

Předmět: Genetika v zubním lékařství – cvičení (jaro 2011)

Jméno a příjmení:

Studijní skupina:

Datum:

### ***Úvod:***

#### **Interleukin 1 (IL-1)**

IL-1 je protein ze skupiny cytokinů. Je uvolňován monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami. V organismu se vyskytuje ve dvou formách, IL-1alfa a IL-1beta. Hladiny IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (prozánětlivé cytokiny) a poměr IL-1 s antagonistou IL-1 receptoru (IL-1RA, protizánětlivý cytokin) jsou zvýšené u chorob parodontálních tkání.

IL-1 se nachází na chromozomu 2q13-q21. Recesivní alely IL1A -889 a IL1B +3953 zvyšují genovou transkripci a produkci proteinů, čímž roste prozánětlivá odpověď. Zatímco recesivní alely IL1RN VNTR snižují genovou transkripci a produkci proteinů.

Existují již asociační studie u parodontitidy, na trhu jsou komerčně dostupné kity.

### ***Cíl:***

#### **IL-1RA**

1. Izolace DNA z periferní krve
2. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction = PCR)
3. Elektroforéza v agarózovém gelu

### ***Metodika:***

#### **ad1. Izolace DNA z periferní krve**

*Princip:* Fenol-chloroformovou extrakci publikovali v roce 1987 Chomczynski a Sacchi. DNA (deoxyribonukleová kyselina) může být z krve izolována pomocí chloroformové extrakce, kdy dochází k rozdělení buněčných kompartmentů (DNA, RNA a proteinů) mezi 2 fáze na základě jejich hydrofilních, resp. hydrofobních vlastností. Denaturované proteiny tvoří prsteneček mezi oběma fázemi. Vodná fáze je poté odebrána a přidáním isopropanolu dojde ke sražení nukleové kyseliny.

## ad2. PCR IL-1R VNTR

*Princip:* Kary B. Mullis dostal v roce 1983 Nobelovu cenu za objev PCR. PCR je enzymatická reakce probíhající v teplotních cyklech, při které dochází na principu komplementarity bazí k amplifikaci (zmnožení) zvolených úseků DNA. Tyto úseky musí být ohraničeny na začátku a na konci primery (krátkými oligonukleotidy DNA). Výsledkem PCR je  $10^n$  ( $n$  = počet cyklů reakce) množství kopií původní sekvence DNA.

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) označuje variabilní počet tandemových opakování, neboli polymorfní úsek DNA (lokus), který je vytvořen tandemovým uspořádáním mnohočetných kopií krátkých sekvencí DNA. Locus má v populaci několik alel.

*Postup:*

Délka produktu: 86bp

Primery:

P1 IL-1Rf CTC AGC AAC ACT CCT AT ( $T_a = 50,0^\circ\text{C} \dots 56,3^\circ\text{C}$ )

P2 IL-1Rr TCC TGG TCT GCA GGT AA ( $T_a = 51,1^\circ\text{C} \dots 55,8^\circ\text{C}$ )

Reakční směs pro PCR 25,0 $\mu\text{l}$ :



Master Mix (MM)		
roztok	Množství v $\mu\text{l}$ na 1 vzorek	Množství v $\mu\text{l}$ na vzorků
PCR voda	12,5	
Pufř DYNEX	2,5	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,0	
P1	1,25	
P2	1,25	
dNTP	0,5	
Taq polymerasa (1U $\mu\text{l}^{-1}$ )	1,0	
23,0 $\mu\text{l}$ MM + 2,0 $\mu\text{l}$ templátové DNA (50ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) + 1 kapka minerálního oleje na 1 vzorek		

Vzorky:

MIG



Průběh PCR v termocycleru:

1. 95°C        5 minuty
2. 95°C        45 sekund    krok 2.- 4. – cyklus 35x
3. 56°C        45 sekund
4. 72°C        45 sekund
5. 72°C        7 minut
6. 10°C        10 minut

### **ad3. Elektroforéza v agarózovém gelu**

**Princip:**        Působením elektrického napětí dochází k pohybu molekul DNA od katody k anodě. V závislosti na hustotě prostředí jsou molekuly separovány dle velikosti, případně i jiných parametrů (konformace). K vizualizaci se nejčastěji používá interkalační barvivo ethidiumbromid (EtBr), které se vmezeřuje mezi baze v dsDNA, a po ozáření UV světlem fluoreskuje.

*Postup:*

Příprava gelu:

3,0 % gel agarosa Serva a 1x koncentrovaný TBE pufr

Privést k varu v mikrovlnné troubě.

1,0μl EtBr ( $c = 5\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) na 10,0ml gelu

Nanesení vzorků a standardu na gel:

20,0μl PCR produkt

2,0μl Loading buffer

4,0μl velikostní standard Gene Ruler Fermentas 50bp

Průběh elektroforézy:

Při konstantním napětí 90V po dobu 30 minut.

**Výsledky:**

Homozygot/heterozygot	Délky produktů v bp
A. 4 repetice	412
B. 2 repetice	240
C. 3 repetice	326
D. 5 repetice	498
E. 6 repetice	584

Gel a hodnocení:



240bp	B
326bp	C
412bp	A
498bp	D
584bp	E

	genotypy											
st			A/B		A/B	B/B	A/A	A/D	B/B	B/D		A/A



**DOPLŇTE!**

**Závěr:**