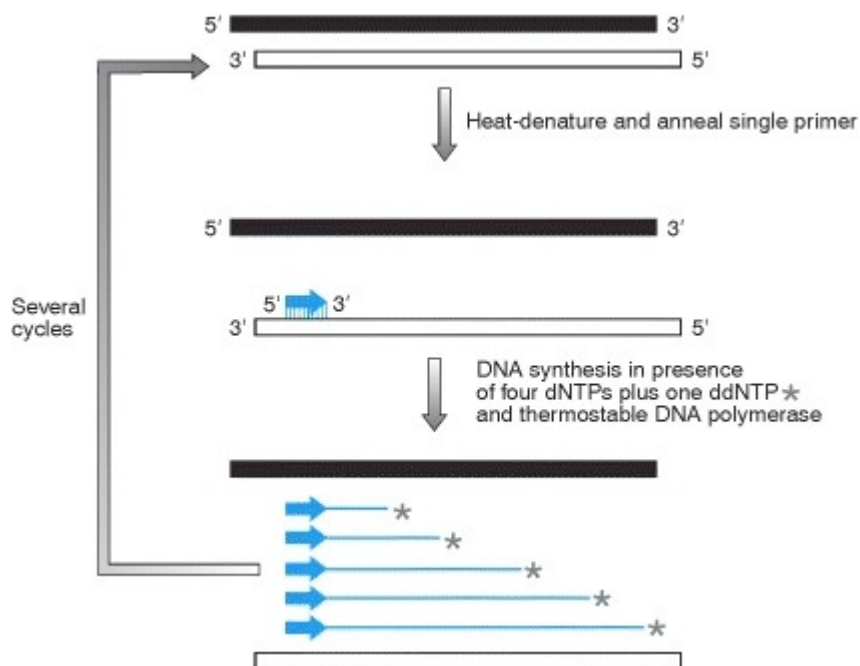


Sekvenační analýza - Sangerova metoda

Úvod:

- využívá vlastnosti speciálních nukleotidů - 2',3'-dideoxyribonukleotidtrifosfátů (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP), které nemají na 3' uhlíku ribosy OH skupinu, ukončit syntézu DNA. Pokud tedy DNA polymeráza začlení takový nukleotid do narůstajícího řetězce další nukleotid se nemůže navázat a syntéza DNA řetězce je ukončena.
- reakční směs: jednovláknová DNA, DNA polymeráza, pufr, příslušné sekvenační primery, 2'-deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a fluorescenčně značené 2',3'-dideoxyribonukleotidtrifosfáty
- použitelná k sekvenování krátké sekvence (až 700bp) jednovláknové DNA

Princip:



Úloha:

Stanovení přítomnosti mutace v genu pro LDL receptor

Úvod:

LDLR gen: 19. chromozóm (p13.1 - p13.3), 45kb, 18 exonů.

Mutace nebo přestavby v genu pro LDL receptor jsou příčinou familiární hypercholesterolemie. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění charakterizované zvýšením hladiny LDL cholesterolu v krvi, která má za následek předčasný rozvoj atherosklerózy.

Úkol:

Stanovení přítomnosti mutací v genu pro LDL receptor v předložených vzorcích.

Pracovní postup:

PCR reakce

1. Provedení amplifikace jednotlivých exonů v genu pro LDL receptor podle tabulky:

5 μ l ředěné DNA + 20 μ l MM

a/ amplifikace **exonu 9**:

- sek9A+sek9B primery
- 1mM Mg^{2+}
- program L61 ($T_a=61^\circ C$)
- délka produktu 380bp

a/ (μ l)	1x	3x	4x	5x
H₂O	13,25			
RB	2,5			
Mg²⁺	1,0			
dNTP	0,5			
Sek9A	1,25			
Sek9B	1,25			
Taq pol.	0,25			
řed.DNA	5 μ l	5	5	5

b/ amplifikace **exonu 5**:

- sek5A+sek5B primery
- 1,5mM Mg^{2+}
- program L57 ($T_a=57^\circ C$)
- délka produktu 268bp

b/+c/ (μ l)	1x	3x	4x	5x
H₂O	12,75			
RB	2,5			
Mg²⁺	1,5			
dNTP	0,5			
Sek9A	1,25			
Sek9B	1,25			
Taq pol.	0,25			
řed.DNA	5 μ l	5	5	5

c/ amplifikace **exonu 12**:

- sek12A+sek12B primery
- 1,5mM Mg^{2+}
- program L58 ($T_a=58^\circ C$)
- délka produktu 357bp

Kontrola PCR produktu

- elektroforéza, 2% gel SERVA, nanášet 5 μ l

Předčištění PCR produktu (s využitím QIAquick PCR purification Kit)

1. Do eppendorfky na 2 ml napipetovat 20 μ l PCR produktu a 100 μ l roztoku PBI. (vždy zachovat poměr 1:5)
2. Celý objem (120 μ l) přepipetovat do kolonky a dát stočit na centrifugu 1min/13000otáček.
3. Odstředěný objem vylít, do kolonky přidat 700 μ l roztoku PE a dát stočit na 1min/13000ot.
4. Odstředěný objem opět vylít a dát stočit na 3min/13000otáček.
5. Kolonku umístit do nové eppendorfky (2ml) a do středu kolonky opatrně nanést 20-35 μ l H₂O (dle síly PCR produktu).
6. Vzorek nechat stát ve vodorovné poloze asi 15 minut.
7. Vzorek dát stočit na 2min/13000ot., poté kolonku vyhodit a u eppendorfky s předčištěním PCR produktem změřit koncentraci.

V této fázi lze opět provést kontrolu PCR produktu pomocí elektroforézy za stejných podmínek.

Sekvenační DEYSSEQ reakce (s využitím BigDye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing kit)

(μ l)	1x	0,5x
H ₂ O	5,5	6,0
PCR produkt	1,0	0,5
Primer	0,5	0,5
5xSB	1,0	1,0
TRRM	2,0	2,0

Vysušení produktu

1. Zvortexovat kolonku pro resuspendaci reninu.
2. Uvolnit závit spodní části kolonky o ¼ otočení, ulomit jej a umístit kolonku do speciální sběrné nádobky.
3. Takto nachystaný vzorek dát na centrifugu 3min/3000otáček (0,8rcf).
4. Přenést kolonku do čisté eppendorfky na 2ml.
5. Opatrně nanést produkt ze sekvenační reakce doprostřed horní části šikmé gelové vrstvy tak, abych se nedotkla gelu ani stěn eppendorfky.
6. Produkt dát centrifugovat 3min/3000ot.
7. Vyhodit kolonku, produkt zůstane odstředěný v eppendorfce, do které přidáme formamid v poměru 1:1 (v našem případě 10 μ l FA).
8. Vzorky uschováme do lednice na sekvenaci – automatický sekvenátor ABI 3130xl.

Hodnocení výsledků:

Subjektivní odečtení výsledků sekvenační analýzy srovnáním s kontrolní sekvencí. Hodnocení pomocí softwaru Mutation Surveyor (Softgenetics LLC).