



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Katja Repnik, Uroš Potočnik

GENOMIKA V BIOMEDICINSKI TEHNOLOGIJI

Navodila za laboratorijske vaje

Maribor, 2013/2014

KAZALO

KAZALO	2
NAVODILO ZA PRIPRAVO LABORATORIJSKEGA DNEVNIKA	6
1 ISKANJE PODATKOV V GENETIKI	7
1.1 HUGO NAVIGATOR	8
1.2 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)	8
1.2.1 PODATKOVNA ZBIRKA PUBMED	9
1.2.2 NCBI dbSNP	9
1.2.3 NCBI GENE	10
1.2.4 HAPMAP	10
1.2.5 VEZAVNO NERAVNOVESJE (LD - LINKAGE DISEQUILIBRIUM)	11
1.3 ASOCIACIJSKA ANALIZA	13
1.3.1 GENOTIPSKE IN ALELNE FREKVENCE	13
1.3.2 TOČNOST REZULTATOV: HARDY-WEINBERG-OV ZAKON	14
2 IZOLACIJA DNK IZ KRVNIH VZORCEV	15
3 LAKTOZNA INTOLERANCA: ANALIZA POLIMORFIZMA V GENU LCT S PCR-RFLP TEHNIKO	17
3.1 TEORETIČNE OSNOVE	17
3.1.1 LAKTOZNA INTOLERANCA	17
3.1.2 GENETIKA LAKTOZNE INTOLERANCE	17
3.1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	18
3.1.4 RAČUNANJE KOLIČIN REAGENTOV POTREBNIH ZA USPEŠNO PCR REAKCIJO	20
3.1.5 GELSKA ELEKTROFOREZA	21
3.1.6 POLIMORFIZEM DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV (RFLP)	22
3.2 IZVEDBA VAJE	24
3.3 REZULTATI	26
4 FAKTOR TUMORSKE NEKROZE: MERJENJE EKSPRESIJE GENA TNFA S KVANTITATIVNIM PCR V REALNEM ČASU (QPCR)	27
4.1 TEORETIČNE OSNOVE	27
4.1.1 IMUNSKI SISTEM IN CITOKINI	27
4.1.2 FAKTOR TUMORSKE NEKROZE: CITOKIN PRIMARNEGA IMUNSKEGA ODZIVA	28
4.1.3 TNF IN BOLEZNI	28
4.1.4 KVANTITATIVNI PCR V REALNEM ČASU	29
4.1.5 METODE DETEKCIJE PRODUKTA PRI QPCR	31

Laboratorijske vaje iz predmeta Genomika v biomedicinski tehnologiji

4.1.6	REVERZNA TRANSKRIPCija	32
4.1.7	ANALIZA PODATKOV	33
4.2	IZVEDBA VAJE	36
4.3	REZULTATI	37
4.4	RAČUNSKA NALOGA	40
<u>5</u>	<u>LITERATURA</u>	<u>41</u>

DELO IN VARNOST V LABORATORIJU

Osnovna pravila varnega dela v laboratoriju

- V laboratorij ne nosimo pijače in hrane.
- Pred pričetkom dela se ustrezno zavarujemo z osebno varnostno opremo (zaščitna halja, zaščitna očala, zaščitne rokavice).
- Dolge lase povežemo v čop.
- Delovni prostor pred izvedbo poskusa očistimo.
- Pred izvajanjem poskusov proučimo osnovne lastnosti kemikalij (strupenost, vnetljivost - nalepka na steklenici oz. varnostni list), ki jih bomo uporabljali.
- Zdravju škodljive hlapne snovi vedno prelivamo v digestoriju.
- Tekočine pipetiramo z nastavkom.
- Odpadkov ne zlivamo v pomivalna korita ali smetišča, ampak jih ločeno zbiramo v zaprtih, označenih posodah.
- Z aparaturami je potrebno ravnati v skladu z navodili in pod nadzorom asistenta oziroma tehničnega sodelavca.
- Pri nesrečah moramo kolikor je mogoče, nuditi prvo pomoč.
- Po končanem delu si umijemo roke.

Posebni varnostni ukrepi za namen izvajanja vaje

- Preberi navodila za ustrezno laboratorijsko vajo, preden prideš na vajo!
- Pri delu z biološkim materialom je potrebno OBVEZNO nositi zaščitno haljo in rokavice. Uporabljalj tudi prijemalke in očala.
- Označite svoje eksperimente z imenom, datumom.
- Napravite si natančne zapiske postopkov in rezultatov. Po opravljeni vaji je potrebno oddati poročilo.
- Pozorno opazuj demonstracije.
- Z opremo ravnaj previdno, v skladu z navodili, ne izvajaj nikakršnih postopkov na silo.
- Preden zapustiš laboratorij pospravi in očisti površino, preveri ali je zaprt dovod plina.
- V laboratoriju ne jej in ne pij, pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnik, peresa, steklovina itd.).
- Uporabljalj aseptično tehniko, pred in po začetku dela si razkuži roke.
- Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje. Dolgi lasje morajo biti speti.
- Med delom z mikrobi in kužnino so vrata in okna zaprta, da zračni tok ne nosi mikrobov po laboratoriju.
- Pri delu pazimo, da mikrobnih kultur ne polivamo po mizi, po tleh in obleki. Z rokami se ne dotikamo kolonij in suspenzij živih mikrobov. Če pride kužnina v stik s kožo ali delavno površino, obvestimo asistenta ali tehničnega sodelavca.
- Kontaminirano delovno površino pokrijemo s staničevino in jo prelijemo z razkužilom. Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
- Kontaminiran material odlagamo v odlagalnike ali na za to označeno mesto in ga nato avtoklaviramo.

Laboratorijske vaje iz predmeta Genomika v biomedicinski tehnologiji

- Kovinske predmete, ki pridejo v stik s kužnino (pincete, bakteriološke zanke itd.) sproti ožigamo v plamenu. Ožigamo tudi vratove epruvet, erlenmajeric in steklenic z mikrobi, preden jih odpremo in po uporabi.
- Delovni prostor je potrebno pred in po delu obvezno razkužiti (razkužilo, 5% natrijev hipoklorit, etanol).
- Ostanke biološkega materiala je potrebno odlagati v posebej za to namenjene odlagalnike (rdečke vrečke, primerne za avtoklaviranje) ter jih po končanem delu takoj odvreči v rumen zabojnik.
- Raztopino etidijevega bromida lahko pripravlja le usposobljen raziskovalec oz. tehnični sodelavec. Delo z etidijevim bromidom poteka le v digestoriju.
- Agarozne gele vedno prenašamo v za to namenjeni banjici, gele po končani analizi vedno odvržemo v rumen zabojnik. Delovno površino, kjer se izvaja elektroforeza, ter transiluminator, redno čistimo s 75 % etanolom.
- Pri delu z UV transiluminatorjem je potrebno vedno uporabljati zaščitni pokrov.
- Z rokavicami, se je prepovedano dotikati kljuk na vratih oz. površin, s katerimi so v stiku ostali prisotni v laboratoriju.
- Nevarne kemikalije so skladiščimo v ognjevarni omari, ki se nahaja pod digestorijem.
- Oprema za prvo pomoč se nahaja na vidnem mestu nad umivalnikom.
- Ob izrednih dogodkih (požar, razlitje kemikalij, vlom ter ostale nesreče), je potrebno takoj poklicati odgovorne osebe. Seznam s telefonskimi številkami le-teh visi na oglasni deski.

NAVODILO ZA PRIPRAVO LABORATORIJSKEGA DNEVNIKA

Laboratorijski dnevnik mora vsebovati opis vsake vaje po naslednjih razdelkih:

1. UVOD
2. MATERIALI IN METODE
3. REZULTATI
4. DISKUSIJA

V **Uvodu** je potrebno na kratko opisati teoretske osnove, ki so potrebne za razumevanje vaje. Uvod mora obvezno vsebovati tudi namen in cilje vaje.

V razdelku **materiali in metode** so navedeni vsi uporabljeni materiali (kemikalije in laboratorijska oprema) ter opisani vsi postopki tako, da lahko vajo kdorkoli ponovi.

V **Rezultatih** so navedeni dobljeni rezultati (tabele, grafi...).

V **Diskusiji** so dobljeni rezultati razloženi, kaj pomenijo, kaj je iz njih razvidno.

Priznan dnevnik je pogoj za pristop na kolokvij iz vaj.

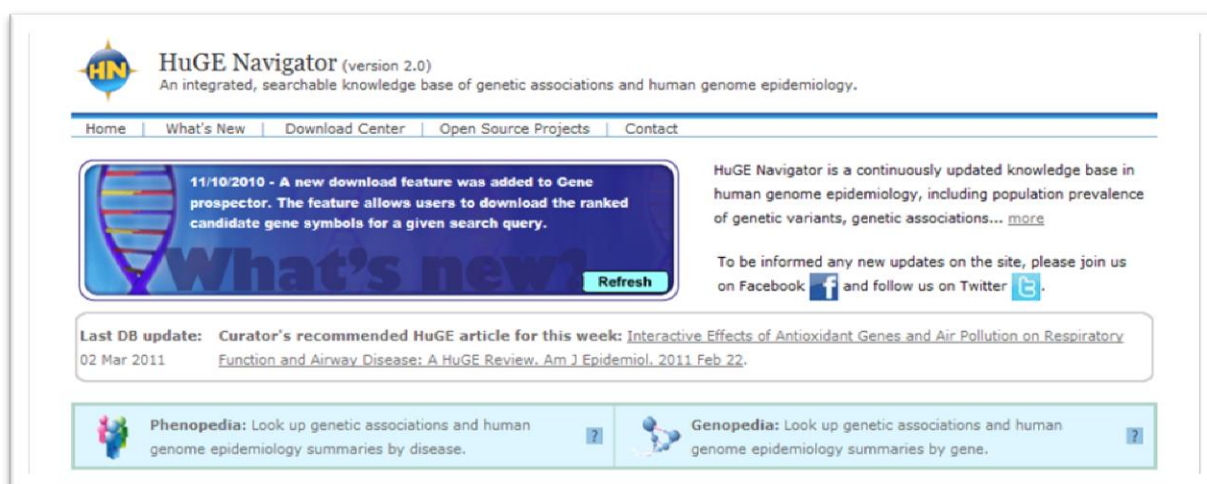
1 ISKANJE PODATKOV V GENETIKI

Pri iskanju genov oz. polimorfizmov, povezanih s kompleksnimi boleznimi, so se kot najuspešnejša metoda izkazale asociacijske študije. Z asociacijskimi študijami skušamo najti povezavo med polimorfizmi in boleznijo pri posameznikih, ki niso v sorodu in sicer tako, da primerjamo frekvence alelov med skupino bolnikov in kontrolno skupino zdravih posameznikov (t.j. študija primeri:kontrola). V primerjavi z analizo genetske vezave, ki lahko zajema velike genomske regije, so bile asociacijske študije doslej praviloma omejene le na proučevanje nekaj kandidatnih genov. Napredek tehnologije v zadnjih letih omogoča hkratno proučevanje velikega števila SNP oziroma asociacijske študije na celotnem genomu (genome wide association – GWA). GWA študije so močno orožje za odkrivanje polimorfizmov povezanih s kompleksnimi boleznimi. Asociacijske študije v celotnem genomu (GWA) temeljijo na primerjavi frekvence bolezenskega alela med kontrolami in bolniki, pri čemer genotipiziramo tisoče polimorfizmov SNP v celotnem genomu na veliki skupini posameznikov z boleznijo in zdravih posameznikov. Razvoj takšnih študij je omogočil velik napredek v tehniki genotipizacije, predvsem DNK mikročipi. Ugotovljeni označevalci za posamezno bolezen pa so pogosto samo v vezavnem neravnotežju z odseki genoma, ki so dejansko etiološko vpleteni v nastanek bolezni. Za natančnejšo identifikacijo gena in polimorfizma, ki je vpleten v patogenezo posamezne kompleksne bolezni, so še vedno potrebne asociacijske študije kandidatnih genov, ki pa so s pomočjo GWA študij usmerjene v ožja področja genoma.

Ko načrtujemo genetsko raziskavo oz. asociacijsko analizo, se pri tem, tako kot tudi pri ostalih znanostih, naslanjamo na znanje predhodnih študij. Danes so najpomembnejši vir informacij strokovni članki objavljeni v znanstvenih revijah in prispevkih na konferencah. Ker pa se objavi vsak dan ogromna količina člankov, je brez bioinformatičnih orodij in spletnih podatkovnih zbirk praktično nemogoče izmed vseh dostopnih informacij izbrati tiste, ki jih potrebujemo.

Nadalje so opisane podatkovne baze, prosto dostopne na svetovnem spletu, s pomočjo katerih lahko iščemo z boleznijo povezane polimorfizme SNP in gene, kot tudi načrtujemo študije, s katerimi bi poiskale nove kandidate, povezane z določeno boleznijo.

1.1 HuGE Navigator



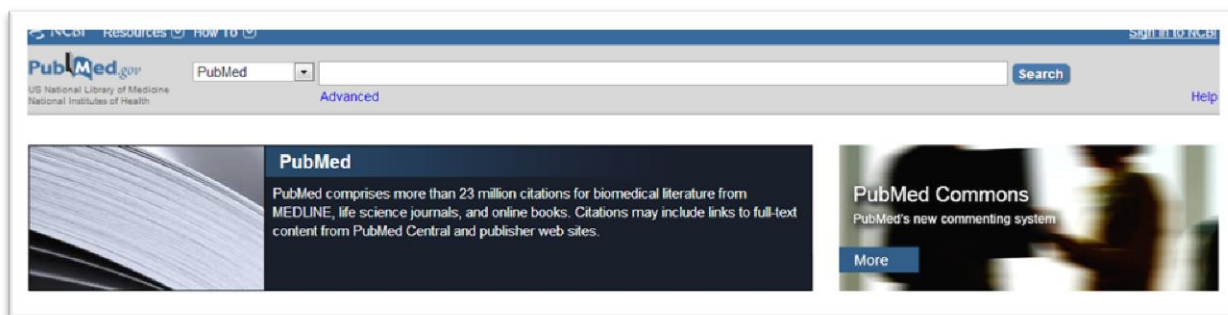
HuGE Navigator (verzija 2.0) - <http://www.hugenavigator.net> omogoča dostop do redno obnovljenih podatkovnih baz o epidemiologiji človeškega genoma, ki vključujejo informacije o prevalencah genetskih variant, povezav med geni in boleznimi, gen-gen in gen-okolje interakcijami ter razvijanjem genetskih testov. Znotraj baze lahko iščemo podatke o povezavah glede na posamezen gen (Genopedia) ali glede na bolezen (Phenopedia). Poleg tega pa vsebuje tudi ostala bioinformatična orodja, kot so brskalnik literature, iskalnik genov, ki razvrsti, rangira in prikaže informacije o genih v povezavi s človeškimi boleznimi, dejavniki tveganja in drugimi genotipi, pa tudi bioinformatično orodje za robustno iskanje in analitično funkcionalnost vseh objavljenih GWA študij ki so na voljo v GWA katalogu.

Iskalnik je pregleden in uporabniku prijazen. Z uporabo HugeNavigator z lahkoto poiščemo vse študije, ki so preučevale povezavo med določenim genom in boleznijo. Ugotovimo lahko, koliko genov je do sedaj že bilo povezanih z določeno boleznijo, koliko je bilo narejenih GWA študij, kot tudi metaanaliz pri določeni bolezni, s katerimi boleznimi je povezan določen gen in podobno.

1.2 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

NCBI (National Center for Biotechnology Information) je ena najpomembnejših podatkovnih zbirk in iskalnikov po človeškem genomu in genomu modelnih organizmov. NCBI vsebuje vrsto različnih zbirk podatkov, povezanih z biotehnologijo in biomedicino. Glavni in največji bazi sta GenBank, kjer so podane sekvence DNK ter PubMed, ki je bibliografska baza podatkov za biomedicinsko literaturo. Vse baze so na voljo na spletu preko iskalnika Entrez.

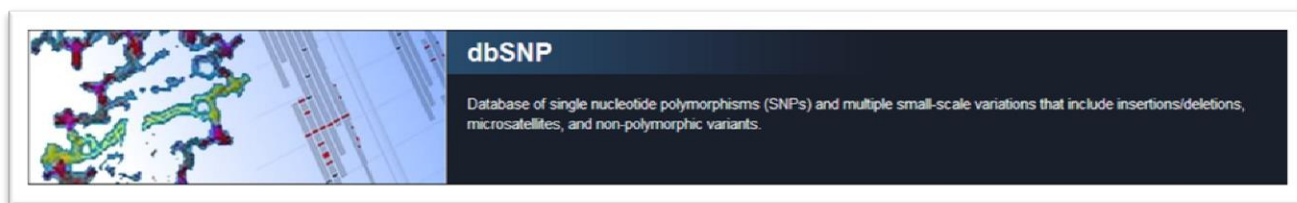
1.2.1 Podatkovna zbirka PubMed



Podatkovna zbirka PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) vključuje več kot 23 milijonov citatov biomedicinske literature iz MEDLINE, znanstvenih revij in elektronskih knjig. Je brezplačen iskalnik, ki v glavnem dostopa do baze referenc MEDLINE in povzetkov o znanosti o življenju in biomedicinskih temah. Poleg MEDLINE, PubMed omogoča dostop še do naslednjih referenc:

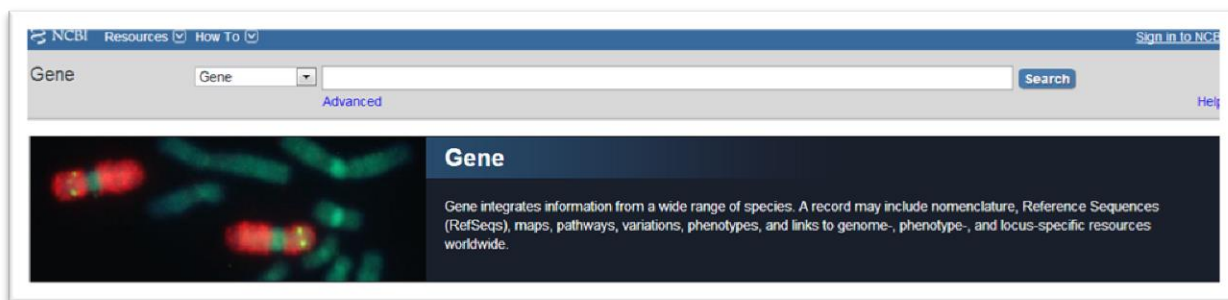
- starejših referenc iz tiskanih izdaj *Index Medicus* do leta 1951
- reference nekaterih revij, preden so bile indeksirane v *Index Medicus* in MEDLINE (npr. *Science*, *BMJ* in *Annals of Surgery*)
- zadnji vpisi v seznam za članke, preden so bili indeksirani z Medical Subject Headings (MeSH) in dodani v MEDLINE
- zbirka knjig, ki so dostopne v polnem tekstu in druge podskupine NLM zapisov
- PMC (PubMed Central) citati

1.2.2 NCBI dbSNP



Spremembe v sekvenci so prisotne na določenih položajih znotraj genoma in so odgovorne za posamezne fenotipske lastnosti, vključno z nagnjenostjo posameznika k razvoju kompleksnih bolezni, kot so rak in bolezni srca. Podatkovna zbirka dbSNP je javna domena s široko zbirko preprostih genetskih polimorfizmov. Ta zbirka polimorfizmov vključuje polimorfizme posameznega nukleotida (SNP ang. za single nucleotide polymorphism), večbazne delecije ali insercije, retropozone ter mikrosatelitne ponovitve. V bazi najdemo podatke o sekvenci okoli polimorfizma, frekvenco polimorfizma v različnih populacijah ter lokacijo za vse vnešene variatne. Variatne so podane za različne organizme iz kateregakoli dela genoma.

1.2.3 NCBI Gene



Baza Gene daje podrobne informacije za znane in predvidene gene, ki so definirani z nukleotidno sekvenco ali položajem. Baza vsebuje več kot 14 milijonov vpisov in vključuje podatke od vseh večjih taksonomskih skupin. Vsak zapis v bazi ustreza enemu genu. Zapis o posameznem genu vključuje nomenklaturu, referenčno sekvenco (RefSeq), lokacijo, poti, variacije, fenotipe in povezave do genotip-fenotip in lokus-specifične vire po vsem svetu.

1.2.4 HapMap



Prelomnica v razvoju GWA študij je bil projekt HapMap. Cilj tega mednarodnega projekta je razviti haplotipsko strukturo humanega genoma, ki bo opisal skupne vzorce genskih variacij človeškega genoma. Od projekta se pričakuje, da bo postal ključni vir informacij raziskovalcem za odkrivanje genov, povezanih z boleznijo ter odzivom na zdravljenje ter dejavnike okolja.

V projekt HapMap je vključena genotipizacija 1 milijona polimorfizmov SNP človeškega genoma v prvi fazi in 3,1 milijona polimorfizmov SNP v drugi fazi projekta. Na spletni strani HapMap-a (www.hapmap.org) lahko dostopamo do podatkov o frekvencah polimorfizmov SNP in njihovih korelacijah skozi vezavno neravnovesje (LD).

Faze HapMap projekta:

- **Faza 1** – sekvenčni podatki 4 populacij CEU (S Evropejci), YRI (Yoruban, Nigerija), CHB (Kitajska, Beijing), JPT (Tokijo, Japan). 269 posameznikov.
#SNP = 1 milijon, prib. 1 na 5 kb preko genoma, MAF > 0.05
- **Faza 2** – več sekvenciranja na zgoraj omenjenih populacijah.
#SNP = 3.1 milijon več, prib. 1 kb preko genoma MAF > 0.05
- **Faza 3** – več sekvenciranja na zgoraj omenjenih populacijah in sekvenciranje na 7 novih populacijah
#SNP = 1.6 milijonov in več

Populacije v projektu HapMap:

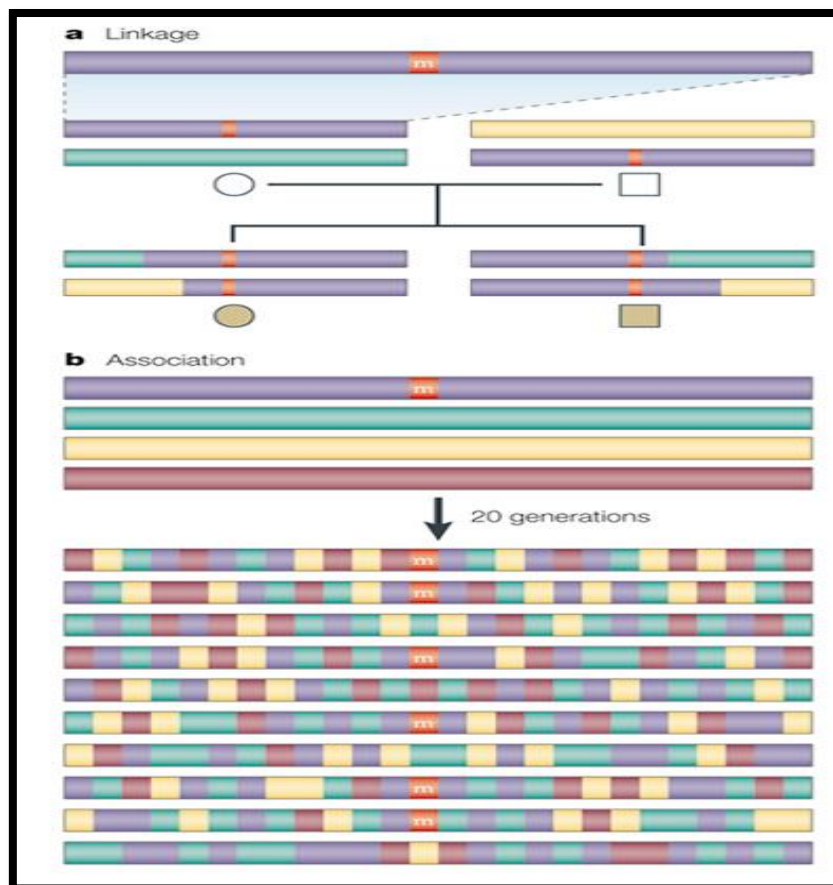
- ASW* Potomci afričanov v SZ ZDA
- CEU* Prebivalci Utaha, potomci S in Z evropejcev
- CHB Han Kitajci Beijing, Kitajska
- CHD Kitajci v Denverju, Colorado
- GIH Gujarati Indijanci v Houston, Texas
- JPT Japonci v Tokiju, Japonska
- LWK Luhya v Webuya, Kenija
- MEX* Mehikanski predniki v Los Angeles, Kalifornija
- MKK* Maasai v Kinyawa, Kenija
- TSI Toscani v Italiji
- YRI* Yoruba v Ibadan, Nigerija

* populacija je iz družinskih trojk (TRI-os) (mati, oče, otrok)

1.2.5 Vezavno neravnovesje (LD - Linkage Disequilibrium)

Vezavno neravnovesje (LD – linkage disequilibrium) je oblika neposredne asociacijske študije za kartiranje vzročnih motenj in genov. Uspešnost LD je odvisna od razumevanja vezavnega neravnovesja in vplivov, ki jih določajo, kot so mutacije rekombinacije in zgodovina populacije. Skozi generacije se mutacije zaradi rekombinacij ločijo od specifičnih alelov originalnega haplotipa in se premešajo z ostalimi, določene variacije na DNK pa ostanejo na originalnem haplotipu skozi mnogo generacij. Takšno nenaključno združevanje alelov imenujemo vezavno neravnovesje (LD), ki predstavlja genetski temelj večine asociacijskih strategij.

Vezavno neravnovesje se meri z različnimi parametri, kot sta Lewontinov D' in indeks r^2 . Lewontinov D' se imenuje tudi asociacijska verjetnost in predstavlja pomembno mero za identifikacijo regij, v katerih je bilo malo rekombinacij. Kadar je vrednost $D' = 1$, lahko govorimo o popolnem neravnovesju. Indeks r^2 nam pokaže moč posrednih asociacij in lahko varira, kljub temu da je $D' = 1$. Vrednost indeksa r^2 je povezana z alelnimi frekvencami in s pozicijo korespondenčne mutacije.



Na sliki je prikazan primer poljubne mutacije »m«. Mutacija »m« se čez čas loči od izvirnih haplotipov zaradi pojava, ki ga imenujemo rekombinacija, in se pomeša z ostalimi haplotipi. Ta pojav se imenuje vezavno neravnovesje.

Padanje LD je odvisno od lokacije na kromosomu (regije z nizko rekombinacijsko frekvenco (centromeri) imajo visok LD).

Statistika LD:

- D' lahko zavzema vrednosti med 1 in -1, pomembno $|D'|$;
- $D' = 1$ pomeni dogodek **brez** rekombinacije;
- vrednost < 1 pomeni rekombinacijo;
- vmesne vrednosti za D' je težko interpretirati (vrednosti se dvignejo, ko je vzorec majhen ali alelne frekvence nizke);
- Uporabljamo tudi kvadrirani korelacijski koeficient r^2 . Dobimo ga z deljenjem D' z alelnimi frekvencami na obeh lokusih $[D'/(p_1p_2q_1q_2)]$;
- Ko je $r^2=1$, dajejo označevalci informacijo da ni rekombinacije in da so alelne frekvence enake;
- Glavna prednost r^2 je obratno sorazmerje z velikostjo vzorca , ki je potreben za prepoznavanje genetske asociacije med označevalci ;
- r^2 je občutljiv na alelno frekvenco in ga je težko interpretirati, če imata dva lokusa različne alelne frekvence.

- **Alelne frekvence so lahko populacijsko specifične:**
 - *SNP alelne frekvence se lahko razlikujejo med različnimi populacijami;*
 - *LD se lahko razlikuje med populacijami;*
 - *Rezultati genotipizacije ene populacije (ne) predstavljajo druge.*

Naloga: S pomočjo opisanih programskih orodij poiščite gene, vključene v nastanek laktozne intolerance. Izpišite 4 najbolj preučevane gene povezane s to boleznijo. Poiščite 2 polimorfizma SNP, ki jih uporabljamo pri diagnostiki laktozne intolerance. Ugotovi, na katerem kromosomu, genu in na katerem delu tega gena (intron, ekson,...) se polimorfizma SNP nahajata in do kakšne zamenjave baze pride. Izpišite frekvenco obeh polimorfizmov SNP pri evropejcih (HapMap CEU).

1.3 Asociacijska analiza

Pri asociacijskih študijah primerjamo genotipe oz. genotipske in alelne frekvence med dvema skupinama, najpogosteje so to bolniki in kontrolna skupina zdravih posameznikov. Pri izbiri vzorca je pomembno, da je fenotip posameznikov dobro določen, kar pomeni, da morajo zdravi posamezniki resnično biti zdravi ter obratno.

Pri primerjavi genotipskih in alelnih frekvenc uporabljamo Fisherjev natančni test, ki je na razpolago v statističnem programskem orodju SPSS.

1.3.1 Genotipske in alelne frekvence

Najprej moramo določiti genotipske in alelne frekvence za analiziran polimorfizem posebej v skupini bolnikov in zdravih posameznikov. Genotipske frekvence izračunamo kot odstotek posameznega genotipa glede na celotno število posameznikov v skupini. Alelno frekvenco pa izračunamo po naslednji formuli:

predpostavljamo, da imamo polimorfizem A/G – možni genotipi so AA, AG in GG

frekvenca alela A = $(2 \times n(\text{AA}) + n(\text{AG})) / 2n(\text{AA} + \text{AG} + \text{GG})$

frekvenca alela G = $(2 \times n(\text{GG}) + n(\text{AG})) / 2n(\text{AA} + \text{AG} + \text{GG})$

(n – število posameznikov z genotipom)

1.3.2 Točnost rezultatov: Hardy-Weinberg-ov zakon

Ko imamo genotipske in alelne frekvence našega vzorca, najprej preverimo, če se ujemajo s frekvencami v podatkovnih zbirkah (npr. dbSNP). Vedno upoštevamo tiste frekvence, ki se nanašajo na evropsko populacijo (npr. HapMap CEU).

Frekvence genotipov v naravi niso naključne, temveč so genotipi v Hardy-Weinberg-ovem ravnovesju, kar v našem primeru pomeni, da če je frekvenca alela A = q in frekvenca alela G = p , potem je frekvenca genotipa AA = p^2 ; genotipa AG = $2pq$; in genotipa GG = q^2 .

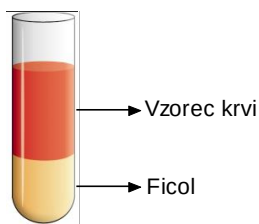
Iz dobljene frekvence za alel A in alel G izračunamo vrednosti p^2 , q^2 in $2pq$. Vrednosti p^2 , $2pq$ in q^2 pomnožimo s številom vseh genotipiziranih posameznikov v skupino in dobljene vrednosti primerjamo z dejanskimi vrednosti genotipizacije ter vrednosti statistično opredelimo, pri čemer mora biti p vrednost blizu 1 (med 0,5 in 1). Eden od takšnih kalkulatorjev je <http://quantpsy.org/chisq/chisq.htm>.

2 IZOLACIJA DNK IZ KRVNIH VZORCEV

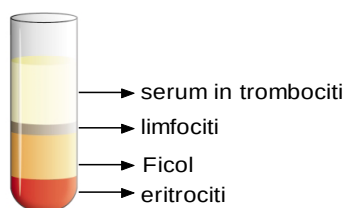
Za kakršnokoli analizo DNA (sekvenciranje, pomnoževanje določenega odseka...) je le to potrebno najprej izolirati iz vzorcev. V medicinskih raziskavah najpogosteje izoliramo DNA iz periferne krvi, natančneje iz limfocitov. V postopku izolacije je potrebno celice najprej razbiti, nato DNK oboriti, jo očistiti nečistoč in nazadnje zopet raztopiti za nadaljno uporabo.

Zbiranje limfocitov

- v 1,5 mL epico odvzamemo 650 μ L krvi
- dodamo 650 μ L pufra PBS
- premešamo
- v novo sterilno 2 mL epico odmerimo 650 μ L Ficolla
- na Ficol previdno naneseemo 1300 μ L suspenzije krvi in PBS-a (kri nalivamo ob steni zelo počasi in pazimo, da se ne pomeša s Ficol-om).
-



- centrifugiramo pri 1800 rpm, 30 min, pri 18 °C
- prvo fazo (serum in trombociti) odsesamo
- drugo fazo z limfociti prenesemo pipeto v novo 1,5 mL sterilno epico



- dodamo 1 mL PBS-a
- centrifugiramo pri 1400 rpm, 15 min, pri 18 °C
- odsesamo supernatant
- dodamo 650 μ L PBS-a
- centrifugiramo pri 1400 rpm, 15 min
- odsesamo supernatant v celoti (pomagamo si s pipeto)

Izolacija DNK s TRI reagentom

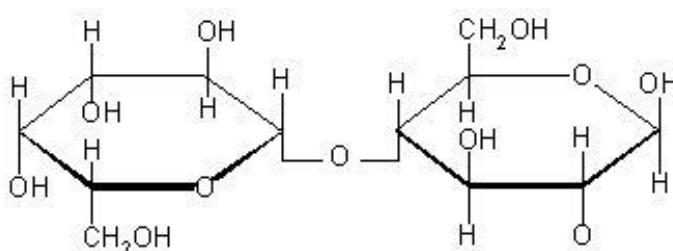
- dodamo 260 μ L TRI reagenta celice razbijamo s pipetiranjem
- inkubiramo 5 min na sobni temperaturi
- dodamo 52 μ L kloroforma
- zapremo epice in vorteksiramo 15 s
- vzorce inkubiramo na sobni temperaturi 5 min
- mešanico centrifugiramo na 12000 x g, 15 min pri 4 °C, da se loči v tri faze
 - spodnja rdeča – proteini
 - vmesna bela – DNK
 - zgornja prozorna – vodna raztopina RNK
- vodno fazo odstranimo, preostanek uporabimo za izolacijo DNK
- po odstranitvi vodne faze za izolacijo RNK, DNK precipitiramo iz vmesne faze in organske faze tako, da dodamo 100 μ L 100 % etanola
- premešamo z obračanjem in pustimo stati 2 – 3 min na sobni temperaturi
- centrifugiramo pri 2.000 x g, 5 min pri 4 °C
- odstranimo supernatant in ga uporabimo za izolacijo proteinov
- pelet DNK 2-krat speremo v 260 μ L 0.1 M natrijevega citrata/10 % etanolu
- med vsakim spiranjem naj pelet DNA stoji (z občasnim mešanjem) 10 min
- centrifugiramo pri 2.000 x g, 5 min pri 4 °C.
- resuspendiramo DNK pelet v 430 μ L 75 % etanola
- to naj stoji 10 – 20 min pri sobni temperaturi
- centrifugiraj pri 2.000 x g, 5 min pri 4 °C
- supernatant zavržemo, pelet DNK pa posušimo na zraku in ga raztopimo v 20 μ L H₂O s ponavljajočim pipetiranjem z mikropipeto

3 LAKTOZNA INTOLERANCA: ANALIZA POLIMORFIZMA V GENU LCT S PCR-RFLP TEHNIKO

3.1 TEORETIČNE OSNOVE

3.1.1 Laktozna intoleranca

Laktozna intoleranca je avtosomno recesivna metabolna lastnost, ki prizadene velik del odraslega prebivalstva po celem svetu. Gre za nezmožnost razgrajevanja laktoze, disaharida, znanega po tudi pod izrazom »mlečni sladkor«.



Slika 1: Laktoza - disaharid glukoze in galaktoze

Laktozo v črevesju razgrajuje encim laktaza (polno ime – laktaza-florizin hidrolaza: LPH), ki disaharid hidrolizira v glukozo in saharozo. Pomanjkanje LPH onemogoči popolno razgradnjo, nerazgrajena laktoza pa povzroči številne neprijetne simptome kot so prebavne težave, utrujenost, razdražljivost, potenje, izpuščaje... Nerazgrajena laktoza namreč v tankem črevesu v črevo povleče veliko količino vode, v debelem črevesu pa normalno prisotne bakterije fermentirajo nerazgrajeno laktozo, pri čemer se sproščajo metan, ogljikov dioksid, vodik in hlapne kisline. Nekaj vodika se s krvjo prenese v pljuča, kjer ga lahko zaznamo v izdihanem zraku.

Zaradi neprijetnih simptomov se ljudje z laktozno intoleranco odpovedujejo mleku in mlečnim izdelkom, kar lahko privede do drugih težav, npr. pomanjkanje kalcija, magnezija in vitamina D.

3.1.2 Genetika laktozne intolerance

Gen LCT, ki kodira protein LPH, leži na 2. kromosomu. Laktozno intoleranco v odrasli dobi povzroči zmanjšano izražanje tega gena in se pojavi pri znatnem deležu populacije.

Ekspresijo LCT nadzoruje del DNA – regulatorni element – ki se nahaja približno 14 Kbp stran navzgor (v smeri proti 5') od iniciacijskega kodona ATG tega gena. Regulatorno mesto LCT leži v intronu gena MCM6, katerega produkt je regulator celičnega cikla in funkcionalno ni povezan z laktozo, gre le za naključno prekrivanje.

Leta 2002 so odkrili polimorfizem znotraj omenjenega regulatornega elementa oz. introna na genu MCM6, ki je 100 % povezan z razvojem laktozne intolerance v odrasli dobi. Za polimorfizem sta možna dva alela – C in T. Alel C je povezan z nizko, alel T pa z visoko ekspresijo gena LCT oz. posledično s količino encima LPH. Alel T deluje dominantno, kar pomeni, da lahko laktozno intoleranco pričakujemo zgolj pri homozigotih za alel C – torej posamezniki z genotipom CC, ne pa tudi tisti s CT ali TT.

Genotipizacija je najzanejslivejši način diagnostike laktozne intolerance – vendar pa jo lahko uporabljamo le kot izločitveni test. Osebe, ki imajo genotip CT ali TT laktozne intolerance ne morejo razviti in vkolikor imajo opisane simptome, moramo iskati vzroke za njih kje drugje. Osebe z genotipom CC imajo tveganje za laktozno intoleranco, ki se lahko pojavi bodisi v puberteti, odrasli dobi, v pozni starosti ali pa nikoli.

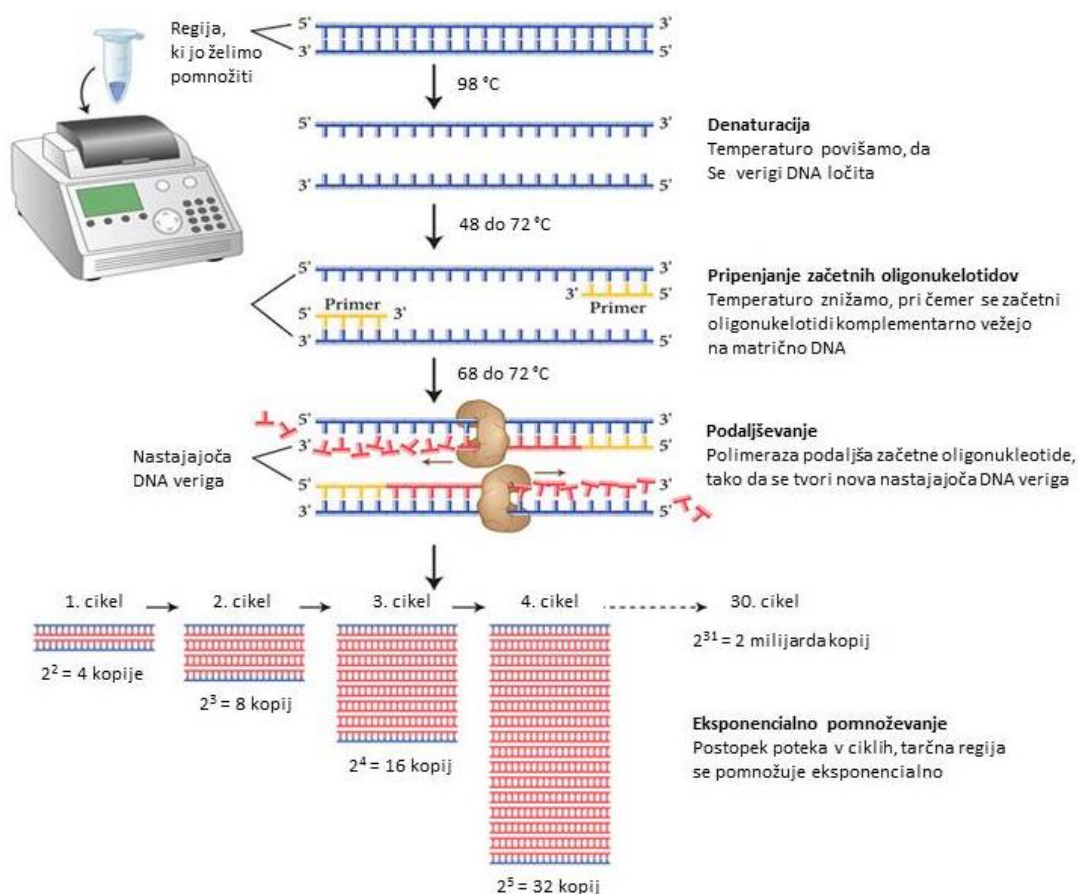
3.1.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo, znana tudi pod angleško kratico PCR (Polymerase Chain Reaction), je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Lahko rečemo, da s to metodo kloniramo DNA, ne da bi za to potrebovali žive celice, to pa pred odkritjem PCR praktično ni bilo mogoče

Kopiranje odsekov DNA poteka tako, da uporabimo dve kratki molekuli DNA, ki sta komplementarni začetnemu in končnemu delu segmenta, ki ga želimo kopirati, dodamo encim, raztopino soli in deoksiribonukleotide (gradnike DNA). Reakcija poteka verižno; to pomeni, da jo večkrat ponovimo. Pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji; tako lahko po 20 ponovitvah reakcije dobimo iz 1 kopije DNA teoretično več kot 1 milijon kopij. Temperatura reakcije se mora kontrolirano spreminjati. Za vezavo kratkih molekul DNA (začetnih oligonukleotidov) na matrico, ki jo želimo pomnoževati, je namreč nujno, da je matrica v enoverižni obliki, to pa dosežemo tako, da DNA za kratek čas segrejemo na 92 °C ali več (to stopnjo imenujemo denaturacija DNA). Da pride do prileganja začetnih oligonukleotidov na matrico je treba temperaturo spet znižati (na 50 - 65 °C) (pripenjanje začetnih oligonukleotidov), nato pa spet prilagoditi pogojem, ki so optimalni za delovanje DNA-polimeraze – 72 °C (polimerizacija).

PCR izvajamo v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati. Določimo lahko temperature, trajanje inkubiranja, število ponovitev ciklov in podobno.

Laboratorijske vaje iz predmeta Genomika v biomedicinski tehnologiji



Slika 2: Shematski prikaz PCR reakcije

Ker se v vsakem ciklu število molekul podvoji, lahko število molekul zelenega odsega DNA izračunamo po naslednji formuli:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

(N=št. molekul, N₀= začetno št. molekul, n=št.ciklov)

V prvih nekaj ciklih nastajajo pridelki neposredno s pomnoževanjem matrične DNK, tu nastajajo tudi mnogi neželeni, nespecifični produkti. Kasneje je s pomnoževanjem nastalih produktov, rast števila produktov iz cikla v cikel eksponentna. Po določenem številu ciklov (običajno 35 do 45) pride do t.i. efekta PCR platoja, tj. ko novi produkti ne nastajajo več, zato ni smiselno povečevati števila ciklov v neskončnost. Vzrok za efekt platoja je verjetno ta, da zaradi prebitka pridelkov PCR, pri prilepljanju začetnih oligonukleotidov le-te izpodrinejo, se kompetitivno vežejo nazaj na drugo verigo DNK. Zato in da bi nastalo čim več produkta dajemo v reakcijo začetne oligonukleotide v prebitku.

3.1.4 Računanje količin reagentov potrebnih za uspešno PCR reakcijo

Za PCR reakcijo potrebujemo naslednje reagente:

- Vzorčno DNA
- Mononukleotide (dNTP)
- MgCl₂ (nekateri pufri ga že vsebujejo)
- Pufer
- Primer 1
- Primer 2
- Polimerazo

Da bo PCR reakcija uspešna in da bomo dobili produkte iz katerih bo razviden želen rezultat, moramo izbrati optimalne količine vsakega od reagentov.

Najpogosteje delamo 10 µL reakcije, kar pomeni, da je končen skupen volumen reakcijske mešanice 10 µL.

Količine potrebne vzorčne DNA, dNTP, pufru (z MgCl₂) in encima polimeraze so enake za vsako klasično PCR reakcijo, med tem ko moramo optimalno količino obeh primerjev določiti eksperimentalno, saj se le ta razlikuje glede na par primerjev.

Količino določenega reagenta potrebnega v neki reakciji izrazimo s koncentracijo – količino snovi v volumski enoti.

- Masna koncentracija: g/L (oz. g/mL, µg/µL, ng/µL...)
 - DNA
- Molarna koncentracija: mol/L = M (mmol/L = mM, mmol/ml = M...)
 - dNTP, MgCl₂, primer-ji
- koncentracija encimov: U/L (U/µL...)

Koncentracija DNA

Eksperimente, kot so različne oblike PCR reakcije izvajamo večinoma tako, da uporabimo 50 ng vzorčne DNA.

Po izolaciji DNA vzorcem izmerimo koncentracijo s spektrofotometrično metodo in sicer tako, da izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Vse vzorce je najbolje razredčiti z vodo na isto koncentracijo – najpogosteje na 25 ng/µL, ter nato v eksperimentih uporabljati 2 µL tako razredčene DNA.

Za izračun vode in raztopine DNA, ki jo moramo dodati, uporabimo naslednjo formulo:

$$c \cdot V = c_1 \cdot V_1 + c_2 \cdot V_2 \quad V = V_1 + V_2$$

c... končna koncentracija (25ng/µL)

V... končen volumen

c1... koncentracija raztopine izolirane DNA

- V1... volumen raztopine izolirane DNA (ki ga moramo dodati, da dobimo želen končni volumen z želeno koncentracijo)
- c1... koncentracija DNA v vodi = 0!
- V1... volumen vode (ki ga moramo dodati, da dobimo želen končni volumen z želeno koncentracijo).

Pufer, dNTP in polimeraza

Pufer v reakcijski mešanici vzdržuje ustrezen pH v katerem encim polimeraza optimalno deluje. Nekaterim pufrom je dodan tudi $MgCl_2$.

dNTP-ji oz. mononukleotidi morajo biti prisotni, da se iz njih zgradijo nove verige oz. produkt. Zadostna koncentracija za klasičen PCR je 200 μM za vsak posamezen nukleotid (ATP, CTP, GTP, TTP). Za lažje delo si navadno pripravimo koncentrirano mešanico vseh štirih dNTP-jev, ki vsebuje 10mM vsakega dNTP, in jo uporabljamo za pripravo reakcijske mešanice.

Koncentracija encimov je vedno podana v enotah (U) na enoto volumna. Količina polimeraze, ki zadošča za uspešno PCR reakcijo s končnim volumnom reakcijske mešanice 10 μL je 0,5 U, oz. ustrezno večja v kolikor delamo z večjim volumnom, kar pomeni 0,05 U/ μL .

Optimizacija temperature in količine primerjev

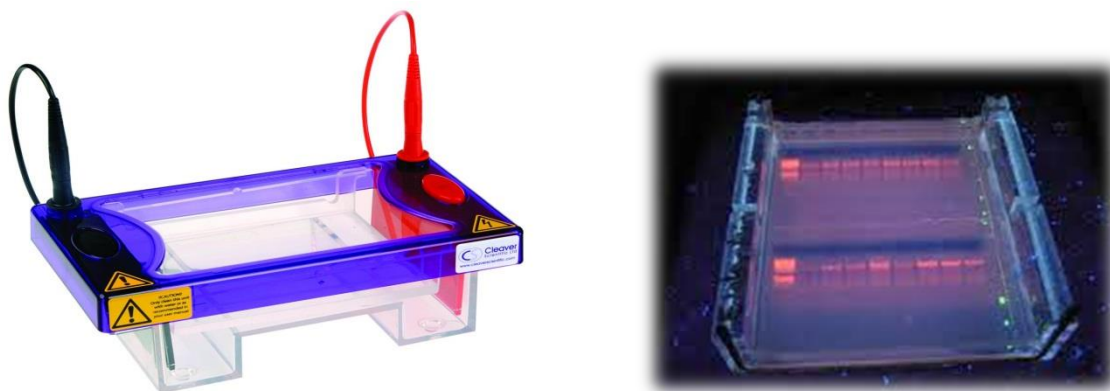
Optimizacijo PCR začnemo z iskanjem najustreznejše temperature pripenjanja primerjev. To naredimo tako, da naredimo reakcijsko mešanico z maksimalno količino primerjev ter to mešanico dodamo 7krat k istemu vzorcu (ki je nanešen v 7 žepkov stripa oz. v 7 mikrotubic) ter tudi k vodi (negativna kontrola). Za vsako izmed 7 ponovitev izvajamo PCR pri različni temperaturi pripenjanja primerjev. Vse skupaj delamo v duplikatu (za 2 vzorca) ter na koncu na gelu preverimo, pri kateri temperaturi nastanejo najlepši produkti in najmanj oz. nič nespecifičnih produktov.

Tudi optimalno koncentracijo primerjev določimo eksperimentalno. Praviloma je PCR reakcija učinkovitejša, če je koncentracija višja, vendar pa prevelika količina primerjev privede do nespecifične vezave le teh, kar vodi v nastanek nespecifičnih produktov ter tvorbo primerskih dimerov.

3.1.5 Gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza poteka v agaroznem ali pa poliakrilamidnem gelu, v pufru, ki omogoča stabilen pH in električno prevodnost. DNK je negativno nabita in potuje proti pozitivni elektrodi.

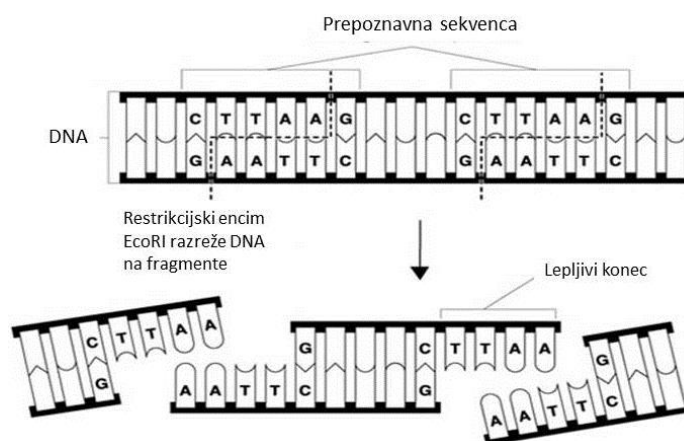
Namen elektroforeze je preparativni ali analitski. Običajno poleg pridelka PCR ali odsekov DNK dodamo še velikostni marker, da lahko ocenimo velikost nastalih pridelkov PCR. Večje molekule DNA so namreč težje in potujejo počasneje v primerjavi z manjšimi. Na takšen način lahko ugotovimo za kateri alel DNK vsebuje določen vzorec.



Slika 3: Detekcija DNA na agaroznem gelu.

3.1.6 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)

Kadar želimo analizirati mononukleotidne polimorfizme (SNP-je), pogosto uporabimo tehniko PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism). Želen odsek DNA, v katerem je zajet tudi SNP, ki ga preiskujemo najprej pomnožimo s PCR reakcijo, nato pa produktom dodamo restrikcijski encim, ki specifično reže produkt.



Slika 4: Shematski prikaz delovanja encima EcoR I

Naravna vloga restrikcijskih encimov je predvsem prepoznavanje tuje DNA in restrikcija le teh. Ti encimi prepoznajo značilno sekvenco, za katero molekulo razrežejo. Z orodji bioinformatike izberemo takšen encim, ki reže produkt le v primeru enega alela, drugega pa ne, ali pa ju reže različno.

Te produkte nato ločimo s pomočjo gelske elektroforeze in na podlagi velikosti fragmentov določimo genotip.

Tako lahko npr. s PCR pomnožimo 243 bp dolgo sekvenco v okolici polimorfizma rs4988235, odgovornega za regulacijo gena LCT.

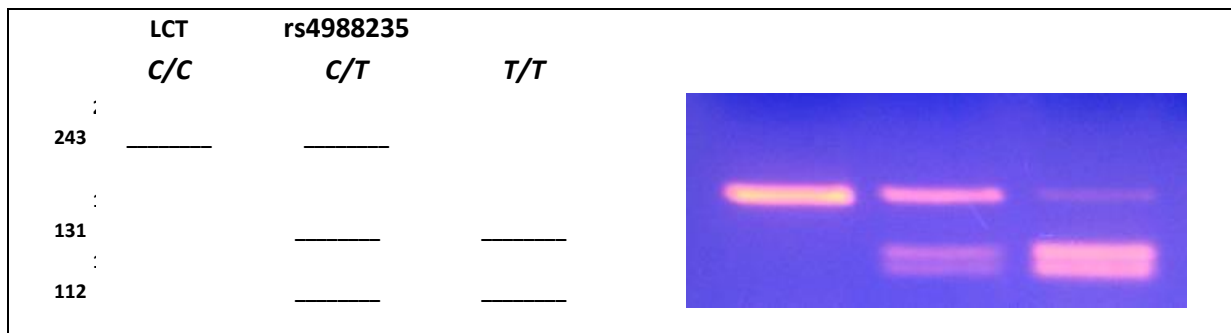
ATAAGACTCCTTAAGTTCTCTACAATGTACGACCCGGAAAGGTTGCACAACTTAGACCCTACAATGTACTAGTAGGCCTCTG
CGCTGGCAATACAGATAAGATAATGTAG[C/T]CCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGTTGCATTTGTATAATGTTT
GATTTTATAGAACAAAGGTTGCATGTACTAGTTCTCCTCCTTAAGTTCTCGTTCTCCTCCAATAAGAATAAGATAATGTT

Encim Fag I prepozna sekvenco TAGTCC in molekulo prereže na dva dela. Ker pa se ta sekvenca nahaja samo na tistih produktih, ki imajo za polimorfizem rs4988235 alel T, dobimo po inkubaciji z encimom različno dolge produkte, kot prikazuje slika:

Alel C: CAATACAGATAAGATAATGTAG[C]CCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCC



Alel T: CAATACAGATAAGATAATGTAG[T]CCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCC



Slika 5: Detekcija produktov PCR-RFLP reakcije za rs4988235

3.2 IZVEDBA VAJE

MATERIALI

Vzorčna DNA, reagenti za PCR reakcijo (dNTP, pufer, začetni oligonukleotidi, polimeraza), pipete, stripi, termični ciklizator, elektroforeza, reagenti za restrikcijo (encim Fag I, SAM, pufer).

POSTOPEK

- V žepke stripa nanesi po 2 μ L vzorčne DNA vse tri pozitivne kontrole (vzorci DNA z znanimi genotipi) ter vodo kot negativno kontrolo.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8

Žepček	9	10	11	12	13	14	15	16
Vzorec	V9	V10	V11	V12	CC	CT	TT	voda

- Reagente (razen polimeraze) najprej odtajaj, nato vorteksiraj, centrifugiraj in postavi na led. Polimerazo le centrifugiraj – naj bo ves čas na ledu.

- Pripravi reakcijsko mešanico z naslednjo sestavo:

Reagent	Količina za 1 vzorec	Količina za 20 vzorcev
Voda	12,5	
dNTP	0,4	
Pufer	2	
Primer 1	2	
Primer 2	2	
Polimeraza	0,1	
Skupni volumen:	18	
Skupni volumen reakcije:	20	/

- K vsakemu vzorcu dodaj 18 μ L reakcijske mešanice; strip vorteksiraj in centrifugiraj.
- PCR reakcijo izvedi v 35 ciklih. Optimalna temperatura pripenjanja začetnih oligonukleotidov je 63 °C.
- Med potekom PCR reakcije pripravi 2 % agarozni gel za detekcijo produktov.
 - Zatehtaj 1 g agaroze in ga s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztopi v 50 mL pufra TBE.
 - Še vročemu gelu dodaj 2,5 μ L etidijevega bromida ter vlij v pripravljen modelček.
- Po končani PCR reakciji z gelsko elektroforezo preveri uspešnost - porabi 10 μ L vzorca.
 - Vzorec na parafilmu pomešaj z barvilom xylen cianol in ga nanesi v žepček gela.
 - Elektroforeza naj teče 15 min na 160 V.
 - Detektiraj pod UV svetlobo.

- Reagente za restrikcijo (razen encima) odtajaj, vorteksiraj in centrifugiraj ter postavi na led, encim pa le centrifugiraj – naj bo ves čas na ledu.

- Pripravi restrikcijsko mešanico z naslednjo sestavo:

Reagent	Količina za 1 vzorec	Količina za 17 vzorcev
Voda	17,27	
Pufer	2	
SAM	0,6	
Encim: Fag I	0,13	
Skupni volumen:	20	
Skupni volumen reakcije:	30	/

- Restrikcijsko mešanico vorteksiraj in centrifugiraj ter dodaj k preostalemu PCR produktu – po 18 µL k vsakemu vzorcu. Strip vorteksiraj in centrifugiraj.
- Vzorce z dodanim encimom inkubiraj čez noč na 37 °C.
- Po inkubaciji produkte znova detektiraj na agaroznem gelu in odčitaj genotipe posameznih vzorcev.
- Izračunaj frekvence (odstotke) posameznih genotipov tako da upoštevaš rezultate vseh skupin.

3.3 REZULTATI

Vaša skupina:

Vzorec	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Rezultat								

Vzorec	V9	V10	V11	V12	CC	CT	TT	voda
Rezultat								

Število uspešno genotipiziranih vzorcev: _____

Genotip	Število vzorcev	Odstotek
CC		
CT		
TT		

4 FAKTOR TUMORSKE NEKROZE: MERJENJE EKSPRESIJE GENA $TNF\alpha$ S KVANTITATIVNIM PCR V REALNEM ČASU (qPCR)

4.1 TEORETIČNE OSNOVE

4.1.1 Imunski sistem in citokini

Imunski sistem je sistem specializiranih celic, organov in procesov, ki nadzorujejo organizem in ga varujejo pred boleznimi. Za pravilno delovanje mora imunski sistem prepoznati veliko različnih dejavnikov kot so virusi, bakterije in drugi paraziti in jih razlikovati od lastnega organizma oz. zdravega tkiva.

Poznamo več različnih mehanizmov obrambe, ki jih delimo v dve skupini. Mikroorganizmi ali toksini, ki uspešno vstopijo v organizem, najprej naletijo na celice in mehanizme primarne oz. prirojene imunosti. Primarna imunost je nespecifična in pomeni sistemski odgovor telesa proti patogenom. Sekundarni oz. pridobljeni imunski odziv pa prepozna specifične antigene in omogoča močnejši in specifičen imunski odziv.

Celice imunskega sistema med sabo komunicirajo preko majhnih proteinskih molekul, ki jih imenujemo citokini. Pravilna in uravnovešena produkcija citokinov je zato ključnega pomena za dobro delovanje imunskega sistema.

Citokini so skupina majhnih molekulskih regulacijskih proteinov, ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa limfociti (Th celice) in makrofagi. Delujejo kot medcelične sporočilne molekule, ki po vezavi na receptorje odzivnih tarčnih celic spodbudijo v njih določeno biološko aktivnost. Med številnimi fiziološkimi odzivi, za katere je potrebna udeležba citokinov, je razvoj humoralnega in celično posredovanega imunskega odziva, sprožitev vnetja, uravnavanje hemopoeze, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter zdravljenje ran.

Citokini se vežejo s specifičnim receptorjem na membrani tarčne celice in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Zaradi velike afinitete vezave lahko posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Delujejo lahko avtokrino (vezava na receptorske celice, ki jih izloča), endokrino (vezava na celico v oddaljenem delu telesa), najpogosteje pa parakrino (na celice v bližini celice, ki jih izloča).

Pravilno in uravnovešeno izdelovanje citokinov je zato ključnega pomena za dobro delovanje imunskega sistema. Motnje imunskega sistema lahko privedejo do avtoimunskih bolezni, kroničnih vnetnih bolezni in tudi do raka.

4.1.2 Faktor tumorske nekroze: citokin primarnega imunskega odziva

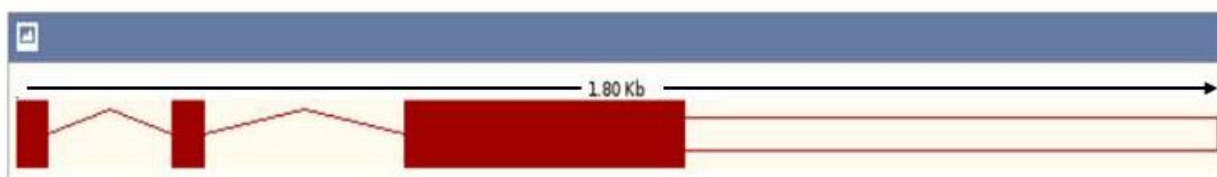
Citokine primarnega imunskega sistema izločajo predvsem mononuklearni fagociti kot odgovor na infekcijo. Izločanje sprožijo produkti bakterij (lipopolisaharidi) in virusov (dvojna veriga RNA). Večina citokinov te skupine deluje v endotelijskih celicah in levkocitih tako, da stimulirajo zgodnji vnetni odziv na patogene organizme pri primarnem imunskem odzivu.

TNF je vključen v številne biološke procese kot so proliferacija, diferenciacija, apoptoza, presnova lipidov in koagulacija. Je glavni posrednik akutnega vnetnega odgovora in je odgovoren za številne sistemske zaplete pri hudih okužbah.

Majhne koncentracije spodbudijo žilne endotelijske celice (notranja plast obtočil) k izražanju površinskih adhezijskih molekul (molekule na celični membrani, ki omogočajo povezave s sestavinami zunajceličnega matriksa), ki napravijo endotelijske celice lepljive, kar prispeva k nakopičenju levkocitov. Poleg tega spodbudi ostale celice imunskega sistema, predvsem mononuklearne fagocite, k izločanju drugih vnetnih citokinov (interlevkin 1 - IL-1, interlevkin 6 - IL-6, sam TNF in kemokine).

Kadar se izločajo večje količine TNF, le ta vstopi v krvni obtok, kjer deluje kot endokrini hormon in sicer kot pirogen – inducira vročino. V jetrnih celicah (hepatocitih) povečuje izločanje nekaterih proteinov akutne faze ter zavira delitev matičnih celic v kostnem mozgu.

Gen, ki kodira TNF, leži na 6. kromosomu in je dolg 2770 bp. Sestavljen je iz treh eksonov, po translaciji RNA pa nastane 171 aminokislin dolg protein.



Eksoni: 3 Kodirajoči eksoni: 3 Dolžina transkripta: 1,315 bp Dolžina translacije: 171 aminokislinskih ostankov

Slika 6: Shematski prikaz gena TNF

4.1.3 TNF in bolezni

Citokin TNF je vpleten v nastanek številnih bolezni, vključno z avtoimunskimi boleznimi, inzulinske rezistence, raka in drugih. Kronično izpostavljanje TNF lahko povzroči številne zaplete npr. limfopenijo in imunsko pomanjkljivost. »Knockout« študije na miškah so pokazale, da ima pomemben vpliv tudi na živčni sistem.

Asociacijske študije, ki so primerjale polimorfizme tega gena med različnimi skupinami bolnikov in zdravimi posamezniki, so ugotovile povezavo z astmo, revmatoidnim artritisom, diabetesom tipa 1 in 2, Crohn-ovo boleznijo in še mnogimi drugimi. Polimorfizmi, ki kažejo največji vpliv, ležijo v promotorju tega gena, ki regulira gensko ekspresijo.

Ugotavljajo, da je za vse naštetе bolezni značilna povišana ekspresija gena TNF, ki je posledica polimorfizmov v promotorju. Povišana ekspresija privede do povišane koncentracije citokina, le ta pa pripomore k razvoju različnih bolezni. Gensko ekspresijo oz. količino mRNA lahko merimo z uporabo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR).

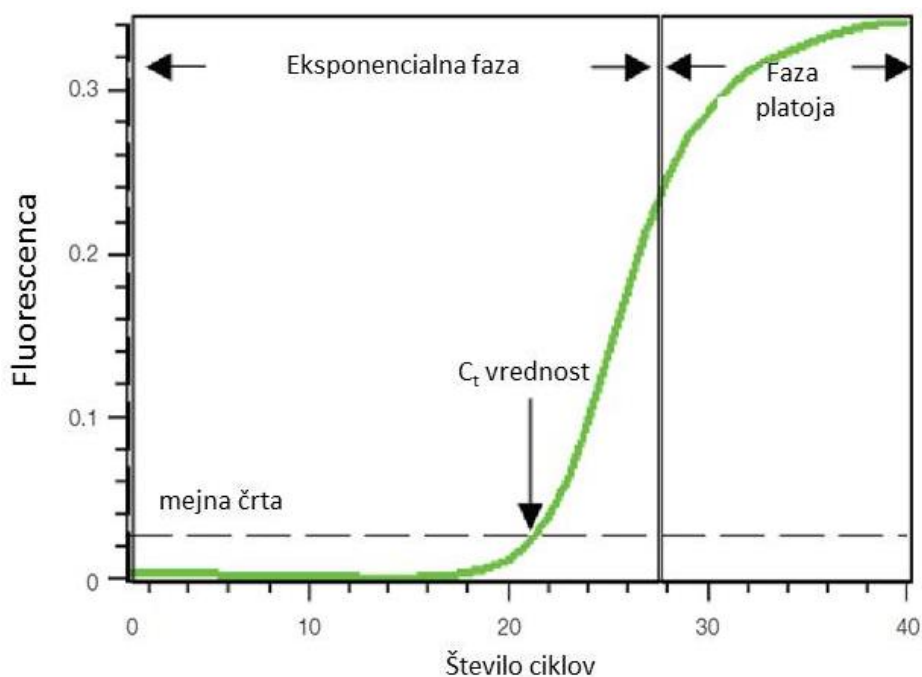
4.1.4 Kvantitativni PCR v realnem času

Pri klasični PCR reakciji detektiramo produkt po končani reakciji, torej po zadnjem ciklu, ponavadi na agaroznem gelu. Z metodo PCR v realnem času oz. real time PCR, pa lahko spremljamo nastajanje produkta med samo reakcijo, opazujemo in izmerimo kako reakcija napreduje.

Spremljanje reakcije v »realnem času« temelji na spremljanju fluorescentnega signala, zato moramo vključiti tudi fluorescentne molekule. Jakost signala je sorazmerna s količino produkta. Uporabimo lahko fluorescenčno barvilo, ali pa fluorescenčne probe oz. sonde, ki se specifično vežejo na komplementarno molekulo DNA. Signal meri PCR aparat (termo-cycler), ki tudi detektira fluorescenco. Povezan je z računalnikom in s programsko opremo, s pomočjo katere lahko po vsakem ciklu detektiramo rezultate, omogoča pa nam tudi številne analize le teh.

PCR v realnem času lahko uporabimo tako za kvalitativno (zanima nas prisotnost/odsotnost določene sekvence), kot za kvantitativno (število kopij DNA). Kadar uporabljamo slednji način, imenujemo metodo tudi kvantitativni PCR (qPCR).

Za detekcijo produkta v primerjavi z navadnim PCR-jem, ne potrebujemo gela, saj nam sam sistem že poda rezultate, s tem pa se zmanjša čas, ki ga za reakcijo porabimo in tudi možnost kontaminacije. Potek reakcije je prikazan na sliki 7. X os predstavlja število ciklov, y os pa fluorescenco, ki jo oddaja nastajajoči produkt in je sorazmerna s količino produkta. Količina produkta najprej raste eksponencialno (v vsakem ciklu se količina podvoji), nato pa sledni ne-eksponencialna faza platoja.



Slika 7: »Baseline« nastajanja produkta pri RT-PCR.

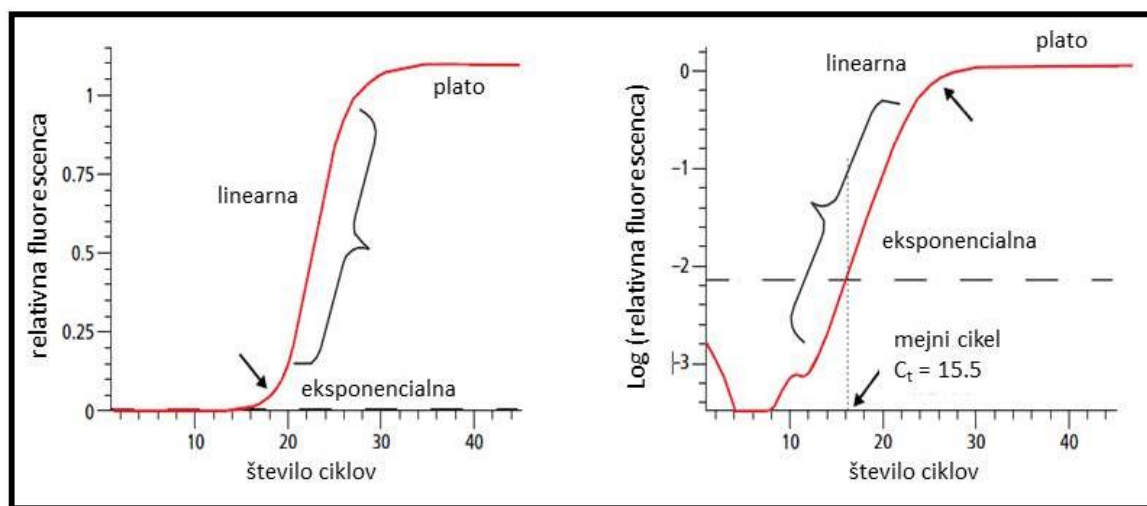
V prvih ciklih gre za zelo majhne količine produkta, zato povečanja fluorescence ne moremo detektirati kljub eksponencialni rasti produkta, saj prevlada fluorescenca ozadja. Cikel v katerem količina produkta naraste dovolj, da signal lahko detektiramo imenujemo »threshold« cikel, in ga označimo s C_T .

Vrednost C_T za posamezno reakcijo je odvisna od količine DNA, ki je prisotna na začetku reakcije. Če je prisotna večja količina bo potrebnih manj ciklov, da bomo dobili signal tolikšne intenzitete, da ga

lahko detektiramo → vrednost C_T bo majhna. Obratno bo pri majhni količini DNA molekul v vzorcu potrebnih več ciklov, da bo signal dosegel enako intenziteto → C_T bo večja. Ta povezava je osnova RT-PCR.

Teoretično vsi vzorci, pri isti jakosti signala, vsebujejo enako število produkta. Jakost, pri kateri odčitamo C_T vrednosti na grafu, prikažemo kot »threshold« črto → vsi vzorci imajo po C_T številu ciklov identično število specifičnih kopij.

Graf lahko prikažemo tudi tako, da na y-os nanašamo logaritem relativne vrednosti fluorescence, kot je prikazano na sliki 8.



Slika 8: »Baseline« nastajanja produkta pri RT-PCR.

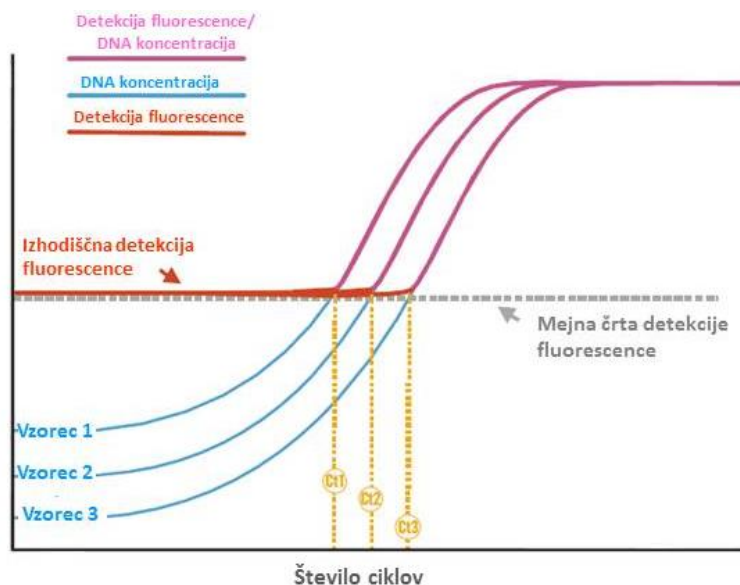
Če povzamemo: reakcija RT-PCR ima tri faze:

- I. »Background« faza: signala ne moremo zaznati, zato ne moremo meriti količine produkta.
- II. Eksponencialna faza: optimalna kinetika. To fazo uporabimo za kvantifikacijo.
- III. Faza platoja: produkt ne nastaja več zaradi prebitka produkta glede na primerje, zmanjšane encimske aktivnosti, zmanjšane koncentracije mononukleotidov...

Vrednost C_T predstavlja začetek eksponencialne faze.

Vsak posamezen cikel RT-PCR reakcije je sestavljen enako kot pri navadnem PCR iz treh faz – denaturacije (95°C), pripenjanja začetnih oligonukleotidov (50-64°C) in polimerizacije (72°C).

Slika 9 prikazuje klasičen način prikaza poteka RT-PCR reakcije, pri kateri smo spremljali 3 različne vzorce.



Slika 9: Trije vzorci in njihove CT vrednosti.

4.1.5 Metode detekcije produkta pri qPCR

Za detekcijo produkta pri qPCR uporabljamo dve metodi. Prva temelji na fluorescenčnem barvilu (nespecifična detekcija), druga pa na fluorescenčni sondi (specifična detekcija). Obe metodi omogočata meritev količine produkta.

Metoda z uporabo barvila temelji na vezavi barvila v DNA molekule, ki nastanejo med PCR reakcijo. Barvila so nespecifična in se vežejo na vse dvojnovijačne molekule ter s tem povzročijo emitiranje fluorescence. To nam omogoča določitev začetne koncentracije DNA v vzorcu. Najpogosteje uporabljeno barvilo je SYBR Green.

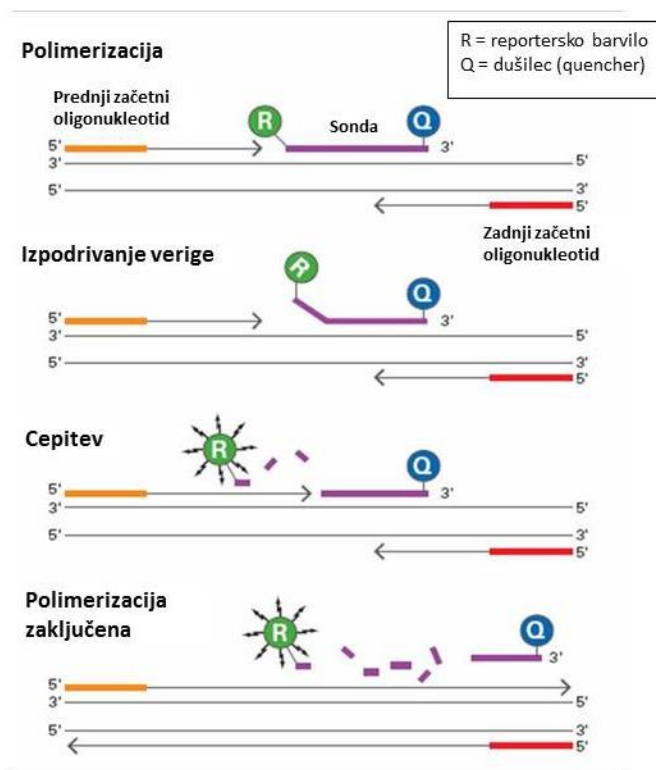
Reakcijska mešanica vsebuje encim polimerazo, dNTP (mononukleotide), pufer in barvilo, ki se na enovijačno DNA v vzorcu ne veže. Na sliki 11 je barvilo vidno kot zelene »kroglice«. Ko pa PCR reakcija poteka, nastajajo dvovertični produkti, v katere se barvilo veže in postane fluorescentno. Ko je produkta toliko, da signal fluorescence naraste čez mejo ozadja, ga lahko detektiramo. Ta cikel imenujemo »threshold« cikel.



Slika 10: qPCR z uporabo barvila (SYBR Green).

SYBR Green se veže na vsak novo nastali dvovertični DNA kompleks in fluorescira. Fluorescenca se akumulira medtem ko se PCR nadaljuje in se izmeri na koncu vsakega PCR cikla.

Kvantifikacija produkta s pomočjo sonde ali probe temelji na specifičnih sondah, ki se vežejo specifično samo na določeno DNA verigo. Tako lahko produkt tudi kvalitativno detektiramo, saj npr. v primeru drugega alela, ne dobimo signala. Sonde imajo vezane tako imenovano reportersko barvilo (npr. FAM, VIC) in barvilo dušilca (quencher). Polimeraza med podaljševanjem amplikona cepi hidrolizno sondo, kar loči barvilo poročevalca od dušilca, pri čemer pride do oddajanja fluorescence. Postopek je prikazan na sliki 12. Sonda se specifično veže na verigo, ko pa se sintetizira nova veriga se ta odcepi, odcepi se tudi reporter in začne oddajati signal. Oddana fluorescenca v vsakem PCR ciklu je sorazmerna količini nastalega produkta.



Slika 11: RT-PCR z uporabo TaqMan sonde.

To metodo lahko uporabljamo tudi za določanje več produktov hkrati. Pri tem uporabimo več sond, ki oddajajo različen barvni signal (multipleks). Najpogosteje uporabljamo zeleno in rdečo barvo.

4.1.6 Reverzna transkripcija

Kadar želimo meriti gensko ekspresijo, moramo določiti količino določene mRNA v vzorcu. Vendar pa s PCR reakcijo pomnožujemo le DNA, zato mRNA predhodno prepišemo v enoverižno DNA molekulo, ki je komplementarna mRNA (complementary DNA = cDNA). Uporabimo encim reverzno transkriptazo. Reverzna transkriptaza je virusnega izvora in pri retrovirusih izdeluje DNK na podlagi RNK matrice, tako da se na tak način integrira DNK v genom gostitelja kot provirus. V raziskavah ta encim uporabimo za sineto cDNA, ki jo nato uporabimo za analize.

4.1.7 Analiza podatkov

Kvalitativne in kvantitativne analize

Najosnovnejša genetska analiza zahteva le odgovor DA ali NE – je določen gen ali mRNA prisotna v vzorcu, ali ni. Takšno analizo lahko pri qPCRju izvedemo s sondami – torej ali se je sonda vezala na vzorec ali se ni. Obenem pa lahko merimo tudi količino te specifične DNA v vzorcu.

Kvantitativne metode lahko razdelimo v dve glavni skupini – absolutna in relativna kvantifikacija. Pri absolutni kvantifikaciji določimo absolutno količino tarčne molekule. Tak način pogosto uporabljamo pri raziskavah v virologiji in mikrobiologiji. Pri relativni kvantifikaciji pa primerjamo nivo izražanja dveh različnih tarčnih sekvenc v istem vzorcu. Končni rezultat prikažemo kot razmerje izražanja obeh tarč. Relativna kvantifikacija se pogosto uporablja, saj lahko primerjamo razmerje med različnimi vzorci, medtem ko primerjava absolutnih vrednosti, zaradi različne kvalitete vzorcev (npr. uspešnosti izolacije) ni relevantna.

Zakaj relativna kvantifikacija?

V genetskih raziskavah npr. pri merjenju genske ekspresije, se večinoma uporablja relativna kvantifikacija – torej vrednosti Ct normaliziramo na nek referenčni gen, za katerega vemo, da se v obeh tipih celic. Absolutne vrednosti v takšnih raziskavah ne bi bile relevantne, saj v vzorcih nimamo enakih koncentracij mRNA.

Primer: ekspresija p53 mRNA v rakastih in normalnih celic

Znano je, da je se količina proteina p53 spremeni v rakastih celicah. Znanstvenike je zanimalo, kolikšna je ta razlika v p53 mRNA.

- a) Prva skupina znanstvenikov je ekstrahirala mRNA iz 1000 rakastih celic in 1000 celic zdravega tkiva in z uporabo qPCR določila količino p53 mRNA v obeh vzorcih. Ugotovili so značilno razliko v količini mRNA p53 normirano na enako število celic v obeh vzorcih.*
- b) Druga skupina znanstvenikov je izmerili količino GAPDH mRNA v zdravih in rakastih celicah tako da so uporabili enako število celic in ugotovili da je količina identična. Nato so z uporabo qPCR izmerili količino p53 mRNA in GAPDH mRNA v različnih vzorcih in za vsak vzorec. Kot rezultat relativne kvantifikacije so podali razmerje med količino p53 mRNA in GAPDH mRNA ter ugotovili značilno razliko med zdravimi in rakastimi celicami.*

V obeh primerih so dobili enak rezultat – prvi so uporabili normalizacijo na število celic, drugi pa na količino GAPDH, za katero so predhodno ugotovili, da je identična v obeh tipih celic.

Relativna kvalifikacija normalizirana na referenčni gen

Ker vzorci, ki jih v analizah uporabljamo navadno vsebujejo različno število celic, uporabljamo normalizacijo na referenčni gen (GAPDH, beta-actin). Takšen postopek je hiter in enostaven, pogoj pa je, da moramo poznati referenčni gen, ki se v vseh vzorčnih celicah izraža z enako intenziteto in se ekspresija ne spremeni med morebitno terapijo.

Ko z relativno kvantifikacijo primerjamo več vzorcev, enega izmed vzorcev izberemo za kalibrator (lahko tudi povprečno vrednost vseh vzorcev) in ekspresijo tarčnih genov prikažemo kot porast ali znižanje glede na kalibrator.

Primer: ekspresija p53 mRNA v rakastih in normalnih celic

Imamo 3 vzorce rakastega tkiva in 3 vzorec zdravega. Kot kalibrator lahko vzamemo povprečne vrednosti vseh zdravih/kontrolnih vzorcev (lahko bi vzeli tudi en sam vzorec ali pa povprečne

Da lahko določimo relativno ekspresijo tarčnega gena v vzorcu z uporabo referenčnega gena moramo za vsak vzorec z uporabo qPCR določiti Ct vrednosti tarčnega in referenčnega gena.

Primer: ekspresija p53 mRNA v rakastih in normalnih celic

	Z1	Z2	Z3	B1	B2	B3
Tarčni gen	Ct _{Z1T}	Ct _{Z2T}	Ct _{Z3T}	Ct _{B1T}	Ct _{B2T}	Ct _{B3T}
Referenčni gen	Ct _{Z1R}	Ct _{Z2R}	Ct _{Z3R}	Ct _{B1R}	Ct _{B2R}	Ct _{B3R}

Ko določimo vrednost Ct lahko določimo nivo ekspresije z različnimi metodami. Najpogosteje se uporablja »Livak-ova metoda« oz. bolj znana pod imenom metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$

To metodo lahko uporabimo, če se ekspresija tarčnega in referenčnega gena sklada od 5% do skoraj 100%.

Dobljene vrednosti najprej preračunamo glede na kalibrator.

$$\Delta Ct_{\text{vzorec}} = Ct_{\text{vzorec,T}} - Ct_{\text{vzorec,R}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibrator}} = Ct_{\text{kalibrator,T}} - Ct_{\text{kalibrator,R}}$$

Dobljene ΔCt vrednosti za vzorec normaliziramo na kalibrator.

$$\Delta\Delta Ct_{\text{vzorec}} = \Delta Ct_{\text{vzorec}} - \Delta Ct_{\text{kalibrator}}$$

Nato izračunamo nivo ekspresije:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{normaliziran nivo ekspresije}$$

Ta rezultat nam pove zvišanje ali znižanje genske ekspresije tarčnega gena glede na kalibrator in normalizirano na referenčni gen. Rezultat je povsem neodvisen od količine vzorca oz. celic v vzorcu.

Primer: ekspresija p53 mRNA v rakastih in normalnih celic

Izmerili smo naslednje vrednosti za p53 mRNA (tarčni gen) in GAPDH mRNA (referenčni gen)

	Z1	Z2	Z3	B1	B2	B3
Ct - Tarčni gen	15,0	16,8	15,9	12,0	11,5	12,2
Ct - Referenčni gen	17,2	17,9	17,7	17,8	17,3	17,7
ΔCt	-2,2	-2,1	-1,8	-5,8	-5,8	-5,5

Za kalibrator lahko uporabimo povprečni $\Delta Ct = -3,9$

Izračunamo $\Delta\Delta Ct$.

Za prvi vzorec Z1 npr.: $\Delta\Delta Ct = (-2,2) - (-3,9) = 1,7$ $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,308$

In za ostale:

	Z1	Z2	Z3	B1	B2	B3
$\Delta\Delta Ct$	1,7	1,8	2,1	-1,9	-1,9	-1,6
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,308	0,287	0,233	3,732	3,732	3,031

Vidimo, da je ekspresija gena p53 v vzorcih bolnega tkiva značilno višja v primerjavi s kontrolami. Iz tega ugotovimo, da je višji nivo p53 mRNA povezan s kancerogenezo.

4.2 IZVEDBA VAJE

MATERIALI

Vzorčna cDNA, reagenti za PCR reakcijo (SybrGreen master mix, začetni oligonukleotidi), pipete, ploščica, kvantitativni termični ciklizator)

POSTOPEK

Za 5 različnih vzorcev bomo izmerili ekspresijo TNF mRNA z uporabo qPCR. Kot referenčni gen uporabi B2M mRNA.

- Enega izmed vzorcev uporabi za konstruiranje standardne krivulje. Pripravi redčitve 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 ter jih nanesi na ploščico kot prikazuje tabela:

	1	2	3	4	5	6	7	
A	V1 1:1	V1 1:2	V1 1:5	V1 1:10	V1 1:20	V1 1:40	V1 1:80	→ TNF
B	V1 1:1	V1 1:2	V1 1:5	V1 1:10	V1 1:20	V1 1:40	V1 1:80	→ TNF
C	V1 1:1	V1 1:2	V1 1:5	V1 1:10	V1 1:20	V1 1:40	V1 1:80	→ B2M
D	V1 1:1	V1 1:2	V1 1:5	V1 1:10	V1 1:20	V1 1:40	V1 1:80	→ B2M
E	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	→ TNF
F	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	→ B2M

- Za merjenje ekspresije pripravi dve reakcijski mešanici:

tarčni gen

TNF	1	x
2*SYBR GREEN	5	
primer 1	1,2	
primer 2	1,2	
cDNA	2	
H2O	0,6	
	10	

referenčni gen

B2M	1	x
2*SYBR GREEN	5	
primer 1	0,5	
primer 2	0,5	
cDNA	2	
H2O	2	
	10	

- K vsakemu vzorcu dodamo 8 μ L ustrezne reakcijske mešanice.
- Vsem redčitvam določi Ct vrednosti za oba gena in nariši standardno krivuljo!
- Določi še Ct vrednosti vsem vzorcem in izračunaj relativno ekspresijo po metodi $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3 REZULTATI

Standardna krivulja za tarčni gen TNF:

Redčitev	C	Log(C)	Ct ₁	Ct ₂	Ct _{povp.}
1:1	1				
1:2					
1:5					
1:10					
1:20					
1:40					
1:80					

Standardna krivulja za referenčni gen B2M:

Redčitev	C	Log(C)	Ct ₁	Ct ₂	Ct _{povp.}
1:1	1				
1:2					
1:5					
1:10					
1:20					
1:40					
1:80					

Laboratorijske vaje iz predmeta Genomika v biomedicinski tehnologiji

Vzorec	Ct _{TNF}	Ct _{B2M}	ΔCt	ΔCt _{povp.}	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
V1						
V2						
V3						
V4						
V5						
V6						
V7						

4.4 RAČUNSKA NALOGA

Preračunaj kako bi razredčil vzorcev (koliko vode in koliko bolj koncentriranega vzorca bi zmešal), da bi dobil vseh potrebnih redčitev zadostno količino za opisan eksperiment?

	H2O	Predhodna redčitev	Končni volumen
1	/		
1:2			
1:5			
1:10			
1:20			
1:40			
1:80			

Založna koncentracija primerjev je 5 μ M

250nM primer		
	1 vzorec	___ vzorcev
H2O		
SYBR Green Mix	5	
P1		
P2		
DNA	2	
Total volume	10	

300 nM primer		
	1 vzorec	___ vzorcev
H2O		
SYBR Green Mix	5	
P1		
P2		
DNA	2	
Total volume	10	

350 nM primer		
	1 vzorec	___ vzorcev
H2O		
SYBR Green Mix	5	
P1		
P2		
DNA	2	
Total volume	10	

5 LITERATURA

1. William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino: Concepts of Genetics, 10. izdaja, Pearson, 2012
2. William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino: Essentials of Genetics, 8. izdaja, Pearson, 2012
3. Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott: Molecular Cell Biology, 7. izdaja, Freeman, 2012
4. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods 25, 402-408 (2001).
5. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. Hum Mutat. 2009, 30(6):857-9.
6. Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. Hum Mutat. 2009 Jun;30(6):860-6.