



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



**Zpráva o řešení projektu reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_015/0002362 za období 022020 - 042020**

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK

**Příloha 1**

# DNA PRAKTIKA – MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE 2020

## ČÁST PRVNÍ

POZN. VIDEO SE MNE POVEDLO KOMPRIMOVAT A TEDY JSEM HO  
BYL SCHOPEN NAHRAT NA VYUKU.

### Náplň praktik

1. DNA izolace (měření koncentrace)
2. PCR – amplifikace HFE genu
3. Gelová elektroforéza – verifikace PCR produktů HFE genu
4. RFLP – restrikční analýza HFE genu
5. PCR – amplifikace CFTR genu
6. Test

### Testované mutace

(nejčastější/nejzávažnější)

Cystické fibrózy :

• gen CFTR, na 7. chromozomu

mutace  **$\Delta F508$**

Hemochromatózy :

- **gen HFE**, na 6. chromozomu

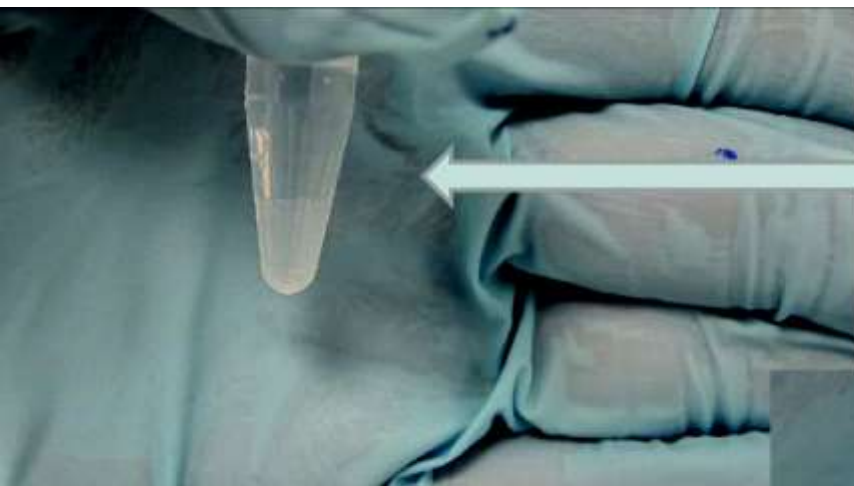
mutace **C282Y** + **H63D**

**ANALÝZA**

# DNA izolace

## Základní kroky:

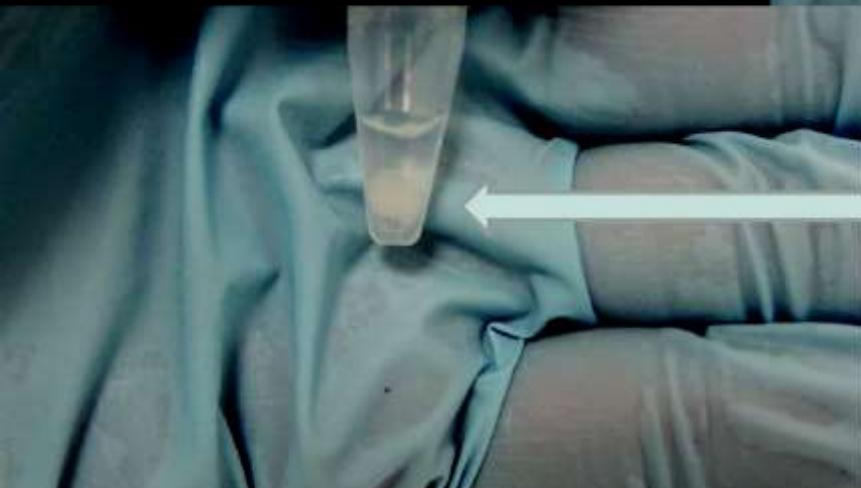
- 1) Lyze buněk → uvolnění DNA do roztoku
- 2) Odstranění proteinů
- 3) Odstranění nečistot
- 4) Měření koncentrace DNA (spektrofotometr absorbance vzorku při 260 nm)



Chelex s H<sub>2</sub>O



Buněčná peleta, přidání chelexou a H<sub>2</sub>O



Po centrifugaci, kuličky sedimentují na dně, poté peleta (nerozbité buňky, bun. zbytky) a roztok H<sub>2</sub>O s DNA1

# PCR (polymerázová řetězová reakce)

Amplifikace vybraného úseku DNA ve 30 – 40 cyklech:

Každý cyklus sestává z: denaturace

annealingu

extenze

Základní komponenty PCR:

- DNA vzorek
- Pár primerů (přímý + zpětný)
- Volné nukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- DNA polymeráza
- Pufr a hořčnaté ionty

# HFE gen: mutace H63D

= nahrazení histidinu kys. asparagovou (63. AA v proteinu)

## Normální DNA

5'.....T / GAT / CAT.....3' (kódující vlákno)

3'.....A / CTA / GTA.....5'

H – His – Histidin (CAT) na pozici 63 v proteinu

## Mutovaná DNA

5'.....T / GAT / GAT.....3' (kódující vlákno)

3'.....A / CTA / CTA.....5'

D – Asp – kyselina asparagová (GAT)

BclI  RII     50°  

5'...TGATCA...3'  
3'...ACTAGT...5'

# HFE gen: mutace C282Y

= nahrazení cysteinu tyrozinem (282. AA v proteinové řetězci)

## Normální DNA

5'..... G / TGC..... 3' (kódující vlákno)

3'..... C / ACG..... 5'

C – Cys – Cystein (TGC) na pozici 282 v proteinu

RsaI



5'...GTAC...3'  
3'...CATG...5'

## Mutovaná DNA

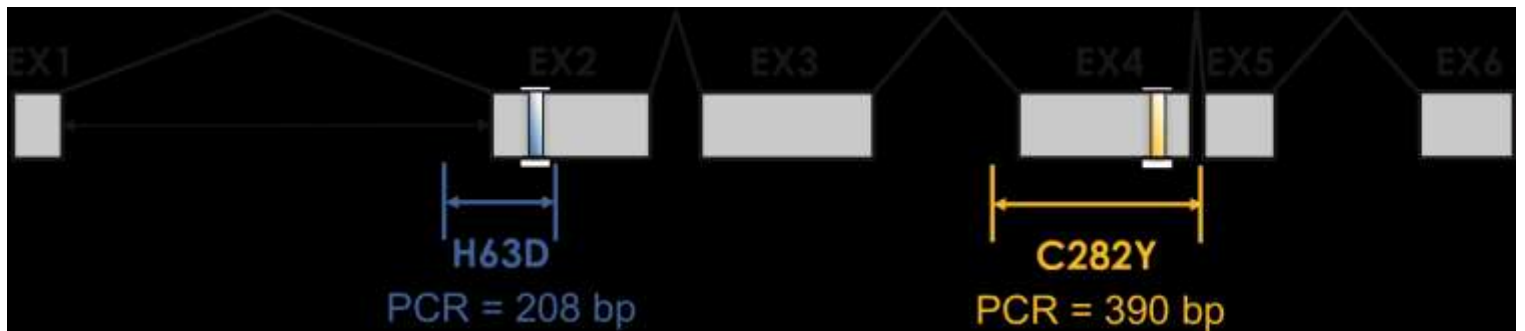
5'..... G / TAC..... 3' (kódující vlákno)

3'..... C / ATG..... 5'

Y – Tyr – Tyrosin (TAC)



# STRUKTURA GENU HFE



## HFE GEN: MUTACE C282Y

PCR MIX – na 1 vzorek (žlutá zkumavka)

- H<sub>2</sub>O 15,0 µl
- pufr 2,5 µl
- Mg<sup>2+</sup> 2,0 µl
- dNTP mix 0,5 µl
- Primer 1 1,5 µl (PC1)
- Primer 2 1,5 µl (PC2)
- DNA 1,8 µl
- Taq polymeráza 0,2 µl (na ledu)

# HFE GEN: MUTACE H63D

PCR MIX – na 1 vzorek (modrá zkumavka)

- H<sub>2</sub>O 14,5 µl
- pufr 2,5 µl
- Mg<sup>2+</sup> 2,5 µl
- dNTP mix 0,5 µl
- Primer 1 1,5 µl (PH1)
- Primer 2 1,5 µl (PH2)
- DNA 1,8 µl

• *Taq* polymeráza 0,2 µl (na ledu)