



Praktiska tips

- undersökning av markören D1S80 hos människa

Inköp och pris

Alla reagens till pcr kan beställas från Sigma Aldrich (artikelnumren nedan gäller Sigma utom för GelGreen).

Primers beställs från webbsidan "Oligos & peptides" (http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=STANDARD). Knappa in sekvensen för den primer man vill ha och t.ex om man vill ha den uppdelad i portioner. Välj minsta mängd DNA (0,025 μmol) och högsta antal portioner (5). Ett rör räcker då till ca 160 reaktioner, vilket är mycket mer än vi hinner använda innan de blir dåliga. Pris för primers (5x0,025 μmol) beror på primerlängden men har för oss legat mellan 95-138 kr exkl. moms.

REDTaq Readymix för PCR (100 reaktioner) inkl. laddningsfärg och separat rör med nukleasfritt vatten (Art.nr R2523). Pris: 1293,74 kr exkl. moms + 125 kr för isleverens. Förvaras i -20 graders frys.

Chelex 100 (Art.nr C7901) 25 g. Pris: 802,12 kr exkl. moms.

Storleksmarkör (Art.nr P1473) 1505,92 kr (75 laddningar). Denna måste man blanda med en sk. laddningsbuffert. Den kan göras själv eller köpas färdig (G2526, 5 ml, 234,95kr)

En variant på storleksmarkör som är färdig att ladda på gel (innehåller laddningsbuffert) finns också (art.nr D3687 2245,94 kr, 75 laddningar).

GelGreen eller GelRed (VWR, art-nr 41005) 500 μl . Pris ca 700:- exkl moms. Räcker till ca 50 gelkörningar.

Spädning av reagens, recept och förvaring.

Primers levereras med ett datablad (se bilaga Primers_datasheet.pdf) med information om hur man ska späda för att få lagom koncentration till pcr-reaktionen. I den PCR-mix vi använder (se bilaga readymix.pdf) ska man till en reaktion ha en primerkoncentration i intervallet 0,1-1,0 μM . Späd till 50 μM eller till 25 μM om det är bättre för eleverna att tillsätta 2 μl av varje primer, det blir då ca 160-320 μl av varje primer, vilket räcker till ca 160 reaktioner. Normalreceptet ger 50 μl , men det behövs bara 10 μl för elektrofores. Om man vill spara pengar kan man alltså halvera volymerna till pcr-körningen. Primers löses i TE-buffert (10mM Tris, pH7.5-8.0, 1mM EDTA) eller sterilt vatten. Frystorkade kan de förvaras länge i frys -20°C. Lösta håller de flera veckor i frys -20°C.

Till pcr-mixen följer ett rör med **nukleasfritt vatten** med som förvaras i frys.

Chelex blandas till 10% med 0,050 M Tris pH 11 (ställ pH med NaOH). Förvaras i rumstemperatur.

GelGreen/GelRed förvaras i rumstemperatur men i mörkt utrymme (ljuskänsligt).

Gel- och körningsbuffert

Recept för 50x TAE (per liter):

1. Gör 0,5 M EDTA-lösning (ethylenediamine tetraacetic acid). För att göra 500 ml 0,5 M EDTA-lösning väger man upp 93,05 g EDTA-dinatriumsalt (molekylmassa = 372,2 g/mol). Lös upp detta i 400 ml avjonat vatten och ställ in pH 8,0 med NaOH-lösning. EDTA löser sig inte fullständigt om inte pH justeras till ungefär 8,0. Justera volymen till 500 ml.

2. Väg upp 242 g Tris (molekylmassa = 121,14 g/mol) och lös det i ungefär 750 ml avjonat vatten.

3. Tillsätt till Tris-lösningen försiktigt 57,1 ml koncentrerad ättiksyra och 100 ml av 0,5 M EDTA-lösning (pH 8,0) och justera till slutvolymen 1 liter. Kan förvaras i rumstemperatur och bör ha pH på ungefär 8,5.

Brukslösning i gel/elbuffert 1x TAE:

Brukslösningen 1x TAE fås vid spädning av 50x TAE. Ta 20 mL 50x TAE och späd till 1 liter med avjonat vatten.

Körning av gel:

Man kan köra gelen med ca 5-15 V spänning/cm gel. Exempel: en gel som är 12 cm lång som ska köras med 10 V/cm motsvarar att man ställer in spänningsaggregatet på 120 V. Är gelen istället 14 cm lång så kan vi ställa in spänningsaggregatet på 140 V. Körtiden anpassas så att den röda färgen (ingår i REDTaq PCR-mix) vandrar mot änden av gelen. Den röda färgen motsvarar i storlek DNA-fragment av storleken 125 bp (1% agarosgel) eller ca 300 bp (2% agarosgel).

Den beskrivna laborationen är utprovad och bearbetad av Mia Pontoppidan (lektor i biologi) och Åsa Steinholz (institutionstekniker) vid Katedralskolan i Uppsala.

