



Katedra Farmacji Stosowanej
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”
Farmacja
2017

Katedra Farmacji Stosowanej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



Analiza delecji 32 pz w genie *CCR5* wykrywającej oporność na wirusa HIV

Wstęp

Receptor CCR5 znajduje się na powierzchni m. in. limfocytów T, makrofagów, niedojrzałych komórek dendrytycznych. W odniesieniu do wirusa HIV, pełni funkcję jego koreceptora, umożliwiając wniknięcie wirusa do komórki. Gen *ccr5* znajduje się na chromosomie 3. W populacji ludzkiej znane są dwie odmiany alleliczne *ccr5* i *ccr5Δ32*. Allel *ccr5Δ32* związany jest z powstaniem nieprawidłowo sfałdowanego białka, które gromadzi się w retikulum endoplazmatycznym. Allel *ccr5Δ32* występuje z różną częstotliwością. 4-18% w populacji kaukaskiej, 9% w populacji europejskiej, 10,9% w populacji Polskiej, 12% w populacji Dolnego Śląska. Osoby posiadające obie kopie genu z delecją 32 pz (homozygoty typu zmutowanego) cechują się genetyczną opornością na zakażenie wirusem HIV, jednakże znane są przypadki, kiedy pomimo obecności obu alleli *ccr5Δ32* doszło do zakażenia wirusem HIV. Do 2009 r znane było 12 przypadków zakażenia wirusem HIV homozygoty *ccr5Δ32*. Homozygoty *ccr5Δ32* nie są odporne na zakażenie wirusem HIV szczepu CXCR4-tropowymi. Częstość występowania homozygot *ccr5Δ32* wynosi 1-2 % w populacji kaukaskiej. Heterozygoty *ccr5* i *ccr5Δ32* cechują się mniejszą podatnością na zakażenie, wolniejszym rozwojem choroby – opisuje się przedłużenie rozwoju AIDS o 2-3 lata. Ponadto stwierdzono mniejszą częstotliwość rozwoju chłoniaków niezłośliwych u pacjentów z AIDS oraz lepszą odpowiedź pacjenta na terapię antywirusową.

Izolacja DNA

W 1869 roku szwajcarski biochemik Miescher dokonał odkrycia DNA. Nie poznano jednak wtedy struktury tej cząsteczki. Prawie 100 lat później, bo w roku 1953 Watson i Crick opisali budowę dwuniciowej helisy. Z kolei w roku 1979 Vogelstein i Gillespie odkryli, iż krótkie fragmenty DNA w obecności jodku sodu, gromadzą się na powierzchni flintu czyli szkła krzemowo - ołowiowego o dużym współczynniku załamania światła. W późniejszych latach potwierdzono, że właściwość ta, charakterystyczna jest również dla pozostałych rodzajów kwasów nukleinowych.



Pierwszym etapem izolacji DNA jest wykonanie lizy komórek. Reakcja ta przebiega w podwyższonej temperaturze przy udziale proteinazy K oraz odpowiedniego buforu. Dochodzi w tym czasie do degradacji błon i białek komórkowych. Dodatkowo, w procesie izolacji DNA wymagana jest obecność soli chaotropowych, do których należy np.: tiocyjanian guanidyny, ułatwiający proces lizy komórek oraz inaktywujący nukleazy. Sole chaotropowe są to związki charakteryzujące się zdolnością do przecinania wiązań wodorowych, znajdujących się między makrocząsteczkami i wodą. Dzięki temu możliwe jest przyłączenie cząsteczek DNA do złoża krzemionkowego. W następnym etapie izolacji DNA, uzyskany materiał, po potraktowaniu etanolem przenoszony jest na kolumnę, gdzie dochodzi do wybiórczego związania cząsteczek DNA z membraną. DNA oczyszczane jest z zanieczyszczeń oraz substancji hamujących reakcje enzymatyczne poprzez przepłukiwanie kolumny roztworami myjącymi. Po osuszeniu kolumny, kwas nukleinowy wypłukiwany jest ze złoża, poprzez dodanie buforu o niskiej sile jonowej lub wody.

Uwagi wstępne:

Praca z kwasami nukleinowymi wymaga zachowania szczególnej czystości, ponieważ kwasy nukleinowe łatwo ulegają degradacji.

Miejsce do izolacji kwasów nukleinowych przemywamy 70% etanolem

Wszystkie czynności wykonujemy w czystych rękawiczkach, które przemywamy 70% etanolem

1. Izolacja DNA z wymazu

- Pałeczkę wymazową z pobranymi komórkami nabłonka umieścić w eppendorfie 1,5 ml, odciąć wystającą część, tak aby móc zamknąć probówkę.
- Dodać 350 μ l buforu lizującego SSL
- Dodać 6 μ l roztworu Proteinazy K i worteksować przez 3 sekundy
- Całość przepipetować i inkubować w temp. 56°C przez 30 min, co jakiś czas obracając probówkę
- Dodać 350 μ l buforu wiążącego SSB
- Próbkę zworteksować 3 sekundy
- Przenieść próbkę do 70°C i inkubować 6 min.
- Pałeczkę wymazową dokładnie wycisnąć o brzeg probówki, tak aby uzyskać jak największą ilość lizatu. Pałeczkę odrzucić.
- Dodać 200 μ l 96% etanolu, wymieszać przez odwracanie probówki
- Lizat przenieść na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA w ilości max 650 μ l



- Wirować 1 min przy 11 tyś. RPM
- Wyjąć minikolumnę i wylać przesącz z próbki odbierającą
- Pobrać resztę lizatu i nanieść na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA
- Wirować 1 min. przy 11 tyś. RPM
- Przenieść minikolumnę do nowej próbki odbierającej
- Do kolumny dodać 600µl roztworu płuczącego 1 (DNA znajduje się na minikolumnie)
- Wirować 30 s. przy 11 tyś. RPM
- Wylać przesącz z dolnej próbki i dodać do minikolumny 400µl roztworu płuczącego 2
- Wirować 30 s. przy 11 tyś. RPM
- Wylać przesącz z próbki odbierającej i umieścić w niej z powrotem minikolumnę
- Wirować pustą minikolumnę 2 min. przy 13 tys. RPM
- Osuszoną minikolumnę umieścić w nowej próbce 1,5 ml i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodać 50 µl buforu do elucji uprzednio ogrzanego do temp. 70°C
- Inkubować próbkę przez 2 min. w temp. pokojowej
- Wirować 1 min. przy 11 tyś. RPM
- Minikolumnę usunąć, a oczyszczone DNA przetrzymać w lodówce lub -20°C do czasu dalszych analiz lub użyć bezpośrednio do reakcji PCR.

2. Przygotowanie reakcji PCR

1. Mieszana reakcyjna

- Należy wykonać tzw. mix reakcyjny na ilość reakcji równej ilości osób przy stole laboratoryjnym plus 1 w nadmiarze. Należy również uwzględnić 3 próbki kontrolne. 2 kontrole dodatnie i jedna ujemna.



Skład mieszaniny reakcyjnej

	1 reakcja	X reakcji np.4
Master Mix	10,625 μ l	
dNTP	1,25 μ l	
Polimeraza DNA	0,125 μ l	

- Przygotowany mix zworteksować, zwirować i rozdzielić do probówek (0,2 ml) po 12 μ l. Do probówki, każda osoba indywidualnie dodaje 0,5 μ l wyizolowanego DNA. Do próbek kontrolnych, zamiast własnego DNA dodać kontrolne DNA lub wodę. Całość zworteksować lub kilkakrotnie przepipetować i zwirować.
- Opisać próbki i włożyć do termocyklera

2. Po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej i dodaniu do niej matrycy (DNA) w odpowiedniej ilości jak zamieszczono powyżej należy wykonać reakcję PCR.

PCR wykonujemy w termocyklerze, który umożliwia płynną zmianę temperatury.

Etapy reakcji PCR

1. Denaturacja

Pierwszym etapem jest rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA. W wysokiej temperaturze (zwykle około 95 °C) pękają wiązania wodorowe i podwójna helisa DNA rozdziela się na dwa pojedyncze łańcuchy.

2. Annealing - Hybrydyzacja odcinków starterowych.

Etap ten, polega na tworzeniu odcinków dwuniciowych, składających się z przygotowanych starterów - cząsteczek DNA i komplementarnej do nich sekwencji DNA. Startery oskrzydla gen mający ulec amplifikacji. Etap ten zachodzi w temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów (pomiędzy 45-60 °C)



3. Elongacja

Na tym etapie zachodzi właściwa synteza DNA i tym samym amplifikacja pożądanego genu. Podwyższenie temperatury do optymalnej temperatury działania polimerazy (72 °C) powoduje utworzenie się na matrycy z przyłączonymi do niej starterami, kompleksu z polimerazą DNA. W efekcie, rozpoczyna się synteza nici komplementarnej do matrycy. Reakcja ta trwa zwykle 30 sekund.

- Reakcję PCR prowadzić w następujących warunkach

2 min	96° C	
30 sek	96° C	40 cykli
30 sek	55° C	
30 sek	72° C	
2 min	72° C	

- Próbki po wyjęciu z termocyklera należy krótko zworteksować

3. Elektroforeza produktów reakcji PCR

Produkt reakcji identyfikujemy, rozdzielając uzyskany materiał w żelu agarozowym. Równocześnie z badanym materiałem nanosimy na żel standardy masowe - fragmenty DNA o znanych masach cząsteczkowych wyrażonych w ilości par zasad. Na podstawie położenia badanego genu w stosunku do standardów masowych określamy jego wielkość. Dodatkowo rozdzielamy również kontrolę dodatnią i ujemną.

Przygotowanie żelu agarozowego

1. Saneczki włożyć w formę i wyważyć jej równowagę
2. W saneczki włożyć grzebień
3. Przygotować żel agarozowy 2% w objętości 140 ml

Miejsce na obliczenia



4. Rozcieńczyć buforu TAE 50x, tak aby przygotować roztwór TAE 1x

Miejsce na obliczenia

5. Do naważki agarozy dodać bufor TAE 1x oraz SYBR Safe (14 μ l) i rozpuścić na gorąco
6. Klarowny roztwór agarozy ochłodzić do temp ok 50°C
7. Wylać żel na saneczki, uważając by nie pojawiły się bąble powietrza
8. żel zastyga ok 20 min

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

1. Z żelu wyciągnąć grzebień i przenieść saneczki do komory elektroforetycznej
2. Napęlić komorę buforem TAE 1x, w ilości która zapewni pokrycie żelu
3. Przygotować próby do nałożenia na żel: **15 μ l próby + 2 μ l obciążnika**,
 - a. **W przypadku kontroli dodatniej należy użyć 10 μ l próby + 2 μ l obciążnika**
4. wymieszać przez przepipetowanie w próbówce i nałożyć na żel – jeżeli pozostał płyn na ściance próbówki, należy próbę zwirować
5. Elektroforezę prowadzić przez 30-40 min / 80V
6. Po zakończonej elektroforezie przeanalizować wynik w świetle UV
7. Wyniki omówić z asystentem

Wyniki testu:

1. Prążek na wysokości 220 pz – homozygota typu dzikiego
2. Prążek na wysokości 180 pz – homozygota typu zmutowanego
3. Prążek na wysokości 180 pz i 220 pz – heterozygota