

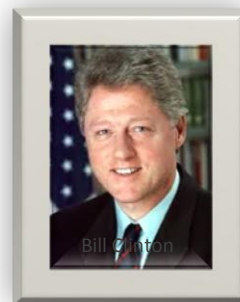
Kapitola 22 DNA diagnostika lidských chorob

V pondělí 26. června 2000 bylo uskutečněno satelitní spojení mezi Bílým domem ve Washingtonu a Downing Street v Londýně, aby Bill Clinton a Toni Blair spolu se špičkami zúčastněných vědců oznámili světu, že byl uskutečněn největší objev století, a to přečtení celého lidského genomu. Předcházelo tomu desetiletí usilovné práce vědců prakticky celého světa, soustředěných převážně do dvou velkých, soupeřících skupin, které ovšem směřovaly k jednomu cíli a také jeho dosažení společně oznámily. Lidstvo si od detailního poznání genetické skladby člověka hodně slibuje. S geny je spojována řada chorob, od mozkových nádorů, přes nádory kostí, prsů, vaječníků, tlustého střeva, plic, leukemie, cukrovku, astma, hypertenzi, srdeční choroby, prionové choroby (nemoc šílených krav), klasické genetické choroby jako jsou talasemie či cystická fibróza, po Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu, mentální retardaci, schizofrenii a mnohé další. Změny v genech kódujících povrchové receptory T-buněk vedou ke snazšímu nebo naopak obtížnějšímu pronikání virů (např. HIV) do buněk, jiné změny v genech vedou k rozdílným schopnostem jedinců, některé změny v určitých genech mohou vést i k asociálnímu chování postiženého individua. Poslední výzkumy naznačují, že „zakódovány“ jsou i mužský a ženský způsob chování a jednání i celková kognitivní (poznávací) schopnost, neboli obecná inteligence. Naskytá se zde tedy široké pole působnosti jak na poli farmacie při hledání nových účinných léků, tak na poli molekulární biologie usilující o detekci příslušných genů, ale i o „nápravu“ pozmeněných genů, ať už ve smyslu vyléčení choroby či vylepšení jedince.

V celém tomto procesu se uplatnily a uplatňují metody dále popsané v této kapitole a další, zde neuváděné a jistě se uplatní i jiné, které na svůj vývoj teprve čekají. Lidstvo se díky těmto technikám a úsilí badatelů dostalo do „postdarwinovské“ éry, kdy nebude muset čekat na přirozený vývoj a bude moci žádané vlastnosti a úpravy (lidského druhu) provádět samo. Zde ovšem nastupuje nutně otázka, zda je na tuto etapu vývoje dostatečně zralé. Věda, techniky a metodiky samy o sobě nejsou špatné, ale mohou být špatně použity. A zde je volné místo pro uplatnění etiky a morálky.

Nová vědní odvětví, rozšiřující původní *genomiku* (nauku o genech), se týkají zejména analýzy funkce genů – *funkční genomika* a struktury příslušných proteinů – *strukturní genomika*.

V tomto „postgenomovém“ období se posiluje význam *proteomiky*, která by měla zodpovědět otázky týkající se významu a úlohy jednotlivých proteinů, čili, měla by vést k porozumění stovkám tisíců proteinů zakódovaných v lidských genech. Navíc, jak se ukazuje, není úloha genů tak fatální, jak by se na první pohled mohlo zdát. Příroda si umí (většinou) poradit i ve velmi svízelných situacích. Velmi důležitá je totiž i následná činnost po syntéze proteinu (*posttranslační činnost*, tj. jeho „úprava“). Významnou roli hrají zejména metylace, jak je zmíněno na str. 22-10, kterými může organismus podstatně změnit vlastnosti vyprodukované bílkoviny, případně ji zcela vyřadit z činnosti.



Bill Clinton



Tony Blair

22.1. Nukleové kyseliny

Crick s Watsonem publikovali svůj názor na strukturu deoxyribonukleové kyseliny (*DNA, DeoxyriboNucleic Acid*), původem z buněčného jádra, v sobotu 25. dubna 1953, v časopise *Nature*. Ukázalo se, že jejich názor byl správný a tato práce otevřela široké pole působnosti badatelům v oblasti, kterou je zvykem nazývat *molekulární biologie*. Během následujících let byly vyvinuty techniky, které umožnily poznat detailně strukturu DNA a RNA (*RiboNucleic Acid*, ribonukleová kyselina, další nukleová kyselina), poznat mechanismy přenosu genetické informace, regulace buněčné diferenciaci a proliferaci i odchylky v jejich funkci během nádorového bujení, mechanismy životních pochodů mikroorganismů, patologické procesy spojené s invazí infekčních mikroorganismů, umístění a složení genů i identifikaci genů odpovědných za genetické choroby.

Tyto techniky bylo možno posléze přenést ze základního výzkumu a aplikovat je do běžné praxe v oborech jako jsou medicína či kriminalistika, ale také do zcela nového odvětví, zvaného *genetické inženýrství*, které umožňuje např. získávat v dostatečném množství proteiny, za běžných okolností se vyskytujících v minimálních množstvích a tudíž obtížně získatelných, i kombinace genů, které by se v přírodě pravděpodobně vůbec nikdy nevyskytly. Nové technologie těží informaci přímo z molekuly nukleové kyseliny.

Podstatný pokrok zaznamenala zhruba před 35 léty technologie nejčastěji nazývaná *technologii rekombinantní DNA*; ta učinila z dříve velmi obtížně analyzovatelné DNA poměrně snadno analyzovatelnou makromolekulu a dává molekulárním biologům spoustu možností, např.:

- vyštěpit z určitého genomu oblast DNA, která obsahuje požadovaný gen,
- prakticky neomezeně namnožit tento gen v přesných kopiích,
- zjistit jeho nukleotidovou sekvenci,
- pozměnit izolovaný gen požadovaným způsobem,
- vrátit pozměněný gen zpátky do buněk a
 - zkoumat jeho funkci, nebo
 - začlenit ho do genomu rostliny nebo živočicha tak, aby se stal jeho funkční a dědičnou součástí.
- Gen je možno z genomu živé buňky i vyřadit a tak zjistit jeho funkci v buňce.

Technologie rekombinantní DNA našla uplatnění i mimo vědecké a výzkumné laboratoře molekulárních biologů. V běžném životě je to např. ve formě teplotně stabilních *proteáz* získaných metodami genového inženýrství, které tvoří běžnou součást pracích prášků, v kriminalistice a forenzní medicíně při identifikaci osob, ve farmacii v produkci různých farmaceutických látek (inzulin, faktor VIII) apod. Zcela logicky si našla i své místo v medicíně, kde tyto metody, založené na analýze nukleových kyselin, umožňují lépe pochopit podstatu onemocnění a dávají lékařům do rukou výborný diagnostický i terapeutický prostředek.

Nová technika zde našla uplatnění

- v diagnostice virových, bakteriálních, mykotických a parazitárních onemocnění (detekce patogenů),
- v prenatalní a postnatalní diagnostice dědičných chorob (detekce mutací),
- v diagnostice nádorových chorob (genové exprese) a
- v identifikaci (*DNA typizaci*) osob pro účely transplantační nebo forenzní (genotypizace).

Pochopení dále popsaných technik předpokládá poznání základních vlastností nukleových kyselin. I když zmiňované je předmětem obecné biochemie, základní informace si uvedeme i v tomto textu.

22.2. Základní vlastnosti nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou molekuly, jejichž struktura a uspořádání v chromosomech určují genetické vlastnosti organismu. Technologie diagnostiky DNA a RNA byly umožněny poznáním základních vlastností nukleových kyselin.

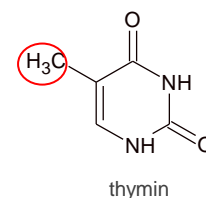
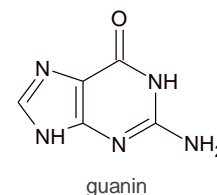
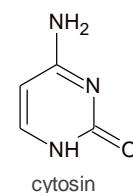
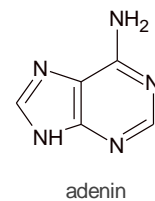
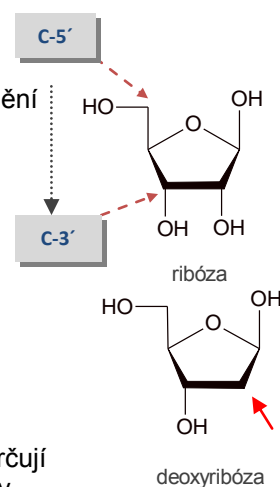
DNA je složitý biopolymer (přesněji: *biokondenzát*) uspořádaný do dvoušroubovice. Základní organizační jednotkou je *sekvence* (= pořadí) purinových (**A**=adenin, **G**=guanin) a pyrimidinových (**C**=cytosin, **T**=thymin) bází, které jsou připojeny k cukru deoxyribose (v pozici C-1') a báze jsou spolu spojeny fosfodiesterovou vazbou mezi 3'- a 5'- pozicemi svých cukerných zbytků. Střídání deoxyribózových a fosfátových skupin tvoří páteř dvojité šroubovice. Tyto 3'-5' vazby určují také orientaci vlákna molekuly DNA.

Na obrázku na straně 22-3 je ukázán princip stavby nukleosidů a nukleotidů, základních stavebních kamenů nukleových kyselin. Rovněž je naznačeno párování bází a jsou uvedeny čtyři nukleotidy. V DNA jsou vždy dvě vlákna přiložena k sobě v navzájem obráceném směru, jsou *antiparalelní*. Adenin a thymin a guanin s cytosinem tvoří navzájem páry, spojené vodíkovými můstky. Tyto páry bází se nazývají komplementární, obsah adeninu je stejný jako obsah thyminu a obsah guaninu je stejný jako obsah cytosinu (*Chargaffovo pravidlo*). Párování bází a podélné hydrofobní interakce drží dvě vlákna DNA pohromadě. Interakce **C-G** tvořená třemi vodíkovými můstky je pevnější než interakce **A-T**, tvořené pouze dvěma vodíkovými můstky (viz obrázek). Interakce lze zrušit zahříváním DNA, nebo změnou koncentrace solí, případně změnou pH, což vede k denaturaci a oddělení vláken. Při pozvolném návratu k původnímu stavu (např. pozvolném snižování teploty roztoku) se opět dvě komplementární vlákna DNA spojí uspořádaně. Míra párování nebo nepárování může být stanovena podle teploty potřebné k denaturaci/renaturaci: oblasti DNA s vyšším stupněm uspořádání bází vyžadují k denaturaci vyšší teplotu. (Tato reakce je základem *hybridizace*).

Aby DNA zabrala v jádře buňky minimum místa, je pomocí mnoha proteinů, z nichž nejvýznamnější jsou bazické proteiny zvané *histony*, sbalena do kompaktní struktury. Takto se DNA o délce asi 1m pohodlně směstná do objemu několika krychlových mikrometrů.

V **RNA** je místo thyminu uracil [U], místo deoxyribózy je ribóza a na rozdíl od DNA je jednovláknová.

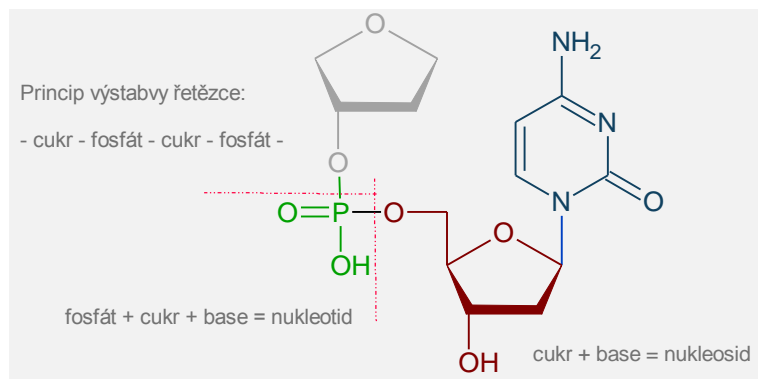
Pavel Nezbeda



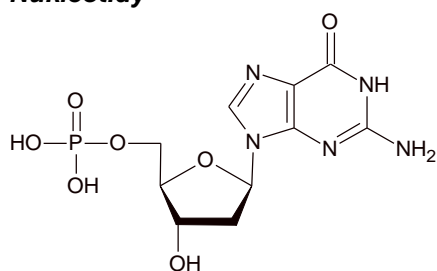
Bez CH₃ = uracil

Principy stavby nukleových kyselin

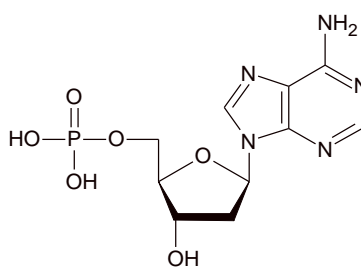
Princip stavby nukleosidů a nukleotidů



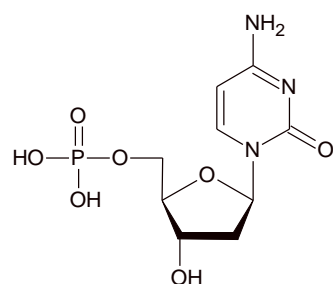
Nukleotidy



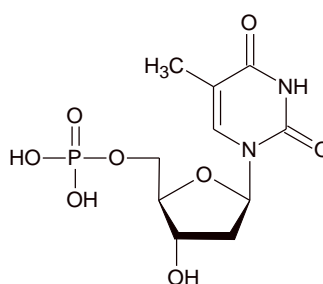
deoxyguanosinmonofosfát



deoxyadenosinmonofosfát



deoxyuridinmonofosfát



deoxythymidinmonofosfát

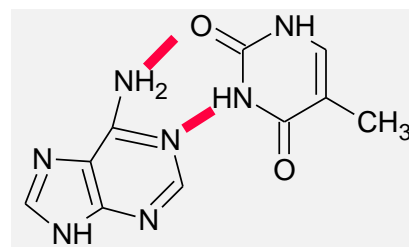
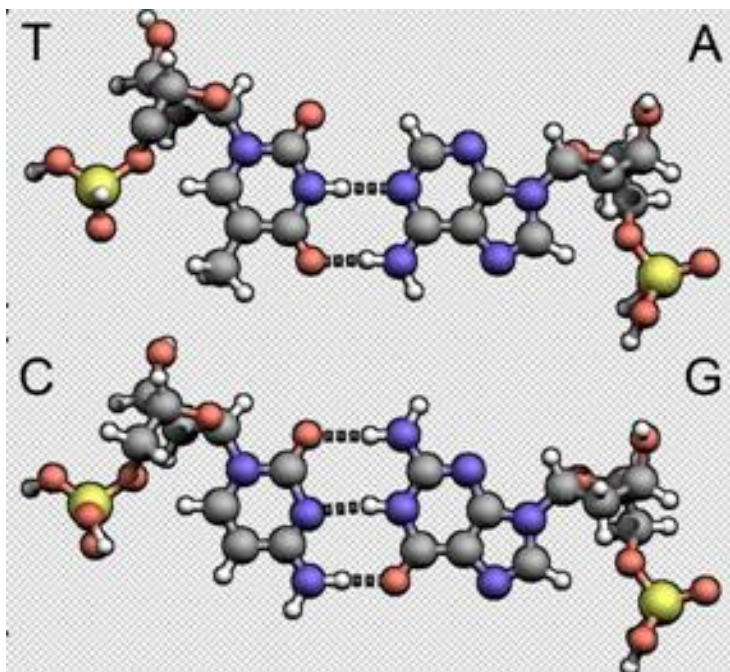
Princip párování bází

Pyrimidiny i puriny obsahují ionizovatelné funkční skupiny, takže se mohou vázat pomocí vodíkových vazeb, vodíkových můstků. Adenin (A) a thymin (T) jsou poutány dvěma vodíkovými můstky, cytozin (C) a guanin (G) jsou vázány třemi vodíkovými můstky. Vazba C-G (G-C) je pevnější než vazba A-T (T-A), resp. pro rozpojení vazeb C-G je třeba více energie (je zapotřebí vyšší teplota), než pro rozpojení vazeb A-T. Schémata iontových vazeb jsou na obrázcích.

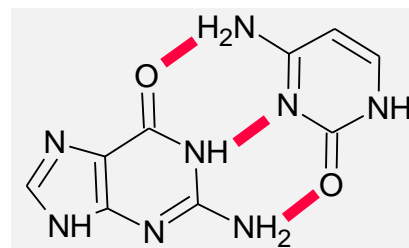
Gen a genom

Určitá část molekuly DNA, sekvence nukleotidů popisující určitou vlastnost, se nazývá *gen*, soubor všech genů je *genom*. Celý genom člověka sestává z přibližně 30 – 35 tisíc genů, což představuje asi 3×10^9 párů bází. Ačkoliv každý druh i každý jedinec má v řetězci své nukleové kyseliny jedinečné, unikátní, tzv. cílové sekvence, které jej odlišují nejen od ostatních druhů, ale i od ostatních jedinců stejného druhu (podobně jako papírární linie na prstech rukou), přesto řada sekvencí (od virů a bakterií, přes rostliny a živočichy až po člověka) je totožná. Tak genom člověka a šimpanze je shodný z 98% a shoda dvou lidí je dokonce 99,9%. K odlišnosti dvou jedinců stačí 0,1% genomu (!).

Nalezení *charakteristických sekvencí* nukleových kyselin v biologickém vzorku umožňuje identifikovat původního nositele: lze stanovovat viry, bakterie, kvasinky atd., diagnostikovat infekční choroby, určovat genetické poruchy plodu, genetické poruchy vedoucí k malignímu množení buněk a tkání (onkologie), lze snáze řešit paternitní a maternitní spory a identifikovat jedince (forenzní diagnostika v soudním lékařství atd.).



A - T / T - A: dva vodíkové můstky

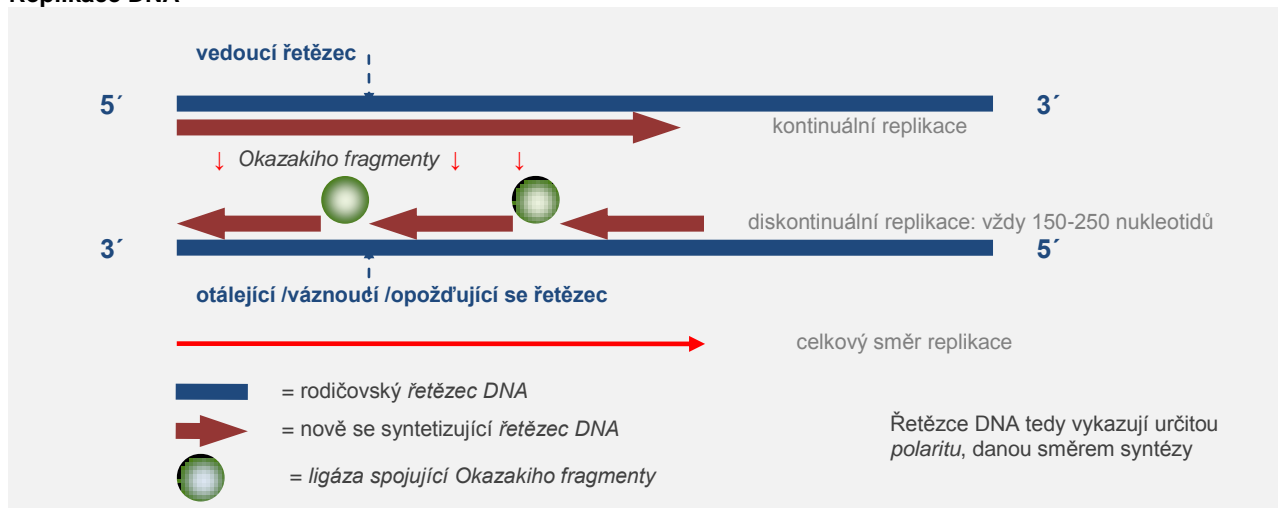


G - C / C - G: tři vodíkové můstky

Syntéza DNA

Při předávání genomu dceřině buňce při buněčném dělení, musí se DNA zdvojit, replikovat, složitým procesem za účasti specifických proteinů a enzymů. Rodičovská dvoušroubovice se rozdělí a ke každému rodičovskému vlákně je syntetizováno dceřiné vlákno enzymem *polymeráza III*, který z rodičovské templátové [template = šablona, matrice, vzor] kyseliny odečítá pořadí nukleotidů a podle toho přiřazuje správné nukleotidy (podle zásad párování bází) do dceřině části molekuly. Tento způsob zmožení DNA se nazývá *semikonzervativní* způsob replikace. Do dceřiných buněk takto přejdou molekuly DNA, z nichž každá obsahuje jedno vlákno rodičovské a jedno vlákno nově syntetizované dceřině molekuly DNA.

Replikace DNA

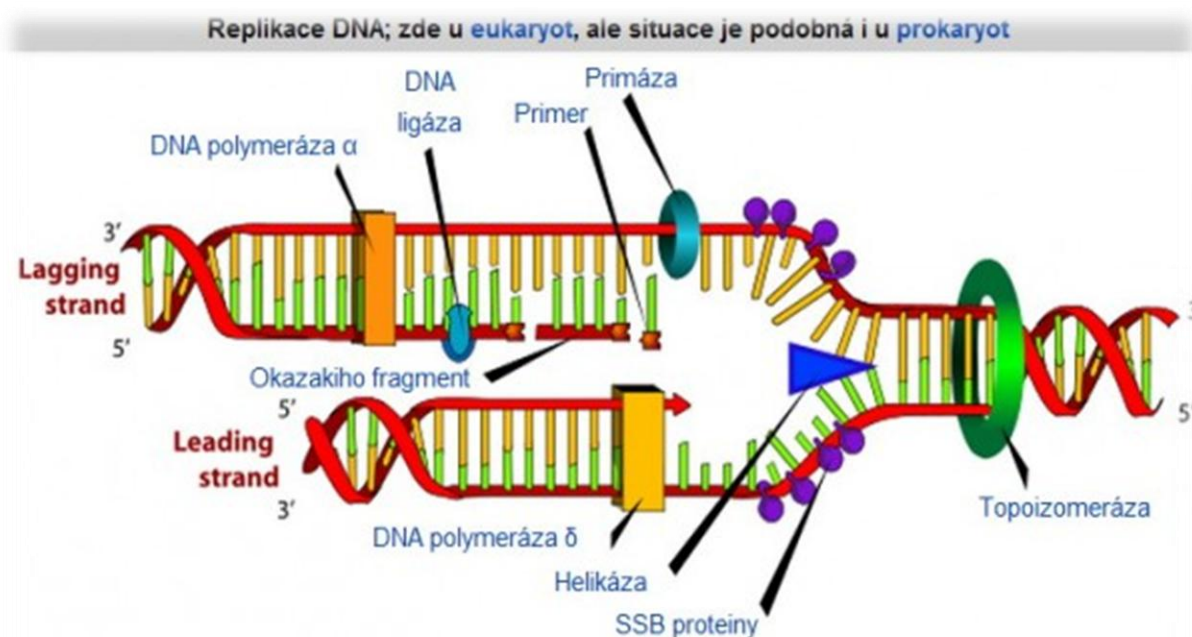


Rozvinutí a oddělení řetězců zajišťuje enzym *helicáza*. K zahájení vlastní syntézy DNA je potřeba krátká RNA (o 10-200 nukleotidech) zvaná *primer* [výslovnost = *prajm*], kterou syntetizuje enzym *primáza*, a která je později z DNA odstraněna *nukleázou* a nahrazena odpovídajícím úsekem DNA pomocí *opravné polymerázy*. Růst obou řetězců probíhá současně, a to směrem 5' → 3', čili ve směru fosfodiesterové vazby od 5. uhlíku deoxyribózy předchozího nukleotidu ke 3. uhlíku deoxyribózy následujícího nukleotidu.

DNA polymeráza, odpovědná za růst řetězce, dokáže totiž navazovat pouze na alkoholickou skupinu na třetím uhlíku, a proto také potřebuje již zmíněný primer, který tuto skupinu nabídne. Zatímco na tzv. *vedoucím řetězci* probíhá syntéza bez problémů kontinuálně, na druhém, *otálejícím řetězci*, probíhá syntéza diskontinuálně, protože se po úsecích vždy zpolymeruje 150 – 250 nukleotidových fragmentů, tzv. *Okazakiho fragmentů* (stále ve směru 5' → 3'; viz obrázek dole). Fragmenty jsou spojovány pomocí enzymu *ligázy*. Celá situace na otálejícím řetězci je o to složitější, že syntéza každého fragmentu musí být nastartována separátním primerem, který je ve chvíli, kdy *DNA polymeráza* dosyntetizuje řetězec až k němu odbourán *nukleázou*, *opravná polymeráza* doplní vzniklou mezeru nukleotidy a nakonec je fragment připojen k předcházejícímu fragmentu *ligázou*. Tyto podrobnosti na obrázku nejsou uvedeny.

Pro zvědavé studenty, replikace DNA, podrobnější obrázek

(Zdroj: Wikipedie)



Helikáza

Enzym, při pohybu podél DNA rozvíjí dvoušroubovicové struktury, k tomu využívá energii z hydrolýzy ATP

Topoizomeráza

Enzym ze skupiny izomeráz, umožňuje měnit terciární strukturu DNA (tzv. *supercoiling* či *superhelix*), tj. *nadšroubovicové vinutí*, což je dodatečné vinutí již vytvořené dvoušroubovice (primární a sekundární struktura tímto enzymem ovlivněny nejsou). Topoizomeráza dohlíží při replikaci DNA na to, aby se v replikační vidlici při rozmotávání vlákna DNA pomocí helikáz zbývající vlákno příliš neutáhlo (natolik, že by již nešlo rozmotat).

SSB proteiny

(*single-strain binding proteins*), vazebné proteiny pro jednoduché řetězce, zabraňují odděleným vláknům znovu se spojit

Primáza

Enzym, vytvářející úseky RNA dlouhé přibližně deset nukleotidů, které se párují s templátovým řetězcem (slouží jako primer) a poskytují svůj 3'-konec jako začátek pro DNA-polymerázu, která umí pouze připojovat nové nukleotidy k již spárovaným nukleotidům, ale nedokáže začít syntetizovat nové vlákno.

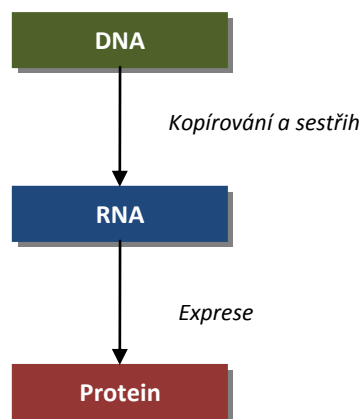
DNA-polymeráza

Enzym syntetizující nové vlákno DNA podle původního řetězce, katalyzuje připojování nukleotidů na 3'-konec rostoucího řetězce, kdy je vytvářena fosfodiesterová vazba mezi skupinou 3'-OH řetězce a 5'-fosfátovou skupinou přidávaného nukleotidu (k zahájení syntézy nespárovaných nukleotidů vyžaduje primázu).

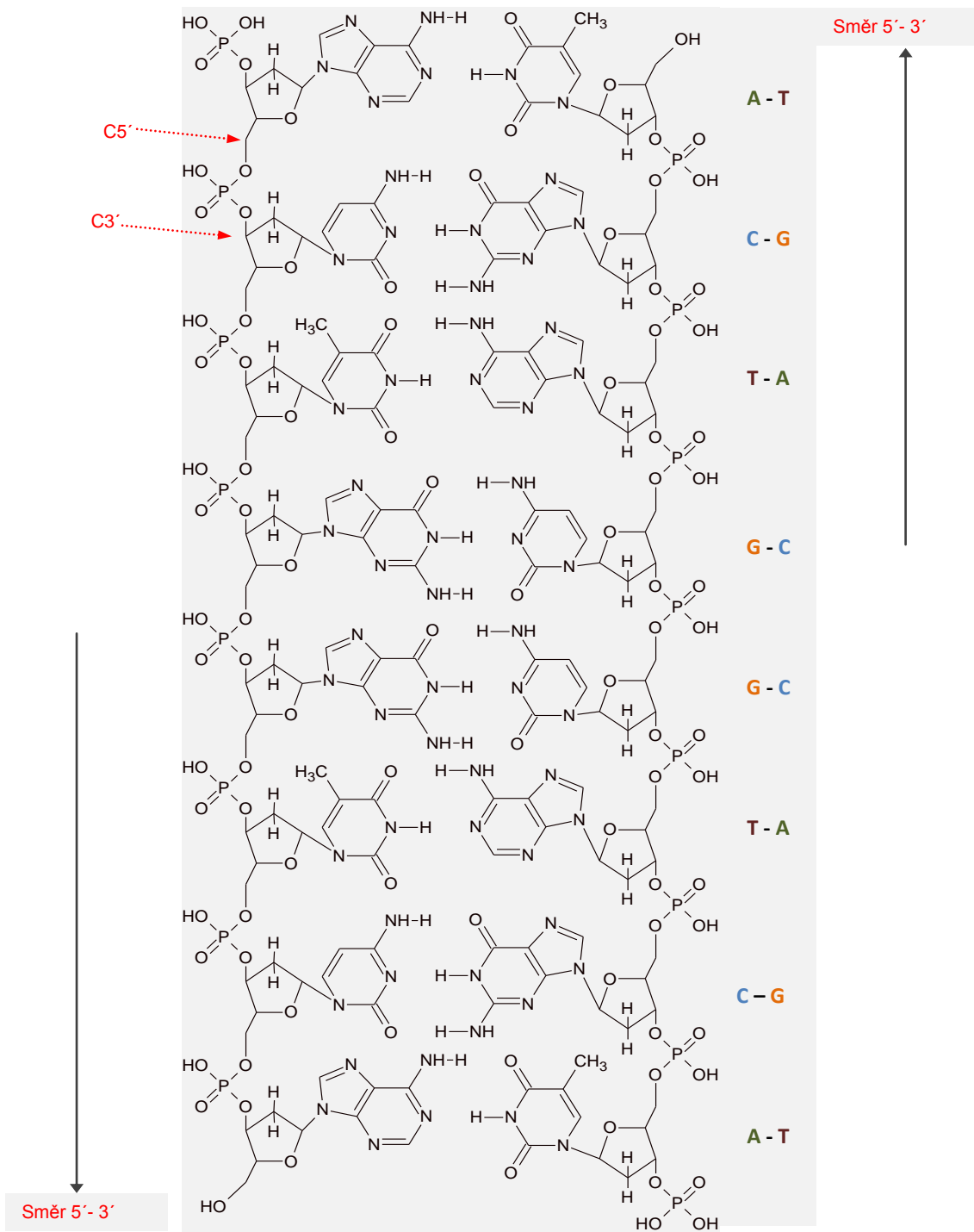
Ligáza Enzym spojující *Okazakiho fragmenty*.

Tzv. **ústřední dogma molekulární biologie** vychází z modelu znázorněného vpravo:

- Genetická informace je uložena v jádře v DNA ve formě genů, sekvencí nukleotidů, úseků DNA, které se po vhodném impulzu (a rozvinutí DNA) procesem obdobným výše popsané replikaci DNA, kopírují do RNA, která přechází do cytoplazmy.
- Z RNA jsou odstraněny nekódující sekvence (tzv. sestřih) a
- na ribozomech je přečtena vložená informace o skladbě proteinu a jsou syntetizovány příslušné proteiny (exprese čili vyjádření genu).

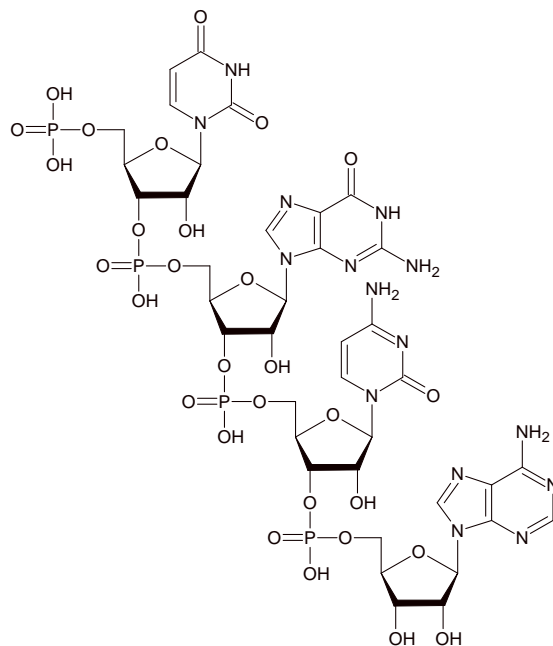


Část řetězce DNA, párování bazí, polarizace



RNA

Vyjádření (*expres*) genetické informace se realizuje v prvním stupni syntézou mRNA a dále syntézou bílkoviny (enzymu, protilátky, strukturního proteinu, apod.). Ve zkratce probíhá tento děj tak, že se příslušné místo na DNA (gen) *templátového řetězce* (tj. toho, který nese přímou informaci o struktuře bílkoviny, přímou informaci nese *kódující řetězec*) okopíruje do RNA (*mRNA*, *messenger RNA*, *mediátorová RNA*), což je jednovláknová nukleová kyselina „konstruovaná“ podle stejných zásad jako vlákna DNA s tím rozdílem, jak již bylo uvedeno, že místo cukru deoxyribózy je v RNA ribóza a místo thyminu je v RNA báze uracil. Kopírování se děje prakticky stejně, jako replikace DNA: k příslušnému místu na DNA se komplementárně vytvoří (nasyntetizuje) RNA, která se posléze odpojí. Principy párování jsou stejné (adenin-uracil, cytozin-guanin). Tuto „pracovní kopii“, která představuje stavební plán bílkoviny, tj. pořadí aminokyselin v molekule proteinu, dokáže aparát proteosyntézy v buňce přečíst a podle ní „sestrojit“ příslušnou bílkovinnou makromolekulu. Důležitou okolností je, že mRNA než opustí jádro je „sestrižena“ (*nick*), tzn., že jsou z ní odstraněny tzv. *introny* (úseky nenesoucí genetickou informaci), *mezery* a *promotory* (místa, kde začíná syntéza DNA), tedy je kratší než původní úsek DNA a obsahuje pouze potřebné kopie genů.



Část řetězce RNA, která obsahuje, na rozdíl od DNA, ribózu a uracil, molekula je jednovláknová

22.2.1. Polymorfismus DNA

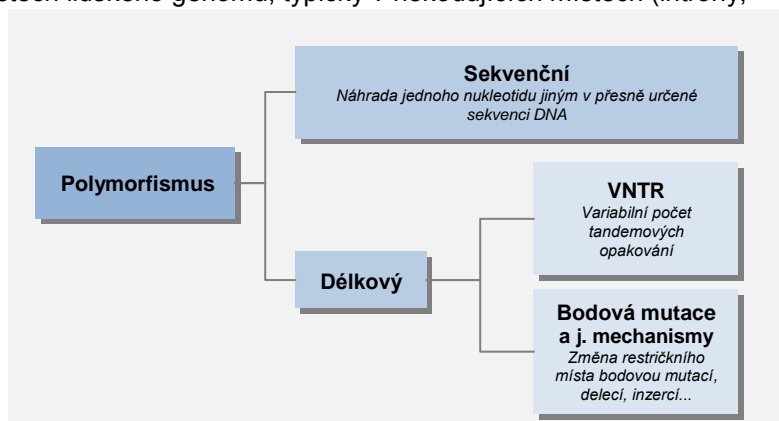
Výraz *polymorfismus* pochází z řeckých *polys*, mnohý a *morfe*, tvar. Znamená tvarovou pestrost, mnohotvárnost, různotvarost. *Polymorfismus DNA* odkazuje na vzájemnou odlišnost DNA uvnitř druhu. Polymorfismus DNA může být *délkový* a *sekvenční*. Názvy naznačují, že se bude jednat o různorodost v *délce* konkrétního úseku homologní DNA či o změnu v *pořadí nukleotidů* v konkrétním úseku DNA, především v genu.

Polymorfní gen je gen, který se v lidské populaci vyskytuje ve více formách, tzv. *alelách*. Produktem polymorfních genů jsou i polymorfní proteiny. Lze tedy analyzovat jak proteiny, tak nukleovou kyselinu (viz dále *sekvenční polymorfismus*). Genetické vyšetření je však citlivější, rozliší jemnější rozdíly, má větší informační hodnotu a je méně závislé na stáří a kvalitě vzorku, než vyšetření proteinů. S rozvojem molekulárně genetických praktik se postupně (od zhruba poloviny 80. let) přechází od analýzy proteinů na analýzu DNA. Polymorfní však mohou být i úseky DNA nekódující proteiny, proto tento typ polymorfismu je detekovatelný pouze na úrovni DNA (viz *VNTR*).

Délkový polymorfismus

Délkový polymorfismus může mít svůj původ v opakování krátkých motivů (sekvencí nukleotidů), které těsně nasedají k sobě, tzv. *VNTR* (*variable number of tandem repeats - variabilní počet tandemových opakování*). Tato opakování lze nalézt v různých místech lidského genomu, typicky v nekódujících místech (introny, mezerníky). Počet opakování bývá 4 – 40, typický počet nukleotidů v motivu bývá uváděn 2 – 50 párů bází.

Poznámka: Podrobnosti je třeba hledat v předmětu genetika. Obecně se rozlišují klasická satelitní DNA, mini- a mikrosatelitní DNA, rozlišené počtem bází v sekvenci. Mikrosatelity obsahují 2-10 párů bází, které se opakují, minisatelity jsou delší, obsahují 20 – 100 párů bází. Termínu „mikrosatelity“ odpovídají i používané termíny „Short Tandem Repeat (STR)“ a „Simple Sequence Repeat (SSR)“. VNTR jsou mezi mikro- a minisatelity.



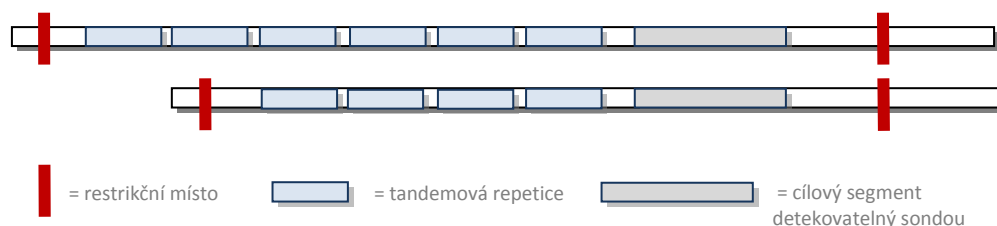
VNTR zřejmě vznikly díky chybám při rekombinaci nebo replikaci DNA. Existuje vysoká pravděpodobnost, že jedinec získá, díky variabilitě těchto sekvencí v populaci, různé VNTR oblasti od každého z rodičů, a že dvě nepříbuzné osoby nebudou mít tyto oblasti stejné. Je tedy soubor krátkých tandemových repetací pro jedince (kromě jednovaječných dvojčat) unikátní. Na tomto polymorfismu jsou založeny některé metody genetické individuální identifikace (tzv. *profilování DNA*), využitelné např. v kriminalistice.

Variabilní tandemové repetice lze

- odštěpit pomocí restričních enzymů (srovnej dále RFLP na str. 22-9 a 22-11) nebo
- amplifikovat polymerázovou řetězovou reakcí (*PCR*).

V obou případech pak následuje gelová elektroforéza, po které většinou následuje Southernův přenos (*Southern blotting*), jehož součástí je *hybridizace* se sondou (viz str.22-13). Sonda s fragmentem hybridizuje, pokud je délka fragmentu se sondou komplementární. Tak se zjistí délka fragmentu.

Délkový polymorfismus restričních míst způsobený VNTR



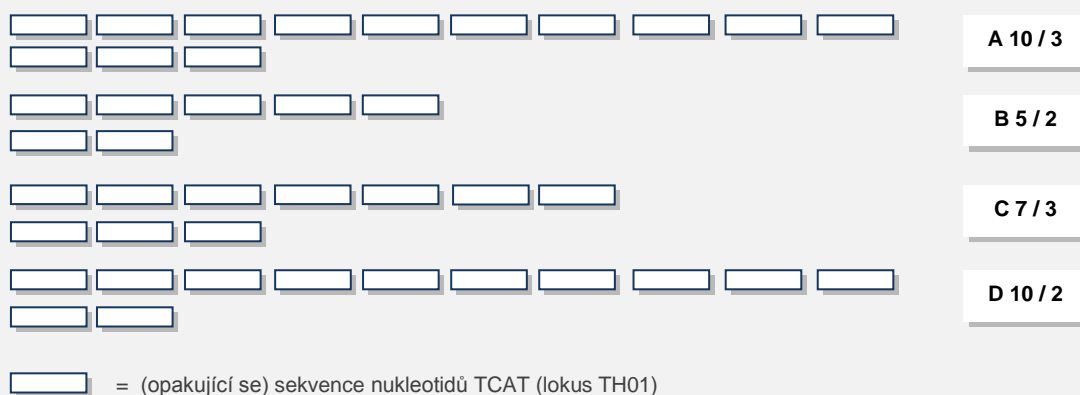
Alely obsahují v okolí cílové oblasti tandemové repetice v různém počtu, v jednom případě je to šest repetací, v druhém případě pouze čtyři. Po štěpení příslušnou endonukleázou bude v druhém případě zjištěn kratší fragment (po elektroforéze a vizualizaci pomocí sondy).

Příklad využití délkového polymorfismu v kriminalistice

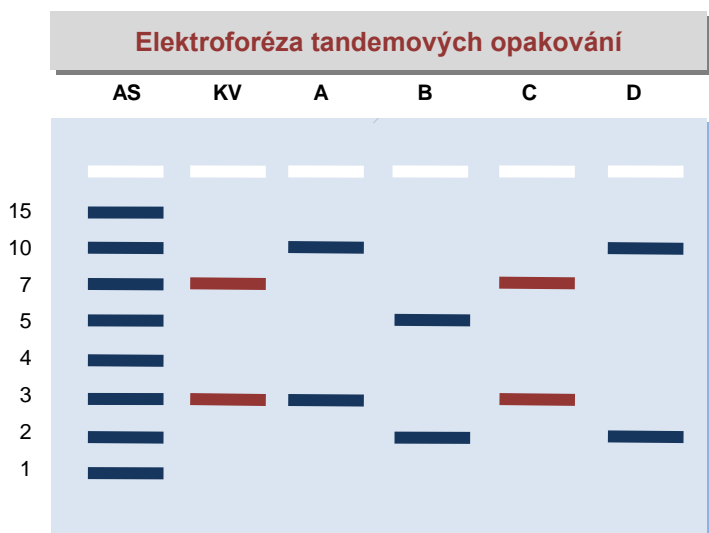
Současně používaným lokusem v kriminalistice je lokus známý jako **TH01**, který obsahuje opakování bází **T-C-A-T**. Tento lokus existuje ve více variantách, alelách, známo je jich nejméně 20. V tomto myšlenkovém pokusu uvažujeme variantu TH01.

Na následujícím schématu jsou uvedeni čtyři jedinci, **A, B, C** a **D** s různým počtem opakování tohoto lokusu: jedinec A zdědil od jednoho svého rodiče deset opakování TH01, od druhého tři opakování tohoto lokusu; jedinec B zdědil pět a dvě opakování, jedinec C sedm a tři a jedinec D deset a dvě opakování TH01. Opakující se sekvence TCAT (tj. lokusu TH01) je na schématu znázorněna obdélníčkem.

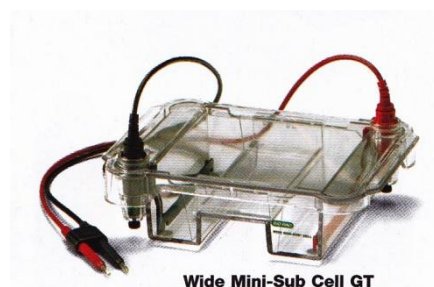
VNTR TH01 jedinců A, B, C, D



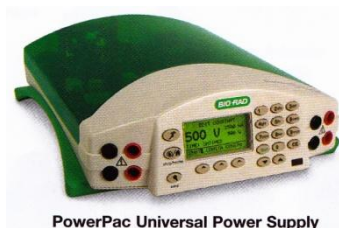
Vzorky od těchto jedinců a vzorek kriminalistického zájmu se podrobí PCR, případně působení restričních enzymů (viz dále) a vzniklá směs se rozdělí pomocí gelové elektroforézy. Současně se elektroforeticky rozdělí i *alelový standard*, který obsahuje různé délky (opakování) požadovaných sekvencí. Po vizualizaci elektroforeogramu se z rozložení jednotlivých frakcí vyloučí podezřelí, případně určí pachatel.



AS = alelový standard
 KV = kriminalistický vzorek
 A, B, C, D = čtyři podezřelí
 Červená barva ukazuje shodu podezřelého C s kriminalistickým vzorkem



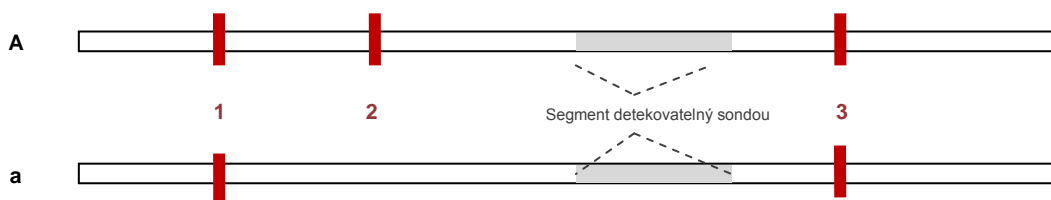
Ukázka elektroforetické vany pro elektroforézu v agarosovém gelu firmy Bio-Rad



Univerzální zdroj k elektroforetické vaně, fy Bio-Rad

Délkový polymorfismus může mít svůj původ i v bodové mutaci, jejímž následkem je změna restrikčního místa v DNA, a výsledkem jsou nesejně dlouhé štěpy u různých (jednodruhových) DNA při použití stejné endonukleázy. Podstata tohoto druhu délkového polymorfismu spočívá v posunu restrikčního místa, takže kromě bodové mutace připadají v úvahu jako příčiny změny restrikčního místa i další mechanismy, např. inserce, delece, translokace a inverze. V tomto případě se hovoří o délkovém polymorfismu restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP, srovnej též na str. 22-11).

Délkový polymorfismus restrikčních míst způsobený změnou restrikčního místa



Na horním schematicém obrázku úseku DNA (alela A) jsou naznačena tři restrikční místa 1, 2 a 3. Spodní obrázek (alela a) restrikční místo 2 postrádá, došlo zde k mutaci. Výsledek působení restrikčního enzymu bude u obou alel různý. V případě rodičů s těmito genotypy AA, aa, Aa (všechny možné kombinace), genotyp potomků může být: AA, Aa, aA, aa (všechny možné kombinace). Elektroforetický obrazec může vypadat např. takto (vlevo možní rodiče, vpravo možní potomci):



Sekvenční polymorfismus

Sekvenční polymorfismus spočívá v náhradě jednoho nukleotidu jiným v přesně určené sekvenci DNA, případně ve vyřazení nukleotidu z této sekvence, nebo naopak vmezeření nukleotidu do této sekvence.

Příkladem jsou krevní skupiny, alely v HLA systému, isoenzymy, apod.

A*24032 AAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCATGTGGCGGAGCAG
 A*2418 AAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCATGAGGCGGAGCAG

V uvedeném příkladu je zobrazen krátký úsek DNA dvou HLA alel (HLA-A*24032 a HLA-A*2418), kde je zvýrazněno místo v sekvenci, lišící se v jednom nukleotidu (T – A). Metodika vyšetřování tohoto typu polymorfismu může vycházet jak z exprese genu (viz uvedený příklad), tak z genetické analýzy (jak bylo uvedeno na začátku tohoto odstavce).

Single nucleotide polymorphism (SNP) je jednoduchý sekvenční polymorfismus, kde jednotkou typizace není alela, ale nukleotid na přesné pozici v chromozomu. V současné době má využití „tandemový“ SNP při zjišťování trisomií plodu z krve těhotné ženy.

22.3. Principy práce s nukleovými kyselinami

22.3.1. Izolace a čištění (purifikace) nukleových kyselin

Zdrojem pro izolaci DNA bývají, podle zamýšleného účelu, jádra leukocytů z krevních vzorků, buňky ústní sliznice nebo vlasové kořínky, mohou to být i spermie apod.

Krevní vzorky je nutno nejpozději do 3 hodin zmrazit a skladovat při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při izolaci DNA je třeba rozbít membrány (buněčnou, jadernou), nejčastěji použitím detergentů a převést DNA do roztoku. Oddělí se lipidy, proteiny a ostatní složky buněčného obsahu a DNA se získá precipitací (např. alkoholem, izopropanolem aj.). Celý proces je kombinací laboratorních postupů, jako je hemolýza, centrifugace, homogenizace a použití různých detergentů.

Podobně RNA se získává z rozbitých buněk ultracentrifugací, extrakcí, případně precipitací (např. alkoholem, izopropanolem aj.). Čistota získaných preparátů se kontroluje spektrofotometrií při dvou vlnových délkách: 260 nm (absorbují nukleové kyseliny) a 280 nm (absorbují kontaminující proteiny). Při malých množstvích nukleových kyselin se používá fluorimetrie s ethidiumbromidem. Kontrola celistvosti získané DNA se provádí elektroforézou na agarózovém gelu.

22.3.2. Použití restrikčních enzymů

Endonukleázy, také nazývané *restrikční enzymy*, štěpí DNA mezi určitými sekvencemi uvnitř molekuly..

Endonukleáza	Štěpená sekvence	Výsledné štěpy	Zdroj (mikrob)
Bam HI	<pre> ↓ GGATCC CCTAGG ↑ </pre>	<pre> G GATCC CCTAG G </pre>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
Hpa I	<pre> ↓ GTTAAC CAATTG ↑ </pre>	<pre> GTT AAC CAA TTG </pre>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Eco RI	<pre> ↓ GAATTC CTTAAG ↑ </pre>	<pre> G AATTC CTTAA G </pre>	<i>Escherichia coli RY13</i>
Hha I	<pre> ↓ GCGC CGCG ↑ </pre>	<pre> GCG C C GCG </pre>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
HaeIII	<pre> ↓ GGCC CCGG ↑ </pre>	<pre> GG CC CC GG </pre>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
AluI	<pre> ↓ AGCT TCGA ↑ </pre>	<pre> AG CT TC GA </pre>	<i>Arthrobacter luteus</i>
NotI	<pre> ↓ GCGGCCGC CGCCGGCG ↑ </pre>	<pre> GC GGCCGC CGCCGG CG </pre>	<i>Nocardia otitidis</i>
HindIII	<pre> ↓ AAGCTT TTCGAA ↑ </pre>	<pre> A AAGCTT TTCGA A </pre>	<i>Haemophilus influenzae</i>
Taq I	<pre> ↓ TCGA AGCT ↑ </pre>	<pre> TC GA AG CT </pre>	<i>Thermus aquaticus YTI</i>
Směr čtení horního vlákna: 5' → 3' HpaI, HaeIII, AluI, TaqI: tvoří štěpy s tzv. <i>tupými konci</i>			
Směr čtení spodního vlákna: 3' ← 5' Hi, Eco RI, HhaI, NotI, HindIII: tvoří se štěpy s tzv. <i>přesahujícími konci</i>			

Poznámka: pro „přesahující konce“ se používá i pojem „lepivé konce“.

Hydrolyzují fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách. Tvoří součást enzymového vybavení bakterií. Jimi se bakterie brání proti cizorodým DNA, které náhodně pronikly do jejich vnitřního prostředí. Jsou pojmenovávány podle bakterií, z nichž byly izolovány: Eco RI je z *Escherichia coli*, Bam HI je z *Bacillus amyloliquefaciens* (první písmeno označuje rod, další dvě písmena druh, může následovat označení kmene a římská číslovka označující pořadí objevu). Každý enzym rozeznává specifickou sekvenci dvouvláknové DNA dlouhou 4 – 7 párů bází a štěpí ji na různě dlouhé úseky, fragmenty, podle individuálního pořadí nukleotidů a rozpoznané sekvence. Štěpí lze izolovat (identifikovat a analyzovat) elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Díky skutečnosti, že štěpení probíhá vždy na charakteristických místech DNA, lze sestavit tzv. *restrikční mapy* a rozlišovat různé DNA, protože počet i délka fragmentů jsou pro daného jedince specifické.

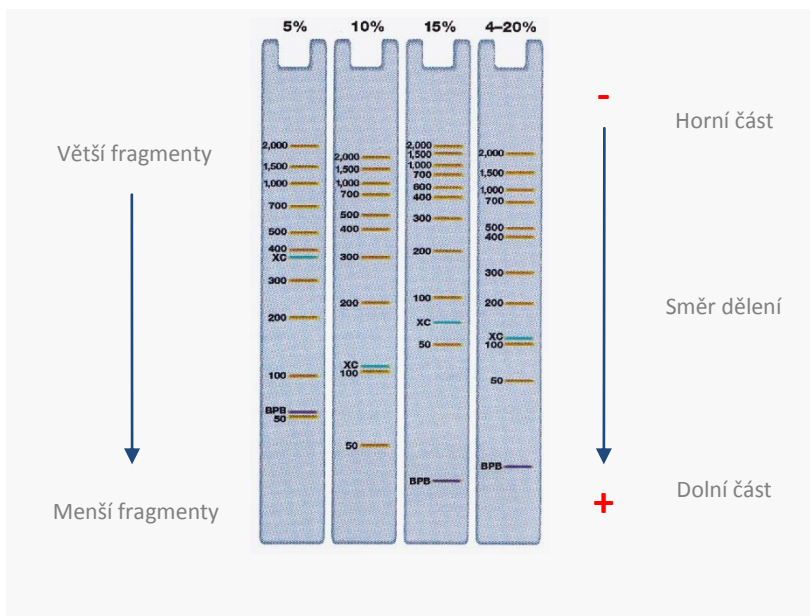
Mnohé ze specifických sekvencí patří mezi tzv. *palindromické* sekvence (palindrom je slovo nebo výraz, které se čte stejně zepředu i pozpátku a dává stejný smysl, např. *radar, kajak, krk, nepochopen, 999* apod.).

Palindromické sekvence v DNA jsou dvojího typu:

- *zrcadlová sekvence*, např. GTAATG, tato sekvence se čte s obou stran stejně na jednom řetězci DNA (jednovláknová DNA), anebo to jsou
- *komplementární sekvence*, které se čtou stejně z obou stran, ale každá na jiném řetězci DNA (dvouvláknová DNA). Tyto sekvence jsou známější a mají větší biologický význam, než zrcadlové sekvence, protože restrikční enzymy se obvykle vážou jako *homodimery* (komplex tvořený dvěma, obvykle nekovalentně vázanými makromolekulami, v daném případě endonukleázami), dochází tak k odštěpení nukleotidových *párů*. Příklady komplementárních sekvencí jsou uvedeny v tabulce na předcházející straně.

K dělení fragmentů DNA se používá *gelová elektroforéza*, která tyto fragmenty rozdělí podle velikosti.

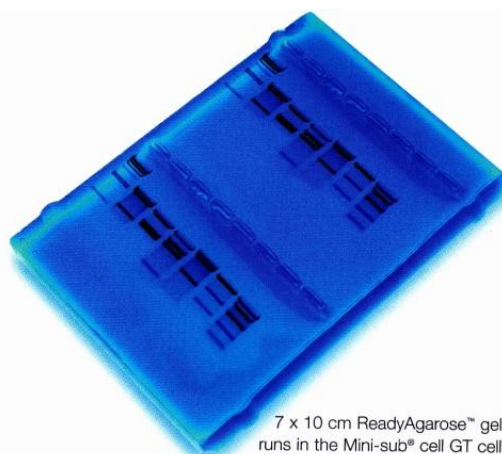
Dělení fragmentů DNA gelovou elektroforézou



Na obrázku jsou ukázány polyakrylamidové gely o různé koncentraci (5%, 10%, 15% a tzv. gradientový gel o koncentraci 4-20%, umožňující dělení fragmentů nukleových kyselin o velikostech od 50 do 1 750 nukleotidových párů. Současně je naznačen způsob dělení jednotlivých fragmentů.

(Propagační materiál fy Bio-Rad).

Vizualizaci fragmentů je možno provést vazbou fluorescenční látky na DNA (fluorescence fragmentů v UV světle, podobná technika je užitá např. v tzv. FISH technice, viz obr na str. 22-13), případně začleněním radioaktivně značených nukleotidů do DNA – např. radionuklidu ^{32}P , který se zavede ještě před štěpením do DNA ve formě fosfátu (*srovnej s tabulkou na str. 22-39, polynukleotidová kináza*). Tento β -zářič lze detekovat např. pomocí autoradiografie (po přiložení fotografického filmu na povrch gelu v něm dochází k expozici způsobené zářením a po vyvolání se objeví obrazce poloh jednotlivých fragmentů, viz. obrázek na str. 22-16). Firma Bio-Rad také používá speciální barvivo DNA, *Fast Blast™* (což je ukázáno na vedlejším obrázku vpravo). Nejobvyklejším postupem vizualizace fragmentů je, jak již bylo zmíněno, *Southern blotting*, který využívá různé typy vizualizace, např. hybridizační sondy.



Kombinacemi štěpení různými endonukleázami se získají různé fragmenty a výsledkem jejich porovnání jsou, jak již bylo také zmíněno, tzv. *restrikční mapy*. Jejich pomocí je možno od sebe odlišit blízkce příbuzné.

Restrikční enzymy sehrály zásadní roli v mapování genomu, v poznávání genového polymorfismu atd. Metoda charakterizace DNA s využitím štěpení homologních molekul DNA endonukleázami na fragmenty, kdy jednotlivé alely jsou charakterizovány velikostí získaných štěpů, je známa jako **RFLP** (*vyslovováno „rif-lip“*, *restriction fragment length polymorphism - délkový polymorfismus restrikčních fragmentů*, resp. *polymorfismus délek restrikčních fragmentů*).

Metoda RFLP, využívající restrikční enzymy, patřila mezi důležité nástroje mapování genomu, lokalizace genů zodpovědných za genetické choroby, určení rizika chorob i paternitních testů. Navíc, byla to první, relativně levná, široce používaná metoda DNA typizace ve smyslu *genetických otisků prstů* (DNA profilování, DNA testování), která našla své uplatnění zejména ve forenzní (soudní) vědě, kde byla nápomocná při identifikaci jedinců pomocí jejich DNA profilů. S rozvojem oboru, zejména technik sekvenování DNA, byly v současnosti zavedeny do praxe lepší metody pro daný účel.

Fragmenty, získané cíleným štěpením restrikčními enzymy, lze využít dále při tvorbě *chimérických* neboli *rekombinantních DNA* a při *klonování*. Celkový počet použitelných endonukleáz je asi 1500. Několik příkladů spolu se zdrojem, štěpenou sekvencí a výslednými štěpy je uvedeno v tabulce na str. 22-10.

Vedle restrikčních enzymů se nacházejí v bakterii i místně specifické *DNA-metylázy*, které metylací chrání DNA před napadením vlastními endonukleázami. V některých případech je naopak metylace pro štěpení endonukleázami nezbytná. Znalost restrikčních endonukleáz citlivých na metylaci se uplatňuje v diagnostických studiích u řady onemocnění.

22.3.3. Chimérická DNA, klonování a rekombinantní proteiny

Štěpy, získané pomocí restrikčních endonukleáz je možno navzájem (cíleně) spojovat různým způsobem, např. s několikrát se opakující sekvencí. Vznikají tak umělé molekuly, které se nazývají *chimérické* [chimaira, ř. – ve starořeckých bájích obluda s částmi těla lva, draka, kozy], případně *rekombinantní* molekuly. Do molekuly lze vnést také konkrétní restrikční místo, jehož pomocí je možno následný fragment snadno izolovat a použít k dalším účelům. Testují se možnosti využití chimérických a plazmidových DNA k léčbě nádorů (tvorba vakcín).

Přípravu velkého množství identických molekul DNA umožňuje *klonování*. Za pomoci *endonukleáz* a *DNA-ligáz* (enzymů spojujících fragmenty DNA, viz tabulka v dodatku na str. 22-38) je v tzv. *klonujícím vektoru* vytvořena chimérická (či *rekombinantní*) DNA, do které je včleněn fragment DNA, který je předmětem zájmu. (*Paul Berg, Nobelova cena za chemii v roce 1980*).

Klonující vektory jsou

- *plasmidy bakterií* (plasmid je malá kruhová dvouvláknová DNA, která má některé vlastnosti velmi vhodné pro vnášení cizích úseků DNA do své molekuly); plasmid není součástí bakteriálního chromozomu a je schopen replikace nezávisle na něm; existuje mnoho druhů plasmidů, některé z nich jsou schopné iniciovat *bakteriální konjugaci* a přenos DNA (viz dále v textu)
- *kosmidy* (plasmidy, do kterých mohou být vneseny velké fragmenty DNA)
- *lineární molekuly DNA fágů* (fágy obsahují obvykle lineární molekulu DNA, do níž může být vložena cizí DNA, na různých místech štěpitelnou restrikčními enzymy).

Po zpětném vložení vektoru (procesem zvaným *transformace*) do hostitelské buňky (tj. bakterie), se s použitím jejích regulačních systémů DNA replikuje, včetně vložené cizorodé části. Tato technika umožňuje přípravu velkého počtu identických molekul DNA, které pak mohou být charakterizovány nebo použity pro další cíle (např. pro výrobu *hybridizačních sond*). Jak bylo uvedeno, takovýto postup se obecně nazývá *klonování*.

Klon je velká populace identických molekul, bakterií nebo buněk, které mají společného předka.

Pokud rekombinantní DNA představuje kompletní gen a jsou-li zajištěny i ostatní nutné podmínky pro syntézu proteinů (ideální případ), je syntetizován (rekombinantní) protein, který může být následně použit např. jako *antigen v imunoanalýze*. Proteinem může ale být i inzulín, faktor VIII apod. (genové inženýrství).

Přenos genů u bakterií je možný trojím způsobem

1. konjugací
2. transformací
3. transdukcí.

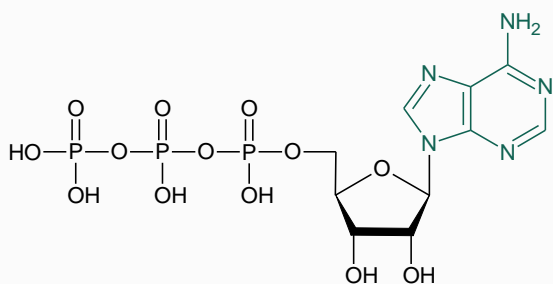
Bakteriální konjugaci mohou být přenášeny geny pouze u bakterií, které obsahují plasmid se schopností iniciovat konjugaci a přenos DNA (např. *E.coli* obsahuje tzv. *F-plasmid*, tj. *fertility plasmid*). Bakteriální konjugace je pochod, kdy dojde k zachycení bakterie druhou bakterií pomocí přívěsku (*pohlavní pilus*) a vytvoření cytoplasmatického můstku, kterým je přenesena do druhé buňky kopie plasmidu. Při tomto přenosu existuje DNA ve své normální formě, tj. ve vazbě s proteiny a nikdy neopouští své přirozené prostředí. U některých bakterií (*E.coli*) je to hlavní způsob přenosu genů.

Transformace je mechanismus přenosu DNA upřednostňovaný některými bakteriálními druhy, jakým je např. půdní bakterie *Bacillus subtilis*. Při tomto způsobu přenosu genetické informace bakterie zachytí fragmenty DNA pocházející z jiných mrtvých a rozbitých bakterií a přenesou je přes svou buněčnou membránu dovnitř buňky. Fragment bývá velmi často *rekombinací* začleněn do genomu bakterie a stává se jeho součástí. Výsledkem může být taková radikální změna, že výsledný efekt dává dojem „transformace“ jednoho bakteriálního kmenu v jiný – odtud název pochodu. Při tomto ději se přenáší *holá DNA*, bez proteinů a mimo své přirozené prostředí. Transformace našla velké uplatnění v laboratorní praxi.

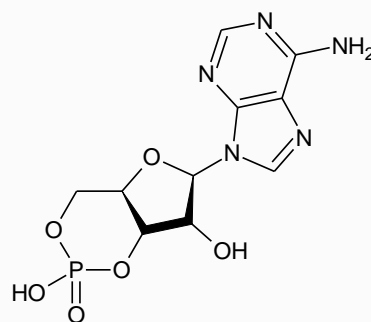
Transdukcce je způsob přenosu genetické informace zprostředkovaný bakteriálními viry, bakteriofágy. Fág injektuje svou DNA do bakteriální buňky a tzv. *místně specifickou rekombinací* začlení svou DNA do bakteriálního chromozomu. Za vhodných podmínek „vyštípne“ svou DNA z rekombinantního chromozomu a za využití syntetického aparátu bakterie se pomnoží. Vyštípnutí se někdy děje nepřesně a součástí DNA fága se stane i část genomu bakterie, která je takto přenášena a množena dál.

Shrnutí: pomocí molekulárních technik (technologie rekombinantní DNA) lze syntetizující aparát prokaryontů (organismů s buňkami s neostře ohraničeným jádrem, tj. bakterií, např. *E.coli*) přinutit produkovat rekombinantní proteiny. Vektory produkující rekombinantní proteiny se nazývají *expressivní vektory*. Tato technika může být využita i k průmyslové výrobě specifických proteinů.

DVA VÝZNAMNÉ NUKLEOTIDY (s cukrem ribózou)



ADENOSINTRIFOSFÁT (ATP)



CYKICKÝ ADENOSINMONOFOSFÁT (cAMP)

22.4. Technologie (hybridizačních) sond

22.4.1. Hybridizační sondy

Hybridizační sondy jsou *krátké úseky nukleových kyselin* označené radionuklidem, chemiluminoforem, haptenem, antigenem nebo enzymem, které jsou schopny se specificky vázat (*hybridizovat*) ke komplementárním sekvencím řetězce nukleové kyseliny, jíž může být jak DNA, tak RNA.

Hybridizační sondy slouží k vyhledávání charakteristických sekvencí nukleových kyselin např. *virů, bakterií, plísní* apod. Specializovaná pracoviště si mohou potřebné sondy vyrábět sama (syntetické oligonukleotidy), mnohé sondy jsou ovšem komerčně dostupné.

22.4.2. Metody založené na technologii hybridizačních sond

Řetězce DNA jsou drženy pohromadě vodíkovými můstky, což jsou relativně slabé vazby, rozrušitelné např. změnou teploty (zahřátím na přibližně 90 °C) nebo drastickou změnou pH. Výsledkem takových činností jsou dvě oddělená vlákna, čili *denaturace* DNA. Pomalým odstraněním příčin denaturace dojde k *renaturaci* neboli *hybridizaci* nukleové kyseliny – vlákna se znovu spojí a dvouřetězcová struktura se obnoví. Je třeba si uvědomit, že hybridizovat mohou mezi sebou libovolné jednořetězcové molekuly nukleových kyselin (DNA/RNA, RNA/RNA, RNA/DNA), samozřejmě pouze v případě, že obsahují komplementární nukleotidové sekvence. Skutečnost, že tvorba dvouřetězcových molekul je podmíněná komplementární nukleotidovou sekvencí, umožňuje *detekci* specifických nukleotidových sekvencí v DNA i RNA. K tomu se právě využívají *hybridizační sondy* se známou sekvencí nukleotidů.

V technologii hybridizačních sond je výsledkem hybridizace *hybrid*, tj. dvouvláknová molekula nukleové kyseliny, složená z jednoho vlákna testované nukleové kyseliny a z jednoho vlákna nukleové kyseliny představovaného (hybridizační) sondou. Jak bylo uvedeno, jednovláknové molekuly mohou být DNA nebo RNA a výsledkem mohou být hybridy DNA-DNA, DNA-RNA nebo RNA-RNA. Nejsou-li jednovláknové molekuly komplementární, hybrid se nevytvoří. Tvorba hybridu je tudíž *důkazem přítomnosti hledané sekvence*.

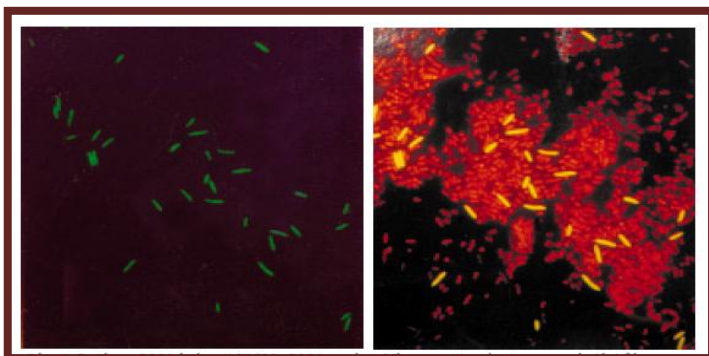
Hybridizace se provádí

- *in situ* [*in situ* = na původním místě, ve své poloze],
- *na pevných nosičích* (membrány z nitrátu celulózy nebo z nylonu) a proces zviditelnění a odlišení od ostatních molekul vyžaduje ještě další analytické techniky. Souhrn těchto technik se nazývá *přenos*. V odborné literatuře se často vyskytuje název „blotování“ (*blotting*). Známé techniky jsou *dot*, *blot* a *slot hybridizace*, *Southernův přenos*, *hybridizace RNA (northern blotting)* a další
- *sendvičová*
- *ve volném roztoku*.

Technika FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

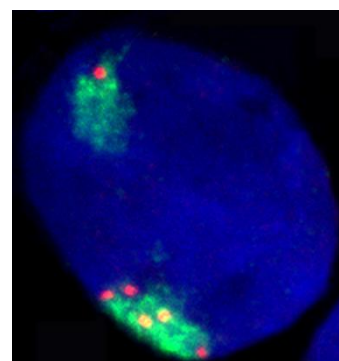
Je technika používaná k detekci sekvencí DNA v chromozomech nebo RNA sekvencí v buňkách při studiu telomer savčích chromosomů, v lékařské diagnostice např. k rozlišení tuberkulózních a netuberkulózních mykobakterií aj. Sondy jsou značené fluoresceinem a možné výsledky testování jsou vidět na obrázku. Metody značení sond jsou různé. FISH technika je kombinací klasické mikroskopie s moderní technikou hybridizačních sond.

Průkaz ribozomální RNA (rRNA) bakterií FISH s PNA sondou.



Vlevo byl použit zelený filtr, vpravo byl použit duální filtr.
O PNA sondách viz dále v textu.

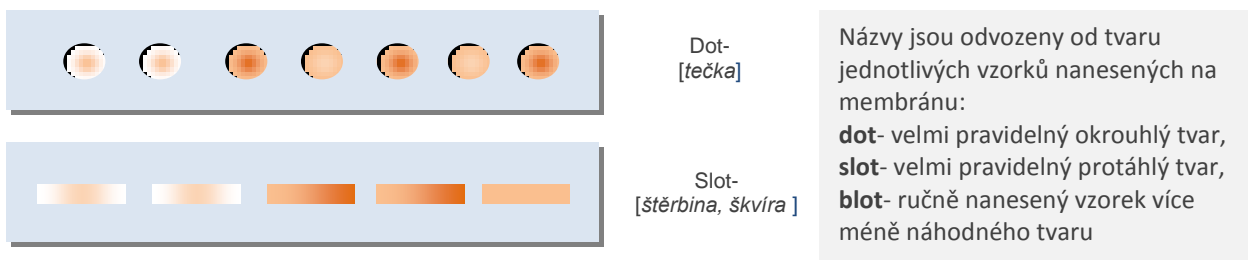
Detekce různých částí genomu.



Amplikony genu *c-myc* (červeně) a teritoria chromozómu 8 (zeleně) u buněk HT29 (DNA modře) - zdroj

Dot /blot /slot hybridizace

Hybridizace na membránách, určená pro detekci nukleové kyseliny upevněné na membráně. Detekce se provádí pomocí značené sondy.



Video viz např.: <http://www.vectorlabs.com/tutorials.display.asp?id=15>

Princip: DNA se extrahuje ze vzorku, denaturuje a naváže se buď adsorpčními silami na nitrocelulóзовou či nylonovou membránu nebo kovalentními vazbami na papír aktivovaný *m-nitrobenzoyloxymethyl bromidem* (srovnej též kapitola 10, str.10-18). K přenosu na pevný nosič se využívá i vakuum nebo elektrický proud (*electroblotting*), je-li pochod sám o sobě pomalý. Nenavázané nukleové kyseliny a proteiny se vymyjí a pevná fáze (papír, nitrocelulóza) se inkubuje se sondou značenou enzymem, radionuklidem apod. Po dalším promytí a inkubaci se substrátem, resp. s využitím jiné vizualizační techniky, se v případě, že hledaná nukleová kyselina je přítomna ve vzorku, objeví barevné body. Pokud byl použit radioaktivní marker, exponuje se *autoradiogram*. Tuto techniku lze použít i pro štěpy nukleových kyselin získaných restrikčními enzymy. (*Dot-, slot- blotting lze použít i pro imobilizaci proteinu a jeho průkaz pomocí značené protilátky*).

Sendvičová (sandwich) metoda

Princip: Používají se dvě sondy: sonda navázaná na pevnou fázi a označená sonda. Analyzovaná nukleová kyselina se nejprve naváže na fixovanou sondu a následně reaguje s označenou sondou. Hodnota měřeného signálu (z označené sondy) je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

Southernův přenos (Southern blotting)

Southernův přenos (a příbuzné techniky viz kapitola 10, str. 10-18) vypovídá jak o přítomnosti, tak o velikosti nukleové kyseliny hybridizující s použitou sondou, protože vlastní fixaci předchází separační technika, nejčastěji gelová elektroforéza, která rozdělí molekuly podle velikosti.

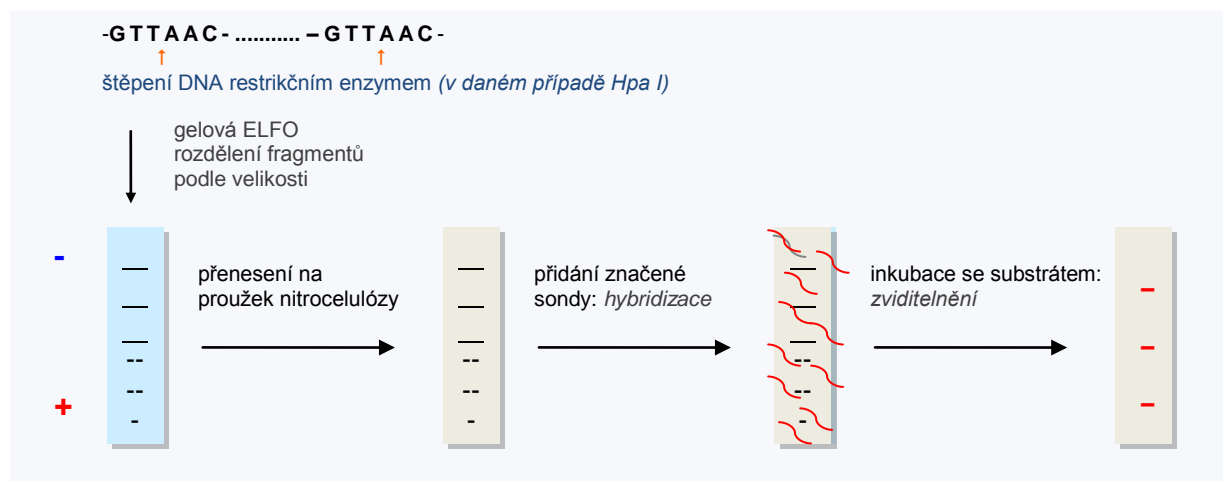
Princip Southernova přenosu: DNA z jaderných tkání je pomocí *endonukleáz* rozdělena na fragmenty, které sice mohou mít různou délku, ale vždy začínají a končí stejnou bází (např. T na začátku a A na konci při použití *Hpa I*, viz tabulka *Endonukleázy* na str.22-9).

Tyto fragmenty se rozdělí podle délky svého řetězce gelovou elektroforézou, přenesou se na nitrocelulóзовý proužek a nechají se hybridizovat spolu s označenou sondou.

Zvolená DNA sonda je komplementární s cílovým fragmentem, tzn., že např. sonda **GATA** se páruje s cílovým fragmentem **CTAT**.

Vizualizace ethidiumbromidem je na obrázku, na str. 22-19

Southernův přenos



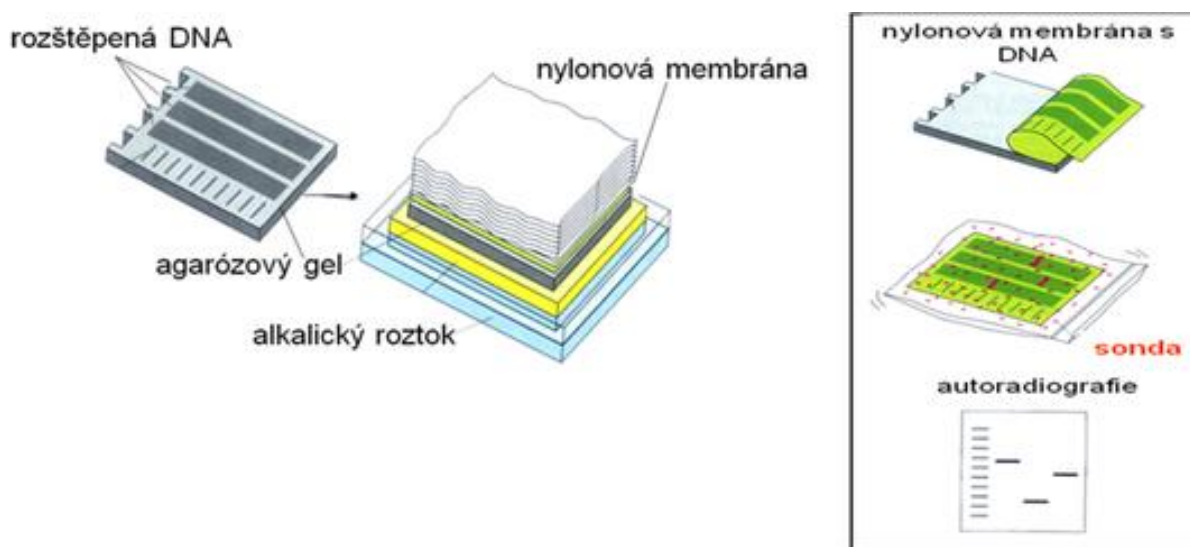
Často se jako sondy vybírají oligonukleotidy se známou sekvencí 15-25 bází. Oligonukleotid **(CAC)₅** má největší individualizační potenciál u lidí, protože **(CAC)₅** „otisky prstů“ (*fingerprints*) jsou různé u všech lidských jedinců, kromě homozygotních dvojčat.

Příbuzné techniky jsou

- *northernový* přenos (pro RNA) a
- *westernový* přenos (pro proteiny)
- *southwesternový* přenos (srovnej též kapitola 13, str. 13 -18) .

Poznámka: Jak již bylo uvedeno v kapitole 13 na str. 13-18, jsou názvy northernový a westernový slovními hříčkami, neboť southern blotting, nazvaný po svém strůjci Edwin Mellor Southernovi v překladu znamená jižní, zmiňované techniky pak severní, západní a jihozápadní (přenos, blotting).

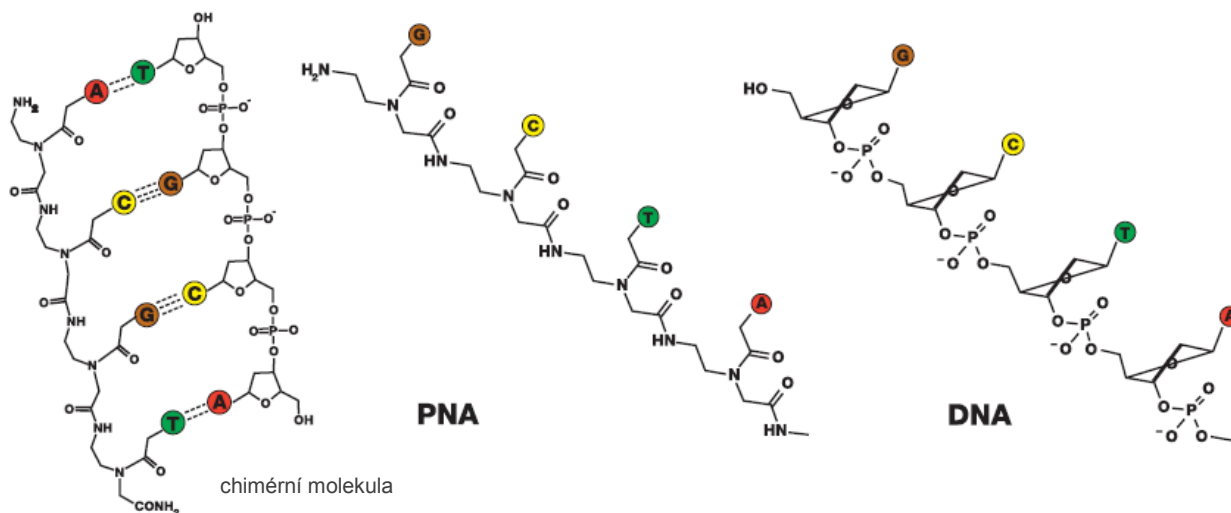
Southernův přenos s radioaktivně značenou sondou



PNA sondy

V roce 1991 byl učiněn zajímavý objev: polymerní molekula *N*-(2-aminoethyl)-glycínpolyamidu může nést purinové a pyrimidinové báze, které se mohou párovat podobně jako v DNA, a to dokonce s ještě vyšší afinitou. Porovnání obou molekul a chimérická molekula PNA-DNA jsou uvedeny na obrázku. Oligomery PNA jsou svými vlastnostmi vhodné pro použití jako hybridizační sondy v různých typech molekulárně biologických laboratorních technik.

Chimérická molekula PNA-DNA (zcela vlevo) a molekuly PNA a DNA



SHRNUTÍ - OBEČNÝ POSTUP PŘI HYBRIDIZACI

Denaturace analyzované nukleové kyseliny, aby poskytla jednovláčkovou sekvenci nukleové kyseliny (působením alkálií či zahříváním, viz též odstavec 20.5.1.), případně ještě působením restrikčních enzymů

Výběr sondy s odpovídající cílovou sekvencí.

Sondy mohou být

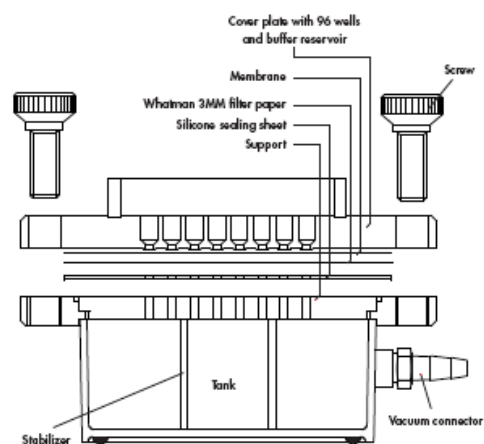
- **syntetické** (oligonukleotidy),
- **klonované** (rekombinanty), nebo to mohou být
- označené jednovláčkové **genomické sekvence**

Aplikace vhodné techniky, tj.

- **hybridizace na membránách** (dot, blot, slot, Southernovo blotování apod.),
- **sendvičová hybridizace**,
- **hybridizace ve volném roztoku** a následná separace hybridů od volné sondy např. pomocí hydroxylapatitu.



Zařízení pro dot-blotting pomocí vakua
Bližší podrobnosti viz na www.biometra.com



Princip funkce blotovacího zařízení

22.5. Amplifikační techniky

Současné možnosti molekulárně-biologické diagnostiky by nebyly možné bez rozvoje amplifikačních metod. Často se stává, že cílová nukleová kyselina není přítomna v množství postačujícím pro genetické studie či detekci mikroorganismů. Proto, aby se zvýšila analytická citlivost, musí být nukleová kyselina specificky replikována, tj. zmnožena, případně musí být zesílen (amplifikován) detekční signál. K replikaci nukleové kyseliny, kromě klonování, tedy slouží i amplifikační metody.
[amplificare, l. = rozšířit, zvětšit]

Rozdělení amplifikačních metod:

Amplifikace sekvencí nukleových kyselin

(*Target Amplification*; target, angl. = cíl, plán, úkol; vyslov [táɡe.ti])

- PCR (Řetězová polymerázová reakce)
- LCR (Řetězová ligázová reakce)
- LDR (Detekční ligázová reakce)
- LAR (Ligázová amplifikační reakce)
- RT-PCR (reverzně transkripční PCR)
- NASBA, 3SR (*Self-sustained sequence replication*)
- TAS (transkripčně-amplifikační systém)
- TMA (*Transcription Mediated Amplification*)
- SDA (*Strain Displacement Amplification*)
- **Amplifikace hybridizační sondy**
 - Q-beta replikázová amplifikace
- **Amplifikace signálu**
 - bDNA (*Multiple Sandwich Assay = branch DNA Assay*)

Amplifikační metody

Amplifikace sekvencí nukleových kyselin

Amplifikace hybridizační sondy

Amplifikace signálu

22.5.1. Amplifikace sekvencí nukleových kyselin

Řetězová polymerázová reakce (PCR)

Ze jmenovaných metod je PCR metodou nejužitečnější a nejužívanější. Na počátku 80. let minulého století objevil Kari Mullis z americké firmy *Cetus Corporation* polymerázovou řetězovou reakci (*Polymerase Chain Reaction, PCR*, Nobelova cena z roku 1994), což je metoda pro enzymovou syntézu **sekvencí DNA in vitro**, přesněji, je to metoda zmožení **určité sekvence DNA**.

Reakce využívá přirozené vlastnosti DNA vytvářet (z přítomných aktivovaných bází za přispění polymerázy) dvoušroubovici párováním komplementárních bází nukleotidů, k již přítomnému řetězci nukleotidů. Kromě ostatních nutných ingrediencí musí být v reakční směsi přítomny dva syntetické řetězce (*primery*; vyslov: *prajmry*), komplementární s oblastí (na obou vláknech DNA) sousedící s úsekem, který má být amplifikován.

Po rozdělení dvojlákna DNA, navážou se primery do těchto komplementárních sekvencí (hybridují) a ohraničují žádanou oblast. Každé vlákno je pak kopírováno polymerázou počínajíc od primeru (primer se prodlužuje kopírováním úseku testované DNA). Tento proces se opakuje do vytvoření dostatečného množství materiálu, tj. segmentů DNA o definované délce a sekvenci, který se dále testuje fyzikálně-chemickými metodami. PCR umožňuje množit sekvence DNA o délce od 50-100 párů bází do 2,5 tisíce párů bází.

Vše je patrné ze schématu na str. 22-19.

Analýza nukleových kyselin pomocí PCR sestává ze tří kroků:

- separace nukleové kyseliny z biologického vzorku
- vlastní PCR
- oddělení a identifikace cílové (*target*) sekvence nukleové kyseliny

Separace nukleové kyseliny z biologického vzorku: vzorek se homogenizuje, lyzují se buňky nukleová kyselina se získá extrakcí nebo sorpcí na sorbenty ve speciálních zkumavkách (viz též odst. 22.3.).

Vlastní PCR:

- DNA se **zahřeje** na optimálně 95 °C (toleranční rozpětí je 92 – 98 °C), teplota se udržuje po dobu 15 – 60 sekund (podle velikosti fragmentů); tepelnou denaturací dojde k rozštěpení dvojlákna na dvě jednoduchá vlákna, tzv. templátové nebo matricové molekuly DNA (1. cyklus na obrázku)
- při **ochlazení** na teplotu 50 - 55 °C se na hledané cílové sekvence rozpojeného dvojlákna DNA napojí komplementární syntetické *primery*, neboli *oligonukleotidové sondy*, které řídí syntézu nových vláken (na obrázku „Hybridizace primerů...“)
- **znovu zahřátí**, tentokrát na 72 °C (rozpětí 70 – 74 °C, pro některé případy až 80 °C), tepelně odolná DNA-polymeráza (např. *Taq* z bakterie *Thermus aquaticus* jejíž životní optimum je 70 - 80 °C) dosyntetizuje (z aktivovaných bází) od primeru k vláknům DNA chybějící komplementární část a dosyntetizovaná vlákna se znovu spojí do dvojlákna; reakce trvá 1– 15 minut (na obr. „Syntéza DNA...“)



LightCycler® 1.5 fy Roche

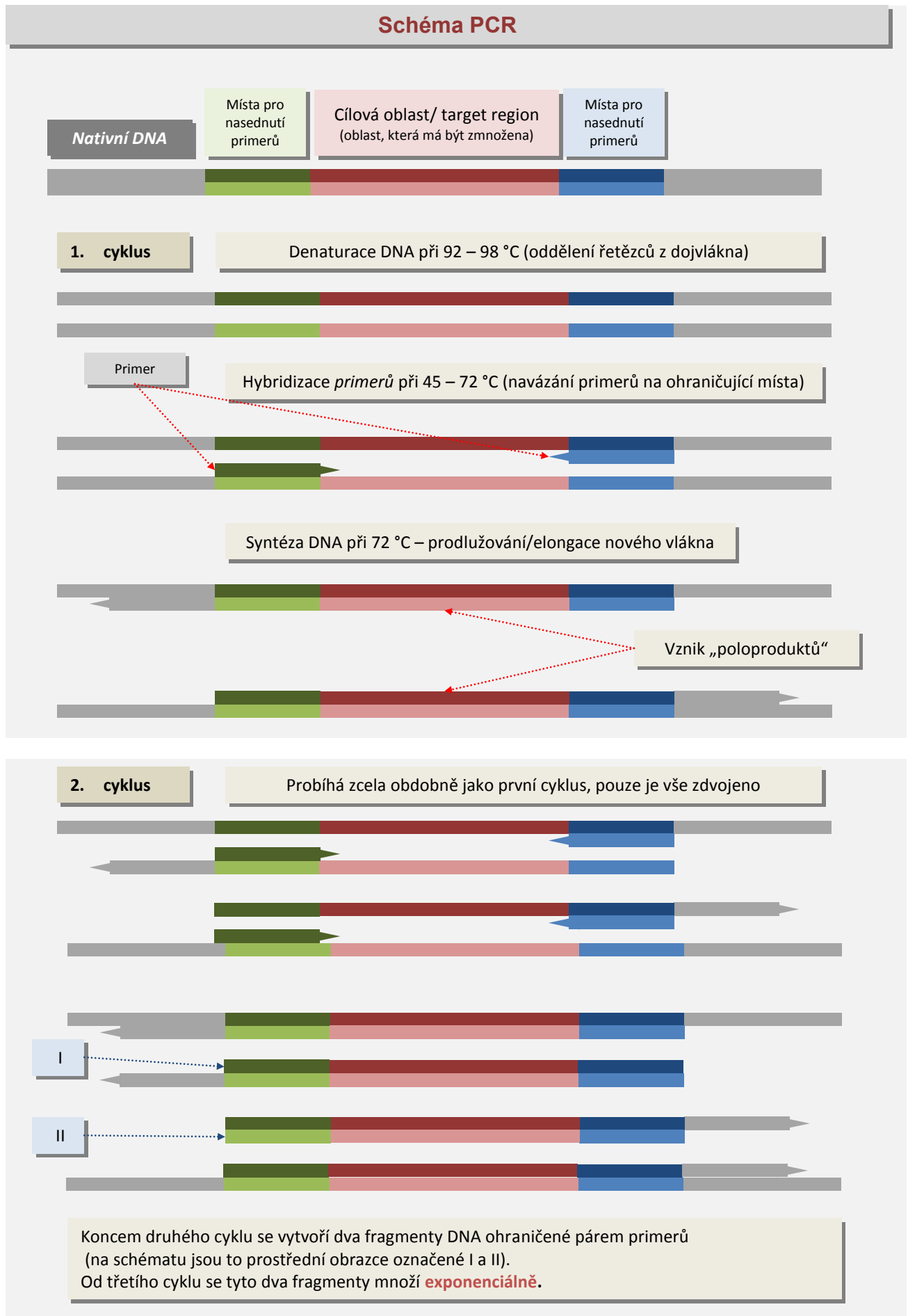
Pro rychlou PCR v reálném čase. Umožňuje kvantifikaci genové exprese, detekci SNP (polymorfismus sekvencí lišících se pouze v jedné bázi, viz též str. 22-23).

Je určen pro diagnostické aplikace, lze užít i v biologickém výzkumu, při analýze potravin a v soudních a jiných laboratorních disciplínách, kde se vyžaduje použití PCR.

Princip činnosti přístroje je na obrázku na str. 22-23.

Existuje několik modifikací přístroj LightCycler (více podrobnosti na stránkách Roche Diagnostics.cz, nebo Roche.com

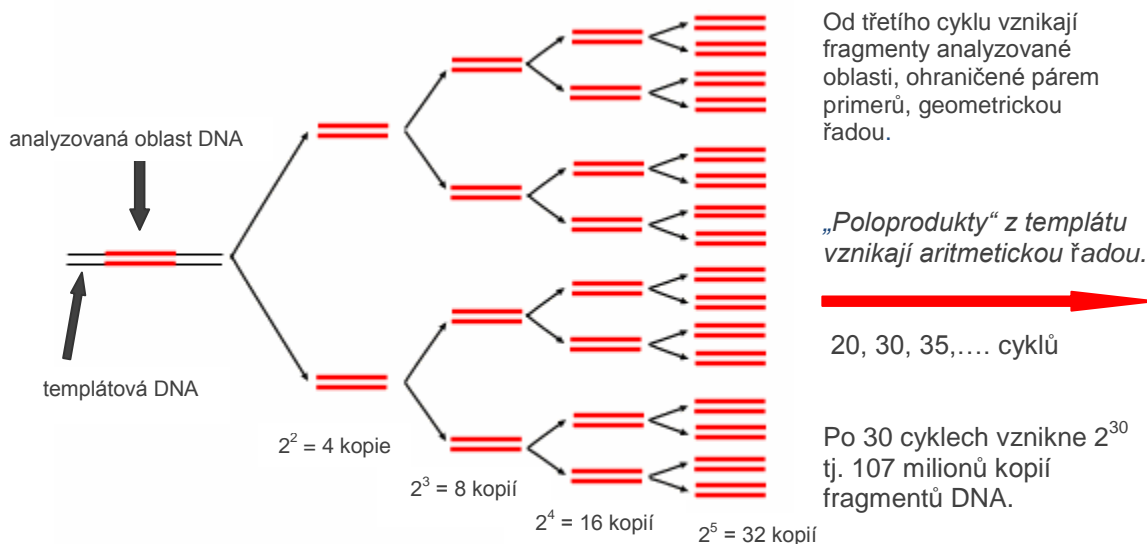
Schéma PCR



Poznámka: V prvním kroku syntéza pokračuje až za cílovou oblast, ale v následných krocích se množí převážně úseky mezi dvěma primery (lze se myšlenkově přesvědčit s kouskem papíru a tužkou v ruce, nebo podle obrázku - 2. cyklus, I. II)

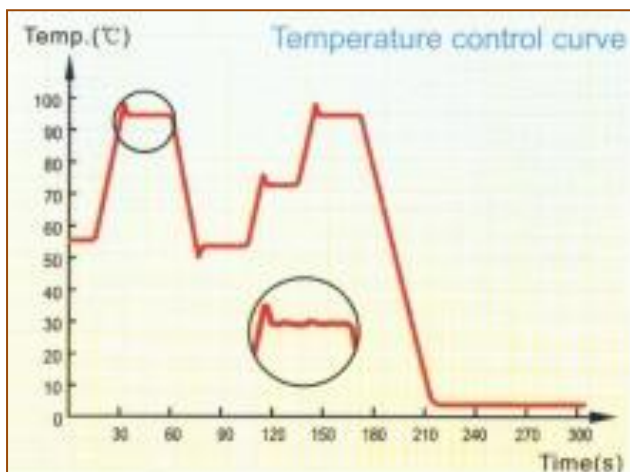
Incubační směs obsahuje vzorek, polymerázu, aktivované báze (směs nukleotidtrifosfátů čtyř bází – adeninu, guaninu, cytosinu a thyminu) a nezbytné kofaktory (především KCl a MgCl₂). Celý cyklus se opakuje 15 – 30x. Úplná replikace cílové sekvence nukleové kyseliny trvá asi hodinu, původní počet cílových sekvencí se zmnoží (amplifikuje) na 10⁶ až 10⁹. Namnožené úseky DNA se nazývají *amplikony*. Zde je zřejmé, že kritickým bodem je příprava vzorku. Je nutno zajistit, aby amplifikovaná molekula byla právě jen ta sledovaná a nikoliv jiná, zavlečená do reakce náhodně. Opakovatelnost a kontrola kvality (positivní a negativní kontroly) jsou základními podmínkami PCR.

Exponenciální růst cílové sekvence v PCR



Spoustu názorných obrázků PCR lze „vygúglovat“ např. [zde](#). Video PCR [zde](#).

Přístrojem pro PCR je *termocykler*, který musí zaručovat dokonalé fázování a opakování cyklů velmi rychlého zahřívání, chlazení a držení naprogramovaných teplot.



Řídící teplotní křivka přístroje Termocykler Porter

Na obrázcích na další straně jsou ukázány malé přístroje MyCycler Thermal Cycler a MJ Mini Thermal Cycler firmy Bio-Rad. Na obrázku na str. 9-21 je schéma přístroje LightCycler[®] firmy Roche.

MyCycler Thermal Cycler a MJ Mini Thermal Cycler firmy Bio-Rad



MyCycler Thermal Cycler



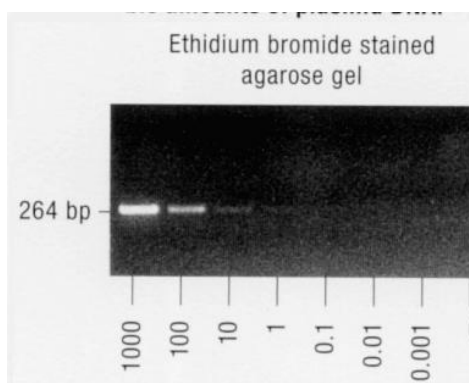
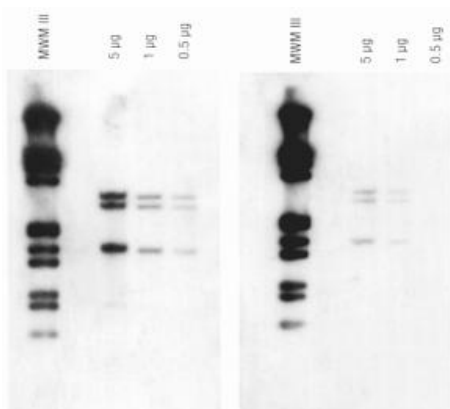
MJ Mini Thermal Cycler

Oddělení a identifikace cílové sekvence nukleové kyseliny

se provádí buď elektroforeticky s následným vybarvením frakcí, nebo se k jejímu oddělení z reakční směsi využívají *biotinylované primery* s avidinovým můstkem a *hybridizační sondy*. Poté následuje dělení elektroforézou nebo techniky *sendvičové ELISA*. Primery mohou být značeny radionuklidem, fluoroforem i jinak a k detekci se využívá autoradiografie nebo fluorimetrie. Hybridizační sondy slouží často jak k oddělení hledané látky, tak k potvrzení (konfirmasi) její identity.

Často užívanou technikou pro identifikaci produktů PCR je **gelová elektroforéza**, a to na gelech agarózy (obvykle 2% gel) nebo polyakrylamidu (4-6% gel). V řadě případů lze produkt oddělit gelovou elektroforézou a zviditelnit vybarvením zón stříbrem (výsledkem jsou červené zóny) nebo ethidiumbromidem (zóny v UV světle fluoreskují).

Ukázka výsledku gelové elektroforézy (vlevo) a vizualizace ethidium bromidem po agaroforéze (vpravo)

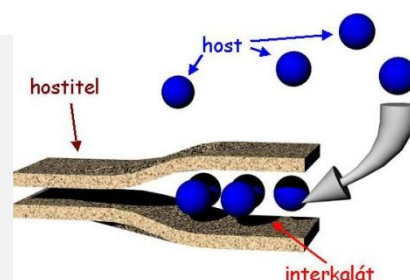


Vizualizace ethidium bromidem

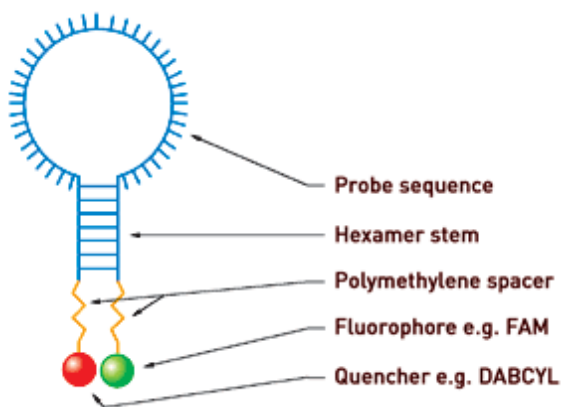
Real time PCR, řetězová polymerázová reakce v reálném čase

PCR v reálném čase umožňuje *bezprostřední* kvantifikaci buď pomocí barviv (používají se tzv. *interkalační barviva*, tj. např. ethidium

Termín *interkalace* označuje proces při němž je molekula nebo ion (host) umísťován do hostitelské mřížky. Struktura hostitelské části zůstává v komplexu host-hostitel neboli v interkalační sloučenině (interkalátu) stejná nebo pouze mírně odlišná od původního hostitele. Probíhající interkalace bývá chemicky nebo termálně reverzibilní. Často jsou používány pro interkalační reakce i jiné pojmy jako inzerce, inkluze, nebo topotaktická reakce, ale všechny spadají do výše uvedené definice. Interkalační chemie tak patří k jedné z oblastí supramolekulární (česky někdy též nadmolekulární) chemie. <http://www.upce.cz/fcht/slchpl/vyzkum/interkalacni.html>



bromid), kdy se barvivo dostane mezi dvě vlákna DNA a v této formě intenzivně fluoreskuje (viz obrázek na předchozí straně), kdežto mimo tato vlákna je fluorescence barviva mizivá. Další způsob je pomocí *fluorescenčně značených oligonucleotidových sond*, které hybridizují určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikované oblasti a při této činnosti zvyšují svou fluorescenční aktivitu. Je to umožněno tím, že kromě fluorescenční látky je na sondu navázána další molekula, tzv. *quencher* (zhášecí molekula), která, pokud je v blízkosti fluorescenčního barviva, potlačuje jeho fluorescenci/aktivitu. Po hybridizaci, tj. rozvinutí původně svinuté molekuly, se *quencher* od barviva oddálí a tím mu umožní se projevit. Vše je zřejmé z následujících obrázků:



Oligonukleotidová sonda značená fluoroforem

Vysvětlivky:

probe = sonda

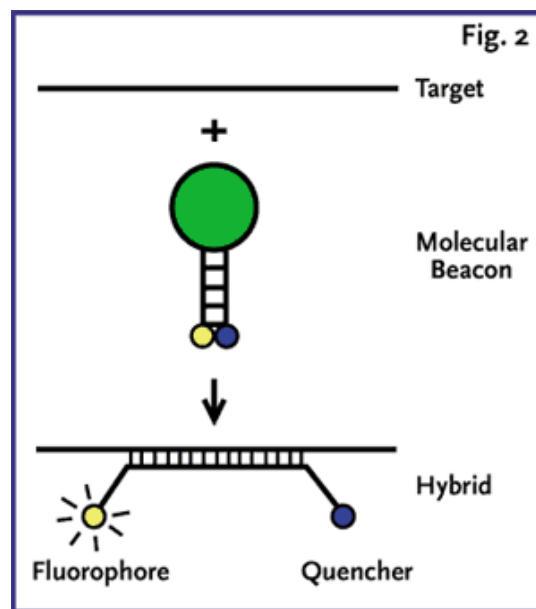
stem = stonek, stopka, nožka

spacer = rozpěrka, vymezovač, distanční vložka

e.g. = např. (FAM a DABCYL jsou konkrétní látky)

beacon (obr. vpravo) = maják, světelná bóje

target = cíl



Princip funkce oligonukleotidové sondy

Mnohonásobná čili multiplexní real time PCR

Výraz *multiplexní* vyjadřuje skutečnost, že je v jedné kyvetě současně amplifikováno několik odlišných úseků DNA. Používá se několik párů primerů s odlišnou specifitou. Smyslem je současná detekce několika úseků nukleových kyselin, např. současná detekce více druhů mikroorganismů, společná detekce cílového genu apod. Tato forma PCR šetří čas a náklady na analýzu. Detekce je možná využitím oligonukleotidových sond příslušných konkrétní amplifikované oblasti, přičemž každá příslušná sonda je označena jiným fluoroforem a fluorofory se vzájemně liší emisními spektry. Jednotlivé emise jsou odečítány v příslušných „kanálech“ a platí teze „jeden kanál – jeden cíl (*target*)“. Toto paradigma (*vzor, příklad, model, určitý vzor vztahů, vzorec myšlení*) je překonáno novými technikami, o nichž bude zmínka v Dodatku. Multiplexové analýzy se již osvědčily v medicínské praxi (např. během pandemie chřipky způsobené v roce 2009 virem H1N1, při genotypizaci BCR-Abl u leukemie dospělých a při detekci příčinných/kausálních patogenů sepse). Multiplexové analýzy však přinášejí i některé problémy a jsou určitým způsobem omezeny. Problémem jsou např. nespecifické amplifikace.

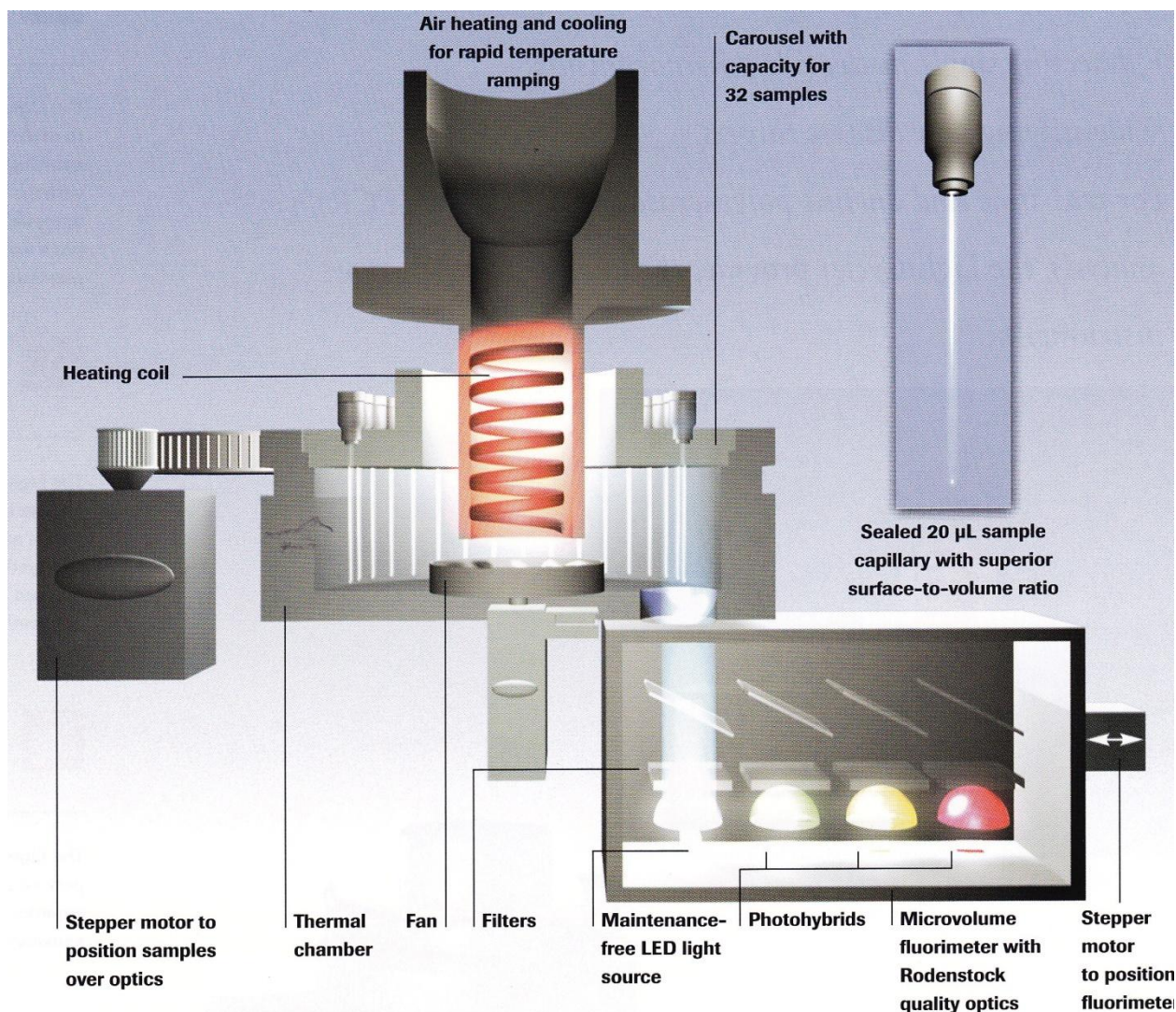
PCR je vysoce citlivá metoda náchylná k přenosu (*carry over*) rozmnožených cílových sekvencí z jednoho vzorku do druhého, pracuje se proto v oddělených prostorách (příprava vzorku, vlastní PCR a identifikace cílové sekvence nukleové kyseliny), ve flow-boxech, s různým personálem. Místnosti i přístroje jsou průběžně sterilizovány gama-zářením, UV-zářením příp. chemickými prostředky. Existují i jiné prostředky na potlačení kontaminace, např. záměna aktivovaného thyminu v reakční směsi za aktivovaný uridin, což spolu s enzymem uracil-N-glykosylázou znemožňuje replikaci „nesprávné“ nukleové kyseliny s kyselinou obsahující uridin.

Metoda (PCR) dovoluje namnožit a analyzovat (úseky) DNA z jediné buňky, z vlasového váčku nebo spermatu. Z toho je zjevné její využití v soudním lékařství.

Řetězová reakce se také používá

- k detekci infekčních agens
- v prenatalní genetické diagnostice
- k detekci alelického polymorfismu (amplifikace u metod RFLP, VNTR, STR, viz odstavec 22.4.)
- k přesnému určení typu tkáně pro transplantaci
- ke studiu evoluce s použitím DNA z archeologických nálezů
- v základním výzkumu
- další oblasti jejího využití se jistě ještě objeví.

Schéma přístroje *LightCycler*[®] firmy Roche (se čtyřmi „kanály“ pro jednotlivá světla)



Slovník k obrázku:

Heating coil = topná spirála

Stepper motor to position samples over optics = krokový motor k posunu vzorků nad optiku

Thermal chamber = vyhřívaná komůrka

Fan = větrák

Photohybrids = fotonásobiče

Maintenance-free LED light source = bezúdržbový LED zdroj světla

Microvolume fluorimeter = mikroobjemový fluorimetr

Stepper motor to position fluorimeter = krokový motor pro nastavení fluorimetru

Sealed 20 µL sample capillary with superior surface-to-volume ratio = utěsněná 20 µL vzorková kapilára s vynikajícím poměrem povrch/objem

Carousel with capacity for 32 samples = karusel s kapacitou pro 32 vzorků.

Air heating and cooling for rapid temperature ramping = ohřívací a chladicí vzduch k rychlému nastavení teploty

Existuje řada modifikací PCR:

- „nested“ PCR, [nested = vnořená smyčka, vnořený cyklus], kdy templátem je produkt reakce předcházející
- asymetrická PCR (umožňuje syntézu jenom z jednoho vlákna z dvojice vláken DNA)
- SSPR (*single strand producing reaction* = reakce produkující jednotlivé/jednoduché řetězce)
- již zmíněná multiplexová reakce používaná k testování mnoha delecí a bodových mutací v jedné amplifikační reakci
- analýza heteroduplexů používaná k detekci mutací genetických onemocnění
- AS-PCR (alelově specifická PCR) pro detekci bodových mutací a malých delecí
- ARMS (amplifikační refrakční mutační systém) – varianta AS-PCR se stejným použitím
- PSM (*PCR – mediated site directed mutagenesis*, zprostředkovaná řízená mutagenese během PCR), metoda pro identifikaci specifických alel umělou změnou sekvence (dojde k vytvoření nového nebo zániku původního restriční místa pro endonukleázu) během PCR
- RACE, metoda rychlé amplifikace cDNA konců pomocí PCR
- a některé jiné.

Podrobnosti o těchto a jiných metodách viz např. na adrese <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>

Řetězová ligázová reakce (LCR, LAR) a ligázová detekční reakce (LDR)

Řetězová ligázová reakce je alternativní amplifikační technikou k PCR. Je určena k detekci stopových množství DNA o známé sekvenci. Původně byla (v roce 1980) popsána jako *ligázová amplifikační reakce* (LAR). Je to amplifikační metoda určená především pro automatizaci. Může se kombinovat s PCR či jinými metodami a může být přímo použita k detekci bodových mutací (LDR).

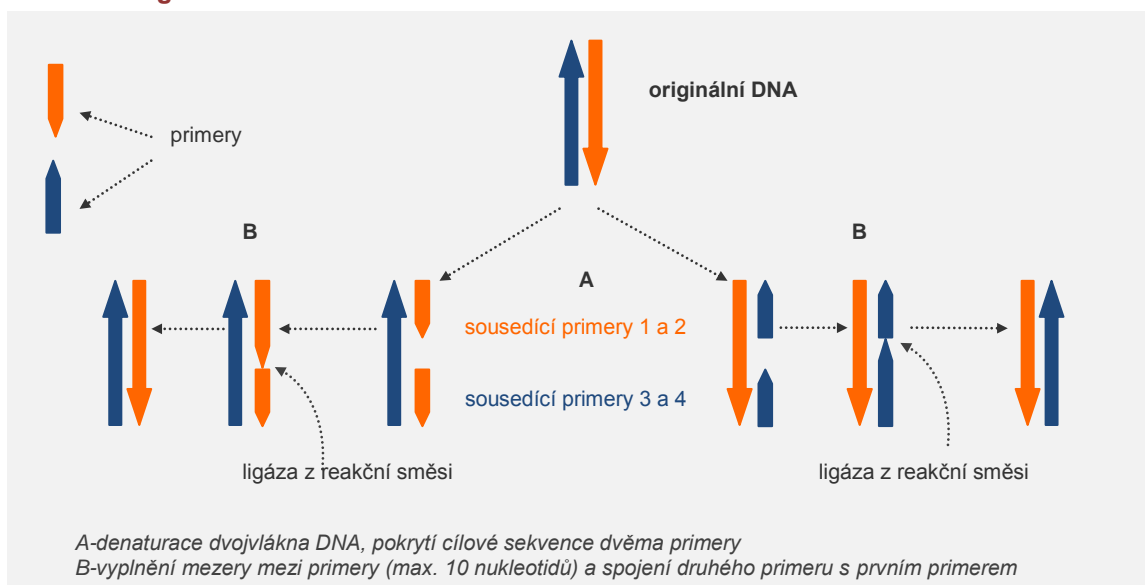
Hlavní charakteristiky LCR ve srovnání s PCR jsou:

- PCR používá dva primery, aby získala tři části informace
 - přítomnost cílové sekvence
 - délka sekvence
 - sekvence mezi primery
- LCR používá čtyři primery, aby získala dvě části informace
 - přítomnost sousedící cílové oblasti
 - perfektní komplementaritu primerů na jejich vazebných stranách

Princip: LCR vychází z replikace DNA *in vivo*, tj. jak probíhá v živém organismu, konkrétně z principu otálejícího řetězce (viz obr.na str. 22-5.). K pokrytí cílové sekvence DNA se použijí dva sousedící páry primerů. Každý z těchto primerů je komplementární k jednomu vlákně DNA. Po navázání primerů na vlákno DNA a dosyntetizování asi 10 nukleotidů ve směru 3'→5' (vyplnění mezery mezi primery) spojí ligáza přítomná v reakční směsi vždy druhý primer z obou párů primerů s prvním. Spojené páry primerů tvoří základ pro další replikaci, což vede k exponenciálnímu nárůstu cílové sekvence.

Na obrázku je znázorněna první fáze LCR, kdy z původních dvou vláken DNA vznikají čtyři vlákna.

Řetězová ligázová reakce



Aby ligáza mohla spojit sousedící primery, je potřeba, aby na místě spojení primerů bylo dokonalé párování bází. Tato reakce je vhodná k detekci okamžitých množství DNA, tj. virů a bakterií.

Podmínka dokonalého párování bází v místě spojení primerů ligázou, pro úspěšné proběhnutí LCR, může být využita pro *detekci bodových mutací* (LDR). V tomto případě se v oddělených reakčních směsích používají primery s „divokou“ tj. přirozenou a „mutantní“ sekvencí. Mutantní sekvence primeru se může párovat pouze s mutantní sekvencí testované DNA a divoká sekvence primeru se může vázat pouze s divokou sekvencí testované DNA. V rutinní praxi se primery spojují pomocí „můstku“ (jako je biotin a podobné látky) s fluorescenčními barvivy, takže navázaný produkt může být elegantně detekován.

Poznámka: MUDr. Emil Pavlík, z jehož článků uveřejněných v časopise Labor Actuell fy Roche bylo v této práci také čerpáno, řadí LAR do amplifikačních technik hybridizačních sond: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – část 6, MUDr. Emil Pavlík, Univerzita Karlova, 1. LF UK, Ústav pro lékařskou mikrobiologii Praha; viz též poznámka I na str. 22-32. Faktem je, že takto se dá namnožit cílová sekvence pro hybridizační sondu.

Reverzně transkripční řetězová polymerázová reakce (RT-PCR)

PCR amplifikuje DNA, přitom řada virů má pouze RNA a PCR v předložené podobě nelze použít. Pro přímý průkaz virů byla vyvinuta RT-PCR, která využívá vlastností enzymu *reverzní transkriptázy* získané z retrovirů: tento enzym „umí“ přepsat RNA do DNA, označované cDNA (*copy*DNA). Je to polymeráza závislá na RNA a použije-li se mRNA (viz str. 22-7) jako sonda, je možné přepsat (kopírovat, *copy*) mRNA

do dvouvláknové cDNA. Po tomto přepisu následuje PCR. Reverzní transkriptáza je využita i v jiných technikách, např. v dále popsaných NASBA/3SR aj.

Transkripčně-amplifikační systém (TAS, *Transcription-based Amplification System*)

TAS je metoda vyvinutá pro detekci *charakteristické oblasti RNA viru HIV-1*. V první fázi reakce se pomocí reverzní transkriptázy syntetizuje podle virové RNA komplementární řetězec DNA (cDNA), který pak slouží jako templát pro syntézu (transkripci, přepis) RNA, což je umožněno RNA polymerázou z bakteriofága. Bylo popsáno, že tato technika umožňuje zjistit jednu infikovanou buňku v populaci 10^6 neinfikovaných buněk.

Self-sustained sequence replication (NASBA, 3SR)

- **NASBA** = *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

- **3SR** = *Self-sustained sequence Replication* (sebepodporující, autopodporující, sekvenční replikace)




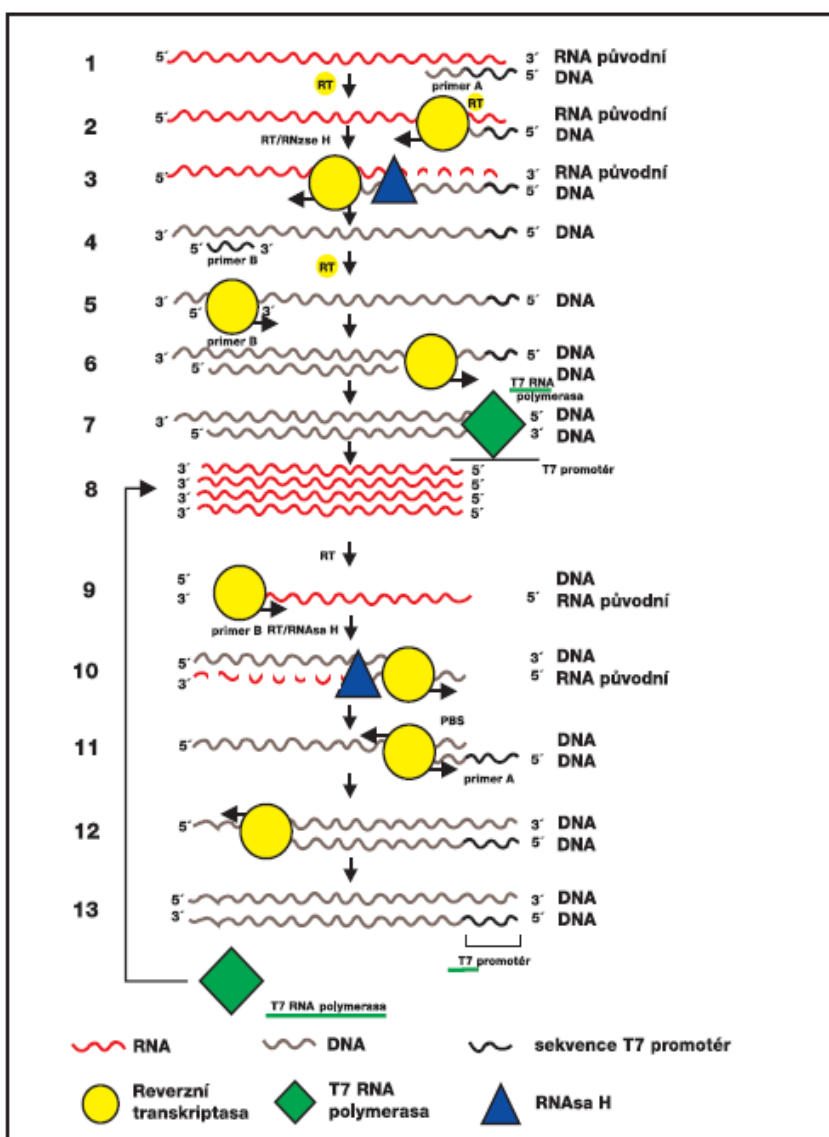
Jedná se v principu o stejné techniky pocházející ze dvou nezávislých zdrojů. V podstatě jde o přírodní replikační proces retrovirů realizovaný *in vitro*. Je to metoda určená především k amplifikaci RNA, ale dá se použít i pro amplifikaci DNA. Jak je vidět z následujícího obrázku (viz dále odkazy na tento obrázek vpravo vedle něho), akce se zúčastňují tři enzymy, a to  reverzní transkriptáza,  T7 RNA polymeráza a  RNáza H.

Schéma NASBA/3SR



Krok 1 a 2:

Cílová RNA (červená vlnovka) je reverzní transkriptázou s využitím primeru A přepisována do cDNA (černá vlnovka)

Krok 3:

Další enzym, RNáza H, současně destruuje původní (cílovou) RNA (rozpadlá červená vlnovka)

Kroky 4, 5 a 6:

Reverzní transkriptáza, která má polymerázovou aktivitu, syntetizuje, s využitím primeru B (krátká černá vlnovka vlevo dole u č. 4), komplementární vlákno k DNA .

Kroky 7 a 8:

Tato DNA má cílovou sekvenci RNA, ze které třetí enzym, T7 RNA polymeráza může (s T7 promotérem) syntetizovat mnoho nových kopií RNA.

Kroky 9 až 13:

Tyto nové kopie jsou opět převedeny na cDNA atd.

Takto může dojít během 2-3 hodin k nárůstu 10^{12} (bilionkrát zvětšené množství startovního materiálu, tj. RNA, což je cílem této techniky.

TMA (*Transcription Mediated Amplification*).

Jedná se o amplifikaci ribozomální RNA (rRNA) optimalizovaným postupem 3SR zvaným TMA. Detekce produktu se provádí chemiluminiscenčně. TMA je produktem firmy *Gen Probe Inc., San Diego, California USA*, která dodává soupravy na tomto principu pro stanovení mykobakterií a chlamydií. Metoda je rychlá a robustní, proti PCR poněkud dražší.

SDA (Strain Displacement Amplification)

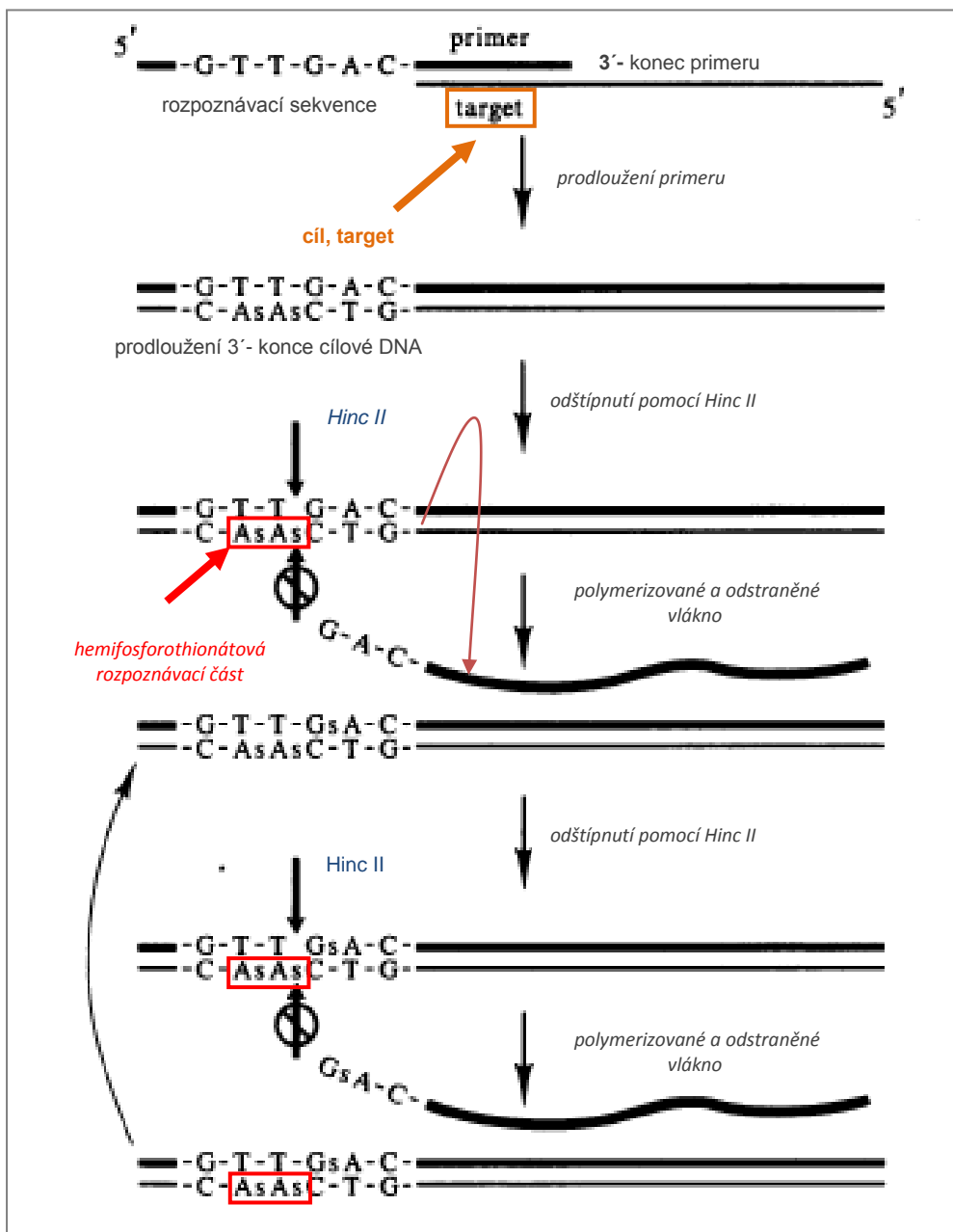
Metoda vyvinutá pro stanovení *Mycobacterium tuberculosis* je založena na dvou klíčových skutečnostech:

- schopnosti restričních enzymů (endonukleáz, viz tabulka na str. 22-9) vyštípnout z DNA specifickou cílovou sekvencí (*target*)
- schopnosti DNA-polymeráz tuto vyštípnutou oblast dosyntetizovat (opravit).

Překlad názvu metody do češtiny, snad *amplifikace s odstraňováním řetězce*.

V této technice se amplifikuje pouze jedno vlákno. Ve vlastní reakci je třeba obejít skutečnost, že endonukleáza obvykle tvoří dvouřetězcové štěpy DNA (v tomto případě by ovšem nevznikla matrice pro novotvořený řetězec, bylo by nutno dvoušroubovice denaturovat, jako na počátku reakce). Řeší se to tak, že při syntéze nového řetězce se do směsi přidají nukleotidy *substituované v poloze 5' sírou*, takže vzniká *alfa-thio-substituovaný nukleotid*, který endonukleáza *neumí přečíst* a z vytvořené dvoušroubovice odštípne pouze jeden řetězec (bez thio-nukleotidu). Principiální schéma k pochopení reakce je uvedeno na následujícím obrázku.

Základní reakční schéma SDA



Jednovláknový (**cílový, target**) fragment DNA a primer se hybridují na svých komplementárních 3'- koncích. Oba konce 5'- přesahují, konec primeru nese rozpoznávací sekvenci (**GTTGAC**) pro endonukleázu *Hinc II*. DNA polymeráza I prodlužuje 3'- konec primeru i 3'- konec cílového fragmentu DNA (tj. dochází k replikaci DNA), přičemž jsou v reakční směsi přítomny 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (**dCTP, dGTP aTTP**) a **deoxyadenosin 5'-[alpha-thio]trifosfát (dATP[αS])**, takže výsledný dvojitý řetězec obsahuje v nově vytvořené rozpoznávací části pro endonukleázu thiosloučeninu (As), tzv.

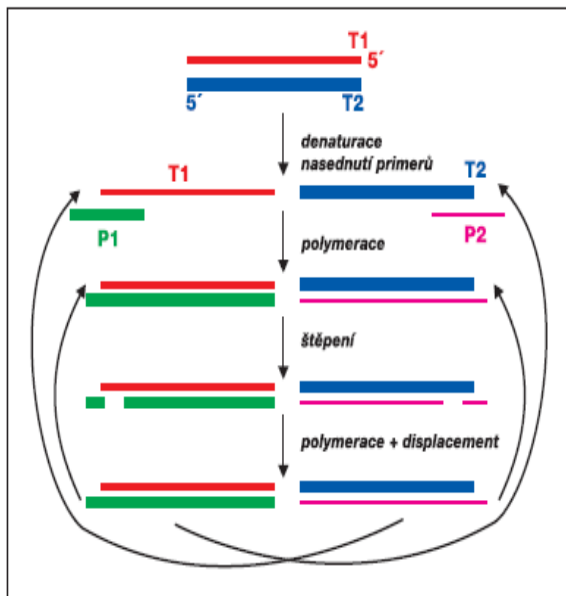
hemifosforothionátovou rozpoznávací část.

Tato struktura nemůže být endonukleázou *Hinc II* rozpoznána a je proto odštípnut (*nick*) a odstraněn nechráněný řetězec primeru. Spodní řetězec (na obrázku představovaný tenčí linkou) s As zůstává netknutý.

Zbývá horní část původního primeru je opět DNA polymerázou

dosyntetizována (od 3'- konce v místě stříhu), takže vzniká, kromě celého fragmentu, regenerovaná rozpoznávací část. Vazba 5'-G-sA-3' (v sekvenci -G-T-T-G-sA-C-) nevádí aktivitě endonukleázy, takže horní řetězce (na obrázku silnější linie) může být znovu odštípnut a odstraněn. Takto se opakovaně tvoří nové a nové **jednovláknové target fragmenty**. Amplifikace je lineární.

Schéma postupu SDA s dvouvláknovým fragmentem a dvěma primery .



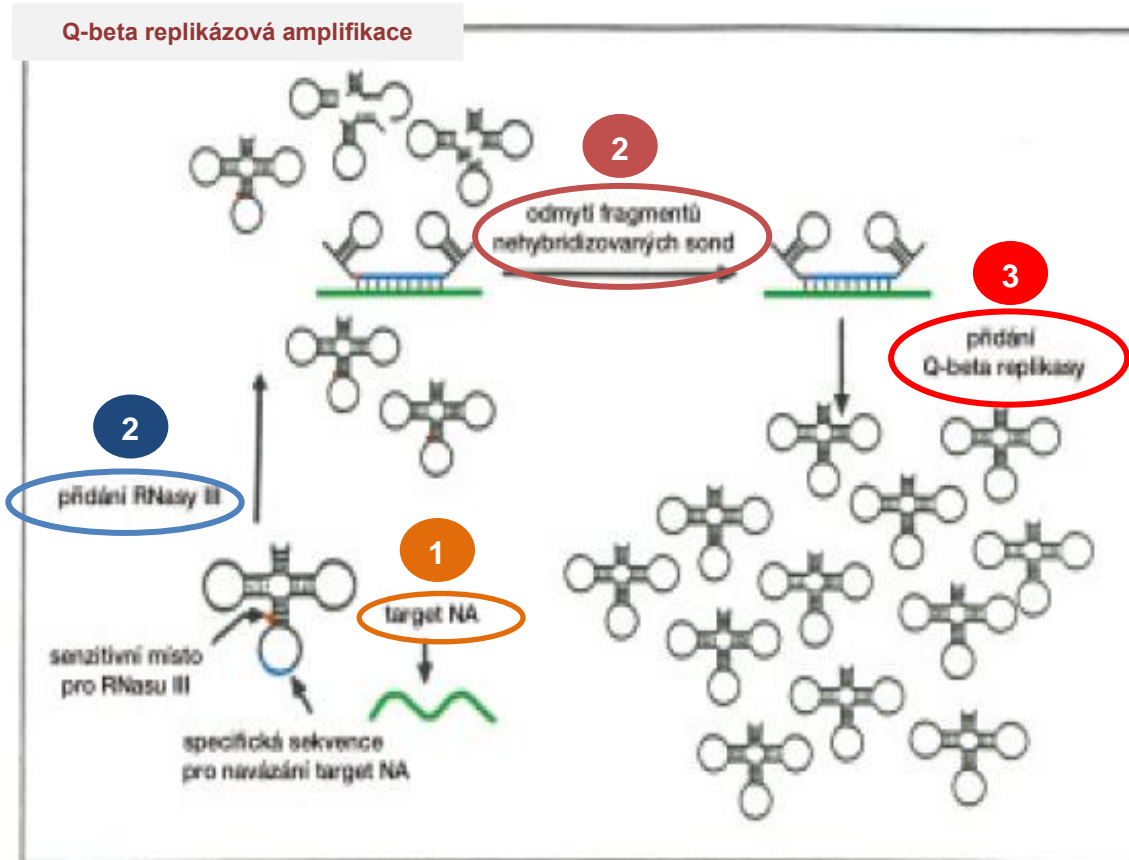
Na obrázku vlevo je znázorněna stejná technika, jak právě probraná na předchozí straně, tentokrát s *dvouvláknovým* fragmentem a dvěma primery.

Endonukleáza vyštípne z DNA vyšetřovaného materiálu cílovou sekvenci ve formě dvojitého úseku DNA (T1-T2). Tu je potřeba denaturovat, aby došlo k rozdělení dvoušroubovice na dvě jednotlivá vlákna (T1 a T2). Poté se přidají primery (P1 a P2) a aktivované nukleotidy, z nichž jeden je thio-derivát (obsahuje v poloze 5' síru místo kyslíku) a DNA polymeráza I, která „umí“ dosyntetizovat řetězec primeru od 3' konce. Primery tedy postupně narůstají od 3' konce až na cílovou délku (polymerace). Pak dojde endonukleázou k odštěpení řetězce a nové polymeraci od 3'- konce původního primeru. Řetězec tvořený z primeru P1 je antiparalelní k T1, tzn. má stejnou sekvenci jako T2, tedy je matricí pro P2. Obráceně řetězec syntetizovaný z primeru P2 je antiparalelní k T2, tedy má stejnou strukturu jako T1, tudíž je matricí pro P1. Celý proces má takto exponenciální charakter (exponenciální amplifikace).

22.5.2. Amplifikace hybridizační sondy

Q-beta replikázová amplifikace

Tato diagnostická technika využívá enzym *Q-beta replikázu*, enzym, který replikuje *genomovou RNA bakteriofága Q-beta*.



Genomová RNA bakteriofága Q-beta tvoří párováním bází specifickou sekundární strukturu, připomínající trojlístek. Tato struktura je pro Q-beta replikázu specifická, vzorky sekundárních struktur RNA jiných organismů nejsou pro Q-beta replikázu substrátem. Tento enzym však dokáže „tolerovat“ krátké úseky vnesené do RNA bakteriofága (tzv. *inzerce*), které mohou sloužit jako *hybridizační sondy pro cílovou (target) nukleovou kyselinu* (např. z určitého infekčního agens).

Postup (viz obrázek na předchozí straně):

1. V RNA bakteriofága je vložena krátká inserce (srovnej s odstavcem 22.3.3. Chiméřní DNA... na str. 22-12), *specifická sekvence - hybridizační sonda*, na kterou se naváže (hybridizuje), pokud je přítomna, cílová nukleová kyselina.

Na obrázku: vlevo dole: **1** *target NA*.

2. V dalším kroku se přidá enzym RNáza III, který rozloží nehybridizované sondy a jejich zbytky se vymyjí. Hybridizované sondy jsou netknuté.

Na obrázku: vlevo a vlevo nahoře: **2** *přidání RNázy III*, a dále nahoře: *odmytí fragmentů nehybridizovaných sond*. **2**

3. Po odstranění zbytků nehybridizovaných sond zůstanou hybridizované sondy, tj. sondy s navázanou cílovou nukleovou kyselinou, ale je jich málo. Proto se přidá *Q-beta replikáza*, jejímž účinkem dojde k amplifikaci (pouze) hybridizovaných sond, které se následně zviditelní, což lze provádět různými způsoby. Jedná se o *selektivní amplifikaci* těch sond, které hybridizovaly s cílovou nukleovou kyselinou.

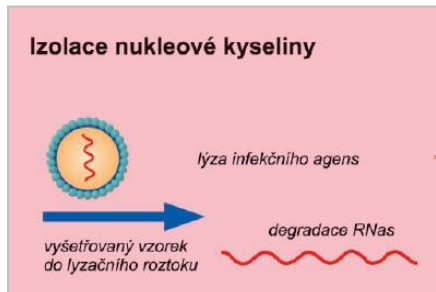
Na obrázku: vpravo **3** *přidání Q-beta replikázy*.

22.5.3. Amplifikace signálu

bDNA-branched DNA assay (Multiple Sandwich Assay)

Název se dá přeložit přibližně jako *stanovení s rozvětvenou DNA*, resp. *vícenásobná sendvičová analýza*. Je to technika k zesílení/amplifikaci detekčního signálu. Metoda je založena na *vazbě syntetických, rozvětvených molekul DNA na cílovou nukleovou kyselinu*. Enzymové konjugáty navázané na tyto větvené molekuly způsobí silnou amplifikaci signálu. Metoda je nezávislá na primeru, cílová nukleová kyselina se nereplikuje.

Branched DNA assay

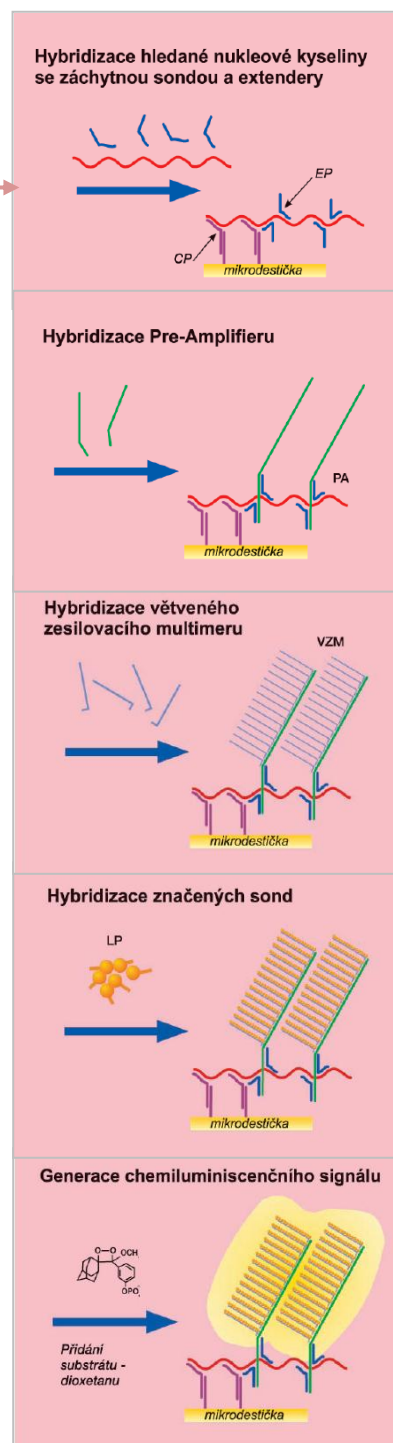


Ze vzorku se izoluje DNA/RNA, která se denaturuje.

Na dvě cílové sekvence nukleové kyseliny (target, cílová nukleová kyselina) se navážou (hybridizují) dvě komplementární záchytné hybridizační sondy (*CP*, *capture probes*), které jsou imobilizovány/navázané v jamce polystyrenové mikrodestičky. Současně se na dva jiné specifické úseky cílové nukleové kyseliny navážou (hybridizují) další dvě komplementární (detekční) sondy, nazývané extendery (*EP*, *extender probes*), které mají na svém konci navázané extenze/prodloužení, na která se v dalším kroku naváže (hybridizuje) nosič rozvětvené DNA, tzv. *PreAmplifier* (*PA*, předzesilovač). Další krok je amplifikační: na *PreAmplifier* se naváže větvená DNA, tzv. *větvený zesilovací multimer* (*VZM*).

V dalším kroku se na větvené úseky zesilovacího multimeru (větvené DNA) hybridizuje značné množství oligonukleotidů značených alkalickou fosfatázou, tzv. *Label Probes* (*LP*). Takto lze na každou molekulu zachycené cílové nukleové kyseliny navázat až 3000 molekul enzymu (*ALP*). Přidá se (dioxetanový) substrát a měří se chemiluminiscence. Celý proces probíhá simultánně.

Tato složitá technika se dá shrnout přibližně takto: sondy navázané v mikrodestičce zachytí cílovou nukleovou kyselinu a po promytí a odstranění nenavázaných nukleových kyselin a jiných



látek se hybridizační technikou naváže v několika krocích větvená DNA, na kterou lze v dalším kroku navázat velké množství syntetických oligonukleotidů značených enzymem (*ALP*). Toto velké množství enzymu navázaného na jednu molekulu cílové nukleové kyseliny, umožňuje i při malém záchytu těchto kyselin generaci silného signálu, v tomto případě silnou, dobře detekovatelnou chemiluminiscenci. Technika je vhodná pro sledování antivirové léčby hepatitid B a C a infekcí HIV a CMV (cytomegalovirus). Obdobnou technikou je technika „*Christmas tree*“ (vánoční stromek).

Složené sondy (Compound Probes)

Na komplementární místo cílové nukleové kyseliny se naváže *primární sonda*. Tato sonda obsahuje v druhé části molekuly sekvence vhodné k hybridizaci *sekundárních sond*, které obsahují tzv. *reporter*, tj. skupinu iniciující na vhodném substrátu detekční reakci. Sekundární sondy mohou vytvářet různé košaté formy (viz *Christmas tree* výš), případně jednoduché cirkulární struktury. V obou případech dojde k výraznému zesílení signálu.

22.6. Sekvenování nukleových kyselin

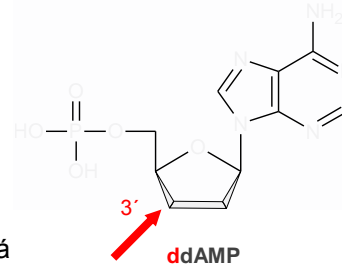
V 70. až 80. letech minulého století byly objeveny metody, které umožňují poznat pořadí/sekvenci nukleotidů v DNA. V současné době jsou tyto postupy zcela automatizovány, ale princip vychází ze dvou původních metod

- *enzymová metoda* podle Sangera (s použitím T7 DNA polymerázy)
- *chemická metoda* podle Maxama a Gilberta.

Enzymová metoda využívá k určení sekvence nukleotidů dideoxynukleotidy,

kteří po včlenění do řetězce zastaví další růst vlákna, který probíhá na izolované matrici (klasickým způsobem prodlužováním primeru navázaném na jednovláknové DNA). Pro každý dideoxynukleotid probíhá zvláštní sekvenační reakce (celkem 4 reakce). V místě, ve kterém se včlenění dideoxynukleotid se reakce zastaví, takže vzniká směs různě velkých fragmentů. Fragменты se dělí v sekvenačním denaturačním gelu (polyakrylamidový gel s močovinou), který má rozlišovací dělicí schopnost jedné báze. Primer je značen radioizotopem, což se projeví na autoradiogramu tmavým pásem. Sekvence od čela elektroforeogramu ke startu je komplementární 5' → 3' sekvenci k matrici/templátu.

Moderní modifikace této metody probíhá v termocykleru, všechny 4 reakce probíhají současně, značení je prováděno fluoresceinem, detekce je laserová (detekce 4 různých fluorescenčních barev), vše je řízeno počítačem a plně automatizováno.



Poznámka: jak je patrné ze vzorce dideoxyadenosinmonofosfátu (ddAMP), jako zástupce dideoxydovaných nukleotidů, ztrátou OH skupiny v poloze 3' pozbyl nukleotid schopnost vazby s fosfátovou skupinou v pozici 5', nemůže se tedy tvořit fosfodiesterová vazba a syntéza řetězce se ukončí.

Stručné schéma metody je uvedeno na obrázku na následující straně.

Chemická metoda je založena na specifické chemické degradaci (na konci označeného) řetězce/fragmentu DNA chemickým činidlem, které specificky narušuje vazby u určitého nukleotidu. Konečná fáze je obdobná metodě Sangerově – elektroforéza na sekvenačním gelu a vizualizace výsledku.



Ion PGM™ Sequencer



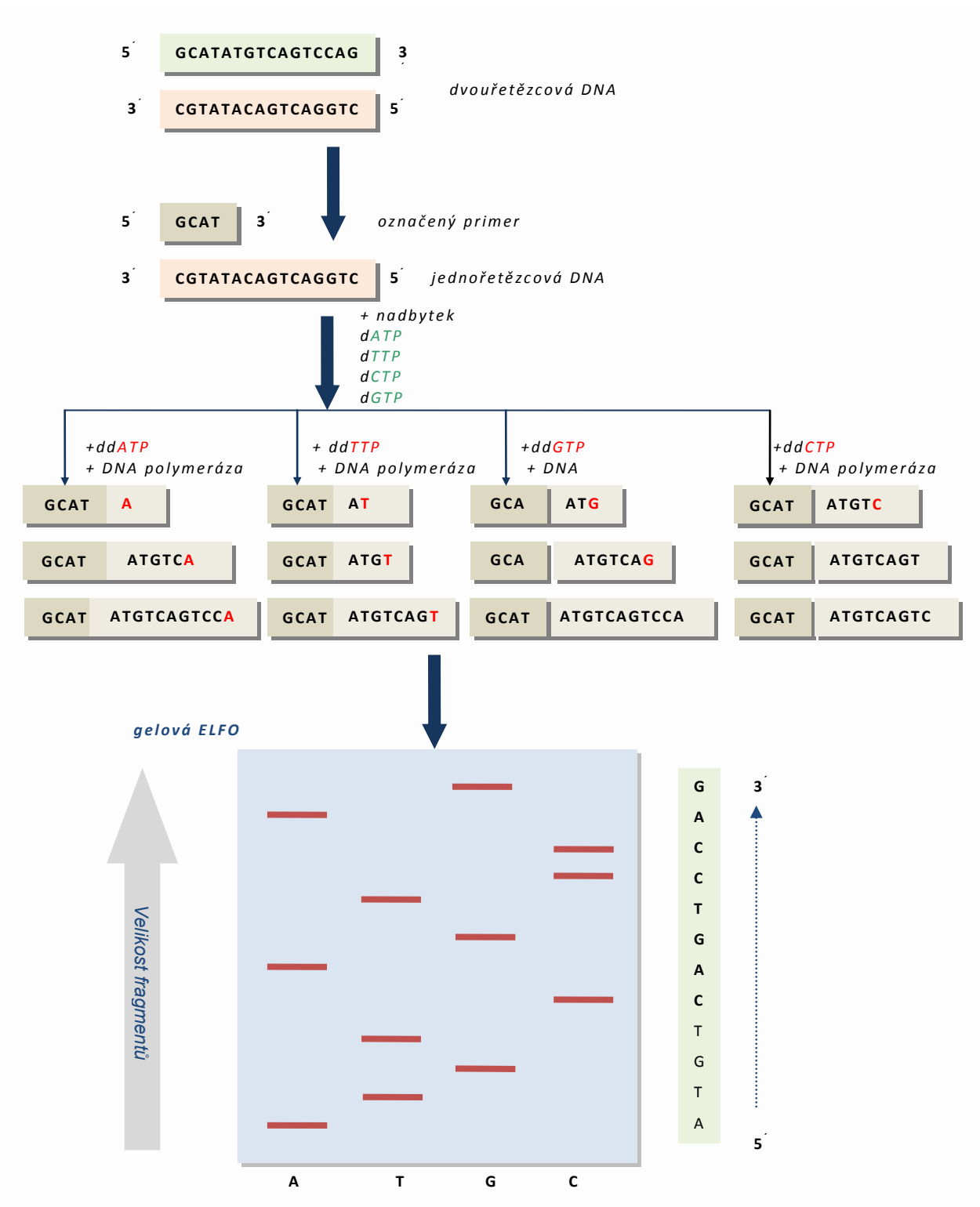
Ion Proton™ Sequencer

Dva moderní sekvenátory „příští generace“ firmy Life Technologies
Video na adrese:

https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxlfuKs&feature=player_embedded

Kurz on-line o moderních metodách sekvenování lze nalézt [zde](#) [stránka European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), součásti European Molecular Biology Laboratory (EMBL),]

Enzymová metoda sekvenování DNA



22.7. Biosenzory, mikročipy a mikroarraye

Pojem *čip* (z anglického *chip* = *kousek*) je známý z elektroniky, především z počítačových technologií. V této souvislosti představuje čip polovodičovou součástku, integrovaný obvod, tj. vzájemně pospojované diody, odpory, tranzistory a další elektronické prvky na základní destičce umístěné v plastickém obalu. V současné době je technologie výroby těchto součástek na takové úrovni, že jednotlivé čipy obsahují desítky milionů zmiňovaných jednotlivých (tzv. diskrétních) součástek. V elektronice se tak zmenšily nároky na prostor a spotřebu energie.

Biočipy svou skladbou připomínají počítačové procesory/čipy. Výroba biočipů je kombinací klasických polovodičových výrobních technik, chemie pevné fáze, tzv. *kombinatorní chemie*, molekulární biologie a moderní robotiky. Biosenzory či biočipy jsou často nazývány také mikročipy, mikroarraye, mikrosoubory apod. (viz dále v textu a též kapitola 10, str. 10-29). Biosenzory založené na DNA se nazývají *DNA čipy*, *genové čipy*.

Ming Zhou z National Research Council Canada definuje biočipy/biosenzory takto:

*Biosensor je kompaktní analytické zařízení, které obsahuje biologicky aktivní snímací prvek spojený s fyzikálně chemickým snímačem. Základním principem je **selektivní přeměna biologického nebo biochemického děje na detekovatelný signál bez předběžné separace vícesložkových vzorků**. Lze rozlišovat biosenzory elektrochemické, optické, akustické a jiné, s různým využitím v praxi.*

(Ming Zhou Micro- and Nano-Structured Biosensors, Institute for National Measurement Standards, National Research Council Canada, MRS&DCAN, September 30, 2004 dostupné na adrese

<http://www.cmcmicrosystems.ca/news/events/mrdcan2004/highlights/zhoupresentation04.pdf>

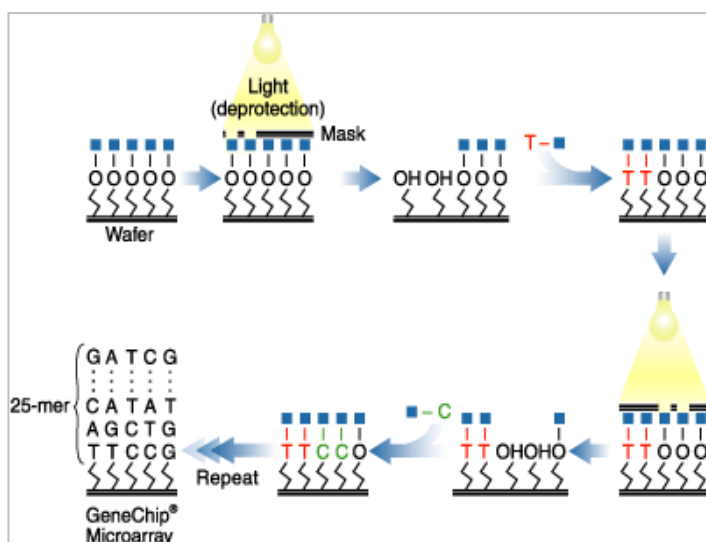
Biočip je soubor miniaturizovaných zkušebních plošek (*mikroarray*, z anglického *array* = *pole*, *sada*; *mikroarray* se může přeložit i jako *mikrosoubor*) uspořádaných na pevném substrátu; umožňuje provedení mnoha testů (i různých) současně, s cílem dosáhnout vyššího průchodu a rychlosti. Většinou není povrchová plocha větší než nehet. Podobně jako počítačový čip, který umožňuje provedení milionů matematických operací za sekundu, může *biočip* provést během několika sekund tisíce biologických reakcí, jako je např. dekodování genů.

DNA čip je navržen k tomu, aby na místě „zamrazil“ struktury mnoha krátkých vláken DNA (sond). V principu slouží jako určitý druh „testovací nádoby“ pro reálné chemické vzorky.

Genové čipy se navrhuje pro

- *detekci specifických genů* (stanovení přítomnosti genu či jeho sekvence)
- *měření exprese genů ve vzorcích tkání* (tj. přepis sekvence genů do informační RNA – mRNA - a následný překlad informace z mRNA do bílkoviny)

Schématické znázornění výroby tzv. GeneChip® Microarray firmy



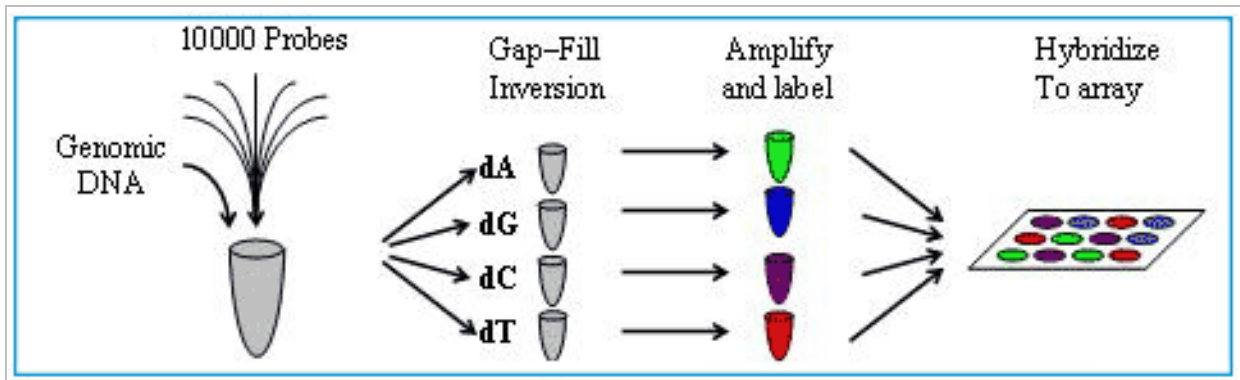
Na obrázku je schématicky znázorněna výroba *GeneChip® Microarray*, který využívá tzv. inverzní sondy (na trh přišla tato diagnostická technika v září 1997).

Povrch nosné křemíkové destičky (na obrázku *wafer* = *oplatka*, *hostie*) se připraví litografickým procesem na vazbu oligonukleotidů DNA (sondy), které kopírují určité úseky genů, které jsou cíleně předmětem zájmu (např. rodově nebo druhově specifické sekvence v případě mikrobiologické diagnostiky).

Proces vazby oligonukleotidů (obvyklá délka je 25 nukleotidů) se opakuje, až je celá destička zaplněna.

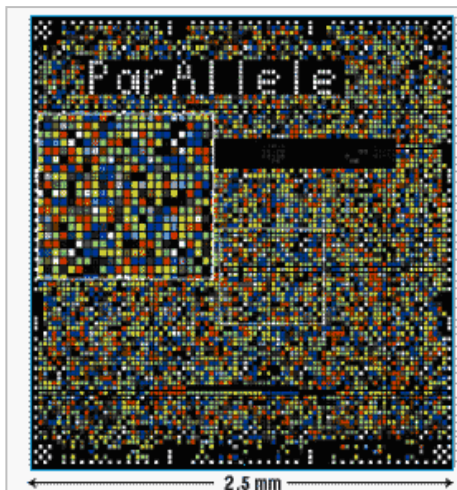
Na jednu array se vměstná přes 1,3 milionů požadovaných kombinací. Podle potřeby je možno každou destičku (*afér*) rozřezat na desítky až stovky individuálních čipů (*array*). Na čip se kápne vzorek s obsahem jednovláknové DNA (ssDNA) označené barvivem. Během hybridizace dojde k navázání na specifickou sondu lokalizovanou na určitém místě biočipu a vytvoření charakteristického obrazce.

Barevné označení jednotlivých nukleotidů (při použití tzv. inverzních sond)



Laserový skener odečítá charakteristický obraz (laser iniciuje fluorescenční záření), který je možno uložit v elektronické podobě a dále zpracovávat. Výsledek ukazuje, jestli vzorek obsahuje sekvence zakotvené na čipu.

Čtyřbarevný obraz při použití tzv. inverzních sond (Affymetrix GeneChip® Tag Array)



Barvy v mikroarrayi:

Zelená představuje kontrolní DNA získanou z normální tkáňe a hybridizovanou s cílovou DNA.

Červená je DNA ze vzorku, získaná z nemocné tkáňe a hybridizovaná s cílovou DNA.

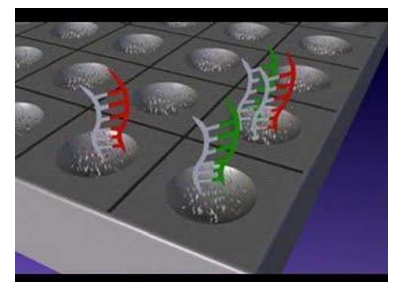
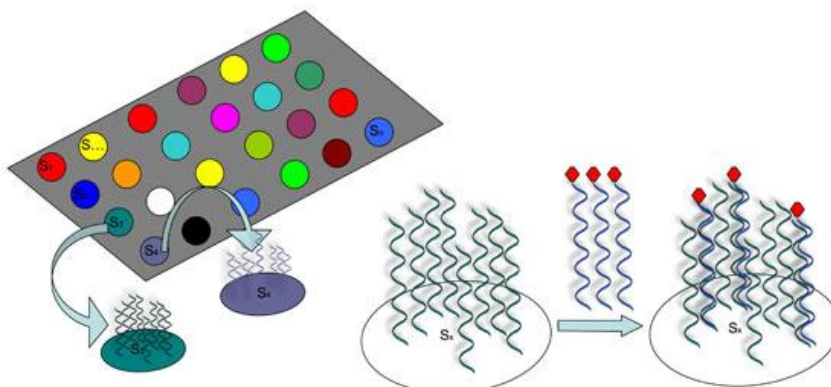
Žlutá je kombinací DNA kontrolní a DNA ze vzorku, které byly stejným dílem hybridizovány k cílové DNA.

Černá představuje oblasti, kde k cílové DNA nebyly hybridizovány ani kontrolní DNA ani DNA ze vzorku.

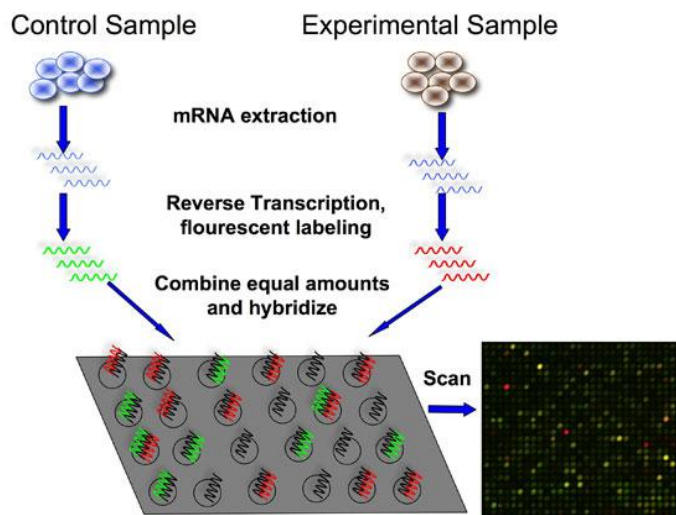
Každý bod na čipu je spojen se zvláštním genem. Každá barva představuje buď zdravou (kontrolní) nebo nemocnou (ze vzorku) tkáň. Podle typu použitého čipu, vypoví umístění a intenzita barvy, zda je přítomen gen nebo jeho mutace buď v kontrole nebo ve vzorku. Rovněž poskytne odhad o expresi hladiny genu/ů ve vzorku a v kontrole.

Dvoubarevný obraz

DNA mikroarray se zafixovanými syntetickými sondami (*probes*). Výsledná „mřížka“ (srovnej obrázek vpravo) může hybridizovat např. s cílovými sekvencemi získanými z experimentálních vzorků za účelem zjištění hladiny exprese specifických mRNA ve vzorku.



Měření genové exprese pomocí DNA mikroarray



Zdroj: <http://bitesizebio.com/articles/introduction-to-dna-microarrays/>

Měření genové exprese pomocí DNA mikroarray (příklad postupu, který může být i odlišný):

- V prvním stupni se izoluje mRNA, která je předmětem zájmu, jeden vzorek je kontrolní (např. od zdravého jedince), druhý je experimentální (např. od nemocného jedince).
- Reverzní transkripcí se mRNA amplifikuje a převede na cDNA. Při tomto procesu se do DNA inkorporuje fluorescenční barvivo (nukleotid s navázaným barvivem).
- cDNA se aplikuje na mikroarray, hybridizuje se syntetickými sondami.
- Skenování mikroarray a kvantifikace signálu (po vybuzení fluorescence laserem). Síla signálu závisí na množství cílového vzorku navázaného na sondy v příslušném místě.

(Celý postup zahrnuje řadu promývání k odstranění nenavázaných sekvencí)

Hybridizaci lze detekovat i jinými způsoby. Příkladem může být *bioelektronická detekce eSensoru* fy Motorola, která je založena na využití redox potenciálů derivátů ferrocenyly. Tyto čipy jsou vyráběny technologií tištěných spojů. Na nosnou destičku se umístí zlaté elektrody, na které navazuje vrstva (SAM = *self-assembled monolayer*) obsahující zachytné DNA sondy, které na sebe vážou, pomocí vodíkových můstků, sekvence analyzované nukleové kyseliny. Na imobilizované (zachycené) DNA se na komplementární sekvenci hybridizuje signální sonda obsahující některý z derivátů ferrocenyly. SAM zprostředkovává přenos elektronů mezi imobilizovanými ferrocenylderiváty a zlatou elektrodou. Vše je uspořádáno tak, že žádné jiné potenciály přítomných sloučenin neovlivňují zlatou elektrodu a dochází tak k vysoce selektivní detekci specifických sekvencí amplikonů.

DNA má také zvláštní elektrické vlastnosti - může pracovat jako malinký elektrický drát, přitom se DNA chová jako polovodič. Odtud plyne další možnost využití DNA čipů – v počítačovém průmyslu lze nahradit křemík touto kyselinou a vyrábět čipy o velikosti molekuly (nanotechnologie).

(K hlubšímu studiu doporučuji výše uvedenou citaci autor Ming Zhoue a dále uvedené citace MUDr. Emila Pavlíka, CSc, v *Labor Aktuell [LA]*; dále např. Stephen H. Friend a Roland B. Stughton, *Kouzla mikrosouborů, Scientific American CZ, 34 – 41, únor 2002 (zde se lze dočíst i o proteinových čipech)*; přehledně lze hledat i v encyklopedii Wikipedia – *anglická mutace* – např.: <http://en.wikipedia.org/wiki/Biochip>)

Průkopníkem na poli technologií biočipových mřížek – array je firma **RANDOX**, jejíž analyzátoř řady **Evidence** (*Evidence, Evidence Evolution, Evidence Investigator, Evidence Multistat*) umožňují širokou paletu testů z oblasti proteinů (viz kapitola 10 Bílkoviny), léků a drog (viz kapitola 17 Toxikologie) i DNA a RNA analýz v multiplexovém provedení.

Z posledně jmenované oblasti analyzátoř umožňují

- SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) genotypizaci
- stanovení genové exprese
- detekci patogenů
- detekci mutací.

SNP genotypizace

Speciální primer umí odlišit sekvence, které se liší pouze v jedné bázi. Produkty amplifikace odpovídají cílové oblasti DNA z tkání, ústního výtěru nebo krve.

Amplifikované úseky hybridizují na biočipovou mřížku (*biochip array*) s prostorově zřetěženými sondami komplementárními k cílovým amplikonům. Každá pozice na mřížce odpovídá specifickému SNP genotypu, takže mřížka je schopna jak multiplexního stanovení tak určení stupně podobnosti alel (*zygosity*) ve vzorku.

Expres genů

Interpretace úrovně exprese genů může přinést cenné informace o fyziologickém zdraví buněk či souvisejících orgánů příslušného jedince v daném čase. Fa Randox disponuje mnoha arrayemi umožňujícími kvantitativní RNA expresi, které mohou vylepšit klinická rozhodnutí a výběr terapie, což dále vede k personalizované péči o každého pacienta.

Detekce patogenů

Vzorkem mohou být sputum, moč, výtěry atd. Cílová oblast vyextrahované DNA je amplifikována v jednoduché reakci a následně hybridizována na biočipovou mřížku s 23 sondami specifickými pro jednotlivé patogeny. Tento rychlý proces umožňuje současně stanovit primární i koexistující infekce, často u asymptomatických pacientů. Lze užít mnoho různých panelů.

Detekce mutací

Princip je podobný s výše popsanou SNP genotypizací. Mřížka obsahuje prostorově zřetěžené sondy se specifickými kombinacemi mutací, na které hybridizují amplikony z předchozích PCR. Každé místo na mřížce odpovídá konkrétní sondě, takže je možno relativně rychle (reakce trvá 3 hodiny) současně stanovit vícečetné mutace v jednom vzorku.

22.8. Dodatky

22.8.1. Nové technologie v multiplexové kvantitativní *real time PCR*

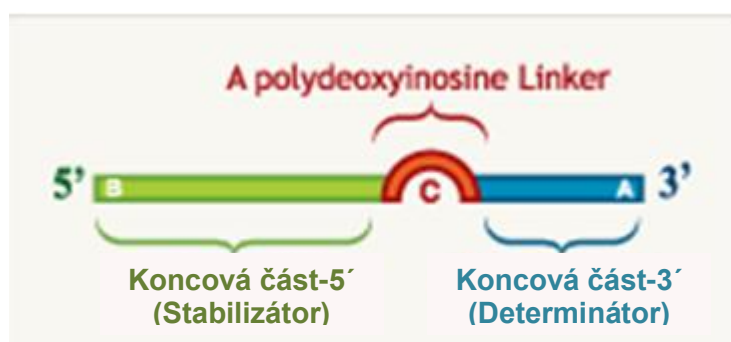
Nové technologie, se kterými přišla firma Seegene, Inc. z korejského Soulu, jsou současně i novými pojmy:

- TOCE[®]: *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*
- DPO[™]: *Dual-Priming Oligonucleotides*
- cyclic-CMTA: *cyclic-Catcher Melting Temperature Analysis*
- *Pitchers a Catchers*

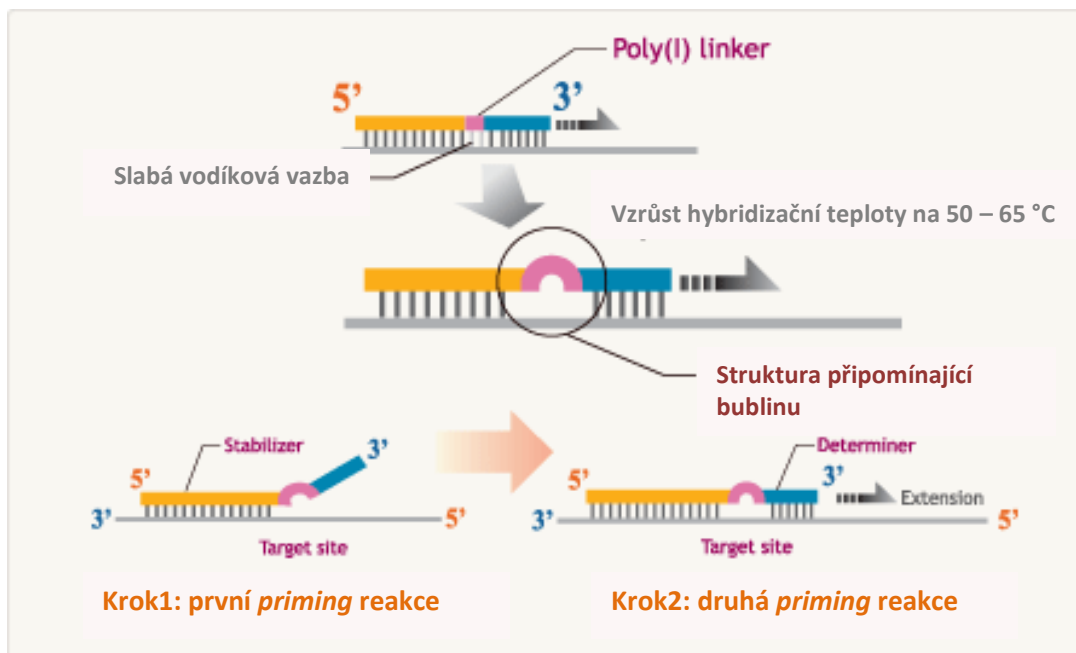
Tyto pojmy alespoň stručně vysvětlíme v následujícím textu.

Technologie DPO[™]

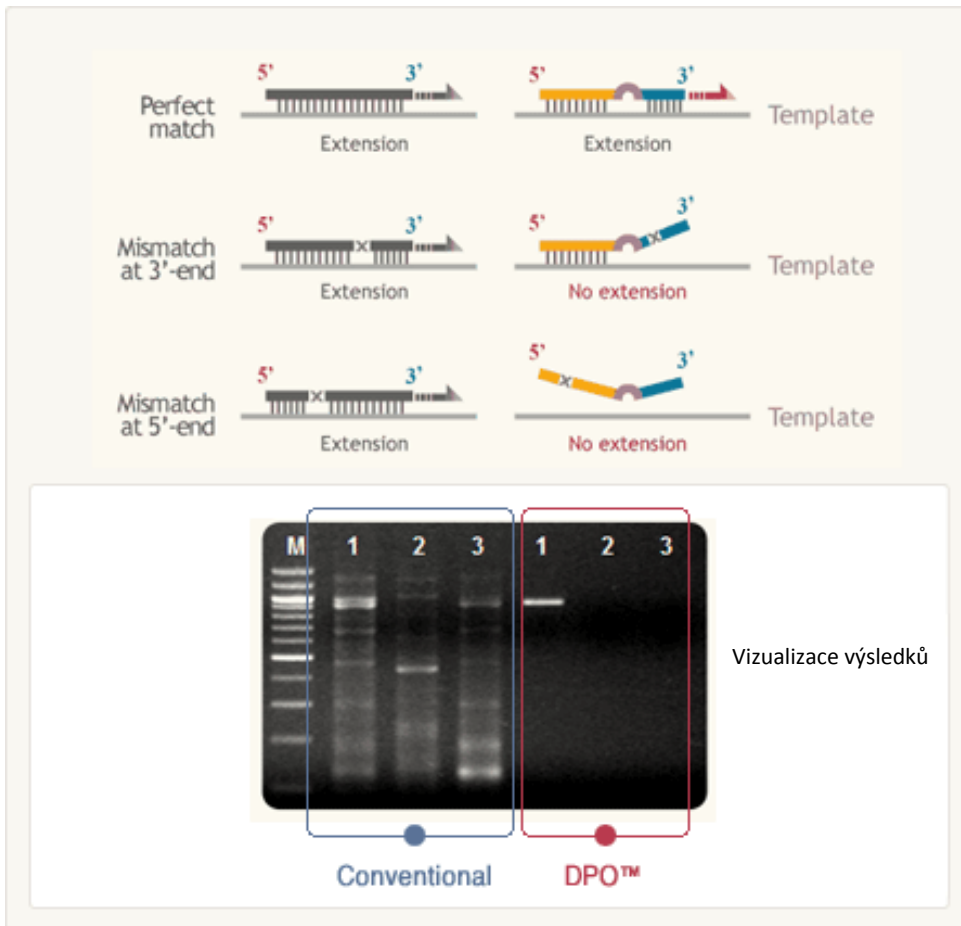
DPO[™] je firmou Seegene patentovaný cílově-specifický (*target-specific*) primer, který zajišťuje vysoce specifickou amplifikaci cílové oblasti. DPO primery jsou strukturálně odlišné od konvenčních primerů. Jsou tvořeny dvěma různými hybridizujícími oblastmi oddělenými unikátním polydeoxyinosinovým *linkerem*.



Díky této struktuře je kontrolováno dvoukrokové navázání DPO primeru, přičemž jako první se váže oblast 5'-konce, stabilizátoru. Prodlužování primeru je řízeno specifitější hybridizující částí 3', determinátorem. Toto patentované uspořádání vylepšuje cílovou (*target*) specifitu a je zvláště vhodné pro multiplexové uspořádání.



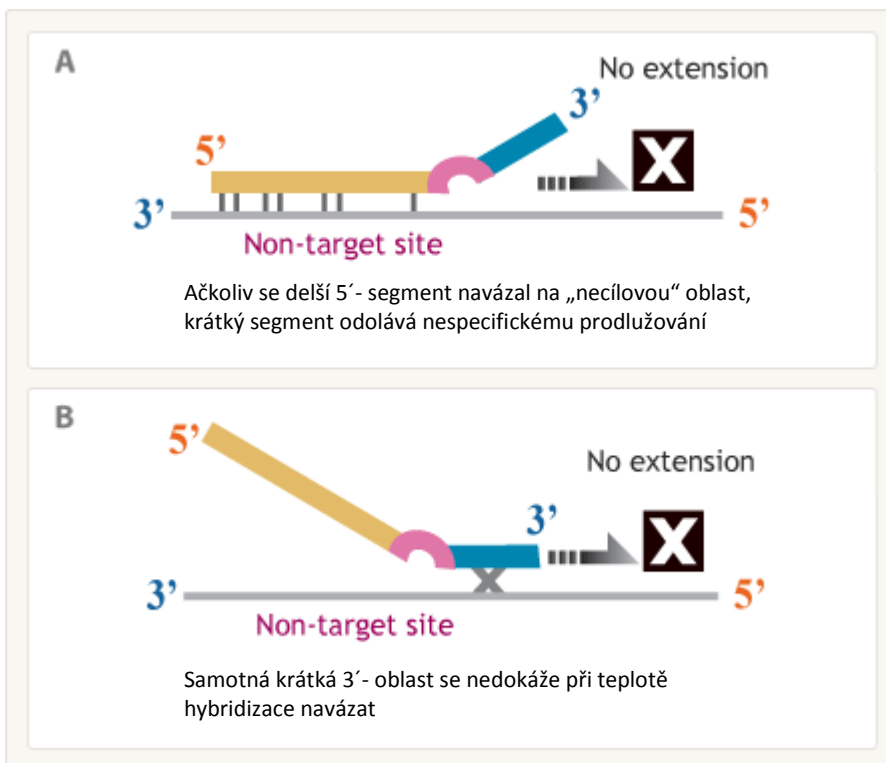
Zpřesnění vazby DPO primeru na cílovou oblast (*annealing*) je zřejmé z následujících obrázků. Část následujícího obrázku věnovaná vizualizaci jasně ukazuje „čistou“ hybridizaci DPO primeru ve srovnání s výsledky hybridizace konvenčních primerů.



Perfektní navázání obou částí primeru – primer se prodlužuje

Neshoda na 3'- konci; primer se neprodužuje

Neshoda na 5'- konci; primer se neprodužuje



Pitcher a Catcher

Názvy *Pitcher* a *Catcher* jsou převzaty z baseballové terminologie a vzhledem k funkcím, které uvedené látky v dané reakci vykonávají, dá se říci, že trefně. *Pitcher* a *Catcher* realizují unikátní generaci signálu v reálném čase.

Pitcher je jednovláknový oligonukleotid složený z označené části (*Tagging portion*) přilehlé k cílové části (*Targeting portion*), která specificky hybridizuje s oblastí zájmu na nukleové kyselině. Označená část *Pitcheru* má unikátní sekvenci a nehybridizuje se žádnou cílovou oblastí.

Catcher je dvojitě označený jednovláknový umělý templát složený ze záchytné části (*Capturing portion*), která je komplementární k *Tagging portion* „nadhazovače“, *Pitcheru*, přilehlé k templátové části (*Templating portion*).

Na začátku PCR se DPO™ primery a *Pitcher* hybridizují na specifická místa cílové oblasti. Během každého cyklu PCR, prodlužování protisměrného DPO™ primeru, které je uskutečňováno *Taq* polymerázou s 5'- nukleázovou aktivitou, vede k odbourání navázaného *Pitcheru* a uvolnění *Tagging portion*. Uvolněná *Tagging portion* hybridizuje s *Capturing portion* „chytáče“, *Catcheru*. Prodloužení (extenze) *Tagging portion* vede k tvorbě „dvojitého chytáče“, *Duplex Catcher*, a fyzicky oddělí zhášecí molekulu (*quencher*) od fluoroforu, což vede ke generaci světelného signálu.

Vše je zřejmé ze schématu TOCE® technologie na následující straně. V této reakci 5'- nukleázová aktivita specificky odbourá *Pitcher* navázaný na cílovou oblast a to tak, že označená část je uvolněna. Uvolněná označená část hybridizuje se záchytnou oblastí (*capturing portion*) *Catcheru*. Následná tvorba dvojitého *Catcheru* (*Duplex Catcher*) vede k oddálení zhášecí molekuly (*quencher*) a ke generaci signálu.

Kombinace těchto dvou molekul, DPO primerů a CCMTA (cyklická analýza teploty tání *Catcheru*) tvoří podstatu technologie TOCE, tj. v podstatě homogenní vysoce multiplexní real time kvantitativní PCR technologie. Překlad do češtiny zní krkolomně, proto ještě jednou v angličtině – *Homogenous high multiple real-time quantitative PCR technology*.



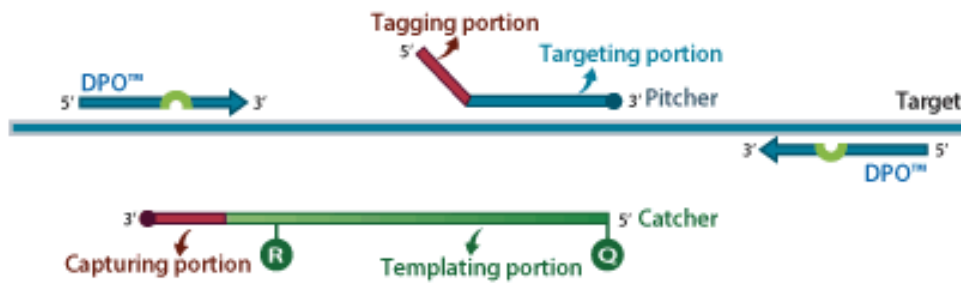
Baseball pitcher - nadhazovač



Baseball catcher - chytač

Technologie TOCE®

A. Annealing of DPO™ & Pitcher

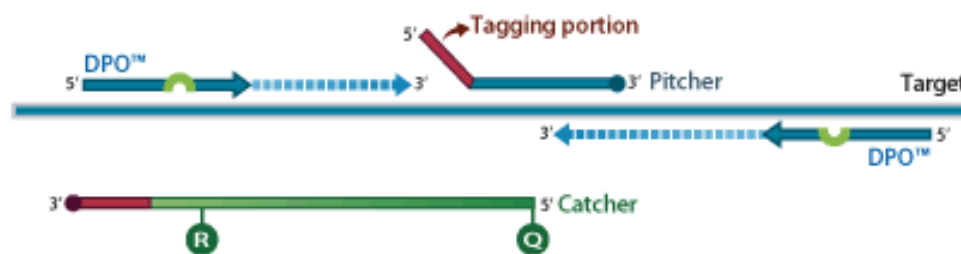


The DPO™ primers and the Pitcher hybridize specifically to target sequences. The tagging portion of the pitcher is designed not to hybridize to the target sequence.

A. Hybridizace DPO™ & Pitcher

Primerové páry DPO™ a Pitcher se specificky hybridizují na cílové sekvenční. Značená (*tagging*) část pitcheru není určena k hybridizaci na cílovou frekvenci.

B. Extension

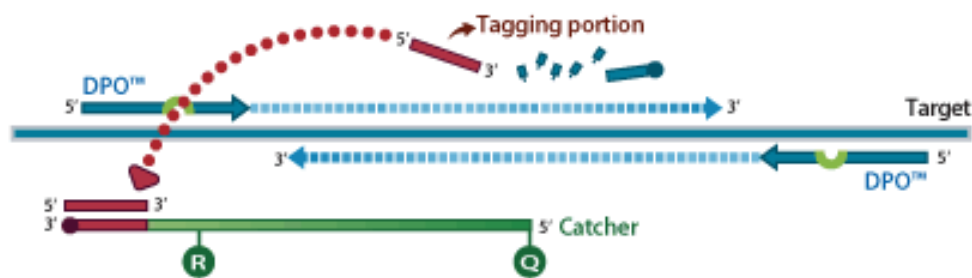


During the DPO™ primer extension, the Pitcher is cleaved by the exonuclease activity of DNA polymerase and then the tagging portion is released.

B. Prodlužování/Extension

Během prodlužování/extensione DPO™ primeru je Pitcher rozštěpen exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy a poté je označená část uvolněna.

C. Cleavage and annealing of the Tagging portion



The released tagging portion hybridizes to the Catcher which has complementary sequences of the tagging portion.

C. Odštěpení/Cleavage a hybridizace/annealing cílové části

Uvolněná označená část se hybridizuje na Catcher, který obsahuje komplementární sekvence označené části.

D. Extension and signal generation

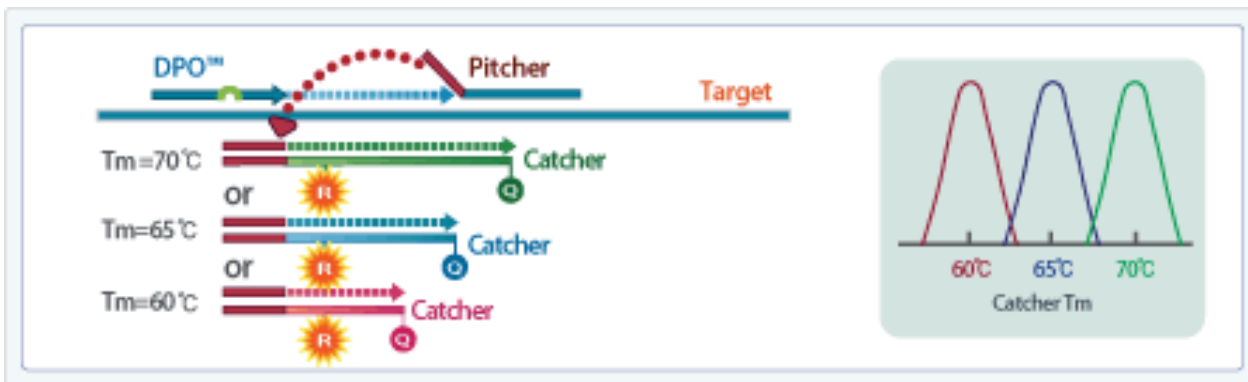


Extension of the tagging portion separates the fluorescent reporter molecule from the quencher molecule, resulting in a signal generation.

D. Prodlužování a generace signálu.

Prodloužení označené části oddělí fluorescenční molekulu reportéra-zpravodaje od zhasací molekuly/quencher, což vede ke generaci signálu.

Technologie cyclic-CMTA (CCMTA)

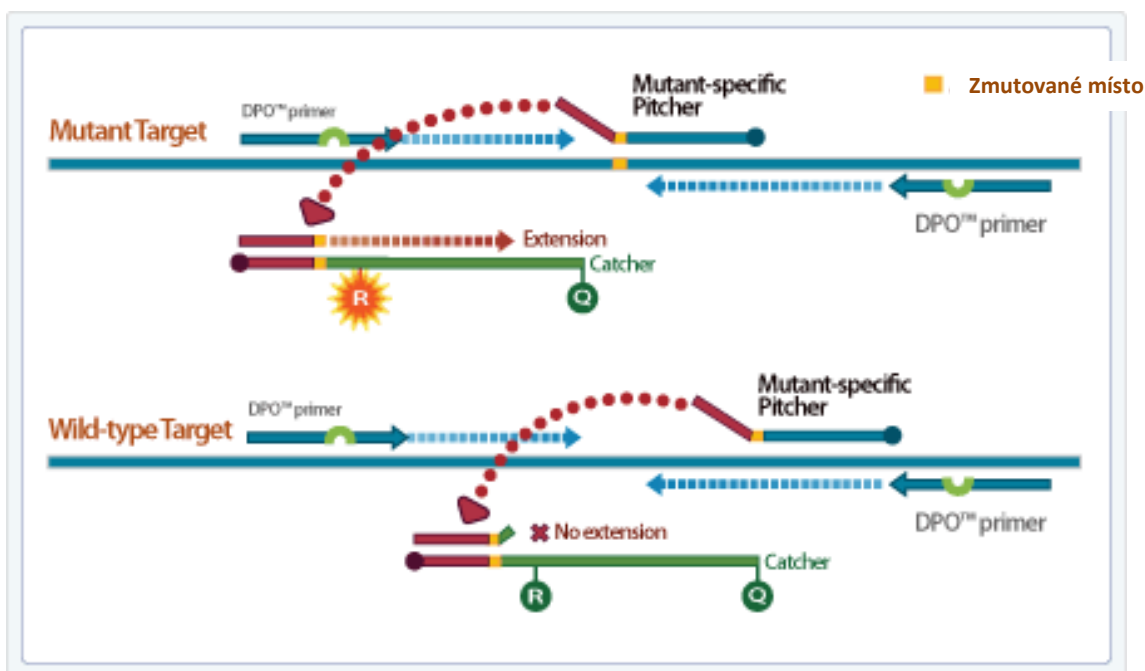


Unikátním znakem technologie TOCE™ je začlenění fluorescenčně značeného umělého templátu (*catcher*), který generuje signál příslušný konkrétní cílové sekvenci. Hodnota *Catcher-Tm* může být řízena nastavením sekvence a délky *Catcheru*. Pro optimalizaci TOCE™ stanovení (*assay*) může být hodnota *Catcher-Tm* snadno nastavena a není omezena na cílovou sekvenci.

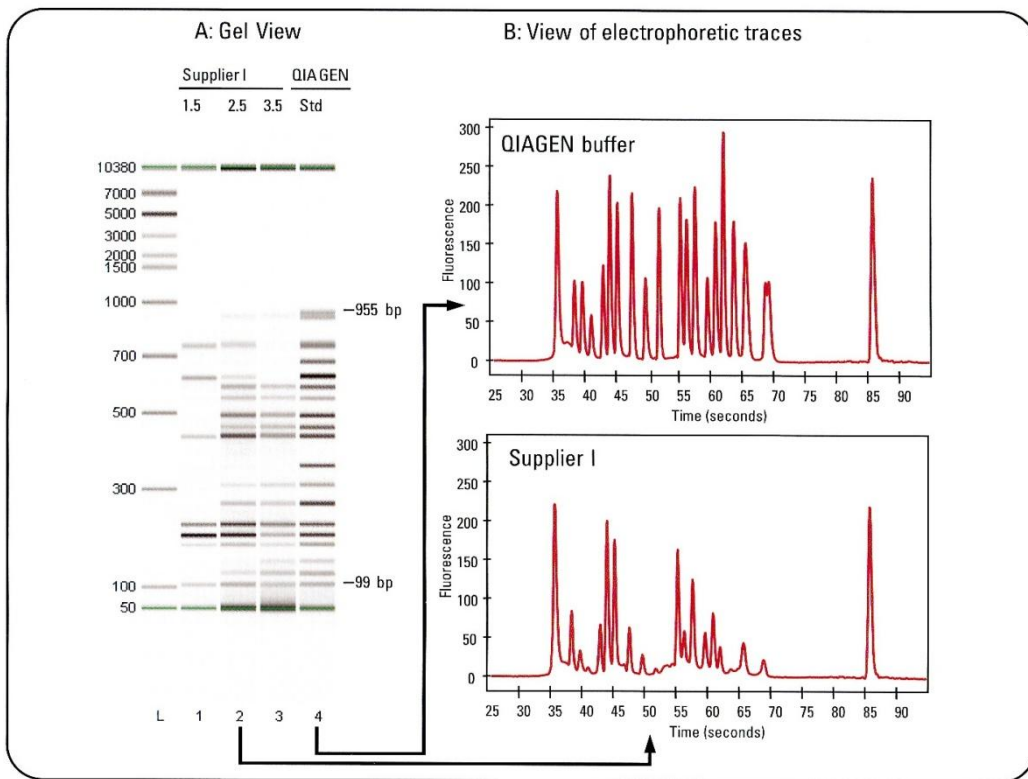
Díky této technologii může být současně detekováno několik *catcher* (popsáno bylo 5) v jediné reakci a v jednom světelném kanálu, což značně zvyšuje počet cílových sekvencí (*targets*) současně detekovatelných v konvenčním 4-kanálovém real-time termocyklieru.

Detekce mutací pomocí technologie TOCE™

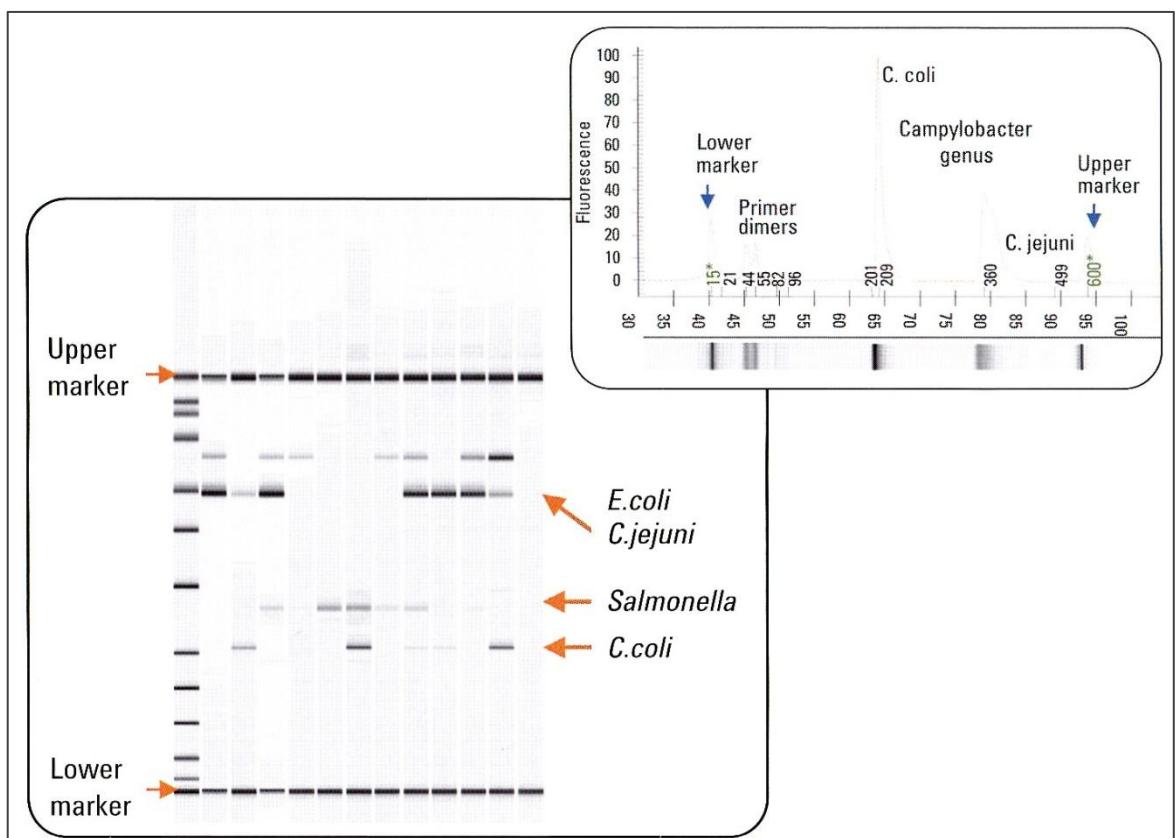
Technologie TOCE™ umožňuje detekci mutací s rozlišením i pouze jediné báze, což umožňuje detekci nahlučených (*clustered*) mutací. V příkladu na obrázku je signál generován pouze v případě, že *Pitcher* specifický pro danou mutaci se naváže na zmutovanou cílovou oblast a rozliší tak mutace od „divoké“ (*wild*) formy sekvence.



22.8.2. Ukázky výsledků multiplexové PCR



Multiplexová PCR s 19 produkty



Ukázka multiplexové PCR analýzy bakterií u kuřat

Jsou použity čtyři páry primerů, každý primer je specifický pro určitou sekvenci DNA jedné ze čtyř testovaných bakterií.

22.8.3. Některé další enzymy používané při práci s nukleovými kyselinami

Enzym	Funkce	Hlavní použití
Alkalická fosfatáza	defosforyluje DNA a RNA na 5' konci	prevence samovolné ligace
DNA ligáza	katalyzuje vazbu dvou molekul DNA	ligace DNA molekul
DNA polymeráza I	syntetizuje dsDNA (dvouřetězcovou DNA) na templátu jednovláknové DNA, má obě exonukleázové aktivity	syntéza ds cDNA, "nick translate" (značení DNA radioizotopy metodou posunu zlomu)
DNáza I	odštěpuje nukleotidy z DNA zaváděním zlomů	"nick translate", mutagenesa
Exonukleáza III	odštěpuje nukleotidy na 3' konci DNA	sekvenování DNA, k vytváření delecí
λ- Exonukleáza	odštěpuje nukleotidy na 5' konci DNA	sekvenování DNA
Exonukleáza <i>Bal31</i>	odštěpuje nukleotidy na obou koncích DNA	progresivní zkracování DNA, k vytváření delecí
Terminální transferáza	přidává nukleotidy na 3' konci DNA	syntéza homopolymerního konce
SI-nukleáza	štěpí jednovláknovou DNA na nukleotidy	odstranění smyček vznikajících při syntéze cDNA
Polynukleotidová kináza	přenáší fosfát z ATP na DNA nebo RNA	značení DNA nebo RNA izotopem ³² P
Reversní transkriptáza	syntetizuje DNA na templátu RNA	syntéza cDNA z mRNA
Restrikční endonukleáza (typ II)	štěpí DNA podle specifické sekvence nukleotidů	restrikční analýza, tvorba rekombinantní DNA
<i>Taq</i> polymeráza (termostabilní)	syntetizuje dsDNA z jednovláknové DNA	polymerázová řetězová reakce
T4 DNA polymeráza	syntetizuje dsDNA, 3' exonukleázová aktivita	značení DNA fragmentů výměnou syntézou na 3' konci

22.8.4. Nové jednotky

Diagnostika nukleových kyselin přináší do světa analytiky zcela nové pohledy a přístupy. Pokud doposud analytik pracoval s částicemi (atomy, ionty, molekulami) na úrovni milimolů až mikromolů v oblasti substrátů, nanomolů a pikomolů v oblasti imunoanalýzy, pracoval s celkovým počtem částic řádově okolo 10^{20} až 10^{11} . Polymerázová řetězová reakce pracuje (před jejich pomnožením, amplifikací) s jednotlivými molekulami. Bylo proto nutno zavést nové jednotky jako jsou *zeptomol* a *yoctomol*. V tabulce na následující straně jsou přehledně uspořádány základní jednotky menší jak mol (počet částic v molu dává Avogadrova konstanta, tj. zaokrouhleno $6,023 \times 10^{23}$, v tabulce je pro názornost ponechána tato zaokrouhlená hodnota).

Základní jednotky menší jak 1 mol

Název	Řád	Počet částic
milimol	10^{-3}	$6,023 \times 10^{20}$: 602 300 000 000 000 000 000
mikromol	10^{-6}	$6,023 \times 10^{17}$: 602 300 000 000 000 000
nanomol	10^{-9}	$6,023 \times 10^{14}$: 602 300 000 000 000
pikomol	10^{-12}	$6,023 \times 10^{11}$: 602 300 000 000
femtomol	10^{-15}	$6,023 \times 10^8$: 602 300 000
attomol	10^{-18}	$6,023 \times 10^5$: 602 300
zeptomol	10^{-21}	$6,023 \times 10^2$: 602,3
yoctomol	10^{-24}	$6,023 \times 10^{-1}$: 0,6023

Z posledního řádku tabulky je jasné, že 1 *yoctomol* nemůže existovat, protože tato jednotka představuje množství něco přes půl molekuly. Opačný výpočet dává výsledek, že 1 molekula má hodnotu 1,7 *yoctomolu*; tedy např. 3,4 *yoctomolu* představuje množství 2 molekul, atd. Zeptomoly až yoctomoly pokrývají rozsah měření používaný při jedné z technik (PCR) diagnostiky DNA a RNA.

Poznámka I:

Obrázky popis některých technik v této kapitole byly převzaty z prací, WEB stránek a propagačních materiálů:

- Pavlík, M.: *Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku*, LA, časopis firmy Roche, seriál vydávaný od roku 1999
- Průša, R., Lány, J., Vejvalka, J., Karker, V., Kotaška, K.: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky*
- Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Shank, D.D.: *Isothermal in vitro Amplification of DNA by a Restriction Enzyme/DNA Polymerase System*
- materiály fy Bio-Rad, a obrázek 19-12 je převzat z WEB stránek firem Roche
- Učební text *Molekulární biologie*, VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat
- Ipser, Jan, *Genetika, Distanční opory pro kombinované studium biologie*, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Přírodovědecká fakulta, katedra biologie, Ústí nad Labem, 2006
- WEB stránky firmy Affymetrix, Bio-Rad, Roche, Seegene, Onkologického centra J.G.Mendela Nový Jičín, z materiálů Laboratoře molekulární biologie, Univerzity v Pardubicích, Fakulta chemicko-technologická; Wikipedie
- Z propagačních materiálů většiny jmenovaných firem

Poznámka II: Popis a výčet molekulárních technik užívaných v diagnostice lidských chorob v této kapitole není úplný, ale přináší výčet a popis hlavních technologií.

Poznámka III: při zadání hesla „Lab on a Chip“ do internetového vyhledávače, lze najít spoustu užitečných (a poučných) odkazů na chipové technologie různých typů. V tomto případě se obzvláště uplatní znalost angličtiny

22.8.5. Doporučené adresy:

<http://www.allaboutscience.org/dna-double-helix-video.htm>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Biochip>

http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray

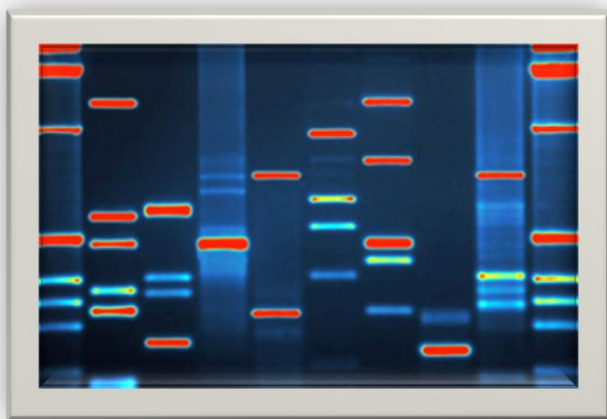
<http://www.umass.edu/molvis/tutorials/dna/dnapairs.htm> (struktura DNA - 3D model)

<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf> (dtto, lepší obrázky a provedení)

<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/pdf/skripta.pdf> (Průša, R.: Základy analytických metod v molekulární biologii, 1997)

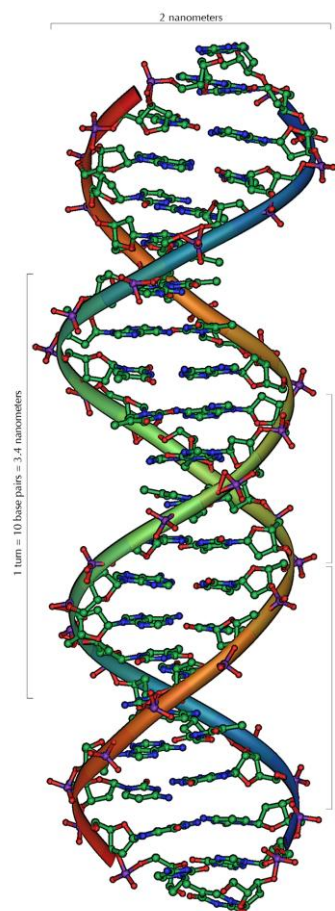
<http://www.dnalc.org/resources/3d/19-polymerase-chain-reaction.html>

DNA jako umění



Na adrese www.dna11.com je možno si nechat zhotovit a zaslat DNA obraz svůj, svých přátel, nebo domácích mazlíčků

Ilustrační obrázek DNA



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/DNA_Overview.png

Pro pobavení a pro procvičení angličtiny článek z The Independent

DNA tests prove your close friends are probably distant relatives

DNA testy ukazují, že vaši blízcí přátelé jsou pravděpodobně (vašimi) vzdálenými příbuznými

[THE INDEPENDENT](#) Thursday 17 July 2014

You can choose your friends, but you can't choose your family, or so says the adage. But scientists have found that by choosing friends we may also be unwittingly choosing the company of distant relatives.

A study into the genetic nature of friendship has found that, on average, close friends are likely to be as genetically related to one another as fourth cousins who share the same great, great, great grandparents.

The findings suggest there is an unexplained mechanism that helps us to choose our friends based on how similar they are to us in terms of their DNA, said James Fowler, professor of medical genetics at the University of California, San Diego.

"Looking across the whole genome we find that, on average, we are genetically similar to our friends. We have more DNA in common with the people we pick as friends than we do with strangers in the same population," Professor Fowler said.

The phenomenon may have arisen as part of an evolutionary process, he said. "The first mutant to speak needed someone else to speak to. The ability is useless if there's no-one who shares it," he said.

"These types of traits in people are a kind of social network effect."

The research involved genome-wide studies of nearly 2,000 people who were part of a larger, long-term investigation into the factors that influence heart disease and who, as a result, had already had their DNA analysed for the smallest mutations.

Professor Fowler and his colleague Nicholas Christakis of Yale University took pairs of individuals based simply on whether they were friends or total strangers and analysed their DNA to see how different or similar each member of a pair was to one another. They found that the strangers were quite dissimilar in terms of their DNA mutations, but that the pairs of friends were on average about as related to one another as fourth cousins, a genetic similarity of about 1 per cent of their DNA.

Although relatively small, the difference was still statistically significant, Professor Christakis said. "One per cent may not sound like much to the layperson, but to geneticists it is a significant number," he explained.

"And how remarkable: most people don't even know who their fourth cousins are. Yet we are somehow, among the myriad of possibilities, managing to select as friends the people who resemble our kin," he said.

The findings could not be explained by people tending to make friends with members of the same ethnic group as the heart study overwhelmingly involved Americans of European ancestry, the scientists said.

In their study published in the journal *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Christakis and Fowler suggest that the phenomenon may have evolved as a version of a well-documented feature in Darwinism known as "kin selection", when closely related animals cooperate to the mutual benefit of the genes they share.

The two scientists argued that friends are behaving as a sort of "functional kin" and that the genetic similarities of modern day friends to one another may have deep evolutionary roots that have in the past aided survival.

"Cues of kinship may foster altruistic impulses and cooperative exchanges with individuals displaying those cues, and it is not hard to imagine that such a system might possibly be extended to preferential (active) friendship formation," they write in their scientific paper.

The olfactory sense of smell may be one possible way for people to subconsciously judge the genetic similarity of strangers to themselves, they said.

Previous studies, for instance, have shown that women can judge male attractiveness based on smell and this may result in choosing spouses whose immune systems are genetically unrelated, which could serve as a mechanism for avoiding in-breeding, the scientists said.

Christakis and Fowler found evidence to support this idea by showing that friends are most similar in the genes affecting the sense of smell, but they are more dissimilar for the genes that control immunity.

"It is possible that individuals who smell things in the same way are drawn to similar environments where they interact with and befriend one another," the researchers said.

Perhaps the most intriguing result of the study, they said, is that the genes that are most similar between friends are also the ones that appear to have evolved the fastest over the past 30,000 years.

"It seems that our fitness depends not only on our own genetic constitutions, but also on the genetic constitutions of our friends," said Professor Christakis.

OBSAH:

Kapitola 22 DNA a RNA diagnostika lidských chorob	22-1
22.1. Nukleové kyseliny	22-1
22.2. Základní vlastnosti nukleových kyselin	22-2
22.2.1. Polymorfismus DNA	22-7
Délkový polymorfismus.....	22-7
Sekvenční polymorfismus.....	22-9
22.3. Principy práce s nukleovými kyselinami	22-10
22.3.1. Izolace a čištění (purifikace) nukleových kyselin	22-10
22.3.2. Použití restrikčních enzymů	22-10
22.3.3. Chimérická DNA, klonování a rekombinantní proteiny	22-12
22.4. Technologie (hybridizačních) sond	22-14
22.4.1. Hybridizační sondy	22-14
22.4.2. Metody založené na technologii hybridizačních sond.....	22-14
Sendvičová (sandwich) metoda.....	22-15
Southernův přenos (Southern blotting)	22-15
PNA sondy	22-16
22.5. Amplifikační techniky	22-17
22.5.1. Amplifikace sekvencí nukleových kyselin	22-18
Řetězová polymerázová reakce (PCR)	22-18
Řetězová ligázová reakce (LCR, LAR) a ligázová detekční reakce (LDR)	22-24
Reverzně transkripční řetězová polymerázová reakce (RT-PCR)	22-24
Transkripčně-amplifikační systém	22-25
Self-sustained sequence replication (NASBA, 3SR)	22-25
TMA (Transcription Mediated Amplification)	22-25
SDA (Strain Displacement Amplification)	22-26
22.5.2. Amplifikace hybridizační sondy	22-27
Q-beta replikázová amplifikace	22-27
22.5.3. Amplifikace signálu	22-28
bDNA-branched DNA assay (Multiple Sandwich Assay)	22-28
Složené sondy (Compound Probes).....	22-29
22.6. Sekvenování nukleových kyselin	22-29
22.7. Biosenzory, mikročipy a mikroarraye.....	22-31
22.8. Dodatky.....	22-34
22.8.1. Nové technologie v multiplexové kvantitativní real time PCR.....	22-34
Technologie DPO™	22-34
Pitcher a Catcher	22-36
Technologie TOCE®	22-37
Technologie cyclic-CMTA (CCMTA).....	22-38
Detekce mutací pomocí technologie TOCE™	22-38
22.8.2. Ukázky výsledků multiplexové PCR.....	22-39
22.8.3. Některé další enzymy používané při práci s nukleovými kyselinami	22-40
22.8.4. Nové jednotky	22-41
22.8.5. Doporučené adresy:.....	22-42
Pro pobavení a pro procvičení angličtiny článek z The Independent.....	22-43