

Literatura

Coltman, D. W. (1999). Male reproductive success in a promiscuous mammal: behavioural estimates compared with genetic paternity. *Mol Ecol.* 8:(7): 1199-1209.

Fornůšková, A. (2007). Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopýrů. Bakalářská práce.

Michaux J.R., Kinet, S. Filippuci, M.G. Libois, R. Besnard, A. Catzeffis, F.: Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae: Rodentia). *Molecular Ecology Notes*, 2001, 1:260-263.

Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. July 2000.

Určení pohlaví - http://cs.wikipedia.org/wiki/Ur%C4%8Den%C3%AD_pohlav%C3%AD

Molekulární metody pro střední školy



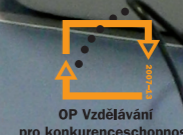
CZ.1.07/2.3.00/35.0026 Věda všemi smysly

Text: Mgr. Eva Holánová
Editorka: Mgr. Anna Bryjová
www.zivaveda.ivb.cz

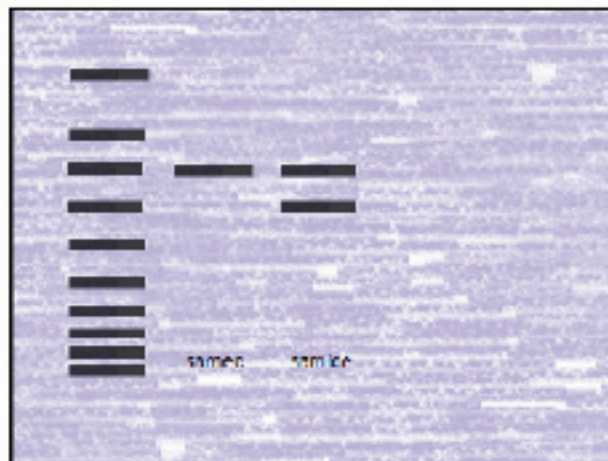
Vytištěno z prostředků projektu
Věda všemi smysly (CZ.1.07/2.3.00/35.0026)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Molekulární genetika je obor zabývající se studiem buněčných biologických procesů na molekulární úrovni. Nositelkami genetické informace jsou nukleové kyseliny DNA a RNA. K uchování genetické informace slouží dvouřetězcová DNA. Jednořetězcová RNA zajišťuje přenos genetické informace z DNA do primární struktury bílkovin.

Molekulárně-genetické metody umožňují manipulaci s nukleovými kyselinami. Zásadní metodou je PCR (Polymerázová řetězová reakce), která umožňuje amplifikaci konkrétního úseku DNA. Jako templát slouží denaturovaná DNA, podle níž je syntetizován

komplementární řetězec. K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce DNA, po předchozí denaturaci. Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek. Teoreticky lze získat 2n řetězců (kopií). V rámci tohoto cvičení se zaměříme na metody, které nám pomohou určit pohlaví a otcovství u ptáků, a dále na rozlišení myšice křovinné a myšice lesní genetickým testem.

Určování pohlaví patří k běžnému výzkumu molekulární genetiky. V případě genetického určení je většinou rozlišeno pohlaví se stejnými pohlavními chromozomy (samci ptáků, samice savců,...) a pohlaví s různými pohlavními chromozomy (samice ptáků, samci savců,...).

Analýza paternity (otcovství) a příbuznosti pomáhá odhalit párovací strategie u různých druhů živočichů a stanovit reprodukční úspěšnost samců (Coltman 1999; Pemberton et al. 1992). K určení otcovství se často využívají tzv. mikrosatelity. Mikrosatelity jsou nekódující, tandemově se opakující oblasti DNA o délce 2-6 párů bazí. Využití mikrosatelitové DNA pro zjištění paternity a příbuzenských vztahů ve vybrané populaci je založeno na studiu variability určitého mikrosatelitového lokusu u všech zkoumaných jedinců. Vychází se zde z faktu, že mikrosatelitové lokusy jsou sice variabilní v počtu opakování základního motivu, tedy ve své délce, ale zároveň se z rodičů na potomky dědí striktně podle pravidel Mendelovské dědičnosti. Potomek tedy může od svých rodičů zdědit pouze ty alely, které jeho rodiče mají.

V České republice žije 16 druhů myšovitých hlodavců, z toho 4 druhy myšic. Jedná se o myšici malookou, myšici temnopásou, myšici křovinnou a myšici lesní. Myšici křovinnou a myšici lesní můžeme rozpoznat podle hnědé skvrny na spodní straně krku, kterou mívá myšice křovinná výrazně menší. Tento znak je však variabilní a tím pádem ne úplně spolehlivý. Tyto dva druhy byly tradičně rozlišovány také podle délky zadní tlapky, nevýhodou této metody je ovšem její použitelnost pouze pro dospělé jedince. Nejspolehlivější metodou je rozlišení těchto druhů na základě jejich genetické informace.

Tabulka 6

	počet reakcí 1	počet reakcí	zásobní konc.	jednotky	finální koncentrace	ředění (x)
PCR pufr	2		10	x	1	10
Primer AF-UP	1		10	uM	0,5	20
Primer AF-DN	1		10	uM	0,5	20
dNTPs	0,4		10	mM	0,2	50
MgCl ₂ (1,5mM)	2,4		25	mM	3	8,333333
Taq (Fermentas)	0,1		5	U/ul	0,5	
dd H ₂ O	11,1					
	18					
DNA	2			ul		
objem	20					

Tabulka 7

1) 94°C	2 min		úvodní denaturace, aktivace polymerázy
2) 94°C	20 s	počet cyklů 33	denaturace vláken DNA
3) 58°C	30 s		přisednutí primerů na specifická místa v DNA
4) 72°C	90 s		prodlužování nového řetězce DNA od primeru
5) 72°C	10 min		opravení chyb a dokončení prodloužení všech úseků DNA

Tabulka 8

	počet reakcí 1	počet reakcí	zásobní konc.	jednotky	finální koncentrace	ředění (x)
PCR pufr	2		10	x	1	10
Primer AS-UP	1		10	uM	0,5	20
Primer AS-DN	1		10	uM	0,5	20
dNTPs	0,4		10	mM	0,2	50
MgCl ₂ (1,5mM)	1,2		25	mM	1,5	16,666667
Taq (Fermentas)	0,1		5	U/ul	0,5	
dd H ₂ O	3,6					
	9					
DNA	1			ul		
objem	10					

C. Příprava 1,5% agarózového gelu

Postup popsán výše

Co očekávat na gelu?

Pro každého testovaného jedince existují dvě PCR. Jen jedna z nich však může mít pozitivní výsledek, který je rozpoznán při zobrazení gelu jako svítící proužek. Při použití primerů AF-UP a AF-DN se zobrazí proužek u vzorků myšice lesní. Při PCR s primery AS-UP a AS-DN se zobrazí na gelu proužek pouze u myšice křovinné.

4. ROZLIŠENÍ MYŠICE KŘOVINNÉ A MYŠICE LESNÍ GENETICKÝM TESTEM

Metoda je založena na mezidruhové variabilitě mitochondriálního genu pro cytochrom b (cyt-b). Tento gen kóduje polypeptidy významné pro dýchací řetězec. Michaux et al. (2001) popsali důkladně cyt-b tří druhů myšic a pro každý z těchto druhů definovali část, jež lze pomocí specifických primerů amplifikovat pouze pro daný druh. Tyto primery budou použity pro rozlišení myšice křovinné a lesní.

A. Izolace DNA

Viz HotSHOT izolace genomické DNA - se vzorky myších tkání.

B. PCR

Pro každý vzorek je potřeba namíchat 2 PCR, z nichž každá je specifická buď pro myšici křovinnou nebo myšici lesní. Pozitivní výsledek pro jednu z nich identifikuje druh.

Potřebné reagensy a vybavení:

- vyizolovaná DNA myšice lesní a myšice křovinné; enzym polymeráza; primery AF-UP (5'-AGCTACACTAACACGTTTC-3'), AF-DN (5'-GCGTATGCAAATAGGAAGTAC-3'); AS-UP (5'-GAGGAGGATTCTCAGTAGAC-3') a AS-DN (5'-TTAATATGGGGTGGGGTGTTA-3'); sada dinukleotidů; MgCl₂; PCR pufr; denaturovaná voda
- pipety; špičky; mikrozkušavky; rukavice; box s ledem; termální cykler; třepačka; centrifuga

Postup práce:

1. Do mikrozkušavky o velikosti 1,5 ml napipetujte potřebné množství vody. Přidejte PCR pufr, dinukleotidy, MgCl₂, primery specifické pro myšici lesní a úplně nakonec polymerázu (viz Tabulka 6 a 8). Tu po celou dobu nechte v mrazáku a co nejrychleji po použití vraťte zpět.
2. Zkušavku uzavřete a obsah důkladně promíchejte pomocí tzv. třepačky. Aby na víčku nezůstaly zbytky směsi, zkušavku krátce centrifugujte.
3. Do čtyř mikrozkušavek o velikosti 0,2 ml napipetujte potřebné množství této směsi a přidejte DNA z analyzované zkušavky.
4. Mikrozkušavky důkladně uzavřete a krátce zcentrifugujte. Poté je vložte do cykleru a spusťte reakci (viz Tabulka 7).
5. Celý proces opakujte s primery specifickými pro myšici křovinnou.

1. IZOLACE DNA Z KRVE ČI TKÁNÍ

Potřebné reagensy a vybavení:

- vzorky krve, či tkání v lihu; proteináza K; komerční kit pro izolaci DNA (Qiagen); ethanol
- sada pipet; špičky; 2 x 1,5 ml zkušavka/1 vzorek; stripy (po 8); stojánek; vortex (míchačka); centrifuga; termální blok (lázeň)

Před začátkem:

Zapněte termální blok (lázeň) a nechte nahřát na 56°C. Pak do něj vložte pufr AL.

Postup práce:

A. Izolace genomické DNA pomocí komerčního kitu od firmy Qiagen

1. Pipetujte 20 µl proteinázy K do 1,5 ml zkušavky. Do této zkušavky napipetujte 10 µl krve, či odstříhnete část tkáně. Doplněte pufrém ATL na objem 220 µl (tzn. přidejte 190 µl ATL).
2. Přidejte do stejné zkušavky 200 µl pufru AL. Vortexujte a nechte inkubovat 10 minut při 56°C v termálním bloku.
3. Přidejte do zkušavky 200 µl ethanolu (96%), silně vortexujte.
4. Přepipetujte směs z 3. kroku do DNeasy Mini spin zkušavek (součást komerčního kitu) umístěných v 2 ml sběracích zkušavkách. Centrifugujte 1 min/8 000 rpm. Odstraňte sběrací zkušavku a umístěte DNeasy Mini spin zkušavku do nové 2 ml sběrací zkušavky.
5. Přidejte 500 µl pufru AW1 a centrifugujte 1 min/8 000 rpm. Opět odstraňte sběrací zkušavku a umístěte DNeasy Mini spin zkušavku do nové 2 ml sběrací zkušavky.
6. Přidejte 500 µl pufru AW2 a centrifugujte 3 min/14 000 rpm, aby došlo k vysušení filtru.
7. Odstraňte sběrací zkušavku a umístěte DNeasy Mini spin zkušavku do čisté 1,5 ml zkušavky (popsaná číslem jedince!!).
8. Pipetujte 100 µl pufru AE přímo na filtr. Inkubujte při pokojové teplotě 1 min a následně centrifugujte 1 min/8 000 rpm. DNA se nyní nachází v 1,5 ml zkušavce!

PRAKTICKÁ ČÁST

B. HotSHOT izolace genomické DNA

1. Připravte si alkalizační reagent = 25mM NaOH smíchejte s 0,2 mM EDTA (pH=12 vznikne rozpuštěním reagentů ve vodě):

Pro přípravu 200 ml alkalizačního reagentu rozpustěte 0,2 g NaOH ve 180 ml vody. Do vody přidejte 0,8 ml 0,5M EDTA a doplňte do 200 ml. pH upravte na hodnotu 12.

2. Připravte si neutralizační reagent = 40mM Tris-HCl (pH=5 – rozpustit ve vodě):

Pro přípravu 200 ml roztoku naředte 8 ml zásobního 1M TRIS do 200 ml vody a upravte pH na hodnotu 5 pomocí HCl.

3. Do stripů si připravte velmi malé vzorky (tkáně) pro izolaci DNA.

4. Ke každému vzorku přidejte 75 µl alkalizačního reagentu a zahřejte směs na 95°C po dobu 50 min až 1 hod., dokud se tkáň nerozvaří.

5. Ke každému vzorku přidejte 75 µl neutralizačního reagentu. Nechte vzorky alespoň 1 hod. v ledničce.

6. Pro 10 µl PCR směsi se může použít 1-5 µl takto vyzolované genomické DNA.



PRAKTICKÁ ČÁST

Tabulka 4

	počet reakcí	počet reakcí	zásobní konc.	jednotky	finální koncentrace	ředění (x)
PCR pufr	5		10	x	5	2
Tgu3 -Fw	0,2		10	uM	0,2	50
Tgu3 -rev	0,2		10	uM	0,2	50
dd H2O	3,6					
DNA	9			ul		
objem	10					

Tabulka 5

1) 95°C	15 min		úvodní denaturace, aktivace polymerázy
2) 94°C	30 s	počet cyklů 35	denaturace vláken DNA
3) 57°C	90 s		přisednutí primerů na specifická místa v DNA
4) 72°C	60 s		prodlužování nového řetězce DNA od primeru
5) 60°C	30 min		opravení chyb a dokončení prodloužení všech úseků DNA

B. Příprava 2,5% agarózového gelu

Elektroforéza je jednou ze základních metod molekulární biologie. Tato standardní metoda se používá k separaci, identifikaci a purifikaci fragmentů DNA. Jako nosič se nejčastěji používá agaróza.

	Agaróza (g)	TAE (ml)
1,5% gel		
2,5% gel		

Co očekávat na gelu?

Proužek, který se bude vyskytovat u otce se objeví ve stejné velikosti i u vlastního mláděte.

3. URČENÍ PATERNITY ZEBŘIČEK

Studenti si připraví multiplex PCR, pomocí které se amplifikuje panel 2 mikrosatelitů.

A. PCR**Potřebné reagensy a vybavení:**

- genomická DNA zebřičky pestré; primery Tgu2 a Tgu13; Multiplex PCR Kit (Qiagen); denaturovaná voda
- sada pipet; špičky; stripy (po 8 mikrozkušavkách); led (příp. mrazící box); vortex (míchačka); centrifuga; termální cykler

Postup práce:

1. Nachystejte si led a popište si zkumavky. Zvortexujte a zcentrifugujte potřebné chemikálie pro přípravu PCR.
2. Do 1,5 ml zkumavky napipetujte všechny složky multiplex PCR směsi v následujícím pořadí a množství (viz Tabulka 3 a 4). Teplotní protokol je uveden v tabulce 5.
3. Z 1,5 ml zkumavky rozpipetujte do stripů vždy po 9 μ l připravenou reakční směs. Do každé mikrozkušavky pak napipetujte 1 μ l DNA od daného jedince.
4. Na termálním cykleru zkontrolujte následující teplotní profil (viz Tabulka 5).
5. Vložte zkumavky s připravenou reakční směsí do cykleru a nechte proběhnout amplifikaci (trvá přibližně 2 hodiny). Poté uložte vzorky do lednice.

Tabulka 3

	počet reakcí 1	počet reakcí	zásobní konc.	jednotky	finální koncentrace	ředění (x)
PCR pufr	5		10	x	5	2
Tgu12	0,2		10	uM	0,2	50
Tgu12	0,2		10	uM	0,2	50
dd H ₂ O	3,6					
DNA	9 1			ul		
objem	10					

2. URČENÍ POHLAVÍ ZEBŘIČEK POMOCÍ AGARÓZOVÉ ELEKTROFORÉZY

Studenti si připraví multiplex PCR, pomocí které si naamplifikují DNA zebřiček. Tuto DNA dále nanesou na agarózový gel a proběhne elektroforéza. Tento gel nakonec vloží do UV přístroje a odečtou pohlaví daného vzorku DNA zebřiček. Jeden proužek zobrazené DNA odpovídá samci, dva proužky samici.

A. PCR**Potřebné reagensy a vybavení:**

- genomická DNA zebřičky pestré, primery P2 (5' - TCTGCATCGCTAAATCCTTT- 3') a P8 (5' - CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3')
- Multiplex PCR Kit (Qiagen); denaturovaná voda; led
- sada pipet; špičky; stripy (po 8 mikrozkušavkách); 1 x 1,5 ml zkumavka; vortex (míchačka); centrifuga

Postup práce:

1. Nachystejte si led a popište si zkumavky. Zvortexujte a zcentrifugujte potřebné chemikálie pro přípravu PCR.
2. Do 1,5 ml zkumavky napipetujte všechny složky multiplex PCR směsi v následujícím pořadí a množství (viz Tabulka 1).
3. Z 1,5 ml zkumavky rozpipetujte do stripů vždy po 9 μ l připravenou reakční směs. Do každé mikrozkušavky pak napipetujte 1 μ l DNA od daného jedince.
4. Na termálním cykleru zkontrolujte následující teplotní profil (viz Tabulka 2).
5. Vložte zkumavky s připravenou reakční směsí do cykleru a nechte proběhnout amplifikaci. Poté uložte vzorky do lednice.

Tabulka 1

	počet reakcí 1	počet reakcí	zásobní konc.	jednotky	finální koncentrace	ředění (x)
PCR pufr	5		10	x	5	2
Primer P8	0,3		10	uM	0,2	50
Primer P2	0,3		10	uM	0,2	50
dd H ₂ O	3,4					
DNA	9 1			ul		
objem	10					

PRAKTICKÁ ČÁST

Tabulka 2

1) 95°C	15 min		úvodní denaturace, aktivace polymerázy
2) 94°C	30 s	počet cyklů 35	denaturace vláken DNA
3) 48°C	90 s		přisednutí primerů na specifická místa v DNA
4) 72°C	60 s		prodlužování nového řetězce DNA od primeru
5) 60°C	30 min		opravení chyb a dokončení prodloužení všech úseků DNA

B. Příprava 1,5 % agarózového gelu

Elektroforéza je jednou ze základních metod molekulární biologie. Tato standardní metoda se používá k separaci, identifikaci a purifikaci fragmentů DNA. Jako nosič se nejčastěji používá agaróza.

Elektroforetické pufry

Nejběžněji používané jsou:

TRIS-acetátový (TAE): 0,04 M Tris-acetát; 0,002 M EDTA, pH 8,2

TRIS-borátový (TBE): 0,089 M Tris-borát; 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA

Příprava Tris-acetátového pufru TAE- (50× koncentrovaný zásobní roztok)

242 g Tris báze

57,1 ml ledové kyseliny octové

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

H₂O doplnit do 1000 ml (výsledné pH je 8,2)

Potřebné reagensie a vybavení:

- PCR produkty (naamplifikovaná DNA zebříček); agar; TAE (nebo TBE) pufr; GeneRuler DNA ladder (100bp); barvička = Loading Dye 5x; GoodView (HGV-II)
- skleněná nádoba s víčkem; váhy; odměrný válec; „formička“ na gel; hřebínek; elektroforetická vanička; zdroj napětí

Postup práce:

Ve skleněné nádobě s víčkem nebo v Erlenmayerově baňce studenti připraví 1,5 % agarózový gel:

1. Na stůl si připravte „formičku“ na gel, do které vložíte hřebínek.
2. Nachystejte si skleněnou nádobu s víčkem nebo Erlenmayerovu baňku. Na analytických vahách si na kouskulobalu navažte 0,45g agarózy. Agarózu přesypte do skleněné nádoby.
3. V odměrném válci odměřte 30 ml 5xTAE (TBE) pufru. Nalijte ho do skleněné nádoby s agarózou.
4. Skleněnou nádobu s agarózou a 5xTAE (TBE) puftrem zatočte víčkem – nedotahujte. Pokud máte agarózu v Erlenmayerově baňce zadělejte ji trychtýřkem. Skleněnou nádobu vložte do mikrovlnné trouby. Agar rozvaňte.

PRAKTICKÁ ČÁST

5. Nyní nechte agar schladnout na cca 50°C (přiložená nádoba na ruce nepálí), poté do něj vložte 1,5 ul GoodView barvičky.

6. Agar s GoldView barvičkou nalijte do připravené „formičky“ na gel s hřebínkem. Pozor, „formička“ musí být uložena na vodorovném podkladu. Nechte 30 min zchladnout.

7. Po vychladnutí vyndejte hřebínek a přeneste gel do elektroforetické vany, ve které je 5xTAE (TBE) pufr. Jamky musí být ponořené v 5xTAE (TBE) pufru.

8. Do první jamky napipetujte 5 ul GeneRuler DNA Ladderu.

9. Smíchejte 5 ul vašeho vzorku DNA s cca 1 ul barvičky Loading Dye 5x (na proužku parafilmu nebo v eppendorfkách) a toto množství naneste do jamek na gelu (opakovat se všemi vzorky DNA; vždy vyměnit špičku).

10. Po nanesení všech vzorků zapněte elektroforézu (100 V, cca 15-20 min).

11. Gel vyjměte a dejte do UV přístroje. Vidíte proužky, které odpovídají vaší DNA (jeden proužek samec, dva samička).

	Agaróza (g)	TAE (ml)
1,5% gel		
2,5% gel		

Co očekávat na gelu?

