

DNA, RNA
SONDY

SONDA, VYUŽITÍ

= Molekula NK sloužící k vyhledání určité sekvence ve vzorku DNA, RNA

➤ Využíváme při tom schopnost jednovláknových molekul nukleových kyselin tvořit hybridní molekuly (*pouze pokud obsahuje komplementární sekvenci*)

➤ Sonda je uměle připravena s přesně zvolenou sekvencí (metodou PCR – namnožení úseku DNA) → vyšetření konkrétní sekvence ve vzorku

→ přítomnost chorobné nebo zdravé alely genu

→ intenzita exprese určitého genu v určité populaci buněk

PODMÍNKY HYBRIDIZACE

- Pouze jednovláknové molekuly
- Pokud jsou sonda nebo vyšetřovaná NK dvojitá, musí být nejdříve denaturovány
- Vznik stabilních H-můstků mezi sondou-NK
- !Vliv teploty a koncentrace iontů!
- Nízké hodnoty → hybridizace i ne přesně komplementárních molekul → H-můstky budou stabilnější

PODMÍNKY HYBRIDIZACE

- Při vysokých hodnotách bude hybridizace probíhat pomaleji nebo vůbec → málo stabilní H-můstky
- Teplota se odvozuje od teploty tání sondy (množství energie nutné k uvolnění H-můstků)
- Teplota je závislá na délce molekuly a sekvenci
- Přísné podmínky zajistí stabilitu jen přesně
- spárovaných hybridních molekul → lze vyvodit závěr o přítomnosti či nepřítomnosti komplementární sekvence ve vyšetřované NK

PROVEDENÍ

- Dvojvláknová molekula → denaturace (vysoká T, denaturační činidlo – močovina, formamid)
- Smísení sondy s vyšetřovanou NK
- Zajištění podmínek pro hybridizaci
- Odmytí nenavázané sondy puftrem, udrží se jen dokonale komplementární sondy

DETEKCE

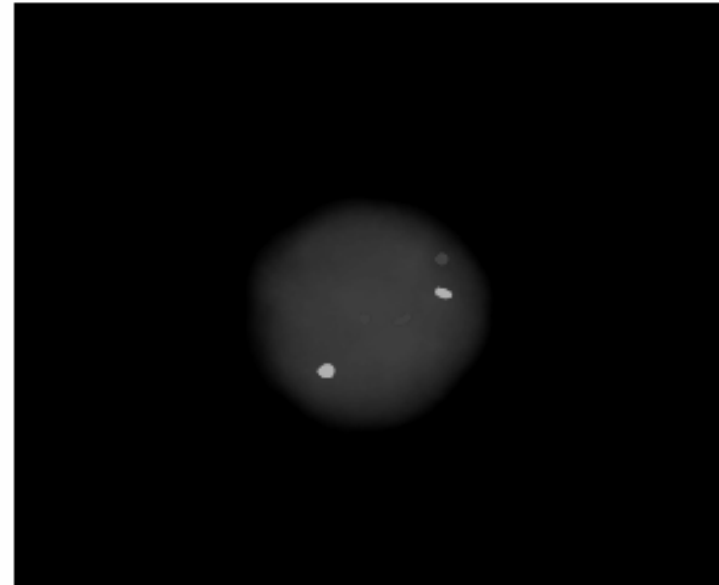
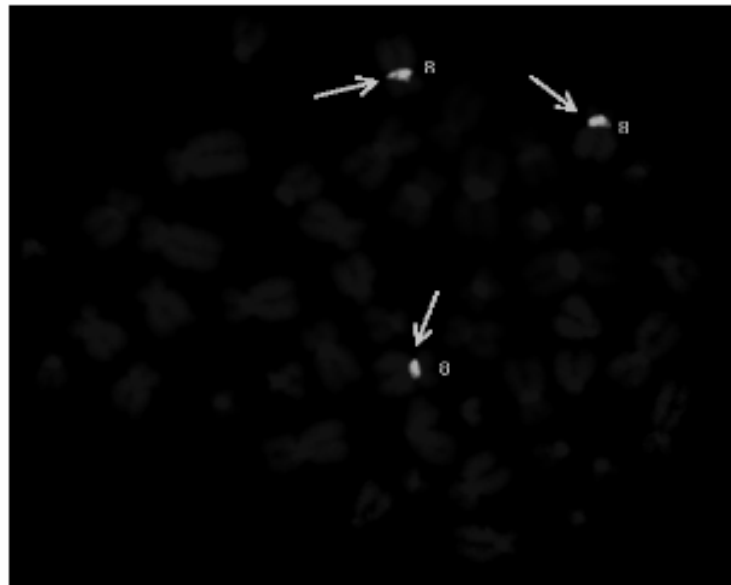
Pro zjištění proběhlé hybridizace musíme mít označeny molekuly použité sondy:

- 1) Radioaktivním P značené nukleotidy → radioaktivita → expozice a vyvolání filmu, vznik tmavých skvrn
- citlivost, jednoduchost
- 2) Použití antigenu → vazba značené protilátky (fluorescenční barvivo, enzym) → chemická reakce
- bez radioaktivity

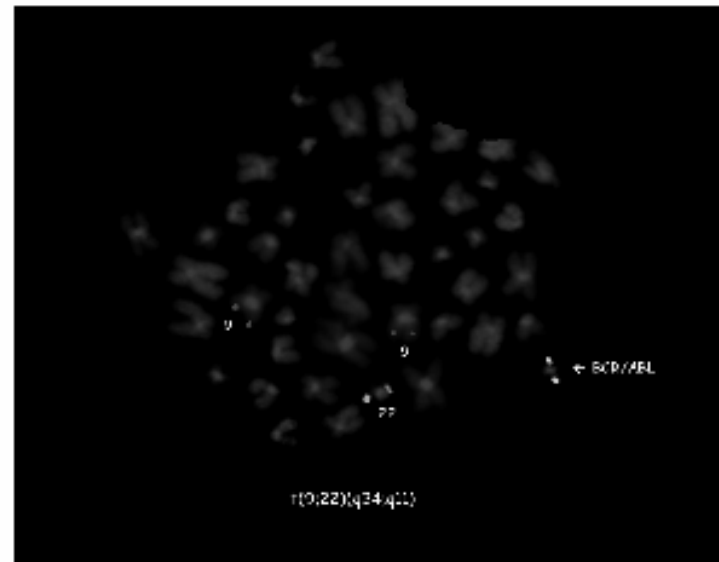
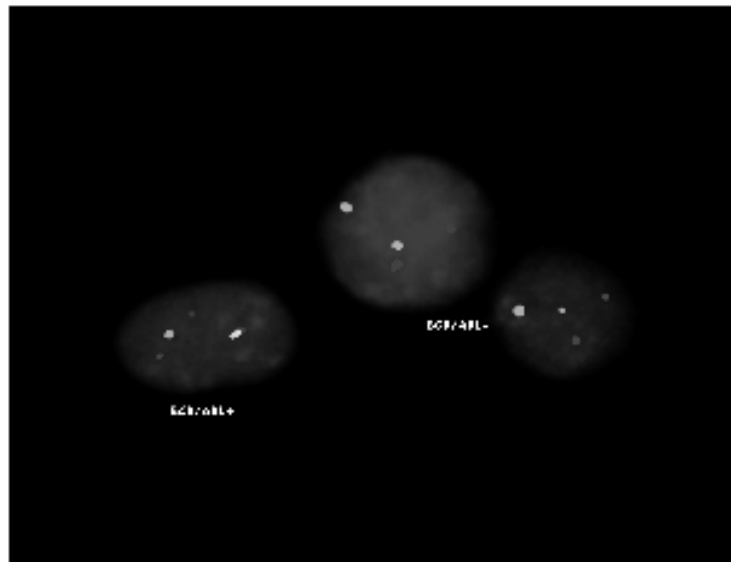
FISH

- Fluoresc. barvívem značené sondy → pozorování fluoresc. mikroskopem
- Hybridizace se sekvencí v centromere chromosomu → určení *genetické aberace* (monosomie, trisomie)

CENTROMERICKÉ SONĎY



LOKUS-SPECIFICKÉ SONĎY



➤ Pro každý chromosom jiné barvivo → pozorování všech chromosomů současně → snadná identifikace, posouzení morfologie, lokalizace genů, organizace chromosomů

MALOVACÍ SONDY

