

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

**Optimalizace a validace metody AS PCR pro
vyšetření SNP rs1801294 v genu MTRR a její
zavedení do klinické praxe**

**Optimalization and validation of the AS PCR
method for the analysis of SNP rs1801294 in the
MTRR gene and its implementation into clinical
practice**

Autoři: Veronika Čermáková

Škola: Česko-anglické gymnázium s.r.o.

Kraj: Jihočeský kraj

Konzultant: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D., RNDr. Květa
Tůmová

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Českých Budějovicích dne datum

Veronika Čermáková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Monice Maradové, která mě k napsání práce motivovala a pomohla mi najít pracoviště a RNDr. Květě Tůmové, která mi s prací vždy ochotně pomohla. Nejvíce si ovšem cením pomoci, kterou mi poskytla Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D. Vedla mě v průběhu celé práce a věnovala mi spoustu trpělivosti a cenných rad.

Anotace

Gen MTRR je schopný recyklovat enzym MTR (Methionine synthase), který je nezbytný pro přeměnu homocysteinu na methionin. Pokud se v genu nachází polymorfismus (nejčastěji A66G rs 1801294) k syntéze homocysteinu nedochází. Absence této fyziologické reakce vede ke zvýšené hladině homocysteinu v krvi a poruše nazývané hyperhomocysteinémie (HHcy).

Tato práce se zabývá optimalizací podmínek jedné z modifikací PCR metody - alelově-specifické polymerázové řetězové reakce (AS-PCR) - kterou je možné využít k vyšetření dříve zmiňovaného genu MTRR. V teoretické části práce je blíže popsána metoda AS-PCR a reagentie, které jsou k provedení testu zapotřebí. Praktická část obsahuje popis všech provedených reakcí, díky kterým jsme zjistili, jaký mix a annealingová teplota je pro průběh reakce nejvhodnější.

Klíčová slova

PCR, metoda AS-PCR, gen MTRR, annealingová teplota, Master Mix

Annotation

The MTRR gene is able to recycle the MTR enzyme (Methionine synthase), which is necessary for the conversion of homocysteine to methionine. If there is a polymorphism in the gene (most commonly A66G rs 1801294), homocysteine synthesis does not occur. The absence of this physiological reaction leads to elevated blood levels of homocysteine and a disorder called hyperhomocysteinemia (HHcy).

This work focuses on optimizing the conditions of one of the modifications of the PCR method - allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) - which can be used to investigate the previously mentioned MTRR gene. In the theoretical part of the work, the AS-PCR method and the reagents needed to perform the test are described in more detail. The practical part contains a description of all the reactions performed, thanks to which we found out which mix and annealing temperature is the most suitable for the course of the reaction.

Keywords

AS-PCR method, MTRR gene, polymorphism, annealing temperature, Master Mix

Obsah

1	Úvod.....	7
2	PCR.....	7
2.1	Objev metody.....	7
2.2	Využití.....	8
2.3	Průběh.....	8
2.4	Elektroforéza nukleových kyselin.....	10
2.5	Složky PCR směsi.....	11
2.5.1	Templátová DNA.....	11
2.5.2	Primer.....	12
2.5.3	DNA polymeráza.....	12
2.5.4	Nukleotidy (dNTP).....	13
2.5.5	MgCl ₂	14
2.5.6	Pufr.....	14
2.6	Alelově-specifická PCR.....	14
3	Související pojmy.....	15
3.1	Heterozygot a homozygot.....	15
3.2	Polymorfismus.....	15
3.3	SNP.....	15
3.4	Gen MTRR.....	16
4	Praktická část.....	16
4.1	Izolace DNA.....	17
4.2	Reakce.....	17
4.3	Gelová elektroforéza.....	19
5	Výsledky.....	19
5.1	Optimalizační reakce 1.....	20
5.2	Optimalizační reakce 2.....	21

5.3	Výsledná reakce	22
6	Závěr	24

1 ÚVOD

MTRR je enzym, který je v organismu nezbytný pro tvorbu methioninu. Methionin patří mezi esenciální aminokyseliny, z čehož plyne, že jeho syntéza není v lidském organismu možná a musí být získán potravou, nebo štěpením tkáňových proteinů. Hlavní funkce enzymu MTRR v metabolickém cyklu spočívá v tom, že přemění aminokyselinu homocystein (Hcy) na již zmiňovaný methionin, který je pak po určité době aktivní.

Metoda PCR se skládá z několika kroků, tudíž jsou v procesu k nalezení různé faktory, kterými můžeme průběh reakce ovlivnit. Postupem času se ze základní PCR vyvinuly nové modifikace a v této práci bude detailněji rozebrána jedna z nich – metoda AS PCR, neboli alelově-specifická polymerázová řetězová reakce.

Náplní teoretické části práce bude popis metody PCR, její modifikace, klinický význam, funkce genu MTRR a objasnění pojmů, které s metodou souvisí – například SNP, polymorfismus, heterozygot, homozygot, atd. Praktická část bude realizována v genetické laboratoři GENLABS. V této části práce se soustředím na základní orientaci v metodách molekulární biologie. Jejím hlavním cílem bude optimalizace metody AS-PCR pro vyšetření SNP rs1801394 v genu MTRR. Při reakci bude sledován vliv PCR profilu a Master Mixu na výsledek detekce a následné uvedení této metody do klinické praxe.

Mým podnětem pro výběr tématu byla možnost práce v laboratorním prostředí, která mě jakožto člověka se zájmem o přírodní vědy ihned nadchla. Touto problematikou jsem se nikdy nezabývala, a proto beru psaní jako šanci se něco naučit a zorientovat se v novém oboru, se kterým jsem se do této doby setkala jen okrajově. Středoškolská odborná činnost je spojením aktivit, které mi v procesu vzdělávání přijdou stěžejní – přijímání nových výzev a rozšiřování obzorů. Zároveň toto téma nebylo mnohokrát zpracováno formou odborného textu nebo článků, a tak bych ráda svou práci pojala jako shrnutí všech nalezených zdrojů.

2 PCR

2.1 Objev metody

PCR metoda byla vyvíjena od začátku 70. let minulého století. Objevení základního principu je připisováno americkému vědci Kary B. Mullisovi, který toho času pracoval jako laborant pro americkou společnost Cetus, zaměřenou na biotechnologie. V následujících letech se metoda

díky vynálezu automatické syntézy oligonukleotidů výrazně posunula kupředu, pronikla do většiny laboratoří a začala se běžně užívat v praxi. V roce 1985 byla tato metoda poprvé publikována v prestižním vědeckém časopise Science a již za 10 let obdržel Kary Banks Mullis za svůj objev Nobelovu cenu za chemii (*The Nobel Prize*, 1993)

2.2 Využití

PCR se dostala do povědomí většiny lidí v důsledku pandemie Covidu, která vypukla v roce 2020. Metoda se běžně používá pro diagnostiku virových infekcí a tedy i viru SARS-CoV-2, který zapříčiňuje zmíněné onemocnění (*Národní zdravotní informační portál*, 2022). To je ovšem pouhý zlomek možného využití PCR.

PCR je velmi senzitivní metoda a umožňuje přesné detekování různých mutací, genetických predispozic nebo onemocnění, jako jsou tuberkulóza, virová meningitida a hepatitida, nebo například AIDS. Lze nahlédnout i do mnoha dalších oborů. V zoologii se metoda využívá při rozboru chování zvířat, v archeologii a paleontologii se díky ní mohou analyzovat genové variace tisíce let starých zvířecích i rostlinných druhů, evoluční biologové ji uplatňují při zařazování organismů do taxonomických tříd. (*American physiological society*, 2004)

2.3 Průběh

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR (Polymerase Chain Reaction) (*LabGuide*, 2014) je jednou z hlavních technik molekulární biologie a funguje na principu řízené replikace DNA. Její průběh lze rozdělit do několika částí.

Na počátku celého procesu, než začne opakující se cyklus reakcí, je počáteční denaturace DNA. Provádí se při teplotách kolem 95 °C, po dobu 3–5 minut (ŠMARDA, 2005), během kterých se dvoušroubovice deoxyribonukleové kyseliny rozplete na dva řetězce. Denaturace v samotných cyklech probíhá za stejné teploty, ale její doba je několikanásobně kratší (zpravidla 30–60 sekund), protože už je k dispozici templátová DNA vytvořená v prvním cyklu PCR, která je obvykle kratší a její denaturace tím pádem není tak komplikovaná.

Po denuraci přichází na řadu annealing, což je proces trvající zhruba 20 – 45 sekund, při němž se primery (krátké úseky nukleové kyseliny) spárují s komplementárním úsekem templátového řetězce (*Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU*, 1994). Dvoušroubovice je v tuto chvíli již plně denaturovaná a je tedy umožněno navázání primerů na oba dva řetězce. Teplota, při

keré probíhá annealing (napojení specifického úseku řetězce nukleové kyseliny ke komplementárnímu řetězci) (T_a – annealing temperature), je velmi důležitým krokem, protože v případě, že není dostatečně nízká, může se stát, že nasednutí primeru na řetězec DNA neproběhne. Na druhou stranu ale musí být dostatečně vysoká, aby nedocházelo k nespecifickému nasedání oligonukleotidů a následnému vzniku nespecifických produktů. Annealingovou teplotu je možné vypočítat pomocí vzorce nebo určit experimentálně (ŠMARDA, 2005).

V následující fázi jsou primery nahybridizované a připravené na proces elongace (také zvaný extenze) při teplotě 72 °C (*Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU*, 1994). Syntéza DNA probíhá v přítomnosti termostabilní polymerázy – enzymu, který se izoluje z termofilních mikroorganismů. Jako příklad takového enzymu můžeme uvést Taq DNA polymerázu, která se izoluje z bakterie *Thermus aquaticus* (*ScienceDirect*, 1995) . Organismus byl objeven v extrémních podmínkách a je podle toho i pojmenován – *thermus* pro jeho stabilitu při vysokých teplotách a *aquaticus* jako označení jeho výskytu. Je prvním druhem bakterie, který je schopen přežít a rychle se rozmnožit v teplotách přesahujících 80 °C. Během syntézy DNA se polymeráza napojí na 3' - konec oligonukleotidu a přidává k nově se syntetizovanému řetězci DNA nové nukleotidy (*ExCedr*, 2013).

Všechny výše popsané kroky jsou citlivé na teplotu a právě dodržení odpovídající teploty je zásadní pro správný průběh PCR. Celý proces se odehrává v přístroji zvaném termocykler, který je schopný cyklicky měnit teplotu v krátkém časovém úseku. Celý cyklus se opakuje přibližně 25 – 35krát a počet kopií DNA, podle vzorce (2^n , kde n je počet cyklů), exponenciálně roste. Použitím vzorce můžeme spočítat, kolikrát byl vybraný úsek DNA amplifikován a zjistíme, že se počty mohou vyšplhat až na miliardu kopií (ŠMARDA, 2005).

Produktem PCR reakce jsou úseky DNA nazývané amplikony, které se dále dají zkoumat pomocí mnoha různých metod. Jednou z nejznámějších je elektroforéza – metoda, která funguje na principu separace nabitých částic v elektrickém poli (*Biogen*, 1999). Vzorky se nanesou do jamek vytvořených hřebenem v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu a následně se podrobí elektroforetické separaci (*LabGuide*, 2014).

2.4 Elektroforéza nukleových kyselin

Nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny, které jsou záporně nabitě. Těto vlastnosti DNA využívá jedna z nejpoužívanějších metod molekulární biologie, elektroforetická separace, díky které můžeme analyzovat produkty PCR (GOTTWALDOVÁ, 2017).

Existuje více druhů elektroforéz – pulzní gelová elektroforéza, která pracuje s molekulami větších rozměrů, které by neprošly pórovitou strukturou gelu při standardní gelové elektroforéze. Dalším typem je denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), jenž denaturuje dvoušroubovici DNA, rozvětňuje ji a tím vytváří jednořetězcové oblasti. Čtvrtým typem elektroforézy bych se chtěla zabývat podrobněji, jelikož jsem jeho prostřednictvím analyzovala výsledky AS-PCR.

Gelová elektroforéza nejčastěji využívá jako nosič vzorků gel z polyakrylamidu nebo agarózy. Gely se liší velikostí pórů, které se nachází v jejich síťovité struktuře – polyakrylamidovým gelem projdou jen menší molekuly o velikosti kolem 10-1000 bp, zatímco póry agarózového gelu jsou větší a mohou se v nich pohybovat molekuly o rozměrech 100 bp – 50 kb. Při vertikální a horizontální gelové elektroforéze se gel nachází na desce, při kapilární elektroforéze v kapilárách (ŠMARDA, 2005, str. 13). Příprava agarózového gelu spočívá v rozpuštění agarózy v pufru, který se nachází i v elektrolytu (*Veterinární fakulta Brno*, 2011). Tekutá směs gelu se nalije do elektroforetické vany s hřebenem, který se po ztuhnutí gelu vyjme a zanechá po sobě jamky, kam se následně pomocí pipety nanese DNA.

Gelová elektroforéza je způsob, kterým lze separovat částice na základě jejich rozměrů. (*Amoeba Sisters*, 2018). Elektroforetická pohyblivost (rychlost pohybu částic), totiž nezávisí na velikosti elektrického náboje, nýbrž na velikosti částice – menší se pohybují rychleji, a tím pádem se v gelu dostanou dál, než ty větší. (ŠMARDA, 2005, strana 14)

Gelová elektroforéza funguje na principu mechanického přenosu hmoty, způsobeného elektrickým polem. Do elektroforetické vany se nejdříve umístí gel s elektrolytem, do jamek se napipetuje DNA a potom se spustí elektrický proud, vlivem kterého se vytvoří elektrické pole. Na straně gelu, kde byly hřebenem vytvořeny jamky, se nachází katoda, zatímco na straně druhé nalezneme opačně nabitou anodu, ke které se sbíhají záporně nabitě fosfátové skupiny přítomné v DNA (*Amoeba Sisters*, 2018).

Výsledky elektroforetické separace nejsou samy o sobě dobře viditelné, a tak se pro jejich zvýraznění používají barviva, nejčastěji etidiumbromid. Látka se interkaluje mezi páry nukleových bází a červeným fluoreskovaním reaguje na ultrafialové záření, takže můžeme sledovat, kam se dostaly jednotlivé fragmenty DNA. Dalším způsobem, jak zviditelnit fragmenty DNA v agarózovém gelu jsou fluorescenční kyaninová barviva. Pro polyakrylamidové gely lze použít barvení stříbrem. (ŠMARDA, 2005. strana 14)

2.5 Složky PCR směsi

2.5.1 Templátová DNA

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina, je nezbytnou složkou PCR směsi, jelikož obsahuje sekvenci, která je během procesu amplifikována a zároveň zastává funkci předlohy nebo templátu, podle kterého se syntetizují nové řetězce. Je tvořena nukleotidy – základními stavebními jednotkami DNA. Nukleotidy se skládají z fosfátové skupiny a deoxyribózy (pětiuhlíkového sacharidu), na kterou je připojena jedna ze 4 nukleových bází – adenin (A), thymin (T), cytosin (C) nebo guanin (G) (*National Human Genome Research Institute*, 2005) (*Národní zdravotní informační portál*, 2018). Na základě komplementarity bází jsou pak vlákna schopná se spojit a vytvořit tvar dvoušroubovice. Pro potřeby PCR se DNA obvykle izoluje z krve, dalších tělních tekutin, mikroorganických kultur atd.

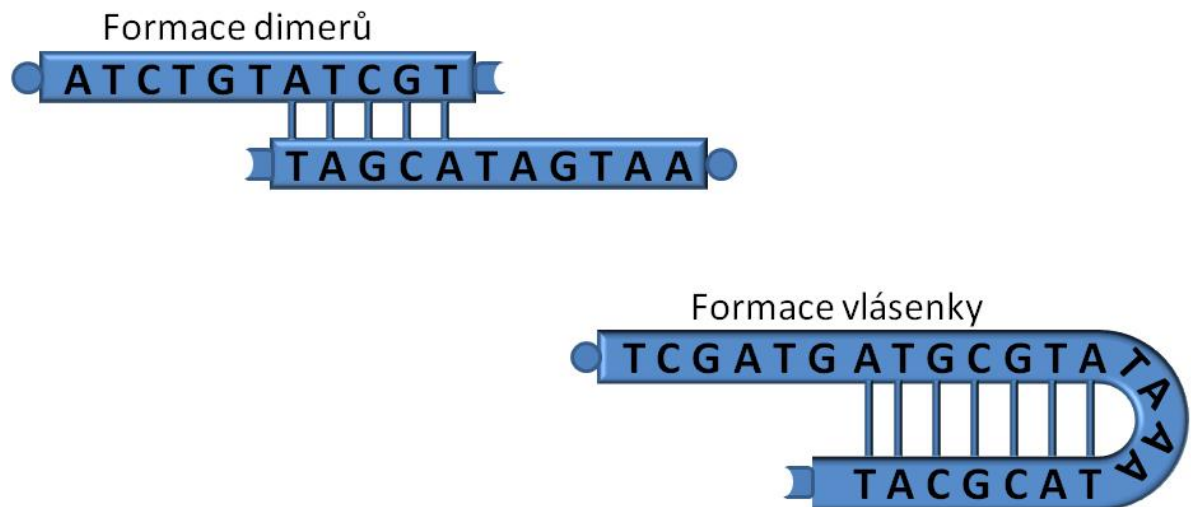
Extrakce DNA předchází většině molekulárně-biologických vyšetření. K provedení reakce stačí jen fragment genetické informace a není podmínkou, že musí být dokonale izolovaný – lze použít například přímo část tkáně. Obecně ovšem platí, že čím precizněji je DNA vyizolována, tím kvalitnější a lépe čitelnější je pak výsledný produkt amplifikační reakce (*WikiSkripta*, 2020).

Genetickou informaci je možné získat jak z prokaryotických (DNA tohoto původu se dále dělí na genomovou a plazmidovou) tak i z eukaryotických organismů, tkání, orgánů, tělních tekutin nebo i zpětně, z produktů získaných PCR reakcí (PANTŮČEK, 2018). Při extrakci se většinou kombinují chemické a fyzikální techniky (*LabGuide*, 2014). Prvním krokem procesu izolace genomové DNA z tkání je rozrušení buněk pomocí tloučků, homogenizátorů nebo sonikátorů. Následuje homogenizace směsi buněk, která se provádí prostřednictvím lyzačního roztoku. Už z názvu roztoku vyplývá, že slouží k rozpuštění buněčných stěn (z latinského *lysis* = rozpuštění) (*Velký lékařský slovník*, 2006) a díky proteáze a RNáze, které obsahuje, také k natrávení bílkovin a odstranění RNA. Ve třetí fázi je DNA separována od proteinů a dalších nežádoucích

látek (*LabGuide*, 2014). Jednotlivé kroky extrakce se liší v závislosti na látce, se kterou je proces prováděn. DNA může být izolována pomocí gravitačních kolonek, chelexu nebo komerčních kitů, avšak nejspolehlivější je způsob, který využívá fenol-chloroform. Ačkoliv je to relativně pracný a časově náročný proces, přináší velké množství velmi čisté DNA. (*LabGuide*, 2022)

2.5.2 Primer

Primer je oligonukleotidový řetězec (*Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU*, 1994), obvykle dlouhý 20 – 25 nt, který se po denuraci dvoušroubovice naváže na začátek/konec amplifikovaného úseku. Daný pár musí obsahovat vyvážený poměr AT a CG párů – upřednostňovány jsou primery s 50 – 60% obsahem AT nebo CG párů. Primery zároveň nesmí být příliš komplementární, protože by mohly hybridizovat spolu a vytvářet tzv. dimery. To samé platí o jednom primeru – pokud by byly jeho konce komplementární, hrozil by vznik vlásenky, formace, při které se konec primeru přichytí ke komplementárním nukleotidům v jiné části řetězce (*LabGuide*, 2014).



Obr. 1: Formace primerů (<https://labguide.cz/wp-content/uploads/2022/04/LG-dimer-vlasenka-768x371.jpg>)

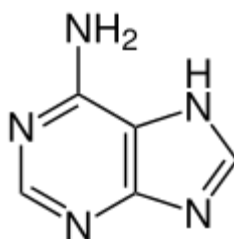
2.5.3 DNA polymeráza

DNA polymeráza je enzym, který je v reakční směsi nezbytný pro syntézu nového řetězce DNA, ta následuje po annealingu – připojení primerů na vlákno DNA (*LabGuide*, 2014). Ke zmiňovanému templátu syntetizuje komplementární řetězec a genetická informace se tak duplikuje (*Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU*, 1994).

2.5.4 Nukleotidy (dNTP)

Další nezbytnou složkou PCR směsi jsou volné nukleotidy, které jsou pak DNA polymerázou na základě komplementarity bazí připojovány k templátu za vzniku nového vlákna. Nukleotid je základní stavební jednotka DNA (deoxyribonukleové kyseliny) i RNA (ribonukleové kyseliny) a skládá se ze 3 částí – fosfátové skupiny, monosacharidu (deoxyribózy nebo ribózy) a nukleotidové báze (*National Human Genome Research Institute*, 2005). V molekulách DNA se vyskytují 4 typy bází:

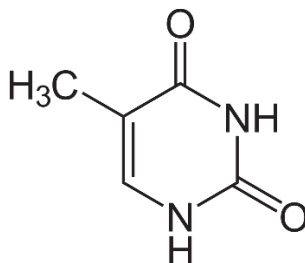
- adenin (A) – 6-aminopurin (ŠÍPEK, 2011, str. 134)



Obrázek 2: chemický vzorec adeninu

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f9/Adenin_%28chemical_structure%29.svg/800px-Adenin_%28chemical_structure%29.svg.png

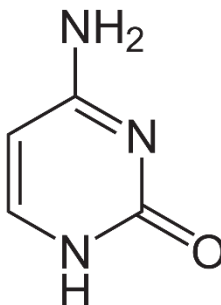
- thymin (T) – 2,4-dioxo-5-methylpyrimidin (ŠÍPEK, 2011, str. 143)



Obrázek 3: chemický vzorec thyminu

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/15/Thymin.svg/1024px-Thymin.svg.png>

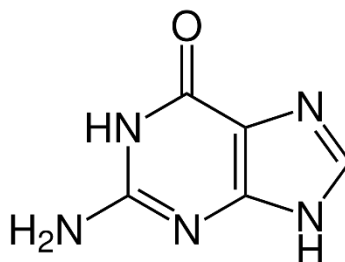
- cytosin (C) – 2-oxo-4-aminopyrimidin (ŠÍPEK, 2011, str. 135)



Obrázek 4: chemický vzorec cytosinu

(<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/dd/Cytosin.svg/800px-Cytosin.svg.png>)

- guanin (G) – 2-amino-6-oxopurin (ŠÍPEK, 2011, str. 137)



Obrázek 5: chemický vzorec guaninu

(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/29/Guanin_%28vzorec%29.svg/1024px-Guanin_%28vzorec%29.svg.png)

Komplementární báze adenin a thymin nebo cytosin a guanin jsou schopné se spolu párovat a držet tím dvě vlákna DNA v dvoušroubovici pohromadě (*Národní zdravotní informační portál*, 2018).

2.5.5 MgCl₂

Chlorid hořečnatý je důležitou složkou enzymatických reakcí v organismu, jako je například syntéza proteinů. V PCR podporuje nasednutí primerů na specifická místa ovlivňováním teploty tání primeru (*ExCedr*, 2013).

2.5.6 Pufr

Pufr je zajišťuje optimální prostředí, ve kterém PCR probíhá (ŠÍPEK, 2011, str. 129), přičemž dokáže udržet vhodné podmínky pro aktivitu DNA polymerázy (*Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU*, 1994). Pufr zajišťuje hodnotu pH od 8,3 do 9,0 (PAPOUŠEK, 2022), což je ideální rozmezí pro funkci a stabilitu polymerázy, která umožňuje syntézu DNA.

2.6 Alelově-specifická PCR

Alelově specifická PCR je typem reakce, která je prováděna za účelem nalezení mutací v určitém úseku genetické informace. Její princip je poměrně jednoduchý – skládá se ze dvou oddělených PCR reakcí a tří specifických primerů. První primer je v jedné reakci komplementární s obvyklou formou genu a v druhé reakci se naopak napojuje na sekvenci, která obsahuje mutaci nebo polymorfismus. Druhý primer je v obou reakcích totožný

(ŠMARDÁ, 2005). Podle toho, ve které reakci došlo k amplifikaci za vzniku PCR produktu, se následně rozhodne o přítomnosti/nepřítomnosti mutace či polymorfismu. (*LabGuide*, 2022)

3 SOUVISEJÍCÍ POJMY

3.1 Heterozygot a homozygot

Gen lze popsat jako jednotku dědičné informace (ŠÍPEK, 2011, str. 137), která se nachází na chromozomu a udává fenotyp (viditelný projev znaku) (ŠÍPEK, 2011, str. 136). Gen je v genomu zastoupen dvěma alelami – jednu dědíme od matky a druhou od otce – které se nachází v určitém lokusu (konkrétní pozice na chromozomu). Geny mohou kódovat jeden fenotypový projev (monogenní dědičnost, například barva duhovky nebo množství produkovaného proteinu) nebo i více fenotypových projevů (pleiotropní efekt). Naopak některé znaky jsou kódovány více geny (polygenní dědičnost). Rozdíl mezi heterozygotem a homozygotem spočívá v tom, zda jsou alely v genu jedince stejné – v případě homozygota – nebo naopak rozdílné – v případě heterozygota (*Národní zdravotnický informační portál*, 2022).

3.2 Polymorfismus

Polymorfní (*poly* = více/mnoho a *morphos* = tvar) znamená vícetvarý nebo mnohotvárný. (*Genetický polymorfismus*, 2016) Genovým polymorfismem označujeme stav, kdy je možný výskyt více než jedné alely (*Polymorfismus lidské DNA*, 2007). V případě, že se jedna z alel vyskytuje u méně než 1 % populace, hovoříme o mutaci (ŠÍPEK, 2011, str. 37) – tzn. změně sekvence DNA, která je (v případě, že nebrání v rozmnožování) dědičná. (ŠÍPEK, 2011, str. 140) DNA polymorfismus je velmi běžný, jelikož se obvykle fenotypově neprojevuje. (*Genetika – Biologie*, 2011)

3.3 SNP

Single nucleotid polymorphism, česky zvaný jednobodový polymorfismus (*Genetika – Biologie*, 2011), je nejběžnější typ polymorfismu v genomu člověka (*Genetika – Biologie*, 2011). Jedná se o záměnu jedné báze v genové sekvenci. Vzniká kombinací vzniku mutace a tzv. genetického driftu (ŠÍPEK, 2011, str. 143), což je situace, kdy se do následující generace náhodně dostane rozdílný poměr zastoupení dvou alel např. v důsledku migrace (*Biogeografie*, 2010). Substitucí nukleové báze může dojít ke záměně aminokyseliny a někdy i změně projevu

fenotypu (*Polymorfismus lidské DNA*, 2007). Identifikace SNP se využívá například ke konstrukci genetických map, ověřování parentity, identifikaci jedinců nebo při výzkumech v oblasti populační genetiky (*Polymorfismus lidské DNA*, 2007).

3.4 Gen MTRR

Gen MTRR, také nazýván zkratkou MSR (Methionine Synthase Reductase), se nachází na chromozomu 5p15.31. Nejčastějším polymorfismem tohoto genu je A66G rs1801294, který způsobuje substituci alely A za alelu G v pozici 66 genu MTRR.

Funkční gen MTRR, jehož alely nejsou variantní, je schopný recyklovat MTR (Methionine synthase) – enzym umožňující chemickou reakci, při níž se homocystein přeměňuje na methionin (*Gene Reports*, 2020). Díky obnově MTR enzymu může probíhat remethylace homocysteinu (Hcy). Homocystein je škodlivá látka, která je v organismu přirozeně odbourávána. Pokud se v genu vyskytuje zmíněný polymorfismus a remethylace neprobíhá, zvýší se koncentrace homocysteinu v krvi a dojde k poruše nazývané hyperhomocysteinémie (HHcy). HHcy může být způsobena nedostatkem vitamínů B₆ a B₁₂ nebo kyseliny listové – látek zásadních pro správnou funkci metabolismu homocysteinu nebo přítomností polymorfismů v genech MTR, MTRR a MTHFR, které kódují enzymy nezbytné pro katabolismus Hcy. Vysoká hladina homocysteinu škodí nervovým buňkám a organismus je potom náchylnější k rozvinutí neuropsychiatrických onemocnění, jako jsou například porucha autistického spektra (ASD), Alzheimerova choroba, deprese nebo schizofrenie. (*OMIM*, 2017)

4 PRAKTICKÁ ČÁST

Zázemím pro realizaci praktické části méj seminární práce byla laboratoř GENLABS s.r.o., kde jsem měla možnost podílet se na optimalizaci jedné z výše zmíněných modifikací PCR – alelově-specifické polymerázové řetězové reakci (AS-PCR) pro detekci mutace A66G v genu MTRR.

Pojmem optimalizace se rozumí upravení reakčních podmínek, se záměrem získání co nejvíce specifického PCR produktu. Cílem je zajistit podmínky metody AS-PCR tak, aby z reakce vyšel jen jeden konkrétní produkt, který bude velikostně odpovídat amplifikované sekvenci. Existuje více způsobů, kterými je možné průběh reakce ovlivnit (*Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU*, 1994):

- Koncentrace DNA – rozmezí, ve kterém se pohybuje hodnota ideální koncentrace DNA je poměrně robustní, protože PCR může proběhnout s 1–50 i více ng DNA.
- Annealingová teplota – snížením teploty anealingu bychom mohli zajistit jistější nasedání primerů na řetězec DNA. Tato teplota nesmí ale klesnout příliš, protože při moc nízkých teplotách dochází k tvorbě nespecifických produktů. Doporučuje se provést tzv. gradientová analýza, kdy pro anealing použijeme teplotní gradient (různé teploty lišící se např. 1 °C), ale stejnou reakční směs se stejným vzorkem. Následně vybereme teplotu, při které vznikl nejvíce specifický produkt.
- Koncentrace MgCl₂ – chlorid hořečnatý působí v reakční směsi jako stabilizátor DNA polymerázy a zvýšení jeho koncentrace by mohlo výsledek reakce pozitivně ovlivnit.
- Aditiva – stejně jako chlorid hořečnatý mohou stabilitu reakce podporovat látky jako formamid, betaine, glycerol nebo síran amonný (NH₄)₂SO₄.
- Úprava počtu a délky cyklů může pozitivně ovlivnit výtěžek reakce.
- Touch-down protokol – úprava PCR profilu na principu touch-down PCR metody, která je díky vyšším teplotám počátečních cyklů a jejich postupným snižováním velmi citlivá a dosahuje specifitější výsledky.
- Ramping time – mezi faktory ovlivňující PCR patří i rychlost změny jednotlivých teplot. Za neuspokojivými produkty může stát příliš rychle zahřátí PCR směsi, v jejímž důsledku odpadá část primerů.

Při práci v laboratoři jsem se zaměřila především na vhodnou annealingovou teplotu a použité reagenty.

4.1 Izolace DNA

Jak bylo již dříve zmíněno, DNA lze izolovat z mnoha různých zdrojů. Pro účely naší reakce, byly použity vzorky DNA izolované z periferní krve 5 zdravých žen a 5 zdravých mužů, které byly v době mezi odběrem a extrakcí DNA skladovány při teplotě -20 °C. DNA, která z těchto vzorků byla vyizolována měla koncentraci od 216,4 do 918 ng/μl.

4.2 Reakce

Polymorfismus A66G (rs1801394) genu MTRR byl amplifikován v termocykleru MultiGeneTM. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce I. a byly převzaty z článku Ajabi et al., 2017. Pro každý vzorek byly připraveny dvě reakční směsi. Primery MTRR F1 a

MTRR R1 sloužily k detekci alely A (první reakce) a PCR produkt o délce 367 bp a primery MTRR F2 a MTRR R2 byly navrženy pro alelu G (druhá reakce) a PCR produkt o délce 401 bp.

Primer	Sekvence
MTRR F1	5'-TCAAGCCCAAGTAGTTTCGAG-3'
MTRR R1	5'-TGTACCACAGCTTGCTCACAT-3'
MTRR F2	5'-CTTGTCTACAGGGTTGCACT-3'
MTRR R2	5'-TGTACCACAGCTTGCTCACAC-3'

Tabulka I: Použité primery (Ajabi et al., 2017)

Reakční směs, jejíž složení je popsáno v tabulce II., byla namíchána na mrazicích stojácích ve zkumavkách o objemu 0,2 ml, kdy celkový objem reakce byl 25 μ l.

Reagencie	Objem (μl)
PPP Master/Aptamer (Top-Bio, s.r.o.)	12,5
dH ₂ O	9,5
MTRR F1/F2 primer (20 pmol)	1
MTRR R1/R2 primer (20 pmol)	1
DNA	1
Celkem	25

Tabulka II: Složení reakční směsi pro jednu reakci.

Příprava směsi probíhala v laminárním boxu, který byl vysvícen UV světlem, aby nedošlo ke kontaminaci. Nejprve bylo do zkumavek napipetováno 12,5 μ l mixu – v našem případě to byl

PPP Master Mix nebo Aptamer (Top-Bio, s.r.o.). Testovala jsem dva různé mixy z důvodu optimalizace procesu. Následně bylo do reakční směsi přidáno 9,5 µl destilované vody, po 1 µl od každého z primerů a 1 µl izolované DNA. Koncentrace DNA v použitých vzorcích se pohybovala od 216,4 do 918 ng/µl. Po napipetování všech vzorků byly zkumavky uzavřeny a vloženy do termocyklu.

4.3 Gelová elektroforéza

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena pomocí dříve popsané elektroforetické metody (ELFO), která díky elektroforetické separaci a použití fluorescenčních barviv umožňuje vizualizaci PCR produktu a určení velikosti jednotlivých fragmentů.

Elektroforéza byla provedena na 4% agarózovém gelu, který byl připraven smícháním 2g agarózy v tabletkách FastGene Agarose (Nippon Genetics) a 50ml TBE pufru. Po rozpuštění tablet byl roztok zhruba po dobu dvou minut zahříván v mikrovlnné troubě. Do tekutého gelu bylo přidáno 5,5 µl fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics). Připravená směs byla nalita do formy s hřebínkem, díky němuž se v gelu vytvořily jamky. Do každé jamky bylo následně nanášeno 4 µl velikostního markeru FastGene 100 bp DNA Ladder (Nippon Genetics) a 15 µl PCR produktu.

Výsledné PCR produkty mohly dosahovat pouze dvou délek - 367 bp v případě alely A nebo 401 bp v případě alely G. Pokud byla délka PCR produktu v první PCR reakci 367 bp a ve druhé PCR reakci nebyl žádný produkt, jednalo se o homozygota AA. Heterozygot AG byl potvrzen v případě, že produkt získaný v první PCR reakci dosáhl délky 367 bp a v druhé PCR reakci 401 bp. Poslední možností byl mutovaný homozygot GG, tzn. v první PCR reakci nevznikl žádný produkt a produkt ve druhé PCR reakci dosahoval délky 401 bp.

5 VÝSLEDKY

Celkem byly provedeny dvě optimalizační reakce, při nichž byl testován vhodný mix a annealingová teplota. V následující kapitole práce jsou popsány parametry všech provedených reakcí a genotypy testovaných vzorků, které vzešly z výsledné optimalizované reakce.

5.1 Optimalizační reakce 1

Během první optimalizační reakce byly testovány dva mixy – Aptamer a PPP Master mix (TopBio s.r.o.) – a použili jsme vzorky M1 a F3. Jednotlivé reagentie a jejich objemy lze vidět v tabulce III, PCR profil je popsán v tabulce IV.

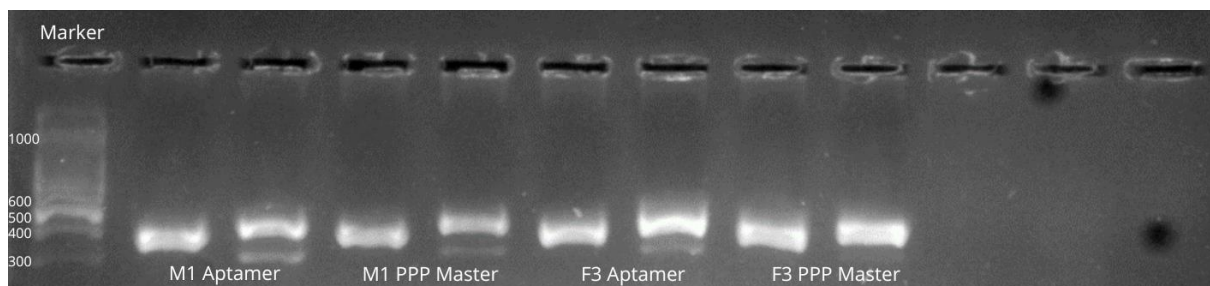
Reagentie	Objem (μl)
PPP Master/Aptamer (Top-Bio, s.r.o.)	12,5
dH ₂ O	9,5
MTRR F1/F2 primer (20 pmol)	1
MTRR R1/R2 primer (20 pmol)	1
DNA	1
Celkem	25

Tabulka III: Složení reakční směsi pro první optimalizační reakci

	Počet cyklů	Teplota °C	Čas (min)
Počáteční denaturace	1	94	1
Denaturace	35	94	0,5
Annealing		60	0,5
Elongace		72	0,5
Post elongace	1	72	5

Tabulka IV.: Použitý PCR profil pro detekci polymorfismu MTRR A66G.

Při pohledu na obrázek I není mezi dvěma různými mixy značný rozdíl. Pro výslednou reakci byl použit mix PPP Master.



Obrázek I: Výsledný produkt první reakce.

5.2 Optimalizační reakce 2

Druhá optimalizační reakce, při které byl použit vzorek M5 a mix PPP Master, byla cílena na annealingovou teplotu. K jejímu určení byl použit gradient annealingu, který je popsán v tabulce VI.

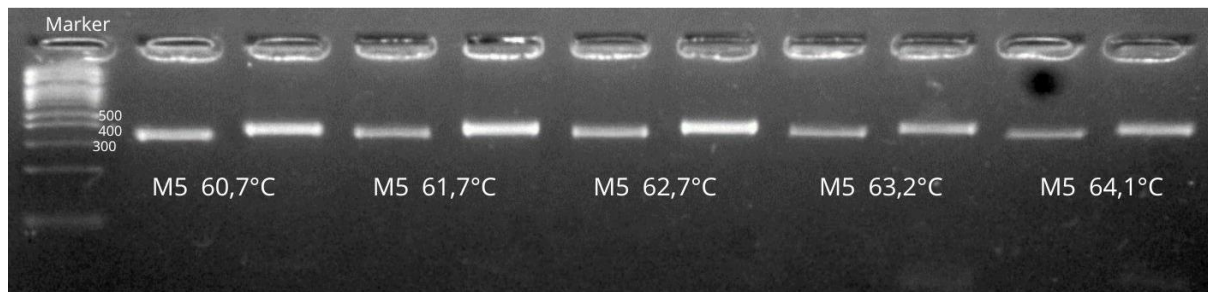
Reagencie	Objem (μl)
PPP Master mix (Top-Bio, s.r.o.)	12,5
dH2O	9,5
MTRR F1/F2 primer (20 pmol)	1
MTRR R1/R2 primer (20 pmol)	1
DNA	1
Celkem	25

Tabulka V: Složení reakční směsi pro druhou optimalizační reakci

	Počet cyklů	Teplota °C	Čas (min)
Počáteční denaturace	1	94	1
Denaturace	35	94	0,5
Annealing		60,7 – 64,1	0,5
Elongace		72	0,5
Post elongace	1	72	5

Tabulka VI: PCR profil pro amplifikaci polymorfismu MTRR A66G.

Produkt druhé optimalizační reakce můžeme vidět na obrázku II. Při zvýšení annealingové teploty nevznikaly nescifické produkty a jako nejlépe čitelný se ukázal vzorek nanesený v 8. a 9. jamce. Pro další testování byla vybrána annealingová teplota 63 °C.



Obrázek II.: Výsledný produkt druhé reakce.

5.3 Výsledná reakce

Ve třetí, závěrečné reakci, byly využity parametry z předchozích dvou optimalizačních reakcí. Z dvojice testovaných mixů jsme vybrali PPP Master mix a ideální annealingovou teplotu jsme stanovili na 63°C. Objem reagensů a PCR profil výsledné reakce jsou popsány v tabulkách VII a VIII.

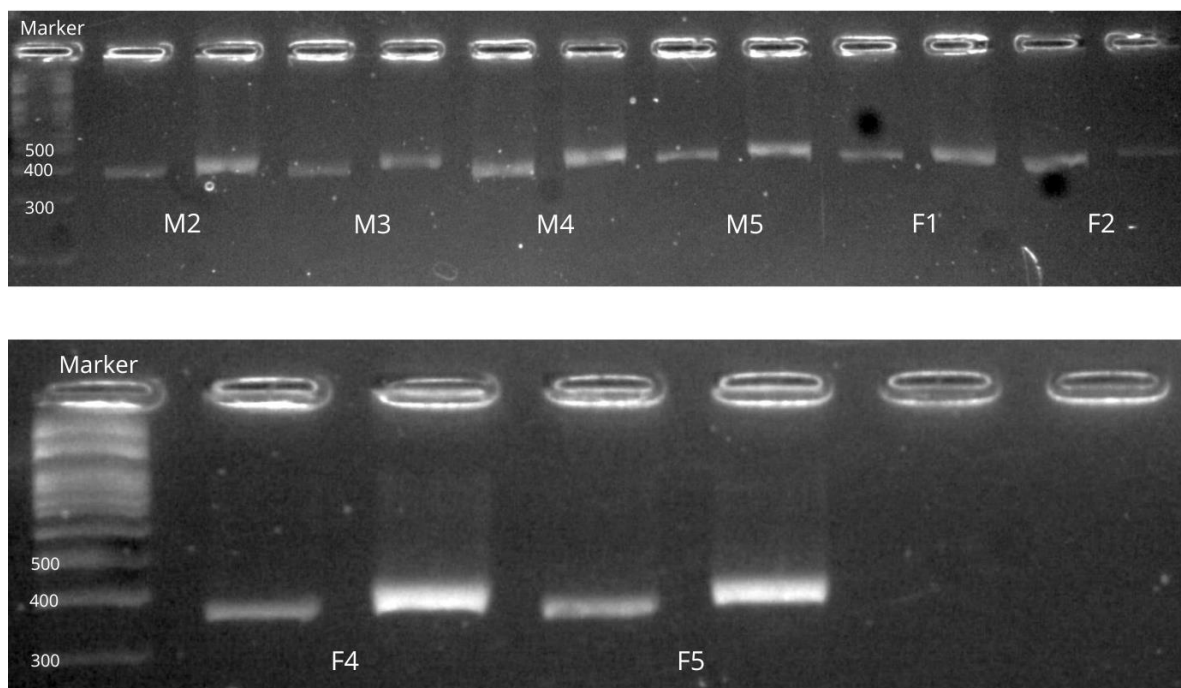
Reagencie	Objem (μl)
PPP Master mix (TopBio s.r.o.)	12,5
dH2O	9,5
MTRR F1/F2 primer (20 pmol)	1
MTRR R1/R2 primer (20 pmol)	1
DNA	1
Celkem	25

Tabulka VII: Složení reakční směsi pro výslednou reakci.

	Počet cyklů	Teplota °C	Čas (min)
Počáteční denaturace	1	94	1
Denaturace	35	94	0,5
Annealing		63	0,5
Elongace		72	0,5
Post elongace	1	72	5

Tabulka VIII: PCR profil výsledné reakce

Na obrázku III lze vidět produkty poslední optimalizační reakce. Na gel byly naneseny všechny vzorky s výjimkou M1 a F3, jelikož jejich genotypy byly patrné z první optimalizační reakce a nebylo proto nutné je testovat znovu.



Obrázek III: Výsledný produkt poslední reakce

Tabulka IX ukazuje, že ve všech případech byla potvrzen genotyp AG, tedy heterozygotní genotyp.

Vzorek	Výsledný genotyp
F1	AG
F2	AG
F3	AG
F4	AG
F5	AG
M1	AG
M2	AG
M3	AG
M4	AG
M5	AG

Tabulka IX: Výsledné genotypy vzorků

6 ZÁVĚR

Teoretická část této práce pojednávala o metodě PCR, složkách reakční směsi a možnostech zobrazení PCR produktu. Dále byly objasněny důležité pojmy související tématem práce, jako například polymorfismus v genu MTRR. Nakonec byla popsána konkrétní modifikace PCR, která byla využita v praktické části práce – alelově-specifická polymerázová řetězová reakce (AS-PCR).

Následovala praktická část, ve které byl jako první vysvětlen proces optimalizace – v našem případě určení vhodného mixu a annealingové teploty. Dále jsem shrnula průběh izolace DNA a složení reakční směsi, které jsme při reakcích použili. V poslední podkapitole, kterou praktická část obsahovala, byla popsána gelová elektroforéza, její postup a získané výsledky.

Cíl práce byl naplněn provedením dvou optimalizačních reakcí – na základě výsledků první reakce byl vybrán vhodný mix a pomocí gradientové analýzy byla určena annealingová teplota. Všechny testované vzorky vykazovaly heterozygotní genotyp. Získané výsledky budou validovány pomocí jiné nezávislé metody, např. sekvenací.

7 BIBLIOGRAFIE

- [1] Association study of polymorphisms at A66G (rs1801394) of MTRR gene and autism spectrum disorders in a Kurdish population. *Gene Reports* [online]. 2020, 2020 (21), 5 [cit. 2023-11-30]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2452014420303630>
- [2] COVID-19: úvod, inkubační doba, průvodce a sezónnost onemocnění. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. 2022 [cit. 2023-10-22]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/447-covid-19-zakladni-informace>
- [3] Deoxyribonucleic acid (DNA). *National Human Genome Research Institute* [online]. 2005 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>
- [4] Elektroforetická separace nukleových kyselin. *LabGuide* [online]. 2014 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [5] Elektroforéza nukleových kyselin. *Biogen* [online]. 1999 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://biogen.cz/elektroforeza-nukleovych-kyselin>
- [6] Gel Electrophoresis. *Amoeba Sisters* [online]. 2018. [cit. 2023-11-20]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=ZDZUAleWX78>
- [7] Gelová elektroforéza. *Fakulta veterinární hygieny a ekologie - Veterinární fakulta Brno* [online]. 2011.[cit. 2023-11-20]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
- [8] Genetický drift. *Biogeografie* [online]. 2010 [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/Z0005/18118868/index_book_2-5-2.html
- [9] *Genetický polymorfismus* [Soubor PDF]. 2016. [cit. 2023-11-23]. Dostupné také z: <http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz--6c6fdb1b9c.pdf>

- [10] GOTTWALDOVÁ, Jana. *Elektroforetické techniky* [Soubor PDF]. 2017. [cit. 2023-11-20]. Dostupné také z https://is.muni.cz/el/med/jaro2017/BLIT0222p/um/Elektroforeticke_techiky.pdf
- [11] Izolace DNA. *WikiSkripta* [online]. 2020, 30.11.2020 [cit. 2023-11-20]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Izolace_DNA
- [12] Izolace genomové DNA. *LabGuide.cz* [online]. 2014 [cit. 2024-01-24]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin-z-tkani/izolace-genomove-dna/>
- [13] Izolace genomové DNA pomocí. *LabGuide.cz* [online]. 2022, 9.8.2022 [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin-z-tkani/izolace-genomove-dna/izolace-genomove-dna-pomoci-fenol-chloroformu/>
- [14] Karry B. Mullis. *The Nobel Prize* [online]. 1997 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>
- [15] Lýza. *Velký lékařský slovník* [online]. 2006. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/lyza-3>
- [16] METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE; MTRR. *OMIM* [online]. 12.6.2017 [cit. 2023-11-30]. Dostupné z: <https://omim.org/entry/602568?search=MTRR&highlight=mtrr>
- [17] Modifikace PCR. *LabGuide.cz* [online]. 2022, 16.5.2022 [cit. 2023-10-24]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/modifikace-pcr/>
- [18] Nukleotidy. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. 2018 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/1550>
- [19] PANTŮČEK, Roman. *Izolace nukleových kyselin* [Soubor PDF]. 20. 2. 2018. [cit. 2023-11-20]. Dostupné také z https://is.muni.cz/el/sci/jaro2018/Bi4020c/um/Izolace_nukleovych_kyselin.pdf
- [20] PAPOUŠEK, Ivo. *Polymerázová řetězová reakce (PCR)* [Prezentace PowerPoint Microsoft 365]. Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno, 2022.
- [21] PCR. *LabGuide* [online]. 2014 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

- [22] Polymerázová řetězová reakce. *Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU* [online]. 1994 [cit. 2023-10-01]. Dostupné z: <https://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>
- [23] Polymorfismus lidské DNA [Soubor PDF]. 2007. [cit. 2023-11-23]. Dostupné také z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2007/Bi7250/um/Polymorfismus_lidske_DNA.pdf
- [24] Rejstřík pojmů - Alela. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. 2022 [cit. 2023-10-22]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/4978>
- [25] SNP. *Genetika - Biologie* [online]. 2011, 31.8.2011 [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/snp>
- [26] ŠÍPEK, Antonín. *Genetika* [Soubor PDF]. 2011. [cit. 2023-10-23]. Dostupné také z: <http://www.genetika-biologie.cz/soubory/Genetika.pdf>
- [27] ŠMARDA, Jiří; Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ, Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1
- [28] TAQ Polymerase: What Is It & What Does It Do? *ExCedr.com* [online]. 2013 [cit. 2023-10-10]. Dostupné z: <https://www.excedr.com/resources/taq-polymerase-what-is-it-and-what-does-it-do>
- [29] *The polymerase chain reaction*. Online. *American physiological society* [online]. 2004. [cit. 2023-10-22]. Dostupné z: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00002.2004>.
- [30] *Thermus Aquaticus*. *ScienceDirect* [online]. 1995 [cit. 2023-10-01]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/thermus-aquaticus>

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. I Výsledný produkt první reakce

Obr. II Výsledný produkt druhé reakce

Obr. III Výsledný produkt poslední reakce

Tab. I Použité primery

Tab. II Složení reakční směsi pro jednu reakci

Tab. III Složení reakční směsi pro první optimalizační reakci

Tab. IV Použitý PCR profil pro detekci polymorfismu MTRR A66G

Tab. V Složení reakční směsi pro druhou optimalizační reakci

Tab. VI PCR profil pro amplifikaci polymorfismu MTRR A66G

Tab. VII Složení reakční směsi pro výslednou reakci

Tab. VIII PCR profil výsledné reakce

Tab. IX Výsledné genotypy vzorků