

Protokol za izolaciju DNK iz KRVI goveda

Quick – gDNA™ MiniPrep
ZYMO RESEARCH
Catalog No: D3025

Sve dolenađene procedure treba da se rade pri sobnoj temperaturi (15-30° C), dok svi koraci ovog protokola koji se odnose na centrifugiranje uzoraka treba vršiti pri brzini centrifuge od 13 000 obrtaja u minuti.

Priprema pufera:

Za optimalne performanse, dodati 500 µl 96% etanola u 100 ml pufera „*Genomic Lysis Buffer*“ (ukoliko je izolacioni kit novootvoren).

Svežu, ohlađenu ili zamrznutu punu krv ostaviti na sobnoj temperaturi dok ne dostigne temperaturu iste, potom krv promešati na vorteks aparatu u trajanju od 3 do 5 sekundi.

1. Odmeriti 200 µl krvi u novu, sterilnu epruvetu zapremine 1,5 ml.
2. Da bi lizirali uzorak, potrebno je dodati pufer „*Genomic Lysis Buffer*“ u zapremini 4 puta većoj od uzorka krvi (i.e. 800 µl).
3. Smešu uzorka i pufera promešati na vorteks aparatu 4 do 6 sekundi i nakon toga ostaviti da odstoji na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 do 10 min.
4. Kolonicu „*Zymo-Spin Column*“ ubaciti u sabirnu epruvetu od 2 ml (nalazi se u izolacionom kitu), a zatim 700 µl smeše pripremljene u prethodnom koraku prebaciti u kolonicu. Centrifugirati 1 min. Dobijeni filtrat prosuti i ponovo iskoristiti sabirnu epruvetu. Postupak ponoviti sa preostalim 300 µl smeše, te dobijeni filtrat, kao i sabirnu epruvetu odbaciti.
5. Prebaciti kolonicu u novu sabirnu epruvetu. Odmeriti 200 µl pufera „*DNA Pre-Wash Buffer*“ u kolonicu. Centrifugirati 1 min. Odbaciti filtrat iz sabirne epruvete i ponovo je iskoristiti u sledećem koraku.
6. Odmeriti 500 µl pufera „*g-DNA Wash Buffer*“ u kolonicu. Centrifugirati 1 min. Odbaciti dobijeni filtrat i sabirnu epruvetu.
7. Prebaciti kolonicu u novu, sterilnu epruvetu zapremine 1,5 ml.
Odmeriti ≥ 50 µl pufera „*Elution Buffer*“ u središte kolonice. Inkubirati na sobnoj temperaturi 2 do 5 min., a zatim centrifugirati 1 min. kako bi izvršili ispiranje DNK sa silikatne membrane smeštene u kolonici.

Dobijena DNK može se koristiti odmah za dalje analize, ili se može deponovati u zamrzivaču na temperaturi $\leq 20^{\circ}$ C.

Protokol za izolaciju DNK iz dlake korišćenjem KAPA Expres Extract

1. Uključiti vodeno kupatilo i podesiti ga na 75°C
2. Pripremiti epruvete zapremine 1,5ml
3. U epruvete dodati iseckane dlake (2-5mm sa korenom)
 - U svaku epruvetu dodati po:
 - **10 µl** 10x KAPA Express Extract Buffer-a
 - **40 µl** H₂O
 - **2µl** KAPA Express Extract Enzyme
 - **20 µl** DDT*
4. Epruvete postaviti u vodeno kupatilo:
 - 15 minuta na 75°C
 - 5 minuta na 95°C
5. Promešati na vorteks aparatu 4 do 6 sekundi
6. Centrifugirati – 1minut na 130k rpm
7. Prebaciti supernatant u novu 1.5ml epruvetu i u nju dodati:
 - **2 µl** TE pufera +
 - **198 µl** H₂O dodati
 - **50 µl** izolovane DNK
8. Razređenu DNK čuvati u zamrzivaču

* Za 1000 µl (1 µl) = 0,1543 g praha DTT i doliti do 1 ml destilovane vode (čuvati u zamrzivaču)

Protokol za izolaciju RNK iz macerata pčela

Quick-RNA™ MiniPrep
(50 preps.)
ZYMO RESEARCH
Catalog No: 1054

Priprema uzoraka

Sveže, žive ili tek zaleđene pčele prelivene sa 1 x PBS-om dobro izmacerirati u sterilnim staklenim epruvetama, pomoću sterilnih staklenih štipica (za određivanje ekspresije gena imunih peptida pčela macerirano je 6 pčela u 2 ml 1 x PBS-a). Velikom mikropipetom odvaditi macerat u obeležene sterilne 2 ml epruvetice.

Izolacija RNK

I Liziranje

1. Pomešati macerat pčela i *RNA Lysis Buffer* u odnosu 1:4 (za određivanje ekspresije gena imunih peptida pčela uzimano je 200 µl macerata i 800 µl *RNA Lysis Buffer*). Dobro vorteksovati.

II Čišćenje uzoraka

1. Prečistiti lizat centrifugovanjem na 13000 rpm u trajanju od 1 minut.
2. Prebaciti supernatant u *Spin-Away™ Filter (žutu)* kolonicu prethodno postavljenu u sabirnu epruveticu. Centrifugovati 1 minut na 13000 rpm.
Napomena: Iscedak sačuvati za RNK purifikaciju.
Napomena: Ukoliko je više supernatanta nego što staje u jednu kolonicu, iscedak prebaciti u novu čistu 2 ml epruveticu i ostatak supernatanta centrifugovati u kolonici (istoj).

III RNK purifikacija

1. U epruveticu sa iscedkom dodati 1 volumen (isto toliku količinu) etanola i dobro izmešati na vorteksu.
2. Prebaciti miksot u *Zymo-Spin™ IICG Column (zelenu)* kolonicu prethodno postavljenu u sabirnu epruveticu. Centrifugovati 30 sekundi na 13000 rpm. Odbaciti iscedak.
Napomena: Za uzorke veće od 700 µl ponoviti postupak (u istim kolonicama) sve dok ima miksata.

3. DNase tretman (opciono)

Korak koji se koristi za otklanjanje DNK

- a. Dodati 400 µl *RNA Wash Buffer* u kolonicu. Centrifugovati 30 sekundi. Odbaciti iscedak. – ispiranje.
- b. Prema broju uzoraka pripremiti *Dnase I reaction mix* u čistoj 1,5 ml epruvetici (nije priložena). Po svakom uzorku dodati reagense u sledećim količinama prateći redosled:

<i>Dnase I</i>	5 µl
<i>10X Dnase I Reaction Buffer</i>	8 µl
<i>Dnase/Rnase-Free Water</i>	3 µl
<i>RNA Wash Buffer</i> (sa dodatim etanolom)	64 µl
	80 µl po uzorku

Napomena: *Dnase I* i *10X Dnase I Reaction Buffer* se nalaze u frižideru.

- c. Dodati po 80 µl *Dnase I reaction mix*-a direktno u svaku kolonicu. Inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi (20-30 °C).

4. Dodati 400 μ l *RNA Prep Buffer* u kolonicu i centrifugovati 30 sekundi na 13000 rpm. Odbaciti supernatant.
5. Dodati 700 μ l *RNA Wash Buffer* u kolonicu i centrifugovati 30 sekundi na 13000 rpm. Baciti kolekcione tube (u kojima je i supernatant).
6. Dodati 400 μ l *RNA Wash Buffer* u kolonicu i centrifugovati 2 minuta na 13000 rpm. Baciti sabirnu epruveticu (u kojoj je i supernatant).
7. Prebaciti kolonicu u novu, sterilnu, obelezenu 1,5 ml epruveticu (nije priložena). Dodati ≥ 30 μ l *Dnase/Rnase-Free Water* u kolonicu (za određivanje ekspresije gena imunih peptida pčela korišćeno je 30 μ l *Dnase/Rnase-Free Water*). Centrifugovati 30 sekundi na najvećoj brzini.
8. Obeležne epruvetice sa RNK izolatom čuvati na -20°C ili odmah koristiti kao uzorak za RT-PCR.

Protocol for PCR – određivanje porekla uzoraka mesa

Date:

KAPA Taq Polymerase

	Stock concentration	Final concentration	25 µl's reaction	Mastermix x
H ₂ O			14,9	
PCR-buffer	10 x	1 x	2,5	
dNTP	10 mM	200 µM	0,5	
MgCl ₂			1	
Primer 1	10 µM	0,5 µM	1	
Primer 2	10 µM	0,5 µM	1	
Taq-polymerase	5 U/µl	0,02 U / µl = 0,5 U/react.	0,1	
Template DNA			5	

Program: SRNDAC

2 min at 93°C (activation)
at 93°C for 30 sec
40 cycles { at 61°C for 30 sec
at 72°C for 45 sec
at 72°C for 5 min (final elongation)

Samples:

1.	9.	17.	25.
2.	10.	18.	26.
3.	11.	19.	27.
4.	12.	20.	28.
5.	13.	21.	29.
6.	14.	22.	30.
7.	15.	23.	31.
8.	16.	24.	32.

Comments:

**Protocol for Real-time RT-PCR – *Virusi pcela* AgPath-ID Applied(25 µl's)
 ABPV, DWV, CBPV, SBV (0,2 µl PCR tube) Date:**

	Stock concentration	Final concentration	25 µl's reaction	Mastermix x
H ₂ O			6,5 µl	
2X RT-PCR Buffer	2x	1 x	12,5 µl	
Primer 1	20 µM	0,8 µM	1 µl	
Primer 2	20 µM	0,8 µM	1 µl	
Probe	10 µM	0,4 µM	1 µl	
25X RT-PCR Enzyme Mix			1 µl	
Template DNA			2 µl	

50°C for 10 min (reverse transcription)

Program: Virusi

95°C for 10 min (activation)

45 cycles {
 at 95°C for 15 sec
 at 50°C for 45 sec
 at 72°C for 30 sec

Samples:

1.	9.	17.	25.
2.	10.	18.	26.
3.	11.	19.	27.
4.	12.	20.	28.
5.	13.	21.	29.
6.	14.	22.	30.
7.	15.	23.	31.
8.	16.	24.	32.
