

## Ćwiczenia nr 2

### *Równoczesna amplifikacja kilku loci mikrosatelitarnych w reakcji multipleks PCR*

Mikrosatelity znajdują szerokie zastosowanie w ekologii molekularnej, jednym z najważniejszych jest analiza pokrewieństw. Znaczne skrócenie czasu i obniżenie kosztów analiz uzyskuje się poprzez równoczesną amplifikację kilku loci, które później genotypowane są także równocześnie.

Technika PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. *Polymerase Chain Reaction*) pozwala na uzyskanie dużej ilości ściśle zdefiniowanego fragmentu DNA. O specyficzności reakcji PCR decyduje dobór starterów – są to jednoniciowe fragmenty DNA o długości 15-30 nukleotydów, które przyłączają się do DNA stanowiącego matrycę, zgodnie z regułami komplementarności zasad w DNA. W wyniku reakcji PCR z każdej cząsteczki matrycy otrzymamy miliony kopii fragmentu zlokalizowanego między miejscami przyłączenia się starterów. Ponieważ do reakcji PCR wystarcza zaledwie kilka cząsteczek matrycy, pozwala ona na uzyskiwanie genotypów ze śladów biologicznych (włosy, naskórek, płyny ustrojowe itp.) oraz szczątków kopalnych.

Ponieważ każdy cykl reakcji PCR (liczba cykli wynosi w zależności od zastosowania 20 – 40) rozpoczyna się od denaturacji dwuniciowego DNA w wysokiej temperaturze (ok. 95°C), w reakcji PCR wykorzystuje się termostabilne polimerazy DNA, np. polimerazę *Taq*.

Aby wyeliminować niespecyficzną amplifikację, oraz problemy spowodowane nieoptymalnymi starterami (z różnych powodów możemy być zmuszeni wykorzystać startery, które nie są optymalne z punktu widzenia wydajności reakcji PCR), często wykorzystuje się polimerazy HotStart *Taq*. Enzym HotStart jest zmodyfikowany w ten sposób, że pozostaje całkowicie nieaktywny w temperaturze pokojowej. Aktywacja możliwa jest poprzez inkubację (3-15 min, w zależności od modyfikacji) w 95 °C.

Jeżeli w reakcji PCR wykorzystuje się jednocześnie więcej niż jedną parę starterów celem namnożenia więcej niż jednego produktu, taką reakcję nazywamy multipleks PCR. Multipleks PCR zazwyczaj jest trudniejszy niż “zwykły” PCR, ponieważ startery z różnych par mogą sobie wzajemnie „przeszkadzać”. Niektóre z tych negatywnych efektów mogą być usunięte przez specjalnie dobrane warunki reakcji PCR, w szczególności odpowiedni bufor. Najlepsze wyniki multipleks PCR uzyskuje się z wykorzystaniem specjalnych „master-

miksów”, zawierających termostabilną polimerazę, trifosforany deoksyrybonukleotydów (dNTP), jony  $Mg^{2+}$  oraz odpowiedni bufor. Dokładny skład master-miksów danego producenta jest nieznan.

Na ćwiczeniach będziemy amplifikować pięć loci mikrosatelitarnych z genomu normicy rudej. Ponieważ produkty amplifikacji będą rozdzielane i wizualizowane w automatycznym analizatorze DNA, jeden starter z każdej pary jest znakowany fluorescencyjnie. W systemie, jaki wykorzystujemy, dostępne są cztery barwniki fluorescencyjne (FAM, NED, PET, VIC). Równoczesna amplifikacja i detekcja większej liczby loci jest możliwa, jeżeli allele w loci, do których znakowania użyto takiego samego barwnika, mają niezachodzące na siebie zakresy długości.

## 1. Przygotowanie reakcji multipleks PCR

I. Przygotuj w probówce 1.5 ml mieszaninę na 3.5 reakcji PCR o objętości 14.5  $\mu$ l każda:

Odczynnik	1 reakcja ( $\mu$ l)	3.5 reakcji ( $\mu$ l)
Woda dejonizowana do PCR	5.5	19.3
2 x Multiplex Master Mix	7.5	26.3
Mieszanina starterów (stęż 1-4 $\mu$ M)	1.5	5.3
<b>Razem</b>	<b>14.5</b>	<b>50.9</b>

**Uwaga!** Przed dodaniem, każdy odczynnik musi być rozmrożony i wymieszany przez pipetowanie!

II. Podpisz probówki do PCR numerem grupy ćwiczeniowej i numerem zespołu (1.1, 2.3 itd.), zaznacz, gdzie jest początek i umieść probówki na statywie w pudełku z lodem. Wymieszaj mieszaninę z p. I przez pipetowanie i dodaj 14.5  $\mu$ l do każdej z trzech probówek do PCR.

III. Do pierwszych dwóch próbówek dodaj po 0.5  $\mu$ l DNA i kontroli negatywnej z poprzednich ćwiczeń („DNA” i „KN”), a do trzeciej 0.5  $\mu$ l wody dejonizowanej (kontrola negatywna PCR).

IV. W termocyklerze wybierz odpowiedni program PCR (MPX\_eco) i upewnij się, że składa się z następujących etapów:

A. 95°C, 15 min; w tym kroku DNA ulega denaturacji a polimeraza HotStart aktywacji

- B. 32 cykle (właściwa amplifikacja):
  - 1. 94°C, 30 sek; denaturacja
  - 2. 53°C, 60 sek; przyłączanie starterów
  - 3. 72°C, 45 sek; wydłużanie
- C. 60 °C, 30 min; końcowe wydłużanie i dodawanie A
- D. 8°C pauza; po zakończeniu PCR

V. Włóż próbki do termocyklera i uruchom program MPX\_eco.

Ponieważ program trwa ponad 2 godziny, na żelu agarozowym rozdzielać będziecie produkty PCR przygotowane przed zajęciami. Wasze produkty PCR zostaną rozdzielone na żelu po zajęciach, a wyniki rozdziału będą umieszczone na stronie kursu.

## 2. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

- I. 1.5% żel agarozowy został przygotowany przed zajęciami. Żel zawiera barwnik GelRed.
- II. Na parafilmie przygotuj 3 krople (1-2 ul) buforu obciążającego (zawiera on również barwniki ułatwiające monitorowanie przebiegu elektroforezy). Do każdej kropli dodaj 5 ul produktu PCR z odpowiedniej probówki. Produkty wymieszane z buforem obciążającym załaduj do studzienek. Do ostatniej studzienki dodaj 3 ul znacznika wielkości DNA.
- III. Podłącz kable do zasilacza. Włącz zasilacz i ustaw napięcie na 80V. Po 40 min wyłącz zasilacz i obejrzyj żel w świetle UV na transiluminatorze (**Użyj okularów ochronnych!**)
- IV. Zinterpretuj wyniki.

### Po ćwiczeniach powinniście potrafić:

1. Wymienić czynniki odpowiedzialne za sukces amplifikacji DNA w reakcji PCR
2. Wyjaśnić dlaczego w reakcji PCR używa się termostabilnej polimerazy DNA?
3. Wyjaśnić dlaczego w PCR stosuje się kontrolę negatywną, dlaczego użyliśmy dwu kontroli negatywnych, jaka jest między nimi różnica?
4. Czy w tym eksperymencie zastosowano również kontrolę pozytywną?
5. Jaka jest rola jonów  $Mg^{2+}$  w reakcji PCR?
6. Dlaczego niektóre startery wykorzystane w reakcji PCR były znakowane fluorescencyjnie.
7. Jaka jest różnica między „zwykłą” polimerazą *Taq* a polimerazą HotStart *Taq*.