz primer számolt Tm-je:	56,4 °C
GC tartalom:	35%
Hairpin: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-0,97
Self-dimer: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-4,67
Forward primer szekvenciája: (BF2)	5' CCC TAC AGC CAT TCT ATC GA 3'
Forward primer számolt Tm-je:	60,8 °C
GC tartalom:	50%
Hairpin: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	0,4
Self-dimer: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-6,47
Heterodimer (forward – reverse): $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-4,67
Termékméret:	412 bp

Házi kacska	
Reverz primer szekvenciája (univerzális): (BR1)	5' TAG TCC TTT TTA CAG AGG TT 3'
Reverz primer számolt Tm-je:	56,4 °C
GC tartalom:	35%
Hairpin: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-0,97
Self-dimer: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-4,67
Forward primer szekvenciája: (BF4)	5' TAG CAC TAC TCA CCT TCT GT 3'
Forward primer számolt Tm-je:	60,1 °C
GC tartalom:	45%
Hairpin: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-0,02
Self-dimer: $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-3,14
Heterodimer (forward – reverse): $\Delta G(\text{kcal/mol})$	-6,47
Termékméret:	782 bp

A reakció során felhasznált elegy összetétele 10 μl -re vonatkoztatva:

- 5 mM MgCl_2 (Promega)
- 1x GoTaq puffer (Promega)
- 200 μM dNTP (Fermentas)
- 1,5 pmol reverz primer (Sigma)
- 1,5 pmol forward primer (Sigma)
- 1,5 pmol forward primer (Sigma)
- 1U GoTaq polimeráz (Promega)

Ezen végkonc. eléréséhez az alábbi mennyiségeket kell összemérni:

- 2,0 µl MgCl₂ (25mM)
- 2,0 µl GoTaq puffer (5x)
- 1,0 µl dNTP (2mM)
- 0,15 µl univerzális reverz primer (10 pmol/µl)
- 0,15 µl kacsza forward primer (10 pmol/µl)
- 0,15 µl pulyka forward primer (10 pmol/µl)
- 0,2 µl GoTaq polimeráz (5 U/µl)
- 3,35 µl desztillált víz

+ 1 µl DNS minta PCR csövenként

A reakció lépései:

- Kezdeti denaturáció: 95°C, 2 perc
 - Denaturáció: 95°C, 30 s
 - Anellálás: 70°C, 30 s
(ciklusonként 1,1 °C csökkenés)
 - Extenzió: 72°C, 1 perc
 - Denaturáció: 95°C, 30 s
 - Anellálás: 59°C, 30 s
 - Extenzió: 72°C, 1 perc
 - Végző lánchosszabítás: 72°C, 10 perc.
-
- 10 ciklus
- 27 ciklus

Ciklusok száma: 37.

Emlősfajok azonosítása (ló és szarvasmarha) mitokondriális DNS SNP alapján

Ló: gi|5835107|ref|NC_001640.1|

Szarvasmarha: gi|33321661|gb|AF492351.1|

```

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      CATTCATCATGATCAAAATATTACCATTATCCTAATAGGAGCCAATATCACCATCACCGCC
gi|33321661|gb|AF492351.1|      CCTTTTCATGATCTAACATTACAATTATCTAATAGGAGTAAATATAGTAATCACCGCC
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      TCTACTCCCTATACATACTAATCACAACACAACGAGGGAAATACACACACCATATCAACA
gi|33321661|gb|AF492351.1|      TATATCTCTATACATGCTAATTATAACCCAACGAGGAAATATACCTACCACATTAATA
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      GCATTAACCTTCATTTACACGAGAAAACGCACTCATGGCCCTCCACATGACTCCCTTAC
gi|33321661|gb|AF492351.1|      ATATCTCGCCTTCCTTTACACGGGAAATGCACTCATATCATTACACATCTCACCCTTAC
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      TACTCCTATCACTTAACCTAAAATTATCCTAGGCTTTACGTACTGTAATATAGTTTAA
gi|33321661|gb|AF492351.1|      TACTCCTAACCTAACCCAAAAATATCTTAGGACCTTATACTGTAATATAGTTTAA
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      CA-AAAACACTAGATTGTGGATCTAGAAACAGAACTTA--ATATTTCTTATTTACCGAG
gi|33321661|gb|AF492351.1|      CA-AAAACATTAGATTGTGAATCTAACCAATAGAACTCA-TTACCTTCTATTTACCGAA
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      AAAGTATGCAAGAAGTCTAATTC-ATGCCCCCATGTCCAACAAACATGGCTCTCTCAAA
gi|33321661|gb|AF492351.1|      AAAGTATGCAAGAAGTCTAATTCATGCTCCATATCTAAT-AGTATGGCTTTTCGAA
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      CTTTTAAAGGATAGGAG-CTATCCGTT-GGTCTTAGGACCAAAAATTTGGTGCACCTCC
gi|33321661|gb|AF492351.1|      CTTTTAAAGGATAGTAGTTTATCCGTT-GGTCTTAGGACCAAAAATTTGGTGCACCTCC
* * * * *
* * * * *
5' GGAGTTGCACCAATTTTTGG3'
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      TTCAAGAGCTCACAAAAATAGCAGCATCATCTCCCCACACTAATAGCCATTATAGCAC
gi|33321661|gb|AF492351.1|      TCCAAGAGATAACAAAAATACAGCATCATCTACCCACTTTCATAGCAATCACAGCTC
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      TACTCAACCTCTACTTCTACATACGACTAACCTATTCACCTCACTGACCATATCCCAT
gi|33321661|gb|AF492351.1|      TACTAAACTTATATTTTATATACGACTACGTATTCTACCACACTAACAAATATCCCT
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      CCACAAACAACATAAAAAATAAAATGACAATTCGAA--ACCAACGAATTACTCTCTTAC
gi|33321661|gb|AF492351.1|      CCACAAACAACATAAAAAATAAAATGACAATTTCCCTTATGAAAAATAACTTTTCTAC
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      CCCCGTTAATGTTATATCTCCCTACTCCTCCCCCTAACCCCATACTATCAATTTGG
gi|33321661|gb|AF492351.1|      CAACAATAGTCGTATTATCTACCATAATACTACCACTCACGCAATACTATCAGTGTTAG
* * * * *
* * * * *

gi|5835107|ref|NC_001640.1|      ACT-----AGGAATTTAGGTTAACATCCAGACCAAGAGCCTTCAAAGCTTAAGC
gi|33321661|gb|AF492351.1|      AAT-----AGGAATTTAGGTTAA-A---CAGACCAAGAGCCTTCAAAGCCTTAAGC
* * * * *
* * * * *
5' GCTTTGAAGGCTCTTGGTCT3'
* * * * *

```

Ló	
Reverz primer szekvenciája: (MR1)	5' GGA GTT GCA CCA ATT TTT TGG 3'
Reverz primer számolt Tm-je:	61,1 °C
GC tartalom:	42,9%
Hairpin: ΔG(kcal/mol)	-3,33
Self-dimer: ΔG(kcal/mol)	-7,05
Forward primer szekvenciája: (MF3)	5' TAA TAG GAG CCA ATA TCA CC 3'
Forward primer számolt Tm-je:	56,6 °C
GC tartalom:	40%
Hairpin: ΔG(kcal/mol)	0,48
Self-dimer: ΔG(kcal/mol)	-3,91
Heterodimer (forward – reverse): ΔG(kcal/mol)	-6,97
Termékméret:	390 bp

Szarvasmarha	
Reverz primer szekvenciája: (MR2)	5' GCT TTG AAG GCT CTT GGT CT 3'
Reverz primer számolt Tm-je:	62,6°C
GC tartalom:	50%
Hairpin: ΔG (kcal/mol)	-0,7
Self-dimer: ΔG (kcal/mol)	-3,54
Forward primer szekvenciája: (MF5)	5' CAG CAT CAT TCT ACC CAC TT 3'
Forward primer számolt Tm-je:	59,9°C
GC tartalom:	45%
Hairpin: ΔG (kcal/mol)	1,36
Self-dimer: ΔG (kcal/mol)	-3,14
Heterodimer (forward – reverse): ΔG (kcal/mol)	-4,74
Termékméret:	271 bp

A reakció során felhasznált elegy összetétele 10 μ l-re vonatkoztatva:

- 5 mM MgCl₂ (Promega)
- 1x GoTaq puffer (Promega)
- 200 μ M dNTP (Fermentas)
- 1,5 pmol reverz primer (Sigma)
- 1,5 pmol forward primer (Sigma)
- 1,5 pmol forward primer (Sigma)
- 1U GoTaq polimeráz (Promega)

Ezen végkonc. eléréséhez az alábbi mennyiségeket kell összemérni:

- 2,0 μ l MgCl₂ (25mM)
 - 2,0 μ l GoTaq puffer (5x)
 - 1,0 μ l dNTP (2mM)
 - 0,15 μ l ló reverz primer (10 pmol/ μ l)
 - 0,15 μ l szarvasmarha reverz primer (10 pmol/ μ l)
 - 0,15 μ l ló forward primer (10 pmol/ μ l)
 - 0,15 μ l szarvasmarha forward primer (10 pmol/ μ l)
 - 0,2 μ l GoTaq polimeráz (5 U/ μ l)
 - 3,2 μ l desztillált víz
- + 1 μ l DNS minta PCR csövenként

A reakció lépései:

- Kezdeti denaturáció: 95°C, 2 perc
 - Denaturáció: 95°C, 30 s
 - Anellálás: 70°C, 30 s
 - (ciklusonként 0,8 °C csökkenés)
 - Extenzió: 72°C, 1 perc
 - Denaturáció: 95°C, 30 s
 - Anellálás: 62°C, 30 s
 - Extenzió: 72°C, 1 perc
 - Végző lánchosszabítás: 72°C, 10 perc.
-
- 10 ciklus
- 27 ciklus

Ciklusok száma: 37.

III/9. Hőmérséklet grádiens polimeráz láncreakció (PCR)

A reakció gyakorlatilag megegyezik az általános PCR reakció felépítésével, a különbséget az adja, hogy egy PCR gépben egyidejűleg azonos összetételű reakciókat különböző hőmérsékleti profilok alkalmazásával futtathatunk, ezáltal megállapíthatjuk az alkalmazott primerek legoptimálisabb tapadási hőmérsékletét. Ezzel a lépéssel optimalizáljuk a polimeráz láncreakciót annak érdekében, hogy a megfelelő tapadási hőmérsékletet használjuk a továbbiakban.

Szükséges eszközök:

- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipettahegyek
- 2 ml mikro tesztcső
- 200 µl-es PCR csövek
- 200 µl-es 8-as strip
- 200 µl-es 8-as strip fedő
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 µl-es PCR csövekhez
- PCR készülék
- vortex
- asztali centrifuga
- jégkása

Szükséges vegyszerek:

- steril desztillált víz
- MgCl₂ oldat
- dNTP oldat
- 10x Taq puffer oldat
- reverse primer
- forward primer
- Taq polimeráz (Dream Taq)

Szükséges minták:

10-100 ng/ul koncentrációjú DNS minták

A hőmérséklet-grádiens PCR reakció során alkalmazott hőmérsékleti grádiens meghatározott értékei a következők:

55°C; 55,9°C; 57,8°C; 59,3°C; 61,0°C; 62,4°C; 64,3°C; 65,0°C

A Bio-Rad PCR készülék grádiens kalkulátor funkciója a PCR blokk 12 oszlopára kalkulál T_m értékeket. A fenti értékek a 55-65 °C tartományra vonatkoznak.

A hőmérséklet grádiens PCR reakció során alkalmazott reakcióelegy összetétele 10 µl-re vonatkoztatva:

- 2 mM $MgCl_2$ (Fermentas)
- 1x Dream Taq puffer (Fermentas)
- 100 µM dNTP (Fermentas)
- 1 pmol reverz primer (Sigma)
- 1 pmol forward primer (Sigma)
- 0,5 U Dream Taq polimeráz (Fermentas)

Ezen végkoncentráció eléréséhez az alábbi mennyiségeket kell összemérni:

- 0,8 µl $MgCl_2$ (25mM)
 - 1,0 µl puffer (10x)
 - 1,0 µl dNTP (2mM)
 - 0,1 µl reverz primer (10 pmol/µl)
 - 0,1 µl forward primer (10 pmol/µl)
 - 0,1 µl polimeráz (5 U/µl)
 - 5,9 µl desztillált víz
- + 1 µl DNS minta PCR csövenként

A reakcióelegyet lamináris boxban mértük össze. 9 µl PCR mixhez 1 µl DNS-t adtunk.

A végrehajtott PCR reakciók sikerességét minden esetben agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük.

Az alkalmazott 2 m/v%-os gél összetétele 150 ml-re vonatkoztatva:

- 3 g agaróz (SeaKem® LE Agarose, Lonza)
- 150 ml 1x TAE puffer (1000 ml-re vonatkoztatva 20 ml AccuGENE 50x TAE Buffer, Lonza; 980 ml dH_2O)
- 150 µl 1000x GelRed (Biotium, 10 000x vízben)

III/10. PCR-RFLP (PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)

A PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus során a PCR reakcióban megfelelő primerek alkalmazásával felszaporítjuk a vizsgálni kívánt régiót. A kapott PCR terméket restrikciós endonukleázok segítségével hasítjuk kisebb fragmentumokra, majd ezeket gélelektroforézis során választjuk el egymástól, így az adott fajra jellemző restrikciós fragmenthossz mintázatot kapunk. A restrikciós emésztés alapja a specifikus nukleotidsorrend, ami enzimfelismerő helyként funkcionál. Amennyiben a felismerő helyben eltérés adódik (például SNP), úgy a restrikciós enzim nem hasít. Heterozigóta egyedek esetén az agaróz gélen hasított és hasítatlan PCR termék is megjelenik.

A PCR-RFLP analízis elterjedten használják az élelmiszerekből történő fajazonosítás során, ezt jól mutatja az adott módszerrel kapcsolatban fellelhető nagy mennyiségű publikáció. Számos kutatócsoport alkalmazta a módszert fajok, némely esetben fajták, illetve bizonyos genotípusok elkülönítésére is.

Szükséges eszközök:

- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 20-200 µl
- Pipettahegyek
- 2 ml mikro tesztcső
- 200 µl-es PCR csövek
- 200 µl-es 8-as strip
- 200 µl-es 8-as strip fedő
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 µl-es PCR csövekhez
- PCR készülék
- vortex
- asztali centrifuga
- horizontális elektroforézis készülék
- jégkása

Szükséges vegyszerek:

- steril desztillált víz
- MgCl₂ oldat
- dNTP oldat
- 10x Taq puffer oldat
- reverse primer
- forward primer
- Taq polimeráz (Dream Taq)

Szükséges minták:

10-100 ng/ul koncentrációjú DNS minták szarvasmarha, bivaly, juh és kecske fajokból

PCR-RFLP Girish et al., 2005 módszere alapján

A célszekvencia a mitokondriális genomban található 12S rRNS génben helyezkedik el. A felszaporított szakasz mérete 456 bp. Az alkalmazott restrikciós enzim az AluI., ami a keletkezett 456 bp méretű terméket szarvasmarha esetében 359+97 bp méretű fragmentekre hasítja, bivaly esetében nem történik hasítás, míg a juh és a kecske esetében egyaránt 246+210 bp méretű fragmenteket eredményez a hasítás.

A PCR reakcióhoz alkalmazott primerek:

- forward primer: 5'-CAAAGTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'
- reverse primer: 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'

A reakció során felhasznált elegy összetétele 50 µl végtérfogatra vonatkoztatva:

- 1x PCR puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl és 0,1% zselatin)
- 100µM dNTP
- 1pM forward primer
- 1pM reverse primer
- 2,5 U Taq DNS polimeráz

Ezen végkonc. eléréséhez az alábbi mennyiségeket kell összemérni:

- 5 µl PCR puffer (10x)
 - 1 µl dNTP (2mM)
 - 1 µl forward primer (10 pmol/µl)
 - 1 µl reverse primer (10 pmol/µl)
 - 0,25 µl Taq DNS polimeráz (5 U/ µl)
 - 38,65 µl desztillált víz
- + 3 µl DNS minta PCR csövenként

A reakció lépései:

- Kezdeti denaturáció: 94°C, 5 perc
- Denaturáció: 94°C, 45 s
- Anellálás: 60°C, 45 s
- Extenzió: 72°C, 1 perc
- Végső lánchosszabítás: 72°C, 10 perc.

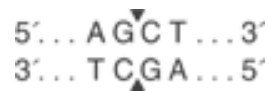
Ciklusok száma: 35.

A keletkező PCR termékeket 1 m/v%-os agaróz gélen ellenőrizzük. A futtatást konstans feszültségen végezzük 100V-on, a DNS-t gelred interkalálódó festékkel tesszük UV fény alatt láthatóvá.

Az RFLP reakció elegy összetétele 15 µl végtérfogatra vonatkoztatva:

- 0,5 µl Alu I. restrikciós enzim (10 U/µl)
- 1,5 µl puffer (10x)
- 6 µl PCR termék
- 7 µl desztillált víz

Az Alu I. restrikciós enzim felismerő- és hasítóhelye:



Az emésztés 37°C-on 3h keresztül történik.

Az emésztés eredményének kimutatása 2 m/v%-os gélen történik 100 bp-os DNS létra alkalmazása mellett.

III/11. PCR-heteroduplex analízis

A heteroduplex olyan kettős szálú DNS molekula, mely genetikai rekombináció vagy különböző eredetű, de homológ kromoszómák, vagy különböző fajok DNS-ének a hibridizációjával keletkezik. A heteroduplexek képződhetnek olyan homológ DNS molekulákból, melyek szekvenciájában egy-egy bázist érintő mutációk, változatok fordulnak elő (például SNP-k), így közöttük a bázisok komplementaritása nagymértékben megegyezik, így hibridizációjuk lehetséges. Azokon a pontokon, ahol a mutációk, bázis eltérések találhatóak, ún. „buborékok” (hidrogénhid kötést ki nem alakító bázisok) jönnek létre. Ezeknek a buborékoknak köszönhetően a kétszálú DNS molekulák vándorlási sebessége csökken a gélelektroforézis során, ennek következtében akár a közel azonos bázispárból álló DNS szekvenciák között is különbséget tudunk tenni. Ezen alapszik a heteroduplex analízis elválasztás-technika.

A heteroduplex analízis módszer során a vizsgálni kívánt, különböző eredetű DNS molekulákat magas hőmérsékleten (94°C – 95°C) denaturálják. A denaturációt követően a különböző DNS mintákat összekeverik, és csökkentik a hőmérsékletet, hogy a hibridizáció végbemehessen. Ezt követően a képződött heteroduplexeket poliakrilamid gélen futtatják, melyek mobilitása, vándorlási sebessége a bennük megtalálható buborékok mennyiségétől függően változik. A heteroduplex analízist gyakran az SSCP (single strand conformation polymorphism) eljárással párhuzamosan végzik. Mivel az utóbbi esetében a denaturálódott, egyszálú DNS molekulák újra hibridizálhatnak, és kétszálúsodhatnak, ezért fontos lehet az egyszálú/kétszálú DNS arányainak kimutatása, hogy pontosabb és értékelhető legyen az eredmény mind a kettő eljárás tekintetében.

A PCR termékek előállítását a már leírt protokoll alapján végezzük (PCR fejezet).

A vizsgálathoz a kapott PCR termékeket megfelelő módon összekeverjük, majd egy többlépéses folyamatban, PCR gép segítségével denaturáljuk. Fajtaazonosításos PCR-ben keletkező PCR terméket használunk.

Vizsgált gén:

A szarvasmarha (*Bos taurus*) melanokortin-1-receptor gén (MC1R) mRNS-szekvenciája
(GénBank azonosító: AF445642.1)

```
cagcctggggctggtgagtcctcgtggagaacgtgctggttagtggtgccattgccaagaa  
ccgcaacctgcactcccccatgtactactttatctgctgcctggctgtgtctgacttgct  
ggtgagcgtcagcaacgtgctggagacggcagtcatgcCgctgctggaggccGgtgtcct  
ggccaccaggcggcggcgtggtgagcagctggacaatgtcatcgacgtgctcatctgagg  
atccatggtgtccagcctctgcttccctgggtgccattgctgtggaccgctacatctccat  
cttctacgccctgcggtaccacagtggttgacactgccccgagcgtggaggatcattgc  
ggccatctgggtggccagcatcctcaccagcctgctcttcatcacctactacaaccacaa  
ggtcatcctgctgtgcctcgttggcctcttcatagctatgctggccctgatggccgtcct  
ctacgtccacatgctggccccggcctgccagca tgcccggggcattgccCggctccagaa  
gaggcagcggccccattcatcagggctttggcctcaagggcgctgccaacctcaccatcct  
gctgggcgtcttcttccctctgctggggccccttcttccctgcacctctcgctcatgctcct  
ctgccccagcaccacacctgtggctgcatcttcaagaactcaacctcttccctggccct  
catcatttgcaacgccattgtggacccccctcatctatgcttccgcagccaggagctccg
```

g - 310/311 **G** deléció (allél: **e**)

c - 296 **T/C** szubsztitúció (allél: **Ed**)

c - 667 **T/C** szubsztitúció (allél: **E1**)

tgcccggggcat - 650 duplikáció (allél: **E2**), (a szekvenciában
jelölt szakasz duplikálódik **E2** allél esetében,
a duplikáció a jelölt szakasz előtt jelenik
meg)

Szükséges eszközök:

- Pipetta 1-10 µl
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 100-1000 µl
- Pipetta 1-5 ml
- Pipettahegyek
- 200 µl-es 8-as strip
- 200 µl-es 8-as strip fedő
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 µl-es PCR csövekhez
- PCR készülék
- asztali centrifuga
- vertikális elektroforézis készülék
- mérőhenger
- mágneses keverő
- analitikai mérleg

- géltartó-festő doboz 20x20 cm-es gélhez
- rázógép
- Erlenmeyer lombik 3 l-es
- főzőpohár 100ml-es
- elektromos pipetta

Szükséges vegyszerek:

- ionmentes víz
- Akrilamid (40 %)
- TBE puffer
- temed
- amper (ammónium perszulfát)
- 0,5 % v/v ecetsav
- 0,1 % m/v AgNO₃ törzsoldat
- 10 % v/v absz. alkohol
- 37 % v/v formaldehid
- 7,5 % m/v Na₂CO₃
- 1 % NaBH₄ m/v törzsoldat

Szükséges minták:

MC1R (melanokortin-1 receptor gén) exonjának felszaporított PCR terméke genotípus alapján: e/e, ED/ED, E1/E1, E2/E2, E3/E3 – homozigóta egyedek.

Keverési arányok a különböző MC1R genotípusok esetében:

5-5 µl az egyes genotípusok PCR termékeiből

- | | |
|----------|-------|
| 1. E1/E1 | E3/E3 |
| 2. E2/E2 | E3/E3 |
| 3. ED/ED | E3/E3 |
| 4. e/e | E3/E3 |
| 5. E3/E3 | |

Az E3 allél jelenti azt a genotípust, amely nem hordoz SNP-t, így minden más genotípus esetében a heteroduplexeket E3/E3 változattal állítjuk elő.

A heteroduplex képzési folyamat lépései a következők:

1. 95°C, 2 perc 40 s
2. 95-80°C, 20 s, 15 ciklus, 1 ciklus alatt 1°C hőmérséklet-csökkenés
3. 80-55°C, 1 perc, 25 ciklus, 1 ciklus alatt 1°C hőmérséklet-csökkenés
4. 55°C, 18 perc
5. 55-45°C, 1 perc, 10 ciklus, 1 ciklus alatt 1°C hőmérséklet-csökkenés
6. 45-35°C, 30 s, 10 ciklus, 1 ciklus alatt 1°C hőmérséklet-csökkenés
7. 12°C, ∞

A hűtött vertikális elektroforézis rendszer összeállítása, a gélöntés és polimerizáció, mintafelvitel, a futtatás és a DNS megfestése ezüsttel a PCR SSCP protokollnál részletesen megtalálható.

A poliakrilamid gél összetétele:

12% akrilamid	21ml
TBE (5x)	8,4ml
AMPER	700μl
TEMED	52,5μl
<u>dH₂O</u> kiegészítés	<u>70ml-re</u>
Összesen:	70ml

Az elektroforézis beállításai:

400V, 6h 30min, 22°C konstans hőmérséklet

10 μl minta mennyiség/zseb

III/12. PCR-SSCP (PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus)

A módszer elvi háttérét képezi, hogy az egyszálú formában, denaturáló körülményeket biztosító közegben jelenlévő DNS molekulák eltérő térbeli konformációt vesznek fel annak függvényében, hogy az egyes fajok milyen pontmutációkat tartalmaznak a vizsgált szakaszon. A polimeráz láncreakcióval felszaporított DNS-t formamid jelenlétében 95 °C-on denaturáljuk. Ezen a hőmérsékleten a kétszálú DNS egyszálú formába kerül és formamid jelenlétében (ami nem lehet kisebb, mint 85%) alacsonyabb hőmérsékleten is megőrzi konformációját, aminek hatására eltűnik a kétszálú DNS megszokott térbeli alakulása és az egyszálú DNS molekulák sajátos, egyedi térbeli konformációkat vesznek fel. Az így létrehozott DNS mintákat nem denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis segítségével választjuk el. Az egyes fajok esetében a vizsgált génben található mutációk miatt feltételezhetően különböző konformációjú egyszálú DNS szakaszok jönnek létre, amelyek a poliakrilamid gélen fajokra jellemző sávmintázatokat eredményeznek. A géleken kialakuló mintázatokat ezüstoffestés segítségével tesszük láthatóvá. A festés elméleti háttere, hogy a gélben a DNS által elfoglalt és el nem foglalt helyek között redoxpotenciál különbség áll fenn. Ennek eredményeképpen az ezüst ionok a DNS által elfoglalt helyeken gyorsabban redukálódnak fém ezüstré. A festési eljárás igen érzékeny DNS kimutatási eljárás, a kimutathatósági határa 3 pg DNS/mm².

Szükséges eszközök:

- Pipetta 1-10 µl
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 100-1000 µl
- Pipetta 1-5 ml
- Pipetta 1-10 ml
- Pipettahegyek
- 200 µl-es 8-as strip
- 200 µl-es 8-as strip fedő
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 µl-es PCR csövekhez
- PCR készülék
- asztali centrifuga
- vertikális elektroforézis készülék
- mérőhenger
- mágneses keverő
- analitikai mérleg

- géltartó-festő doboz 20x20 cm-es gélhez
- rázógép
- Erlenmeyer lombik 3 l-es
- főzőpohár 100ml-es
- elektromos pipetta

Szükséges vegyszerek:

- ionmentes víz
- akrilamid (40 %)
- TBE puffer
- temed
- amper (ammónium perszulfát)
- 0,5% v/v ecetsav
- 0,1 % m/v AgNO₃ törzsoldat
- 10% v/v etanol
- 7,5 % m/v Na₂CO₃
- 37% v/v formaldehid
- 1 % m/v NaBH₄ törzsoldat
- 15% m/v NaOH
- cc. formamid

Szükséges minták:

A fajazonosításhoz univerzális primerekkel felszaporított mitokondriális DNS szakaszok.

Megjegyzés, fontos tudnivaló:

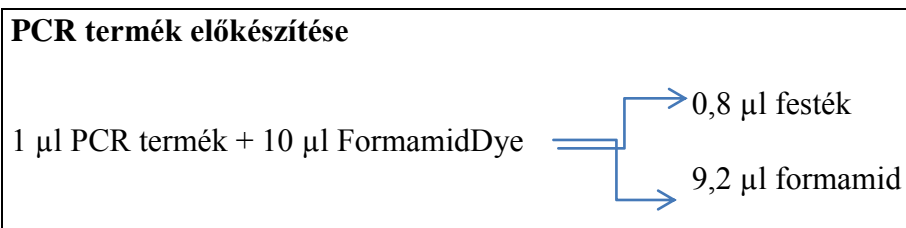
A proteomikára és a DNS munkákhoz használt vertikális elektroforézis rendszer részei hasonlóak, ezért nagyon ügyeljünk arra, hogy véletlenül se keverjük össze őket!

Feladat menete:

I. Gél öntése:

lásd poliakrilamid gél öntése fejezetrész!

II. PCR minták



Mindig több mintára kell számolni a FormamidDye-t, mint amennyi mintával dolgozunk!

A formamidot és festéket tartalmazó PCR terméket PCR készülékben 5 percig, 95°C-on egyszálúsítjuk. Öt perc letelte után rögtön jégbe helyezzük.

Fontos, hogy nem szabad megvárni, hogy a PCR elkezdje hűteni a blokkot!

III. Minták felvitele és futtatás

- A fésűket eltávolítjuk a polimerizálódott gélből.
- Kitisztítjuk dH₂O-el a zsebeket.
- Az üveglapok között lévő géleket belepattintjuk a futtatáshoz szükséges tartóállványba (erősen, felülről lefelé-előre nyomva két kézzel).
- Elkészítjük a 0,6X-os TBE puffert egy 2000 ml-es lombikba:
120 ml TBE + 1872 ml dH₂O => 1992 ml
- A puffert futtatókád felső puffertartályába öntjük.
- Ellenőrizzük az esetleges pufferszivárgást!
- Felvisszük a zsebekbe a mintákat (10 µl/minta).
- Elindítjuk a beslő blokkban átfolyó hűtőfolyadék hűtését és keringetését.
- Az anódot és a katódot rákötjük a tápegységre és elndítjuk a futtatást. Ez jellemzően állandó feszültségen történik.

IV. Ezüstfestés

a. Fixálás:

- 500 ml-es mérőhengerbe beleöntjük az 50 ml etanolt, 2,5 ml tömény ecetsavat és desztillált vízzel 500 ml-re, jelig feltöltjük.
- Leállítjuk a futtatást, a vertikális elektroforézis rendszer belső blokkját kivesszük, az üveglapok közül, alulról indulva kibontjuk az akrilamid gélt. A gélt nagy felületen fogva a gélfestő edénybe helyezzük, fixáló oldatot öntünk rá, majd 10 percig rázatjuk.
- desztillált vízzel öblítjük

b. Festés:

- Az 1%-os AgNO₃ oldatból 10x hígítást készítünk:
50 ml 1%-os AgNO₃ + 450 ml dH₂O
- A 0,1%-os AgNO₃ oldatot ráöntjük a géltre folyamatos rázatás mellett 10 percig benne hagyjuk.

- 2x öblítjük.

c. Előhívás:

- Elkészítjük az NaBH oldatot

0,5g NaBH + 100ml dH₂O – mágnesen keverővel oldatba visszük.

- 100 ml-es mérőhengerbe 60 ml 15% m/v NaOH-t kimérünk, ezt egy 1000 ml-es mérőhengerbe átöntjük és 500 ml-re egészítjük ki dH₂O-el. Ehhez adunk 6 ml NaBH-t és 700 µl formaldehidet, majd 600 ml-re egészítjük ki desztvízzel.

- Lemossuk az AgNO₃-ot ionmentes vízzel.

- 80 ml NaOH-NaBH-s oldatot öntünk rá, leöntjük a kicsapódó ezüstöt. Ez követően ráöntjük az egész oldatot és 10-15 percig állni hagyjuk.

d. Leállítás:

- 50 ml 7,5 m/v Na₂CO₃ oldatot 500 ml-re egészítjük ki dH₂O-el, és mágneses keverőn homogenizáljuk.

- Az előhívó oldatot leöntjük a gélekről és rátesszük a frissen elkészített leállító oldatot.

e. Géldokumentálás:

- Géldokumentációs rendszeren, fehér fény világítással lefotózzuk a géleket.

III/13. PCR-DGGE és PCR-TTGE

PCR-DGGE (PCR-denaturáló grádiens gélelektroforézis)

A PCR-DGGE módszer során a vizsgálat tárgyát képező duplahelikális, részlegesen denaturált vagy egyszálú DNS molekulák egy poliakrilamid gélen kerülnek elválasztásra, amelynek összetétele denaturáló körülményeket biztosít a vizsgálatához, olyan módon, hogy a denaturáló ágens(ek) koncentráció grádiens mentén oszlanak el a gél mátrixában. Legjellemzőbb ilyen denaturáló ágens a formamid (HCONH_2) és az urea ($\text{CO(NH}_2)_2$). A formamidot jellemzően 0-40 v/v% tartományban alkalmazzák, az ureát pedig 0-7 M koncentráció tartományban. A DGGE módszer kimutatási hatékonyságát jól mutatja, hogy ismert mutációk csoportját vizsgálva a CFTR (cisztikus fibrózis) génben embernél, 201 ismert mutációból mind a 201 mutációt képesek voltak azonosítani az alkalmazott technika segítségével. A módszer továbbá alkalmas heteroplazmia kimutatására mitokondriális betegségek esetében.

A DGGE módszerből számos továbbfejlesztett változat alakult ki a széleskörű kutatásoknak köszönhetően. Ilyen módszerek a nagy tartományú DGGE (broad range DGGE), amellyel lehetőség nyílik egyetlen gélen adott futtatási körülmények mellett egy gén összes exonját vizsgálni. A multiplex DGGE során szimultán módon képesek több exon vizsgálatát végrehajtani. A mikroTGGE (microtemperature gradient gelelectrophoresis) módszert egy $20 \times 20 \times 0,5$ mm méretű gélt felhasználva végzik, aminek eredményeképpen a futtatáshoz szükséges DNS mennyisége csökken, csakúgy mint az időtartam (12 perc, 100V, 10mA). Dupla grádiens DGGE esetében a denaturáló anyagok (formamid, urea) koncentráció grádienséhez társul a gélt alkotó poliakrilamidnak a koncentráció grádiense is (6-12 v/v%).

PCR-TTGE (PCR-időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis)

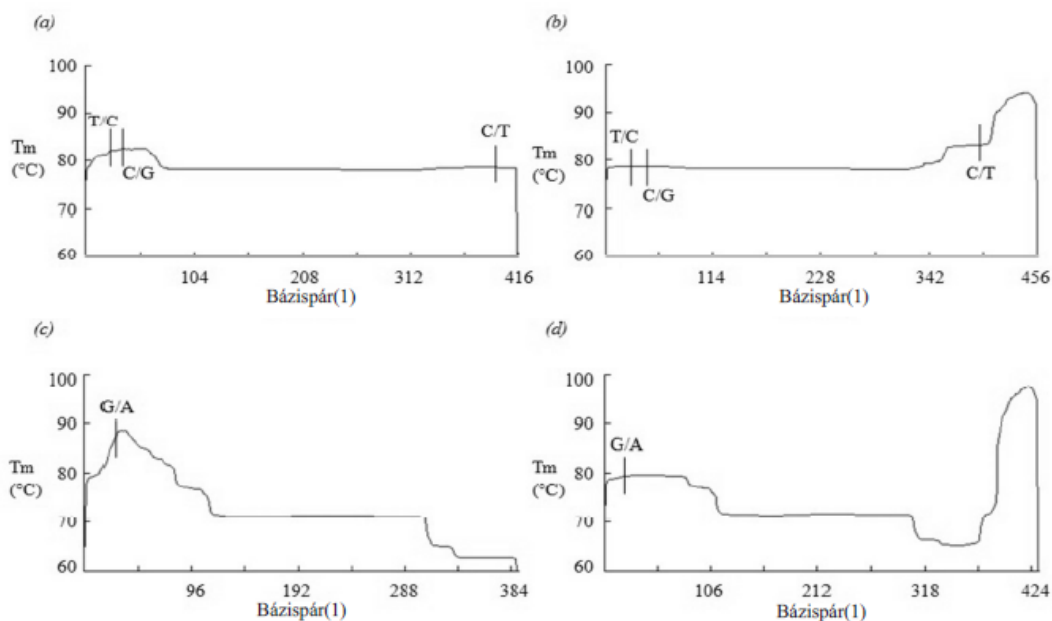
Az utóbbi két évtizedben jelentős fejlődésen estek át a DNS-alapú, mutációk detektálását lehetővé tevő módszerek. A PCR, PCR-RFLP vagy a PCR-SSCP módszerek mellett újabb, mutáció detektáló metodikák is fejlődésnek indultak, ilyen módszer a PCR-TGGE

(hőmérséklet gradiens gélelektroforézis) vagy a PCR-TTGE (időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis).

A hőmérséklet gradiens gélelektroforézis (TGGE) olyan DNS alapú elválasztási technika, mely segítségével azonos bázispár hosszúságú, de különböző bázisszekvenciájú DNS molekulákat tudunk elválasztani poliakrilamid gélen. A módszer segítségével akár egyetlen bázisban eltérő DNS molekulákat is elkülöníthetünk egymástól (SNP-k). A módszert a denaturáló gradiens gélelektroforézisből fejlesztették ki (DGGE), ahol a gélben denaturáló közeg van, mely segítségével az elektroforézis közben a kétszálú DNS molekulák a közegben folyamatosan, a haladási iránnyal megegyezően növekvő koncentrációjú denaturáló ágensek, az urea és a formamid hatására egyszálúsodnak, és az SSCP módszerben leírtak alapján specifikus konformáció kialakulása miatt mozgásuk a gélben megreked.

A TTGE módszer hasonló a TGGE módszerhez, azonban ebben az esetben nincs hőmérséklet gradiens kialakítva a gélben, hanem az elektroforézis során, meghatározott időközönként növeljük a hőmérsékletet, ezzel biztosítva a mintában található kétszálú DNS molekulák denaturációját. A PCR-TGGE és TTGE módszerek során GC-clamp-et (guanin és citozin bázisokból álló oligo) tartalmazó primerek segítségével szaporítják fel a vizsgálni kívánt DNS szakaszokat, ez a struktúra megakadályozza, hogy a denaturáció hatására teljesen elváljon egymástól a DNS molekula két szála. Amikor a molekula eléri a gélben azt a hőmérsékleti tartományt, ami megfelel az olvadáspontjának (T_m), a kétszálú formájából részlegesen denaturált formába kezd el átalakulni, ezáltal erőteljesen csökken a molekula mobilitása a gél mátrixában.

A vizsgálathoz az olvadási pont alapján tervező program segítségével lehet megfelelő primereket tervezni. Több olvadáspont analizáló bioinformatikai program áll rendelkezésünkre, melyek közül a DGGE módszerhez használt meltINGENY (Ingeny International) program a leghasznosabb és ingyenesen elérhető. A szoftver képes meghatározni a vizsgált DNS régió olvadási profilját, így a tényleges laboratóriumi munkát megelőzve képet kaphatunk arról, hogy a vizsgálni kívánt mutációnk a legalacsonyabb hőmérsékletű olvadási doménba esik-e, így lehetőség van ezekkel a módszerekkel a kimutatására vagy sem, és ebben az esetben más jellegű módszert kell választani a mutáció detektálásához.



a) a GC kapcsolatot nem tartalmazó MC1R allélok PCR termékeinek olvadási profilja, b) a reverz primer segítségével bevitt 40 bp hosszú GC kapocs a TTGE során megakadályozza az MC1R allélok PCR termékeinek teljes denaturációját, mivel a harmadik olvadási tartomány olvadási hőmérsékletét 90 °C fölé emeli. c) a szarvasmarha PACAP gén 5. exon 384 bp méretű fragmensének olvadási profilja. A fragmens három olvadási tartományra osztható, a G/A mutáció egy természetesen előforduló, magas olvadáspontú tartományban helyezkedik el. d) a 384 bp méretű fragmens olvadási profilja a 40 bp hosszú GC kapocs alkalmazását követően. A mutáció az egyszálúvá váló szakaszon belül a legmagasabb olvadási tartományban található, ezért TTGE és DGGE módszerekkel valószínűleg nem mutatható ki.

Szükséges eszközök:

- Pipetta 1-10 µl
- Pipetta 10-100 µl
- Pipetta 100-1000 µl
- Pipetta 1-5 ml
- Pipetta 1-10 ml
- Pipettahegyek
- 200 µl-es 8-as strip
- 200 µl-es 8-as strip fedő
- PCR csőtartó blokk
- fagyasztóblokk 200 µl-es PCR csövekhez
- PCR készülék
- asztali centrifuga
- vertikális elektroforézis készülék
- mérőhenger
- mágneses keverő
- analitikai mérleg
- géltartó-festő doboz 20x20 cm-es gélhez
- rázógép

- Erlenmeyer lombik 3 l-es
- főzőpohár 100ml-es
- elektromos pipetta

Szükséges vegyszerek:

- ionmentes víz
- Akrilamid (40 %)
- TAE puffer
- TEMED
- amper (ammónium perszulfát)
- 0,5% v/v ecetsav
- 0,1 % m/v AgNO₃ törzsoldat
- 10% v/v absz. Alkohol
- 7,5 m/v% Na₂CO₃
- 37% v/v formaldehid
- 1 % NaBH₄ m/v törzsoldat
- 8M urea

Szükséges minták:

A fajazonosításhoz univerzális primerekkel felszaporított mitokondriális DNS szakaszok.

A TTGE beállítási körülményei az alábbiak:

- Gél összetétele: 10% akrilamid gél, 7 M urea (1 M urea 2 °C-kal csökkenti a T_m-et)
- Futtatási körülmények:
 - feszültség: 400 V
 - futtatási idő: 5 óra és 5 óra 30 perc
 - hőmérsékleti lépték: 0,2 °C/8 perc, 60–66,6 °C
- A gél összetétele 40 ml végtérfogatban:
 - 1x TAE
 - 8 M urea
 - 10–11% 37,5:1 akrilamid:bisakrilamid
 - 400 µl 10%-os ammónium-perszulfát oldat
 - 30 µl tetrametiletiléndiamin (TEMED)

Elektroforézis rendszer: Bio-Rad Protean II xi Cell.

DNS festés: ezüst festés korábban leírt protokoll szerint.

A DGGE és TTGE módszer esetében végrehajtott PCR reakciók ugyanolyan paraméterek mellett zajlottak. A módszerek kivitelezése során fontos szerepe van az ún. GC-clampet tartalmazó primereknek. A GC-clamp egy jellemzően 30-40 bp hosszú DNS szakasz, amely citozin és guanin bázisokban gazdag. Szerepe az olvadási hőmérséklet növelése, ami viszont azt eredményezi, hogy a TTGE módszer során előállított minták magasabb hőmérsékleti tartományban sem fognak teljesen egyszálúvá válni. Így a gélben nagyobb távot fognak megtenni, azokhoz a mintákhoz képest, amelyek nem rendelkeznek ilyen régióval.

Az alkalmazott PCR reakció leírása:

A reakcióhoz alkalmazott primerek:

- GC_MC1R_F (melanokortin1 receptor gén forward):
5'CGCCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGGCAGCAACGTGCT
GAGACGGC 3'
- GC_MC1R_R (reverse):
5'CGCCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGGGGGCGCTGCCT
TTCTGGAG3'

A reakció során felhasznált elegy összetétele 20 µl végtérfogatra vonatkoztatva:

- 1x GoTaq puffer
- 200 µM dNTP
- 3 mM MgCl₂
- 1 pmol forward primer
- 1 pmol reverse primer
- 1 pmol GC-clampes forward primer
- 1 pmol GC-clampes reverse primer
- 1 U GoTaq polimeráz

Ezen végkonc. eléréséhez az alábbi mennyiségeket kell összemérni:

- 4,0 µl puffer (5x)
- 2,0 µl dNTP (2mM)
- 2,4 µl MgCl₂ (25mM)
- 0,2 µl forward primer (10pmol/µl)
- 0,2 µl reverz primer (10pmol/µl)

- 0,2 µl GC-clampes forward primer (10pmol/µl)
- 0,2 µl GC-clampes reverz primer (10pmol/µl)
- 0,2 µl GoTaq polimeráz (5U/ µl)
- 9,6 µl dH₂O

+ 1 µl DNS minta

A reakció lépései:

- Kezdeti denaturáció: 95°C, 2 perc
- Denaturáció: 95°C, 0,5 perc
- Anellálás: 69°C, 0,5 perc
- Extenzió: 72°C, 0,5 perc
- Végző lánchosszabítás: 72°C, 5 perc.

A keletkező PCR termékeket 2 m/v%-os agaróz gélen ellenőrizzük. Ciklusok száma: 35.

PCR-DGGE kivitelezése:

A mintaként használt PCR termék megegyzik a PCR TTGE eljárás során előállított PCR termékekkel.

A kimutatás a melanokortin 1 receptor gén fajtaspecifikus mutációin alapul.

		60%-os denaturáló gél oldat (A)	40%-os denaturáló gél oldat (B)
Akrilamid (37,5:1)		3 ml (6%)	3 ml (6%)
TAE puffer (50 X)		200 µl (0,5 X)	200 µl (0,5 X)
Urea		5,04 g (4,2 M)	3,36 g (2,8 M)
Formamid		4,8 ml (24%)	3,2 ml (16%)
Brómfenolkék		200 µl (1%) vagy néhány mg por	-
Glicerín		400 µl (2%)	400 µl (2%)
dH₂O		11,4 ml	13,2 ml
10% AMPER oldat		10 µl (0,05%)	10 µl (0,05%)
TEMED		10 µl (0,05%)	10 µl (0,05%)
Σ		20 ml	20 ml
		80%-os denaturáló gél oldat (A)	40%-os denaturáló gél oldat (B)
Akrilamid (37,5:1)		3 ml (6%)	3 ml (6%)
TAE puffer (50 X)		200 µl (0,5 X)	200 µl (0,5 X)
Urea		6,72 g (5,6 M)	3,36 g (2,8 M)
Formamid		6,4 ml (32%)	3,2 ml (16%)
Brómfenolkék		200 µl (1%) vagy néhány mg por	-
Glicerín		400 µl (2%)	400 µl (2%)
dH₂O		9,8 ml	13,2 ml
10% AMPER oldat		10 µl (0,05%)	10 µl (0,05%)
TEMED		10 µl (0,05%)	10 µl (0,05%)
Σ		20 ml	20 ml

Glicerín: a sávok mobilitását ilyen alacsony koncentrációban már nem befolyásolja, használatával a gél kevésbé lesz törékeny.

Tanácsok és feladatok a poliakrilamid gélelektroforézishez:

- Ha az urea lassan oldódik, melegítsük az oldatot a mágneses keverővel.
- 10%-os AMPER oldat készítés: 1000 µl dH₂O-ban feloldunk 100 mg AMPER port.
- Először a kivezető cső csapját nyissuk meg, majd a két kamra közötti csapot.
- Gél öntés után azonnal öblítsük át a gradiens készítő eszközt meleg vízzel.
- 2000 ml 0,5 X TAE puffer készítés: 20 ml + 1980 ml dH₂O
- Hagyjuk legalább másfél órán át polimerizálódni a géleket.
- 1 µl PCR terméket elegendő felvinni.

Elektroforézis körülményei:

200V állandó feszültség 60°C, 6 óra,

óránként mintafelvétel: t0: 0. perc t1: 60 perc; t2: 120 perc; t3: 180 perc; t4: 240 perc; t5: 300 perc; t6: 360 perc

Denaturáló törzsoldatok elkészítése:

	0%-os denaturáló törzsoldat	100%-os denaturáló törzsoldat
40%-os akrilamid oldat (37:1)	15 ml (6%-os PAA gélhez)	15 ml (6%-os PAA gélhez)
50X TAE puffer	1 ml (0,5 X)	1 ml (0,5 X)
urea	-	42 g (7 M)
formamid	-	40 ml (40%)
dH ₂ O	84 ml	kiegészíteni 100 ml-re

DGGE gél öntése U-alakú gradiens gélöntő használatával:

1. 0v/v%-os és 100v/v%-os denaturáló akrilamid-oldatokat állítunk össze.
2. Az elkészített denaturáló oldatokat olyan térfogatban készítjük el, amelyek együttesen a teljes gél térfogatát adják, pl.: 50 ml-es gélhez 25 ml 0v/v%-os és 25 ml 100 v/v%-os oldatot készítünk.
3. A gél öntése előtt 15 percig 4 °C-on tartjuk az oldatokat.
4. Az U-alakú közlekedő-edényt egy mágneses keverőre helyezük. Ezt a gélöntő forma felett kell elhelyezni kb. 30-40 cm-es távolságban, mivel a gradiens gélöntőhöz kapcsolódik egy gumicső, amin keresztül a keveredő oldatok az üveglapok közé jutnak.
5. A mágneses keverőre helyezést követően a gradiens gélöntő két része között az átjárást még nem engedjük meg, azokat egy csap elzárásával választjuk el egymástól.

6. Az elkészített oldatokat szintén mágneses keverőre helyezzük, majd mind az alacsony, mind a magas koncentrációjú oldathoz 10 μ l ammónium-perszulfátot és 10 μ l TEMED-et adunk.
7. Az alacsony koncentrációjú oldatot öntjük bele a grádiens gélöntőnek abba a részébe, amely nem rendelkezik közvetlen kimenettel a gélöntő kivezető csövéhez. Mindezt olyan formában, hogy a grádiens gélöntő két része közötti csapot kissé megnyitjuk, így valamennyi oldat átjut a másik részbe, ezzel megakadályozva azt, hogy a járatban buborék képződjön.
8. Ezután a magas koncentrációjú oldatot is beletöltjük a grádiens gélöntő kivezetőcsőnél lévő tartályába, majd elindítjuk a kevertetést és megnyitjuk az elvezető cső csapját, így az oldatot a gravitáció az elvezető csőn keresztül a gélöntő forma üveglapjai közé vezeti, egyidejűleg megnyitjuk a közlekedő-edény két része közötti csapot, így az alacsony és magas koncentrációjú oldat keveredését is biztosítjuk.
9. A kivezető csövön keresztüli áramlást az üveglapok közé szabályozni lehet egy csipesszel. Úgy kell kivitelezni a gél öntését, hogy a teljes oldatmennyiség 5-10 perc leforgása alatt folyjon le a kivezető csövön.
10. A gél polimerizációja 1-2 órát vesz igénybe.

III/14. Agaróz gélelektroforézis

A molekuláris biológiai vizsgálatok során széleskörben alkalmazott szeparálási eljárás az agaróz gélelektroforézis. Az eljárás során a vizsgálni kívánt minták elektromos erőtér hatására a töltésükkel ellentétes elektródok irányába vándorolnak az agaróz gél mátrixában. A szeparálás alapját képezi, hogy a PCR reakció során felszaporodott fragmentumok a gél anyagában a méretük függvényében vándorolnak.

Az agarózt vörös algából vonják ki és kémiaailag módosítják, annak elérése érdekében, hogy nagyobb stabilitással rendelkezzen, alacsonyabb olvadáspontja legyen és mentes legyen a nukleinsavak lebontására képes enzimektől. Nagy előnye a poliakrilamidhoz képest, hogy nem mutat toxikus tulajdonságokat. Kezelése könnyű, a szükséges mennyiségű agaróz port megfelelő pufferben feloldva, melegítve és formába öntve állítható elő az elválasztáshoz szükséges agaróz gél.

A hagyományos gélelektroforézis elválasztási tartománya rendkívül széles, alkalmas lehet 40-50 kbp méretű fragmentumok elválasztására is, de pulzáló erőterű gélelektroforézist alkalmazva lehetőség nyílik Mbp nagyságrendű fragmentumok elválasztására is. Az agaróz gélelektroforézis felbontása kisebb, mint a poliakrilamid gélelektroforézisé. A fragmentek méretbeli elkülönítésén túl, az agaróz gélelektroforézis alkalmas DNS és RNS minták koncentrációinak becslésére is. Ezen alkalmazáshoz gél dokumentációs rendszert és gélelemző szoftvert használunk, a géltre pedig ismert koncentrációjú DNS-t viszünk fel.

Az előállított PCR termékek kimutatásához 1-3 m/v%-os agaróz gélt alkalmazunk.

Az alkalmazott 2 m/v%-os gél összetétele 150 ml-re vonatkoztatva:

- 3 g agaróz (SeaKem® LE Agarose, Lonza)
- 150 ml 1x TAE puffer (1000 ml-re vonatkoztatva 20 ml AccuGENE 50x TAE Buffer, Lonza; 980 ml dH₂O)
- 150 µl 1000x GelRed (Biotium, 10 000x vízben)

III/15. Poliakrilamid gélelektroforézis

A másik leggyakrabban alkalmazott polimer a gélelektroforézis során a poliakrilamid, mely akrilamid monomerekből felépülő térhálós szerkezetű polimer, az akrilamid egységek keresztkötését a legtöbb esetben az N-N'-metilén-bisz-akrilamid biztosítja. A poliakrilamid mátrixának pórusméretét az akrilamid és az alkalmazott keresztkötő vegyület koncentrációi határozzák meg. Az alkalmazott monomer koncentrációja fordított arányosságot mutat a mátrix pórusméretével. Ennek következménye, hogy amennyiben növekszik a monomer koncentrációja, úgy növekszik a mátrix szűrőhatása. 5% C_{bisz} értéknél a legkisebb a gél pórusátmérője, ettől akár csökkenő, akár növekvő irányba eltérve nő a pórusméret, vagyis csökken a gél szűrőhatása.

A poliakrilamid géleknek két nagy csoportját különíthetjük el: a nem denaturáló és a denaturáló géleket. A nem denaturáló gélt legfeljebb 1000 bp hosszúságú DNS szakaszokhoz lehet felhasználni. A DNS másodlagos szerkezete megmarad, az egyes fragmentumok vándorlási sebessége függeni fog az adott szakasz bázisösszetételétől.

A denaturáló poliakrilamid gélben az alkalmazott denaturáló ágensek (urea, formamid, hő) megszüntetik a másodlagos szerkezetet, vagyis a DNS mobilitása nem fog függeni a bázisösszetételtől. A denaturáló gélek alkalmasak lehetnek bázisszekvencia meghatározására.

A poliakrilamid gélek alkalmazása lehetővé teszi akár 1bp különbség kimutatását, valamint a géltre felvitt DNS mennyisége kellőképpen magas lehet, elérheti az 1µg/mm² mennyiséget is. A poliakrilamidnak azonban jelentős hátránya, hogy monomer formában erős, kumulatív hatású neurotoxin, habár eddig a laboratóriumi gyakorlatban nem jegyezték fel mérgező esetet. Hátránya továbbá, hogy toxikus hatása miatt fokozott elővigyázatosságot igényel, valamint polimerizációja nehezen ellenőrizhető és szűk az elválasztási tartománya.

Poliakrilamid gél öntése, futtási paraméterek beállítása:

Szükséges eszközök, vegyszerek:

- Protean II xi Cell gélöntő állvány és forma (BioRad)
- Power Pac Universal Power Supply (BioRad)
- Acrylamide/bis-Acrylamide Solution (Sigma)
- steril desztillált víz

- 10%-os ammónium-perszulfát oldat (Sigma)
- TEMED (tetrametil-etiléndiamin) (BioRad)

A poliakrilamid gél előállításánál akrilamid-biszakrilamid származékokat használunk, amelyeket megfelelő koncentrációjú és pH értékű pufferoldat hozzáadása mellett polimerizálunk katalizátor és iniciátor molekulák alkalmazásával. Esetünkben az alkalmazott akrilamid-biszakrilamid 40%-os töménységű, a felhasznált pufferoldat 10X TBE (Tris-borát-EDTA). Katalizátorként ammónium-perszulfátot adunk az akrilamidhoz, ami vizes közegben spontán bomlik, ennek eredményeképpen szabad gyökök keletkeznek, amelyek elengedhetetlenül fontosak az akrilamid polimerizációjához, amely a gyökös típusú láncreakciók közé tartozik. Ugyanakkor önmagukban ezek a szabad gyökök nem képesek stabilizálni a polimer szerkezetét, ehhez szükséges még TEMED (tetrametil-etiléndiamin), amely az ammónium-perszulfátból keletkező gyökök hatására maga is bomlik, és olyan gyököket eredményez, amelyek már aktiválják a polimerizációt.

Poliakrilamid gél öntése:

1. A gél formáját adó üveglapokat és ún. távtartókat használunk, a távtartók vastagsága határozza meg az üveglapok közötti tér vastagságát, ezáltal a gél vastagságát is. Ez esetünkben 0,75 mm.
2. Az egymásra helyezett üveglapokat és távtartókat műanyag tartókba állítjuk, amelyeket össze lehet szorítani, majd az így kapott szerkezetet egy állványba állítjuk oly módon, hogy egy szivacsos anyagcsíkot helyezünk az üveglapok alá. Az üveglapok közé kerül a gélben zsebeket kialakító műanyag fésű.
3. Az összeállított gélöntő forma tesztelhető, vizet lehet pipettázni az üveglapok közé, így megbizonyosodhatunk róla, hogy nincs szivárgás, vagyis a későbbiekben a gél biztonságosan önthető meg (vizet óvatosan kiöntjük az üveglapok közül).
4. Következő lépésben történik az oldatok összemérése:

40%-os akrilamid-biszakrilamid:	9,9 ml
10X TBE puffer:	2,4 ml
Desztillált víz:	27,7 ml
5. A katalizátor ammónium-perszulfátot frissen készítjük el:

10%-os ammónium-perszulfát oldatot állítunk össze:
--

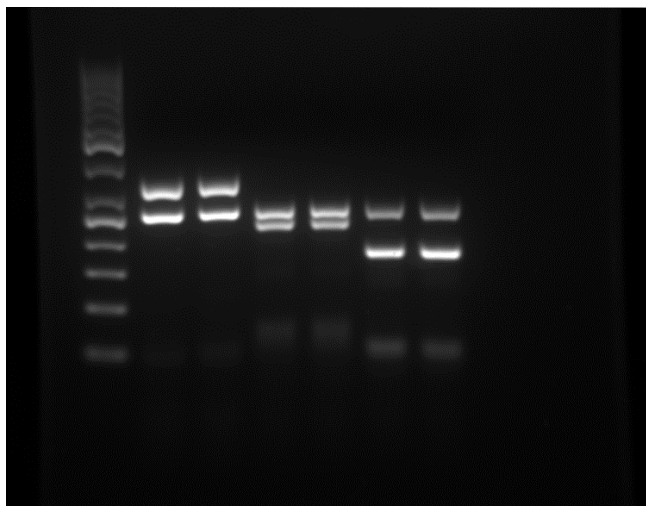
Ammónium-perszulfát por: 0,1 g

Desztillált víz: 1000 µl

6. A 4. pontban összeállított elegyhez először 400 µl ammónium-perszulfát oldatot adunk. Ezután pipettázunk hozzá 30 µl TEMED-et. Eközben az oldatot végig mágneses keverőn kevertetjük a polimerizáció megakadályozása miatt, amíg meg nem öntjük a gélt. A keverőn lévő oldatot valamilyen módon (alufólia) lefedjük, mivel az akrilamid-biszakrilamid folyékony halmazállapotában neurotoxin és egyben rákkeltő tulajdonságú is. Fokozott odafigyelést igényel.
7. A gél öntése történhet közvetlenül a főzőpohárból, de érdekesebb egy 10 ml-es pipettát használni, amivel pontosabban önthető a gélloldat az üveglapok közé.
8. A kiöntött gél 10-30 percen belül megszilárdul és alkalmassá válik a minták felvitelére és futtatására.
9. Az összeállított géllöntő formát egy futtatókádba helyezzük, a géllöntő forma felső részére és a futtatókádba 0,6X TBE puffert töltünk oly módon, hogy az elektródokat elfedje a folyadék.
10. Ezután a tápegységen (Power Pac Universal, BioRad) beállítjuk az elektroforézishez alkalmazott feszültség értéket, ami 400 V.
11. A rendszer hőmérsékletét szabályozhatjuk, annak függvényében, hogy milyen vizsgálatot végzünk. PCR-SSCP során hűtés szükséges (10°C), míg TTGE módszer során a rendszert melegíteni kell.

III/16. Troubleshooting – Gélképek és magyarázatuk

1. Duplex PCR agaróz gélelektroforézise



A fenti képen egy agaróz gélelektroforézis során kapott gélkép látható. A bal szélső pozícióban egy ún. DNS létra látható, amely meghatározott bázispár hosszúságú fragmentumokat tartalmaz, amelyek referenciaként használhatóak a vizsgált DNS minták méretének a megállapításához. A vizsgálati minták felvitelére kettes ismétlésben került sor.

A képen látható minták duplex-PCR reakcióban kerültek amplifikálásra, vagyis egy reakcióban két primerpár alkalmazásával a két faj eltérő DNS régióra terveztük az oligokat. Mindegyik minta tartalmazza a szarvasmarhára jellemző méretű fragmentumot (256 bp, az erősebb sávként látható 250 bp-os létra magasságában), amelyek mindhárom minta esetében ugyanazon méretnél jelennek meg, míg a hozzáadott kecske, bivaly és juh fajok PCR termékei 326 bp, 226 bp és 172 bp nagyságúak, ezért a szarvasmarha DNS pozíciójához képest eltérő helyen találhatóak a gélen, ugyanakkor jól láthatóan egymáshoz képest is eltérőek.

A képen látható DNS létra 50 bp-os, ami azt jelenti, hogy a legkisebb fragmentum 50 bp hosszúságú. Az 50 bp-os DNS létra 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp hosszúságú DNS szakaszokat tartalmaz.

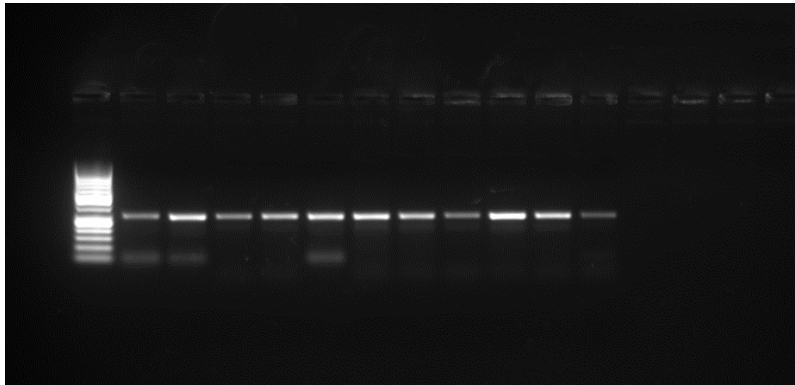
Attól függően, hogy milyen méretű a felszaporított DNS régió, más mérettartományú DNS létrákat is lehet alkalmazni. Általánosan alkalmazott DNS létrák a 100 bp-os, a 100 bp-os (plusz) és az 1 kbp-os létrák.

A 100 bp-os létra egységei: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp.

A 100 bp-os (plusz) létra egységei: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000 bp.

Az 1 kbp-os létra egységei: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.

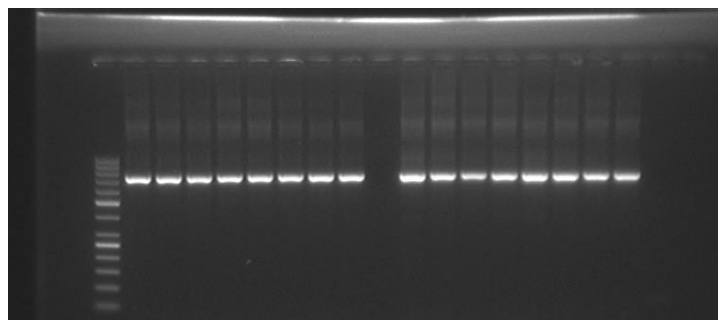
2. PCR univerzális primerekkel több faj esetén (agaróz gélelektroforézis)



A gélképen univerzális primerekkel felszaporított DNS régiók figyelhetőek meg, amelyek azonos méretű fragmentumot képeznek különböző fajok esetében is. Ez jól megfigyelhető a gélképen is, minden egyes minta sávja azonos méretnél jelenik meg. Az első, második és ötödik minta esetében 50 bp-os mérettartományban elmosódott halvány sáv (folt) látható. Ez primerdimerek megjelenésére utalhat, amelyek kialakulását okozhatja a reakció során felhasznált nagy mennyiségű primer, illetve az enzim aktivitásának csökkenése okozhatja ezek megjelenését azáltal, hogy a reakcióban visszamaradó, fel nem használt primerek alkothatnak dimereket.

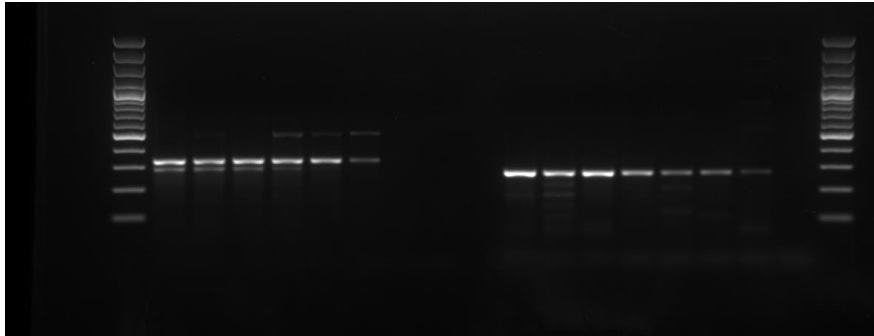
A PCR termék méretének meghatározását 50 bp DNS létra segíti.

3. Szimplex hőmérséklet gradiens PCR termék agaróz gélelektroforézise



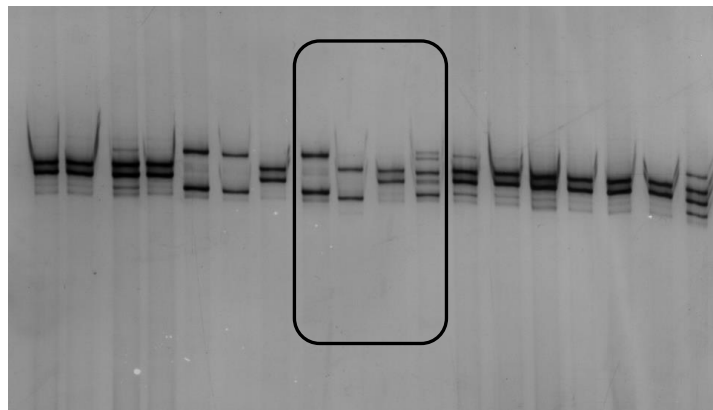
A képen egy hőmérséklet grádiens PCR reakció során felszaporított DNS szakaszok láthatóak. Mindegyik mintában azonos méretű sávot láthatunk, mivel ebben az esetben univerzális primereket teszteltünk. Megállapítható, hogy az adott kiválasztott hőmérséklet tartomány minden egyes hőmérsékletén a primerek azonos hatékonysággal képesek működni.

4. Hőmérséklet grádiens PCR fajspecifikus primerekkel (agaróz gélelektroforézis)



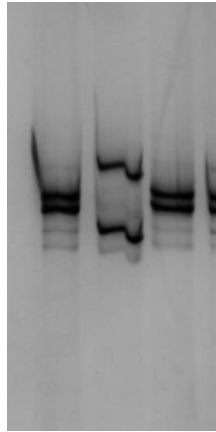
Az agaróz gélképen fajspecifikus primerek hőmérséklet grádiens PCR során kapott termékeit festettük meg gelred-el. A kép baloldalán szarvasmarha, míg a jobb oldalon bivaly minták láthatóak. A szarvasmarha minták esetében a kiválasztott hőmérsékleti tartományban a primerek nem működnek optimálisan egyik hőmérsékleten sem, mivel minden egyes minta esetében melléktermékek figyelhetők meg, ami alapján meg lehet állapítani, hogy az adott hőmérsékleti tartományban a primereket nem lehet alkalmazni.

5. PCR-SSCP poliakrilamid gélen



A képen egy PCR-SSCP módszer során poliakrilamid gélelektroforézissel kapott sávmintázat látható. 8-11 minták kontrolllok, amelyek szarvasmarha (8), bivaly (9), juh (10) és kecske (11)

fajok mintáit jelentik. A többi minta (1-7., illetve 12-18.) kereskedelmi forgalomban kapható tejtermék. Az elektroforézis időtartama 5 óra volt, amely nem eredményez teljesen egyértelmű elválást a bivaly és a kecske fajok egyes sávjai között.



A képen látható második sávmintázat torzult. Ennek magyarázata, hogy a gél öntése során a zseb kialakításához használt ún. fésű alatt buborék képződött, ami miatt a később a zsebbe felvitt minta is torzult alakban kezdett el a gélben vándorolni és ezt az alakot a teljes elektroforézis ideje alatt megtartotta.



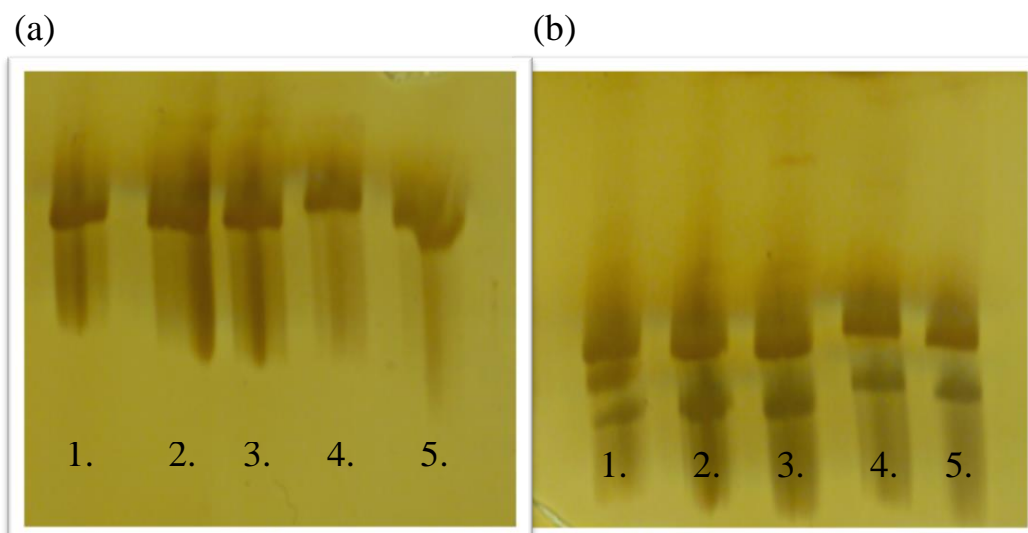
Poliakrilmid gélelektroforézis képe 7 óra futási idő után. 8-11. minták kontroll minták, amelyek szarvasmarha, bivaly, juh és kecske fajokat jelentenek. A kontroll minták jelentősen halványabb mintázatot adtak, mint a többi minta. Ez magyarázható a kiindulási DNS templátok különböző DNS koncentrációival, illetve magyarázatként szolgálhat az is, hogy a PCR reakciók során eltérő mértékben sikerült felszaporítani az egyes szakaszokat.

6. PCR-TTGE poliakrilamid gélen

Az urea koncentráció csökkenti a várható T_m -et. Az akrilamidhoz adott 7M urea várhatóan 14°C-kal csökkentette a várható olvadási pontot, így az 64-67 °C közé esik. A részleges denaturáció miatt itt a migráció leáll (erőteljesen lelassul). GC-clamp nélkül a teljes denaturálódás is bekövetkezik.

5h 30 perc futtatási időnél, 66,6°C hőmérsékletnél egy újabb DNS sáv jelentkezett, melyből arra következtethetünk, hogy az olvadáspontját elért DNS egyszálúsodott. Az MC1R génre homozigóta egyedek PCR termékei 2 olvadási doménbe estek, melyek egyike a vizsgált génszakasz elülső részére, másik pedig a végére esett.

GC-clamp nélküli homozigóta szarvasmarha MC1R PCR termékek poliakrilamid gélmintázata időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis után



Mintafelviteli sorrend: 1. E1/E1, 2. E2/E2, 3. E3/E3, 4. ED/ED, 5. e/e genotípusú szarvasmarha MC1R PCR TTGE minták.

Elektroforézis körülményei: 400V feszültség, a) 5h illetve b) 5h 30 min. futtatási idő, 0,2 °C/8 perc hőmérséklet lépték, 60 °C – 66,6 °C hőmérséklet tartomány.