



# Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

Mgr. et Mgr. Kristýna Brzobohatá

[brzobohata@sci.muni.cz](mailto:brzobohata@sci.muni.cz)

Laboratoř biologické a molekulární antropologie,  
ÚEB, PřF, Mu



## Metody analýzy aDNA:

### Metody I. – 12. 10.

- 1) Výběr vhodného vzorku, očištění, separace tkáně
- 2) Izolace DNA - lyzace, dekalifikace, purifikace
- 3) Amplifikace aDNA

### Metody II. – 19. 10.

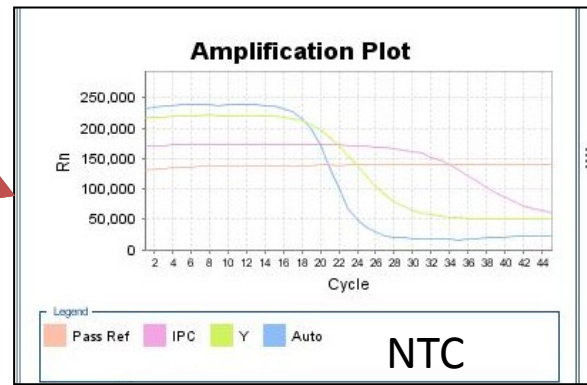
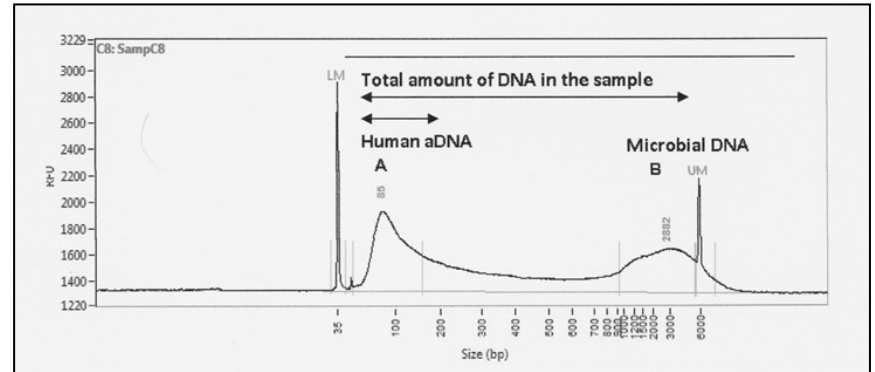
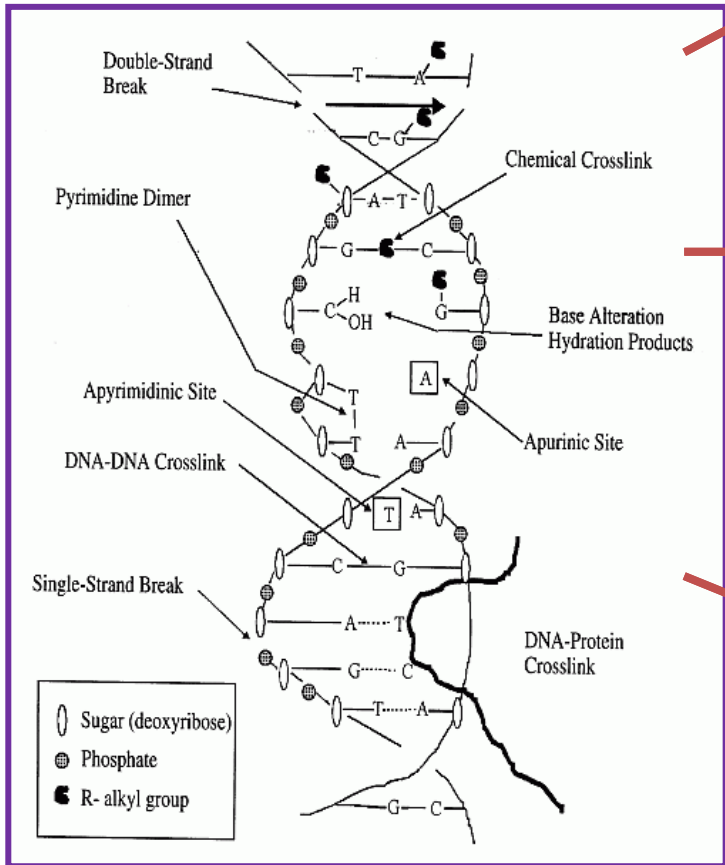
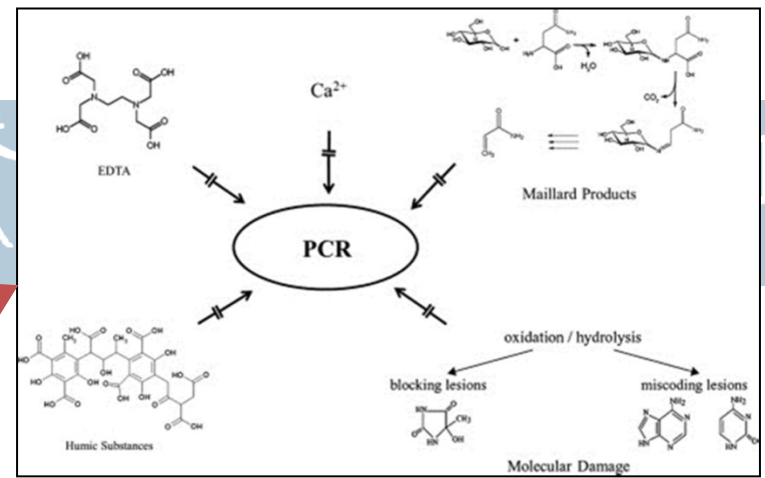
- 1) qPCR, klonování aDNA
- 2) Sangerova sekvenace
- 3) Masivní paralelní sekvenování
- 4) aDNA a epigenetika, aRNA

# Metody I.

Hydrolytické poškození

Oxidativní poškození

aDNA



ATGCATTGC  
 ATGCATTGC  
 ATG**T**ATTGC  
 ATGCATTGC  
 ATGCATTGC  
 ATGCATTGC  
 ATGCATTGC



## Odběr vhodného vzorku aDNA v terénu

- Spolupráce s archeologickými institucemi
- Prevenční opatření proti kontaminaci a zamezení urychlení degradace
- Zhodnocení podmínek nálezů, **fotodokumentace**
- Nutnost dodržovat protikontaminační opatření



Odstranění ornice, zarovnání plochy na spraš, detekce hrobových jam, odkrytí hrobu na úroveň lebky.



Ojedinelý nález – exkavace skeletu  
Plošné pohřebiště – odběr lebky



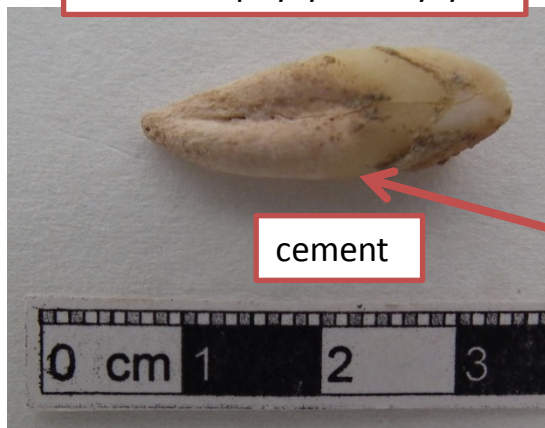
Jeskyně El Sidrón  
Lalueza-Fox C et al., 2008



## Tkáň pro izolaci aDNA

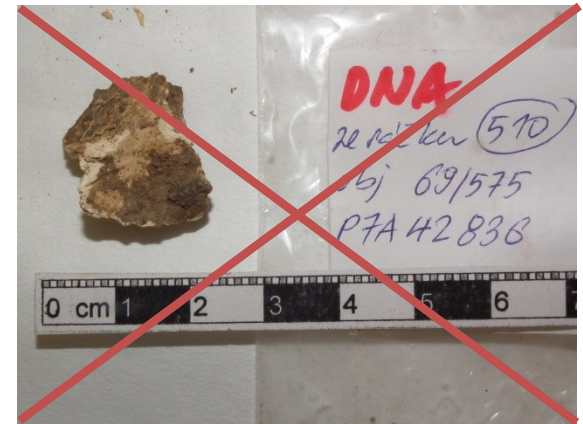
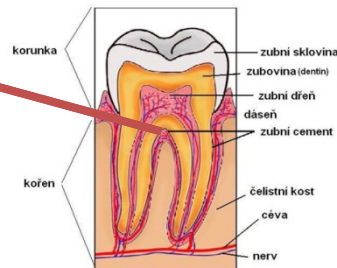


Přechod epifýzy a diafýzy

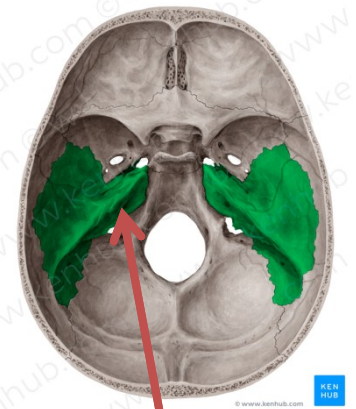


cement

- Zub nebo dlouhá kost (Sosa *et al.*, 2013; Prinz *et al.*, 2007).
- Kost musí být tvrdá, těžká, bez porézní struktury, prasklin a poškození.
- Zub má mít zachovalé kořeny (Bollongio *et al.*, 2008).
- DNA se v kosti fixuje již za života člověka během remodelace kostní tkáně (Campos *et al.* 2012).



S rozvojem technik NGS bylo prokázáno, že aDNA byla nejvíce zachována v kosti skalní, která je součástí kosti spánkové (Pinhasi *et al.*, 2015).



Kost skalní



## Preizolační zpracování vzorku

- Mechanické odstranění zeminy - kost nebo zub neumýváme, pouze lehce utřeme DNA free vodou (Rohland *et* Hofreiter, 2007), poté látkou degradující povrchovou DNA
- Z kosti je bruskou vyříznut fragment cca 1 x 1 cm, zub použijeme celý, popř. pouze kořen
- Tkáň je exponována pod zdrojem UV záření (254 nm) po dobu 20 minut z každé strany
- Poté je vzorek uložen do hlubokomrazicího boxu (-80° C) na minimálně 24 hodin.
- Následně je podchlazený vzorek tkáně homogenizován (pulverizován).



## Izolace aDNA

- Extrakce aDNA je klíčovým krokem k úspěchu v následných analýzách.
- Charakteristika tzv. „low copy number“, LCN (Bar *et al.*, 2000; Capelli *et al.*, 2003; Allonso *et al.*, 2004; Edson *et al.*, 2004; von Wurmb-Schwark *et al.*, 2008; Alaeddini *et al.*, 2010).

Při extrakci aDNA musí být odstraněna jak organická, tak i anorganická složka kosti, tak aby nedošlo ke ztrátě aDNA či její další degradaci.

Anorganická složka – hydroxyapatit

Organická - kolagenem typu I.

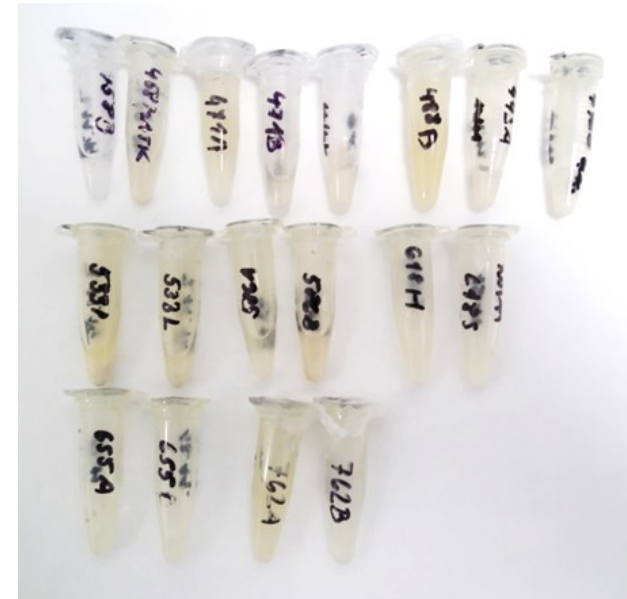
Vhodný protokol pro extrakci aDNA také odstraní potenciální inhibitory enzymatických reakcí (Höss *et al.*, 1993; Kalmar *et al.*, 2000, Keyser-Tracqui and Ludes, 2005)!

Dodnes není k dispozici protokol, který by dokázal řešit všechny komplikace spojené s extrakcí aDNA (Anderung *et al.*, 2008).



## Lyzace + dekalcifikace kostní tkáně

- Extrakce aDNA = 1) **lyzace + dekalcifikace** a 2) **purifikace DNA**.
- 50 mg - 40 g kostního prášku
- Lyzace = inkubace kostního prášku v pufru složeného z kyseliny etylendiamintetraoctové (EDTA), proteinázy K a různých aditiv (dodecylsulfát sodný, dithiothreitol, Triton X-100, N-lauryl sarkosin).



Přítomnost huminových kyselin značí tmavé zbarvení lyzátu.





## Lyzace + dekalifikace kostní tkáně

- EDTA je chelační činidlo, které vychytává dvojmocné vápenaté ionty a také chrání DNA před působením nukleáz (Loreille *et al.*, 2007; Butler, 2005).
- Proteináza K štěpí z karboxylové strany hydrofobní, alifatické a aromatické aminokyseliny, čímž zapříčiňuje digesci proteinů, zejména kolagenu.
- 3 – 24 hodin.

### Purifikace aDNA

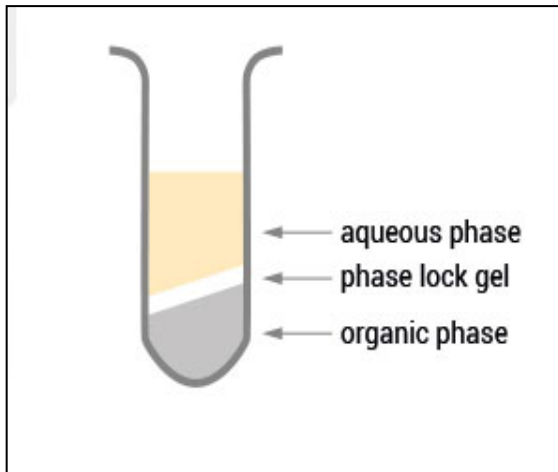
1. fenol-chloroformová extrakce
2. adsorpce DNA na silikátové částice
3. adsorpce DNA na magnetické kuličky



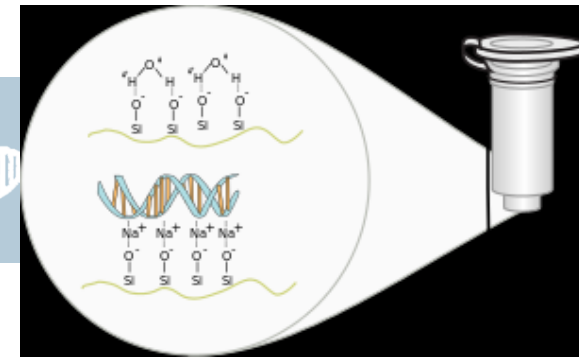
## Purifikace aDNA: fenol – chloroformová metoda

Odstranění proteinů extrakcí pufrem ekvilibrovaným směsí fenolu a chloroformu (fenol:chloroform:isoamylalkohol v poměru 25:24:1)

→ směs fenol + chloroform se nemísí s vodou → ve vodném prostředí buněčného lyzátu tvorba 2 vrstev: těžší organické fáze a lehčí vodné fáze



promíchání směsi → denaturace proteinů a jejich vysrážení a centrifugace: oddělení těžší organické fáze od lehčí vodné fáze (s nukleovými kyselinami) získáme vodný roztok DNA bez proteinů, naředěný a se stopami fenolu a chloroformu → precipitace alkoholem (etanolem nebo isopropanolem) nebo zkoncentrování kolonami.  
<http://www.youtube.com/watch?v=JNl1kpw9ZDQ>



## Purifikace aDNA: vazba na silikát

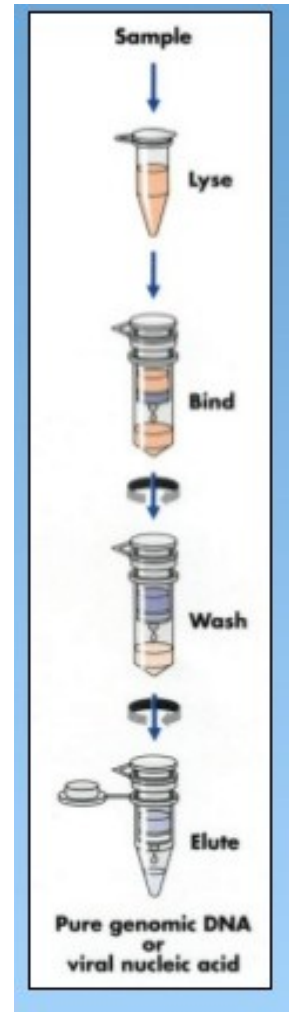
DNA se váže na silikátový povrch v přítomnosti **chaotropních solí** (např. GuSCN –guanidinium thiokyanát, NaI), které narušují vodíkové můstky mezi molekulami vody a DNA a mění rozpustnost DNA ve vodných roztocích.

Metoda obecně zahrnuje následující kroky:

- 1) Přidání silikátových kuliček (z dioxidu křemíku) a chaotropních solí k pufu s DNA
- 2) Adsorpce DNA na skleněný povrch
- 3) Sedimentace kuliček
- 4) Odsátí supernatantu
- 5) Uvolnění DNA do roztoku snížením iontové síly
- 6) Vysrážení DNA alkoholem, promytí a rozpuštění přečištěné DNA ve vodném roztoku

Pro purifikaci aDNA se nejhojněji využívají částečně předhotovené kity, které využívají silikátové frity v kolonce (skleněné sítko/membrána ve zkumavce bez dna).

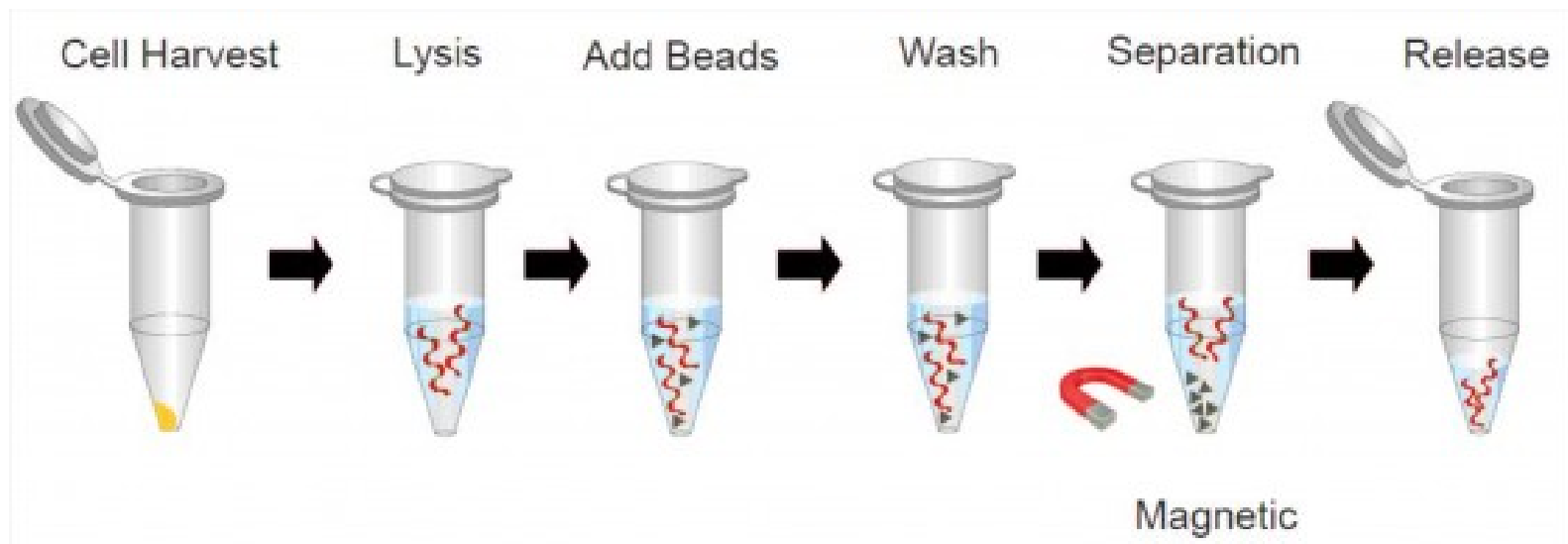
DNA se v přítomnosti chaotropních solí zachytí na fritě → lze ji promývat.





## Purifikace aDNA: vazba na magnetické kuličky

[http://www.youtube.com/watch?v=NGp671m1\\_\\_A](http://www.youtube.com/watch?v=NGp671m1__A)





## Amplifikace aDNA

- PCR a její modifikace
- Klonování aDNA v bakteriích



## Polymerázová řetězová reakce (PCR)

1. Denaturace
2. Annealing
3. Elongace

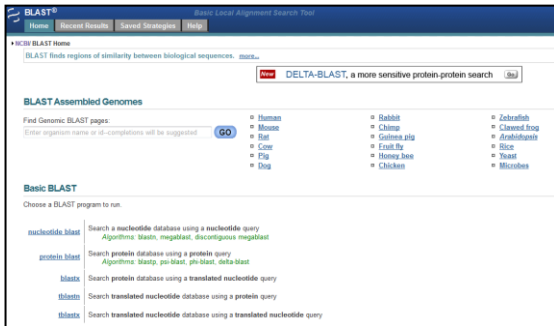
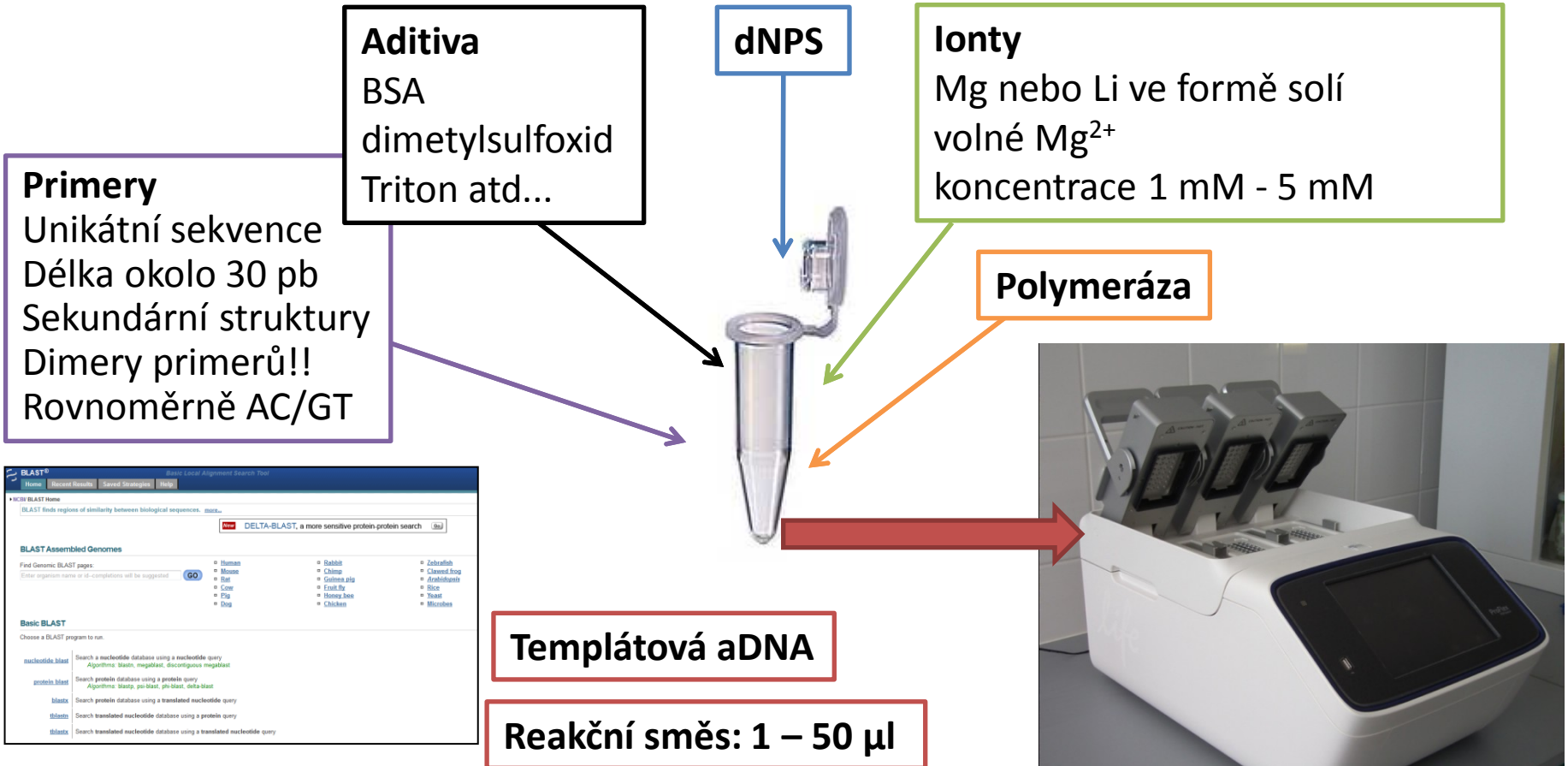
[http://www.youtube.com/watch?v=eEcy9k\\_KsDI](http://www.youtube.com/watch?v=eEcy9k_KsDI)

## Objev Polymerázové řetězové reakce

- 1971 Kleppe et al. objev amplifikace in vitro
- 1976 objev termostabilní polymerázy z *Thermus aquaticus* (Chien *et al.*, 1976)
- 1983 Mullis pracující ve společnosti Cetus Corporation (Kalifornie) vymyslel koncept PCR
- 1993 Nobelova cena za chemii



# Složení reakční směsi aDNA





# Složení reakční směsi aDNA

## Primery

Teplota nasedání ~ 60° C  
Sekvenčně i druhově specifické  
Dimery!!!

**OVERLAPPING PRIMERS STRATEGIE**

dNPS

## Ionty

Rezidua Ca mohou inhibovat Mg, proto je nutné optimalizovat jejich koncentraci tzv. **HOŘČÍKOVOU ŘADOU**

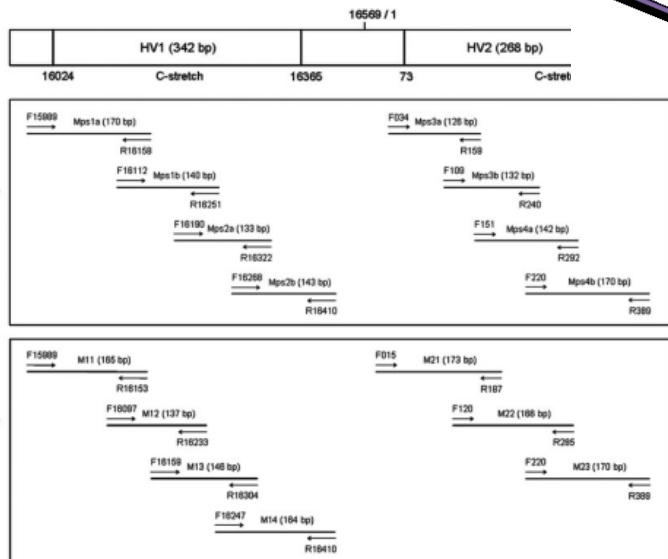
Polymeráza

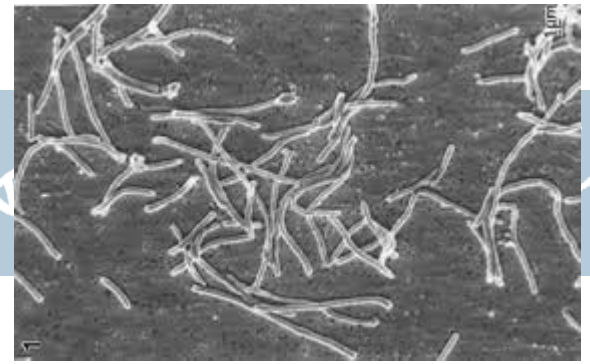
Templátová aDNA

Reakční směs: 20 – 50 µl

## Aditiva

BSA – bovinní sérový albumin, napomáhá činnosti polymerázy  
Triton – detergent,  
spermatická lososí DNA





## Polymeráza

- Enzym polymeráza pochází z bakterie *Thermus aquaticus* (Taq polymeráza), *Tth* (*Thermus thermophilus*) nebo *Tfl* (*Thermus flavus*), pro analýzu aDNA se však nejčastěji používají modifikované polymerázy, které se v přírodě nevyskytují.
- Polymeráza je při amplifikaci aDNA nejčastěji zasažena inhibitory a poškozením templátové molekuly. Buď je enzym **inhibován**, což způsobí nižší výtěžek reakce nebo **částečně** či **zcela selže**, což má za následek falešně negativní výsledek. Řešením je navýšení počtu jednotek (U) polymerázy v PCR směsi.





## Polymeráza

- Modifikace polymeráz:

Hot start – např. Amplitaq Gold polymerase

Přesné - Platinum Taq DNA *Polymerase High Fidelity*,

Phusion Hot Start

**Reparační – např. Restorase DNA polymerase**

Kromě vlastní amplifikace může být aDNA reparována i směsí enzymů, které se cyklování neúčastní – např. **PreCR Repair Mix** (New England Biolabs);

<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/dna-damage-and-precr>



## Modifikace podmínek cyklování aDNA:

Počet cyklů reakce (až 50)

1) Hot start PCR: využívá **hot start polymerázu**, která redukuje nespecifickou amplifikaci, polymeráza je chemicky (protilátkou) nebo mechanicky modifikována tak, aby její aktivita byla spuštěna až zahřáním na 95 °C.

2) Multiplexová PCR: amplifikace **více lokusů** během jedné reakce, je však nutná důkladná optimalizace primerů a podmínek cyklování

3) Nested PCR: Zvyšuje specifitu PCR, dva PCR cykly v jednom:

1) Produkt amplifikace **je méně specifický**, delší než požadovaný produkt

2) **Přesné primery**, jako templát slouží produkt předchozí reakce

4) Touch down PCR: redukuje nespecifické pozadí reakce, snižování teploty nasedání primerů od nespecifické - o 3 - 5°C vyšší k přesné teplotě nasedání

Nižší teplota – zvyšuje přesnost nasedání

Vyšší teplota – zvyšuje šanci na nasednutí primerů

**PCR v reálném čase (kvantitativní)**

