

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za kemijo in kemijsko tehnologijo*



**Marko Dolinar in Marina Klemenčič**

# **TEHNOLOGIJA DNA**

**NAVODILA ZA VAJE**

**Ljubljana, 2016**

**TEHNOLOGIJA DNA - navodila za vaje**

*Avtorja* prof. dr. Marko Dolinar in dr. Marina Klemenčič

*Recenzenta* asist. dr. Helena Čelešnik in prof. dr. Uroš Petrovič

*Izdala in založila* Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
Ljubljana, 2016

*Za založbo* prof. dr. Matjaž Krajnc

*Jezikovni pregled* Mojca Bajc, prof.

*Oblikovanje in risbe* prof. dr. Marko Dolinar in dr. Marina Klemenčič

*Urednica* doc. dr. Barbara Modec

1. spletna izdaja, 2016

*Dostopna na* <http://www.fkkt.uni-lj.si/sl/zalozba-ul-fkkt/spletna-knjigarna/>

© (2016) Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

577.21(075.8)(076)(0.034.2)

DOLINAR, Marko, 1961-

Tehnologija DNA [Elektronski vir] : navodila za vaje / Marko Dolinar in Marina Klemenčič. - 1. spletna izd. - El. knjiga. - Ljubljana : Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2016

Način dostopa (URL): <http://www.fkkt.uni-lj.si/sl/zalozba-ul-fkkt/spletna-knjigarna/>

ISBN 978-961-6756-66-2 (pdf)

1. Klemenčič, Marina

283844864

## UVOD

V študijskem letu 2015/16 smo na podlagi odzivov študentov vaje pri predmetu Tehnologija DNA razširili. Prej je bila vaja samo ena in se je nanašala na forenzično analizo DNA, sedaj pa smo dodali še vajo s področja mutageneze z namenom, da še praktično utrdite snov s predavanj in seminarjev.

Iz praktičnih razlogov vaj ne bomo izvajali zaporedno, temveč kombinirano, saj bomo na tak način največ naredili v treh terminih.

Vaša naloga je, da si pred vajo preberete, kaj je tema poskusov, ter da razumete teoretično ozadje dela in postopek, ki je pred vami. Med vajo si spremembe v postopku, preračune in dodatne razlage, če so potrebne, zapišite.

Upoštevajte laboratorijski red, upoštevajte navodila za izvedbo vaje, in če česa v zvezi z vajo ne razumete ali ne veste, vprašajte. Od vas vsi pričakujemo, da boste upoštevali, kar ste se o praktičnem delu v laboratoriju naučili v preteklih letih. Pozorni bodite tudi pri označevanju vzorcev, da jih ne zamenjate s kom drugim.

Poročilo vseh vaj bo skupno in ga boste oddali po koncu vaj. Na koncu vsake od vaj so napisana kratka vprašanja, ki naj so vam vodilo pri pisanju poročil. Bistveno je, da ustrezno označite vse rezultate in jih smiselno komentirate. Oddano poročilo bo pogoj za pristop k izpitu.

Za recenzijo teh navodil se zahvaljujema asist. dr. Heleni Čelešnik in prof. dr. Urošu Petroviču.

Marina Klemenčič in Marko Dolinar

september 2016



## KAZALO

1 Mutiranje zelenega fluorescenčnega proteina (GFP)	3
2 Določanje genomskih polimorfizmov	9
a) Izolacija genomske DNA iz majhnega števila človeških celic	10
b) Pomnoževanje specifične regije na 3. kromosomu s PCR: polimorfizem kratkih tandemskih ponovitev (STR)	11
c) Pomnoževanje variabilne regije na 1. kromosomu s PCR: polimorfizem števila tandemskih ponovitev (VNTR)	14
3 Dodatek	17



## 1 Mutiranje zelenega fluorescenčnega proteina (GFP)

Značilnost proteinov določa njihova primarna zgradba, ki narekuje zvitje proteinov in posledično njihovo funkcijo. Pri študijah proteinov nas pogosto zanima, kakšna je specifična vloga posamezne aminokislina v proteinu, zaradi česar se odločamo za pripravo mutiranih oblik oz. mutantov posameznih proteinov.

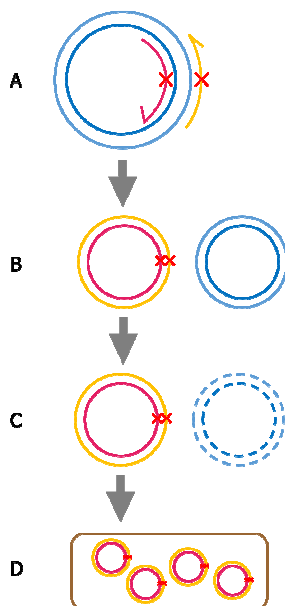
Najpogosteje mutanta pripravimo tako, da tarčno aminokislino spremenimo v majhno aminokislino, ki naj bi imela čim manjši vpliv na zvitje in stabilnost proteina. Ponavadi je to aminokislina serin ali alanin. Ko pa nas zanima vloga pozitivno ali negativno nabite aminokislina, se lahko odločimo tudi za pripravo nasprotno nabitih aminokislin (D, E → R, K).

Pri današnji vaji boste raziskovali vpliv določenih aminokislin na fluorescenco zelenega fluorescenčnega proteina (GFP) iz meduze *Aequorea victoria*, katerega nukleotidno in prevedeno aminokislinsko zaporedje sta prikazani na sliki 1. Čeprav je ponavadi za spremembo fluorescence potrebna mutacija več aminokislinskih ostankov, so raziskovalci odkrili, da lahko že s spremembo tirozina na mestu 66 v histidin (Y66H) povzročite spremembo v maksimumu emisije fluorescence, kjer se vrh z zelene (510 nm) prestavi na modro (450 nm). Glede na to, da proteinov iz celic ne boste izolirali, temveč boste opazovali samo fluorescenco celic, boste nekateri izmed vas dobili za izvedbo vaje plazmid, ki vsebuje še mutacijo na mestu 145 (Y145F), pri kateri je sprememba barve še bolj očitna. Nekateri med vami pa boste dobili vektor z zapisom za spremenjeno obliko GFP, ki mu zaradi delecije treh nukleotidov manjka treonin na mestu 63 (ΔT63), kar povzroči izgubo fluorescence. Če na mesto delecije ponovno uvedemo prvotne tri nukleotide, protein znova fluorescira, kar dokazuje pomen ostanka Thr 63 za funkcionalnost GFP.

```
atgcgtaaaggagaagaacttttccactggagttgtcccaattccttgttgaattagatggt
M R K G E E L F T G V V P I L V E L D G
gatgttaatgggcacaaattttctgtcagtgagaggggtgaaggtgatgcaacatacggg
D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G
aaacttacccttaaatattttgtcactactggaaaactacctgttccatggccaacactt
K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L
gtcactactttcggttatggtggttcaatgctttgagagataccagatcatatgaaacag
V T T F G Y G V Q C F A R Y P D H M K Q
catgactttttcaagagtgccatgcccgaagggttatgtacaggaaagaactatatttttc
H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F
aaagatgacgggaactacaagacacgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttgtt
K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V
aatagaatcgagttaaaaggattgatttttaagaagatggaaacattccttgacacaaa
N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K
ttggaatacaactataactcacacaatgtatacatcatggcagacaaaacaaaagaatgga
L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G
atcaaagtttaacttcaaaatttagacacaacattgaagatggaagcgttcaactagcagac
I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D
cattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattac
H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y
ctgtccacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtcctt
L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L
cttgagtttgaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatacaaaataa
L E F V T A A G I T H G M D E L Y K -
```

**Slika 1:** Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje proteina GFP. Z oranžno bravo je označen treonin na mestu 63, z zeleno bravo tirozin na mestu 66 in z modro tirozin na mestu 145. Zadnji trije nukleotidi označujejo kodon stop.

To vajo boste izvajali v parih. Vaja bo potekala tako, da boste prvi dan pripravili reakcijo PCR, s katero boste vektor pomnožili navzven, torej boste izvedli inverzni PCR, ki je shematsko prikazan na sliki 2. Po končani reakciji boste del reakcijske mešanice uporabili za analizo z agarozno gelsko elektroforezo, del pa boste obdelali z restriktazo *DpnI*. (Ta restriktaza prepozna zaporedje CATG in ga reže na sredini, vendar samo v primeru, da je A metiliran. Metilacijo katalizirajo bakterijske metiltransferaze *in vivo*, produkt PCR pa ni metiliran, zato ga *DpnI* ne more rezati.) Naslednji teden bo sledila transformacija bakterij *E. coli* DH5a. Zadnji teden bomo pregledali plošče in opazovali kolonije pod UV-svetlobo.



**Slika 2:** Shema reakcije inverznega PCR.

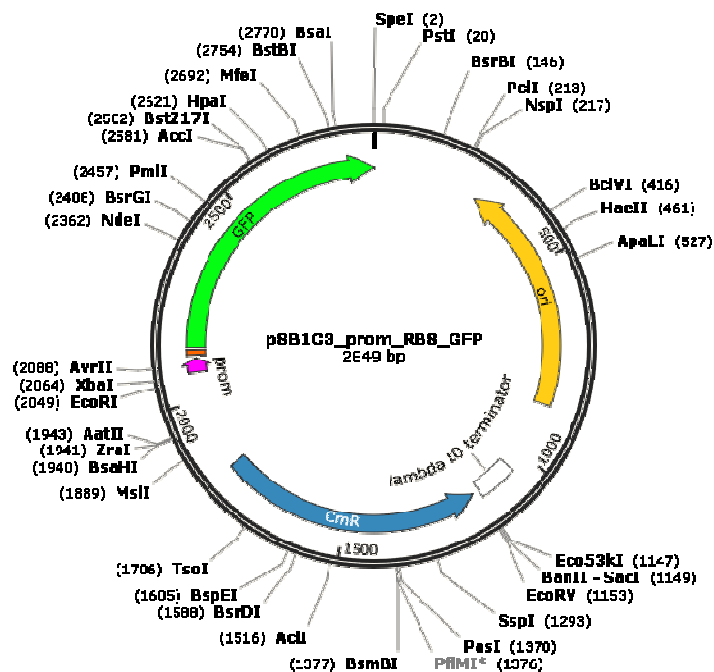
**A:** Začetni koraki pri metodi točkovnega mutiranja vključujejo denaturacijo matrične plazmidne DNA, prileganje oligonukleotidov ter pomnoževanje matrične DNA navzven. Mutacije na začetnih oligonukleotidih označujejo rdeči križci. **B:** Po končani reakciji PCR je v reakcijski mešanici poleg nastalega produkta še vedno tudi izvorna matrična DNA. **C:** Matrično DNA razgradimo z restriktazo *DpnI*, ki specifično cepi samo metilirano DNA. **D:** S tako obdelano reakcijsko mešanico transformiramo kompetentne celice DH5a.

Za reakcijo PCR boste uporabili spodaj navedene začetne oligonukleotide. Glede na to, da boste izvajali inverzni PCR, boste uporabili po dva oligonukleotida, ki vsebujeta ustrezne mutacije na sredini in sta si komplementarna. Mutirani nukleotidi so podčrtani.

Ime	Začetni oligonukleotid	Mutacija	Restriksijsko mesto
ΔT63	5'-CCA ACA CTT GTC ACT --- TTC TCT TAT GGT GTT CAA TGC-3'	ΔT63	/
	5'-GCA TTG AAC ACC ATA AGA GAA --- AGT GAC AAG TGT TGG-3'		
Zelen	5'-CCA ACA CTT GTC ACT ACT TTC TCT TAT GGT GTT CAA TGC-3'	/	/
	5'-GCA TTG AAC ACC ATA AGA GAA AGT AGT GAC AAG TGT TGG-3'		
Y66H	5'-CCA ACA CTT GTC ACT ACT TTC <u>AGCCAT</u> GGT GTT CAA TGC-3'	Y66H	<b><i>NcoI</i></b>
	5'-GCA TTG AAC <u>ACC ATGGCT</u> GAA AGT AGT GAC AAG TGT TGG-3'		
Y145F	5'-GGA CAC <u>AAG CTT</u> GAG TAC AAC <u>TTT</u> AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC-3'	F145Y	<b><i>HindIII</i></b>
	5'-GAT GTA TAC ATT GTG TGA GTT <u>AAA</u> GTT GTA CTC <u>AAG CTT</u> GTG TCC-3'		



Karta vektorja, ki ga boste na vajah uporabili, je prikazana na sliki 3. Gre sicer v osnovi za klonirni vektor pSB1C3, ki pa ima dodane vse komponente za konstitutivno izražanje proteina (promotor, vezavno mesto za ribosom) pred zapisom za reporterski protein GFP.



Slika 3: Karta vektorja pSB1C3\_prom\_RBS\_GFP.

### **Verižna reakcija s polimerazo (PCR)**

Pri vsaki reakciji PCR potrebujete: matrično DNA, prebitok dNTP, ustrezen pufer in dodatke ( $Mg^{2+}$ ), oligonukleotida, ki se vežeta na začetek oz. konec regije, ki jo pomnožujemo, ter termostabilno polimerazo. Količina komponent, ki jih potrebujete pri tej reakciji, je navedena v preglednici na naslednji strani.

Ker med reakcijo PCR potekajo posamezne stopnje pri visoki temperaturi, bi prihajalo do izhlapevanja tekočine, če pokrov aparature za PCR ne bi bil segrevan. Pri starejših aparataturah je bilo treba za preprečevanje izhlapevanja vzorec prekrito s plastjo mineralnega olja.

Standardni volumen reakcije je 50  $\mu$ l, zato lahko uporabimo mikrocentrifugirke z volumnom 200  $\mu$ l (za starejše aparature 0,5 ml), nekateri pa izvajajo reakcijo le še v 20  $\mu$ l in lahko uporabljajo mikrotitrne ploščice, čemur mora biti prirejen tudi Peltierjev člen PCR-aparature. Pri tej vaji bo volumen reakcijske mešanice 30  $\mu$ l, torej boste mešanice pripravili v 200-mikrolitrskih mikrocentrifugirkah.

Med pomnoževanjem se izmenjujejo trije procesi, ki tečejo pri različnih temperaturah: denaturacija dsDNA (92–94 °C), pripenjanje oligonukleotidov (37–55 °C, odvisno od sestave, dolžine in želene specifičnosti vezave) in polimerizacija (72 °C). Uporabljamo termostabilne DNA-polimeraze, najpogosteje polimerazo *Taq*, ki sicer spada v skupino manj natančnih polimeraz (nima aktivnosti kontrolnega branja), je pa manj občutljiva za nečistoče v reakciji in za nepopolno prileganje oligonukleotidov na matrično DNA. Pri tej vaji bomo uporabili DNA-polimerazo *Phusion*, ki ima popravljalno funkcijo (angl. high fidelity).

polymerase), da ne bo prišlo do uvajanja dodatnih naključnih mutacij v dolg PCR-produkt. Iz istega razloga je potrebno tudi manjše število ciklov pomnoževanja kot običajno.

Za prvo vajo pripravite reakcijsko mešanico za PCR tako, da v 200-mikrolitrski mikrocentrifugirki zmešate:

komponenta	končna koncentracija	volumen
PCR-pufer (5×)	1×	
mešanica dNTP (vsak 10 mM)	200 μM	
5'-začetni oligonukleotid (5 μM)	0,5 μM	
3'-začetni oligonukleotid (5 μM)	0,5 μM	
matrična DNA	50 ng	
DNA-polimeraza <i>Phusion</i>	0,2 μl	
dH <sub>2</sub> O		
		<b>Σ = 30 μl</b>

Program pomnoževanja naj bo:

2 min 94 °C  
 30 s 94 °C  
 30 s 55 °C  
 2 min 72 °C  
 in na koncu 10 min 72 °C

18x

---

Po končani reakciji PCR odzemetite 10 μl reakcijske mešanice in jo prenesite v svežo mikrocentrifugirko. Ustrezno jo označite. K preostalim 20 μl dodajte:

0,4 μl pufru Tango  
 0,25 μl restrikcijskega encima *DpnI*, katerega funkcija je razgradnja matrične (nemutirane) DNA.

Inkubirajte pri 37 °C vsaj eno uro.

Po inkubaciji zopet odzemetite 10 μl in jih prenesite v svežo mikrocentrifugirko. Ustrezno označite.

Na ledu odtalite kompetentne celice DH5α in jim dodajte preostalih 10 μl restrikcijske mešanice. Inkubirajte na ledu 30 min. Izvedite temperaturni šok (42 °C, 45 s) in celice prenesite nazaj na led. Dodajte 800 μl gojišča LB brez antibiotika in dajte stresati v stresalnik za 30 min pri 37 °C.

Celice posedite s centrifugiranjem pri 3000 g 3 min. Supernatant odstranite, celice resuspendirajte v približno 200 μl gojišča LB in razmažite na plošče z ustreznim antibiotikom. Plošče inkubirajte preko noči pri 37 °C.

### **Preverjanje transformant**

Uspešnost reakcije priprave mutantov boste opazovali tako fenotipsko kot tudi genotipsko.

Pod svetlobo UV si oglejte plošče, na katerih so preko noči zrastle celice, transformirane z različnimi konstrukti. Primerjajte itenziteto fluorescence kot tudi barvo fluorescirajočih kolonij.

Dan pred vajo bo asistent z vsake plošče nekaj kolonij inokuliral v 5 ml svežega tekočega gojišča z namenom, da na vaji iz prekonočne kulture bakterij izolirate DNA in preverite transformante. V ta namen boste uporabili komercialno dostopen komplet reagentov. Sledite protokolu za izolacijo plazmidne DNA.

Postopek izolacije plazmidne DNA iz bakterijskih celic:

- 1,5 ml kulture prenesite v svežo mikrocentrifugirko in posedite celice s centrifugiranjem 3 min pri 3000 g.
- Odlijte supernatant. Bakterije s pipetiranjem resuspendirajte v 250 µl pufru za resuspendiranje (angl. Resuspension buffer).
- Dodajte 250 µl pufru za lizo celic (angl. Lysis buffer). Premešajte s trikratnim obračanjem centrifugirke.
- Dodajte 350 µl pufru za nevtralizacijo (angl. Neutralization buffer). Premešajte s trikratnim obračanjem centrifugirke.
- Oborino posedite s centrifugiranjem 5 min pri 14 000 g.
- Supernatant previdno odlijte v kolono za izolacijo DNA in centrifugirajte 1 min pri 14 000 g.
- Tekočino, ki je v spodnji centrifugirki, odlijte in na kolono odpipetirajte 500 µl pufru za spiranje (angl. Wash buffer). Centrifugirajte 1 min pri 14 000 g.
- Tekočino, ki je v spodnji centrifugirki, zopet odlijte in na kolono odpipetirajte še 500 µl pufru za spiranje. Centrifugirajte 1 min pri 14 000 g.
- Tekočino, ki je v spodnji centrifugirki, zopet odlijte in kolono prazno centrifugirajte še enkrat 1 min pri 14.000 g, da odstranite ves etanol, ki bi lahko motil nadaljnje korake pri uporabi izolirane DNA.
- DNA eluirajte s kolone v dveh zaporednih korakih. Spodnjo centrifugirko zavržite in kolono prenesite v svežo avtoklavirano 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko. Na sredino kolone previdno odpipetirajte najprej 10 µl pufru za elucijo (angl. Elution buffer). Centrifugirajte 1 min pri 14 000 g. Korak elucije še enkrat ponovite z dodatkom 10 µl pufru za elucijo in centrifugiranjem 1 min pri 14 000 g. Skupaj ste tako DNA eluirali v 20 µl pufru. Kolono zavržite, centrifugirko z eluirano DNA pa ustrezno označite.
- Določite koncentracijo izolirane DNA z merjenjem absorbanca pri 260 nm na spektrofotometru.

---

Tisti, ki ste pripravljali konstrukte z mutiranimi oblikami zapisa za GFP, pri katerih je prišlo do uvedbe novih restrikcijskih mest, njihovo uvedbo preverite:

V svežo mikrocentrifugirko prenesite 1 µg izoliranega plazmida in dodajte toliko dH<sub>2</sub>O, da bo končni volumen 8,75 µl. Mikrocentrifugirko označite.

V primeru uvedbe Y66H dodajte 1 µl pufru Tango in 0,25 µl restriktaze *Nco*I.

V primeru uvedbe F145Y dodajte 1 µl pufru R in 0,25 µl restriktaze *Hind*III.

Pripravite tudi kontroli za obe restriktazi, pri čemer namesto izoliranega plazmida uporabite plazmid, ki je služil kot matrica pri reakciji inverznega PCR.

Inkubirajte 30 min pri 37 °C. V tem času pripravite 0,8-odstotni agarozni gel – glejte navodila v Dodatku.

Na gel nanesite:

–60 ng izhodiščnega plazmida, ki ste ga uporabili za reakcijo PCR,

–10 µl reakcijske mešanice PCR pred dodatkom restriktaze *Dpn*I,

–10 µl reakcijske mešanice PCR, obdelane z restriktazo *Dpn*I,

–10 µl izoliranega plazmida iz prekonočne kulture,

–10 µl izoliranega plazmida po restrikciji z ustrezno restriktazo (*Nco*I ali *Hind*III) s kontrolama.

Priklopite tok in pustite elektroforezo teči tako dolgo, da barvilo bromfenolmodro prepotuje vsaj 4 cm.

### **Analiza rezultatov**

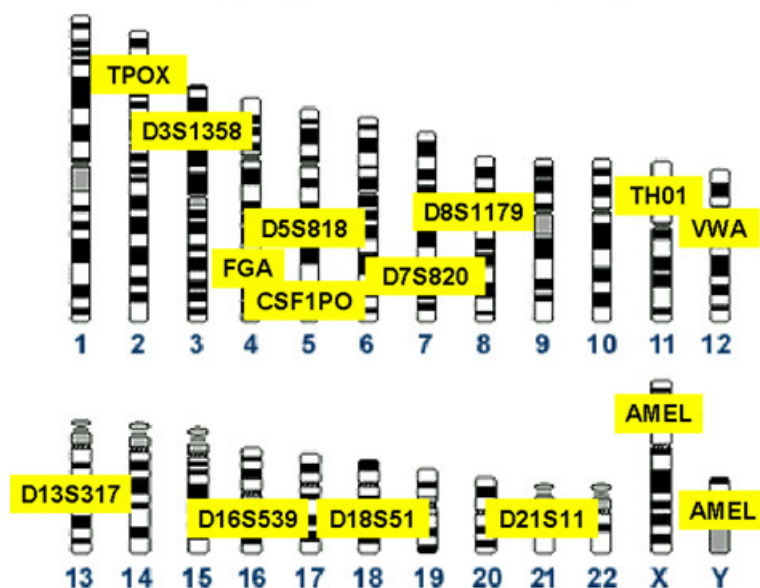
- Kako velike produkte pričakujete po reakciji PCR? Ali na podlagi vaših rezultatov lahko trdite, da je bilo pomnoževanje uspešno?
- Koliko lis je vidnih po izolaciji plazmida in kakšna je njihova velikost? Je to pričakovano?
- Koliko lis je vidnih po restrikciji z restriktazama *NcoI* in *HindIII*? Kaj iz tega lahko sklepate?
- Ali se genotipske lastnosti ujemajo z opaženimi fenotipskimi?

## 2 Določanje genomskih polimorfizmov

Čeprav je zaporedje nukleotidov v genomu dveh oseb 99,9 % identično, so v preostalem 0,1 % zaporedja lahko razen točkovnih mutacij tudi širša območja, ki so variabilna. Te razlike s pridom izkoriščajo v forenziki, kjer na osnovi primerjave vzorcev DNA, ki jih najdejo na kraju zločina in DNA osumljencev, izločijo ali potrdijo identiteto domnevnih storilcev. Tako lahko tudi potrdimo ali ovržemo sorodstvene odnose med preiskovanci, določamo očetovstvo in podobno.

Z analizami DNA v forenziki so začeli konec osemdesetih let prejšnjega stoletja. Sprva so analizirali polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov, v zadnjem času pa standardno analizirajo tandemske ponovitve nekaj nukleotidov, ki se pojavljajo na različnih kromosomih. Za vzorce razgrajene DNA, kakršni so na primer arheološki vzorci ali vzorci trupel iz obdobja svetovnih vojn, analizirajo zaporedja na mitohondrijski DNA, ki je krožna in zato bolj stabilna, v celicah pa je prisotna v večjem številu kopij.

Forenzični laboratoriji v svetu rutinsko analizirajo tisoče vzorcev DNA dnevno. Dobljene podatke analiz STR (angl. Short Tandem Repeats) na primer agencija FBI za vse obsojence v Združenih državah Amerike shranjuje v zbirki CODIS (slika 4), ki zajema značilnosti najmanj 13 regij s ponovitvami (regija AMEL [amelogenin] je za določevanje spola), v Veliki Britaniji pa se obsežna zbirka podatkov imenuje NDNAD. V Evropski uniji podpisniki Prümske pogodbe izmenjujejo podatke o DNA-profilih, ki vključujejo 15 lokusov STR. Podpisnica je tudi Slovenija, ki hrani okrog 30 000 profilov v lastni bazi podatkov (stanje leta 2015).



**Slika 4:** 13 lokusov, vključenih v zbirki DNA-profilov CODIS.  
*Vir: National Institute of Standards and Technology, STR Internet DataBase.*

Na vajah je vaša naloga, da pridobite vzorec (lastne) genske DNA iz celic ustne sluznice, potem pa to DNA uporabite kot matrico za pomnoževanje enega od polimorfnihih segmentov s PCR. Ugotavljali boste polimorfizem dveh različno dolgih regij na dveh različnih kromosomih. Vajo opravljata vsak zase.

### **a) Izolacija genomske DNA iz majhnega števila človeških celic**

Za analize, ki vključujejo PCR, potrebujete manj kot 0,1 ng DNA, za kar nam zadošča nekaj celic, v skrajnem primeru tudi ena sama (diploidna celica pri človeku vsebuje ~ 7 pg DNA). To je še posebej pomembno pri forenzičnih preiskavah. Če potrebujete človeško DNA, jo lahko dobite iz celic brez agresivnih posegov (odvzem krvi, puljenje las) z izpiranjem celic ustne sluznice. Nevarnost pri tem pa je, da bo v izpirku tudi veliko bakterijskih celic, zato morate pri analizi rezultatov, dobljenih s tako DNA, biti previdni. Če pomnožujete s specifičnimi oligonukleotidi, ki se vežejo na zaporedja, znana samo v genomu višjih organizmov, pa nevarnosti lažnih rezultatov skoraj ni.

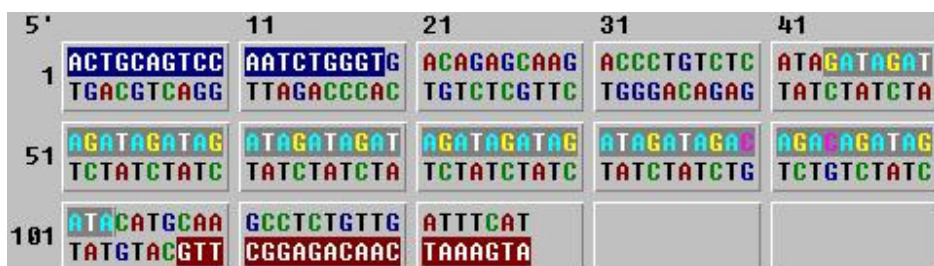
Pri izolaciji boste uporabili reagent Chelex, ki je tržno ime za polistiren-divinilbenzen-iminodiacetat. Gre za kelacijsko sredstvo, ki ga ne smete prenašati v reakcije, ki zahtevajo prisotnost dvovalentnih kovinskih ionov, saj bi jih nosilec vezal in s tem preprečil potek reakcije. Reagent Chelex uporabljajo tudi kot ionski izmenjevalec. Tudi pri izolaciji DNA opravlja to funkcijo, saj veže pozitivno nabite celične sestavine, hkrati pa se nanj vežejo dvovalentni kovinski ioni, ki so kofaktorji nukleaz. S tem se bistveno zmanjša razgradnja tako izolirane DNA.

#### **Postopek izolacije lastne genomske DNA:**

- V ustih temeljito (~ 30 s) prežvrkljajte 10 ml 0,9-odstotnega NaCl. Izpljunite v čašo.
  - Premešajte vsebino čaše in takoj odpipetirajte 1 ml tekočine v mikrocentrifugirko.
  - Centrifugirajte pri 10 000 r/min 1 min.
  - Supernatant previdno odpipetirajte in zavržite, nato k celicam na dnu dodajte 30 µl 0,9-odstotnega NaCl.
  - Premešajte na vibracijskem mešalu in dodajte še 100 µl 10-odstotne suspenzije nosilca Chelex. Nosilec premešajte tik pred odvzemom; uporabite spodaj odrezan nastavek, sicer se kroglic Chelexa ne da odpipetirati.
  - Dobro premešajte.
  - Inkubirajte v vreli vodni kopeli 10 min, nato ohladite na ledu.
  - Centrifugirajte pri polnih obratih 5 min.
  - Odvzemite 25 µl bistrega supernatanta in prenesite v svežo mikrocentrifugirko. Označite jo.
  - Do uporabe shranite v hladilniku ali zamrznite.
-

## b) Pomnoževanje specifične regije na 3. kromosomu s PCR: polimorfizem kratkih tandenskih ponovitev (STR)

Pomnoževali boste le eno od 13 regij, ki jih analizira FBI, to je območje D3S1358, znotraj katerega variira število ponovitev zaporedja GATA med 12 in 19 (najkrajša dolžina pomnoženega fragmenta je 114 bp, najdaljša pa 142 bp). Gre za območje na kromosomu 3p, katerega nukleotidno zaporedje je prikazano na sliki 5 na primeru s 15 ponovitvami (skupna dolžina 127 bp). Posameznik ima lahko večje ali manjše število ponovitev, lahko je homozigot ali heterozigot. Ker je število ponovitev različno, bodo tudi produkti PCR različno veliki, kar je mogoče ugotoviti s poliakrilamidno gelsko elektroforezo na kontinuirnem gelskem sistemu.



**Slika 5:** Nukleotidno zaporedje lokusa D3S1358 na primeru s 15 kratkimi tandenskiimi ponovitvami.

Z modro barvo je označeno zaporedje 5'-, z rdečo barvo pa 3'-začetnega oligonukleotida.

Vir: National Institute of Standards and Technology, STR Internet DataBase.

### Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za razliko od reakcije PCR pri prvi vaji boste pri tej uporabili drugo termostabilno DNA-polimerazo – polimerazo *Taq*, ki je manj občutljiva na nečistoče in inhibitorne snovi v reakcijski mešanici. Tudi za to reakcijo boste potrebovali: matično DNA (to je genomska DNA, ki ste jo izolirali v prvem delu te vaje), prebitok dNTP, ustrezen pufer in dodatke ( $Mg^{2+}$ ) ter oligonukleotida, ki se vežeta na začetek oz. konec regije, ki jo pomnožujete. Encim boste tokrat dodali po prvem denaturacijskem koraku, ko DNA in oligonukleotide že denaturiramo s kuhanjem (*zakaj?*).

Sestava reakcijske mešanice:

PCR-pufer (10×)	5 µl
mešanica dNTP (vsak 2,5 mM)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
5'-začetni oligonukleotid (5 µM)	2,5 µl
3'-začetni oligonukleotid (5 µM)	2,5 µl
matrična DNA	2 µl
dH <sub>2</sub> O	30 µl

Inkubirajte 3 min pri 100 °C, nato hitro (da se raztopina ne ohladi pod 80 °C) dodajte 1 µl (1,5 U) DNA-polimeraze *Taq* in takoj vrnite v aparaturo ter začnite s cikli pomnoževanja. Delo si lahko olajšate tako, da po začetni denaturaciji dodate še eno stopnjo, torej nekaj minut pri 80 °C, ki je namenjena samo pipetiranju polimeraze. Nato naj sledijo cikli denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja.

Program pomnoževanja naj bo: 35 x (30 s 94 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C) in na koncu 10 min 72 °C. Medtem ko bo potekalo pomnoževanje, pripravite poliakrilamidni gel za kasnejše ločevanje produktov PCR.

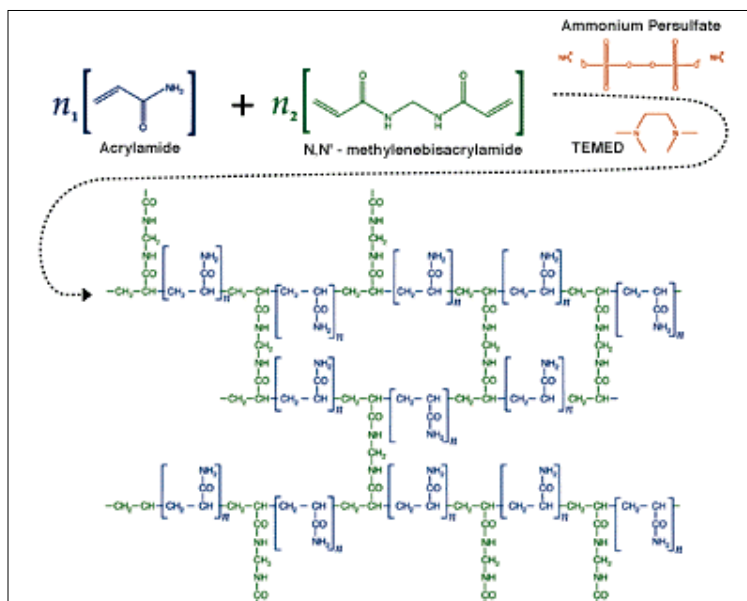
### **Ločevanje produktov PCR s PAGE**

Pripravite 8-odstotni poliakrilamidni gel (slika 6) v pufru TBE. Gel pripravite po navodilih v Dodatku.

*Pozor! Akrilamid je v nepolimerizirani obliki škodljiv za zdravje. Draži oči, kožo in dihala, verjetno pa deluje tudi na živčni sistem in je kancerogen. Obvezno je delo z rokavicami in očali. Tudi po polimeriziranju lahko ostane nekaj akrilamida v prosti, torej strupeni obliki.*

Za ločevanje DNA uporabljamo kontinuirni elektroforezni sistem s pufrom TBE, ki ima dobro pufrsko kapaciteto in ga lahko uporabljamo tudi pri ločevanju, ki teče dalj časa, in kljub segrevanju. TBE je oznaka za tris-borat (89 mM, pH 8,3) z Na<sub>2</sub>EDTA (2 mM).

Da bi dosegli ločevanje v obliki tankih lis, mora biti vzorec za nanos čimbolj skoncentriran.



**Slika 6:** Zgradba poliakrilamidnega matriksa.  
Vir: katalog National Diagnostics.



## **Koncentriranje DNA z obarjanjem**

Po končani reakciji PCR skoncentrirajte produkt z obarjanjem iz etanola v prisotnosti Na-acetata.

- K 30  $\mu$ l produkta PCR (prenesite ga v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko) dodajte 3,3  $\mu$ l (ustreza 0,1 V vodne faze) 3 M Na-acetata (pH 5,2) in 83  $\mu$ l (2,5 V vodne faze) absolutnega etanola.
- Po dodatku etanola vsebino dobro premešajte in inkubirajte v zmrzovalniku ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 10 min, nato pa centrifugirajte 10 min pri polnih obratih mikrocentrifuge pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Odstranite supernatant in dodajte 100  $\mu$ l 70-odstotnega etanola. Stresajte na vibracijskem mešalniku 30 s.
- Centrifugirajte pri 10 000 g 1 min. Koločina oborjene DNA je tako majhna, da oborina običajno ni vidna s prostim očesom.
- Odpipetirajte supernatant do zadnjih sledov in na kratko posušite na zraku.
- Dodajte 7  $\mu$ l pufra TBE (1 $\times$ ) in 3  $\mu$ l nanašalnega pufra, ki vsebuje tudi barvili ksilencianol in bromfenolmodro – ti nam bosta služili za oceno prepotovane poti produktov PCR. Dobro premešajte na vibracijskem mešalniku.

Polimeriziran gel namestite v vertikalno elektroforezno kadičko, nalijte nad obe elektrodi pufer 1 $\times$  TBE in sperite žepke s pipeto, da odstranite ostanke akrilamida. Elektroforeza naj teče najprej brez vzorcev  $\sim 20$  min pri 8 V/cm, da se gel ogreje (a ne nad  $\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nato nanesite vzorec svojega produkta PCR in prižgite elektroforezo, ki naj teče pri 5 V/cm oziroma pri napetosti, manjši od 10 V/cm, kar pa ne sme povzročiti pregrevanja gela (temperatura plošče naj ostane  $< 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sicer pride do denaturacije DNA in do izrazitega 'smejalnega učinka', pri katerem vzorci na sredinskih stezah potujejo hitreje kot enako veliki vzorci na robovih).

Na levi strani na vsakem gelu nanesite standard velikosti (lestvico 100 bp; 8  $\mu$ l raztopine fragmentov DNA) – tako lažje orientirate gel in najdete svoj nanos, hkrati pa lahko določite približno velikost fragmentov na gelu.

Po končanem ločevanju, ko se bromfenolmodro približa spodnjemu robu gela, prenesite gel iz steklenega sendviča v raztopino etidijevega bromida (1  $\mu$ g/ml; *pozor, lahko povzroča mutacije!*) in barvajte 10 min ob občasnem mešanju. Gel splaknite v vodi in si ga oglejte na transiluminatorju. Meja detekcije DNA v poliakrilamidu je višja kot v agarози; zaznamo lahko  $> 15$  ng DNA (teoretično). *Kako bi lahko detektirali manjše količine DNA?*

Rezultate skicirajte in označite svoj vzorec. Ker ste vzorce analizirali na 2 gelih, poskušajte izenačiti hitrosti potovanja s pomočjo poravnave označevalcev velikosti in obeh indikatorskih barvil v gelu.

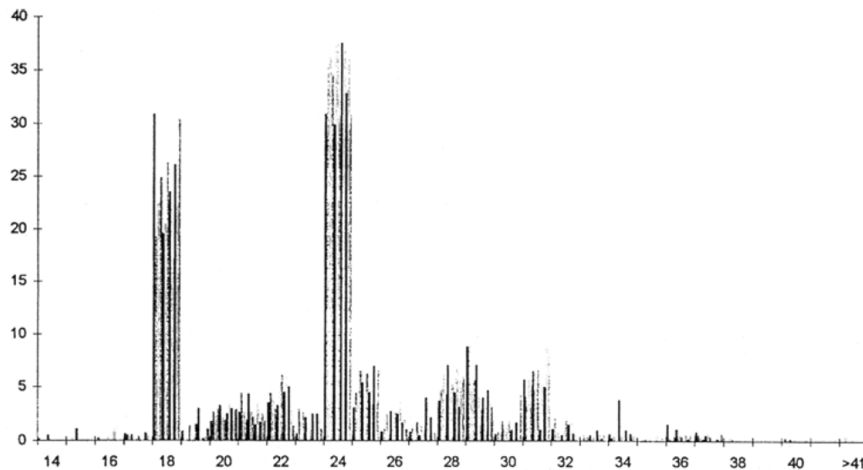
## **Analiza rezultatov**

- Poskušajte ugotoviti, koliko različno velikih fragmentov se je pomnožilo v celi skupini! Nekateri vzorci DNA so ob pomnoževanju dali dve lisi, drugi eno liso – koliko je katerih in kaj pomeni prisotnost več lis?
- Na osnovi rezultatov cele skupine poskušajte ugotoviti, kakšna je pogostost posameznih ponovitev v populaciji!
- Po podatkih iz literature je v slovenski populaciji delež heterozigotov 77 %, alelna razporeditev pa je prikazana v tabeli na naslednji strani in ni bistveno različna glede na druge evropske populacije. Rezultati v tabeli temeljijo na analizi 237 vzorcev (I. Zupanič, J. Balažič, R. Komel, Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int. J. Legal Med.* 111, 248–250, 1998).

Alel	Frekvenca
13	0,002
14	0,129
15	0,238
16	0,238
17	0,226
18	0,152
19	0,011
20	0,004

### c) Pomnoževanje variabilne regije na 1. kromosomu s PCR: polimorfizem števila tandemskih ponovitev (VNTR)

Za VNTR (angl. *variable number of tandem repeats*) je značilno, da so ponavljajoče se regije precej daljše kot pri STR – med 8 in 100 bp (pri STR 4–7 bp). Take regije imenujemo tudi minisatelitske regije. Če je število teh ponovitev večje, je produkte mogoče ločiti med seboj z agarozno gelsko elektroforezo. Za analizo smo izbrali regijo D1S80, v kateri se ponavlja 16 bp dolg segment. Med vsemi analiziranimi vzorci na svetu so našli več kot 35 različnih variant te polimorfne regije, katerih dolžina je bila med 200 in 700 bp (14–41 ponovitev). Kar ~ 75 % belcev je heterozigotov za to regijo, zato je zelo verjetno, da bo analiza pokazala dva različna produkta pomnoževanja – torej dva različna alela. Število teoretično možnih razporeditev dveh alelov je okrog 730, čeprav so frekvence posameznih alelov različne (predvsem so redki aleli z 31 ali več ponovitvami). Analize evropskih populacij so pokazale, da je najpogostejše število ponovitev 24 (34 %), temu sledi 18 (24 %), preostalih pa je precej manj (slika 7).



**Slika 7:** Porazdelitev frekvenc ponovitev v alelu D1S80 pri 12 evropskih populacijah. Na abscisi je število ponovitev, na ordinati pa frekvenca (v odstotkih).  
Vir: Magueri in sod., *Int. J. Anthropol.* 14, 191–202, 1999.

Uporabili boste naslednja začetna oligonukleotida:

VNTR1: 5'-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCCGCG-3'

VNTR2: 5'-GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCTTGC-3'

Reakcijsko mešanico sestavite kot v prvem delu vaje (STR), prav tako uporabite isti program: 35 x (30 s 94 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C) in na koncu 10 min 72 °C.

Produkte ločite na 1,75-odstotnem agaroznem gelu z vključenim etidijevim bromidom.

### **Analiza rezultatov**

- Ugotovite, koliko različno velikih fragmentov se je pomnožilo v celi skupini! Kolikšen je delež heterozigotov?
- Ali se to ujema s podatki iz literature?



### 3 DODATEK

#### Agarozna gelska elektroforeza

Elektroforezo običajno izvajamo v pufru TAE (tris-acetat-EDTA). Potrebni volumen gela je 60 ml za malo kadičko, 80 ml za srednjo.

za 0,8-odstotno raztopino: 0,48 g agaroze v 60 ml pufru TAE (0,64 g v 80 ml)

za 1-odstotno raztopino: 0,60 g agaroze v 60 ml pufru TAE (0,80 g v 80 ml)

za 1,2-odstotno raztopino: 0,72 g agaroze v 60 ml TAE (0,96 g v 80 ml)

za 1,5-odstotno raztopino: 0,90 g agaroze v 60 ml TAE (1,20 g v 80 ml)

Agarozo zatehtamo v visoko čašo (vsaj 500 ml), dolijemo pufer (1×) TAE in označimo višino raztopine s flomastrom za primer, da nam pri kuhanju izhlapi preveč tekočine.

Suspenzijo agaroze prevremo v mikrovalovni pečici ob večkratnim premešanju – toliko, da se razpustijo vsi delčki. Pufer ne sme povreti! Če je treba, dopolnimo z vodo. V model z vstavljenim glavničkom nalijemo gel šele, ko se nekoliko ohladi. Elektroforeza na majem gelu naj teče pri 90 V, na velikem pa pri 110 V.

**TAE** – končne koncentracije v 1× pufru so: 40 mM tris-acetat, pH 7,6, 1 mM EDTA

Običajno pripravimo 20× založno raztopino (včasih tudi 50×), ki jo pred uporabo redčimo z vodo. Za 500 ml 20× pufru rabimo: 48,4 g trisa (baze), 11,4 ml ledocetne kisline, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8).

Območja optimalnega ločevanja dsDNA in potovanje indikatorskih barvil na agaroznih gelih (standardna agarozna v pufru TAE):

koncentr. agaroze	območje ločevanja	ksilencianol	bromofenol modro
0,75 %	15 000 bp – 1000 bp	~ 10 000 bp	~ 1000 bp
1,00 %	10 000 bp – 500 bp	~ 6000 bp	~ 500 bp
1,25 %	5000 bp – 300 bp	~ 3600 bp	~ 370 bp
1,50 %	4000 bp – 200 bp	~ 2800 bp	~ 300 bp
2,00 %	2500 bp – 100 bp	~ 300 bp	~ 150 bp

(Podatki: Roche Applied Science, Cambrex)

## Poliakrilamidna gelska elektroforeza DNA

Za **ločevanje DNA** uporabimo kontinuirni gel v pufrskem sistemu TBE (tris-borat-EDTA).

Potovanje indikatorskih barvil (ekvivalent dsDNA s podano dolžino).

Izberemo tako koncentracijo akrilamida, da potuje analizirani fragment DNA med obema barviloma.

koncentr.	ksilencianol	bromofenol modro
3,5 %	460	100
5,0 %	260	65
8,0 %	160	45
12,0 %	70	20
15,0 %	60	15
20,0 %	45	12

(Podatki: Promega)

Priprava enofaznega 8-odstotnega gela (količine za 2 gela = 14 ml):

raztopina	ločevalni gel
akrilamid (37,5 : 1)	2,9 ml
dest. voda	8,9 ml
TBE (10×)	1,4 ml
1,5-odstotni APS	0,80 ml
TEMED	0,008 ml

Premešajte vse sestavine pred in po dodatku TEMED, ki inducira polimerizacijo. Takoj nalijte v vnaprej pripravljen stekleni sendvič in pazite, da v tekočino med nalivanjem ne pridejo mehurčki. Vstavite glavniček in pri tem pazite, da vam na dnu žepkov ne ostanejo mehurčki. Počakajte, da gel polimerizira. Vstavite v elektroforezno napravo, nalijte pufer (1× TBE), odstranite glavniček in sperite žepke. Elektroforeza teče pri 6–8 V/cm. Občasno preverite temperaturo stekelc in zmanjšajte tok, če prihaja do prekomernega gretja.

Barvajte v raztopini etidijevega bromida (0,5 µg/ml), najbolje skupaj s stekelcem, na katerem je ostal gel po razklenitvi sendviča. *Pozor: gel je zelo občutljiv in se hitro raztrga!* Po ~ 10 min sperite gel z vodo in ga prenesite na transiluminator. Pri prenašanju si lahko pomagate s prozorno folijo za gospodinjstvo.

Opisani postopek je primeren za ločevanje kratkih fragmentov dsDNA. Za ločevanje ssDNA mora biti v gelu prisotna urea (7 M), vzorec pa denaturiran v formamidu. Povišana temperatura pomaga pri preprečevanju nastanka sekundarnih struktur, ki bi vplivale na potovanje DNA.

APS (amonijev persulfat): Zatehtajte svežega – pripravite 10 ml (150 mg APS, dH<sub>2</sub>O do 10 ml), ostanek shranite v zmrzovalniku (obstojno ~ 1 mesec).

TEMED (tetrametiletildiamin): Gre za zdravju nevarno kemikalijo z neprijetnim vonjem, zato delajte previdno in v digestoriju. Steklениčko takoj po odpipetiranju zaprite.

TBE: 1 liter (10×) pufru vsebuje: 108 g trisa (baze), 55 g borove kisline in 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8).