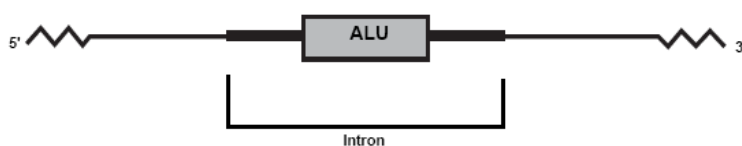


PCR gyakorlat

Az Alu szekvencia:

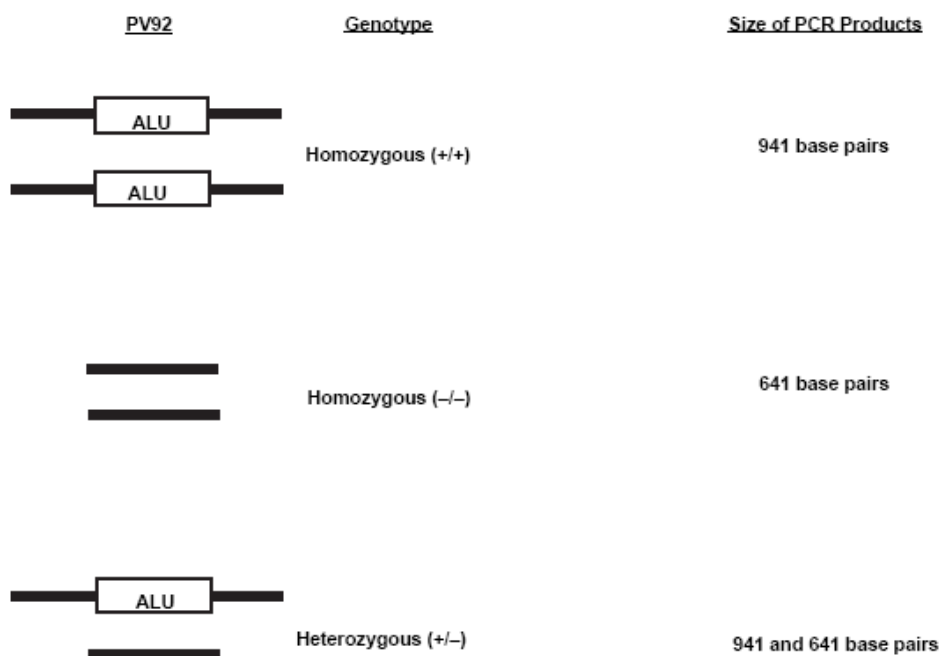
Az eukariótákban a gének kódoló (exon) és nem kódoló (intron) szekvenciákat is tartalmaznak. Az evolúció során az intronokba rövid, ismétlődő szekvenciák (SINEs) épültek be. Az egyik ilyen szekvencia az Alu, amely neve az *Alu* I restrikciós enzimből ered, amely felismerési helye ebben a szekvenciában található. Az Alu szekvencia körülbelül 300 bp méretű és a humán genomon belül majdnem 500 000-szer ismétlődik. Az eredete és funkciója ezeknek az ismétlődő szekvenciáknak még nem ismert. Az Alu szekvencia az egyének közötti rokonság mértékének becslésére használható.



1. ábra: Az Alu inzerció helye az intronban

A gyakorlat során egy Alu szekvenciát vizsgálunk a 16-os kromoszómán található PV92 lókuszon. Ez az Alu szekvencia dimorf, ami azt jelenti, hogy bizonyos egyedekben jelen van, másokban nincs. Egyes embereknek csak az egyik, másoknak mindkét homológ kromoszómáján megtalálható.

A gyakorlaton a PCR reakcióhoz használt primerek mindkét fajta genomhoz kapcsolódnak és elindítják az amplifikációt. Egy 941 bp méretű fragmentet amplifikálunk, ha az Alu inzerció jelen van, egy 641 bp méretű fragmentet, ha az Alu szekvencia hiányzik. Az agaróz gél elektroforézissel meg tudjuk különböztetni a (+/+) homozigótákat, amelyekben az Alu szekvencia jelen van (csak 941 bp méretű termék), a (-/-) homozigótákat, amelyekben az Alu szekvencia hiányzik (csak 641 bp méretű termék), illetve a (+/-) heterozigótákat, amelyeknél a 941 bp és 641 bp méretű terméket is kapunk a PCR reakció során.



2. ábra: Az Alu inzerció jelenléte vagy hiánya a PV92 lókuszon a 16-os kromoszómán

Oldatok:

TBS puffer (1000 ml):

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 3 g Trisz

Feloldjuk 800 ml desztillált vízben. Hozzáadunk 0,015 g fenol vöröst és a pH-t 7,4-re állítjuk sósavval (átcsapási szín: hagymavörös). Az oldatot 1 literre egészítjük ki desztillált vízzel. Autoklávban sterilizzük.

Komplett master mix: A PCR reakció előtt **15-30 percen belül** készítendő el!

- 20 µl master mix (Biorad)
A master mix tartalma: nukleotidok (dATP, dTTP, dCTP és dGTP),
puffer,
Taq DNS polimeráz.
- 0,4 µl primer mix (Biorad)

A komplett master mix 0,05 unit/µl *Taq* DNS polimerázt, 3 mM MgCl₂-ot és 1,6 mM dNTP-t tartalmaz, valamint 1 µM-t tartalmaz minden primerből.

A sárga színű oldatot jól elkeverjük és **0 °C-on** tartjuk. Az oldat komponensei rendkívül érzékenyek!

Az oldat sárga színét a primer mix-ben lévő tartazin festék okozza, amely a ~50 bp méretű DNS-sel vándorol együtt. A minta jól láthatóvá tételére szolgál.

Mintavétel, minta előkészítés:

1. Steril fülpiszkáló egyik végével mintát veszünk a száj nyálkahártyájából.
2. A fülpiszkáló végét 96 %-os etanolban sterilizált ollóval levágjuk és 100 µl TBS pufferbe tesszük 1 órára. Az oldódást időnkénti vortexeléssel segítjük.
3. A mintából 100 µl-t kiveszünk és 2 percig 12 000 rpm-mel centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük.
4. A sejtekhez 20 µl InstaGene oldatot adunk és összevortexeljük. Az InstaGene oldatot (Biorad) a hozzáadás előtt **jól el kell keverni**, hogy a kivett mennyiség tartalmazzon mátrix gyöngyöket.

Az InstaGene mátrix szerepe: Az InstaGene mátrix negatív töltésű, mikroszkopikus Chelex gyöngyöket tartalmaz, amelyek megkötik a két vegyértékű kationokat, mint például a Mg²⁺-t. A kétértékű kationok eltávolítása azért fontos, mert a DNS bontó enzimek működéséhez szükségesek, így eltávolításokkal megvédhetjük a DNSünket.

5. A mintákat 10 percig 56 °C-on inkubáljuk. 5 perc után a mintákat finoman megkeverjük, majd visszatesszük a vízfürdőbe.

Az 56 °C-os inkubáció szerepe: 1. Elősegíti a kötőszövetek felbomlását.
2. A DNázok inaktiválódnak.

6. A mintákat megkeverjük és 5 percig 100 °C-on inkubáljuk.

Az 100 °C-os inkubáció szerepe: A sejtek membránja felszakad és a sejtek tartalma (a templát DNS is) kiszabadul.

7. A mintákat megkeverjük és 5 percig 6000 rpm-mel centrifugáljuk.
8. (A további használatig a mintákat fagyasztva tároljuk.)

PCR:

1. (A mintákat kiolvasztjuk és 5 percig 6000 rpm-mel centrifugáljuk.)
2. PCR csőbe kimérünk 20 µl oldatot. (A PCR csöveket kupak nélküli Eppendorf csövekben tároljuk. Vigyázat, a PCR csövek törékenyek.) **Fontos**, hogy egyetlen mátrix gyöngyöt se vigyünk át, mivel a mátrix gyöngyök megkötik a magnézium ionokat, melyek a *Taq* DNS polimeráz enzim működéséhez szükségesek.
3. A mintához 20 µl komplett master mixet adunk, a pipettával két-háromszori újra felszívással elkeverjük. A sárga színű oldatot 0 °C-on tartjuk.
4. Elkészítjük a kontroll mintákat: 20 µl kontroll mintához (+/+, +/- és -/- kontroll) 20 µl komplett master mixet adunk, a pipettával két-háromszori újra felszívással elkeverjük. A sárga színű oldatot 0 °C-on tartjuk.
5. A mintákat a PCR készülékbe helyezzük. Fontos, hogy a PCR csövek jól le legyenek zárva, mert a nagy mértékű elpárolgás az amplifikációt gátolja. A következő programot futtatjuk:

1. szakasz: ELŐ DENATURÁCIÓ:	94°C	2 perc	1×
2. szakasz: DENATURÁCIÓ:	94°C	1 perc	} 50×
PRIMERTAPADÁS:	60°C	1 perc	
LÁNCHOSSZABÍTÁS:	72°C	2 perc	
3. szakasz: VÉGSŐ LÁNCHOSSZABÍTÁS:	72°C	10 perc	1×

(utána 4°C-on hidegen tartja a reakcióelegyet)

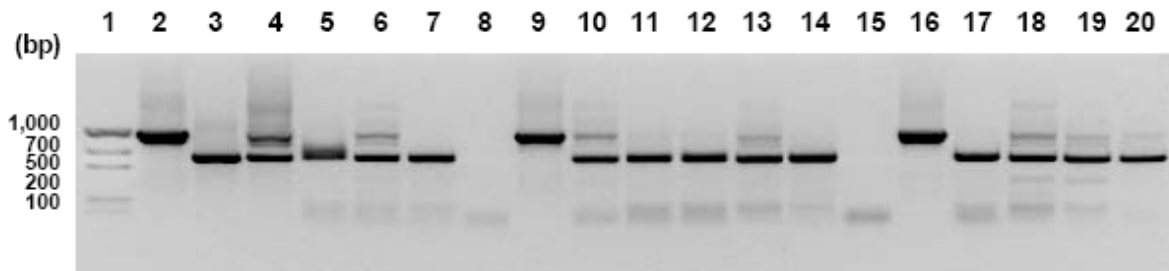
Gél elektroforézis:

1. A mintákhoz 10 µl 5×PV92 XC loading dye-t (Biorad) adunk és óvatosan összekeverjük. A „loading dye” glicerolt és Xylene Cyanole festéket tartalmaz; a glicerol biztosítja, hogy a minta a zseb aljára süllyedjen, a festék a 4000 bp méretű DNS fragmensekkel vándorol együtt.
2. A következő mintákból 10 µl-t a gélen lévő zsebekbe adagolunk:
 - EZ Load létra
 - ++ homozigóta kontroll
 - +/- heterozigóta kontroll
 - -/- homozigóta kontroll
 - saját minták
3. A 10 µl etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben (60 ml) a mintákat 45-60 percig 100 V feszültségen futtatjuk.

Az EZ Load létra (Biorad) fragmenseinek mérete: 1000 bp
 700 bp
 500 bp
 200 bp
 100 bp.

Beadandó jegyzőkönyv:

1. A PCR program.
2. A felcseppentési terv és a gél elektroforézis képe.
3. A kontrollok és a saját minta fragmentumainak becsült mérete a DNS létra alapján.
4. ++ homozigóta, -/- homozigóta vagy +/- heterozigóta? Ha nincs fragmens, akkor mi okozhatta a problémát? (Az eredmények kiértékelése)



3.ábra: Példa a gél elektroforézis eredményére

1. EZ load létra
2. ++ homozigóta kontroll
3. -/- homozigóta kontroll
4. +/- heterozigóta kontroll
- 8., 15. sikertelen amplifikáció
- 6., 10., 13., 18., 19., 20. +/- heterozigóta.

A heterozigóta minták gyakran egy intenzíven látszó 641 bp méretű és egy halványabb, 941 bp méretű fragmenst eredményeznek. Ennek oka, hogy az amplifikáció során a kisebb és a nagyobb fragmensek versengenek egymással, és a kisebb méretű fragmens hatékonyabban amplifikálódik.