

Úloha č. 2

Detekce polymorfizmu I/D genu pro ACE pomocí PCR

ÚVOD

Angiotensinkonvertáza (ACE) je enzym, jehož hlavní funkcí v organismu je katalýza přeměny angiotensinu I na angiotensin II, který má vazokonstrikční účinky. Navíc má ještě plno dalších funkcí - inaktivuje bradykinin (vazodilatátor), substanci P (uplatňuje se ve vnímání bolesti, snižování krevního tlaku), neurotensin a enkefaliny (obojí neurotransmitery). ACE je součástí renin-angiotensinového systému (RAS), který je aktivován za účelem zvýšení krevního tlaku a mimo jiné jsou složky tohoto systému zodpovědné například za regulaci hospodaření s vodou a minerály. Úloha RAS byla donedávna zmiňována pouze v souvislosti s regulací krevního tlaku. V posledních letech je velmi často diskutována role RAS v mozku, kde byly nalezeny mRNA pro renin, angiotensinogen i angiotensinkonvertázu. Bylo zjištěno, že angiotensin má mnoho behaviorálních efektů, jako je stimulace žízně a modulace chuti na slané, ovlivňování paměti a učení atd. Byla nalezena interakce mezi mozkovým RAS a klasickými neurotransmitterovými systémy, jako jsou systém cholinergní, noradrenergí, dopaminový, GABAergní a opioidní.

Polymorfismus I/D (inzerce/delece) genu pro ACE spočívá v inzerci, resp. deleci úseku DNA o délce 287 bp. Vzhledem k tomu, že se gen v organismu vyskytuje ve dvou formách (alelách), můžeme tak kombinací získat tři genotypy: homozygotní genotyp II (považovaný za běžnou variantu = wild type), heterozygotní genotyp ID a homozygotní genotyp DD (mutovaný). Bylo zjištěno, že polymorfismus I/D ACE ovlivňuje plazmatickou hladinu tohoto enzymu tak, že se jeho hladina snižuje od genotypu DD po genotyp II, přičemž je genotyp DD považovaný za rizikový faktor hypertenze a jejích komplikací a také může mít spojitost s neurodegenerativními chorobami. Do současné doby bylo publikováno několik studií zabývajících se vztahem polymorfizmu I/D ACE k mozkovým funkcím. Arinami et al. (1996) zjistil, že polymorfismus I/D ACE je jedním z genetických faktorů ovlivňujících interindividuální variabilitu hladiny substance P a také, že může mít vztah k dispozicím k afektivním poruchám. Amouyel et al. (1996) sledoval vliv polymorfizmu I/D ACE na kognitivní funkce a zjistil, že u skupiny osob s kognitivní poruchou byla frekvence alely D (genotyp DD) vyšší. Richard et al (2000) potvrdil homozygotní kombinaci alel DD jako rizikový faktor kognitivních poruch. Hollá et al. (1999) studovala polymorfismus I/D ACE a M235T polymorfismus genu pro angiotensinogen u zdravých osob ve vztahu k typu osobnosti zjišťovaného podle rozšířené Bortnerovy stupnice. Zjistila, že genotyp IIMT má vztah k osobnosti typu A a genotyp DDMT má vztah k osobnosti typu B. Zjistila také prevalenci alely D u osobnosti typu B, který může být charakterizován jako introvertní typ osobnosti.

V rámci cvičení bude provedena amplifikace specifických úseků DNA klasickou jedнокrokovou PCR. Následná analýza vybraných polymorfizmů bude provedena pomocí standardní agaróзовé elektroforézy s vizualizací PCR fragmentů v UV světle.

PRACOVNÍ POSTUP

I. PCR reakce

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozukmavky (0,2 µl), termocykler, reagentie pro PCR – KAPA mix, primery, PCR voda, DNA.

Reakční směs pro PCR (25 µl/vzorek):

*KAPA mix.....	12,5 µl
*ID-1 primer.....	0,5 µl
*ID-2 primer.....	0,5 µl
PCR voda.....	10,5 µl
<hr/>	
*DNA.....	1,0 µl

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix – obsahuje HotStart DNA polymerázu, PCR pufr, dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (1,5 mM), stabilizátory.

*ID-1 (5´ - CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT - forward)

*ID-2 (5´ - GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T - reverse)

*DNA – použity izoláty z 1. cvičení

Amplifikace fragmentů:

- Mikrozukmavky vložte do termocykleru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

	94°C	2,5 min
30x	94°C	30 sek (denaturace)
	59°C	30 sek (annealing)
	72°C	30 sek (extenze)
	72°C	5 min (extenze)
	10°C	hold

II. Analýza na agarózovém gelu

Příprava agarózového gelu – agaróza, TBE pufr (Tris-borát-EDTA), ethidium bromid:

1) Výpočet

- vypočet objem vany, určené pro elektroforézu ($V = a.b.c$)
- do výsledného objemu se připraví 1,5% gel

$$\begin{array}{r} \text{př.: } V = 150 \text{ ml;} \\ 150 \text{ ml} \dots\dots\dots 100 \% \\ x \text{ ml (g)} \dots\dots\dots 1,5 \% \\ \hline x = 1,5/100 * 150 = 2,25 \text{ g} \end{array}$$

Pro přípravu 1,5% agarózového gelu je potřeba 150 ml TBE pufru a 2,25 g agarózy.

2) Postup

- a) v mikrovlnné troubě se rozvaří příslušné množství agarózy v odpovídajícím objemu TBE pufru. Je nutno dbát na dokonalé rozpuštění agarózy (úplně čirý roztok),
- b) roztok se ochladí cca na 60 °C (lze udržet v ruce),
- c) mezitím se připraví elektroforetická vanička a hřebínek. Hřebínek se nesmí dotýkat dna vaničky, musí být asi 1 mm nad jejím dnem,
- d) poté se přidá ethidium bromid do výsledné koncentrace 1 µl/30 ml gelu. **Pozor, ethidium bromid je mutagenní látka, pracuje se vždy v rukavicích a v odvětrávané digestoři!**
- e) směs se pozvolna promíchává, aby se nevytvořily vzduchové bubliny, následně se nalévá do předem připravené vaničky s hřebínkem tak, aby se vytvořil gel o výšce 0,5 – 0,8 cm. Případné bublinky se odstraní špičkou. Směs se nechá 15 – 20 minut tuhnout při pokojové teplotě,
- f) ztuhlá agaróza ve vaničce se vloží do elektroforetické vany naplněné TBE puftrem, gel musí být zcela ponořen, opatrně se vyjme hřebínek a zkontroluje se, zda vzniklé komůrky zůstaly nepoškozeny.

Gel je připraven pro nanášení vzorků.

Nanášení vzorků na gel:

- cca 10 µl amplifikované PCR směsi se pipetou smíchá s kapkou nanášecího pufru.
- směs se pomocí pipety nanese do komůrek v gelu, přičemž do první jamky se nanese 1,5 µl DNA standardu o známých velikostech DNA fragmentů. Vzorek ani standard nesmí vytéct mimo komůrku a špička nesmí komůrku propíchnout.

Elektroforéza:

- gel ve vaničce musí být správně orientován, komůrky s DNA musí být umístěny u katody, aby DNA mohla migrovat gelem směrem k anodě.
- elektroforéza se provádí při napětí 80 V po dobu 40 minut. Při správném zapojení se na elektrodách generují bublinky jako produkt elektrolýzy vody.
- elektroforéza se obvykle ukončuje, když barvička (součást nanášecího pufru) doputuje do 2/3 gelu.

Vizualizace DNA fragmentů:

- gel se umístí na UV skleněnou plochu transiluminátoru. Před pozorování DNA fragmentů v UV světle je nutno překrýt gel ochranným štítem (součást transiluminátoru), event. použít ochranné brýle!
- gel je možné zdokumentovat pomocí digitálního fotoaparátu s UV filtrem.

Vyhodnocení výsledků

Dva proužky znamenají heterozygotní genotyp ID. Jeden proužek značí buď homozygotní genotyp II nebo DD (v případě genotypu DD je analyzovaný úsek DNA kratší, a proto při elektroforéze doputuje dál od místa nanesení vzorku).