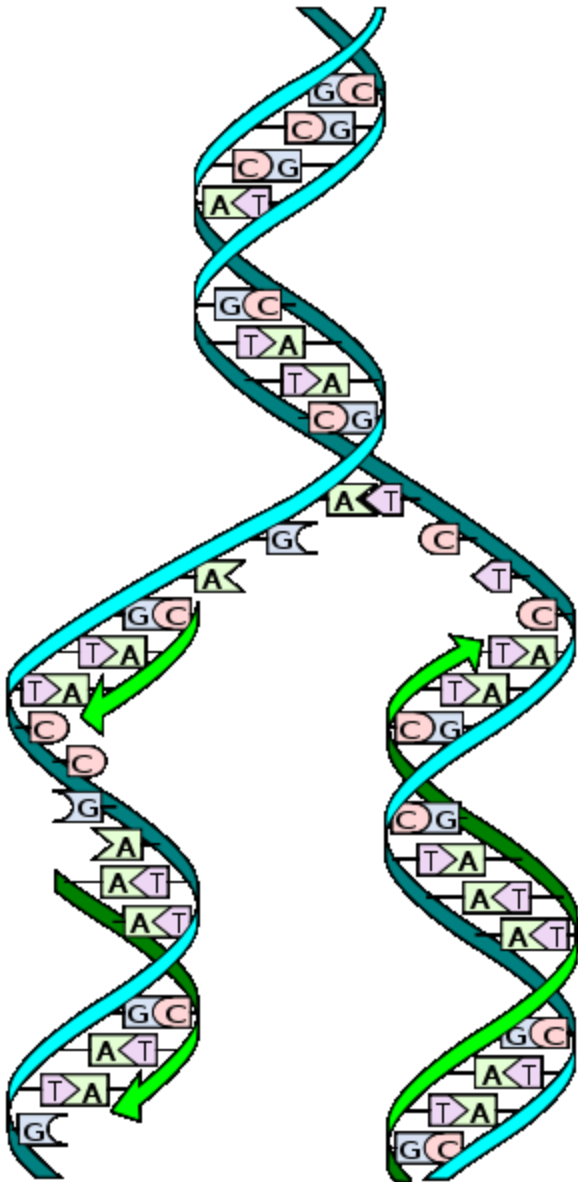


Výšetřovací metody v molekulární biologii

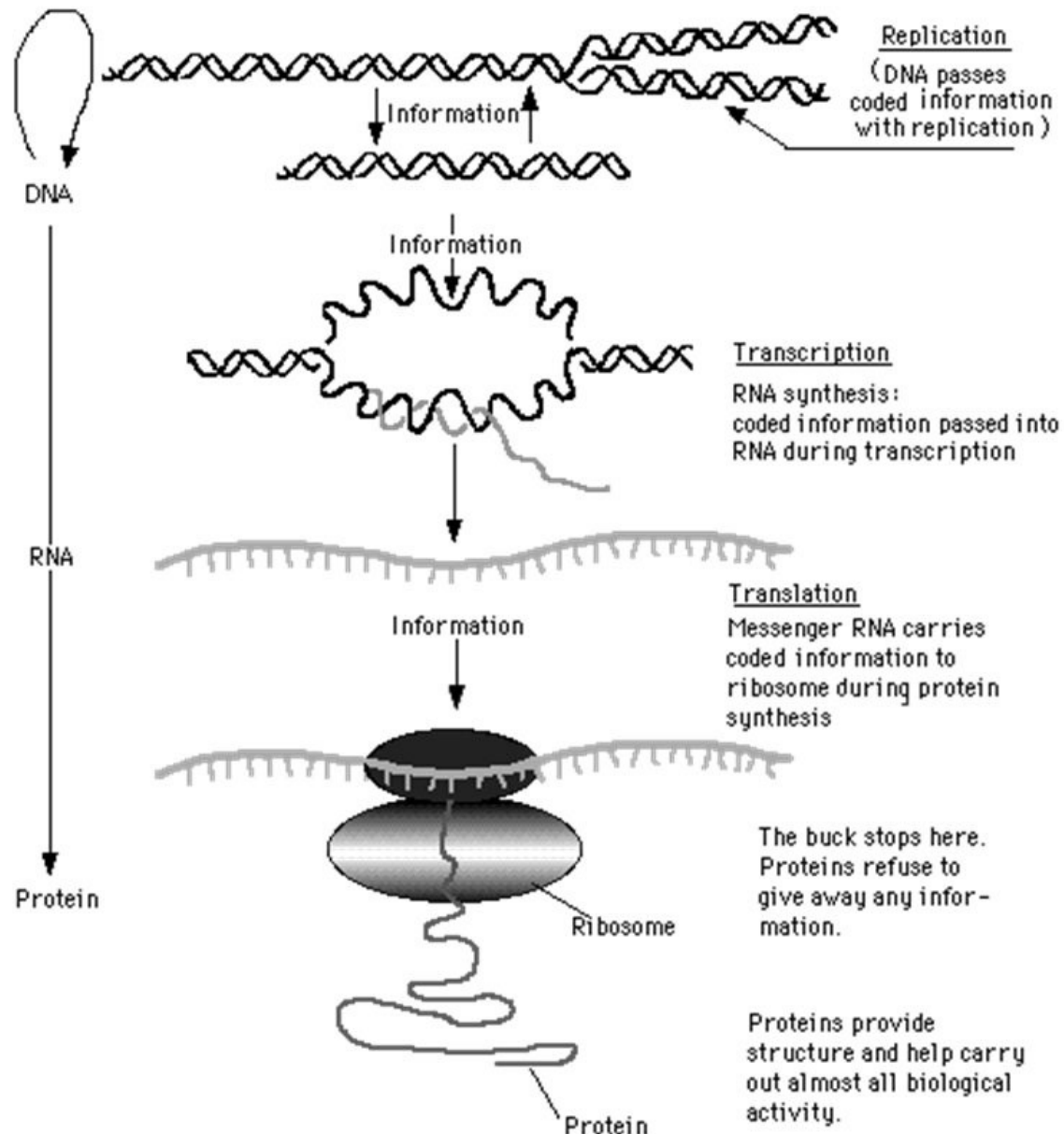
MUDr. Dana Bučková, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie FN Brno



Molekulární biologie

- vědní disciplína zabývající se studiem buněčných biologických procesů na jejich molekulární úrovni
- věnuje se popisu biologických makromolekul a jejich vzájemným funkčním vztahům
- pozornost je především věnována funkci makromolekul podílejících se na dědičnosti organismů, tedy DNA, RNA a proteinům:
$$\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{protein}$$
- integruje ve svém přístupu hlediska biologická, chemická, fyzikální i genetická

The Central Dogma of Molecular Biology



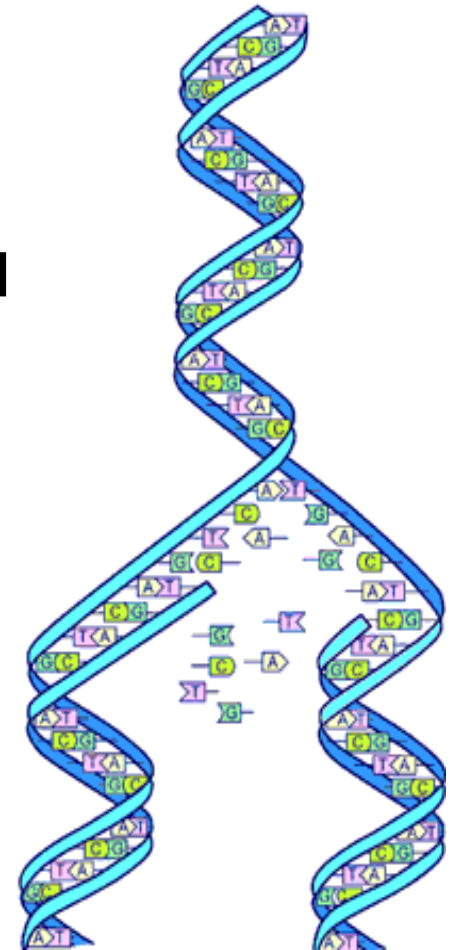
5% DNA

Využití molekulárně biologických metod

- **genetika** - detekce dědičných chorob (fenylketonurie, cystická fibróza aj.)
- **farmakogenetika** (glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, N-acetyltransferáza)
- **genetické inženýrství** - konstrukce genotypů metodami molekulární biochemie
- **přímý průkaz patogenních mikroorganismů** (CMV, HBV, HCV, borrelie atd.)
- **kriminalistika** (identifikace pachatelů i obětí)
- **výzkum** (hledání zodpovědných genů)

Metody

- izolace DNA (RNA)
- amplifikace pomocí PCR
- RFLP - identifikace polymorfizmů
- mapování a sekvenování genomu
- genová exprese mRNA
- Real-time RT-PCR
- hybridizační techniky



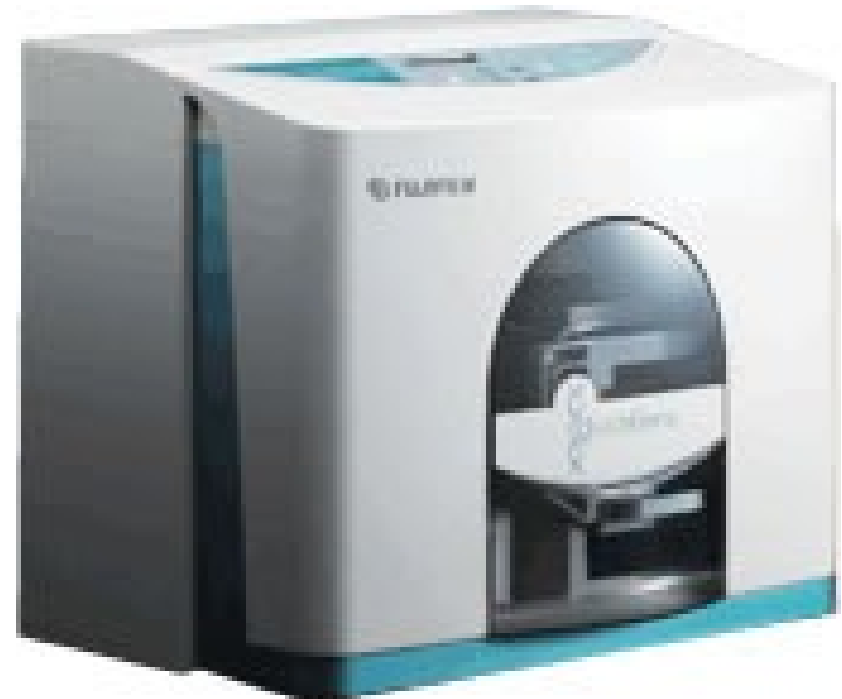
Izolace DNA dle Sambrooka (1989)

- 5ml venózní krve do 0,3 ml 0,5M EDTA, + dest. voda (do 20 ml), zmražení na -20°C min na 48 hod
- rozmražení ve vlažné vodě cca 20 min, centrifugace 10 min při 5000(4°C), opak. promytí dest. vodou a fyziolog. roztokem, opět centrifugace 10 min při 5000(4°C), k promytému sedimentu 0,5 ml fyziolog. roztoku, přidá se FASANO (5M NaCl, 0,5M EDTA, 1M TRIS, 10% sodium dodecylsulfát) a 20 μg proteinázy K, inkubace při 37°C do druhého dne,
- 1,4 ml 5M NaCl a 1,4 ml chloroformu, centrifugace 15 min při 8000(4°C), horní vrstva se odpipetuje a přidá se k ní 4 ml ledového izopropylalkoholu
- vysrážená vlákna DNA se namotají na skleněný háček, opláchnou 70% etanolem a osuší 5 min na vzduchu, pak se rozpustí ve 250 μl TE pufru a nechá se 24 hod při pokojové teplotě za občasného míchání
- zásobní roztok DNA se uchovává při teplotě -20°C

QuickGene – 810 (FUJIFILM)

- systém pro izolaci DNA/RNA
- vysoká výtěžnost, reprodukovatelnost a bezkonkurenční čas trvání izolace
- vysoká kvalita a čistota, vhodná pro PCR a kvantitativní real-time PCR, blotování, SNP, genotypizaci, sekvenování, klonování...

.....cena 280.000 bez DPH + kity



Processing time (8 samples)

DNA Isolation

SAMPLE	TIME
WHOLE BLOOD	6 min
TISSUE	13 min

PLASMID DNA Isolation

SAMPLE	TIME
PLASMID	6 min

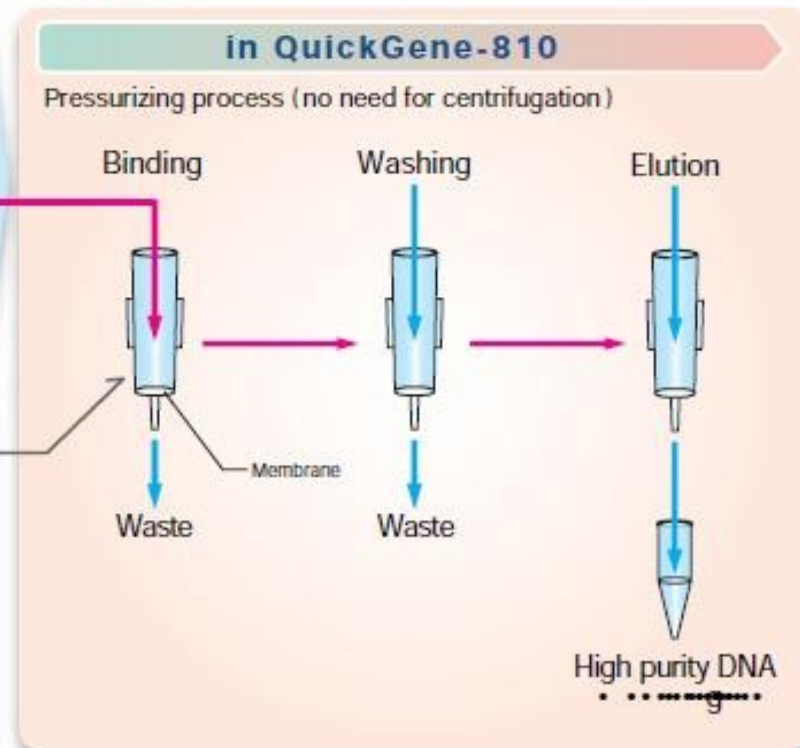
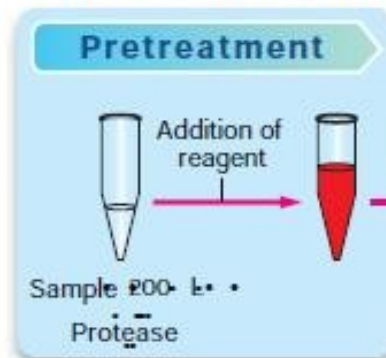
RNA Isolation

SAMPLE	TIME
TISSUE	15 min
CULTURED CELL (adherent / floating)	13 min
CULTURED CELL (6/10cm dish)	16 min
BLOOD CELL	20 min

High purity and high yield without centrifugation

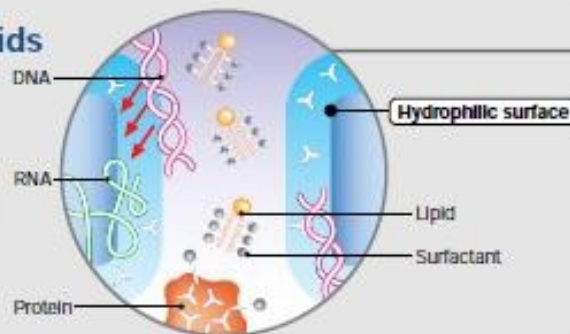
Three pressurizing stages – binding, washing and elution – occur automatically in the unit. Because of the outstanding adsorptive and desorptive properties of the membrane, high-purity nucleic acid can be obtained easily at low pressure without any complex processes such as centrifugation.

Isolation of DNA from whole blood



Adsorption of nucleic acids

Owing to their hydrophilic properties, nucleic acids get adsorbed onto the membrane, while proteins and lipids, which are comparatively hydrophobic, tend to seep out of the membrane.



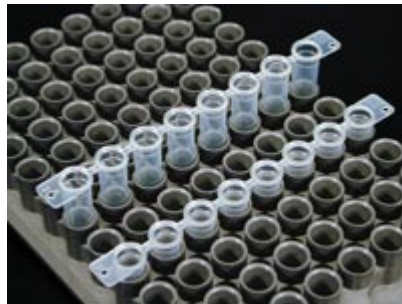
PCR (polymerase chain reaction)

- umožňuje zmnožit (amplifikovat) zvolený úsek DNA teoreticky i z jedné molekuly na měřitelné jednotky (ng a μg)
- namnožit úsek DNA můžeme jen tehdy, když známe pořadí nukleotidů na obou koncích tohoto úseku → primery (20-30 bazí)
- byla užita Taq polymeráza, izolovaná z druhu bakterie *Thermus aquaticus* (teplé prameny v Yellow-stone National Park) a její teplotní optimum je $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, dnes se běžně užívá rekombinantní Taq polymeráza

Master mix



- umožňuje provádění PCR
- musí obsahovat pufr, nukleotidy (dNTP), primery, polymerázu a H_2O (pro PCR), Mg^{2+}
- DNA pak doplníme do každé zkumavky zvlášť
- mikrozkušavka PCR 0,2 ml s víčkem



Průběh PCR

- 1. krok: DENATURACE** (denaturation)
 - při 94-95°C, 15 sec až 1 min
- 2. krok: VAZBA PRIMERŮ** (annealing)
 - obvykle 50-65°C, desítky sec až minuta
- 3. krok: AMPLIFIKACE** (extension)
 - obvykle 70-74°C, malé 20-45 sec, velké (desítky kb) až 15 min

Přístroje thermocycler (termocykler, cykler) již od 99.000 bez DPH



-174C/G polymorfizmus v IL-6

- 9,4 μl H₂O pro PCR
- 1,5 μl Tris-HCl pufru
- 1,5 μl MgCl₂
- 0,6 μl od každého primeru (P1, P2)
- 0,3 μl dNTP
- 0,1 μl Taq polymerázy
- 2,0 μl DNA

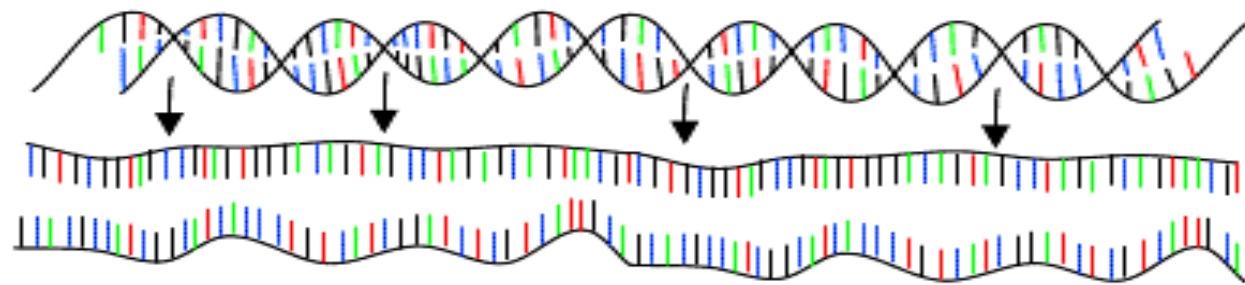
Celkový objem 16 μl

- denaturace DNA 95°C/2min
- 35 cyklů: denaturace 94°C/45s, anealing 55°C/25s, extenze 72°C/45s
- finální extenze 72°C/5min
- chlazení



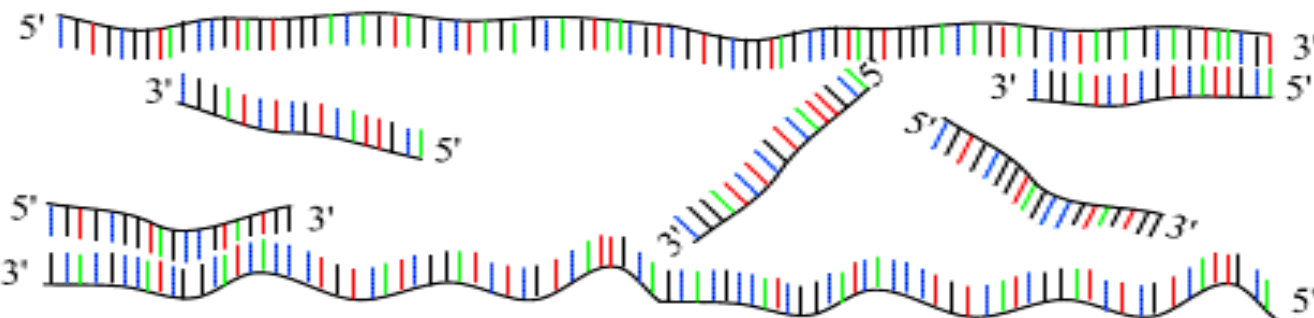
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

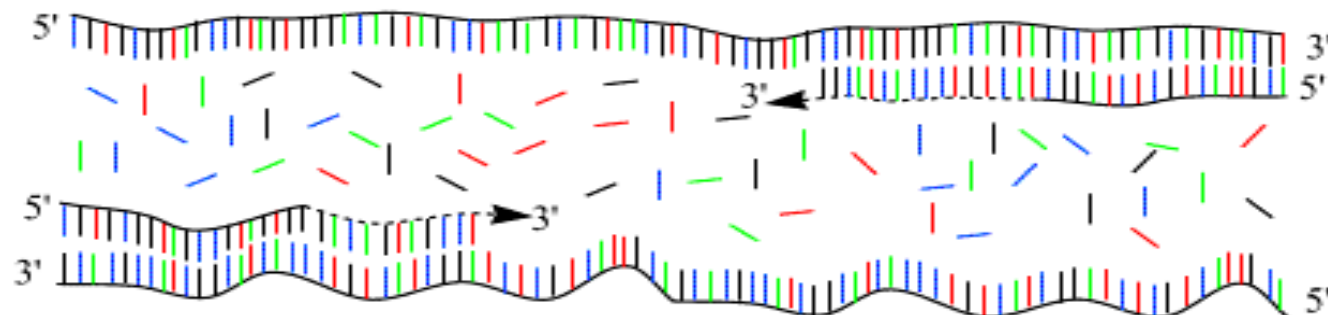
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

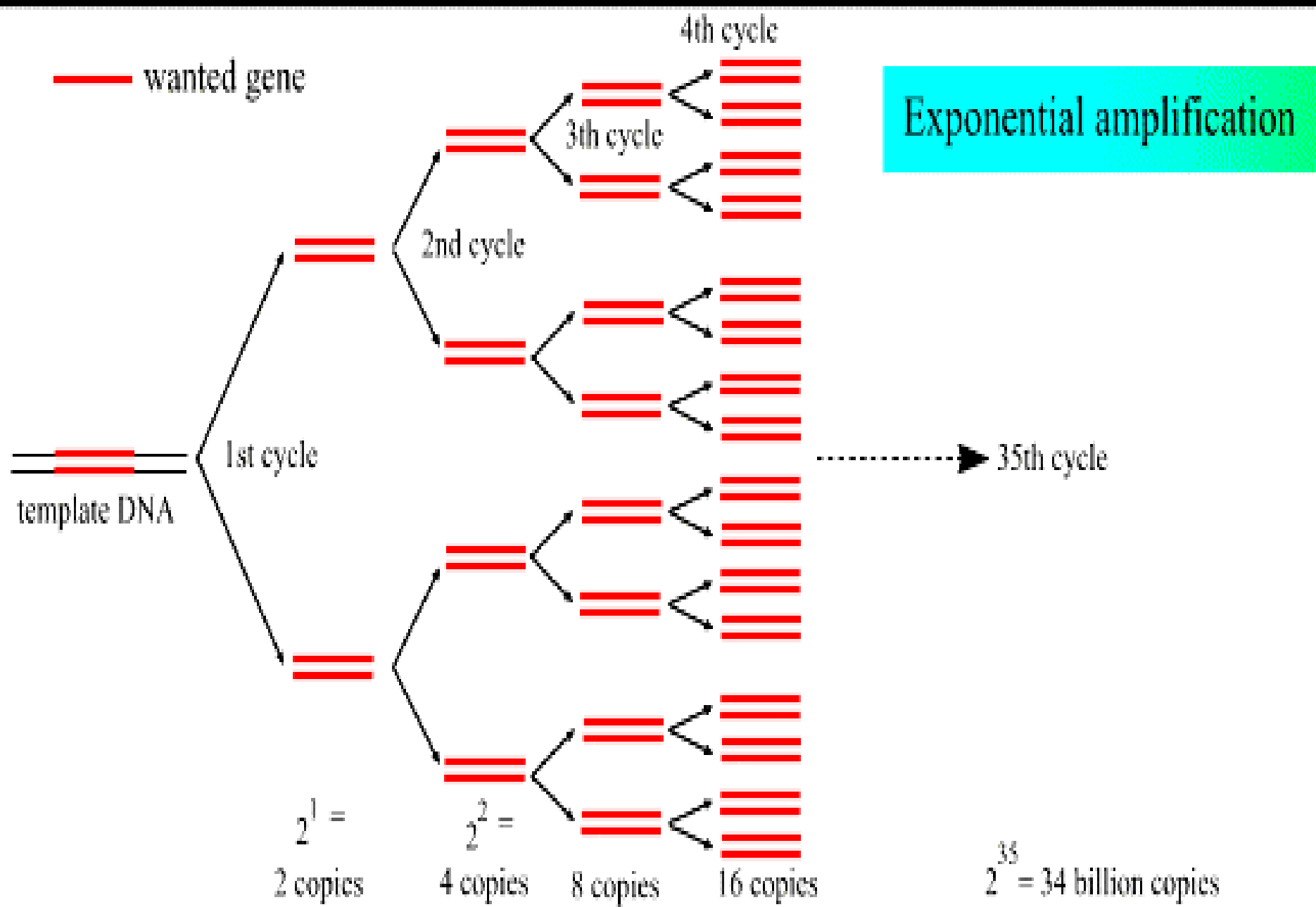
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

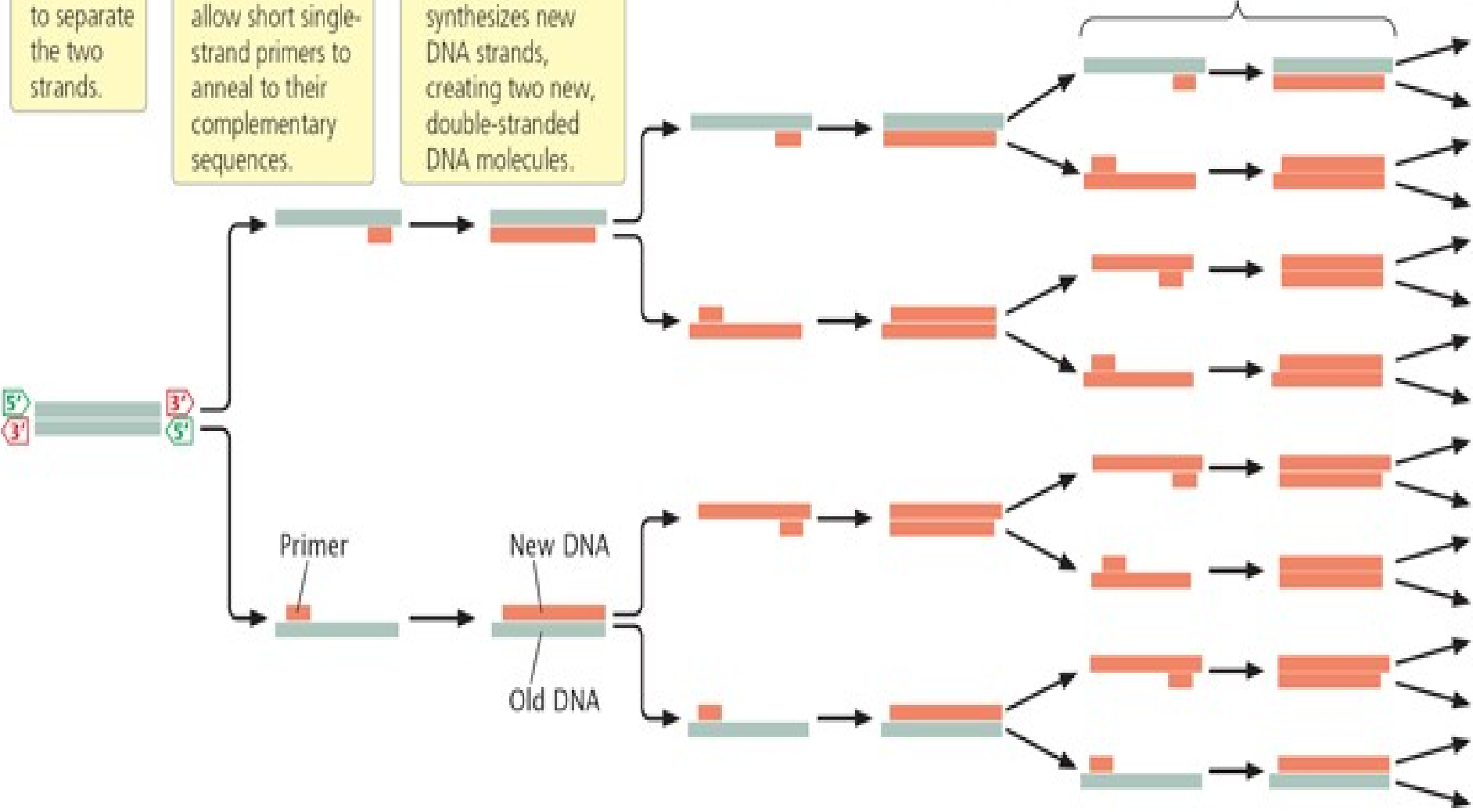


1 DNA is heated to 90°-100°C to separate the two strands.

2 The DNA is quickly cooled to 30°-65°C to allow short single-strand primers to anneal to their complementary sequences.

3 The solution is heated to 60°-70°C; DNA polymerase synthesizes new DNA strands, creating two new, double-stranded DNA molecules.

The entire cycle is repeated. Each time the cycle is repeated, the amount of target DNA doubles.



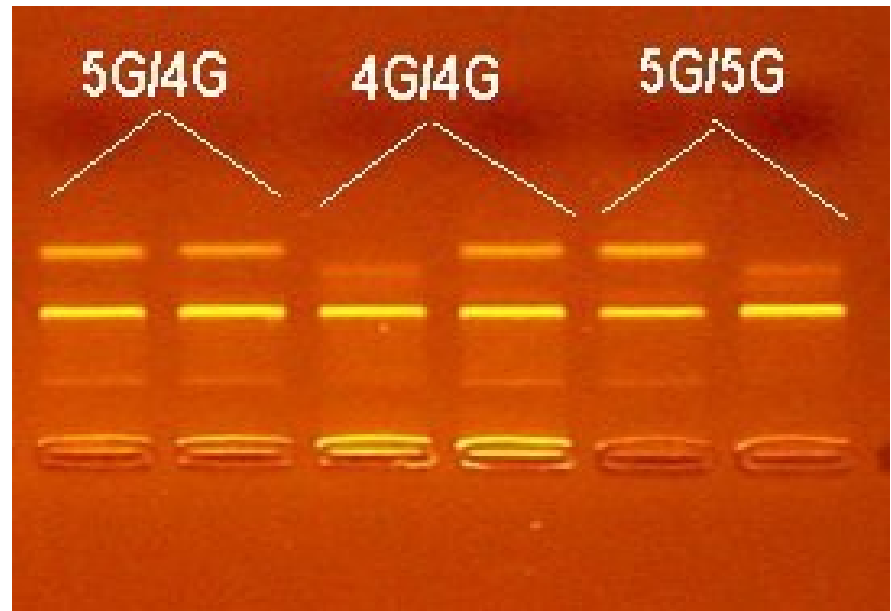






Alelicky specifická PCR

- detekce bodových mutací, malých delecí
- alelicky specifické oligonukleotidy
- 3 primery, 2 alternativní verze jednoho konce (mutovaná/nemutovaná), druhý konec stabilní
- mutace je kryta primerem



Analýza PCR produktu

- Hybridizace
- Sekvenování
- RFLP
(Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RT-PCR (Real Time RT-PCR)
RNA => cDNA

Cobas Amplicor®

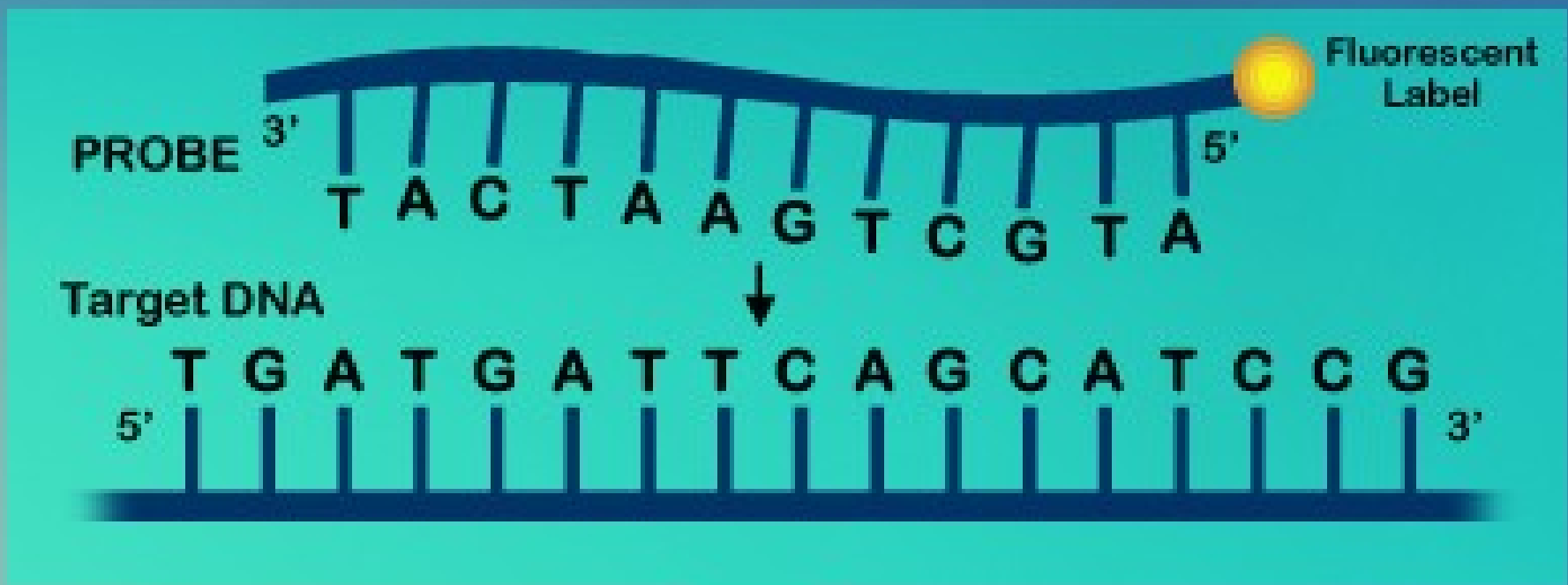
- provádí amplifikace a detekce v jednom integrovaném systému
- výsledky k dispozici během 4 - 6 hodin
- HCV, HBV, HIV, CMV, *C.trachomatis*,
N.gonorrhoeae, *M.tuberculosis*

Interní kontrola eliminuje
falešně negativní výsledky

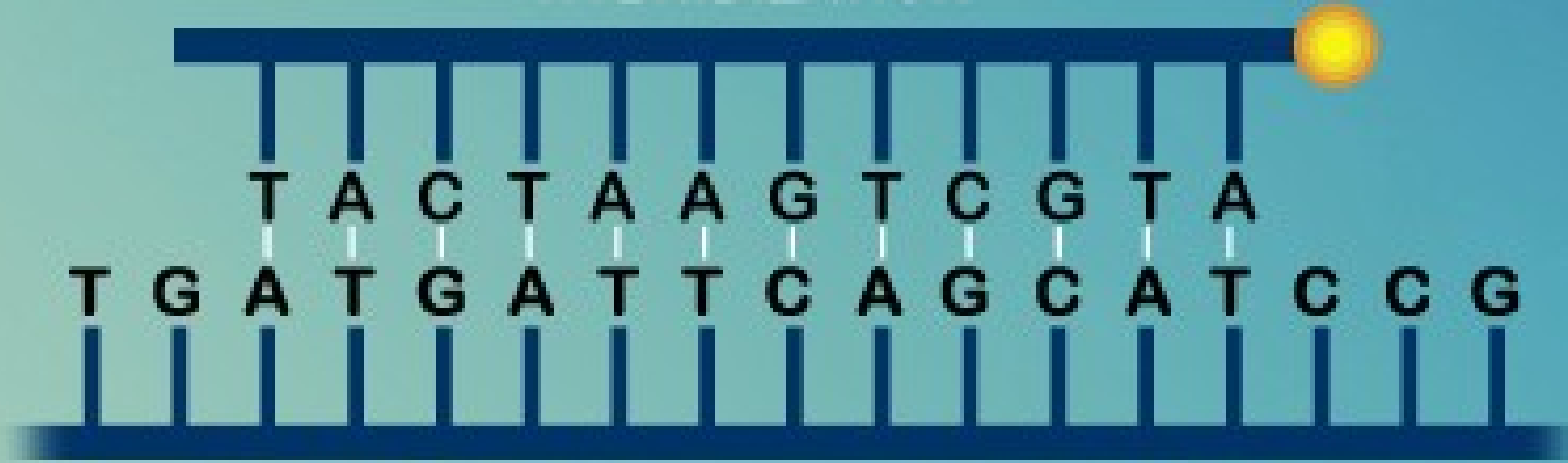


Hybridizační techniky

- spojování dvou jednořetězcových molekul nukleových kyselin za tvorby hybridu:
DNA x DNA, DNA x RNA, RNA x RNA
- obě vlákna jsou v roztoku nebo je jedna hybridizující složka vázána na nosič
- hybridizace NK zakotvených na filtrech (nitrocelulózoové a nylonové) se značenou sondou
- sondu označujeme molekulu nukleové kyseliny, kterou použijeme k vyhledání určité sekvence ve vzorku testované DNA nebo RNA



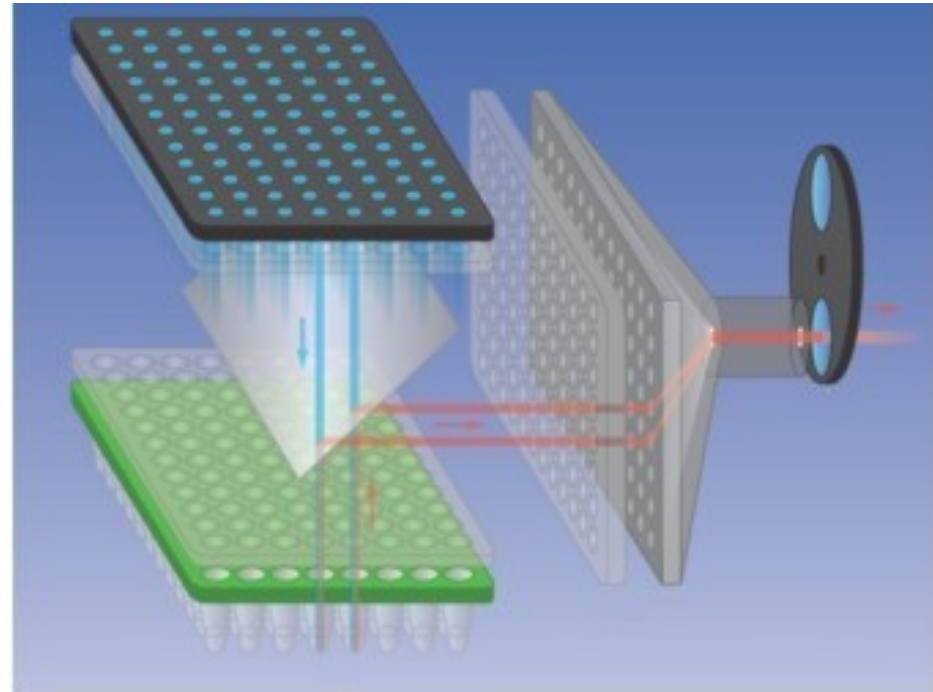
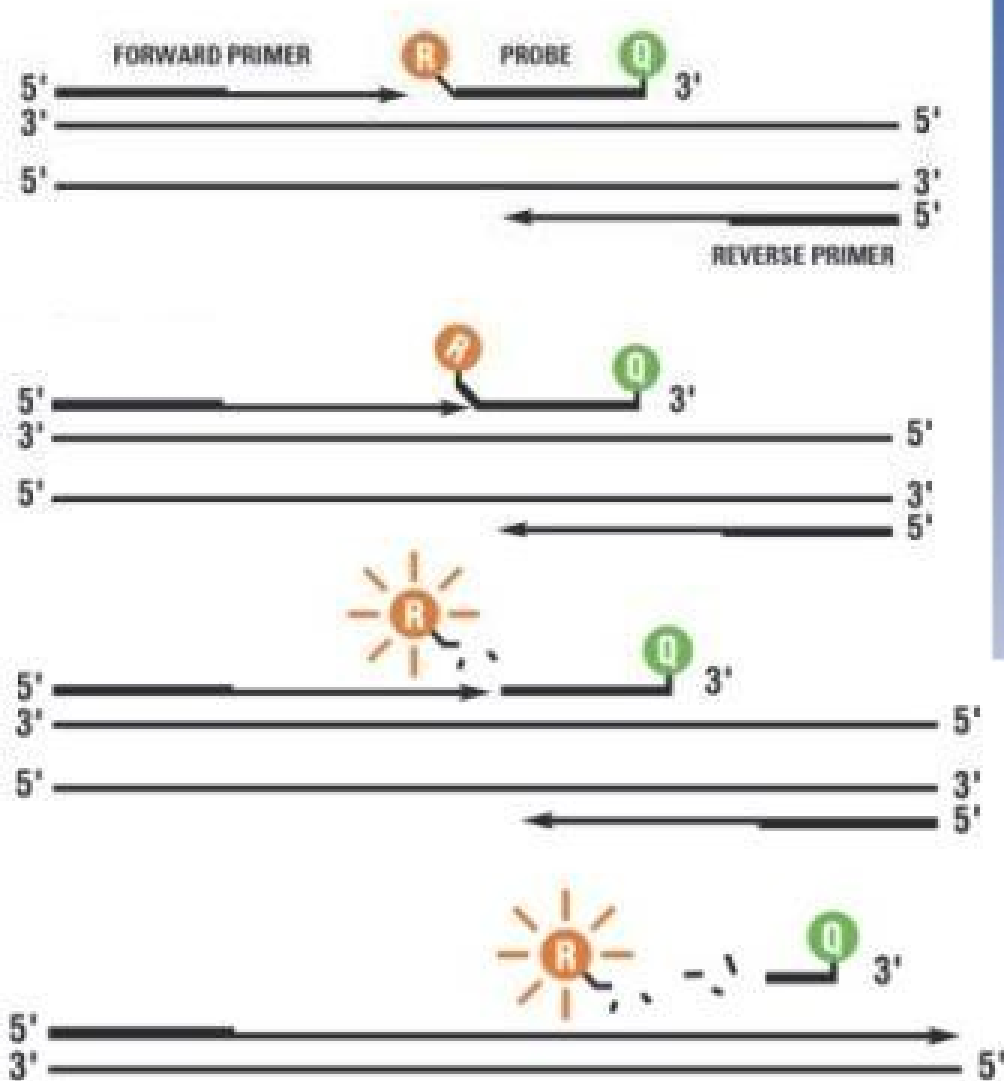
HYBRIDIZATION



Kvantitativní PCR v reálném čase

- sondy označené fluorescenčním barvivem
- hybridizují s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery (v oblasti mezi nimi)
- DNA-polymeráza má také exonukleázovou aktivitu - odbourává nasedlou sondu
- schopnost fluorescence až po uvolnění do roztoku - v průběhu PCR je ozařován vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva
- reverzní transkripce - PCR (Real-time RT PCR)
- přesné množství vstupní templátové DNA

Real-time RT PCR

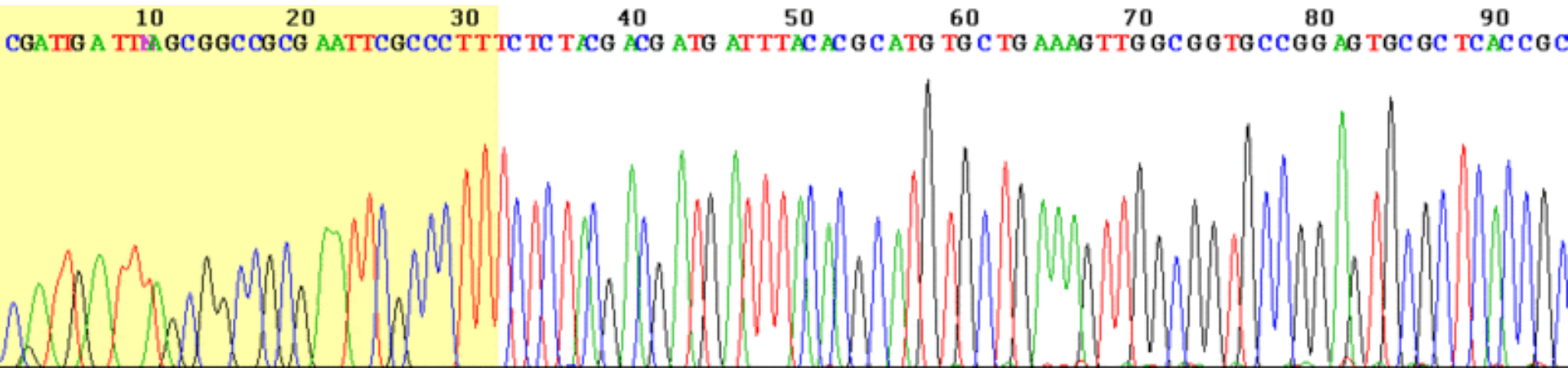


Minimální reziduální choroba (MRD)

- přítomnost metastáz u pacienta s nádorovým onemocněním
- zobrazovací techniky (např. CT, magnetická rezonance, ultrazvuk) a mikroskopické metody nemají dostatečnou citlivost
- detekce izolovaných nádorových buněk v krvi, kostní dřeni či v lymfatickém systému
- pod limitem standardních vyšetřovacích metod (imunohistochemie, průtoková cytometrie aj.) → Real-time RT PCR

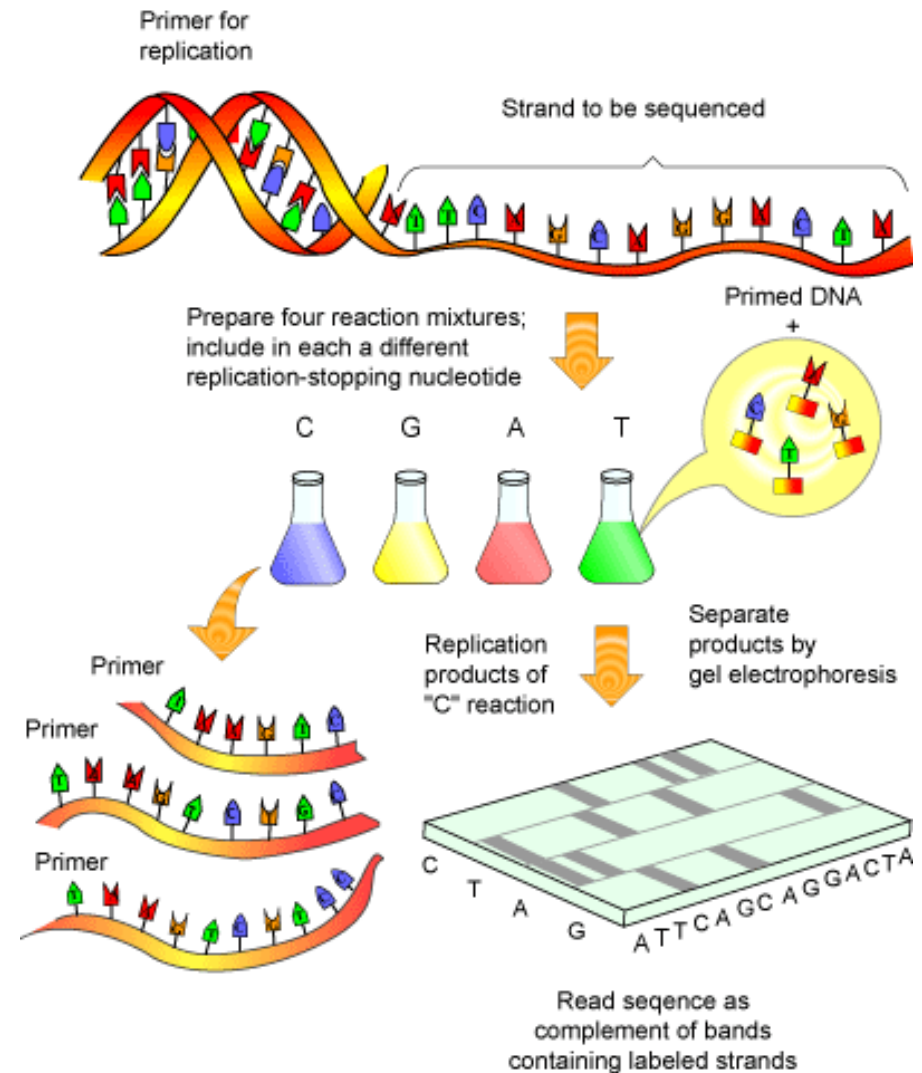
Sekvenování (sekvenace, sekvencování)

- zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA (jádro, mitochondrie, plazmidy)
- od 70. let 20. století je používána metoda Fredericka Sanger, která využívá dideoxynukleotidů a následné elektroforézy
- projekt čtení lidského genomu

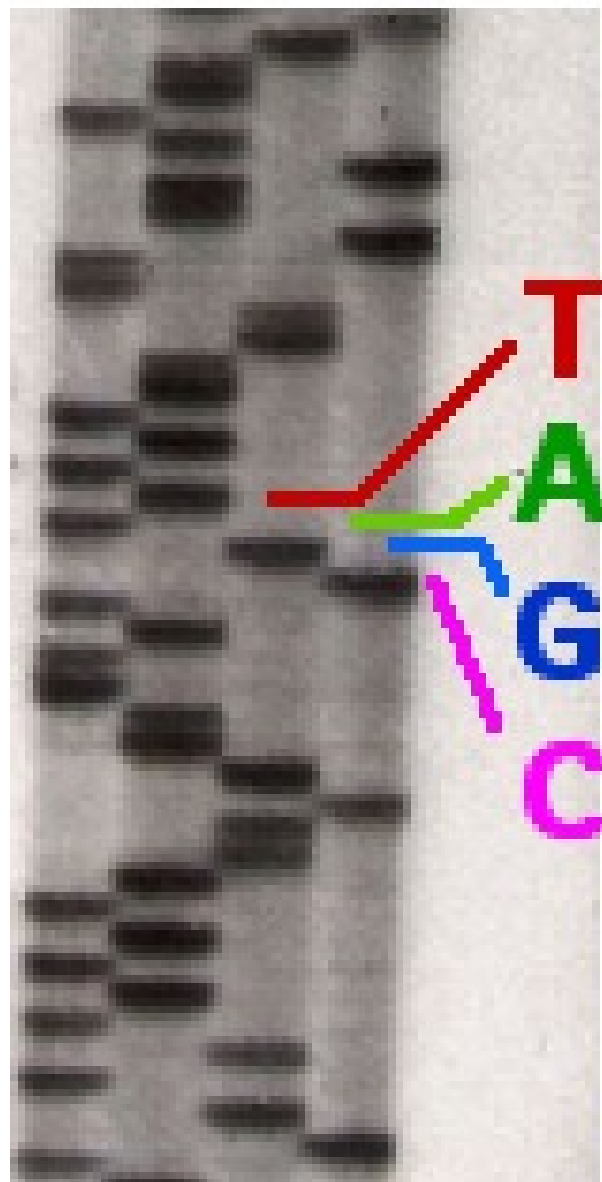


Sangerova metoda

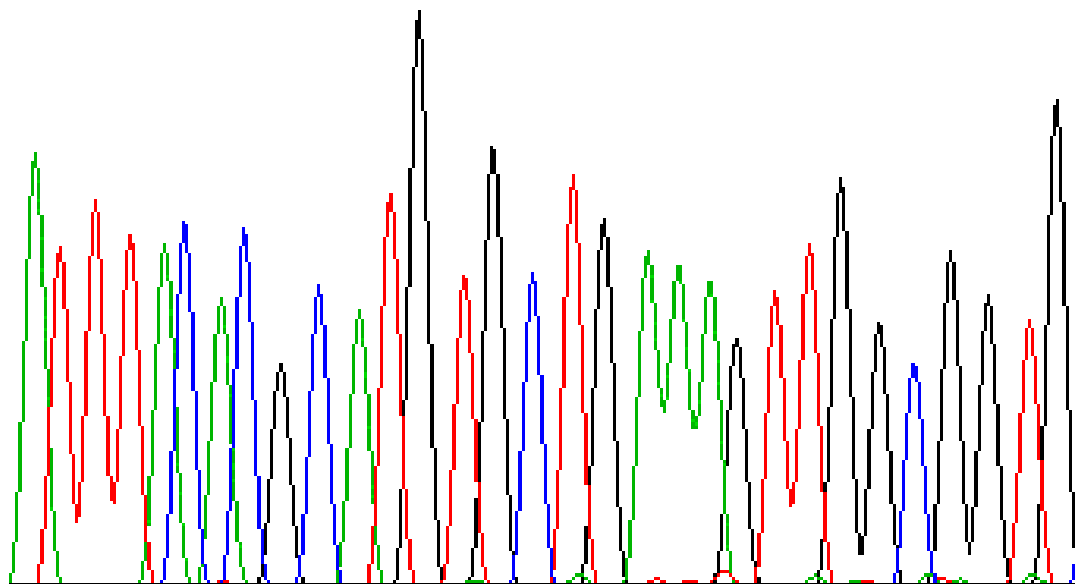
- sekvence, primer, DNA polymerázu, dNTP, jeden ze čtyř dideoxynukleotidů
- začlení se do replikující se DNA, ale zastaví elongaci řetězce - nemá OH skupinu
- každý dideoxynukleotid se vloží do jedné ze čtyř nádob



A T G C

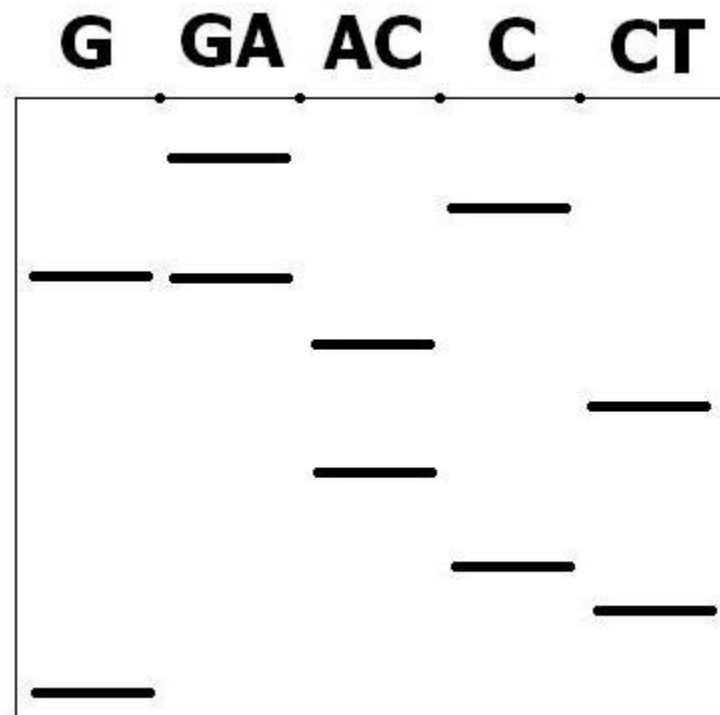


ATTTACACGCATG TGC TG AAAGTTGGC GGTG



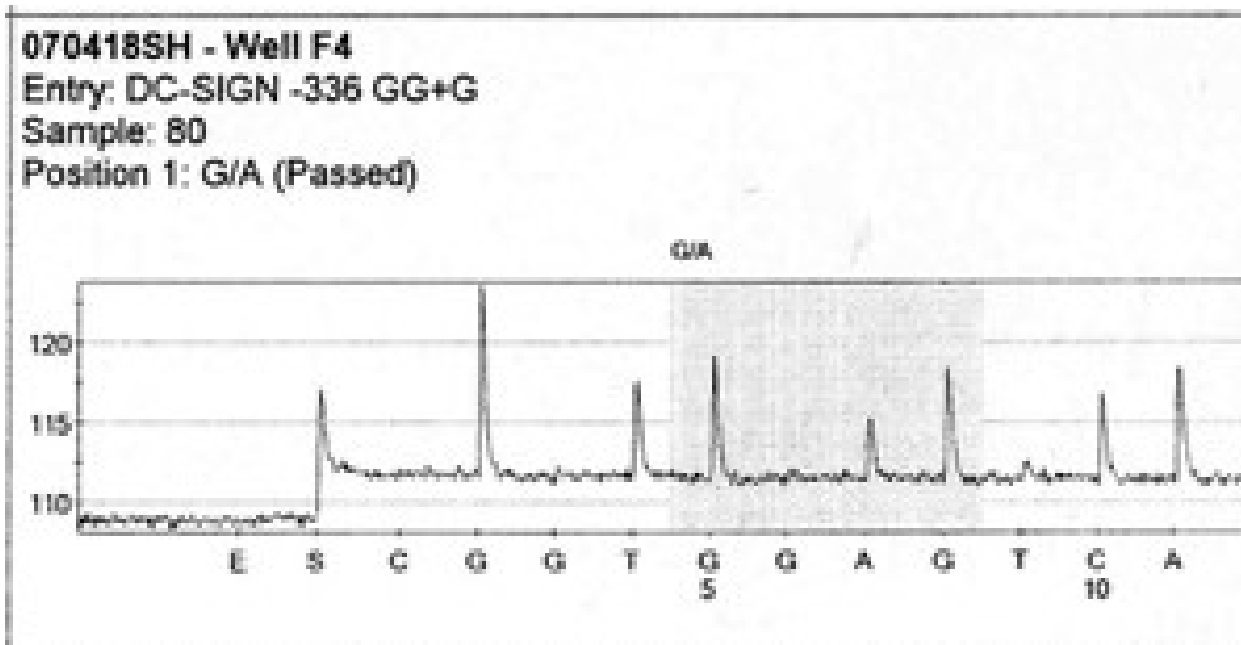
Maxam-Gilbertova metoda

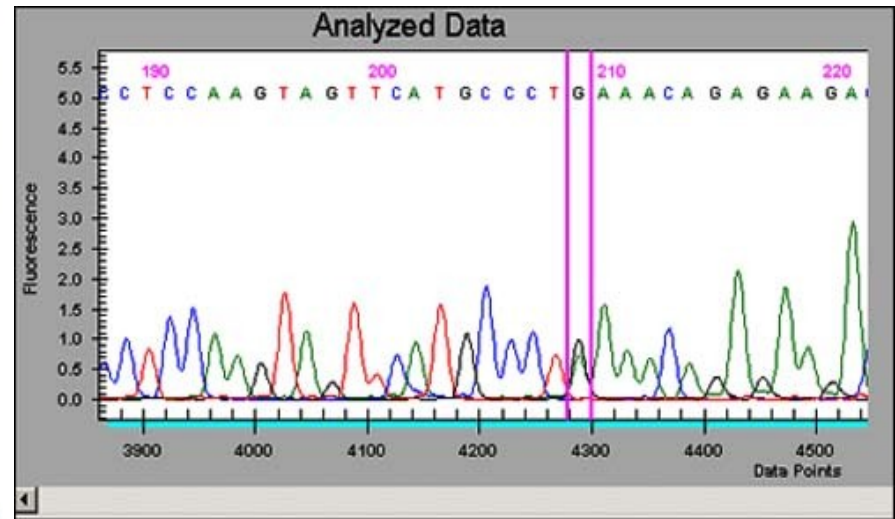
- DNA na 5' konci radioaktivně označena fosforem
- vystavena chemikáliím, které specificky štípají sekvenci DNA v místě, kde rozpoznají jistou nukleovou bázi
- do polyakrylamidového gelu a spustí se elektroforéza
- sekvence DNA je GTCATAGCA (čte se zespondu)



Pyrosekvenování

- novější metoda, vznikla v roce 1996
- mimo DNA polymerázy ještě ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza, adenosinfosulfát a luciferin
- postupně vkládány nukleotidy různých typů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) – přidáním se z uvolní světelné záření... uvolnění pyrofosfátu z nukleotidu a spotřeba vzniklého ATP luciferázou k oxidaci luciferinu

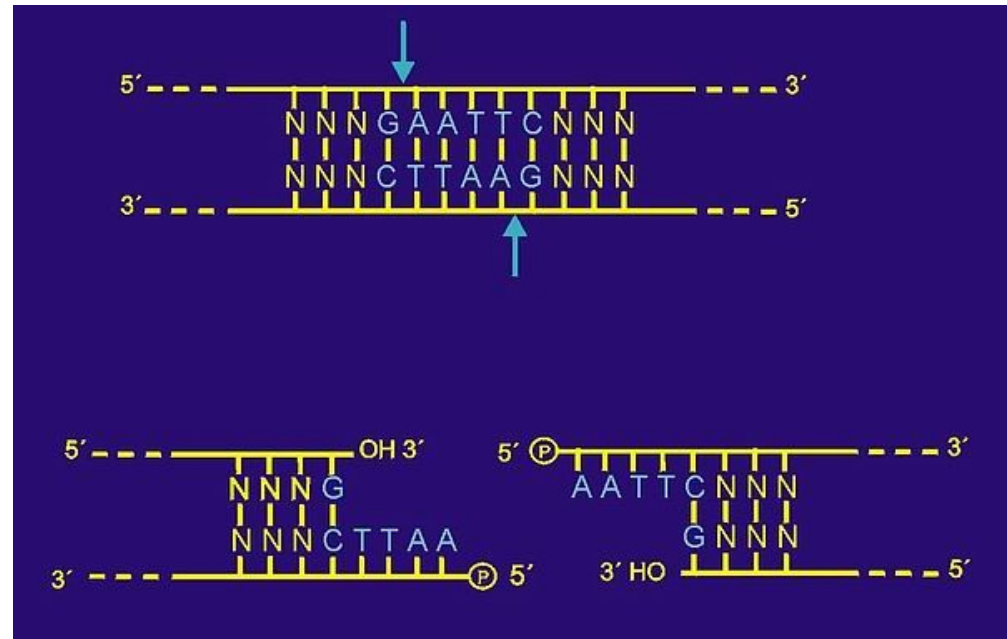
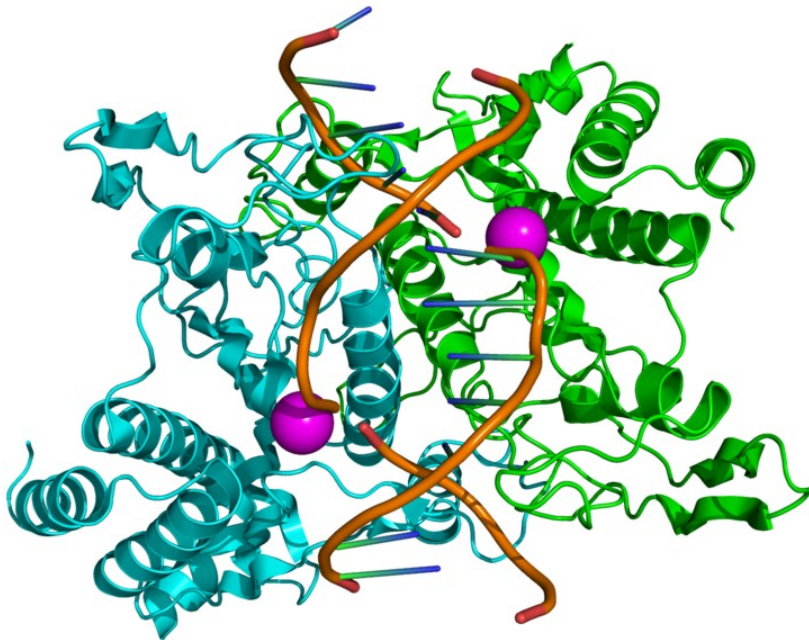




Sekvenator - ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer

RFLP (délkový polymorfizmus restričních fragmentů)

- bakteriálních endonukleázy („restriktázy“), které štěpí DNA, v přesně definované sekvenci nukleotidů, např. bakterie *Escherichia coli* - enzym s názvem EcoRI



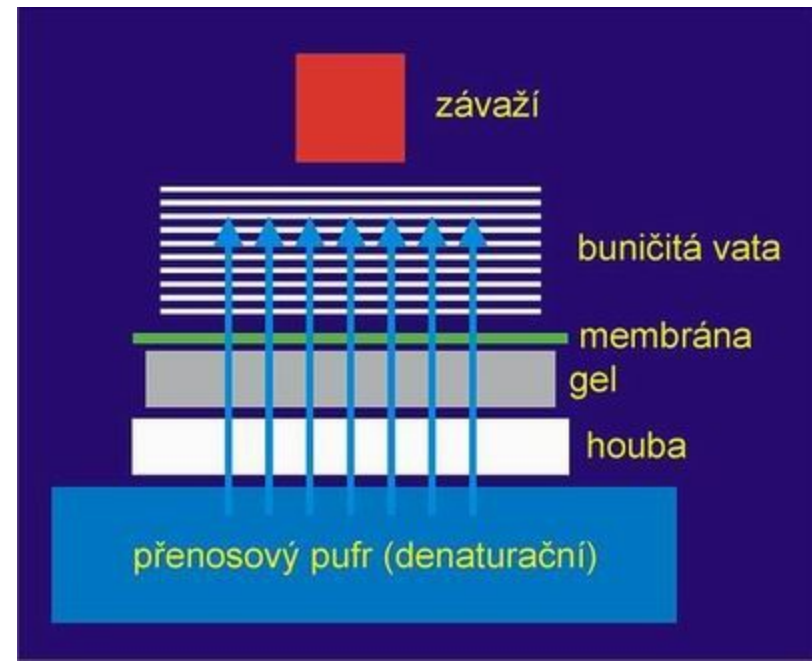
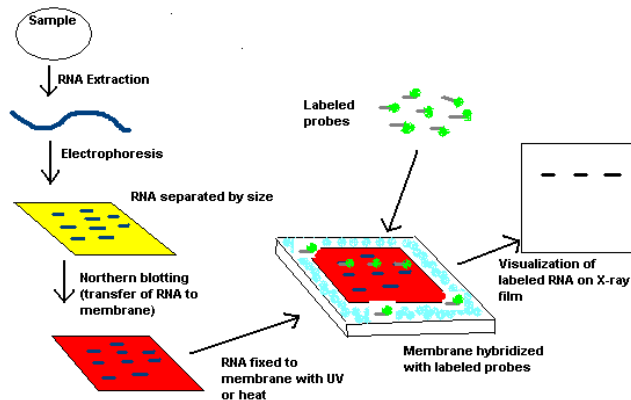
Restrikční endonukleázy

- přirozeně se vyskytují v bakteriích
- chrání je před infikujícími bakteriofágy
- enzym „rozstříhá“ DNA fága, když vnikne do buňky
- bakteriální DNA je chráněna metylací sekvencí, které enzym rozeznává
- typicky rozeznávají úseky o 4-6 bp
- známe asi 300-400 různých endonukleáz

Southernův blotting

základní princip metody:

- štěpení celkové DNA na fragmenty pomocí restričních endonukleáz
- elektroforetické rozdělení fragmentů dle délky
- přenos fragmentů na membránu (nylon, nitrocelulóza)
- denaturace DNA
- hybridizace se značenou sondou
- rtg film, expozice



Restrikční analýza -573G/C v IL-6

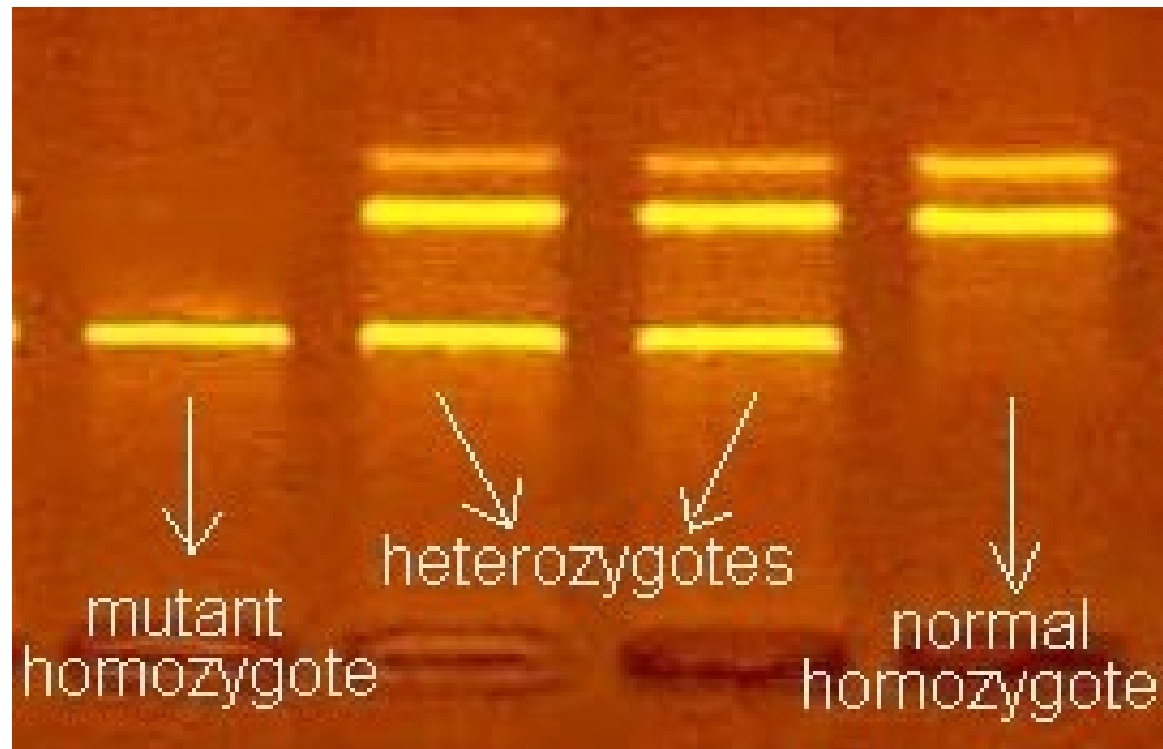
PCR produkt 543bp 12 μ l

- voda 2,7 μ l
- pufr 2,0 μ l
- BsrBI 0,3 μ l

inkubace při 37°C po dobu 4 hod

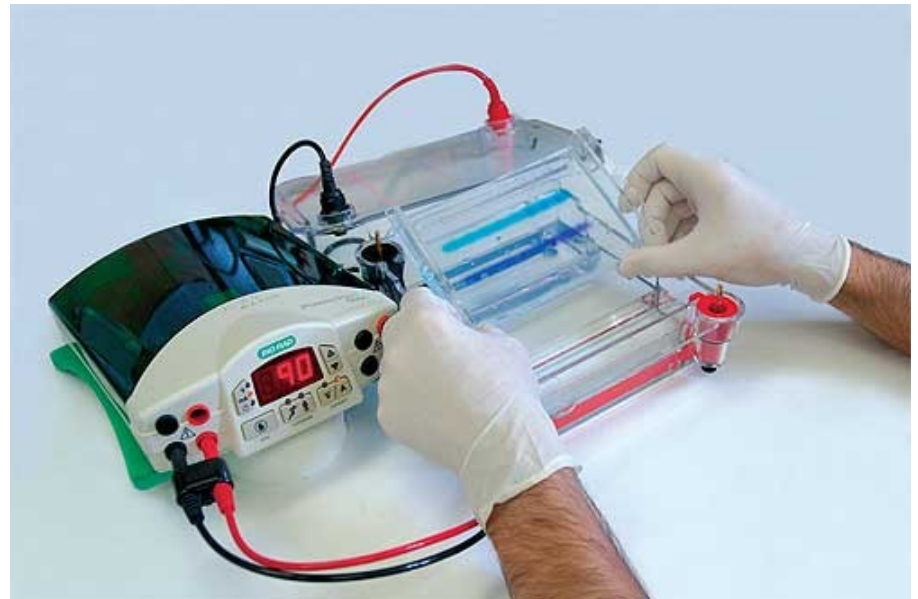
výsledné fragmenty: 274 a 269 bp (G alela)
543 bp (C alela)

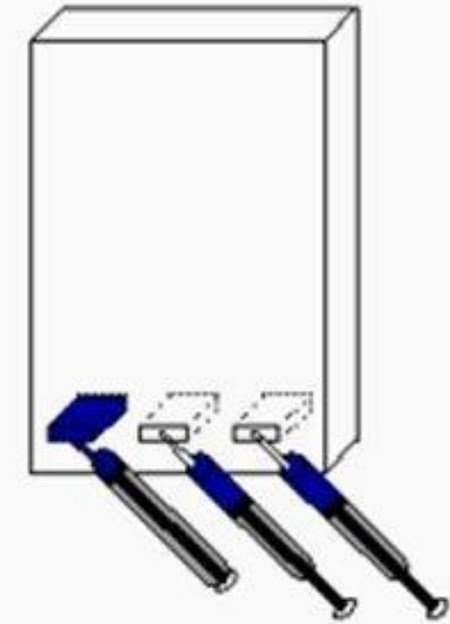
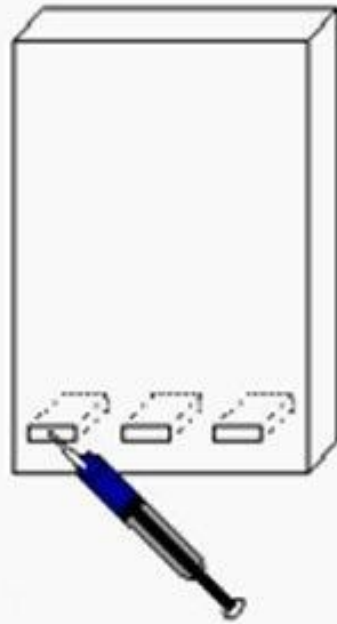
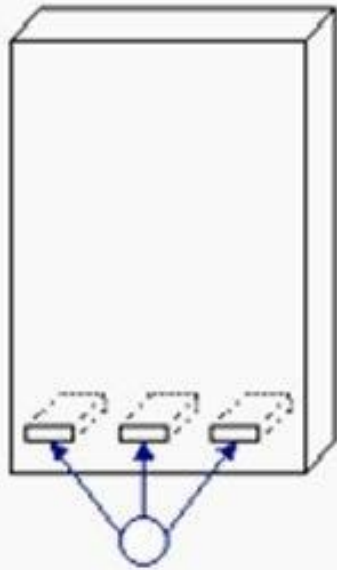
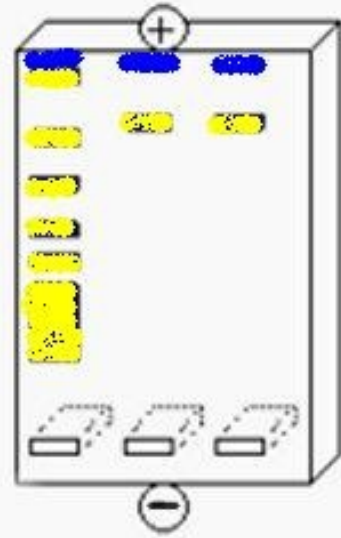
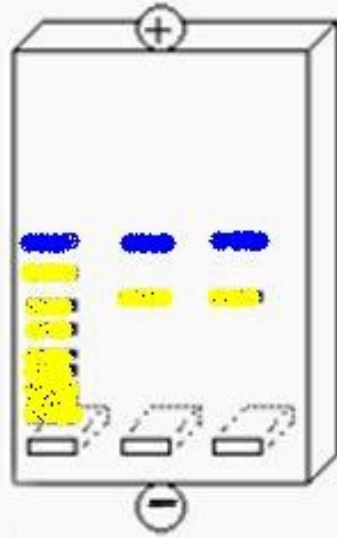
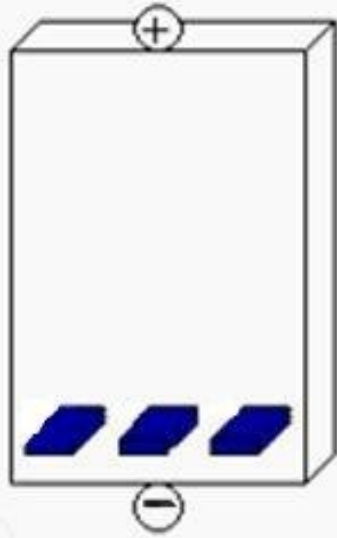
ELFO ve 2% agarózovém gelu



Elektroforéza fragmentů DNA

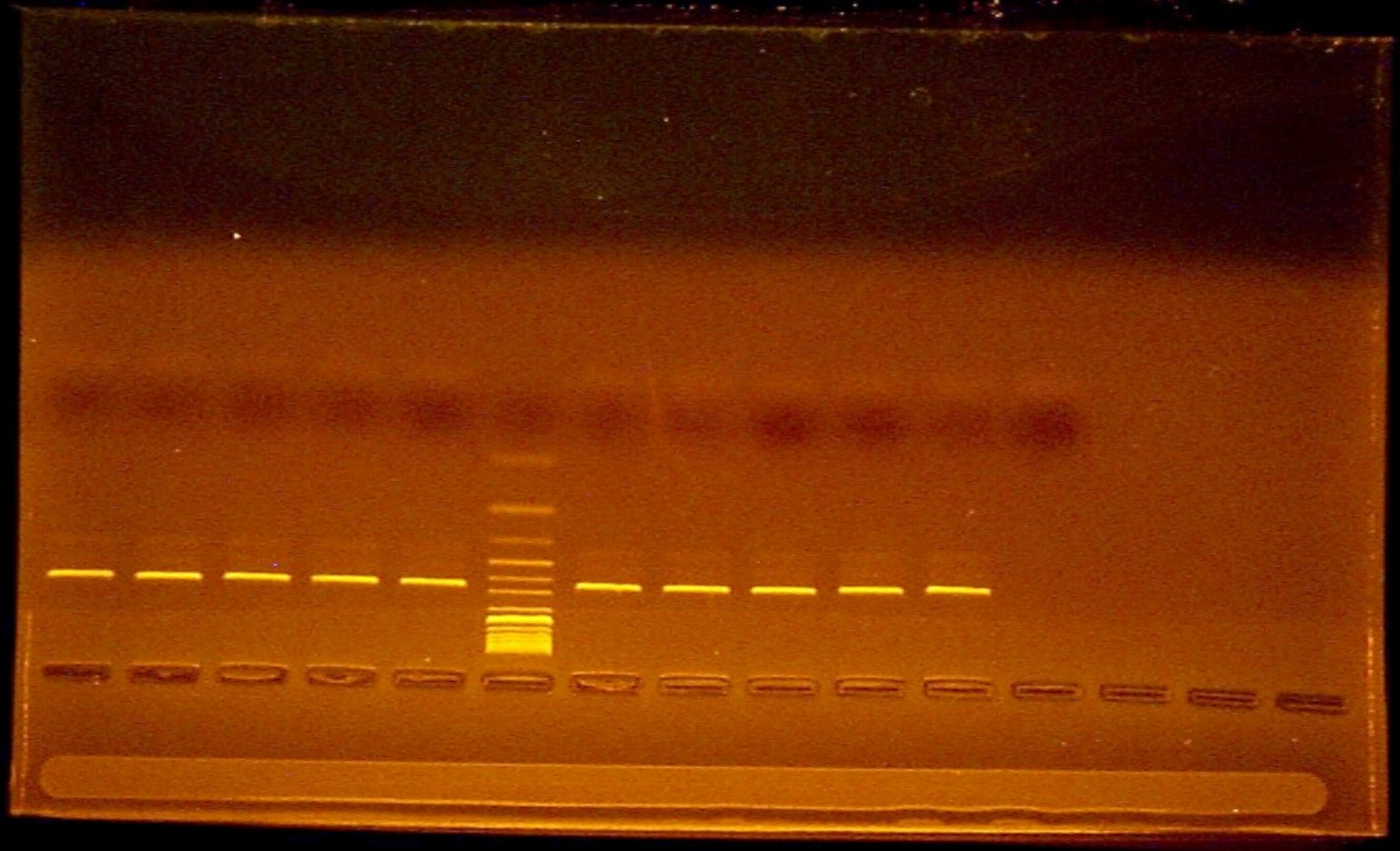
- vkládací pufry - roztoky o vysoké hustotě usnadní vkládání vzorků DNA do jamek
- manipulaci se vzorky umožní barviva - pohyblivost při elfo jako DNA (např. bromofenolová modř)
- záporný náboj - pohybují v elektrickém poli od katody k anodě
- vizualizace pomocí ethidium bromidu popř. jiných barviv (*SYBRGreenu*, *GelGreen* a *GelRed*)

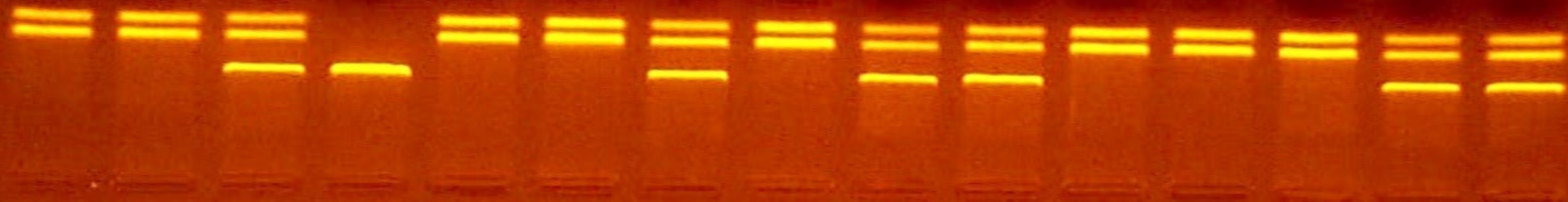
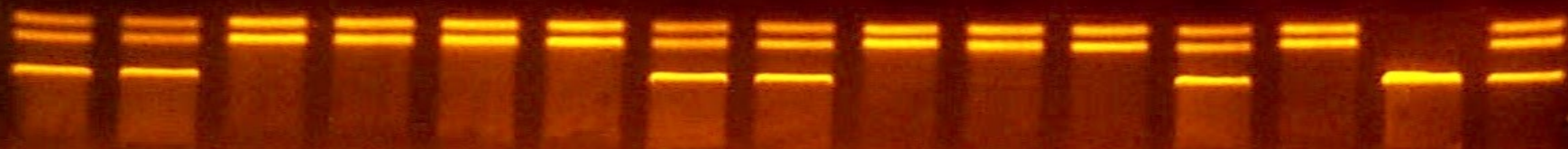


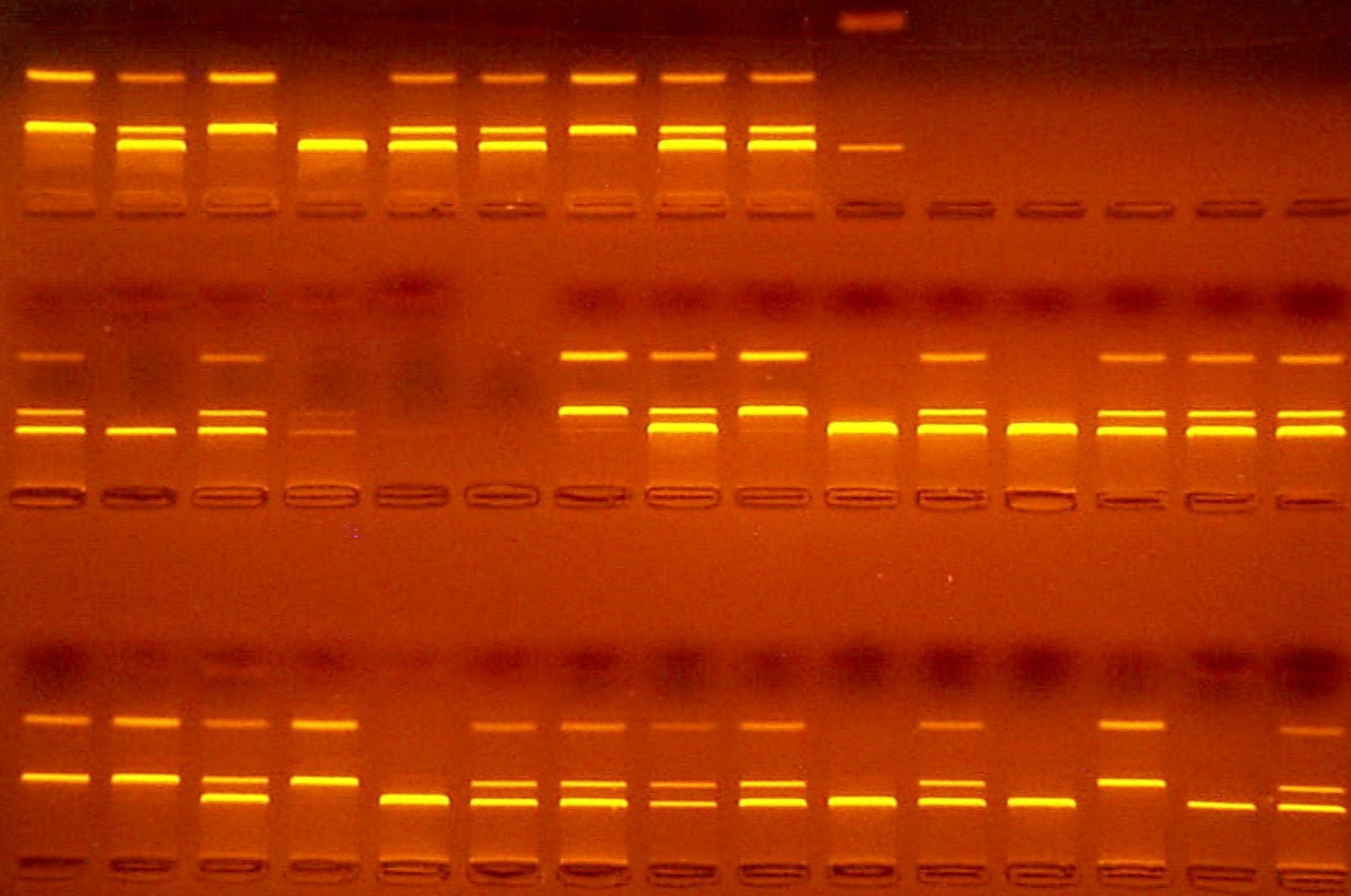


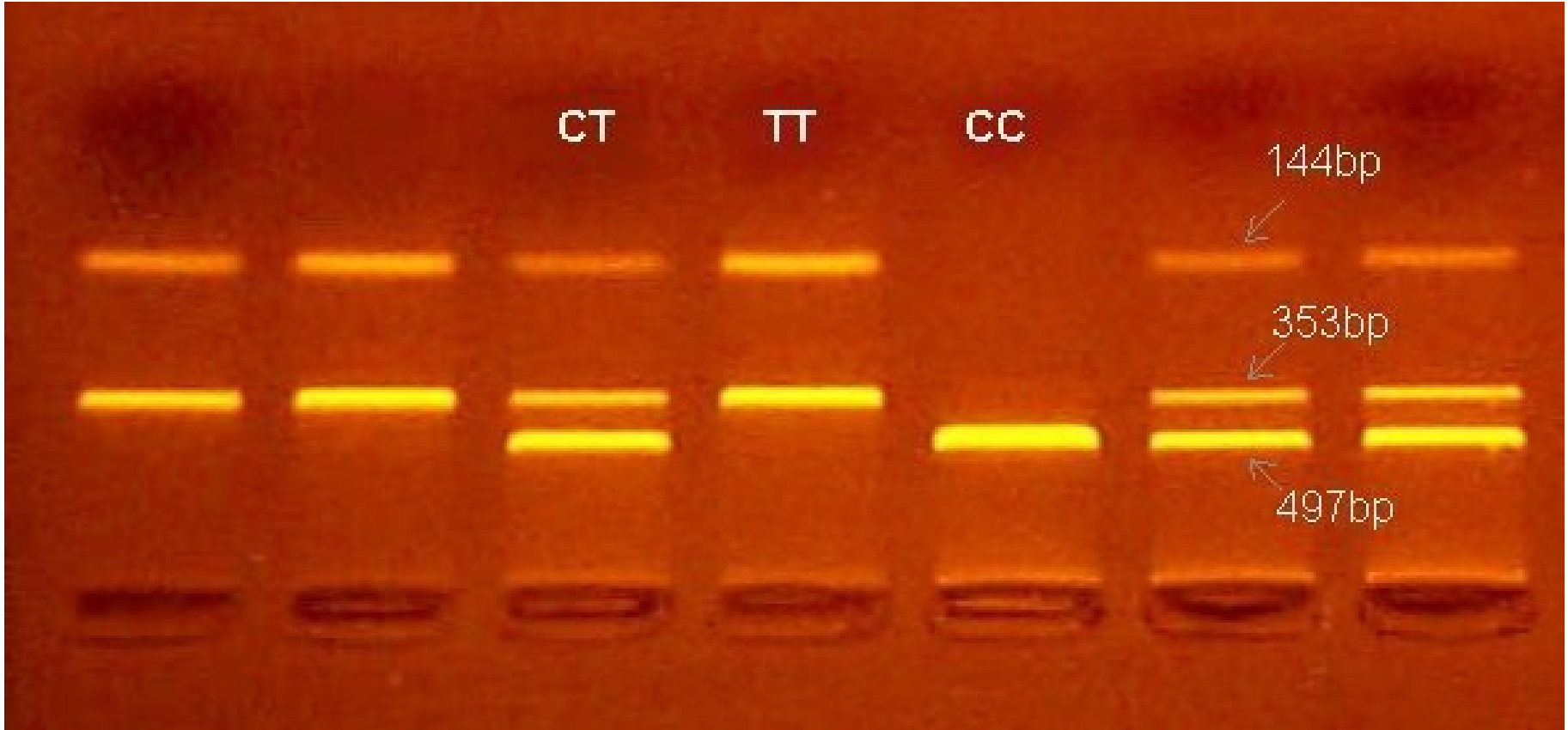
UV transluminátor

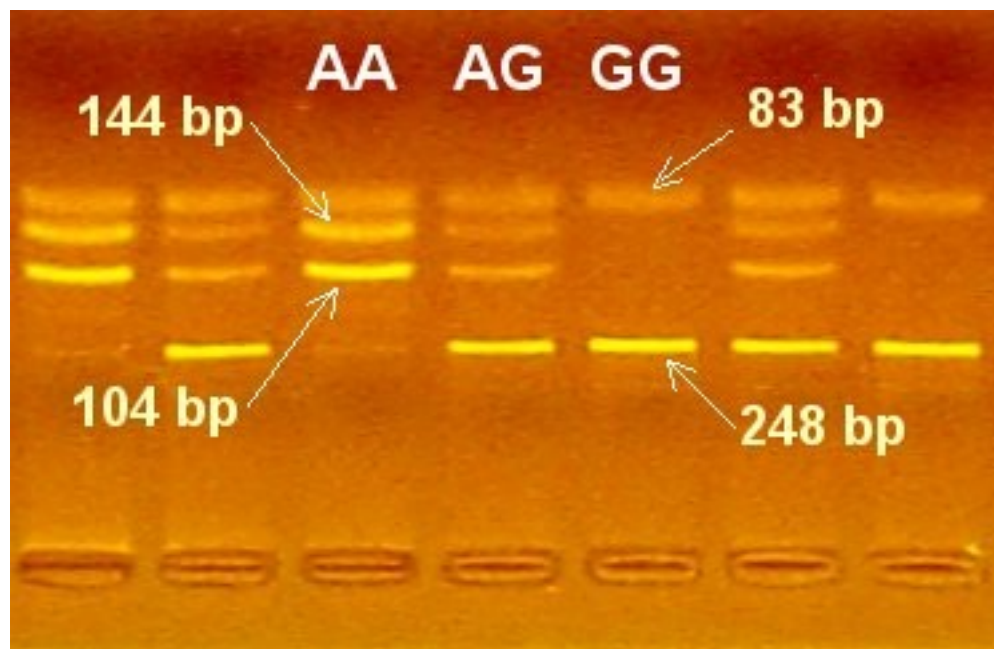
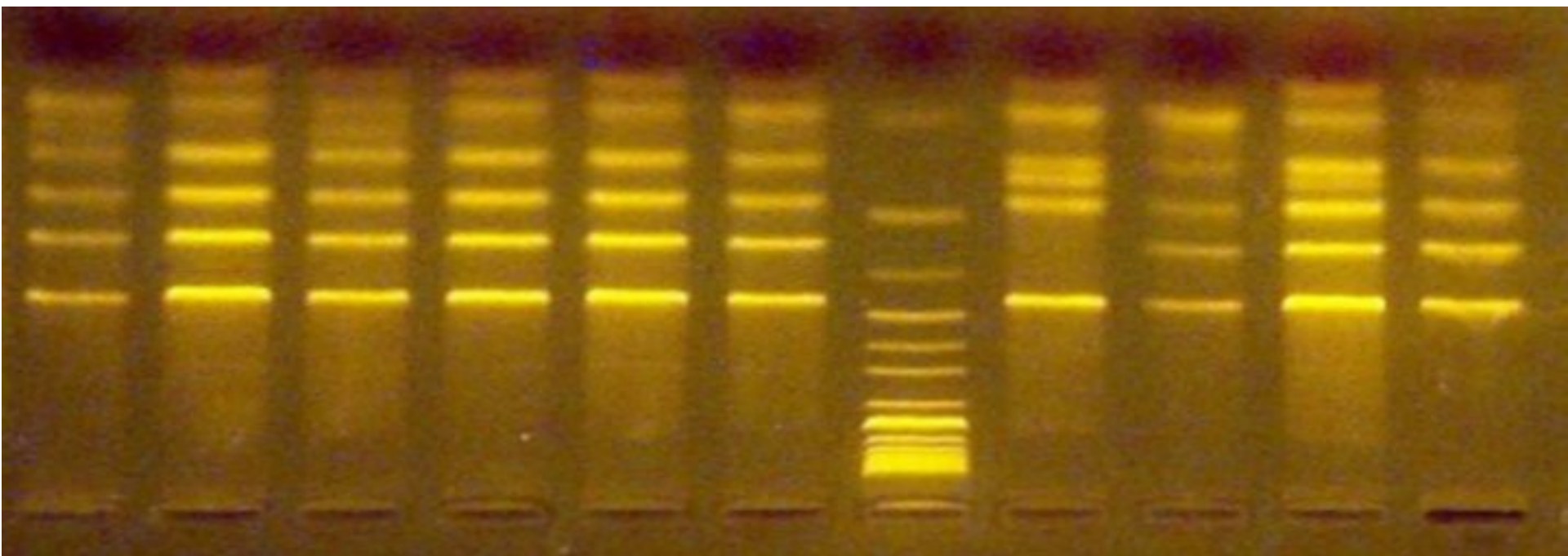


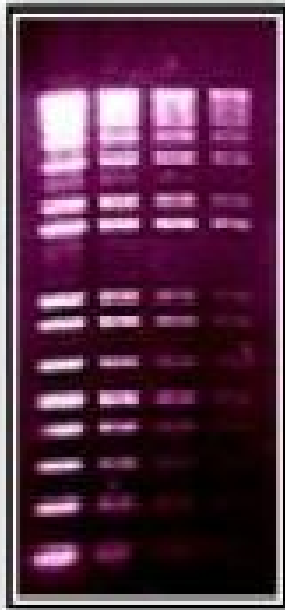




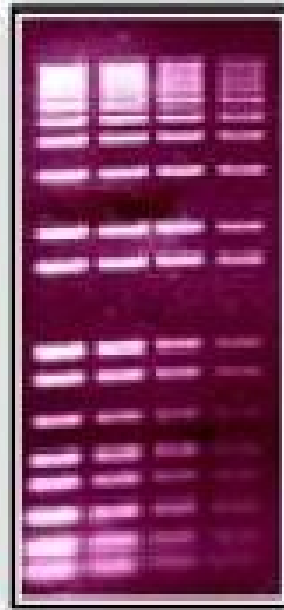








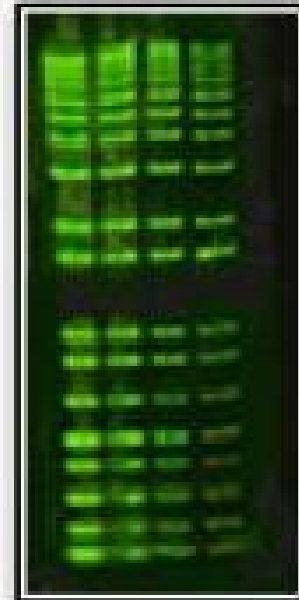
GelRed™
Precast
Staining



GelRed™
Post
Staining



EB
Precast
Staining



GelGreen™
Post
staining

Vyhledávání mutací

- **SSCP** (single strand conformation polymorphism, **polymorfismus konformace jednořetězcové DNA**)
- elektroforéza jednovláknové DNA na polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě - rychlost, jakou putuje během elektroforézy, závisí na přesné konformaci
- **odliší často i záměnu jediné báze**

Děkuji za pozornost





CYCLERtest