

# Základy práce s aDNA – cvičení

## Protokol

**Barbora Miklasová**

**7. 1. 2018**

### Úvod

V praktické části v rámci předmětu Základy práce s aDNA jsme provedli analýzu aDNA vybraného jedince z archeologických sbírek depozitáře LBMA. Cílem analýzy bylo jednak se prakticky seznámit s laboratorními metodami a dále určit haplotyp zkoumaného jedince podle analýzy HV1 regionu mtDNA.

*Mitochondriální DNA (mtDNA)* je kruhová dvouřetězcová molekula DNA, obsažená ve 2-8 kopiích v mitochondriích eukaryotických buněk. Je nositelkou mimojaderné genetické informace. Dědičnost mtDNA u lidí (u savců) probíhá uniparentálně, konkrétně matrilineárně. Na molekule mtDNA rozlišujeme těžký řetězec, bohatý na purinové báze, a lehký, v němž převažují pyrimidinové báze. Délka lidské mtDNA je 16 569 párů bází. Na molekule mtDNA byla identifikována kódující oblast 13 genů pro tvorbu polypeptidů, které zajišťují metabolismus mitochondrií, dále 2 genů pro rRNA a 22 genů pro tRNA. Na molekule rozlišujeme i kontrolní oblast, tzv. D-smyčku, dlouhou 1 124 párů bází, v níž se nachází počátek replikace těžkého řetězce a je oblastí nasedání transkripčních faktorů. V této oblasti byl zjištěn několikanásobně vyšší výskyt jedonukleotidových polymorfismů (SNP), konkrétně na místech tzv. hypervariabilních oblastí HV1, HV2 a HV3. Při studiu kombinací SNP v hypervariabilních oblastech lze porovnáním mtDNA jedince s rCRS (revidovaná Cambridžská referenční sekvence) stanovit tzv. *haplotyp*. Jednotlivé haplotypy pak řadíme do *haploskupin*, díky kterým můžeme sledovat příbuznost po mateřské linii zpětně, a tak zkoumat genetický vývoj populací ve světě a odhadovat jejich migrace v historii, neboli sestavit fylogenetické stromy lidských populací.

### Materiál

Pro analýzu aDNA byly použity vzorky kostní tkáně a zubu jedince z hrobu č. 727 z archeologického naleziště Znojmo Hradiště, patřící k osídlení velkomoravské populace, tedy z období přelomu 9./10. stol. n.l. Antropologický materiál byl na lokalitě vyzvednut v roce 2012. Odhad stáří – dospělý jedinec, datum odběru 6. 10. 2017, označení vzorku ZH 727 A.

- KOST – vzorek 1x1cm z místa přechodu proximální epifýzy a diafýzy levého femuru, bez povrchového poškození v místě odběru, zachovalost kosti středně dobrá s poškozenou kloubní hlavicí a chybějící částí proxim. epifýzy.

- ZUB – trvalý zub, horní levá 3 stolička (/M3), zub bez poškození se zachovalými kořeny.



## Metody

Analýza HV1 regionu mitochondriální aDNA zahrnovala přípravu vzorků, izolaci za použití izolačního protokolu PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction kit, dále PCR amplifikaci, vizualizaci PCR produktů gelovou elektroforézou, purifikaci PCR produktů a sekvenaci produktů pomocí laboratoří spol. Seqme, s.r.o. Při všech krocích bylo potřeba dodržovat protikontaminační opatření LBMA.

### • Příprava vzorků

Z kosti byl vyřezán vzorek 1x1cm bruskou, zub byl použit celý a jeho povrch byl jemně mechanicky obroušen pro odstranění nečistot. Vzorky byly otřeny DNA free vodou, DNA removerem a exponovány UV záření po dobu 20 minut z každé strany pro odstranění povrchové DNA. Poté byly namlety na prášek a přesypány do zkumavek, každý zvlášť.

### • Izolace aDNA

Nejprve jsme připravily lyzační pufr:

Komponenta	Objem (1 reakce)
PrepFiler® BTA Lysis Buffer	220 $\mu$ l
1.0 M DTT	3 $\mu$ l
Proteináza K	7 $\mu$ l

Po přidání ke vzorku jsme směs důkladně promíchaly a nechaly inkubovat při 56°C po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky centrifugovány, lyzát bez sedimentu odebrán a uchován v lednici po dobu 2 týdnů. Po přidání PrepFiler Lysis Bufferu byly ke vzorkům napipetovány magnetické částice PrepFiler Magnetic Particles a pomalu a krátce promíchány, stejně tak izopropanol. Dále byly směsi 10 minut inkubovány při pokojové teplotě a zvortexovány na maximum. Následně byly zkumavky umístěny do magnetického stojanu na 10 minut pro nasednutí mag. částic s navázanou DNA na stranu. Poté mohla být odsáta vodná fáze. Vzorky byly

promývány Prepfiler Wash Bufferem A a B a při opakovaném umístění do magnetického pole byla odsáta veškerá tekutina. Poté jsme přidaly Prepfiler Elution Buffer, směsi promíchaly a inkubovaly, aby se molekuly DNA opět vyvázaly z magnetických částic. Po umístění zkumavek do magnetického stojánku pak bylo možné pipetou odsát čistý izolát s aDNA.

### • PCR amplifikace

Jelikož aDNA je ve většině případů poškozená a degradovaná, místo klasické Taq polymerázy jsme použily *mtDNA restorázu*, která je schopná v různé míře aDNA opravit. Proto samotné PCR amplifikaci předcházela inkubace vzorků s reakční směsí s mtDNA restorázou po dobu 1 hodiny. Až poté byly ke směsi přidány primery a spuštěna PCR. Vzhledem k rozdělení vzorků, viz níže, byla reakční směs, neboli tzv. mastermix, připravena o následujícím objemu (násobek 11):

Reagencie	Objem	Množství	Upravený objem
10x Restorase reaction buffer	5	1x	55
dNTPs Mix	8	200 µM/každý	88
Primer forward	1	0,5 µM	11
Primer reverse	1	0,5 µM	11
DDW	24		264
Restorase	1	0,05U/µL	11
DNA	10	1-2 ng	110
<b>Celkem</b>	<b>50</b>		<b>550</b>

Pro zvýšení přesnosti analýzy byly amplifikovány 4 překrývající se úseky sekvence v regionu HV1 (označeny HVI/1, HVI/2, HVI/3, HVI/4). K tomu bylo zapotřebí zvolit 4 vhodné dvojice primerů, přímý (forward), ohraničující začátek sekvence, a zpětný (reverse), definující konec. Z toho důvodu byl vzorek kostní tkáně a stejně tak i vzorek ze zubu rozpipetován, každý do 4 jamek kolonky. Pro kontrolu úspěšné PCR a případné kontaminace byla zařazena i pozitivní (s již známou DNA) a negativní (čistá voda) kontrola. Celkem tedy 10 jamek. Sekvence zvolených primerů a délku amplifikovaných úseků uvádí následující tabulka:

Mt DNA region				Sequence of primers	Product size
<u>HV1</u>	F15989	HV I/1	1a	CCCAAAGCTAAGATTCTAAT	165 bp
	R16153*		1b	CAGGTGGTCAAGTATTTATGG	
	F16097*	HV I/2	2a	TACATTACTGCCAGCCAC	137 bp
	R16233*		2b	TGATAGTTGAAGGTTGATTGCTGT	
	F16159 *	HV I/3	3a	CATAAAAACCCAATCCACAT	146 bp
	R16304		3b	ACTGTTAAGGGTGGGTAGGT	
	F16247*	HV I/4	4a	ACTCCAAAGCCACCCCTCA	164 bp
	R16410		4b	GAGGATGGTGGTCAAGGGAC	

Průběh PCR je popsán tabulkou:

Preinkubace	37 °C	1 hod	
-------------	-------	-------	--

	72 °C	5 min	
Iničiační denaturace	94 °C	30 sec	
Přidání primerů	35 °C v termobloku		
Denaturace	94 °C	30 sec	
Annealing	56 °C	30 sec	40x
Extenze	72 °C	30 sec	
Finální extenze	72 °C	7 min	

### • Vizualizace gelovou elektroforézou

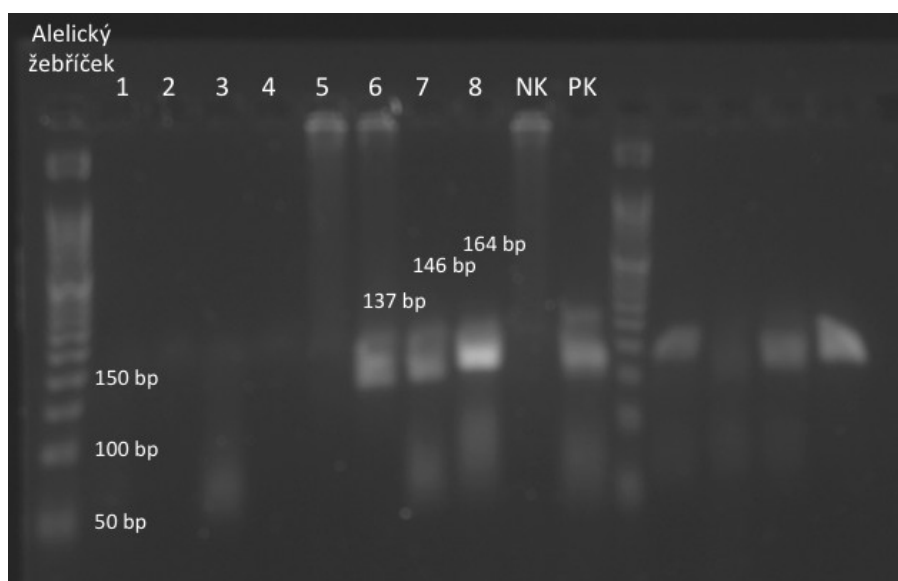
Pro elektroforézu jsme použily 3% agarózový gel, který jsme připravily z 2,1 g agarózy a 80 ml TBE pufru. Pro možnost vizualizace jsme do gelu přidaly 16 µl Nancy – 520 DNA Gel stain solution (Sigma Aldrich) a zároveň jsme k PCR produktům přidaly 5 µl gelové barvičku Gel Loading Solution (Sigma Aldrich). Do připravených jamek jsme napipetovaly 10 µl alelického žebříku a dále po 10 µl PCR produktu z každé jamky. Po zapojení elektrod jsme reakci nechaly běžet cca 1 hodinu.

### • Sekvence

Před samotným sekvenováním jsme směsi naamplifikovaných PCR produktů nejprve přečistily od přítomných primerů a dNTP, a to inkubací 10 µl každého vzorku se 4 µl CleanSweep PCR Purification Regagentem a následnou deaktivací enzymu zvýšením teploty až na 80 °C. Následně jsme přečištěné PCR produkty obohatily opět sekvenačními primery v potřebném množství. Pro sekvenaci byly vzorky zaslány do společnosti Seqme, s.r.o.

## Výsledky

Výsledkem vizualizace gelovou elektroforézou je následující elektroforogram:



- 1 – HVI/1 kost
- 2 – HVI/2 kost
- 3 – HVI/3 kost
- 4 – HVI/4 kost
- 5 – HVI/1 zub
- 6 – HVI/2 zub
- 7 – HVI/3 zub
- 8 – HVI/4 zub
- 9 – negativní kontrola
- 10 – pozitivní kontrola

Na něm vidíme, že PCR amplifikace byla úspěšná pouze u vzorků ze zubu, a to konkrétně u vzorků 6, 7, 8, kde máme produkty regionů HVI/2, HVI/3 a HVI/4.

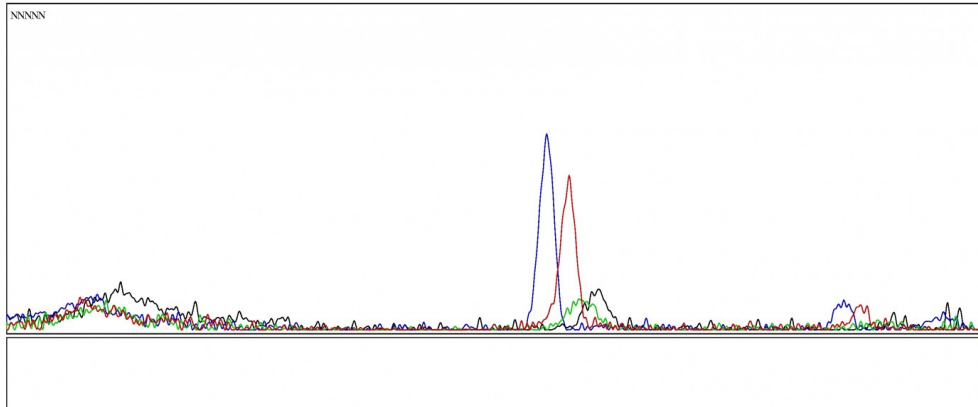
Negativní kontrola značí nepřítomnost kontaminace cizorodou DNA a pozitivní kontrola je potvrzením úspěšně proběhlé PCR.

Výsledkem Sangerova sekvenování ukazují následující obrázky:  
HVI/1 forward



Sample name: 1

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017

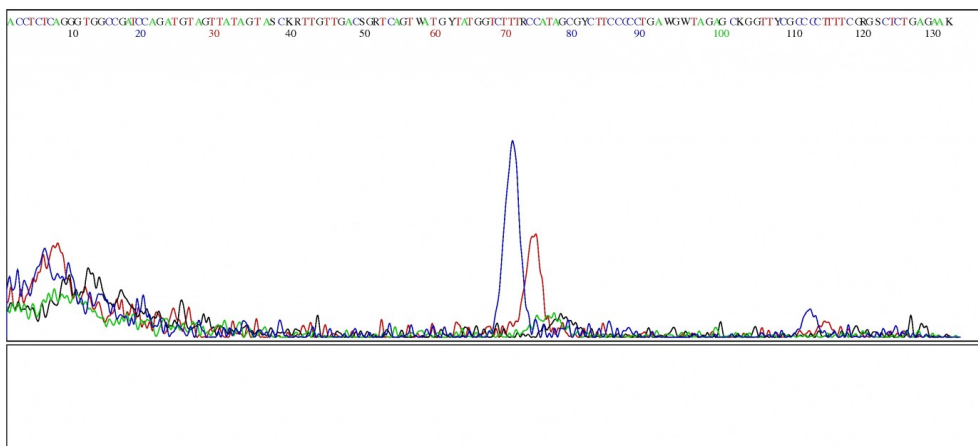


HVI/1 reverse



Sample name: 2

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017

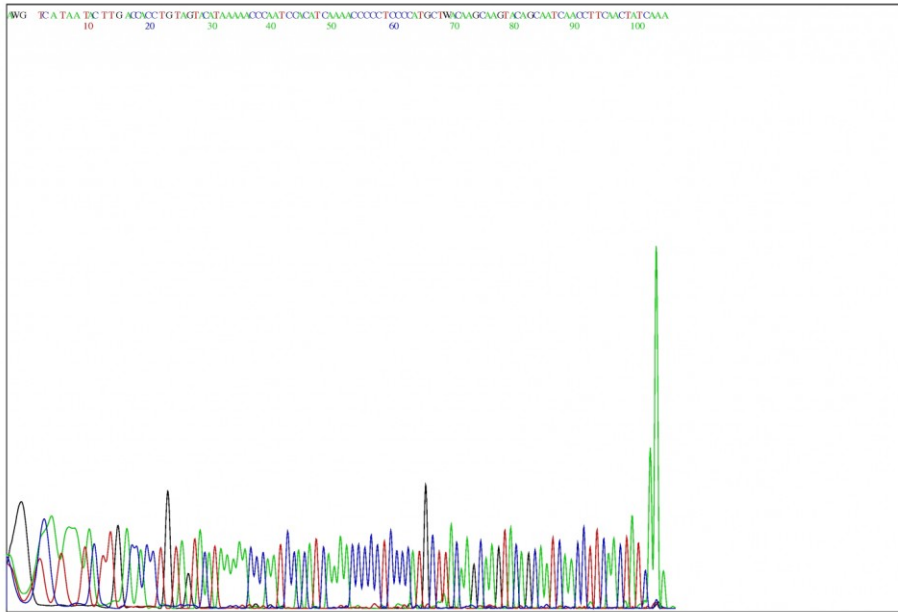


## HVI/2 forward



Sample name: 3

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017



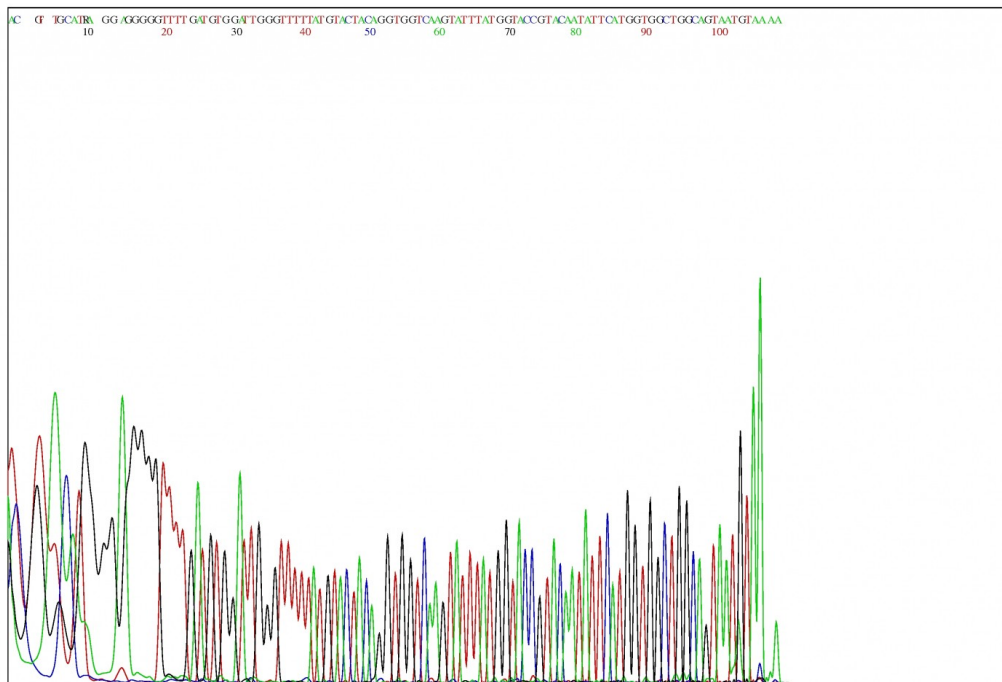
Please notice that it is highly recommended to interpret obtained sequences based on .abi files.

## HVI/2 reverse



Sample name: 4

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017



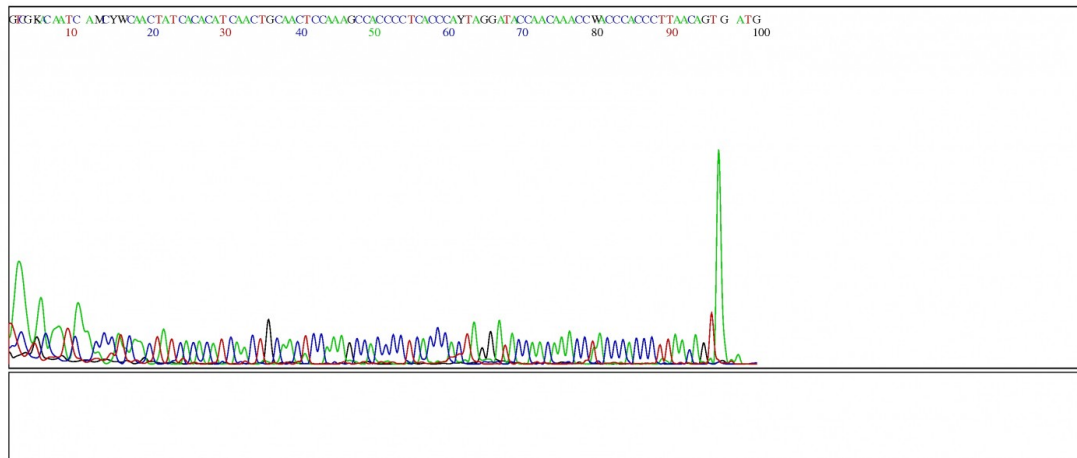
Please notice that it is highly recommended to interpret obtained sequences based on .abi files.

### HVI/3 forward



Sample name: 5

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017

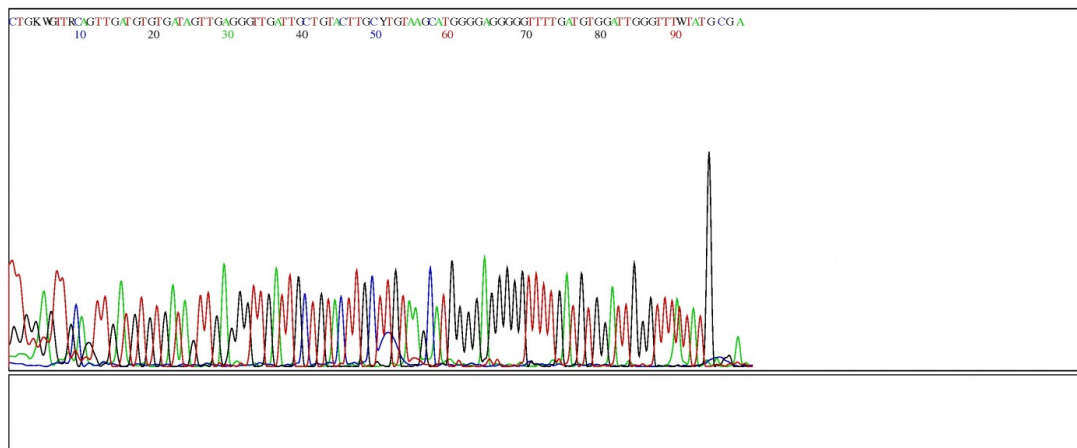


### HVI/3 reverse



Sample name: 6

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017

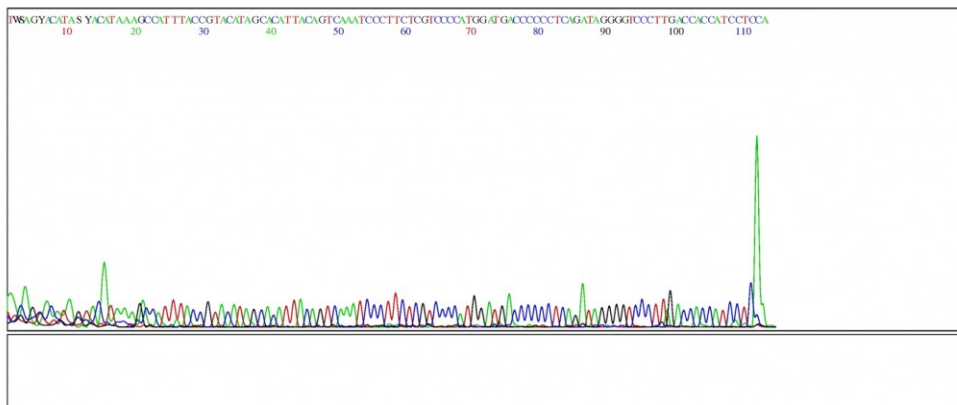


### HVI/4 forward



Sample name: 7

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017

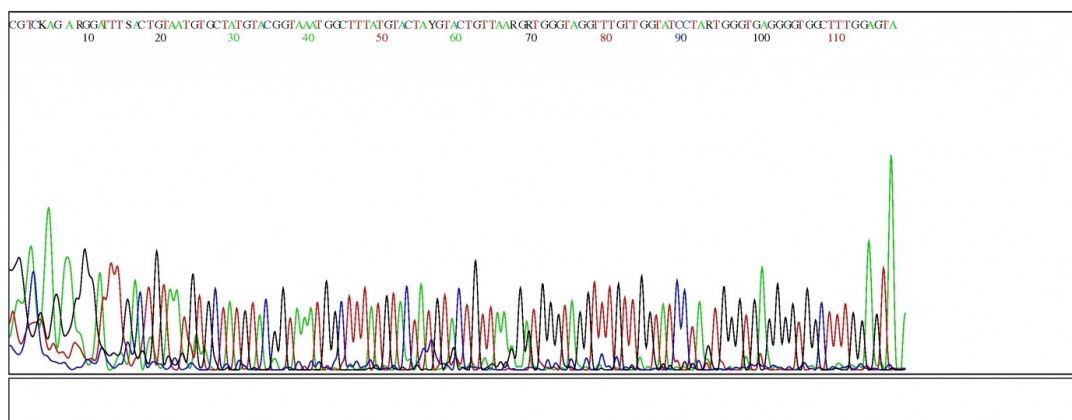


## HVI/4 reverse



Sample name: 8

User name: Kristýna Pižová  
Order no.: 172113389  
Order date: 05.12.2017



Výsledné sekvence:

### HVI/1 165 bp

1. forward – neúspěšná sekvenace/amplifikace

2. z reverzího řetězce – nenalezen žádný z primerů

MTTCTCAGAGSCYGGAAAAGGGGCGRAACCMGCTCTAWCWTCAGGGGGAAGRCGCT  
ATGGYAAAGACCATARCATWACTGAYCSGTCAACAAYMGSTACTATAACTACATCTG  
GATCGGCCACCCTGAGAGGT

### HVI/2 137bp

3. forward - modře 3a primer

TACTAATACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCTCC  
CCATGCTWACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCAA

4. z reverzního – zeleně 2a + modře 3a + žlutě 1b rev. primery

TTTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAACTTGACCACC  
TG TAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCTCCTYATGCA

### HVI/3 146 bp

5. forward – fialově 4a primer

GKCAATCACAMCYWCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACC  
CAYTAGGATACCAACAAACCWACCCACCTTAACAGTGATG

6. z reverzního – 2b primer

TCGCATAWAAACCCAATCCACATCAAACCCCTCCCCATGCTTACARGCAAGTACA  
GCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGYAACWMCAG

### HVI/4 164 bp

7. forward – nenalezen primer

AGYACATASYACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCT  
CGTCCCCATGGATGACCCCTCAGATAGGGGTCCCTTGACCACCATCCTCCA

8. z reverzního – 4a primer



TACTCCAAAGCCACCCCTCA CCCAYTAGGATACCAACAAACCTACCCAYCYTTAACAG  
TACRTAGTACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTSAAATCCYTCTMG  
ACG

Souvislá sekvence proti rCRS:

CCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTTCATGGGGAAGCAGATT  
TGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTCTG TACATTA  
CTGCCAGCCAC CATGAATATTGTACGGTACCATAAATACTTGACCACCTG TAGTACA  
TAAAAACCCAATCCACAT CAAAACCCCTCCTYATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATC  
AACCTTCAACTATCACACATCAACTGCA ACTCCAAAGCCACCCCTCA CCCAYTAGGAT  
ACCAACAAACCT ACCCACCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACA  
TAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGG  
TCCCTTGACCACCATCCT

šedě nezískaná sekvence, barevně primery, červeně tučně rozdílly v sekvenci

Při porovnání v programu MITOMASTER

<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>) byla určena haploskupina X2b (X2b + 226 + 16192) se 2 variantami: C16192T a C16223T.

## Závěr

Analýza mtDNA příslušníka velkomoravské populace z hrobu ZH 727 byla provedena ze 2 tkáňových vzorků, z kosti a ze zubu. Amplifikace PCR se ukázala jako úspěšná pouze ze zubu, u všech 4 vzorků z kosti byl výtěžek nedostačující. Příčinou mohlo být poškození proximální epifyzy femuru, kudy se dovnitř kosti mohla dostat voda a jiné faktory, degradující DNA po smrti jedince. Jako úspěch bych hodnotila fakt, že nebyla prokázána kontaminace cizorodou DNA a zároveň bylo možné eliminovat inhibitory analýz, takže výtěžek ze zubu vedl úspěšně k určení haplotypu jedince podle mtDNA.

Na základě srovnání sekvence HV1 oblasti s referenční Cambridžskou sekvencí byl jedinec zařazen do haploskupiny X2B 2 variantami SNP, a to C16192T a C16223T. Haploskupina X2b patří do linie velké výchozí skupiny N, ze které se oddělila před 20 000 – 30 000 lety. Haploskupina X2b, je jednou z podskupin haploskupiny X, což je jedna z nejméně zastoupených maternálních haploskupin v současné Evropě (1%). Pozorována je především v Řecku, Makedonii, Rumunsku a v okolí Kavkazu. Jediné Euroasijské etnikum, které má poměrně vysoký podíl haploskupiny X (15%) jsou Drúzové žijící v Libanonu, Sýrii a Izraeli. X2b se nejčastěji objevuje v neolitické Evropě. Skupina byla identifikována v nálezech po celé Evropě, i na Sardinii, nebo v Maroku. Také se vyskytuje v populacích původních obyvatel Amerického kontinentu. Předpokládá se tedy, že nositelé tohoto haplotypu byly účastni v první vlně při osídlování Ameriky. Podle výzkumů populací v jižních oblastech Sibíře došlo k rozšíření této

haploskupiny do Asie teprve nedávno, zhruba v 5. stol. př. n.l., pravděpodobně z oblasti Jižního Kavkazu. Nabízí se tedy otázka, zda náš jedinec, příslušník velkomoravské populace, mohl získat tyto varianty jakožto příslušník slovanské populace, jejichž původ se odhaduje do oblasti Zakarpatí, nebo zda mohly být tyto alelové varianty např. více zastoupeny u populací zemědělců, ke kterým Slované na našem území patřily. Pro lepší porozumění by bylo potřeba zjistit četnost haploskupiny v rámci velkomoravské populace a porovnat ji s četností např. s dřívějšími populacemi, obývající toto území.