

**Polymerázová řetězová reakce (PCR) - amplifikace
fragmentu genu *GH* lína obecného, *CytB* u jesetera sibiřského a část
mitochondriálního genu *can* dáta obecného**

Pracovní potřeby: termální cykler
stolní centrifuga
tenkostěnná mikrozkušavka pro PCR 0,2 ml
sada mikropipet
špičky k mikropipetám

Chemikálie: redestilovaná H₂O
dNTP mix (směs nukleotidů: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
LA pufr pro PCR (10x *buffer PCR*)
roztok primeru A (10 pmol/μl), roztok primeru B (10 pmol/μl)
LA polymeráza (5U/μl)
roztok DNA (Vámi získaný izolát)

Pracovní postup:

1. Na mikropipetě nastavíte 18,8 μl, nasadíte špičku a odeberete 18,8 μl redestilované vody do PCR mikrozkušavky.
2. Odeberete 2,5 μl pufru a přidáte k vodě v mikrozkušavce, můžete vyjimečně použít stejnou špičku.
3. Dále odeberte a přidejte 0,5 μl dNTP mix, 0,5 μl primeru A a 0,5 μl primeru B.
4. Nyní přidejte opatrně 0,2 μl *LA* polymerázy (enzym musí být uchováván při -20 °C).
5. Na závěr přidejte 2 μl vlastního izolátu DNA. Celou směs je nutno řádně promíchat, použijte pipetu se špičkou nebo vortex. **Nemíchejte obracením nebo třepáním zkumavkou!**
6. Mikrozkušavku umístěte do centrifugy a krátce stočte, aby roztok nebyl po stěnách.
7. Nyní umístěte mikrozkušavku s PCR směsí do termálního cyklu předem vyhřátého na 95 °C a spustíte reakci.

Tab. 1. Složení reakční směsi PCR:

Složka	Objem μ l
Redestilovaná voda	18,8
Pufr pro PCR (10x <i>buffer</i> PCR)	2,5
dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	0,5
Primer A (10 pmol/ μ l)	0,5
Primer B (10 pmol/ μ l)	0,5
LA Polymeráza (5U/ μ l)	0,2
DNA	2
Celkem	25

Tab. 2. Příklad cyklování při PCR reakci (teplotní profil reakce)

Název kroku	Teplota	Čas	K čemu dochází	
Úvodní denaturace DNA:	95 °C	2 min	Oddělí se vlákna dvoušroubovice genomové DNA	
Cyklování 35x	Denaturace:	95 °C	20 s	Oddělí se vlákna dvoušroubovice amplifikované (templátové) DNA
	Annealing:	56 °C	30 s	Specifické nasedání primerů na jednořetězce templátové DNA
	Elongace:	68 °C	45 s	Syntéza komplementárních řetězců DNA od místa primerů ve směru 5' → 3'
Závěrečná elongace:	68 °C	7 min	Dosyntetizování řetězců	
Chlazení:	4 °C	∞ h	Přerušování polymerační reakce	

Výsledek PCR reakce ověříme na 2,5% agarózovém gelu, 100 V, 20 min.