

PRAKTIKA Z MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE – LS 2020

Autorský kolektiv: Zdeněk Kleibl¹, Petra Kleiblová^{1,2}, Markéta Janatová¹, Michal Vočka³,
Jana Soukupová¹, Jan Ševčík¹

¹ÚBEO 1. LF UK, ²ÚBLG 1. LF UK a VFN, ³Onkologická klinika VFN a 1. LF UK

Jméno: _____ **Kruh:** _____

Praktikový den: _____

1	Úloha 1. Úvodní týden	Toxicita DPD Tools: PubMed, Gene Sekvence (c.DNA/g.DNA). Kdo nechce analyzovat sebe, Prostudovat návody
2	Úloha 2.2. Izolace DNA Úloha 3.2.1. Měření, naředění DNA	<i>Teorie:</i> izolace DNA ze tkání
3	Úloha 3.2.2 Elfo DNA Úloha 4.2.1. PCR	<i>Teorie:</i> PCR
4	Úloha 4.2.2. Elfo PCR Úloha 5.2.1. Restrikční reakce PCR	<i>Teorie:</i> RE/RFLP
5	Úloha 5.2.2. Elfo RE Úloha 6.2.1., 6.2.2. Sekvenační reakce	<i>Teorie:</i> sekvenace – Sanger SW Finch, Příklady mutací.
6	Úloha 6.2.3. Precipitace a Seq Run	<i>Teorie:</i> Klonování, CRISPR.
7	Úloha 7. Vyhodnocení	Test, Vyhodnocení, kazuistiky

Obsah

1	Úvod.....	3
2	Izolace DNA ze stěru z bukální sliznice	5
	2.1 Teorie	5
	2.2 Pracovní postup	6
3	Elektroforéza a kvantifikace DNA	7
	3.1 Teorie	7
	3.2 Pracovní postup	9
	3.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	9
	3.2.2 Kontrola integrity DNA elektroforézou v agarózovém gelu.....	9
4	PCR amplifikace vybraných úseků genu <i>DPYD</i>	11
	4.1 Teorie	11
	4.2 Pracovní postup	14
	4.2.1 PCR amplifikace tří úseků genu <i>DPYD</i>	14
	4.2.2 Elektroforéza PCR produktů	15
5	Restrikční analýza PCR produktů genu <i>DPYD</i> – intron 10, exon 14.....	17
	5.1 Teorie	17
	5.2 Pracovní postup	18
	5.2.1 Příprava a inkubace restrikční reakce.....	18
	5.2.2 Elektroforéza restrikčních produktů PCR	18
6	Sekvenování PCR produktu exonu 13 genu <i>DPYD</i>	20
	6.1 Teorie	20
	6.2 Pracovní postup	22
	6.2.1 Odstranění nezainkorporovaných primerů a dNTPs z PCR produktu.....	22
	6.2.2 Příprava sekvenační reakce	22
	6.2.3 Precipitace sekvenační reakce a analýza na sekvenátoru	22
	6.2.4 Vyhodnocení sekvenačního chromatogramu	23
7	Vyhodnocení praktického bloku	24
8	Použité zkratky:.....	25

1 Úvod

Studium genetické informace má v lékařské diagnostice zvláštní postavení. Na rozdíl od většiny biochemických vyšetření, která odrážejí aktuální dění v organismu, vyšetření genetického materiálu přináší informace o neměnných charakteristikách jedince nebo i celých rodin. Analýza genetického materiálu konkrétního jedince tak obsahuje často citlivé osobní údaje, se kterými je nutné nakládat náležitým způsobem. Analýzu genetické informace můžeme s ohledem na uvedené aspekty rozdělit do dvou skupin:

1. **Analýza dědičné genetické informace**, kterou lze provést z DNA izolované z libovolných jaderných buněk organismu (nejčastěji z leukocytů periferní krve či epitelových buněk sliznice dutiny ústní při stěru z bukalní sliznice), o které platí výše uvedené poznámky. Analýza dědičné informace a interpretace výsledků těchto vyšetření je doménou oboru lékařské genetiky.
2. **Analýza somatické genetické informace**, která vzniká v důsledku změn genomu v konkrétních tkáních v průběhu života vyšetřované osoby. Identifikace somatických změn v genomu je důležitým diagnostickým nástrojem charakterizace nádorových onemocnění, který vyžaduje vyšetření genetického materiálu v nádorových buňkách odebraných z ložiska tumoru.
Somatické alterace DNA lze identifikovat i v cirkulujících nádorových buňkách (např. pro diagnostiku minimální reziduální choroby) či v cirkulující DNA uvolněné z nádorových buněk do krevního oběhu (cfDNA).
Analýza somatických alterací DNA (a případných epigenetických modifikací DNA) leží, z hlediska interpretace, na přechodu od analýzy dědičných změn (které mohou být zachyceny jako „vedlejší nález“ při vyšetření somatických mutací DNA) ke klasickým biochemickým vyšetřením. Dominantním oborem pro analýzy somatických změn genetické a epigenetické informace nádorových onemocnění je patologie.
3. **Analýza alogenní genetické informace**, identifikuje a charakterizuje přítomnost širokého spektra cizorodé DNA v organismu. Touto cizorodou DNA může být genetická informace patogenů (např. bakterií, virů, kvasinek, parazitů) způsobujících lidská onemocnění. Pomocí molekulárně biologických metod lze však charakterizovat i přítomnost fetální cfDNA v cirkulaci matky. Specializovaná molekulárně biologická vyšetření analyzující cizorodou DNA, jejichž výsledky lze interpretovat podobně jako klasická biochemická vyšetření, jsou prováděna řadou oborů, včetně patologie, infektologie, hygieny, akutní, forenzní či reprodukční medicíny.

Cílem bloku praktických cvičení je demonstrace základních molekulárně biologických přístupů a technik. Jako modelový problém nám bude sloužit analýza genetických variant genu *DPYD* ovlivňujících účinnost enzymu dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) v degradaci fluoropyrimidinů.

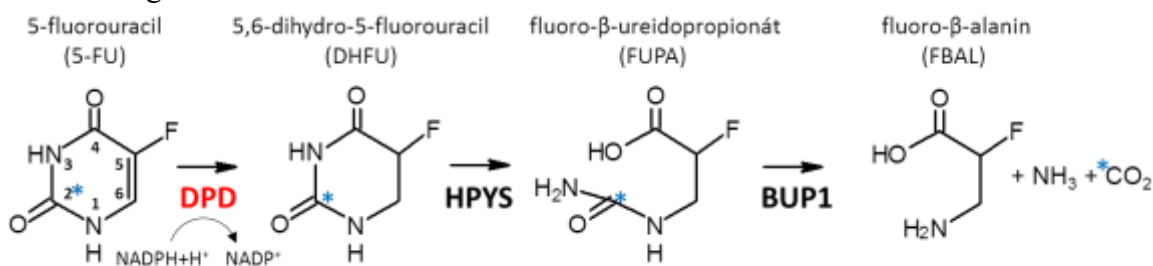
Fluoropyrimidiny (např. **5-fluorouracil**; **5-FU** nebo kapecitabin) jsou jedním ze základních cytostatik v léčbě nádorových onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu. Kromě standardních terapeutických režimů se podávají i v podobě adjuvantní (zajišťovací) léčby podávání u pacientů s vysokou šancí na dlouhodobé přežívání bez relapsu nádorového onemocnění. Třebaže fluoropyrimidiny reprezentují účinné a ekonomicky výhodné protinádorové léky, jejich podávání je spojeno s řadou závažných a v přibližně 1% případů i život ohrožujících nežádoucích účinků, které zahrnují především pokles hladiny krevních elementů (včetně pancytopenie z útlumu kostní dřeně) a defekty slizničního epitelu (stomatitida/mukositida), které při poškození střevního epitelu způsobuje závažné průjemy. U

přibližně 25% léčených pacientů mohou být tyto nežádoucí účinky natolik výrazné, že je nutná intenzivní a nákladná léčba včetně hospitalizace.

Mechanismus protinádorového účinku 5-FU spočívá ve vzniku fluorovaných analog nukleotidů (FdUMP, FUTP, FdUTP) způsobujících přímo poruchy syntézy DNA a RNA a především inhibujících tymidylátsyntázu, pro kterou je uracil (resp. dUMP) substrátem pro vznik tyminu (resp. dTMP).

Za hlavní příčinu vzniku závažné toxicity po podání fluoropyrimidinů se považují vrozené mutace postihující geny kódující katabolické enzymy degradace 5-fluorouracylu (5-FU). Klíčovým enzymem katabolismu 5-FU je úvodní redukce 5-FU na DHFU katalyzovaná **dihydropyrimidindehydrogenázou (DPD; EC 1.3.1.2; Obr. 1)**. DPD zajišťuje v našem organismu za normálních podmínek degradaci uracilu a tyminu. Tento enzym je kódován genem *DPYD*.

Obr. 1. Degradční dráha 5-FU.



Nosiči variant jedné alely *DPYD* [např. c.1905+1G>A (IVS14+1G>A)], které snižují katalytickou účinnost DPD, mají za normálních okolností zcela dostatečnou schopnost degradace přirozeně se vyskytujících pyrimidinů. Snižovaná katalytická schopnost enzymu se projeví teprve při vysoké náloži pyrimidinů, jako je tomu při léčbě 5-FU. U nosičů mutací po podání 5-FU dochází v důsledku snížené degradace ke zvýšení systémové koncentrace 5-FU. Prodloužení expozice zvýšeným dávkám fluoropyrimidinů přesahujícím limit pro vznik toxické reakce způsobuje poruchy růstu buněk mitoticky vysoce aktivních tkání, které se projeví v podobě vzniku nežádoucích účinků léčby.

Gen pro *DPYD* má velikost přes 800 kbp (843 317 bp; sekvenec <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=DPYD>) a u člověka je lokalizován na 1. chromozómu (1p21.3; <http://omim.org/entry/612779>).

V praktickém cvičení provedeme vyšetření tří oblastí genu *DPYD*, které obsahují známé varianty vedoucí k syntéze enzymových izoforem způsobujících snížení katalytické účinnosti DPD. Výsledky genetických analýz zhodnotíme. Vyšetření provedeme na vzorku DNA izolovaném z vlastních buněk bukalní sliznice. Pro analýzu zároveň použijeme vzorky od pacientů, kteří byli léčeni fluoropyrimidiny, a kteří vyvinuli závažné nežádoucí účinky v průběhu této terapie.

Na každé praktikum si přineste:

- Tento vtištěný návod
- Popisovací nerasmazatelný tenký fix
- Jednorázové rukavice

2 Izolace DNA ze stěru z bukální sliznice

2.1 TEORIE

Základním krokem molekulárně-biologických analýz, které zkoumají genetický materiál, je **izolace DNA nebo RNA**. Izolaci genomové DNA lze provést z libovolného materiálu obsahujícího jaderné buňky (krev, tkáň, močový sediment) či jejich fragmenty, nebo ze vzorků obsahující volnou DNA (např. sérum). Nejčastěji je genomová DNA izolována z periferní nesrážlivé krve, kde se nachází v leukocytech. Neinvazivním zdrojem jaderných buněk pro izolaci genomové DNA je stěr z bukální sliznice.

Izolace DNA z epitelových buněk bukální sliznice vyžaduje nejprve **roztušení** mezibuněčné hmoty **tkáně** za uvolnění jednotlivých buněk (pomocí proteinázy K)¹. Tento krok není nutný při izolaci DNA z disperzních tkání (krve nebo kostní dřeně) nebo buněčných suspenzí. Následně je třeba zpřístupnit DNA rozrušením cytoplazmatické a jaderné membrány a uvolnit DNA z nukleoproteinových komplexů (vysrážením proteinů). Uvolněná DNA se následně z vodného roztoku vysráží (precipituje) pomocí nepolárních rozpouštědel (isopropanolu nebo etanolu). Precipitát DNA se po očištění od kontaminujících látek (nepolárním rozpouštědlem) a opatrném osušení rozpustí v redestilované vodě. Vzniklý roztok rozpuštěné DNA je nezbytné charakterizovat – určit koncentraci DNA a míru její fragmentace.

Pro izolaci genomové DNA použijeme modifikovaný protokol Wizard Genomic DNA Purification Kit firmy Promega; A1125; [manuál](#)). Izolace probíhá v několika krocích:

1. Rozrušení tkáně (proteináza K), lýza buněk a jader (Nuclei Lysis Solution)
2. Odstranění proteinů jejich vysrážením (vysolením pomocí solí)
3. Vysrážení a odsolení DNA izopropanolovou precipitací
4. Rozpuštění DNA ve vodě.

Práce s genetickým materiálem klade vysoké nároky na přesnost a čistotu laboratorních postupů. Základem většiny analýz nukleových kyselin je následná amplifikace cílového úseku DNA. Amplifikace znamená zmnožení zvolené cílové sekvence v řádech $10^5 - 10^7$. Z tohoto důvodu je nezbytné zachovávat přísně sterilní podmínky (práce v rukavicích, sterilní roztoky, sterilní zkumavky, špičky), aby analyzovaný genetický materiál nebyl kontaminován cizorodou DNA (např. jiným vzorkem), nebo DNA z "vnějšího prostředí".

¹ Proteináza K je serinová endopeptidáza štěpící peptidové vazby i v molekule keratinových filament epitelových buněk.

2.2 PRACOVNÍ POSTUP

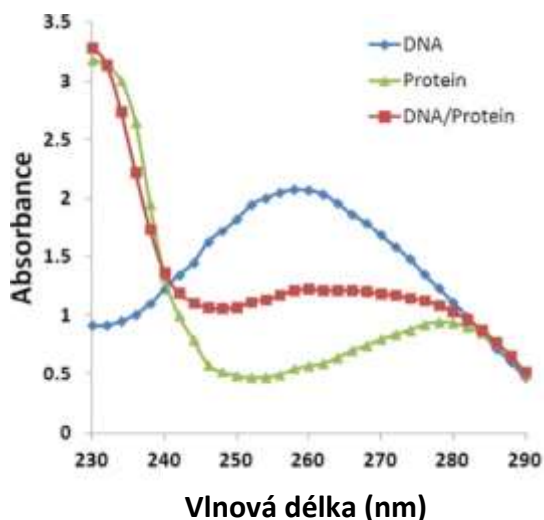
1. Zapište si do protokolu **číslo vašich vzorků přidělené vašim asistentem:**_____.
2. Označte **2 ml zkumavku** přiděleným číslem a napipetujte do ní:
 1. 300 μ l PBS,
 2. 300 μ l Nuclei Lysis Solution,
 3. 15 μ l Proteinázy K.
3. Vzorky bukální sliznice získajte **stěrem buněk bukální sliznice** krouživým pohybem (cca 1 min) pomocí speciální stěrky. **POZOR: Před odběrem si vypláchněte ústa vodou. Doporučená doba mezi odběrem a posledním příjmem potravy je nejméně 10 min.**
4. **Stěrku vložte do zkumavky** připravené v bodě 1 a odlomte rukojeť.
5. Zkumavku uzavřete a **protřepejte na vortexu** (20 s) a **inkubujte** v suchém bloku **30 min** při 55°C.
6. **Centrifugujte 1 min při 13 000 ot./min** (maximální rychlost). **POZOR:** Zkumavky při všech centrifugacích uspořádejte tak, aby zobáček víčka směřoval ke středu centrifugy.
7. **Celý supernatant** přeneste pipetou **do nové 1,5 ml zkumavky** označené vašim číslem. Zkumavku se zbytkem stěrky vyhod'te.
8. K supernatantu **připipetujte 200 μ l Protein Precipitation Solution** a **ihned** vortexujte po dobu **20 s**. **POZN.:** *Roztok by měl být mléčně zakalený.*
9. **Centrifugujte 4 min při 13 000 ot./min** (maximální rychlost). **POZOR:** Zkumavky při všech centrifugacích uspořádejte tak, aby zobáček víčka směřoval ke středu centrifugy.
10. Na dně zkumavky je usazena peleta proteinů. **Opatrně odsajte** pipetou nastavenou na 700 μ l **supernatant obsahující DNA do čisté 1,5 ml zkumavky** označené vašim číslem. Peletu sraženin proteinů i se zkumavkou vyhod'te.
11. K supernatantu **přidejte 800 μ l isopropanolu** a uzavřenou zkumavku **opatrně** obračejte, dokud nevidíte formující se sraženinu DNA. **POZOR:** *Sraženina DNA bude (špatně) viditelná jako miniaturní vlákno nebo vločky.*
12. **Centrifugujte 4 min maximální rychlostí.** **POZOR:** Zkumavky při všech centrifugacích uspořádejte tak, aby zobáček víčka směřoval ke středu centrifugy.
13. Na stěně zkumavky je (špatně) viditelná peleta DNA. Supernatant **opatrně** slijte (nepipetujte!) do odpadní kádinky tak, **abyste nevylili peletu** a osušte ústí zkumavky na filtračním papíru.
14. K peletě **připipetujte 300 μ l 70% etanolu**. Uzavřenou zkumavku několikrát **jemně** převraťte pro omytí pelety.
15. **Centrifugujte 2 min maximální rychlostí.** **POZOR:** Zkumavky při všech centrifugacích uspořádejte tak, aby zobáček víčka směřoval ke středu centrifugy.
16. **Supernatant opatrně slijte** do odpadní kádinky. Osušte **opatrně** vnitřek zkumavky filtračním papírem srolovaným pomocí pinzety do ruličky **tak, abyste se nedotkli pelety DNA.**
17. Otevřenou zkumavku nechte stát na stole, dokud se neodpaří zbytky etanolu (cca 10 minut). **POZOR:** *DNA nesmí přeschnout, jinak bude špatně rozpustná.*
18. K peletě DNA **připipetujte 50 μ l rehydratačního roztoku**. Zkumavku uzavřete a **jemně** zvortexujte, nechte rozpouštět v suchém bloku při 50°C. Izolovaná DNA se uchovává při 4°C pro další analýzy.

3 Elektroforéza a kvantifikace DNA

3.1 TEORIE

Pro další analýzy je nutné určit koncentraci izolované nukleové kyseliny, ověřit její čistotu a kvalitu - integritu (neporušenost).

Koncentrace nukleových kyselin se určuje **spektrofotometricky**. Nukleové kyseliny absorbují v důsledku přítomnosti dusíkatých bází v ultrafialové oblasti spektra s absorpčním maximem při 260 nm (Obr. 2).



Obr. 2. Graf absorpce DNA, proteinu a směsi DNA/protein (1:10) v závislosti na vlnové délce v ultrafialovém spektru 230 – 290 nm ([zdroj](#)).

Pro **určení koncentrace** izolované **DNA** vycházíme z toho, že při měření v 1 cm kyvetě je jednotková optická denzita (1 OD) ekvivalentní roztoku dvouřetězcové DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, tedy $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \text{ dsDNA} = 50 \mu\text{g/ml}$.

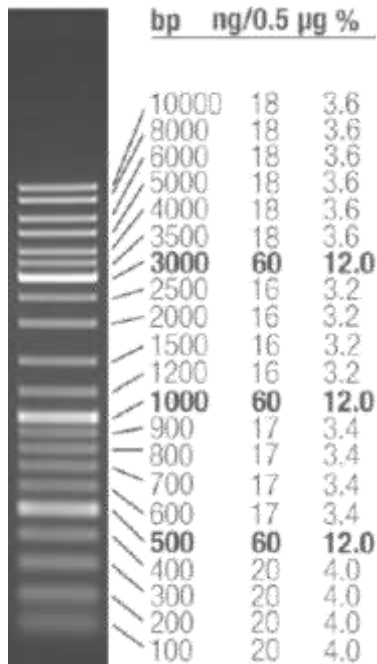
Pro **určení čistoty DNA** je kritickým faktorem kontaminace proteiny. Proteiny dosahují absorpčních maxim při 280 nm (Obr. 2), proto provádíme při stanovení koncentrace nukleových kyselin i vyhodnocení poměru $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$. Tento poměr by u čistého roztoku DNA měl dosahovat hodnot kolem 1,8.

K **ověření integrity nukleové kyseliny** slouží **gelová elektroforéza – separace fragmentů DNA podle jejich délky ve stejnosměrném elektrickém poli na gelové matici** (agarózový nebo polyakrylamidový gel). Výběr gelové matrice závisí na délce analyzované nukleové kyseliny. V praxi budeme provádět výhradně agarózovou elektroforézu, která je schopna separovat DNA fragmenty od 10 bp do 20 kbp. Rychlost migrace DNA ve stejnosměrném elektrickém poli ($\sim 7 \text{ V/cm}$ délky gelu) je nepřímo úměrná délce fragmentů DNA (tj. kratší putují rychleji).

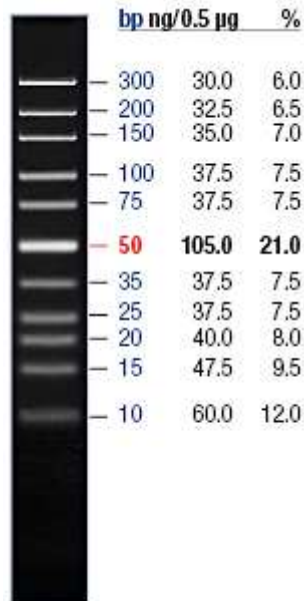
DNA nanášená na elektroforézu musí být nejprve smíchána se **vzorkovým pufrem**, který slouží pro zvýšení hustoty vzorku, aby roztok analyzované DNA klesal vlivem zvýšené hustoty na dno jamky. Přidané barvy (**bromfenolová modř** a **xylencyanol**) umožňují vizuální kontrolu průběhu elektroforézy (putují společně s DNA k anodě). Bromfenolová modř migruje v 1% agarózovém gelu (v 1x TBE pufru) s dsDNA o velikosti $\sim 300 \text{ bp}$, xylencyanol s dsDNA o velikosti $\sim 4 \text{ kb}$.

Určení velikostí fragmentů analyzované DNA se provádí porovnáním s velikostním standardem DNA obsahujícím fragmenty o známé délce (Obr. 3).

A.
Pro genomovou DNA a PCR



B.
Pro restrikční analýzu

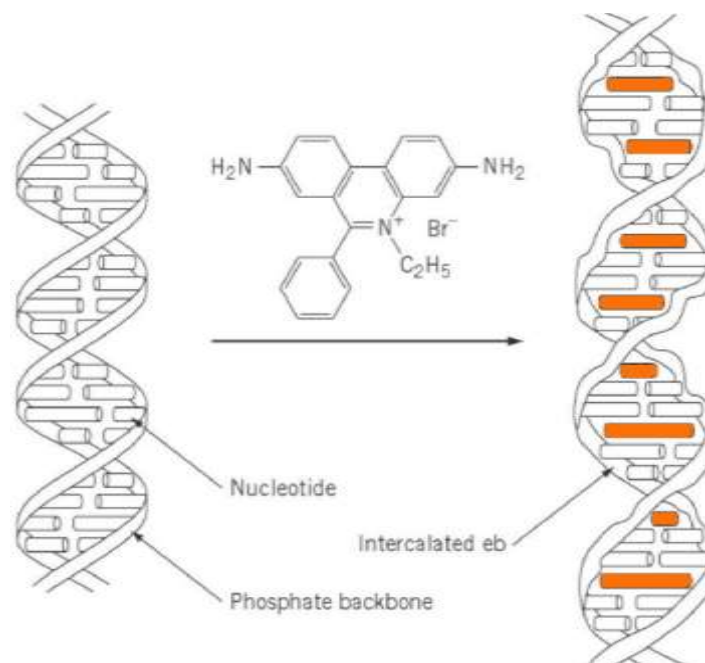


Obr. 3. DNA velikostní standardy pro vyhodnocení délky DNA pomocí gelové elektroforézy použité v praxi. Pro analýzu genomové DNA použijeme vhodné velikostní standardy:

A. pro analýzu genomové DNA a PCR produktů O'GeneRuler DNA Ladder Mix (100 bp – 10 kbp; ThermoFisher Scientific; #SM1173). 1% agarózový gel

B. pro analýzu produktů restrikční reakce GeneRuler Ultra Low Range DNA ladder (10 bp – 300bp; ThermoFisher Scientific; #SM1213). 5% agarózový gel

Pro vizualizaci dvouřetězcových nukleových kyselin se užívá ethidiumbromid - **interkalační činidlo**, které se vmezeruje mezi planárně orientované báze DNA/RNA spojené vodíkovými můstky (Obr. 4). Po prosvětlení gelu UV světlem emituje ethidiumbromid viditelné jasně oranžové světlo v místech jeho vysoké koncentrace, tedy v místech, kde se nachází DNA.



Obr. 4. Molekula ethidiumbromidu (eb) se interkaluje mezi báze DNA (vpravo). <http://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/>.

Pro vizualizaci DNA (nebo i RNA) lze místo mutagenního ethidiumbromidu použít netoxického fluorescenčního barviva GelRed, jak provedeme v úloze.

3.2 PRACOVNÍ POSTUP

3.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Kvantifikaci izolované DNA provedeme pomocí UV/VIS spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), který umožňuje kvantifikovat vzorky v mikro objemu 1 μ l.

1. Zvedněte „vzorkové rameno“ přístroje a pipetou (0-2 μ l) **naneste na dolní měřící plošku 1 μ l vzorku DNA** (viz Obr. 5):

Obr. 5. Nanášení vzorku DNA na spektrofotometr NanoDrop 1000



2. **Přiklopte** vzorkové rameno, klikněte na „MEASURE“ a na obrazovce počítače odečtete koncentraci vzorku DNA a poměr její čistoty 260/280 nm.
3. Před dalším měřením obě měřící plošky očistěte čtverečkem buničiny.
4. Parametry vámi izolované DNA zapište do tabulky:

vzorek č.	OD _{260 nm}	OD _{280 nm}	ng/ μ l	OD _{260 nm/280 nm}

5. **Nařed'te DNA** na koncentraci **50 ng/ μ l**. Dopočítejte ředění:

Vaše DNA (objem) _____ μ l

Rehydratační roztok (přidaný objem) _____ μ l

3.2.2 Kontrola integrity DNA elektroforézou v agarózovém gelu

Reagencie:

- „LD“ – vzorkový pufr (0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylencyanol, 30% glycerol)
- TBE pufr (Tris-kyselina boritá 0,04 mol/l, EDTA 0,001 mol/l)
- 1,0% agarózový gel v 1xTBE obsahující GelRed Nucleic Acid Gel Stain ([Biotium](#))

Vzorek smíchaný s vzorkovým pufrům se nanáší do jamek v agarózovém gelu umístěného v elektroforetické vaně obsahující 1 x TBE pufr.

1. **Označte** sterilní 0,2 ml mikrozkušavku na víčko číslem vaší DNA: _____ (číslo).
2. Do označené zkumavky napipetujte **2 μ l modrého vzorkového pufru (LD)** a **3 μ l vaší DNA**.
3. **Promíchejte** na vortexu a **krátce zcentrifugujte** při 13 000 ot/min.
4. Naneste **celý objem vzorku (5 μ l)** na **dno jamky** v agarózovém gelu umístěném v elfo vaně s 1 x TBE pufrům. **NENANÁŠEJTE VZOREK DO 1. JAMKY VLEVO.**
5. **Zaznamenejte si pozici jamky** s vaším vzorkem DNA:

(pozice zleva): _____, řada (shora): _____.

6. Připojte elektroforetickou vanu na zdroj el. proudu (80 - 100 V).
7. Elektroforézu ukončete při vyputování bromfenolové modři z gelu.
8. Vyjměte gel a **zkontrolujte jej pod UV** světlem (na transluminátoru ve fotokomoře).
9. Snímek z elektroforézy vaší DNA (vyvěšený na <http://ubeo.lf1.cuni.cz/>) vytiskněte a vlepíte do protokolu:

Elektroforéza DNA. Datum_____.

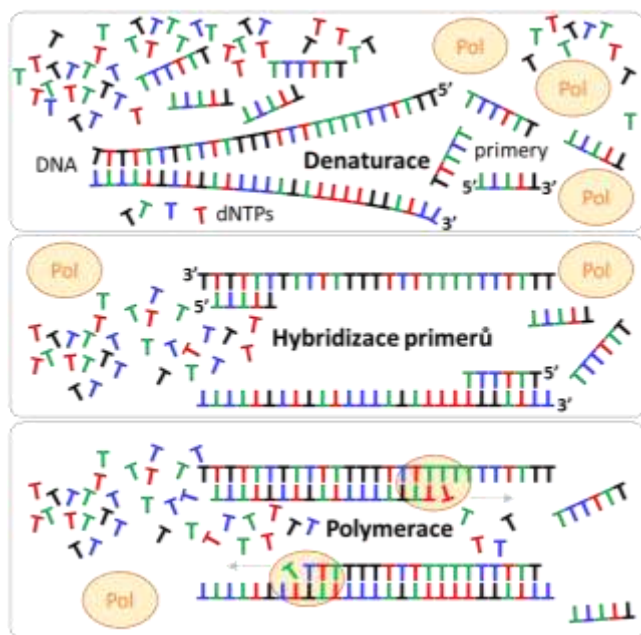
10. Na snímku šipkou označte váš vzorek, vyznačte velikosti fragmentů velikostního standardu (v bp; dle Obr. 3A).
11. **Stručně** запиšte výsledek z vaší izolace DNA (metoda, výtěžek, čistota, integrita, velikost):

4 PCR amplifikace vybraných úseků genu *DPYD*

4.1 TEORIE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je enzymová syntéza DNA sloužící k namnožení (amplifikaci) vybraného úseku DNA *in vitro*. V současnosti je PCR zcela rutinní a patrně nejrozšířenější molekulárně biologickou technikou, jejímž primárním úkolem je namnožení definovaného úseku DNA pro jeho další analýzu.

Cílový úsek amplifikované DNA (obvykle dsDNA) je vymezen dvojicí oligonukleotidů (**primerů**), které po teplotní denaturaci DNA nasedají (hybridizují, annealing) na komplementární vlákna **templátu DNA**. Primery jsou uměle připravené (na zakázku syntetizované) ssDNA oligonukleotidy komplementární k cílovému úseku DNA. Délka primerů je 18 – 30 b (logickou podmínkou pro jejich syntézu je znalost sekvence studovaného úseku DNA). Primery vyznačují místa pro nasednutí **termostabilní DNA-dependentní-DNA polymerázy**, která od 3' konce primeru syntetizuje (polymerizuje) komplementární vlákno DNA. Polymerace probíhá ve směru 5'→3' připojováním nukleotidů (jako při replikaci *in vivo*). Substrátem DNA polymerázy jsou deoxynukleotidtrifosfáty (**dNTPs**; Obr. 6), inkorporované do prodlužujícího se nukleotidu.



Obr. 6. Schéma PCR. Nezbytnými součástmi PCR je templátová DNA, primery (forward a revers), termostabilní polymeráza (Pol), dNTPs. Kromě toho PCR obsahuje Mg^{2+} ionty (kofaktor Pol) a pufr udržující optimální pH.

PCR začíná **denaturací dsDNA**. Na rozvolněnou ssDNA následně **hybridizují primery**, které slouží pro nasednutí termostabilní polymerázy, která zajišťuje syntézu (**polymeraci**) komplementárního vlákna DNA.

Opakováním jednotlivých kroků PCR cyklu - denaturace, hybridizace primerů (anelace), polymerace - dochází k exponenciální amplifikaci cíleného úseku DNA.

Zavedení PCR umožnil objev termostabilní DNA-polymerázy, **Taq DNA-polymerázy**, izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Rychlost polymerace Taq polymerázy je 2 - 4 kbp/min.

Namnožení (amplifikace) cílových úseků DNA vymezených primery je dosaženo mnohonásobným opakováním **cyklů PCR**. Jelikož produkty každého cyklu PCR slouží zároveň jako templáty pro následující cykly, narůstá opakováním počet kopií amplifikované oblasti exponenciálně (2^n). PCR cyklus tvoří tři úseky s různými inkubačními teplotami:

1. tepelná **denaturace** cílové dsDNA (rozvolnění dsDNA na ssDNA při 95°C)
2. **hybridizace** primerů (annealing) s ssDNA (při 50°C – 72°C)
3. **polymerace** pomocí termostabilní DNA-polymerázy (při 72°C).

Automatické opakování jednotlivých cyklů umožňují **PCR-termocykléry**. Délka úseků amplifikovaných pomocí PCR činí několik desítek bází až 10 kb.

V praktických cvičeních provedeme PCR amplifikaci tří úseků (fragmentů) genu *DPYD*, ve kterých se vyskytují varianty, o nichž je známo, že způsobují vznik izoforem proteinu DPD, se změnou (sníženou) katalytickou účinností DPD.

Jedná se úseky zahrnující (viz sekvence *DPYD* strana 13):

intron 10 (i10) s variantou c.1129-5923 C>G/hapB3 (pozice v genu 341167)

exon 13 (E13) s variantou c.1679T>G (pozice v genu 405273)

exon 14 (E14) obsahující variantu c.1905+1G>A (pozice v genu 471002)

Pro amplifikaci použijeme následující primery:

Amplifikace i10:

i10f: 5'-CACTCAGCATCAGCCACATATC

i10r: 5'-TGAGGGACAACCTGGTTTATCAAGC

Amplifikace E13:

E13f: 5'-AGATGTAATATGAAACCAAGTATTGG

E13r: 5'-TTAATGTGTAATGATAGGTCTTGTC

Amplifikace E14:

E14f: 5'-CTTTGTCAAAAGGAGACTCAATATC

E14r: 5'-TCACCAACTTATGCCAATTCTC

Na následující straně je vyznačena část genomové DNA kódující vybrané úseky *DPYD* (celý gen (s translací) na stránce [UBEQ](#), v původní podobě na [NCBI/Gene](#)). Nukleotidová sekvence je znázorněna **černě** (čísla označují nukleotidy v genu *DPYD*), proteinová sekvence **modře** (čísla označují aminokyseliny v proteinu DPD).

V sekvenci na straně 13 najděte a vyznačte:

1. **PCR primery** (forward i reverse) pro amplifikaci jednotlivých fragmentů
2. **Zapište hranice amplikonů** (amplifikovaných úseků) a **vypočítejte jejich předpokládané délky**:

i10 (_____ - _____) tj. _____ bp

E13 (_____ - _____) tj. _____ bp

E14 (_____ - _____) tj. _____ bp

3. Vyhledejte a **vyznačte konsensní sestřihová místa**.
4. Vyhledejte a **vyznačte variantní nukleotidy**, kde se nacházejí hledané varianty *DPYD*.

LOCUS NC_000001 843317 bp DNA linear CON 06-JUN-2016
DEFINITION Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p7 Primary Assembly.
ACCESSION NC_000001 REGION: complement(97077743..97921059) GPC_000001293
VERSION NC_000001.11
DBLINK BioProject: PRJNA168
Assembly: GCF_000001405.33
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Homo sapiens (human)

341041 aatcatcgcattacataaagttaatcattaaaatgatgatcattattgcaagtttatagc **i10**
341101 atgctatTTTTtatttccactcagcatcagccacatatctttcctgaatatggaggtgaaaa
341161 tcaaagctgagaattTTTTTTtaactttcccactactgtgtaaaaagaaagtgacaacctg
341221 atttgtcaaatgtaaaaaatggacccttatagctgcttactactttattgggtggagacta
341281 ggaaaagagaggttggcatgtttgcttgataaaccagttgtccctcataaagacatgctc

509 S **E13**
405061 atattatatggacaatttagatgtaatatgaaaccaagtattggtttgtatTTTTgcagTC
510 Q Y G A S V S A K P E L P L F Y T P I D
405121 ACAATATGGAGCTTCCGTTTCTGCCAAGCCTGAACTACCCCTCTTTTACTCTCTATTGA
530 L V D I S V E M A G L K F I N P F G L A
405181 TCTGGTGGACATTAGTGTAGAAATGGCCGGATTGAAGTTTATAAATCCTTTTGGTCTTGC
550 S A T P A T S T S M I R R A F E A G W G
405241 TAGCGCAACTCCAGCCACCAGCACATCAATGATTGGAAGAGCTTTTGAAGCTGGATGGGG
570 F A L T K T F S L D K
405301 TTTTGGCCCTACCAAAACTTTCTCTCTTGATAAGgtaagaaaatattattgaagtcatat
405361 agaaatgtctatcatatatTTTtaattaaggtataaacattataatggattTTTTtacta
405421 agaaatactacttattaaactatttgacaagacctatcattacacattaatctttagttt

470761 atggaaatgagcagataataaagattatagcttttctttgtcaaaaggagactcaatc
581 D I V T N V S P R I I R G T T **E14**
470821 tttactctttcatcagGACATTGTGACAAATGTTTCCCCAGAATCATCCGGGGAACCAC
596 S G P M Y G P G Q S S F L N I E L I S E
470881 CTCTGGCCCCATGTATGGCCCTGGACAAAGCTCCTTTCTGAATATTGAGCTCATCAGTGA
616 K T A A Y W C Q S V T E L K A D F P D N
470941 GAAAACGGCTGCATATTGGTGTCAAAGTGTCACTGAACTAAAGGCTGACTTTCCAGACAA
636
471001 Cgtaagtgtgatttaacatctaaaacaagagaattggcataagttgggtgaatgtttattt

4.2 PRACOVNÍ POSTUP

4.2.1 PCR amplifikace tří úseků genu *DPYD*

Reagencie:

- 5x PCR mastermix (5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix; [Solis BioDyne](#)):
 - HOT FIREPol (Taq) DNA Polymerase
 - 5x PCR buffer (s 12,5 mM MgCl₂)
 - 5x dNTPs (2,5 mM každého dNTP)
 - EvaGreen dye, No ROX dye

1. Připravte **tři sterilní 0,2 ml** PCR mikrozkušavky.
2. **Víčko označte** svým číslem (#) a číslem příslušné PCR: #-**i10** | #-**E13** | #-**E14**.
3. **Vypočtete** složení Vaší PCR reakce:

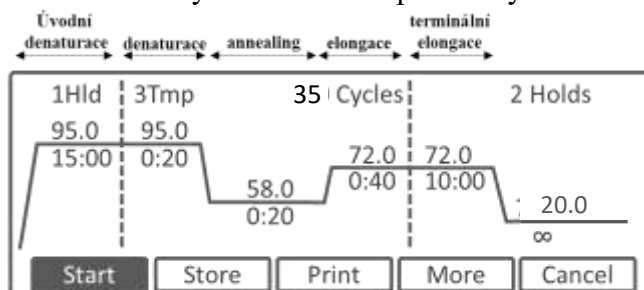
PCR reakční směs	_i10	_E13	_E14
5x PCR mastermix	2,4 µl	2,4 µl	2,4 µl
1,8 pmol primer Forward (1 µM)	i10f: _____µl	E13f: _____µl	E14f: _____µl
1,8 pmol primer Reverse (1 µM)	i10r: _____µl	E13r: _____µl	E14r: _____µl
50 ng DNA (50 µg/ml)	_____µl	_____µl	_____µl
ddH ₂ O ad 12 µl	_____µl	_____µl	_____µl
konečný objem	12 µl	12 µl	12 µl

4. Do zkumavek **napipetujte** (pipeta 1-10) **reakční směs dle tabulky v následujícím pořadí:**
 1. ddH₂O
 2. primery (2 ks)
 3. PCR mastermix,
 4. 50 ng vaší DNA

Proveďte pro všechny tři úseky genu *DPYD*.

5. Reakční směs **zvortexujte** a krátce **zcentrifugujte**.
6. Zkušavku vložte do bloku cykléru GeneAmp PCR System 2720 a aktivujte program "DPYD_PCR" (Obr. 7)

Obr. 7. Schéma protokolu PCR cykléru GeneAmp PCR System 2720.



4.2.2 Elektroforéza PCR produktů

Reagencie:

- vzorkový pufr (0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylencyanol, 30% glycerol)
- TBE pufr (Tris-kyselina boritá 0,04 mol/l, EDTA 0,001 mol/l)
- 1,5% agarózový gel v 1xTBE obsahující GelRed Nucleic Acid Gel Stain ([Biotium](#))
- ddH₂O

Pracovní postup:

1. **Označte** tři sterilní 0,2 ml mikrozkušavky na víčko svým číslem (#) a číslem příslušné PCR: #-i10 | #-E13 | #-E14.
2. Do zkumavky **napipetujte 2 μl modrého vzorkového pufru a 4 μl vašeho PCR produktu.**
3. Zvortexujte a krátce zcentrifugujte.
4. Naneste **celý objem vzorku (6 μl) na dno jamky** v agarózovém gelu umístěném ve vaně s 1 x TBE pufrem. **NENANÁŠEJTE VZOREK DO 1. JAMKY VLEVO.**
5. **Zaznamenejte** si pozice jamek (doplňte číslo vaší DNA).
____-i10 (pozice zleva): _____, řada (shora)_____
____-E13 (pozice zleva): _____, řada (shora)_____
____-E14 (pozice zleva): _____, řada (shora)_____.
6. Připojte elektroforetickou vanu na zdroj el. proudu (80 - 100 V).
7. Elektroforézu ukončete při vyputování bromfenolové modři z gelu.
8. Vyjměte gel a **zkontrolujte jej pod UV světlem** (na transluminátoru ve fotokomoře).
9. Snímek z elektroforézy vašich PCR (vyvěšený na <http://ubeo.lf1.cuni.cz/>) vytiskněte a vlepťe do protokolu:

Elektroforéza PCR. Datum_____.

10. Na snímku čísla označte vaše vzorky, vyznačte velikosti fragmentů velikostního standardu (v bp; dle obr. 3A).
11. Stručně zapište výsledek z vašich jednotlivých PCR (metoda, velikost fragmentů):

5 Restrikční analýza PCR produktů genu *DPYD* – intron 10, exon 14

5.1 TEORIE

Pro následnou detekci známých variant použijeme **restrikční analýzu**, tj. rozštěpení PCR fragmentu **restrikční endonukleázou**. **Restrikční endonukleázy jsou bakteriální endonukleázy** sloužící v bakteriálních buňkách k ochraně před virovou (bakteriofágovou) infekcí, **které mají schopnost rozpoznat konkrétní sekvenci DNA v tzv. rekogničním místě a tuto DNA následně štěpit**. Rekogniční místa mají často charakter genetických **palindromů**. Restrikční enzymy štěpí oba řetězce DNA v místě fosfodiesterové vazby polynukleotidu.

Protože restrikční analýza je volena tak, aby restrikční reakce zasahovala místo polymorfní sekvence, změna této sekvence vede k vytvoření nebo naopak k zániku restrikčního místa. Produkty restrikční reakce budou následně separovány na agarózovém (případně polyakrylamidovém) gelu.

Restrikcí provedeme analýzu přítomnosti *DPYD* variant v intronu 10 (c.1129-5923C>G; a exonu 14 (c.1905+1G>A).

K restrikci PCR fragmentu **i10 použijeme restrikční enzym **AluI**:**

Restrikáza AluI rozpoznává sekvenci (místo štěpení řetězce DNA je označeno |):



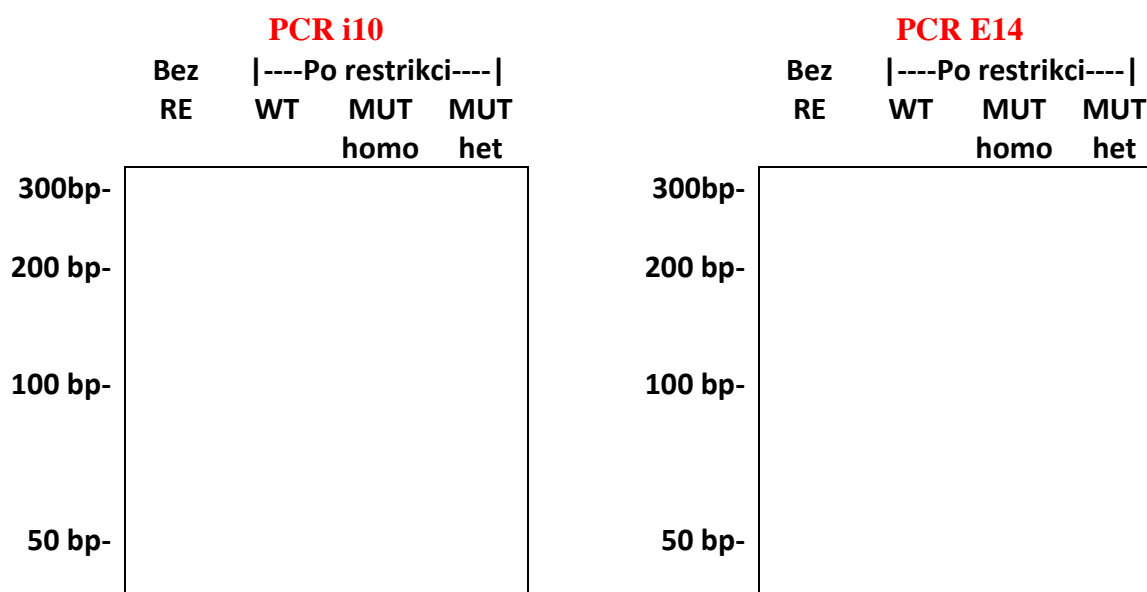
K restrikci PCR fragmentu **E14 použijeme restrikční enzym **HpyCH4IV****

Restrikáza HpyCH4IV rozpoznává sekvenci (místo štěpení řetězce DNA je označeno |):



V sekvenci *DPYD* (na straně 13) **najděte a vyznačte** místo(a) štěpení PCR produktu enzymem AluI resp. HpyCH4IV.

Vypočítejte délky produktů štěpení v případě, že se bude jednat o sekvence **homozygotních** nosičů **wt** sekvence (c.1129-5923**C** resp. c.1905+1**G**) a **heterozygotních** nosičů **mutantních** variant (c.1129-5923**G** resp. c.1905+1**A**). Očekávané fragmenty PCR po restrikčním štěpení a bez restrikce (RE) **zakreslete do schématu** elektroforézy a označte délkou (v bp):



5.2 PRACOVNÍ POSTUP

Reagencie:

- 2x restrikční směs AluI (R0137S; [NEB](#)):
 - 0,2 µl AluI (10 U/µl)
 - 1,0 µl 10X CutSmart® Buffer (1X: 50 mM octan draselný, 20 mM Tris Acetát, 10 mM octan hořečnatý, 100 µg/ml BSA, pH 7.9 @ 25°C)
 - 3,8 µl ddH₂O
- 2x restrikční směs HpyCH4IV (R0619S; [NEB](#)):
 - 0,05 µl HpyCH4IV (10 U/µl)
 - 1,0 µl 10X CutSmart® Buffer (viz výše)
 - 3,95 µl ddH₂O

5.2.1 Příprava a inkubace restrikční reakce

1. Označte dvě sterilní 0,2 ml mikrozkušavky na víčko svým číslem (#) a číslem příslušné PCR: #-i10R | #-E14R.
2. Do zkumavek napipetujte 5 µl **PŘÍSLUŠNÉ** restrikční směsi:
K restrikci PCR fragmentu i10 použijeme restrikční enzym AluI
K restrikci PCR fragmentu E14 použijeme restrikční enzym HpyCH4IV
3. Přidejte 5 µl svého **SPRÁVNÉHO** PCR produktu.
4. Zvortexujte a krátce centrifugujte.
5. Umístěte zkumavku do bloku cykléru GeneAmp PCR System 2700
6. Aktivujte program “restrikce” (Inkubace při 37°C přes noc).

5.2.2 Elektroforéza restrikčních produktů PCR

Reagencie:

- vzorkový pufr (0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylencyanol, 30% glycerol)
- TBE pufr (Tris-kyselina boritá 0,04 mol/l, EDTA 0,001 mol/l)
- 2,5% agarózový gel v 1xTBE obsahující GelRed Nucleic Acid Gel Stain ([Biotium](#))
- ddH₂O

1. Do každé zkumavky s restrikční reakcí přidejte 4 µl **modrého** vzorkového pufru.
2. Obě zkumavky protřepejte na vortexu a krátce centrifugujte.
3. Naneste celý objem vzorků (14 µl) na dno dvou sousedních jamek v agarózovém gelu umístěném ve vaně s pufrům s 1 x TBE pufrům. NENANÁŠEJTE VZOREK DO 1. JAMKY VLEVO A POSLEDNÍCH DVOU JAMEK VPRAVO.
4. Zaznamenejte si pozice jamek (doplňte číslo vaší DNA).
_____-i10R (pozice zleva): _____, řada (shora)_____.
_____-E14R (pozice zleva): _____, řada (shora)_____.
5. Připojte elektroforetickou vanu na zdroj el. proudu (80 - 100 V).
6. Elektroforézu ukončete při vyputování bromfenolové modři z gelu.
7. Vyjměte gel a zkontrolujte jej pod UV světlem (na transluminátoru ve fotokomoře).
8. Snímek z elektroforézy restrikčních produktů vašich PCR (vyvěšený na <http://ubeo.lf1.cuni.cz/>) vytiskněte a vlepťte do protokolu:

Elektroforéza restrikce PCR produktu. Datum _____.

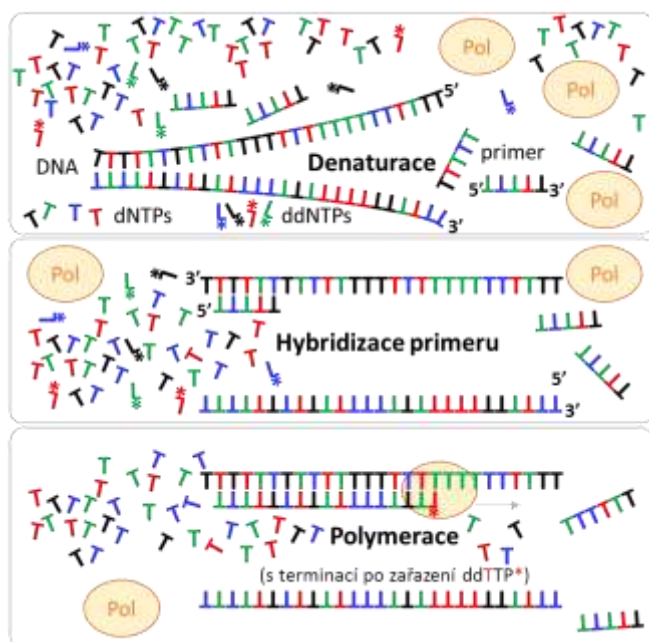
9. **Na snímku čísla označte vaše vzorky, vyznačte velikosti restrikčních fragmentů, fragmentů bez restrikce (poslední dvě jamky v řadě) a velikostního standardu (v bp; dle obr. 3B).**
10. **Stručně запиšte výsledek z restrikce vašich PCR (výsledek restrikce, záchyt variant):**

6 Sekvenování PCR produktu exonu 13 genu *DPYD*

6.1 TEORIE

Sekvenování DNA je metoda umožňující určit pořadí jednotlivých nukleotidů v polynukleotidovém řetězci DNA tedy **primární strukturu DNA**. Pro analýzu jednotlivých fragmentů DNA (amplifikovaných pomocí PCR) se používá tzv. **Sangerovo sekvenování**. Principem Sangerova sekvenování je spojení dvou metod: **1) sekvenační reakce** s použitím značených **2', 3'-dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs; terminátorů)**, jejichž inkorporace do *in vitro* replikujícího se řetězce způsobuje přerušení replikace. **2) elektroforézy s vysokým rozlišením**, která umožňuje velikostní separaci řetězců ssDNA, které se liší pouze o 1b.

Terminátory (ddNTPs) jsou v sekvenační reakci přítomny v nižší koncentraci než dNTPs a náhodně se inkorporují do syntetizovaného vlákna DNA. Po jejich začlenění do syntetizovaného polynukleotidu je syntéza vlákna DNA přerušena, protože **ddNTPs postrádají 3'-OH skupinu** nezbytnou pro vznik fosfodiesterové vazby (**Obr. 8**).



Obr. 8. Schéma sekvenační reakce při Sangerově sekvenování.

Složení sekvenační reakce připomíná PCR (obr. 6). Odlišuje se přítomností pouze jednoho primeru a přítomností značených ddNTPs.

Stejně jako PCR začíná sekvenační reakce **denurací dsDNA**. Na jedno z vláken ssDNA následně **hybridizuje sekvenační primer**, který slouží pro nasednutí DNA polymerázy, která zajišťuje syntézu komplementárního vlákna. To se děje do té doby, dokud není do řetězce náhodně zařazen terminátorový ddNTP. Opakováním jednotlivých kroků sekvenační reakce dochází k **lineární** amplifikaci cíleného úseku DNA.

Pro sekvenování je nezbytné použít **pouze jeden sekvenační primer**, který specificky nasedá na místo v templátové DNA. Ta musí mít dostatečnou koncentraci (miliardy kopií cílové sekvence); proto sekvenování vyžaduje použití amplifikované DNA (PCR produkt, plazmid apod.; Obr. 9).

Pozn.:

Před vlastní sekvenační reakcí, přímo vycházející z PCR, je tedy nezbytné odstranit zbývající nezainkorporované PCR primery a dNTPs. Toho lze docílit precipitací PCR reakce (podobně jako tomu bylo při izolaci DNA, kdy krátké oligonukleotidy primerů a dNTPs jsou rozpuštěny v polárním roztoku alkoholu a odděleny dekantací od sraženiny DNA produktů PCR), nebo enzymaticky, jak to bude provedeno v praktickém cvičení. Při enzymatické degradaci využijeme inkubace PCR se směsí termolabilních enzymů, obsahujících: 1) DNA exonukleázu (Exo), štěpící ssDNA (tedy primery, ale ne dsDNA – PCR produkt) na dNMP a 2) alkalickou fosfatázu (shrimp alkaline phosphatase; SAP) odštěpující 5'-fosfátové skupiny z dNTPs.

DNA template	Quantity
PCR product:	
• 100–200 bp	1–3 ng
• 200–500 bp	3–10 ng
• 500–1000 bp	5–20 ng
• 1000–2000 bp	10–40 ng
• > 2000 bp	20–50 ng
Single-stranded DNA	25–50 ng
Double-stranded DNA	150–300 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2–3 µg

Obr. 9. Doporučená množství DNA pro sekvenování pomocí BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu ([ThermoFisher](#)). **Spočítejte**, kolik cílové sekvence o 300 bp obsahuje (v ng) vámi vyizolované množství DNA:

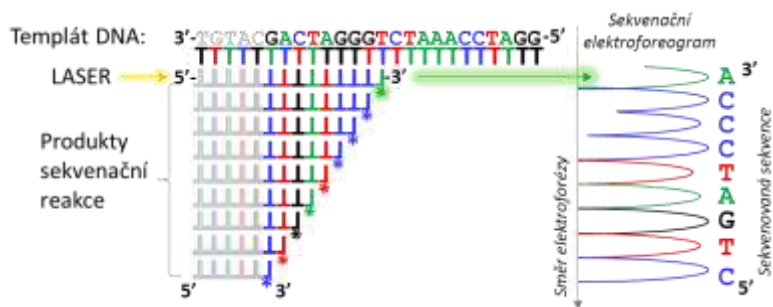
Celkový výtěžek DNA _____ ng

Cílová sekvence 300 bp _____ ng

Opakováním jednotlivých kroků sekvenační reakce dochází pouze k lineární amplifikaci cíleného úseku DNA. **Výsledkem sekvenační reakce je směs různě dlouhých ssDNA** (lišících se délkou o 1 b), **které však všechny končí značeným terminátorem** (*; Obr. 10). Z výsledné sekvenační reakce je nutné **purifikovat** čistou DNA (zbavit sekvenační reakci příměsí, jako jsou proteinové molekuly DNA polymerázy, nezainkorporované dNTPs a ddNTPs, ionty). Po purifikaci je výsledný pelet DNA rozpuštěn ve formamidu a denaturován. V této podobě je vzorek připraven k **analýze na automatickém sekvenátoru**. Sekvenační analyzátor provede **kapilární elektroforézu**, při které putují vzorky ssDNA zakončené barevnou fluorescenční značkou (fluoroforem) tenkou kapilárou, která má skleněné okénko ozařované laserovým paprskem. Každý terminátor (ddGTP, ddATP, ddTTP a ddCTP) obsahuje unikátní **fluorofor**, který emituje po ozáření laserem světlo o jiné vlnové délce. Emitované záření je zaznamenáváno detektorem, který jej převádí na analogový signál **sekvenačního elektroforeogramu**. Křivka elektroforeogramu je softwarově upravena pro vyhodnocení sekvence sekvenované DNA (Obr. 10).

Obr. 10. Schéma kapilární elektroforézy s detekcí a analýzou sekvenačních fragmentů.

V sekvenační kapilární elektroforéze na sekvenátoru putují tenkou kapilárou naplněnou gelem podle velikosti jednotlivé fragmenty ssDNA zakončené terminátorem (ddNTP), který je značený fluoforem (*). V detekčním okénku kapiláry jsou fragmenty ozařovány laserovým paprskem. Detektorem zaznamenané záření jednotlivých fluoroforů je převáděno na záznam sekvenačního chromatogramu umožňujícího rekonstrukci primární sekvence čteného úseku DNA.



6.2 PRACOVNÍ POSTUP

V exonu 13 *DPYD* provedeme analýzu přítomnosti varianty c.1679T>G (p. _____; doplňte); viz sekvence strana 13) pomocí sekvenování PCR produktu. Kromě této varianty se v exonu 13 může vyskytovat i několik dalších variant. K provedení sekvenační reakce použijte váš PCR produkt _____-E13 z úlohy 4.2.1.

Sekvenování provedeme s reverzním primerem E13r.

6.2.1 Odstranění nezainkorporovaných primerů a dNTPs z PCR produktu

Reagencie:

- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent ([ThermoFisher](#)); obsahuje SAP a Exo (naředěn 1:1 s vodou)

1. Označte 0,2 ml eppendorfku na víčko číslem svého PCR produktu: _____.
2. Napipetujte do ní **1 µl ExoSAP-IT** a přidejte **1 µl svého PCR produktu E13**.
3. Zkumavku **zvortexujte** a krátce **centrifugujte**.
4. Zkumavku vložte **do bloku** cykléru GeneAmp PCR System 2700 a aktivujte program – **“exosap”** (15 min @ 37°C; 15 min @ 80°C).

6.2.2 Příprava sekvenační reakce

Reagencie:

- Primer E13r (5 µM)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ([ThermoFisher](#)):
 - 0,4 µl BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (DNA Pol. dNTPs; ddNTPs*; pufr)
 - 1,0 µl 5X Sequencing Buffer
 - 0,6 µl ddH₂O

1. Do 0,2 ml eppendorfky s přečištěným PCR produktem napipetujte **2 µl Sekvenačního Master Mixu (BD)** a **1,0 µl primeru E13r**.
2. Zkumavku **zvortexujte** a krátce **centrifugujte**.
3. Zkumavku vložte **do bloku** cykléru GeneAmp PCR System 2700 a aktivujte sekvenační reakci – **program “BD”** (30x: 10 s @ 96°C; 5 s @ 50°C; 4 min @ 60°C).

6.2.3 Precipitace sekvenační reakce a analýza na sekvenátoru

Pracovní postup:

1. K sekvenační reakci **připipetujte 1,3 µl EDTA, 1,3 µl octanu sodného a 30 µl 100% etanolu**.
2. **Zvortexujte a centrifugujte 15 minut při 14000 otáčkách**.
3. Supernatant **opatrně odpipetujte** a přidejte **60 µl 70% etanolu**.
4. **Zvortexujte a centrifugujte 10 minut při 14000 otáčkách**.
5. Supernatant **opatrně odpipetujte**.
6. **OTEVŘENOU** zkumavku nechte **sušit 5 minut při 90°C** v otevřeném cykléru.
7. Do suché zkumavky **napipetujte 12 µl formamidu**.

8. Zvortexujte a krátce zcentrifugujte.
9. Denaturujte **5 min při 95°C** v cykleru; zchlaďte **na ledu**.
10. Takto zpracovaný vzorek je připraven k analýze v DNA sekvenátoru ABI3130.
11. Přepipetujte vzorek do 96-jamkového sekvenačního platíčka. Poznačte si:

Pozice vzorku v platíčku: _____

Název vzorku v sample sheetu: _____

12. Vzorek bude mít název:

#kruhu_#DNA_DPYD_E13r

13. Výsledný soubor ze sekvenátoru bude mít název:

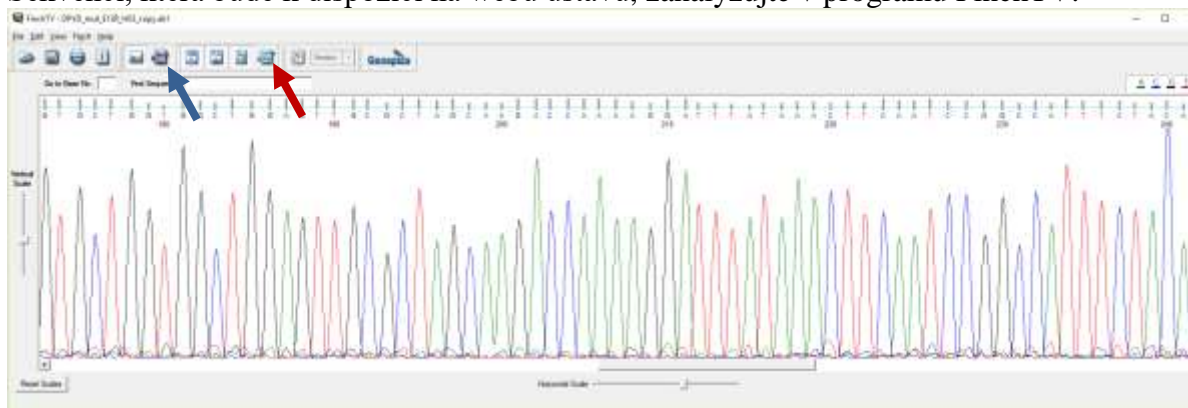
#kruhu_#DNA_DPYD_E13r_pozice v platíčku.ab1

6.2.4 Vyhodnocení sekvenačního chromatogramu

Výstupem z automatického sekvenátoru ABI3130 (Applied Biosystems) jsou datové soubory, kde každý soubor obsahuje analýzu jednoho sekvenovaného fragmentu DNA. Soubory jsou ve formátu *.ab1. Ke čtení těchto souborů použijte freewarový program FinchTV (ke stažení na stránkách <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FinchTV.shtml>):

Obr. 11. Prostředí programu FinchTV 1.4.0 pro vyhodnocení sekvenování.

Sekvenci, která bude k dispozici na webu ústavu, zanalyzujte v programu FinchTV.



1. Váš soubor *.ab1 se sekvencí si stáhněte z webu ústavu.
2. **Otevřete sekvenci v programu FinchTV** (Obr. 11). Sekvenci důkladně **prohlédněte jako forward**. Zmáčknutím tlačítka „Wrapped view“ (modrá šipka) se zobrazí celá sekvence ve více řádcích; zmáčknutím tlačítka „Reverse complement“ (červená šipka) nebo klávesové zkratky CTRL+R získáte zobrazení forward sekvence.
3. **Identifikujte** přítomnost případných variant.
4. Identifikované varianty **poznačte** do sekvence na straně 13.
5. Svoji sekvenci vytiskněte (File>Print...) na jednu stránku (File>Print Setup...; Zaškrtněte Fit to one page). Vytisknutou sekvenci přiložte k protokolu, označte nalezené varianty a přineste s sebou na poslední praktikum bloku molekulární biologie.

8 Použité zkratky:

agaróza	lineární polysacharid z D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy
bp	base pairs (páry bází)
BUB1	β -ureidopropionáza
cDNA	komplementární jednořetězcová DNA, která vznikne reverzním přepisem mRNA.
ddH ₂ O	redestilovaná sterilní voda
DPD	dihydropyrimidindehydrogenáza (enzym)
DPYD	dihydropyrimidindehydrogenáza (gen)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	dinukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
dsDNA	double-stranded (dvouřetězcová) DNA
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
HPYS	hydropyrimidináza
IVS	intervening sequence (= intron)
kbp	kilo base pairs
OD _{260nm}	optická densita při 260 nm
TBE	TRIS – kyselina boritá – EDTA
RT	room temperature (laboratorní teplota)
ssDNA	single-stranded (jednořetězcová) DNA
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
wt	wild type (zdravá alela)

Genetický kód

