

Úloha č. 2

Detekce polymorfizmu I/D genu pro ACE pomocí PCR

ÚVOD

Úloha renin-angiotensinového systému (RAS) byla donedávna zmiňována pouze v souvislosti s regulací krevního tlaku. V posledních letech je velmi často diskutována role RAS v mozku, kde byly nalezeny mRNA pro renin, angiotensinogen i angiotensinkonvertázu. Bylo zjištěno, že angiotensin má mnoho behaviorálních efektů, jako je stimulace žízně a modulace chuti na slané, ovlivňování paměti a učení atd. Byla zjištěna interakce mezi mozkovým RAS a klasickými neurotransmiterovými systémy, jako jsou systém cholinergní, noradrenergní, dopaminový, GABAergní a opioidní.

Angiotensinkonvertáza (ACE) je enzym, který konvertuje angiotensin I na angiotensin II, navíc má ještě plno zajímavých funkcí - inaktivuje bradykinin, substanci P, neurotensin a enkefaliny. Bylo zjištěno, že polymorfismus I/D ACE ovlivňuje plazmatickou hladinu tohoto enzymu tak, že se jeho hladina snižuje od genotypu DD po genotyp II. Do současné doby byly publikovány pouze čtyři studie zabývající se vztahem I/D ACE polymorfizmu k mozkovým funkcím. Arinami et al. (1996) zjistil, že polymorfismus I/D ACE je jedním z genetických faktorů ovlivňujících interindividuální variabilitu hladiny substance P. Dále zjistil, že tento polymorfismus může mít vztah k dispozicím k afektivním poruchám. Amouyel et al. (1996) sledoval vliv polymorfizmu I/D ACE na kognitivní funkce a zjistil, že frekvence alely D u genotypu DD byla vyšší u skupiny osob s kognitivní poruchou. Richard et al (2000) potvrdil homozygotní kombinaci alel DD jako rizikový faktor kognitivních poruch. Hollá et al. (1999) studovala I/D ACE polymorfismus M235T polymorfismus genu pro angiotensinogen u zdravých osob ve vztahu k typu osobnosti zjišťovaného podle rozšířené Bortnerovy stupnice. Zjistila, že genotyp IIMT má vztah k osobnosti typu A a genotyp DDMT má vztah k osobnosti typu B. Zjistila také prevalenci alely D u osobnosti typu B, který může být charakterizován jako introvertní typ osobnosti.

Analýza vybraných polymorfizmů bude provedena pomocí standardní agarózové elektroforézy s vizualizací PCR fragmentů v UV světle. Amplifikace specifických úseků DNA proběhne klasickou jednokrokovou PCR.

PRACOVNÍ POSTUP

I. PCR reakce

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 µl), termocykler, reagentie pro PCR – KAPA mix, primery, PCR voda, DNA.

Reakční směs pro PCR (25 µl/vzorek):

*KAPA mix.....	12,5 µl
*ID-1 primer.....	0,5 µl
*ID-2 primer.....	0,5 µl
PCR voda.....	10,5 µl
<hr/>	
*DNA.....	1,0 µl

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix – obsahuje HotStart DNA polymerázu, PCR pufr, dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (1,5 mM), stabilizátory.

*ID-1 (5´ - CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT - forward)

*ID-2 (5´ - GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T - reverse)

*DNA – použity izoláty z 1. cvičení

Amplifikace fragmentů:

- Mikrozkušavky vložte do termocykléru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

	94°C	2,5 min
32x	94°C	30 sek (denaturace)
	56°C	30 sek (annealing)
	72°C	30 sek (extenze)
	72°C	5 min (extenze)
	10°C	hold

II. Analýza na agarózovém gelu

Příprava agarózového gelu (agaróza, 1xTBE pufr, ethidiumbromid/MidoriGreen):

1) Výpočet

- vypočítáme objem vany, určené pro elektroforézu ($V = a \cdot b \cdot c$)
- do výsledného objemu připravíme 1,5 % gel

$$\begin{array}{r} \text{př.: } V = 120 \text{ ml;} \\ 120 \text{ ml} \dots\dots\dots 100 \% \\ x \text{ ml (g)} \dots\dots\dots 1,5 \% \\ \hline \end{array}$$

$$x = 1,5/100 * 120 = 1,8 \text{ g}$$

Pro přípravu 1,5 % agarózového gelu je potřeba 120 ml 1xTBE pufru a 1,8 g agarózy.

2) Postup

- a) v mikrovlnné troubě se rozvaří příslušné množství agarózy v odpovídajícím objemu TBE pufru. Je nutno dbát na dokonalé rozpuštění agarózy (úplně čirý roztok),
- b) roztok se ochladí cca na 60 °C (lze udržet v ruce),
- c) mezitím se připraví elektroforetická vanička a hřebínek. Hřebínek se nesmí dotýkat dna vaničky, musí být asi 1 mm nad jejím dnem,
- d) poté se přidá etidiumbromid do výsledné koncentrace 1 $\mu\text{l}/50 \text{ ml}$ gelu. (2,4 $\mu\text{l}/120 \text{ ml}$ rozvařené agarózy). **Pozor, ethidiumbromid je mutagenní látka, pracuje se vždy v rukavicích a v odvětrávané digestoři!**
- e) směs se pozvolna promíchává, aby se nevytvořily vzduchové bubliny, následně se nalévá do předem připravené vaničky s hřebínkem tak, aby se vytvořil gel o výšce 0,5 – 0,8 cm. Případné bublinky se odstraní špičkou. Směs se nechá 15 – 20 minut tuhnout při pokojové teplotě,
- f) ztuhlá agaróza ve vaničce se vloží do elektroforetické vany naplněné 1xTBE puftrem, gel musí být zcela ponořen, opatrně se vyjme hřebínek a zkontroluje se, zda vzniklé komůrky zůstaly nepoškozeny.

Gel je připraven pro nanášení vzorků.

Nanášení vzorků na gel:

- cca 10 μl amplifikované PCR směsi se pipetou smíchá s kapkou nanášecího pufru.
- směs se pomocí pipety nanese do komůrek v gelu, přičemž do první jamky se nanese 5 μl DNA standardu o známých velikostech DNA fragmentů. Vzorek ani standard nesmí vytéct mimo komůrku a špička nesmí komůrku propíchnout.

Elektroforéza:

- gel ve vaničce musí být správně orientován, komůrky s DNA musí být umístěny u katody, aby DNA mohla migrovat gelem směrem k anodě.
- elektroforéza se provádí při napětí 90 V po dobu 40 minut. Při správném zapojení se na elektrodách generují bublinky jako produkt elektrolýzy vody.
- elektroforéza se obvykle ukončuje, když barvička (součást nanášecího pufru) doputuje do 2/3 gelu.

Vizualizace DNA fragmentů:

- gel se umístí na UV skleněnou plochu transluminátoru. Před pozorování DNA fragmentů v UV světle je nutno překrýt gel ochranným štítem (součást transluminátoru) event. použít ochranné brýle!
- gel je možné zdokumentovat pomocí digitálního fotoaparátu s UV filtrem.