

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka



2022/23

Obsah

POLYMORFISMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ 3

1. PROVEDENÍ RESTRIKCE 3
2. VYHODNOCENÍ RESTRIKCE POMOCÍ ELEKTROFORÉZY 3

ELEKTROFORÉZA DNA VE 2% AGARÓZOVÉM GELU 6

1. PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU 6
2. NALÉVÁNÍ AGARÓZOVÉHO GELU 6
3. PŘÍPRAVA GELU K ELEKTROFORÉZE A NANÁŠENÍ VZORKŮ 7
4. ELEKTROFORÉZA A VYHODNOCENÍ 8

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

1. Provedení restrikce

Chemikálie a pomůcky

PCR produkt pro vzorek DNA z předchozího praktického cvičení

KpnI (endonukleáza KpnI 0,3 U·μl⁻¹, Tris-HCl 10 mmol·l⁻¹ pH 7,5, MgCl₂ 10 mol·l⁻¹, Triton X-100 0,02 %, albumin 0,3 mg·ml⁻¹)

Tail (endonukleáza Tail 0,3 U·μl⁻¹, Tris-HCl 10 mmol·l⁻¹ pH 8,5, MgCl₂ 10 mmol·l⁻¹, KCl 0,1 mol·l⁻¹, albumin 0,3 mg·ml⁻¹)

Kontrola štěpení – fragment λ-DNA

Vzorkovací roztok 6× (např. bromfenolová modř 0,1 %, glycerol 30 %, EDTA 100 mmol·l⁻¹)

Postup

Ze zkumavky s 25 μl PCR produktu odeberte do dvou čistých 200μl zkumavek po 8 μl PCR produktu. Dále tedy pracujete se třemi zkumavkami: 8 μl PCR produktu se použije pro restrikci s endonukleázou KpnI (zkumavku označíme „K“), 8 μl pro endonukleázu Tail (označíme „T“) a zbývajících 9 μl zůstane jako neštěpená kontrola (označíme „–“).

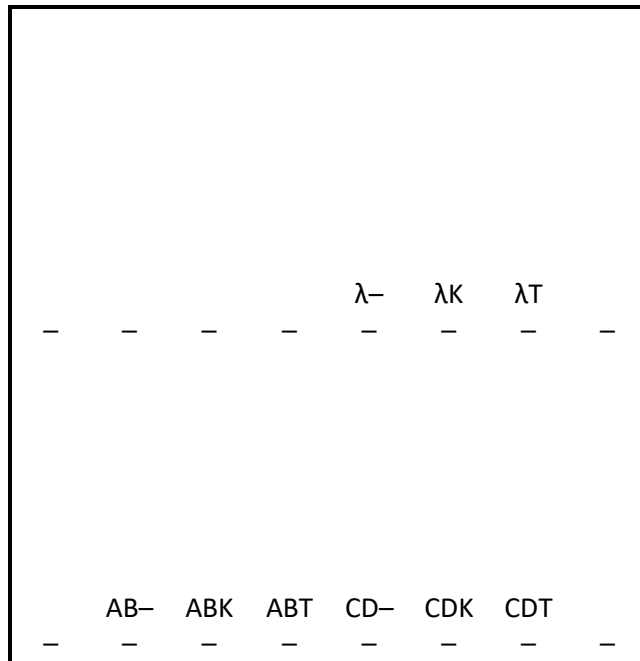
Abychom ověřili, že ke štěpení skutečně dochází, provedeme kontrolu s úsekem λ-fágové DNA, který je přibližně stejně dlouhý jako zkoumaný PCR produkt a obsahuje rozpoznávací sekvence pro obě endonukleázy KpnI i Tail. Kontrolu provedeme jen jednou pro dvě až tři pracovní skupiny.

Označení zkumavky	Štěpení PCR produktu			Pozitivní kontrola s úsekem λ-fágové DNA (pro dvě až tři skupiny společně)		
	K	T	–	λK	λT	λ–
	štěpení KpnI	štěpení Tail	neštěpený produkt	kontrolní štěpení KpnI	kontrolní štěpení Tail	neštěpená λ-DNA
PCR produkt	8 μl	8 μl	zbytek (9 μl)	8 μl	8 μl	8 μl
KpnI	8 μl			8 μl		
Tail		8 μl			8 μl	
	Zkumavky zcentrifugovat (5 s)					
Inkubace 30 minut	37 °C blok	65 °C cykler	4 °C blok	37 °C blok	65 °C cykler	4 °C Blok
Vzorkovací roztok	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl
	Zkumavky zcentrifugovat (5 s)					

2. Vyhodnocení restrikce pomocí elektroforézy

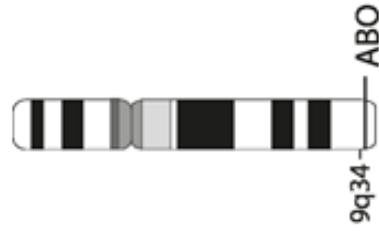
Rozdělte štěpy elektroforézou na 2% agaróze (viz samostatný návod níže). Jeden elektroforetický gel použijí zpravidla dvě pracovní skupiny. Všechny tři zkumavky (tj. „K“, „T“ a „–“), které náleží

k jednomu PCR produktu, dávejte do sousedních jamek, aby bylo možné snadno porovnat polohu proužků; totéž platí i pro všechny tři zkumavky s λ -DNA. **Příklad rozložení vzorků v elektroforetickém gelu** je na následujícím obrázku. V tomto případě byl jeden elektroforetický gel použit pro vyhodnocení štěpení dvou PCR produktů (jeden je označený „AB“ a druhý „CD“) a dále do něj byla nanášena kontrola štěpení na λ -DNA. Některé jamky zůstaly nepoužité.

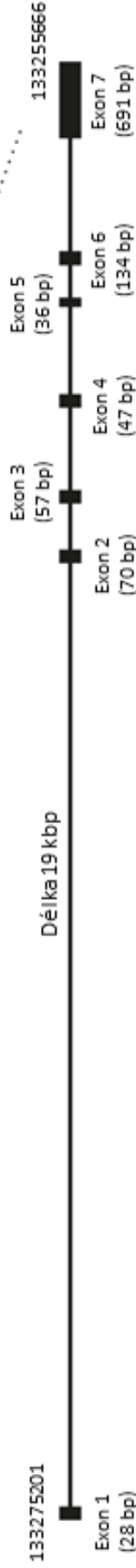


Neštěpený PCR produkt má v našem případě délku 291 bp. KpnI štěpí sekvenci GGTAC^C, která odpovídá alelám O_A a O_G. Tail štěpí sekvenci ACGT[^], která je obsažena v alelách B a O_G. Pokud jsou v PCR produktu příslušné rozpoznávací sekvence, štěpí je obě endonukleázy přibližně na poloviny. Délky vzniklých fragmentů si jsou v obou případech natolik podobné, že je při elektroforéze nemusí být možné od sebe rozlišit a vytvoří jeden proužek. Na druhou stranu se ale délka fragmentů výrazně liší od délky neštěpeného PCR produktu, takže lze rozlišit, zda ke štěpení došlo či nikoliv.

Vytvoří-li DNA po ošetření endonukleázou na elektroforeogramu proužek ve stejné poloze jako neštěpený PCR produkt, znamená to, že DNA neobsahuje rozpoznávací sekvenci pro danou endonukleázu; takový výsledek označíme jako KpnI -/-, případně Tail -/-. Pokud se proužek štěpené DNA posune dále od startu, byl PCR produkt endonukleázou zcela rozštěpen; výsledek označíme jako KpnI +/+ nebo Tail +/+. V případě, že PCR produkt obsahuje DNA jak s rozpoznávací sekvencí tak i bez ní (tj. jde o heterozygocii), zobrazí se proužky dva: jeden v místě neštěpeného PCR produktu a druhý dále od startu. Takový výsledek označíme jako KpnI +/- nebo Tail +/-.



ABO

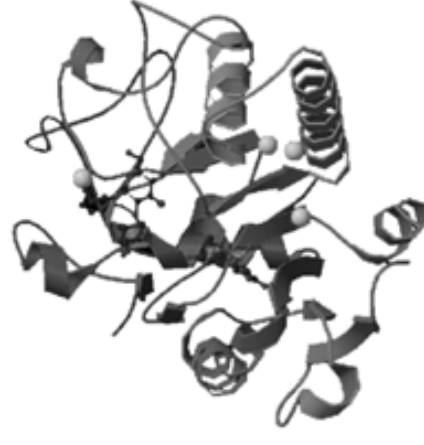


Exon 6



175 139
 (133257521) (133257486)
 A: ...GGTGACC.....ACAT...
 B: ...GGTGACC.....ACGT...
 O_A: ...GGT-ACC.....ACAT...
 O_B: ...GGT-ACC.....ACGT...

restrikční místo pro KpnI restrikční místo pro Tail



Transferáza A

Z výsledku obou štěpení dostaneme genotyp AB0:

	Kpnl +/+	Kpnl +/-	Kpnl -/-
Tail +/+	$O_G O_G$	$B O_G$	$B B$
Tail +/-	$O_A O_G$	$A O_G$ nebo $B O_A$	$A B$
Tail -/-	$O_A O_A$	$A O_A$	$A A$

V případě kombinace Kpnl +/-, Tail +/- nelze o genotypu rozhodnout pouze na základě takto jednoduše provedené restrikční analýzy (může jít o genotyp $A O_G$, který odpovídá fenotypu krevní skupiny A, nebo o genotyp $B O_A$ odpovídající krevní skupině B). Mezi oběma možnostmi lze rozhodnout na základě znalosti fenotypu, nebo by bylo třeba použít další metody vyšetření (např. dvojitého štěpení oběma enzymy současně).

Elektroforéza DNA ve 2% agarózovém gelu

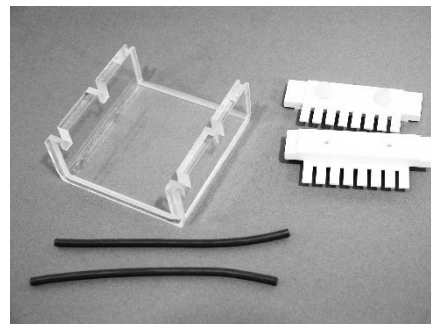
Chemikálie a pomůcky

TBE pufr 0,5× (Tris-HCl 44,5 mmol·l⁻¹, kyselina boritá 44,5 mmol·l⁻¹, EDTA 1,25 mmol·l⁻¹, pH 8,4)

Agaróza

GelRed® 10 000×

Zařízení pro horizontální elektroforézu s příslušenstvím, Erlenmayerovy baňky



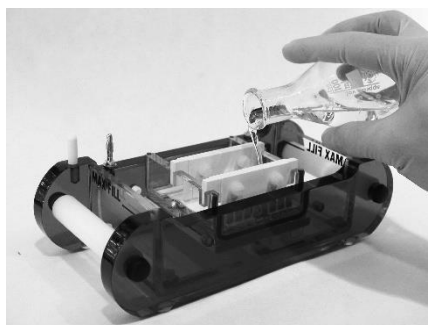
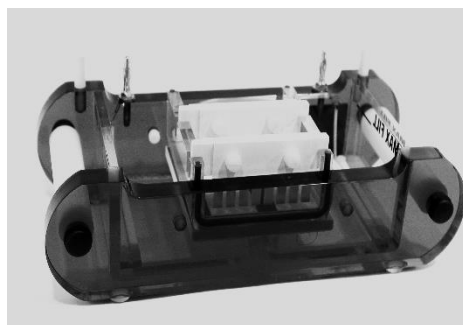
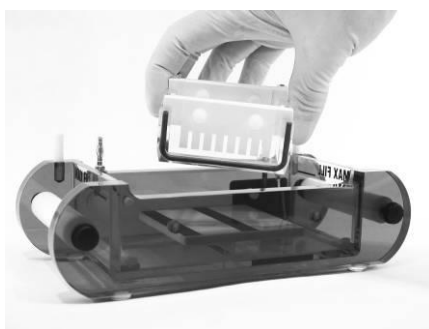
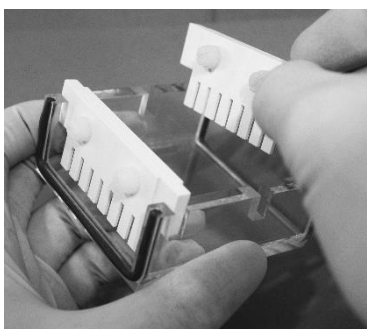
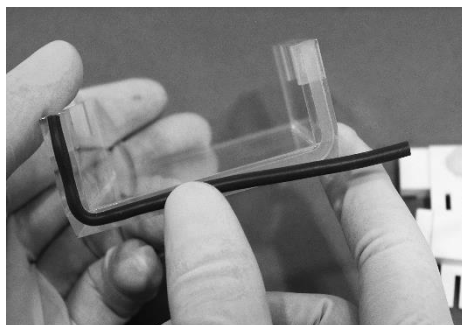
1. Příprava agarózového gelu

K dělení použijeme 2% agarózový gel s fluorescenčním barvivem GelRed. Roztok agarózy se připravuje vždy pro nalití 2 gelů.

1. V Erlenmayerově baňce přelijte 1 g agarózy (připravena již navážená) 50 ml pufru.
2. V mikrovlnné troubě směs přiveďte k varu. Je třeba, aby se směs vařila, ohřev je ale potřeba včas vypnout, aby vroucí gel nepřetekl přes okraj baňky.
3. Horký gel promíchejte kroužením baňkou. Gel musí být homogenní; pokud v něm jsou patrná nerozpuštěná zrnka agarózy, opakujte ohřev.
4. Přidejte 2 μl barviva GelRed. Po promíchání je agaróza připravená k nalévání. Roztok musí být chladnější než 60 °C (baňku musí být možné udržet v ruce), jinak hrozí poškození elektroforetické vany.

2. Nalévání agarózového gelu

1. Sestavte elektroforetickou vanu pro nalévání gelu: do vybroušených žlábků v korýtku vsuňte na obou stranách silikonové těsnění. Do korýtko vložte podle počtu vzorků jeden nebo dva hřebínky; hřebínek se vkládá tak, aby jamky byly co nejbližší okraji korýtko. Korýtko umístěte do vany tak, aby těsnění doléhala na stěnu vany.
2. Zkontrolujte, že zařízení stojí vodorovně, a do korýtko nalijte roztok agarózy s GelRed.
3. Gel nechejte tuhnout asi 20 minut, po tuto dobu s ním nehýbejte.



3. Příprava gelu k elektroforéze a nanášení vzorků

1. Vyjměte korýtko z vany, sejměte silikonová těsnění. Korýtko otočte o 90° a vložte zpět do vany tak, aby jamky ležely nad barevnými proužky na podložce.
2. Do vany nalijte 250 ml pufru.
3. Opatrně vyjměte hřebínky tak, abyste neroztrhli jamky v gelu.
4. Do jednotlivých jamek nanášejte obarvené vzorky (po 10 μ l na jamku), jejich pořadí zaznamenejte do protokolu.



4. Elektroforéza a vyhodnocení

1. Uzavřete elektroforetickou vanu a připojte ji na zdroj napětí. Nastavte 90 V.
2. Elektroforézu nechte probíhat asi 40 minut. Vzorkovací barvička by měla být asi 1 cm od konce dráhy. Pak vypněte zdroj, odpojte kabely a vyjměte gel.
3. Gel vyjměte z korýtky a položte na desku transluminátoru. Pozorujte rozložení jednotlivých frakcí. Je třeba pracovat rychle, gel po několika minutách ozařování UV světlem vybledne.