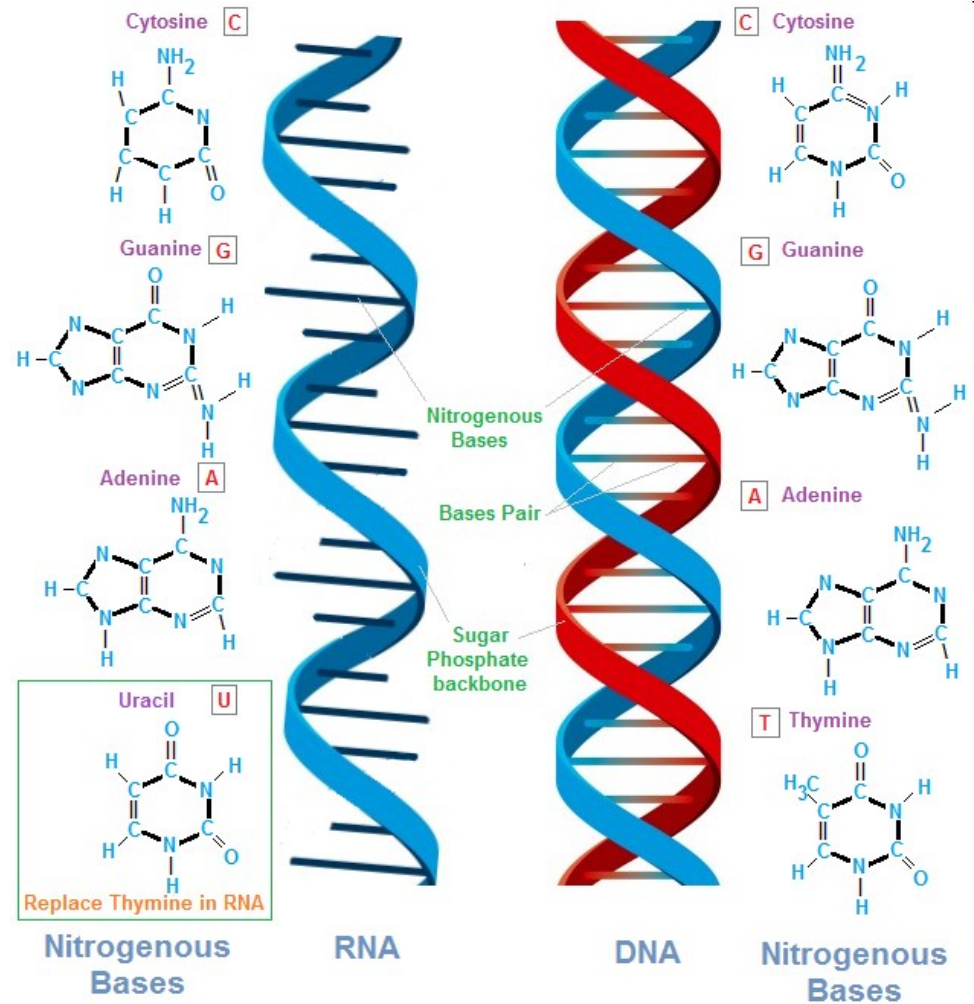
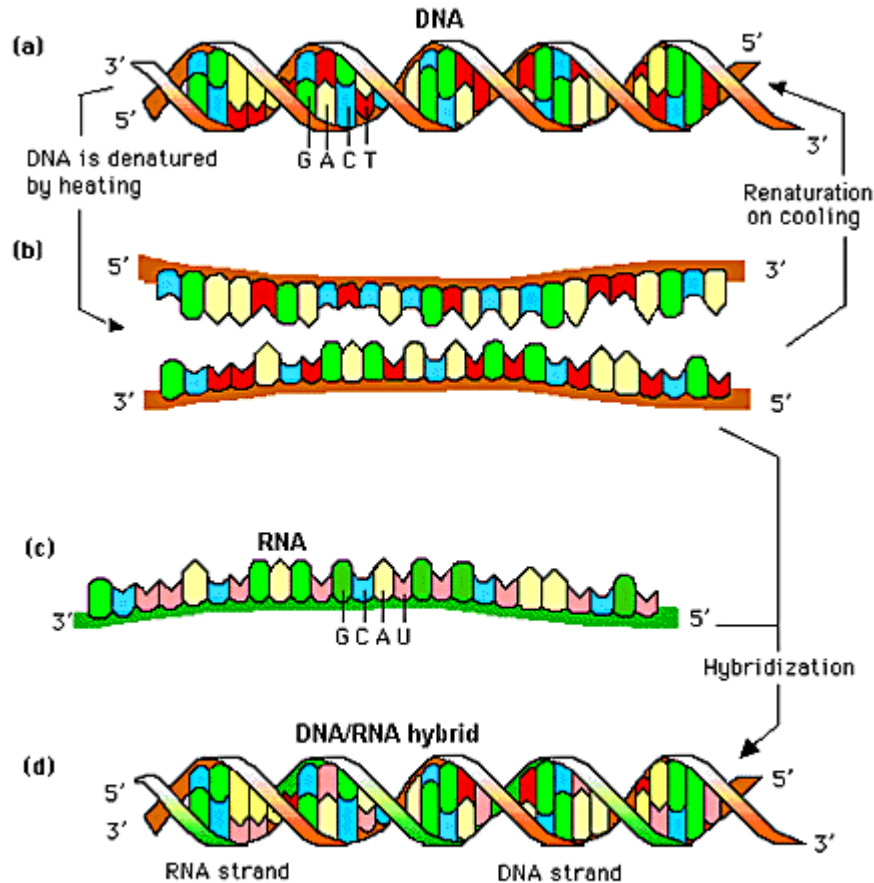


METODY ZALOŽENÉ NA HYBRIDIZACI NUKLEOVÝCH KYSELIN



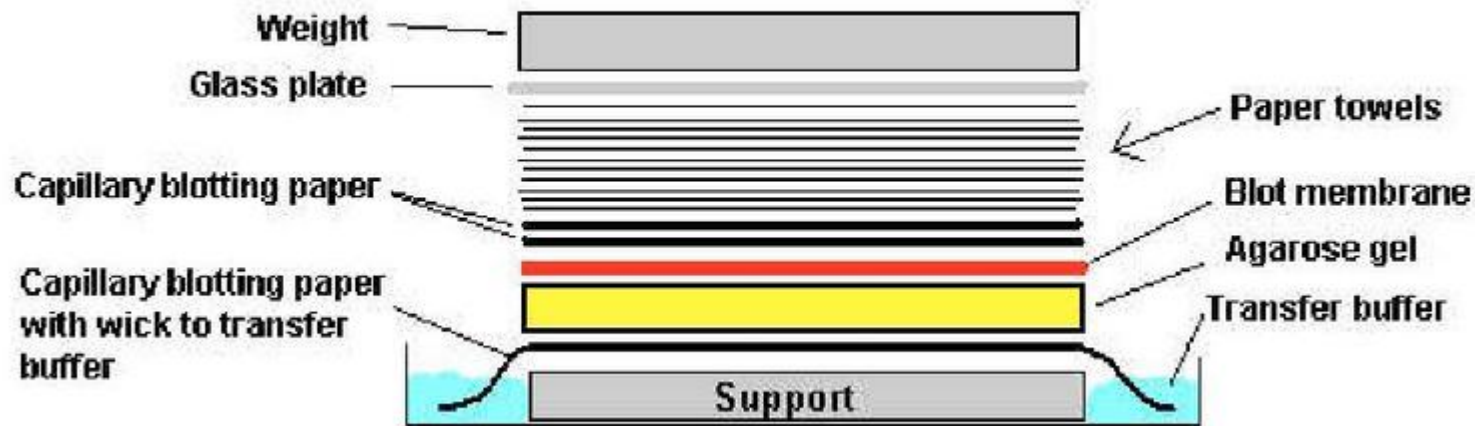
HYBRIDIZACE NA



Southernův přenos
northern blotting (hybr. RNA)
slot-, dot-, blot-hybridizace
in situ hybridizace

Nucleic Acid Hybridization

PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – KAPILÁRNÍ



Příprava gelu před blotováním:

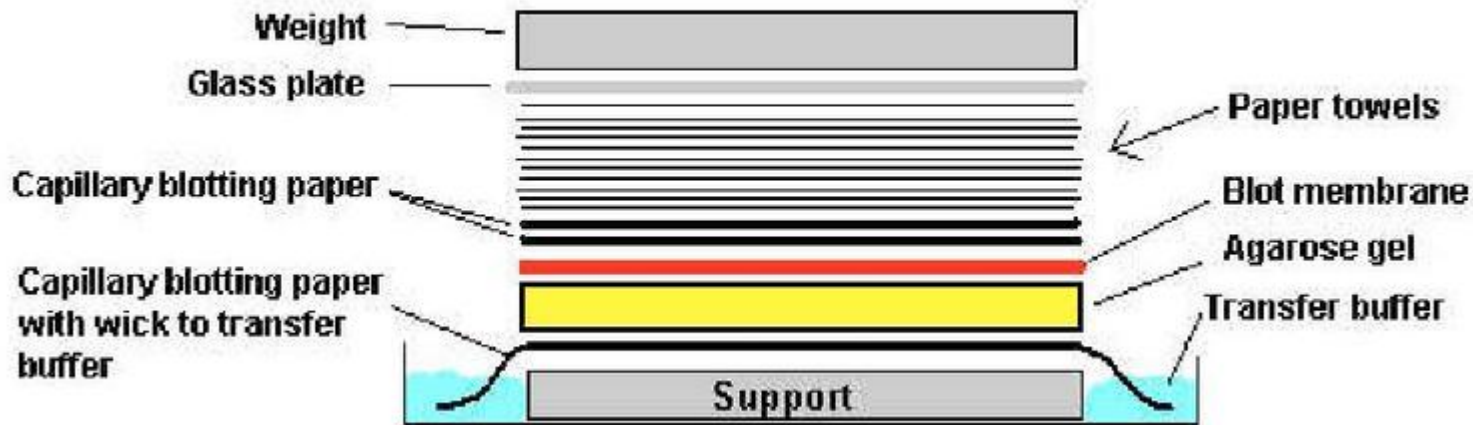
DNA: kyselá depurinace (0.25 M HCl)

alkalická denaturace (0.4 M NaOH), blotování v NaOH

+ neutralizace (3 M NaAc, pH 5.5), blotování v 10xSSC

RNA: MÍRNÁ denaturace (0.05 M NaOH), blotování ve 20xSSC

PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – KAPILÁRNÍ



Přenos DNA / RNA na nylonovou membránu: (srovnání s nitrocelulózovou)

mechanicky odolná

pozitivně nabitě membrány, blotting v alkalickém prostředí

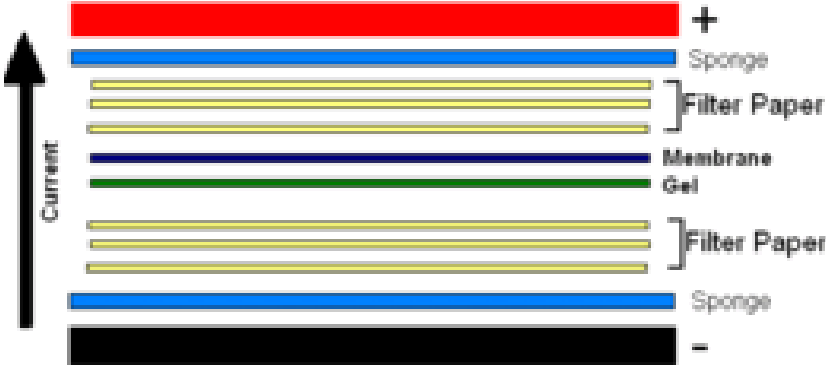
- kovalentní vazba DNA na membránu (UV crosslink, zapékání při 80°C)

vazba krátkých fragmentů (< 50 pb)

vyšší pozadí

PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – ELEKTROBLOTTING

Transfer Stack



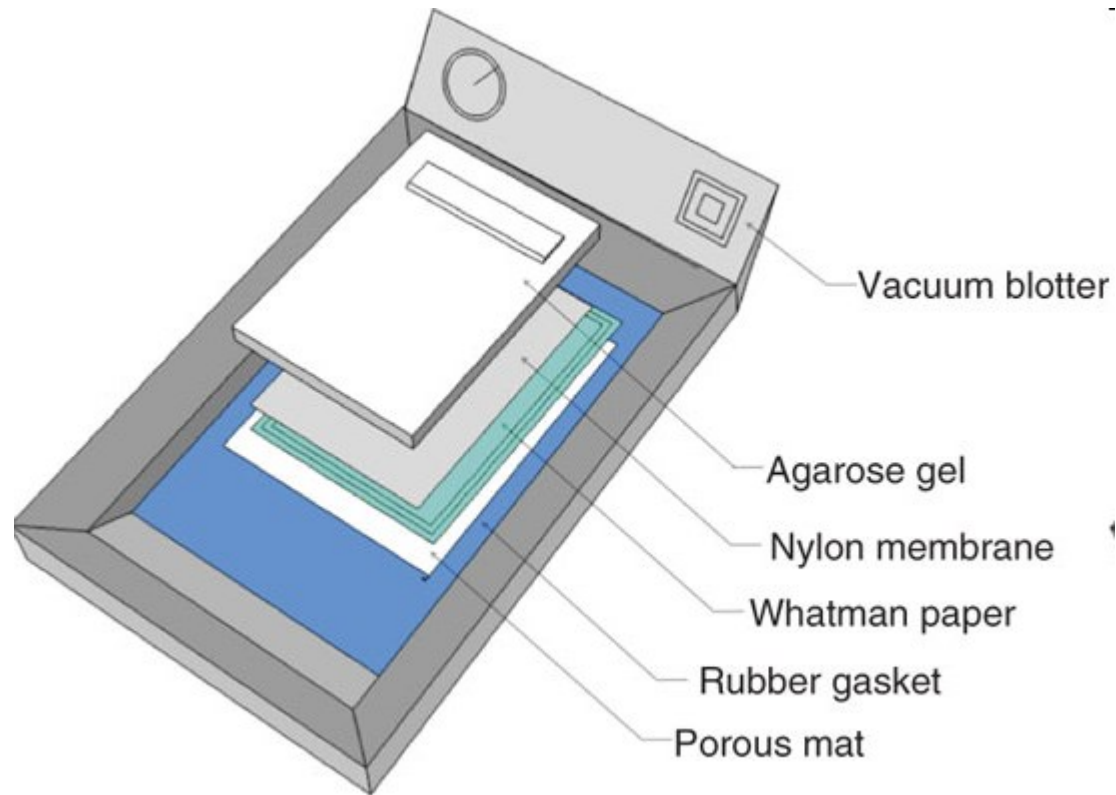
www.frilabo.pt

semi-dry blotting:



www.isogen-lifescience.com

PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – VAKUOVÝ



Kimura et al., Nature Protocols 2010

HYBRIDIZACE

V pufrch s vyšší koncentrací solí, s detergentem (SDS)

RNA:RNA > RNA:DNA > DNA:DNA

Značená ssRNA: vysoká afinita k homolognímu úseku



silný signál

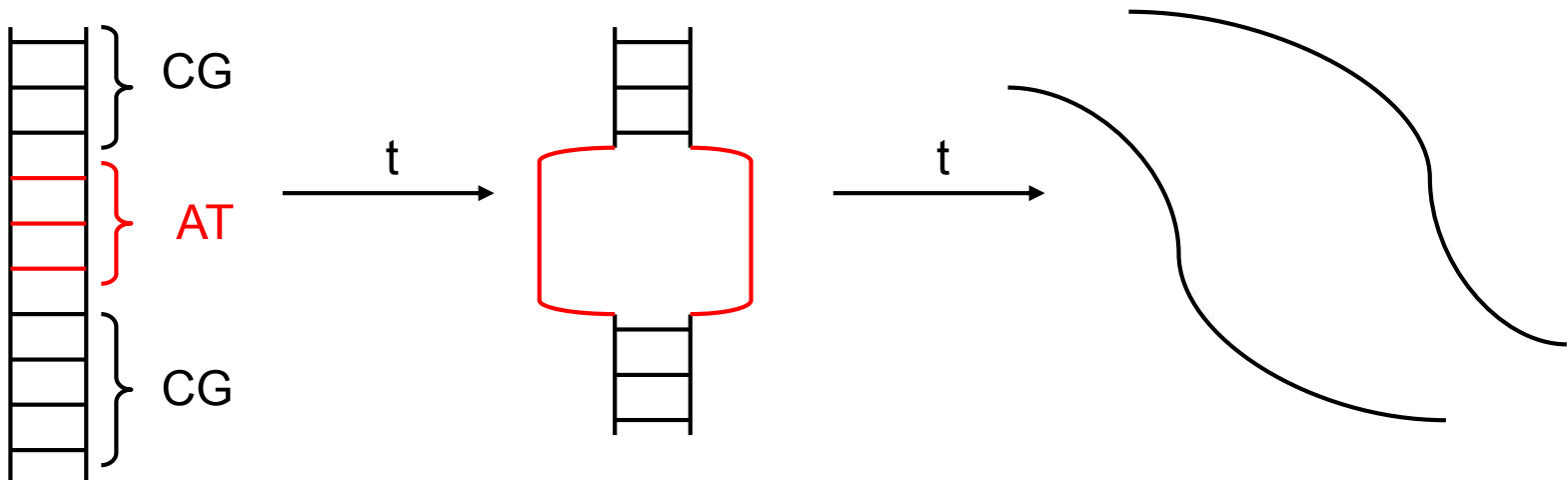
X

citlivost próby k RNázám

HYBRIDIZACE

Teplota hybridizace:

- obsah CG
- délka hybridizační próby
- homologie mezi próbou a sekvencí na membráně
- koncentrace solí
- pH
- složení hybridizačního pufru (formamid, PEG 6000, dextransulfát)



HYBRIDIZACE

Teplota hybridizace a koncentrace solí:

Vodné roztoky:

$$T_m = 69.3 \text{ °C} + 0.41(\%G+C) \text{ °C}$$

$$\text{CG 40\%} \quad T_m = 85.7 \text{ °C}$$

$$\text{CG 45\%} \quad T_m = 87.5 \text{ °C}$$

$$\text{CG 60\%} \quad T_m = 93.9 \text{ °C}$$

Roztoky solí (SSC):

$$\text{Eff}T_m = 81.5 + 16.6(\log M(\text{Na}^+)) + 0.41(\%G+C) - 0.72(\%\text{formamide})$$

1% „nehomologie“ snižuje T_m o 1.4 °C

Teplota hybridizace $T_m - 20 \text{ °C}$

HYBRIDIZACE

Próba > 100 pb: hybridizace při ~ 65 °C

Oligonukleotidy: hybridizace při ~ 55 °C

Formamid: snižuje T_m (hybridizace RNA), hybridizace při ~ 42 °C

PEG 6000:
Dextran sulfát: } molekuly próby síťují – zvýšení citlivosti (10 – 100x)

Komerční hybridizační pufrы: vysoce senzitivní a SPECIFICKÁ hybridizace při nízké teplotě (42 °C)

Stringence: nastavení podmínek hybridizace a odmývání, reflektuje homologii sekvencí a typ próby

Vysoká stringence: homologní sekvence (~95%) a delší próby;
0.2xSSC, 65 °C

Nízká stringence: 2xSSC, 55 – 65 °C, homologie ~80%

HYBRIDIZACE

RNA:

RNA:RNA – vysoká T_m – hybridizační pufrы s formamidem, odmývání při vysoké stringenci

Všechny reagenty a použité nádoby musí být RNase-free

Hybridizace a odmývání: hybridizační pece:

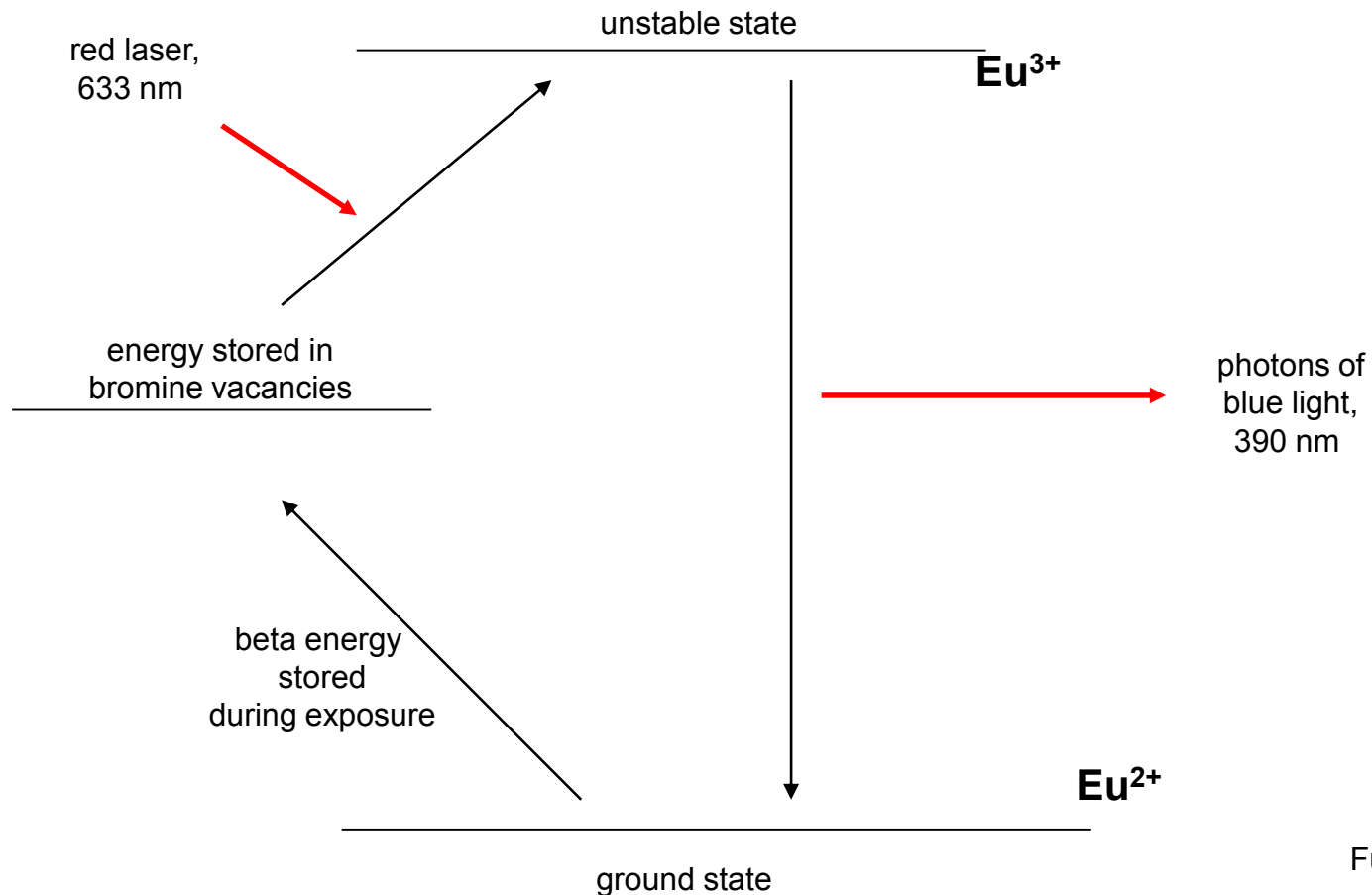


Trigon Plus

HYBRIDIZACE

Detekce radioaktivního signálu:

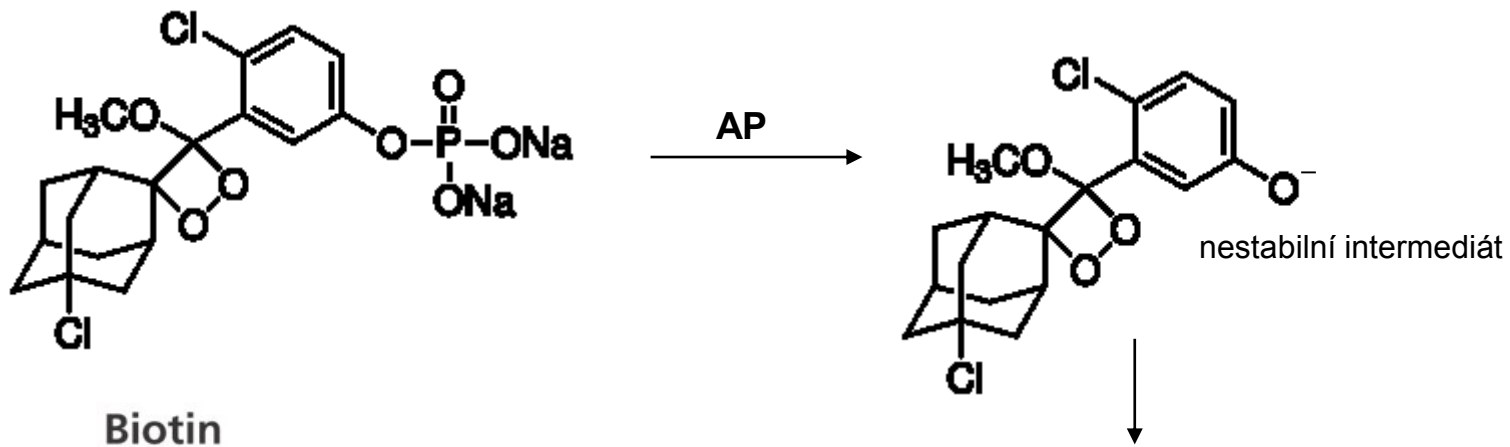
fosfo-imagery: energie je „uložena“ ve fotostimulačních krystalech
(BaFBr:Eu²⁺)



HYBRIDIZACE

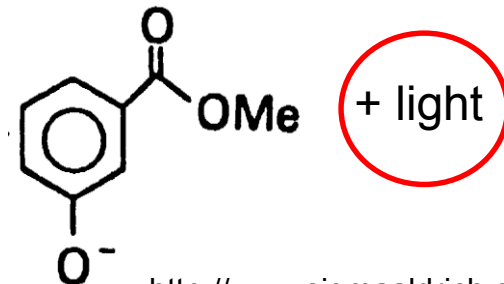
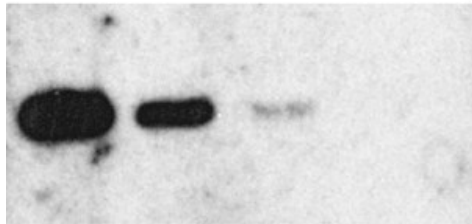
Detekce neradioaktivního signálu: chemiluminiscence, fluorescence

Chemiluminiscenční substrát pro detekci alkalické fosfatázy: CDP Star (Sigma)



Biotin

1000 100 10 1 pg pUC18

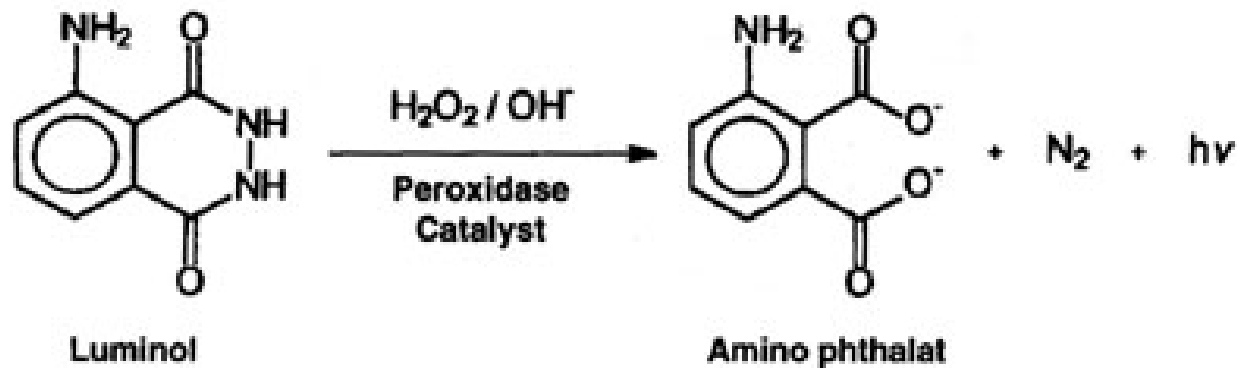


<http://www.sigmaaldrich.com/>

HYBRIDIZACE

Detekce neradioaktivního signálu: chemiluminescence, fluorescence

Chemiluminiscenční substrát pro detekci peroxidázy: Luminol



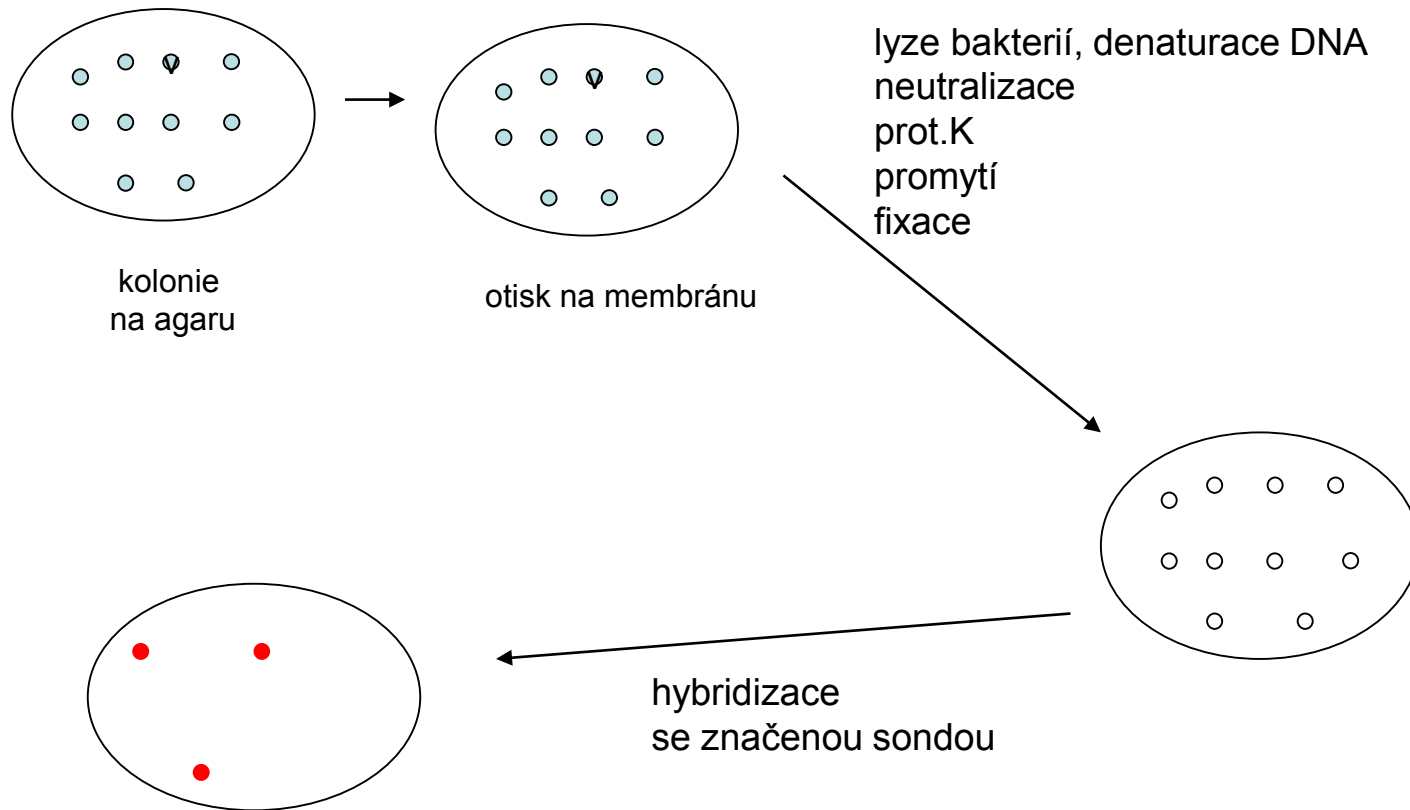
<http://www.anthromed.org/Article.aspx?artpk=74>

ECL – enhanced chemiluminescence

VYUŽITÍ HYBRIDIZACE

• PLAQUE HYBRIDIZATION

identifikace pozitivních kolonií



VYUŽITÍ HYBRIDIZACE

- **SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM**

identifikace záměn jednotlivých nukleotidů

Predispozice k chorobám, predikce odpovědi na léčbu

SNP v genu pro apolipoprotein E – predispozice pro Alzheimerovu nemoc

Bioinformatické databáze pro SNP: dbSNP (NCBI)

Human Gene Mutation Database
International SNP Map

Metody analýzy: sekvenování

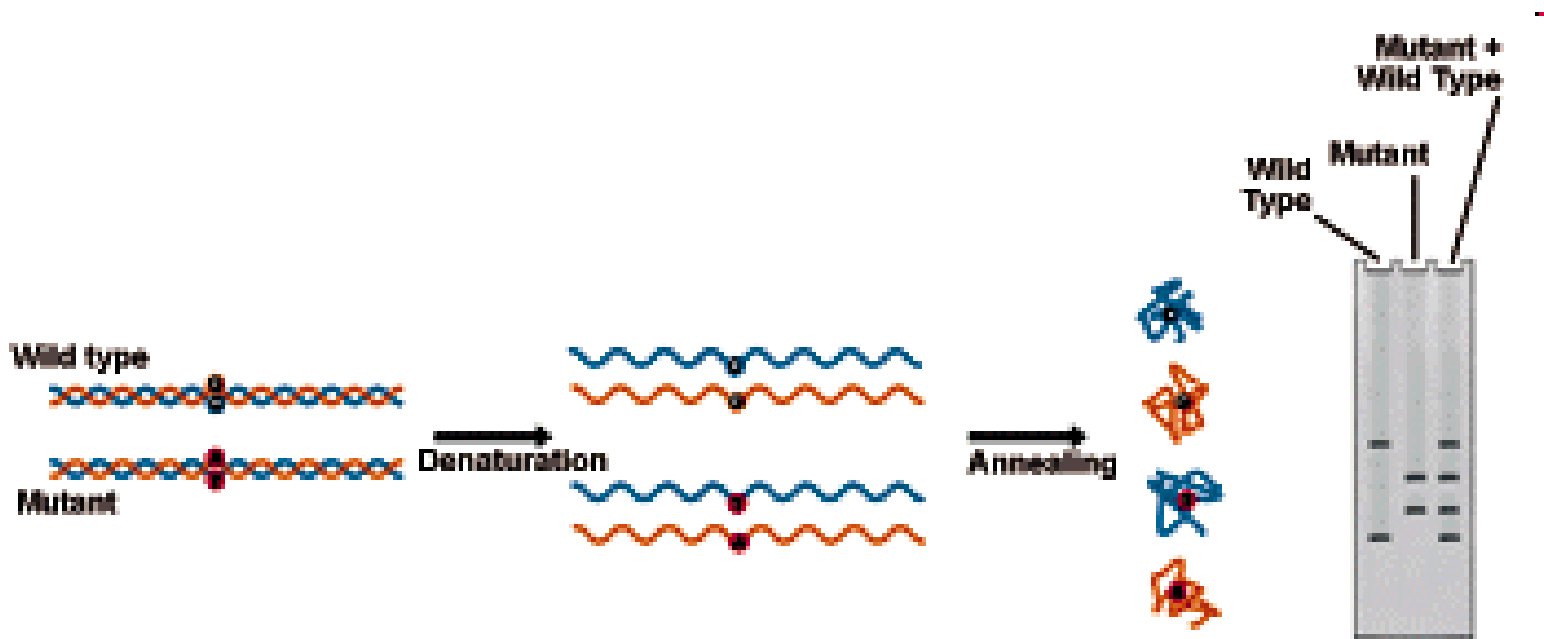
hybridizace

SSCP (single strand conformation polymorphism)

RFLP (restriction fragments length polymorphism)

DETEKCE SNP

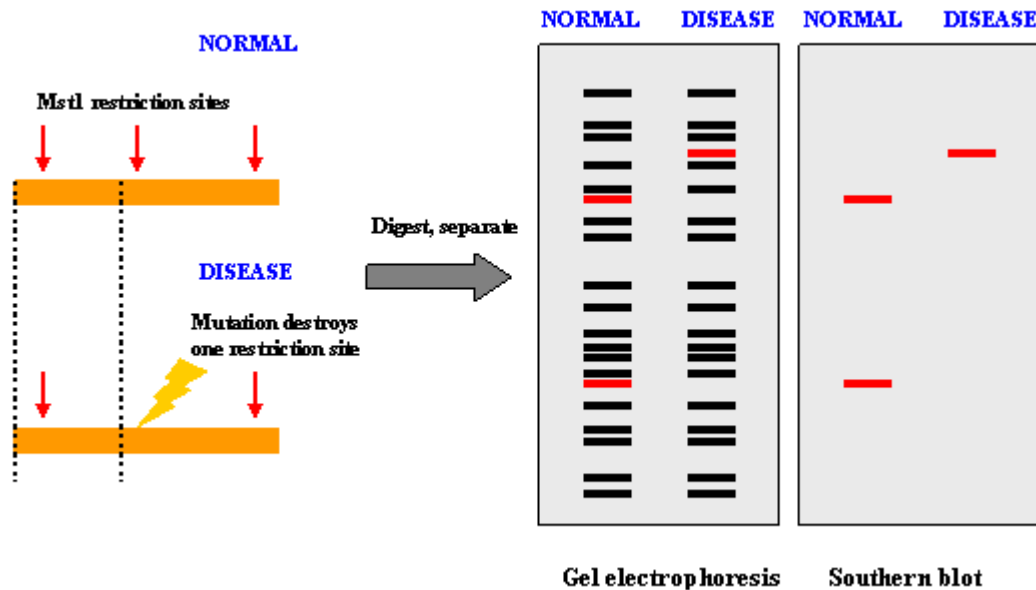
- **SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)**



<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/sscp-analysis>

DETEKCE SNP

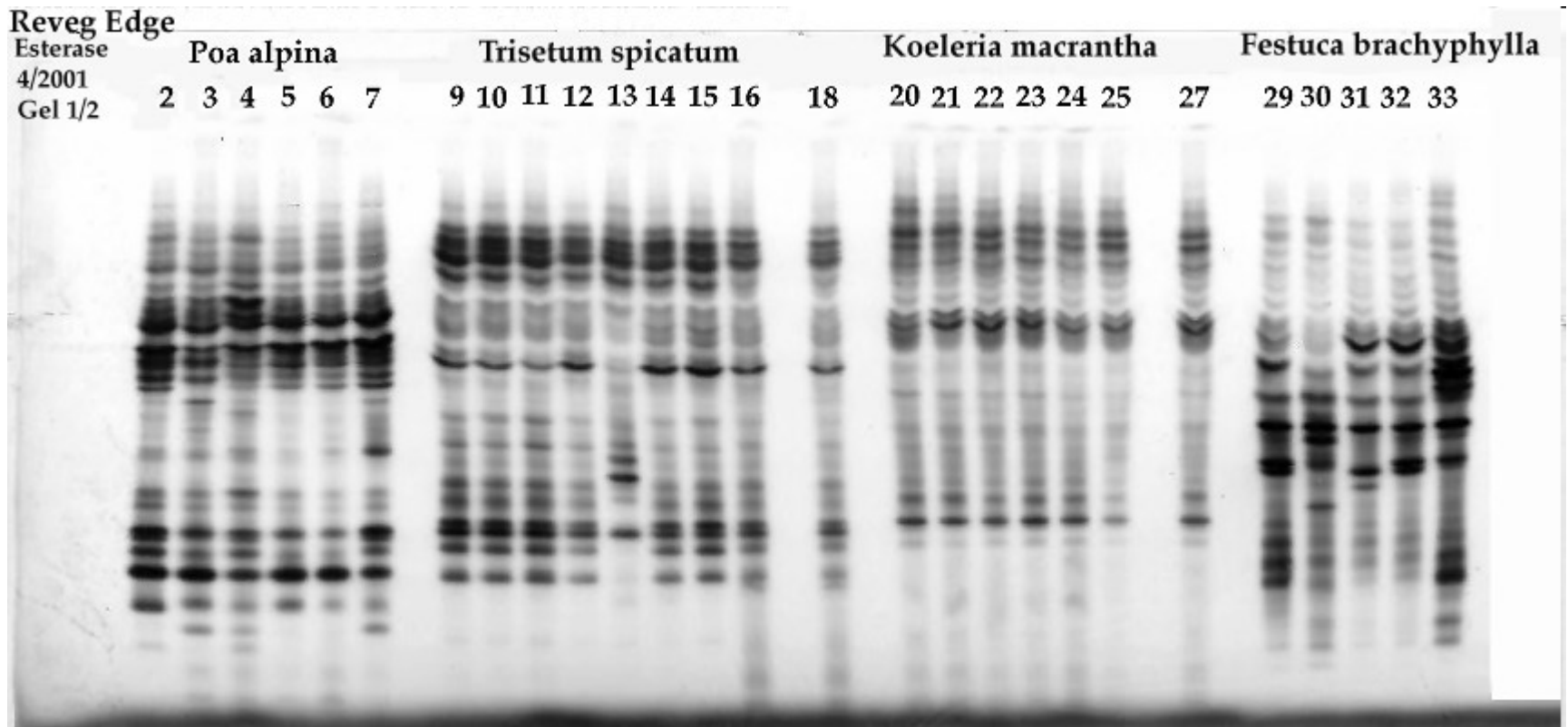
- RFLP (RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM)



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>

DETEKCE SNP

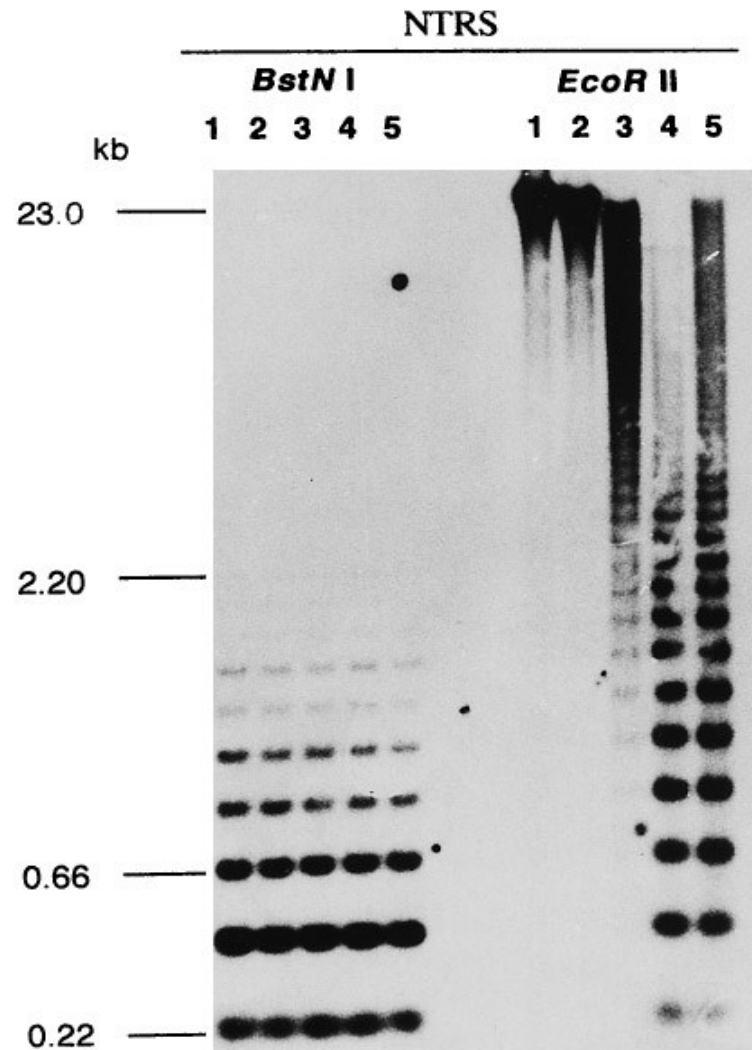
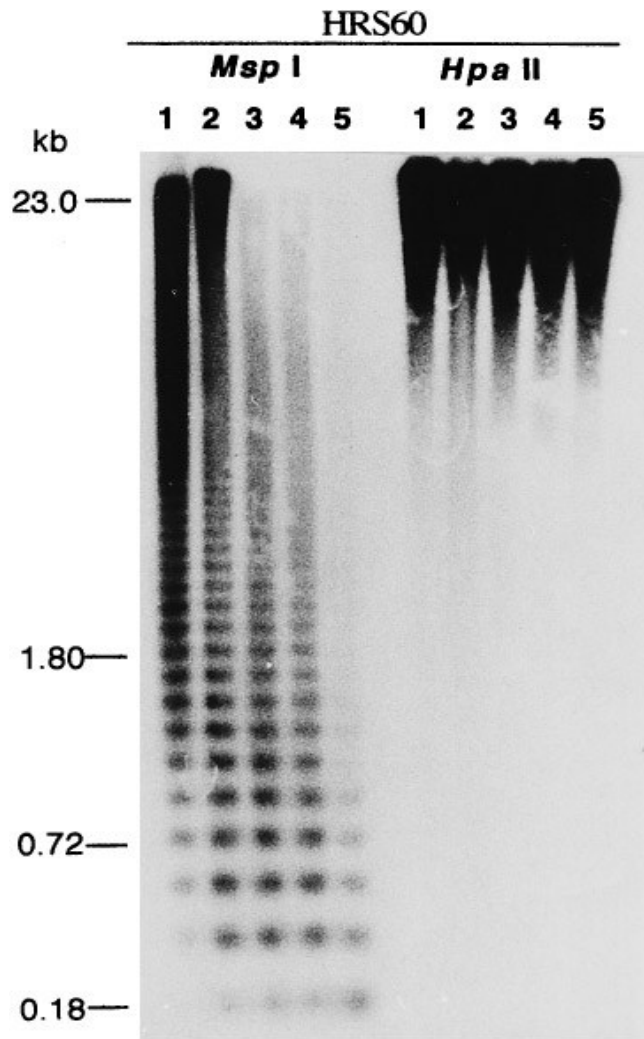
- **RFLP (RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM)**
identifikace ekotypů



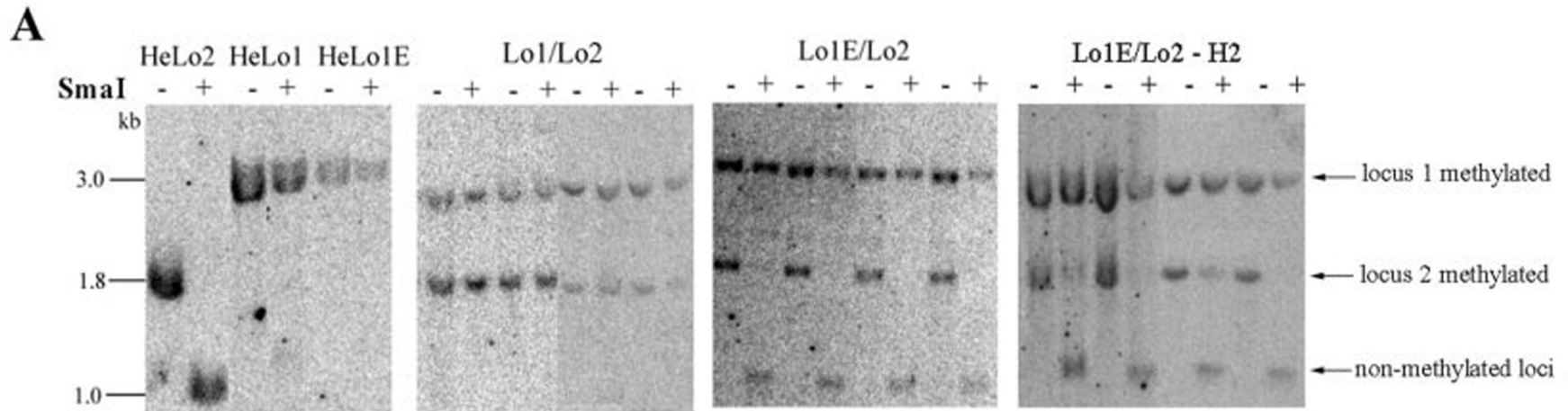
ANALÝZA METYLACE DNA

1. Digeste metylačně citlivou restriční endonukleázou
2. Elfo na agarózovém gelu
3. Blotting na nylonovou membránu
4. Hybridizace s radioaktivně značenou sondou
5. Detekce signálu

ANALÝZA METYLACE DNA



ANALÝZA METYLACE DNA



Fojtová et al., 2006

Sma I - CCCGGG

ANALÝZA DÉLKY TELOMER

Terminal restriction fragments (TRF)

1. Štěpení genomové DNA frekventně štěpící RE, která nemá rozpoznávací místo v telomerové repetici (TTAGGG, TTTAGGG)

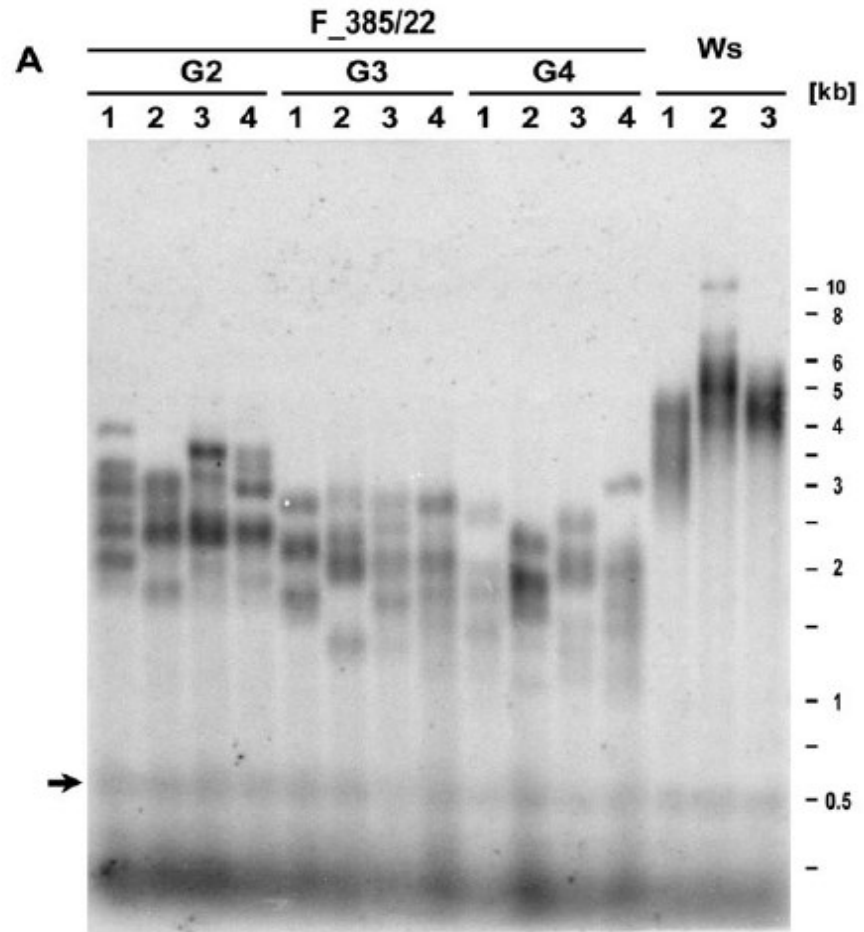
Tru I (*Mse* I) TTAA

Hae III GGCC

Rsa I GTAC

2. Elfo na agarózovém gelu
3. Blotting na nylonovou membránu
4. Hybridizace s radioaktivně značenou sodnou (telomerový oligonukleotid)
5. Detekce hybridizačního signálu

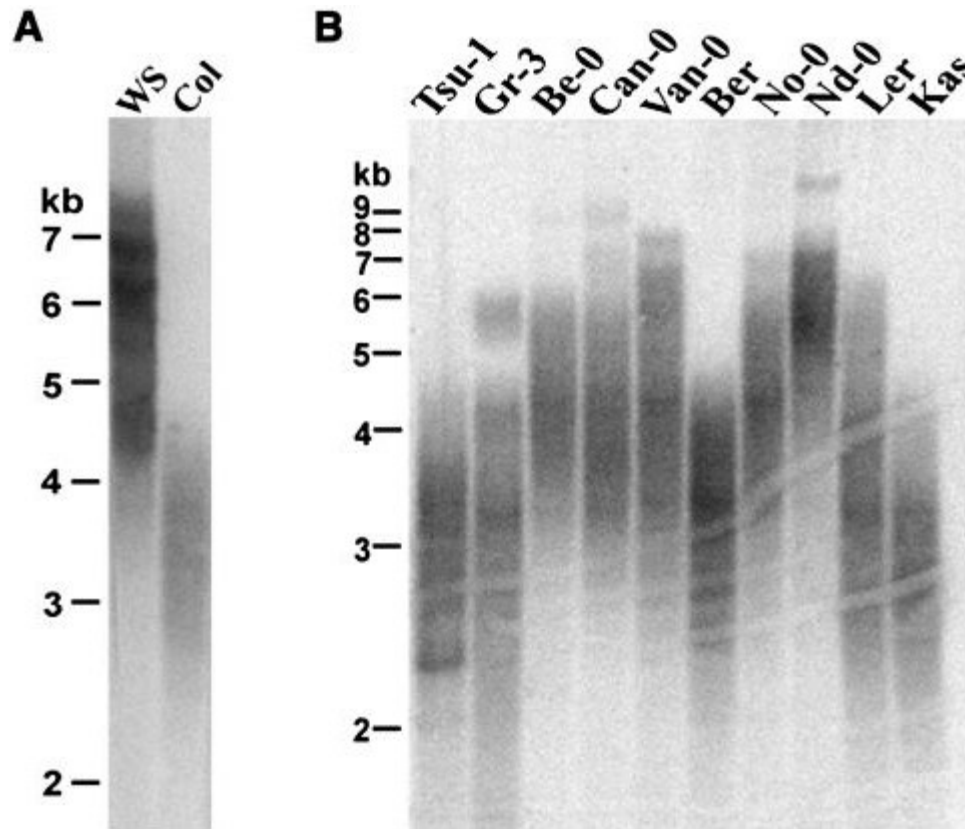
ANALÝZA DÉLKY TELOMER



Telomery *A. thaliana*,
ecotype Wassilevskija

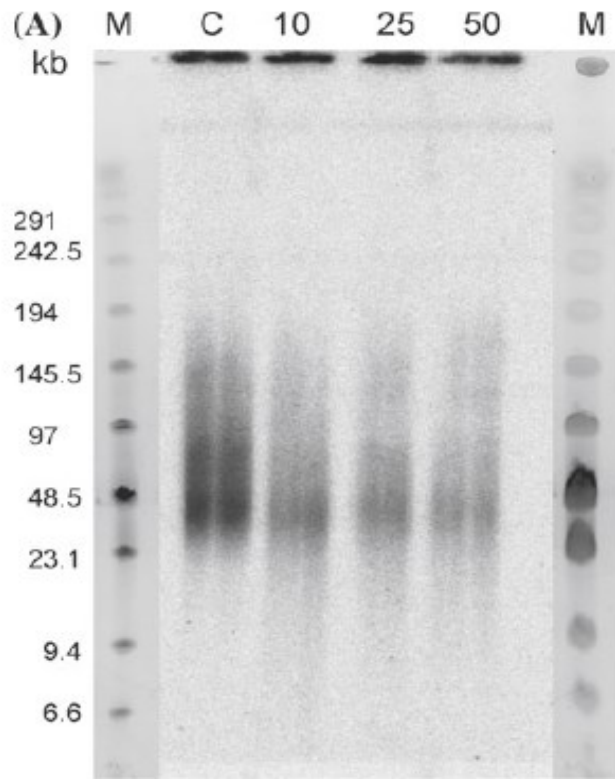
Fojtová et al., 2011

ANALÝZA DÉLKY TELOMER



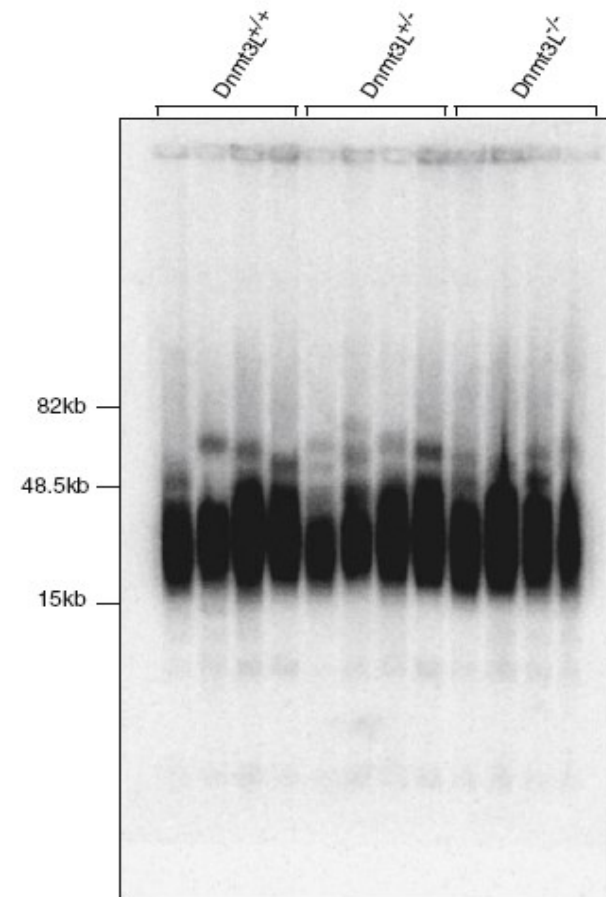
Shakirov and Shippen, 2004

ANALÝZA DÉLKY TELOMER



Majerová et al., 2011

Telomery TBV-2
(suspenní tkáňová kultura tabáku)

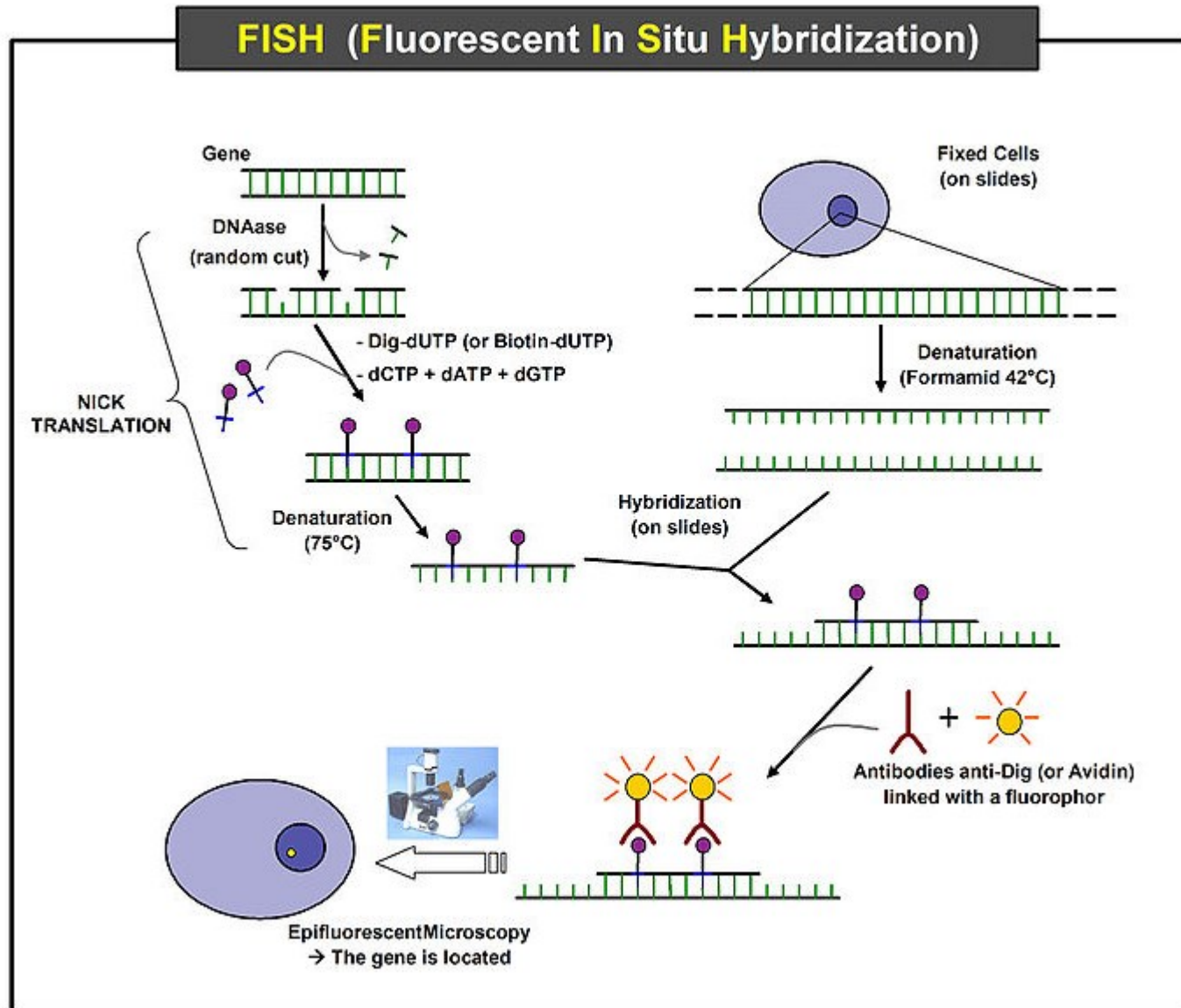


Roberts et al., 2011

Slezina, dospělé myši

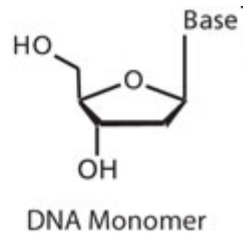
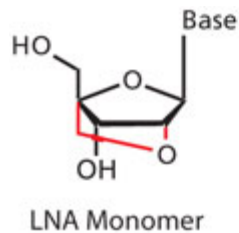
Izolace vysokomolekulární DNA (HMW DNA), PFGE (pulse field gel electrophoresis)

FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE



FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

LNA (locked nucleic acid) sondy

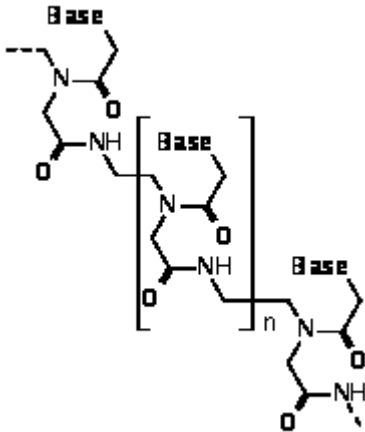


metylénový můstek – vyšší teplotní stabilita
nižší flexibilita
vyšší hybr. interakce

sekvence	bází LNA	T _m
GTGATATGC	0	29 °C
GTGATATGC	3	55 °C
GTGATATGC	9	64 °C

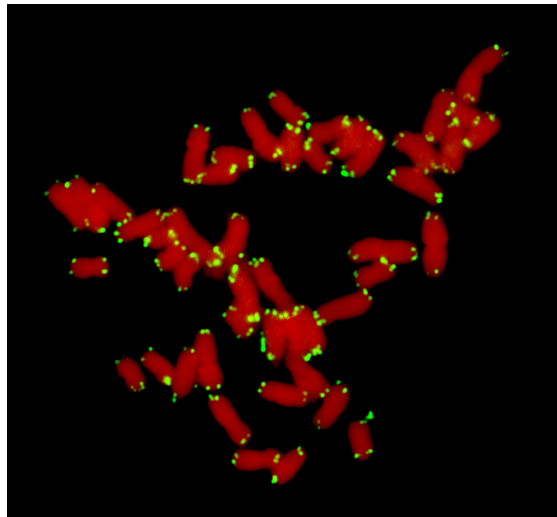
FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

PNA (peptide nucleic acid) sondy



N-(2-aminoethyl)-glycinové monomery
spojené peptidovou vazbou

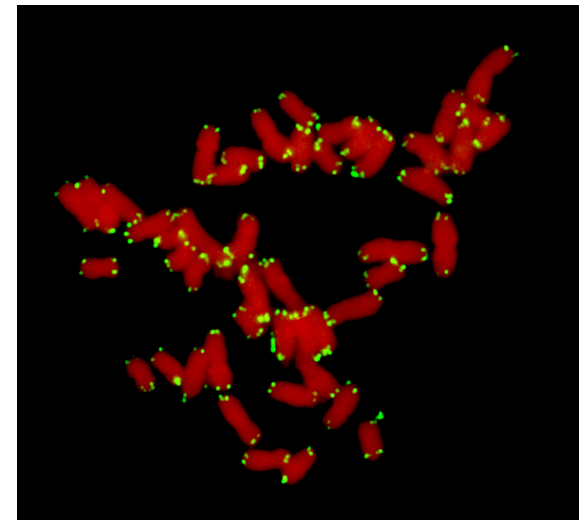
Silná vazba PNA:DNA (bez elektrostatické repulse)
Hydrofobní



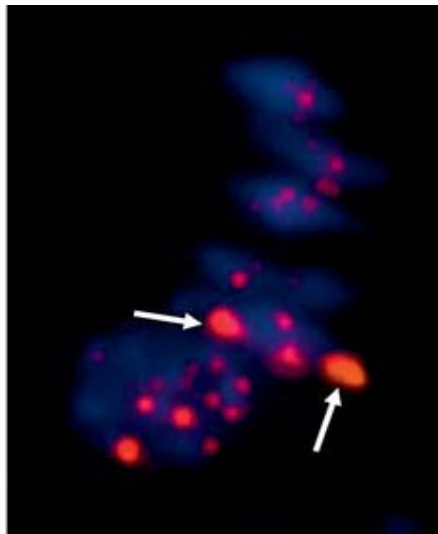
Telomery *Nicotiana tabacum*, © T. Mandáková

FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

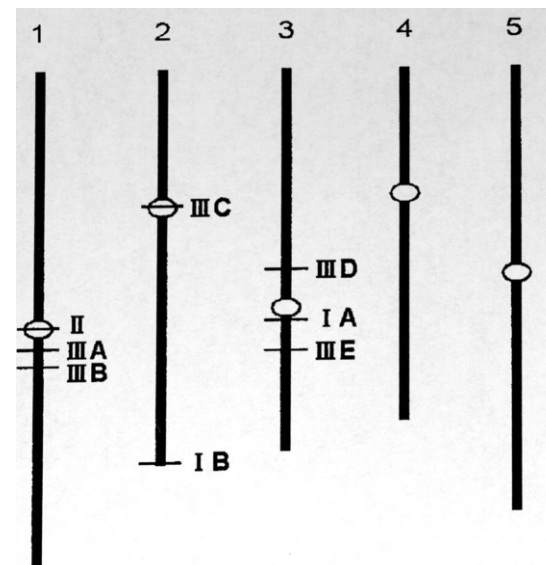
Identifikace intersticiálních (interních) telomerových sekvencí



Telomery *Nicotiana tabacum*, © T. Mandáková

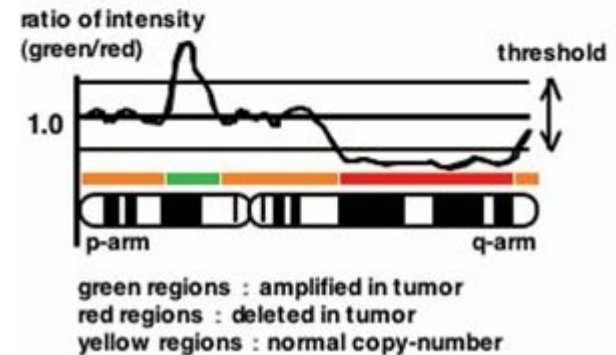
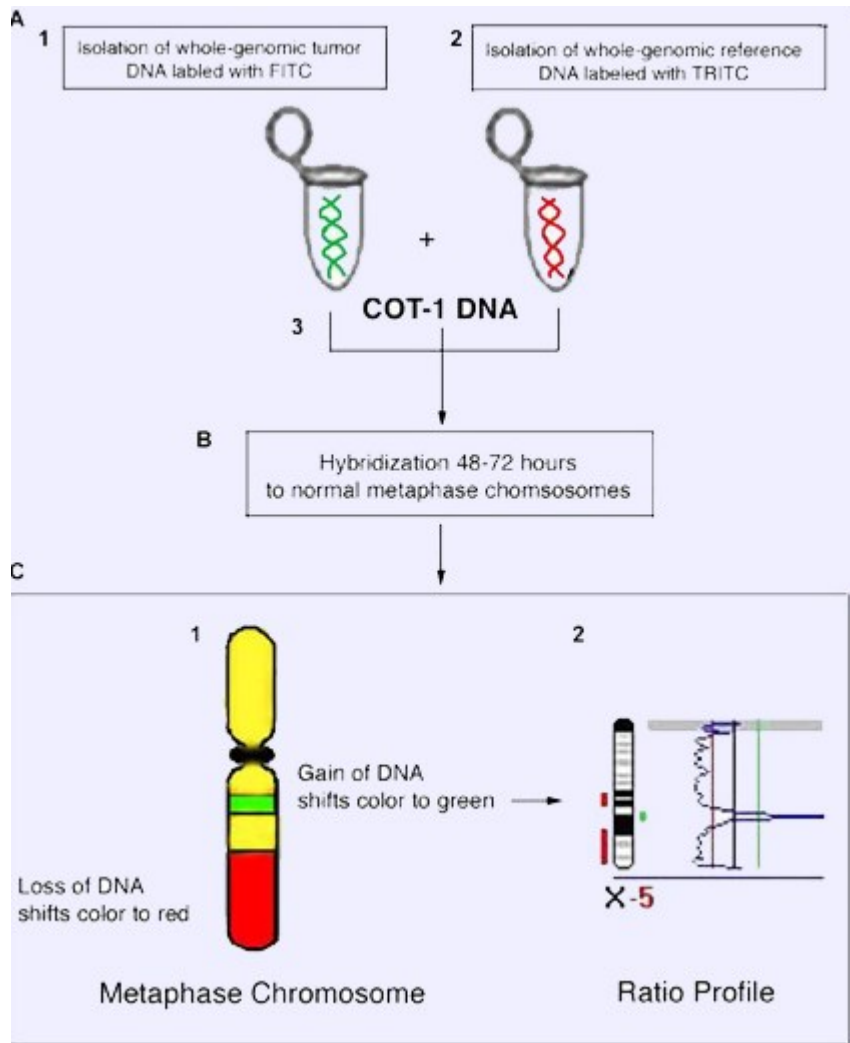


Telomery *A. thaliana*, Šíroký et al., 2002



Uchida et al., 2002

KOMPARATIVNÍ GENOMOVÁ HYBRIDIZACE



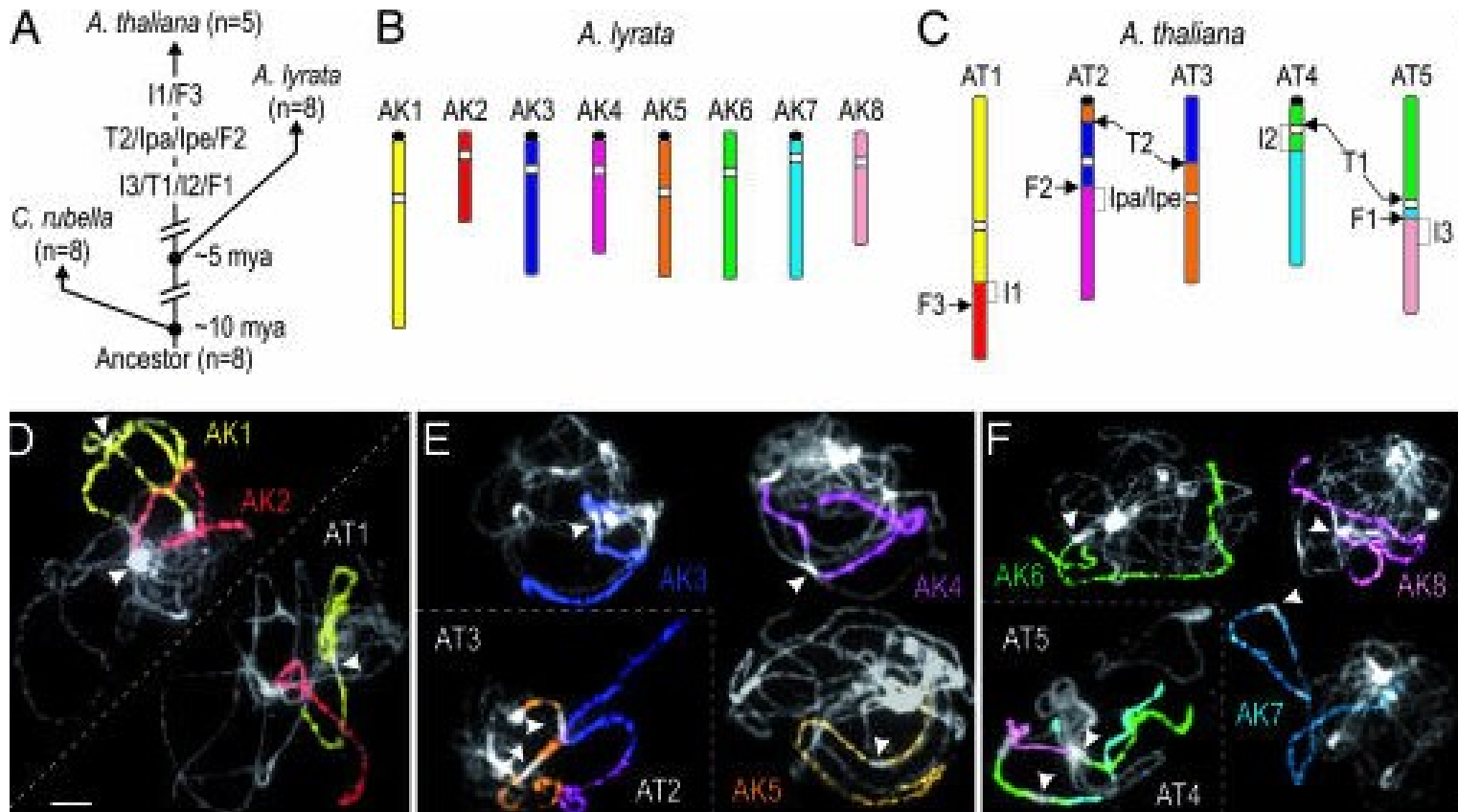
CHROMOSOME PAINTING

Vizualizace velkých chromosomových segmentů se specifickými fluorescenčně značenými DNA sondami (BAC).

Savci, ptáci, plazi, hmyz – identifikace chromozomálních aberací (diagnostika), chromosomové přestavby (evoluční studie)

Rostliny – velký počet chromosomově nespecifických signálů (vysoká komplexita rostlinných genomů)

CHROMOSOME PAINTING



Lysák et al. 2006