

Ime in priimek:

Datum.:

Skupina:

## ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (RFLP)

### Princip:

Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov je metoda, ki omogoča odkrivanje znanih sprememb nukleotidnega zaporedja DNA. Restrikcijski encim prepozna in cepi specifično zaporedje DNA. Prisotnost oziroma odsotnost spremembe ugotovimo na osnovi elektroforezne ločbe pri inkubaciji z encimom nastalih fragmentov. Uporabna je za diagnozo prirojenih boleznih in v sodni medicini.

Z metodo RFLP bomo ugotavljali prisotnost spremembe 6950 A→C nukleotidnega zaporedja v genu za osteoprotegerin in sicer z restrikcijsko endonukleazo *BclI*.

Encim *BclI* prepoznava in cepi zaporedje: 5' T↓GATCA 3'. Odsek gena za OPG z dolžino 323 bp se ob prisotnosti cepitvenega mesta razcepi na odseka z dolžinama 69 bp in 254 bp.

### Postopek:

#### 1) Priprava zmesi za restrikcijo in inkubacija

- ◆ V 1,5 mL epruvete pipetiramo po shemi:

	zmes za restrikcijo z <i>BclI</i>
bidestilirana voda	8,37 μL
<i>BclI</i> (15 U/μL)	0,13 μL
NEBuffer 3 (10x)	1,5 μL
PCR	5 μL
Inkubiramo na vodni kopeli 60 min pri 50 °C.	

#### 2) Priprava gela in elektroforezna ločba

- ◆ Po inkubaciji dodamo v vsako epruveto 2,5 μL nanašalnega pufru in ločimo fragmente z elektroforezo na 3% (m/V) agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. Elektroforeza bo potekala 45 min v 1x TAE pufru in pri stalni napetosti 90 V. Poleg vzorcev nanese na gel tudi označevalec velikosti fragmentov (2,5 μL) in nerestringiran produkt PCR (5 μL) kot negativno kontrolo.
- ◆ Gel pripravimo tako, da v erlenmajerico natehtamo 2,25 g agaroze, dolijemo 75 mL 1x TAE pufru in ponovno stehamo. Pokrijemo z urnim steklom in pustimo 5 minut. Nato erlenmajerico postavimo v mikrovalovno pečico in segrevamo toliko časa, da dobimo prozorno raztopino. Počakamo 5 minut, dodamo 6 μL Midori Green, premešamo in vlijemo gel v pripravljen model. Po 30 minutah vzamemo gel iz modela.

**3) Odčitavanje rezultatov**

- ◆ Po končani elektroforezi gele presvetlimo z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in gel fotografiramo.

**OPOZORILO:**

Midori Green je toksičen, zato je potrebno previdno delo in je obvezna uporaba nitrilnih rokavic.

**Material:**

- restrikcijska endonukleaza *BclI* (15 U/ $\mu$ L)
- NEBuffer 3 (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, , 1 mmol/L ditiotretiol, pH = 7,9)
- nanašalni pufer (*BclI*): 0,025 g ksilencianola, 3,78 g glicerola, dopolnimo z bidestilirano vodo do 7 ml.
- agarozna za PCR
- 50 x TAE-pufer: 2 mol/L Tris-HCl, 1 mol/L očetna kislina, 48 mmol/L EDTA
- Midori Green
- produkti PCR gena za osteoprotegerin

**Aparature:**

**Rezultati:**

**Komentar:**

Opombe:

Pregledal: