

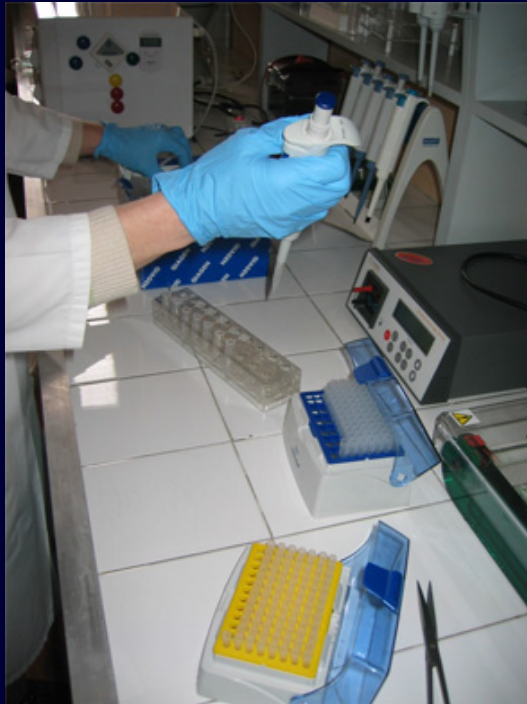
Примена молекуларно генетичких
метода у дијагностици наследних
обољења и анализи генома
животиња и нуклеинских киселина
патогена животиња



Katedra za biologiju

izolacija (ekstrakcija) nukleinskih kiselina iz bioloških uzoraka je **PRVI KORAK** procesa analize DNK/RNK.

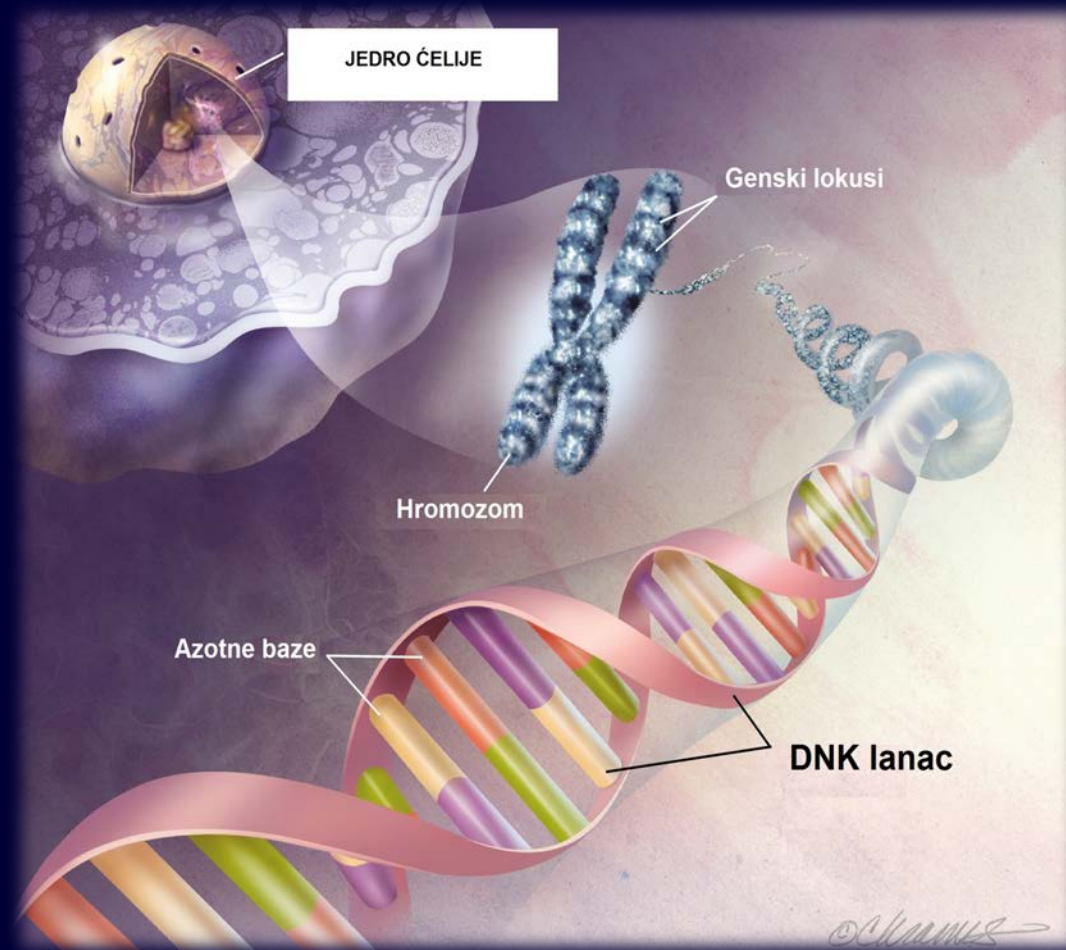
Izolacija DNK/RNK



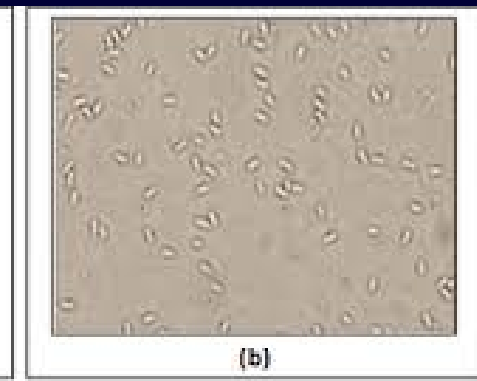
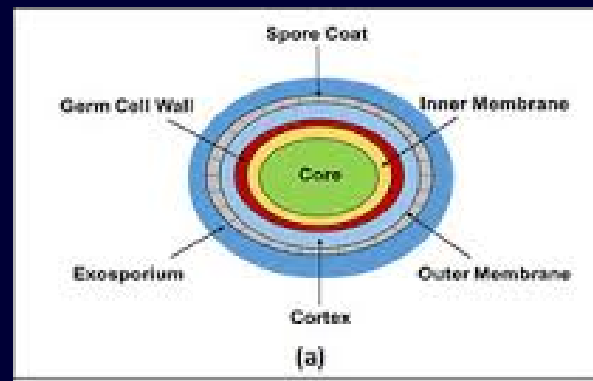
<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>

Izolacija (ekstrakcija) nukleinskih kiselina

Izolacija DNK/RNK iz
podrazumeva
oslobađanje DNK/RNK
iz virusa, bakterija,
Protista i svih
višećelijskih
organizama



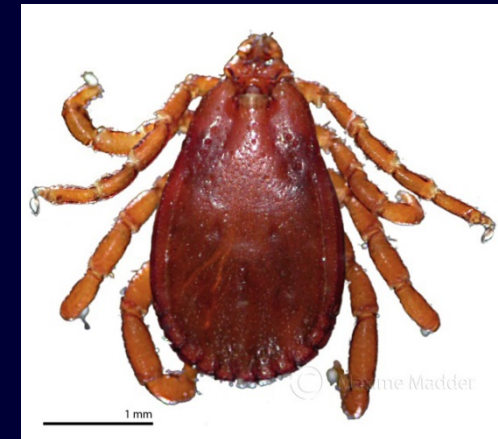
Izolacija DNK/RNK



Izolacija DNK/RNK obavlja se primenom hemikalija i postupaka kojima se razbijaju i liziraju:

- ćelijski zid
- ćelijska membrana i
- membrane organela (jedra, mitohondrija i plastida)

ali i veoma čvrsti zidovi spora (bakterija, protozoa) i brojne čvrste tvorevine (hitinska kutikula, kosti, rožne tvorevine, keratin ...)



TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

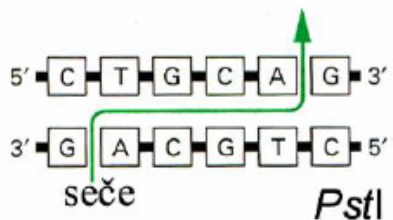
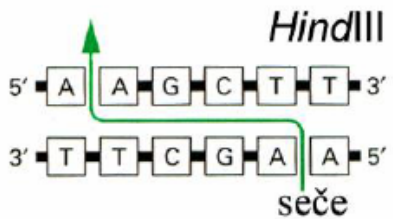
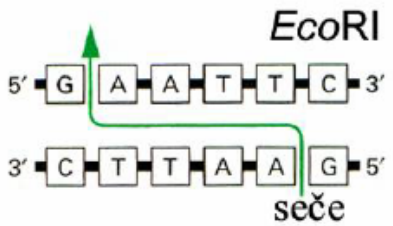
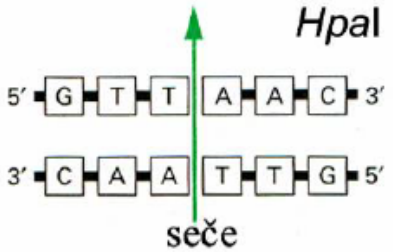
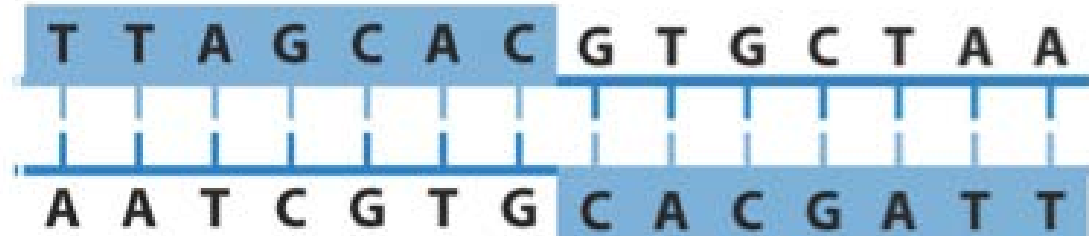
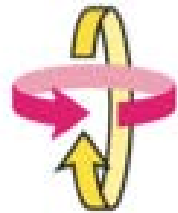
UPOTREBA
RESTRIKCIONIH ENZIMA

Restriktione
endonukleaze

poreklom
od
Procaryota

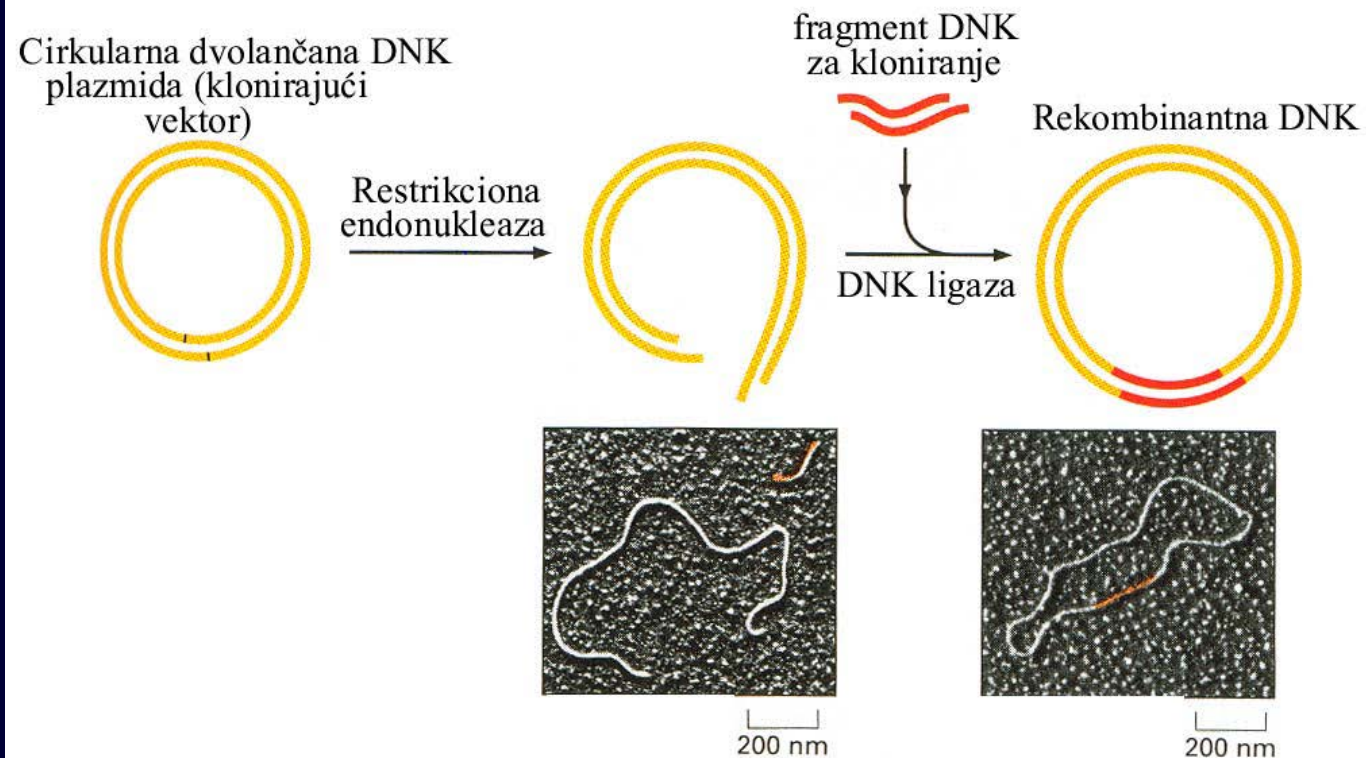
4-8
nukleotida

preko 3000
komercijalno 600



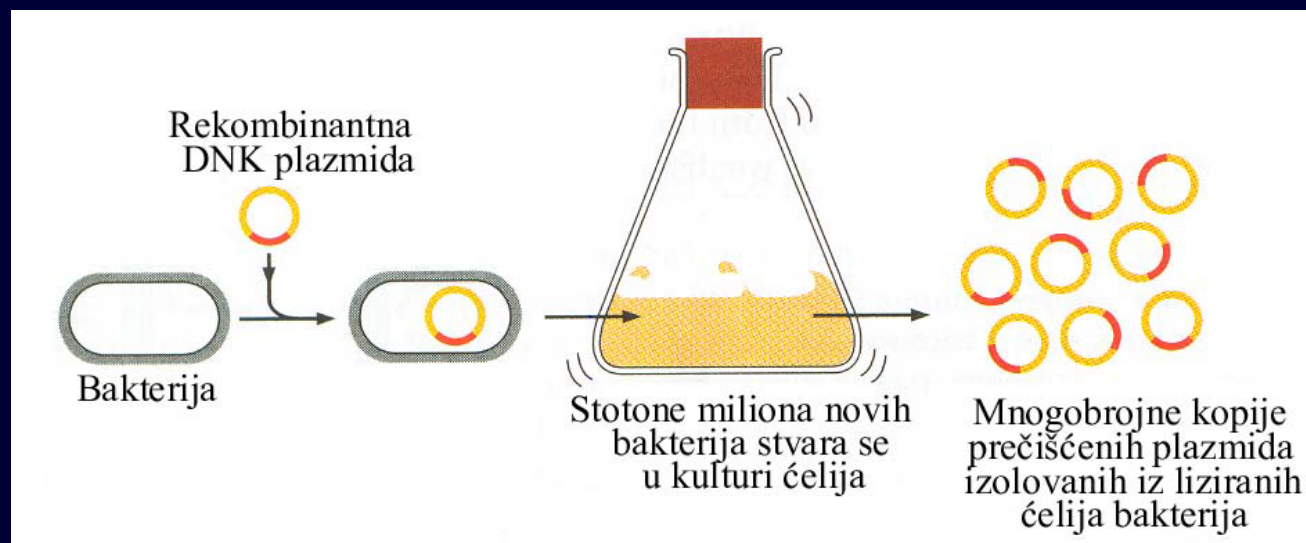
Nakon izolacije DNK (ili RNK) iz ćelije, sledeći korak je **amplifikacija (kloniranje) željenog (ciljanog) gena ili fragmenta DNK**, što se može obaviti *in vivo* i *in vitro*.

In vivo amplifikacija



In vivo amplifikacija

Kod *in vivo* kloniranja, najpre se restrikcionim enzimima „iseče” ciljani deo DNK, a zatim taj deo ugradi u DNK vektora (plazmida ili virusa), odnosno stvori se rekombinantna DNK. U cilju umnožavanja rekombinantne DNK, vektor se ubacuje u ćeliju domaćina (najčešće u bakteriju *Escherichia coli*). Pri svakoj replikaciji rekombinantne DNK, umnožava se i ugrađeni (ciljani) deo DNK.



In vitro amplifikacija

In vitro kloniranje željenog (ciljnog) fragmenta DNK obavlja se putem reakcije lančane polimerizacije, odnosno putem **PCR amplifikacije (Polymerase Chain Reaction – PCR)** u aparatu koji ima mogućnost brze promene temperaturnih uslova.



Za PCR amplifikaciju potrebne su sledeće komponente:

- izolovana DNK čiji određeni fragment želimo da amplifikujemo,
- **prajmeri** (oligonukleotidne sekvence) koji se dizajniraju tako da budu komplementarni sekvencama koji okružuju ciljani region DNK (npr. gen) koji želimo da umnožimo,
- **Taq polimeraza**,
- **slobodni nukleotidi**, odnosno gradivne jedinice za sintezu novih lanaca DNK, u vidu mešavine deoksiribonukleozid trifosfata (dNTP): adeninskih (dATP), timinskih (dTTP), guaninskih (dGTP) i citozinskih (dCTP),
- **Magnezijumovi joni** (Mg^{2+}), kofaktori neophodni za aktivnost Taq polimeraze i polimerizaciju (vezuju se za slobodne nukleotide i obezbeđuju njihovo ugrađivanje u rastući lanac DNK).
- **PCR pufer**,
- sterilna dejonizovana **voda**

<https://youtu.be/DkT6XHWne6E>

Proces PCR amplifikacije obuhvata sledeće korake:

1. Inicijalna denaturacija DNK u trajanju od dva do četiri minuta (zavisno od udela GC parova).

2. Denaturacija DNK – rasplitanje i razdvajanje lanaca DNK. Obavlja se na 94-96°C u trajanju od 30 sec do nekoliko minuta (zavisno od udela GC parova),

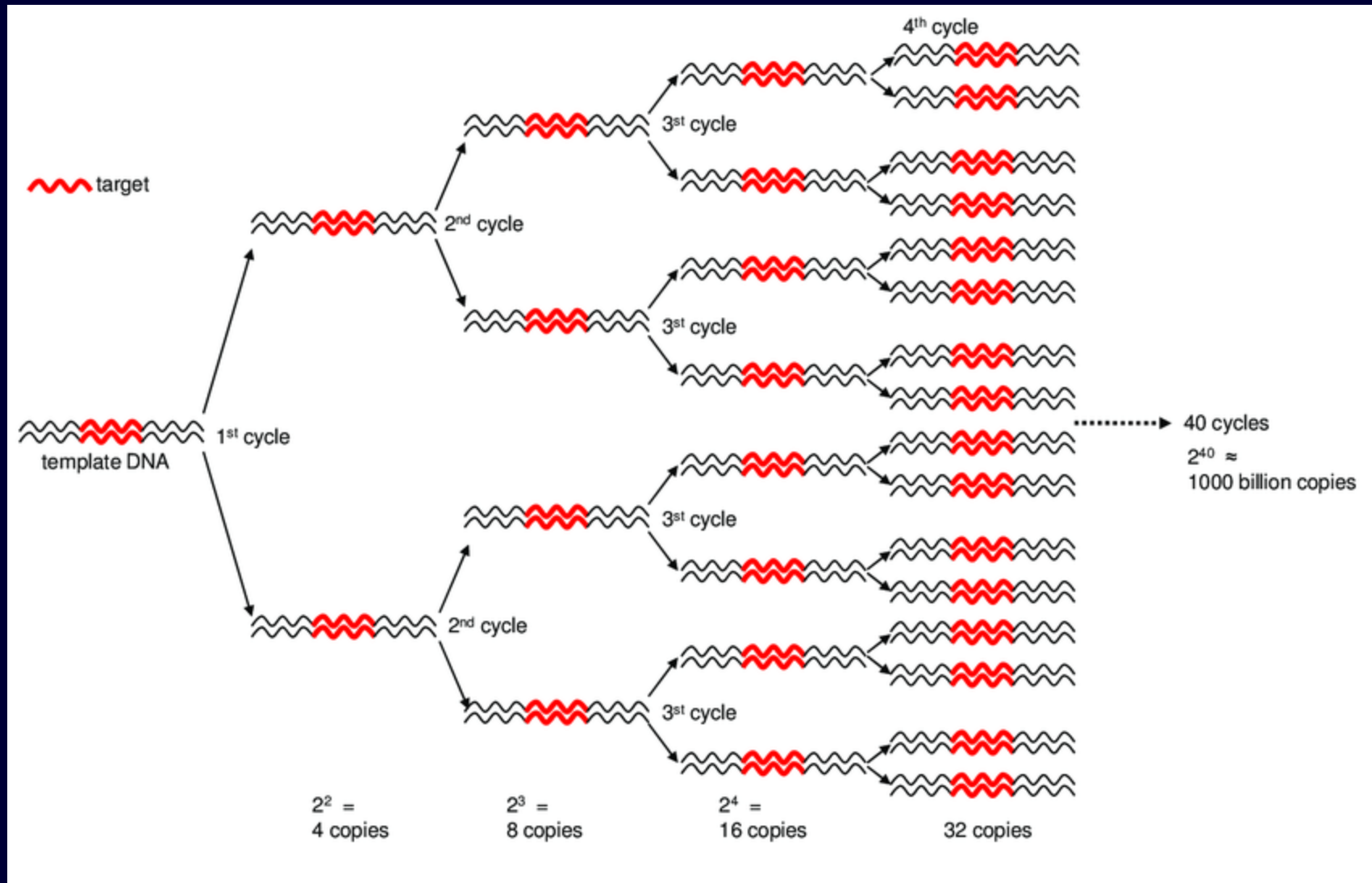
3. Hibridizacija para prajmera sa komplementarnim sekvencama koji okružuju ciljani region DNK. Obavlja se na temperaturi od 45-65°C u trajanju od 30 sekundi do nekoliko minuta,

4. Elongacija prajmera (ekstenzija), odnosno **sinteza novih DNK lanaca** počev od prajmera, tako što se *Taq* polimeraza vezuje za mesta hibridizacije prajmera i katalizuje ugrađivanje novih nukleotida komplementarnih inicijalnim sekvencama. Ovaj proces se obavlja na 72°C i traje od 45 sec do 1 minuta.

Koraci od 2. do 4. ponavljaju se tokom 25 do 40 ciklusa, kako bi se obezbedilo umnožavanje dovoljnog broja kopija ciljnog fragmenta DNK. **Umnoženi ciljni fragmenti DNK nazivaju se amplikoni ili PCR produkti.** U svakom ciklusu količina amplikona se duplicira (u prvom ciklusu nastaju 2 aplikona, u drugom 4, u trećem 8, u četvrtom 16, u petom 32, u šestom 64 ...) tako da na kraju PCR procesa nastaje od milion do bilion amplikona.

5. Elongacija preostalih produkata (na 72 °C, u trajanju od dva do četiri minuta).

Amplifikacija dela genoma

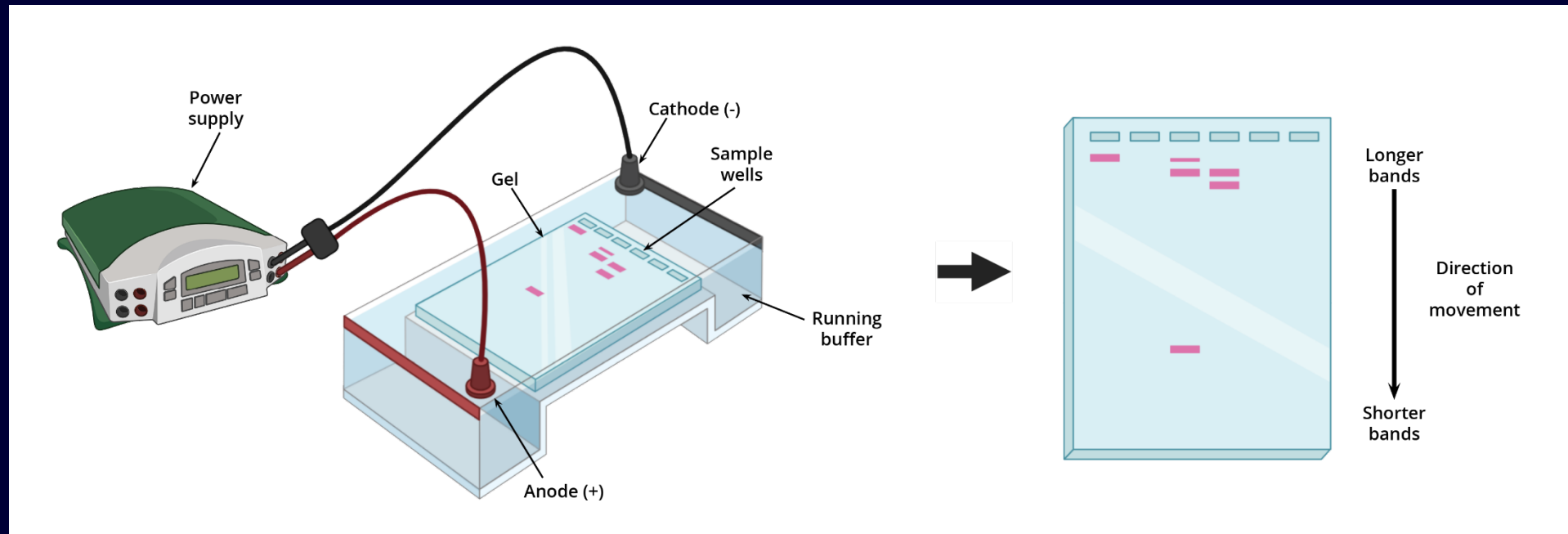


Po završetku *end-point* PCR amplifikacije, dobijaju se PCR produkti (amplikoni) čije se očitavanje može obaviti na dva načina:

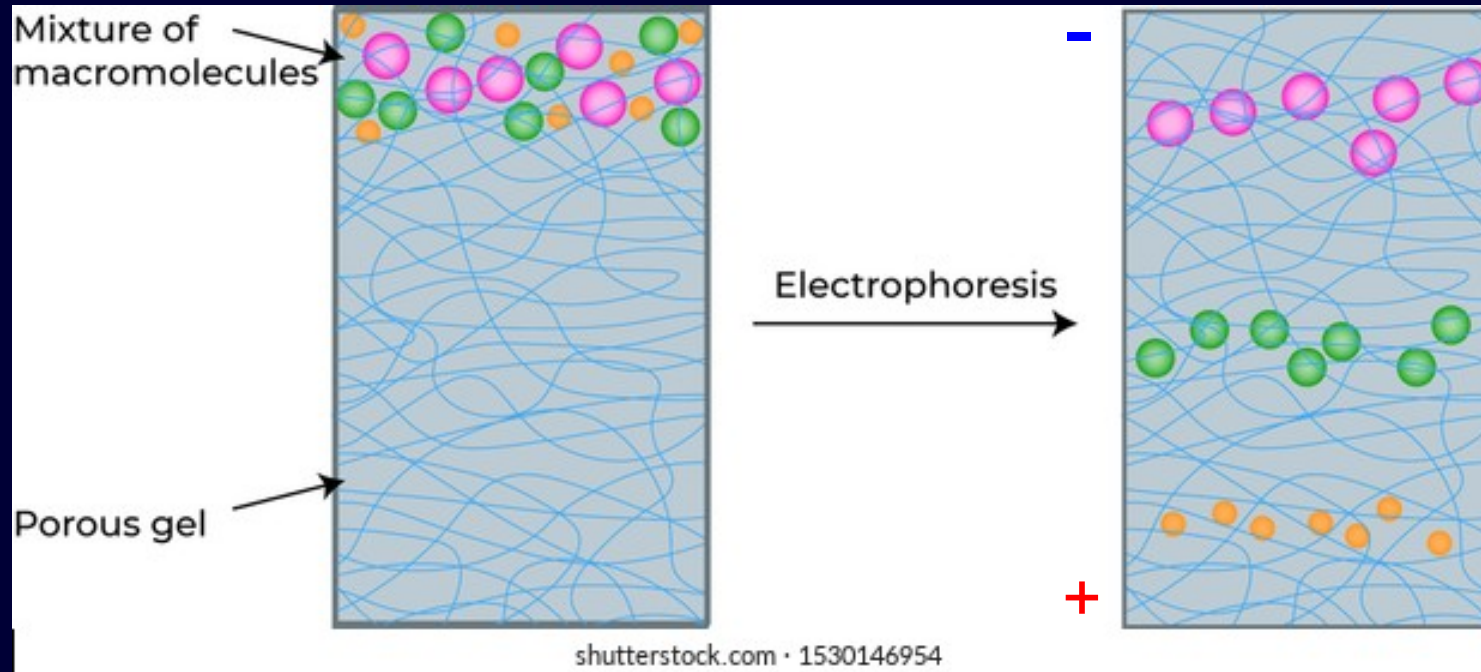
- ELEKTROFOREZOM NA GELU
- SEKVENCIRANJEM

ELEKTROFOREZA

Elektroforeza obezbeđuje razdvajanje molekula različite dužine **pod uticajem električnog polja** prilikom njihovog kretanja kroz **inertan i porozan matriks (agarozni ili poliakrilamidni gel)** potopljen u **rastvor slabog elektrolita**.



Fragmenti DNK različite dužine imaju različitu elektropokretljivost (jer je ukupna količina naelektrisanja DNK proporcionalna njegovoj veličini), te kroz gel putuju različitom brzinom (**od – ka + polu**, obzirom da je DNK molekul negativno naelektrisan).

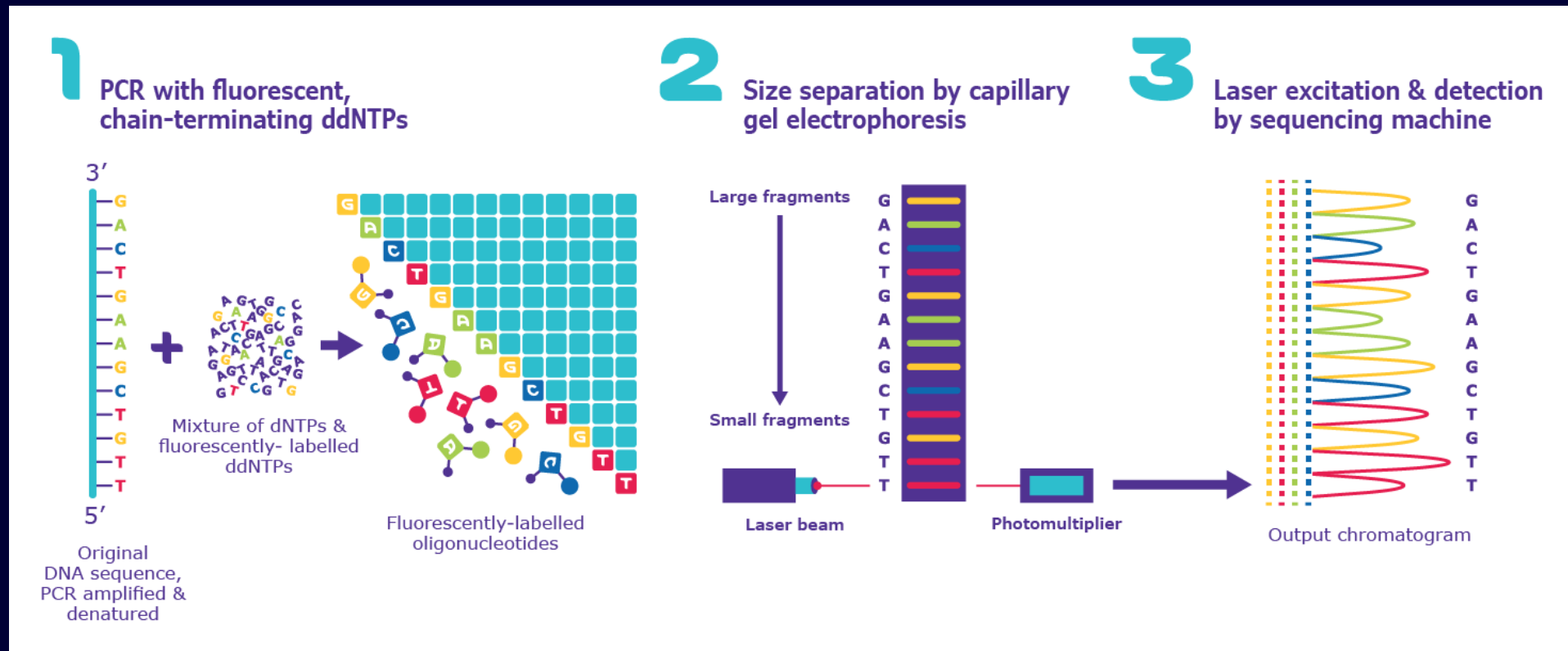


Zbog toga fragmenti različite dužine tokom trajanja elektroforeze prolaze različiti put:

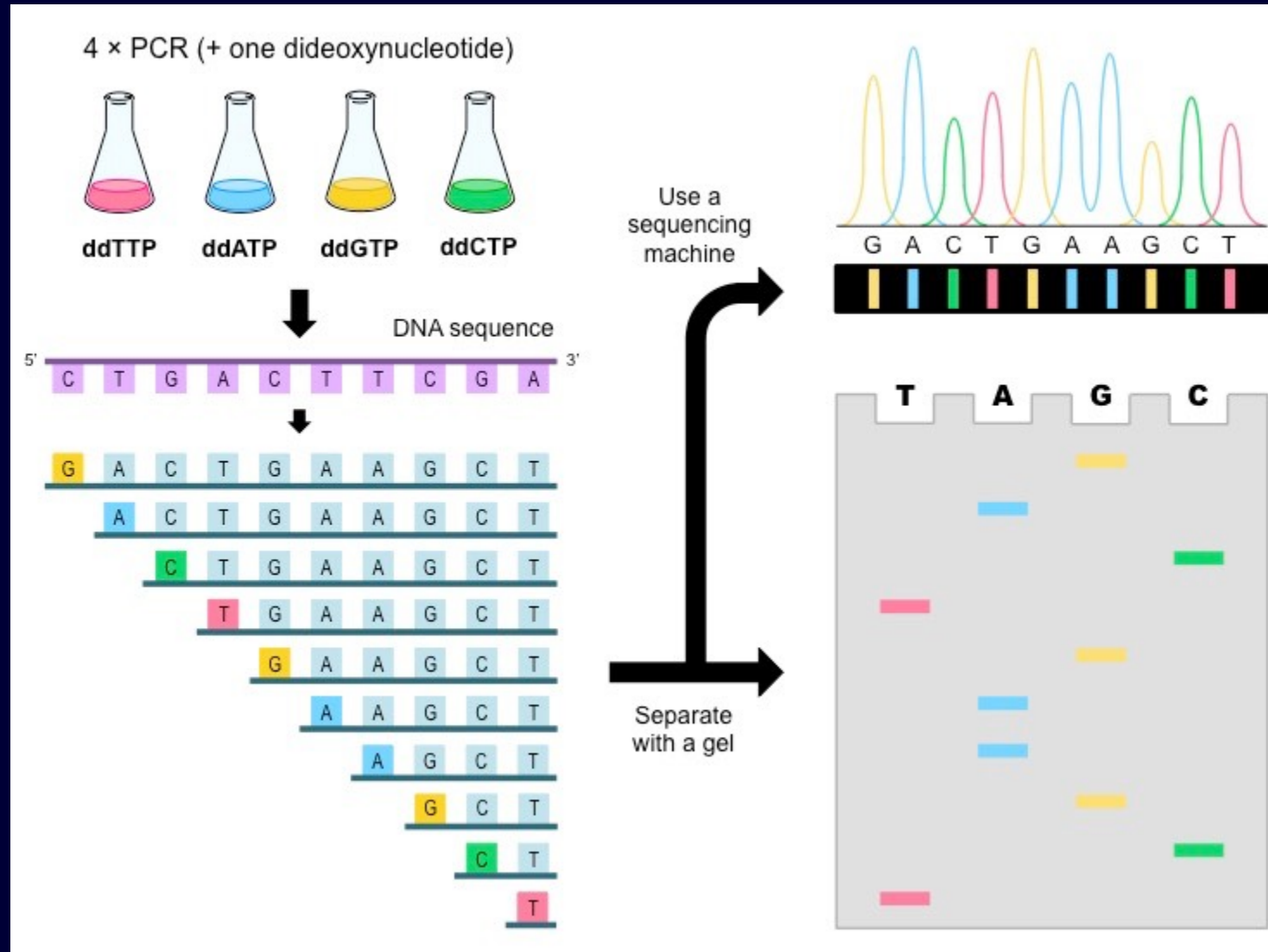
kraći fragmenti (koji se kroz gel probijaju lakše te se kreću brže) **pređu duži put** u odnosu na **duže fragmente** (koji se teže probijaju kroz gel pa se kreću sporije).

SEKVENCIONIRANJE

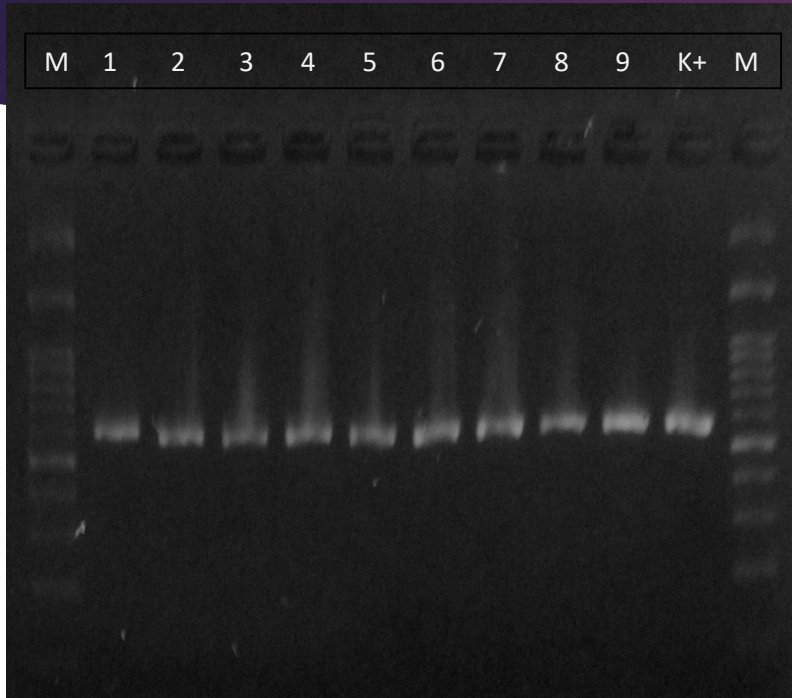
Sanger metoda sekvenciranja DNK



Sanger metoda sekvenciranja DNK



Detekcija parvovirusa pasa



M-100 bp ladder DNA marker
1 – 10 – Uzorci
K+ pozitivna kontrola

538 bp

Primers

555-for CAGGAAGATATCCAGAAGGA

555-rev GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA

Detekcija mikrosporidija iz roda *Nosema*

K+, 47, 54, 68, 82, 83, 86, 87, 129, 132, 153, 154, 155, 156, 157

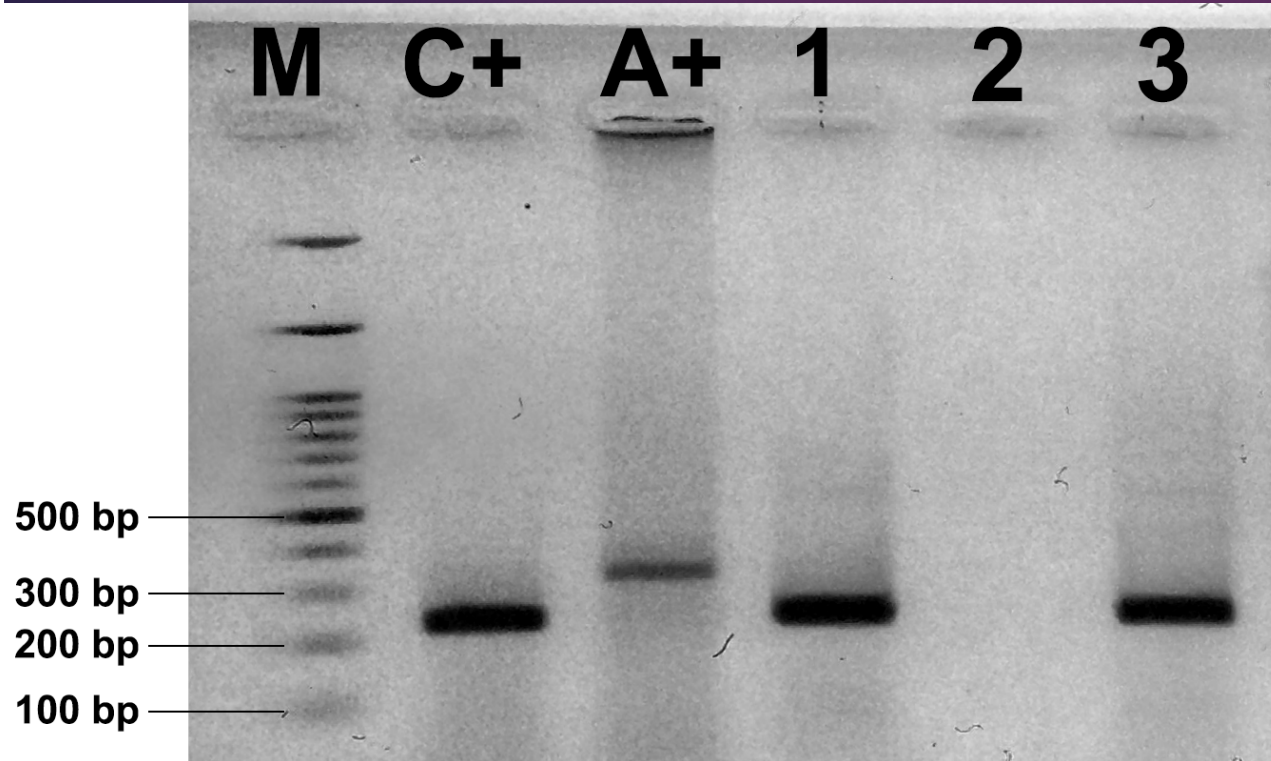
Nosema genus: 488bp

nos-16S-fw CGTAGACGCTATTCCCTAAGATT

nos-16S-rv

CTCCCAACTATACAGTACACCTCATA

Identifikacija *Nosema* vrsta (*N. ceranae*/*N. apis*)



M-100 bp ladder DNA marker;
C+ positive *N. ceranae* control;
A+, positive *N. apis* control;
1-3, tested samples

PAR PRAJMERA za *Nosema ceranae* -218-219

218MITOC-FOR 5'-bpCGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'

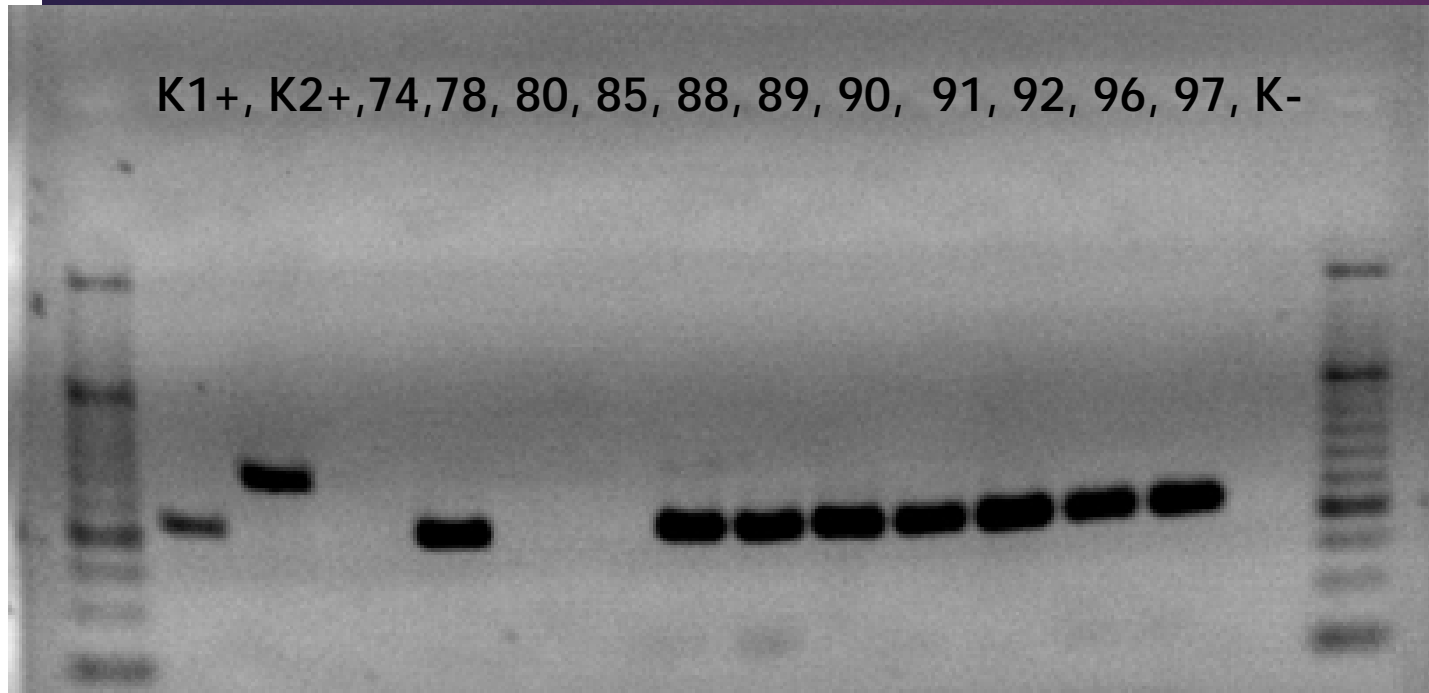
218MITOC-REV 5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG-3'

PAR PRAJMERA za *N. apis* - 321 bp

321APIS-FOR 5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'

321APIS-REV 5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG-3'

Identifikacija *Nosema* vrsta (*N. ceranae*/*N. apis*)



50bp DNA Ladder

K1+ poz. kontrola *N. ceranae*

K2+ poz. kontrola *N. apis*

K- neg. Kontrola

74-97 uzorci

PAR PRAJMERA za *Nosema ceranae* - 218-219 bp

218MITOC-FOR 5'- CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'

218MITOC-REV 5'- CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'

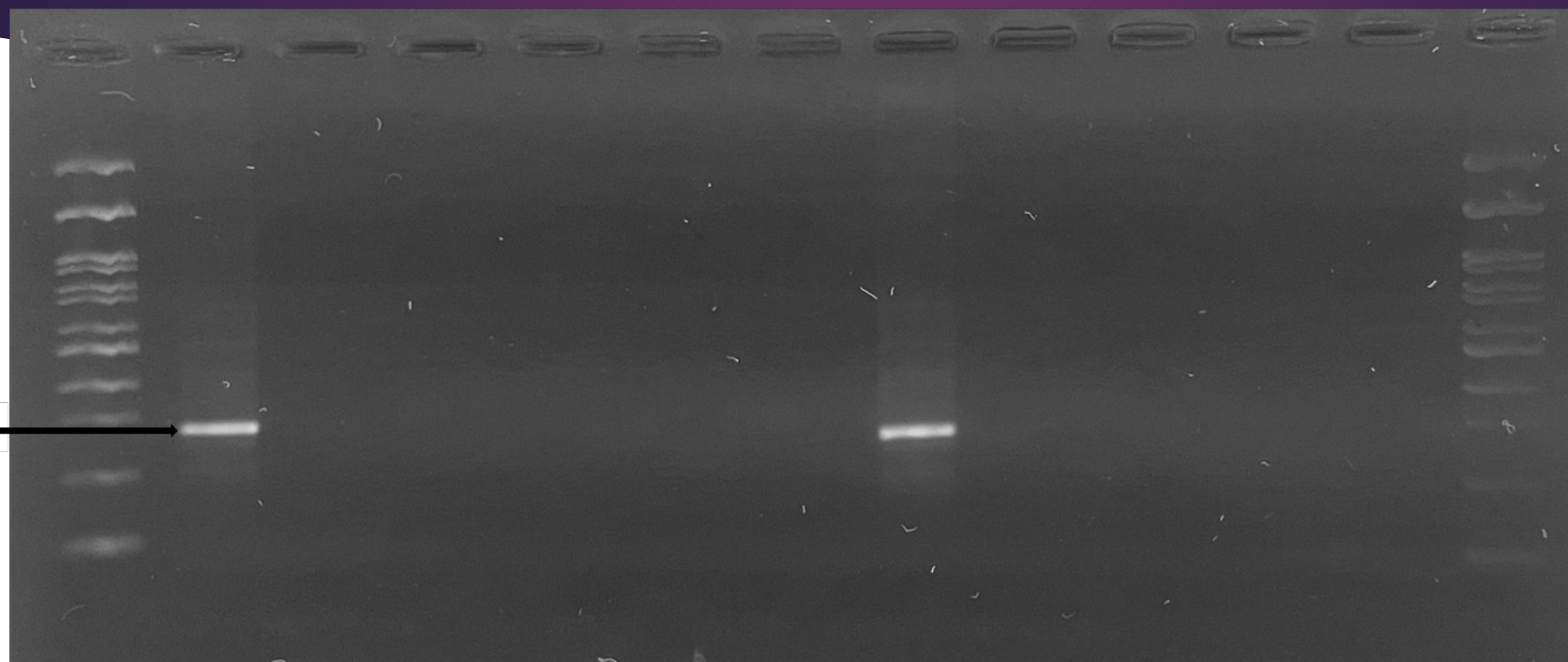
PAR PRAJMERA za *N. apis* - 321 bp

321APIS-FOR 5'-GGGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'

321APIS-REV 5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG-3'

Detekcija parazita iz roda *Giardia*

M K+ K- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M



M-100 bp ladder DNA marker

1 – 9 – Uzorci

K+ pozitivna kontrola

K- negativna kontrola

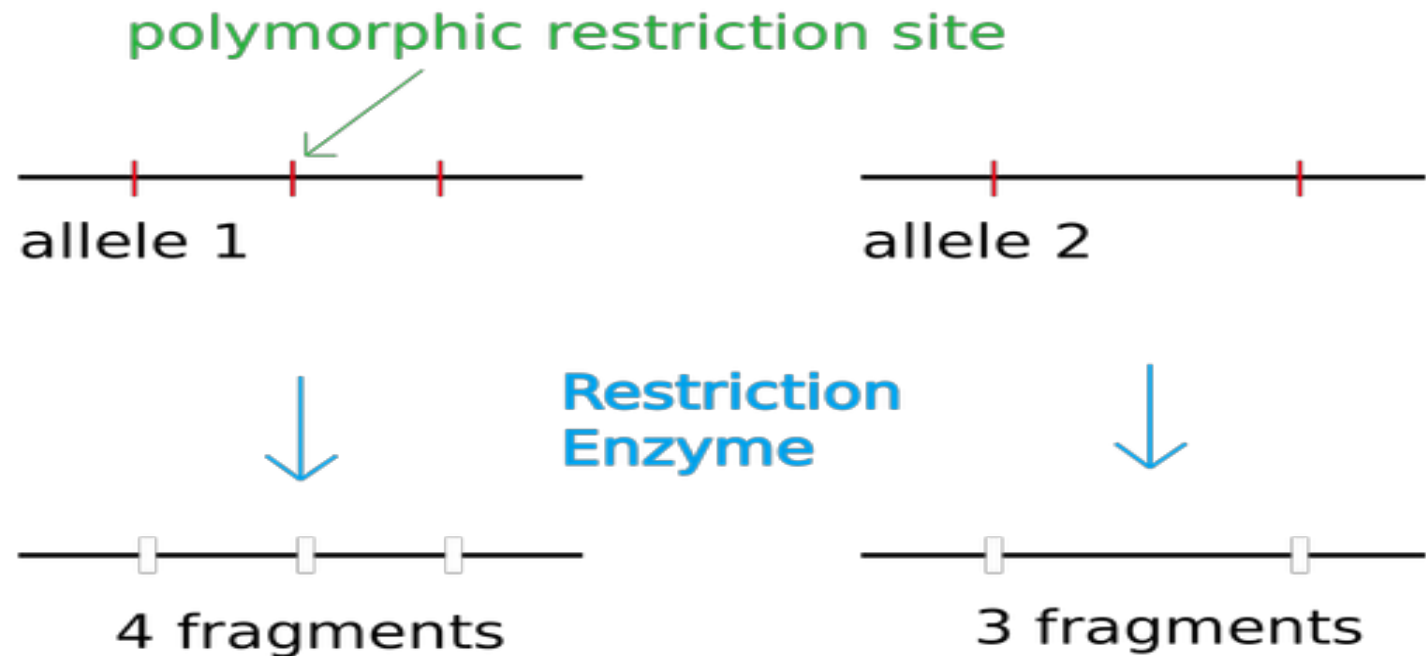
292 bp

RH11 - 5' CATCCGGTCGATCCTGCC 3'

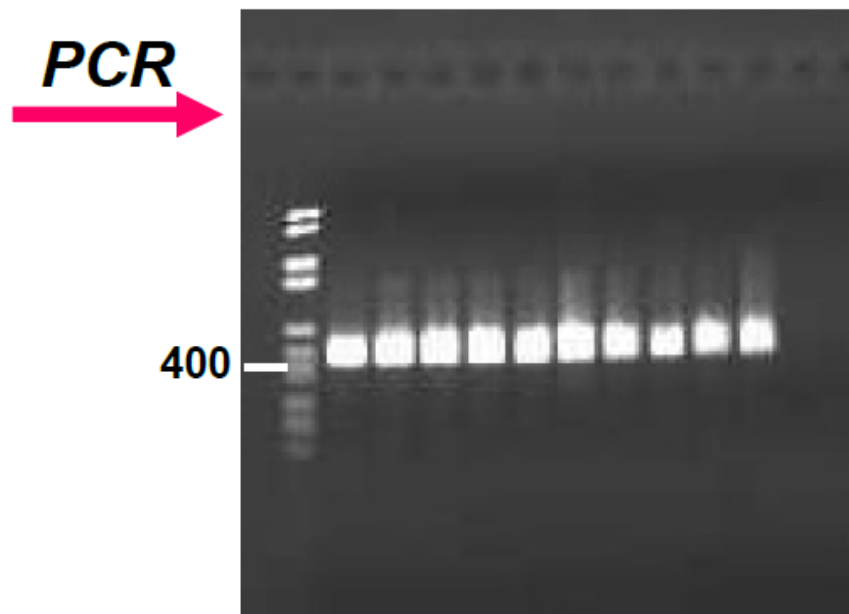
RH4 - 5' AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG 3'

RFLP

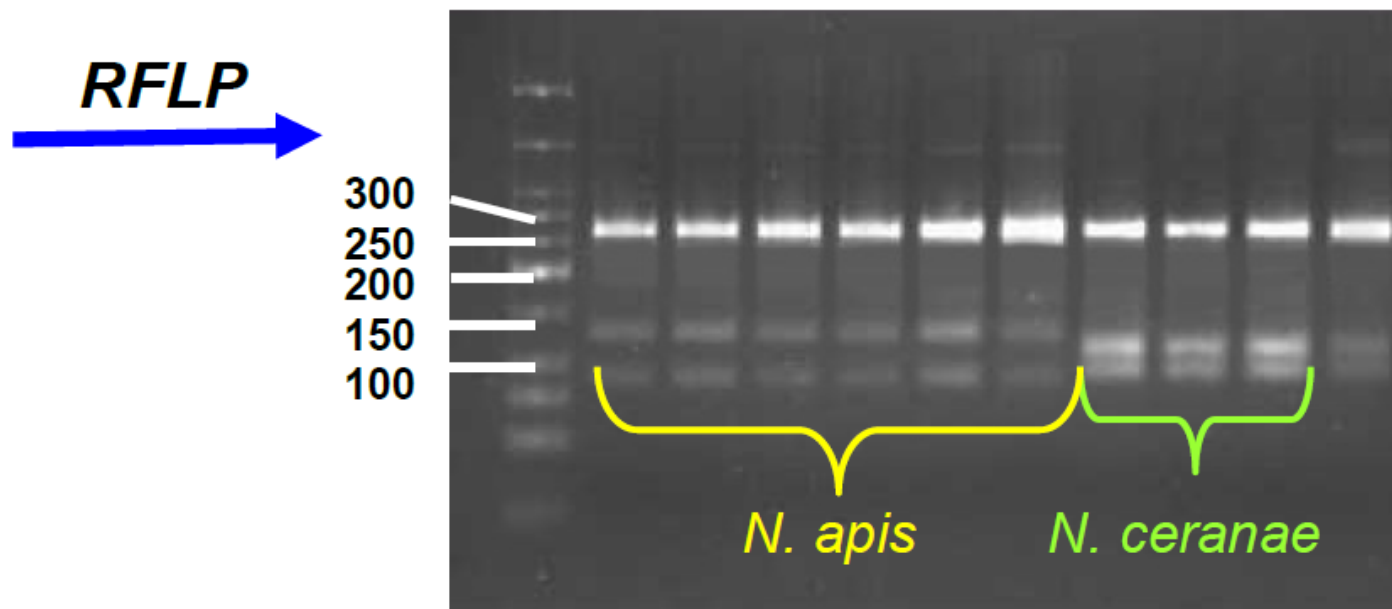
- ULOGA RESTRIKCIONIH ENZIMA
- RFLP - „*Restriction fragment length polymorphism*“
Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata



Primer specijske diferencijacije vrsta *Nosema apis* / *N. ceranae* PCR – RFLP metodom



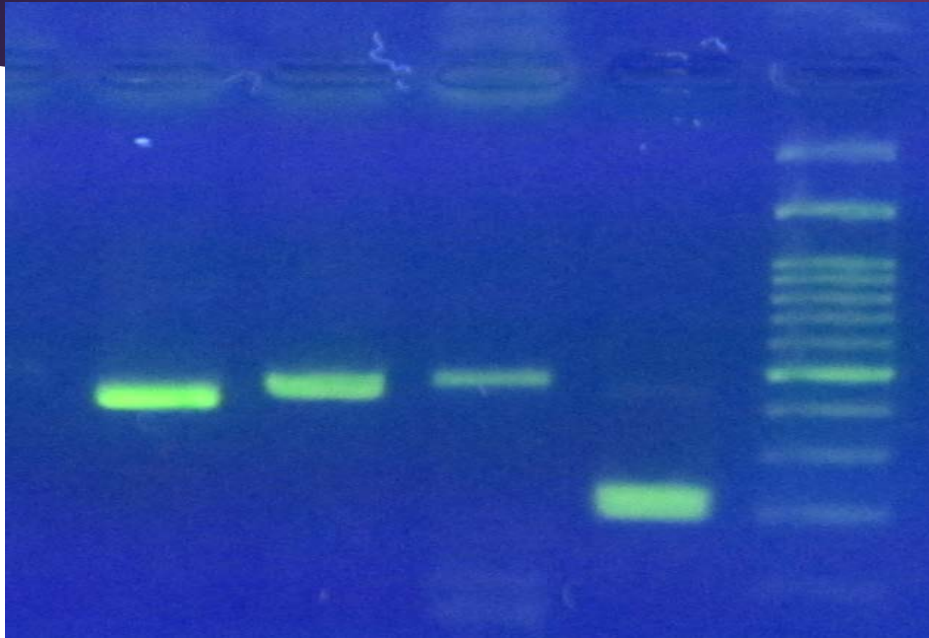
Gel sa PCR produktima
dobijenih sa prajmerima
nos-16S-fw i nos-16S-rv



Gel na kome se vide šabloni RFLP
nakon digestije enzimima
Msp I, *Pac I* i *Nde I*
(na osnovu šablona određuje se
vrsta parazita roda *Nosema*)

Ukoliko je u uzorku *N. apis*, enzimi *Msp I* i *Nde I* iseći će PCR produkt na tri trake veličine: 91 bp, 131 bp, 266 bp)
Ukoliko je u uzorku *N. ceranae*, enzimi *Msp I/Pac I* iseći će PCR produkt na tri trake veličine: 97 bp, 118 bp, 269 bp)

Primer specijske diferencijacije vrsta *Babesia canis* / *B. gibsoni* PCR – RFLP metodom



410 bp – amplifikat dobijen nakon PCR reakcije

200 bp i 205 bp – produkti dobijeni nakon RFLP sa *Hinfl* enzimom, ukoliko se radi o *B.gibsoni*

M-100 bp ladder DNA marker

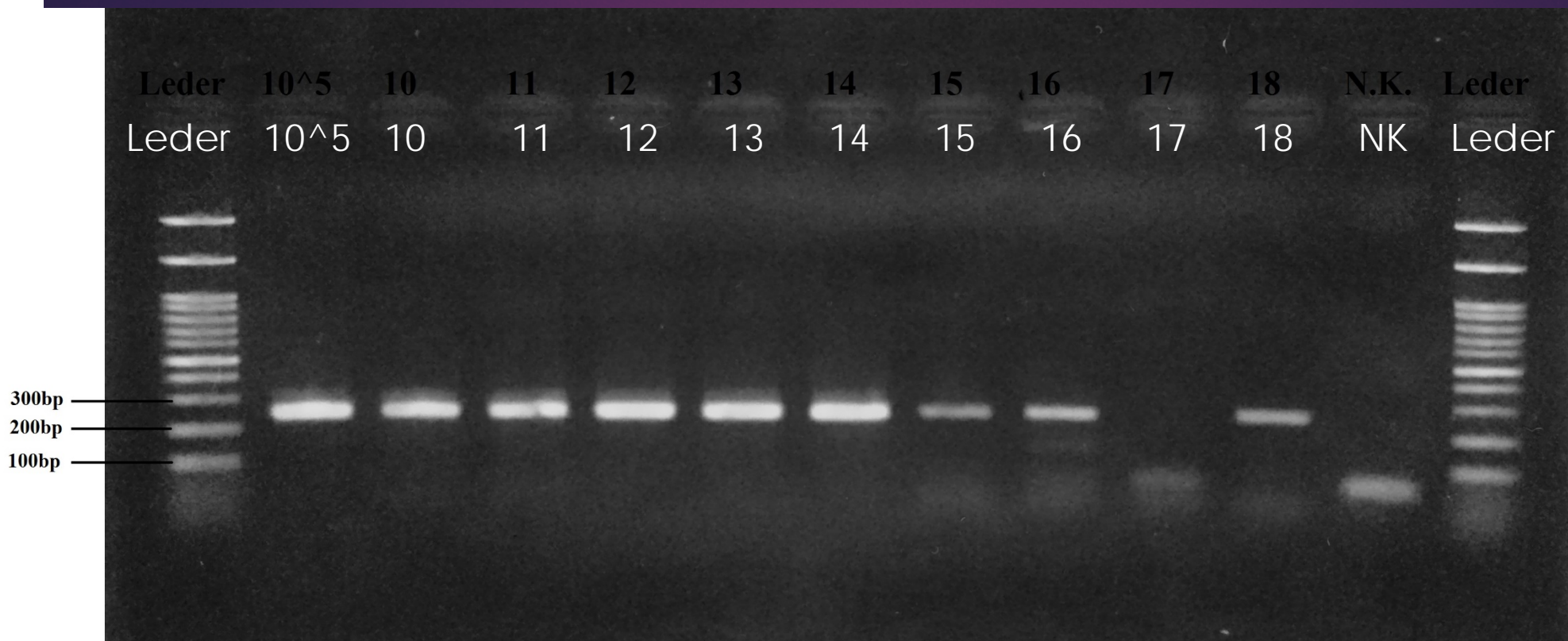
410 bp

Primers

PIRO-A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3')

PIRO-B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3')

Detekcija tripanozome *Lotmaria passim*



ELEKTROFOREZA

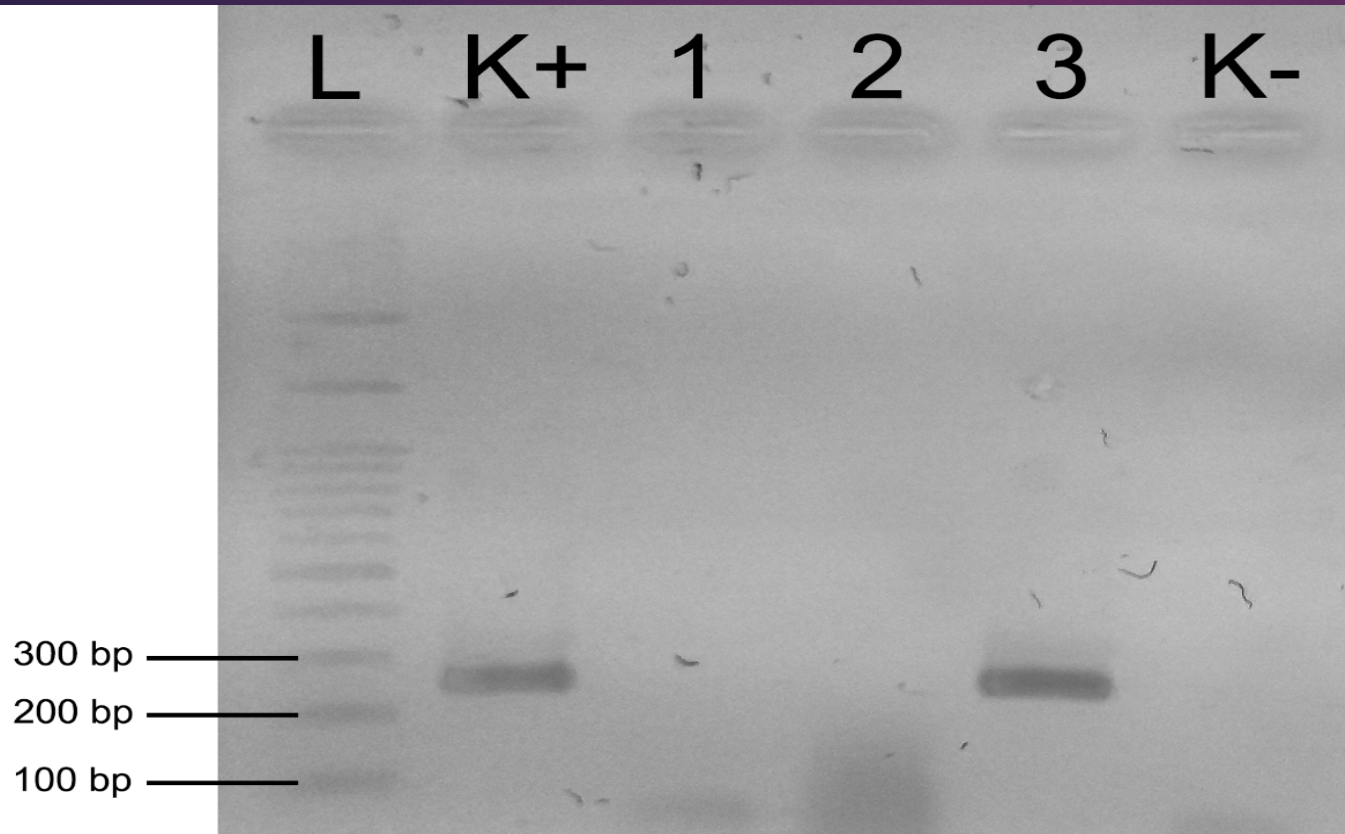
100 V
30 min.

Pozitivna kontrola - 10^5

Leder - 100 bp DNA marker
10 - 18 - Uzorci
K+ 10^5 pozitivna kontrola
NK- negativna kontrola

Lotmaria passim - 247bp
LpCytb_F1 cGAAGTgCaCATATATGCTTtAC
LpCytb_R gcCAaAcACCaATaACTGGtACT

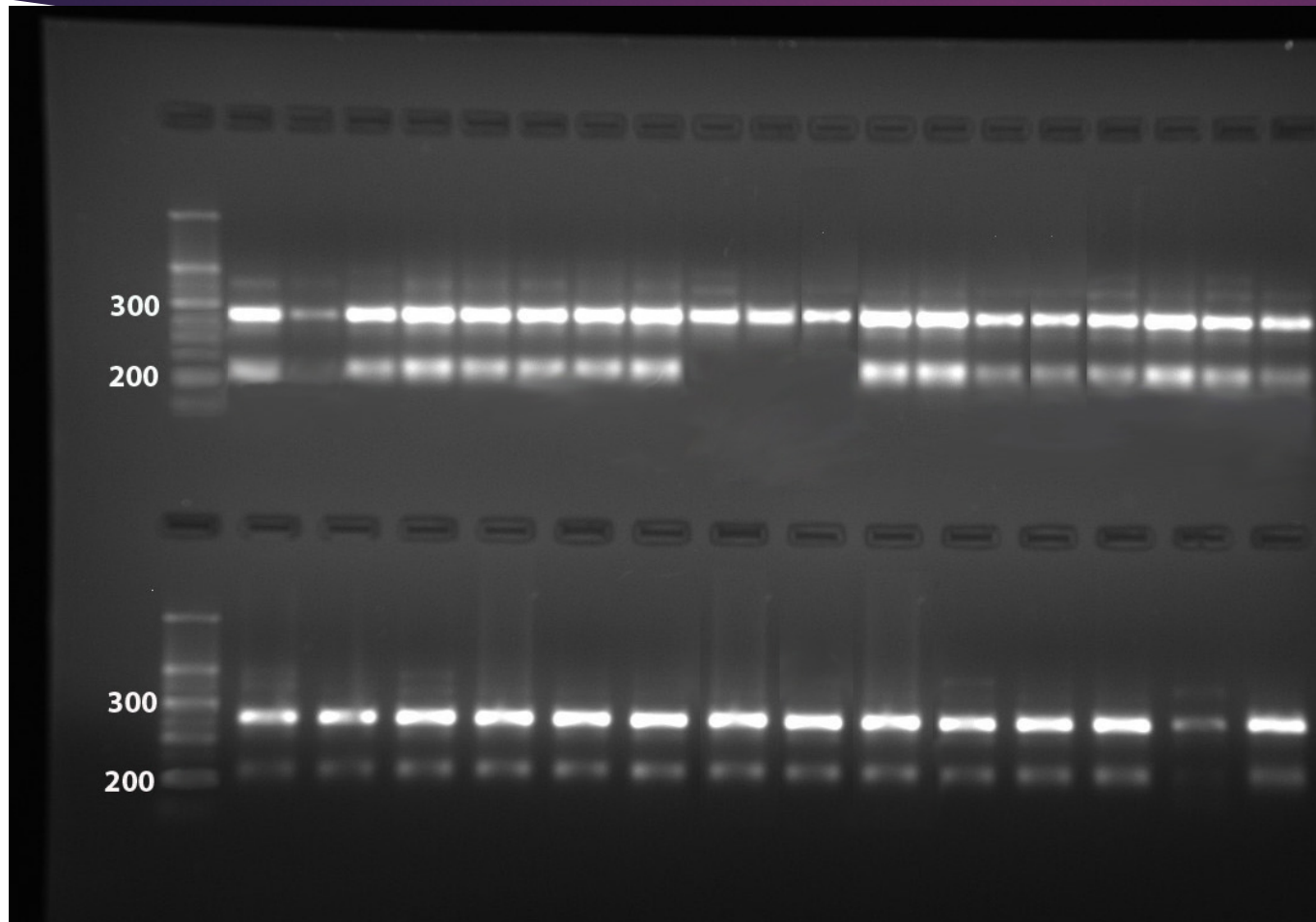
Detekcija tripanozome *Lotmaria passim* u uzorcima legla



L-100 bp ladder DNA marker
1 – 3 – Uzorci
K+ pozitivna kontrola
K- negativna kontrola

Lotmaria passim - 247bp
LpCytb_F1 cGAAGTgCaCATATATGCTTtAC
LpCytb_R gcCAaAcACCaATaACTGGtACT

ODREDJIVANJE POLA SISARA ANALIZOM AMELOGENIN GENA



Za X hromozom AMEX 280 bp
ZA Y hromozom AMEY 217 bp

← 280
← 217

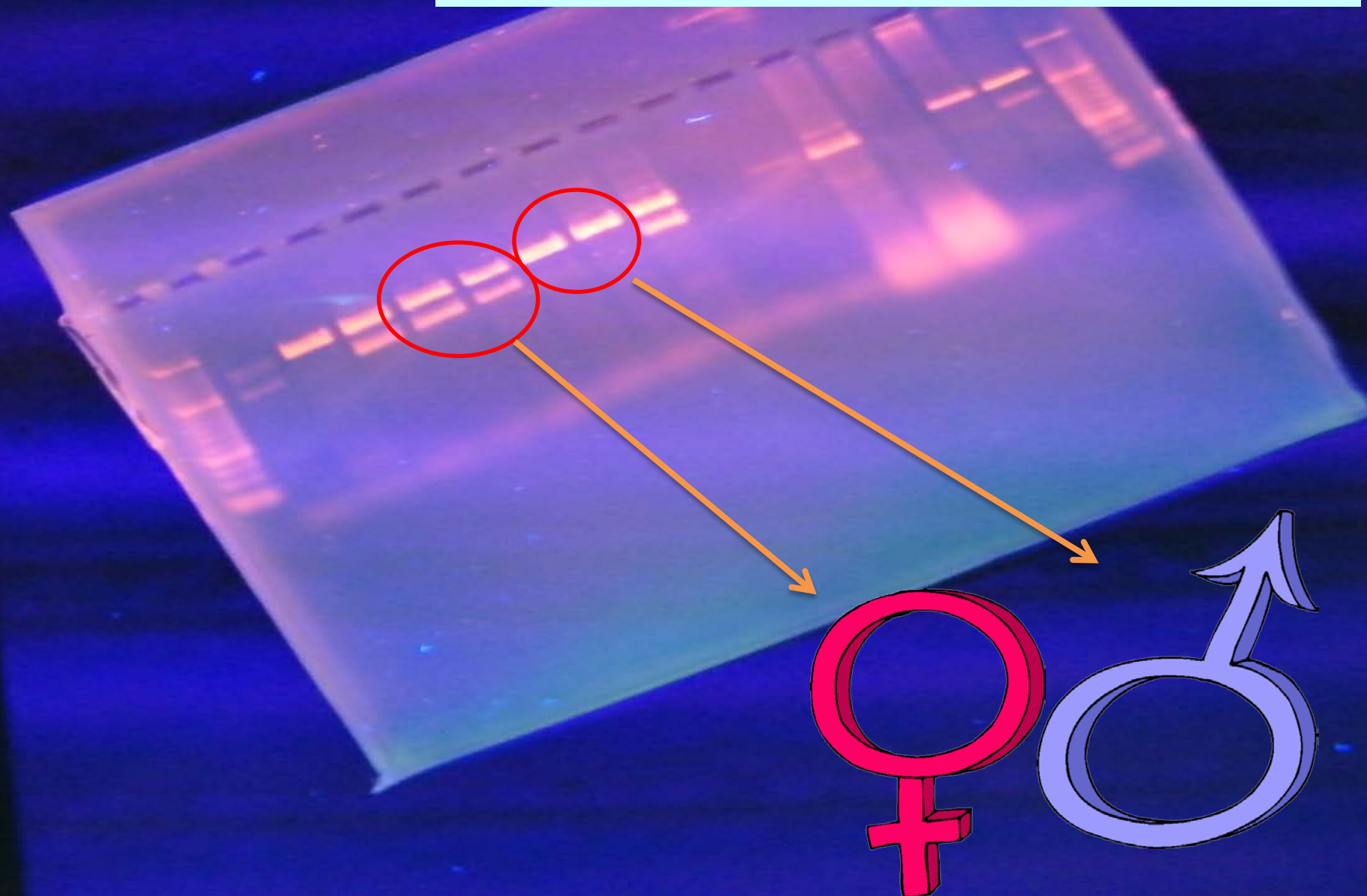
← 280
← 217

Priajmeri:

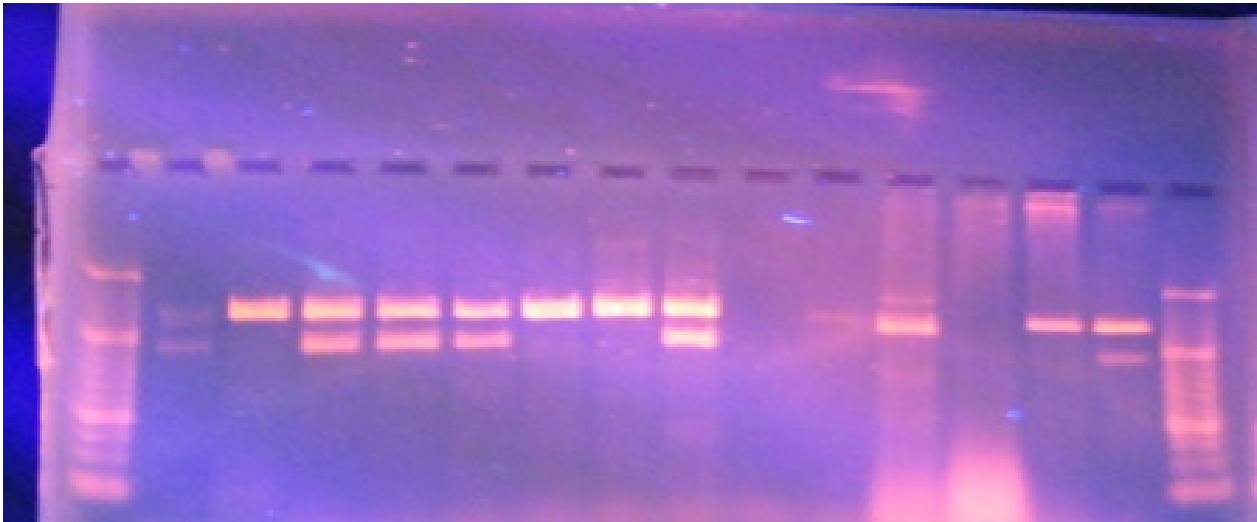
SE 47 CAGCCAAACCTCCCTCTGC
SE 48 CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC

REZULTATI kod prica

jednim setom prajmera amplifikuje se samo CHD-Z fragment kod muškaka (1 traka), odnosno 2 fragmenta CHD-Z i CHD-W kod ženki (2 trake).



ODREDJIVANJE POLA PTICA ANALIZOM CHD gena



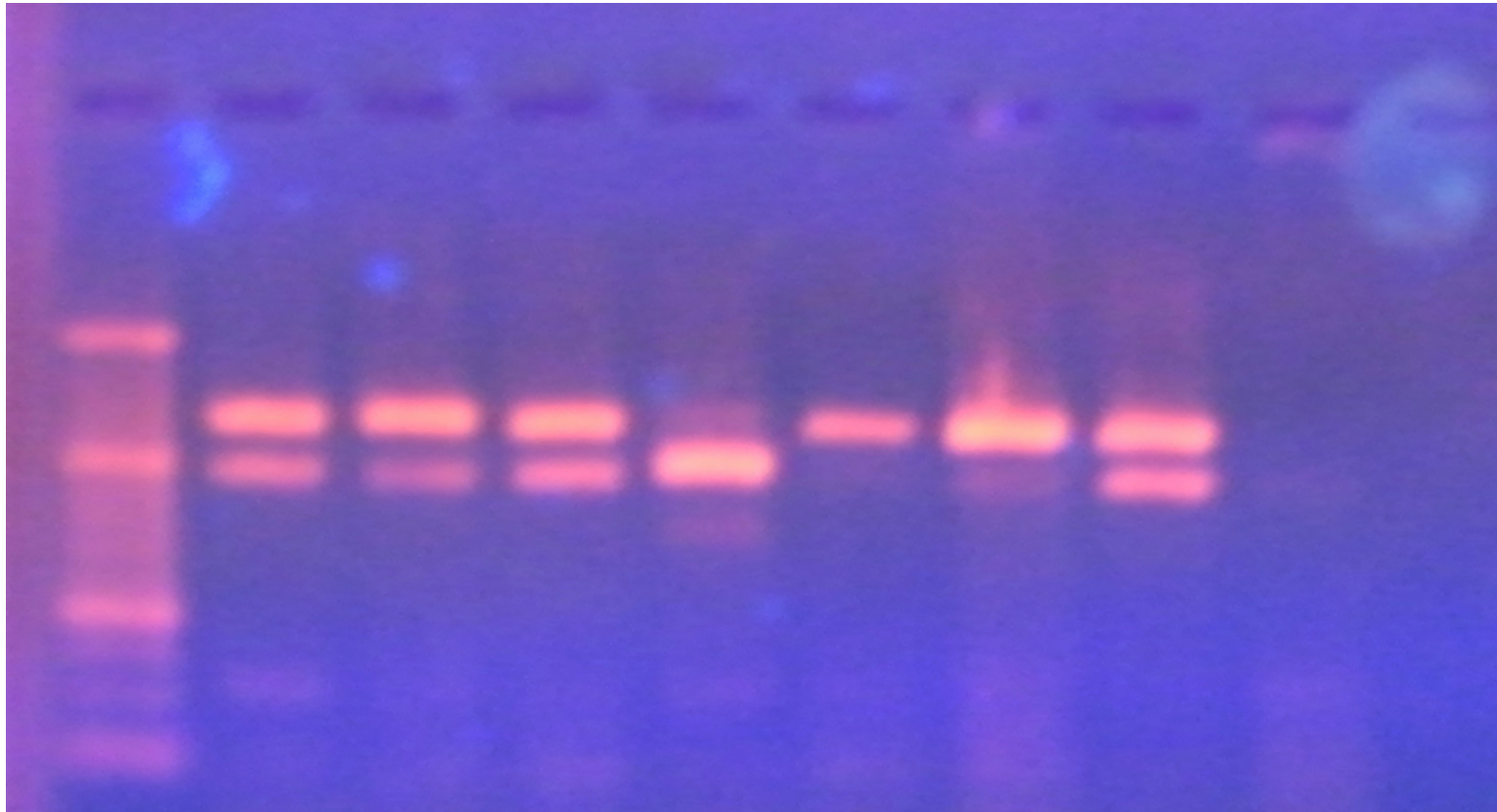
Dužine sekvenci variraju između vrsta

Prajmeri:

P2 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'

P8 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'

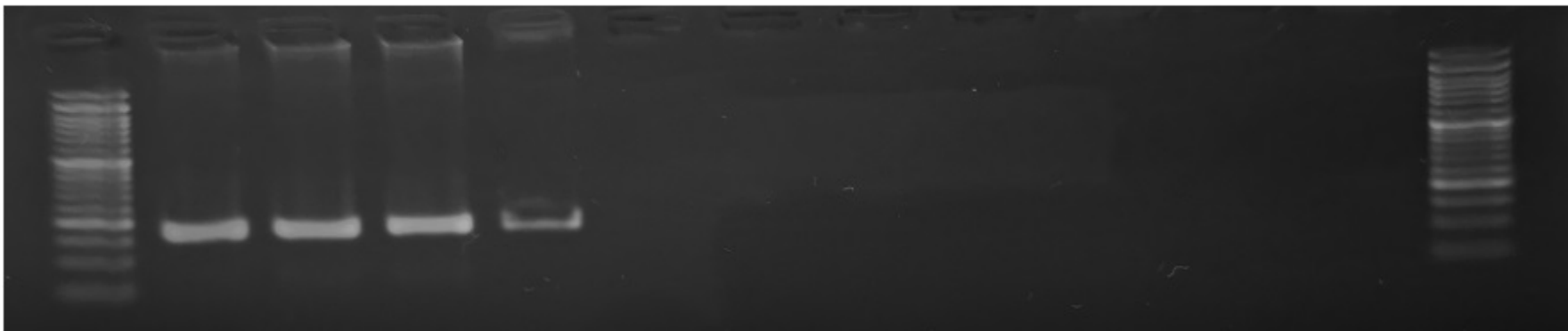
ODREDJIVANJE POLA PTICA ANALIZOM CHD gena



118 – žako
119 – gvajana
120 – žako
124 – turako
133 – žako
151 – žako
150 – žako

Forenzika (vestačenje) vrste srneće divljači

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



M – marker;
1 – pozitivna kontrola Evropski jelen;
2, 5 i 8 – uzorak 2001;
3, 6 i 9 – uzorak 2002;
4, 7 i 10 – uzorak 2003;
11 – negativna kontrola.

Specijes specifični prajmeri za evropskog jelena (*Cervus elaphus*) korišćeni su za uzorke 1, 2, 3 i 4; specijes specifični prajmeri za srnu (*Capreolus capreolus*) korišćeni su za uzorke 5, 6 i 7; specijes specifični prajmeri za jelena lopatara (*Dama dama*) korišćeni su za uzorke 8, 9 i 10;

Specific primers Srndać (*Capreolus capreolus*)

12SCC-FW 5'- TGAAAATAGATAACGAAAGTAGCTTTGAACTA -3'

175bp

Specific primers Evropski jelen (*Cervus elaphus*)

12SCE-FW 5'- CAAAAACATATAACGAAAGTAACTTTCCGACC -3'

175bp

Specific primers Jelen lopatar (*Dama dama*)

12SDD-FW 5'- TAAACAACGAAGGTAACCTTATCG -3'

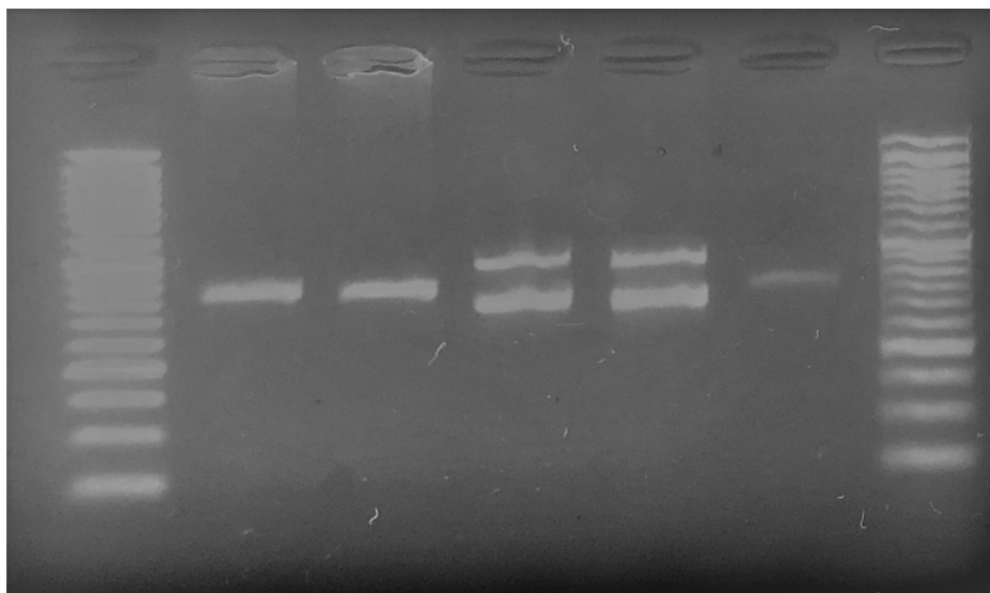
169bp

Reverse primer - ZAJEDNIČKI ZA SVE TRI VRSTE

12SCERV-REV 5'- AAAGCACCGCCAAGTCCTT -3'

Forenzika (vestačenje) pola kod srneće divljači

M 1 2 3 4 5 M



M – marker;

1 – uзорak 2001;

2 – uзорak 2002,

3, 4 – pozitivna kontrola (muzjak),

5 – uзорak 2003;

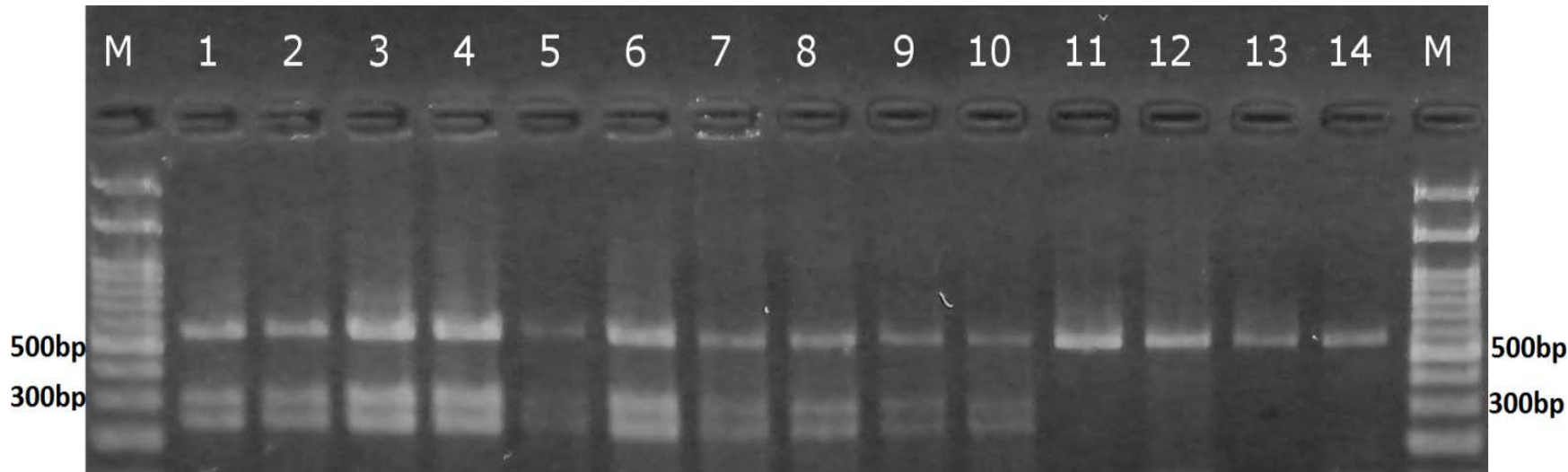
Prajmeri:

SE 47 CAGCCAAACCTCCCTCTGC

SE 48 CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC

Duzina sekvenci varira među vrstama

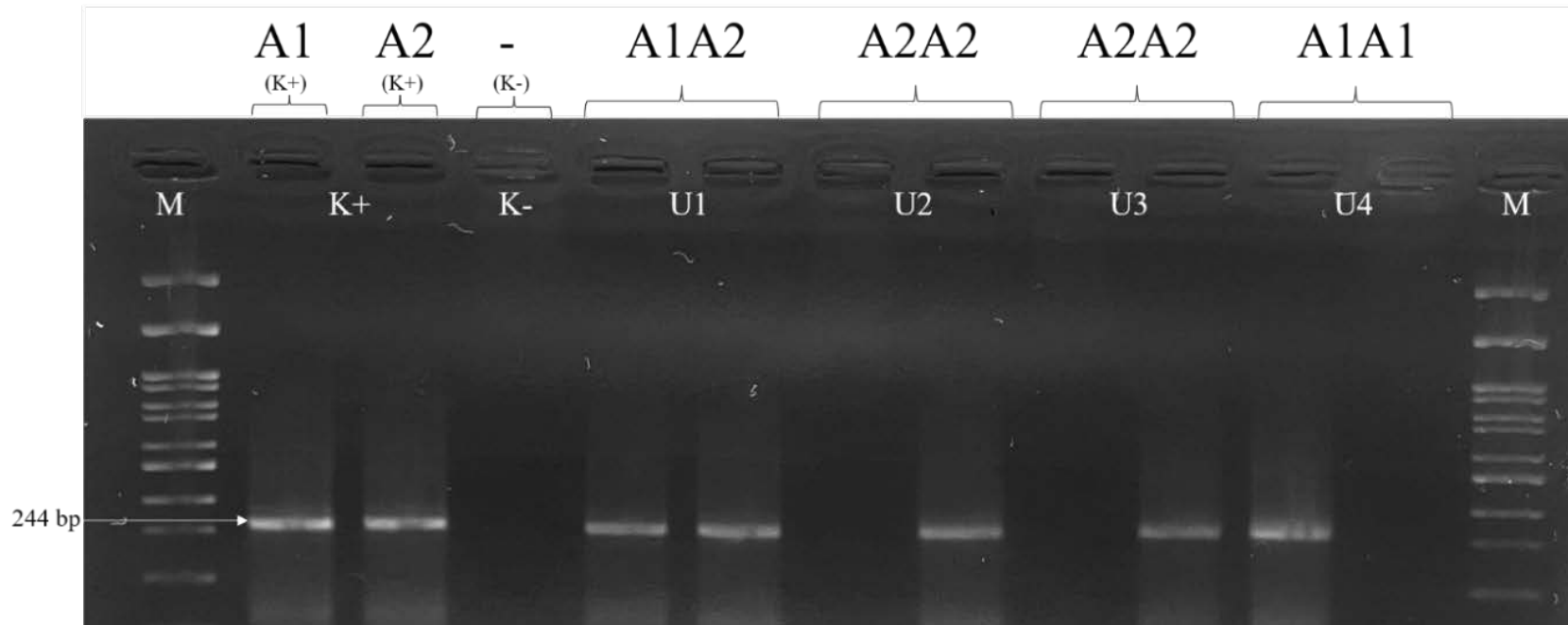
Detekcija gena za PKD (Polycystic kidney disease)



559 bp – amplifikat dobijen nakon PCR reakcije
produkti dobijeni nakon RFLP sa SchI enzimom, ukoliko
postoji mutacija
316 bp i 243 bp – (MlyI)

Prajmeri:
PKD1F 3' CAGGTAGACGGGATAGACGA 5'
PKD2R 3' TTCTCCGTGTCAACGACTG 5'

Utvrđivanje polimorfizma gena za beta kazein



M-100 bp ladder DNA marker
U1 – U4 – Uzorci
K+ pozitivna kontrola
K- negativna kontrola

244 bp

Forward prajmeri

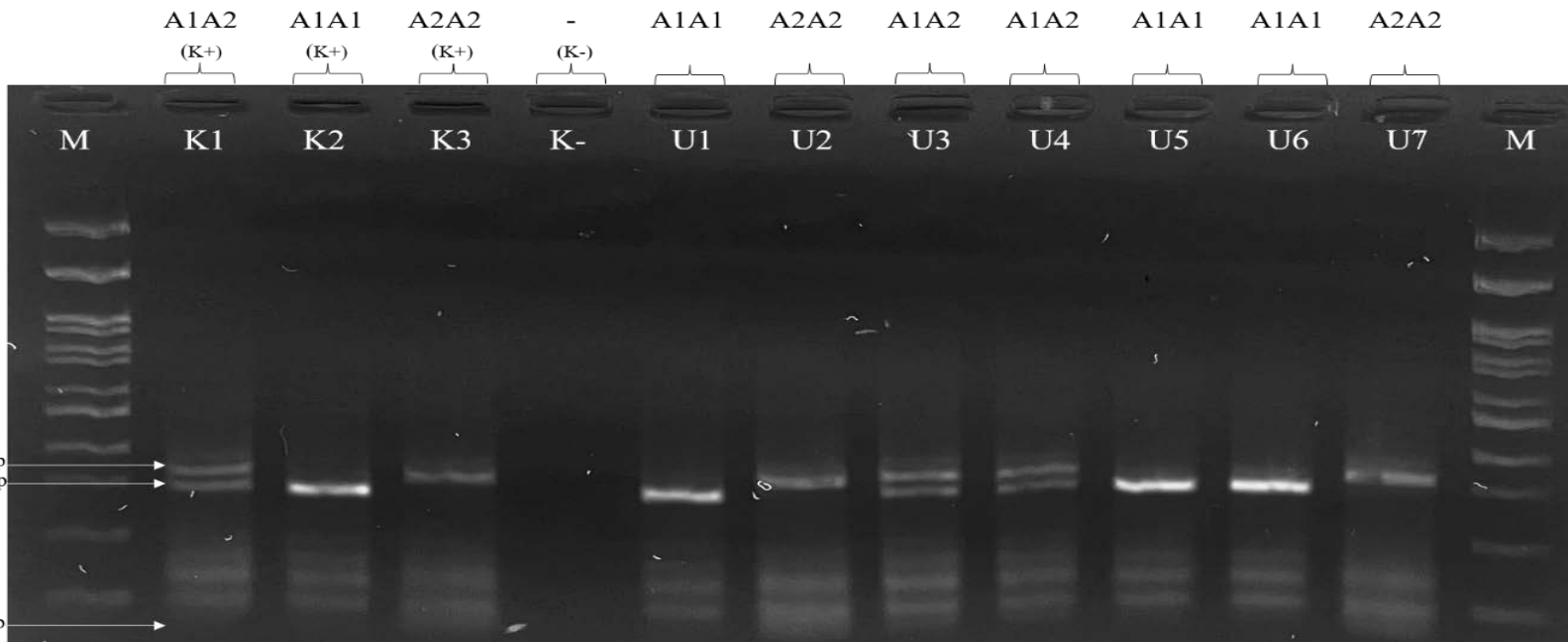
IGBhF: 5' CTT CCC TGG GCC CAT CCA 3')

IGBpF: 5' CTT CCC TGG GCC CAT CC 3')

zajednički Reverse

IGBR: 5' AGA CTG GAG CAG AGG CAG AG 3')

Utvrđivanje polimorfizma gena za beta kazein *RFLP metoda*



M-100 bp ladder DNA marker
U1 – U7 – Uzorci
K1-K3 pozitivne kontrolde
K- negativna kontrola

Nakon aktivnosti restrikcionog
enzima Mph1103I:

A1A1: 284 i 37 bp
A2A2: 321 bp
A1A2 321, 284 i 37 bp

Casein gene 321 bp

CASB forward: 5' GCAGAATTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGACCCATGC 3'

CASB reverse: 5' ACGGACTGAGGAGGAAACATGACAGTTGGAGGAAG 3'