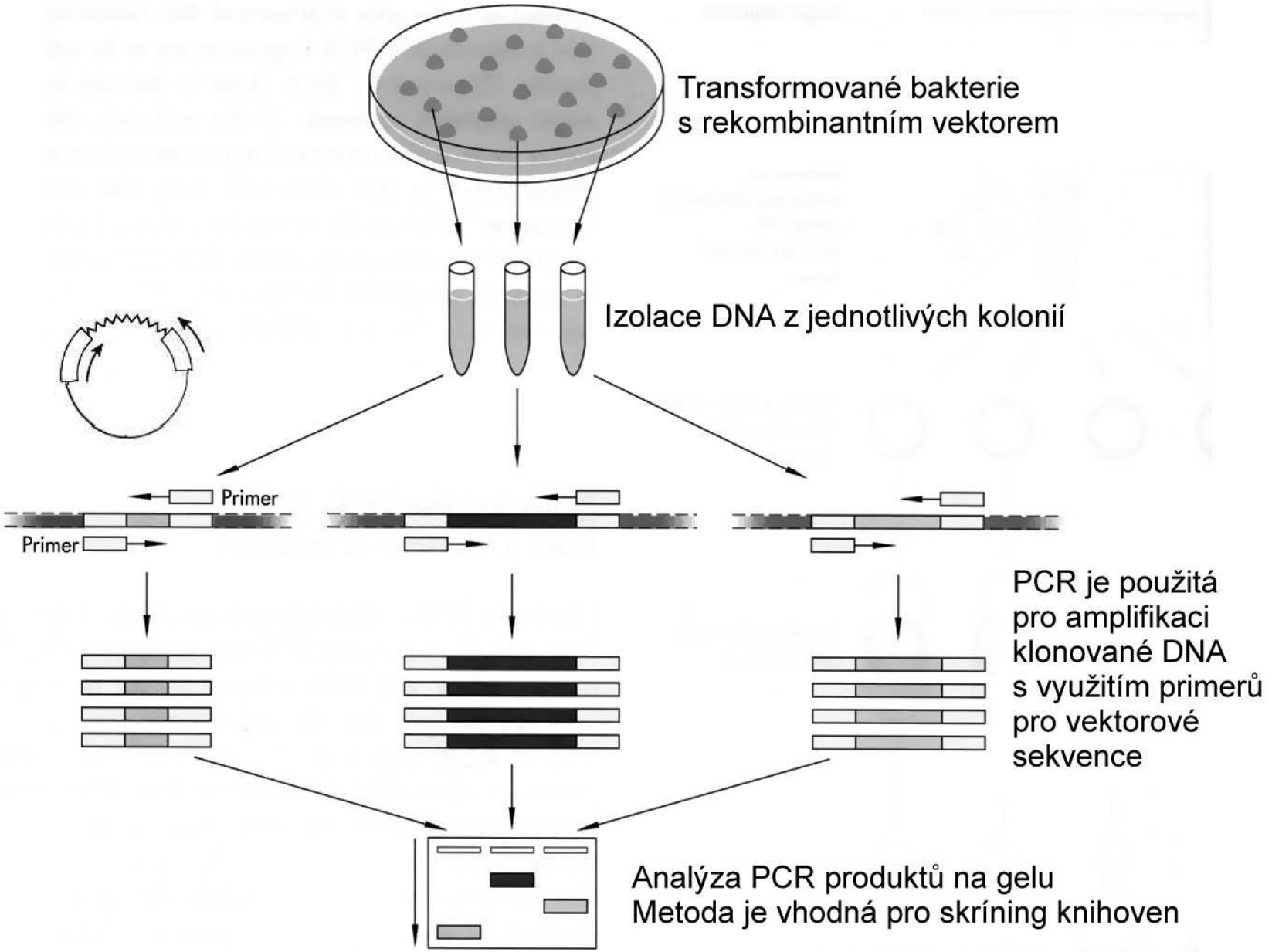
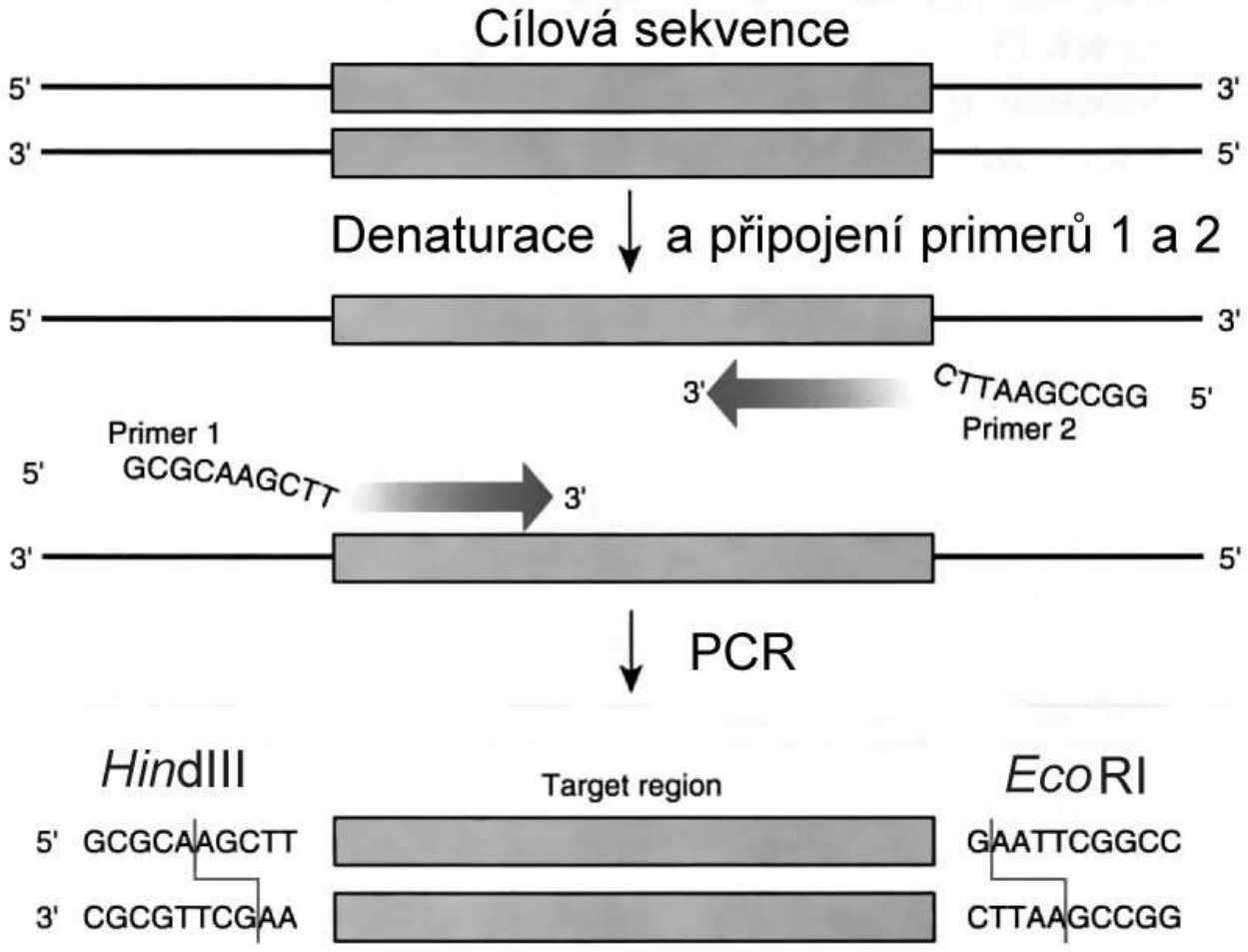
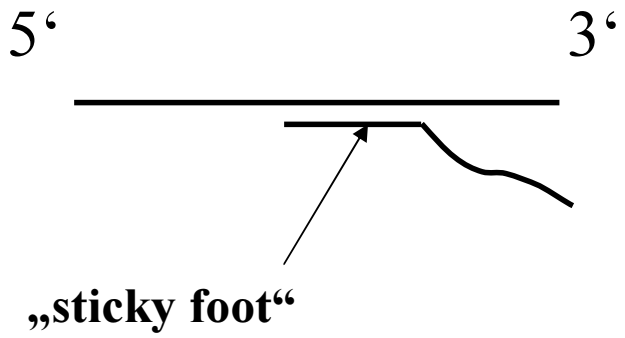
Modifikace PCR používané při analýze genomu

Amplifikace sekvencí klonovaných ve vektorech



Modifikace konců DNA, expression cassete PCR (EC-PCR) Připojení sekvencí prostřednictvím 5‘-konců primerů



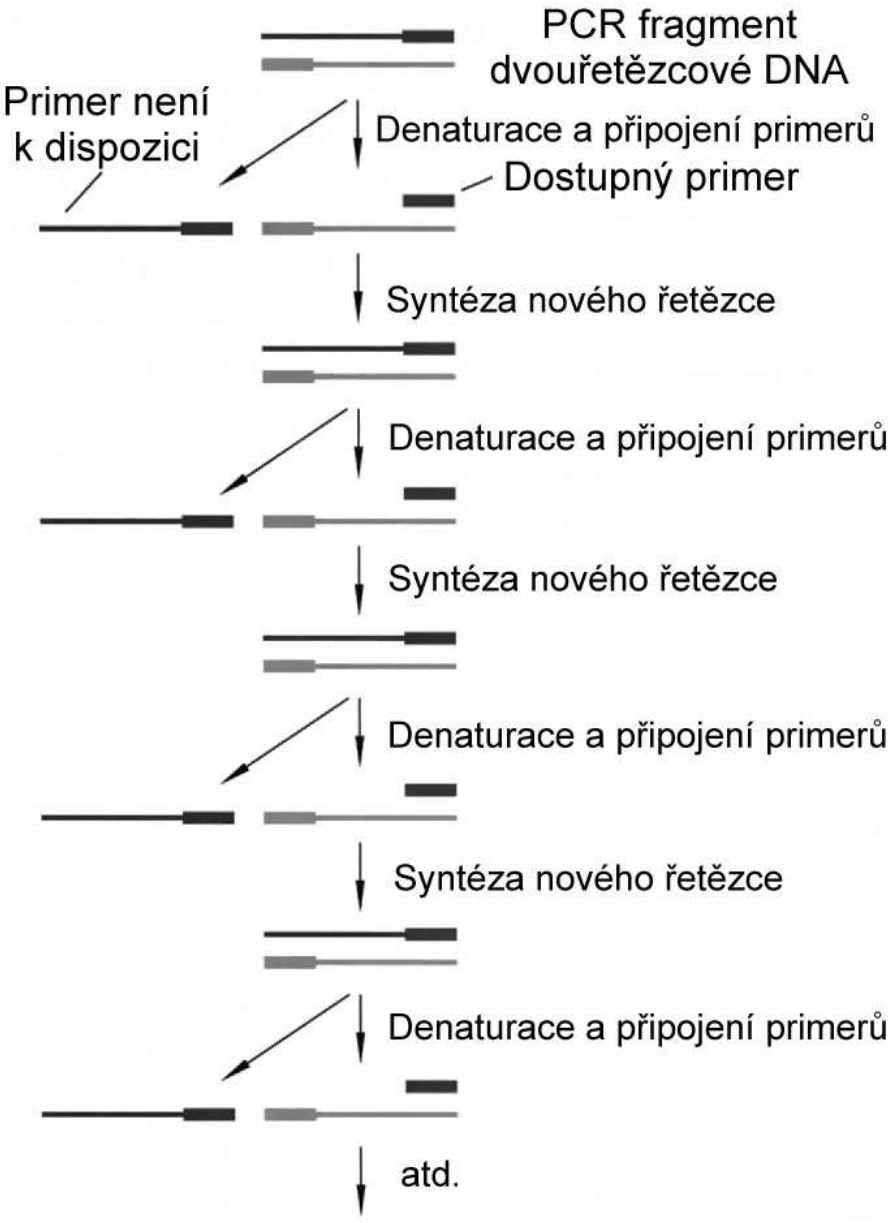


- Přidávané sekvence
  - RE místa
  - Promotory
  - Terminátory
  - Translační signály

Asymetrická PCR

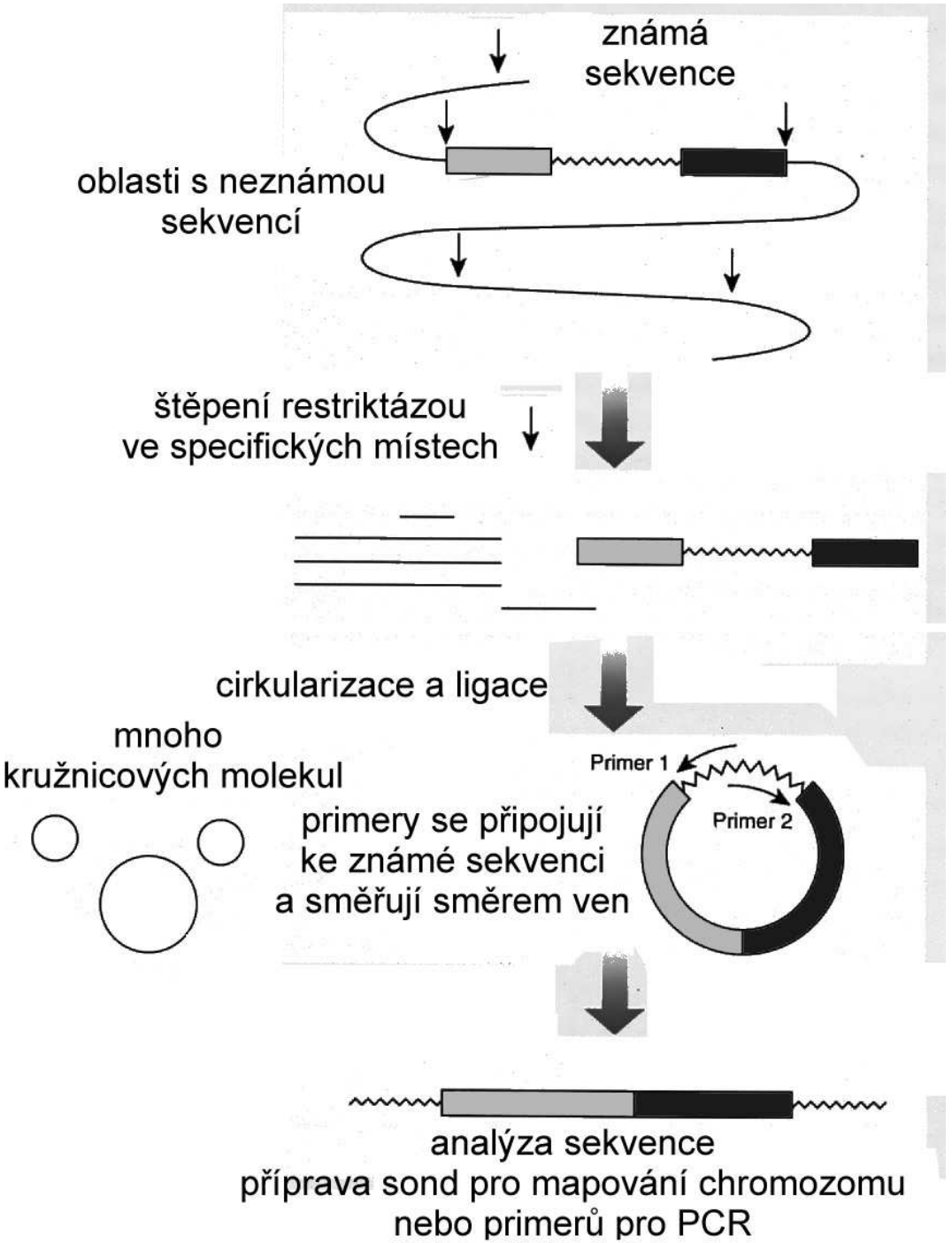
Cycseqpc.exe

- Podobně jako jiné DNA, lze produkty PCR sekvencovat.
- Templátem pro Sangerovu metodu jsou ssDNA. Pro jejich přípravu se používá se technika označovaná jako asymetrická PCR, při níž jsou tvořeny preferenčně ssDNA.
- Standardní PCR se založí s tím rozdílem, že výchozí koncentrace primerů se liší faktorem 100 (tj. jeden z primerů je ve 100 x vyšší konectraci než druhý).
- Dvouřetězcové DNA fragemnty se tvoří až do doby, než se jeden z primerů nevyčerpá.
- Druhý primer pak dále syntetizuje pouze jeden z řetězců - i když se tento tvoří spíše lineární než exponenciální rychlostí, je jeho množství postačující pro sekvencování.

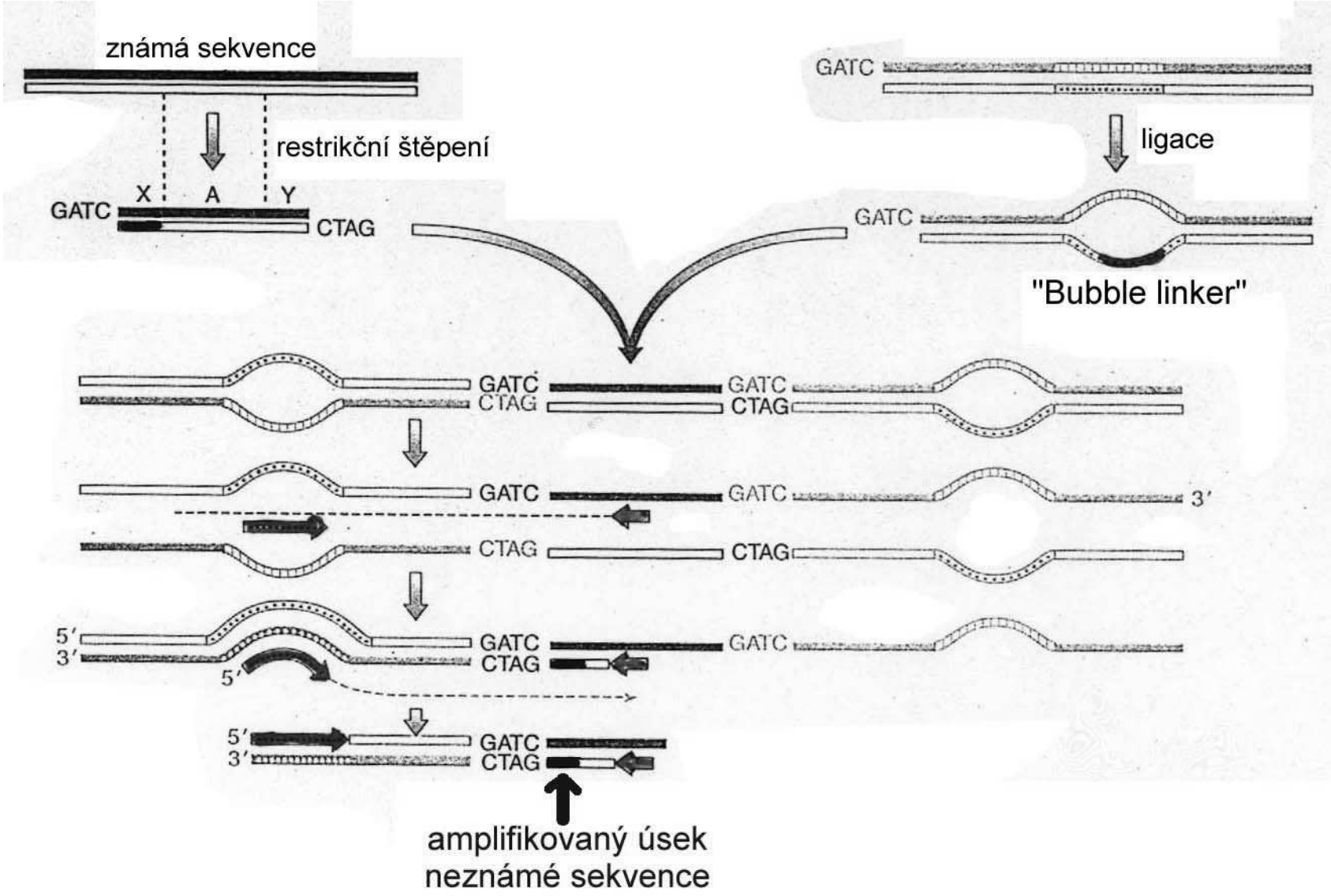


Obrácená PCR (I-PCR)

PCR umožňující amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničené na obou stranách DNA se známou sekvencí.



Využití adaptorů pro PCR amplifikaci neznámé sekvence

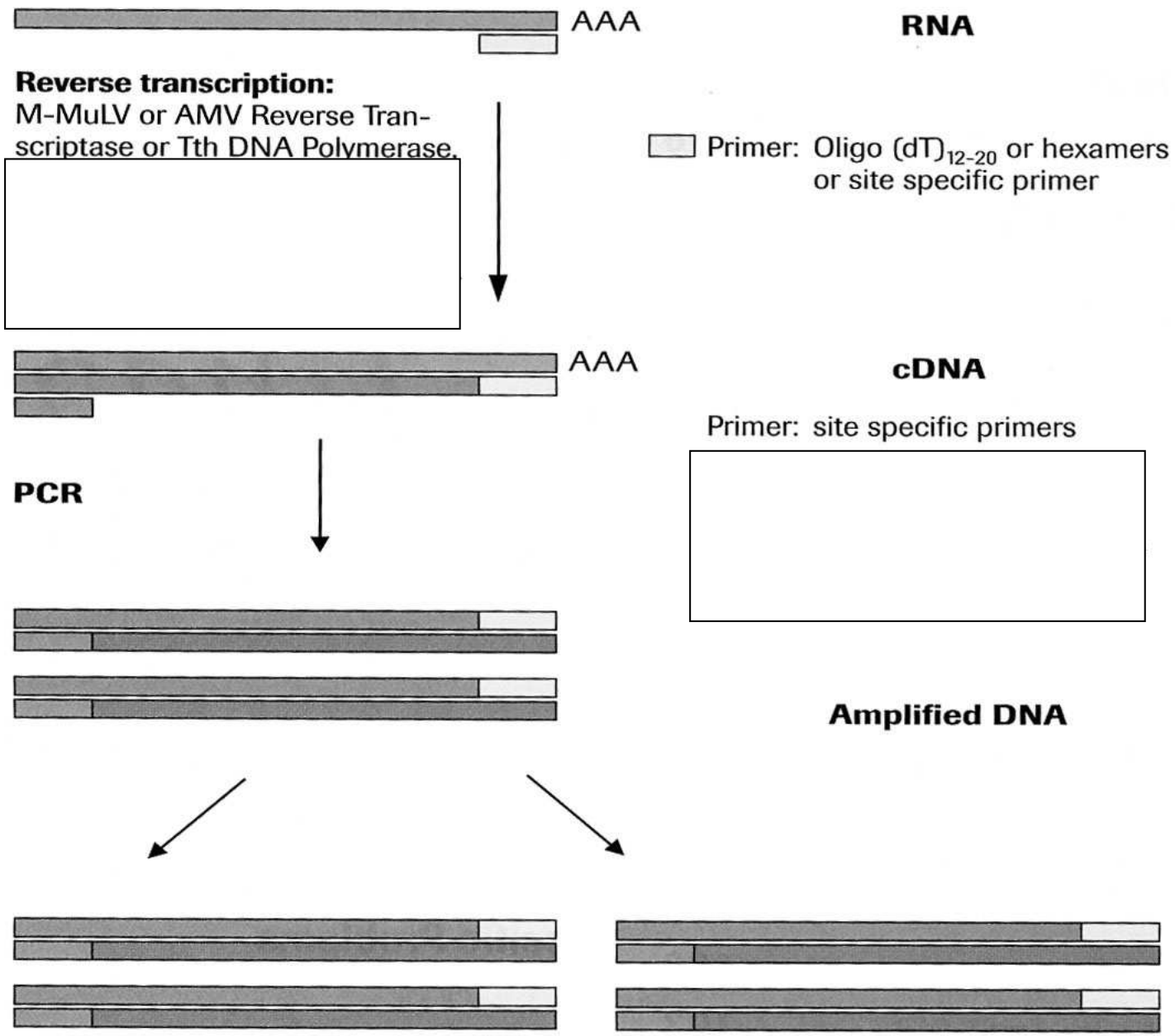


Zpětná (reverzní) PCR (RT-PCR) detekce sekvencí na RNA

- RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR.
- Produkty RT-PCR se tvoří, jestliže je izolovaná RNA nejdříve převedena na cDNA pomocí retrovirové zpětné transkriptázy
  - M-MuLV = Moloney murine leukemia virus
  - AMV = avian myeloblastosis virus

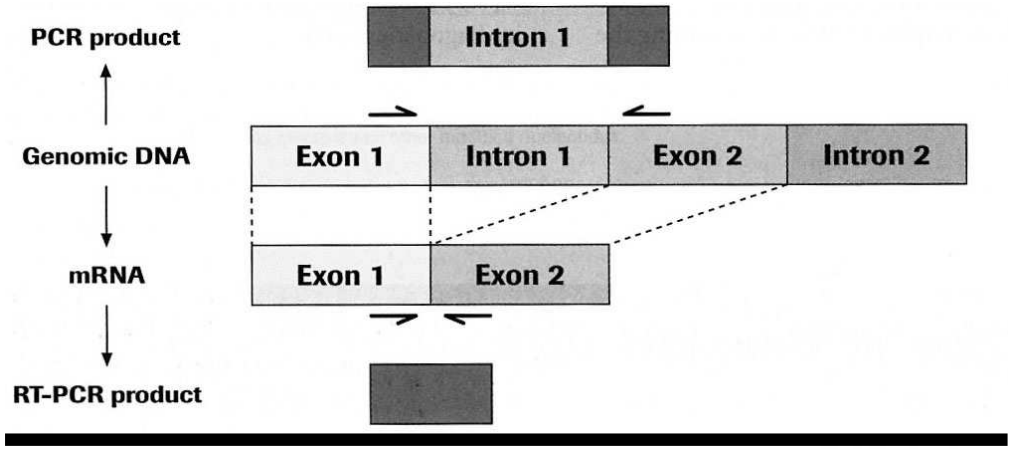
  a poté amplifikována pomocí PCR se dvěma specifickými primery.
- Nevýhody: Zpětná transkriptáza je termolabilní a obvykle nefunkční nad 42°C. Navíc v některých případech znemožňuje převod RNA na cDNA, zejména při složité sekundární struktuře RNA.
- Současná technika:
  - Termostabilní Tth DNA polymeráza z *Thermus thermophilus* je schopná převést RNA na DNA (RNA dependentní DNA polymerázová aktivita) za přítomnosti Mn^{2+} iontů při 72°C.
  - Pomocí stejného enzymu je poté prováděna PCR reakce.
- Použití:
  - mRNA
  - virové genomy (např. hepatitis C virus, virus chřipky, pikornaviry)

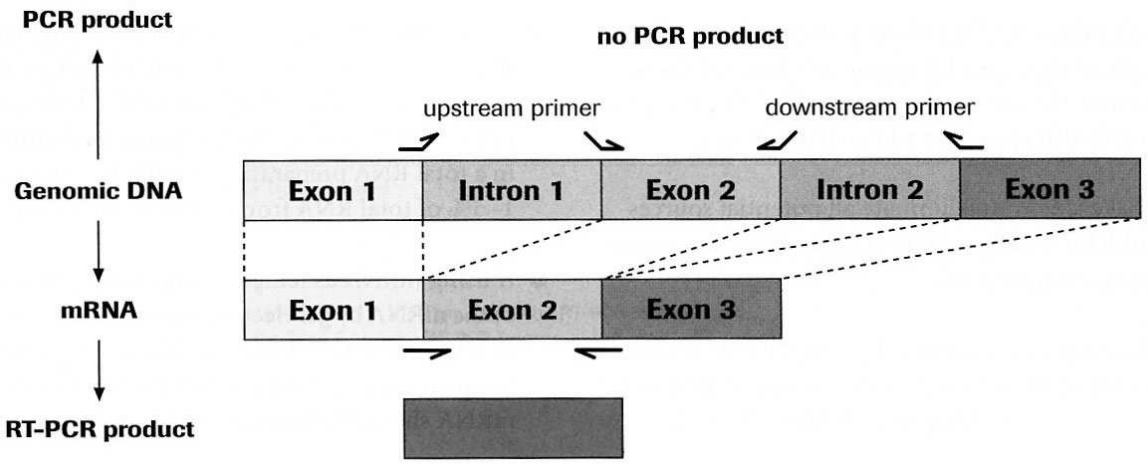
Princip RT-PCR



Návrh primerů pro RT-PCR

- RT-PCR amplifikace mRNA vyžaduje dvojici specifických primerů.
- Primery můžeme navrhnout tak, abychom odlišili produkty vznikací při RT-PCR a při standardní PCR s genomovou DNA.
- Dva přístupy pro návrh primerů:
  - Primery, které se připojují k sekvenci 2 exonů na obou stranách určitého intronu. Amplifikační produkt z genomové DNA je větší než produkt RT-PCR.
  - Primery komplementární k sekvenci na spojení exon/exon. Takové primery neamplifikují genomovou DNA.





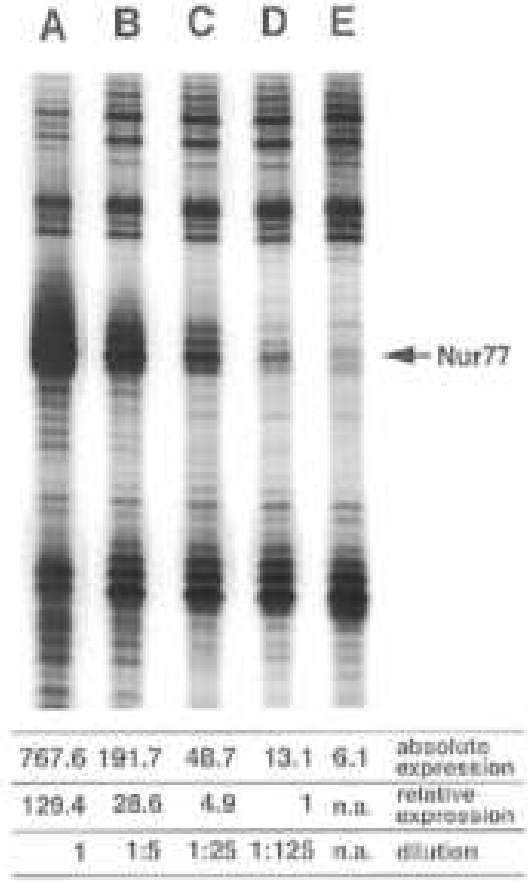
Uspořádání RT-PCR reakce

- **Jednokroková RT-PCR**
  - *Tth* DNA polymeráza
  - dvojice primerů
  - syntéza cDNA za přítomnosti Mn^{2+}
- Výhody:
  - rychlost
  - není riziko kontaminace
  - vyšší citlivost (probíhá při vyšší teplotě)

- **Dvoukroková RT-PCR**
  - První krok: zpětná transkriptáza + oligo(dT)
  - Druhý krok: Taq DNA polymeráza + dvojice primerů
- Výhody:
  - umožňuje optimalizovat zvlášť zpětnou transkripci a zvlášť PCR
  - umožňujě syntézu dlouhých produktů (až 14 kb)

DD-PCR, Differential Display-PCR

- V genomech obratlovců existuje cca 100 000 strukturních genů
- V jednotlivých tkáních je exprimováno pouze malé procento z nich
- DD-PCR slouží pro studium úrovně exprese genů
  - v různých tkáních
  - při patologických procesech
- Princip:
  - Vzorek RNA je převeden na cDNA pomocí RT-PCR
    - s oligo-dT primerem, který má na 3'-konci dvě degenerované báze: 5' TTTTTTTTTTTTMN 3' , kde M = A, G nebo C; N = jakýkoli dNTP)
    - druhý primer je směsný náhodný 8-10mer tvořený náhodnými sekvencemi
    - Pro odhalení co největšího počtu mRNA mohou být využity různé sady druhého náhodného primeru
  - RT-PCR se provádí s radioaktivně značenými oligonukleotidy
  - Rozdílně exprimované mRNA jsou detekovány na autoradiogramu

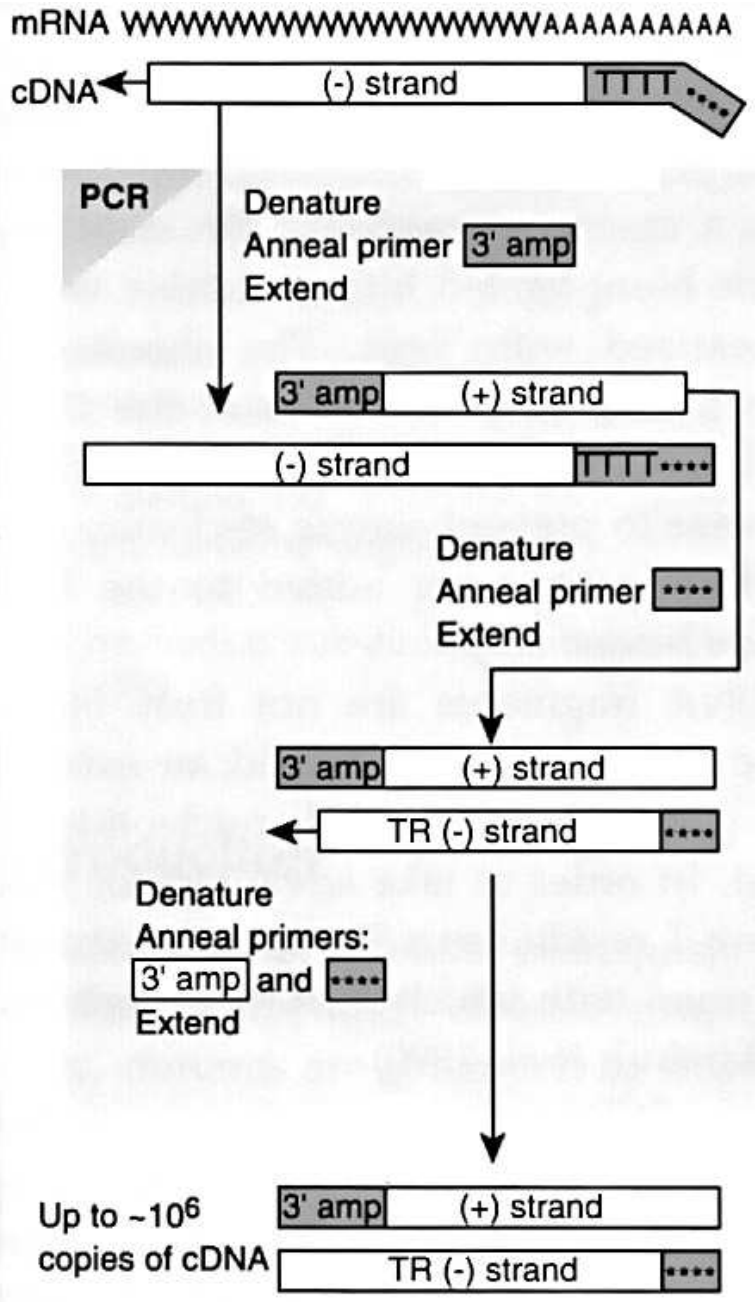


RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

- Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE) je technika založená na PCR vyvinutá k usnadnění klonování cDNA o úplné délce s 5´a 3´konci poté, co byla stanovena část sekvence cDNA jinými metodami.
- Syntéza cDNA z mRNA o úplné délce není pomocí reverzní transkripce snadná.
- Pomocí RACE se amplifikuje kratší úsek od jednoho konce (3´ nebo 5´) a ze střední části o známé sekvenci.
    - 3´ RACE
    - 5´ RACE

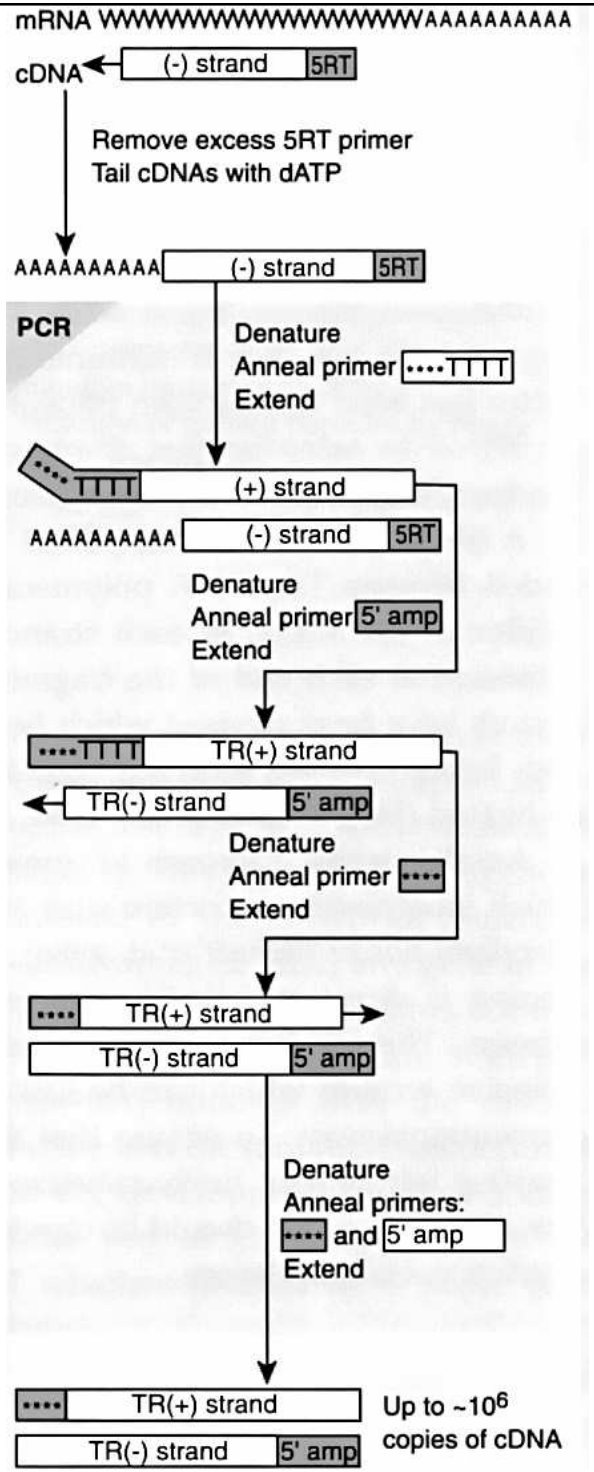
3´ RACE

- Využívá výhody přirozeného poly(A) konce na mRNA jako místa pro zahájení PCR amplifikace.
- Při reverzní transkripci od 3´konce je první řetězec cDNA je inciován u poly(A) pomocí oligo-dT hybridního kotvícího primeru.
  - 17 oligo-dT zbytků navázaných na 17-mer adaptor
    - má Tm vyšší než samotný oligo(dT17)
    - je vhodné, když nese restrikční místa pro následné klonování
- Amplifikace je docílena bez další purifikace, za využití PCR kotvícího primeru a uživatelem navrženého specifického primeru ve vnitřní části mRNA, která je cílem další analýzy.



5´ RACE

- První řetězec cDNA je nasyntetiozován z celkové poly(A) RNA za použití prvního genově-specifického primeru (SP1) pomocí AMV RT a deoxynukleotidového mixu.
  - První řetězec cDNA je purifikován od neinkorporovaných nukleotidů a primeru SP1
- Reakční produkt první reakce (cDNA) je pak prodloužen pomocí terminální transferázy, která přidá homopolymerní konec dA na 3´konec cDNA
- cDNA s napojeným koncem je pak amplifikována PCR s použitím druhého genově-specifického primeru SP2, oligo dT-kotvícího primeru a Taq polymerázy – stejným systémem jako u 3´ RACE.
- Pokud je to třeba, získaná cDNA může být dále amplifikována s použitím druhé PCR s využitím nested (sousedního) primeru SP3 a PCR kotvícího primeru.



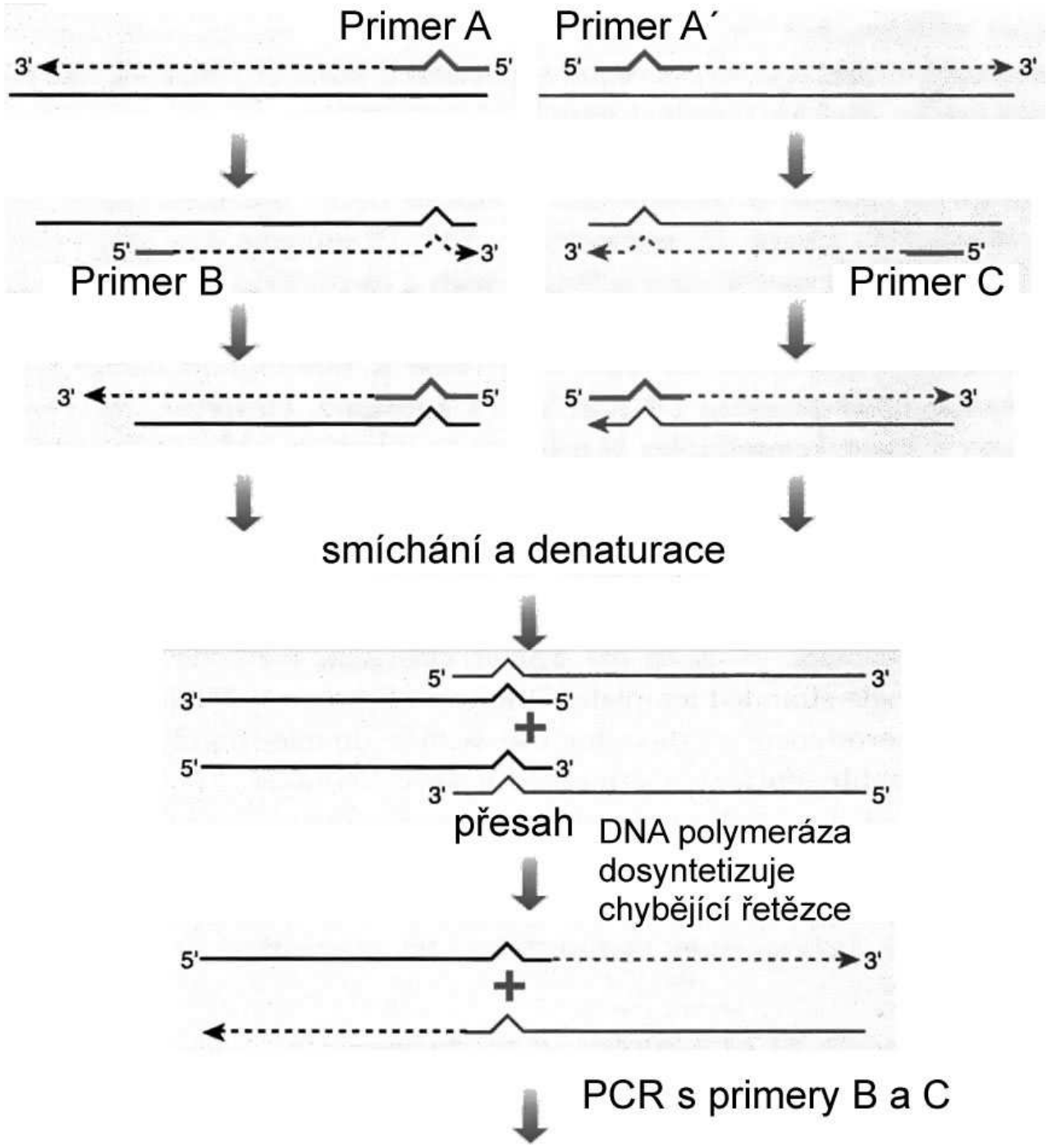
Degenerovaná PCR

- Využívá pro amplifikaci směsi degenerovaných primerů
- Používá se, jestliže nevíme, která z variant sekvence se může v genomu vyskytovat
  - Kolísavé sekvence
  - Sekvence předpokládané na základě zpětné translace z proteinového motivu
  - Degenerace je zajištěna při syntéze primeru. Není nutné objednávat zvlášť všechny varianty

```
    Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
5' TGG GAY ACN GCN GGN CAR GA 3'
          T   G   G   G   G
          C   A   A   A   A
              T   T   T
              C   C   C
Výsledkem je 256 variant primeru
```

- Příklady využití:
  - Vyhledání sekvence DNA na základě sekvence aa stanovené u proteinu
  - Vyhledání a klonování homologických genů např. člověka a myši
  - Hledání a studium genových rodin s určitou strukturní podobností
  - Fylogenetické a evoluční studie: hledání a srovnávání ortologních genů

Overlap extension PCR má využití v mutagenezi

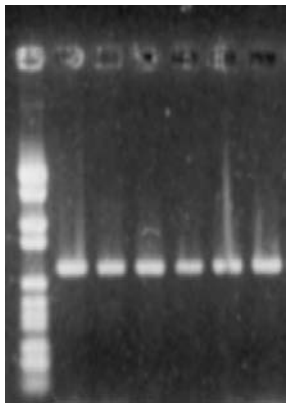


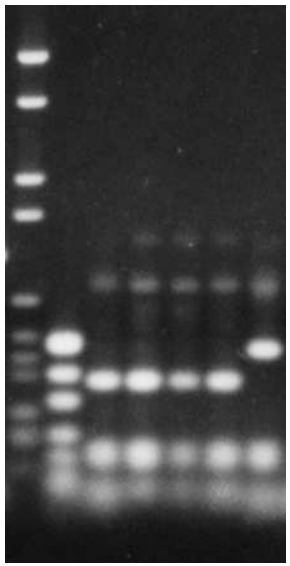
Modifikace PCR používané v diagnostice

- PCR metody nabízejí následující výhody:
  - rychlost
  - je potřeba malé množství buněk

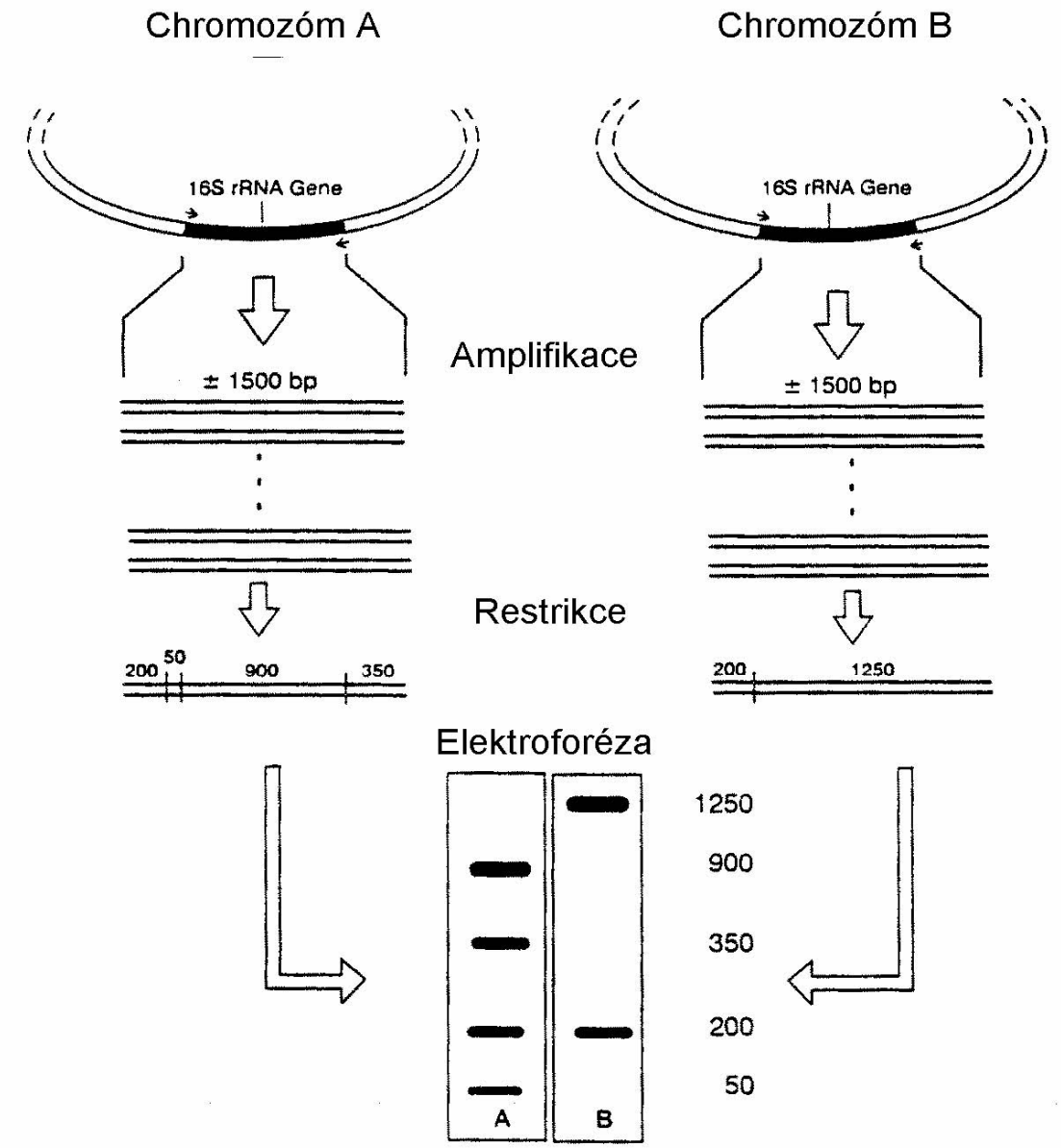
PCR-RFLP

- Amplifikace známé sekvence se dvěma specifickými primery
  - Cílová sekvence (obvykle určitého genu) o délce 1 až 2 kb je amplifokována při vysoce stringentních podmínkách.
  - Výsledkem amplifikace jsou amlikony (PCR produkty o stejné délce) detekované elektroforeticky
- Amplikony jsou štěpeny restrikční endonukleázou se 4 bp rozpoznávacím místem a poté opět analyzovány pomocí elektroforézy
- Separace fragmentů DNA v agarózovém nebo polyakralamidovém gelu.
- Srovnání restrikčních fragmentů amplifikované DNA u různých vzorků.





PCR-RFLP fingerprinting ilustrovaný na příkladu genu pro 16S rRNA (rDNA-RFLP)

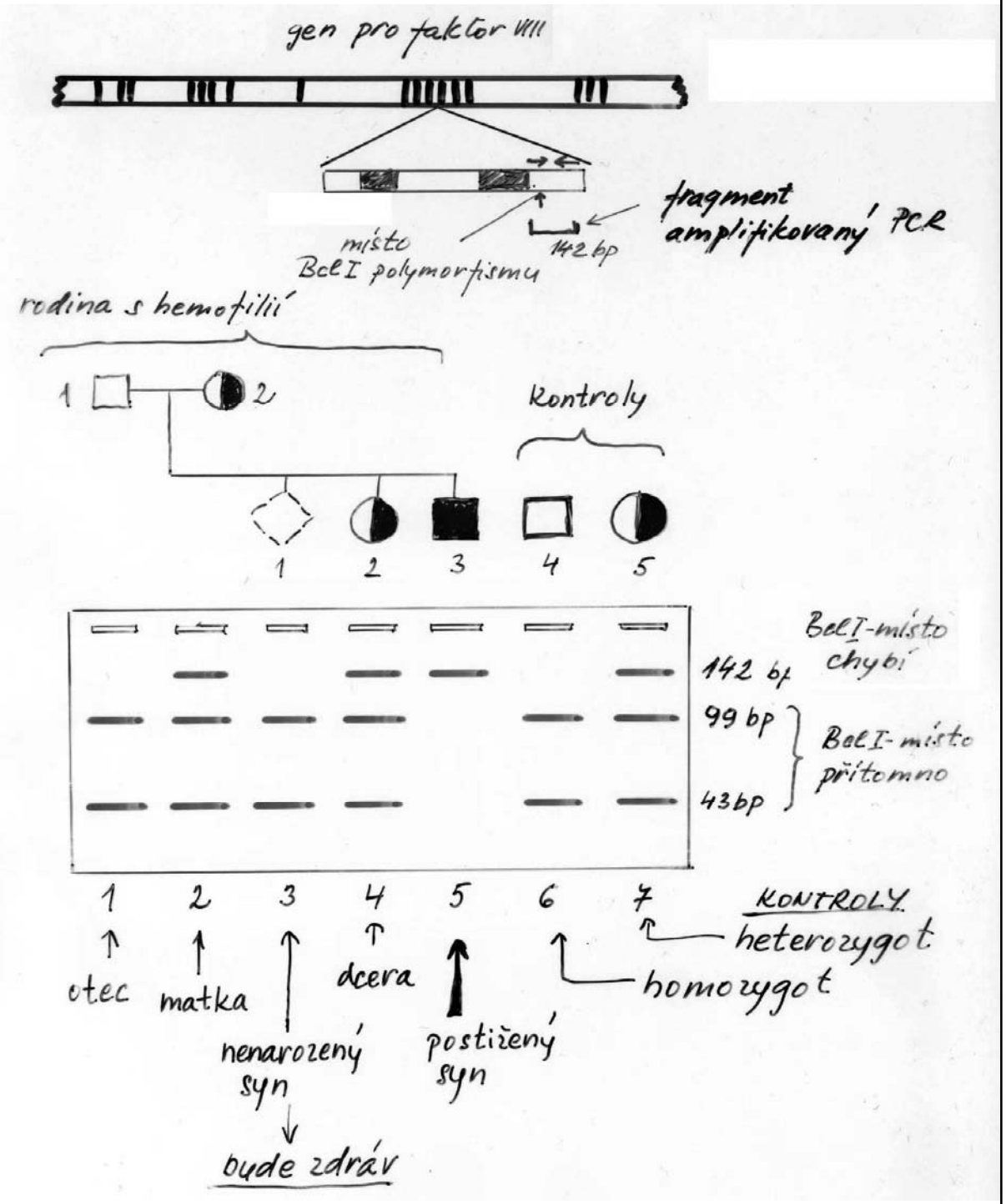


→ : Univerzální primery komplementární k vysoce konzervativním oblastem na koncích genu pro 16S rRNA

Pozn.: V závislosti na volbě primeru může být provedena PCR-RFLP analýza jakéhokoli genu

Prenatální diagnóza hemofilie pomocí PCR-RFLP

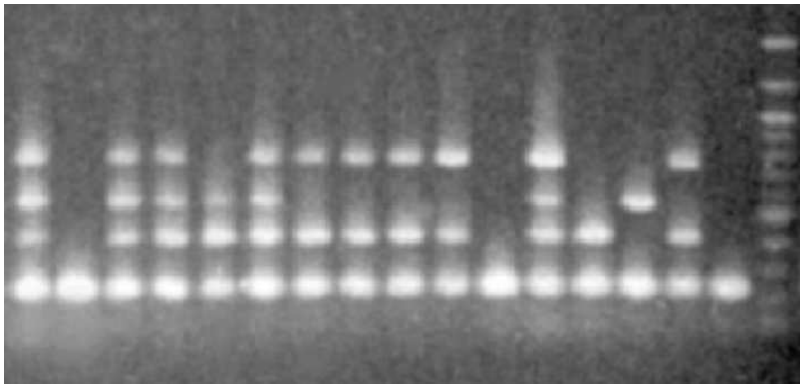
- V analyzované oblasti DNA mohou být až tři místa *Bcl*I, přičemž jedno z těchto míst v intronu 18 je polymorfní.
- Fragment DNA o délce 142 bp obklopující polymorfní místo *Bcl*I je nasyntetizován s pomocí oligonukleotidových primerů.
- Normální alela má *Bcl*I místo a proto je fragment štěpen na 99 + 43 bp fragmenty
- Polymorfní místo může
  - chybět na obou chromozomech (5),
  - přítomné na jednom a chybět u druhého (2,4,7)
  - nebo být přítomné na obou (1,3,6).



Mnohonásobná PCR (multiplex PCR)

- Při multiplex PCR je použito více párů specifických primerů.
- Dochází k amplifikaci více cílových sekvencí při jedné reakci.
- Použití a výhody:
  - Vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA
  - Testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA
  - Amplifikace vnitřních kontrol současně se vzorky
  - Nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích
- Používané aplikace:
  - Detekce specifických toxinů produkovaných některými organizmy (*Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*) - může být detekováno až 7 různých genů kódujících toxiny.
  - Detekce více genů kódujících rezistenci k různým antibiotikům.
  - Detekce více druhově specifických genů - identifikace organizmů
  - Ko-amplifikace vnitřních kontrol

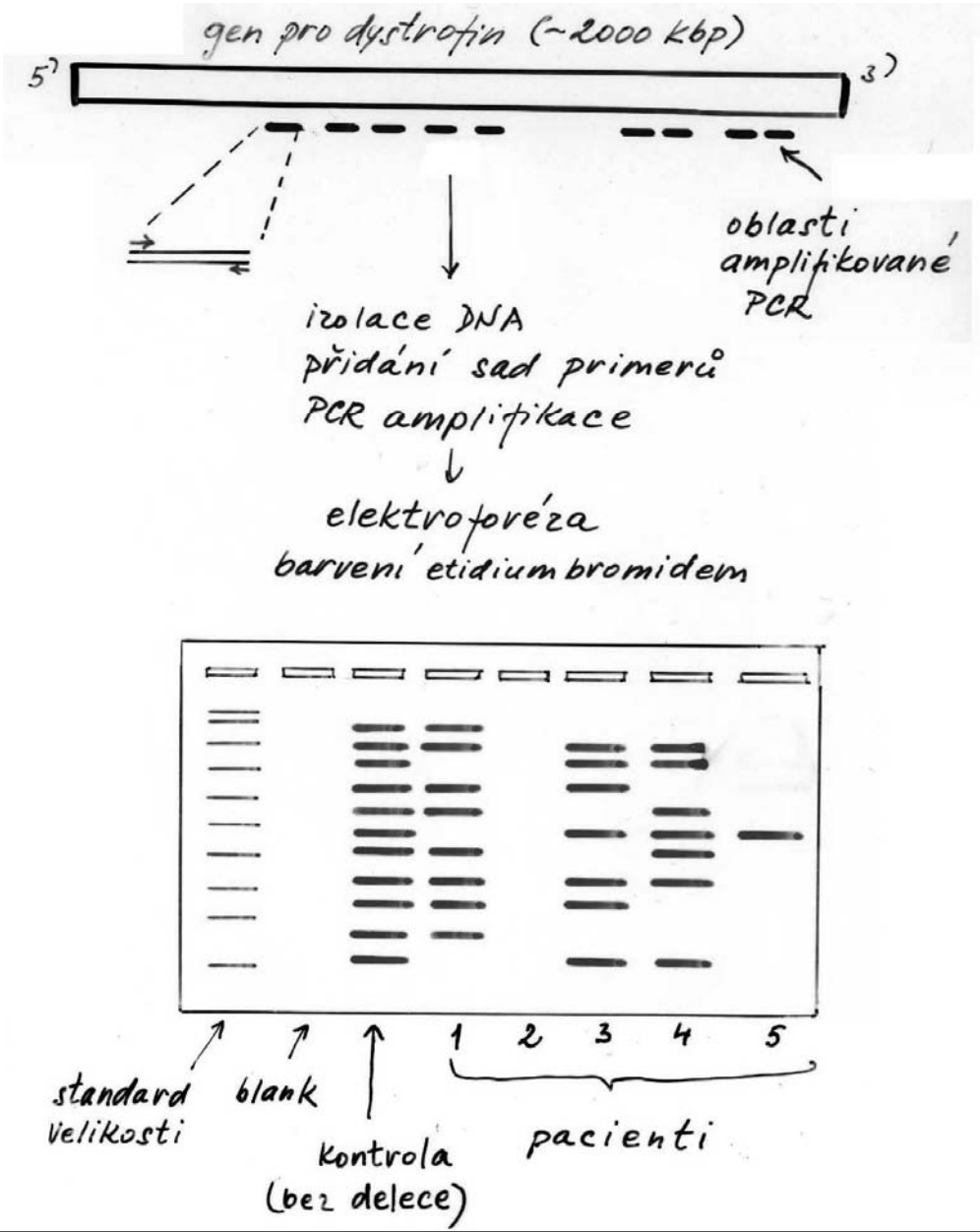
Příklad detekce lyzogenie v genomu bakterie *Staphylococcus aureus* pomocí multiplex PCR



Příklad použití multiplex PCR pro analýzu mutací v jednom genu

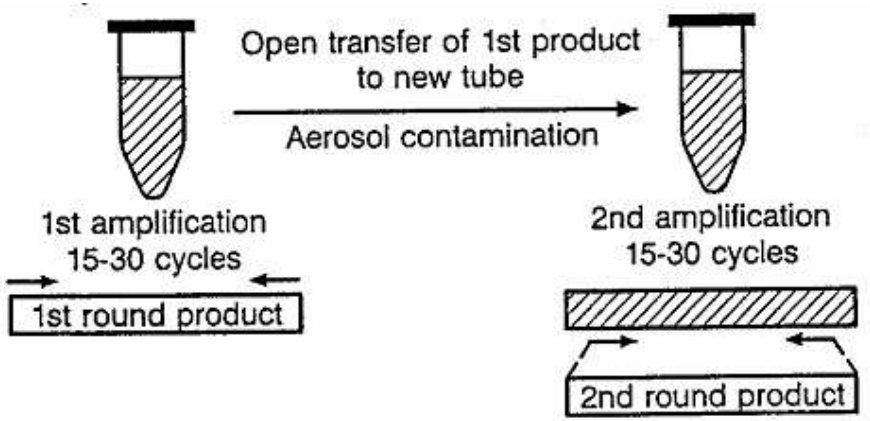
Diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie za použití mnohonásobné PCR k detekci deletovaných exonů

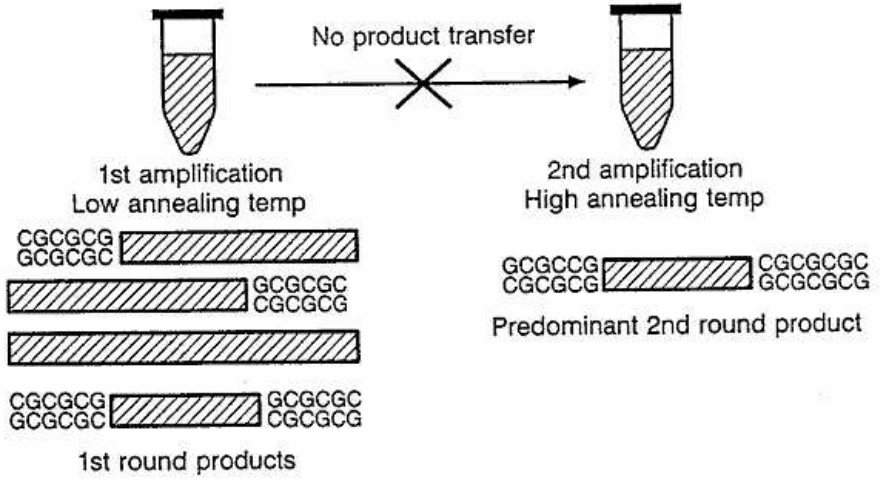
- V genu pro dystrofin o délce 2000 kbp je navrženo celkem 9 úseků určených k amplifikaci.
- Tyto úseky představují části genu, které bývají nejčastěji postiženy delecí.
- Vzorky DNA z pacienta jsou amplifikovány za současného použití sady devíti primerů v jedné reakci a produkty jsou separovány na elektroforéze a barveny EB.
  - Pacient 1 má 1 deleci, pacient 2 má velkou deleci asi 1000 kbp. Ostatní mají více různých delecí.



Odstupňovaná PCR

- Při PCR pomocí vnějších a vnitřních primerů („nested“ PCR) se amplifikace provádí ve dvou krocích. Metoda má oproti standardní PCR velmi vysokou citlivost. Používají se 2 modifikace:
  - **Dvoukroková**
    - První kolo zahrnuje 15-30 cyklů amplifikace s jedním párem vnějších primerů.
    - Potom je reakce převedena do druhé zkumavky a prováděna amplifikace zahrnující opět 15-30 cyklů s párem vnitřních primerů.
  - **Jednokroková**
    - První kolo amplifikace s jedním párem primerů se provádí při nestringentních podmínkách (nižší teplota pro připojení primerů) s 10-15 cykly.
    - Následuje reamplifikace zahrnující 15-30 cyklů při stringentních podmínkách s vnitřními primery, při které se ověří specifita amplifikace z prvního kola.





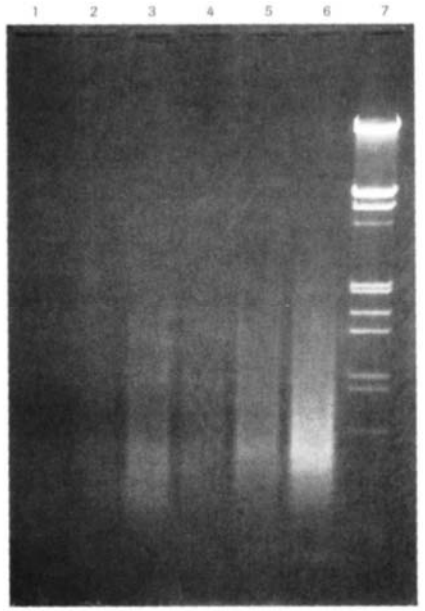
Alelově specifická PCR (AS-PCR)

- Využití
  - Pro detekci bodových mutací v genomech
  - detekce homozygotního a heterozygotního stavu v klinických disciplínách
- Je prováděna ve dvou nebo více paralelních reakcích
  - V první reakci je horní primer komplementární ke standardní sekvenci
  - V další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci
  - Spodní primer je v obou reakcích stejný
- Předpokládá se, že k elongaci dojde pouze tehdy, pokud jsou primer a cílová sekvence plně komplementární.
- Uvažujeme-li homozygotní stav, k amplifikaci bude docházet pouze v jedné reakci.
- Metoda byla popsána nezávisle pod různými označeními a využívá dva odlišné přístupy.
  - První přístup je založen na chybějící elongaci v důsledku chybného párování bází na 3'-konci primeru.
    - amplifikaci nedostupný mutační systém (ARMS),
    - PCR-amplifikace specifických alel (PASA)
    - alelově specifická amplifikace (ASA).
  - Ve druhém přístupu se chybné párování nachází ve střední části sekvence primeru a brání tak hybridizaci primeru k cílovému místu v případě, že se v templátové DNA vyskytuje.
    - kompetitivní připojení oligonukleotidu (COP).
- Pro snazší odlišení heterozygotního stavu v jediné reakci je používána varianta označená jako PCR-amplifikace více specifických alel (PAMSA) nebo dvojitý ARMS.
  - Jeden z alelově-specifických primerů obsahuje na 5'-konci přídatný úsek několika nekomplementárních nukleotidů, a tak mohou být amplifikační produkty obou alel rozlišeny na základě své délky.
- Metoda je obecně velmi citlivá na optimalizaci experimentálních podmínek reakce, zejména koncentrace jednotlivých reagentů a templátové DNA.

PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR)

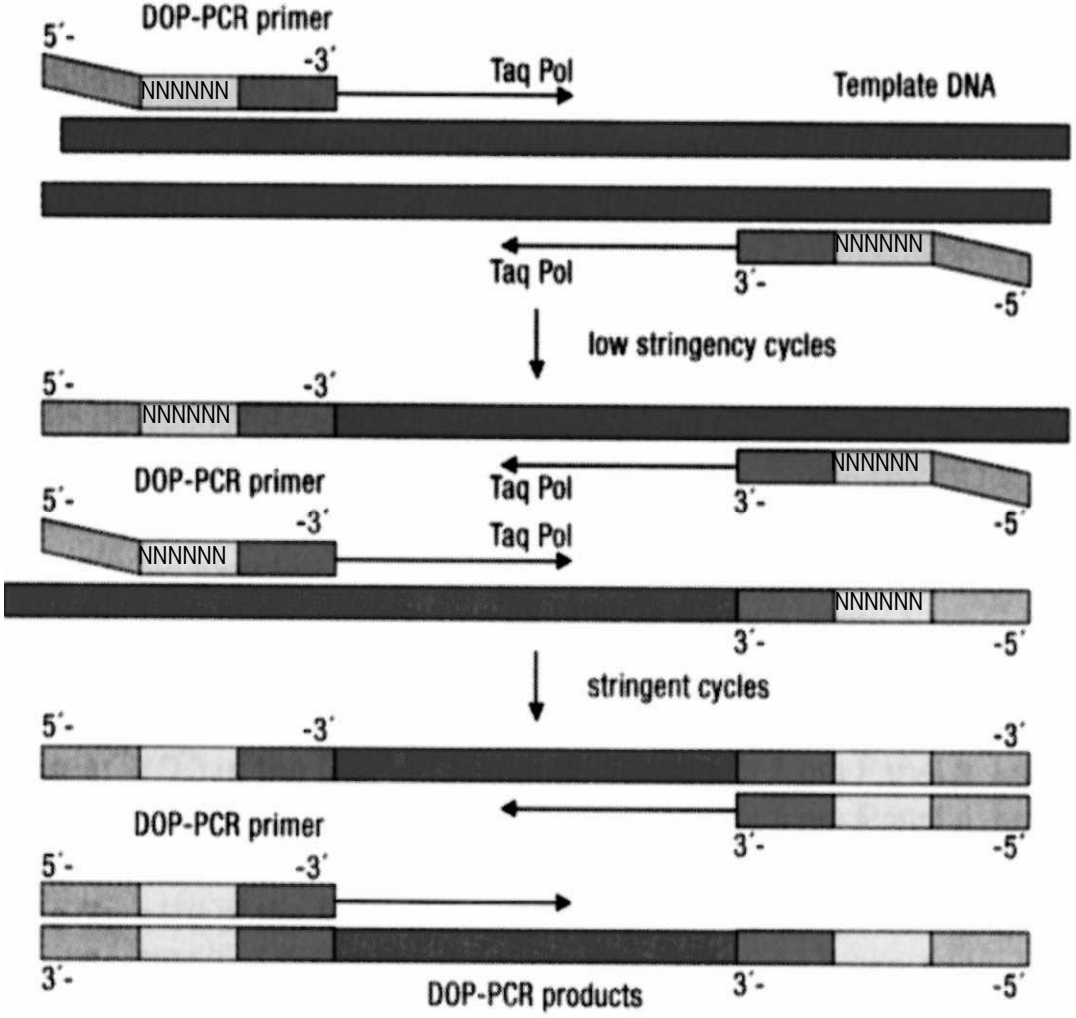
- DOP (degenerate oligonucleotide primer) PCR slouží pro uniformní náhodnou amplifikaci DNA pokud je k dispozici pouze **malé množství vzorku**.
- Další postupy (klonování, značení, hybridizace, následná PCR) mohou být potom **provedeny účinněji**.
- DOP-PCR se používá jako první krok při:
  - hybridizaci in situ
  - srovnávací genomové hybridizaci (CGH)
  - přípravě DNA fragmentů frakcionovaných podle velikosti pro další hybridizace
  - analýzu DNA ze špatně kultivovatelných organizmů
  - analýzu nebo klonování stopových množství DNA

Amplifikace DOP-PCR vede ke vzniku různě dlouhých DNA fragmentů, které jsou viditelné na agarózovém gelu obarveném etidiumbromidem ve formě šmouhy.



DOP-PCR

- DOP-PCR primery mají definované sekvence na 5’- a 3’-koncích a náhodnou hexamerovou sekvenci mezi těmito definovanými konci.
- Prvních 5 cyklů DOP-PCR probíhá při velmi nízké stringenci.
- Dalších 35 cyklů probíhá při vyšší teplotě pro připojení primerů.
- Za stringentnějších podmínek je materiál vytvořený při prvních cyklech amplifikován preferenčně, protože obsahuje kompletní primerovou sekvenci na obou koncích. Na jiných místech se DOP-primer při stringentních podmínkách neváže.



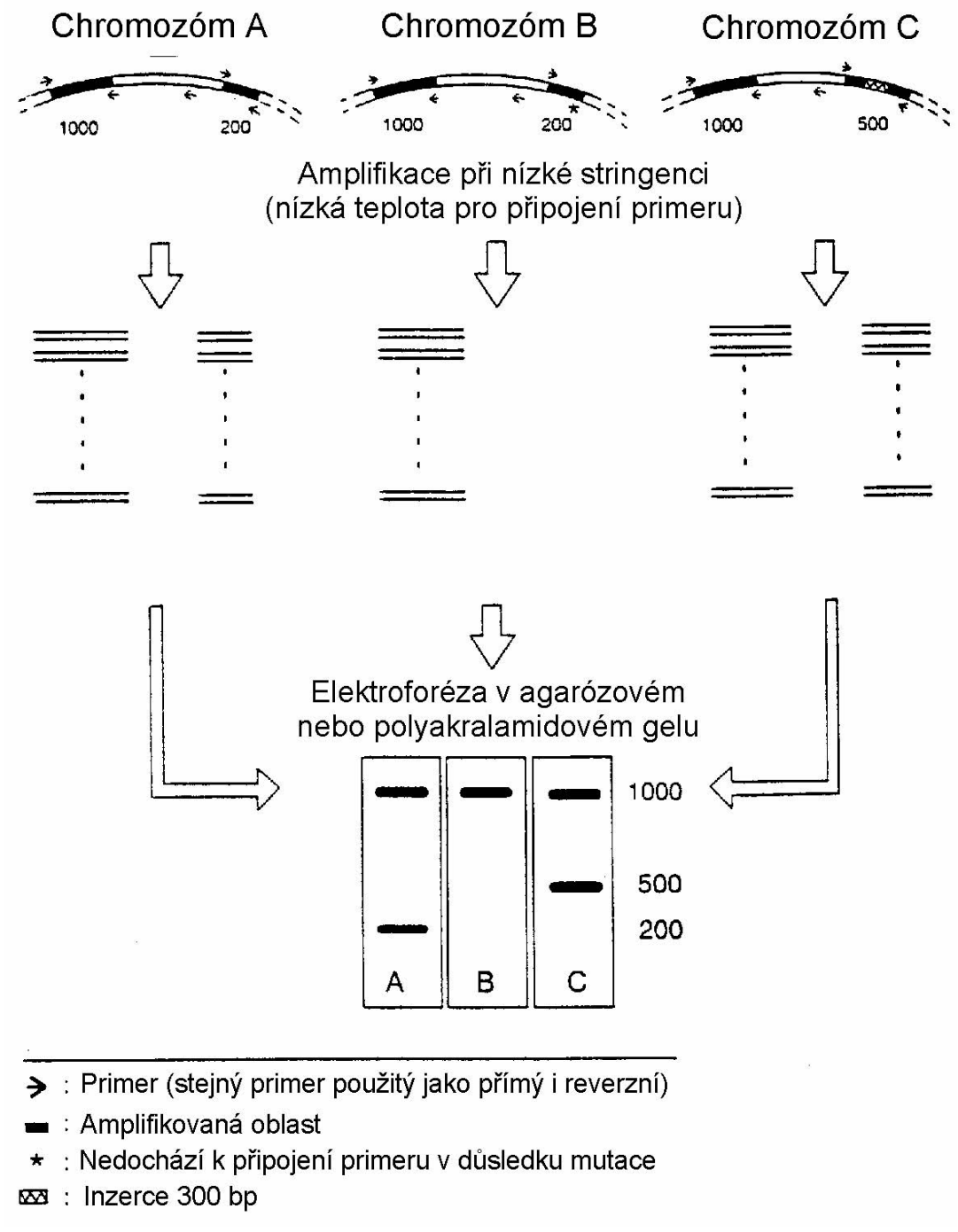
Náhodně amplifikovaná DNA

- Náhodná amplifikace využívající jeden nebo více primerů s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA
- Vzniká více amplikonů s různou velikostí a rozdílným molárním množstvím, nevyžaduje se proto štěpení restrikčními endonukleázami
- Úspěšná, rychlá a jednoduchá technika pro DNA fingerprinting popsaná nezávisle pod různými označeními:
  - AP-PCR (arbitrarily primed PCR fingerprinting)
  - RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)
  - DAF (DNA-amplified fingerprinting)
  - MAAP (multiple arbitrary amplicon profiling)
  - PCR-mediated genotyping
- Princip metody:
  - Metoda používá obvykle jeden krátký primer (8 - 10 bp nebo M13).
  - Teplota pro připojení primeru je mnohem nižší než teoretická hodnota T_a.
  - Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomální nebo plazmidové DNA.
  - Obvykle se vyskytne několik míst pro připojení primeru umožňujících nasednutí primerů 3‘ konci k sobě, která se vyskytují na protilehlých řetězcích, a nejsou od sebe příliš vzdálená.
  - Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2000 bp).

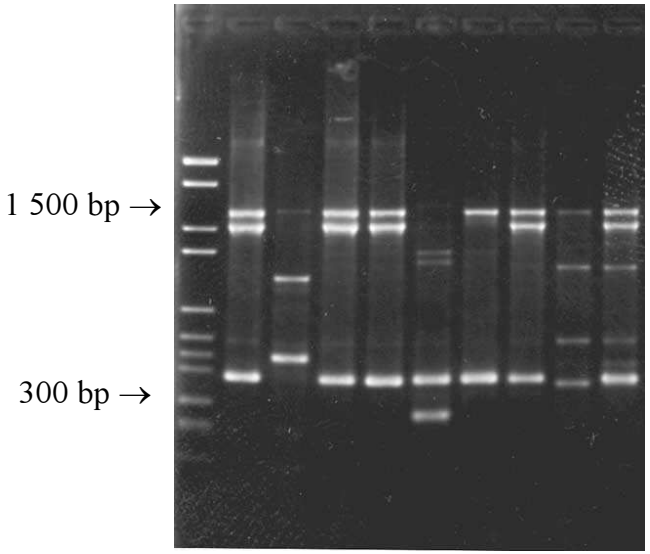
Náhodně amplifikovaná DNA

- Použití:
  - Rychlá typizace většiny izolátů mikroorganizmů
  - Typizace genomové rostlinné DNA z různých kultivarů
  - Taxonomické studie a identifikační postupy
  - Analýza mikrosatelitů
  - AP-PCR může být kombinována s DGGE nebo SSCP analýzou.
  - Produkty AP-PCR slouží pro přípravu hybridizačních sond používaných při binární typizaci
  - Metoda má vyšší diskriminační schopnost než PCR 16S-23S mezerníkových oblastí, ale nižší než Rep-PCR.
- Nevýhody:
  - Nízká reprodukovatelnost mezi laboratořemi.
  - Částečné zvýšení reprodukovatelnosti je možné provedením reakce s různým ředěním DNA. Výsledek ovlivňují plazmidy přítomné v izolované DNA.

Náhodně amplifikovaná DNA (AP-PCR)



Příklad elektroforézy s AP-PCR produkty



Analýza mezerníkových oblastí mezi repeticemi (Interrepetitivní-PCR, Rep-PCR)

- Technika pro analýzu celého chromozómu využívající přítomnosti repetitivních elementů v bakteriálních nebo eukaryotických genomech.
- Princip metody:
  - Amplifikace známé sekvence, vyskytující se v genomu ve více kopiích (repetice, IS elementy, mezerníky, VNTR)
  - Pro získání DNA fingerprintu je třeba kompletní chromozomální DNA podobně jako u AP-PCR, ačkoli jsou amplifikovány pouze malé části chromozómu.
  - Primery jsou navrhovány tak, aby se připojovaly přímo ke koncovým, konzervativním oblastem repeticí.
  - vzniká více amplikonů o různé velikosti, nevyžaduje se proto štěpení restrikčními endonukleázami
- Nejčastěji je interrepetitivní PCR používaána u prokaryot:
- Je třeba navrhnou konsenzní sekvenci primeru a zvolit nížší teplotu pro připojení. 3‘ konce primeru směřují směrem k mezerníkovým oblastem tak, aby se neamplifikovala samotná repetice.
- Jelikož se mezerníkové oblasti mezi repeticemi liší svou délkou, při amplifikaci vzniká směs různě dlouhých amplikonů (fragmentů DNA), které dávají jedinečný fingerprint
- V závislosti na zvolené repetici jemožné získat specifický fingerprint pro druhy (tRNA-interrepetitivní PCR) nebo kmeny (ERIC, REP, BOX a IS6110 interrepetitivní PCR).

TYPY REPETICÍ V PROKARYOTICKÝCH GENOMECH

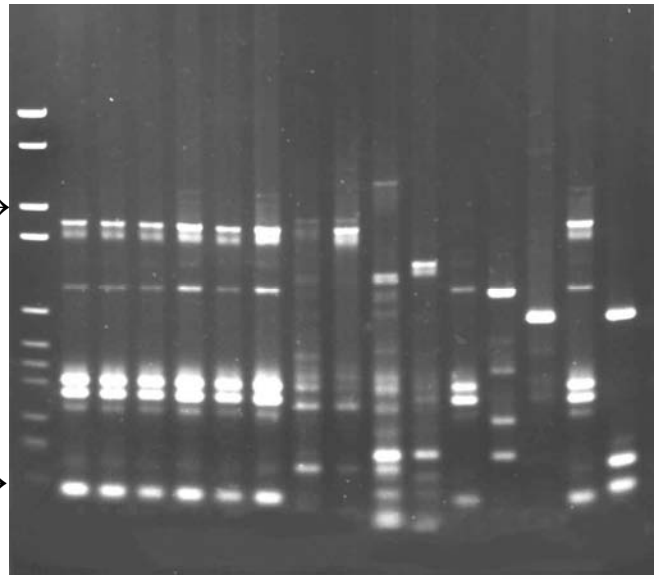
A. **Polynukleotidové sekvence a tandemové repetice**
- **Trinukleotid TGG** – nejčastější trinukleotid *E. coli* (součást penta nebo oktanukleotidů).
- **Nonamer AAGTGCGGT** (uptake signal sequence –USS) *H. influenzae* - 1465 kopií.
- **Tandemově opakované polynukleotidové sekvence (GTG)n nebo (GCC)n** - vysoce repetitivní u *E. coli*, *S. typhimurium* a *Shigella* sp.
- **Short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences** - heptanukleotidová opakování u sinice *Calothrix*.
- **Major polymorphic tandem repeat (MPTR)** - polymorfní 10-bp DR u *Mycobacterium tuberculosis* a dalších mykobakterií.

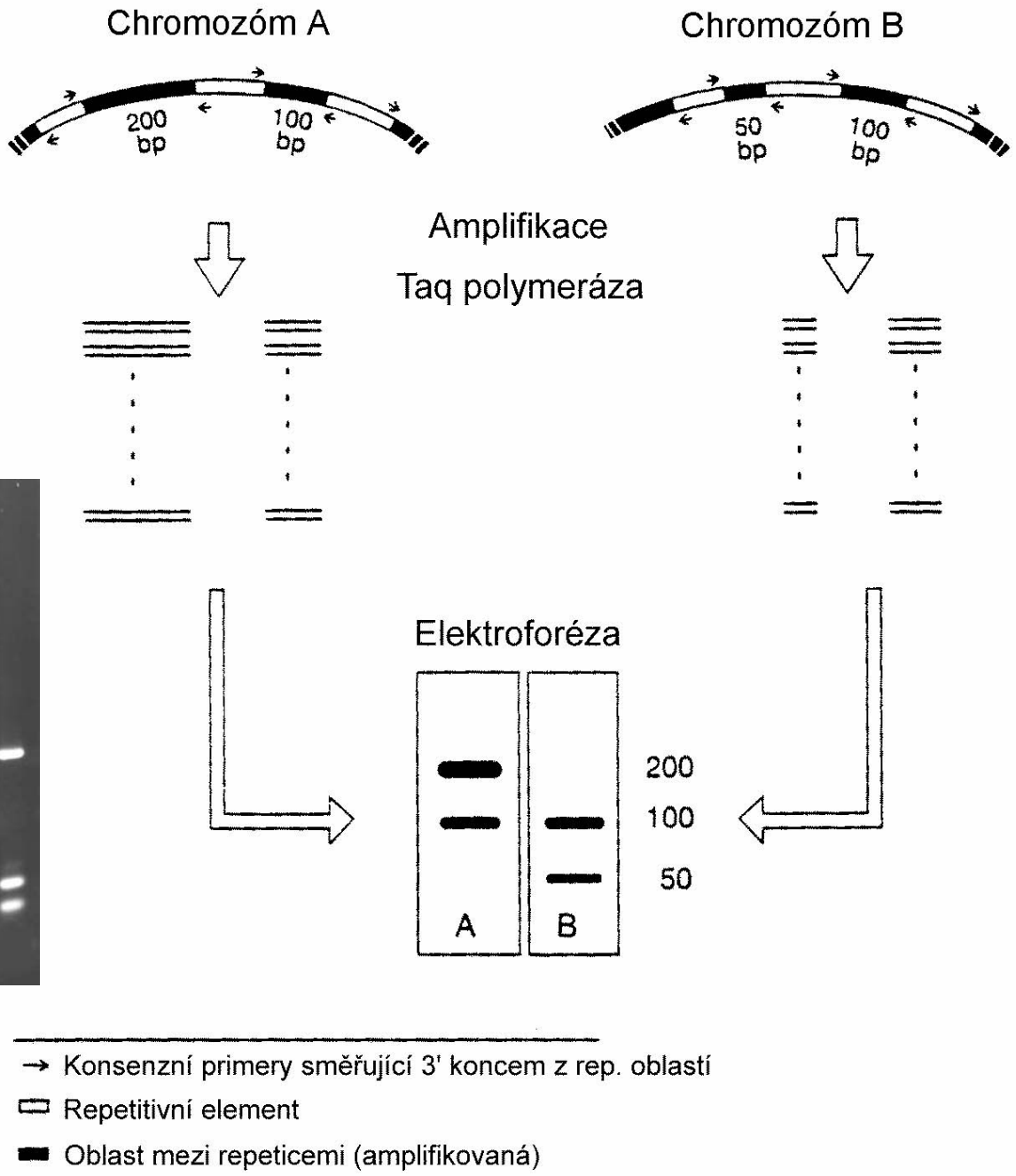
B. **Krátké roztroušené repetitivní sekvence** (kratší než 50 bp)
- **REP (repetitivní extragenové palindromatické sekvence)** 33-40 bp, obrácené repetice typu palindromů; 500 - 1000 REP u *E. coli*.
- **PU (palindromic units)** u *E. coli* a *S. typhimurium*.
- **Mnohokopiový 26-mer (nGREP)** u *Neisseria* sp.
- **Mnohokopiový 24-mer DR element** u *Mycobacterium bovis* (38 kopií).

C. **Dlouhé roztroušené repetitivní elementy** (větší než 50 bp)
- **Intergenic repeat unit (IRU)**
- **Enterococcal repetitive intergenic consensus (ERIC)** 124-127 bp nebo zkrácené formy. Chromozomová lokalizace se liší u kmenů a druhů. ERIC-like sekvence přítomné v 30 – 150 kopiích v celé bakteriální říši.
- **RLEP** (545 - 1063 bp) u *Mycoplasma leprae* 28 (0,6% genomu).
- **Mx-REP** u *Myxococcus xanthus* - 87 pb jádrová sekvence.
- **Dr-REP** (SARK) u Deinocccus radidurans. Element o variabilní délce (150-192 bp).
- **RepMP1-2, SDC1** (150 bp – 1 kb) u Mycplasma pneumoniae, v genomu 8-10 kopií.
- **RepMP2-like** u *Staphylococcus*

D. **Mosaikové repetitivní elementy**
- **Bacterial Interspersed Mosaic Elements (BIME)** – (kombinace REP a sedmi dalších repetitivních motivů).
- **REP MP** - 1 300 bp element ohraničený kratšími reeptitivními sekvencemi u *M.pneumoniae.*
- **BOX elementy** – 154 bp rozptýlené repetitivní elementy přítomné v 25 kopiích u G+ (*Streptococcus pneumoniae*).

Interrepetitivní PCR





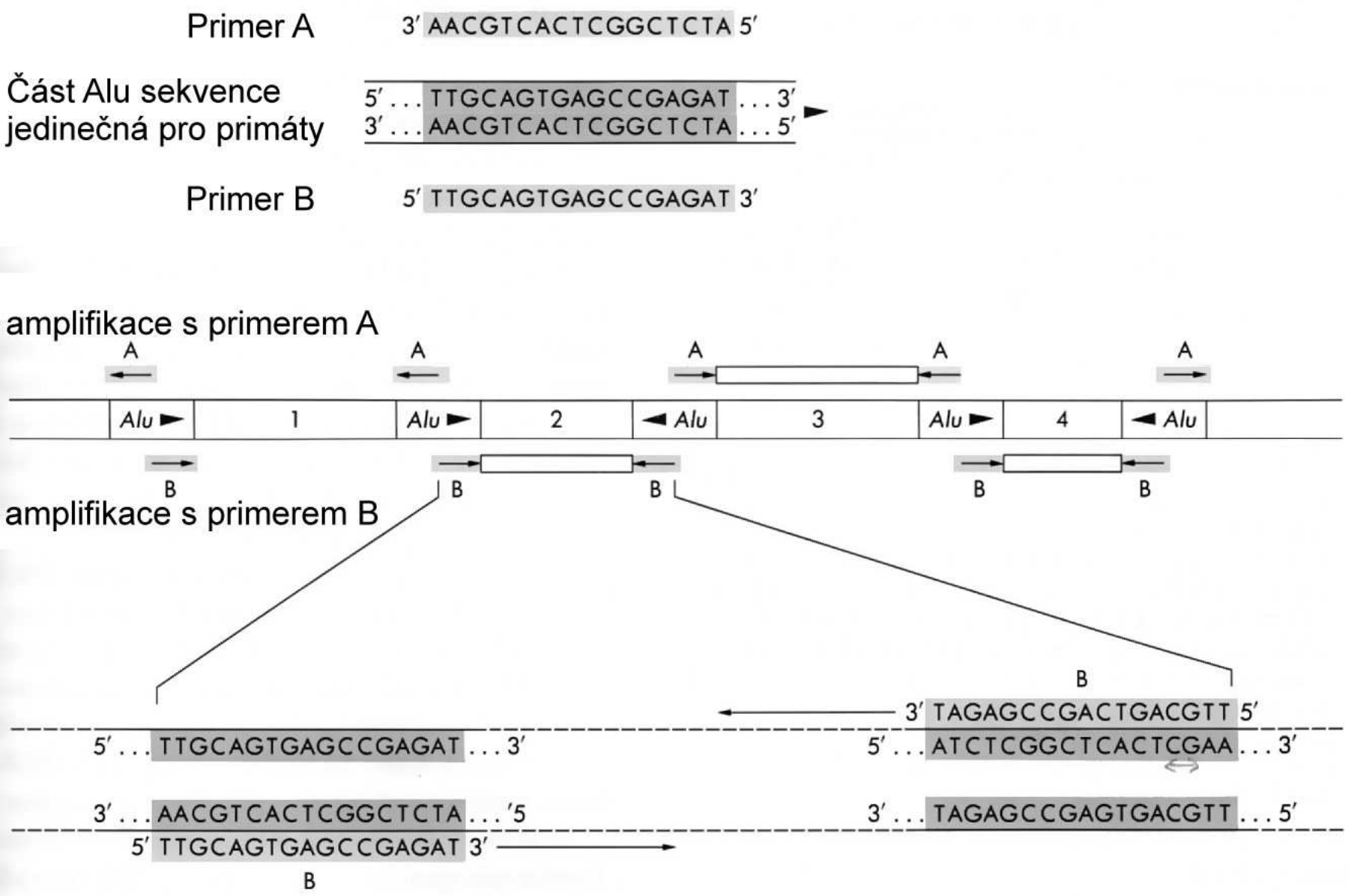
Využití interrepetitivní PCR u eukaryot

- U eukaryotických genomů se amplifikují markery označené jako
  - inverzní sekvenčně značené repetice (ISTR)
    - primery komplementární např. k rozptýleným vysokokopiovým retrotranspozonům.
  - amplifikace mezi jednoduchými repetitivními sekvencemi (ISSR)
  - amplifikační reakce s jedním primerem (SPAR)
    - primery homologické k sekvencím SSR v rostlinných genomech
- Pro zahájení amplifikace je navržen primer odvozený ze samotné repetitivní sekvence a ten umožňuje amplifikaci jedinečných sekvencí oddělujících jednotlivé SSR.
- Pro zamezení překrývání primerů mohou být prodlouženy o jedinečnou genomovou sekvenci ohraničující repetici.
- Primery navržené z tetranukleotidových repeticí, např. (GATA)4, dávají lepší výsledky než dinukleotidové nebo trinukleotidové.
- Určitým vylepšením metody interrepetitivní PCR je fluoroforem zdokonalená interrepetitivní PCR (FERP), která používá primerů značených na 5'-konci fluorescenční látkou, rozdělení produktů PCR v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu a digitální zpracování otisků DNA.
- Další obměnou je automatická laserová fluorescenční analýza (ALFA), při které se rovněž používají 5'-koncově fluorescenčně značené PCR-primery a produkty PCR jsou rozděleny v denaturujícím polyakrylamidovém gelu na automatizovaném sekvenátoru, což značně zlepší rozlišení a reprodukovatelnost.

*Alu*I-PCR

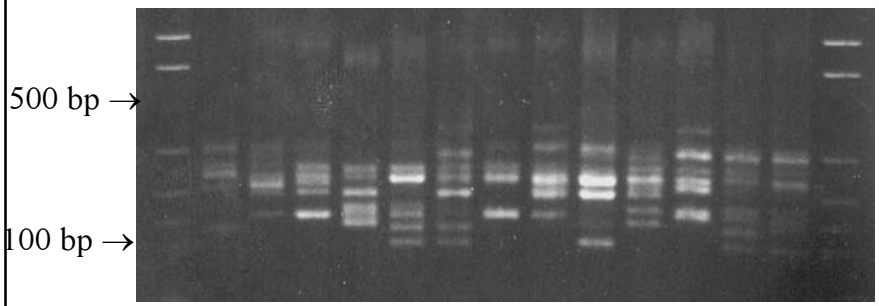
- PCR je používána k amplifikaci DNA sekvencí specifických pro člověka, představuje velmi jednoduchý prostředek k charakterizaci a amplifikaci právě jen lidské DNA.
- Metoda používá primery pro repetitivní sekvence, které jsou inzertovány na mnoha místech genomu. Z těchto elementů jsou Alu-sekvence (opakování) přítomny v množství 900 000 kopií v lidském genomu.
- Tato 300-bp *Alu*-repetice je velmi variabilní, ale obsahuje sekvenci, která je specifická pro člověka. Připraví se dva primery, každý pro jeden směr, přičemž se využije nejvíce konzervativních úseků těchto sekvencí.
- Primery nelze použít společně, neboť vzájemně hybridizují. Sekvence *Alu* však mohou být přítomny na DNA v obou směrech, takže primery se používají samostatně.
- Lidské sekvence se budou amplifikovat, pokud leží mezi sousedními *Alu*-repeticemi, které jsou umístěny (orientovány) v opačných směrech. Tvoří se různý počet fragmentů lidské DNA v závislosti na velikosti lidské DNA v buněčné linii. Tato technika je často používána pro "odhalení" lidské DNA od ostatních DNA.

*Alu*I-PCR

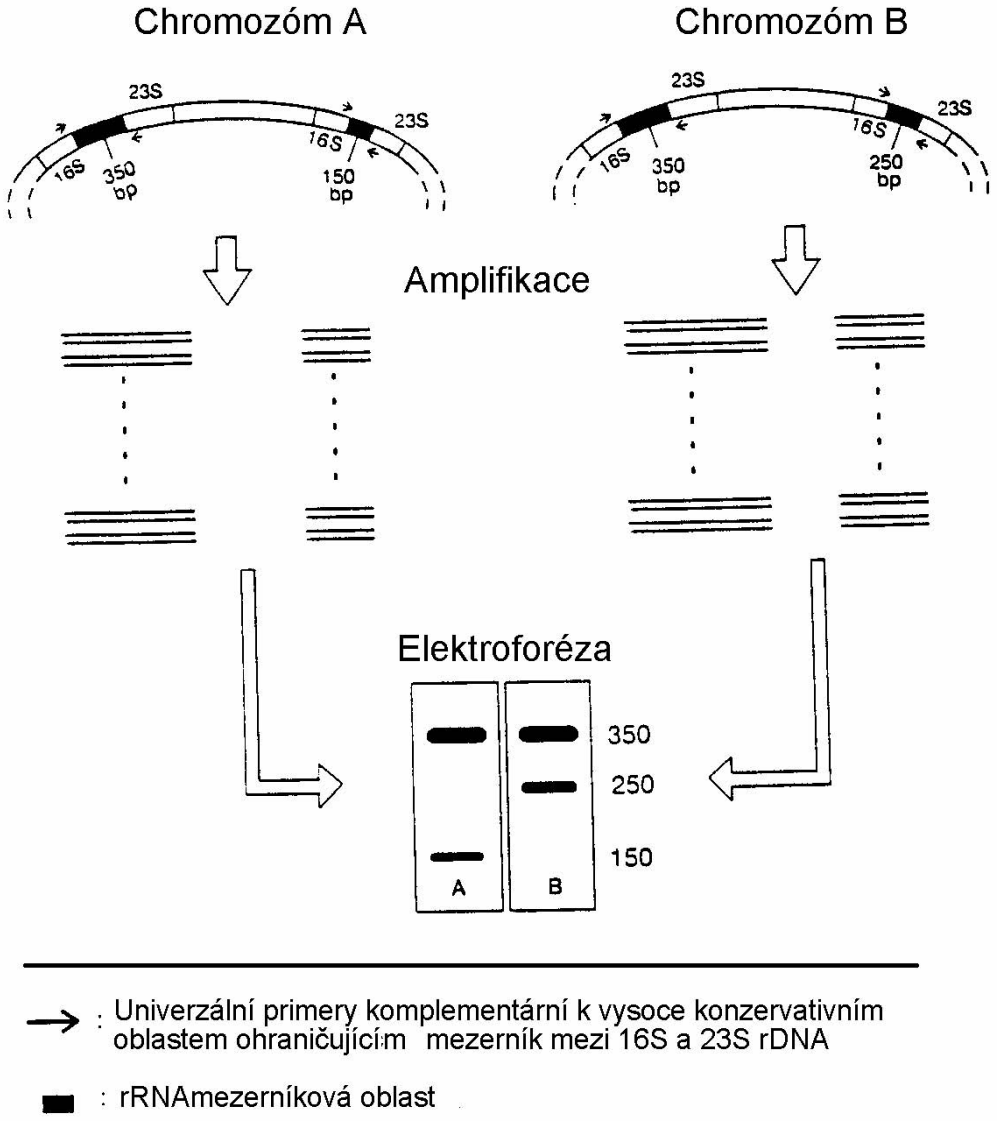

Primer A
3′ AACGTCACTCGGCTCTA 5′
Část Alu sekvence jedinečná pro primáty
5′ . . . TTGCAGTGAGCCGAGAT . . . 3′
3′ . . . AACGTCACTCGGCTCTA . . . 5′
Primer B
5′ TTGCAGTGAGCCGAGAT 3′
amplifikace s primerem A
A
Alu
1
2
3
4
B
amplifikace s primerem B
3′ TAGAGCCGACTGACGTT 5′
5′ . . . ATCTCGGCTCACTCGAA . . . 3′
3′ . . . TAGAGCCGAGTGACGTT . . . 5′

Analýza mezerníkových oblastí v rDNA (RS-PCR, PCR-ribotypizace)

- U prokaryot obsahují rDNA operony geny pro všechny tři typy rRNA (16S, 23S a 5S).
- Geny pro 16S a 23S rRNA jsou odděleny mezerníkovou oblastí, která se liší délkou v závislosti na druhu (od 278 bp u mykobakterií do do 2 kb u borrelií). Navíc u většiny Eubakterií se vyskytuje více kopií rDNA operonu, u nichž se vyskytují menší rozdíly v délce mezerníků.



U *Staphylococcus aureus* se nachází v genomu 6 *rrn* operonů, všech 6 mezerníků mezi 16S a 23S rRNA se může lišit svou délkou.

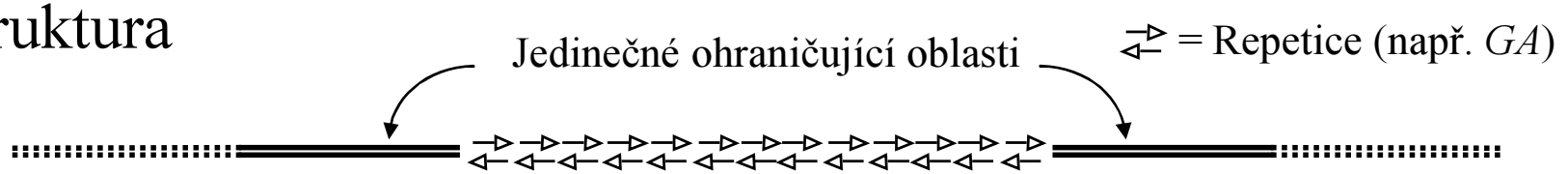


Polymorfizmus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR)

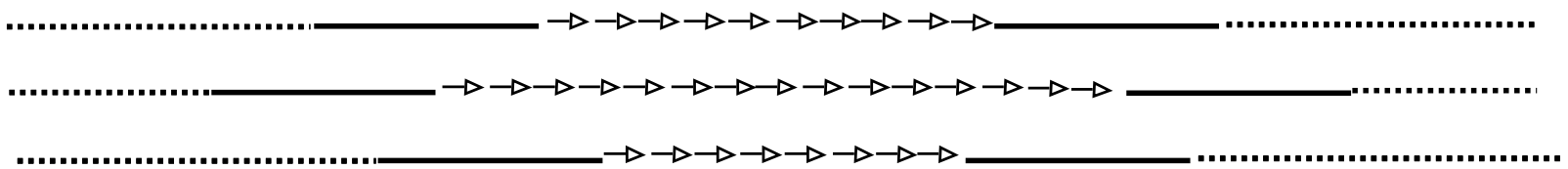
- Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetice o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80.
- V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit.
- Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly oblastem ohraničujícím SSR.
  - Tyto ohraničující sekvence bývají konzervativní pouze v rámci druhu a proto je nutné navrhovat pro každý druh novou sadu primerů.
- Jelikož je mezi jedinci počet repeticí značně variabilní, výsledkem amplifikace je vznik různě dlouhých PCR produktů, které jsou separovány na polyakrylamidové nebo agarózové gelové elektroforéze s vysokým rozlišením.
- Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací.

Příklad amplifikace mikrosatelitů

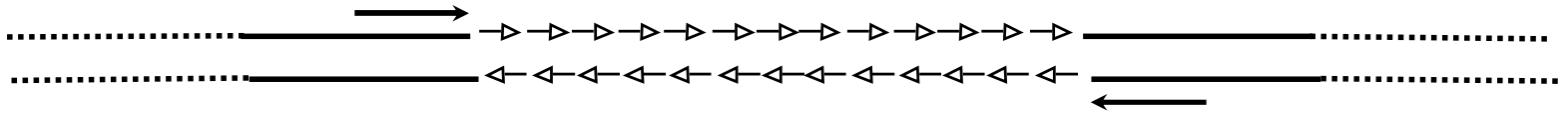
- Struktura



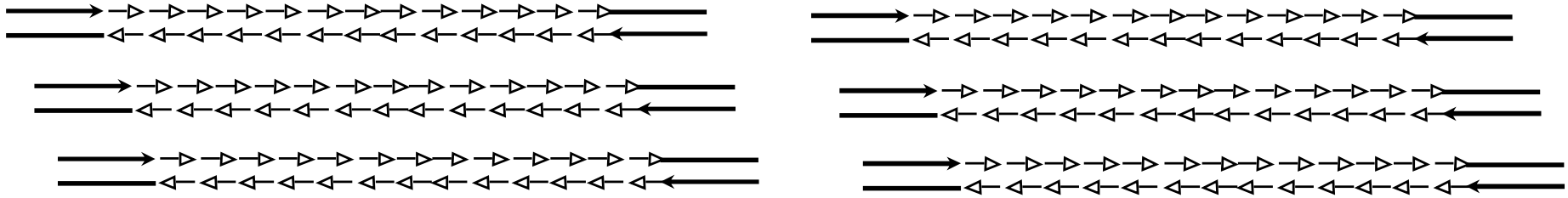
- Počet repeticí je velice variabilní mezi jedinci



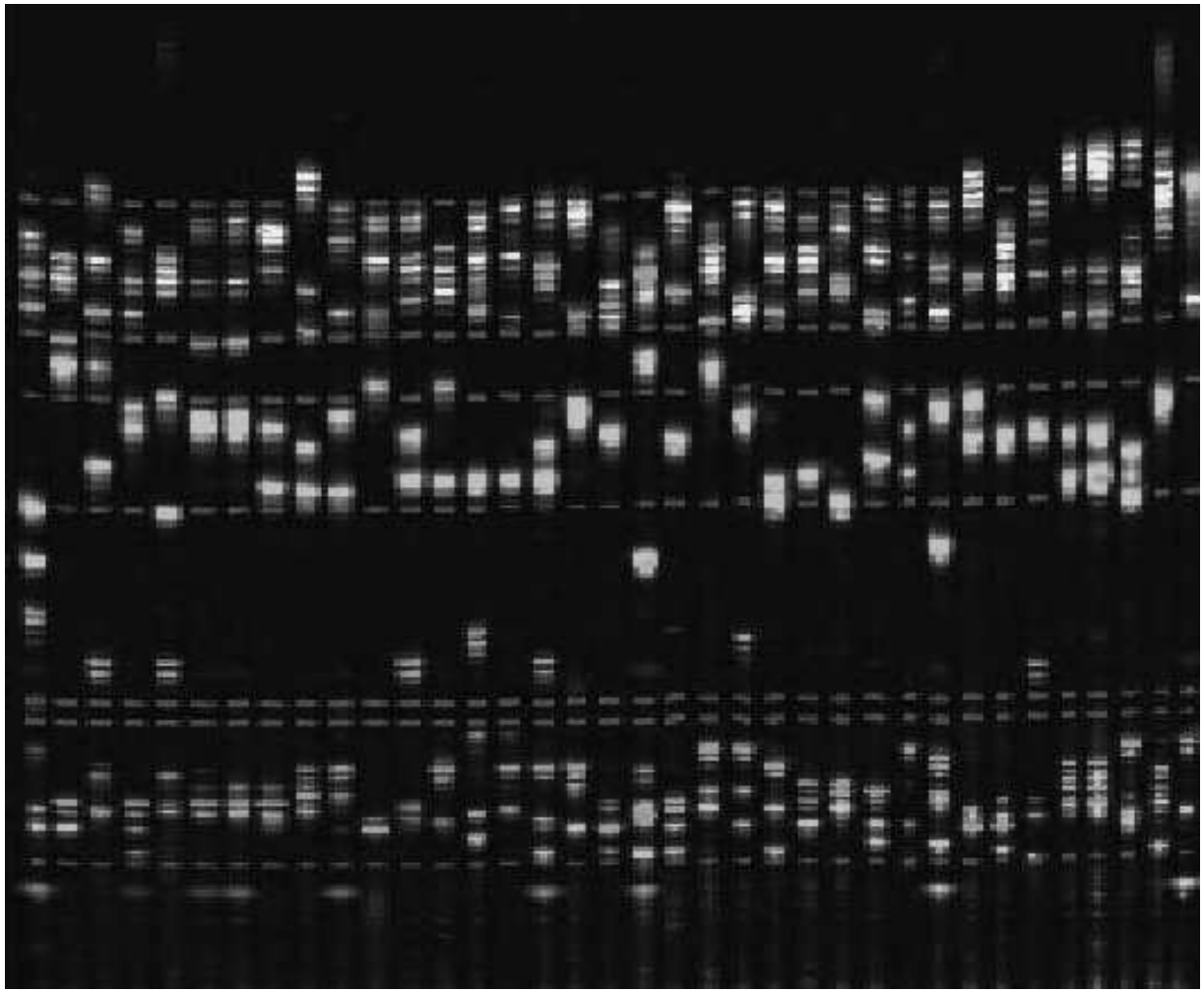
Návrh pimerů (⟷) komplementárních k ohraničujícím sekvencím



Amplifikace repeticí pomocí PCR



Multiplex PCR-SSLP

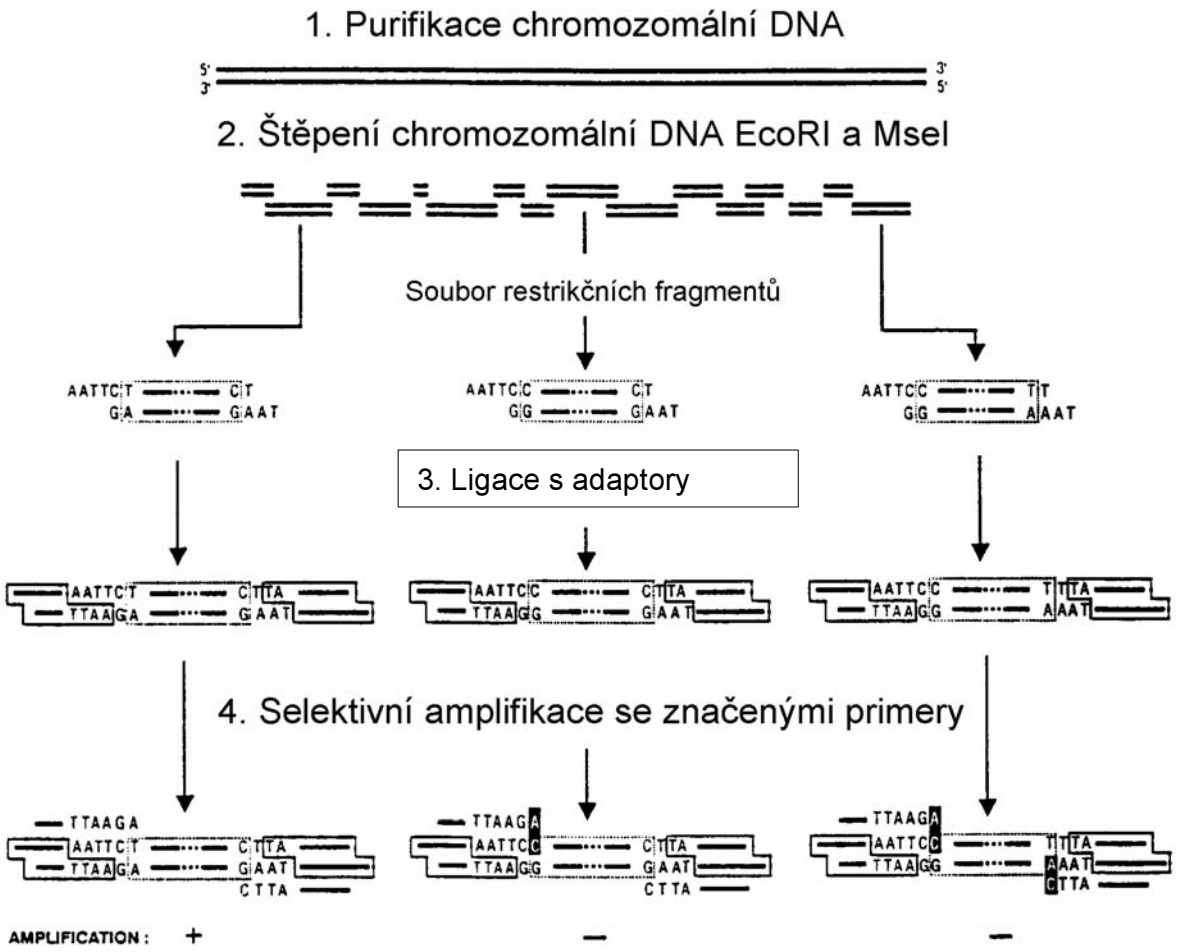


Fluorescenční značení primerů pro amplifikaci mikrosatelitů umožňuje amplifikaci několika lokusů

AFLP - Polymorfizmus velikostí amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)

- Selektivní amplifikace určitého souboru fragmentů DNA vytvářeného štěpením restrikční endonukleázou. Polymorfizmus je založen na ztrátě nebo získání restrikčních míst.
- Metoda využívající kroky restrikce jednou nebo dvěma restrikčními endonukleázami a ligace genomové DNA se speciálně navrženými adaptory s následnou amplifikací pomocí jednoho nebo dvou selektivních primerů.
- Nevyžaduje znalost sekvence.
- Technicky i finančně náročnější ale spolehlivější než RAPD.
- Další používaná označení: SRFA (primer dependent selective restriction fragment amplification), IRS-PCR (infrequent restriction site amplification).

Schema obvyklého postupu AFLP

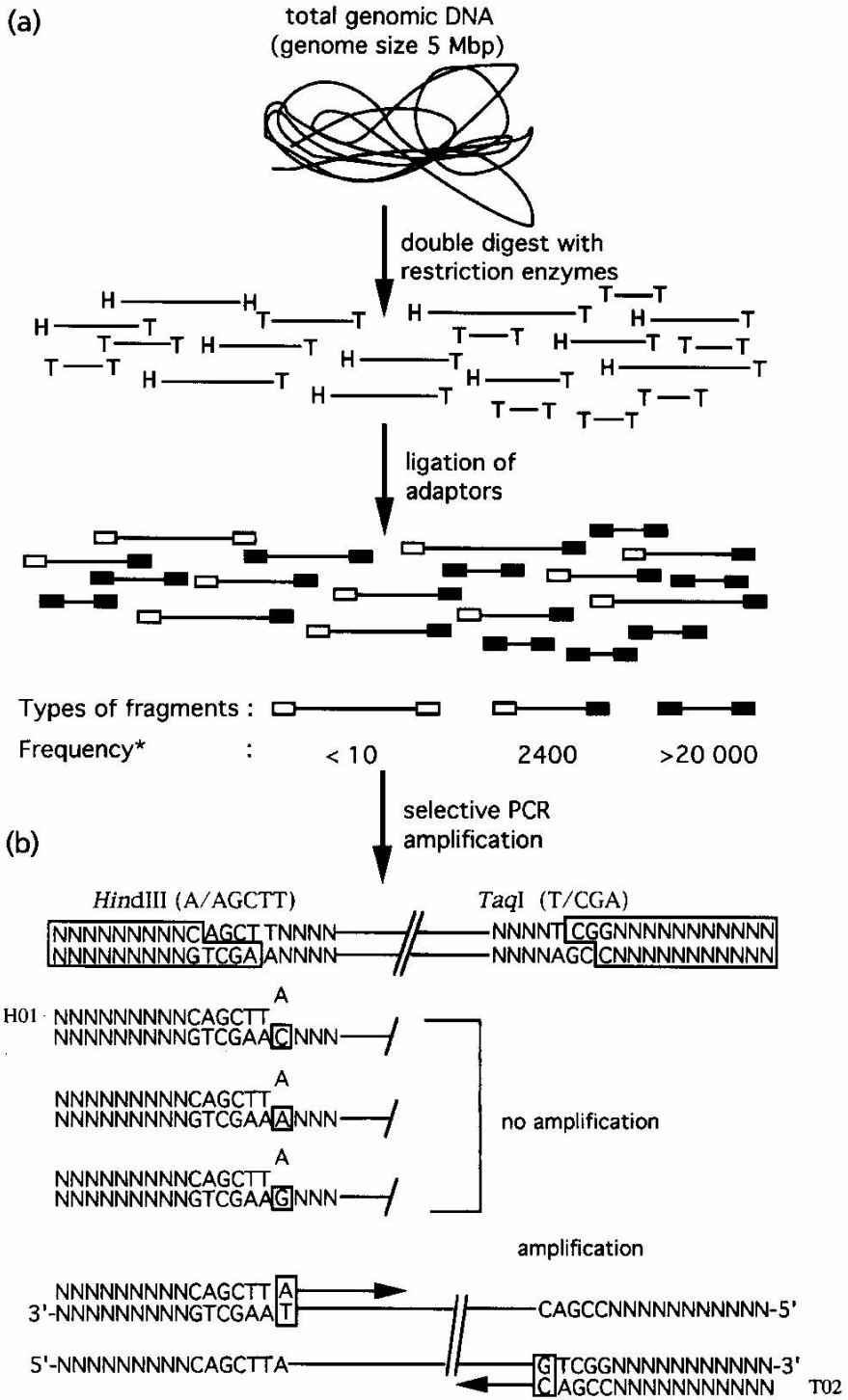


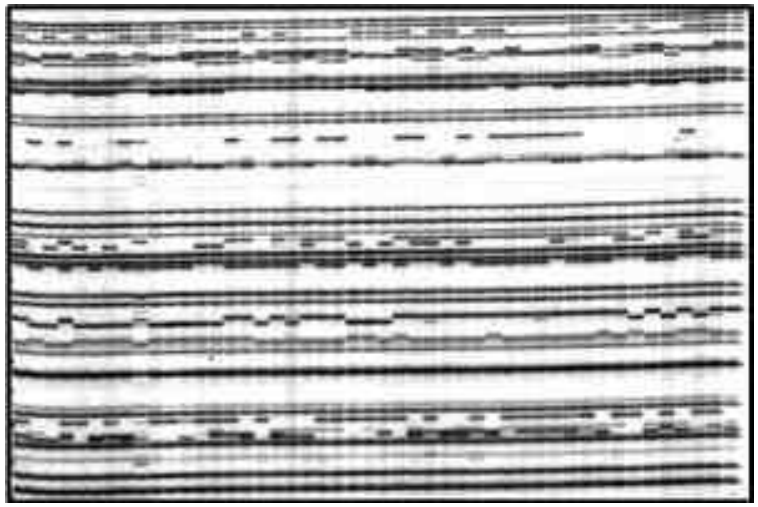
[a] ds oligonucleotides with an overhang complementary to the restriction site overhangs.

*Eco*RI adapter *Mse*I adapter

[b] *Eco*RI primer : complementary to (*Eco*RI adapter + *Eco*RI restriction site + T)
*Mse*I primer : complementary to (*Mse*I adapter + *Mse*I restriction site + G)

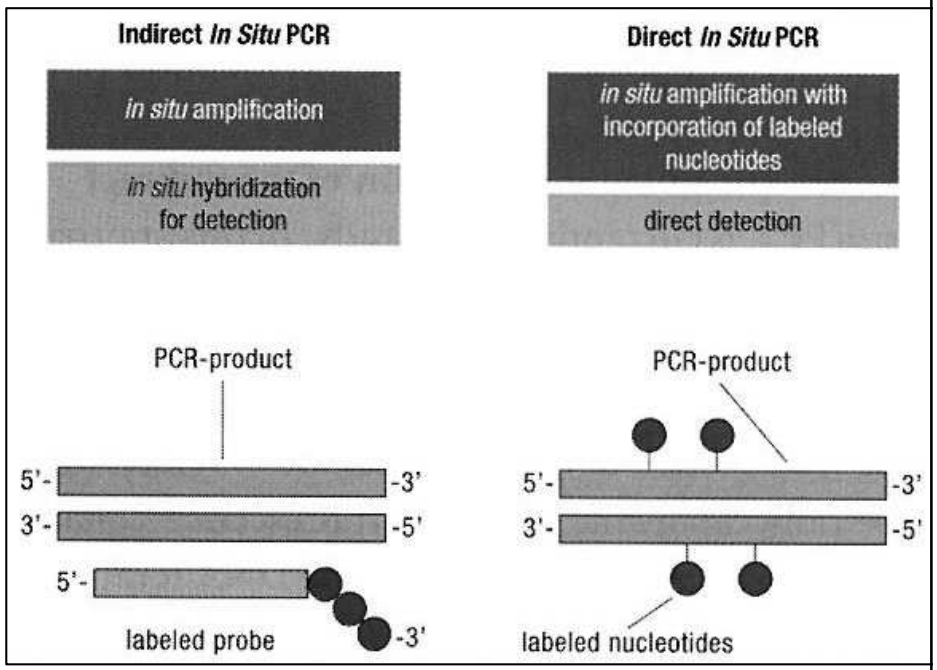
Black box : mismatch of 3' end of primer


(a)
total genomic DNA
(genome size 5 Mbp)
double digest with
restriction enzymes
ligation of
adaptors
Types of fragments :
Frequency* :
< 10
2400
>20 000
selective PCR
amplification
(b)
HindIII (A/AGCTT)
TaqI (T/CGA)
NNNNNNNNNCAGCTTNNNN
NNNNNNNNNGTCGAANNNN
NNNNTCGGNNNNNNNNNNN
NNNNAGCCNNNNNNNNNNN
H01
no amplification
amplification
CAGCCNNNNNNNNNNN-5'
5'-NNNNNNNNNCAGCTTA
TCGGNNNNNNNNNNN-3'
AGCCNNNNNNNNNNN
T02



In situ PCR (PCR *in situ*, incell PCR)

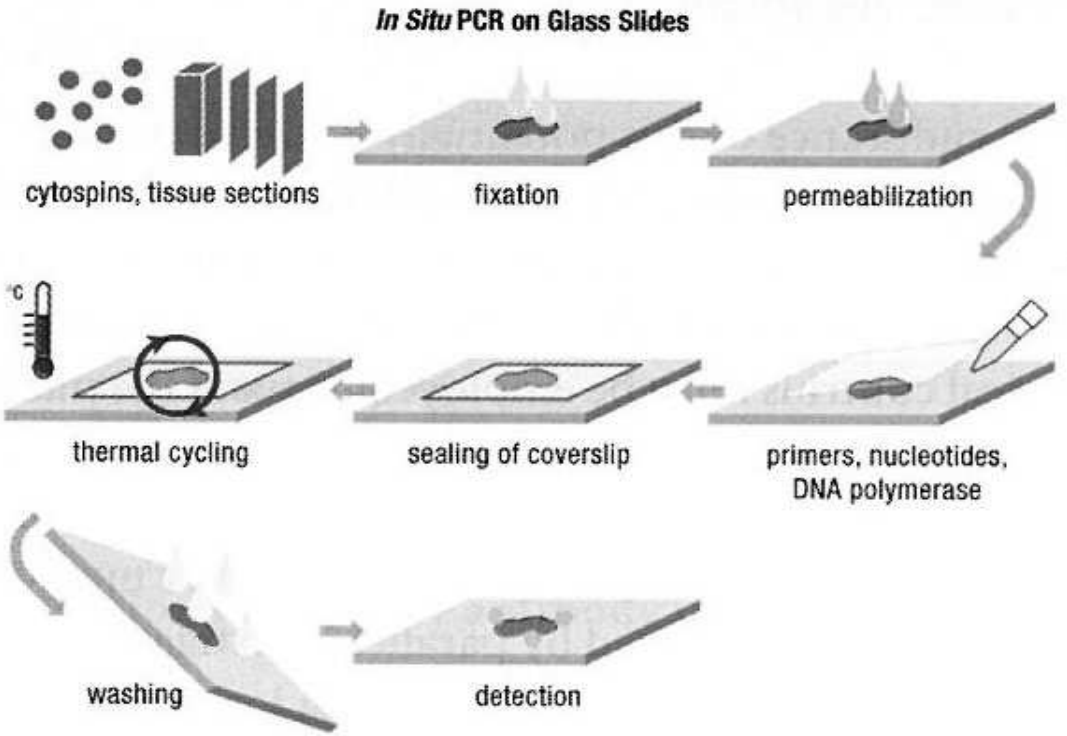
- Hybridizace in situ (ISH) umožňuje lokalizaci určité sekvence NK uvnitř jednotlivých buěnk, ale vykazuje nízkou detekční aktivitu.
- Konvenční PCR vyžaduje nutnost tkáně nebo buňky destruovat a izolovat NK, nelze asociovat výsledek amplifikaceke specifickému histologickému typu buněk.
- *In situ* PCR kombinuje vysokou citlivost PCR s cytologickou lokalizací sekvencí poskytnutou ISH
  - PCR in situ hybridization
  - incell PCR
  - PCR driven ISH
  - umožňuje asociovat výsledek amplifikace ke specifickému histologickému typu buněk
  - umožňuje korelovat výsledek s histopatologickými rysy nebo množstvím buněk, obsahujících cílovou sekvenci



- Specifické sekvence jsou uvnitř buňky amplifikovány, čímž se zvýší počet kopií natolik, že je lze snadno detekovat
  - pomocí ISH (nepřímá in situ PCR)
  - imunochemicky (přímá in situ PCR)

Příprava vzorku pro *in situ* PCR

- Fixace buněk nebo tkáně – zachování morfologie (paraformaldehyd)
- Permeabilizace - přístup PCR reagentů k NK (detergenty, proteázy)
  - průběh PCR
  - v buněčných suspenzích
  - v cytocentrifugačních preparátech
  - pod mikroskopickým sklem
- Detekce intracelulárních produktů
  - ISH
  - Imunochemicky (protilátky proti DIG-11-dUTP, fluorescein-dUTP, 3H-CTP)



- *In situ* PCR má aplikace jak ve výzkumu, tak v diagnostice:
  - detekce virových nebo provirových NK (HIV, CMV, HBV, HSV-2)
  - chromozomální přeskupení, translokace, hledání jednokopiových genů
  - mapování nízkokopiových chromozomálních sekvencí v metafázických chromozomech
  - detekce nízkokopiových mRNA a virových RNA