

Úloha č. 3

Detekce polymorfizmu TaqI A genu pro DRD2

ÚVOD

ADHD (porucha pozornosti/hyperkinetický syndrom) je multifaktoriální onemocnění podmíněné různými kandidátními geny. Hyperkinetický syndrom se vyskytuje asi u 6 – 10 % dětské populace v poměru chlapců a dívek 3 až 10:1 (dle diagnostických kritérií). K základním symptomům patří nadměrná aktivita, nepozornost a impulzivita, výjimkou nejsou ani další přidružené psychické poruchy.

Pro pochopení multifaktoriální etiologie ADHD a komorbidních poruch je potřebné odhalit co největší počet genů, které se podílí na vzniku, vývoji a závažnosti onemocnění a identifikovat funkční polymorfismy asociované s fenotypem. V současné době je známo více než 30 genů různých polygenních systémů podílejících se na vzniku a vývoji onemocnění. Jednotlivé alely těchto genů mohou být v populaci relativně časté, protože nepředstavují klasické mutace, které vyřazují gen z funkce, ale polymorfismy, které jsou příčinou arteficiální aktivity produktu ať už jde o transkripci, translaci či o dysbalanci různých isoform výsledného proteinu. Výzkum se zaměřuje především na geny kódující jednotlivé proteinové složky dopaminergního systému, protože některé struktury, zahrnuté do patogeneze ADHD, jsou bohaté na dopaminovou inervaci. Vyšetřuje se souvislost mezi poruchou pozornosti/hyperaktivním syndromem a polymorfismy v genech pro dopaminové receptory (DRD2, DRD3, DRD4 a DRD5), dopaminový transportér (DAT1), dopamin-b-hydroxylázu (DBH), enzym, zapojený do metabolismu dopaminu, a serotoninový transportér (5-HTT). Sleduje se přítomnost rizikových alel, hodnotí se vliv těchto rizikových alel a kombinaci vlivů alel vzájemně interagujících genů na vývoj a závažnost onemocnění a výskyt dalších komorbidit. Studium jednotlivých transmitterových systémů, které jsou do patogeneze ADHD zapojeny, může v budoucnosti pomoci při volbě vhodného psychofarmaka vzhledem k tomu, že v léčbě hyperkinetické poruchy se uplatňují látky s různým mechanismem účinku.

Byla prokázána souvislost mezi TaqI A1 polymorfismem (resp. alelou A1) a ADHD, kdy homozygoti pro tuto rizikovou alelu vykazovali vyšší frekvenci onemocnění.

Vybraný polymorfismus bude rovněž detekován pomocí agarózové elektroforézy v UV světle. Amplifikace specifických úseků DNA klasickou jednkrokovou PCR bude navíc doplněna o restriční analýzu.

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
DO-1 primer.....	0,5 µl
DO-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.

*DNA – použity izoláty z 1. cvičení

Amplifikace fragmentů:

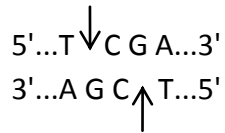
- Mikrozkušavky vložte do termocykleru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

	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. Restrikční analýza

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 µl), termocykler, reagentie pro restrikční analýzu – PCR produkt, restrikční enzym FastDigest TaqI, 10x FastDigest Buffer, PCR voda.

Restrikční místo enzymu:



Reakční směs:

10x FastDigest Buffer	1,0 µl
Taq I	0,5 µl
PCR voda.....	3,5 µl
<hr/>	
PCR produkt	5,0 µl

Teplotní profil restrikce (termocykler): 65°C – 15 min

III. 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

př.: $V = 120 \text{ ml}$;

120 ml.....100 %

x ml (g).....1,5 %

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

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 pufrem, 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.
-
- Amplifikáty naneste na připravený 1,5% agarózový gel v elektroforetické vaně. Vanu připojte ke zdroji elektrického napětí a nechte proběhnout elektroforézu cca 40 minut při 90 V.
 - Poté vyjměte gel z elektroforetické vany a vložte jej do transluminátoru ke konečnému vyhodnocení.

Vyhodnocení výsledků

Polymorfismus TaqIA se může vyskytovat ve dvou variantách – TaqI A1 a TaqI A2. Alela A1 nepodléhá restrikčnímu štěpení, na gelu tedy nalezneme jediný proužek o délce 310 bp. Alela A2 je enzymem štěpena, po elektroforéze vidíme na gelu proužky dva o délce 130 bp a 180 bp.