



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalaurų rengimui**

BIO 414. EVOLIUCIJA IR POPULIACIJŲ GENETIKA

Laboratorinis darbas

Populiacinis DNR polimorfizmas

Įvadas

Filogenetinių ryšių, tokių, kaip genetinės medžiagos ir jos elementų formavimasis, kitimas, vystymasis bei mutacinis kintamumas evoliucijos eigoje, nustatymas tarp įvairių organizmų iki šiol daugiausiai rėmėsi morfometrinių duomenų, baltymų ir izofermentinių sistemų tyrimais bei įvertinimu. Dabartiniu metu, filogenetinių ryšių įvertinimui, yra naudojami DNR tyrimu pagrįsti metodai, kurie, dėl tikslumo ir platesnio pritaikymo spektro, suteikia detalesnę ir patikimesnę informaciją apie organizmus, molekulinės ekologijos, sistematikos, populiacinės ir evoliucinės genetikos tyrimų srityse. Pagrindiniai DNR tyrimo pranašumai, lyginant juos su anksčiau naudotais metodais yra tokie, kad šiuo atveju yra tiriama tiesiogiai genetinė medžiaga, o ne jos produktai, o patys DNR tyrimo metodai pasižymi dideliu specifiskumu ir gauti rezultatai yra labai tikslūs. Be to, tyrimus galima atlikti bet kokio amžiaus ar fiziologinės būklės organizmui, netgi jam nebesant gyvam. DNR galima išskirti iš nedidelio kiekio kraujo, audinio ar plaukų, o kadangi DNR molekulės yra gana stabilios ir ilgą laiką nesuyra, išskirtą DNR galima užkonservuoti ir saugoti ilgą laiką.

1. Molekuliniai tyrimo metodai

J. Watson ir F.H.C. Crick sukūrė dvigrandės DNR struktūros modelį, kuris tapo pagrindu daugeliui šiuolaikinių molekulinės genetikos tyrimų, taikomų žmogaus ir gyvūnų diagnostinėje medicinoje, teisminėje medicinoje, giminystės nustatyme, mokslinėje veikloje, tiriančioje fauną ir florą, bei kitose srityse.

Rekombinantinės DNR tyrimai yra atliekami nustatant žmonių genus, nešančius tam tikras mutacijas, atsakingas už genetiškai paveldimų ligų, tokių kaip cistinė fibrozė ir kt. pasireiškimą.

Dėl savo 99,9 % tikslumo ir pakankamai nesudėtingos atlikimo technikos, molekuliniai DNR tyrimo metodai po truputį išstumia iki šiol giminystės ryšiams ir tėvystei nustatyti plačiai naudotą kraujo grupių antigeninių faktorių nustatymo metodą.

DNR metodai yra plačiai naudojami gyvulininkystėje, identifikuojant pavienius gyvulius, įvertinant veislių ar net skirtingų rūšių savitumą, nustatant ar patikslinant kilmę, nustatant genų mutacijas, atliekant genetiškai paveldimų ligų diagnozavimą, moksliniuose eksperimentiniuose darbuose panaudojant genetinius markerius.

Įvairūs molekuliniai DNR tyrimų metodai taikomi ir augalininkystėje, naudojant genetinius markerius atskirų požymių nustatymui bei skirtingų augalų rūšių įvertinimui. Naudojantis molekuliniais DNR tyrimo metodais, iš audinio, plaukų ar kaulų liekanų galima nustatyti kokias gyvūnų rūšias ar net konkrečiam gyvuliui priklausė tirtas mėginys, taip pat, naudojant Y chromosomai specifinius genetinius markerius, jau embriono stadijoje galima nustatyti būsimo gyvūno lytį. Pastaruoju metu nemaža dalis esamų molekulinų DNR tyrimo metodų yra standartizuoti ir pritaikyti darbui laboratorijose.

1.1. DNR skyrimo metodai

DNR gali būti skiriama iš kraujo, įvairių audinių (tiek gyvūnų tiek augalų).

Taikomi skyrimo metodai susideda iš trijų pagrindinių etapų:

- Ląstelių lizavimo.
- Baltymų ir likusių priemaišų pašalinimo chloroformu.
- DNR iškrisdinimo alkoholiu.

1.1.1. DNR skyrimas iš gyvūnų audinių

Darbo tikslas: Išskirti DNR iš audinių.

Darbo trukmė: 2 – 3 val.

Medžiagos ir įranga:

- ◆ Audinys
- ◆ Termostatas
- ◆ Centrifuga
- ◆ Svarstyklės
- ◆ Šaldytuvai su šaldikliu
- ◆ Žirkutės
- ◆ Pincetas
- ◆ Ependorf mėgintuvėliai (1,5 ml)
- ◆ Mikropipetė (10 μl, 100μl, 1000μl)
- ◆ TE buferis
- ◆ Universalus DNR išskyrimo rinkinys(AB “Fermentas”):
Lizuojantis buferis
Išsodinimo tirpalas
NaCl
- ◆ 96% spiritas
- ◆ Chloroformas
- ◆ dist. H₂O

Darbo eiga

Iš vidinių sluoksnių paimti 10 mg audinio.

Mėgintuvėlio turinį užpilti 200 μl TE buferio.

Mėginį gerai sumaišyti ir užpilti 400 μl lizės buferio.

Mėginį inkubuoti 65 °C temperatūroje 15 min. kas 2 min. mėginius pavartant.

5. Po inkubacijos atilikti mėginio valymą chloroformu. Užpilti mėginį 600 μl tirpalo ir sumaišyti taip, kad gautūsi emulsija.
6. Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
7. Nuosėdos nusėda, o centrifugate, kuris yra viršutiniame vandeniniame sluoksnyje, lieka išsiskyrusi DNR.
8. Centrifugatą nusiurbti pipetės pagalba ir pernešti į kitą mėgintuvėlį.
9. Jei nusiurbtas centrifugatas dar nėra skaidrus reikia pakartoti valymą chloroformu.
10. Gautą DNR vandeninį tirpalą užpilti tokiu pat tūriu DNR išsodinimo tirpalo. Išsodinimo tirpalas paruošiamas 80 μl išsodinimo tirpalo sumaišant su 720 μl distiliuoto vandens.
11. Tirpalą švelniai pavartyti 2-5 kartus.

Pastaba: Chloroformas labai laki kenksminga medžiaga! Būkite atsargūs ir dirbkite tikrai traukos spintoje. Jei įmanoma naudokite apsaugos priemones tokias kaip respiratoriai.

12. Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
13. Gautą tirpalą nupilti nuo nuosėdų.
14. Nuosėdas užpilti 100 µl NaCl tirpalo ir visiškai jas ištirpinti.
15. Tirpalą užpilti 300 µl 96% etanolio švelniai pavartyti ir palikti –20 °C 10 min.
16. Mėginį centrifuguoti 2min 10 000 aps/min greičiu.
17. Spiritą nupilti nuo gautų DNR nuosėdų ir visiškai nudžiovinti.
18. Mėginį užpilti 100 µl distiliuoto vandens arba TE buferio.

Iš audinių išskirtą DNR galima naudoti tuojau pat, arba ilgesnį laiką saugoti –20 °C temperatūroje.

1.1.2. DNR skyrimas iš augalų

Darbo tikslas: Išskirti DNR iš augalų.

Darbo trukmė: 3 – 4 val.

Medžiagos ir įranga:

- ◆ Augalo lapas ar kitas audinys
- ◆ Termostatas
- ◆ Centrifuga
- ◆ Svarstyklės
- ◆ Piestelė su grūstuvėliu
- ◆ Šaldytuvas su šaldikliu
- ◆ Ependorf mėgintuvėliai (1,5 ml)
- ◆ Mikropipetė (10 µl, 100µl, 1000µl)
- ◆ TE buferis
- ◆ Skystas azotas
- ◆ Universalus DNR išskyrimo rinkinys(AB “Fermentas”):
Lizuojantis buferis
Išsodinimo tirpalas
NaCl
- ◆ 96% spiritas
- ◆ Chloroformas
- ◆ dist. H₂O

Darbo eiga

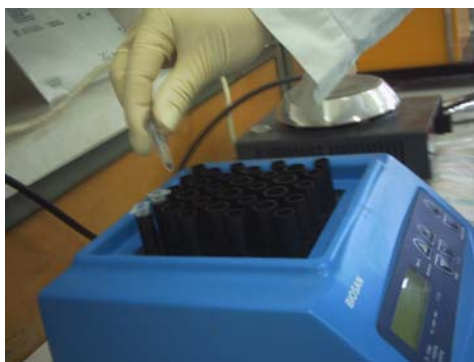
1. Pasverti 100 mg tyrimui reikalingos augalo medžiagos. Augalo lapą švariai nuplauti distiliuotu vandeniu ir nudžiovinti.
2. Lapus sudėti į grūstuvėlį, užpilti skystu azotu ir sutrinti iki miltelių. (Jei reikia pakartoti dar kartą.)(1 pav.)



1 pav. Augalo lapai sudėti į grūstuvėlį užpilami skystu azotu.

3. Viską sugramdyti ir sudėti į 1,5 ml ependorf mėgintuvėlį, kuriame jau įpilta 200 µl TE buferio ir 400 µl lizės buferio.
4. Mėginį gerai sumaišyti

- Mėginį sudėti į termostatą ir inkubuoti 65 °C temperatūroje 15 min. kas 2 min. mėginus pavartant.(2 pav.)



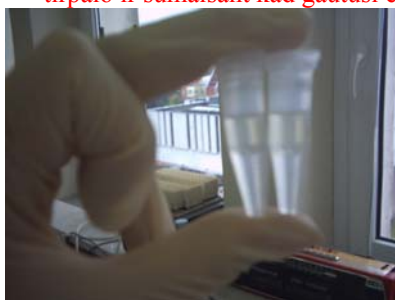
2 pav. Termostatas kuriame inkubuojami mėginiai.

- Po inkubacijos atilikti mėginio valymą chloroformu. Užpilti mėginį 600 μ l tirpalo ir sumaišyti taip, kad gautūsi emulsija.
- Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
- Nuosėdos nusėda, o centrifugate, kuris yra viršutiam vandeniame sluoksnyje, lieka išsiskyrusi DNR.
- Viršutinį vandeninį sluoksnį, kuriame yra DNR (3 pav.) nusiurbti pipetės pagalba ir pernešti į naują mėgintuvėlį.



3 pav. Mėginys po pirmo valymo chloroformu. Išsiskiria trys sluoksniai: 1 chloroformas su įvairiomis priemaišomis. 2. ląstelių ir augalo auginių nuolaužos. 3. vandeninis DNR tirpalas.

- Dar kartą kartojame valymą chloroformu žpildami mėginį 500 μ l chloroformo tirpalo ir sumaišant kad gautūsi emulsija.(4 pav.)



4 pav. Taip atrodo mėginys po pakartotinio valymo chloroformu

- Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
- Pakartojame DNR vandeninio tirpalo nusiurbimą į švairius mėgintuvėlius.
- Gautą DNR vandeninį tirpalą užpilti tokiu pat tūriu DNR išsodinimo tirpalo. Išsodinimo tirpalas paruošiamas 80 μ l išsodinimo tirpalo sumaišant su 720 μ l distiliuoto vandens.
- Tirpalą švelniai pavartyti 2-5 kartus.
- Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
- Gautą tirpalą nupilti nuo nuosėdų.
- Nuosėdas užpilti 100 μ l NaCl tirpalo ir visiškai jas ištirpinti.
- Tirpalą užpilti 300 μ l 96% etanolio švelniai pavartyti ir palikti -20 °C 10 min.
- Mėginį centrifuguoti 2min 10 000 aps/min greičiu.

20. Nuo gautų DNR nuosėdų spiritą nupilti, o nuosėdas užpilti 70% spiritu. Kelis kartu pavartyti ir palikti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min.
21. Mėginį centrifuguoti 2min 10 000 aps/min greičiu.
22. Spiritą nupilti nuo gautų DNR nuosėdų ir visiškai nudžiovinti.
23. Mėginį užpilti 100 μl distiliuoto vandens arba TE buferio.

Iš audinių išskirtą DNR galima naudoti tuojau pat, arba ilgesnį laiką saugoti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Raudonai pažymėtas tekstas paryškina augalų ir gyvunų DNR išskyrimo skirtumus.

1.1.3. DNR skyrimas iš kraujo

Darbo tikslas: Išskirti DNR iš kraujo.

Įranga:

- ◆ Kraujas
- ◆ Termostatas
- ◆ Šaldoma centrifuga
- ◆ Maišyklė "Vortex"
- ◆ Purtyklė
- ◆ Šaldytuvas su šaldikliu
- ◆ Vakuuminiai mėgintuvėliai su konservantu
- ◆ Mėgintuvėliai (50 ml)
- ◆ Mėgintuvėliai (200 µl, 1500 µl)
- ◆ Vandens vonia
- ◆ Ledo vonia
- ◆ Kilpelė
- ◆ Pipetė (5 ml)
- ◆ Mikropipetės (100 µl, 200 µl, 1000 µl)

1. Paimti 200µl kraujo ir supilti į 1,5 ml eppendorf mėgintuvėlius.
2. Ant kraujo bandinio užpilti 200 µl TE buferio.
3. Mėginį gerai sumaišyti ir užpilti 400 µl lizės buferio.
4. Mėginį inkubuoti 65 °C temperatūroje 15 min. kas 2 min. mėginius pavartant.
5. Po inkubacijos atilikti mėginio valymą chloroformu. Užpilti mėginį 600 µl tirpalo ir sumaišyti taip, kad gautūsi emulsija.
6. Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
7. Nuosėdos nusėda, o centrifugate, kuris yra viršutiniame vandeniniame sluoksnyje, lieka išsiskyrusi DNR.
8. Centrifugatą nusiurbti pipetės pagalba ir pernešti į kitą mėgintuvėlį.
9. Jei nusiurbtas centrifugatas dar nėra skaidrus reikia pakartoti valymą chloroformu.
10. Gautą DNR vandeninį tirpalą užpilti tokiu pat tūriu DNR išsodinimo tirpalo. Išsodinimo tirpalas paruošiamas 80 µl išsodinimo tirpalo sumaišant su 720 µl distiliuoto vandens.
11. Tirpalą švelniai pavartyti 2-5 kartus.
12. Mėginį centrifuguoti 3min 10 000 aps/min greičiu.
13. Gautą tirpalą nupilti nuo nuosėdų.
14. Nuosėdas užpilti 100 µl NaCl tirpalo ir visiškai jas ištirpinti.
15. Tirpalą užpilti 300 µl 96% etanolio švelniai pavartyti ir palikti -20 °C 10 min.
16. Mėginį centrifuguoti 2min 10 000 aps/min greičiu.
17. Spiritą nupilti nuo gautų DNR nuosėdų ir visiškai nudžiovinti.
18. Mėginį užpilti 100 µl distiliuoto vandens arba TE buferio.

1.2. DNR švarumo ir koncentracijos nustatymas

DNR tirpalai sugeria 260 nm ultravioletinius spindulius. Nustatyta, kad kai tirpalo sluoksnio storis yra 1 cm (kiušetės storis), o optinis tankis $D = 1$, dvigandės DNR koncentracija tirpale atitinka 50 µg/ml.

Darbo tikslas: Spektrofotometriniu metodu nustatyti išskirtos genominės DNR kiekį ir švarumą.

Įranga:

- ◆ Spektrofotometras su kiuvete
- ◆ Mikropipetės (10 µl, 100 µl)
- ◆ Ependorf mėgintuvėliai (0,5 ml)
- ◆ Maišyklė

Darbo eiga

1. Paimti tiek ependorf mėgintuvėlių kiek norima patikrinti DNR mėginių koncentracijas. Į juos įpilti po 10 µl DNR tirpalo ir po 90 µl dist. H₂O (skiedžiama 10 kartų).

2. Tirpalus gerai išmaišyti maišyklė ir palikti kambario temperatūroje bent 1 val. Kad DNR vandenyje gerai ištirptų.
3. Mėginius matuoti spektrofotometru, prie 260 nm bangos ilgio (kontrolėi naudoti dist. H₂O). Mėginių optinį tankį nustatyti ir prie 280 nm bangos ilgio. Optinių tankių santykis 260 nm/280 nm rodo DNR tirpalų švarumą. Jis turi būti lygus arba didesnis už 1,8.

Žinant praskiestų DNR tirpalų optinio tankio reikšmes (esant 260 nm), DNR kiekis (μg/ml) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$CDNR_{\mu g/ml} = D_{260} \cdot 10 \cdot \text{Praskiedimas.}$$



5 pav. Spektrofotometras.

Pastaba: švarių DNR tirpalų optinių tankių santykis yra 1,8-2,0. Jei tirpale yra baltymų ar fenolio priemaišų, šis santykis bus mažesnis nei nurodyta. Baltymų koncentracija neturi viršyti 0,5 mg/ml ribos. Jei tirpale priemaišų yra daugiau, reikia atlikti pakartotinį genominės DNR valymą.

Šiuo metu laboratorijose naudojami spektrofotometrai iš karto nustato ir apskaičiuoja tiek DNR, tiek baltymų koncentraciją tirpale.

1.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandininė reakcija (angl. *Polymerase chain reaction (PCR)*) yra metodas, pavadintas pagal DNR polimerazę - fermentą, katalizuojantį DNR replikaciją ląstelėje. PGR yra nukleorūgščių sintezės *in vitro* metodas, kuriuo laboratoriniame mėgintuvėlyje gali būti specifiskai padauginti (amplifikuoti) atskiri DNR fragmentai. PGR metodas yra labai jautrus, todėl padauginti pasirinkta DNR atkarpa gali sudaryti netgi vieną milijoninę genominės DNR dalį. Tai reiškia, kad, naudojant PGR, galima amplifikuoti net ir vienintelį pasirinktą geną ar jo fragmentą.

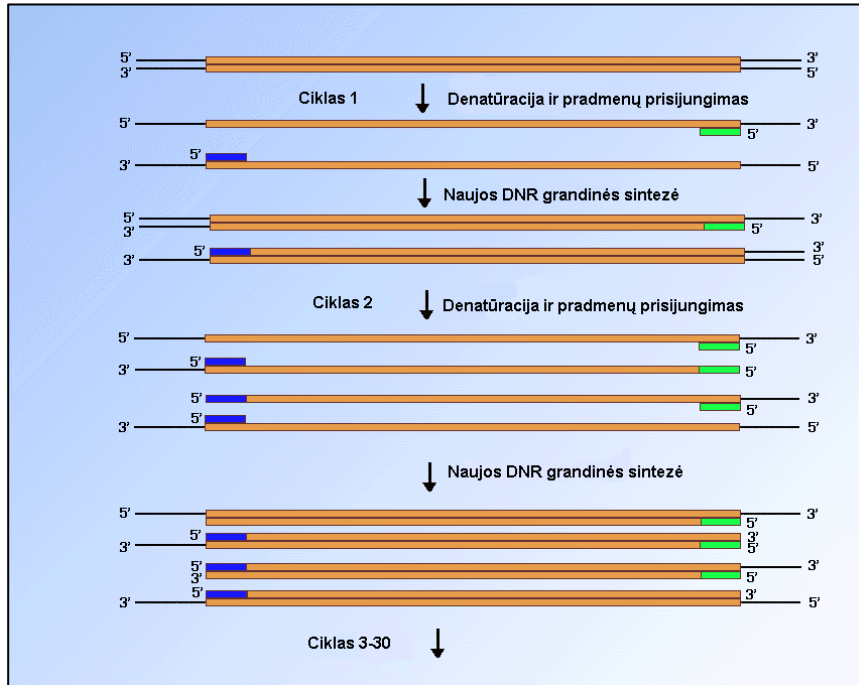
Tam, kad būtų galima atlikti PGR, reikalinga: DNR, specifiniai pradmenys, deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP), termostabili *Taq* DNR polimerazė ir magnio jonų (Mg²⁺) turintis buferis.

PGR vykdoma trimis, cikliška besikartojančiais etapais:

- ✓ denatūracija 94 °C – 95 °C temperatūroje, kurios metu nutrūksta vandenilinės jungtys tarp azotinių bazių ir DNR grandinės viena nuo kitos atsiskiria;
- ✓ pradmenų hibridizacija – pradmenų prisijungimas vandenilinėmis jungtimis prie jiems komplementarių dauginamos DNR sričių. Hibridizacija vykdoma 40 °C – 60 °C temperatūroje, priklausomai nuo amplifikuojamo DNR fragmento ilgio, bazių sudėties ir pradmenų nukleotidų sudėties;

- ✓ naujos DNR grandinės sintezė vyksta 72 °C temperatūroje, reakciją katalizuojant fermentui *Taq* DNR polimerazei. Šio proceso metu iš terpės imami laisvi nukleotidai ir komplementariai įjungiami į naujai sintetinamą DNR grandinę (1 pav.).

6 pav. Polimerazės grandininė reakcija..



Optimalus PGR ciklų skaičius yra 25-35 ir priklauso nuo pradinės amplifikuojamos DNR koncentracijos, kai kiti rodikliai yra optimalūs. Reakcijos pabaigoje iš 50 ng DNR galima gauti 100 ng – 1 mg amplifikuoto specifinio DNR fragmento.

1.5. PGR komponentai

DNR

PGR – labai jautrus metodas, sėkmingai atliekamas turint net ir 0,1 – 1 µg genomines DNR. Nuo DNR koncentracijos labai priklauso PGR kokybė ir susintetinto produkto išeiga, todėl, atsižvelgiant į pradinį DNR kiekį, būtina optimaliai parinkti kitų PGR komponentų koncentraciją. Per didelė DNR koncentracija sąlygoja nespecifinių PGR produktų sintezę.

PGR buferis

Standartinio PGR buferio sudėtyje yra KCl, Tris ir MgCl₂. Du pagrindiniai komponentai, sąlygojantys kokybiško PGR produkto gavimą, yra KCl ir MgCl₂ koncentracija. MgCl₂ sudaro tirpius kompleksus su dNTP, kuriuos, kaip substratą, atpažįsta DNR *Taq* polimerazė ir įjungia į sintetinamą DNR grandinę. Per didelė KCl ar MgCl₂ koncentracija inhibuoja *Taq* polimerazės aktyvumą, ko pasekoje mažėja PGR produkto išeiga ir didėja nespecifinių produktų gavimo tikimybė. Esant standartinėms PGR sąlygoms, rekomenduojama MgCl₂ koncentracija buferyje yra 1.5 mM, kai kiekvieno dNTP koncentracija yra 200 µM ir reakcija vykdoma 25 µl tūryje. Šios reakcijos išdavoje turėtų būti susintetinta 6 – 6,5 µg DNR.

Deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP)

Deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP) - tai laisvi substratai, kurie, pradant nuo pradmens laisvojo galo, komplementariu būdu jungiasi prie DNR grandinės –

matricos ir tokiu būdu sintetina naują DNR grandinę. dNTP koncentracija turi įtakos reakcijos tikslumui. Rekomenduojama kiekvieno iš keturių dNTP (dATP, dCTP, dGTP ir dTTP) koncentracija yra 200 μM, kai MgCl₂ koncentracija buferyje yra 1.5 mM ir reakcija vykdoma 25 μl tūryje. Per didelė dNTP koncentracija gali inaktivuoti PGR ir sąlygoti nespecifinio produkto susidarymą.

Pradmenys

Tai trumpi, viengrandžiai, 18-25 nukleotidų ilgio, dirbtinai susintetinti fragmentai. Jų paskirtis yra atpažinti norimo padauginti DNR fragmento pradžios ir pabaigos sekas, bei komplementariai prie jų prisijungti. PGR metu dažniausiai naudojami du pradmenys. Pradmenims yra keliami visi reikalavimai: pradmenys turi būti nekomplementarus vienas kitam, negali turėti vidinės antrinės struktūros ir polindrominių sekų. C ir G nukleotidų kiekis pradmenyse turi siekti 40 % - 60 %. Labai svarbu teisingai parinkti pradmenų prisijungimo prie dauginamo DNR fragmento temperatūrą, kurią apsprendžia nukleotidų lydymosi temperatūra (T_m). Jei pradmenų ilgis yra mažesnis nei 20 nukleotidų, jų T_m apskaičiuojama pagal formulę:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

G, C, A, T-atitinkamas nukleotidų skaičius pradmenyje.

Pradmenų prisijungimo prie dauginamo DNR fragmento temperatūra turi būti apie 5 °C žemesnė nei T_m. Rekomenduojama T_m yra 55 – 80 °C. Be to, būtina atkreipti dėmesį į pradmenų koncentraciją. Rekomenduojama kiekvieno pradmens koncentracija yra 0,1-0,5 μM. Didesnė pradmenų koncentracija gali lemti klaidingą jų prisijungimą ar nespecifinio PGR produkto gavimą. Jei pradmenų koncentracija per maža, mažėja reakcijos produkto išeiga.

DNR Taq polimerazė

DNR Taq polimerazė - tai fermentas, atsakingas už naujos DNR grandinės sintezę. Fermentas yra išskirtas iš termofilinių bakterijų (*Thermus aquaticus*), todėl nepraranda aktyvumo aukštesnėje nei 92 °C temperatūroje, kuri reikalinga DNR grandinėms vienai nuo kitos atskirti. DNR Taq polimerazės optimali veikimo temperatūra – 72 °C. Fermentas pasižymi ir dideliu specifiskumu, t.y. nekomplementaraus nukleotido įjungimo tikimybė naujai sintetinamoje DNR grandinėje yra tik 1 iš 9000 nukleotidų. Fermentas yra jautrus pH pokyčiams terpėje. Optimalus pH 8,2-9,0. Keičiantis pH reikšmei į vieną ar į kitą pusę, DNR Taq polimerazės aktyvumas mažėja. Rekomenduojama DNR Taq polimerazės koncentracija - 2 aktyvumo vienetai, kai reakcijos mišinio tūris yra 25 μl, o kitų reakcijos komponentų koncentracijos yra optimalios. Be DNR Taq polimerazės, PGR dar gali būti naudojamos kitos, aukštai temperatūrai atsparios, DNR polimerazės, išskirtos iš *Thermus thermophilus*, *Bacillus sterothermophilus* ir *Thermococcus litoralis* bakterijų.

1 lentelė. DNR amplifikacijos sąlygos.

	Ciklo etapai	Temperatūra, °C	Laikas, s
1.	Denatūracija	94	20
2.	Pradmenų hibridizacija	55	20
3.	DNR grandinės sintezė	72	30

1.6. DNR amplifikacija

DNR amplifikacija yra jautrus metodas, priklausantis nuo tiksliai apskaičiuotų, reakcijoje naudojamų medžiagų koncentracijos, dauginamo DNR fragmento ilgio, bei pradmenų nukleotidų sudėties. Taigi reakcijos vykdymo sąlygos kiekvienam tyrimui yra individualiai parenkamos. Tačiau R. Saiki (1989 m) pasiūlė universalias sąlygas amplifikacijos reakcijai vykdyti, kurios, poreikiui esant, gali būti modifikuojamos.

Reakcijai dažniausiai ruošiama 25 μ l arba 100 μ l mišinio. Ruošiant amplifikacijos mišinį, į sterilų mėgintuvėlį imama: 1 μ g genominės DNR; 50 mM KCl; 10 mM Tris – HCl (pH 8,4); 1,5 mM MgCl₂; po 0,25 μ M kiekvieno pradmens, po 200 μ M kiekvieno dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) ir 2,5 aktyvumo vienetai DNR *Taq* polimerazės. Mėgintuvėlis trumpai centrifuguojamas, dedamas į amplifikatorių ir vykdoma amplifikacija.

PGR ciklai kartojami 25 – 35 kartų. Pasibaigus amplifikacijai, mėginys gerai išmaišomas ir trumpai centrifuguojamas. Paruoštas mėginys naudojamas tolimesniems tyrimams, arba laikomas –20 °C temperatūroje.

1.7. Atsitiktinai amplifikuotos polimorfinės DNR metodo taikymas genetinės įvairovės tyrimuose

Atsitiktinai amplifikuotos polimorfinės DNR (AAPD) metodas pradėtas taikyti 1990m. Skirtingai nei įprasti PGR pradmenys, kurie yra komplementarūs konkrečioms matricinės DNR sekoms, AAPD metode naudojami pradmenys komplementariai jungiasi su *atsitiktinėmis* genominės DNR sekomis, kurių genome gali būti iki kelių šimtų. Yra tikimybė, kad atsitiktiniai pradmenys hibridizuosis su bet kuriuo genomu. Tyrimui naudojant didelį kiekį pradmenų porų, galima aptikti ir norimą DNR fragmentą. Paprastai šie polimorfiniai DNR fragmentai yra paveldimi pagal Mendelio dėsnius kaip dominantinis požymis, tačiau jų gali nebūti kiekvienoje chromosomoje ar kiekviename individe. Paprastai AAPD metodu gaunama nuo 1 iki 20 DNR fragmentų.

Atsitiktiniai pradmenys gali būti 8 – 50 nukleotidų ilgio. Dažniausiai AAPD analizėje naudojami 10 nukleotidų pradmenys.

AAPD metodas nereikalauja jokios papildomos informacijos apie tiriamos populiacijos genotipą. Panaudojus didelį pradmenų kiekį galima gauti informacijos apie bet kurių tiriamų rūšių, populiacijų, subpopuliacijų ar atskirų individų DNR grandinės skirtumus, kuriais remiantis sprendžiama apie tiriamų organizmų tarp rūšinę ir vidurūšinę genetinę įvairovę. Atsitiktinai amplifikuotų DNR fragmentų polimorfizmas gali būti panaudojamas ir kaip sisteminis požymis nustatant rūšį. Pavyzdžiui, šiuo metodu atlikti *Apodemus* genties pelių tyrimai, nustatyti filogenetiniai ryšiai tarp atskirų šios genties rūšių.

Naudojant AAPD metodą taip pat galima atrasti molekulinis žymenis, susijusius su fenotipiniais bruožais (pavyzdžiui, vabzdžių atsparumu insekticidams).

AAPD metodą dar galima panaudoti tėvystės nustatymui. Kai yra žinoma, kad tam tikras fragmentas yra paveldimas pagal Mendelio dėsnius, ištyrus grupę individų įmanoma nustatyti kas iš jų yra dominančio individo tėvai. Panaudojant didelį atsitiktinių pradmenų kiekį galima tiksliai nustatyti tiriamų individų giminystės ryšius.

AAPD metodas turi nemažai trūkumų. Atliekant PGR ne visada gaunami atsikartojantys rezultatai, jie gali priklausyti nuo nežymių naudojamos genominės DNR kokybės skirtumų. Norint gauti tikslius rezultatus būtina griežtai kontroliuoti PGR sąlygas. Taip pat sunku identifikuoti homologinius lokusus. Šią problemą galima spręsti nustatant gauto fragmento seką.

Nepaisant šių trūkumų, atitinkamame taksonominiame lygmenyje AAPD yra tinkamas populiacinės genetikos ir sistematikos tyrimų metodas

Darbo tikslas: Panaudojant atsitiktinai amplifikuotus DNR fragmentus ivertinti tarprūšinę graužikų genetinę įvairovę

Medžiagos ir įranga:

- ◆ Termocikleris
- ◆ Eppendorf mėgintuvėliai 0,5 µl
- ◆ Automatinės pipetės su vienkartiniais antaglais(10 µl, 100 µl).
- ◆ Vienkartinės pirštinės
- ◆ PGR reagentai:
 - Genominė DNR
 - 2 mM kiekvieno dNTP
 - 10×PGR buferis (su 1,5mM MgCl₂)
 - Pradmenys:
 - ROTH-180-01 (5'-GCACCCGACG-3')
 - ROTH-180-06 (5'-GCACGCCGGA-3')
 - Taq-polimerazė (2U).

Darbo eiga

1. Paruošti PGR reagentų mišinį. Į 25 µl reakcijos mišinio įeina:

20 ng matricinės DNR

200 ng pradmens

po 200 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP

1,5 U Taq polimerazės

iki 25 µl reakcijos buferio (1,5mM MgCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,8), 50mM KCl, 0,08% NP-40).

2. Amplifikuoti mėginį naudojant pateiktą programą:

1 ciklas:

94 °C 1 min

30 ciklų:

94 °C 30 s

42 °C 1 min

72 °C 1 min

72 °C 10 min

4 °C (laikymas)



7 pav. Amplifikatorius kuriame yra atliekama PGR reakcija.

3. Paruošti 2 % agarozės gelį (žr. 1.8.1. Elektroforezė).
4. Į 2 % agarozės gelį įvesti atsitiktinai amplifikuotus DNR fragmentus ir molekulinės masės žymeklį Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus.
5. Vykdyti elektroforezę 2 h 30 min esant 120 V.
6. Nudažyti agarozės gelį etidžio bromidu (žr. 1.8.1 Dažymas etidžio bromido).
7. Rezultatą įvertinti UV šviesoje. (žr. 1.8).

1.8. Elektroforezė

1.8.1. DNR dažymas ir elektroforezė agarozės gelyje.

DNR elektroforezė atliekama horizontaliame 0,65-3,0 % agarozės gelyje. Genominės DNR molekulinė masė yra didelė, todėl tokia DNR frakcionuojama mažesnės koncentracijos (0,8-1,0 %) agarozės gelyje. DNR fragmentų molekulinė masė yra mažesnė, todėl jie frakcionuojami didesnės koncentracijos (1,5-2,0 %) agarozės gelyje.

Darbo tikslas: Paruošti norimos koncentracijos agarozės gelį ir elektroforezės metu išfrakcionuoti DNR fragmentus.

Medžiagos ir įranga:

- ◆ Maitinimo šaltinis
- ◆ Horizontalios elektroforezės aparatas
- ◆ Mikro bangų krosnelė
- ◆ UV lempa
- ◆ Svarstyklės
- ◆ Stiklinė kolba (100 ml, 1000 ml)
- ◆ Mėgintuvėliai (200 µl)
- ◆ Mikropipetės (10-100 µl)

- ◆ 1xTAE buferis:

Ledinė acto rūgštis	57 ml	
Tris		242 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml	
dist. H ₂ O	iki 1000 ml	
- ◆ 0,5 M EDTA (pH 8,0):

EDTAx2H ₂ O	186,1 g
dist. H ₂ O	800 ml
- ◆ Agarozės milteliai
- ◆ Bromfenolio mėlio dažas
- ◆ Etidium bromidas (10 mg/ml).

◆

Darbo eiga

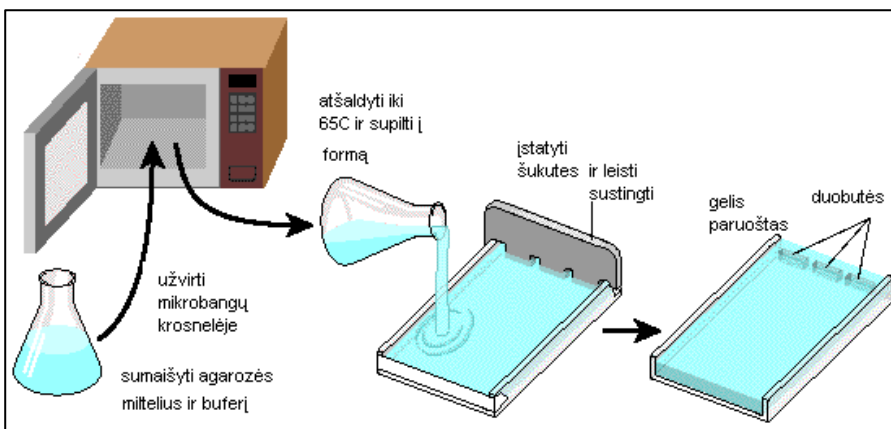
1. Priklausomai nuo norimos gelio koncentracijos, paimti reikiamą agarozės miltelių kiekį, ištirpinti jį 1xTAE buferyje kaitinant mikrobangų krosnelėje kelis kartus po 1-3 min. tol, kol tirpalas pasidaro skaidrus ir vientisos konsistencijos. Vėstant, indas su ištirpinta agaroze maišomas atsargiai, kad agarozėje nesusidarytų oro burbulai.

Norint pagaminti 3,0 % agarozės gelį, reikia 3 g agarozės miltelių ištirpinti 100 ml 1xTAE buferio.

2. Iki 70 – 65 °C atvėsintą agarozę pridėti 20µl etidium bromido(0,5 µg/ml), kuris yra specifinis DNR dažas ir atsargiai išmaišyti agarozę ir greitai, bet tolygiai supilti į paruoštą formą. Po to, į gelį įstatyti “šukutes” ir formą palikti 60 min. kambario temperatūroje, kad gelis sustingtų.
8 pav. Agarozės gelio ruošimas.

Pastaba: etidžio bromidas labai pavojingas mutagenas! Dirbant su juo būtina dėvėti pirštines, neįkvėpkite, saugokite odą ir akis.

3. Sustingus geliui, atsargiai ištraukti “šukutes”. Prieš įvedant DNR mėginius į susiformavusius “šulinėlius”, gelį įstatyti į elektroforezės vonelę, užpildytą 1xTAE buferiu taip, kad šis apsemtų gelį.
4. Į kiekvieną šulinėlį (9 pav.) įvesti po PGR produktą (žiūrėti 1) DNR mėginį, sumaišytą su bromfenolio mėlio dažais (3,0-25,0 µl DNR mėginio + 3,0 µl dažo).



9 pav. Mėginių užnešimas į agarozinį gelį.

5. Prieš paleidžiant elektros srovę per gelį į buferį reikia įdėti 20 µl etidium bromido.
6. Elektroforezė vykdoma leidžiant elektros srovę per gelį, ko poveikyje DNR fragmentai juda nuo katodo link teigiamo poliaus - anodo. Fragmentų judėjimo greitis gelyje priklauso nuo jų dydžio: mažesni fragmentai juda

greičiau, didesni - lėčiau. Atsižvelgiant į gelio dydį ir DNR fragmentų molekulinę masę, elektroforezė vykdoma 30 - 60 min, esant 70 – 110 V įtampai.

1.9. Rezultatų įvertinimas ir duomenų dokumentavimas.

Po DNR fragmentų frakcionavimo agarozės gelyje, gautus rezultatus galime stebėti transiluminatoriaus pagalba UV šviesoje (šviesos bangos ilgis – 312 nm), prieš tai nudažius gelį etidžio bromido tirpale (etidžio bromidas su DNR sudaro UV šviesoje fluorescuojantį kompleksą).

Pastaruoju metu laboratorijose yra plačiai naudojamos Polaroido fotokameros. Jų pagalba yra padaromos UV šviesoje fluorescuojančių DNR fragmentų nuotraukos.

Be to, vis didesnį populiarumą įgauna specialios kompiuterizuotos UV kameros. Specialios kompiuterinės video dokumentavimo sistemos pagalba gelis yra fotografuojamas, o gautas vaizdas perkeliamas į kompiuterį, kur yra analizuojamas ir išsaugojamas duomenų bazėje (10 pav.).

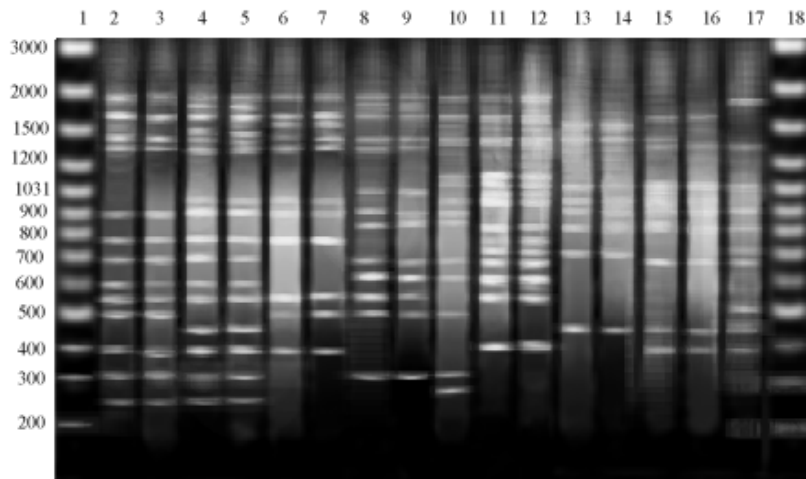
Pastaba: saugokite akis nuo tiesioginių UV spindulių užsidėdami specialius akinius arba žiūrint į fluorescuojančią DNR tiktai per stiklą!



10 pav. Video dokumentavimo sistema.

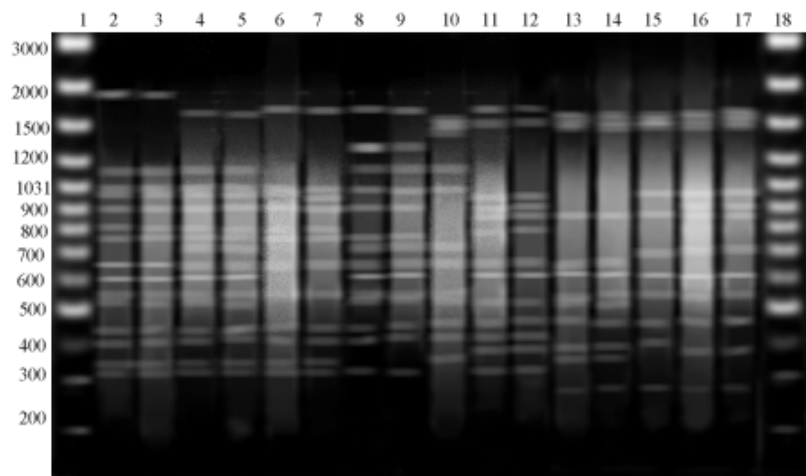
Rezultatų įvertinimas

- ✓ Išanalizavus tirtų graužikų rūšių amplifikacijos su ROTH-180-01 pradmeniu rezultatus (11 pav.) nustatyta, kad *M. arvalis* ir *C. glareolus* DNR fragmentų skaičius buvo didžiausias (16). Amplifikuojant *A. agrarius* DNR gauti tik 8 fragmentai. Fragmentų dydis svyruoja nuo 200 iki 1900 bazių porų. Didžiausias genetinis panašumas nustatytas tarp *M. rossiaemeridionalis* ir *M. arvalis*. Mažiausias genetinis panašumas - tarp *M. rossiaemeridionalis* ir *A. agrarius*.



11 pav. Amplifikuotų su pradmeniu ROTH-180-01 DNR fragmentų pasiskirstymas elektroforezės 2 % gelyje. 1, 18 – Gene Ruler™ 100bp DNA Lader Plus; 2, 3 – *M. rossiaemeridionalis*; 4, 5 – *M. arvalis*; 6, 7 – *M. agrestis*; 8, 9 – *M. oeconomus*; 10 – *M. minutus*; 11, 12 – *C. glareolus*; 13, 14 – *A. agrarius*; 15, 16 – *A. flavicollis*; 17 – *A. uralensis*.

- ✓ Amplifikuojant graužikų DNR su ROTH-180-08 pradmeniu (12 pav.) susidarė 10 – 16 fragmentų. *M. arvalis* turėjo 16 DNR fragmentų. 10 fragmentų gauta amplifikuojant *A. flavicollis* DNR. Fragmentų dydis nuo 260 iki 1900. Didžiausias genetinis panašumas nustatytas tarp *M. rossiaemeridionalis* ir *M. arvalis*, mažiausias - tarp *M. rossiaemeridionalis* ir *A. flavicollis*.



12 pav. Amplifikuotų su pradmeniu ROTH-180-08 DNR fragmentų pasiskirstymas elektroforezės 2 % agarozės gelyje. 1, 18 – Gene Ruler™ 100bp DNA Lader Plus; 2, 3 – *M. rossiaemeridionalis*; 4, 5 – *M. arvalis*; 6, 7 – *M. agrestis*; 8, 9 – *M. oeconomus*; 10 – *M. minutus*; 11, 12 – *C. glareolus*; 13, 14 – *A. agrarius*; 15, 16 – *A. flavicollis*; 17 – *A. uralensis*.