

Určování pohlaví pomocí analýzy genu SRY TaqMan Copy Number Assays (Applied Biosystems)

Pomůcky a chemikálie:

sonda 1: TaqMan® Copy Number Customer Assay - SRY,Hs00243216_s1, (LifeTechnologies)

sonda 2: TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P (LifeTechnologies)

master mix: TaqMan® Universal Master Mix II (LifeTechnologies)

voda: Ambion® Nuclease -Free Water (LifeTechnologies)

jednorázové latexové rukavice

pipety o objemu 0,5-10 µl; 10-100 µl a 100-1000 µl

špičky k pipetám (Eppendorf)

mikrozkumavky o objemu 0,2 ml (Biotech)

PCR desky:

MicroAmp™ Optical 96 - well Reaction Plate (LifeTechnologies, P)

krycí fólie:

MicroAmp™ Optical 96 Adhesive Cover (LifeTechnologies)

Stripy:

MicroAmp™ Fast Reaction Tubes (LifeTechnologies)

MicroAmp™ Fast Optical 8 -cap (LifeTechnologies)

Přístrojové vybavení:

centrifuga: mikrocentrifuga s funkcí Vortex Multi-Spin MSC-3000 (Biosan Ltd.)

minicentrifuga: minicentrifuga miniSpin Plus (Eppendorf)

vortex: vortex mixer (Velp Scientifica, P: Obr. IV)

real-time cykler: StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems
(LifeTechnologies)

Příprava reakční směsi a vzorku:

PCR probíhala v objemu 20 µl

1. Rozmrazíme TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P, TaqMan® Copy Number Customer Assays a vodu. Vše zvortexujeme.
2. Spočítáme množství master mixu včetně negativní kontroly a navýšení reagentů pro chybu pipetování.
3. Připravíme reakční směs smícháním reagentů podle tabulky.
4. Zvortexujeme.
5. Napipetujeme 8 µl z reakční směsi do jamky ve stripu/destičce.
6. Přidáme 2 µl mužské standardní DNA nebo analyzovaného vzorku do reakční směsi v příslušné jamce.
9. Utěsníme destičku nebo strip pomocí fólie či víček.
7. Krátce centrifugujeme
8. Vložíme do cykleru a spustíme reakci

TaqMan® Copy Number Assays	µl
TaqMan® Universal Master Mix II	10
TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P	1
TaqMan® Copy Number Customer Assays	1
Voda	4
DNA	4

fáze	teplota	čas
	95 °C	10 min
cyklus PCR (40 cyklů)	95 °C	15 s
	60 °C	1 min

Po skončení amplifikace byly výsledky uloženy ve formátu .sds., eds. a jpg pro další vyhodnocení reakce

Určování pohlaví pomocí analýzy genu AMELX a AMEL Y pomocí LNA fluorescenčních sond

Pomůcky a chemikálie:

Primery (Sigma Aldrich, s. r. o.)

1. forward primer-se sekvencí

- -

2. reverse primer:-se sekvencí

- -

fluorescenční sondy: LNA sondy –Locked Nucleic Acid

(Sigma Aldrich, s.r.o)

sekvence sondy genu pro amelogenin X

amelX, značená fluorescenčním barvivem HEX:

-[HEX]TCC[+A]GA[+T]GT[+T]TC[+T]CA[+A]GTGGTCCT[BHQ1] –

a sekvence sondy genu pro amelogenin nacházejícího se na chromozomu Y

amelY, značená fluorescenčním barvivem FAM:

-[FAM]TCC[+A]GA[+T]AA[+A]GT[+G]GT[+T]TC[+T]CAAGTGGT[BHQ1] –

Maxima™ Probe qPCR Master Mix 2X

voda: nuclease – free water dodávaná s master mixem

jednorázové latexové rukavice

pipety o objemu 0,5-10 µl; 10-100 µl a 100-1000 µl

špičky k pipetám (Eppendorf)

mikrozkumavky

o objemu 0,2 ml (Biotech)

PCR desky:

MicroAmp™ Optical 96 - well Reaction Plate (LifeTechnologies, P)

krycí fólie:

MicroAmp™ Optical 96 Adhesive Cover (LifeTechnologies)

Stripy:

MicroAmp™ Fast Reaction Tubes (LifeTechnologies)

MicroAmp™ Fast Optical 8 -cap (LifeTechnologies)

Příprava reakční směsi a vzorku:

1. Smícháním reagensí podle tabulky připravíme reakční směs a krátce promícháme na vortexu.
2. Napipetujeme 18 µl z reakční směsi do jamky v destičce.
3. Přidáme 2 µl DNA každého vzorku určeného k analýze do reakční směsi v příslušné jamce.
4. Utěsníme destičku pomocí fólie a krátce centrifugujeme.
5. Destičku vložíme do cykleru a po nastavení přístroje spustíme reakci.

Složení reakční směsi		
reagencie	množství µl /reakce	množství µl /10 reakcí
Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2x)	10,0	100
Primer forward (100 pmol/µl)	0,10	1
Primer reverse (100 pmol/µl)	0,10	1
Sonda FAM (10 pmol/µl)	0,10	1
Sonda HEX (10 pmol/µl)	0,10	1
Nuclease-Free Water	4	40
celkem reakční směsi	18	180
DNA	2	10x2
celkem	20	160 + 10x4 DNA

proces	část reakce	cílová teplota (°C)	doba trvání	počet opakování	fluorescence
	počáteční denaturace	95	10 min	1x	
PCR amplifikace	denaturace	95	10 s	40x	FAM, HEX
	annealing	64	20 s		
		65			
		66			
extenze	67	20 s			
	závěrečná extenze	72	30 s	1x	
chlazení		60	---	1x	

Plexor® HY System

(Technical Manual Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems)

Kalibrace 7500 Fast Real-Time cyklu

Před použitím Plexor® HY, musí být přístroj kalibrován pro fluoresceiny CAL Fluor® Orange 560, CAL Fluor® Red 610 a IC5 Plexor®.

Postup kalibrace:

1. Rozmrazíme všechny čtyři zkumavky s koncentrovanými barvivy pro kalibraci (fluorescein, CAL Fluor® Orange 560, CAL Fluor® Red 610 a IC5) a kalibrační pufr.
2. Veškeré chemikálie zvortexujeme.
3. Pro každou spektrální barvu naředíme 20 µl koncentrované kalibrační barvy v 1,980 ul kalibračního pufru.
5. Napipetujeme 20 µl směsi do všech jamek destičky stejnou kalibrační barvu, takže budeme mít čtyři desky se všemi barvami a označíme destičku.
6. Přikryjeme fólií, zahladíme a chráníme před světlem.
7. Krátce destičku centrifugujeme.
8. Destičku vložíme do cyklu a postupujeme podle příslušné kapitoly v Technical Manual Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR
9. Destičky uchováme v temnu a při -20° C pro další použití.

Příprava reakčního směsi

Reakce probíhá v objemu 20 µl.

1. Rozmrazíme Plexor® HY 2X Master Mix, Plexor® HY 20X Primer / IPC Mix a vodu a zvortexujeme.
2. Spočítáme množství mastermixu včetně negativní kontroly a navýšení reagentů pro chybu pipetování.
3. Připravíme reakční směs smícháním vody, Plexor® HY 2x Master Mix a Plexor® HY 20X Primer / IPC Mix
4. Zvortexujeme.

5. Napipetujeme 18 μ l z reakční směsi do jamky ve stripu nebo destičce.
6. Přidáme 2 μ l mužské standardní DNA nebo analyzovaného vzorku k reakční směsi v příslušné jamce
9. Utěsníme destičku nebo strip,
7. Krátce centrifugujeme
8. Vložíme do cykleru a spustíme reakci

Pro PCR byl použit následující program, který vychází z doporučení v manuálu.

VI.B. Thermal Cycling Program

The thermal cycling program is shown in Table 3. Figure 8 illustrates the final thermal cycling program.

Table 3. Thermal Cycling Program.

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial denaturation:	95°C	2 minutes	1 cycle
Denaturation:	95°C	5 seconds	38 cycles
Annealing and extension:	60°C	35 seconds	
Melt temperature curve:	Use the default "Dissociation Function" settings.		

Po skončení amplifikace byly výsledky uloženy ve formátu .sds., eds. a jpg pro další vyhodnocení reakce.