



Genetika v ZL
cvičení - 2
jaro 2012

Mgr. Petra Linhartová
peta.linhartova@gmail.com



Obsah cvičení

Teoretická část

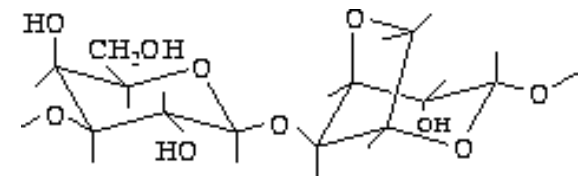
1. cvičení - význam DNA diagnostiky v patogenezi parodontitidy
2. cvičení - molekulárně genetické metody

Praktická část

- Detekce polymorfismu v genu pro interleukin-1
1. cvičení - polymerázová řetězová reakce a restriční štěpení
 2. cvičení - elektroforéza na agarózovém gelu

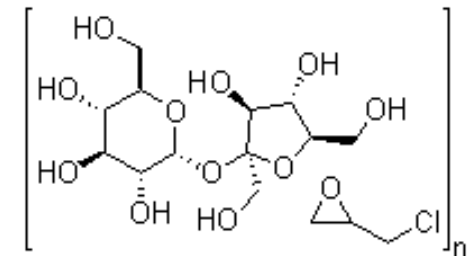
Elektroforéza

- separace NA v elektrickém poli v gelu (molekulární síto) na základě rozdílného náboje (amino či fosfátových skupin) a velikosti
 - gel z agarózy (horizontálně)
 - lineární polymer z řasy *Agar agar*
- elektroforetická pohyblivost vzorků je srovnána se standardy o známé velikosti
- Loading buffer - nanášecí pufr:
 - Ficoll - hustý, drží vzorek na dně
 - bromfenolová modř - vizualizace

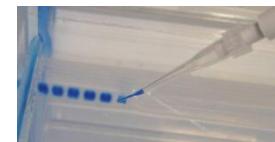


D-galaktosa

3,6-anhydro L-galaktosa



Ficoll



Elektroforéza

- DNA nutno vizualizovat
- fluorescenční barviva x interkalační barvivo (EtBr - UV světlo 590nm, kancerogen, mutagen, teratogen!)

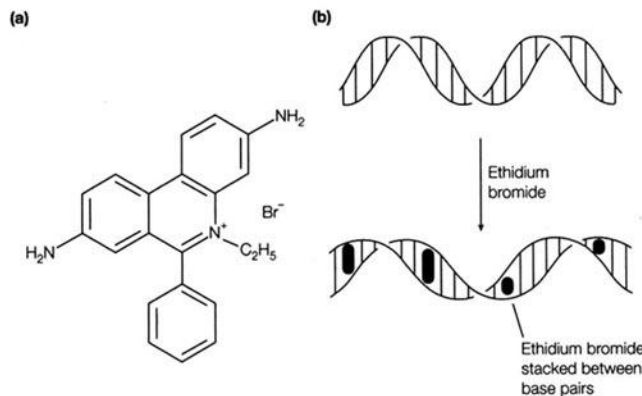
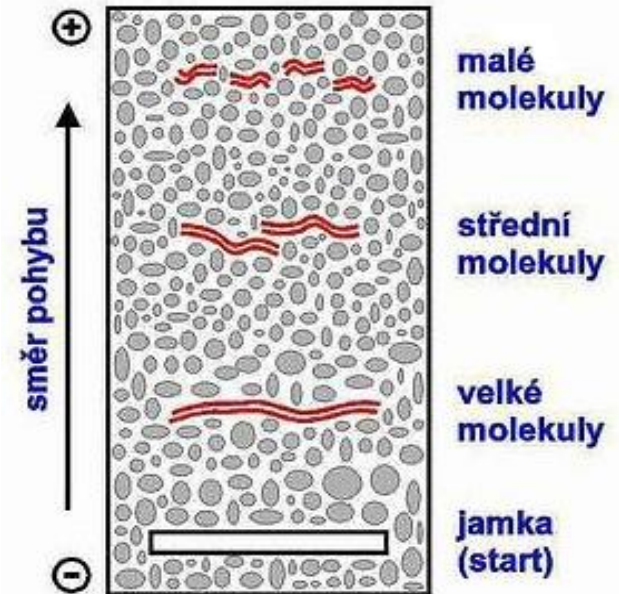
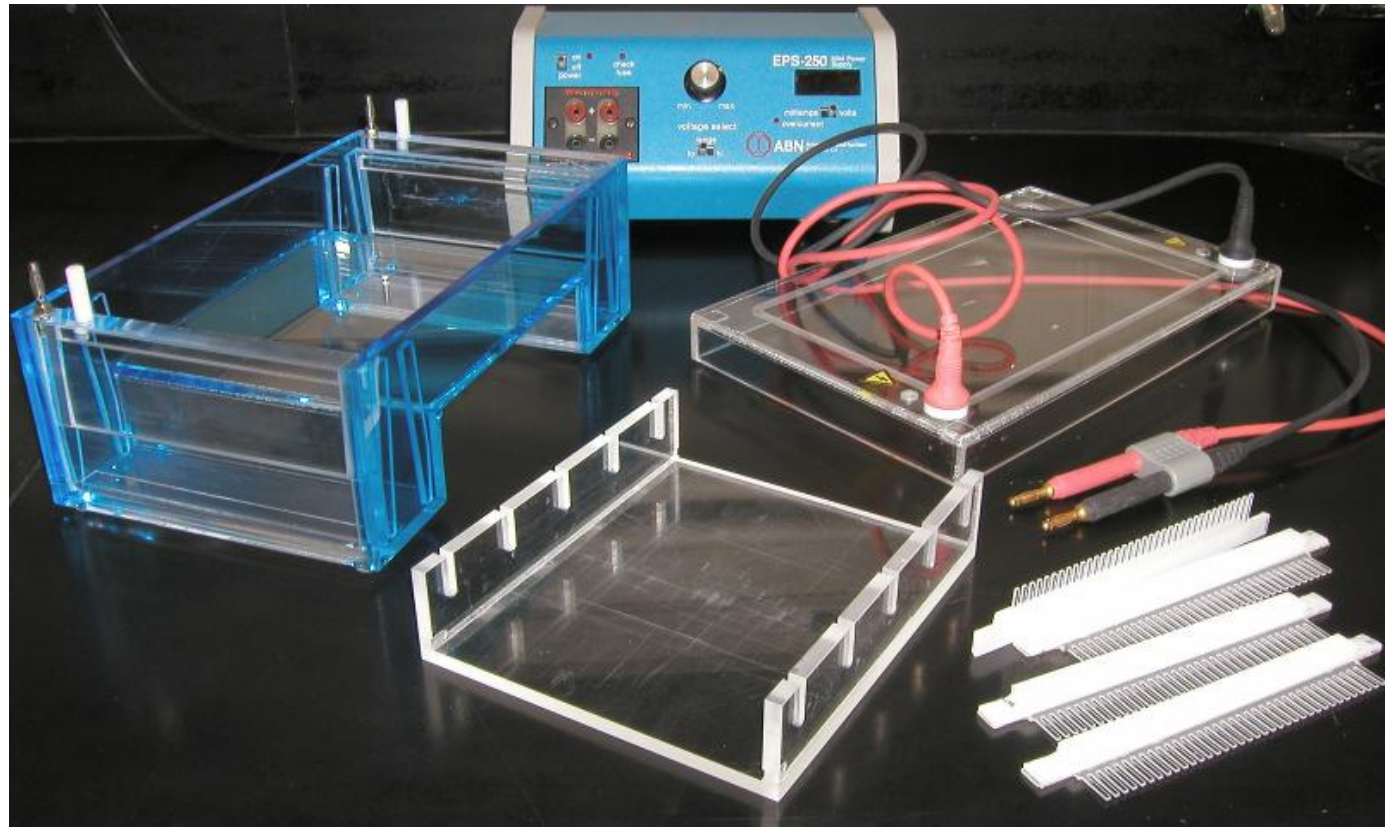


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



Elektroforéza



Elektroforéza

- 1) příprava nalévací misky (olepit páskou nebo umístit do „formičky“, nasadit hřebínek a zkontrolovat jeho vzdálenost ode dna)
- 2) umístění vaničky na vodorovnou podložku
- 3) příprava gelu:
 - navážit agarózu a přenést do Erlenmayerovy baňky (5x větší objem než je objem připravovaného gelu)
 - Přidat TBE pufr 1x koncentrovaný
 - Přivést roztok 3x k varu v mikrovlnné troubě, doplnit dest. vodou
- 4) Přidat EtBr k roztoku, nalít agarózu do vaničky o teplotě cca 40 °C
 - EtBr - teplotně labilní, při přidání do vroucí agarózy dochází k jeho degradaci !! + některé vaničky jsou citlivé na vysoké teploty
- 5) chladnutí gelu
- 6) odstranění hřebínku a pásek kolem, vložení do vany s pufrem



Elektroforéza

- 1) na gel nanést velikostní standard (do 2. jamky od kraje)
- 2) připravit si na parafinový papír kapku (2 μ l) nanášecího puftru
- 3) vzorek smíchat na parafínu s nanášecím pufrem
- 4) vzorek nanést na gel
- 5) zkontrolovat ponoření všech jamek pod pufrem
- 6) zapnout elektrický obvod (nastavit konstantní napětí) - ve vaně se začnou tvořit bublinky
- 7) sledovat postup vzorku na gelu
- 8) odpojit od zdroje
- 9) vyhodnotit pod UV světlem
- 10) vyfotit gel



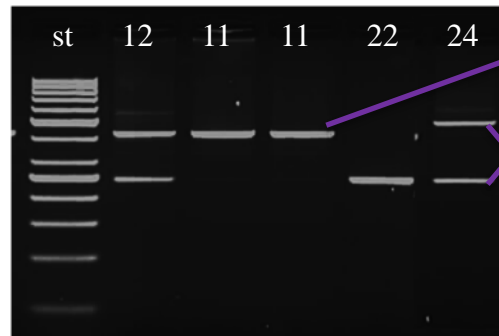
Výsledek genotypizace

PCR VNTR

IL-1RN

intron 2

86bp repetice



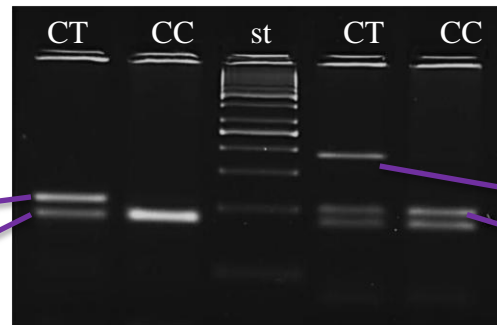
1. 4 repetice - 412bp
2. 2 repetice - 240bp
3. 3 repetice - 326bp
4. 5 repetice - 498bp
5. 6 repetice - 584bp

PCR RFLP

IL-1 α -889C/T

T 99bp

C 16bp + 83bp



IL-1 β +3953C/T

exon 5

T 182bp +12bp

C 97bp + 85bp +12bp

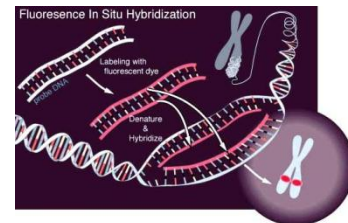


Molekulárně biologické metody

- 1) Hybridizace DNA
- 2) Klonování DNA
- 3) Sekvenování DNA
- 4) Microarray
- 5) ELISA

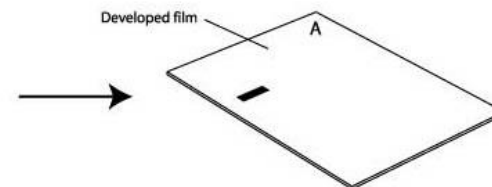
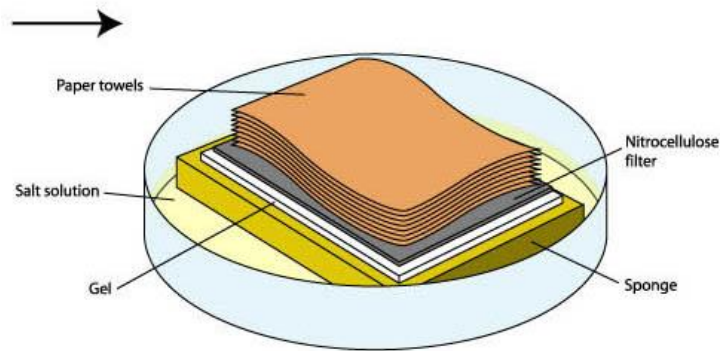
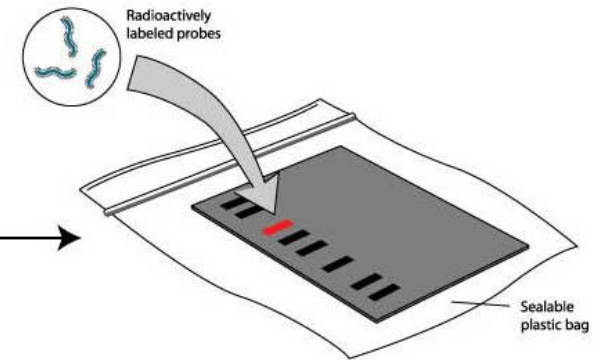
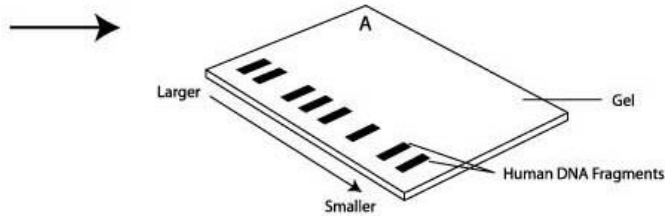
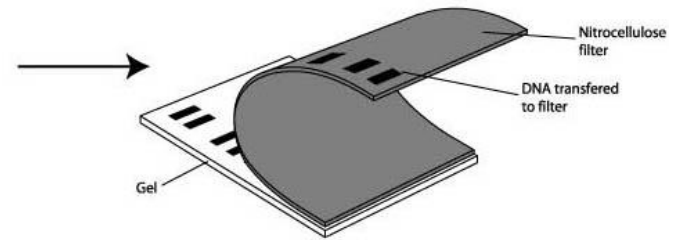
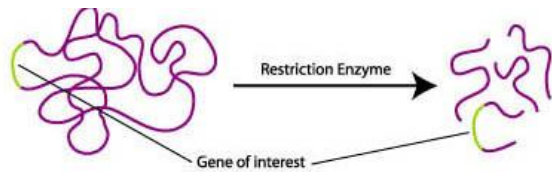
Hybridizace NA

- v roztoku
- na pevných podkladech (nitrocelulóзовý filtr nebo nylonová membrána)
 - přenos po elektroforetické separaci
 - kapilární přenos
 - elektroforetický přenos
 - vakuový přenos
 - typ přenášených molekul
 - DNA - Southernův přenos
 - RNA - Northernový přenos
 - proteiny - Westernový přenos
 - prehybridizace (obsazení volného místa na membráně)
 - hybridizace (ponoření membrány do roztoku s jednořetězcovou sondou)
 - promývání nenavázané sondy
 - detekce sondy
- v preparátech chromozomů, buněk a tkání (*in situ*)
 - fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)



Hybridizace NA

Southernův přenos

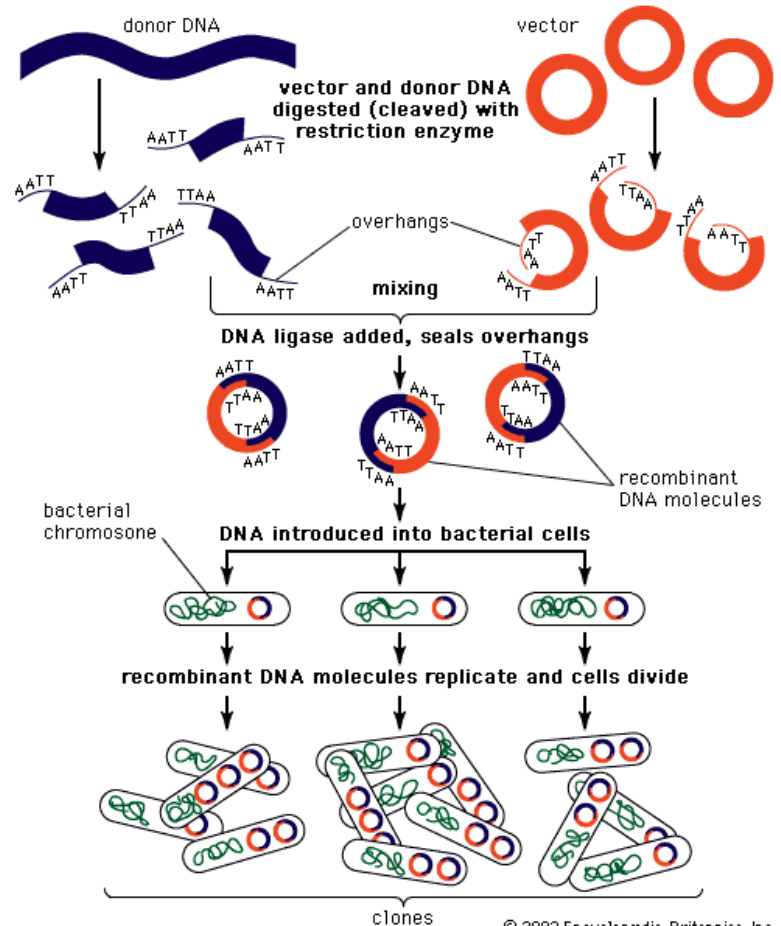


Klonování DNA

- tvorba souboru identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA (klonů DNA) např. množením rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo pomocí PCR (*in vitro*)
- rekombinantní DNA vznikne spojením inzertu (cizorodé DNA) s vektorem

Aplikace

- studium funkce izolovaných genů
- studium regulačních oblastí genů
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizorodých genů a tvorba rekombinantních proteinů



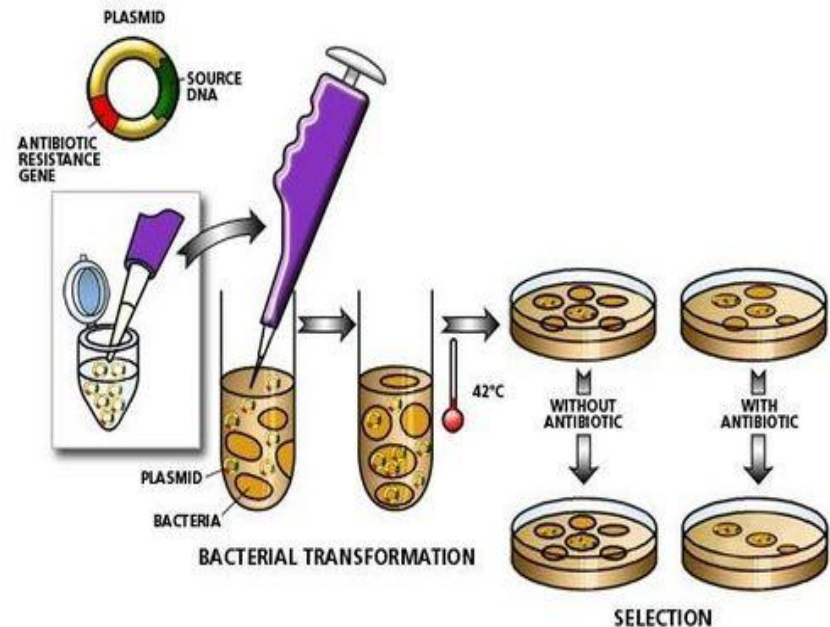
Klonování DNA

Postup

- příprava inzertu - gDNA, cDNA, PCR produkt
- přenos inzertu do vektoru - transformace, elektroporace
- selekce klonů obsahujících inzert - inzerční inaktivace, alfa-komplementace

Klonovací vektory

- plazmidové (2-15kb)
- fágové (37-52kb)
- kosmidy - hybridy mezi plazmidy a fágy (32-47kb)





Sekvenování DNA

Využití

- Diagnostika chorob a časně zjištění náchylnosti jedince k určitým nemocem (rakovina, kardiovaskulární onemocnění), genová terapie
- Celogenomové sekvenování (evoluční biologie)
- Fylogenetika (evoluční vývoj) organizmů
- Antropologie: srovnávání DNA k zjišťování migrací lidských ras (zejména podle mitochondriální DNA a Y-chromozomální DNA)
- Forezní vědy: důkaz viny či nevin v zločinu, určení otcovství a podobně - mikrosatelity (test paternity)
- Zemědělství: geneticky modifikované plodiny

Dvě principiálně odlišné metody

- Chemická (Maxam-Gilbertova)
- Enzymatická (Sangerova)

- ELFO - horizontální, kapilární

Sekvenování DNA

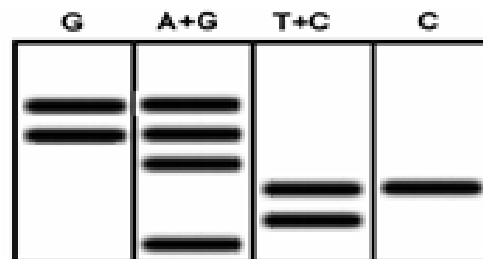
Chemická metoda

- štěpení zkoumané molekuly v místě modifikace

Postup

1. Příprava ssDNA
2. DNA na svém 5' konci radioaktivně označena fosforem ^{32}P
3. Rozdělení vzorku DNA do 4 částí a každá je vystavena chemikáliím,
4. v každé ze 4 nádob docíleno různě dlouhých sekvencí DNA
5. PAGE ELFO fragmentů DNA
6. Autoradiografická (nebo jiná) detekce fragmentů DNA

G - dimetylsulfát (DMS) + piperidin
G + A - kys. mravenčí + piperidin
C + T - hydrazin + piperidin
C - hydrazin + NaCl + piperidin



Sekvenování DNA

Enzymatická metoda

- amplifikace krátkých fragmentů očekávané délky

Postup

- Soubor ssDNA s fluorescenčně definovaným koncem lišících se o jednu bázi
- Rozdělení elektroforézou
- Vyhodnocení

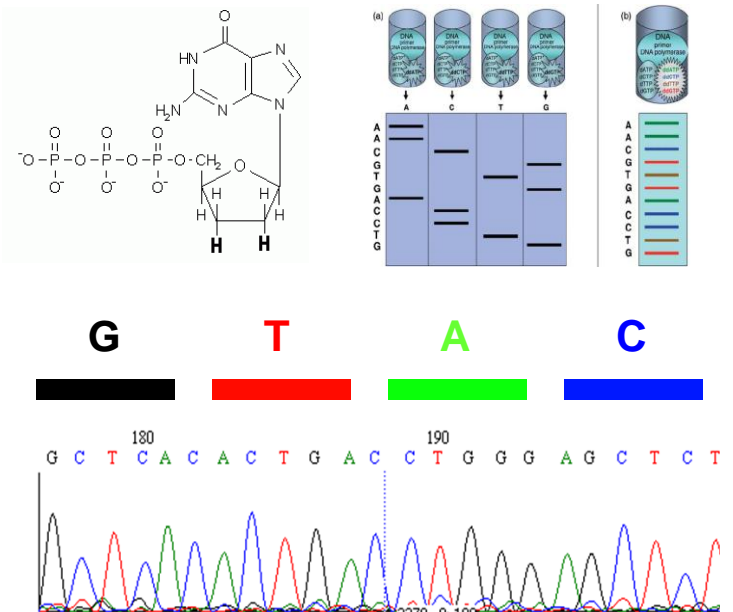
DNA templát

primer

ddNTP-fluorescenčně značen
dNTP (100x více než ddNTP)

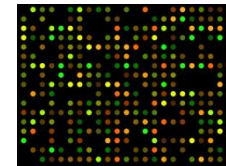
Taq DNA polymeráza

Pufir

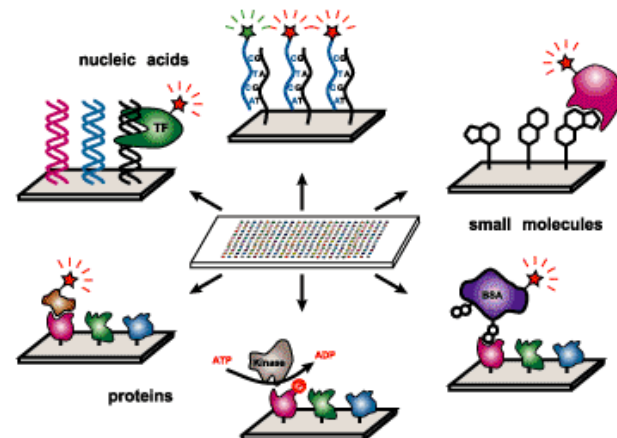


Microarrays

- <http://www.youtube.com/watch?v=ePFE7yg7LvM&feature=related>
- analýza exprese genů
- DNA čip - oligonukleotid ssDNA (sonda) - destička (skleněná, silikonová) - mnoho sond
- vzorek - značená ssDNA
- hybridizace - komplementarita
- omytí čipu
- skenování čipu - excitace laserem, detekce na bázi fluorescence
- zpracování výsledků

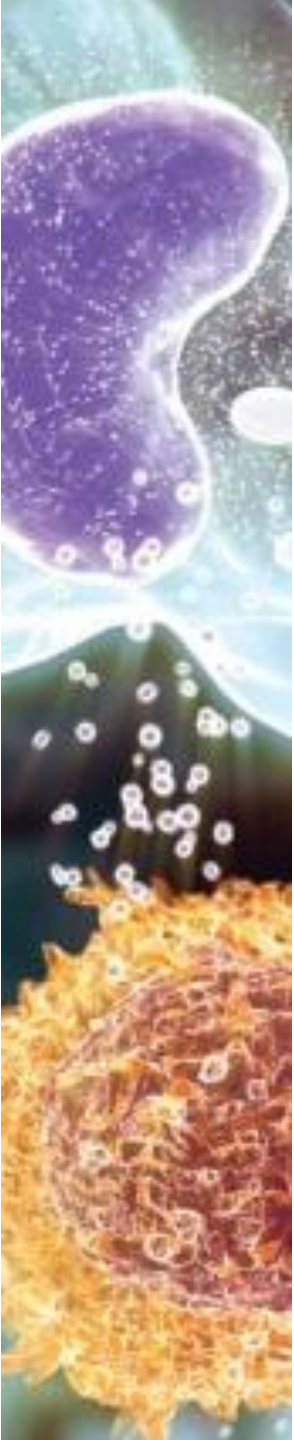


- DNA čipy
- RNA čipy
- Proteinové čipy



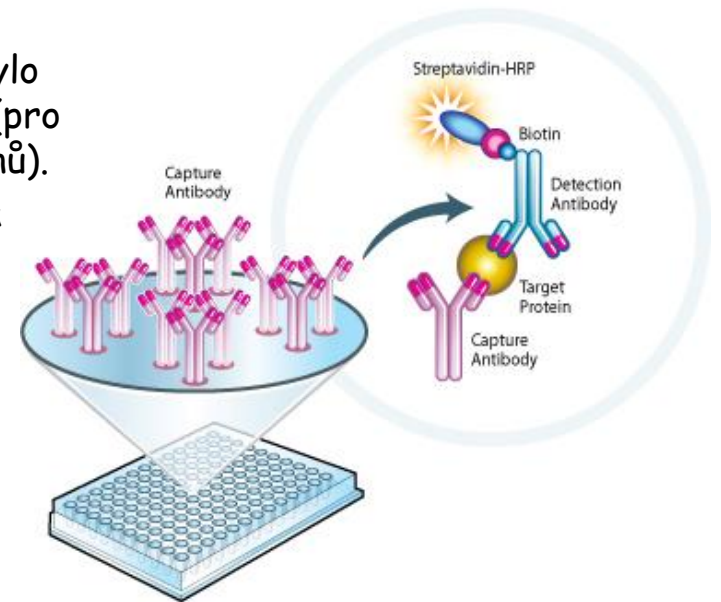
ELISA

- z angl. **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**
- imunologická metoda sloužící k detekci protilátek
- metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen.
- využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů
 1. schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch plastů (např. polystyrenu)
 2. schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty („nožička“ imunoglobulinu je tvořena těžkými řetězci, kt. tvoří krystalizující fragment) imunoglobulinových molekul
- **Antigen** - detekovaný v testovaném vzorku, známý, komerčně připravovaný
- **Protilátka** - detekovaná v testovaném séru, známá, komerčně připravovaná
- **Konjugát** - jedná se opět o protilátku proti protilátce (konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA), na kt. je navázaný enzym
- **Substrát** - je chemická látka, která reaguje s enzymem, a tím změní svou barvu



ELISA

- Přímý průkaz HIV infekce
- Protein p24 je součástí kapsidy virionu HIV. Jeho koncentrace v krvi strmě vzrůstá přibližně 2 týdny po proniknutí viru do organismu.
- ELISA
 1. k pevné fázi (polystyrénová destička) je přichycena protilátka proti p24
 2. přidán vzorek testovaného séra, na nějž bylo předtím působeno detergentním činidlem (pro rozrušení virionů a uvolnění volných antigenů).
 3. v přítomnosti antigenu p24 v séru vazba na protilátku
 4. odmytí zbytku séra
 5. přidána protilátka proti p24 s navázaným biotinem.
 6. přidán streptavidin v komplexu s peroxidázou.
 7. avidin se naváže na biotin, a vázaná peroxidáza poté přemění substrát (např. tetrametylbenzidin) na barevný produkt





ELISA - IL-1beta

- quantitative sandwich immunoassay
- Princip:

The microtiter plate provided in this kit has been pre-coated with a monoclonal antibody specific to IL-1. Standards or samples are then added to the appropriate microtiter plate wells with a biotin-conjugated monoclonal antibody preparation specific for IL-1 and incubated. IL-1 if present, will bind and become immobilized by the antibody pre-coated on the wells and then become "sandwiched" by biotin conjugate. The microtiter plate wells are thoroughly washed to remove unbound IL-1 and other components of the sample. In order to quantitatively determine the amount of IL-1 present in the sample, Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) is added to each microplate well and incubated. Avidin is a tetramer containing four identical subunits, each having a high affinity-binding site for biotin. The wells are thoroughly washed to remove all unbound HRP-conjugated Avidin and a TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) substrate solution is added to each well. The enzyme (HRP) and substrate are allowed to react over a short incubation period. Only those wells that contain IL-1, biotin-conjugated antibody, and enzyme-conjugated Avidin will exhibit a change in colour. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of a sulphuric acid solution and the colour change is measured spectrophotometrically at a wavelength of $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.



CCR-5 - HIV a černý mor

Nature. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.

Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.

Samson M et kol.

Abstract

HIV-1 and related viruses require co-receptors, in addition to CD4, to infect target cells. **The chemokine receptor CCR-5** (ref.1) was recently demonstrated to be **a co-receptor for macrophage-tropic (M-tropic) HIV-1 strains**, and the orphan receptor LESTR (also called fusin) allows infection by strains adapted for growth in transformed T-cell lines (T-tropic strains). Here we show that a **mutant allele of CCR-5 is present at a high frequency in caucasian populations** (allele frequency, 0.092), but is absent in black populations from Western and Central Africa and Japanese populations. **A 32-base-pair deletion within the coding region results in a frame shift, and generates a non-functional receptor that does not support membrane fusion or infection by macrophage- and dual-tropic HIV-1 strains.** In a cohort of HIV-1 infected caucasian subjects, no individual homozygous for the mutation was found, and the frequency of heterozygotes was 35% lower than in the general population. White blood cells from an individual homozygous for the null allele were found to be highly resistant to infection by M-tropic HIV-1 viruses, confirming that CCR-5 is the major co-receptor for primary HIV-1 strains. The lower frequency of heterozygotes in seropositive patients may indicate partial resistance.

Celiakie

- celoživotní autoimunitní onemocnění způsobené nesnášenlivostí lepku (glutenu)
- lepek mění povrch sliznice tenkého střeva, mizí zde mikrokilky a klky, povrch tenkého střeva snižuje, s tím se zmenšuje jeho schopnost trávení a vstřebávání živin
- příznaky: průjem, plynatost, křeče, pokles hmotnosti nebo únava, anémie z nedostatku železa, zvracení, snížená chuť k jídlu, osteoporóza, zvýšená kazivost zubů, bolesti kloubů, deprese
- od dětství, nebo později - po zátěži (nemoc, těhotenství)
- bezlepková dieta





Celiakie

Diagnostika

- stanovení autoprotilátek k tkáňové transglutamináze v krevním séru
- při pozitivním výsledku je indikována biopsie sliznice dvanáctníku u nemocného, který konzumuje stravu s obsahem lepku

Cílený screening

- Pro osoby s rizikovými chorobami
- S podezřelými nebo nespecifickými symptomy
- S autoimunními chorobami asociovanými s celiakií (T1DM...)
- U příbuzných jedinců s celiakií
- http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/f-dg

Celiakie

- AD s neúplnou penetrancí
- Genetické vyšetření predispozičních HLA alel II. třídy kódujících heterodimer DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0201 nebo DQA1*02:01/DQB1*02:02) a heterodimer DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302)
- Heterodimer HLA-DQ2 se vyskytuje asi u 95 % pacientů s celiakií (jen ve 20 % u kontrolních osob).
- Riziko pro jednotlivce spojené s přítomností heterodimeru HLA-DQ2 je 50× zvýšeno oproti průměrnému riziku v populaci.
- Menšina pacientů, kteří jsou HLA-DQ2 negativní, bývají pozitivní na HLA-DQ8, často ještě ve spojení s alelou HLA-DRB1*04.
- Genetické vyšetření má vysokou negativní prediktivní hodnotu, nepřítomnost predispozičních alel DQ2/DQ8 téměř s jistotou (99%) vylučuje diagnózu celiakie.
- Oproti sérologickému vyšetření protilátek vykazuje menší výskyt falešně negativních výsledků, zejména u dětí mladších 2 let a u pacientů na bezlepkové dietě.

GHC GENETICS 1600Kč

