

CVIČENÍ Z GENETIKY ČLOVĚKA (KBB/GCCSB)

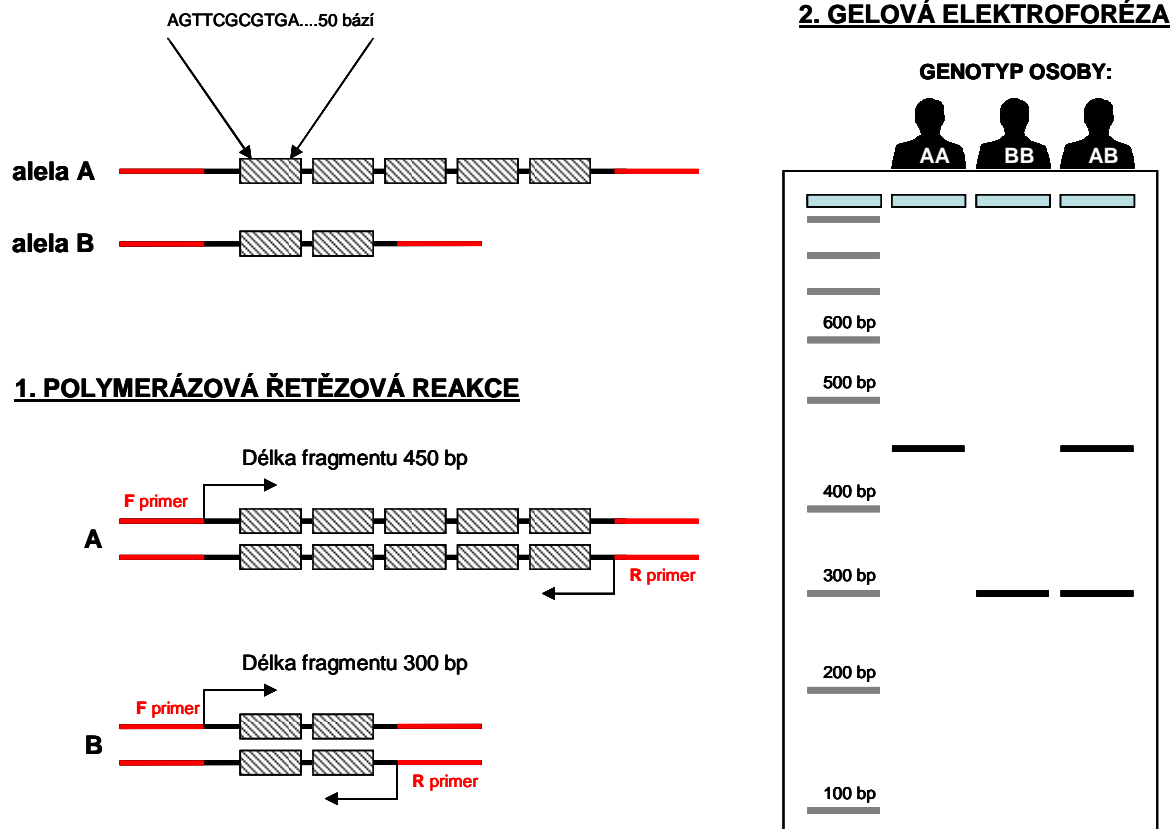
DNA FINGERPRINTING VE FORENZNÍ GENETICE – IDENTIFIKACE NEZNÁMÉHO PACHATELE

I. ÚVOD

DNA fingerprinting je v současné době rutinní způsob určení totožnosti osob z biologického vzorku na základě polymorfismů sekvencí vybraných úseků DNA. Je široce využíván jak v trestních případech, tak ve sporech občanskoprávních zejména ve spojitosti s určováním rodičovství. V obou případech jeho výsledky často slouží jako hlavní důkazní materiál. Postup DNA fingerprintingu je založen na určování genetické identity srovnáváním DNA sekvencí, které jsou jedinečné pro každou osobu (s výjimkou jednovaječných dvojčat!). Pojem DNA fingerprinting zahrnuje v sobě techniky jako *polymorfismus délek restrikčních fragmentů* (RFLP) a na PCR založené určení *variabilního počtu tandemových repetitiv* (VNTR) nebo *krátkých tandemových repetitiv* (STR).

Metoda RFLP vychází ze skutečnosti, že počet restrikčních fragmentů a jejich velikosti odráží specifické sekvence nukleotidů v DNA. Protože RFLP potřebuje relativně vysoké množství kvalitní DNA a navíc je to časově náročná metoda, nebývá běžně používána. Metody detekující VNTR nebo STR markery jsou běžnější díky citlivosti a menší časové náročnosti. Obě metody využívají PCR k amplifikaci krátkých úseků DNA. V současné době je určování STR lokusů nejběžnější metodou forezní genetiky. Vzhledem k tomu, že detekce velmi krátkých STR lokusů je instrumentálně a materiálně náročnější, nehodí se příliš pro praktická cvičení, jejichž cílem je především demonstrovat princip DNA fingerprintingu (viz. Obr. 1). Tato úloha používá snáze detekovatelné VNTR lokusy, jejichž vypovídací hodnota je vůči STR nižší, avšak pro účely praktického cvičení zcela postačuje. VNTR lokusy se obvykle skládají z opakujících se sekvencí délky 10-200 bp. Protože se jejich počet liší mezi jednotlivci, lze je takto použít jako specifické markery. Následující úloha v sobě spojuje základní úkon molekulární genetiky – izolaci DNA s její pokročilejší analýzou, která pomůže vyřešit konkrétní praktickou otázku po identifikaci jedince. Studenti by si takto měli snáze uvědomit společenský význam molekulárně-biologických metod a porozumět základnímu konceptu forezní genetiky.

Podstatou následující úlohy bude PCR amplifikace nekódujících úseků DNA, o kterých je známo, že vykazují polymorfismus u člověka. Pro identifikaci každého z biologických vzorků budou použity 4 odlišné typy primerů pro lokusy: Serotoninový transporter, (STT, krátký typ: 484 bp, dlouhý typ: 528 bp) u kterého je znám bimorfismus, dále pak Dopaminový receptor (DRD4) s až 11 rozdílnými alelami (nejkratší: 319 bp, nejdelší: 799, nárůst o 48 bp), D17S30 jež je vysoce polymorfní s více než 10 alelami a pohlaví determinující oblast na chromosomu Y (SRY), kde pozitivní reakci vykazují jen muži.



Obr. 1: Schematické znázornění principu DNA fingerprintingu

Studovaný VNTR lokus na obrázku se vyskytuje v populaci ve dvou variantách – alely A a B. Každá z variant obsahuje jiný počet repetitivních jednotek ohraničených konstantní oblastí, na kterou jsou navrženy primery. Amplifikací z těchto oblastí obdržíme PCR fragmenty, které se liší délkou v závislosti na počtu repetitivních jednotek v dané alele. Pomocí gelové elektroforézy separujeme DNA fragmenty podle jejich molekulové hmotnosti, což umožňuje rozlišit různě dlouhé PCR fragmenty. U každé osoby jsme takto schopni určit, které alely daného VNTR lokusu jedinec nese.

II. ÚKOL aneb Kriminálka Holice vyšetřuje:

Na místě násilného trestného činu byly zajištěny dva biologické vzorky – označené jako V1 a V2. V daném okamžiku se v okolí místa činu pohybovaly tři osoby (označené jako P1, P2 a P3), tyto byly podrobeny odběru biologických vzorků za účelem identifikace. Rovněž byl odebrán vzorek oběti (označen jako O1). Vaším úkolem je určit původ biologických vzorků V1 a V2, tj. jejich totožnost či rozdílnost se vzorky podezřelých a oběti.

Na základě PCR profilů biologických vzorků jednotlivých osob, určete původ neznámých vzorků „z místa činu“.

III. PROVEDENÍ

JE NEZBYTNÉ PRACOVAT V RUKAVICÍCH A DBÁT NA ČISTOTU PRÁCE, ABY SE ZAMEZILO KONTAMINACI VZORKŮ!!! VŠECHEN SPOTŘEBNÍ MATERIÁL (ŠPIČKY, ZKUMAVKY) MUSÍ BÝT STERILNÍ A CERTIFIKOVANÝ PRO PRÁCI S DNA.

1. Speciální materiál a použité roztoky:

10x PBS (na 1l: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 2,4 g KH₂PO₄; pH 7,4; autoklávováno)

10x TAE pufr (na 1l: 48,4 g Tris; 20 ml 0,5 M EDTA; 11,44 ml ledové kys. octové; pH 8,0)

1x TE pufr (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5 autoklávováno)

FTA classic cards, FTA roztok (Whatman, UK)

Chelex (5% suspenze Chelexu-100 ve sterilní destilované vodě, Sigma-Aldrich)

Proteinasa K (20 mg/ml, Sigma - Aldrich)

Taq polymerasa (GoTaq 5units/ul, Promega)

5x Betain/DMSO (1,3 M Betain rozp. v 1.3% DMSO; filtrováno přes Milipore 0,45 µm)

FR primer mix STT (rozpis na jednu reakci: 2 µl F primer 10 pmol/µl, 2 µl R primer 10 pmol/µl, 10 µl 5x Betain/DMSO)

FR primer mix DRD4 (2 µl F primer 10 pmol/µl, 2 µl R primer 10 pmol/µl, 10 µl 5x Betain/DMSO)

FR primer mix D17S30 (2 µl F primer 10 pmol/µl, 2 µl R primer 10 pmol/µl, 10 µl 5x Betain/DMSO)

FR primer mix SRY (2 µl F primer 10 pmol/µl, 2 µl R primer 10 pmol/µl, 10 µl 5x Betain/DMSO)

6x Loading Dye (Promega)

100 kbp DNA ladder (Promega)

EtBr (5 mg/ml v H₂O)

Tabulka 1. Sekvence primerů VNTR lokusů

Lokus	Forward	Reverse
<i>STT</i>	5'ggcgtgcccgtctgaatgc3'	5'gacggactgagctggacaaccac3'
<i>DRD4</i>	5'gctgctctactggccacgt3'	5'gaccctcatggccttgcgct3'
<i>D17S30</i>	5'cccacatccgctccccaagttaa3'	5'gagtgaagtgcacaggaggcaa3'
<i>SRY</i>	5'attcatcgtgtggtctcgca3'	5'ttctctctgcatggcctgta3'

2. Extrakce DNA z krve a z buněk bukalní sliznice pomocí FTA karty:

A. Extrakce z kapky krve (*kroky psané kurzívou provádí vedoucí cvičení*)

- 1) Sterilní lancetou provedeme vpich do bříška prstu a kapku krve (cca. 5 - 10 μ l) nakápneme na FTA kartu, okamžitě zakápneme vzorek 150 μ l methanolu a necháme schnout asi 20 minut při laboratorní teplotě.
- 2) Na zaschlý vzorek znovu nakápneme 150 μ l methanolu a necháme uschnout, takto připravený vzorek můžeme skladovat při laboratorní teplotě.
- 3) Sterilním jednorázovým skalpelem vyřízneme z FTA karty čtvercový úsek (cca. 3 x 3 mm) z oblasti vzorku a vložíme jej do 1,5 ml zkumavek obsahující 200 μ l FTA roztoku.
- 4) Vzorek inkubujeme 5 min při laboratorní teplotě, poté odsajeme supernatant.
- 5) Znovu přidáme 200 μ l FTA roztoku a inkubujeme 5 min při laboratorní teplotě, supernatant odsajeme.
- 6) Zopakujeme krok 4.
- 7) Ke vzorku přidáme 200 μ l 1x TE pufru, poklepem promícháme a odsajeme.
- 8) Zopakujeme promytí TE pufrům a supernatant odsajeme. Výsek FTA karty přeneseme sterilní špičkou do nové zkumavky.
- 9) Necháme vzorek uschnout na stěně otevřené zkumavky 1 hodinu při laboratorní teplotě ve flowboxu.
- 10) Do 0,2 ml PCR zkumavky napipetujeme 6 μ l 5x GoTaq buffer, 5 μ l Proteinasy K a 19 μ l H₂O (eluční mix) – pro více vzorku připravíme eluční mix a rozpipetujeme jej po 30 μ l.
- 11) Suchý FTA výsek přeneseme sterilní špičkou do PCR zkumavky s uvedenou směsí a dáme do termocykleru s následujícím programem: 60°C, 30 min ; 99°C, 10 min; 4°C, 5 min.
- 12) Supernatant opatrně odpipetujeme do čisté zkumavky, tak abychom nenabrali vlákna FTA výseku (inhibují PCR). Ze vzorku odebereme 2 μ l pro stanovení koncentrace a vzorek umístíme na led.
- 13) Ke 2 μ l vzorku přidáme 98 μ l sterilní destilované vody a změříme koncentraci DNA na spektrofotometru, jako blank použijeme sterilní destilovanou vodu.¹

¹ Nebo alternativní metoda stanovení koncentrace DNA.

B. Extrakce z buněk bukové sliznice (kroky psané kurzívou provádí vedoucí cvičení)

- 1) *Provedeme důkladný stěr bukové sliznice SecurSwab odběrovým kitem.*
- 2) *Odběrový tampón přeneseme do sterilní 2 ml zkumavky a zalomíme konec se vzorkem.*
- 3) *Ke vzorku přidáme 400 μ l 1x PBS a vortexujeme 30 sec.*
- 4) *Sterilní špičkou odstraníme ze zkumavky odběrový tampón a vzorek točíme 10 min při 500g ve vychlazené (4°C) centrifuze.*
- 5) *Opatrně odsajeme supernatant a pelet buněk resuspendujeme ve 30 - 50 μ l 1x PBS.*
- 6) *Vzorek nanášíme na střed FTA karty po cca. 25 μ l kapkách vždy do stejného místa, poté okolí vzorku vyznačíme tužkou a okamžitě zakápneme vzorek 150 μ l methanolu, necháme schnout 20 min při laboratorní teplotě.*
- 7) *Na zaschlý vzorek znovu nakápneme 150 μ l methanolu a necháme uschnout, takto připravený vzorek můžeme skladovat při laboratorní teplotě.*
- 8) *Pokračujeme stejně jako při extrakci z krve (viz. výše, bod A.3).*

3. Extrakce DNA z vlasových kořínků pomocí Chelexu:

- 1) Zapneme termoblok na 56 °C.
- 2) Vlasové kořítky (5 ks) odstříhneme od zbytku vlasů a sterilně přeneseme do 1,5 ml zkumavky.
- 3) Sterilním skalpelem seřízíme 200 µl špičku.
- 4) Seříznutou sterilní špičkou přidáme ke vzorku 100 µl 5% chelexu 100, chelex je nutné **intenzivně promíchat a ihned jej nabrat.**
- 5) Ke vzorku přidáme 20 µl 5x GoTaq pufu.
- 6) Ke vzorku přidáme 10 µl Proteinasy K (20 mg/ml) a inkubujeme v termobloku 10 min při 56°C.
- 7) Vzorek povaříme 10 min při 95 °C (pootev řít vršek)
- 8) Vzorek zchladíme 30-60 sec na ledu.
- 9) Vzorky stočíme při 15 000 rpm (nebo při max. otáčkách), 10 min, RT.
- 10) Opatrně odpipetujeme supernatant do čisté zkumavky. **Částice chelexu inhibují PCR!!!**
- 11) Ze supernatantu odebereme 2 µl pro stanovení koncentrace DNA a zbytek ponecháme na ledu.
- 12) Ke 2 µl vzorku přidáme 98 µl sterilní destilované vody a změříme koncentraci DNA na spektrofotometru.²

² *Nebo alternativní metoda stanovení koncentrace DNA.*

4. Polymerázová řetězová reakce:

Pro každý biologický vzorek z místa činu provedeme 4 různé PCR reakce. Je nezbytné pečlivě označit jednotlivé zkumavky a předejít tak záměně vzorků! Všechny kroky přípravy PCR provádíme na ledu.

- 1) DNA izolovanou z biologických vzorků zředíme destilovanou vodou (PCR grade) na koncentraci 50 ng/μl (pokud je výchozí koncentrace některého ze vzorků nižší než 50 ng/μl, upravíme složení následujícího PCR mixu tak abychom do každé z reakcí vnesli 0,5 μg DNA³).
- 2) Popíšeme si 0,2 ml PCR zkumavky pro amplifikaci jednotlivých lokusů dané osoby: STT, D17S30, DRD4, SRY.
- 3) Do popsaných PCR zkumavek napipetujeme 14 μl FR primer mixu pro každý lokus zvlášť!
- 4) Ke každému z FR mixů přidáme 0,5 ug = 10 μl DNA izolované z vlasových kořínků, či FTA karty.
- 5) Připravíme následující PCR mix (rozpis na 4+1 reakci = analýza 1 biologického vzorku):

Tabulka 2. PCR mix pro analýzu jednoho biologického vzorku (5 PCR reakcí).

Chemikálie	Objem
dH ₂ O	53,5 μl
5x GoTaq buffer	50 μl
dNTP (1 mM)	25 μl
GoTaq Polymerase	1,5 μl

- 6) Přidáme 26 μl PCR mixu ke každému FR mixu s DNA, lehce proklepeme, stočíme a dáme do thermocycleru na následující program.

Tabulka 3. Teplotní program PCR.

Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
95	2 min	} 40
95	30 sec	
65	40 sec	
72	1 min	
72	5 min	

Tabulka 4. Přehled složení jedné PCR reakce – analýza jednoho lokusu.

Chemikálie	Objem
FR primer mix STT (nebo DRD4...atd.)	14 μl
DNA 0,5 μg	10 μl
5x GoTaq buffer	10 μl
dNTP (1 mM)	5 μl
GoTaq Polymerase	0,3 μl
dH ₂ O	10,7 μl
Celkový objem reakce	50 μl

³ Množství DNA v PCR reakci může být i nižší avšak je nutné dodržet stejné množství ve všech biologických vzorcích – vlasové kořínky i FTA. V krajním případě lze množství snížit až na 0,3 μg, avšak může dojít ke ztrátě některých slaběji amplifikovaných PCR fragmentů.

5. Elektroforetická separace PCR fragmentů:

V případě barvení EtBr máme na paměti, že se jedná o potencionální karcinogen, pracujeme v rukavicích a dbáme na zamezení kontaminace pracovní plochy a nástrojů!!!

- 1) Navážíme 0,7 g standardní Agarózy a k ní přidáme 0,7 g Low Melting Agarózy.
- 2) Přidáme 70 ml 0,5 x TAE pufru a výšku hladiny označíme fixem.
- 3) Agarózu opatrně rozvaříme v mikrovlnné troubě, případný odpar doplníme dest. vodou po značku.
- 4) Vzniklý gel necháme vychladnout, ale tak aby nezuhl! Do gelu přidáme 5 μ l EtBr, dobře promícháme kroužením nádoby a vlijeme do elektroforetické vany.
- 5) Do vany vložíme hřebínek a gel, necháme tuhnout asi 20 min.
- 6) Ke každým 50 μ l vzorku přidáme 6 μ l 6x nanášecího pufru.
- 7) Gel převrstvíme 0,5x TAE pufrem.
- 8) Do první jamky nanese 5 μ l 100 kbp DNA markeru.
- 9) Do ostatních jamek nanese 15 μ l PCR produktů a separujeme při 70 V, dokud čelo separace nedosáhne spodního okraje gelu (cca. 1,5 h).
- 10) Výsledek separace vyfotografujeme v UV transluminátoru.

6. Vyhodnocení:

Na základě porovnání elektroforetogramů určíme shodu či neshodu mezi vzorky z místa činu a vzorky odebraným osobám se známou totožností. Vypracujeme protokol obsahující postup a výsledek identifikace jedinců.

Návod ke cvičení byl zpracován v rámci projektu financovaného Ministerstvem školství ČR - FRVŠ 514/2011/G4: Zavedení úlohy na téma: DNA fingerprinting ve forenzní genetice – identifikace neznámého pachatele.

Zpracovali: Mgr. Jan Humplík, Mgr. Jana Čížková

Garant: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.