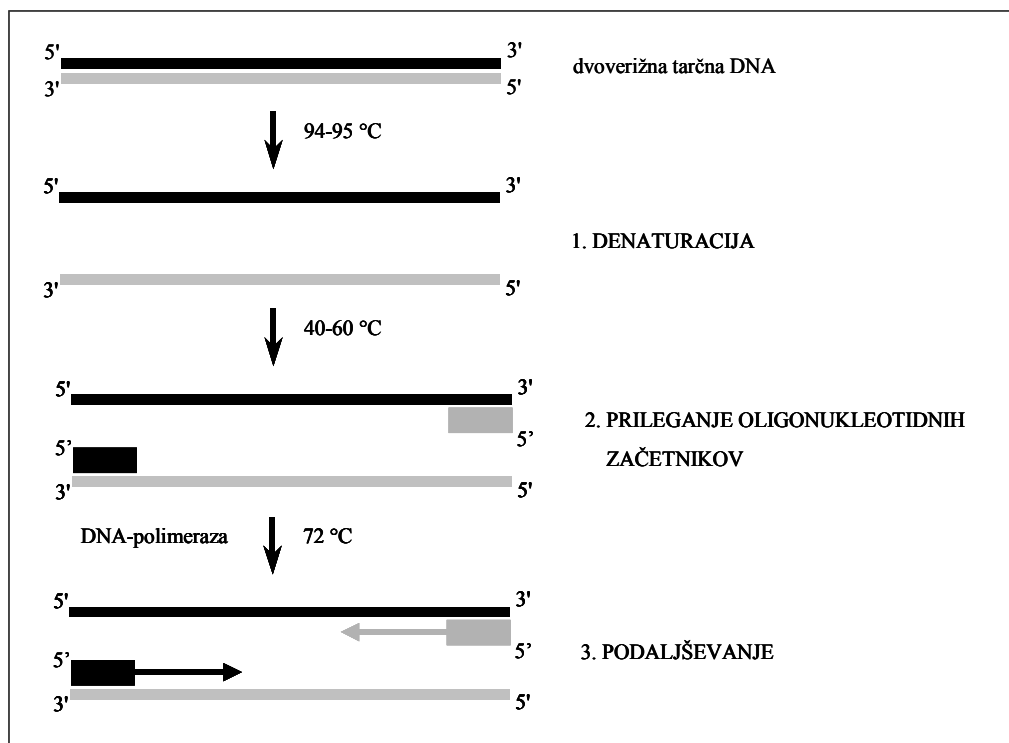


GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

Teoretične osnove

1. Konvencionalni PCR

Za večino metod genotipizacije moramo odsek DNA, ki ga analiziramo, predhodno pomnožiti. To naredimo z reakcijo verižne polimerizacije (PCR), ki je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin. S PCR lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij željenega odseka DNA. Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca (slika 1).



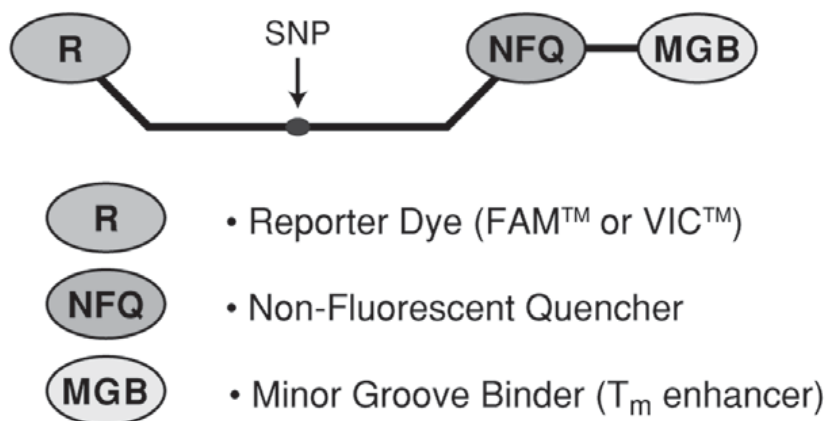
Slika 1: Princip verižne reakcije s polimerazo (PCR). Stopnje denaturacije, prileganja in podaljševanja sestavljajo en cikel.

Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksinukleozid-trifosfati, ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA, Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA-polimeraza. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige. V stopnji denaturacije s segrevanjem na 94-95 °C razklenemo verigi DNA in iz dvoverižne dobimo enoverižni DNA. Nato znižamo temperaturo na 40-60 °C, pri čemer pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNA. Temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna za delovanje termostabilne DNA-polimeraze. Encim se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNA. DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij v drugem ciklu. Teoretično se torej z vsakim ciklom število kopij željenega odseka DNA podvoji. Navadno izvedemo 20-40 ciklov. Pri konvencionalnem (običajnem) PCR poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju, in sicer navadno z elektroforezno ločbo produktov na agaroznem gelu. Dobljeni produkti PCR nam najpogosteje služijo kot izhodni material za nadaljnje analize, s katerimi ugotavljamo

prisotnost sprememb v nukleotidnem zaporedju posameznikove DNA. Včasih pa nas zanima tudi, kakšna je koncentracija določene DNA ali RNA v preiskovanem vzorcu (npr. virusne, bakterijske). Teoretično se število kopij željenega odseka v vsakem ciklu podvoji, kar pomeni, da iz količine produkta PCR v posameznem ciklu lahko določimo začetno število kopij matrice v vzorcu. Teoretičnemu izkoristku pa se dejanski izkoristek PCR približa le v začetnih ciklih, ko količina produkta narašča eksponentno. Zaradi ločenosti pomnoževanja in detekcije predstavlja kvantifikacija nukleinskih kislin šibko točko konvencionalnega PCR.

2. PCR v realnem času

PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Sinonim zanj je kinetični PCR, ker omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in detekcija produktov PCR torej potekata sočasno. Temelji na merjenju fluorescence. Uporabljamo s fluorescentnimi barvili označene sonde. To so kratki oligonukleotidi, ki se specifično vežejo na tarčno zaporedje. Za meritev signala izkoriščamo princip fluorescenčnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. Kadar sta dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata, dovolj blizu, ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, to pa posledično emitira svetlobo drugačne valovne dolžine. Kot akceptorje lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo (dušilci).



Slika 2: Zgradba hidrolizirajoče sonde.

Pri hidrolizirajočih sondah izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost nekaterih DNA-polimeraz. Najpogosteje se uporablja Taq DNA-polimeraza. V reakcijsko zmes dodamo sondo, ki specifično prepozna in se v stopnji prileganja veže na tarčno zaporedje na DNA. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Pri intaktni sondi fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo, vezano na 5' koncu, prestreže drugo barvilo, imenovano dušilec, ki je vezano na 3' koncu. V novejši izvedbi je molekula dušilca lahko tudi nefluorescentna. Tekom PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnosti Taq DNA-polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in tako je onemogočeno prestrazanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR..

Najpomembnejša prednost PCR v realnem času pred konvencionalnim PCR je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin, saj nam kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Zelo pomembno pa je tudi, da nam PCR v realnem času omogoča enostavnejšo genotipizacijo. Genotipizacija s hidrolizirajočimi sondami je primerna za ugotavljanje prisotnosti znanih

točkastih sprememb. Gre za homogen, enostopenjski test. Odsotnost post-PCR stopenj pomeni krajši čas analize in manjšo možnost kontaminacije.

Primeri uporabe genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami

1. Primeri uporabe v kliničnih laboratorijih

Analitika nukleinskih kislin predstavlja eno najhitreje razvijajočih se področij laboratorijske medicine. Ugotavljanje sprememb nukleotidnega zaporedja DNA – genotipizacija je v klinični praksi pomembno kot dopolnilo obstoječih diagnostičnih metod, v prenatalni diagnostiki, za odkrivanje prenašalcev, usmerjanje zdravljenja (farmakogenomika), napoved prognoze in izboljšanje preventive.

Primeri uporabe: cistična fibroza (gen za cistično fibrozni transmembranski regulator konduktivnosti - CFTR), srpasta anemija (gen za beta-globin - HBB) nagnjenost k venski tromboemboliji (gen za koagulacijski faktor V - F5), presnova zdravil (gen za tiopurin-metil-transferazo - TPMT) in hereditarne hemokromatoze (gen za hemokromatozo - HFE).

Hereditarne hemokromatoze je z incidenco 1:200-400 ena najpogostejših genskih bolezni. Deduje se avtosomno recesivno. Gre za motnjo v presnovi železa. Bolniki imajo zvišano absorpcijo železa in sicer 3-4 mg/dan namesto 1-2 mg/dan. Posledica zvišane absorpcije je kopičenje železa v tkivih. Zgodnji simptomi šibkost, letargija, bolečine v sklepih, v trebuhu, se pojavijo v starosti 40-60 let pri moških in po menopavzi pri ženskah. Ker so simptomi nespecifični, se bolezen običajno diagnosticira še pozneje. Zaradi kopičenja železa v tkivih se lahko razvijejo ciroza, sladkorna bolezen, hipopituitarizem, hipogonadizem, artritis in kardiomiopatija.

Obstajajo različne oblike bolezni, za katere so odgovorni različni geni. Vzrok večine primerov hemokromatoze so mutacije v genu HFE. HFE obsega 12 kb na kromosomu 6p in je sestavljen iz 7-ih eksonov. Kodira protein, ki je strukturno soroden proteinom MHC razreda I. Normalni HFE protein se veže na transferinski receptor in zmanjša njegovo afiniteto za vezavo kompleksa transferin-železo. Najpogostejši mutaciji HFE sta C282Y in H63D. 87 % bolnikov kavkazijske rase je homozigotov za C282Y ali kombiniranih heterozigotov za C282Y in H63D. Mutacija C282Y je posledica nukleotidne zamenjave 845A>G v eksonu 4 in povzroči zamenjavo cisteina s tirozinom na mestu 282 v proteinu. Zaradi tega je oviran nastanek disulfidne vezi v proteinu, ki je potrebna za interakcijo z β 2-mikroglobulinom na celični membrani in omogoča vezavo s prostim transferinskim receptorjem. Mutacija H63D je posledica nukleotidne zamenjave 187C>G v eksonu 2 in povzroči zamenjavo histidina z asparaginsko kislino. Nastali protein se sicer izraža na celični membrani, vendar je ovirana njegova interakcija s transferinskim receptorjem, kar vodi do povečanega nalaganja železa v celici.

V diagnostiki hemokromatoze uporabljamo kot presejalna testa določanje nasičenosti transferina (za M > 55%, za Ž > 45%) in koncentracije feritina v serumu (za M > 400 μ g/L, za Ž > 200 μ g/L). Potrditvena testa sta histološka določitev zalog železa v jetrnem bioptu in gensko testiranje. Ko z genskim testiranjem potrdimo vzrok hemokromatoze pri bolniku, je smiselno pri sorodnikih določiti nasičenost transferina, serumsko koncentracijo feritina in narediti gensko analizo, saj lahko s pravočasnim zdravljenjem preprečimo posledice bolezni. Zdravljenje vključuje terapevtsko flebotomijo, izogibanje vnosu železa z zdravili in hrano, ter prevelikemu vnosu vitamina C.

2. Primeri uporabe v raziskovalnih laboratorijih

Analitika nukleinskih kislin je danes še mnogo bolj kot v kliničnih razširjena v raziskovalnih laboratorijih. Cilji raziskovalnega testiranja so: proučiti mehanizme nastanka bolezni in poiskati nove načine za njihovo diagnosticiranje in zdravljenje. Primeri uporabe: metabolični sindrom gen za s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor γ - PPAR γ), presnova zdravil (različni geni za citokrome P450 - CYP), osteoporoza (gen za osteoprotegerin - TNFRSF11B), srčno-žilne bolezni (gen za angiotenzin konvertirajoči encim - ACE) in Gilbertov sindrom (gen za organski anionski prenašalec 1B3 – SLCO1B3).

Gilbertov sindrom (GS) je najpogostejša dedna motnja v presnovi bilirubina, saj je glede na meritve serumske koncentracije bilirubina prisoten kar pri 3 - 10 % populacije. Pogostejši je pri moških (12,4 %), ki imajo tudi višje koncentracije BLR, kot pri ženskah (4,8 %). Serumske koncentracije celotnega BLR se dvignejo na 20 do 50 $\mu\text{mol/L}$, redko pa presežejo 85 $\mu\text{mol/L}$ (referenčne vrednosti za odrasle so do 17 $\mu\text{mol/L}$). Značilno je, da vrednosti nihajo in narastejo ob metabolnem stresu kot je stradanje ali prisotnost druge bolezni.

Pri večini bolnikov se GS diagnosticira v puberteti ali v zgodnji odrasli dobi. Velja za benigno motnjo, saj razen občasno povišanih koncentracij BLR ni prisotnih drugih patoloških odstopanj in zdravljenje ni potrebno. Kljub temu je diagnosticiranje GS klinično pomembno, saj so bolniki bolj dovzetni za stranske učinke nekaterih zdravil. Poleg tega prispeva k razvoju hiperbilirubinemije in povečanemu tveganju za nastanek žolčnih kamnov pri mnogih dednih krvnih boleznih kot so pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, β -talasemiji, sferocitozi, neskladju krvnih skupin AB0 in srpasti anemiji. Prav tako lahko prispeva k povečanemu tveganju za razvoj raka na dojkah in jajčnikih, neonatalni hiperbilirubinemiji in razvoju žolčnih kamnov pri bolnikih s cistično fibrozo. Diagnosticiranje GS je pomembno tudi zaradi izključitve potrebe po nadaljnji invazivni diferencialni diagnostiki vzrokov hiperbilirubinemij, kot je jetrna biopsija.

Vzroki za GS še niso povsem razjasnjeni. Najpomembnejšo vlogo igra znižana konjugacija bilirubina zaradi sprememb v genu za UDP-glukuronil transferazo 1A1 (UGT1A1). Pri bolnikih pa so dokazali tudi zmanjšan privzem organskih anionov v hepatocite, kar kaže, da zmanjšan privzem bilirubina v hepatocite tudi prispeva k hiperbilirubinemiji. Eden izmed možnih genov, ki bi lahko vplivali na privzem bilirubina v hepatocite je gen za organski anionski prenašalec 1B3 (*SLCO1B3*). *SLCO1B3* obsega 106 kb na kromosomu 12p12 in je sestavljen iz 15 eksonov. Kodira protein *SLCO1B3*, ki jse nahaja na membrani hepatocitov in je pomemben za privzem različnih endogenih in eksogenih snovi v hepatocit. Nedavna študija je pokazala povezanost nukleotidne zamenjave G>C v intronu 7 *SLCO1B3* s koncentracijo bilirubina prebivalcev Sardinje. Namen naše študije je ugotoviti morebitno povezanost s koncentracijo bilirubina pri Slovencih.

Priprava na vajo

Poleg teh navodil za vajo je za uspešno izvedbo vaje iz predhodnih predavanj ali virov na spletu potrebno osvežiti naslednje pojme:

mutacija, vrste mutacij, polimorfizem, alel, homozigot, heterozigot, dominantno dedovanje, recesivno dedovanje.

DNEVNIK

Ime in priimek:

Datum.:

Skupina:

Problem

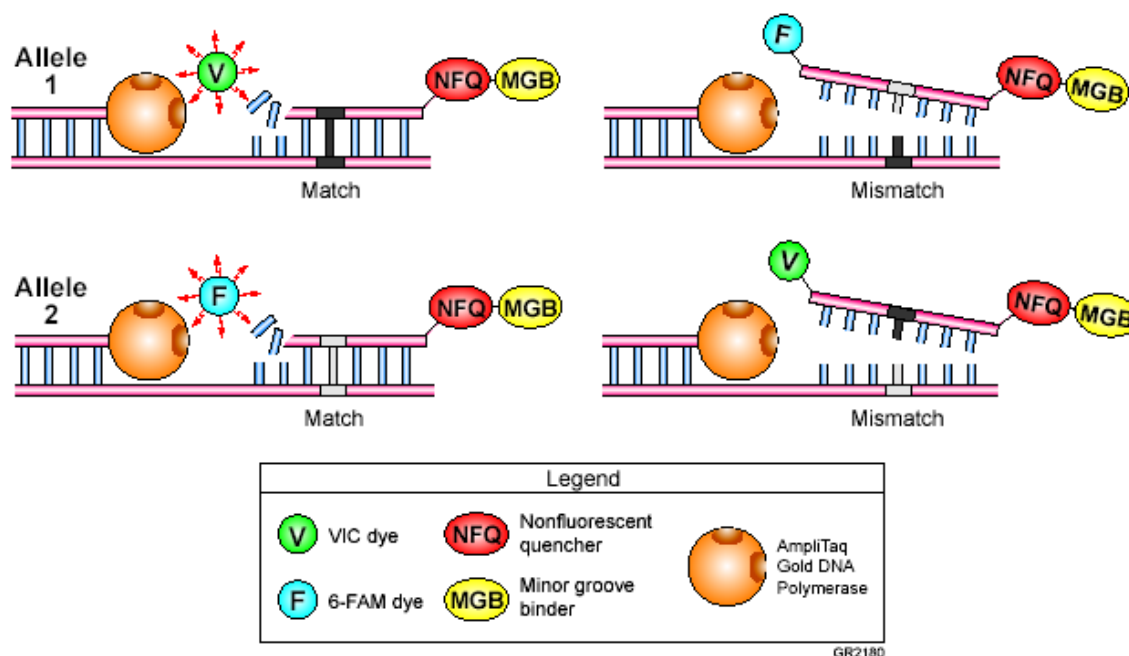
Z genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami želimo v vzorcu DNA ugotoviti prisotnost oziroma odsotnost mutacije C282Y, ki povzroča hereditarno hemokromatozo.

Vzorci

Za genotipizacijo uporabimo genomsko DNA, ki jo običajno izoliramo iz polne venske krvi, odvzete z EDTA. DNA hranimo v hladilniku pri 4 °C, zaščiteno pred svetlobo. Za daljše shranjevanje je primernejša hramba pri -20 °C.

Princip

Pri genotipizaciji s hidrolizirajočimi sondami vključimo v PCR reakcijsko zmes dve fluorescentno označeni sondi. Sonda 1 je označena z barvilom VIC in se popolnoma prilega na normalno zaporedje tarčne DNA (282C), sonda 2 pa je označena z barvilom FAM in se popolnoma prilega na mutirano zaporedje (282Y). Zaradi prisotnosti dušilca, intaktni sondi ne fluorescirata. Tekom PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnosti DNA-polimeraze v stopnji podaljševanja hidrolizo samo popolnoma prilegajoče sonde. Sonda, ki se ne prilega popolnoma, se odlepi od tarčne DNA, predno bi lahko prišlo do hidrolize. Hidroliza sonde onemogoči prestrežanje fluorescence barvila VIC oziroma FAM z dušilcem in tako fluorescenca naraste. Če naraste samo fluorescenca VIC je bolnik homozigot za normalno zaporedje, če naraste samo fluorescenca FAM je bolnik homozigot za mutirano zaporedje, če pa porasteta fluorescenci obeh barvil, je bolnik heterozigot (Slika 3).



Slika 3: Princip genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami.

Postopek

- ◆ V 0,5 mL epruveti pripravimo reakcijsko zmes

Sestavina	1X Volumen (μL)	nX
Ultra čista voda	2,75	
Taq-polimeraza, pufer, Mg ²⁺ , dNTP (2X)	5,0	
Mešanica oligonukleotidnih začetnikovih sond (40X)	0,25	
DNA (5ng/ μL)	2,0	

Opozorilo: mešanico, ki vsebuje sonde hranimo na -20 °C in zaščiteno pred svetlobo.

- ◆ Centrifugiramo 2 min pri 1900 obr/min.
- ◆ Izvedemo pomnoževanje po spodnjem programu.

Aktivacija polimeraze	PCR (40 ciklov)	
95 °C 10 min	92 °C 12 s	60 °C 60s

- ◆ Odčitamo rezultate

Material

Aparature

Rezultati

Komentar

Opombe:

Pregledal: