MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

1. Izolace DNA

Náplň praktik

1. Izolace DNA

- z buněk bukální sliznice - izolační kit MACHEREY-NAGEL

2. PCR

- polymerázová řetězová reakce (templát gDNA)

3. Restrikční štěpení + **elektroforéza**

+ interpretace výsledků

Historie molekulární biologie

1870 - **první izolace** z buněčných jader *(Friedrich Miescher)*

1953 – **stanovení struktury DNA** – James D.Watson, Francis Crick,

Maurice Wilkins – Nobelova cena 1962

"for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material."

1957 – **objev DNA polymerázy** – Artur Kornberg – Nobelova c.1959

1962 – **objev restrikčních endonukleáz** – Werner Aber, Daniel Nathans,

Hamilton O. Smith – Nobelova cena 1978

1985 – **PCR** – Kary Banks Mullis a kol. – Nobelova cena 1993

Nukleové kyseliny

- vlastnosti: **kyselá povaha, velké množství fosforu!**

- chemická struktura: **polynukleotid**

- složení nukleotidu: ***dusíkatá baze*** (pyrimidin, purin)

pentóza (k bazi připojena N-glykosidickou vazbou)

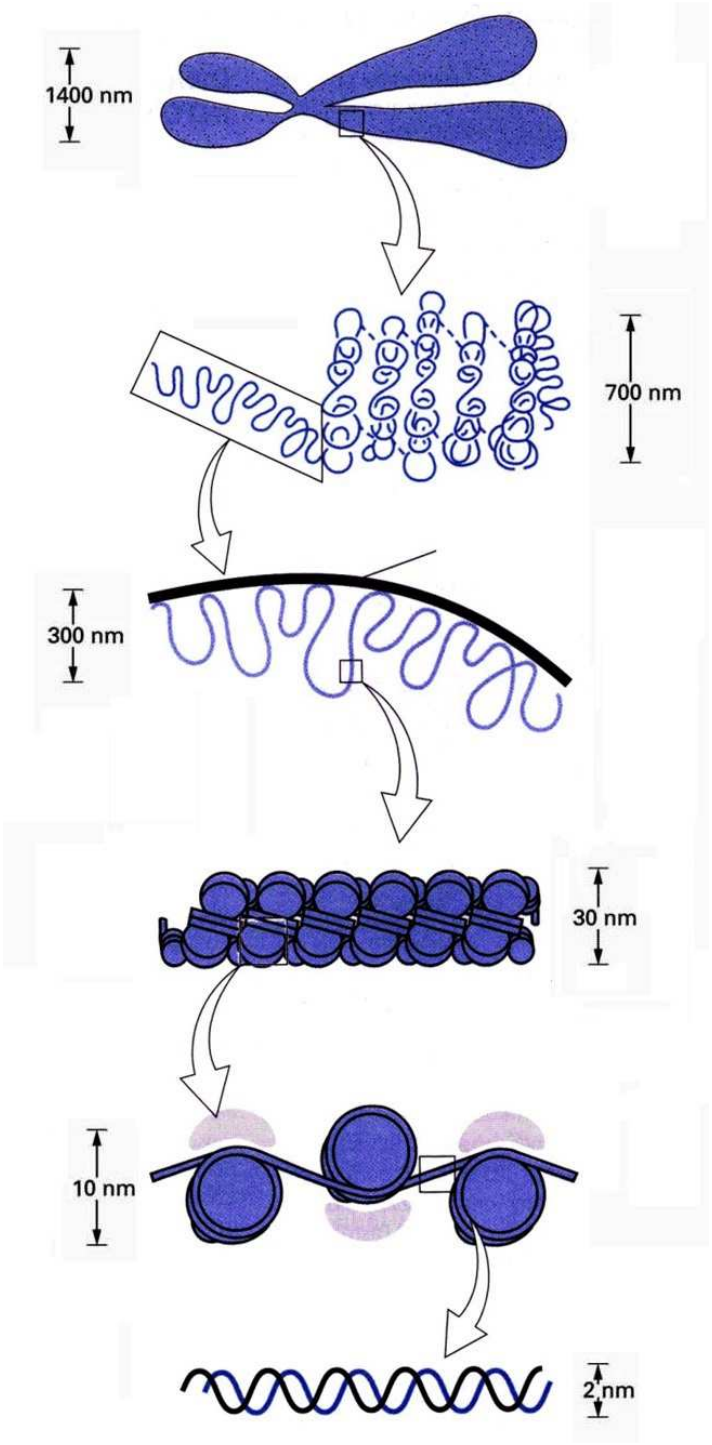
kys.fosforečná (k cukru připojena esterovou vazbou)

- typy: **DEOXYRIBONUKLEOVÁ K. (DNA)** – cukr: deoxyribóza, dvoušroubovice, uložení genetické informace

RIBONUKLEOVÁ K. (RNA) – cukr: ribóza, většinou jednovláknový charakter, mnoho typů, podíl na přenosu genetické informace z DNA na proteiny

Molekulární medicína

→ aplikace molekulární biologie do klinické praxe



chromosom **(1400 nm)**

- jeden chromozom obsahuje jednu molekulu DNA

kondensovaný úsek **(700 nm)**

chromatinové smyčky **(300 nm)**

chromatinová vlákna **(30 nm)**

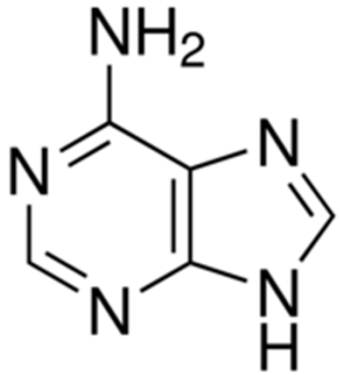
nukleofilamenta **(10 nm)**

dvojitý α-helix **(2 nm)**

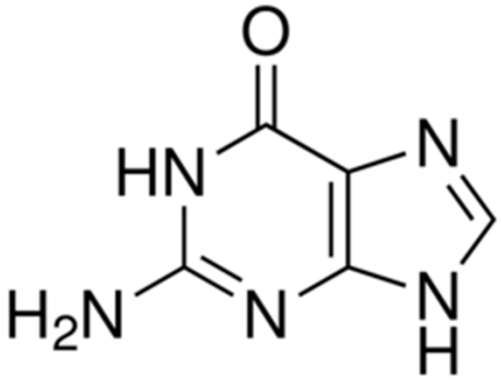
Opakování

purinové baze

A

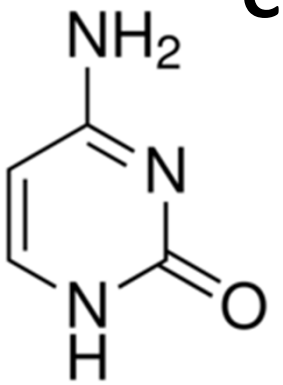


G

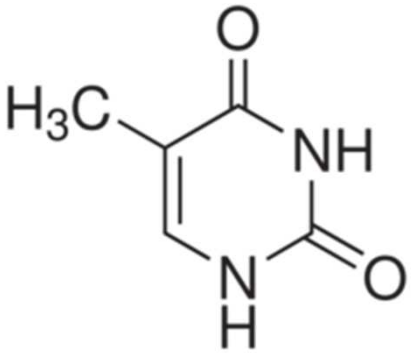


pyrimidinové baze

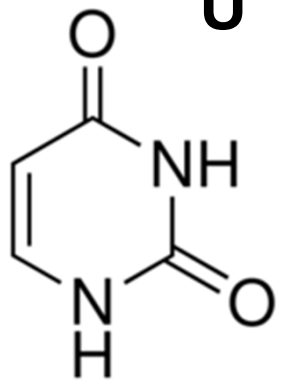
C



T

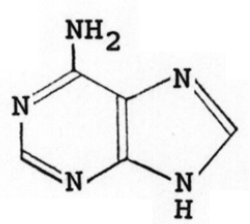


U



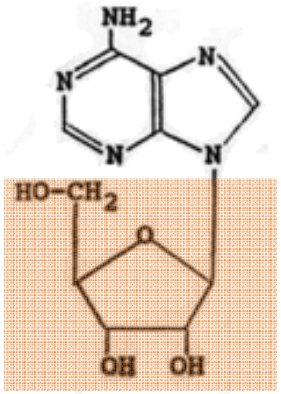
Tvorba nukleosidů a nukleotidů

BAZE



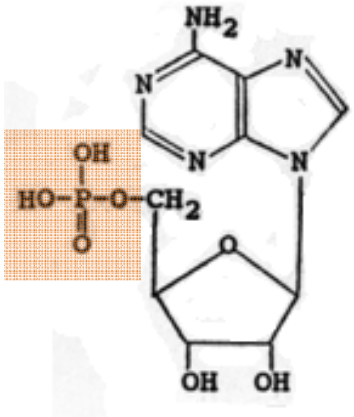
adenin

NUKLEOSID

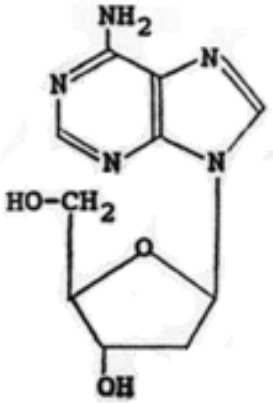


adenosin

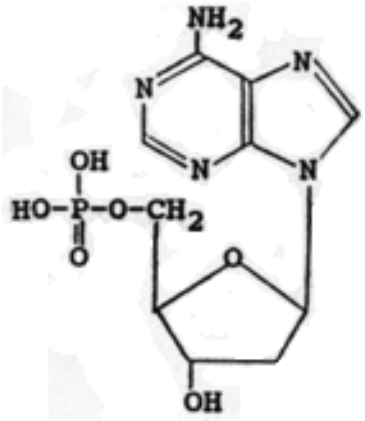
NUKLEOTID



AMP



deoxynukleosid (deoxyadenosin)

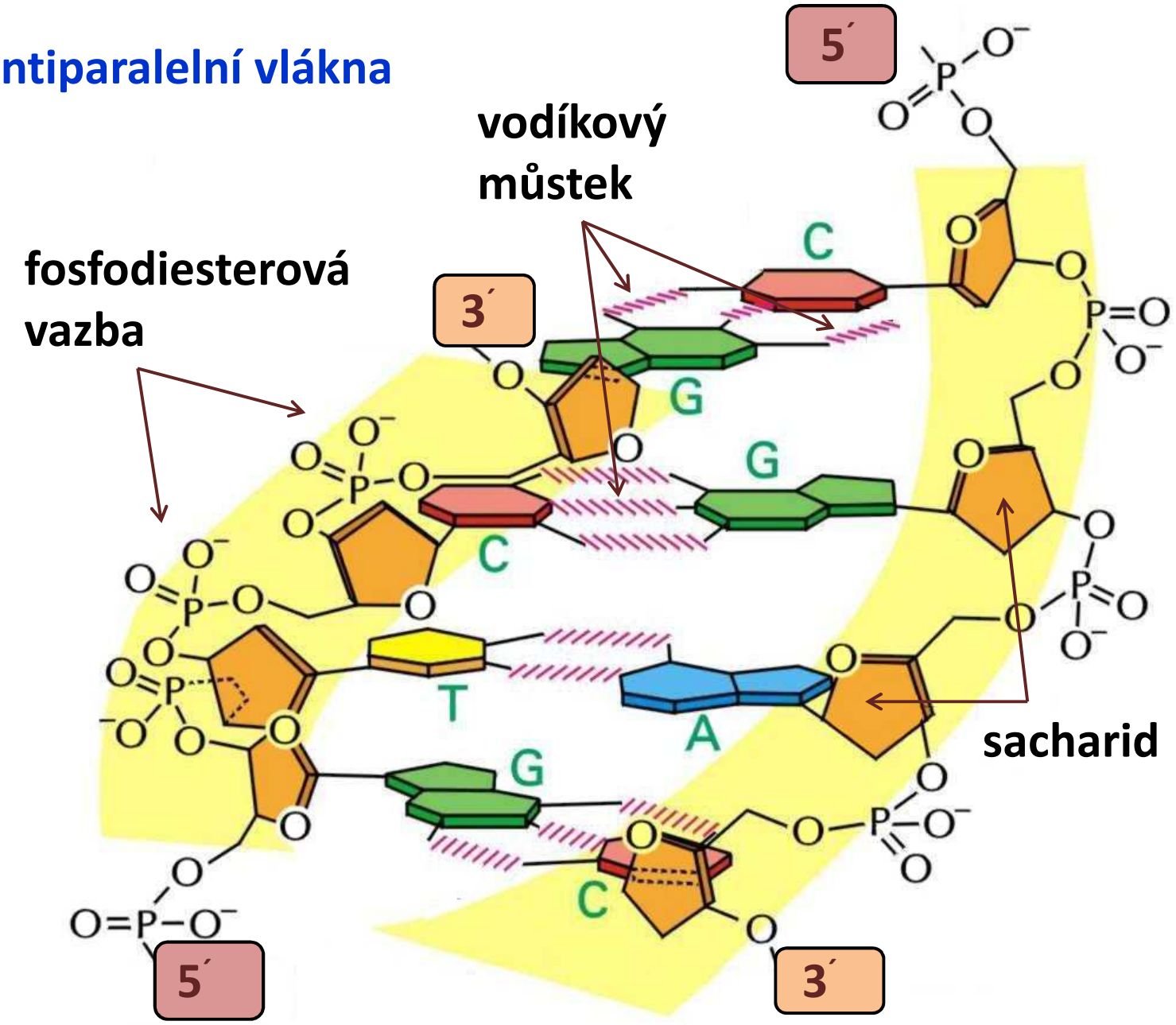


deoxynukleotid (dAMP)

G
A
T
C

C
T
A
G

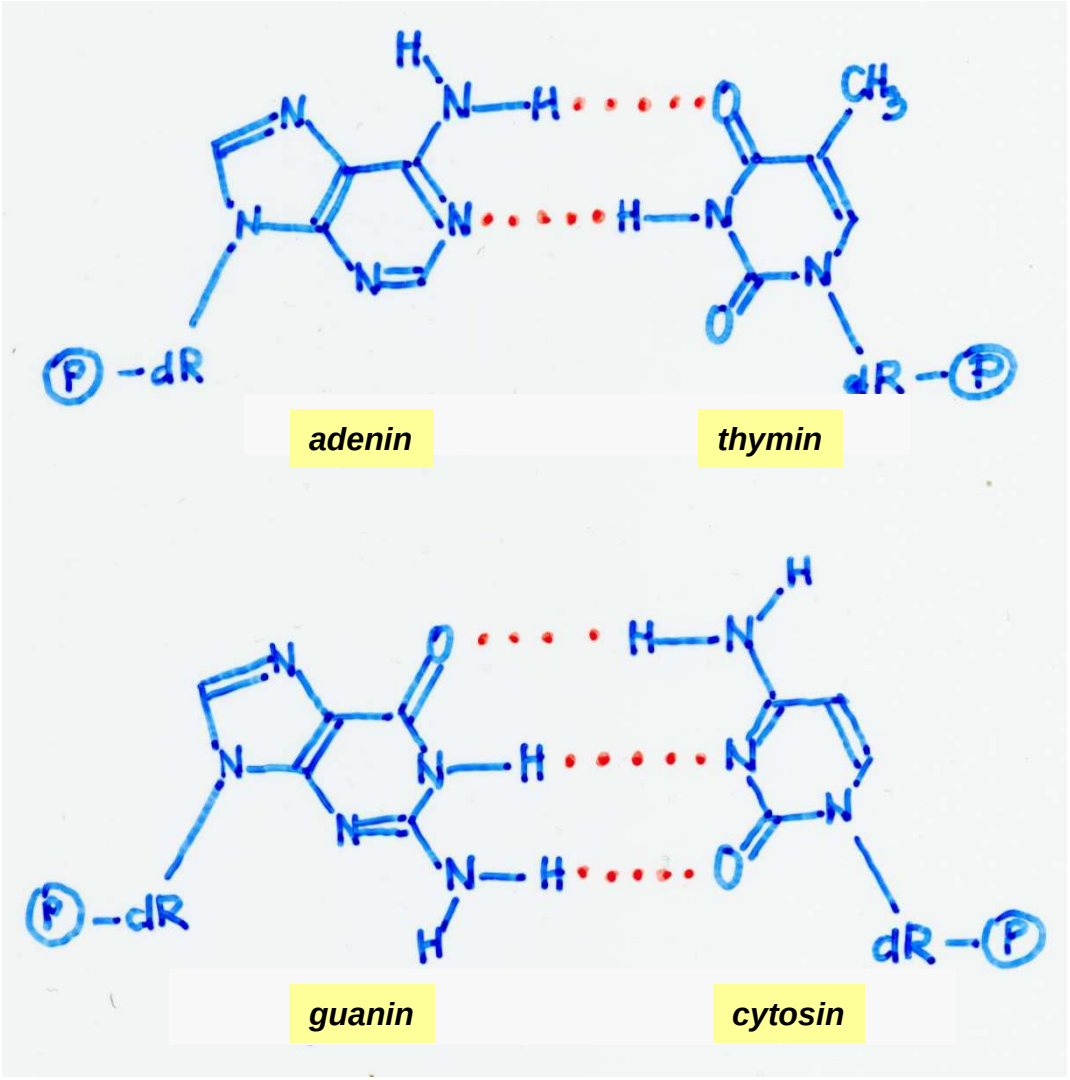
- antiparalelní vlákna



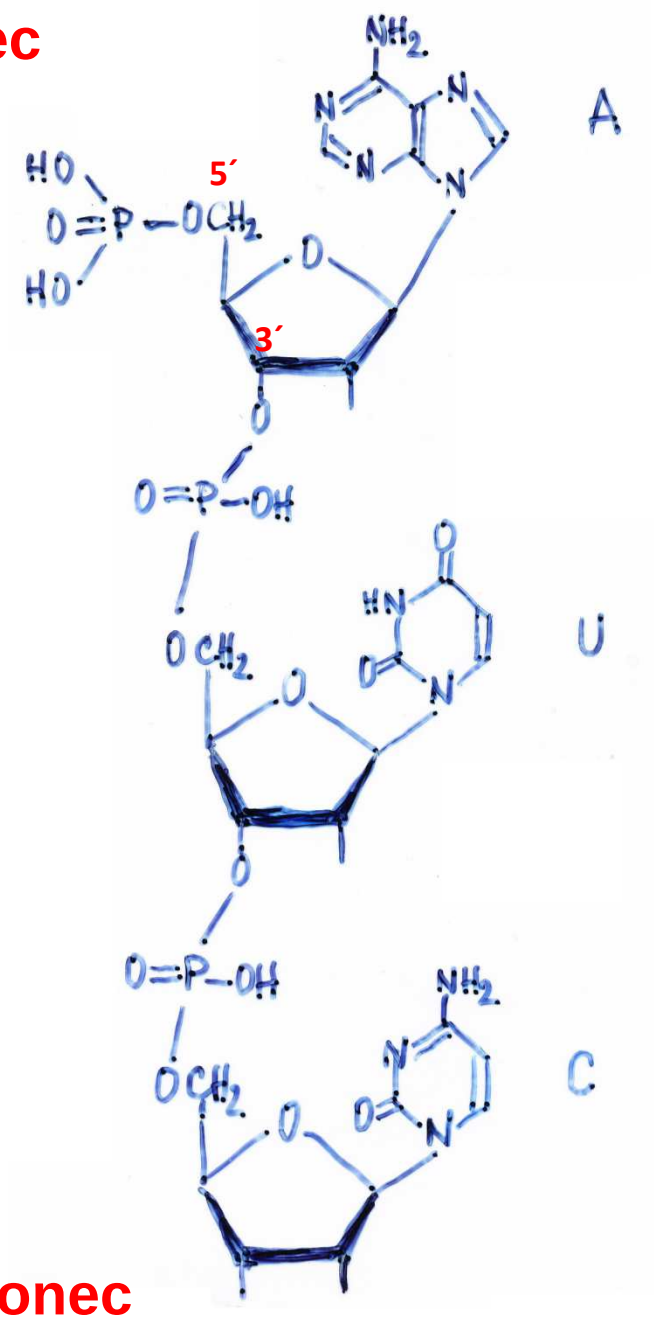
vodíkový můstek

A = T

G ≡ C



5' konec



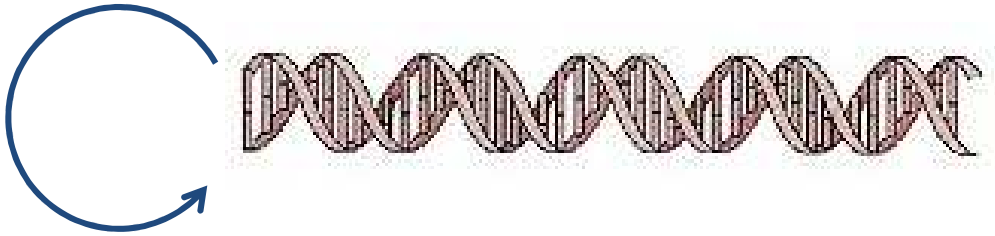
3' konec

TRINUKLEOTID

pAUC OH

Centrální dogma molekulární biologie

Replikace



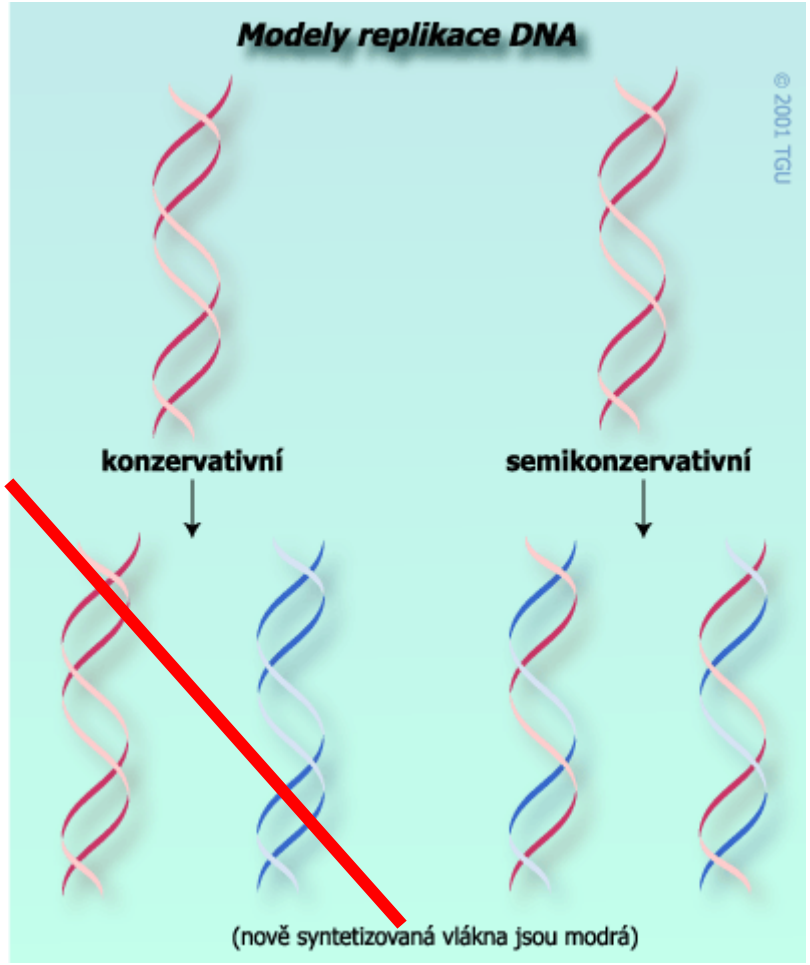
DNA

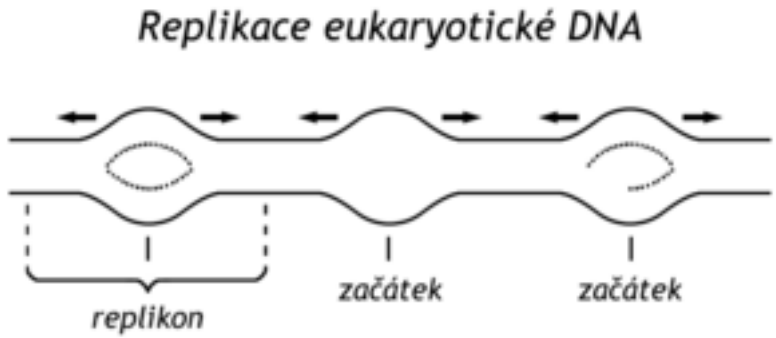
Transkripce

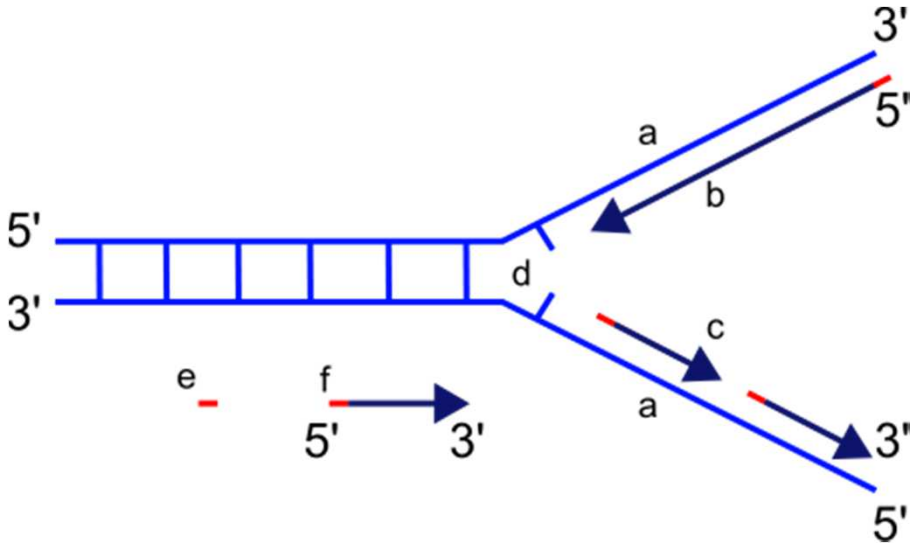
RNA

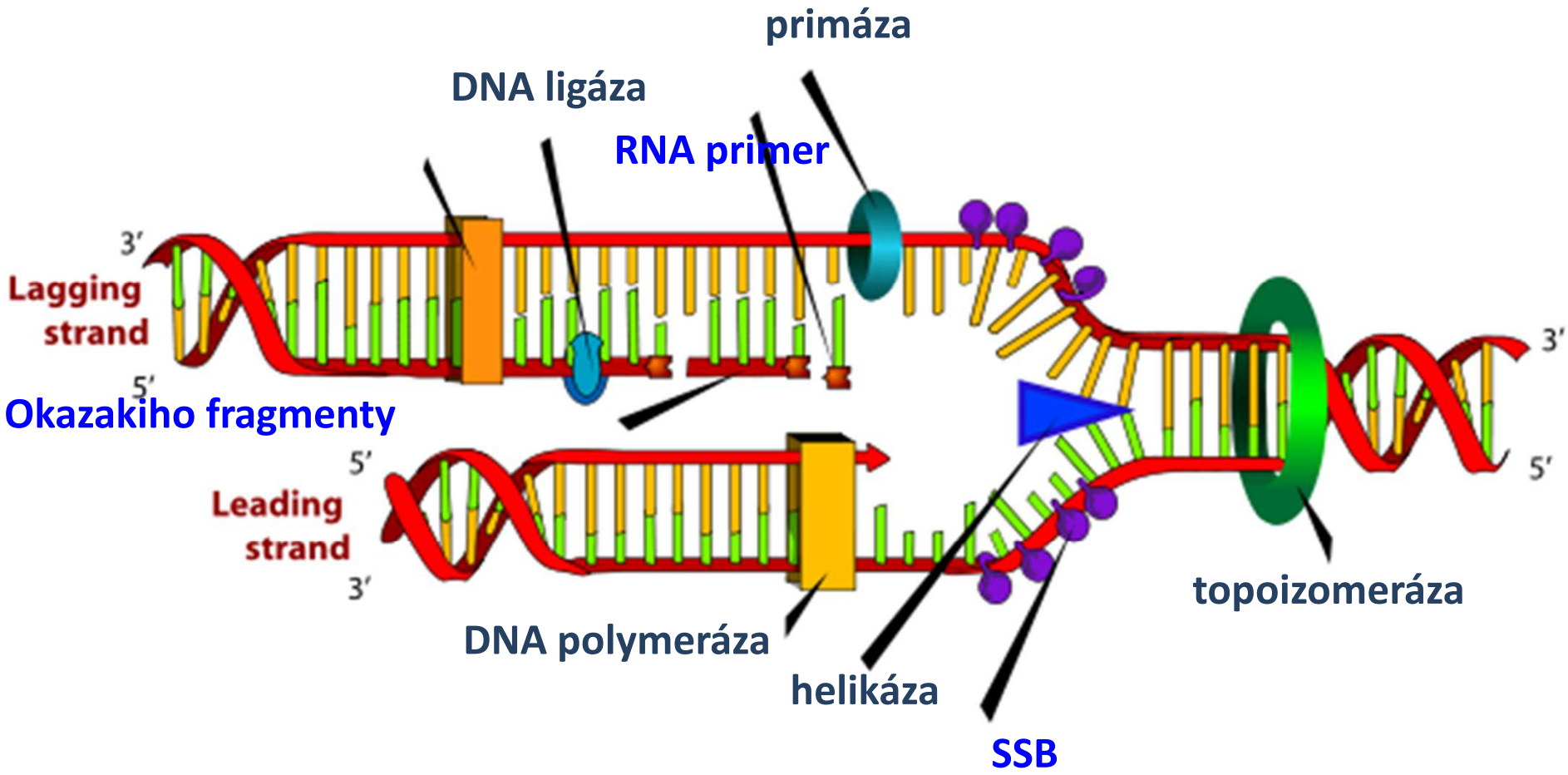
Translace

protein

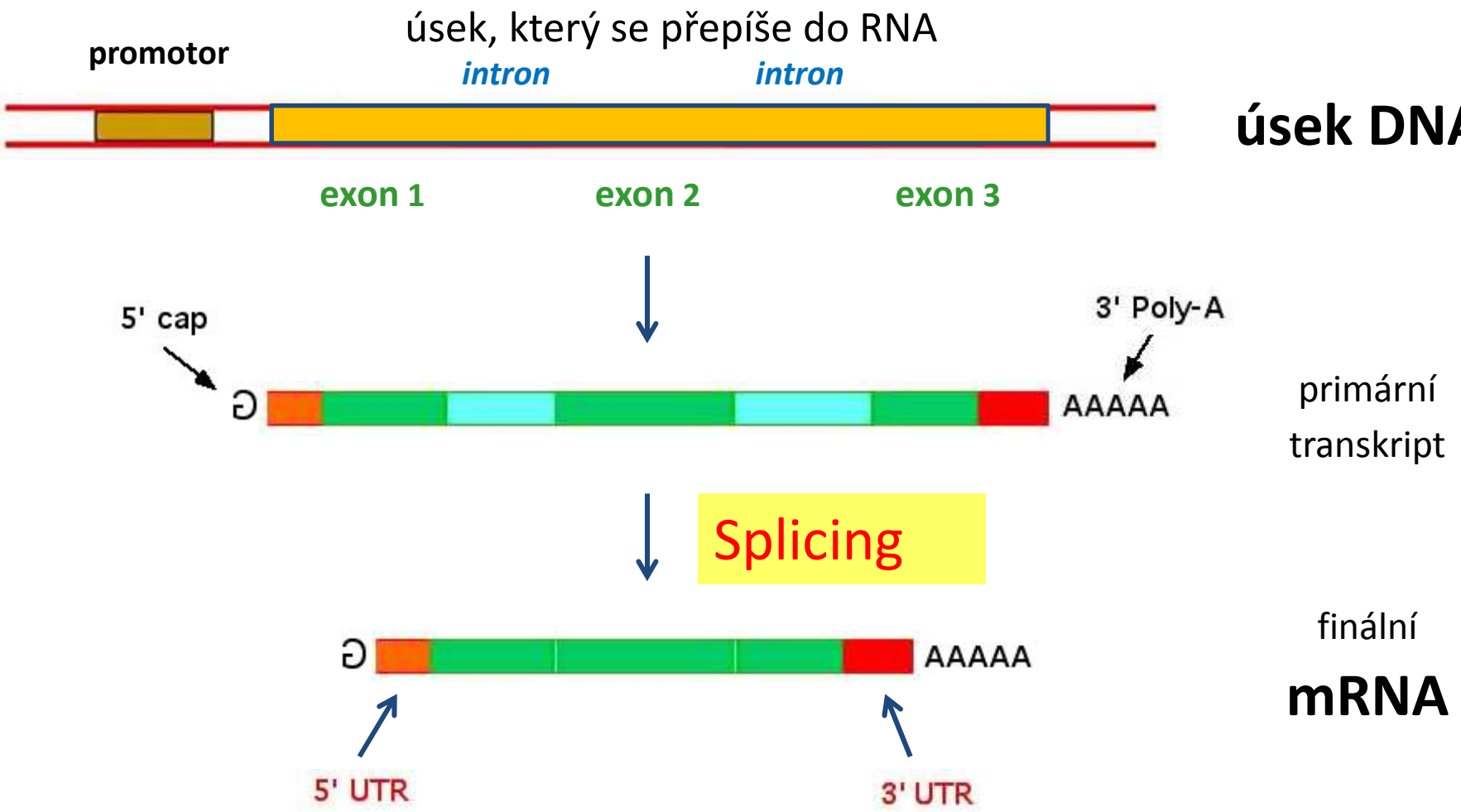

Modely replikace DNA
© 2001 TGU
konzervativní
semikonzervativní
(nově syntetizovaná vlákna jsou modrá)


Replikace eukaryotické DNA
replikon
začátek
začátek


3'
5'
a
b
5'
3'
d
c
e
f
a
5'
3'
3'
5'


primáza
DNA ligáza
RNA primer
3′
Lagging strand
5′
Okazakiho fragmenty
5′
Leading strand
3′
3′
5′
topoizomeráza
DNA polymeráza
helikáza
SSB

Struktura genu



Zaměření praktik -"Leidenská mutace"

APC rezistence

- mutace v genu pro hemokoagulační **faktor V** (AD)

  - dochází k poruše koagulačního systému

    ⇒krevní srážlivost je ***zvýšená***

    = **trombofilní stav**

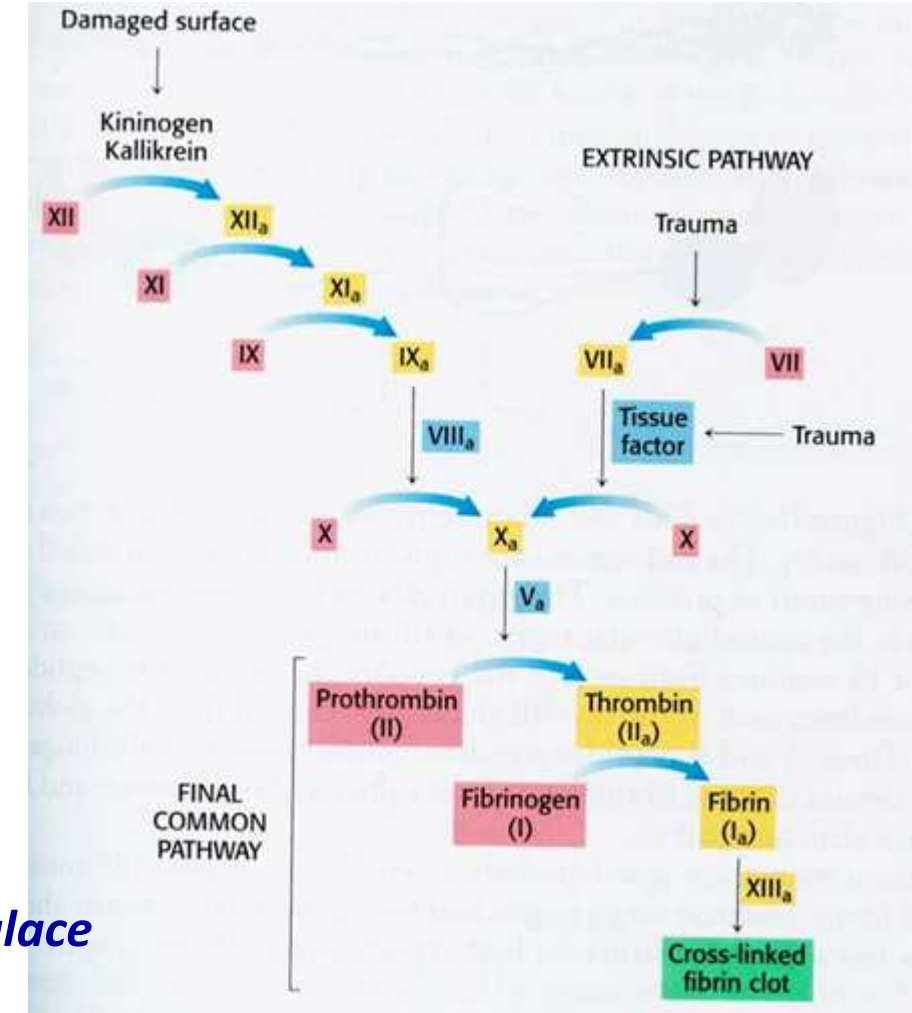
  - objevena r.1993 – holandské město Leiden
  - rizikový faktor, nikoliv nemoc
  - homozygot x heterozygot

FAKTORY SRÁŽENÍ KRVE *(tvorba v játrech)*

inaktivní prekurzory

aktivní proteázy, fibrin

neenzymatické proteiny - regulátory



absence př. ***VIIIa*** → ***hemofilie***
persistence př. ***Va*** → ***hyperkoagulace***

DIC – diseminovaná intravaskulární koagulace
kombinovaná porucha - tvoří se tromby
a v důsledku spotřebování koagulačních faktorů dochází i k těžkému krvácení

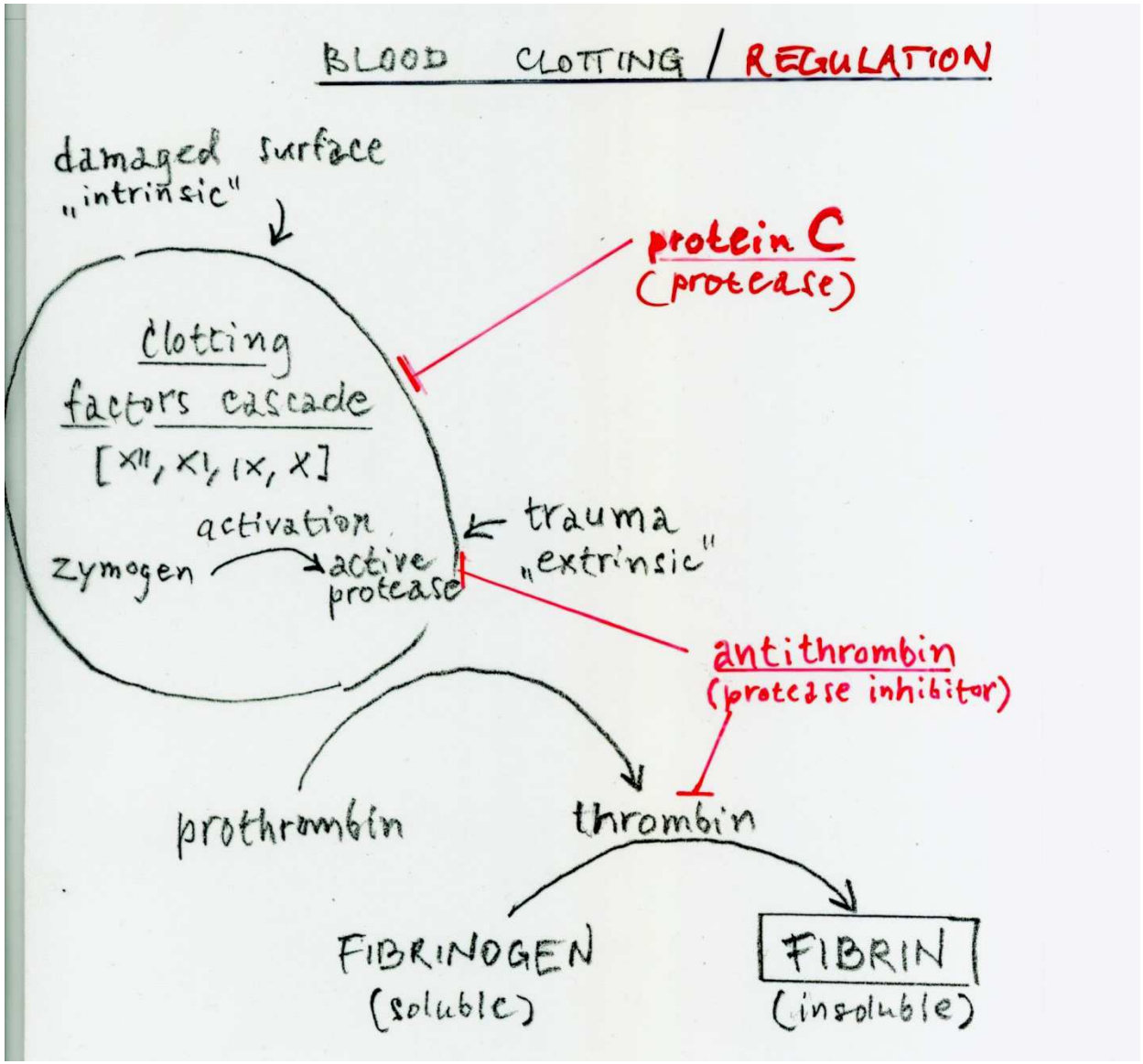
Koagulační faktor V

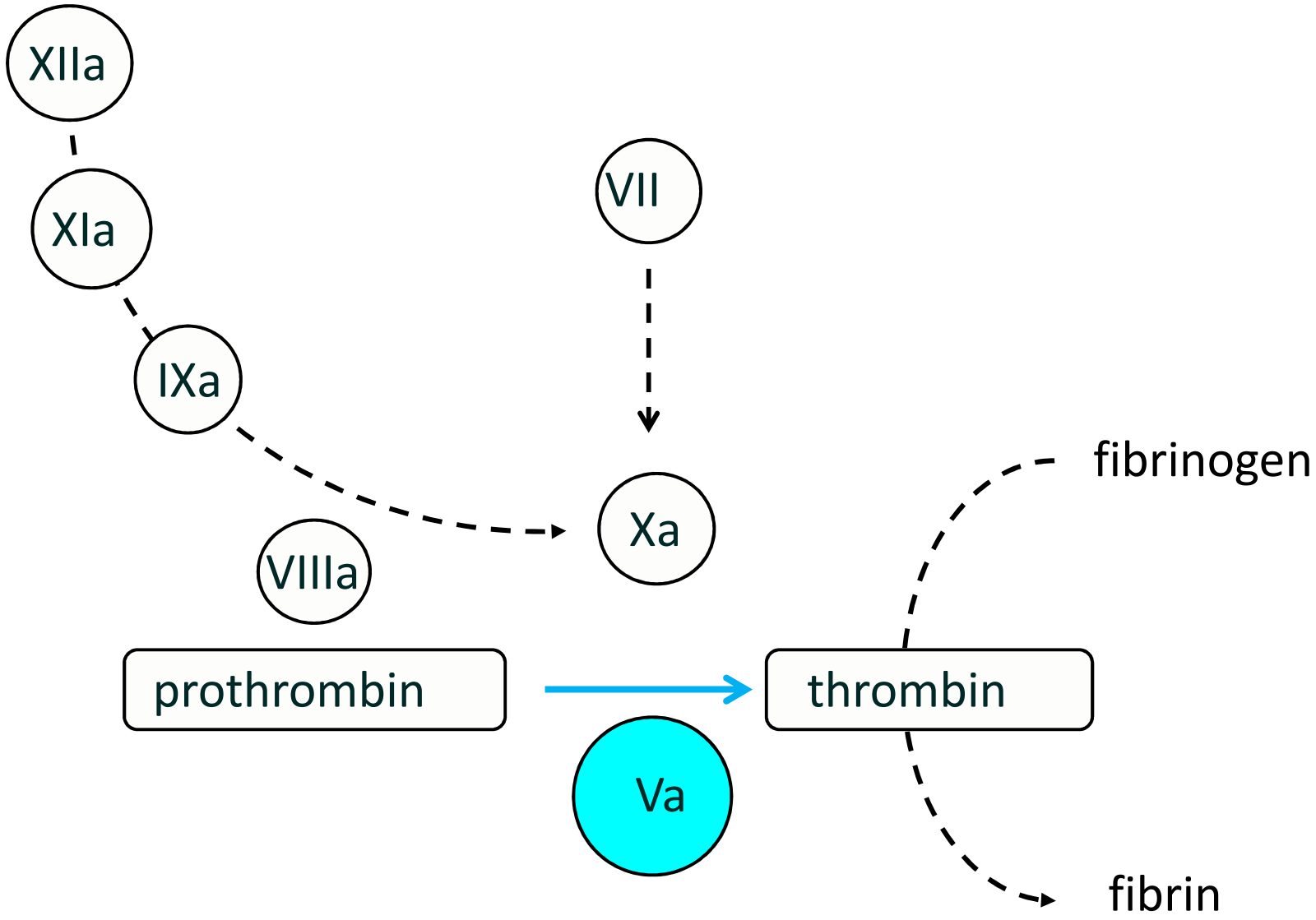
FV – proakcelerin (také *labilní faktor*)

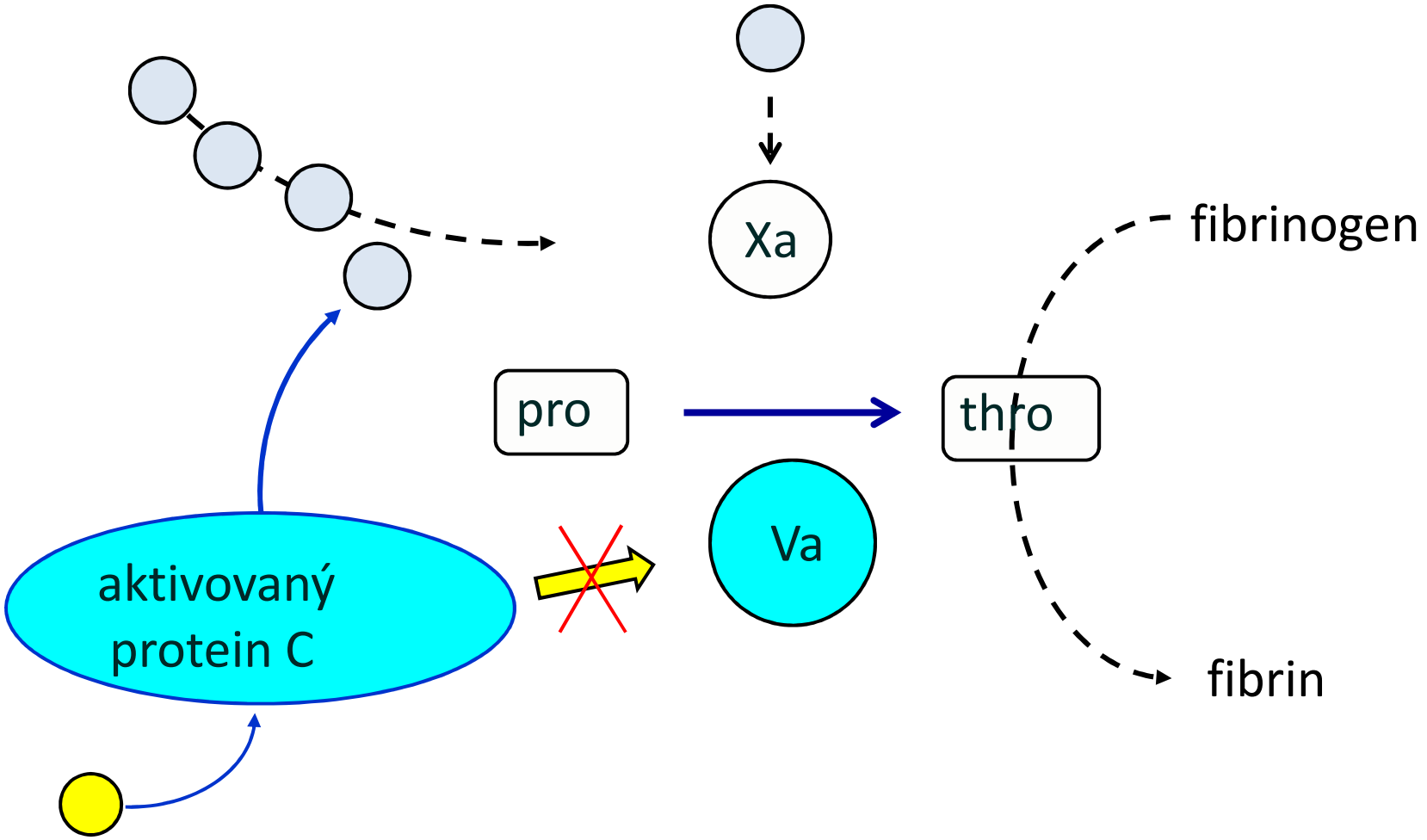
- *FV***a** - kofaktor (*nemá enzymatickou aktivitu)* při přeměně ***protrombinu*** na ***trombin***

- *FV***a** – je **inaktivován** proteolytickým štěpením ***APC*** (= aktivovaný protein C - fyziol. inhibitor koagulace) v místě tří různých argininových zbytků ***proto APC rezistence***

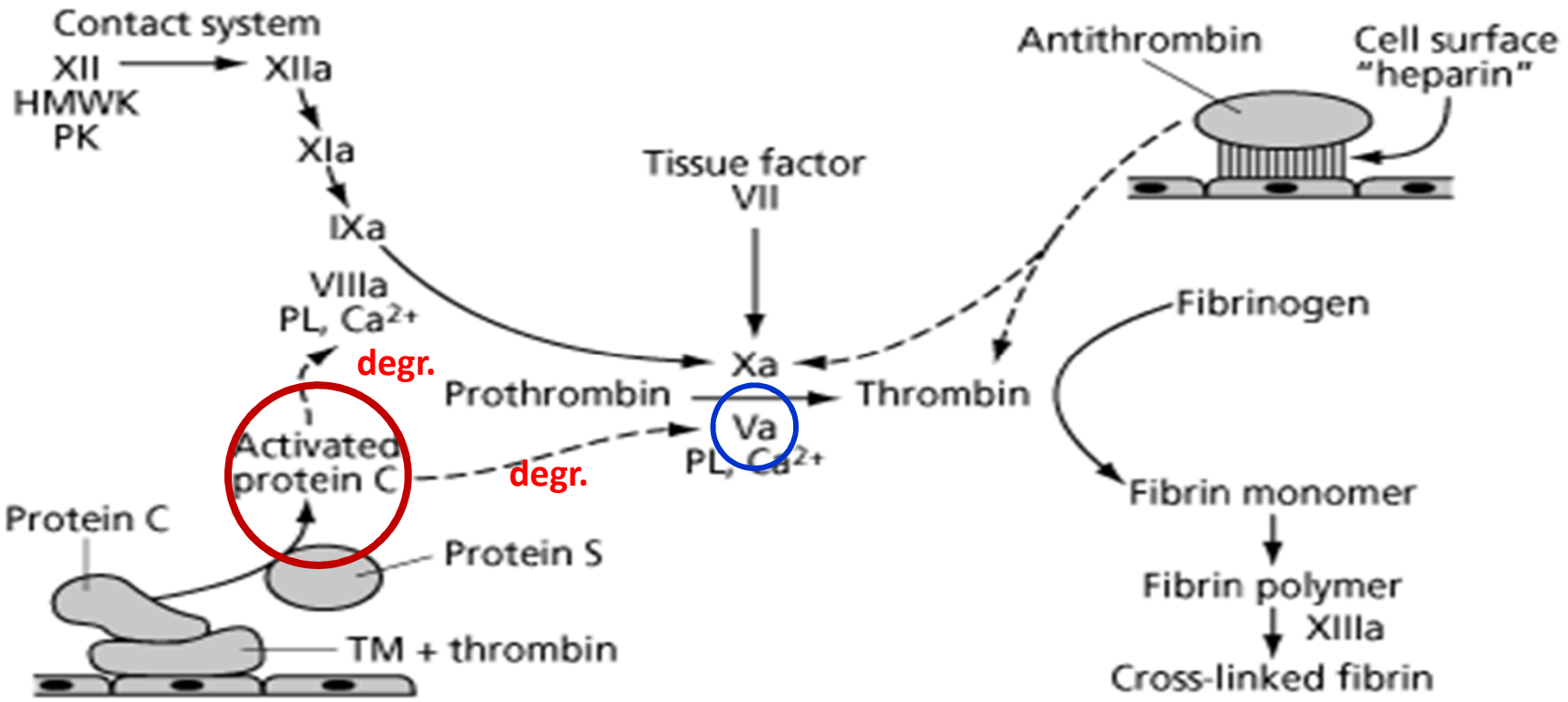
- ***deficit FV → krvácivé stavy (hemofilie)***
- ***mutace (faktor V Leiden) → sklon k trombózám***


BLOOD CLOTTING / REGULATION
damaged surface
"intrinsic"
protein C
(protease)
Clotting
factors cascade
[XII, XI, IX, X]
activation
zymogen
active
protease
trauma
"extrinsic"
antithrombin
(protease inhibitor)
prothrombin
thrombin
FIBRINOGEN
(soluble)
FIBRIN
(insoluble)

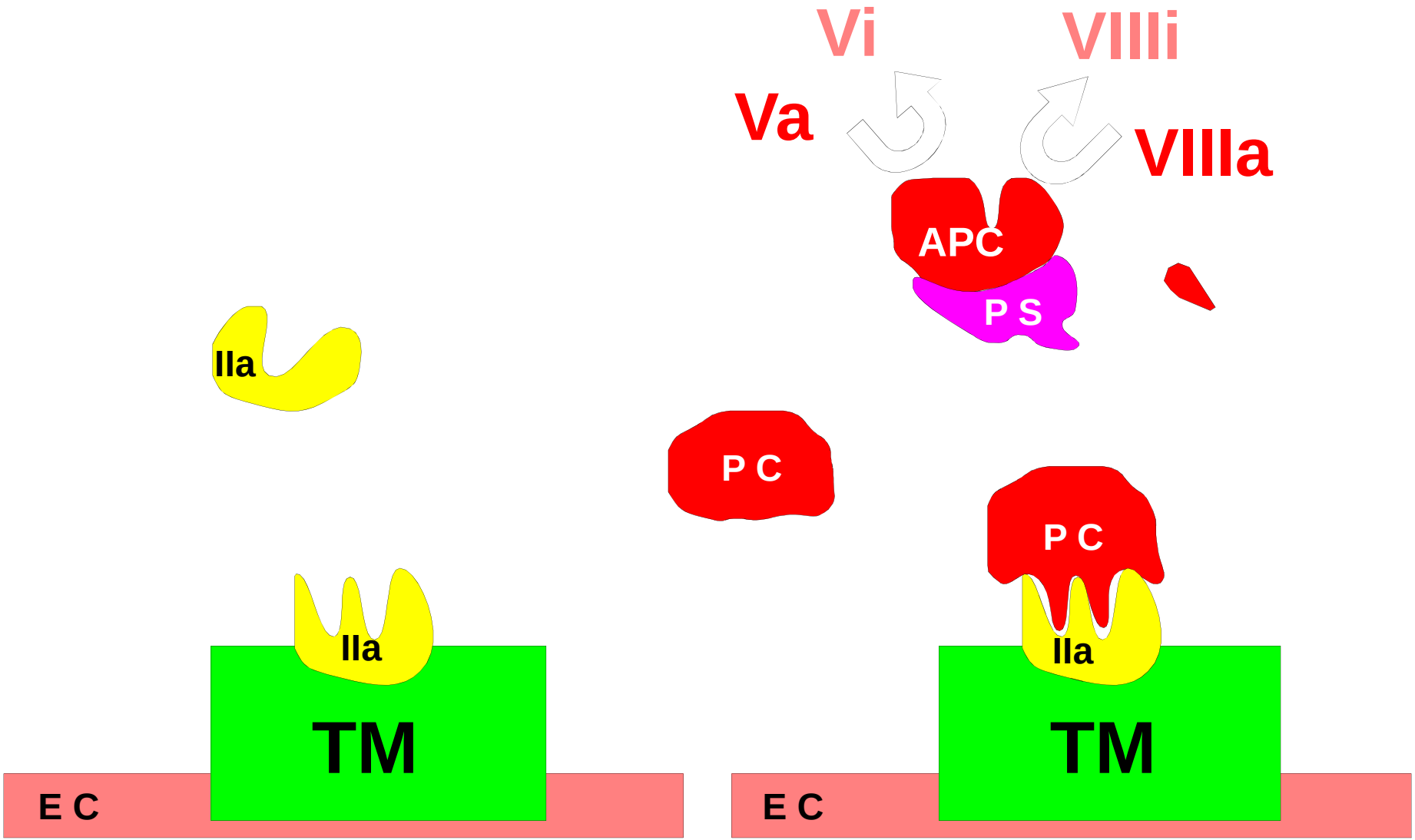

XIIa
XIa
IXa
VIIIa
VII
Xa
prothrombin
thrombin
Va
fibrinogen
fibrin


Xa
fibrinogen
pro
thro
Va
aktivovaný
protein C
fibrin

Vztah protein C – hemokoagulační kaskáda



Systém proteinu C



gen pro FV: chromosom 1 q21-q25

celková délka 80 kb

25 exonů

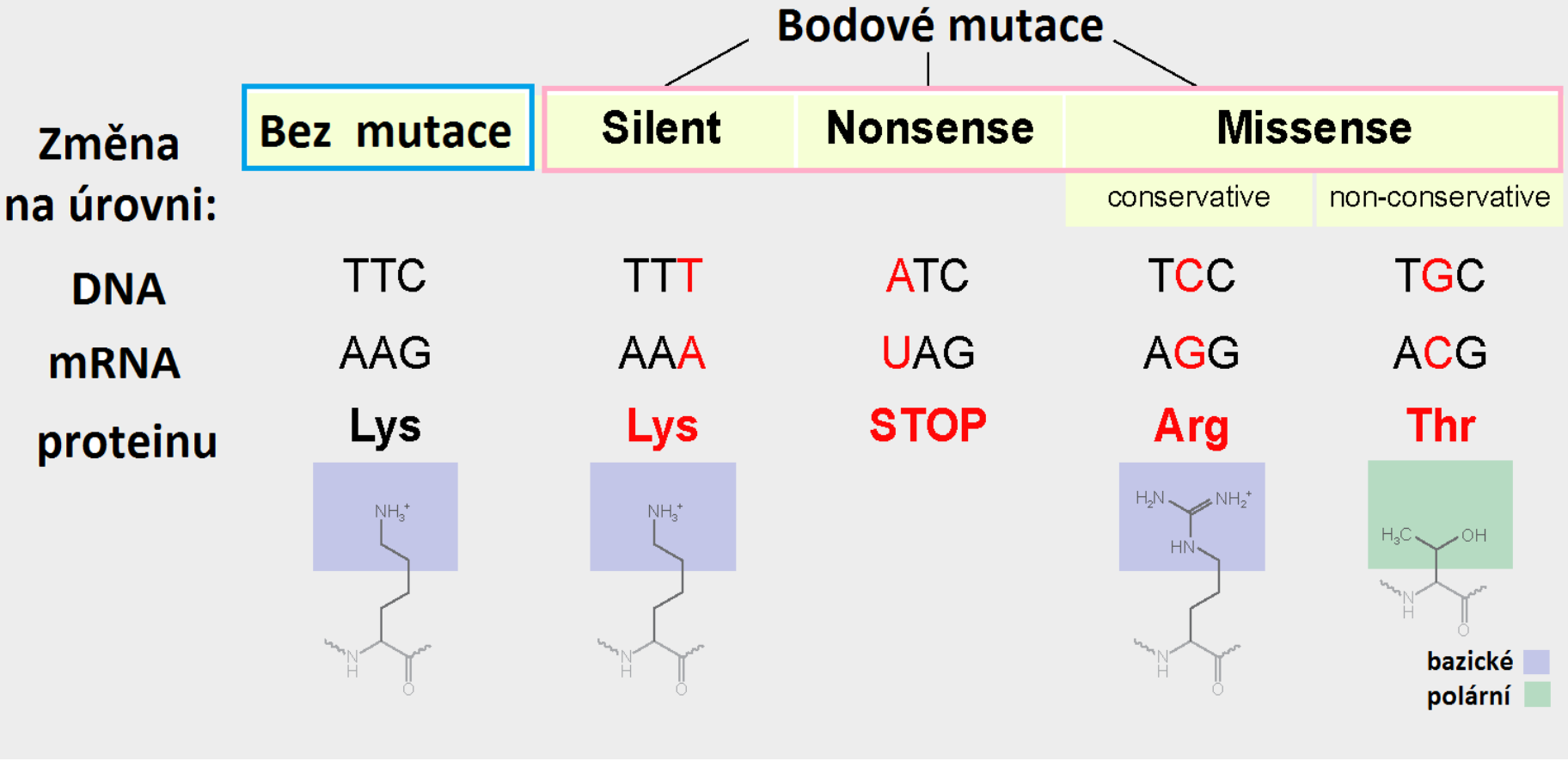
exon 10

FV Leiden: locus q23 SNP G 1691 A

SNP (single nucleotide polymorphism)

= jednonukleotidový polymorfismus

faktor V Leiden = "bodová mutace, substituce"



Faktor V Leiden

rs6025

- v kódující oblasti genu

  - nesynonymní substituce - missense

FV wild type

CTG GAC AGG C**G**A GGA ATA CAG AGG GCA

Leu-Asp-Arg-**Arg**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

FV Leiden

CTG GAC AGG C**A**A GGA ATA CAG AGG GCA

Leu-Asp-Arg-**Gln**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

Arg506Gln **506 Arg>Gln** **R506Q** **506 R>Q**

Oblast zájmu - sekvence

ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA

AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAGGCAGGAACAACACCATGATCAGAGCAG

TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG

AAAATGATGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA

TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCGAG

GAATACAGGTATTTTGTCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT

exon 10 G1691A

"Leidenská mutace" (faktor V Leiden) 1691 G>A

Jak zjistíme pomocí PCR SNP?

Jaké důsledky může mít SNP?

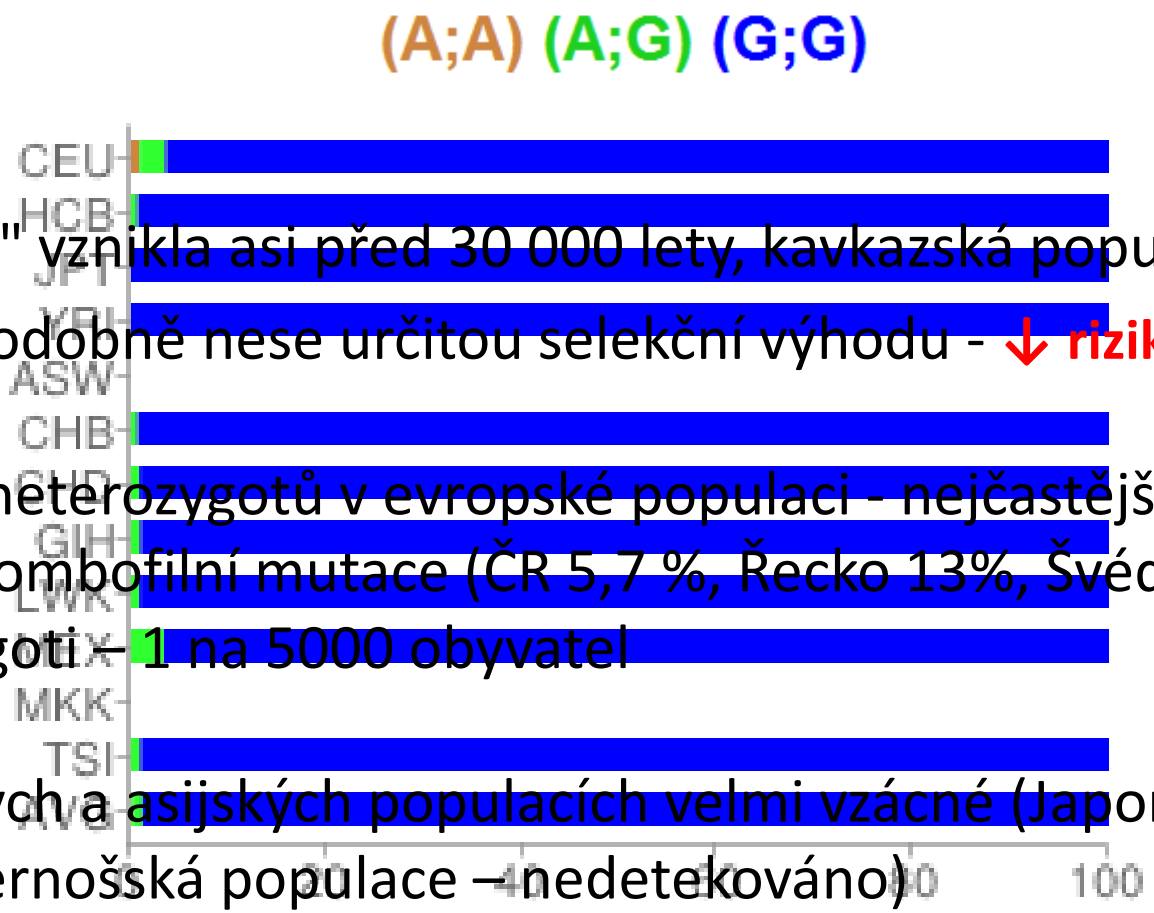
záleží na poloze...

- v **kódující** oblasti genů

  - synonymní substituce *(stejná AK)*
  - nesynonymní substituce
    - missense *(jiná AK)*
    - nonsense *(Stop)*

- v **nekódující** oblasti genů
- v oblasti **mezi geny**

Výskyt v různých populacích



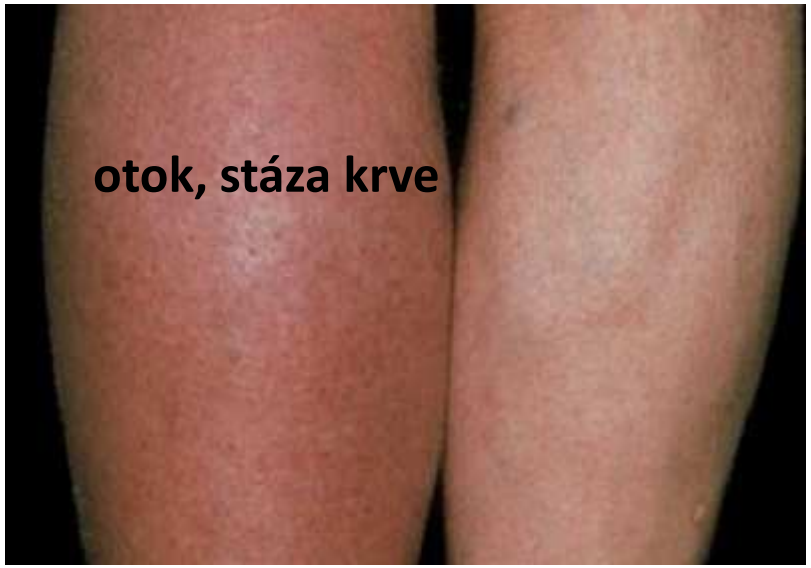
- "mutace" vznikla asi před 30 000 lety, kavkazská populace
- pravděpodobně nese určitou selekční výhodu - ↓ **riziko krvácení**
- asi 5 % heterozygotů v evropské populaci - nejčastější trombofilní mutace (ČR 5,7 %, Řecko 13%, Švédsko 11 %)
-homozygoti – 1 na 5000 obyvatel
- v afrických a asijských populacích velmi vzácné (Japonsko, černošská populace – nedetekováno)

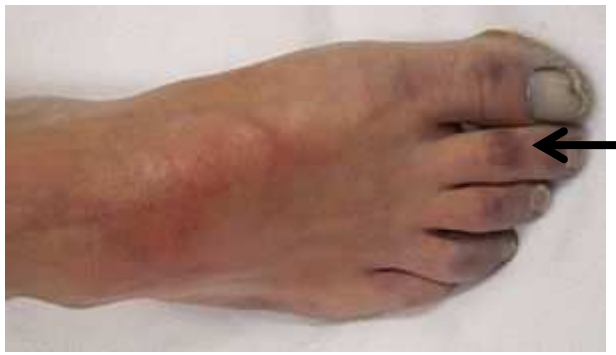
Nejde o nemoc, jde o rizikový faktor vzniku hluboké žilní trombózy

Trombóza

sražení krve v cévách za vzniku ***TROMBU***

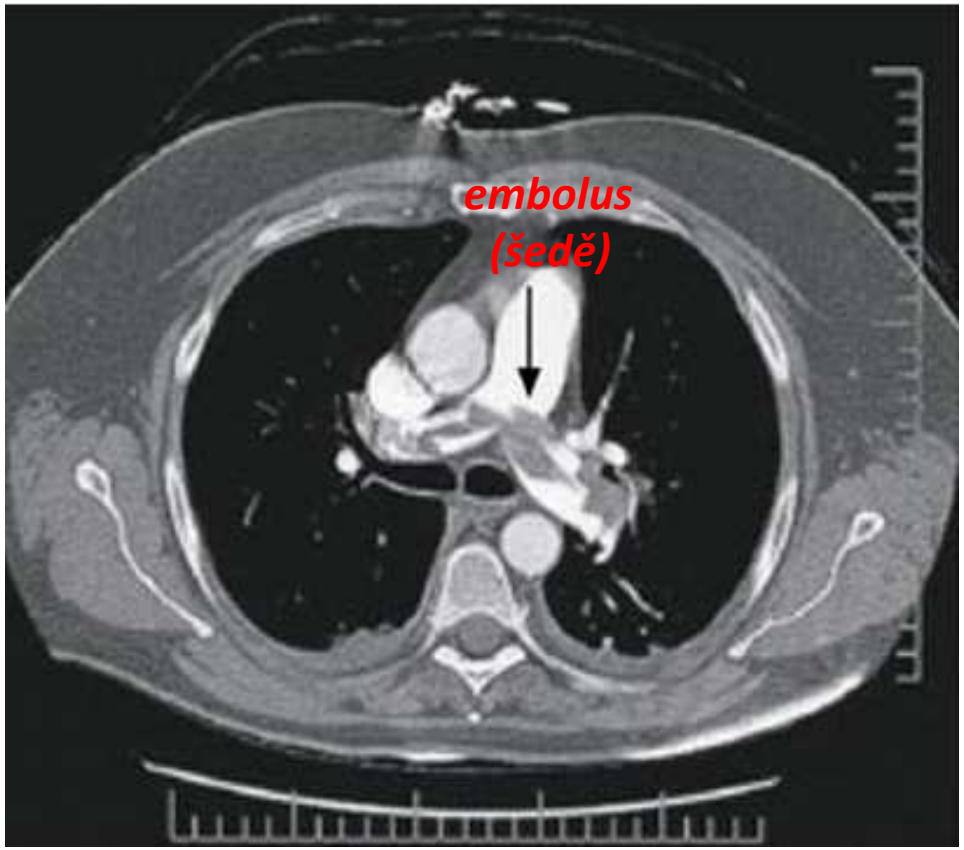
- **arteriální** ⇒ ischemie tepnou zásobované oblasti
- **žilní** ⇒ zhoršení odtoku krve – venostáza
  - *hluboká žilní trombóza* – nejčastější příčina plicní embolie
  - *trombóza povrchových žil* – spojená se zánětem, nevede k embolizaci

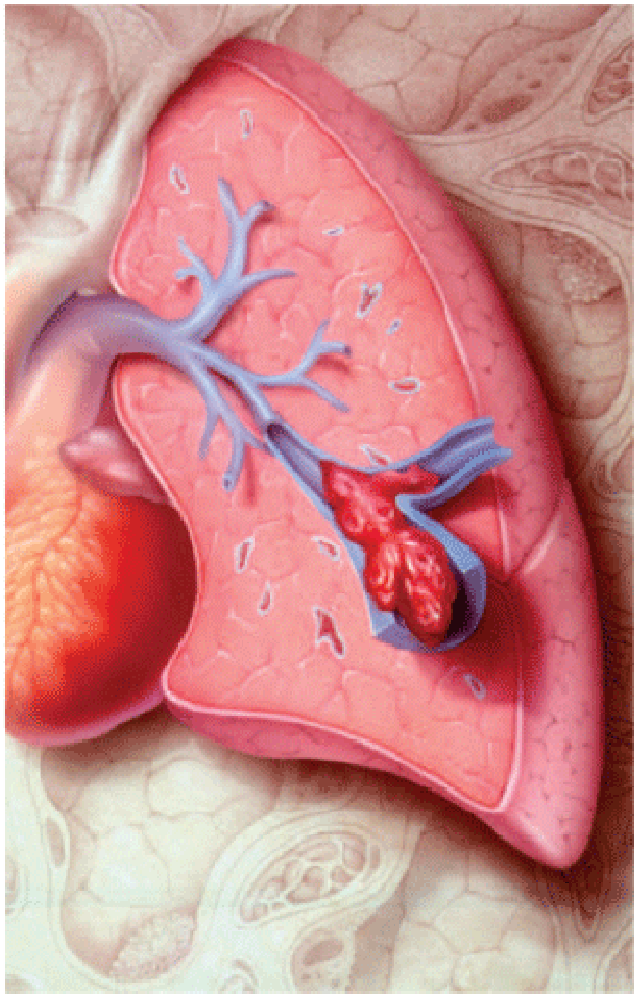




Hluboká žilní trombóza

- **závažná komplikace: plicní embolie**

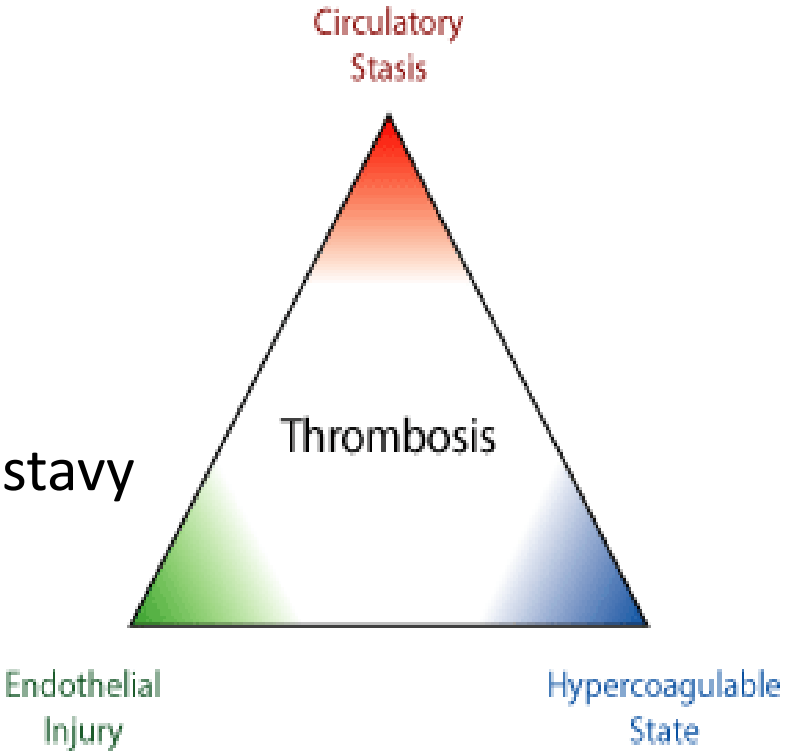




Trombóza

- za normálních okolností – rovnováha mezi vznikem a rozpuštěním trombu
- vyvolávající faktory: **Virchowova trias**

- poškození stěny cévy
- zpomalený tok krve (venostáza)
- zvýšená srážlivost krve = trombofilní stavy



Riziko trombózy

genotyp	*relativní riziko*
normální	**1**
Leiden - heterozygot	**8**
Leiden - homozygot	**80**

- riziko trombózy při užívání hormonální antikoncepce je u heterozygotů 28 – 35 x vyšší

-zvýšené riziko potratů a předčasných porodů

- profylaxe – fraxiparin (nízkomolekulární heparin)
- deriváty dikumarolu- antagonista VIT K (Warfarin, Pelentan)

Praktická část

Izolace DNA

- z buněk bukální sliznice - izolační kit MACHEREY - NAGEL

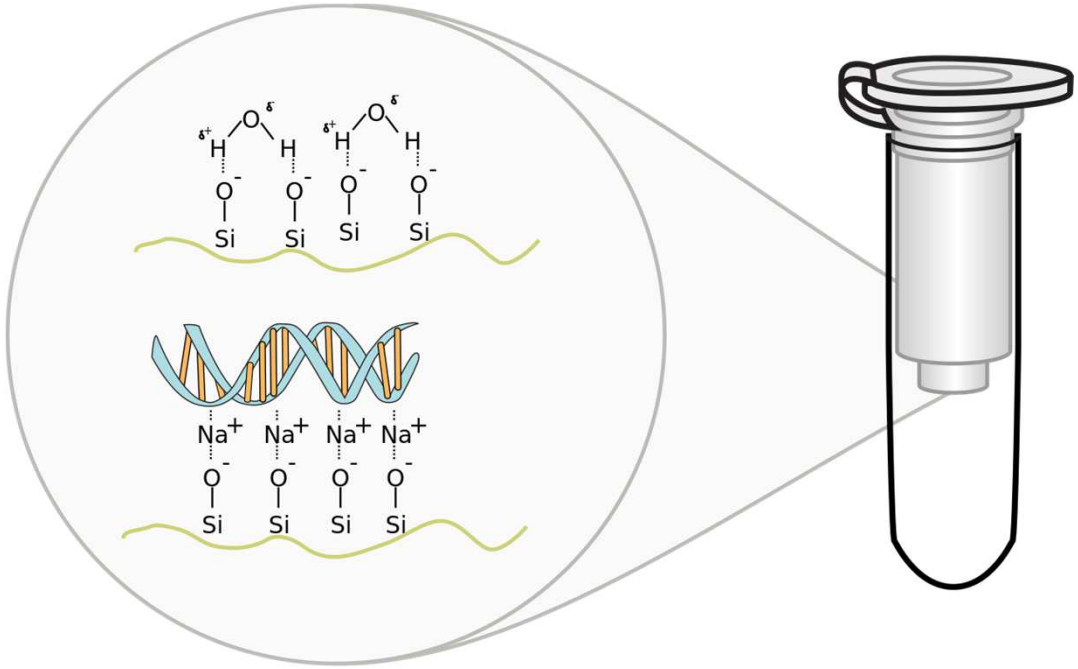
Genomic DNA from blood

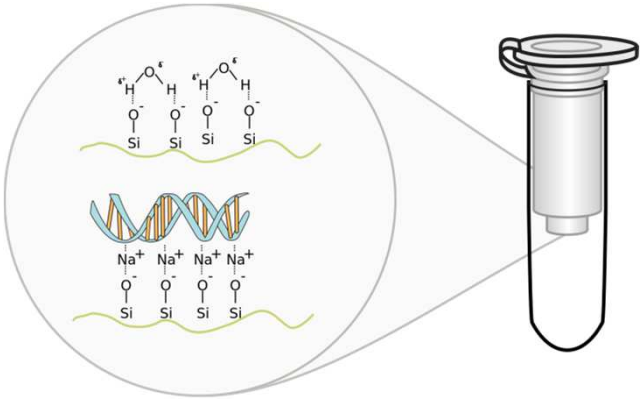
User manual

NucleoSpin® Blood
NucleoSpin® Blood L
NucleoSpin® Blood XL
NucleoSpin® Blood QuickPure

November 2012 / Rev. 13

MACHEREY-NAGEL
www.mn-net.com





Genomic DNA from blood

Protocol-at-a-glance (Rev. 13)

	Mini	Midi	Maxi	Mini
	NucleoSpin® Blood	NucleoSpin® Blood L	NucleoSpin® Blood XL	NucleoSpin® Blood QuickPure
1 Lyse blood samples	200 µL blood 25 µL Pro.K 200 µL B3 Mix 70 °C, 10–15 min	2 mL blood 150 µL Pro.K 2 mL BQ1 Mix 56 °C, 10–15 min	10 mL blood 500 µL Pro.K 10 mL BQ1 Mix 56 °C, 10–15 min	200 µL blood 25 µL Pro.K 200 µL BQ1 Mix 70 °C, 10–15 min
2 Adjust DNA binding conditions	210 µL ethanol	2 mL ethanol	10 mL ethanol	200 µL ethanol
3 Bind DNA	Load all 11,000 x *g*, 1 min	Load 3 mL 4,500 x *g*, 3 min	Load 15 mL 4,000 x *g*, 3 min	Load all 11,000 x *g*, 1 min
	———	Load 3 mL of residue 4,500 x *g*, 5 min	Load 15 mL of residue 4,000 x *g*, 3 min	———
4 Wash silica membrane	500 µL BW 600 µL B5	2 mL BQ2 2 mL BQ2	7.5 mL BQ2 7.5 mL BQ2	350 µL BQ2
1st wash	11,000 x *g*, 1 min	4,500 x *g*, 2 min	4,000 x *g*, 2 min	11,000 x *g*, 3 min
2nd wash	11,000 x *g*, 1 min	4,500 x *g*, 10 min	4,000 x *g*, 10 min	———
5 Dry silica membrane	11,000 x *g*, 1 min	Drying is performed during centrifugation of the last washing step	Drying is performed during centrifugation of the last washing step	Drying is performed during centrifugation of the last washing step
6 Elute highly pure DNA	100 µL BE, (70 °C) RT, 1 min 11,000 x *g* 1 min	200 µL BE (70 °C), RT, 2 min 4,500 x *g*, 2 min	500 µL–2000 µL BE (70 °C) RT, 2 min 4,000 x *g*, 2 min	50 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x *g*, 1 min

buněčná lýza – PROTEINÁZA K

podmínky pro navázání DNA na silikátovou membránu - ETANOL

vazba DNA na silikátovou membránu

proplachování – BW, B5

sušení

uvolnění DNA z kolonky - BE

Genomic DNA from blood

Protocol-at-a-glance (Rev. 13)

	Mini	Midi	Maxi	Mini
	NucleoSpin® Blood	NucleoSpin® Blood L	NucleoSpin® Blood XL	NucleoSpin® Blood QuickPure
1 Lyse blood samples	200 µL blood 25 µL Pro.K 200 µL B3 Mix 70 °C, 10–15 min	2 mL blood 150 µL Pro.K 2 mL BQ1 Mix 56 °C, 10–15 min	10 mL blood 500 µL Pro.K 10 mL BQ1 Mix 56 °C, 10–15 min	200 µL blood 25 µL Pro.K 200 µL BQ1 Mix 70 °C, 10–15 min
2 Adjust DNA binding conditions	210 µL ethanol	2 mL ethanol	10 mL ethanol	200 µL ethanol
3 Bind DNA	Load all 11,000 x *g*, 1 min	Load 3 mL 4,500 x *g*, 3 min	Load 15 mL 4,000 x *g*, 3 min	Load all 11,000 x *g*, 1 min
	——	Load 3 mL of residue 4,500 x *g*, 5 min	Load 15 mL of residue 4,000 x *g*, 3 min	——
4 Wash silica membrane	500 µL BW 600 µL B5	2 mL BQ2 2 mL BQ2	7.5 mL BQ2 7.5 mL BQ2	350 µL BQ2
1st wash	11,000 x *g*, 1 min	4,500 x *g*, 2 min	4,000 x *g*, 2 min	11,000 x *g*, 3 min
2nd wash	11,000 x *g*, 1 min	4,500 x *g*, 10 min	4,000 x *g*, 10 min	——
5 Dry silica membrane	11,000 x *g*, 1 min	Drying is performed during centrifugation of the last washing step	Drying is performed during centrifugation of the last washing step	Drying is performed during centrifugation of the last washing step
6 Elute highly pure DNA	100 µL BE, (70 °C) RT, 1 min 11,000 x *g* 1 min	200 µL BE (70 °C), RT, 2 min 4,500 x *g*, 2 min	500 µL–2000 µL BE (70 °C) RT, 2 min 4,000 x *g*, 2 min	50 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x *g*, 1 min

Izolace DNA ze stěru bukální sliznice - stručný návod

Izolační kit MACHEREY-NAGEL

Postup:

1. Mnohokrát přejedeme odběrovou tyčinkou po sliznici pravé i levé tváře, **cca 2-3 min**.
2. Přeneseme do **1,5ml eppendorfky** a pomocí víčka a stěny zkumavky odlomíme část s vatičkou.

Lýza buněk

3. Přidáme **100 µl PBS**, **15 µl proteinázy K**, **100 µl roztoku B3**. Vortexujeme **60s**.
4. Vložíme do termobloku a inkubujeme **10 min** při **56°C**. Vortexujeme **30s**.
5. Vložíme do termobloku a inkubujeme **5 min** při **70°C**. Vortexujeme **30s**.
6. Přidáme **100 µl 96% ethanolu** a vortexujeme **10s**. Lehce stočíme.

Adsorpce DNA, odstranění nečistot

7. Přeneseme **lyzát** (bez vatičky) pipetou na **kolonku** a centrifugujeme **12000 ot/min, 1min**.
8. Vložíme kolonku do nové zkumavky a přidáme **400 µl roztoku BW**, centrifugujeme **12000 ot/min**, po dobu **1 min**.
9. Vložíme kolonku do nové zkumavky a přidáme **400 µl roztoku B5**, centrifugujeme **12000 ot/min,** po dobu **1 min**.
10. Slijeme promývací roztok ze spodní zkumavky, vložíme kolonku zpět do zkumavky a centrifugujeme **12000 ot/min** po dobu **3 min**.

Uvolnění DNA

11. Vložíme kolonku do 1,5ml eppendorfky, na dno kolonky opatrně napipetujeme **50 µl roztoku BE** předehřátého na **70°C**. Necháme stát **1 min** při pokojové teplotě.
12. Centrifugujeme **12000 ot/min** po dobu **1 min**.

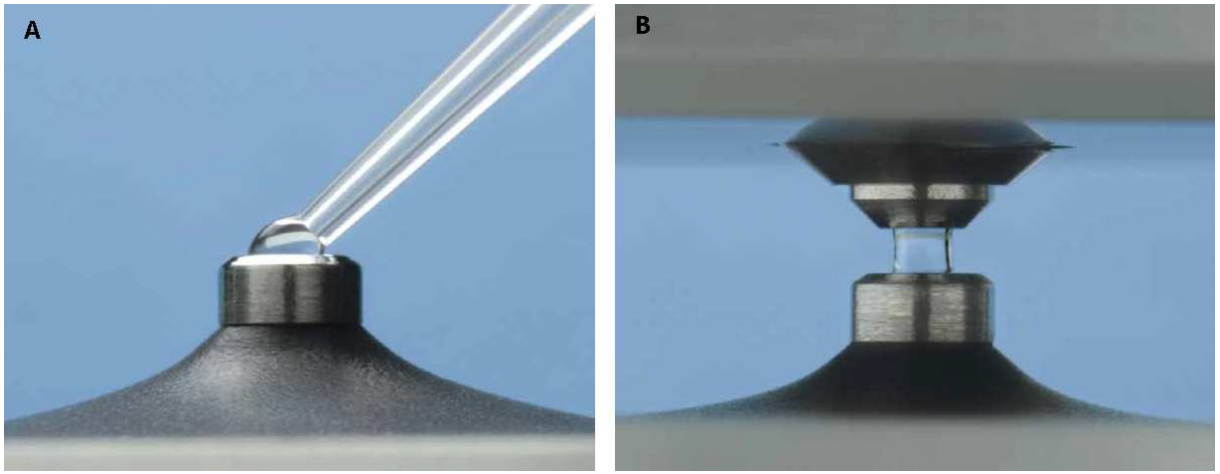
Změření koncentrace DNA, kontrola čistoty

⇒ spektrofotometricky

$A_{260} = 1$

- **dsDNA** **50 µg/ml**
- **ssDNA** **37 µg/ml**
- **RNA** **40 µg/ml**

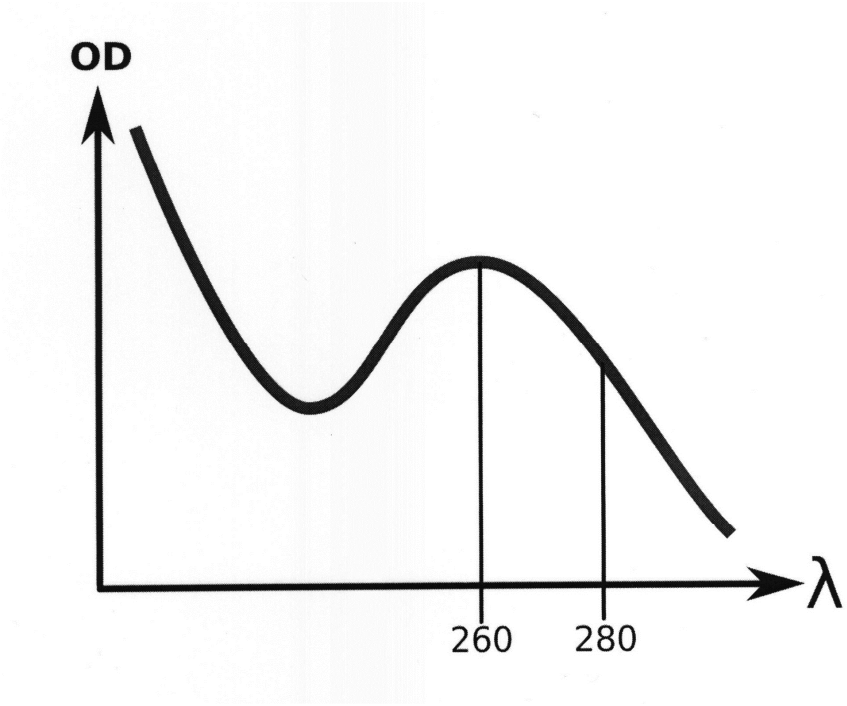
Mikroobjemový spektrofotometr DeNovix DS-11 - nanášíme 1µl vzorku.



STANOVENÍ KONCENTRACE NK A KONTROLA ČISTOTY

Přítomnost **proteinů**: $\mathbf{A_{260} / A_{280} > 1{,}8}$

Přítomnost ostatních kontaminant: $\mathbf{A_{260}/A_{230} > 2}$



Změření koncentrace DNA, kontrola čistoty

Postup:

1. Na spektrofotometru zvolíme program: „dsDNA“.
2. Spektrofotometr vynulujeme proti slepému vzorku („blank“) - v našem případě pufr BE: Na spodní plošku spektrofotometru napipetujeme 1µl pufru BE, přiklopíme a stiskneme tlačítko BLANK. Poté odklopíme víčko, otřeme obě plošky (spodní i horní umístěnou na víčku) buničinou do sucha.
3. Změříme absorpční spektrum vzorku 220 nm - 350nm: Na spodní plošku spektrofotometru napipetujeme 1µl vzorku, přiklopíme a stiskneme tlačítko MEASURE. Poté odklopíme víčko, otřeme obě plošky (spodní i horní umístěnou na víčku) buničinou do sucha.
4. Přístroj zobrazí na displeji změřené spektrum, koncentraci DNA a dále poměry A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230}, které nám poskytnou informaci o čistotě roztoku.

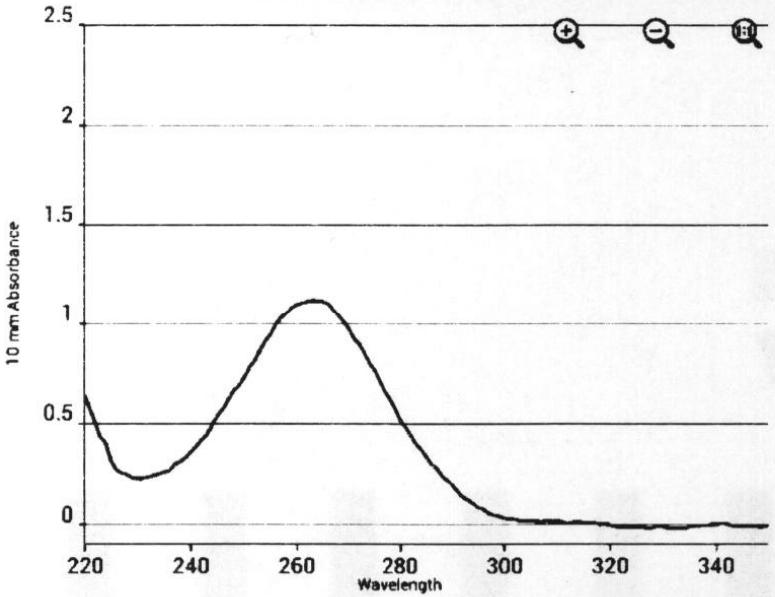
dsDNA RUN REPORT GRAPH GENERAL ACCOUNT

Blank Measure AutoRun

JD x

2

50



54,80	ng/µL	1,096	A260
		4,79	260/230
		2,12	260/280

Baseline correction at 340 nm

Detekce Faktor V Leiden

ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA

PCR primer

AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAGGCAGGAACAACACCATGATCAGAGCAG

TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG

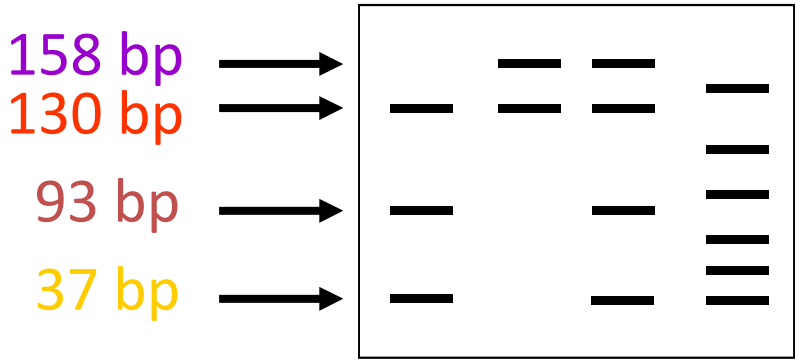
AAAATGATGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA

TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCGAG

GAATACAGGTATTTTGTCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT

PCR primer

délka PCR produktu 288 bp



FVL F	5'- GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA -3'	23 mer
FVL R	5'- TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC -3'	23 mer