



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za naravoslovje in  
matematiko*

## Medicinska biotehnologija za študente biologije

Priročnik za vaje s teoretičnimi osnovami  
(1. izdaja)

Avtorici:

doc. dr. Špela Stangler Herodež  
asist. dr. Alenka Erjavec Škerget

Recenzentka:

prof. dr. Nadja Kokalj Vokač

Maribor, 2011

# PREDGOVOR

V vaših rokah je priročnik vaj medicinske biotehnologije za študente biologije. Sestavljen je tako, da najprej podaja teoretične osnove, ki jim sledijo protokoli posameznih vaj. Na koncu sta dodana laboratorijski priročnik, ki povzema navodila za varno delo v laboratoriju in „recepte“ za posamezne reagente in navodila za pripravo poročil o opravljenih vajah.

Biotehnologija je znanost, ki uporablja tehnologije, osnovane na živih bitjih, za izdelavo uporabnih izdelkov za tržišče. Uporabljamo jo že tisoče let: izdelava sira, jogurta, vina, kislega zelja, piva so tradicionalni biotehnološki postopki v živilski industriji, ki za nikogar niso sporni. Sodobna biotehnologija pa je izdelava zdravil (antibiotiki, hormoni, inzulin, protitelesa.), [žlahtnjenje](#) rastlin, izdelava [encimov](#), zatiranje škodljivcev, čiščenje odplak in še marsikaj.

BIOTEHNOLOGIJA = BIO + TEHNO + LOGIJA

- "bio" (βιο) je starogrška beseda, ki pomeni življenje ali pa živo bitje
- "tehno" (τεχνη) je prav tako starogrška beseda, pomeni spretnost
- "logija" (λογία) pa pomeni beseda ali misel. V današnjem času to besedo uporabljamo v pomenu znanost ali veda.

Biotehnologijo delimo na več področij, ki jih nekateri označujejo z barvami:

**ZELENA BIOTEHNOLOGIJA:** rastlinska biotehnologija

**MODRA BIOTEHNOLOGIJA:** biološko čiščenje odpadnih vod, biološke čistilne naprave

**RDEČA BIOTEHNOLOGIJA:** medicinska biotehnologija

**SIVA BIOTEHNOLOGIJA:** industrijska biotehnologija

Vaje iz medicinske biotehnologije so izbrane tako, da dajejo pregled nekaterih osnovnih tehnik in postopkov. Iz praktičnih razlogov vaje ne morejo vključevati kompleksnih in zamudnih poskusov, kakor tudi ne uporabe dragih aparatov in reagentov. Tehnike, ki jih boste uporabljali, so uveljavljene tako v raziskovalnih in razvojnih kot tudi v diagnostičnih laboratorijih. Nekateri od obravnavanih postopkov se lahko izvajajo tudi drugače. Nikoli ne obstaja samo en način, kako priti do končnega rezultata, obstajajo pa ustaljeni in preizkušeni postopki, ki se jim izplača slediti. Laboratoriji imajo svoje zakonitosti in pogosto uporabljajo metode, ki dajejo najbolj zanesljive rezultate, pa čeprav le-te niso vedno najnovejše in najhitrejše. Prav tako si lahko nekateri laboratoriji privoščijo delo z dragimi, vnaprej pripravljenimi reagenti, ki nudijo hitrejšo delo, večjo ponovljivost rezultatov, med tem, ko so drugi ugotovili, da se da s preprostimi rešitvami izvesti tudi zelo zapletene postopke.

Vaje so sestavljene tako, da vam poskušajo dati vpogled v nekatera področja medicinske biotehnologije, pri čemer se lahko poglobite v zgradbo poskusov ter v način razmišljanja in delovni vsakdan medicinskih biotehnologov. Vaje so razdeljene v dva sklopa; v prvem sklopu se boste seznanili z osnovnimi metodami medicinske biotehnologije in izvedli izolacijo ter spektrofotometrijo DNA; v drugem sklopu pa se boste srečali tako teoretično kot tudi praktično z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR).

Vaša naloga je, da si pred vsako vajo natančno preberete postopek poskusa in ga poskušate razumeti kot celoto. Med vajo si spremembe v postopku, izračune in dodatne razlage zapišite. Po končanem delu pa napišite poročilo v skladu z navodili v tem priročniku.

Avtorici upava, da vam bo predstavljen priročnik v pomoč tako pri vajah iz medicinske biotehnologije, kot tudi pri vašem nadaljnjem študiju biologije. Hkrati upava, da vam vaje ne bodo samo obveza na poti do diplome, ampak vam bodo tudi v veselje in se boste na njih naučili česa koristnega za kasneje.

# KAZALO

## 1. UVOD

- 1.1 Medicinska biotehnologija
- 1.2 Metode v medicinski biotehnologiji
  - 1.2.1 Citogenetske metode
  - 1.2.2 Molekularno citogenetske metode
  - 1.2.3 Molekularno genetske metode
- 1.3. Struktura in funkcija nukleinskih kislin
- 1.4. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)
  - 1.4.1. Pogoji kroga pomnoževanja
  - 1.4.2. Začetni oligonukleotidi
  - 1.4.3. Sestava reakcijske raztopine
  - 1.4.4. Izbira tipa DNA-polimeraze
  - 1.4.5 Uporaba PCR – ja
  - 1.4.6 Alelna specifična verižna reakcija s polimerazo
- 1.5. Agarozna gelska elektroforeza
  - 1.5.1 Agarozna in priprava agaroznega gela
  - 1.5.2 Potovanje molekul v agaroznem gelu
  - 1.5.3. Analiza elektroforeznih fragmentov

## 2. PROTOKOLI VAJ

- 2.1. 1. VAJA: Izolacija DNA
  - 2.1.1. Izvedba vaje
    - 2.1.1.1 Protokol za izolacijo DNA iz levkocitov
    - 2.1.1.2. Protokol za spektrofotometrično določitev koncentracije DNA
    - 2.1.1.3 Poročilo o opravljeni vaji
- 2.2. 2. VAJA: B27 alelna specifična verižna reakcija s polimerazo
  - 2.2.1. Opis testa za določanje prisotnosti alela B27 gena HLA-B
  - 2.2.2. Izvedba vaje
    - 2.2.2.1. Priprava in izvedba alelna specifičnega PCR
    - 2.2.2.2. Priprava in izvedba agarozne gelske elektroforeze
    - 2.2.2.3. Poročilo o opravljeni vaji

## 3. LABORATORIJSKI PRIROČNIK

### 3.1. NAVODILA ZA VARNO DELO V LABORATORIJU

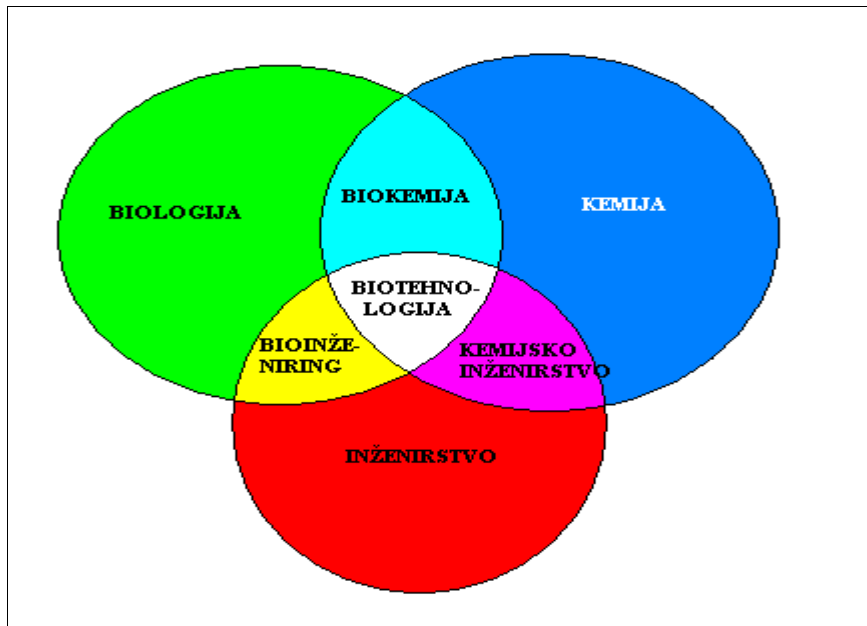
### 3.2. REAGENTI

## 4. NAVODILA ZA PRIPRAVO POROČIL O OPRAVLJENIH VAJAH

## 5. LITERATURA

## 1. UVOD

Biotehnologija je veda, ki združuje spoznanja biokemije, genetike, mikrobiologije in tehnološkega inženirstva, da bi s pomočjo organizmov (mikrobov, celičnih kultur, rastlin) oz. njihovih sestavnih delov (npr. encimov) na industrijski način proizvajala različne učinkovine. Gensko inženirstvo je nepogrešljivi del nove biotehnologije saj z vnosom ali spreminjanjem genov izdeluje mikroorganizme (t.i. transgene organizme) z novimi lastnostmi. Le-ti so potrebni za proizvodnjo večjih količin industrijsko ali farmacevtsko pomembnih spojin oz. izboljšanih učinkovin.



*Slika 1.1: Vpetost biotehnologije med različna področja*

### 1.1 Medicinska biotehnologija

**Medicinska (rdeča) biotehnologija** velja za najpomembnejše uporabno področje biotehnologije. Medicinsko-biotehnološki postopki namreč igrajo čedalje večjo vlogo tako pri razvoju novih zdravil, podobno zasnovana tehnologija pa je uporabna tudi pri diagnostiki genetsko pogojenih bolezni.

**Genetske bolezni in genske okvare** Spremembe v nukleotidnem zaporedju genov lahko povzročijo spremembe v zaporedju aminokislin, ki sestavljajo proteine. Če okvare proteinov prizadenejo dovolj veliko število celic, se odražajo kot okvare metabolizma in okvare tkiv oz. organov. Ko se genetske okvare zgodijo v zarodnih oz. spolnih celicah, ali če prizadenejo vse celice zgodnjega zarodka, bo okvara prisotna v vseh celicah odraslega organizma. Takrat govorimo o trajnih genetskih spremembah oz. mutacijah, katerih posledica so genetske bolezni.

Izraz **genska bolezen** se ponavadi uporablja, ko želimo poudariti, da gre za poškodbo na ravni genov. O *enogenskih boleznih* (monogenskih) govorimo takrat, če je okvarjen en sam gen in se ta okvara odraža v obliki bolezni. Primer je anemija srpastih celic.

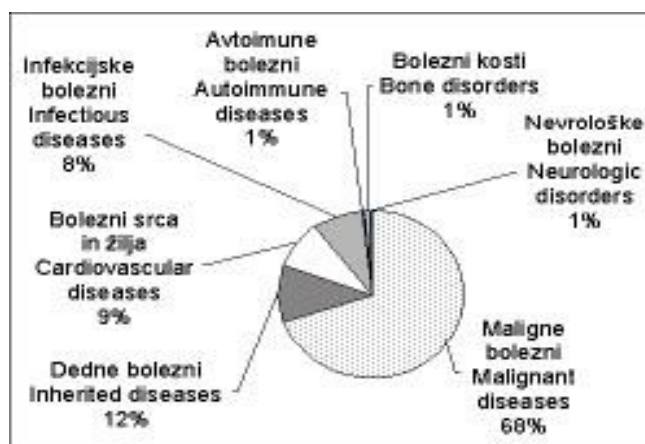
Če bolezen povzročajo okvare večjega števila genov, so to *večgenske (poligenske) bolezni*.

Lahko pa na obliko neke bolezni poleg okvarjenih genov vplivajo tudi drugi dejavniki npr iz okolja, takrat govorimo o *večfaktorskih boleznih*. Večgenske in večfaktorske bolezni so navadno zelo zapletene, saj je pri njih prisotno več mutacij, ponavadi na več različnih genih, ki se jim tekom življenja lahko pridružijo še nove okvare v drugih genih. Številne večgenske bolezni, ki so

dandanes zelo razširjene, so kombinacija podedovanih genskih mutacij in pridobljenih genskih okvar.

O kromosomskih aberacijah govorimo, ko prihaja do sprememb v številu (monoploidnost, poliploidnost, aneuploidnost) in/ali strukturi (delecije, duplikacije, translokacije, inverzije) kromosomskega materiala.

Danes poznamo blizu 6000 bolezni, za katere menimo, da imajo genetsko osnovo. Če tem pridružimo še genske okvare večjega števila celic, ki se zgodijo zaradi izpostavljenosti mutagenom, je to število še večje. Predvidevajo, da genetske bolezni bremenijo 15-20% otroških oddelkov bolnišnic po svetu. Ko se jim pridružijo še večgenske bolezni starejših ljudi, sladkorna bolezen, rakasta obolenja ipd, se ta številka izredno poveča. Zato je v zadnjem času namenjen velik pomen tako odkrivanju t. i. potencialnih genetskih faktorjev (genov) pri določenih boleznih, z namenom njihovega preprečevanja pri potencialnih nosilcih genske okvare in nenazadnje tudi odkrivanju smernic za uspešno genetsko zdravljenje omenjenih bolezni.



*Slika 1.1.1: Porazdelitev postopkov genske terapije po posameznih skupinah bolezni. Podatki so iz baze NIH (Avgust 2010).*

## 1.2 Metode v medicinski biotehnologiji

Različne molekularno-biološke tehnologije se dandanes uporabljajo tako za namene genetske diagnostike kot tudi za uporabo v biotehnoške namene. V nadaljevanju je predstavljenih nekaj najpogosteje uporabljenih metod v medicini.

### 1.2.1 Citogenetske metode

Citogenetske metode so namenjene prepoznavanju kromosomskih strukturnih in številčnih sprememb. Temeljna metoda v citogenetiki je analiza kromosomov. Osnova kromosomske analize je kariotip. Sestavlja ga več kariogramov ene osebe. Kariogram je skupek kromosomov ene celice. Kromosomi so najbolj primerni za preučevanje v metafazi celične delitve (mitoza). v ta namen se opravi kariotipizacija celic iz različnih tipov celic ( krvne celice, amnijske celice, celice horionskih resic, kožno tkivo, kostni mozeg, ...); omogoča pregled celotnega genoma na nivoju 8-10 Mbp velikih sprememb.

Za citogenetsko analizo je primeren vzorec v katerem so žive, aktivne celice, ki so sposobne celične delitve. Vzorec se nasadi v gojišče, ki je za različne vrste vzorca različen, večinoma se uporabljajo

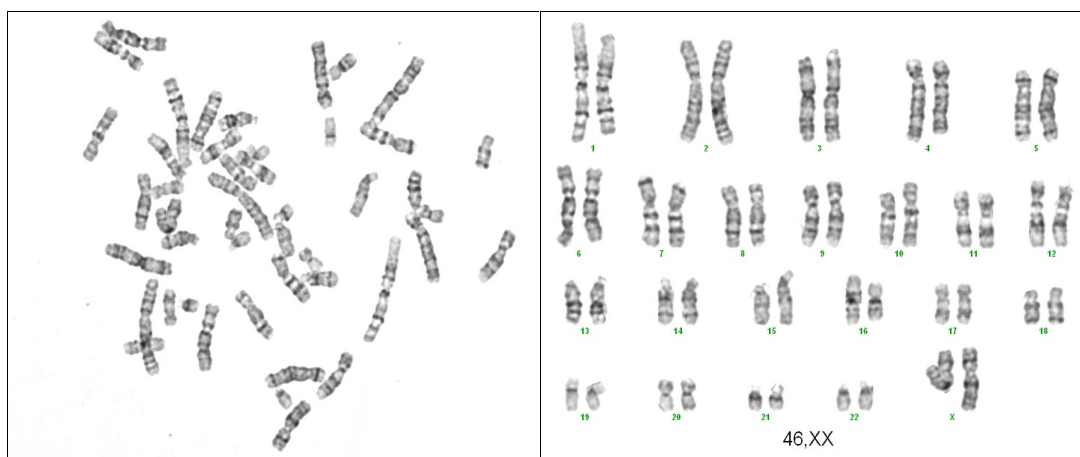
komercialni pripravki.. Odločilni parametri, ki vplivajo na kultiviranje celic so pH(7,2-7,4), temperatura (37°- 37,5°C) in okolje v katerem se gojijo celice (z CO<sub>2</sub>, brez CO<sub>2</sub>). Čas kultivacije je različen glede na vrsto vzorca. Celična kultura se zaključi z dodatkom kolcemida, ki preprečuje nastanek delitvenega vretena.

Naslednji korak v obdelavi celic je dodatek hipotonične raztopine (37°C), ponavadi kalijevega klorida, ki povzroči razpok celic in sprostitvev kromosomov. Nazadnje celice fiksiramo v hladnem fiksirju, jih kanemo na stekelca in pripravimo preparate. Sledi proganje kromosomov po enem od izbranih načinov ter analiza kromosomov z mikroskopijo.

Različne metode proganja kromosomov omogočajo identifikacijo kromosomov, ugotavljanje njihovega števila in strukturnih sprememb. Obdelava z encimom ali denaturacija, kateri sledi barvanje z DNA-specifičnim barvilom, povzroči nastanek različno močno obarvanih prečnih prog, po celotni dolžini kromosoma, in tako nastane določen, za vsak kromosom specifičen, vzorec. Različen vzorec prog je osnova za kromosomsko analizo.

Tehnike barvanja kromosomov so :

- **Giensa barvanje:** za ugotavljanje števila kromosomov in pri študijah lomljivosti kromosomov
- **G-proganje:** uporablja se za identifikacijo kromosomov in iskanje strukturnih sprememb
- **Q-proganje:** uporabno za študij polimorfni variant kromosomov 1, 3, 9, 16 in akrocentričnih kromosomov ter Y kromosoma;
- **R-proganje:** denaturacija s toploto v Earle's raztopini in barvanje z Giensa barvilom povzroči nastanek prog, ki so obratne kot pri G-proganju. Pri R-proganju so temne proge bogate z geni. Uporablja se v kombinaciji z G-proganjem.
- **T-proganje :** uporablja se za študije telomernih regij kromosomov.
- **C-proganje :** uporablja se za študije variabilnosti kromosomov.
- **NOR barvanje:** za identifikacijo transkripcijsko aktivnih genov, ki se nahajajo na kratkih krakih akrocentričnih kromosomov.
- **DA-DAPI:** obarva se heterokromatin kromosomov 1, 9, 16, proksimalni del kratkega kraka kromosoma 15 in distalni del dolgega kraka kromosoma Y.



**Slika 1.2.1.1:** Slika metafaznih neurejenih (A) in zloženih (B) kromosomov, obdelanih po postopku priprave celične suspenzije iz periferne venske krvi ter proganjih z G- načinom proganja; prikazan je normalni ženski kariogram, 46, XX.

### 1.2.2 Molekularno citogenetske metode

Molekularno citogenetske metode so namenjene natančnejšemu vpogledu v genom, vendar smo tukaj pogosto usmerjeni na ciljno preiskovanje določenega kromosomskega predela ali genskega lokusa. Najpogosteje uporabljena tehnika v tej skupini je fluorescentna in situ hibridizacija (FISH). Metoda »in situ« hibridizacije temelji na sposobnosti označene molekule DNA, t.i. DNA-sonde, da se pod določenimi pogoji veže na komplementarno mesto druge verige DNA. Metoda omogoča odkrivanje specifičnih zaporedij nukleinskih kislin s pomočjo DNA-sond na morfološko intaktnih celicah, kromosomih in tkivnih rezinah.

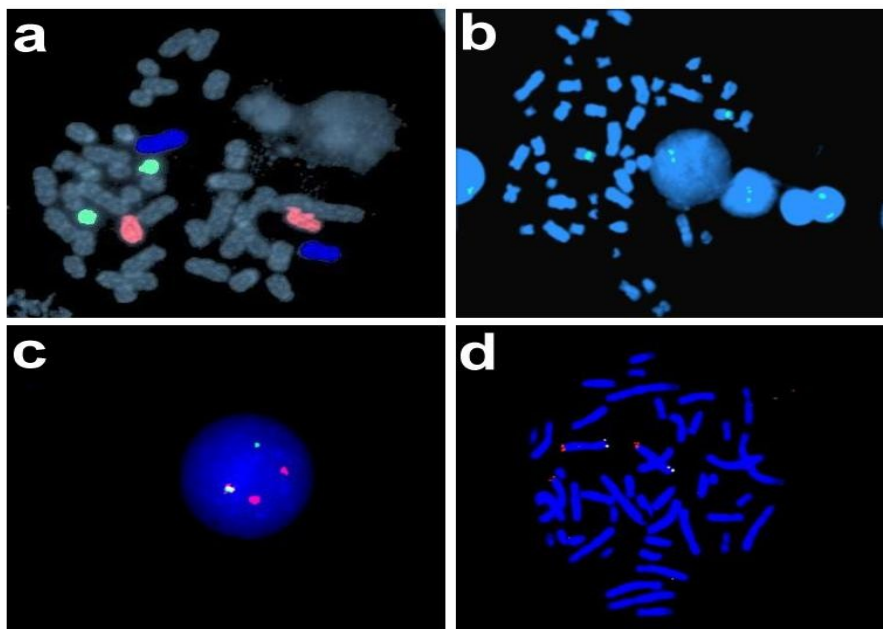
Poznamo štiri glavne tipe DNA sond, ki se uporabljajo v klinične namene :

a) DNA-sonde za barvanje kromosomov : sestavljene so iz velikega števila zaporedij DNA, specifičnih za določen kromosom; z njimi obarvamo celotne kromosome ali dele kromosomov; uporabljajo se za iskanje kromosomski izmenjav (kompleksni kariotipi), pri identifikaciji marker kromosomov, ne dajejo nam pa informacije o preureditvah v okviru kromosoma samega (inverzije, duplikacije)

b) centromerno specifične DNA-sonde : sestavljene iz ponavljajočih DNA sekvenc specifičnih za centromerno regijo posameznega kromosoma; uporabljajo se za ugotavljanje numeričnih kromosomskih sprememb na interfaznih in metafaznih celicah

c) lokus specifične DNA-sonde: to so majhne eukromatske DNA-sonde, ki se uporabljajo za gensko mapiranje, pri odkrivanju mikrodelecijski sindromov, za detekcijo delecij in amplifikacij v onkogenetiki, iskanje fuzijskih genov, uporabljajo se tudi na interfaznih jedrih, zato so pomembne v prenatalni diagnostiki (npr. Down sy. lokus spec. DNA-sonda za ugotavljanje trisomije te regije na nekultiviranih amniocitah);

d) telomerne DNA-sonde: so sestavljene iz ponavljajočih DNA sekvenc specifičnih za subtelomerne regije posameznih kromosomov; so kromosomsko specifične in specifične za vsak krak kromosomoma (kratki (p) in dolgi (q)); uporabljajo se za ugotavljanje kriptičnih terminalnih delecij in drugih preureditev subtelomernih regij kromosomov.



**Slika 1.2.2.1:** Rezultati FISH z uporabo različnih vrst DNA-sond: a) DNA sonde za barvanje kromosomov; b) DNA sonda specifična za centromero kromosoma 12; c) lokus specifična sonda LSI BCR/ABL Dual Color hibridizirana na interfazno jedro d) telomerna DNA sonda kromosoma 7

### **1.2.3 Molekularno genetske metode**

**Izolacija genomske nukleinske kisline** je prva stopnja pri vsaki genetski preiskavi. Različni laboratoriji uporabljajo različne protokole za izolacijo, vsem pa so skupne naslednje tri točke: ločevanje in liziranje celic z genomov iz biološkega vzorca; odstranjevanje ostankov celic in inaktivacija encimov – nukleaz. Več o strukturi ter o postopku - (glej poglavja 1.3 in 2.1).

#### **Tehnologija na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR)**

je na široko uporabljano orodje v molekularni biologiji. Osnovni princip je pomnoževanje želenega dela ali celotne molekule DNA z namenom odkrivati predvsem manjše spremembe v njeni strukturi. Obstaja več različic PCR metodologije, med najpogosteje uporabljenimi so npr. alelna-specifična verižna reakcija s polimerazo, PCR na osnovi reverzne transkripcije (RT-PCR), verižna reakcija s polimerazo v realnem času (QPCR ali real-time PCR) idr. (glej poglavje 1..4)

#### **Molekularne tehnike na osnovi hibridizacije (Blotting)**

Hibridizacija je parjenje dveh enoverižnih nukleinskih kislin po principu komplementarnosti. DNA najprej vežemo na trden nosilec. Sledi hibridizacija označene sonde z DNA, vezane na nosilec. Metode zaznavanja hibridizirane sonde se razlikujejo glede na način označitve sonde.

Glede na način vezave DNA na nosilec in vrsto DNA poznamo več tehnik hibridizacije kot na primer hibridizacija po Southernu, hibridizacija odtisov Northern, točkovna hibridizacija in hibridizacija kolonij ali plakov.

Sondo za hibridizacijo predstavlja krajša ali daljša molekula DNA, katere nukleotidno zaporedje je podobno ali enako zaporedju gena, ki ga želimo analizirati z metodami hibridizacije.

Večinoma se kot sonde za hibridizacijske analize uporabljajo fragmenti DNA, dolgi od 100-1000 bp. Uporabljamo lahko tudi RNA-sonde in oligonukleotidne sonde in glede na tip sonde prilagodimo postopke hibridizacije.

Med posameznimi stopnjami hibridizacije se kot nosilec za DNA uporabljajo različni tipi membran. Nitrocelulozne membrane se odlikujejo po visoki ločljivosti in šibkem ozadju, ki je posledica nespecifično vezane sonde na membrano.

Najlonske membrane so mehansko odpornejše, imajo večjo kapaciteto vezave DNA, so pa nekoliko slabše od nitroceluloznih glede na ločljivost.

Način prenosa DNA na nosilec, je povezan s tipom membrane, ki smo jo izbrali za poskus. Danes se še vedno najpogosteje uporablja kapilarni prenos, ker je enostaven, zanesljiv in ne zahteva posebne laboratorijske opreme. Uporabljamo pa lahko tudi električni in vakuumski prenos. Oba tipa prenosov sta se razvila kot metodi za prenos proteinov na membrane.

Prenos DNA ali RNA na membrano najlažje preverimo z barvanjem le-teh v gelu z etidijevim bromidom ali pa z barvanjem membrane z metilenskim modrim. Po uspešnem prenosu nukleinske kisline vežemo na membrano po postopku, primernem za nosilec, ki smo ga uporabili.

Postopki hibridizacije sonde vključujejo vse stopnje, ki omogočijo parjenje sonde in tarčne DNA po principu komplementarnosti baz v nukleotidih. Tarčna DNA mora biti vezana na trden nosilec, sonda pa na nek način označena, kar omogoči kasnejšo zaznavanje položaja hibrida med DNA vzorca in sondo. Postopki hibridizacije vključujejo tri stopnje-predhibridizacijo, hibridizacijo in spiranje nespecifično vezane sonde.

- V stopnji predhibridizacije z makromolekulami, ki ne reagirajo s sondo, nasičimo membrano. Glede na tip membrane in tip sonde, ki ga uporabljamo, izberemo primerno molekulo za nasičenje membrane. Običajno se za ta namen uporabljata genomska DNA, izolirana iz slanikove sperme ali pa goveji serumski albumin.

- Hibridizacija: Membrano inkubiramo s sondo v raztopini, ki pospešuje parjenje komplementarnih baz. Učinkovito vezavo sonde na tarčno DNA dosežemo, če s pogoji hibridizacije



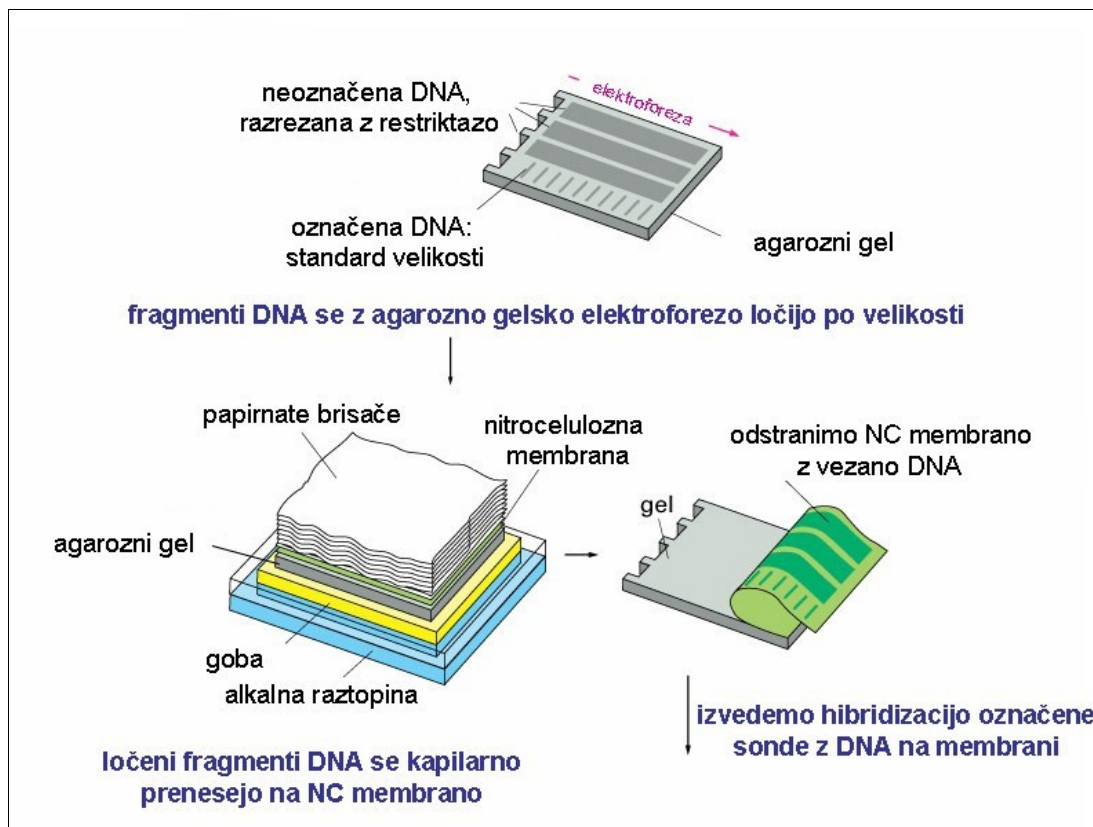
zagotovimo hiter nastanek hibrida in njegovo visoko stabilnost.

- Spiranje nespecifično vezane sonde; Z izbiro ustreznih pogojev spiranja lahko dosežemo, da ostanejo vezane le sonde, ki so 100 % enake tarčni DNA.

Najbolj uporabni metodi hibridizacije sta: hibridizacija po Southernu in hibridizacija odtisa Northern.

**Hibridizacija po Southernu** je hibridizacija sonde s fragmenti DNA, ki smo jih po ločevanju z agarozno elektroforezo prenesli s kapilarnim prenosom na nosilec. Metodo hibridizacije po Southernu uporabljamo za analizo rekombinantnih klonov in za analizo genomov. Ugotovimo lahko, če je določen gen v genomu del večgenske družine in kako so podobni geni organizirani pri različnih vrstah organizmov.

**Hibridizacija odtisa Northern** se uporablja za analizo vzorcev RNA. Tehnike so predvsem prilagojene delu z RNA, tako da je čim manjša možnost kontaminacije vzorca z RNA-zami. Za ločevanje molekul RNA po velikosti se prav tako uporablja agarozna elektroforeza. Metodo uporabljamo za analizo izražanja genov v različnih tkivih ali pa za opazovanje regulacije izražanja genov v različnih stopnjah razvoja organizma in pod vplivom različnih zunanjih dejavnikov.



*Slika 1.2.3.1: Prikaz prenosa Southern (prirejeno iz Alberts et al., Essential Cell Biology, 2. izdaja, Garland Publishing, 2004)*

### Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP)

Restriktaze so nukleaze, ki režejo dvovijačno DNA specifično v ali ob svojem prepoznavnem zaporedju. Encimi so del prokariotskega obrambnega mehanizma pred vdorom tuje DNA. Različne bakterije imajo različne restrikcijsko-modifikacijske sisteme. Poleg tega ima lahko en sev več različnih restrikcijsko-modifikacijskih sistemov. Geni za restrikcijsko in modifikacijske sisteme

so večinoma kromosomski, lahko pa so tudi na plazmidih ali fagih.

Izdelan je poseben sistem nomenklature različnih restriktaz. Vsak encim je označen s tremi črkami v poševnem tisku glede na bakterijsko vrsto, iz katere je bil izoliran. Tako na primer oznaka EcoRI pomeni, da je ta encim izoliran iz bakterije *E. coli* ali HindIII iz bakterije *Haemophilus influenzae*. Sledi črka, ki lahko označuje specifičen sev, pri katerem so našli to restriktazo. Lahko pa označuje, da je encim kodiran na določenem plazmidu, kot je v primeru EcoRI, na plazmidu R. Zadnji del imena encima je rimska številka, ki je zaporedna številka restriktazijskega encima, izoliranega iz istega bakterijskega seva.

Poznamo tri tipe restriktazijsko-modifikacijskih sistemov. Restriktaze tipa II večinoma režejo DNA znotraj svojega prepoznavnega zaporedja. Do danes je znanih več kot 600 različnih restriktaz tipa II. Prepoznavna zaporedja teh encimov so večinoma dolga 4, 5 ali 6 bp in so palindromska (z dvojno osjo simetrije). S številom bp v prepoznavnem zaporedju je povezana pogostost pojavljanja tega zaporedja v DNA. Najpogosteje se statistično pojavljajo prepoznavna zaporedja s 4 bp - to je na  $10^3$  bp. Zaporedja s 6 bp se povprečno pojavljajo na  $10^6$  bp.

Glede na to, kje v prepoznavnem zaporedju režejo restriktaze DNA, lahko nastanejo po končanem rezanju trije tipi fragmentov DNA. Če encim reže v sredini prepoznavnega zaporedja, nastanejo fragmenti s topimi konci (obe verigi na enem koncu sta enako dolgi). Če pa reže obe verigi DNA s stopničastim rezom, lahko nastanejo 5'- ali 3'-štrleči konci.

Za uspešno restrikcijo moramo vzpostaviti optimalne pogoje za delovanje encima. Optimalna vrednost pH, pravilna celokupna ionska jakost, redoks potencial in potrebni kofaktorji so že v pufru, ki ga običajno kupimo skupaj z restriktazijskim encimom. Večina restriktazijskih endonukleaz potrebuje za svoje delovanje ione  $Mg^{2+}$ . Ionsko jakost uravnavamo običajno s kalijevimi ali natrijevimi solmi. Encimi se razlikujejo glede na to, kakšno koncentracijo ionov potrebujejo za optimalno delovanje.

Hitrost encimske reakcije je odvisna predvsem od koncentracije encima, koncentracije DNA in konformacije DNA. Glede na te tri parametre določimo tudi čas trajanja reakcije. Encimska enota je definirana kot tista količina encima, ki razreže 1  $\mu$ g DNA faga  $\lambda$  v eni uri pri optimalni temperaturi. Običajno dodamo 1-5 U/ $\mu$ g DNA. Za večje količine se odločimo, če so prepoznavna mesta v DNA zelo pogosta ali če delamo z genomsko DNA, ki je težje dostopna restriktazijskim endonukleazam. Encimsko delovanje lahko motijo tudi nečistoče v vzorcu, zato je potrebno pripraviti čim bolj čiste vzorce DNA.

Temperaturni optimum encimov se običajno ujema s temperaturo, pri kateri živi organizem, iz katerega je encim izoliran. Običajno je optimalna temperatura reakcije 37°C, pri encimih, izoliranih iz ptičjih patogenov, 42°C (AMV reverzna transkriptaza) in pri encimih, izoliranih iz termofilnih organizmov, nad 70°C (*Taq* DNA-polimeraza).

Večino restriktaz inaktiviramo temperaturno- pri 80°C (10 do 30 min). Drugi način inaktivacije restriktaz je dodatek helatov, kot sta na primer EDTA in EGTA. Te molekule vežejo ione  $Mg^{2+}$ , ki so nujni za encimsko aktivnost teh restriktaz.

### **Elektroforeza nukleinskih kislin**

Elektroforeza je kemijska analitska metoda, s katero lahko glede na velikost ločujemo, prepoznavamo in čistimo molekule DNK. Z elektroforezo ločimo delce z različnimi naboji, ker se razlikujejo njihove elektroforezne mobilnosti, kot tudi delce z enakimi naboji, če so različne velikosti ali oblike, ker nanje delujejo različne zavorne sile. Glede na medij, v katerem poteka elektroforeza ločujemo gelsko ali kapilarno elektroforezo. (Glej poglavje 1.5)

## **Mikromreže**

Mikromreže (biočipi) so sodobno molekularno biološko orodje, ki omogoča biomedicinske preiskave na zelo natančni ravni genoma v enem poskusu. Izraz mikromreže se je uveljavil zaradi značilne slike na nosilec nanešenih označenih fragmentov DNA, ki tvorijo mrežo po izgledu.

Vrste DNA čipov in mikromrež DNA čipi so mikroskopske skupine tisočih DNA molekul z znanimi nukleotidnimi zaporedji, ki jih pritrdimo na podlago. Vsak gen je na mikromreži ali čipu zastopan z vsaj eno skupino identičnih DNA molekul. Organizirana razporeditev skupin DNA molekul predstavlja matrico, na kateri po hibridizaciji določimo razliko v izražanju genov med poskusnim vzorcem in kontrolo. Postopek hibridizacije temelji na komplementarnem parjenju baz A-T in G-C. Mikromrežo z organizirano razporeditvijo tarčnih DNA molekul izpostavimo fluorescentno ali radioaktivno označeni preizkusni snovi (imenovani proba ali sonda), ki jo pripravimo iz preiskovanih celic ali tkiv. Hibridizacijski signal na določenem mestu matrice nam izraža identiteto nukleotidnega zaporedja, velikost signala pa je merilo za količino izraženega genskega produkta. Prvi DNA čipi so se uporabljali za spremljanje celostnega (globalnega) izražanja genov, vedno več pa je tudi uporabe za določanje sprememb na ravni genoma.

Dandanes se DNA čipi najpogosteje uporabljajo za:

1. ugotavljanje količine izraženih genov (transkriptom ali ekspresijsko profiliranje) ter
2. določanje nukleotidnih zaporedij in sprememb na ravni genoma – sekvencioniranje, iskanje enojnih nukleotidnih polimorfizmov (SNP) in mutacij, primerjalno genomsko hibridizacijo (CGH) ter iskanje regulatornih DNA zaporedij (metoda čip-čip – kromatinska imunoprecipitacija z analizo čipov).

Obstaja več vrst DNA mikromrež, od raziskovalnega vprašanja oziroma namena uporabe pa je odvisno, katera je najprimernejša. Mikromreže s kratkimi oligonukleotidi, ki so sintetizirani na matrici in situ, so sprva imenovali DNA čipi, saj je tehnologija priprave podobna pripravi računalniških čipov.

Obstajajo tudi mikromreže z dolgimi oligonukleotidnimi sondami, mikromreže s komplementarnimi DNA (cDNA) sondami in mikromreže z več 100 kb dolgim odseki genomske DNA. imenovane klasične DNA mikromreže, kjer so na stekleno ploščico nanešene 300 do 500 bp komplementarne DNA (cDNA), od katerih vsaka predstavlja en gen. Le-te pridobimo iz celičnih informacijskih RNA (mRNA) s pomočjo gensko specifičnih začetnih oligonukleotidov v reakciji obratnega prepisovanja in verižnega pomnoževanja s polimerazo (RT-PCR).

**DNA čipi za ekspresijsko profiliranje** Za ekspresijsko profiliranje se uporabljajo tako oligonukleotidne kot cDNA mikromreže. Obstajata dve glavni smernici priprave ekspresijskih DNA mikromrež. V prvem primeru čip vsebuje gene, ki jim je skupna fizična lokacija (npr. človeški kromosom 22) ali kar vse gene določenega organizma. Glede na sedanjo tehnologijo je na stekleno ploščico moč nanesti do 50.000 genov.

Pri drugem pristopu čip vsebuje izbrane gene, ki so med seboj smiselno (tematsko) povezani. Načrtovanje takih čipov izhaja iz a priori biokemičnega znanja o funkciji genov in iz poznavanja fiziologije ter patofiziologije proučevanih obolenj. Tematski čipi raziskovalcem ponujajo neomejene možnosti tvorjenja in uresničevanja idej na temeljnem, aplikativnem in klinično-diagnostičnem področju. Na tržišču je vedno večje število usmerjenih čipov, ki se ukvarjajo z izražanjem genov med onkogenezo (onko-čipi) in tekom drugih pogostih bolezni. Mnogi se razvijajo v smislu diagnostičnih orodij, ki bi lahko našla pot tudi v klinično prakso.

## **DNA čipi za določanje nukleotidnih zaporedij in sprememb na ravni genoma**

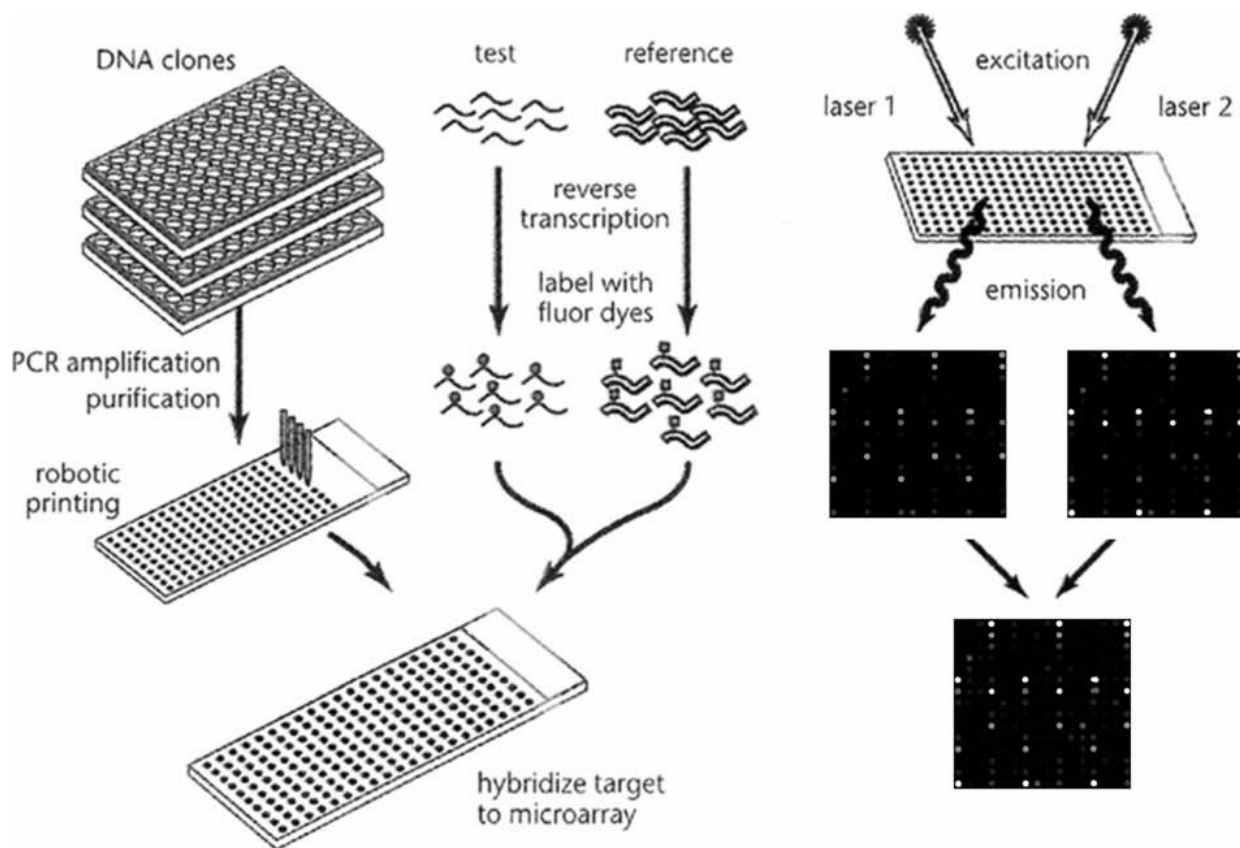
Za drugo vrsto DNA mikromrež je značilno, da ne spremljamo ravni izražanja genov (raven mRNA), temveč določamo nukleotidno zaporedje na izbranih delih genoma (raven DNA). Za namen sekvencioniranja se razvijajo "prekrivajoče" mikromreže (angl. tiling microarrays), kjer so kromosomi po celotni dolžini pokriti s prekrivajočimi se 20 bp dolgimi oligonukleotidi. S tovrstnimi čipi je možno določiti genotip posameznika, tako nukleotidno zaporedje normalnih

alelov kot tudi okvarjenih bolezenskih alelov.

Po podobnem principu deluje tudi iskanje enojnih nukleotidnih polimorfizmov (SNP) in/ali mutacij. Razlika z mikromrežami za sekvencioniranje je v obsegu DNA zaporedja na čipu. Mikromreže za sekvencioniranje morajo vsebovati celotno področje genoma, katerega nukleotidno zaporedje želimo preveriti, SNP čipi pa so lahko omejeni npr. na posamezni polimorfni gen, ki je odgovoren za določeno obolenje.

Posamezniki se namreč v svojem genskem zapisu med seboj razlikujemo tudi po polimorfni nukleotidnih zaporedjih, med katere spadajo tudi SNP. Analiza DNA iz različnih osebkov bo na mikromreži pokazala prisotnost ali odsotnost signala, ki potrjuje prisotnost oziroma odsotnost določenega SNP, z boleznijo povezanega.

Primerjalna genomska hibridizacija (CGH) na čipu je visoko ločljivostna metoda za preiskovanje kvantitativnih sprememb na ravni genoma. Na CGH čipu so nanešeni klonirani poljubno dolgi (tudi do nekaj 100 kb) odseki DNA točno določene lokacije na kromosomu. To omogoča zelo natančno določevanje sprememb in njihovo preslikavo na določeno nukleotidno zaporedje. Metoda se v največji meri uporablja v onkologiji, in sicer v diagnostične namene (prepoznavanje vrste raka) in s tem povezano prognozo, uporabna pa je tudi za določevanje kromosomskih aberacij različnih genetskih obolenj in za prenatalno diagnostiko različnih kromosomskih abnormalnosti, npr. Downovega sindroma (trisomija kromosoma 21).



**Slika 1.2.3.2:** Prikaz postopka priprave in analize DNA čipa; Faze: 1. priprava DNA čipa vključuje sintezo tarčnih DNA molekul in njihovo pritrditev na podlago z nanašalnim robotom; 2. postopek hibridizacije s testnim in referenčnim fluorescentno označenim vzorcem nukleinskih kislin; 3. analiza signala z optičnim laserskim čitalcem (povzeto po Rozman D. Tehnologija DNA mikromrež in njena uporaba v medicini, 2006).

## **Ekspresijsko kloniranje / Genska tehnologija**

Postopku prerazporejanja dobljenih fragmentov DNA pravimo tehnologija rekombinantne DNA ali, če je to natančno načrtovano, gensko inženirstvo ali genska tehnologija.. Če na primer z restriksijskim encimom razrežemo kromosomsko DNA in z enakim encimom odpremo prenašalno molekulo DNA (bakterijski virus ali plazmid), lahko izbrani fragment kromosomske DNA vložimo v prenašalno molekulo. Tako nastalo rekombinantno DNA zapremo, zlepimo s posebnim encimom ligazo. Rekombinirani prenašalec nato vnesemo v bakterijsko celico, ki jo zlahka in hitro namnožimo v tekočem gojišču ter z molekulskim in celičnim kloniranjem imamo možnost pridobiti veliko število kopij omenjenega fragmenta DNA. Če je ta fragment gen, ki nosi informacijo za farmacevtsko zanimiv protein, ga v bakterijskih celicah tudi izrazimo, sprožimo njegovo prepisovanje v mRNA in njeno prevajanje v protein. Na ta način lahko pridobimo zelo veliko količino nekega proteina, ki ga iz evkariontskih celic pridobili manj zaradi tega, ker ga je v njegovih celicah premalo ali pa je slabo dostopen.

Gen lahko tudi malce spremenimo, mu zamenjamo del zaporedja, in tako ustvarimo nekoliko drugačen protein z novimi izboljšanimi lastnostmi: tej izvedenki genskega inženirstva rečemo proteinsko inženirstvo. Pri metabolnem inženirstvu v gostiteljsko celico vnesemo več različnih genov, najpogosteje tako, da jih v prenašalni molekuli razvrstimo v neko zaporedje. To zaporedje predstavlja zaporedje sporočil za biosintezo encimov, ki so potrebni za pretvorbo neke organske molekule v končno učinkovino, npr, antibiotik. Sodobna biotehnoška proizvodnja temelji na genski tehnologiji, s katero uvajamo gene za uporabne proteine v gostiteljske celice, tam se ti na preprost način razmnožijo in izrazijo v obliki svojih proteinskih produktov.

**Gensko inženirstvo** je področje molekularne biologije, ki zajema praktične in teoretične vidike ter metode, s katerimi gene in njihove regulatorje izoliramo, analiziramo, po želji spreminjamo in ponovno vnesemo v isti ali tuji organizem. Metode genskega inženirstva zajemajo naslednji sklopi:

1. najprej je potrebno izolirati in analizirati izbrani gen (določanje nukleotidnega zaporedja);
2. če je potrebno izoliran gen spremenimo ali ga pomnožimo
3. vstavljanje popravljenega gena v plazmid ali drug vektor in vgraditev v gostiteljsko celico
4. stimulacija gostiteljske celice da izdeluje produkte vstavljenih genov.

Na ta način pridobljene gene lahko nato uporabimo

- za preučevanje (spoznavanje vloge genskih produktov, preučevanje izražanja različnih mutacij istega gena, iskanje povezav med geni, ugotavljanje vpliva na izražanje mutacij, spreminjanje genov tekom evolucije, ...)
- za spreminjanje (izdelovanje analogov genov, ki jih popravimo in vrnemo v organizem z namenom genskega zdravljenja)
- za izdelavo genskih produktov v gostiteljskih celicah (npr. inzulin, TPA).

### **Metode genske tehnologije**

**1. Izolacija in izdelava rekombinantne DNK** Veliko molekulo DNK moramo v prvi fazi razrezati na manjše fragmente s pomočjo posebnih encimov, restriktaz. S pomočjo encima ligaza zlepimo oba rezana dela s kovalentnimi vezmi (fosfodiesterne vezi). Tako pridobimo umetno ustvarjeno t.i. rekombinantno DNA.

**2. Analiza strukture gena** Obstajajo različne metode sekveniranja genoma. Sekveniranje pomeni določevanje nukleotidnega zaporedja nukleinske verige. Gre za zelo avtomatizirane postopke, ki potekajo v posebnih napravah, imenovanih sekvenatorji.

**3. Pomnoževanje izoliranega gena** DNK lahko pomnožujemo na dva načina: s pomočjo bakterij ali umetno s pomočjo PCR reakcije v posebnih aparataturah.

Izolirani gen s pomočjo vektorjev vnesemo v bakterijsko celico. Bakterije izolirani gen vgradijo v svoj genom (kromosom ali plazmid). Pogosto se zgodi, da bakterije tujo DNA razrežejo z

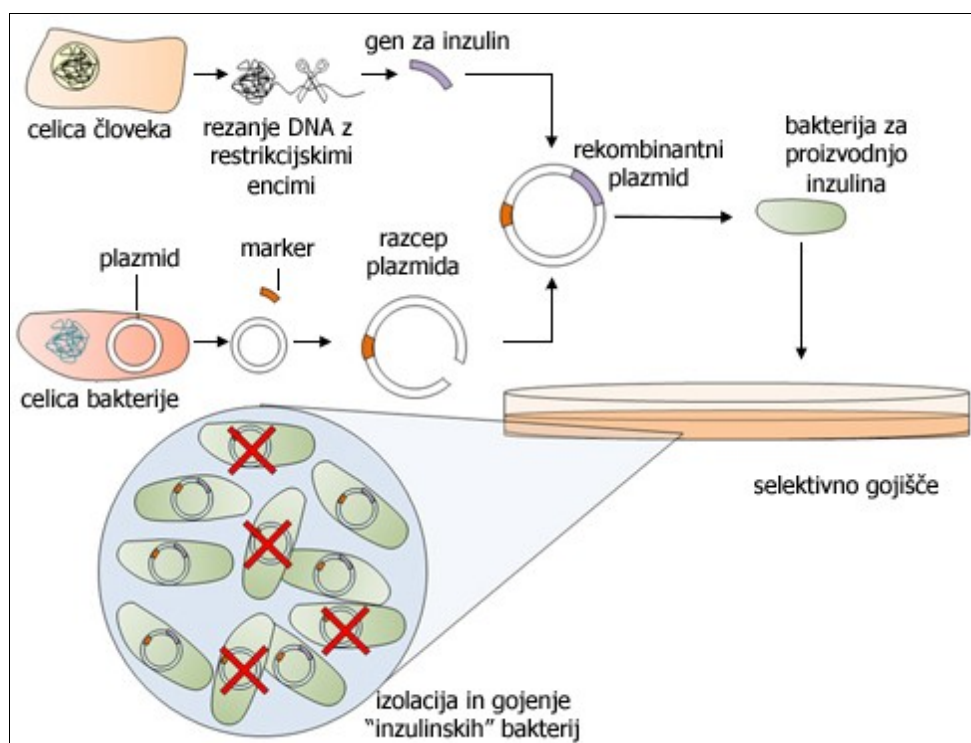
restriksijskimi encimi in je ne vgradijo v svoj genom. Ko se bakterija razmnožuje, prenaša na svoje potomce kopije svojega genoma. Samo če se je vneseni gen vgradil v njen genom, ga bodo imele tudi njene potomke. V tem primeru govorimo, da se je genom bakterije zaradi vnesenega gena spremenil in nastala je rekombinantna DNA.

Drugi način pomnoževanja je pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Pomnožene kopije rekombinantne DNA lahko nato uporabimo za izdelavo rekombinantnih plazmidov, za obstreljevanje tarčnih celic ter za analizo v terapevtske, sodnomedicinske, kriminalistične in druge namene.

**4. Vključevanje gena v gostiteljsko celico** Kot gostiteljske celice se najpogosteje uporabljajo bakterijske celice. Izolirani in pripravljeni gen pa lahko v gostitelja vnesemo na več načinov: s pomočjo vektorjev ( bakteriofagi ali plazmidi), z obstreljevanjem pod visokim tlakom z drobnimi delci (iz volframa ali zlata), na katerih je nanešena DNA, lahko pa tudi s pospeševanjem bakterijske transformacije.

**5. Spreminjanje genov** Geni se običajno spreminjajo z mutacijami, lahko pa jih spreminjamo tudi umetno v laboratoriju tako, da zamenjamo enega ali več nukleotidov, dodajamo nove ali jih odvezemamo. Gre za ustvarjanje genskih analogov. Lahko pa tudi gen izdelajo že na nanov, tako da dodajamo posamezne nukleotide v želeno zaporedje.

**6. Izražanje genov- izdelava genskega produkta** Kot gostitelje za izdelavo genskih produktov na podlagi izoliranih tujih evkariontskih genov se najpogosteje uporabljajo bakterije ali v zadnjem času pa tudi evkariontske celice in /ali organizmi.

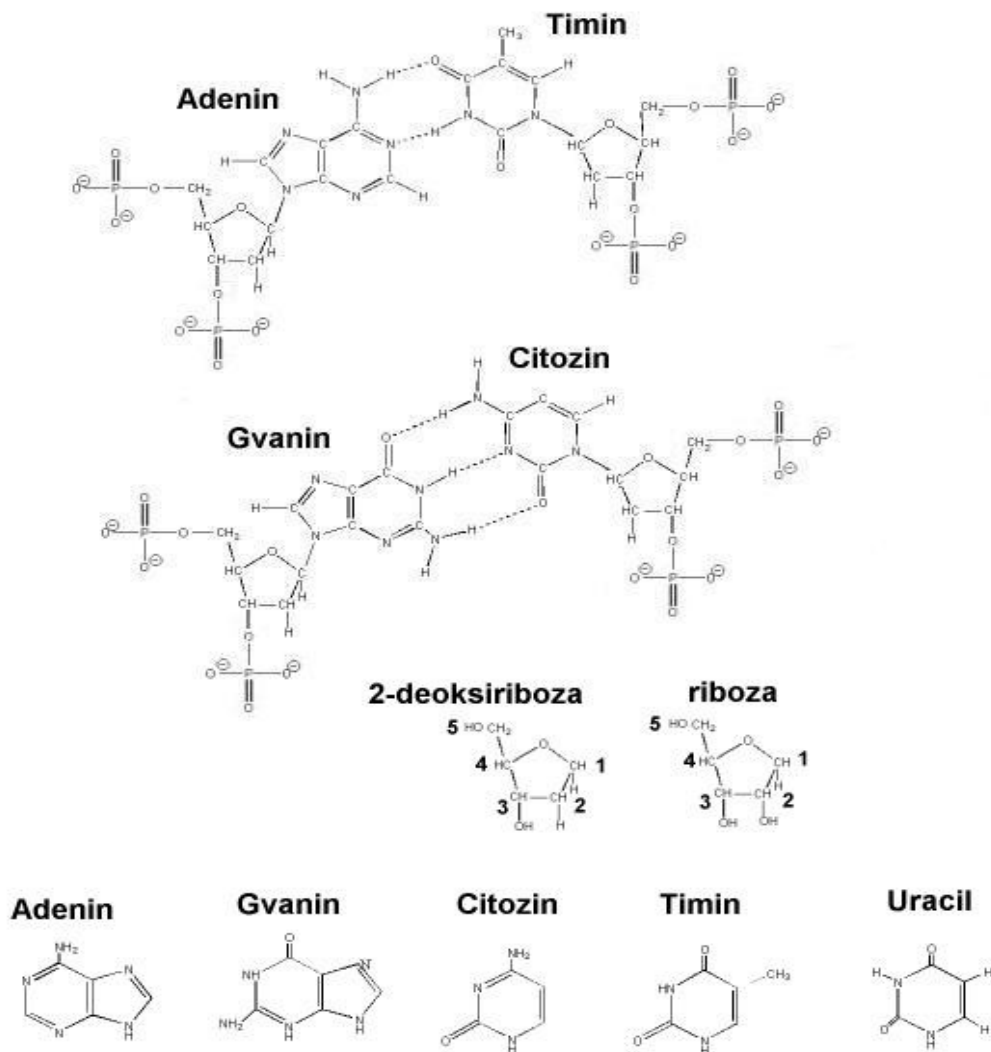


**Slika 1.2.3.3:** Primer uporabe metod genske tehnologije pri pridobivanju človeškega insulina. Iz človeške celice je bil v prvi stopnji izoliran gen za insulin, ki je bil nato vstavljen v bakterijski plazmidni genom, označen z markerjem. Sledilo je intenzivno gojenje bakterij na selektivnem gojišču in po določenem času izolacija pridobljenega insulina. (povzeto po [http://www.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page\\_id=11621](http://www.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page_id=11621))

### 1.3. Struktura in funkcija nukleinskih kislin

Nukleinske kisline so v vseh živih celicah. Odkrili so jih leta 1869 v jedrih ribjih semenčic in jih po jedru (nukleusu) tudi poimenovali. Nahajajo se še v drugih celičnih strukturah, in sicer ribosomih, mitohondrijih in plastidih. V nukleinskih kislinah so vse bistvene informacije o celični zgradbi in njenem delovanju. Med delitvijo celice se te informacije prenašajo na hčerinske celice, zato jih imenujemo dedne informacije.

Nukleinske kisline so sestavljene iz verig nukleotidov. Ker so posamezne nukleinske kisline sestavljene iz več nukleotidov, so polinukleotidi. Nukleotid je sestavljen iz treh delov: iz ostanka fosforne kisline, sladkorja pentoze (riboze ali deoksiriboze) in organske dušikove baze (adenin, gvanin, citozin, timin in uracil). Glede na to, katera pentoza je v nukleotidu, ločimo dve vrsti nukleinskih kislin: deoksiribonukleinsko kislino (DNA) in ribonukleinsko kislino (RNA).

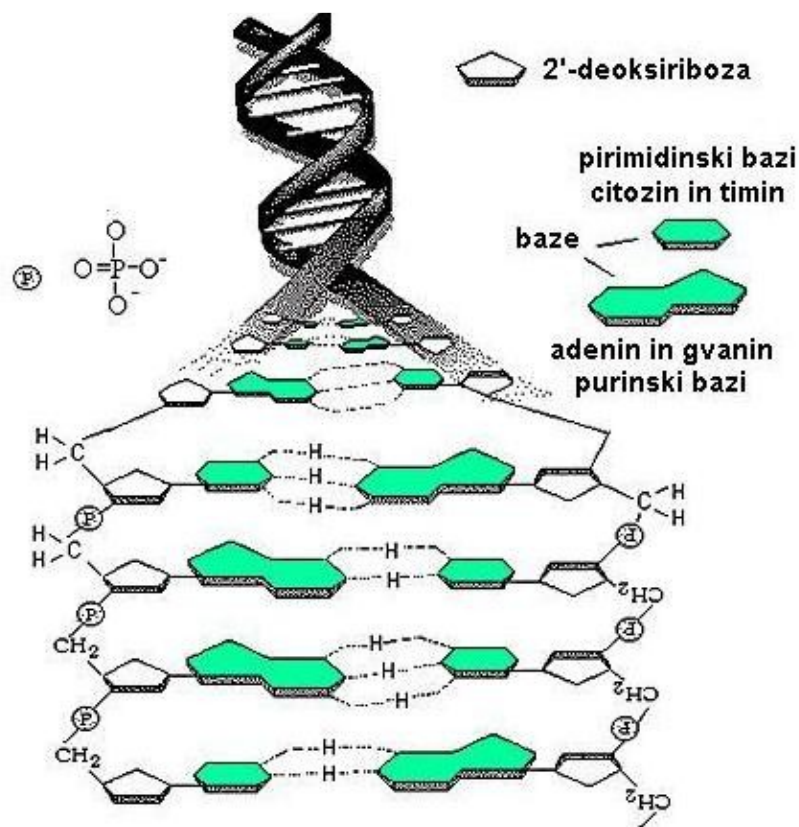


**Slika 1.3.1:** Struktura in vezava nukleotidov ter njegovih sestavnih delov: adenin se poveže s timinom, citozin z gvaninom.

Nukleotidi predstavljajo zaporedno zapisane dedne informacije pri posamezniku. Tako različne vrste organizmov kot tudi osebkci znotraj iste vrste se med seboj razlikujejo po številu nukleotidov in njihovem zaporedju. To zaporedje pa je za vsak organizem značilno, kajti v njem so zapisana dedna sporočila, kako naj se celice v organizmu razvijejo in kako naj delujejo.

Čeprav se delež dušikovih baz v različnih DNA razlikuje, se ohranja razmerje med adeninom in timinom ter med gvaninom in citozinom, ki je vedno okrog ena. Tudi to je eden od dokazov, da so baze v DNA v parih in da je DNA pravzaprav sestavljena iz dveh vzporednih verig nukleotidov, ki sta med seboj povezani prek dušikovih baz. Adenin-nukleotid se poveže s timin-nukleotidom, citozin-nukleotid pa z gvanin-nukleotidom preko vodikovih vezi.

Obe vzporedni verigi nukleotidov se ovijata ena okrog druge in potekata v nasprotnih smereh (antiparalelno). Molekula DNA je kot dvojna vijačnica še dodatno zvita. Osnovno ogrodje teh dveh verig nukleotidov tvorijo sladkorji in ostanki fosforne kisline, prečno pa sta verigi v rednih presledkih povezani z dušikovimi bazami. Prečni pari dušikovih baz se pojavljajo v različnih zaporedjih. Baze so med sabo povezane z vodikovimi vezmi. Adenin in timin sta povezana z dvema vodikovima vezema, gvanin in citozin pa s tremi. Druga povezava je trdnejša kot prva in zato so molekule DNA z večjim številom parov gvanina in citozina odpornejše proti višjim temperaturam.



*Slika 1.3.2: Struktura in sestava molekule DNA.*

### **Postopek izolacije nukleinskih kislin**

Postopki za izolacijo določenega tipa nukleinskih kislin (plazmidna DNA, virusna DNA, kromosomska DNA ali RNA) iz celic so lahko različni, imajo pa nekatere skupne značilnosti. Pri vsakem postopku izolacije najprej sprostimo DNA z razbitjem posameznih celic (liza celic). V posameznih stopnjah nato odstranimo ostanke celic, proteine, majhne molekule in neželene



nukleinske kisline. Za učinkovitejšo odstranitev proteinov iz vzorca se lahko uporabi ekstrakcija s fenolom. Uporabni so tudi različni nosilci, na katere se pri določenih pogojih selektivno veže le nukleinska kislina, nečistoče pa ostanejo v supernatantu. Za izolacijo nepoškodovanih nukleinskih kislin je tudi pomembno, da takoj po lizi celice inaktiviramo nukleaze, ki bi lahko razgradile nukleinsko kislino. Uporabimo lahko ekstrakcijski pufer z bolj ali manj močnim proteinskim denaturantom (gvanidinijev hidroklorid, gvanidinijev izotiocianat, natrijev dodecilsulfat) ali pa proteine s proteinazo K encimsko razgradimo. Manjše molekule (ione, aminokislino, nukleotide) odstranimo iz vzorca z alkoholnim obarjanjem DNA.

Pri izolaciji DNA moramo biti pazljivi, kadar imamo opravka z dolgimi molekulami. Ko želimo izolirati fragmente DNA, daljše od 50 kb, se moramo izogniti delovanju strižnih sil na molekule. Zaradi dolžine takšne molekule DNA težje raztapljamo, tako da jih moramo obarjati zelo previdno.

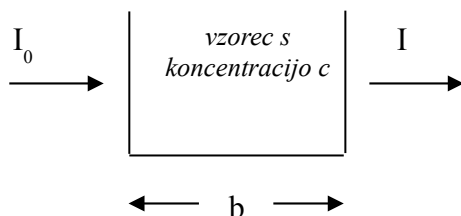
### Vrednotenje pridobljene izolirane nukleinske kisline s spektrofotometrijo

Spektrofotometrično določanje DNA je enostavno in natančno, kadar so vzorci čisti in ne vsebujejo večjih količin proteinov, fenolov, agaroze ali drugih nečistoč. V skladu z *Beer-Lambert* -ovim (ali *Beer*-ovim) zakonom, je absorbanca  $A$  premo sorazmerna logaritmu razmerja med intenzivnostjo svetlobe ( $I$ ), ki je prešla skozi vzorec in začetno intenzivnostjo svetlobe ( $I_0$ ):

$$A = -\log T = -\log (I / I_0)$$

Izmerjena absorbanca je hkrati premo sorazmerna produktu valovne dolžine  $\lambda_a$ , dolžine optične poti  $b$  in koncentracije vzorca  $c$ :

$$A = \lambda_a \cdot b \cdot c$$



**Slika 1.3.3:** Absorpcija svetlobe vzorca s koncentracijo  $c$ .

Za določanje koncentracije DNA uporabljamo merjenje absorbance  $\lambda_a$  pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm. Nukleinske kisline imajo svoj absorpcijski maksimum pri 260 nm. Izmerjena  $A_{260} = 1$  pomeni, da je v vzorcu koncentracija dvoverižne DNA 50  $\mu\text{g/ml}$ . Če analiziramo enoverižno DNA,  $A_{260} = 1$  pomeni, da je koncentracija v vzorcu 40  $\mu\text{g/ml}$ . Absorpcija svetlobe je linearno odvisna od koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu, dokler so vrednosti absorbance pod 1. Razmerje med  $A_{260}$  in  $A_{280}$  nam pove, kako čist je vzorec. Razmerje  $A_{260}/A_{280}$  je pri čistem vzorcu večje od 1,8. Nečistoče v vzorcu bistveno zmanjšajo razmerje med obema absorbancama.

## 1.4. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

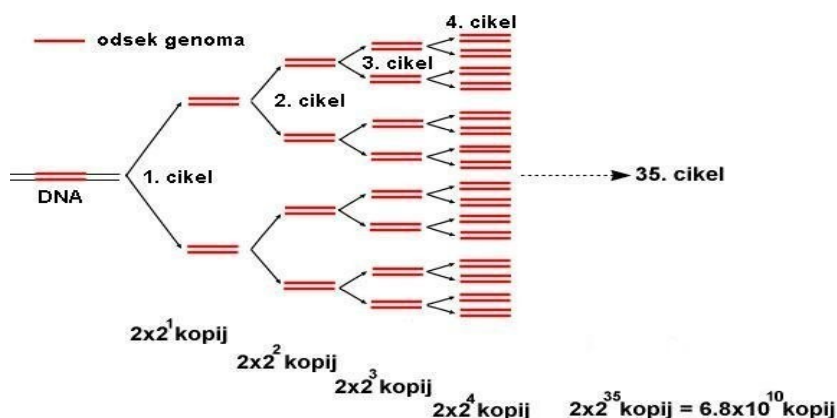
Verižna reakcija s polimerazo, znana pod angleško kratico PCR (Polymerase Chain Reaction), je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Razvil jo je leta 1983 ameriški biokemik Kary Mullis, za kar je leta 1993 prejel Nobelovo nagrado za kemijo. PCR

omogoča direktno kloniranje genomske DNA ali cDNA, ne da bi za to potrebovali žive celice, usmerjeno mutagenezo DNA, analizo majhnih količin DNA in različne diagnostične metode.

Kopiranje odsekov DNA poteka tako, da uporabimo dve kratki molekuli DNA, ki sta komplementarni začetnemu in končnemu delu odseka, ki ga želimo kopirati, dodamo encim, raztopino soli in deoksiribonukleotide (gradnike DNA). Reakcija poteka verižno, kar pomeni, da jo večkrat ponovimo. Pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji. 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 tarčno DNA, ki jo želimo pomnoževati, je namreč nujno, da je le-ta v enoverižni obliki (DNA je običajno dvoverižna molekula), to pa dosežemo tako, da DNA za kratek čas segrejemo na 92°C ali več. Da pride do prileganja začetnih oligonukleotidov na tarčno DNA je nato potrebno temperaturo znižati pod temperaturo tališča vezave začetnih oligonukleotidov, zatem pa spet prilagoditi pogojem, ki so optimalni za delovanje encima DNA-polimeraze.

Nekaj let po tem, ko je Mullis opisal metodo PCR, so jo drugi avtorji izpopolnili tako, da so namesto DNA-polimeraze iz bakterije *Escherichia coli* (ta ima optimalno temperaturo za delovanje 37°C in pri visokih temperaturah denaturacije DNA razpade) uporabili polimerazo iz bakterije *Thermus aquaticus*, ki so jo našli v vročih vrelcih ameriškega narodnega parka Yellowstone. Ta polimeraza optimalno deluje pri 72°C, prenese pa tudi kratkotrajna segrevanja nad 90°C. Zato odtlej ni bilo več potrebno v vsakem ciklu dodati svežega encima, kar je omogočilo avtomatizacijo postopka.

PCR izvajamo v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati. Določimo lahko temperature, trajanje inkubiranja, število ponovitev krogov pomnoževanja in podobno. Reakcije potekajo v volumnih od 20 µl do 100 µl. Pri klasični izvedbi, ki je še vedno najbolj pogosta, po končani reakciji produkte analiziramo z elektroforezo v agaroznem gelu. Novejša izvedba, PCR v realnem času (RT - PCR), pa omogoča sprotno zasledovanje količine nastalega produkta in je zato hitrejša, omogoča pa tudi kvantificiranje točno določene DNA v začetnem vzorcu.



**Slika 1.4.1:** Verižna reakcija s polimerazo (PCR).

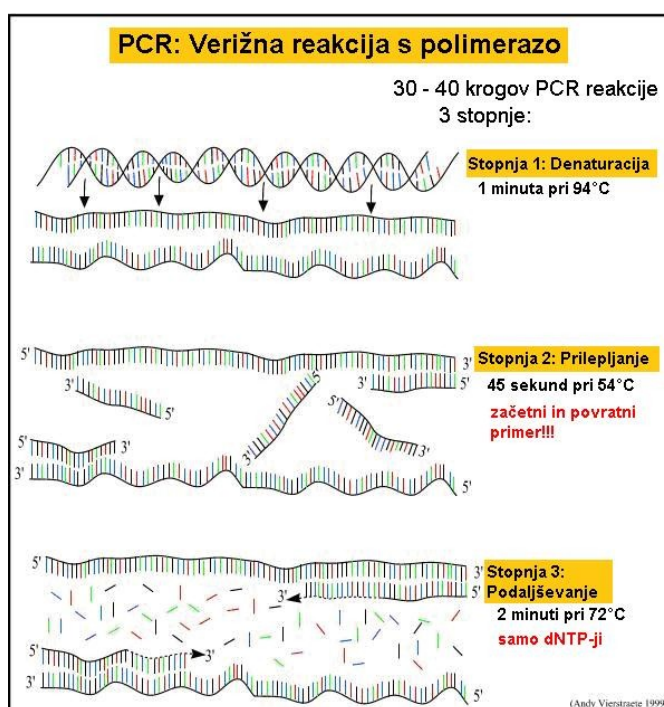
### 1.4.1. Pogoji kroga pomnoževanja

En krog reakcije verižne polimerizacije je sestavljen iz treh stopenj. Pri vsaki stopnji kroga reakcije moramo določiti temperaturo, pri kateri se bo stopnja reakcije izvajala in čas trajanja stopnje. Pri prvi stopnji - denaturaciji izberemo temperaturo in čas, pri kateri dvovijačna DNA že razpade, hkrati pa ne povzročimo bistvene inaktivacije encima. Optimalna temperatura stopnje denaturacije je zato med 92°C in 95°C, trajanje pa med 15 s in 1 min.

Temperaturo druge stopnje, stopnje vezave začetnih oligonukleotidov, naravnoma približno 5°C pod temperaturo tališča vezave oligonukleotidov na tarčno DNA. Pri taki temperaturi je statistično specifično vezanih 95% oligonukleotidov, kar je dovolj za uspešno pomnoževanje, hkrati pa je verjetnost za nespecifično vezavo oligonukleotidov majhna. Čas, v katerem dosežemo vezavo oligonukleotidov, je odvisen od koncentracije oligonukleotidov. Pri koncentracijah, ki se običajno uporabljajo (0,2 do 1mM), je ta čas 15 s. Trajanje stopnje vezave oligonukleotidov določimo med 30 s in 1 min, da DNA-polimeraza doda nekaj nukleotidov in ostane nastali dupleks stabilen tudi pri višjih temperaturah, to je pri temperaturi tretje stopnje, stopnje podaljševanja verige DNA.

Temperaturo stopnje podaljševanja verige DNA določimo glede na optimalno temperaturo ( $T_{opt.}$ ) encima, ki ga uporabljamo.  $T_{opt.}$  večine termostabilnih polimeraz, ki se uporabljajo v molekularni biologiji, je med 72°C in 80°C. Čas trajanja stopnje podaljševanja verige DNA določimo glede na dolžino fragmenta, ki ga pomnožujemo. Hitrost delovanja DNA-polimeraze je pri 72°C 35-100 bp/s. Za pomnoževanje odseka, dolgega 2000 bp, naj bi tako zadostovala 1 minuta.

Optimalno število krogov PCR-ja je odvisno predvsem od koncentracije tarčne DNA. Preveliko število krogov PCR-ja privede do nastanka večjih količin nespecifičnih produktov in produktov z napačno vgrajenimi nukleotidi. V reakcijo moramo dodati toliko tarčne DNA, da se v 25-30 ciklih sintetizira dovolj pomnožene DNA, da jo lahko zaznamo in nam zadošča za nadaljnje delo.



Slika 1.4.2: Shematski prikaz stopenj pri PCR metodi.

### 1.4.2. Začetni oligonukleotidi

Če želimo uspešno pomnožiti želeni odsek DNA, moramo pri izbiri zaporedja v tarčni DNA, na osnovi katerega sintetiziramo začetne oligonukleotide, biti pozorni na določene dejavnike. Oligonukleotid naj bi bil dolg 18-28 nukleotidov (nt) s 50-60 % deležem G in C. S tem dosežemo dovolj visoko temperaturo vezave oligonukleotida in je nespecifična vezava manj verjetna. Za oligonukleotide takšnih dolžin je za enostavno računanje temperature tališča najprimernejše pravilo Theina in Wallaca (1986):

$$T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$$

Temperatura tališča mora biti podobna za oba oligonukleotida. Če se njuni temperaturi bistveno razlikujeta ( $>5^\circ\text{C}$ ), ne moremo doseči optimalne vezave. Nespecifična vezava enega oligonukleotida pa vodi v enako nezaželene rezultate, kot če dopustimo verjetnost za nespecifično vezavo obeh. V posameznem začetnem oligonukleotidu ne sme biti komplementarnih regij, daljših od 4 nt. Pri temperaturi vezave oligonukleotidov se lahko pojavijo sekundarne strukture znotraj zaporedja oligonukleotida, kar onemogoča vezavo oligonukleotida na tarčno DNA. Paziti moramo, da ne izberemo oligonukleotidov tako, da sta 3'-konca izbranega para komplementarna, saj se v takem primeru v stopnji vezave oba oligonukleotida povežeta med sabo in ne na tarčno DNA. Tako dosežemo le podvojevanje oligonukleotidnega dimera in ne zelene DNA.

### 1.4.3. Sestava reakcijske raztopine

Pri PCR postopku so v reakcijski raztopini:

- štiri deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP);
- encim DNA-polimeraza;
- pufer, ki zagotavlja optimalno delovanje encima;
- osnovni odsek dvoverižne DNA, ki ga želimo pomnožiti;
- dva začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna vsak enemu koncu odseka.

Za izbrani encim mora imeti reakcijski pufer optimalno pH vrednost in ionsko jakost. Kritična je optimizacija koncentracije ionov  $\text{Mg}^{2+}$  v reakcijski zmesi. Koncentracija ionov  $\text{Mg}^{2+}$  lahko vpliva na vezavo začetnih oligonukleotidov, na temperaturo denaturacije dvoverižnih molekul DNA, na specifičnost produktov, na nastanek oligonukleotidnih dimerov ter na encimsko aktivnost in natančnost. Optimalno koncentracijo ionov  $\text{Mg}^{2+}$  moramo določiti za vsako reakcijo posebej, saj je odvisna od kombinacije oligonukleotidov, tarčne DNA in encima, ki jih uporabljamo. Običajno je optimalna koncentracija ionov  $\text{Mg}^{2+}$  za 0,5-2 mM večja od skupne koncentracije vseh dNTP-jev. Pri dodanih dNTP-jih moramo paziti, da je koncentracija vseh štirih v reakcijski raztopini enaka. S tem zmanjšamo verjetnost vgrajevanja napačnih nukleotidov v PCR produkt. Verjetnost napačnega vgrajevanja se poveča tudi, če je koncentracija dNTP-jev previsoka. Optimalno koncentracijsko območje je med 20 in 200 pM posameznega dNTP-ja. V večini primerov je 20  $\mu\text{M}$  posameznega dNTP-ja dovolj, saj zadošča za sintezo 2,6  $\mu\text{g}$  DNA.

V reakcijsko raztopino dodajamo tudi kemikalije, ki povečujejo učinkovitost in specifičnost PCR-ja. Večjo učinkovitost reakcije dosežemo z reagenti, ki stabilizirajo encim (s proteinom albuminom, želatino, glicerolom). Če želimo pomnoževati DNA z visokim odstotkom baznih parov GC, je lahko problematična stopnja denaturacije. V takih primerih lahko dodamo formamid, ki zniža  $T_m$  ali pa betain. Specifičnost reakcije povečamo, če dodamo protein SSB (Single-Strand Binding) iz bakterije *E. coli*, ki stabilizira enoverižno DNA. Pri podvojevanju dolgih odsekov se lahko pirofosfat nakopiči do tako visokih koncentracij, da se ravnotežje reakcije dodajanja nukleotidov

prevesi v odvzemanje nukleotidov. V takem primeru lahko dodamo termostabilno pirofosfatazo.

#### **1.4.4. Izbira tipa DNA-polimeraze**

V metodah molekularne biologije se najdlje uporablja *Taq* DNA-polimeraza, ki nima 3'-eksonukleazne aktivnosti in zato je verjetnost napačno vgrajenega nukleotida precej velika. Pomembna lastnost *Taq* polimeraze je, da na 3'-koncu produkta doda nukleotid, običajno A, po koncu tarčne DNA. Na voljo so tudi druge termostabilne DNA-polimeraze, izmed katerih so nekatere sposobne sinteze daljših produktov, druge vgrajujejo nukleotide z manjšo pogostnostjo napak, nekatere sintetizirajo samo tope konce DNA, nekatere pa združujejo več opisanih lastnosti. V splošnem pa so vsi encimi manj učinkoviti od *Taq* DNA-polimeraze.

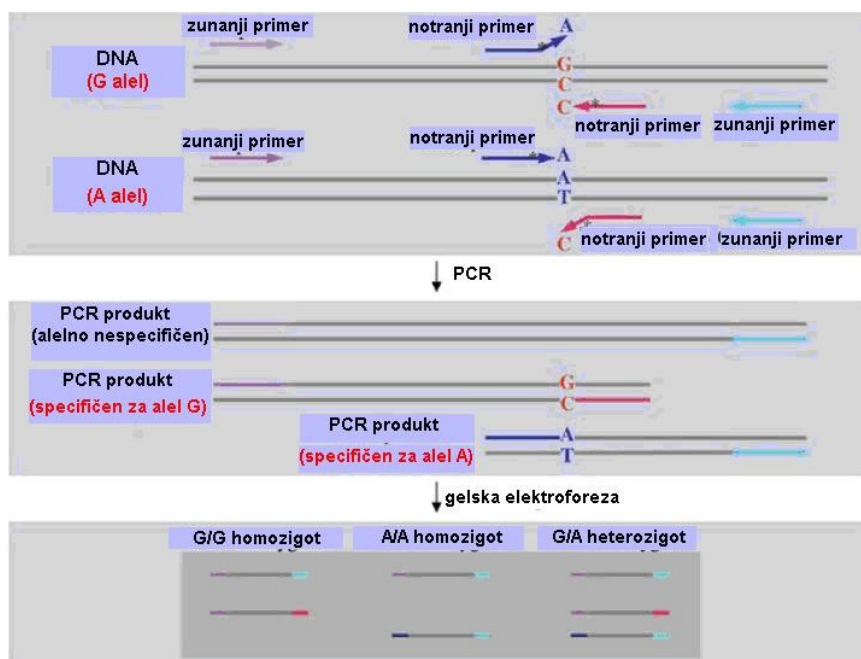
#### **1.4.5. Uporaba PCR - ja**

PCR metode bi lahko razdelili na metode, ki se uporabljajo v raziskovalne namene, in metode, ki so aplikativnega značaja. Pomembnejši primeri uporabe PCR-ja so sledeči:

- direktno določevanje nukleotidnega zaporedja fragmentov DNA, brez predhodne stopnje vgrajevanja v plazmid;
- analiza zelo majhnih količin nukleinskih kislin in redkih nukleinskih kislin;
- kloniranje odsekov DNA in manipulacija nukleotidnega zaporedja odseka. Pripravimo lahko primerne konce odseka za direktno kloniranje ali za sestavljanje več odsekov. Posamezne nukleotide v DNA lahko zamenjamo z usmerjeno mutagenozo s pomočjo PCR-ja. Prav tako lahko s pomočjo PCR-ja v nekaj urah namnožimo katerikoli odsek DNA (priprava sond);
- lažjo analizo genskih prepisov (pri RT-PCR je PCR povezan s predhodno sintezo cDNA z reverzno transkriptazo; metoda diferencialni prikaz ('differential display') pa omogoča prepoznavo in izolacijo genov, katerih izražanje se spreminja pri pogojih, ki jih proučujemo);
- analiza organizacije genov, kadar poznamo nukleotidno zaporedje cDNA;
- določevanje relativnih količin neke določene mRNA v določenem vzorcu (kvantitativna PCR metoda, kjer v reakcijsko zmes dodamo DNA znane količine, s parom ustreznih začetnih oligonukleotidov);
- v medicinski diagnostiki je PCR metoda izrinila nekatere klasične metode npr. točkovno hibridizacijo (uporablja se za določevanje prisotnosti virusov in bakterij v vzorcih bolnikov, pri predporodni diagnostiki ugotavljamo najrazličnejše motnje pri zarodku, uporablja se v diagnostiki rakavih obolenj), najhitrejša metoda za ugotavljanje enobaznih polimorfizmov v genomu je alelna specifična verižna reakcija s polimerazo;
- forenzične preiskave, za identifikacijo oseb.

#### **1.4.6. Alelna specifična verižna reakcija s polimerazo**

Alelna specifični PCR uporabimo kadar v genomu določamo enobazni polimorfizem (single nucleotide polymorphism, SNP). Specifičnost verižne reakcije s polimerazo temelji na specifični hibridizaciji začetnih oligonukleotidov na tarčno DNA. Med fazo pritrditve začetnih oligonukleotidov nastane dvojna vijačnica med začetnim oligonukleotidom in denaturirano tarčno DNA katere 3' konec (OH skupina) je mesto, ki ga prepozna DNA polimeraza da začne sintezo druge komplementarne verige. Za uspešnost sinteze nove verige je bistveno predvsem ujemanje zadnje 3' baze z ustrežno komplementarno bazo na tarčni verigi. Shematski prikaz alelna specifične verižne reakcije s polimerazo je prikazan na sliki 1.4.3.



*Slika 1.4.3: Shema poteka alelno specifične verižne reakcije s polimerazo.*

V primeru neujemanja zadnje 3' baze s podlago je za DNA polimerazo bistveno težje ali celo nemogoče nadaljevati verigo. Če nastane takšna situacija pri podvojevanju DNA v humani celici, ima človeška DNA polimeraza na voljo dodatno encimsko aktivnost, 5'-3' eksonukleazno aktivnost, ki omogoča odstranitev neustrezno vgrajene baze in nadaljevanje sinteze ("proofreading"). Pri verižni reakciji s polimerazo se uporablja Taq DNA polimeraza, ki je termostabilna, vendar nima dokazljive eksonukleazne aktivnosti v smeri 3'-5'. Zato v opisanem primeru neujemanja zadnje 3' baze s podlago Taq DNA polimeraza tega neujemanja ne more popraviti in je sinteza močno otežena ali onemogočena. To dejstvo se lahko izkoristi za uporabo PCR reakcije za dokazovanje prisotnosti razlik v zaporedju nukleotidov v tarčni DNA.

Za človeško DNA je znano, da obstaja zelo veliko število mest v genomu, kjer se zaporedje nukleotidov pri različnih osebah razlikuje - gre za polimorfizme. Najmanjša možna sprememba je SNP, medtem ko so največje spremembe lahko velike več megabaznih parov (Mbp). Te razlike v zaporedju nukleotidov se imenujejo aleli. Ker je genom v tipični človeški celici z jedrom prisoten v dveh kopijah (diploidnost), je lahko posameznik na nekem dvoalelnem polimorfem mestu heterozigot in nosilec obeh alelov oz. homozigot in nosilec dveh enakih kopij posameznega alela. Število alelov ni nujno omejeno na 2 in je lahko višje.

Za uspešno pomnoževanje tarčnega odseka DNA je potrebno pri izbiri začetnih oligonukleotidov upoštevati določene dejavnike. Oligonukleotid naj bi bil dolg 18 - 28 bp s 50-60 % deležem G in C. V posameznem začetnem oligonukleotidu ne sme biti komplementarnih regij, daljših od 4 bp.

## **1.5. Agarozna gelska elektroforeza**

Agarozna gelska elektroforeza je standardna metoda, ki se uporablja za ločevanje, prepoznavo, pa tudi čiščenje DNA/odsekov DNA.

### ***1.5.1. Agarozna in priprava agaroznega gela***

Agaroz je linearni polimer s ponavljajočim dimerom D-galaktoze in 3,6-anhidro-L-galaktoze. Agarozni gel pripravimo tako, da trdno agarozo v obliki soli s segrevanjem raztopimo v elektroforeznem pufu. Z ohlajevanjem raztopine tvori agaroz gel, katerega gostota je odvisna od koncentracije agaroze.

### ***1.5.2. Potovanje molekul v agaroznem gelu***

Potovanje molekul DNA v gelu je mogoče pod vplivom električnega polja. Molekula DNA je zaradi negativno nabitih fosfatnih skupin, nabita negativno. Zaradi negativnega naboja potuje DNA proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Hitrost potovanja DNA skozi agarozni gel je odvisna od več dejavnikov, in sicer velikosti molekule DNA, oblike DNA (krožna, linearna, sproščena oblika), jakosti električnega polja, sestave elektroforeznega pufa, koncentracije agaroze in dodanih interkalirajočih barvil.

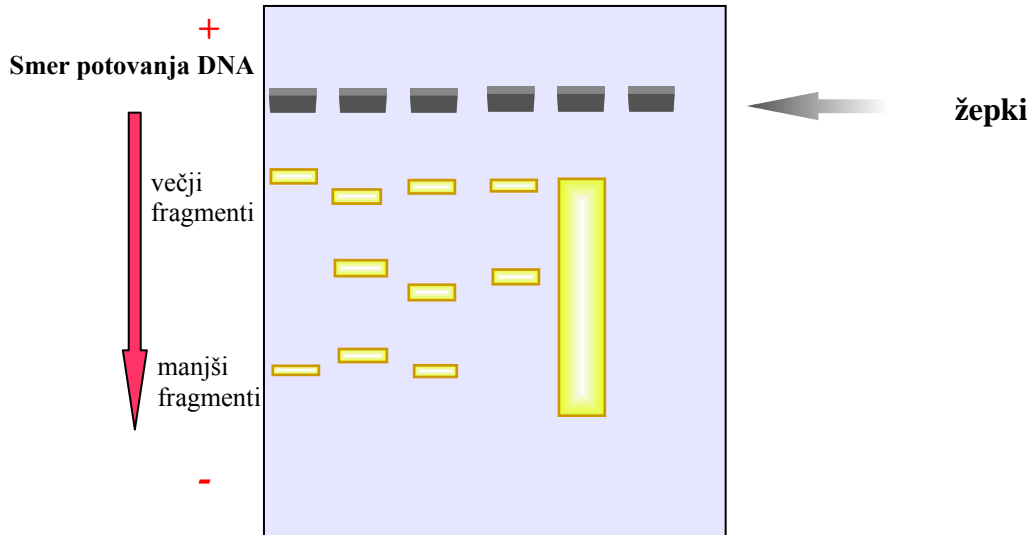
Krajše-manjše molekule potujejo hitreje, ker se lažje prebijajo skozi pore v gelu in ker imajo manjši upor trenja. Z agaroznimi geli lahko v električnem polju ločujemo molekule velikosti 100-50000 bp. Relativna hitrost posamezne oblike je odvisna od koncentracije agaroze, jakosti električnega polja in ionske jakosti pufa. Pod pogoji, ki jih običajno uporabljamo pri agarozni elektroforezi, potuje najhitreje dodatno zvita krožna molekula, nekoliko počasneje linearna in najpočasneje molekula v sproščeni obliki. Linearna DNA določene velikosti potuje skozi gele z različnimi koncentracijami agaroze z različno hitrostjo. V gelu z visoko koncentracijo agaroze molekule potujejo počasneje. Zato lahko v gelu določene gostote ločujemo le molekule določenih velikosti. Večje molekule ločujemo v gelih z nižjo koncentracijo agaroze. Pri nizki napetosti je hitrost potovanja linearne DNA proti anodi sorazmerna z uporabljenimi jakostjo električnega polja. Za ločevanje molekul, večjih od 2 kb, moramo zato uporabljati napetost, ki je manjša od 5 V/cm razdalje med elektrodama. Prisotnost ionov v pufu je potrebna, da skozi gel teče tok potreben za gibanje molekul. Za ločevanje dvovijačne DNA uporabljamo kombinacijo EDTA in Tris-acetata (TAE), Tris-borata (TBE) ali Trisfosfata (TPE) s približno 50 mM koncentracijo ionov.

Na hitrost potovanja DNA pa ne vplivata: zaporedje nukleotidov DNA in temperatura pri kateri teče elektroforeza. Paziti moramo le, da ne presežemo temperature tališča gela.

### ***1.5.3. Analiza elektroforeznih fragmentov***

Fragmenti DNA so lahko označeni na različne načine. Eden najpogosteje uporabljenih je označevanje s fluorescentnim barvilom, specifičnim za DNA, kot je na primer etidijev bromid (EtBr). Zaradi njegove sposobnosti vgradnje v DNA, je EtBr znan mutagen, zato so na voljo tudi varnejše alternative, ki pa so običajno precej dražje za proizvodnjo (novejše variante SYBR barvil). Tako označene fragmente nato pod UV lučjo analiziramo na gelu, na katerem vidimo v posameznem vzorcu različno daleč pripotovalne fragmente ali pasove ali črtice, ki predstavljajo različne skupine molekul z različnimi molekulskimi masami. Velikost fragmentov se običajno podaja v nukleotidih, baznih parih ali kb (tisoč baznih parov), odvisno ali se je ločevala enoverižna ali dvoverižna DNA.

Ker molekule DNA, obarvane z fluorescenčnim barvilom, niso vidne pod naravno svetlobo, moramo vzorcu dodati še negativno nabit nanašalni pufer, preden ga naložimo v gel. Nanašalni pufri so uporabni, ker so vidni pod naravno svetlobo in se premikajo z enako hitrostjo kot DNA določene dolžine. Pri agarozni gelski elektroforezi se lahko uporablja več pufrov. Med pogosteje uporabljane spadajo: tris-acetatni pufer ali TAE (tris/acetat/EDTA), tris-boratni pufer ali TBE (tris/borat/EDTA) ter litijev-boratni pufer ali LB.



*Slika 1.4.4: Shema agaroznega gela po izvedeni elektroforezi, pripravljenega za analizo DNA fragmentov.*



### 3. PROTOKOLI VAJ

#### 2.1. 1. VAJA: Izolacija DNA

##### 2.1.1. Izvedba vaje

Vajo sestavljajo trije deli:

- 1. DEL: Predstavitve teoretičnih osnov tehnik molekularne biologije za potrebe medicinske biotehnologije.
- 2. DEL: Praktični prikaz in samostojna izvedba izolacije genomske DNA iz periferne venske krvi.
- 3. DEL : Praktični prikaz in izvedba spektrofotometrične določitve koncentracije pridobljene DNA.

##### 2.1.1.1 Protokol za izolacijo DNA iz levkocitov

Vzorcu periferne venske krvi (5 do 10 ml)z dodanim antikoagulantom EDTA dolijemo raztopino SLR (20 mM Tris HCl, 5 mM EDTA) do oznake 30 ml in raztopino močno pretresemo - cilj je izprazniti konice centrifugirke (pri obratu na glavo mora biti konica prazna). Vzorec mora biti ustrezno označen z dodeljeno šifro. Centrifugiramo 8 min pri 1600 obratih/min. Previdno odlijemo supernatant v stekleno čašo, ki je namenjena za odpad.

Ponovno dolijemo raztopino SLR do oznake 30 ml, močno ročno premešamo (centrifugiranje lahko oprijem levkocitov tako poveča, da jih moramo zelo močno pretresti). Centrifugiramo 8 min pri 1800 obr/min. Ponovno odlijemo supernatant v čašo za odpad. Pelet levkocitov je bled oz. minimalno obarvan z eritrociti (glavni cilj spiranja je odstranitev eritrocitov).

Peletu dodamo 2 ml raztopine SLR (če nam je predhodno ostalo cca 2ml supernatanta sedaj SLR ne dodajamo), močno premešamo, da se pelet levkocitov popolnoma razbije in nastane suspenzija celic. Dodamo 3ml raztopine SLB (20 mM TRIS, 50 mM NaCl, 10 % SDS) in raztopino dobro premešamo, lahko tudi z električnim mešalom (vortexom). Takšen lizat se lahko hrani pri 4°C do mesec dni.

Zavremo destilirano vodo in lizat v kropu inkubiramo vsaj 5min.

- Dodamo 1/3 volumna 9.5 M amonijevega acetata (za odstranitev proteinov in ostankov membran) in močno premešamo z vortexom.
- Centrifugiramo 10 min pri 2800 obr/min in nato supernatant prenesemo (previdno prelijemo) v novo centrifugirko (**z označeno šifro vzorca**).
- Dodamo (dolijemo) 1x volumen izopropanola in počasi z obračanjem epruveto premešamo, ter spremljamo nastanek meduze – nitke DNA.
- Meduzo s Pasteurjevo pipeto previdno prenesemo v 1.5 ml epico (**označeno**). Speremo jo tako, da dodamo 100ul 100% etanola, epruvetko zapremo, v roki premešamo. Meduza se pri tem mora spustiti na dno epruvetke.

10. Odpipetiramo supernatant, (pazimo, da ne meduze-DNA), ter na sobni temperaturi v stojalu pustimo DNA v odprti epruvetki sušiti čez noč.

11. DNA se posuši, ko odstopi od stene. Raztopimo jo v 200 µl raztopine TE (Tris HCl, EDTA) ter premešamo. Raztopljena DNA se hrani pri 4°C.

### 2.1.1.2. Protokol za spektrofotometrično določitev koncentracije DNA

Za merjenje koncentracije izolirane DNA uporabljamo redčen vzorec, ki ga pripravljamo v kiveti, posebni epruveti, namenjeni za spektrofotometer (Eppendorf). Vzorec pripravimo tako, da 3µl vzorčne DNA raztopimo v 100µl bidestilirane vode.

Pred prvo meritvijo s spektrofotometrom ga moramo najprej umeriti:

#### 1) UMERJANJE

- kiveto napolnimo z 100 µl vode in pritisnemo gumb **BLANK**

#### 2)UPOŠTEVANJE REDČENJA VZORCA

- Pritisnemo gumb **DILUTION** in vpišemo ustrezno razmerje redčenja vzorčne DNA (3:100); nato pritisnemo gumb **ENTER**;

#### • PRIPRAVA IN MERITEV VZORCA DNA

- V kiveto najprej odpipetiramo 100 µl bidestilirane vode, dodamo 3µl izbranega vzorca DNA ter s pipeto premešamo (brez zračnih mehurčkov). Kiveto nato **pravilno** orientirano postavimo v spektrofotometer in pritisnemo gumb **SAMPLE**. Odčitamo **izmerjeno** koncentracijo in čistost izbranega vzorca DNA.

Meritev ponovimo 3 x in izračunamo povprečno vrednost meritev.

### 2.1.1.3 Poročilo o opravljeni vaji

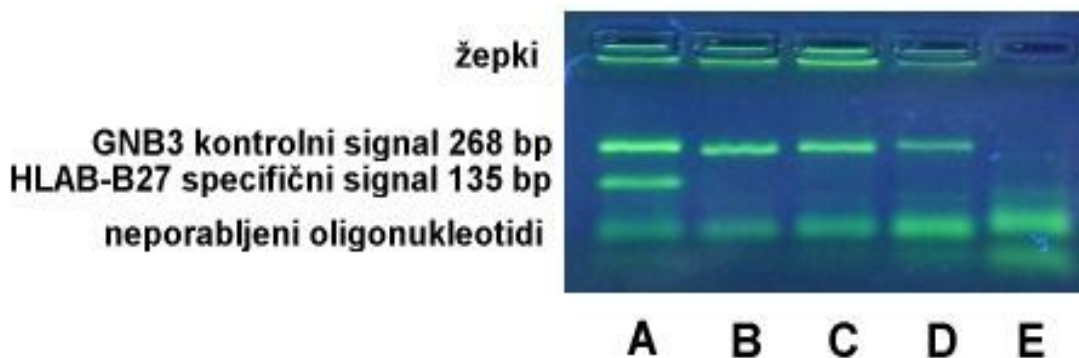
Pripravimo poročilo o opravljeni vaji skladno z navodili za pripravo poročil o opravljenih vajah (poglavje 4) in ga oddamo asistentki v pregled in oceno.

## 2.2. 2. VAJA: B27 alelna specifična verižna reakcija s polimerazo

### 2.2.1. Opis testa za določanje prisotnosti alela B27 gena HLA-B

Zelo zanesljiv način dokazovanja HLA-B27 je ugotavljanje prisotnosti gena za varianto proteina B27. Razlike v aminokislinskem zaporedju so posledica razlik v zaporedju nukleotidov v genu HLA-B in to variabilnost gena je mogoče elegantno dokazovati s pomočjo alelna specifične reakcije PCR. Pri tem se izkoristi razlike v zaporedju nukleotidov in izbere takšne začetne oligonukleotide, da se bodo zanesljivo pomnožila samo tista zaporedja nukleotidov, ki so značilna za HLA-B27, medtem ko se vse druge različice ne pomnožijo. Ključnega pomena pri načrtovanju takšne alelna specifične PCR reakcije je izbira takega položaja začetnih oligonukleotidov, da se najmanj zadnja 3' baza enega in/ali obeh začetnih oligonukleotidov ujema samo z nukleotidnim zaporedjem alela B27 in ne katerega od ostalih B alelov. Rezultat pomnoževanja alelna specifične reakcije je prisoten PCR produkt na gelu samo v primeru, ko je v tarčni DNA prisoten alel B27, sicer na gelu ni signala. Opisana reakcija zahteva še notranjo kontrolo pomnoževanja PCR reakcije. Zato se v isto reakcijsko mešanico vedno doda še par začetnih oligonukleotidov za en drug odsek,

ki se vedno pomnoži. Tako se preverja možnost lažno negativnih reakcij; gre za stanje, da odsotnost produkta pomnoževanja ni posledica odsotnosti alela B27, temveč odsotnosti pomnoževanja zaradi najrazličnejših vzrokov (npr. priprave pomanjkljive reakcijske zmesi) (Slika 2.2.1).



**Slika 2.2.1:** Agarozni gel s produkti alelno specifične reakcije PCR. V kolonah A-D so prisotni produkti pomnoževanja; HLA-B27 pozitiven je vzorec v koloni A, ostali trije so negativni. V koloni E ni signalov, ker gre za negativno kontrolo brez dodane genomske DNA, s katero se preverja morebitno specifično pomnoževanje oz. stopnja kontaminacije.

Med značilnosti opisanega testa sodi tudi dejstvo, da je rezultat pri heterozigotnih nosilcih enega alela HLA-B27 enak kot pri homozigotnih nosilcih dveh alelov HLA-B27, saj test ne omogoča razlikovanja obeh stanj. Glede na objavljeno literaturo, število alelov HLA-B27 za njihov prispevek k določeni bolezni ni pomembno.

### 2.2.2. Izvedba vaje

Vajo sestavljata dva dela:

- 1. DEL: Priprava in izvedba alelno specifičnega PCR;
- 2. DEL: Izvedba agarozne gelske elektroforeze za detekcijo rezultatov.

#### 2.2.2.1. Priprava in izvedba alelno specifičnega PCR

Pripravimo naslednjo PCR raztopino:

- 2.0 µl dNTP
- 2.0 µl pufer
- 2.5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 1.0 µl mešanica začetnih oligonukleotidov
- 4.0 µl betain
- 0.5 µl Taq DNA-polimeraza
- 2.0 µl bidestilirana voda
- 1.0 µl genomska DNA

PCR nato izvedemo v ustrezno programiranem PCR termostatu.

### **2.2.2.2. Priprava in izvedba agarozne gelske elektroforeze**

1. **Priprava 3% agaroznega gela.** Odtehtamo 0,75 g agaroze v prahu in dolijemo do 25 ml raztopine TBE pufer (Tris-Borat-EDTA). Mešanico zavremo v mikrovalovni pečici in jo tekočo ter vročo vlijemo v gelski nosilec. Vstavimo elektroforezne glavničke in počakamo (15 min na sobni temperaturi), da se gel strdi. Ko je strjen, iz gela odstranimo glavničke, na njihovem mestu ostanejo žepki.
2. **Nanos vzorcev.** Gel z nosilcem vstavimo v elektroforezno posodo, napolnjeno z elektroforeznim pufrom. Sledi nanašanje vzorcev DNA z dodanim označevalcem.
3. **Priključitev elektroforeze.** Po zapolnitvi vseh žepkov na gelu priključimo elektroforezno posodo na vir električne napetosti, nastavimo potrebno napetost (običajno 160 V) in določen čas (10-15 min) izvajamo elektroforezo.
4. **Analiza rezultatov.** Po osvetlitvi gela z UV lučjo analiziramo dobljene rezultate pri posameznem vzorčku in jih primerjamo z kontrolnimi. Dobljen rezultat dokumentiramo.

### **2.2.2.3. Poročilo o opravljeni vaji**

Pripravimo poročilo o opravljeni vaji skladno z navodili za pripravo poročil o opravljenih vajah in ga oddamo asistentki v pregled in oceno.

### **3. LABORATORIJSKI PRIROČNIK**

#### **3.1. NAVODILA ZA VARNO DELO V LABORATORIJU**

Laboratorij ni javni prostor, v katerem se sme zadrževati kdorkoli. V vsakem času imajo pravico biti v laboratoriju le osebe, ki so tja takrat razporejene.

Vsak posameznik, ki dela v laboratoriju, ima svoje delovno mesto, za katerega odgovarja vključno s priborom, ki ga uporablja. Delovno mesto je dolžan zapustiti v skladu s predpisanim redom in čistočo laboratorija. Delovna površina mora biti čista, saj bi razlite kemikalije ogrožale tiste, ki bodo na posameznikovem delovnem mestu delali kasneje.

Nekatere kemikalije in pribor so v skupni rabi. Ni jih dovoljeno odnašati na svoje delovno mesto, saj bi s takim ravnanjem ovirali delo drugih. Ves čas morajo ostajati na mestih, ki so namenjena delu z njimi (na delovnih pultih).

Vsak posameznik, ki dela v laboratoriju mora upoštevati naslednja pravila za varno delo v laboratoriju:

- Laboratorij mora biti pred in med vajo aktivno prezračen.
- V laboratorij vstopamo v haljah.
- V laboratoriju ne jemo in ne pijemo.
- V laboratoriju vzdržujemo red in čistočo.
- Pred začetkom in po končanih vajah si skrbno umijemo roke.
- Osebni predmeti se ne odlagajo na laboratorijski pult.
- Dolge lase povežemo v čop.
- Pri delu uporabljamo osebno varovalno opremo (zaščitne rokavice, zaščitno masko) v skladu z navodili asistenta.
- Med delom se ne dotikamo obraza.
- Pred izvajanjem poskusov preučimo lastnosti kemikalij, ki jih bomo uporabljali (nalepka na steklenici oz. Varnostni list).
- S steklovino ravnamo previdno in v skladu z navodili asistenta. Po uporabi steklovino operemo in spravimo na za to določeno mesto.
- Kemikalije hranimo v dobro zaprtih, označenih posodah na za to določenem mestu. Odlivamo jih v za to namenjene, označene posode. Razlite kemikalije po potrebi nevtraliziramo in počistimo prostor ob prisotnosti in po navodilih asistenta. Ob večji koncentraciji hlapov zapustimo prostor.
- Kemikalije pipetiramo z avtomatskimi pipetami in ustreznimi nastavki.
- Odvečne količine kemikalij nikoli ne vračamo v posodo iz katere smo jo vzeli.
- Z aparati ravnamo previdno in v skladu z navodili asistenta. Napak na aparaturah ne

odpravljamo sami. Vsako motnjo javiti asistentu. Po uporabi jih izklopi asistent.

- S sistemom za ultra čisto vodo sme ravnati samo asistent.
- Vsako nezgodo javimo asistentu:
  - oskrbimo tudi najmanjše rane;
  - če pride do stika kemikalije s kožo ali očmi, spiramo z vodo minimalno 15 minut in poiščemo zdravniško pomoč (tel. 112);
  - če kemikalijo zaužijemo, pijemo vodo, ne izzovemo bruhanja in poiščemo zdravniško pomoč (tel. 112);
  - v primeru nezgod z električnim tokom aparat takoj izključimo iz omrežja;
  - v primeru zastoja utripa srca ali dihanja pričnemo z oživljanjem;
  - v primeru motenega delovanja aparatov se umaknemo iz njihove bližine;
  - če moramo zaradi poškodbe k zdravniku, vzamemo s seboj celotna navodila.

### **POSLEDICE NEUPOŠTEVANJA NAVODIL**

- Zdravstvene okvare.
- Ogrožanje okolice.
- Delovno pravne posledice, odstranitev z vaje in prepoved opravljanja vaj.

### 3.2. REAGENTI

Osnovne kemikalije, ki jih bomo uporabljali pri posamezni vaji, ter njihovi proizvajalci so podani v preglednici 3.2.

*Preglednica 3.2: Osnovne kemikalije in njihovi proizvajalci.*

Kemikalija	Proizvajalec
dATP	Fermentas
dTTP	Fermentas
dGTP	Fermentas
dCTP	Fermentas
PCR pufer	Fermentas
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas
Taq polimeraza	Fermentas
Agaroz	Gelly Phor
Syber green	Fluka
DMSO	Sigma
Ethylen glikol	Sigma
Trizma Base	Fluka
Boric Acid	Sigma
EDTA	Sigma
BFB	Sigma
Začetni oligonukleotidi	Sigma

Pri delu bomo uporabljali sledeče reagente:

#### SLR

Zmešamo 10 ml 2 M TRIS HCl in 10 ml 0.5 M EDTA ter dopolnimo do oznake 1L z destilirano H<sub>2</sub>O. Raztopino avtoklaviramo. Hranimo jo v hladilniku.

#### 2 M TRIS HCl (pH=8)

242.2 g TRIZMA BASE (Fluka) raztopimo v do 1L destilirane H<sub>2</sub>O. Po potrebi se pH umerja z koncentrirano HCl. Raztopino avtoklaviramo.

#### SLB

Zmešamo 5 ml 2 M TRIS, 10 ml 5 M NaCl in 20 ml 10 % SDS ter dopolnimo do oznake 1L z destilirano H<sub>2</sub>O. Raztopino avtoklaviramo in hranimo na sobni temperaturi.

#### 5 M NaCl

Natehtamo 292.2 g NaCl in jo raztopimo v do 1L destilirane H<sub>2</sub>O. Raztopino avtoklaviramo in hranimo pri sobni temperaturi.

### **9.5 M AMONIJEV ACETAT**

73.226 g AMONIJEV ACETAT (Sigma) počasi z mešanjem raztapljamo v do 100 ml destilirane H<sub>2</sub>O. Raztopino avtoklaviramo in hranimo pri sobni temperaturi.

### **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

186,1 g EDTA raztopimo v 700 ml vode. Z dodajanjem NaOH naravnamo pH na 8, da se EDTA raztopi. Nato dolijemo destilirano vodo do 1000 mL. Raztopino avtoklaviramo.

### **Pufer TE**

Zmešamo 10 mM Tris-HCl (pH 8) in 1mM EDTA (pH 8) in raztopino avtoklaviramo.

### **10% SDS**

SDS raztopimo v destilirani vodi. Raztopine ne avtoklaviramo. Hranimo jo pri sobni temperaturi.

### **5 x TBE**

54 g TRIZMA BASE, 27,5 g BORIC ACID (borove kisline) dodamo 20 mL 0,5 M EDTA ter dopolnimo do volumna 1000 mL z destilirano vodo.

### **Nanašalno barvilo za agarozni gel**

1 µL SYBR GREEN, 99 µL DIMETHYL SULFOXIDE – DMSO, 100 µL BFB, 50 µL ETHYLEN GLYCOL dodamo 50 µL bidestilirane vode.

### **BFB nanašalni pufer**

200 mg BROMPHENOL BLUE – BFB dodamo 50 mL redestilirane vode.

### **2mM dNTP**

Zmešamo 100 mM dATP, dCTP, dGTP in dTTP in dodamo bidestilirano vodo.



## 4. NAVODILA ZA PRIPRAVO POROČIL O OPRAVLJENIH VAJAH

Po opravljeni vaji napišite poročilo, ki naj bo pripravljeno smiselno in naj na kratko pokaže, kaj ste pri vaji naredili, ter da razumete obravnavano snov.

Vsako poročilo naj bo dolgo maksimalno dve strani in naj ga sestavljajo naslednje točke:

1. Ime in priimek študenta
2. Naslov vaje
3. Namen dela
4. Rezultati
5. Razprava

Pri vaji, za katero ste reagente pripravili sami, izjemoma vključite tudi točko „Metode in materiali“, pri kateri napišete kako ste pripravili (zatehtali, razredčili, ...) reagent. Pri vaji, kjer ste sami sestavili reakcijo, napišite tudi shemo pipetiranja. Vljudno vas prosiva, da ne opisujete postopka posamezne vaje, metode, teoretičnih osnov itd., kot je opisano v protokolih vaj.

Namen dela podate v enem do dveh stavkih.

Rezultati so zbirka vseh podatkov, ki ste jih dobili med vajo, vključno z vsemi opažanji, ki prispevajo k razjasnitvi naloge posamezne vaje.

Razprava vsebuje povzetek in razlago rezultatov. Če niste prišli do pričakovanega rezultata, poskušajte razložiti, kaj je vzrok za neuspeh oziroma, kje je po vašem mnenju prišlo do napake.

Poročila morate oddati najkasneje do petka istega tedna do 24<sup>h</sup> po e-pošti na naslednja e-naslova:

[alenka.erjavec@ukc-mb.si](mailto:alenka.erjavec@ukc-mb.si) (poročilo 1. vaje)

[spela.sh@ukc-mb.si](mailto:spela.sh@ukc-mb.si) (poročilo 2. vaje)

Prisotnost na vajah je obvezna, razen v primeru višje sile (bolezen), kar pa morate dokazati s potrdilom.

## 5. LITERATURA

B. Czepulkowski : **Analyzing Chromosomes**, 2001, Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK

R.-D. Wegner(Ed.) : **Diagnostic Cytogenetics**, 1999, Springer, Lab. Manual, Berlin Heidelberg New York

N. Kokalj Vokač, Andreja Zagorac : **Nove metode v medicinski citogenetiki, ZDRAV VEST 1999; 68: 165-70.**

S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **1988**, 16: 1215.

T. D. Gelehrter, F. S. Collins, D. Ginsburg: Principles of medical genetics. *Williams & Wilkins 1990*. Second edition.

J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller: Recombinant DNA. *Scientific American Books 1992*. Second edition. New York.

B. A. White: PCR protocols. *Methods in molecular biology 1993*, Vol. 15. Humana Press, Totowa.

M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White: PCR protocols. *A Guide to Methods and Applications 1990*, Academic Press, Inc, New York.

F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl: **1998**, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc, New York.

**T. D. Gelehrter, F. S. Collins, D. Ginsburg: Principles of medical genetics. Williams & Wilkins 1990. Second edition.**

M.J. Pollman, A. J. Zuccarelli: Rapid Isolation of High-molecular-weight DNA of Agarose Gels. *Anal Biochem* **1989**, 181: 12-17.

E. Southern: Determination of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol* **1975**, 98: 152-155.

R. Gödde, D.A. Akkad, L. Arning, G. Dekomien, J. Herchenbach, E. Kunstmann, M. Meins, S. Wiczorek, J.T. Epplen, S. Hoffjan: Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* **2006** ;27(5-6):939-46.

O. Dominguez, E. Coto, E. Martinez-Naves, S.Y. Choo, C. Lopez-Larrea Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics* **1992**, 36: 277.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003551.htm> , **2011**.