

Úloha č. 3

Detekce polymorfizmu TaqI A genu pro DRD2

ÚVOD

ADHD (porucha pozornosti/hyperkinetický syndrom) je multifaktoriální onemocnění podmíněné různými kandidátními geny. Hyperkinetický syndrom se vyskytuje asi u 6-10% dětské populace v poměru chlapců a dívek 3 až 10:1 (dle diagnostických kritérií). K základním symptomům patří nadměrná aktivita, nepozornost a impulzivita, výjimkou nejsou ani další přidružené psychické poruchy.

Pro pochopení multifaktoriální etiologie ADHD a komorbidních poruch je potřebné odhalit co největší počet genů, které se podílí na vzniku, vývoji a závažnosti onemocnění a identifikovat funkční polymorfismy asociované s fenotypem. V současné době je známo více než 30 genů různých polygenních systémů podílejících se na vzniku a vývoji onemocnění. Jednotlivé alely těchto genů mohou být v populaci relativně časté, protože nepředstavují klasické mutace, které vyřazují gen z funkce, ale polymorfismy, které jsou příčinou arteficiální aktivity produktu ať už jde o transkripci, translaci či o dysbalanci různých isoform výsledného proteinu. Výzkum se zaměřuje především na geny kodující jednotlivé proteinové složky dopaminergního systému, protože některé struktury, zahrnuté do patogeneze ADHD, jsou bohaté na dopaminovou inervaci. Vyšetřuje se souvislost mezi poruchou pozornosti/hyperaktivním syndromem a polymorfismy v genech pro dopaminové receptory (DRD2, DRD3, DRD4 a DRD5), dopaminový transportér (DAT1), dopamin-b-hydroxylázu (DBH), enzym, zapojený do metabolismu dopaminu, a serotoninový transportér (5-HTT). Sleduje se přítomnost rizikových alel, hodnotí se vliv těchto rizikových alel a kombinaci vlivů alel vzájemně interagujících genů na vývoj a závažnost onemocnění a výskyt dalších komorbidit. Studium jednotlivých transmitterových systémů, které jsou do patogeneze ADHD zapojeny, může v budoucnosti pomoci při volbě vhodného psychofarmaka vzhledem k tomu, že v léčbě hyperkinetické poruchy se uplatňují látky s různým mechanismem účinku.

Byla prokázána souvislost mezi TaqI A1 polymorfismem (resp. alelou A1) a ADHD, kdy homozygoti pro tuto rizikovou alelu vykazovali vyšší frekvenci onemocnění.

Vybraný polymorfismus bude rovněž detekován pomocí agarózové elektroforézy v UV světle. Amplifikace specifických úseků DNA klasickou jednkrokovou PCR bude navíc doplněna o restriční analýzu.

PRACOVNÍ POSTUP

I. PCR reakce

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (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
DO-1 primer.....	0,5 µl
DO-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.

*DNA – použity izoláty z 1. cvičení

Amplifikace fragmentů:

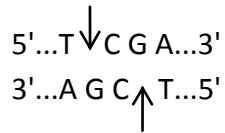
- Mikrozkušavky vložte do termocykléru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

	94°C	2,5 min
32x	94°C	30 sek (denaturace)
	56°C	30 sek (annealing)
	72°C	30 sek (extenze)
	72°C	5 min (extenze)
	10°C	hold

II. Restrikční analýza

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozukmavky (0,2 µl), termocykler, reagentie pro restrikční analýzu – PCR produkt, restrikční enzym FastDigest TaqI, 10 x FastDigest Buffer, PCR voda.

Restrikční místo enzymu:



Reakční směs:

10 x FastDigest Buffer	1,0 µl
Taq I	0,5 µl
PCR voda.....	3,5 µl
<hr/>	
PCR produkt	5,0 µl

Teplotní profil restrikce (cycler Techne): 65°C – 15 min
95°C – 5 min

III. Analýza na agarózovém gelu

- Amplifikáty naneste na připravený 2% agarózový gel v elektroforetické vaně. Vanu připojte ke zdroji elektrického napětí a nechte proběhnout elektroforézu cca 60 minut při 80 V.
- Poté vyjměte gel z elektroforetické vany a vložte jej do transiluminátoru ke konečnému vyhodnocení.

Vyhodnocení výsledků

Polymorfismus TaqIA se může vyskytovat ve dvou variantách – TaqI A1 a TaqI A2. Alela A1 nepodléhá restrikčnímu štěpení, na gelu tedy nalezneme jediný proužek o délce 310 bp. Alela A2 je enzymem štěpena, po elektroforéze vidíme na gelu proužky dva o délce 130 bp a 180 bp.