

Grupa:

Wrocław,

.....
Imię i nazwisko studenta

.....
Imię i nazwisko prowadzącego

Ćwiczenie nr 5.

1. Porównanie działania endonukleaz specyficznych i niespecyficznych.
2. Elektroforeza a) trawionego DNA oraz b) produktów PCR (z ćw. 3).
3. Metody identyfikacji mutacji – analiza wyników.

1. Porównanie działania endonukleaz specyficznych i niespecyficznych.

Odczynniki:

1. 1U/μl DNaza I
2. 10x Bufor Reakcyjny I
3. Woda wolna od nukleaz
4. 10U/μl PvuII
5. 10U/μl BamHI
6. 10x Bufor Fast Digest
7. 1% żel agarozowy z Midori Green Advance
8. Bufor 1xTAE
9. Bufor do obciążenia próbek 6x Loading Dye
10. Marker mas DNA (Perfect 1kb DNA Ladder)

Sprzęt:

1. Termoblok (37°C)
2. Miniwirówka
3. Aparat do elektroforezy
4. Zasilacz
5. Transiluminator
6. Pipety automatyczne

Zadanie 1. Trawienie DNA przy użyciu DNazy I.

1. Przygotuj 2 ponumerowane probówki o obj. 1,5 ml. Do każdej probówki dodaj odczynniki zgodnie z opisem w tabeli 1 (UWAGA kolejność dodawania odczynników ważna).

1U DNazy I (ok. 0,3 jedn. Kunitz’a) trawi 1μg plazmidowego DNA w ciągu 10 minut.

Tabela 1.

Probówka	1	2
Woda [μl]	oblicz	oblicz
10x Bufor Reakcyjny I [μl]	1	1
Plazmidowe DNA (1μg) [μl]	oblicz	oblicz
DNaza I (1U/μl) [μl]	-	1
Objętość końcowa [μl]	10	10

2. Zawartość probówek dokładnie wymieszaj i zwiruj tak aby całość mieszaniny reakcyjnej znajdowała się na dnie probówek. Probówki umieść w termobloku lub łaźni wodnej o temperaturze 37 °C i inkubuj 10 minut.
3. Do probówek dodaj 2 µl 6x buforu do próbek, po czym zwiruj. Preparat gotowy do rozdzielenia w elektroforezie.

Zadanie 2. Trawienie plazmidowego DNA przy użyciu endonukleazy restrykcyjnej PvuII i BamHI.

1. Przygotuj 2 ponumerowane probówki o obj. 1,5 ml. Do każdej probówki dodaj odczynniki zgodnie z opisem w tabeli 2 (UWAGA kolejność dodawania odczynników ważna).

Tabela 2.

Probówka	3 (PvuII)	4(BamHI)
Woda [µl]	oblicz	oblicz
10x Bufor FD[µl]	2	2
Plazmidowe DNA (1µg) [µl]	oblicz	oblicz
Enzym restrykcyjny (10U/µl) [µl]	1	1
Objętość końcowa [µl]	20	20

2. Zawartość probówki dokładnie wymieszaj i zwiruj tak aby całość mieszaniny reakcyjnej znajdowała się na jej dnie. Probówkę umieść w termobloku lub łaźni wodnej o temperaturze 37 °C i inkubuj minimum przez 15 minut.
3. Po zwirowaniu próbka jest gotowa do rozdzielenia elektroforetycznego.

2. Elektroforeza trawionego DNA oraz produktów PCR

a) Elektroforeza trawionego DNA

1. Probówki z produktami trawienia zadania 1 i 2 zwiruj tak aby całość mieszaniny znajdowała się na dnie probówki.
2. Do pierwszej studzienki nanieś 5 µl wzorca mas (Perfect 1kb DNA Ladder).
3. Do kolejnych studzienek w żelu nanosić po 12 µl próbek.
4. Elektroforezę prowadzić przy 100 V przez ok. 1 h w buforze do elektroforezy TAE, 1% żel agarozowy.
5. Po tym czasie rozdzielone cząsteczki DNA w żelu agarozowym obserwować w świetle lampy UV (transiluminator).

b) Elektroforeza produktów PCR (materiał z ćw. 3)

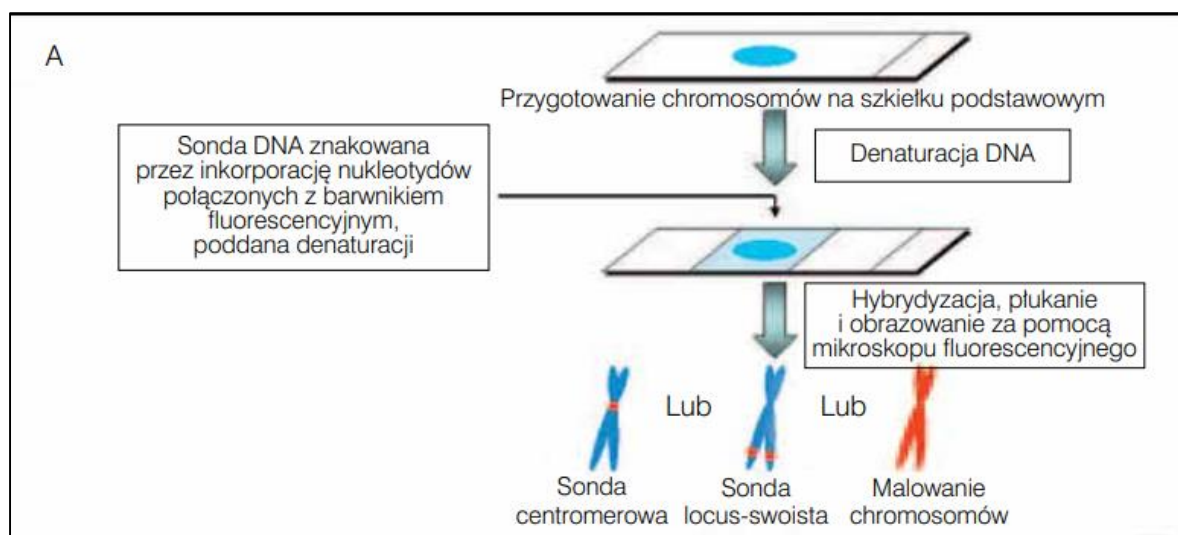
1. Probówki z produktami PCR (z ćwiczenia 3) zwiruj tak aby całość mieszaniny znajdowała się na dnie probówki.
2. Do pierwszej studzienki nanieś 5 µl wzorca mas (Perfect 1kb DNA Ladder).
3. Do kolejnych studzienek w żelu nanosić całość mieszanin PCR (10 µl).
4. Elektroforezę prowadzić przy 100 V przez ok. 1 h w buforze do elektroforezy TAE.
5. Po tym czasie rozdzielone cząsteczki DNA w żelu agarozowym obserwować w świetle lampy UV (transiluminator).

- a. *KpnI*.....
.....
- b. *PvuI*.....
.....
- c. *PvuII*.....
.....
- d. *BssHII*.....
.....

3. Metody identyfikacji mutacji – analiza wyników.

Zapoznaj się z przykładowymi **technikami cytogenetyki molekularnej** wykorzystywanymi w diagnostyce mutacji, a następnie przeanalizuj przedstawione przypadki:

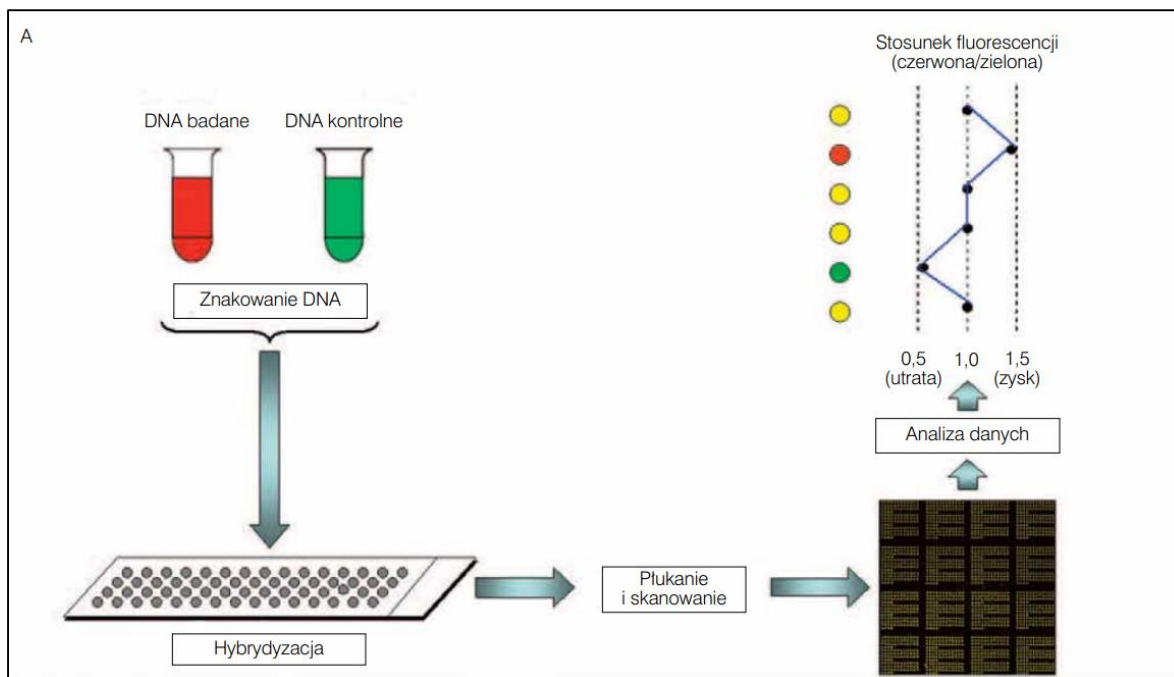
Cytogenetyka molekularna wykorzystuje osiągnięcia, takie jak klonowanie i automatyczne powielanie fragmentów DNA. Takie fragmenty mogą posłużyć, jako sonda molekularna do konkretnych części chromosomów w technice fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ, **FISH – fluorescence in situ hybridization** Rys. 2). Hybrydyzacja in situ wykonywana jest bezpośrednio na preparacie mikroskopowym, jest szeroko stosowana do detekcji określonych sekwencji na preparatach histologicznych, chromosomach, pojedynczych komórkach, a nawet skrawkach tkanek. W technice tej stosuje się sondy zależne od problemu diagnostycznego, są to sondy locus – specyficzne, centromerowe lub malujące.



Rys. 2. Analiza metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Podstawowe etapy FISH (Źródło: K. Goodin i inn. 2009, 13, 4 *Pediatrica po Dyplomie*).

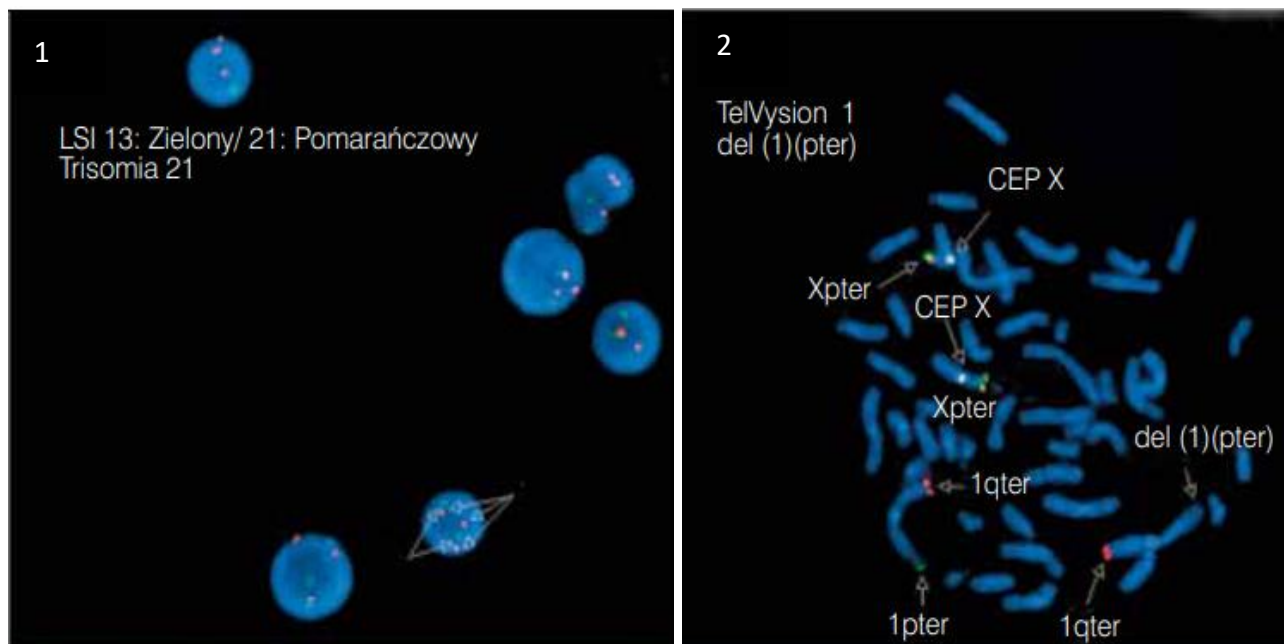
Technika porównawczej hybrydyzacji genomowej, **CGH – comparative genomic hybridization** (Rys. 3) polega na hybrydyzacji dwóch wyznakowanych fluorescencyjnie genomowych DNA, badanego i referencyjnego, zmieszanych w proporcji 1:1, do prawidłowych chromosomów metafazowych. W przypadku CGH do mikromacierzy (aCGH – arrayCGH) uzyskuje się rozdzielczość sięgająca kilkuset, a nawet kilkunastu par zasad.

Metoda aCGH pozwala na jednoczesną identyfikację aneuploidii, duplikacji, delecji oraz amplifikacji każdego reprezentowanego na mikromacierzy locus genowego.



Rys. 3. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (array CGH). Podstawowe etapy array CGH. (Źródło: K. Goodin i inn. 2009, 13, 4 *Pediatrics* po Dyplomie).

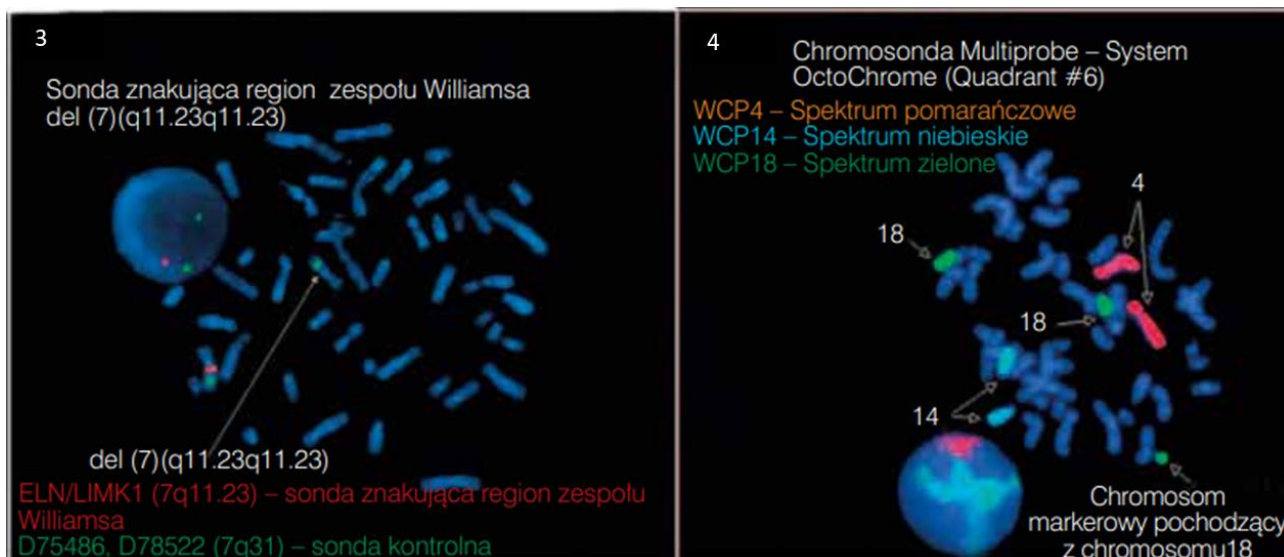
Analiza przypadków:



1. FISH w interfazie z wykorzystaniem sond znakujących chromosomy 13 i 21. 2. FISH w metafazie z wykorzystaniem sond subtelerowych swoistych dla chromosomu 1.

Badanie 1. zaobserwowano

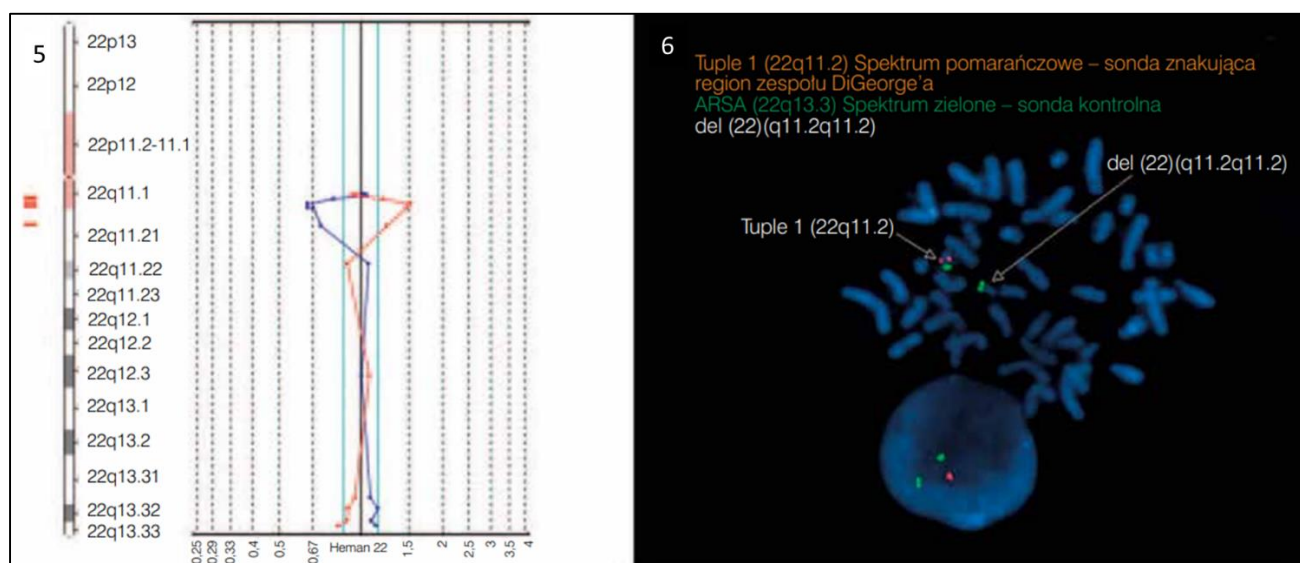
Badanie 2. zaobserwowano



3. FISH w metafazie z wykorzystaniem sondy swoistej dla zespołu Williamsa. 4. Sondy znakujące chromosomy 4, 14 i 18.

Badanie 3. zaobserwowano

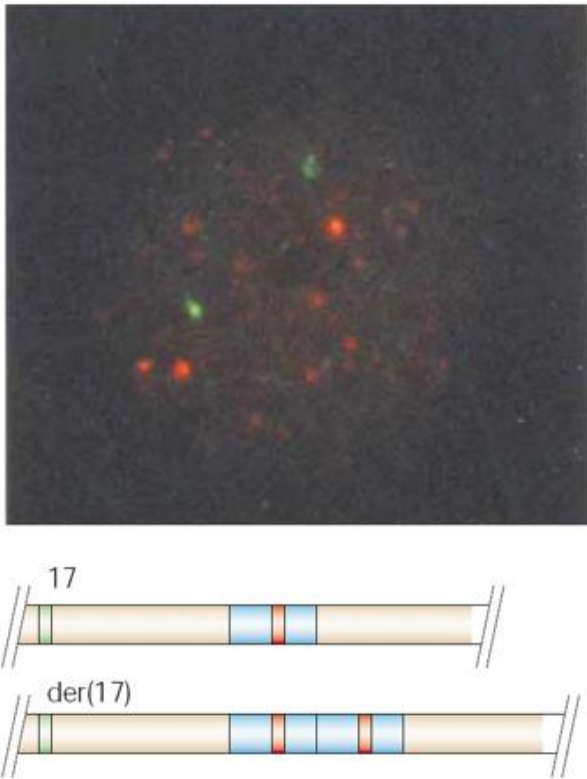
Badanie 4. zaobserwowano



5. Wynik array CGH uzyskany dla chromosomu 22 z delecją regionu DiGeorge'a. Niebieska linia prezentuje wynik hybrydyzacji DNA pacjenta i DNA kontrolnego uzyskany z jednej mikromacierzy, a linia czerwona wynik z drugiej mikromacierzy uzyskany po zastosowaniu znakowania odwrotnego. Klony, które uległy delecji w pierwszej hybrydyzacji, prezentują stosunek fluorescencji ~0,6, podczas gdy w drugiej (znakowanie odwrotne) stosunek ten wynosi ~1,5. 6. FISH w metafazie z wykorzystaniem sondy znakującej region zespołu DiGeorge'a, analiza przypadku przedstawionego na panelu 5.

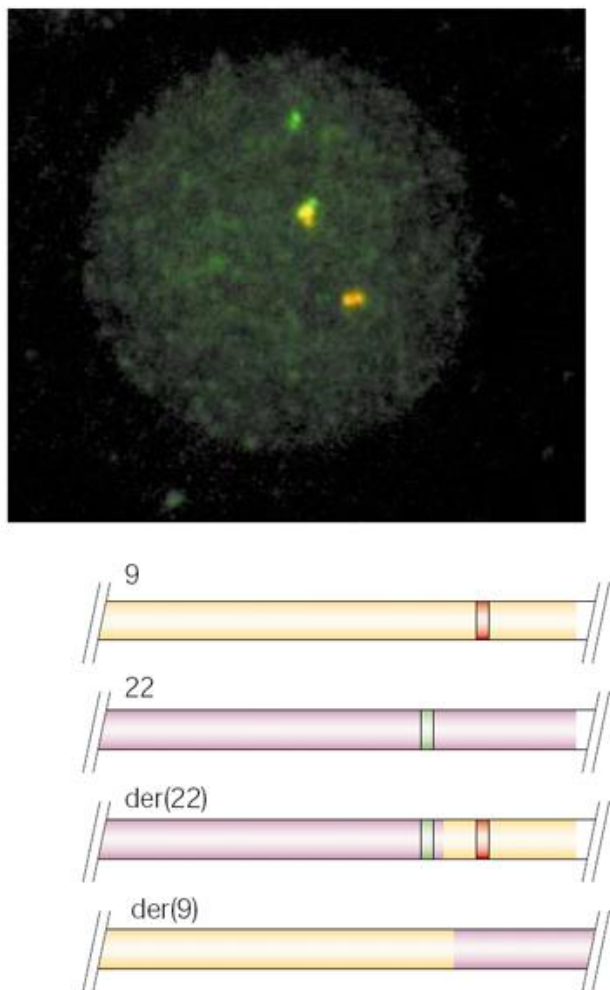
Badanie 6. zaobserwowano

Zastosowanie metody FISH do wykrywania nieprawidłowości chromosomalnych w jądrach interfazowych. Uzupełnij brakujące miejsca w zdaniach.



Rys. 4. Mikrograf jądra komórkowego w interfazie osoby z chorobą Charcot-Marie-Tooth typu 1A z użyciem sondy rozpoznającej miejsce duplikacji na chromosomie 17. Diagramy chromosomów pokazują normalny chromosom 17 i chromosom der(17) (pochodny chromosom, ang. derivative chromosome) z powieloną częścią wskazaną przez czerwoną linię otoczoną niebieskim regionem na chromosomie. Gray J. W., et al.. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51, 141–149 (1986).

W jądrze można zaobserwować trzy czerwone sygnały zamiast dwóch. To wskazuje, że na chromosomie występuje odpowiedzialna za chorobę.



Rys. 5. Analizę FISH zastosowano do wykrywania translokacji chromosomów u pacjenta cierpiącego na przewlekłą białaczkę szpikową (prawy panel). Normalna kopia chromosomu 9 hybrydyzuje z czerwoną sondą, a normalna kopia chromosomu 22 hybrydyzuje z zieloną sondą. Diagramy chromosomów poniżej mikrografu przedstawiają normalne chromosomy 9 i 22, a także chromosomy translokowane, co daje chromosomy der(22) i der(9). Gray J. W., et al.. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51, 141–149 (1986).

..... między chromosomem 9 i 22 wytwarza pochodną wersję chromosomu 9 i pochodną wersję chromosomu 22, która jest nazywana chromosomem Philadelphia. Chromosom Philadelphia hybrydyzuje zarówno z jak i sondą, a sygnały te są obserwowane jako złożona fuzja z centralnym żółtym regionem, który ma czerwone i zielone podregiony.