

Analýza polymorfismu mikrosatelitových lokusů DNA

–

PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů, sekvenační polyakrylamidová elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu, vizualizace fragmentů DNA stříbrem, vyhodnocení paternity na základě analýzy mikrosatelitů (Cvičení č. 4 v předmětu Experimentální metody molekulární biologie)

Teoretický úvod

Mikrosatelity (STRs = single tandem repeats nebo SSRs = simple sequence repeats) jsou typem tandemových repetíci a délka jejich repetitivní jednotky je 1 – 9 bp. Mikrosatelity se obvykle vyskytují ve velkém počtu alel. Jsou kodominantní, vysoce variabilní a somaticky stabilní, což je přímo předurčuje k využití jako molekulární markery. Nejběžněji zastoupeným mikrosatelitem je sekvence CA, dále jsou to např. GATA, GACA, CAC a mnohé jiné. Výhodou mikrosatelitů je rovněž fakt, že se v genomu vyskytují častěji než minisatelity.

Sekvence mikrosatelitové DNA jsou velmi účinným nástrojem pro určování paternity díky kodominanci svých alel a jejich velké variabilitě. Zjištěná frekvence vzniku jejich mutací je $5 \times 10^{-2} - 10^{-6}$, většinou však zůstává v rozmezí $10^{-4} - 10^{-5}$. To je dostatečně vysoká hodnota, aby existoval tak velký alelový polymorfismus, ze kterého lze s vysokou spolehlivostí vyčíst potřebná data týkající se paternity. Zároveň je ale tak nízká, že variabilita mezi jedinci nepřekrývá variabilitu jedinců ve skupině a je možno určovat jejich příbuzenské vztahy. To platí, pokud zkoumaní jedinci pocházejí ze stejného časového období. Pokud je mezi jedinci určitá časová mezera (roky až desetiletí, případně více např. při fylogenetických studiích), nelze účinek mutací na vznik nových alel zanedbávat.

Nové alely téhož mikrosatelitového lokusu vznikají především 'sklouznutím' DNA polymerázy při replikaci DNA (DNA slippage). Ostatní typy mutací jsou při vzniku nových alel mikrosatelitových lokusů vzácné. Lze předpokládat, že nekorektním čtením DNA polymerázy vznikají pouze mutantní alely, které jsou buď kratší nebo delší než alela originální a od ní se liší délkou, jež je násobkem délky základní jednotky repetice. Při studiu mikrosatelitové DNA nelze zjistit, zdali homozygotní jedinec má obě své alely identické původem od společného předka nebo jestli se jedná o produkty různých mutací zděděné od různých předků.

Analýza mikrosatelitové DNA a její využití v ornitologii

První studie využívající mikrosatelitovou DNA se objevily koncem 80. let 20. století. Polymorfní mikrosatelitové lokusy byly hledány v genomické DNA zkoumaného biologického druhu pomocí DNA fingerprintingu. V knihovně fragmentů genomické DNA se pomocí DNA fingerprintingu za použití DNA sondy složené z několika opakování di- až tetranukleotidové repetice vyselektují klony, které se sondou hybridizují. Tyto klony se osekvenují a v jedinečných sekvencích přiléhajících k repetici se navrhnou sekvence primerů. Pokud s nimi provedená PCR amplifikace DNA dává vznik délkově polymorfním produktům u různých jedinců, jsou tyto primery použity pro PCR screening zkoumané populace daného druhu.

Data získaná studiem mikrosatelitových sekvencí DNA sloužila a slouží dodnes u jednotlivých ptačích druhů ke zjišťování příbuzenských vztahů mezi jedinci. Především se takto stanovuje paternita (mimopárových mláďat) a vnitrodruhový hnízdní parazitizmus. V zásadě jde buď pouze o určení mimopárových mláďat, nebo jsou získaná data jednou z indicií, která slouží pro podporu či vyvrácení teorií zabývajících se populačními a reprodukčními charakteristikami studovaných živočichů, případně jejich geografickým rozšířením.

Princip studia variability mikrosatelitové DNA a hodnocení výsledků

Využití mikrosatelitové DNA pro zjištění paternity a příbuzenských vztahů ve vybrané populaci ptáků je založeno na studiu variability určitého mikrosatelitového lokusu u všech zkoumaných jedinců. Konkrétně se jedná o detekci všech různých alel tohoto lokusu u všech vyšetřovaných jedinců.

Vychází se zde z faktu, že VNTRs lokusy jsou sice variabilní v počtu opakování základního motivu, tedy ve své délce, ale zároveň se z rodičů na potomky dědí striktně podle pravidel Mendelovské dědičnosti. Potomek tedy může od svých rodičů zdědit pouze ty alely VNTR lokusu, které jeho rodiče mají, neuvažujeme-li velmi vzácnou možnost mutace právě tohoto lokusu. Každý jedinec tak může být na daném lokusu buď homozygotní nebo heterozygotní. Využití mikrosatelitové DNA pro zjištění paternity tedy spočívá v určení konkrétních alel daného mikrosatelitového lokusu u všech potomků i u jejich potenciálních rodičů a zjištění, zdali potomci opravdu mají takové alely, které jsou některou z možných kombinací alel potenciálních rodičů.

Pokud tomu tak je, testování potenciální rodiče, kteří se o mláďata starají, jsou s velkou pravděpodobností jejich praví biologičtí rodiče. Pokud je u mláďete zjištěna alela, která se u

některého z potenciálních rodičů nevyskytuje, pak tento rodič jednoznačně nemůže být biologickým rodičem tohoto mláděte. Jak z předchozího textu vyplývá, je tedy téměř s absolutní jistotou možné vyloučit příbuzenský vztah mezi potenciálním rodičem a jeho potomkem (zanedbáme-li pravděpodobnost vzniku mutace), ale potvrzení tohoto vztahu na základě výskytu stejných alel má pouze pravděpodobnostní charakter a není nikdy stoprocentní. Pro zvýšení této pravděpodobnosti se proto studuje nezávisle několik mikrosatelitových lokusů a konečné potvrzení či vyvrácení biologické příbuznosti ve vztahu rodič – potomek je výsledkem porovnání dat zjištěných studiem všech těchto vybraných mikrosatelitových lokusů (obvykle 3 až 6).

Provedení spočívá v PCR amplifikaci zvoleného VNTR lokusu ohraničeného párem primerů, které leží v sousedních jedinečných regiorech ohraničujících tuto repetitivní oblast, a v porovnání počtu opakování základního motivu v tomto VNTR lokusu. Prakticky se však porovnává mobilita PCR fragmentů technikami založenými na elektroforetické separaci těchto produktů, kdy rychlost jejich postupu gelem je nepřímo úměrná počtu opakování základního motivu, tedy délce PCR produktů.

K tomuto účelu používáme v naší laboratoři techniku založenou na elektroforetické separaci PCR produktů za denaturujících podmínek v polyakrylamidovém gelu ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce za vysokého napětí ($\approx 1500 - 2500$ V), které následuje barvení stříbrem, usušení gelu a vyhodnocení.

Obvyklým výsledkem elektroforézy PCR produktů amplifikace mikrosatelitového lokusu není jeden band či dvojice bandů (záleží na homozygotní či heterozygotní konstituci organismu v daném lokusu), ale několik bandů, jejichž uspořádání spíše připomíná rozdělení bandů u standardů molekulové hmotnosti. Nejvýraznějším bandem bývá přesná kopie originální alely, další bandy ('stutter' bandy) jsou obvykle kratší než originální alela a liší se od ní v počtu opakování základní repetice. Nejpravděpodobnější vysvětlení vzniku 'stutter' bandů je v in vitro 'sklouznutí' DNA polymerázy (DNA slippage) v průběhu PCR reakce. Tato teorie vzniku 'stutter' bandů je ve shodě s faktem, že čím je DNA řetězec 'stutter' bandu kratší než řetězec originální alely, tím je 'stutter' band méně intenzivnější (světlejší). Pokles intenzity bandů směrem k jejich kratší délce odpovídá snížení pravděpodobnosti vzniku posunu DNA s rostoucí odchylkou délky PCR produktu tvořícího 'stutter' band od délky PCR produktu originální alely. Pravděpodobnost in vitro posunu DNA v průběhu PCR reakce se snižuje se zvětšující se délkou jednotky repetice. Více 'stutter' bandů se tedy vyskytuje v produktech PCR amplifikace mikrosatelitových oblastí s dinukleotidovou jednotkou repetice, méně u trinukleotidových a ještě méně u tetranukleotidových jednotek repetice.

Kromě výše zmíněných ‘stutter‘ bandů, které jsou kratší než originální alela, se u mnoha mikrosatelitů vyskytuje i jeden band s PCR produktem delším, než je délka originální alely. Vznik tohoto bandu je závislý na faktu, že DNA Taq polymeráza vykazuje i aktivitu terminální transferázy, která přidává navíc jeden dATP na konec syntetizovaného vlákna. Tato terminálně transferázová aktivita záleží na druhu používané polymerázy i na použitých primerech.

Dalším jevem, který může negativně ovlivnit analýzu mikrosatelitové DNA, je výskyt tzv. nulových či neamplifikujících se alel. Tyto neamplifikující se alely se například poznají tak, že v populaci, kde sledujeme analýzou mikrosatelitové DNA několika lokusů výskyt mimopárových mládřat, se najde homozygotní matka, jejíž některá mládřata od ní zdánlivě nezdědily její alelu. V první fázi jev připomíná výskyt vnitrodruhového hnízdního parazitizmu, ale ostatní mikrosatelitové lokusy dokazují, že se o hnízdní parazitizmus nejedná. Tento jev se dá vysvětlit výskytem neamplifikující se alely. Matka není ve skutečnosti homozygotní, ale je heterozygotní s jednou amplifikující se a jednou neamplifikující se alelou. Pokud je nositelem nulové alely zdánlivě homozygotní otec, je nebezpečí, že mládřata, která od něho zdědila nulovou alelu, budou označena jako produkty mimopárové paternity.

Principem vzniku nulové alely je mutace DNA v místě, které je homologní k sekvenci primeru (obvykle v úseku blízkém 3' konci primeru), a tím znemožňuje proběhnutí PCR reakce. Přímý důkaz potvrzující nulovou alelu je nasekvenování PCR produktu vyšetřovaného lokusu (některé amplifikující se alely) a následná úprava sekvence nenedávajícího primeru, tedy jeho posunutí o několik nukleotidů vedle mutace. Reakce s takto pozměněným párem primerů proběhne a takovýto lokus je potom plně použitelný pro determinaci paternity.

Technické aspekty použití polyakrylamidových gelů a barvení stříbrem pro molekuly DNA

Vlastní elektroforetické rozdělení DNA se děje v 6% polyakrylamidovém gelu (6% roztoku akrylamid: N, N'-methylenbisakrylamid 19:1, močovina, TBE pufr, deionizovaná voda). Polyakrylamidové (PAA) gely jsou pro sekvenční elektroforézy využívány díky nízkému výskytu nabitých skupin, které by rušily vlastní elektroforetickou separaci DNA fragmentů a dále z důvodu vysoké míry rozlišení rozdělovaných částic a též díky rychlému běhu elektroforézy. Tloušťka polyakrylamidových gelů se pohybuje obvykle v rozmezí 0,1 – 1 mm, což přináší výhodu zejména v jednodušší vizualizaci výsledků a znamená též použití minimálního množství vzorku.

Polymerizace PAA gelu:

Polymerizační reakce při přípravě gelu je založena na řetězení monomeru akrylamidu, ke kterému se jako agens působící prostorové zesíťování gelu přidává N, N'-metylenbisakrylamid. Polymerizace však nastává pouze v přítomnosti volných radikálů. Obvykle se k tomuto účelu používá peroxodisíranový anion ($S_2O_4^{2-}$). Další nezbytnou součástí polymerizační reakce je akcelerátor zastoupený chemickou sloučeninou obsahující ve své molekule terciární aminovou skupinu. Obvykle se k tomuto účelu používá N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED). Protože polyakrylamid je syntetický polymer, mohou být jeho vlastnosti přesně upraveny pro požadované použití změnou koncentrací monomerů a polymeraci ovlivňujících látek.

Velikost pórů gelu:

Obvykle se při charakteristice vlastností PAA gelů používá procentualita. Platí, že čím vyšší procentuální koncentraci PAA gel má, tím nižší je MW molekul, které budou v gelu nejlépe rozděleny. Přesněji se vlastnosti PAA gelu definují pomocí veličin T a C. T udává celkovou procentuální koncentraci akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu v gelu. C udává procentuální koncentraci činidla způsobujícího prostorové zesíťování polymeru (N, N'-metylenbisakrylamid) ve směsi akrylamid:N, N'-metylenbisakrylamid. V případě námi používaného gelu (75 ml 40 % roztoku akrylamid:N, N'-metylenbisakrylamid 19:1 v 1000 ml celkového objemu gelu je procentualita gelu 6 % a obsah N, N'-metylenbisakrylamidu v roztoku akrylamid:N, N'-metylenbisakrylamid je 5 %. Tedy parametry našeho gelu podle TC symboliky jsou T6 C5.

Matematické vyjádření vztahu mezi velikostí pórů a koncentrací gelu říká, že průměrná velikost pórů v PAA gelu je nepřímo úměrná druhé odmocnině koncentrace gelu a je tedy větší u méně koncentrovanějších gelů. Prakticky se nepoužívají gely s hodnotou T nižší než 5, protože již postrádají potřebnou mechanickou stabilitu.

V kontrastu k celkové koncentraci gelu je procentuální zastoupení prostorově zesíťujícího činidla ovlivňující velikost pórů v gelu možno popsat křivkou velmi se přibližující parabole s minimem velikosti pórů v gelu ležícím přibližně v hodnotě C5. Při snížení i zvýšení hodnoty C velikost pórů v gelu roste. Prakticky se nepoužívají gely s hodnotou C vyšší než 30, protože již kolabují díky „vypocení“ vody.

Silanizace:

Jedno ze skel (větší) se ošetří na straně přiléhající k gelu prostředkem proti ulpívání vody na sklech automobilů a druhé (kratší) sklo se na straně kontaktu s gelem potře roztokem 3 – methakryloxypropyltrimethoxysilanu, který působí jako molekulární lepidlo. Tato látka přilne ke sklu a při nalévání gelu se některé funkční skupiny její molekuly zapojují do polymerizační reakce, a tak je gel vlastně ke sklu přilepen. Vzhledem k rozměrům a tloušťce gelu by totiž nebylo možné s ním vůbec manipulovat bez poškození a manipulace s gelem nalepeným na skle je naprosto jednoduchá a sklo s nalepeným a vysušeným gelem může být též následně archivováno i po několik měsíců. PAA gely totiž samy o sobě ke sklu nepřilnou a silanizace je levným a efektivním postupem, jak tuto nevýhodu eliminovat a gel při vizualizaci výsledků nepoškodit.

Chemické vazby vzniklé polymerizací v PAA gelu i vazby vzniklé mezi molekulami gelu a silanem jsou stabilní do hodnoty pH přibližně 10. Dalším zvyšováním alkality se poškozují, polymer křehne, trhá se a odlepuje se od skla. Toho se využívá při znovupoužití skel pro nalití nového gelu, kdy se sklo s gelem ponoří na několik desítek minut až hodin do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l.

Příprava PCR produktů pro elektroforetickou separaci:

Před vlastní elektroforetickou separací PCR produktů se nejprve gel umístí do komůrky a připojí ke zdroji napětí, aby se vytemperoval na teplotu mezi 40 – 50 °C. Před nanesením vzorků se PCR produkty smísí s nanášecím roztokem (formamid + barvivo), denaturují se při 95 °C a prudce se ochladí v ledu.

Nezanedbatelnou součástí nanášecího roztoku jsou barviva, která umožňují velmi spolehlivě odhadnout, kde se právě v gelu nacházejí fragmenty gelu určité délky. V námi používaném 6 % PAA gelu se bromfenolová modř pohybuje přibližně stejně rychle jako řetězce DNA dlouhé 25 bází a xylenová modř se pohybuje přibližně stejně rychle jako řetězce DNA dlouhé 105 bází.

Elektroforetická separace:

Vlastní elektroforetická separace začíná nanesením PCR produktů s nanášecím roztokem do gelu. Vlastní elektroforetické dělení trvá v závislosti na velikosti (délce) PCR produktů 1 – 3 hodiny. Protože gel je dlouhý přes 30 cm a vzorky se rozdělí většinou v délce kolem 10 cm, lze na jeden gel použít dvě sady vzorků. Předem je však nutné spočítat

vzdálenost mezi startem a vzorky a vzdálenost mezi oběma sadami vzorků tak, aby se obě sady produktů na gely nepřekrýly a aby byl záznam na gelu potom hodnotitelný.

Barvení DNA fragmentů v gelu stříbrem:

Barvení stříbrem při studiu elektroforetogramů makromolekul bylo poprvé použito u proteinů. Zde se využívá vzniku malých částeczek vyredukovaného kovového stříbra kolem molekuly proteinu fixovaných prostředím gelové matrix. Následně se zjistilo, že stejného efektu lze dosáhnout při vizualizaci DNA, kdy se stříbrné ionty redukují v kontaktu s bázemi.

Využití redukce stříbrných iontů pro vizualizaci DNA fragmentů je velmi výhodné, neboť umožňuje zviditelnit už množství 1 pg dvouvláknové DNA/mm² v sekvenačním gelu. Tato technika vizualizace DNA v gelu je tedy srovnatelná se systémy, které jsou založeny na fluorescenci či radioaktivitě a je přibližně třikrát citlivější vizualice DNA pomocí ethidium bromidu. Za určitých podmínek je dokonce i citlivější než radioaktivní techniky.

Značení stříbrem je i časově výhodné, neboť celý proces není delší než dvě hodiny, což je často rychlejší než při použití radioaktivity. Navíc není zapotřebí, žádného speciálního laboratorního vybavení, ani speciálních chemikálií a už vůbec nevzniká problém se speciálním režimem laboratoře pro práci s radioaktivními látkami.

Technika vizualizace DNA fragmentů v gelu pomocí stříbra se skládá z několika kroků: První fází je fixace gelu v roztoku kyseliny octové, kdy dochází k vyplavení močoviny z gelu a k fixaci DNA fragmentů v gelu a tedy zabránění difúze těchto molekul DNA. Druhým krokem je opláchnutí gelu v destilované vodě, aby se odstranily všechny zbytky kyseliny octové a močoviny. Pak následuje ponoření gelu do roztoku kyseliny dusičné, které brání vzniku nespecifického pozadí. Následuje další vymytí destilovanou vodou a ponoření na 30 minut do lázně dusičnanu stříbrného s přísadkou formaldehydu, který zvyšuje senzitivitu barvení a kontrast. Před vyvoláním obrazu se gel ještě na 5 vteřin ponoří do vody, aby se odmylo přebytečné stříbro, které by způsobilo vznik nespecifického pozadí. Vyvolávání se děje v alkalickém prostředí uhličitanu sodného, thiosíranu sodného a formaldehydu a zastaví se snížením pH kyselinou octovou. Formaldehyd zde opět slouží k zvýšení citlivosti a kontrastu a thiosíran sodný pomáhá snižovat pozadí, neboť převádí nespecificky vyredukované kovové stříbro na povrchu gelu do komplexní podoby, a tím dochází k jeho rozpuštění a odstranění nežádoucího zbarvení.

Kritické faktory:

Elektroforetická skla: Používají se buď originální skla od výrobce nebo zabroušená skla uříznutá z tzv. zrcadlového skla, které má definovanou konstantní tloušťku. Při použití skla, které toto kritérium nesplňuje, je pak gel po nalití různě tlustý, to způsobuje různé hodnoty proudu a napětí v různých místech gelu při vlastním elektroforetickém znamení a to ve svém důsledku znamená naprostou nemožnost hodnocení elektroforetogramu.

Detergent: Použití detergentu při mytí skel pro elektroforézu je nutné, ale ještě důležití je jeho úplné odstranění, neboť zbytky detergentu způsobují při stříbrném barvení zhnědnutí gelu a tedy zhoršené podmínky jeho hodnocení.

Gel: Gel musí být připravený z kvalitních chemikálií, bez mechanických nečistot a před nalitím dobře rozmíchaný. Nalítí gelu mezi skla musí být rychlé a bez bublinek, které, pokud se vyskytnou, značně ztěžují hodnocení elektroforetogramu.

Vlastní elektroforetické dělení: Skla musí být před upnutím do elektroforetické komůrky důkladně osušena a následně řádně upnuta. Opomenutí obojího znamená riziko probíjení proudu mezi elektrodami přes vyhřívanou hliníkovou desku elektroforézy (zkratu) a může znamenat i naprosté zničení elektroforetogramu.

Teplota gelu: Předehřátí gelu je velmi významný krok, který zaručuje rovnoměrnou teplotu v celé ploše gelu. Pokud gel není dostatečně dobře předehřátý nebo nanášení vzorků trvalo příliš dlouho a gel v různých místech různě vychladnul, dojde k pokroucení linie vzorků, známé jako smileefekt, které je největší u krajů gelu a značně zhoršuje hodnocení gelu.

Voda: Pro všechny operace je nutné používat kvalitní deionizovanou vodu. Neuspokojivá kvalita vody má za následek vznik nespecifického pozadí a pokles senzitivity barvení.

Fixace DNA fragmentů gelu: Tento krok je velmi důležitý a neměla by se zkracovat jeho doba, neboť zbytky nevymyté močoviny v gelu způsobí jeho zežloutnutí a tedy zhoršené podmínky jeho hodnocení. Fixaci je možno prodloužit přes noc, ale ani prodloužení tohoto bodu přes noc nepůsobí problémy.

Teplota vývojky: Optimální teplota vývojky je 4 °C. Vyvíjení záznamu v gelu pak trvá asi 5 minut a lze lépe kontrolovat průběh reakce a tu pak zastavit v okamžiku, kdy zviditelněná DNA má optimální kontrast a pozadí se ještě nevyvinulo. Na rozdíl od např. radioaktivní vizualizace je tento typ barvení DNA ireverzibilní a je proto nutné vyvíjení zbarvení zastavit právě při optimálním kontrastu bandů vzhledem k pozadí.

Koncentrace PCR produktu: Množství PCR produktu ve vzorku určuje kvalitu záznamu, neboť pokud je DNA moc, tak bandy jsou rozmazané a směrem ke startu se z nich vytažují rozmazané stíny.

Uchování obrazů elektroforéz:

Nejjednodušší možností uchování výsledků elektroforéz je uchování skla s gelem. Obarvený a usušený gel je na skle stabilní několik měsíců a pokud se obalí potravinářskou fólií, je na něj možné psát fixem a při vyhodnocování na negatoskopu se zabrání poškození gelu potem z rukou.

Další možností uchování záznamu je naskenování gelu. Při obvyklé velikosti skel sekvenačních elektroforéz je však potřeba scanner formátu A3. Při použití scanneru s menší plochou záznamu sklo s gelem leží několik mm nad plochou scanneru a záznam je rozmazaný.

Alternativní technikou pro uchování záznamu gelu je jeho vyfotografování digitálním fotoaparátem v makrorežimu či ještě lépe s použitím přídavné makročočky. Fotografovat gel je možné na bílém podkladu nebo ještě lépe na zapnutém negatoskopu, kdy je gel prosvěcován a kontrast záznamu na gelu je tak maximální. Vyhodnocení záznamu z gelu v počítači je pak ještě jednodušší, neboť je možné upravovat jas, kontrast a zvětšení problematicky hodnotitelných míst a navíc lze pro hodnocení použít některý speciální software pro hodnocení elektroforetogramů.

Praktické provedení

Úloha: Analýza paternity u lindušky luční (*Anthus pratensis*) pomocí mikrosatelitové DNA

PCR amplifikace DNA

Složení PCR mixu pro 96 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování) pro dvojice primerů FhU2, FhU3, FhU4:

Složení PCR mixu pro 10 (12) vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování) pro lokusy Ase18, Ase48 a Mcyμ4:

- Storage Buffer (10x) 12 μl
- Roztok MgCl₂ o koncentraci 25 nmol/l 7,2 μl
- Roztok dNTPs o koncentraci 100 μmol/l 24 μl

- Primer A o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ 6 μl
- Primer B o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ 6 μl
- *Taq* polymeráza 1 U/ μl 6 μl
- Deionizovaná voda 52 μl

Mikrozkumavku po napipetování všech složek zvortexovat a krátce zcentrifugovat. Každá reakce sestává z 9 μl PCR mixu a 1 μl roztoku DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$.

Časový a teplotní profil PCR reakce je následující:

94 °C: 5 min

35 x: 94 °C: 30 s

61 °C: 30 s (Ase18) nebo 50 °C (Ase48 a Mcy μ 4)

72 °C: 30 s

72 °C: 7 min

Zpracování PCR produktů

Tento postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm. Většina používaných látek jsou jedy, karcinogeny či látky jinak poškozující lidské zdraví, proto je nutné provádět většinu kroků v digestoři a používat ochranné rukavice.

- 1) Obě skla důkladně omýt vodou se saponátem a vydrhnout kartáčkem. Po té je opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát opláchnout 96% ethanolem a osušit papírovým ručníkem.
- 2) Větší sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (Rain-X, Pennzoil-Quaker State, Bishops Stortford, UK), ten rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, pak opláchnout deionizovanou vodou a osušit papírovým ručníkem.
- 3) Kratší sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Ten rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, pak čtyřikrát opláchnout 96% ethanolem a pokaždé osušit papírovým ručníkem.
- 4) Na rovnou podložku v digestoři (polystyrénová deska) umístit větší sklo ošetřenou plochou nahoru, na něj po stranách položit 0,4 mm silné spacers a na ně položit menší sklo ošetřenou

plochou dolu. Spacery umístit až do kraje skel, gumu spaceru přiložit k menšímu sklu, aby se jej těsně dotýkala. Na jedné kratší straně jsou hrany skel přesně v zákrytu, na protilehlé kratší straně jsou konce skel vzájemně posunuty přibližně o 2,5 cm. V místě spacerů skla na každé straně sepnout dvěma klipsy.

- 5) Gel připravit v kádince smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid : N,N'-metylenbisakrylamid 19 : 1, 400 μ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného a 40 μ l N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu. Roztok dobře promíchat a nasát do injekční stříkačky přiměřeného objemu. Pak pomalu vypouštět mezi skla po celé délce kratšího skla na tom čele, kde toto sklo nedosahuje čela skla delšího. Zároveň při tom na sklo druhou rukou poklepávat, aby se předešlo vzniku bublin v gelu.
- 6) Když je vyplněn celý prostor mezi skly gelem, vsunout mezi skla v místě, kde se plnil tento prostor gelem, hřebínek jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hluboko. V místě hřebínku skla sepnout čtyřmi klipsy a gel nechat nejméně hodinu polymerizovat. Pokud se gel připravuje na další den, tak jeho čela zabalit do potravinářské fólie, a tak zabránit jeho vysychání.
- 7) Po utužení gelu odstranit všechny klipsy a skla důkladně omýt od všech zbytků polyakrylamidu, se zvláštním důrazem a opatrností v prostoru hřebínku. Sklo poté osušit papírovým ručníkem a pevně upevnit pomocí šroubovacích úchyťů do elektroforetické komůrky hranou s hřebínkem nahoru a kratším sklem k hliníkové desce elektroforetické komůrky.
- 8) Katodový i anodový prostor zalít 0,5 x TBE pufrem, opatrně vytáhnout hřebínek a vzniklou mezeru mezi skly dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor uzavřít, nasadit elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000V/150mA). Za těchto podmínek nechat gel předežhřát asi 30 minut.
- 9) Pět minut před nanesením vzorků tyto vzorky vzniklé smísením 1 objemového dílu PCR produktu a 1 dílu nanášecího pufru vložit na 3 minuty do denaturačních podmínek (např. termocyklér nebo termoblok vytemperovaný na 96 °C). Po vytažení mikrozkuhavky se vzorky okamžitě vsunout do ledové tříště, aby se zbránilo renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
- 10) Během denaturace zatím vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit katodu, otevřít katodový prostor a znovu dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky mezeru pro hřebínek od zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do této mezery mezi skly vsunout hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu tak, aby nedošlo k ulomení

některého zoubku. Ideální je hřebínek s tvarem zoubku označovaným jako „sharktooth – žraločí zub“ a s označením MP, což znamená, že hřebínek je vhodný pro nanášení vzorků 8 kanálovou pipetou a proces pipetování se tak značně urychlí.

- 11) Nyní je možné nanést po 3 μ l jednotlivých vzorků pipetou do mezer mezi zoubky hřebínku. Na všechny vzorky použít tytéž špičky, které mezi nanášením rozdílných vzorků pročistit několikerým nasátím a vypuštěním pufru z katodového prostoru pipetou. Po napipetování všech vzorků katodový prostor uzavřít, nasadit elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000V/150mA).
- 12) Čas separace vzorků závisí na molekulárních hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů. Orientačně je možné se řídit pomocí barviv v nanášecím pufru, jimiž jsou bromfenolová modř a xylenová modř, které ukazují průběh elektroforézy. Přičemž platí, že v 6% polyakrylamidovém gelu se bromfenolová modř pohybuje stejně rychle jako řetězce DNA dlouhé přibližně 60 párů bází a xylenová modř jako řetězce DNA dlouhé přibližně 220 párů bází. Obvyklá doba separace vzorků je 1 až 3 hodiny.
- 13) Během elektroforetického dělení vzorků připravit následující roztoky: 800 ml roztoku 10% kyseliny octové (fix/stop roztok), 800 ml roztoku 1% HNO_3 , 800 ml roztoku 0,1% roztoku AgNO_3 a 800 ml 3% roztoku Na_2CO_3 (vývojka), který se jako jediný umístí do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C.
- 14) Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a kolečkem na pravé straně elektroforetické komůrky otevřít kanálek, kterým pufr z katodové části přeteče do sběrného prostoru, povolit šrouby úchytů skel a gel se skly vyjmout a položit do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly opatrně vytáhnout hřebínek i oba spacery a skla od sebe odpáčit kouskem plechu nebo čepelí nože, obalenými vrstvou izolepy, aby se předešlo odštípnutí skla působením tvrdého kovu přímo na sklo.
- 15) Odchlípené menší sklo s přilepeným gelem otočit gelem nahoru a uložit do fotomisky (též gelem nahoru), umístit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku na gel je přibližně 20 minut a orientačně je možné charakterizovat dostatečný čas působení vymytím modrého pruhu xylenové modře z gelu do roztoku.
- 16) Fix/stop roztok slít do baňky a sklo s gelem promýt 3 krát po dvou minutách přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody. Pak následuje 5 minutové promytí gelu na třepačce v 1%

roztoku HNO_3 , vylítí tohoto roztoku a promytí gelu 3 krát po dvou minutách přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody.

- 17) Sklo s gelem umístit na třepačku do 0,1 % roztoku AgNO_3 , do kterého se těsně před použitím přidá 1,2 ml formaldehydu a tento roztok nechat na gel působit přibližně 30 minut.
- 18) Na konci této doby připravit jednu fotomisku s 1 – 2 l deionizované vody a druhou fotomisku s 800 ml vychlazeného 3% roztoku Na_2CO_3 (vývojka), do kterého se přidá 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
- 19) Fotomisku s gelem v roztoku AgNO_3 sejmout z třepačky a roztok slít zpět do zásobní lahve. Sklo s gelem vyjmout a na 5 vteřin ponořit do misky s deionizovanou vodou, nechat okapat a přemístit do fotomisky s vývojkou a tu umístit na třepačku, kde se sleduje vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
- 20) Když jsou proužky již dostatečně zřetelné a ještě než začne vystupovat tmavé pozadí, tak vyvíjení zbarvení zastavit přilítím fix/stop roztoku uchovaného z kroku 16). Roztok nechat působit na gel zhruba 2 minuty. Dobu působení je možné orientačně odhadnout podle toho, jestli z roztoku ještě masivně uniká v podobě bublinek vyloučený CO_2 .
- 21) Sklo s gelem potom ponořit asi na 2 minuty do deionizované vody, a pak přenést na 1 hodinu do sušárny, kde se gel při 60 °C vysuší. Po vysušení sklo popsat fixem v místě spaceru, kde není gel, a překrýt potravinářskou fólií. Tak je možné jej na několik týdnů až měsíců archivovat. Takto upravené sklo s gelem vyhodnotit na negatoskopu. Na fólii je možné psát fixem různé pomocné údaje k hodnocení a navíc brání přímému kontaktu pokožky s polyakrylamidem. K záznamu výsledku na skle je vhodné použít digitální fotoaparát v režimu „makro“ nebo sklo s gelem naskenovat.
- 22) Odečíst z elektroforetogramů konkrétní alely všech mikrosatelitových lokusů u mláďat i u jejich potenciálních rodičů a srovnat, jestli potomci mají takové alely, které jsou některou z možných kombinací alel matky i potenciálního otce. Pokud tomu tak je na všech testovaných lokusech, potenciální rodiče, kteří se o mláďata starají, označit jako jejich pravé biologické rodiče. Pokud je u mláďete alespoň na jednom hodnoceném lokusu zjištěna alela, která se u některého z potenciálních rodičů nevyskytuje, pak toto mláďě hodnotit jako mimopárového potomka.
- 23) Sklo s již nepotřebným gelem ponořit na několik desítek minut až několik hodin do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l. Gel by se měl kompletně odlepit a pokud ne, tak jej ze skla strhnout pomocí škrabky. Sklo se umyje a je znovu k použití.

Roztoky a chemikálie:

Zásobní 40% roztok akrylamid : N,N'-methylenbisakrylamid 19:1:

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'-methylenbisakrylamidu
- rozpuštit v 500 ml deionizované H₂O
- objem doplnit na 1 l
- roztok uložit v temné lahvi ve 4 °C

Zásobní roztok 6% akrylamidu:

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované H₂O
- 50 ml 10 x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N,N'-methylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

Polyakrylamidový 6% gel:

- 60ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
- 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

Fix/stop roztok:

- 80 ml ledové kyseliny octové
- objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Roztok 1% kyseliny dusičné HNO₃:

- 12 ml 65% HNO₃
- objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného AgNO₃:

- 0,8 g AgNO₃
- objem doplnit deionizovanou H₂O na 800 ml
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3

objem doplnit deionizovanou H_2O na 800 ml

uložit ve $4\text{ }^\circ\text{C}$

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

1 ml 0,5 % kyseliny octové v 96% ethanolu

3 μl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:

1 g peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

rozpustit v 10 ml deionizované H_2O

uchovávat v mikrozkuvkách po 400 μl v $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

5 g bromfenolová modř

30 ml glycerolu

doplnit deionizovanou H_2O na 100 ml