

Jméno a uço:

Datum:

## ÚLOHA F

### Analýza HLA alel asociovaných s celiakií

### Analýza přítomnosti Leidenské mutace

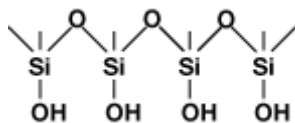
#### TEORETICKÝ ÚVOD

##### *Izolace DNA na kolonkách*

Izolace DNA z jakéhokoliv materiálu je dnes základním postupem v laboratořích zabývajících se molekulárně-biologickými metodami. Izolace DNA je prováděna nejen v klinických laboratořích, ale například také v laboratořích veterinárních, potravinářských (např. testování GMO) a zemědělských. Nejvíce DNA analýz je v současné době prováděno v rámci lékařského výzkumu a v rámci klinické DNA diagnostiky.

Za účelem izolace DNA bylo vypracováno nespočet metod, nicméně v klinických provozech je z důvodu urychlení práce, standardizace práce, standardizace čistoty a výtěžků používáno komerčně dostupných izolačních metod. Mezi nejčastěji používané izolační principy patří izolace na kolonkách nebo pomocí paramagnetických částic.

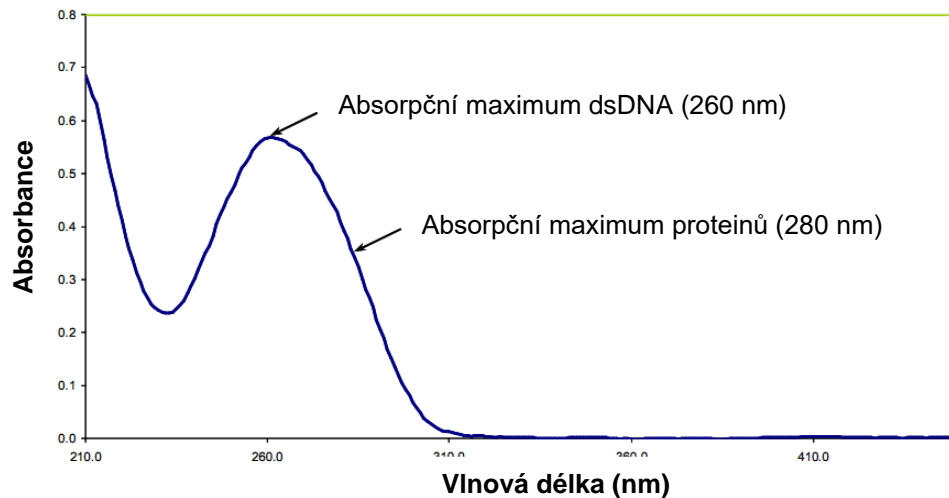
Izolace na kolonkách je založena na principu selektivní vazby DNA a/nebo RNA o určité délce na vrstvu drceného borosilikátového skla, která se nachází mezi dvěma fritami na kolonce. K vazbě dochází v přítomnosti tzv. chaotropní soli, která vytěsňuje z molekul DNA/RNA molekuly vody, čímž potlačuje jiné než iontové interakce a v přítomnosti asi 10% isopropanolu nebo etanolu, který DNA/RNA částečně vysráží. Mezi tzv. chaotropní soli patří například guanidin hydrochlorid, který potlačuje vodíkové vazby a hydrofobní interakce uvnitř molekul DNA/RNA a/nebo proteinů.



V cvičení bude použit kit určený především k izolaci genomové DNA z bukálních stěrů, krve, plazmy a séra. U izolované DNA bude následně stanovena její koncentrace a čistota pomocí UV spektrofotometrie. Měření vychází ze známého faktu, že aromatické struktury bází nukleových kyselin specificky absorbují UV záření určitých vlnových délek s maximem při 260 nm. Zároveň platí, že čím vyšší je absorpce záření, tím vyšší je koncentrace DNA a naopak. Tento vztah je vyjádřen v Lambert-Beerově zákoně pro absorpenci (bezrozměrná veličina):

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon$$

A – absorbance; c – molární koncentrace; l – délka kyvety, resp. tloušťka vrstvy roztoku;  $\epsilon$  – molární absorpční koeficient



Při izolaci DNA se mohou do finálního roztoku rovněž dostat určitá množství dalších molekul obsažených v buňkách (proteiny, polysacharidy, polyfenoly apod.), které mohou inhibovat následné analýzy. Z těchto důvodů je vhodné vedle stanovení koncentrace DNA ve vzorku sledovat i jeho čistotu. Proteiny mají díky aromatickým aminokyselinám (fenylalanin, tyrosin) absorpční maximum při vlnové délce 280 nm. Poměr absorbancí DNA/protein (260/280) pak vyjadřuje míru znečištění proteiny. U čistého vzorku by se tento poměr měl pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0. Ve stejném rozmezí by se měl nacházet i druhý ukazatel znečištění vyjádřený poměrem absorbancí 260/230, který upozorňuje na možnou kontaminaci různými organickými látkami, jako jsou polysacharidy, (poly)fenoly, močovina, thiokyanáty, EDTA apod.

### *Detekce trombofilních faktorů*

Jednou ze základních funkcí krve v organismu je udržování stálého vnitřního prostředí tzv. homeostázy, což je základní podmínka pro jeho správné fungování, resp. existenci. Vzhledem k této nezastupitelné roli krve v těle, musí existovat mechanismus zabraňující jejím nadměrným ztrátám v případě poranění. Schopnost krve srážet se v místě poranění je složitý mnohastupňový proces, který je na každé úrovni přísně regulován. Účinná regulace tohoto procesu je obzvláště důležitá, protože nekontrolované srážení krve by mělo pro organismus fatální následky.

Podnětem ke vzniku krevní sraženiny však nemusí být pouze vnější poranění, může jít i o souhru endogenních pro koagulačních faktorů, jako je zpomalení krevního průtoku cévou, poranění krevní cévy či geneticky podmíněná zvýšená krevní srážlivost.

Vznik trombu (krevní sraženiny) v cévním řečišti je spojen s určitým rizikem jeho odtržení a zanesení do plic, kde může omezit či zcela znemožnit průtok krve plicemi. Tento život ohrožující stav se nazývá plicní embolie. Čím blíže k trupu se trombus vytvoří, tím vyšší je riziko jeho uvolnění.

Genetická dispozice ke zvýšené krevní srážlivosti představuje významný rizikový faktor. Jde o případy, kdy jsou v důsledku mutace v těle produkovány krevní faktory v pozměněné

formě, což způsobuje např. jejich funkční změny či zvýšenou koncentraci. U osob s těmito dispozicemi ovšem ke spontánním trombózám obvykle nedochází, teprve až v součinnosti s dalšími rizikovými faktory se může, ale také nemusí, krevní sraženina vytvořit.

V rámci cvičení bude provedena analýza jedno nukleotidového bodového polymorfismu (SNP) 1691 G/A genu pro faktor V. Faktor V je plazmatický glykoprotein s klíčovou rolí v koagulaci. V koagulační kaskádě působí buď pro koagulačně (pokud byl natráven trombinem či aktivovaným faktorem X) nebo antikoagulačně (pokud byl natráven aktivovaným proteinem C). Tzv. Leidenská mutace způsobuje rezistenci faktoru V k aktivovanému proteinu C, což vede k nedostatečné degradaci mutované varianty proteinem C. Tato mutace je nejznámější a nejrozšířenější, vyskytuje se cca u 5 % osob v populaci. Nositelům Leidenské mutace hrozí až 7x vyšší riziko žilní trombózy.

Ke genotypizaci vzorku bude využita restriční analýza s následnou detekcí vzniklých fragmentů pomocí 2% agaróзовého gelu. Princip metody spočívá ve štěpení produktů amplifikace části genu pro faktor V pomocí restriční endonukleázy *TaqI*, kdy buď dochází ke štěpení PCR produktu (wt alela) nebo nedochází ke štěpení PCR produktu (mutantní alela).

### *Diagnostika celiakie*

Diagnostika bude prováděna soupravou EliGene® Coeliac RT sloužící ke genotypizaci HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02), HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) a HLA-DR4 (DRB1\*04) genů z izolované DNA. Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci alel DQ2, DQ8 a DR4 a interní kontroly jsou použity primery a značené sondy (FAM a JOE).

Celiakie patří mezi jedno z nejčastějších entero-patogenních onemocnění a je charakterizovaná celoživotní přecitlivělostí k lepku, proteinu obsaženém v pšenici, žitě, ovsu a ječmeni. Celiakie nepatří mezi alergická onemocnění, ale je charakterizovaná intolerancí ke gliadinu tvořícím část lepku. Imunologická nesnášenlivost k lepku vede v raném dětství ke chronické zánětlivé odpovědi u sliznice tenkého střeva s následnou špatnou absorpcí vyznačující se chronickým průjmem, tukovitou stolicí a špatným růstem. Celá řada dospělých pacientů poté může pociťovat jiné atypické příznaky jako nadýmání, hubnutí, únavu, problémy s pokožkou a klouby nebo migrény. Naopak celá řada lidí nemusí pociťovat vůbec žádné příznaky. Neléčená celiakie poté zvyšuje riziko NHL (non-Hodgkinovského lymfomu) a zřejmě i riziko rakoviny tenkého střeva.

Do dnešní doby byla celiakie vnímána jako relativně vzácné onemocnění s mírou prevalence 1:1000 až 1:4000. Avšak nově dostupnost sérologických testů vedla k pozorování, že celiakie je daleko častější onemocnění, než bylo dříve předpokládáno, postihující v Evropě zhruba 1 ze 100-400 osob. Většina diagnostikovaných pacientů vykazovala minimální klinické příznaky. Poslední výsledky navíc ukazují na silnou genetickou vazbu ve spojení s rozvojem celiakie.

Celiakie je multi-faktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) nebo DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302) nebo HLA-DRB1\*04. HLA DQ2 alela je exprimována u většiny osob trpících celiakií (>90%), DQ8 alela poté asi u 8%. Expresie zmíněných alel je nezbytná ne však dostatečná k propuknutí celiakie, v současné době se předpokládá pouze asi 50% vliv genetické složky na vznik celiakie. U osob trpících celiakií je výskyt HLA-DQ2 alely asi 95%, zatímco u běžné populace je výskyt této alely pouze 20%. Z malé skupiny osob trpících celiakií a negativních pro HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) alelu, je drtivá většina pozitivní na HLA-DRB1\*04 alelu. Z tohoto pohledu je absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie.

Souprava EliGene® Coeliac RT detekuje geny pro alely DQA1\*05, DQB1\*02 (HLA DQ2), DQB1\*0302 a DRB1\*04. Jako vnitřní kontrola je použit gen SYPL2 (synaptophysin-like 2).

- Pro detekci DQA1\*05, DRB1\*04 a DQB1\*0302 alel je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci DQA1\*03, DQB1\*02 a SYPL2 (interní kontrola) alel je použita sonda značená JOE barvou (exc. 520 nm – emise 548 nm)

### **POSTUP PRÁCE**

#### ***Izolace DNA z bukálního stěru***

Materiál: Izolační kit EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit, pipety, centrifuga, mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a 2 ml, popisovače.

1. Ve dvojici smíchejte Wash Buffer 2 s etanolem. Ke 40 ml Wash Buffer 2 se dle návodu přidává 13 ml etanolu. Zjistěte od asistentů objem Wash Buffer 2 ve zkumavce a vypočítejte množství etanolu, které přidáte k Wash Buffer 2. Takto připravený roztok použijete v bodě 7.
2. Mikrozkušavku se swab puřem a řtěičkou centrifugujte 2 min při 20 000 x g.
3. Odeberte 200 µl vzorku a přeneste do nové 1,5 ml mikrozkušavky.
4. Přidejte 200 µl lyzačního roztoku (lyzační roztok byl dopředu připaven asistentem smícháním Lysis Buffer Stock Solution a Solution M) do 1,5 ml zkumavky se vzorkem.  
*Pozn.: Lyzační roztok slouží ke kompletní lýze virů i buněk a obsahuje detergenty a jiné speciální reagenty usnadňující lýzu a navázání NK na silika membránu kolonky*
5. Krátce stočte pro odstranění tekutiny z víčka a přepipetujte obsah do kolonky ve sběrné
6. zkumavce a vložte do centrifugy. Centrifugujte při 12,000 x g po dobu 1 minuty. Filtrát vylejte, sběrnou zkumavku nevyhazujte a použijte ji znovu.  
*Pozn.: NK se naváže na silika membránu na spin kolonky za pomoci chaotropního činidla. Filtrát obsahuje nenávané zbytků buněčných struktur např. denaturované proteiny.*
7. Přidejte 500 µl Wash Buffer 1 do kolonky a centrifugujte při 12,000 x g po 1 minutu. Filtrát vylejte a sběrnou zkumavku nevyhazujte a použijte ji znovu. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.  
*Pozn.: Wash Buffer 1 je promývací roztok sloužící k odstranění zbytkových nečistot z NK navávaných na kolonky.*
8. Přidejte 500 µl Wash Buffer 2 s etanolem do kolonky. Ujistěte se, že jste přidali do Wash Buffer 2 předepsané množství etanolu! Centrifugujte při 12,000 x g po 1 minutu. Filtrát vylejte a sběrnou zkumavku vyhodte také.  
*Pozn.: Wash Buffer 2 je promývací roztok na bázi etanolu k odstranění zbytkových nečistot z NK navávaných na kolonky.*
9. Vložte kolonku do nové sběrné zkumavky a centrifugujte opět při 12,000 x g po 1 minutu pro úplné vysušení membrány od etanolu.  
*Pozn.: Pouze kompletně vysušená kolonka od zbytků etanolu umožní maximální uvolnění NK z membrány v posledním kroku. Vyjměte kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.*
10. Opatrně vložte kolonku do nové sběrné zkumavky.
11. Přidejte 50 µl Elution Buffer. Nechte stát 1 minutu při pokojové teplotě.

## Úloha F - Analýza Leidenské mutace a celiakie

*Pozn.: Eluční pufr uvolní NK z kolonky, a ta se vypláchne do sběrné zkumavky. Nukleové kyseliny jsou uvolněny z membrány a neobsahují soli ani etanol.*

12. Centrifugujte při 12,000 x g po 1 minutu.

13. Odstraňte kolonku. Přepipetujte roztok nukleových kyselin do zkumavky s víčkem. Zkumavku si řádně popište! Nukleové kyseliny jsou nyní připraveny pro použití v dalších úlohách.

### Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Materiál: pipeta, izolovaná DNA, UV spektrofotometr (IMPLEN)

- 1) Naneste 2.5 µl PCR vody na sklíčko měrné kyvety a přiložte krycí víčko s Lid faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko BLANK.
- 2) Sejměte víčko, otřete měrné plochy kyvety a víčka.
- 3) Naneste 2.5 µl vzorku na sklíčko měrné kyvety a přiložte krycí víčko s Lid faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko SAMPLE.
- 4) Na displeji odečtěte a запиšte si hodnotu koncentrace DNA a příslušné poměry absorbančí.

### Analýza Leidenské mutace pomocí PCR

#### PCR

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozukavky (0,2 ml), termocykler, reagentie pro PCR – 2x RedTaq mix, primery, PCR voda, DNA.

Reakční směs pro PCR (15 µl/1 vzorek):

2x RedTaq mix	7,5 µl
Primer FV1 (2.5 uM)	1,8 µl
Primer FV2 (2.5 uM)	1,8 µl
PCR voda	2,4 µl
DNA	1,5 µl

Mikrozukavku vložte do termocykleru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

95 °C – 2,5 min	1x
95 °C – 10 sec (denaturace)	
55 °C – 20 sec (annealing)	35x
72 °C – 20 sec (extenze)	
72 °C – 5 min (extenze)	1x
10 °C – hold	

#### Restrikční analýza

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

## Úloha F - Analýza Leidenské mutace a celiakie

Reakční směs:

10x FastDigest Buffer Green. 2,0 µl  
TaqI ..... 1.0 µl  
PCR voda..... 7.0 µl  
PCR produkt ..... 10,0 µl

Teplotní profil restrikce (termocykler):

65 °C–20 min

95 °C–5 min

*Separace fragmentů po restrikční analýze*

1. Naneste 10 µl restrikční směsi na připravený 2 % agarózový gel
2. Spusťte elektroforézu za konstantního napětí 135 V
3. Po 30 minutách vypněte elektroforézu, gel umístěte na transiluminátor a podívejte se na separované fragmenty

### **RealTime PCR diagnostika celiakie**

*Příprava reakčního Mixu (MasterMixu):*

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s CELI-DQ2 Mixem, jednu zkumavku s CELI-DQ8 Mixem a jednu zkumavku s CELI-DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do tří sad amplifikačních zkumavek po 17,5 µl každého mixu a přidejte 2,5 µl izolované DNA. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozukavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je souprava stabilní nejméně 14 dní.
2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s CELI-DQ2 Mixem, jednu zkumavku s CELI-DQ8 Mixem a jednu zkumavku s CELI-DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do tří sad amplifikačních zkumavek po 17,5 µl každého Mixu a přidejte 2,5 µl pozitivní kontroly DNA (PC CELI).

*Nastavení přístroje LightCycler® 480II (Roche):*

Pro reakci používejte pouze průhledné stripy.

V menu "Run Settings" vyberte možnosti "Hydrolysis Probes" a "High Quality".

V "Profile menu" nastavte následující teplotní profil:

*Step 1 - Hold*

95 °C            3 min            Ramp rate (2.5°C/s)

*Step 2–3-Step Amplification, 40 cycles*

95 °C            15 s            Ramp rate (2.5°C/s)

58 °C            40 s            Ramp rate (2.5°C/s)    "Acquire" signal

*Step 3 - Hold*

40 °C            1 min            Ramp rate (2.5°C/s)

V menu "Samples" klikněte na okno "Targets" (okno nahoře vpravo) na ikonu "+" a vyberte FAM barvu jako "Target 1". Znovu klikněte na ikonu "+" a vyberte HEX barvu jako "Target 2". V okně "Samples" (okno nahoře vlevo) klikněte na ikonu "+" a přidejte vaše vzorky. Pak přiřadte vzorkům pozice a označte FAM a HEX jako Unknown sample (Samples).

### *Odečet výsledků:*

V nabídce "Analysis" klikněte v okně "Select Analysis" na ikonu "+" a vyberte "Automatic Quantification".

**Pozitivní výsledek:** Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (510-528) a JOE (530-548) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

### *Interpretace výsledků:*

#### *HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) pozitivní*

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1\*05) a JOE (DQB1\*02).

#### *HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) negativní*

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1\*05) a JOE (DQB1\*02). Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ2 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQA1\*05 a DQB1\*02. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ2 pozitivní)

#### *HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) pozitivní*

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELIDQ8 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1\*0302) a JOE (DQA1\*03) a zároveň rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQB1\*0302) a kanálu JOE (DQA1\*03) není vyšší než 4.

#### *HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) negativní*

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELIDQ8 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1\*0302) a JOE (DQA1\*03) nebo rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQB1\*0302) a kanálu JOE (DQA1\*03) je vyšší než 3. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ8 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQA1\*03 a DQB1\*0302. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ8 pozitivní)

#### *HLA-DR4 pozitivní*

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DR4 Mixu v kanálu FAM (DRB1\*04) je vzorek HLA-DR4 pozitivní.

Důležitá poznámka: Vzhledem k tomu, že se DR4 alela vyskytuje v haplotypu s DQ8 alelou, je při detekované pozitivitě DQ8 alely detekována i pozitivita v DR4 alele.

#### *HLA-DR4 negativní*

## Úloha F - Analýza Leidenské mutace a celiakie

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DR4 Mixu v kanálu FAM (DRB1\*04) je vzorek HLA-DRB1\*04 negativní. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

### **VYHODNOCENÍ**

- Zhodnoťte koncentraci a čistotu DNA izolované z bukalního stěru.
- Uveďte sekvenci štěpení pro restrikční endonukleázu *TaqI* a interpretujte naměřený výsledek.
- Interpretujte zjištěné riziko celiakie u analyzovaného vzorku na základě real-time PCR analýzy.