

# **PRAKTIKUM č. 22**

## **ANALÝZA LIDSKÉHO GENOTYPU**

**Detekce alel v lidské DNA  
pomocí PCR a restrikční analýzy**

# Zásady práce s malými objemy a enzymy

- Při pipetování malých objemů roztoků a enzymů se ujistíme že:
  - (1) používáme při manipulaci se zásobními roztoky vždy novou, sterilní špičku (zabráníme tak vzájemné kontaminaci zásobních roztoků)
  - (2) máme jednorázovou špičku ponořenou v roztoku, který odebíráme
  - (3) pipetovaný objem je správný (vyžaduje zkušenost)
  - (4) jsme skutečně přenesli požadovaný roztok do další zkumavky a tento neulpěl na stěnách (případně krátce zcentrifugujeme)
  - (5) enzym přidáváme do reakce až po přidání příslušného pufru
  - (6) enzymy uchovávány ve směsi pufru s glycerolem - při pipetování ulpívá velké množství zásobního roztoku na špičce z venku – proto ponořujeme špičku do zásobního roztoku pouze nezbytně hluboko pod hladinu

# Nasazení PCR reakce

- Podle tabulky v protokolu připravíme master mix pro 4 PCR reakce
- K alikvotním podílům (25 $\mu$ l) přidáme 3  $\mu$ l DNA jednotlivých pacientů (vzorky A-D)
- Promícháme, zcentrifugujeme a vložíme do amplifikátoru
- Spustíme program A: 48 MTHFR
- Amplifikace trvá cca 80 minut

# MTHFR

## Methylentetrahydrofolátreduktáza

- podílí se na metabolismu homocysteinu
- **Mutace** v *mthfr* genu vedou v konečném důsledku ke zvýšení rizika žilní trombózy a onemocnění koronárních arterií
- Záměna  $C_{677} \Rightarrow T_{677}$  k tvorbě termolabilního proteinu (MTHFR-T)

# DETEKCE GENOTYPU V GENU PRO MTHFR

- PCR amplifikace části genové sekvence *mthfr* (o délce 198bp)
- PCR produkt podroben štěpení *Hinf* I
- Cílové místo restriktázy *Hinf* I



# PCR PRODUKTY A MÍSTA *Hinf* I

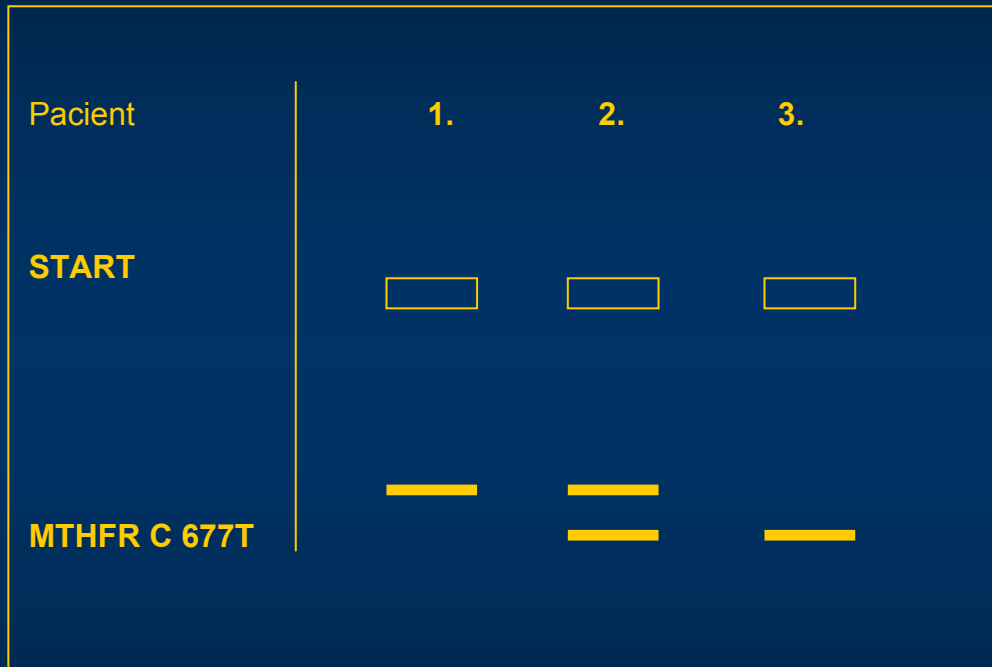
- Standardní protein:

tgaaggagaaggtgtctgcgggagcgattcatcatcacgcagcttttctt  
gaggctgacacattcttccgctttgtgaaggcatgcaccgacatgggcatca  
cttgcccatcgtccccgggatcttcccatccaggtgaggggcccaggaga  
gcccataagctccctccaccccactctcaccgcaccgtcct

- Mutovaná termolabilní forma:

tgaaggagaaggtgtctgcgggagtcgattcatcatcacgcagcttttctt  
tgaggctgacacattcttccgctttgtgaaggcatgcaccgacatgggcatca  
cttgcccatcgtccccgggatcttcccatccaggtgaggggcccaggaga  
gcccataagctccctccaccccactctcaccgcaccgtcct

# Klíč pro hodnocení výsledků



**Pacient 1: MTHFR C677T**

**Pacient 2: MTHFR C677T**

**Pacient 3: MTHFR C677T**

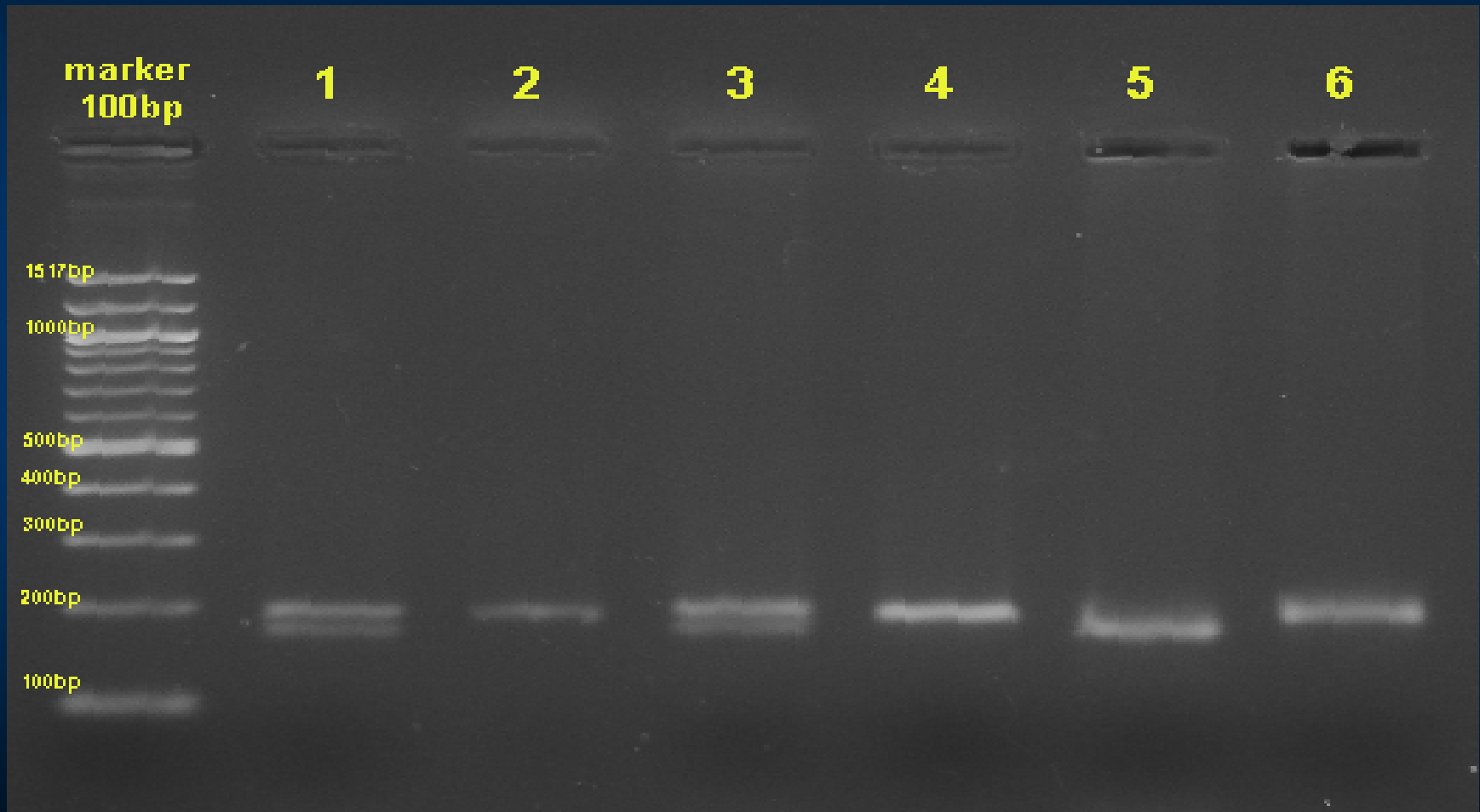
**negativní**

**pozitivní/heterozygot**

**pozitivní/homozygot**

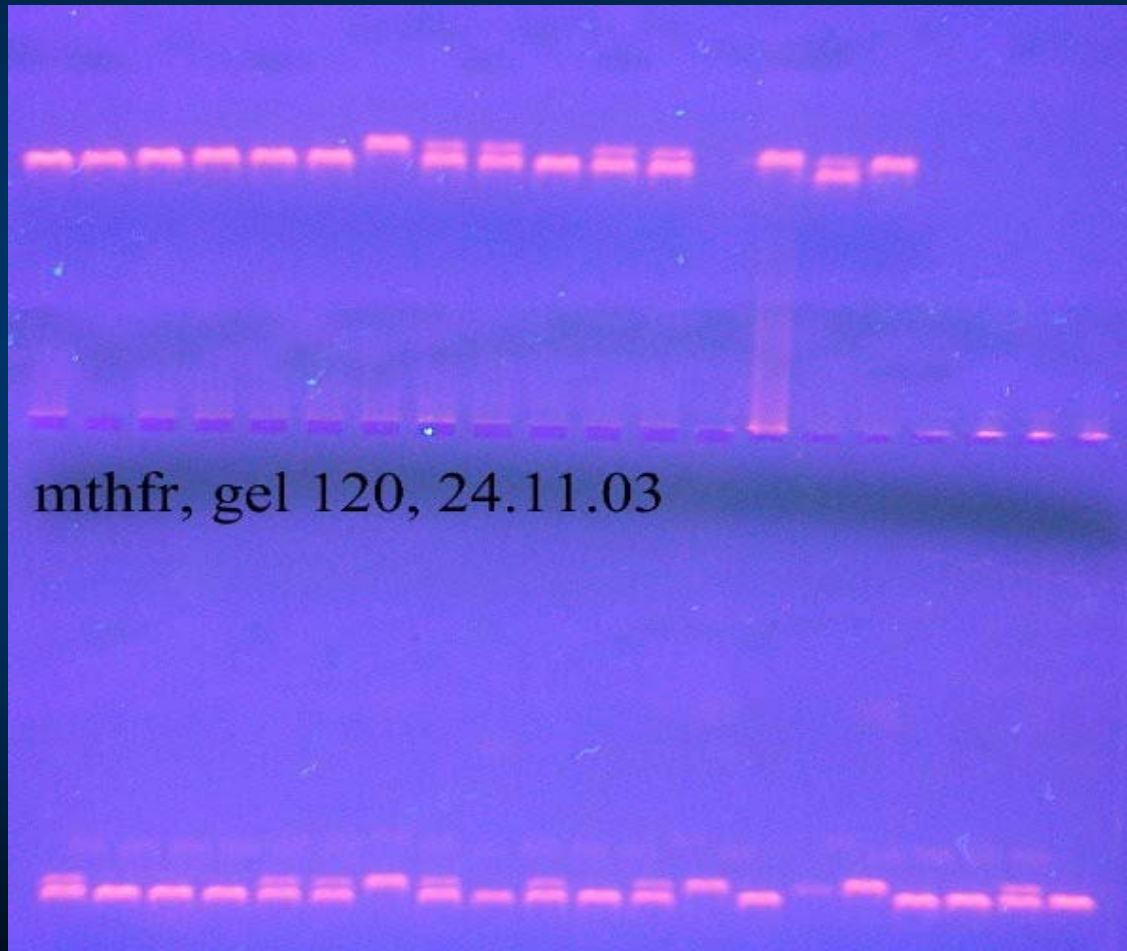
# Výsledky vyšetření 6 pacientů

úkol: podle klíče v protokolu určete jejich genotypy





# VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ V KLINICKÉ PRAXI



# RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ

- Do 4 označených zkumavek přepipetujeme po 5  $\mu$ l příslušného PCR produktu
- Do každé reakce přidáme 1  $\mu$ l NEB pufru č. 2, 3,5  $\mu$ l vody a 0,5  $\mu$ l enzymu *Hinf* I
- Po promíchání a krátké centrifugaci inkubujeme vzorky 3 hodiny při 37 °C
- Poté budou vzorky zamraženy a uchovány do příštího týdne, kdy provedeme ELFO analýzu a vyhodnocení genotypů pacientů v genu *mthfr*