

Metode za odkrivanje/analizo mutacij

Celična biologija z genetiko
1. letnik UŠ LBM, št. leto 2012/13



Detekcija polimorfizmov/mutacij



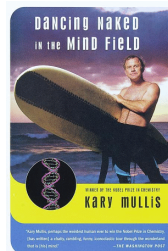
- Sprva so razlike v genomu med posamezniki ugotavljali le z opazovanjem in primerjavo metafaznih kromosomov pod mikroskopom (t.i. kariotipizacija)



Pod mikroskopom so vidne le spremembe > 3Mbp!

Prelomna odkritja v molekularni diagnostiki

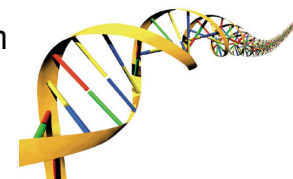
- sekvenciranje** (~1975) za določanje nukleotidnega zaporedja DNA
 - Frederick Sanger (Cambridge)
 - Walter Gilbert & Allan Maxam (Harvard)
- verižna reakcija s polimerazo (PCR: polymerase chain reaction)** (1984) za pomnoževanje določenih odsekov DNA
 - Kary Mullis (Cetus Corp.)
- polimorfizmi dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP: restriction fragment length polymorphism)** (1985)



Lastnosti molekule DNA



- Zelo stabilna molekula
- Pri pH <4 in >9 ter visoki temperaturi (nad 90°C) se reverzibilno denaturira (ddDNA → ssDNA)
- Precipitira (obarja se) v alkoholu (etanol, izopropanol)
- Absorbira pri $A_{\max}=260 \text{ nm}$



Viri DNA

- Vir DNA je **vsaka celica z jedrom** (eritrociti nimajo DNA)
- Za iskanje zarodnih, dednih mutacij je najpogostejši vir kri (levkociti in retikulociti periferne krvi)
- Za iskanje somatskih (tkivnih) mutacij (npr. pri raku) je vir DNA posamezno tkivo oz. tumor
- Prenatalna diagnostika: celice ploda v amnijski tekočini ali celice horionskih resic
- Sodna medicina: bris ustne sluznice, sperma, lasje (dlake),...



Izolacija DNA – različne izvedbe

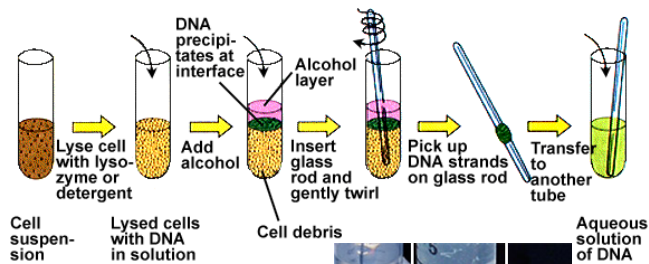
- 1. Liza celic** (razgradnja celične membrane, razpad celice in sprostitve vsebine):
 - z detergenti, npr. SDS,
 - mehansko – mletje, homogeniziranje.
- 2. Odstranitev proteinov**, ki so vezani na DNA:
 - encimska razgradnja, npr. proteinaza K,
 - ekstrakcija z organskimi topili – proteini so topni v fenolu in kloroformu,
 - kromatografija – vezava DNA na različne pozitivno nabite snovi npr. vezava na kolone.
- 3. Purifikacija/koncentriranje DNA** (precipitacija v alkoholu → centrifugiranje → raztapljanje v majhnem volumnu prečiščene vode ali pufra)



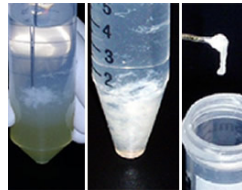
Domača naloga: Izolacija DNA v kuhinji:

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>

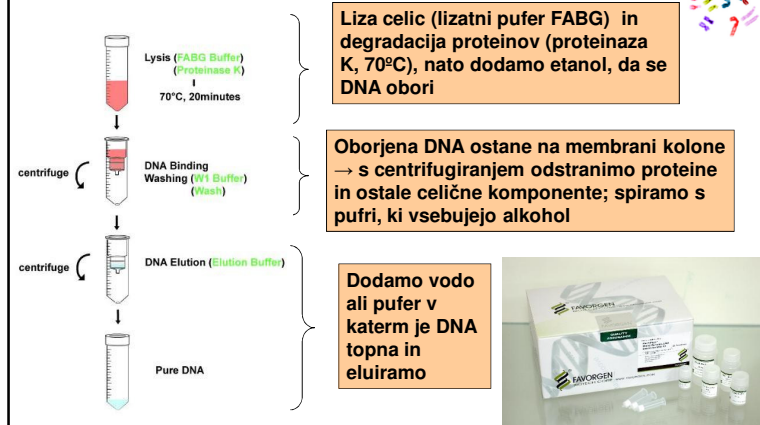
Izolacija DNA – enostaven primer



Ves uporabljeni pribor mora biti STERILEN!



Izolacija DNA – komercialni kompleti za izolacijo



Liza celic (lizatni pufer FABG) in degradacija proteinov (proteinaza K, 70°C), nato dodamo etanol, da se DNA obori

Oborjena DNA ostane na membrani kolone → s centrifugiranjem odstranimo proteine in ostale celične komponente; spiramo s pufrji, ki vsebujejo alkohol

Dodamo vodo ali pufer v katerem je DNA topna in eluiramo





Izolacija RNA

aqueous phase: RNA
interphase: DNA
organic phase: proteins, lipids

- Običajno iz tkiv v katerih želimo analizirati izražanje genov (prepis v mRNA)
- RNA je zelo nestabilna v primerjavi z DNA ter podvržena razgradnji z endogenimi (v celici/tkivu) in eksogenimi (prisotne plovod!) **RNazami**
- **Preprečiti moramo razgradnjo RNA** - predvsem moramo biti pri izolaciji hitri, ves pribor mora biti "RNase-free" – brez prisotnosti RNaz, delamo v posebni komori, večkrat menjamo rokavice...

Verižna reakcija s polimerazo

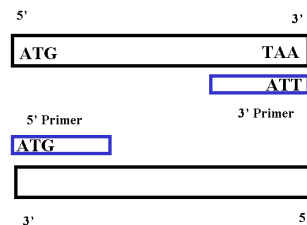
Polymerase Chain Reaction = PCR



- Revolucija na področju molekularne genetike (Kary Mullis, 1984)
- Hitra in vsestranska *in vitro* metoda za **pomnoževanje tarčnih (izbranih) zaporedij DNA**
- Omogoča **selektivno** pomnoževanje izbranega zaporedja v heterogenem vzorcu (npr. genomska DNA posameznika)
- Zahteva: **poznati moramo določeno zaporedje tarčnega gena**

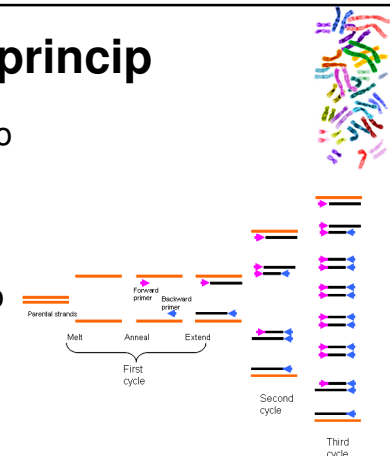
PCR – princip

- **Osnova** = reakcija podvajanja DNA molekule (in vitro)
- Uporabimo **začetne oligonukleotide** (dolžina 15-25 bp), ki so komplementarni sekvenci tarčnega gena, ki jo želimo pomnožiti:



PCR – princip

- Z encimom polimerazo sintetiziramo komplementarni verigi → **proces ciklično ponavljamo**
- Novonastale verige so matrica za naslednji cikel pomnoževanja
- **Ekspozitna rast**: v idealnih pogojih je število pomnoženih PCR produktov v n-tem ciklu 2^n .

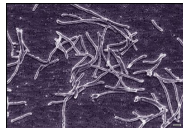


PCR – kaj jo omogoča?

- DNA se mora denaturirati (razpreti) – to dosežemo s povišano temperaturo (93-95°C)
- Običajne polimeraze pri taki temperaturi niso stabilne!
- Rešitev: **termostabilne polimeraze** mikroorganizmov, ki živijo v termalnih vrelih – najbolj razširjena je **Taq DNA polimeraza** (*Thermus aquaticus*)

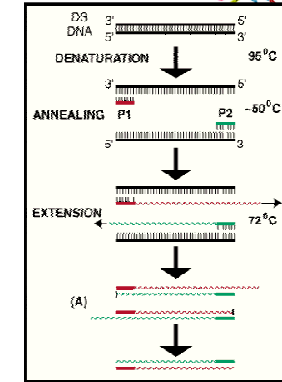


Ideja vredna
Nobelove
nagrade



PCR - potek

1. **denaturacija**: segrevanje na 94-95 °C
 2. **prileganje oligonukleotidnih začetnikov (primerjev)** pri 40-60 °C
 3. **izgrajevanje komplementarne verige s termostabilno DNA polimerazo** (72 °C)
- stopnje 1-3 sestavljajo en **cikel**, ki ga 20-40-krat ponovimo



http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html#

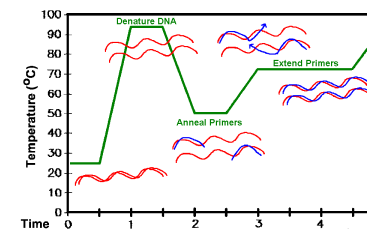
PCR - sestavine reakcijske zmesi

- vzorec DNA z odsekom, ki ga želimo pomnožiti (matrica)
- dva oligonukleotidna začetnika (omejimo odsek za pomnoževanje)
- dATP, dCTP, dTTP, dGTP (dNTP)
- termostabilna DNA polimerazo (običajno Taq)
- Mg⁺⁺
- reakcijski pufer



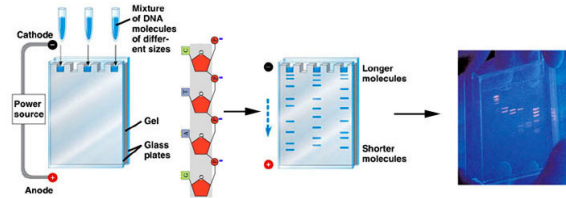
PCR - aparature

- reakcija poteka v cikličnem termostatu
- uspešnost reakcije preverimo z **elektroforezo** na agaroznem gelu



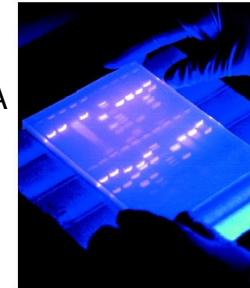
Elektroforeza (EF) (I)

- EF je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju.
- Nabiti delci potujejo proti elektrodi z nasprotnim nabojem:
 - (+) nabiti delci proti (-) nabiti elektrodi (KATODI)
 - (-) nabiti delci pa proti (+) nabiti elektrodi (ANODI)
- DNA je negativno nabita → potuje proti anodi



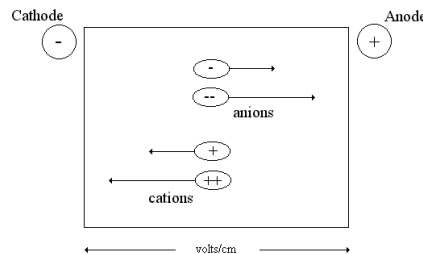
Vplivi na hitrost potovanja nabitega delca v električnem polju

1. NABOJ DELCA
2. VELIKOST IN OBLIKA DELCA
3. JAKOST EL. POLJA
4. LASTNOSTI PUFRA
5. TEMPERATURA
6. LASTNOSTI NOSILCA



Cilj elektroforeze: dobra ločba v čim krajšem času → kompromis med naštetimi dejavniki (+ cena)

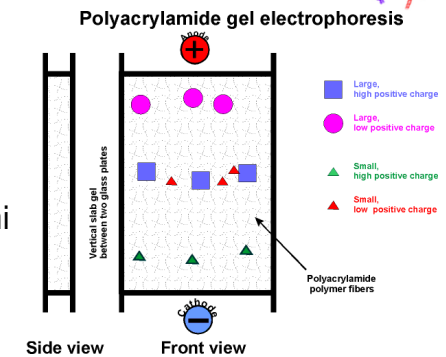
1. Naboj delca



- **↑ naboj → ↑ hitrost potovanja**
- Naboj je odvisen od pK skupin in pH pufra
- izoelektrična točka (pI) je pH, pri katerem je neto naboj delca enak 0

2. Velikost in oblika delca

- **↑ masa ali velikost molekule → ↓ hitrost potovanja**
- nosilci z majhnimi porami delujejo kot molekularna sita



3. Jakost elek. polja

- \uparrow jakost el. polja \rightarrow \uparrow hitrost potovanja ir. \downarrow čas EF
- Vendar: večja jakost el. Polja zahteva izvajanje EF pri višji napetosti. To povzroči naraščanje temperature (T), kar vodi v:
 - izhlapevanje pufra



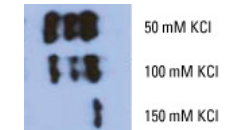
4. Lastnosti pufra

Vloga pufra:

- zagotavlja konstanten pH in s tem vpliva na naboj delcev
- služi kot prevodnik el. toka

Zahteve za EF pufer:

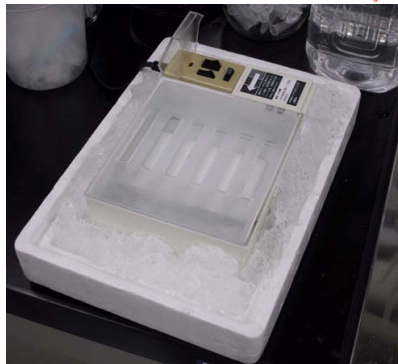
- ne sme reagirati z vzorcem
- imeti mora ustrezno ionsko ionsko jakost



Pufri, ki se uporabljajo za EF nukleinskih kislin:
tris-acetat EDTA (TAE), tris-borat EDTA (TBE) in tris-fosfatni pufri

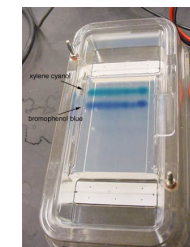
5. Temperatura

- \uparrow T EF \rightarrow \downarrow upor in hitrejša ločba, vendar:
 - nevarnost denaturacije proteinov,
 - izhlapevanje pufra in s tem \uparrow ionska jakost
- Rešitev: **termostatiranje oz. hlajenje**

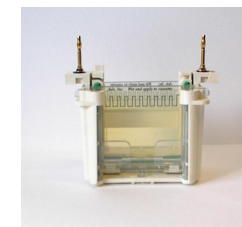


6. Lastnosti nosilca

- Nosilci: agar, agaroz, škrobni gel, papir, celulozni acetat (CA), **poliakrilamidni (PA) gel**
- danes so nosilci izbora agaroz, CA in PA



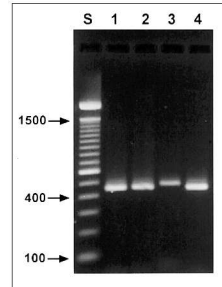
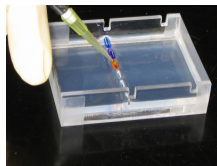
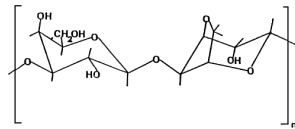
agaroz



poliakrilamid

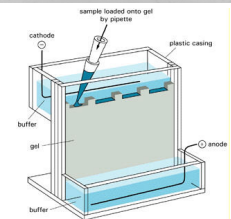
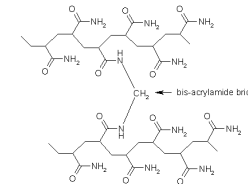
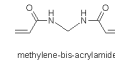
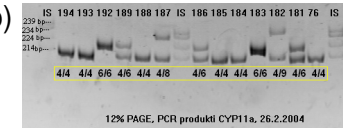
Nosilci za EF – agarozni gel

- **Agaroz** = kompleksen polisaharid
- Horizontalna EF



Nosilci za EF – poliakrilamidni g

- **Poliakrilamid** = nastane s polimerizacijo akrilamida in bisakrilamida, večja ločljivost kot agarozni gel (do nekaj bp)
- Vertikalna EF

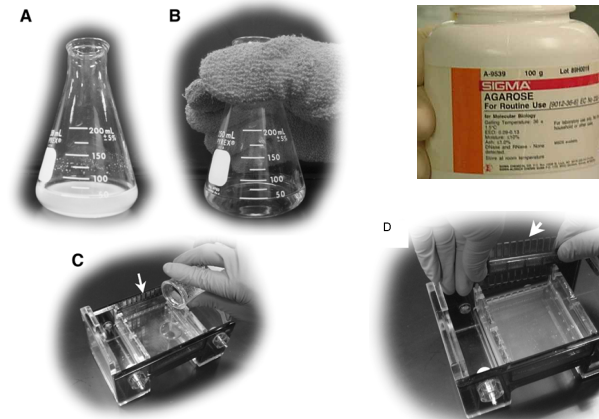


Potek elektroforeze

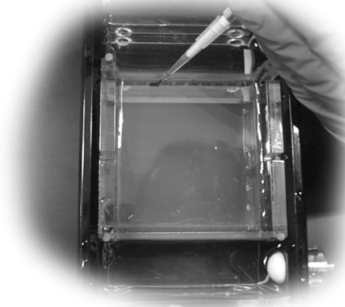
1. priprava gela
2. priprava in nanos vzorca (DNA, RNA, PCR produkt, restrikcijski fragmenti, proteini)
3. ločba
4. barvanje (barvilo lahko že predhodno dodamo v gel med pripravo)
5. odčitavanje rezultatov



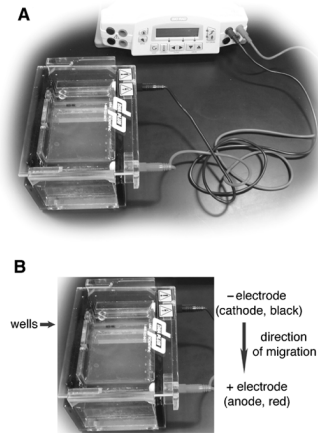
1. Priprava gela



2. Nanos vzorca

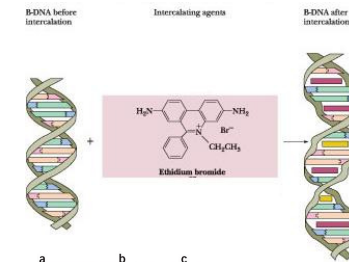
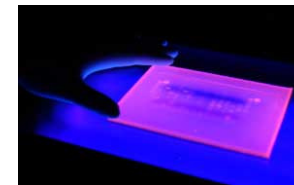


3. Ločba

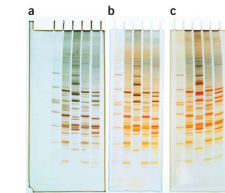


4. Barvanje

- interkalatorji (UV detekcija):
 - ETIDIJEV BROMID
 - SYBR Green, SYBR Safe, ...

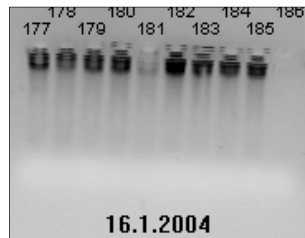


- **Barvanje s srebrom**
(detekcija pod vidno svetlobo)

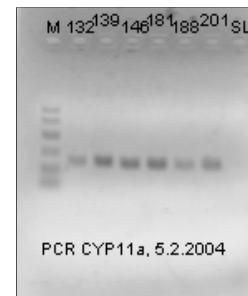


Analiza rezultatov

- Običajno odčitamo položaj lis glede na standard (UV/VIS)



Genomska DNA



PCR produkti

Potek tipične analize – začetne stopnje

1. Izolacija genomske DNA
2. Pomnožitev želenega odseka z reakcijo PCR
3. Elektroforeza PCR produkta na agaroznem gelu:
 - preverimo **prisotnost** produkta
 - preverimo **specifičnost** produkta

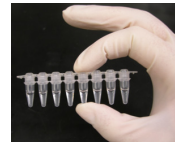
Kako postopamo naprej?



Aplikacije reakcije PCR

- **Genotipizacija** že znanih polimorfizmov oz. mutacij (**RFLP, SSCP, sekvenciranje**):

- prirojene bolezni
- maligna obolenja
- infekcijske bolezni
- transplantacije (ugotavljanje skladnosti tkiv)
- ugotavljanje očetovstva
- sodna medicina

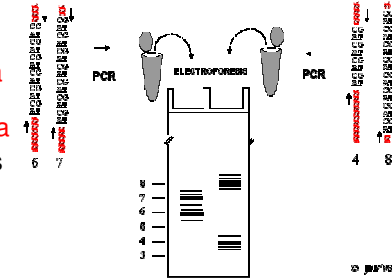


- **Iskanje novih mutacij (SSCP, sekvenciranje)** → ko pride do neujemanja med genotipom in fenotipom



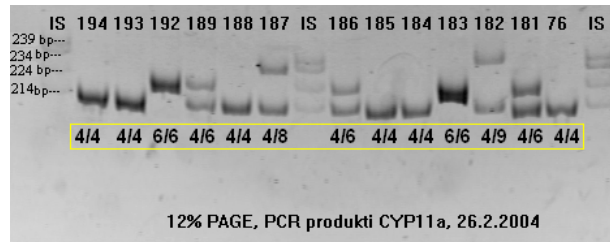
Genotipizacija na osnovi mikrosatelitnih označevalcev

- S PCR reakcijo pomnožimo odsek DNA, ki vsebuje mikrosatelitno zaporedje
- **Različni aleli** imajo **različno dolžino** glede na **število ponovitev mikrosatelitnega zaporedja**
- Izvedemo **elektroforezo** s katero ločimo PCR produkte po velikosti (poliakrilamidni gel ali kapilarna elektroforeza)
- **Odčitamo rezultat** (dolžino alelov primerjamo s standardom)



Genotipizacija na osnovi mikrosatelitnih označevalcev - primer

- V promotorskem delu gena *CYP11A1* se nahaja mikrosatelitno zaporedje $(TTTTA)_n$
- Najbolj pogosti aleli v populaciji imajo 4, 6, 8 in 9 ponovitev zaporedja TTTTA



RFLP

- Najstarejša metoda = **polimorfizmi dolžin restriktivnih fragmentov** ali **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*)
- Temelji na uporabi encimov **restriktivnih endonukleaz**:
 - bakterijski encimi, ki cepijo dsDNA na točno določenem mestu
 - prepoznajo 4-8 bp dolga, običajno **palindromna** zaporedja v dvoverižni DNA

perica reže raci rep;
5' AGCT 3'

3' TCGA 5'
- v okviru SNP-ja oz. v njegovi bližini je cepitveno mesto
- **SNP uniči ali ustvari prepoznavno mesto za določeno rest**
- [http://highered.mcgraw-hill.com/olwweb/cgi/pluginpop.cgi?it=swf:535::535::sites/dl/free/0072437316/120078/bio20.swf::Restriction Fragment Length Polymorphismsresection](http://highered.mcgraw-hill.com/olwweb/cgi/pluginpop.cgi?it=swf:535::535::sites/dl/free/0072437316/120078/bio20.swf::Restriction%20Fragment%20Length%20Polymorphisms%20resection)

Animacija:

http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html#

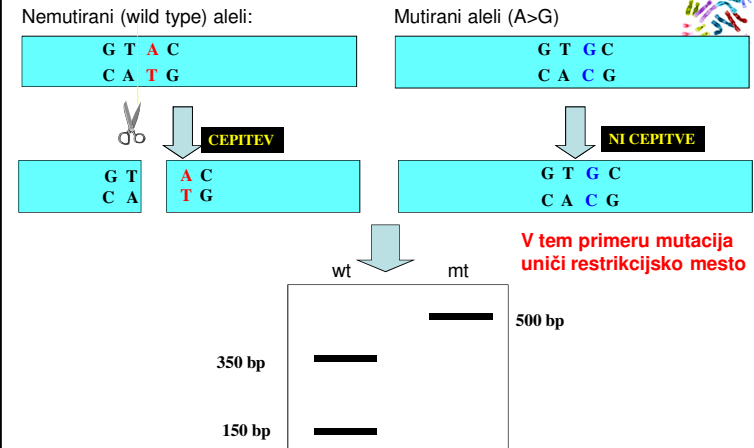


Restriksijski encimi

- V bakterijah razgradijo tujo DNA, npr. virusno. Bakterijska DNA je zaščitena pred cepitvijo z modifikacijo baz (metilacijo) v prepoznavnem mestu.
- aktivnost encima: [U/ μ L]
- izoshizomere: encimi iz različnih bakterij z enakim prepoznavnim mestom (lahko različno cepitveno mesto)
 - Smal: CCC↓GGG
 - XmaI: C↓CCGGG
- Po cepitvi z endonukleazami lahko nastanejo topi (blunt) ali lepljivi (sticky) konci:



Princip analize RFLP



Primer analize RFLP

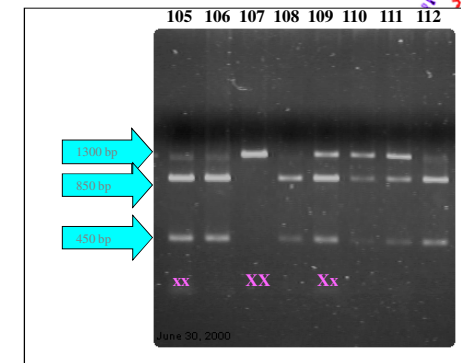
- Restriksijska zmes:

sestavina	volumen (μ L)
bidestilirana voda	9,37
XbaI (20 U/ μ L)	0,13
pufer NEB2 (10X)	1,5
PCR produkt	4

- inkubacija pri 37 °C preko noči
- EF na 2% agaroznem gelu z EtBr (t = 60 min, U= 90 V)
- presvetlitev gela s svetlobo (λ = 302 nm) in detekcija lis s kamero

Rezultat analize RFLP z encimom *XbaI*

- Dolžina PCR produkta: 1300 bp
- XbaI razcepi mutirani alel na 850 bp in 450 bp

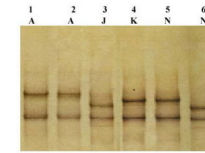


Naloga – restrikcija plazmida

- Plazmid je dolg 5.4 kb
- Restriksijska encima *Bam*HI in *Not*I imata vsak eno restriksijsko mesto v plazmidu, ki sta med seboj oddaljeni 1.4 kb.
- Kako dolge fragmente pri EF dobimo po restrikciji plazmida z:
 - *Bam*HI
 - *Not*I
 - *Bam*HI in *Not*I hkrati?



SSCP

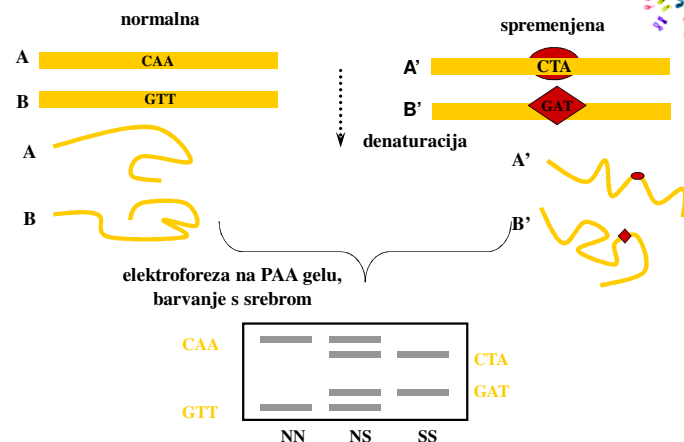


- zaradi razlike v nukleotidnem zaporedju **različna 3D struktura ssDNA (single stranded; enoverižna DNA)** → različen vzorec potovanja

POSTOPEK

- **denaturacija produktov PCR** in hipna ohladitev na ledu → ssDNA
- EF ssDNA na poliakrilamidnem gelu
- barvanje s srebrom in identifikacija lis

SSCP

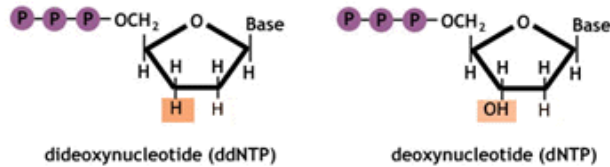


Določanje nukleotidnega zaporedja DNA (Sekvenciranje)

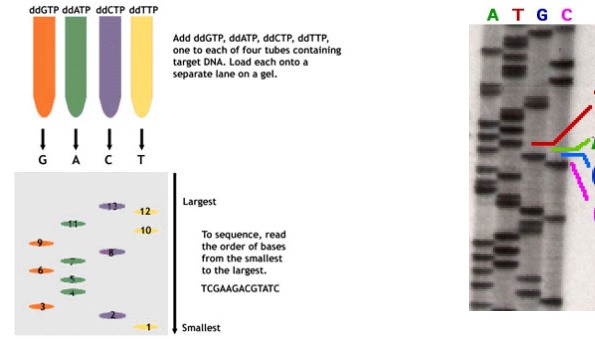
- metoda po **Sangerju** (tehnika terminacije verige - angl. *chain terminator technique*) = razvila sta jo F. Sanger in A. R. Coulson (1975).
- Odsek DNA, ki ga želimo sekvencirati, nam služi kot šablona za **PCR**
- toplotna **denaturacija** → ssDNA → oligonukleotidni začetnik (samo 1) → podaljševanje z DNA-polimerazo
- poleg dNTP v reakcijski zmesi še **dideoksinukleotidi** (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)

Dideoksinukleotidi (ddNTP)

- ddNTP-ji se lahko vgradijo v verigo namesto dNTP. Vgradnja dideoksi-nukleotida, ki nima 3'-OH skupine na deoksiribozi povzroči **prekinitev sinteze DNA verige od ddNTP naprej.**

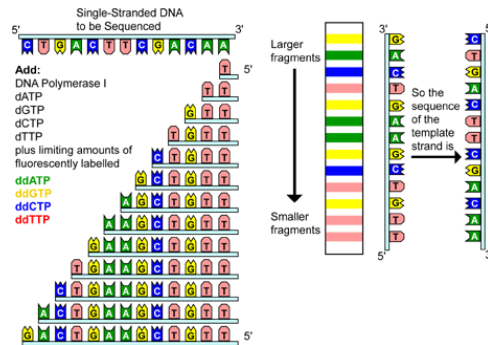


Sekvenciranje – prvotna izvedba (radioaktivno označeni ddNTP)

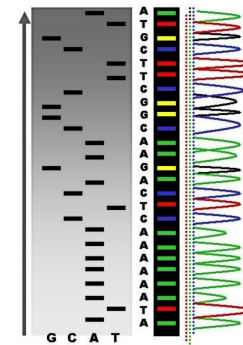


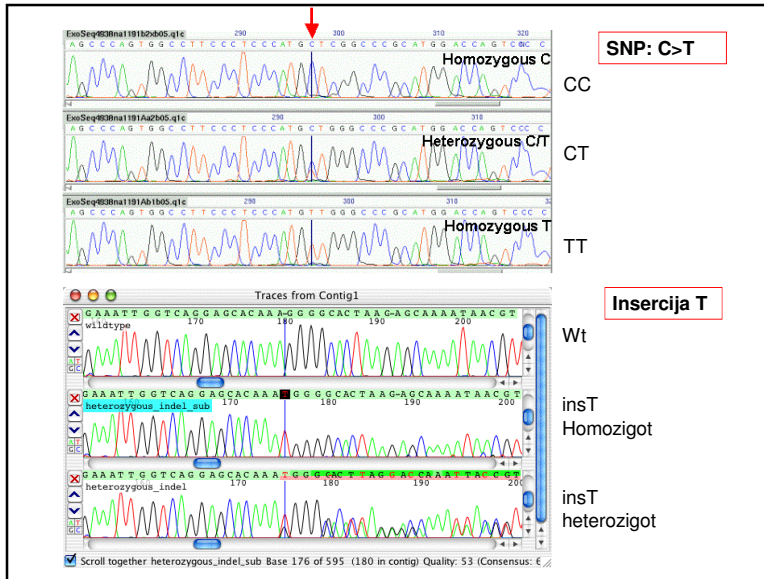
<http://www.youtube.com/watch?v=vK-HIMaitnE>

Sekvenciranje - novejša izvedba (flourescenčno označeni ddNTP)



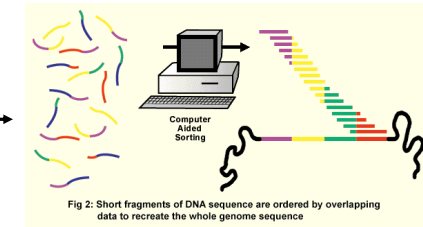
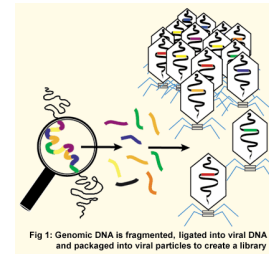
Sekvenciranje - novejša izvedba (flourescenčno označeni ddNTP)



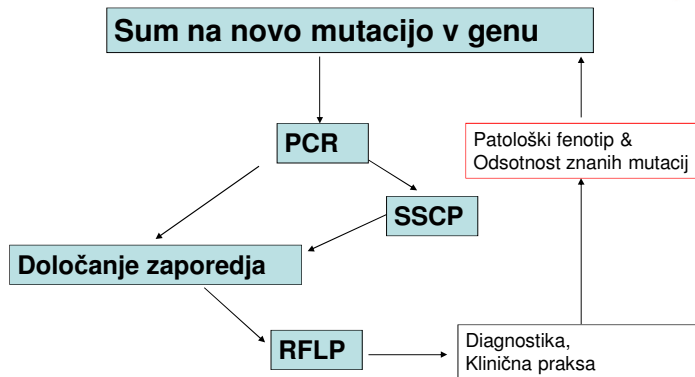


Sekvenciranje genoma

- **Po delih (shotgun)**; posamezne dele med seboj združijo računalniška orodja (glede na prekrivanje)
- Problematični so deli, ki vsebujejo dolge ponavljajoče sekvence



Pot odkrivanja nukleotidnih sprememb



Prednosti in slabosti različnih metod za odkrivanje mutacij

metoda	prednosti 👍	slabosti 🙅
RFLP 	•Enostavna	•samo za znane spremembe •za vsako spremembo ne obstaja encim
SSCP 	•bolj zahtevna kot RFLP •za dokazovanje znanih in neznanih sprememb	•lahko spregleda spremembo •ne locira spremembe
sekvenciranje 	•edina točno identificira spremembo	•tehnično zahtevna, posebna aparatura •draga •dolgotrajna

Podatkovne baze



Zaporedje genoma:

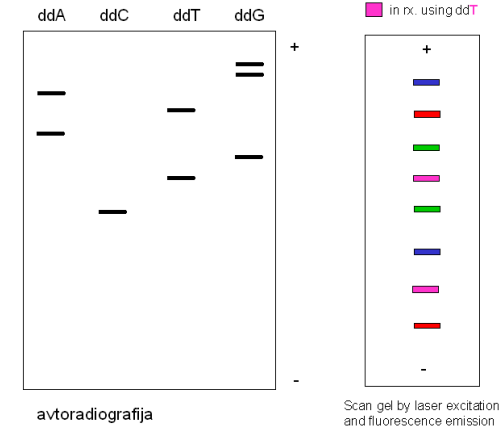
- **NCBI** (The National Center for Biotechnology Information)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>
- **Ensembl!** <http://www.ensembl.org/index.html>

Mutacije:

- Podatkovna baza človeških mutacij (Human Gene Mutation Database, **HGMD**)
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- **OMIM** (Online Mendelian Inheritance in Man)

Naloga - sekvenciranje

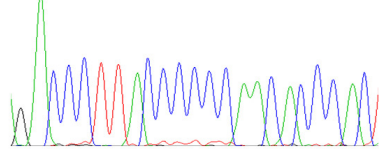
- Določite sekvenco
- matrične DNA po obeh metodah sekvenciranja (od 5' do 3'-konca)!
- Ali je sekvenca v obeh primerih enaka?
- Če ne, za kakšno spremembo DNA zaporedja gre?



Naloga 24.05.13

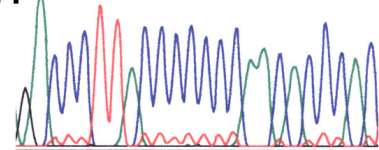
Zapišite sekvenco Za kakšno spremembo DNA zaporedja gre v primeru A?

A G A C C C T T A C C C C C C C A A C A C C C A C



G A C C C T T A C C C C C C C A A C A C C C A C

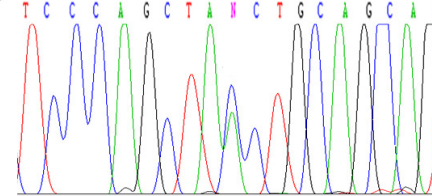
WT



• **Legenda:**

Ze=A
M=C
Rd=T
Č=G

B



- Za kakšno spremembo DNA zaporedja gre v primeru B?
- Ali je sprememba v homo- ali heterozigotnem stanju?