

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka



2020/21

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 restričních 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)

λ-DNA 50 μg·ml⁻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 „-“).

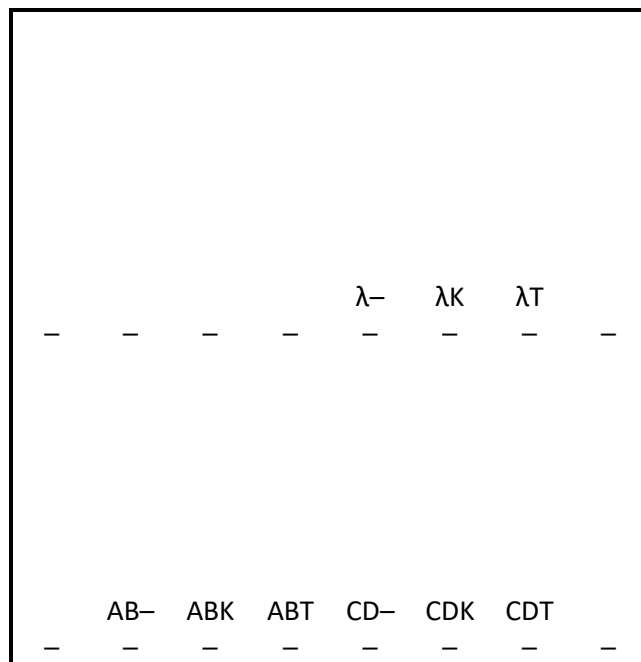
Abychom ověřili, že ke štěpení skutečně dochází, provedeme kontrolu s λ-DNA. Tato DNA izolovaná z λ-fága se štěpí oběma restričními endonukleázami. Kontrolu provedeme jen jednou pro několik pracovních skupin.

Označení zkumavky	Štěpení PCR produktu			Pozitivní kontrola s λ-fágovou DNA (provádí se pro několik skupin 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 náležejí 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 nanesena kontrola štěpení na λ -DNA. Některé jamky zůstaly nepoužité.



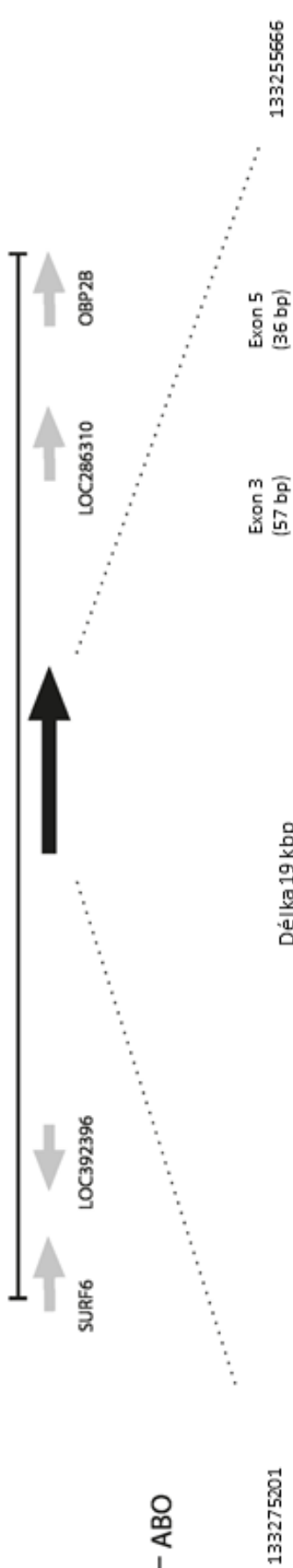
Neštěpený PCR produkt má v našem případě délku 193 bp. KpnI štěpí sekvenci GGTAC[^]C, která odpovídá alelám O_A a O_G. Tail štěpí sekvenci ACGT[^], která je obsažena v alelách B a O_G. Restrikční místo pro KpnI je přibližně 21 bp od konce; v případě štěpení touto endonukleázou se v gelu zobrazí proužek o délce 172 bp. Druhý fragment (o délce 21 bp) je natolik krátký, že při použitém barvení často není vůbec viditelný.

Restrikční místo pro Tail je asi 57 bp od konce PCR produktu; štěpením touto endonukleázou tedy vznikají fragmenty o délkách 136 a 57 bp. I v tomto případě se kratší obvykle nezobrazí, takže opět na elektroforeogramu v případě úplného štěpení uvidíme pouze jediný pruh o délce 136 bp.

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



258 294

(133257521) (133257486)

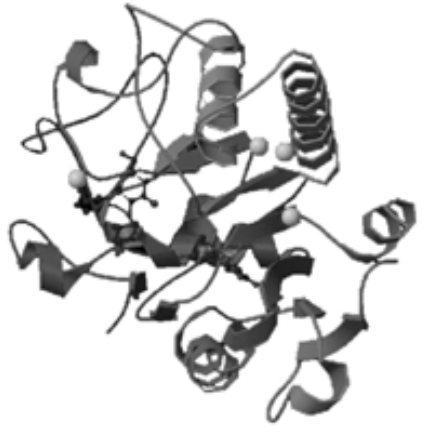
A: ...GGTGACC.....ACAT...

B: ...GGTGACC.....ACGT...

O^A: ...GGT-ACC.....ACAT...

O^G: ...GGT-ACC.....ACGT...

restrikční místo pro Kpn I restrikční místo pro Tail I



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

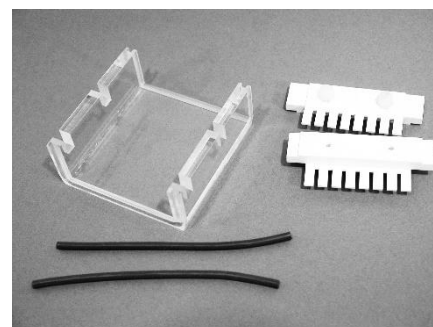
Chemikálie a pomůcky

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×

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



Zařízení pro horizontální elektroforézu s příslušenstvím, Erlenmayerovy baňky

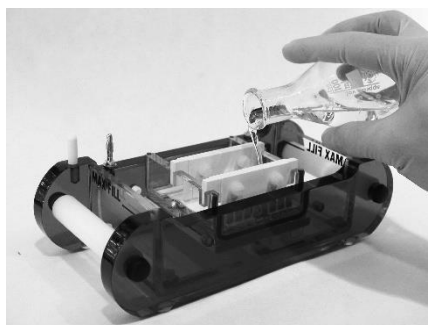
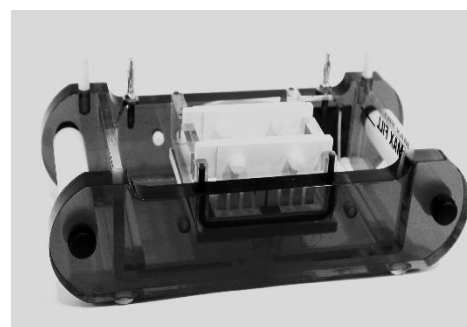
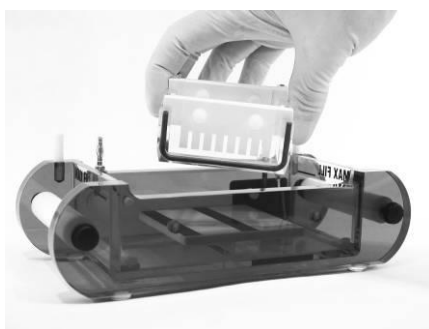
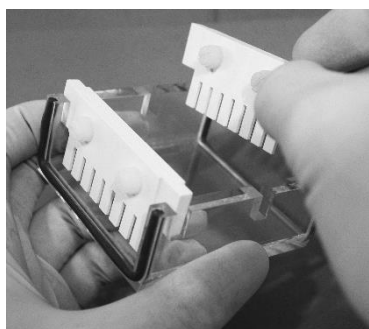
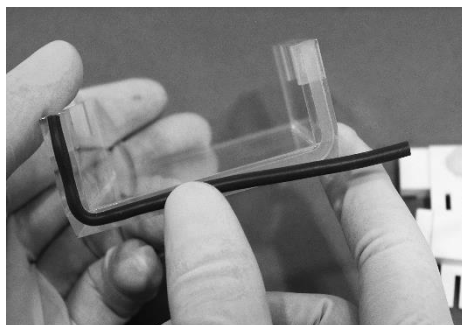
1. Příprava agarózového gelu

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 μ l 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.

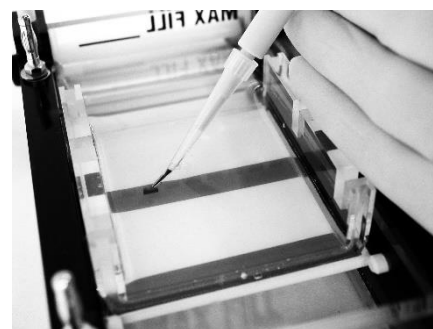
2. Nalévání agarózového gelu

1. Sestavte elektroforetickou vanu pro nalévání gelu: do vybroušených žlábků v korýtku vsuňte na obou stranách silikonové těsnění. Do korýtky vložte podle počtu vzorků jeden nebo dva hřebínky; hřebínek se vkládá tak, aby jamky byly co nejbližší okraji korýtky. Korýtko umístěte do vany tak, aby těsnění doléhala na stěnu vany.
2. Zkontrolujte, že zařízení stojí vodorovně, a do korýtky 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 (celý objem zkumavky po restrikci), 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.