**Gr**up**a**: **……………………………………… Wrocław, ………………………………..**

**…………………………………………………… …………………………………………………………**

**Imię i nazwisko studenta Imię i nazwisko prowadzącego**

**Ćwiczenie nr 5.**

1. **Porównanie działania endonukleaz specyficznych i niespecyficznych.**
2. **Elektroforeza trawionego DNA oraz produktów PCR.**
3. **Metody identyfikacji mutacji – analiza wyników.**
4. **Porównanie działania endonukleaz specyficznych i niespecyficznych.**

**Odczynniki:**

1. 1U/µl DNaza I
2. 10x Bufor Reakcyjny I
3. Woda wolna od nukleaz
4. 10U/µl PvuII
5. 10U/µl BamHI
6. 10x Bufor Fast Digest
7. 1% żel agarozowy z Midori Green Advance
8. Bufor 1xTAE
9. Bufor do obciążenia próbek 6x Loading Dye
10. Marker mas DNA (Perfect 1kb DNA Ladder)

**Sprzęt:**

1. Termoblok (37˚C)
2. Miniwirówka
3. Aparat do elektroforezy
4. Zasilacz
5. Transiluminator
6. Pipety automatyczne

**Zadanie 1. Trawienie DNA przy użyciu DNazy I.**

1. Przygotuj 2 ponumerowane probówki o obj. 1,5 ml. Do każdej probówki dodaj odczynniki zgodnie z opisem w tabeli 1 (UWAGA kolejność dodawania odczynników ważna).

*1U DNazy I (ok. 0,3 jedn. Kunitz’a) trawi 1µg plazmidowego DNA w ciągu 10 minut.*

**Tabela 1.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Probówka** | **1** | **2** |
| Woda [µl] | oblicz | oblicz |
| 10x Bufor Reakcyjny I [µl] | 1 | 1 |
| Plazmidowe DNA (1µg) [µl] | oblicz | oblicz |
| DNaza I (1U/µl) [µl] | - | 1 |
| Objętość końcowa [µl] | 10 | 10 |

1. Zawartość probówek dokładnie wymieszaj i zwiruj tak aby całość mieszaniny reakcyjnej znajdowała się na dnie probówek. Probówki umieść w termobloku lub łaźni wodnej o temperaturze 37 ˚C i inkubuj 10 minut.
2. Do probówek dodaj 2 µl 6x buforu do próbek, po czym zwiruj. Preparat gotowy do rozdziału w elektroforezie.

**Zadanie 2. Trawienie plazmidowego DNA przy użyciu endonukleazy restrykcyjnej PvuII i BamHI.**

1. Przygotuj 2 ponumerowane probówki o obj. 1,5 ml. Do każdej probówki dodaj odczynniki zgodnie z opisem w tabeli 2 (UWAGA kolejność dodawania odczynników ważna).

**Tabela 2.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Probówka** | **3 (PvuII)** | **4(BamHI)** |
| Woda [µl] | oblicz | oblicz |
| 10x Bufor FD[µl] | 2 | 2 |
| Plazmidowe DNA (1µg) [µl] | oblicz | oblicz |
| Enzym restrykcyjny (10U/µl) [µl] | 1 | 1 |
| Objętość końcowa [µl] | 20 | 20 |

1. Zawartość probówki dokładnie wymieszaj i zwiruj tak aby całość mieszaniny reakcyjnej znajdowała się na jej dnie. Probówkę umieść w termobloku lub łaźni wodnej o temperaturze 37 ˚C i inkubuj minimum przez 15 minut.
2. Po zwirowaniu próbka jest gotowa do rozdziału elektroforetycznego.
3. **Elektroforeza trawionego DNA oraz produktów PCR.**

**Zadanie 1. Elektroforeza trawionego DNA**

1. Probówki z produktami trawienia zadania 1 i 2 zwiruj tak aby całość mieszaniny znajdowała się na dnie probówki.
2. Do pierwszej studzienki nanieść 5 µl wzorca mas (Perfect 1kb DNA Ladder).
3. Do kolejnych studzienek w żelu nanosić po 12 µl próbek.
4. Elektroforezę prowadzić przy 100 V przez ok. 1 h w buforze do elektroforezy TAE, 1% żel agarozowy.
5. Po tym czasie rozdzielone cząsteczki DNA w żelu agarozowym obserwować w świetle lampy UV (transiluminator).

**Zadanie 2. Elektroforeza produktów PCR (materiał z ćwiczenia nr 4)**

1. Probówki z produktami PCR (z ćwiczenia 4) zwiruj tak aby całość mieszaniny znajdowała się na dnie probówki.
2. Do pierwszej studzienki nanieść 5 µl wzorca mas (Perfect 1kb DNA Ladder).
3. Do kolejnych studzienek w żelu nanosić całość mieszanin PCR (10 µl).
4. Elektroforezę prowadzić przy 100 V przez ok. 1 h w buforze do elektroforezy TAE.
5. Po tym czasie rozdzielone cząsteczki DNA w żelu agarozowym obserwować w świetle lampy UV (transiluminator).

**Pytania sprawdzające do części „Porównanie działania endonukleaz specyficznych i niespecyficznych”:**

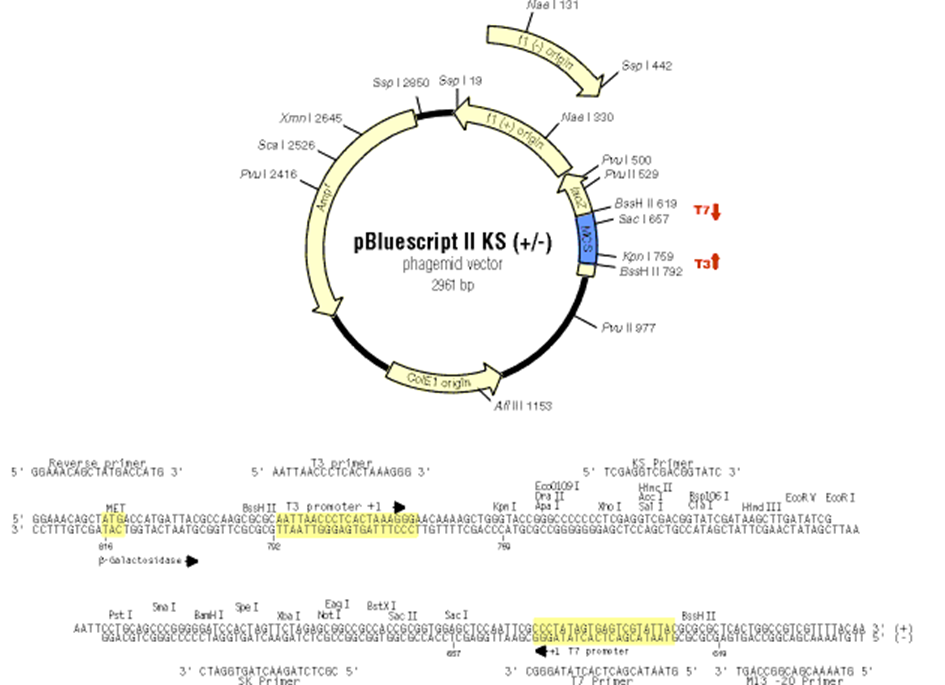
1. Narysuj schematycznie obraz żelu po elektroforezie i opisz poszczególne scieżki na żelu.

WZÓR OBRAZ własnych próbek

***Opisz wyniki analizy:***

***………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………***

1. W oparciu o mapę restrykcyjną wektora plazmidowego pBluescript SK+ podaną na Rys. 1. oblicz jakie będą produkty trawienia tego wektora enzymami (ilość i długość fragmentów DNA):
2. *Kpn*I…………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………….
3. *Pvu*I……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………
4. *Pvu*II………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………..
5. *Bss*HII…………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………….

****

**Rys. 1.** Mapa restrykcyjna wektora plazmidowego pBluescript SK+.

**Pytania sprawdzające do części „Elektroforeza produktów PCR” oraz „Metody identyfikacji mutacji”:**

1. Narysuj schematycznie obraz żelu po elektroforezie produktów PCR i opisz poszczególne scieżki na żelu.

WZÓR OBRAZ własnych próbek

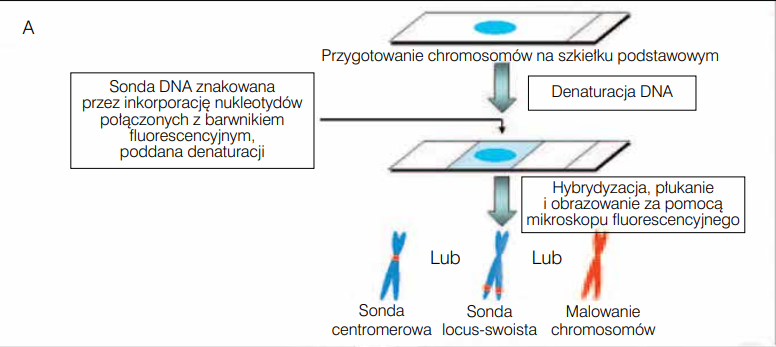
***Opisz wyniki analizy:***

***………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………***

1. **Metody identyfikacji mutacji – analiza wyników.**

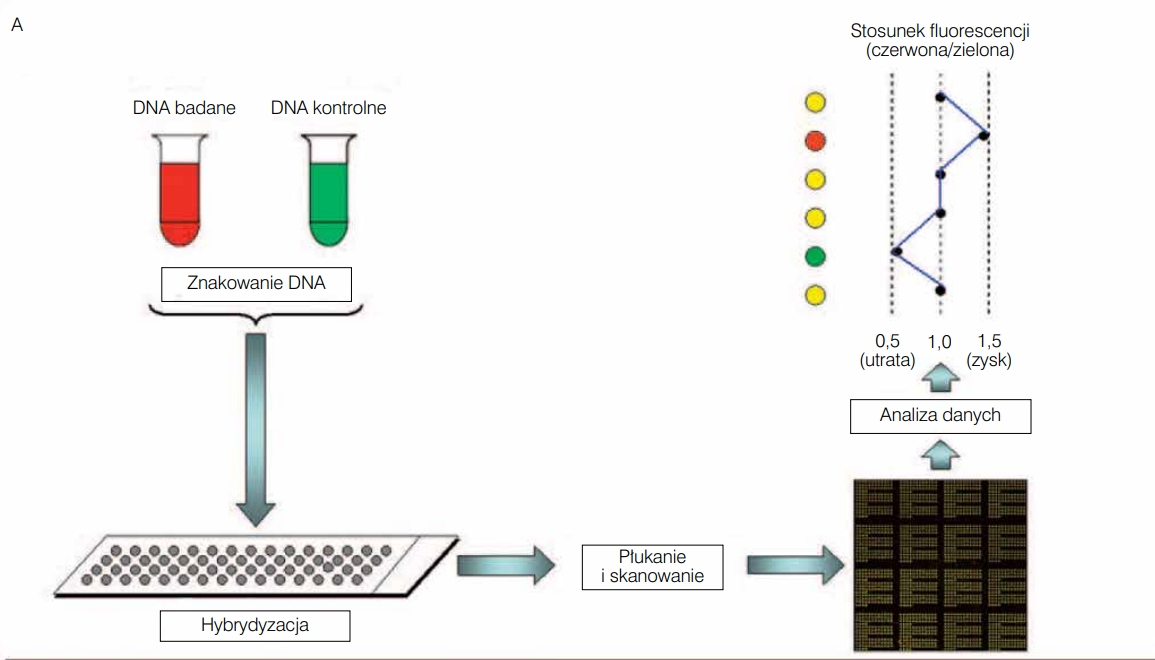
Zapoznaj się z przykładowymi **technikamii cytogenetyki molekularnej** wykorzystywanymi w diagnostyce mutacji, a następnie przeanalizuj przedstawione przypadki:

Cytogenetyka molekularna wykorzystuje osiągnięcia, takie jak klonowanie i automatyczne powielanie fragmentów DNA. Takie fragmenty mogą posłużyć, jako sonda molekularna do konkretnych części chromosomów w technice fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ, **FISH – fluorescence in situ hybridization** Rys. 2). Hybrydyzacja in situ wykonywana jest bezpośrednio na preparacie mikroskopowym, jest szeroko stosowana do detekcji określonych sekwencji na preparatach histologicznych, chromosomach, pojedynczych komórkach, a nawet skrawkach tkanek. W technice tej stosuje się sondy zależne od problemu diagnostycznego, są to sondy locus – specyficzne, centromerowe lub malujące.



**Rys. 2**. Analiza metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Podstawowe etapy FISH (Źródło: K. Goodin i inn. 2009, 13, 4 Pediatria po Dyplomie).

Technika porównawczej hybrydyzacji genomowej, **CGH – comparative genomic hybridization (Rys. 3)** polega na hybrydyzacji dwóch wyznakowanych fluorescencyjnie genomowych DNA, badanego i referencyjnego, zmieszanych w proporcji 1:1, do prawidłowych chromosomów metafazowych. W przypadku CGH do mikromacierzy (aCGH – arrayCGH) uzyskuje się rozdzielczość sięgająca kilkuset, a nawet kilkunastu par zasad. Metoda aCGH pozwala na jednoczesną identyfikację aneuploidii, duplikacji, delecji oraz amplifikacji każdego reprezentowanego na mikromacierzy locus genowego.



**Rys 3**. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (array CGH). Podstawowe etapy array CGH. (Źródło: K. Goodin i inn. 2009, 13, 4 Pediatria po Dyplomie).

**Analiza przypadków:**



1. FISH w interfazie z wykorzystaniem sond znakujących chromosomy 13 i 21. 2. FISH w metafazie z wykorzystaniem sond subtelomerowych swoistych dla chromosomu 1.

Badanie 1. zaobserwowano …………………… ……………………….

Badanie 2. zaobserwowano ………………. ……………………………

Obraz zawierający tekst, monitor, ekran, zrzut ekranu

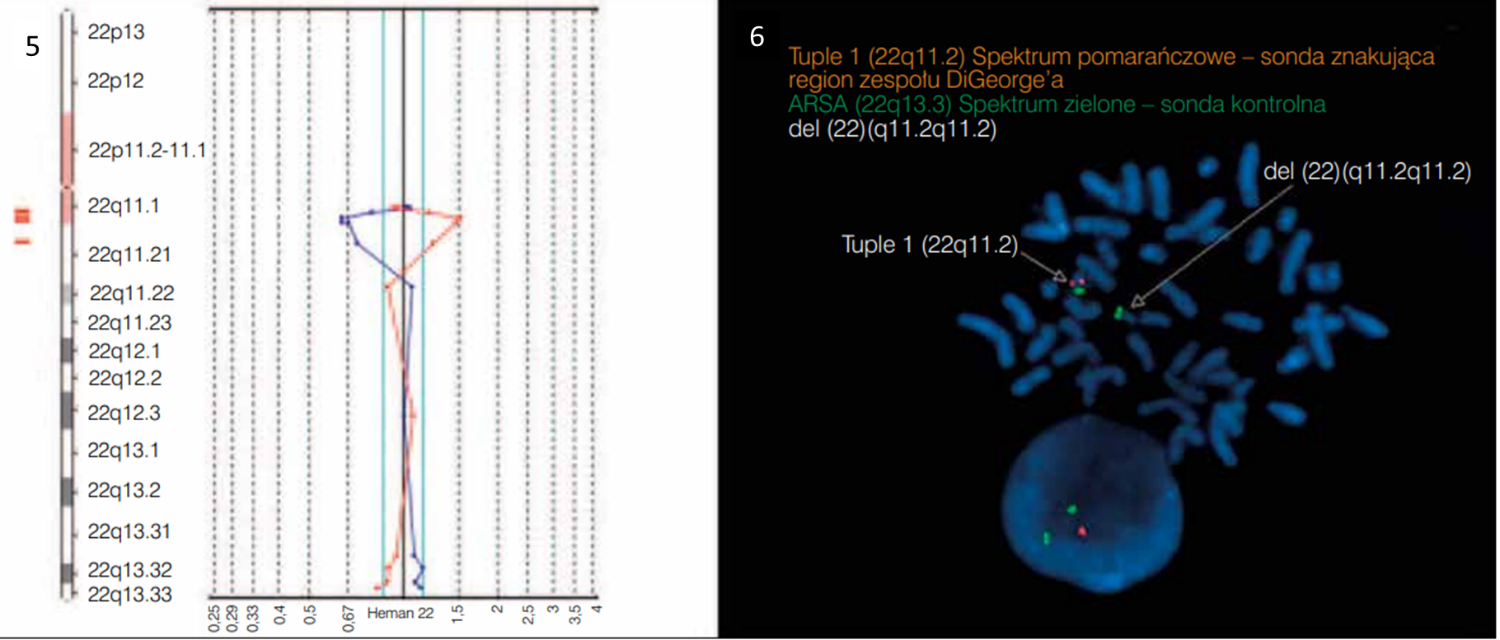
Opis wygenerowany automatycznie

3. FISH w metafazie z wykorzystaniem sondy swoistej dla zespołu Williamsa. 4. Sondy znakujące chromosomy 4, 14 i 18.

Badanie 3. zaobserwowano ………………………….

Badanie 4. zaobserwowano ………………………….





**5.** Wynik array CGH uzyskany dla chromosomu 22 z delecją regionu DiGeorge’a. Niebieska linia prezentuje wynik hybrydyzacji DNA pacjenta i DNA kontrolnego uzyskany z jednej mikromacierzy, a linia czerwona wynik z drugiej mikromacierzy uzyskany po zastosowaniu znakowania odwrotnego. Klony, które uległy delecji w pierwszej hybrydyzacjii, prezentują stosunek fluorescencji ~0,6, podczas gdy w drugiej (znakowanie odwrotne)  
stosunek ten wynosi ~1,5. **6.** FISH w metafazie z wykorzystaniem sondy znakującej region zespołu DiGeorge’a, analiza przypadku przedstawionego na panelu 5.

Badanie 6. zaobserwowano ………………..

Diagnostyka molekularna mutacji wykorzystuje także techniki oparte o metodę PCR, np. analiza **PCR-RLFP.** Metoda PCR-RFLP może być wykorzystywana do badania związku między poszczególnymi genotypami a chorobami genetycznymi. Stosowana jest np. do diagnostyki anemii sierpowatej, w przypadku której u osobników z anemią sierpowatą występuje mutacja punktowa w genie beta-globiny, która niszczy miejsce rozpoznawania przez endonukleazę restrykcyjną *MstII.* Nosiciele mają dłuższy fragment restrykcyjny w porównaniu do fragmentu osobników zdrowych.

Na schemacie poniżej narysuj ile prążków będzie obserwowane po rozdziale elektroforetycznym w przypadku próbki **A** - próbka osobnika zdrowego oraz próbki **B** – próbka osobnika z anemia sierpowatą:



