

Grupa.....

Data:.....

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 7.

Badanie mutacji punktowej metodą PCR-RFLP i translokacji chromosomalnej metodą PCR multipleks cz1.

UWAGA! Proszę przynieść na zajęcia własne rękawice.

Odczynniki:

Polimeraza Taq (rozcieńczona 10x polimeraza o stężeniu 5U/μl w 1 x stęż. buf. B, Eurx)

Bufor B

Sterylna woda

Produkty reakcji RT (z ćwiczenia 6)

Startery

dNTPs, 2mM

Sprzęt:

Miniwirówka

Vortex

Termocykler

Zadanie 1. Identyfikacja mutacji punktowej w cDNA dla TP53 metodą PCR-RFLP

1. Należy odebrać wypreparowane przez siebie cDNA (reakcja RT) podczas ćwiczenia nr 6 z pokoju przygotowawczego. Probówkę trzymać na lodzie.
2. Do sterylnej, podpisanej probówki o pojemności **0,2 ml** dodaj odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli poniżej - **Próbka PCR** (kolejność dodawania również istotna). Każdy z zespołów przygotowuje jeden PCR używając genomowego DNA izolowanego z różnych komórek. Jeden zespół na grupę zamiast próbki PCR przygotowuje reakcję kontrolną NC bez matrycy DNA – kontrola czystości odczynników. Wszystkie czynności wykonywać trzymając probówkę cały czas na lodzie.

(Objętość końcowa próbki 10 μl)

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka PCR	Próbka NC
Woda (DEPC)	-	4,5 μl	6,5 μl
10x Pol Buffer B	1x	1 μl	1 μl
Starter TP53_818F (5 μM)	0,25 μM	0,5 μl	0,5 μl

Starter TP53_818R (5 μ M)	0,25 μ M	0,5 μl	0,5 μ l
dNTPs (2 mM każdy)	0,2 mM	1 μl	1 μ l
Produkt RT		2 μl	-
Polimeraza Taq (0,5U/ μ l)	0,25U	0,5 μl	0,5 μ l

- Po dodaniu wszystkich składników, zawartość probówki delikatnie wymieszaj przez pipetowanie i zwiruj tak, aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieść probówkę w lodzie.
- Zaprogramować termocykler na następujący profil termiczny :
Wstępna denaturacja: 5 min- 94°C
Cykl:
Denaturacja: 30 sek.- 94° C
Przyłączanie starterów: 30 sek.- **57° C**
Synteza nici: 30 sek.- 72° C
Ilość cykli: 40
Dodatkowa elongacja 5 min.-72° C
- Umieść probówkę w termocyklerze i rozpocznij reakcję.
- Po zakończeniu reakcji probówki z produktami PCR oddaj do pokoju przygotowawczego w celu przechowania do kolejnych zajęć. Produkty przechowywać w -20° C. Unikać częstego rozmrażania/zamrażania materiału. Oczekiwana wielkość prążka 429 pz

Zadanie 2. Identyfikacja translokacji chromosomalnej Bcr-Abl metodą multipleksowego PCR (na podstawie Yaghmaie M i wsp., 2008)

- Do sterylnej, podpisanej (tak aby była możliwa identyfikacja przez grupę na następnych ćwiczeniach) probówki o pojemności 0,2 ml dodać odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli poniżej (kolejność również istotna). Wszystkie czynności wykonać, trzymając probówkę cały czas na lodzie.

Odczynnik		Próbka badana PCR	Próbka kontrolna NC
Woda (DEPC)	-	1,1 μl	5,1 μ l
10x Pol Buffer C	1x	1 μl	1 μ l
Starter CA3 (10 μ M)	0,6 μ M	0,6 μl	0,6 μ l
Starter C5e (10 μ M)	0,6 μ M	0,6 μl	0,6 μ l
Starter BCR-C (10 μ M)	0,6 μ M	0,6 μl	0,6 μ l
Starter B2B(10 μ M)	0,6 μ M	0,6 μl	0,6 μ l
dNTPs (2 mM każdy)	0,2 mM	1 μl	1 μ l

Produkty RT		4 µl	-
Polimeraza Taq (0,5 U/ µl)	0,25U	0,5 µl	0,5 µl

- Całość delikatnie wymieszać przez pipetowanie, a następnie zwirować tak, aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieścić probówkę w lodzie.
- Zaprogramować termocykler na następujący profil termiczny:
Wstępny cykl: 10 sec-100° C, 1 min- 96° C, 3 min- 60° C, 2 min- 72° C
Cykl:
Denaturacja: 10 sec.- 100° C, 20 sec.-97° C
Przylączenie starterów: 25 s- 58° C
10 sec- 78° C
Synteza nici: 50 sec-73° C
Ilość cykli: 31
Dodatkowa elongacja 10 min.-73° C
- Umieścić probówkę w termocyklerze i rozpocząć reakcję.

Przed przystąpieniem do odpowiedzi na poniższe pytania proszę zapoznać się z publikacją Yaghmaie M wsp.” Frequency of BCR-ABL Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia”, Arch Iranian Med 2008; 11 (3): 247 – 251.

Translokacja Bcr-Abl dotyczy wymiany nici chromatyny między chromosomem i, co zapisuje się jako..... Tego typu translokacja zachodzi z częstością (%)..... u pacjentów z nowotworem:..... i prowadzi do powstania tzw. chromosomu..... Prawidłowy chromosom 22 zawiera gen *BCR* o nie do końca poznanych funkcjach. Gen *ABL1* koduje enzym o aktywności, które pełni istotną funkcję w procesach takich jak: różnicowanie komórek, adhezja komórkowa, proliferacja komórek. Przeniesienie fragmentu genu *ABL1* za sekwencję genu *BCR*, może prowadzić do powstania genu hybrydowego, którego białko będzie charakteryzowało sięaktywnością i może prowadzić do niekontrolowanychkomórkowych. Lekiem specyficznym hamującym aktywność takiego enzymu jest.....

W reakcji multipleks PCR przeprowadzonej na zajęciach stosuje się mieszaninęstarterów, które pozwalają na wykrycieróżnych połączeń BCR-ABL. Czynnikiem różnicującym poszczególne produkty PCR jest

W przypadku pacjentów CML w Iranie najczęstszą translokacją BCR-ABL jest....., która wynosi