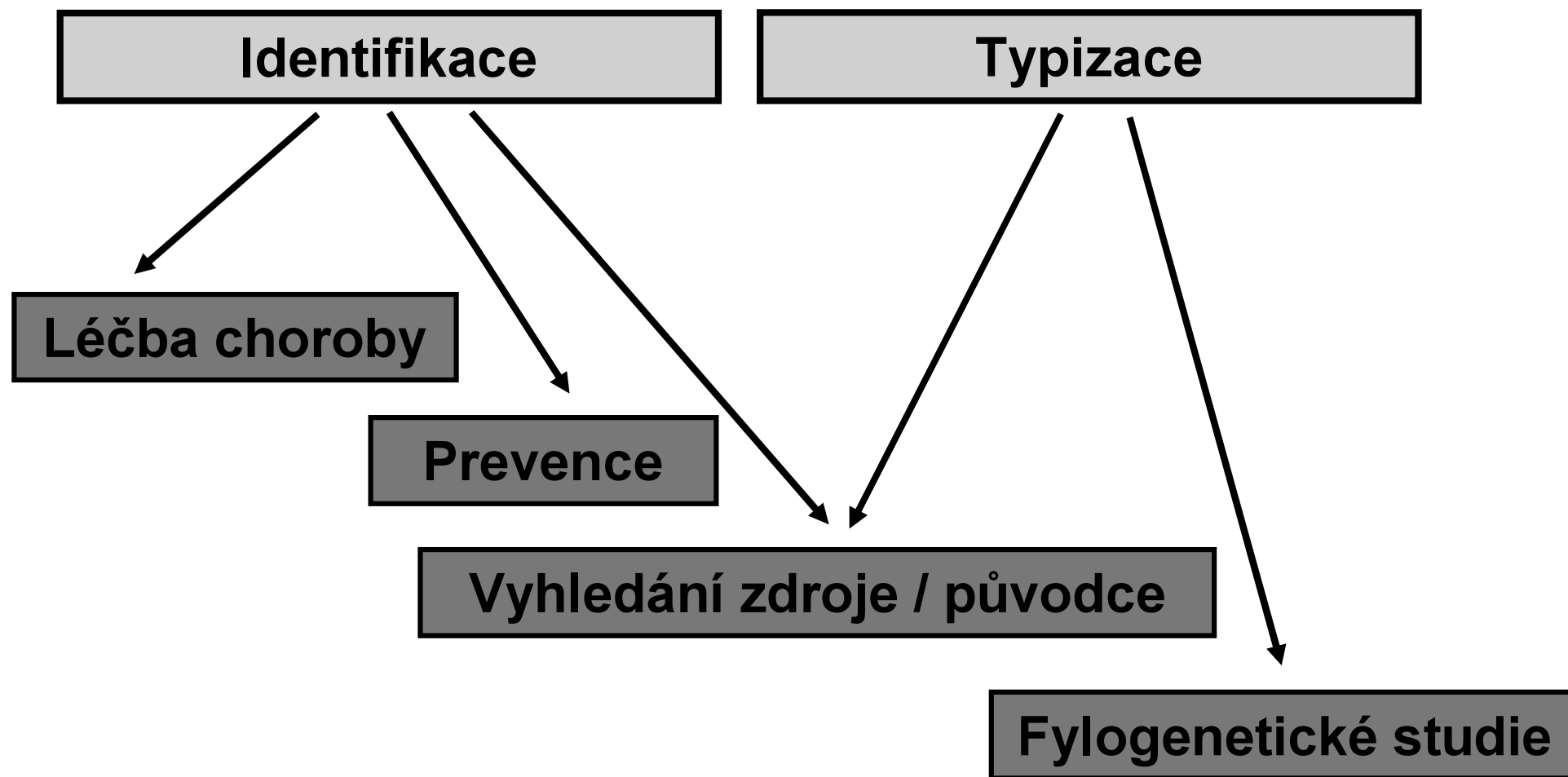


Metody molekulární diagnostiky

Molekulární diagnostika



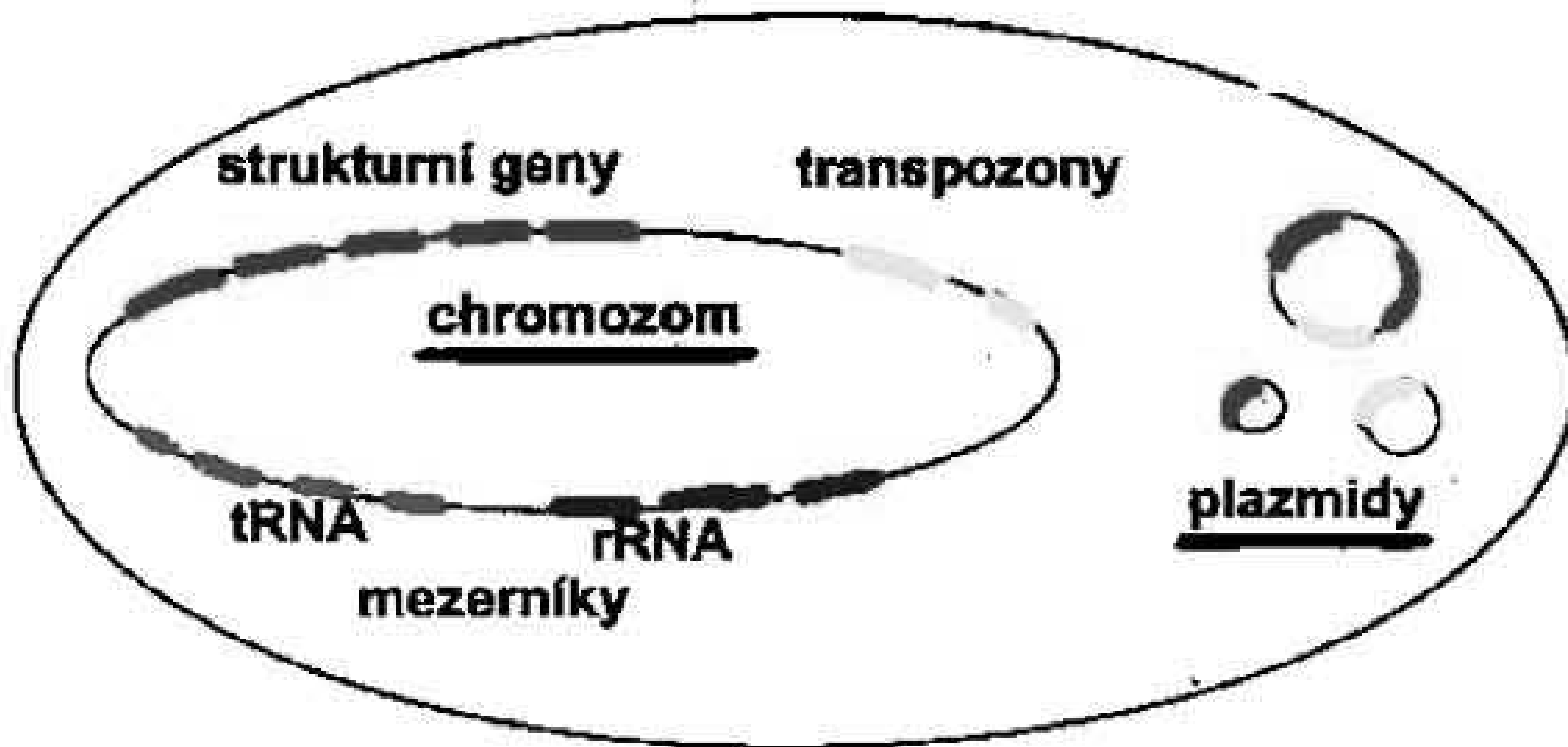
Metody pro detekci polymorfizmů v genomech

**metody elektroforetické a
hybridizační**

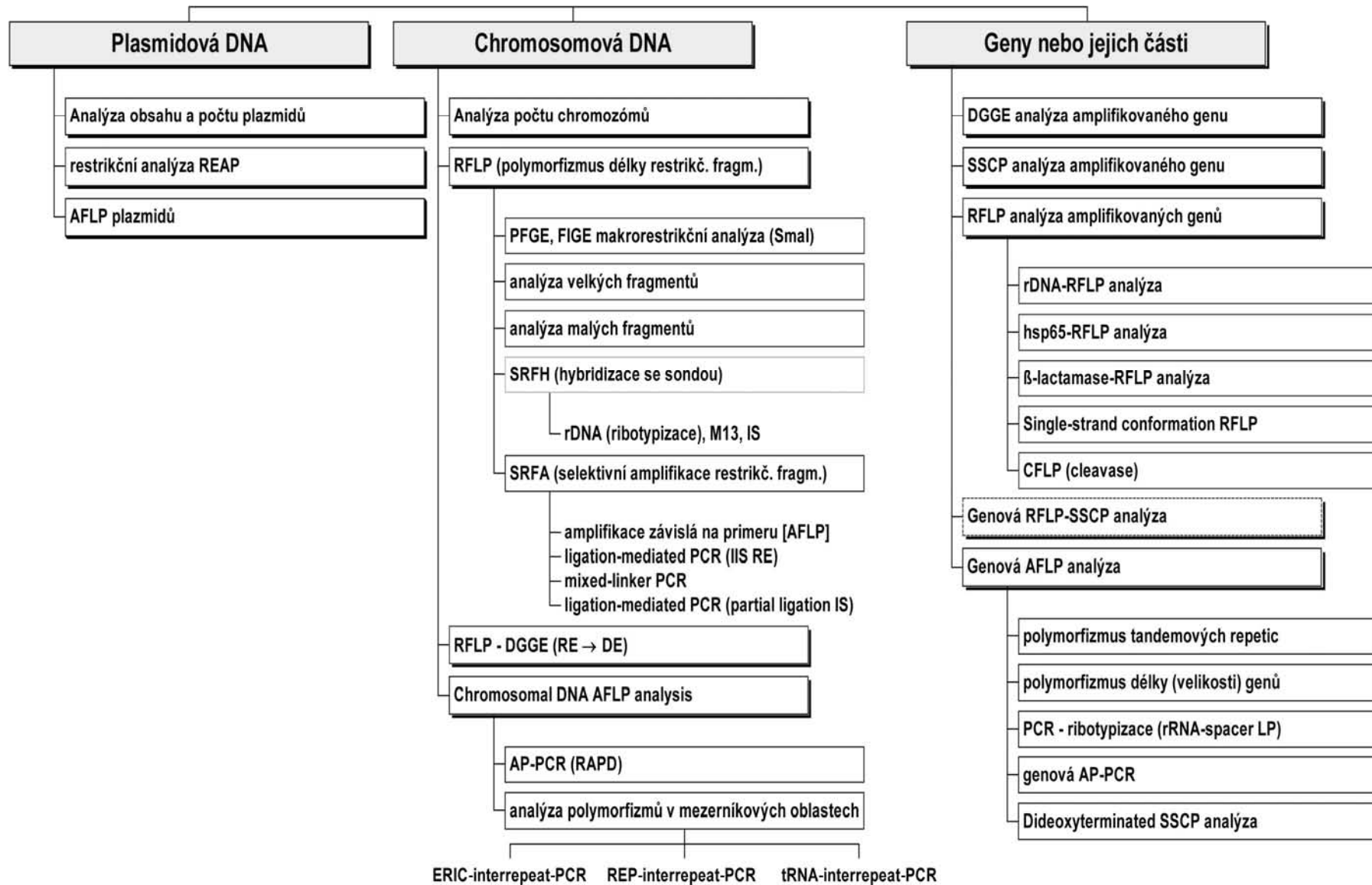
Metody studia sekvenčního polymorfizmu DNA

- 1. Přímá metoda:
 - Sangerovo sekvencování
 - Pyrosekvencování
 - Pomocí čipů
- 2. Nepřímé metody: **fingerprinting** (otisky DNA)
 - RFLP – polymorfismus délek restričních fragmentů
 - AFLP – polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů
 - SSLP – polymorfismus délek fragmentů s jednoduchou repeticí
 - CFLP – polymorfismus délek fragmentů vytvořených klevázou
 - SSCP – polymorfismus konformace jednořetězců
 - DSCP – polymorfismus konformace dvouřetězců
- 3. Metody pro specifickou detekci jednonukleotidových polymorfizmů

Složky prokaryotického genomu a jejich využití pro subtypizaci



Klasifikace technik pro fingerprinting DNA prokaryot

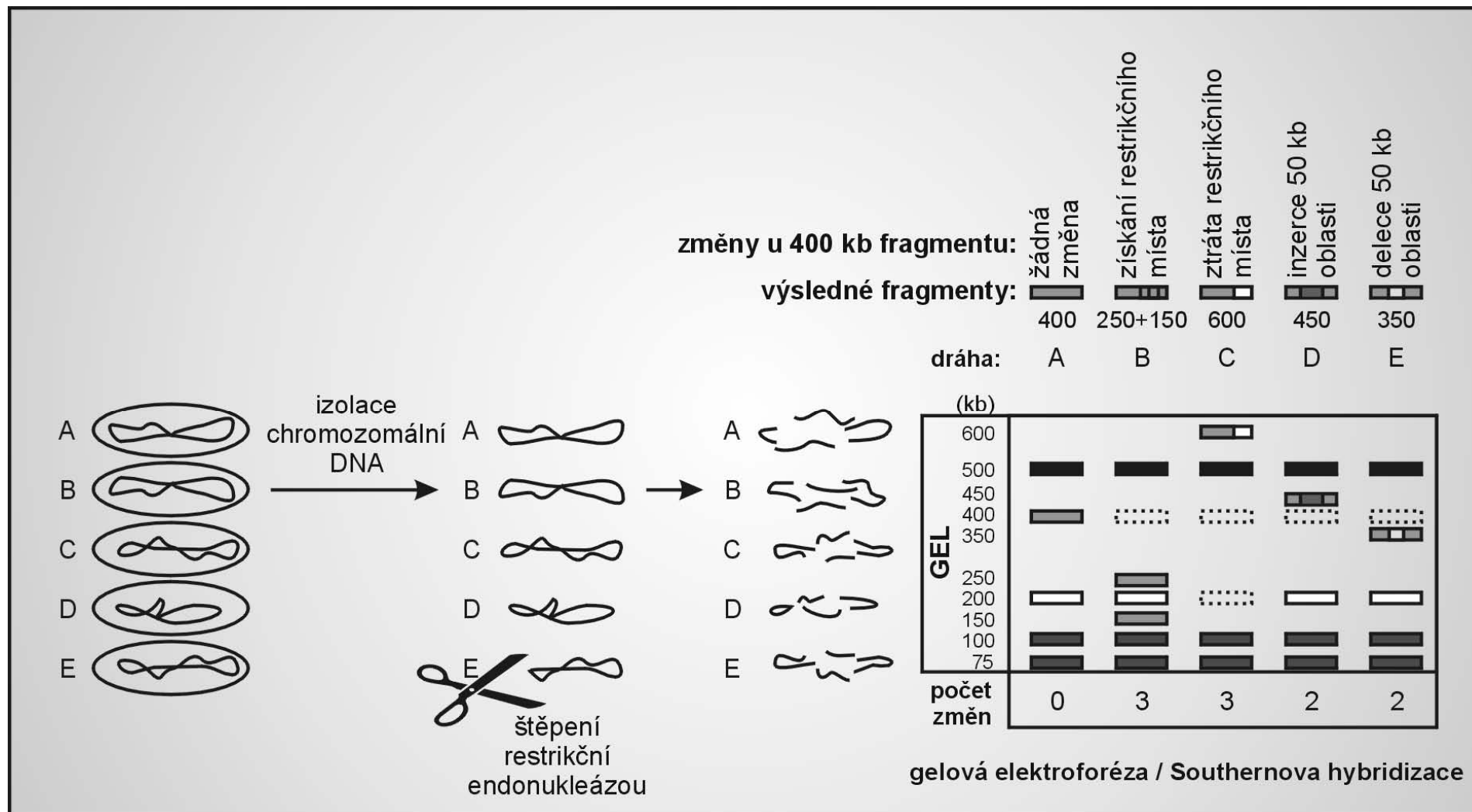


Analýza celkové chromozomové DNA

1. Analýza počtu chromozómů (kvasinky *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*; protozoa; *Aspergillus*)
2. Polymorfismus délky restričních fragmentů, restriční analýza (RFLP)
 - Analýza malých fragmentů
 - Analýza velkých fragmentů
 - Makrorestriční analýza (pulzní gelová elektroforéza)
3. Selektivní hybridizace se sondou (Southernův přenos restričních fragmentů na membránu a následná hybridizace)

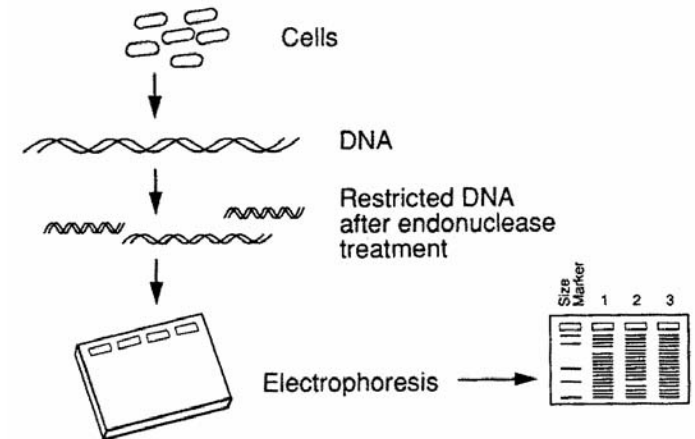
Princip RFLP

RFLP vzniká přestavbami sekvencí
 inzercemi
 delecemi
 substitucemi bazí uvnitř restričních míst



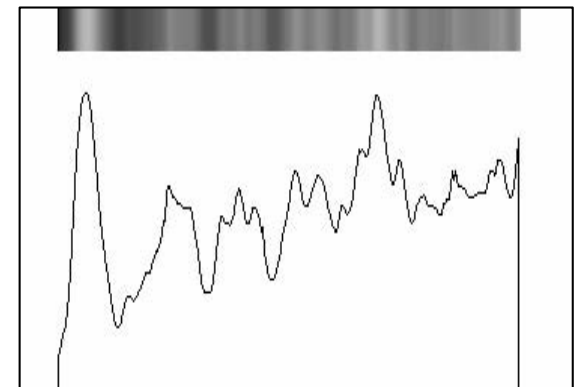
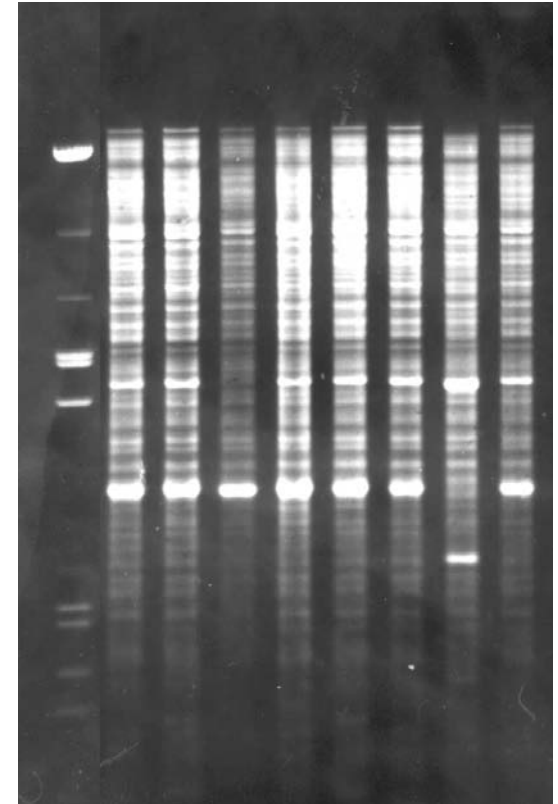
Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- Jedna z prvních DNA typizačních metod zahrnující analýzu počtu a velikosti restrikčních fragmentů vznikajících štěpením specifickou restrikční endonukleázou (RE).
- Rozdíly mezi fragmenty se označují jako polymorfismus délek restrikčních fragmentů (RFLP).
- Metoda restrikční analýzy zahrnuje následující kroky:
 - izolace chromozomární DNA
 - výběr vhodné RE.
 - štěpení RE, která rozpoznává 4 až 6 bp dlouhé sekvence
 - standardní elektroforéza DNA fragmentů o velikosti 20 000 - 1000 bp v agarózovém gelu
 - vizualizace barvením v etidiumbromidu a densitometrické vyhodnocení



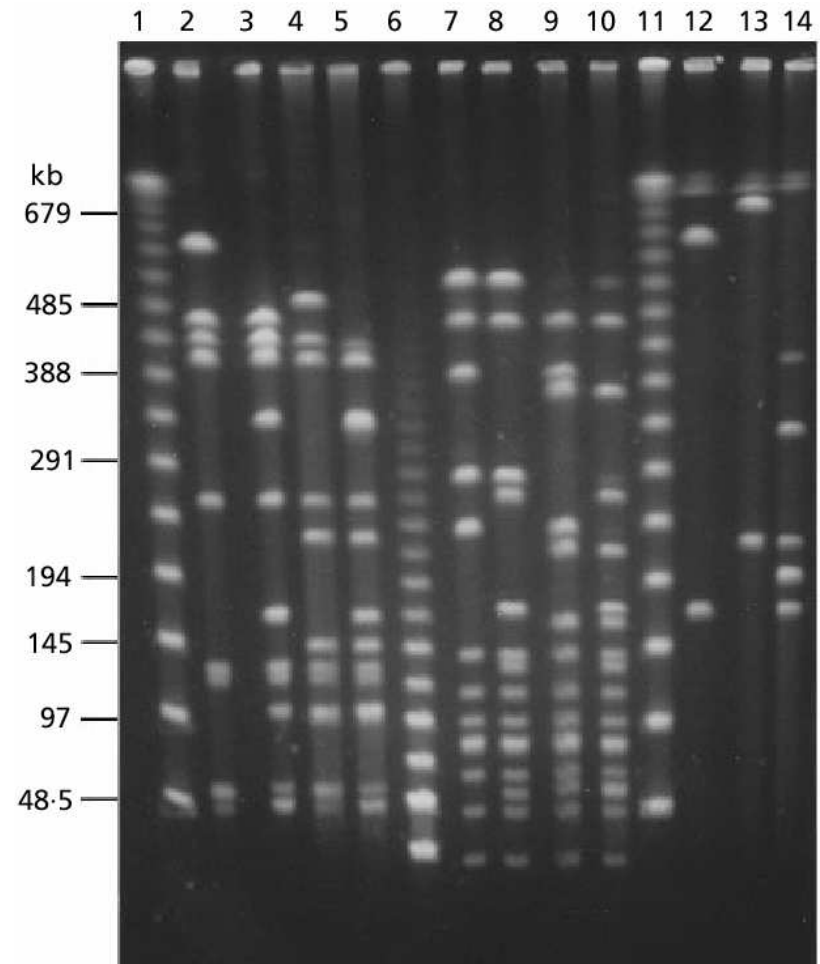
Analýza velkých nebo malých fragmentů

- Nevýhodou RE analýzy celkové chromozomální DNA je velké množství vytvářených restriktů s podobnou pohyblivostí v tradičním agarózovém gelu.
- Výsledkem je spektrum pruhů vizuálně obtížně odlišitelných.
- Pro přesné vyhodnocení míry podobnosti spekter je nutné použít
 - densitometrické měření
 - korelační srovnání densitometrických křivek
- Analýzu zjednoduší hodnocením pouze
 - malých fragmentů 50 – 1000 bp (PAGE + barvení stříbrem)
 - velkých fragmentů 5 - 15 kb (FIGE)
- Přes uvedené obtíže byla REA použita ke studiu příbuznosti u řady bakteriálních druhů *Campylobacter*, *Legionella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, streptokoky aj.



Makrorestrikční analýza chromozomální DNA pomocí PFGE

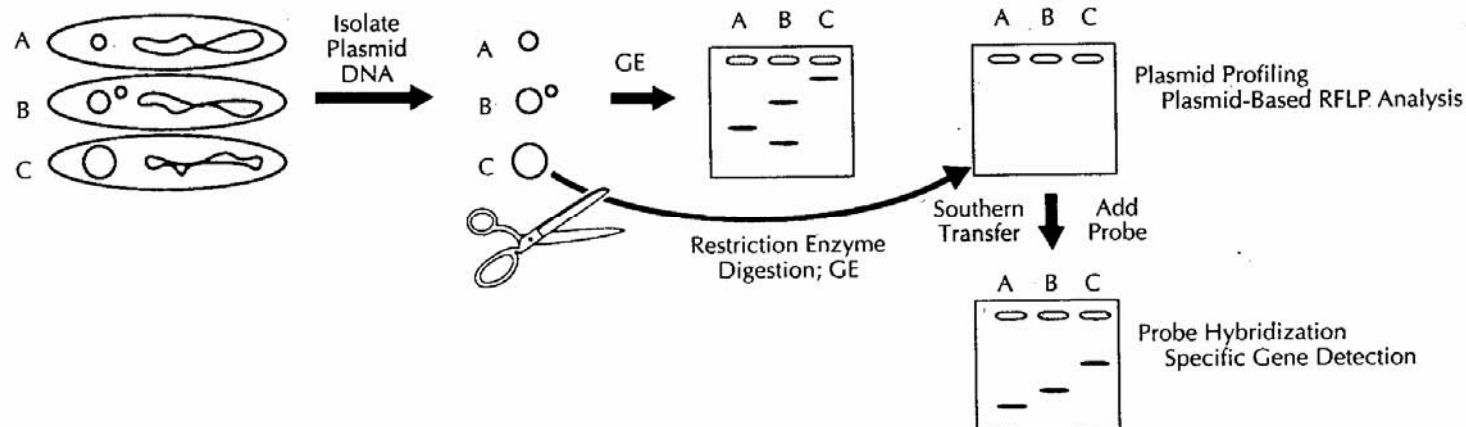
- Metoda slouží pro stanovení RFLP genomové DNA při použití restričních endonukleáz, které štěpí DNA na < 30 místech.
- Vznikají velké fragmenty chromozomální DNA (10 - 1000 kbp), které jsou separovány **pulzní gelovou elektroforézou**.
- Pro izolaci intaktní DNA není vhodná konvenční metoda, ale používá se specifický postup.



Příklad pulzní gelové elektroforézy DNA různých kmenů *Staphylococcus carnosus*.

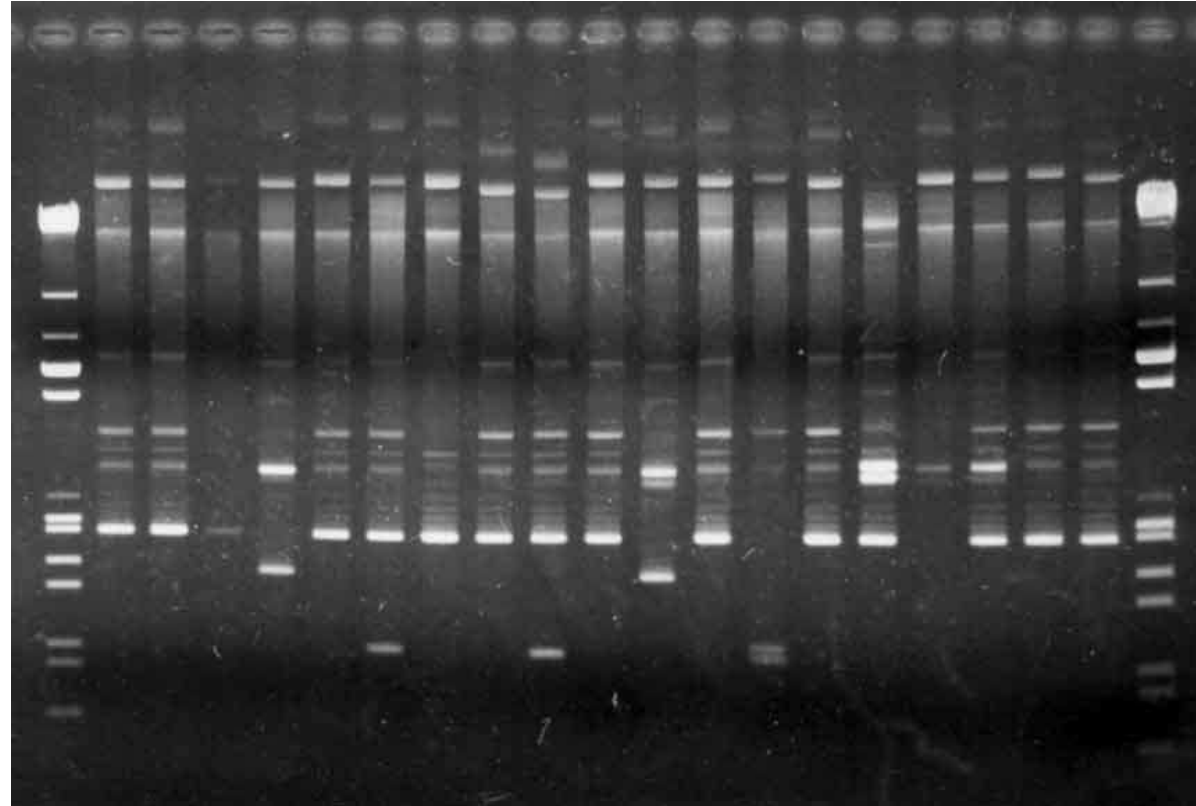
Analýza plazmidové DNA

- Analýza obsahu a počtu plazmidů
- Restrikční analýza plazmidové DNA (REAP)
- Hybridizace se sondou - detekce specifických genů pro
 - virulenci
 - rezistenci k antibiotikům a antimikrobiálním chemoterapeutikům



- Přenos plazmidů mezi kmeny (i mezi různými druhy a rody) se může uskutečňovat:
 1. Konjugací
 2. Transdukcí
 3. Fágem zprostředkovanou konjugací
- Plazmidová analýza je rychlá, jednoduchá a levná metoda.
- Má následující nevýhody:
 - kmeny bez plazmidů jsou netylovatelné
 - interpretace plazmidových profilů není jednoznačná (superhelicita)
 - dlouhodobá stabilita plazmidů je diskutabilní

- Příklad analýzy plazmidů u *Staphylococcus aureus* z epidemie na JIP v Olomoucké nemocnici.

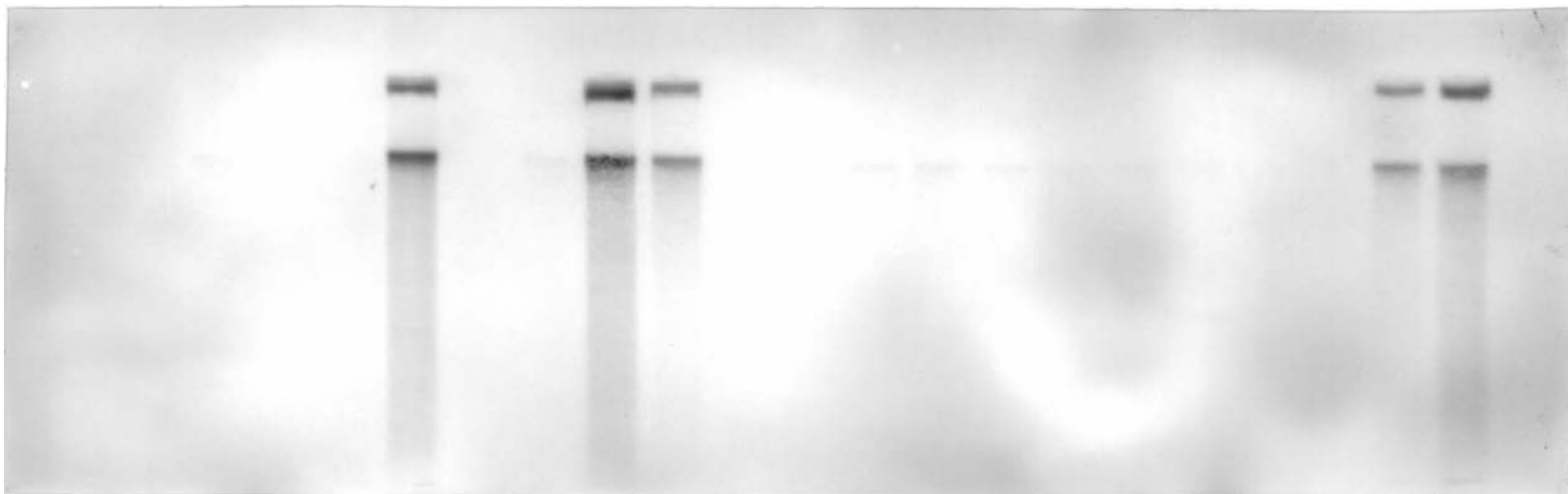
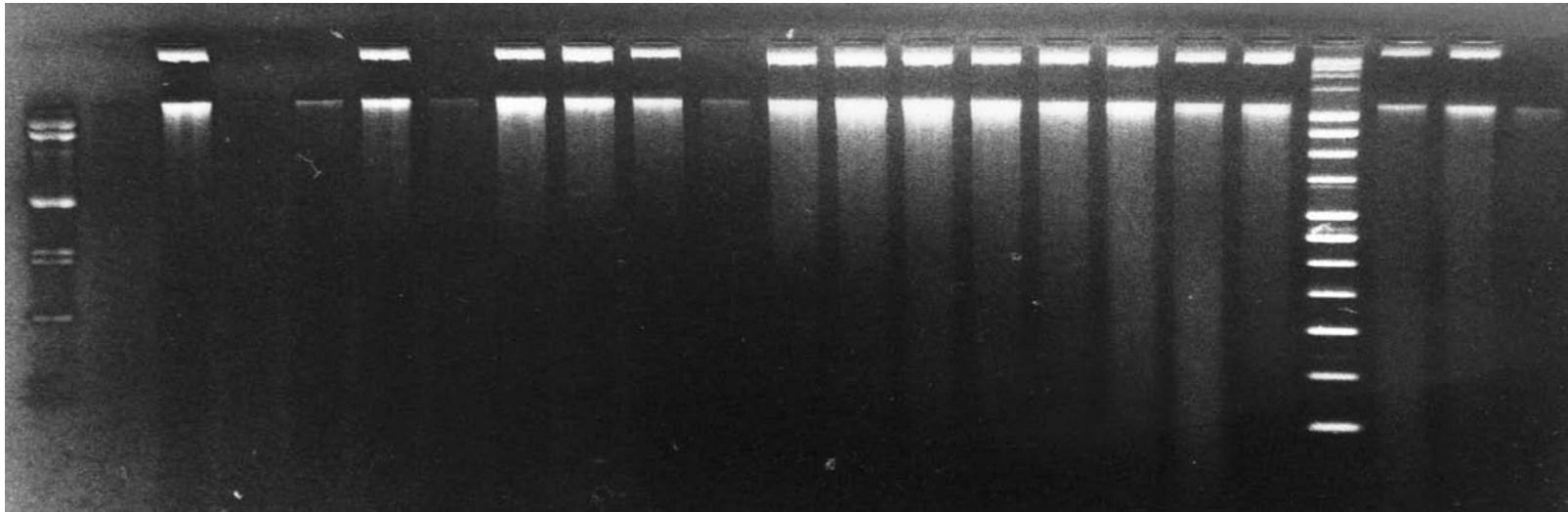


- V současné době se plazmidová analýza používá jako doplňková typizační metoda u gramnegativních (*Salmonella*, *Neisseria*, *Escherichia*) i grampozitivních (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Helicobacter*) bakterií.

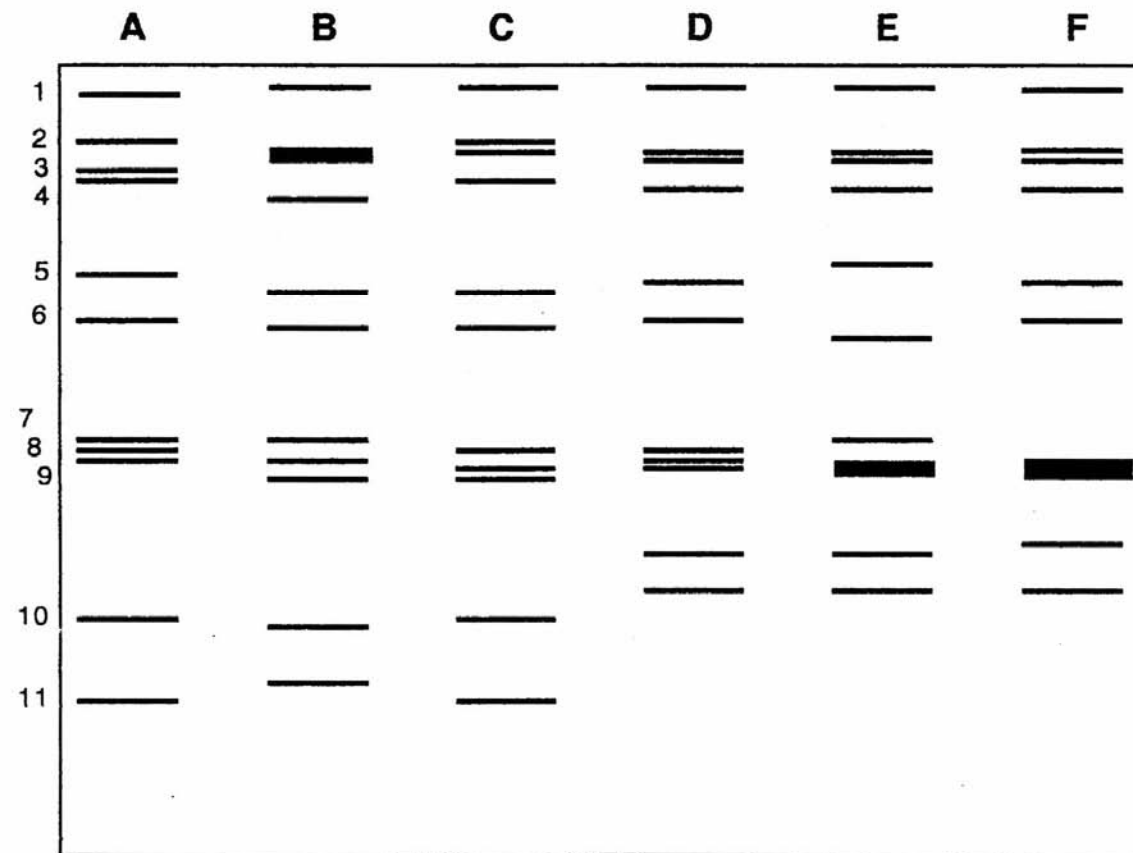
Příklad detekce genu pro exfoliativní toxin na plasmidech kmenů *S. aureus*

OC ♦

CCC ♦



Polymorfizmus délky genomových segmentů u virů se segmentovaným genomem

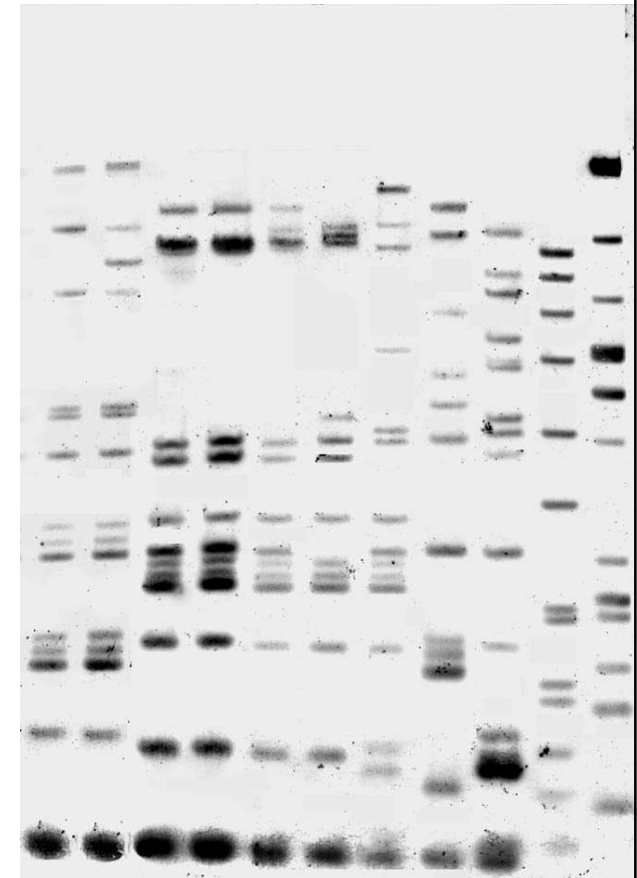
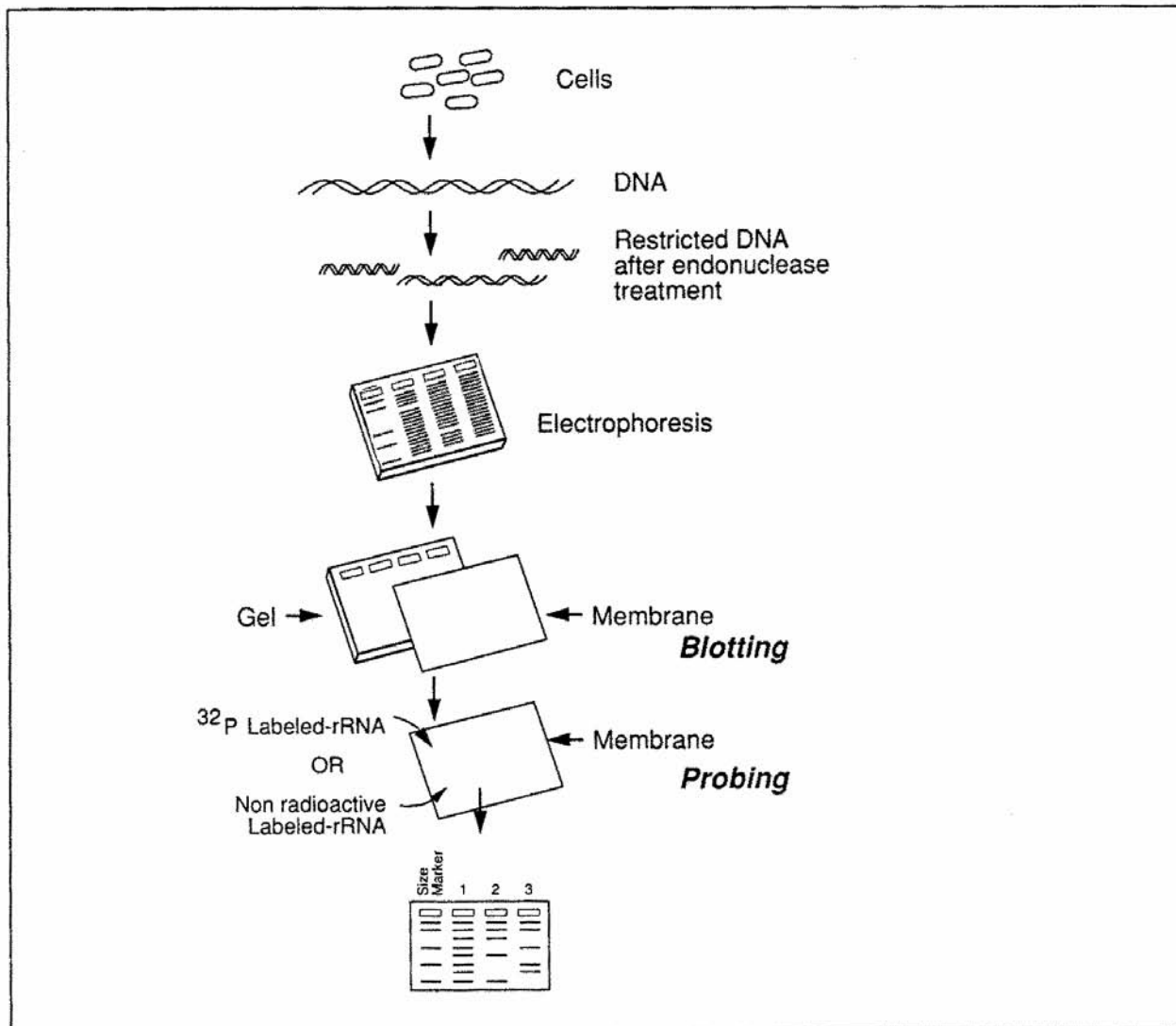


10% polyakrylamidový gel s genomovou segmentovanou RNA rotavirů

Selektivní hybridizace restrikčních fragmentů (SRFH)

- DNA hybridizační diagnostické metody využívají Southernův přenos (1975) pro detekci a lokalizaci vybraných sekvencí, což umožní zjednodušení RFLP analýzy snížením počtu srovnávaných fragmentů.
- Základní metodické kroky při SRFH
 - štěpení celkové chromozomální DNA restrikčním enzymem
 - separace fragmentů pomocí elektroforézy
 - přenos fragmentů z gelu na nitrocelulózovou nebo nylonovou membránu
 - hybridizace DNA navázané na membráně s jednou nebo více značenými sondami homologickými se zkoumanými geny
 - detekce navázané sondy
 - sondy značené radioizotopy + autoradiografie
 - sondy značené neradioaktivně (digoxigenin, biotin, fluorescein, atd.) a následná detekce zahrnující enzym (AP) a barvotvorný substrát nebo enzym a chemiluminiscenční substrát
 - vyhodnocení RFLP

Princip selektivní hybridizace



Příklad hybridizace se sondou specifickou pro 16S rDNA.

Přehled používaných sond pro SRFH u prokaryot

1. Náhodně klonované sondy
 - Relativně stabilní oblasti bakteriálního chromozómu
 - Použití: *Legionella*, *Brucella*
2. Sondy specifické pro geny kódující metabolické faktory nebo faktory virulence
 - Sondy je nutné připravit individuálně pro určité bakteriální druhy, tzn. že tento přístup není použitelný obecně.
 - Sekvence některých genů jsou velice konzervativní a jsou proto nevhodné k přípravě sond, naopak geny s určitou sekvenční variabilitou, případně geny vyskytující se ve více kopiích jsou velice vhodné.
 - Použití: *Pseudomonas aeruginosa*: gen pro exotoxin A
 - *Staphylococcus aureus*: mec (determinant meticilinové rezistence)
 - Genově specifické sondy je možné využít k hybridizaci s makrorestrikčními fragmenty separovanými pomocí PFGE

3. Sondy odvozené z vícekopiových elementů typu inzerčních sekvencí a transpozonů

- Inzerční sekvence (IS) jsou transponovatelné repetitivní DNA elementy nacházející se v genomu prokaryotických a eukaryotických organismů.
- Přítomnost elementu na určitých místech chromozómu je odrazem chromozomálních přestaveb během evoluce.
- Hybridizace se sondami připravenými z IS elementů vykazuje vysokou reprodukovatelnost a vysokou diskriminační schopnost související s přítomností těchto elementů ve více lokusech na chromozómu.
- Bakteriální IS elementy mají na koncích obvykle 10-40 bp dlouhé obrácené repetice, sonda se proto připravuje z vnitřních sekvencí elementu.
- Výběr restriční endonukleázy a vhodného elementu pro přípravu sondy je nutné provést pro každý bakteriální druh.
 - Použití: *Mycobacterium tuberculosis* IS6110
 - další druhy mykobakterií
 - *Staphylococcus aureus* IS257/431

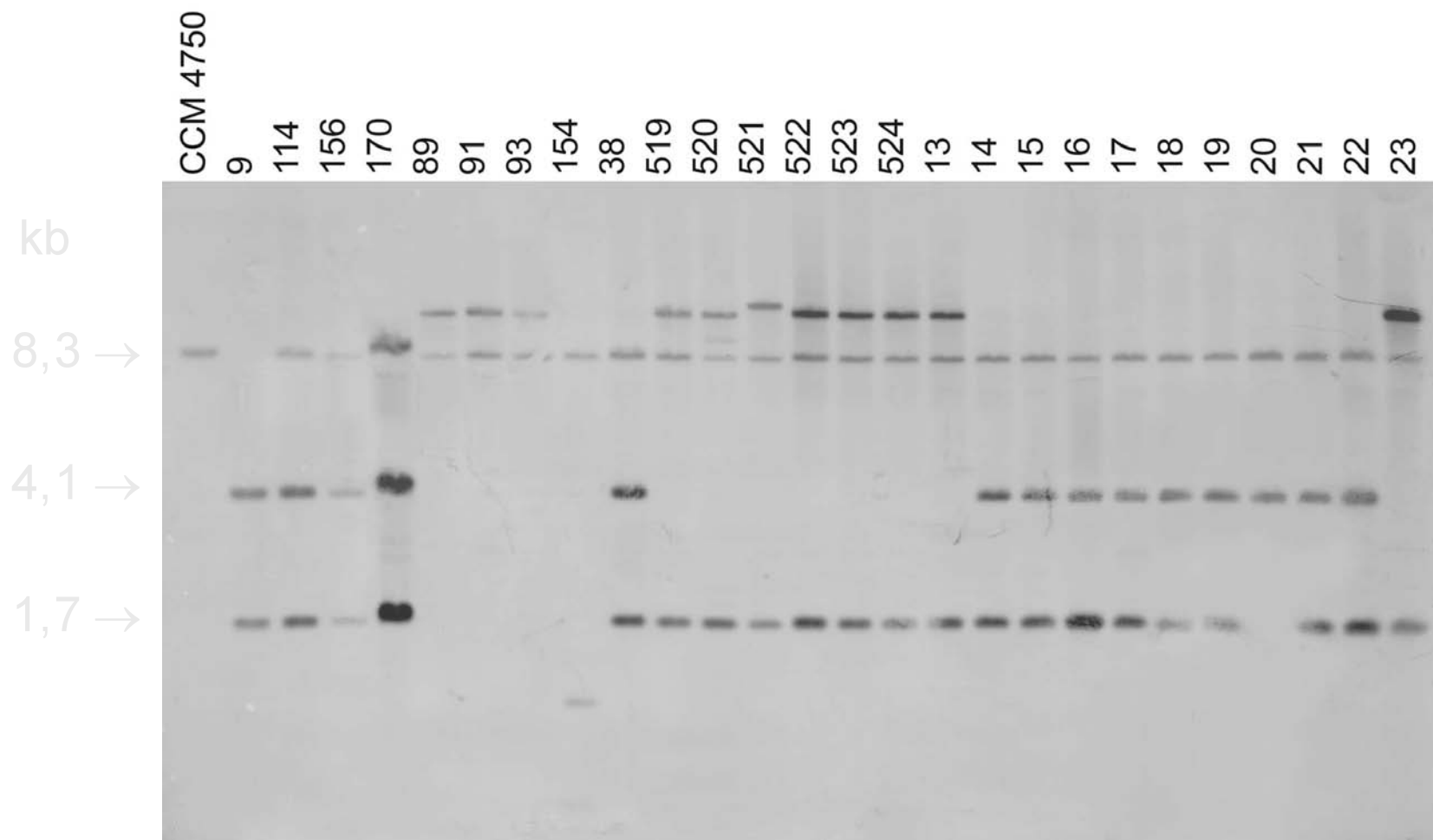
4. Sondy připravené z dalších repetitivních sekvencí

- Pro stanovení polymorfizmů metodou SRFH byly použity některé krátké repetitivní sekvence obecně přítomné v genomech organismů.
- Pouze některé repetice jsou obecně použitelné:
 - 15-bp repetice z pozdního genu *coa* z bakteriofága M13
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus*
 - polymorfní tandemová repetice z mykobakterií
 - *Mycobacterium tuberculosis* (MPTR-SRFH)
 - repetitivní sekvence označovaná BOX
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - náhodné trinukleotidové repetice jako např. (GTG)₅
 - *Salmonella*, *Shigella* a *Mycobacterium*.

5. Sondy připravené z dalších variabilních genetických elementů integrovaných v chromozómu

- Profágy
- Plazmidy

Příklad detekce profágů integrovaných v bakteriálním genomu selektivní hybridizací DNA se 3 sondami specifickými pro různé fágové serologické skupiny, značenými biotinem, digoxigeninem a fluoresceinem

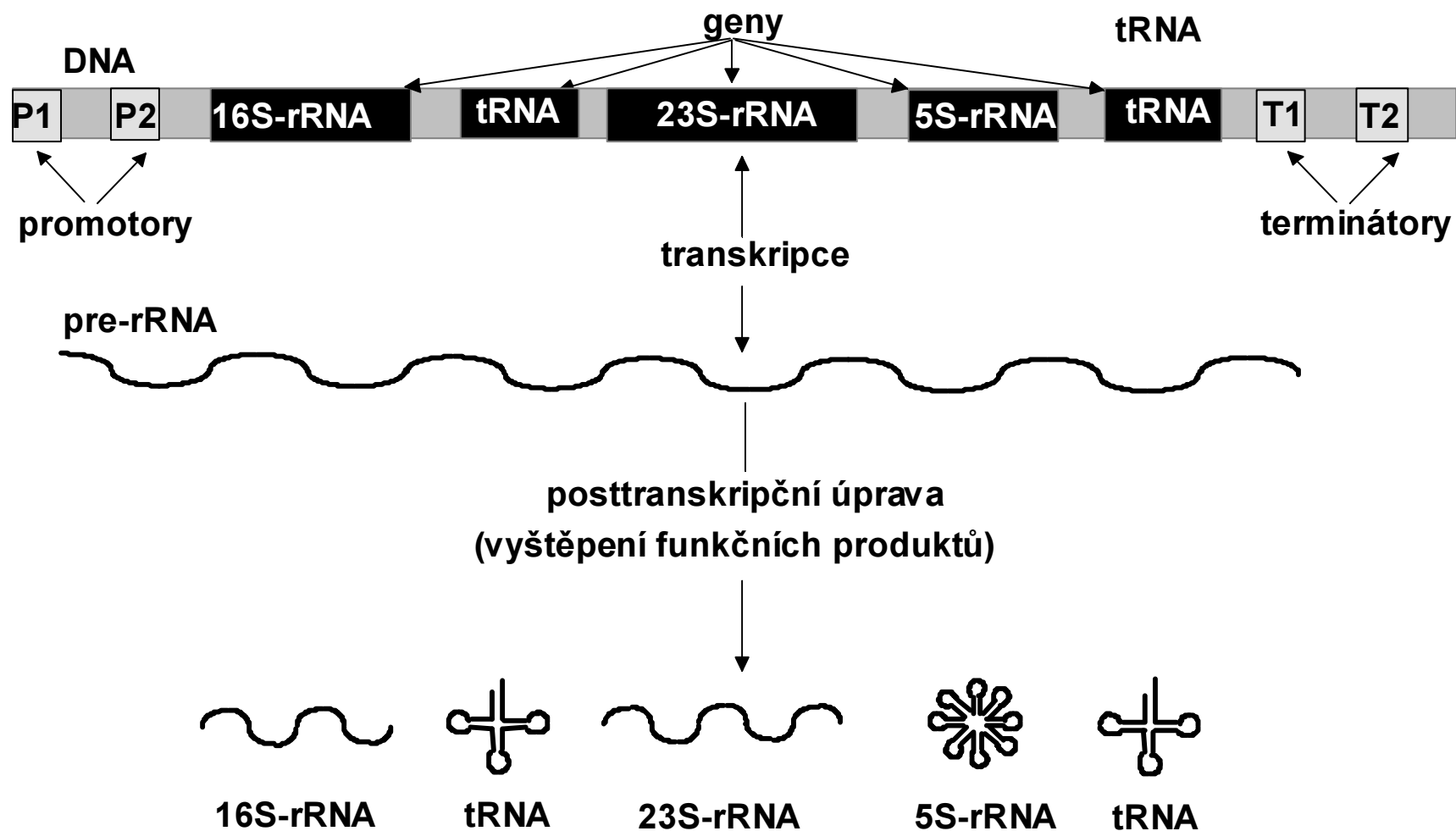


6. Ribotypizace - Sondy připravené z 16S rRNA nebo 23S rRNA (rDNA-SRFH, rDNA-RFLP)

- Ribotypizace je nejvšestrannější a nejvíce využívaná strategie pro získání informace o polymorfizmu bakteriálního genomu.
- Historie:
 - 1965 - bylo zjištěno, že sekvence ribozomální RNA mohou být využitelné ke stanovení příbuznosti organismů
 - 1980 - poprvé byl použit termín **ribotyp**
 - 1981 - byla potvrzena teorie, že ribozomální RNA všech organismů pochází ze společného předka
 - 1983 - byla patentována metoda charakterizace organismů na základě ribozomálních DNA sekvencí
 - 1986 - ribotypizace byla použita pro srovnávací studii 41 různých bakteriálních druhů
 - od 1990 - široké využití v oblasti lékařské a veterinární epidemiologie, patologie, zjišťování kontaminace potravin atd.
 - 1995 - Bylo zavedeno automatizované zařízení RiboPrinter pro fingerprinting DNA bakterií.

Charakteristika bakteriálního *rrn* operonu

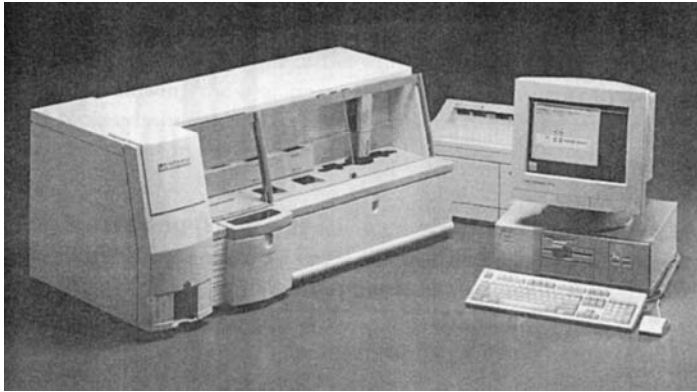
- rRNA-operon (*rrn* operon) se vyskytuje na bakteriálním chromozómu v **několika kopiích**.



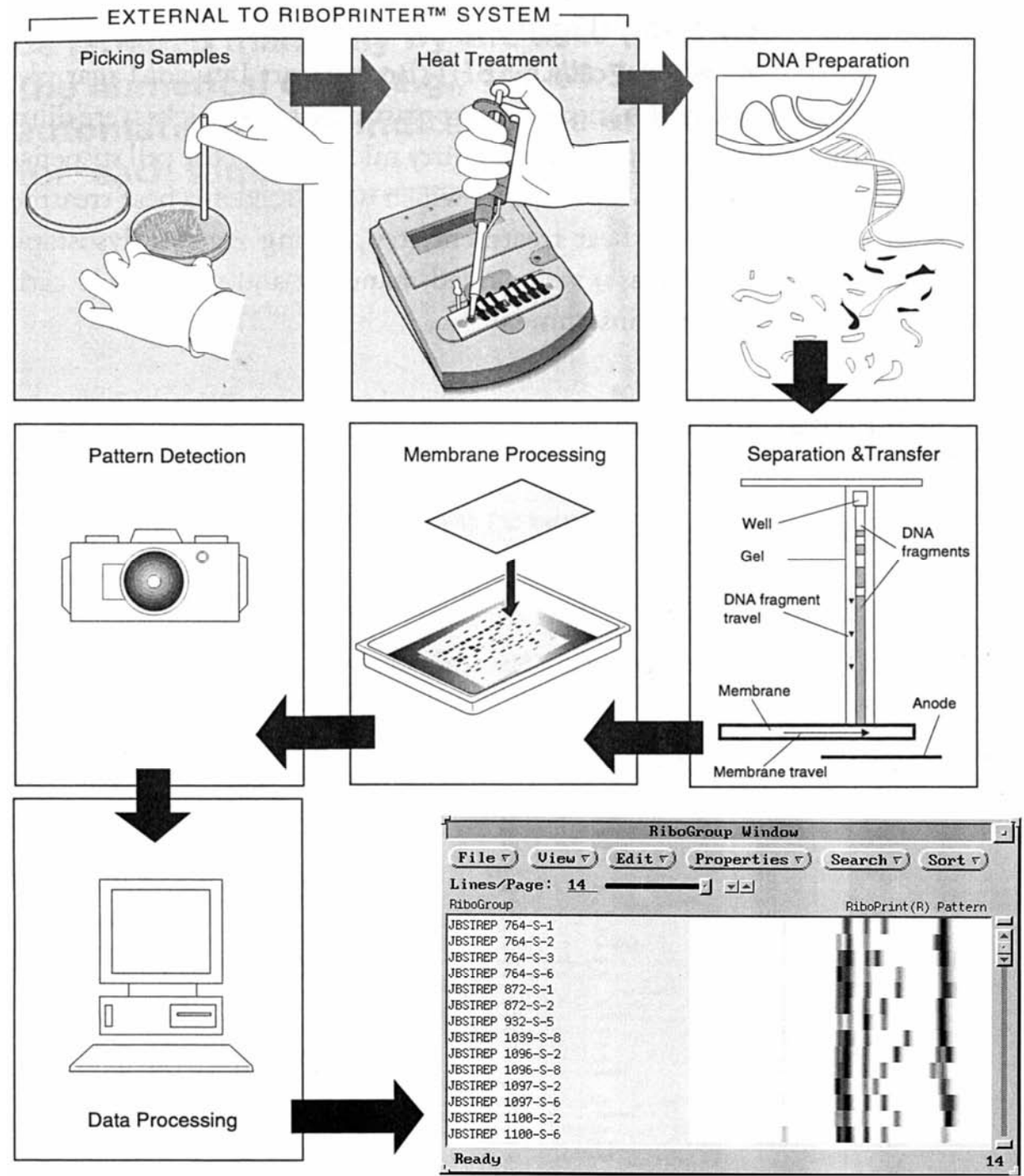
Princip ribotypizace

- Ribotypizace zahrnuje fingerprinting restričních fragmentů genomové DNA, které obsahují celý nebo část genu kódujícího 16S a 23S rRNA.
- Hlavní výhody ribotypizace:
 - Sekvence genů pro ribozomální RNA jsou velice konzervativní, proto pro ribotypizaci všech Eubakterií může být použita jediná sonda.
 - Jelikož většina bakterií obsahuje několik ribozomálních operonů, získáme po hybridizaci dostatečné množství fragmentů umožňující mezidruhové i vnitrodruhové odlišení kmenů.

Automatizace ribotypizace



RiboPrinter™ System Work Flow



Sondy používané pro SRFH u eukaryot

• Jednolokusové sondy

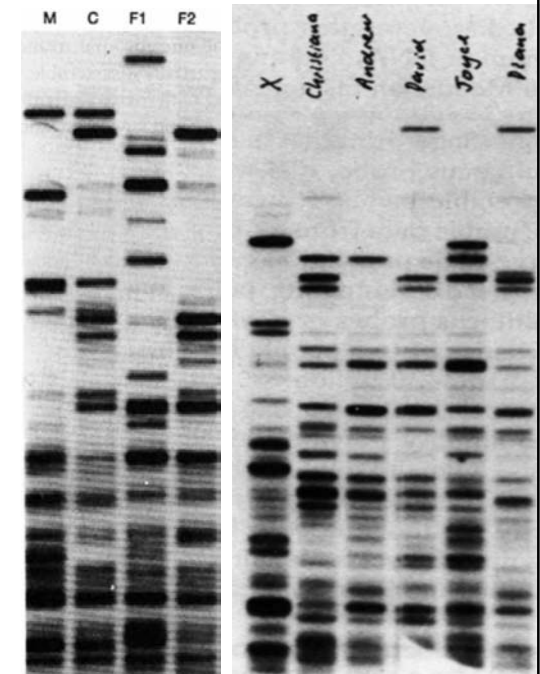
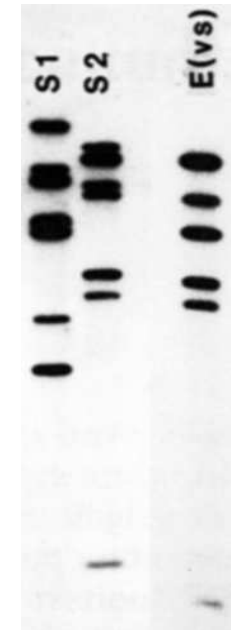
- Hybridizují k jedné hypervariabilní oblasti genomu a vytvářejí vzor o 1-2 proužcích
- Pro identifikační účely se používá směs („koktejl“) jednolokusových sond
- Jsou citlivější a dávají jednodušší obraz než multilokusové sondy
- Pro hybridizaci je třeba min 10 ng DNA

• Mnoholokusové sondy

- Hybridizují k repetitivním sekvencím vyskytujícím se s četností 100 – 1000 v genomu
- Při Southernově hybridizaci se detekuje 20 – 30 proužků
- U člověka se využívá minisatelitů, z nichž 60 má společnou konvenční sekvenci
- Délka repeticí u každé z alel je polymorfní
- Pravděpodobnost, že 2 jedinci budou mít stejnou délku 1 repetice po štěpení restriktázou *HinfI* je 0,25. Pokud uvažujeme 36 detekovatelných lokusů (proužků), je pravděpodobnost výskytu stejného vzoru

$$0,25^{36}=10^{-22}$$

- Nevýhodou je vysoký nárok na množství DNA (250 ng)
- Příklad hybridizace se sondou připravenou z minisatelitu v myoglobinovém genu s konvenční sekvencí GGAGGTGGGCAGGANG



- **Sondy z transponovatelných sekvencí**
 - Transpozony
 - Retrotranspozony
- **Sondy z dlouhých roztroušených elementů (LINEs)**
- **Sondy z krátkých roztroušených elementů (SINEs)**
- **STRs (short tandem repeats)** tetranukleotidové repetice analyzované pomocí multiplex PCR s následným sekvencováním ve 4 lokusech u člověka nahradily od roku 1994 hybridizační metody pro identifikační účely

Interpretace elektroforetických vzorů proužků a konstrukce dendrogramů

- Otisk DNA je výsledkem většiny molekulárních metod.
- Získaný vzor, který je viditelný na obarvených elektroforetických gelech nebo vyvolaných hybridizačních membránách
 - Je specifický pro izoláty určitého klonálního původu
 - Vzorem se rozumí skladba určitých znaků (kvantitativně vyjádřených) jimiž se vyznačuje daný objekt.
 - Znakem je fragment DNA určité velikosti, u kterého se hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost nebo jeho plocha.
- Při DNA-typizaci jedinců získáme velkou množinu dat, kterou je třeba převést do prezentovatelné formy určením tříd nebo skupin.
- K tomuto účelu se využívá **shluková analýza**
 - využívá se k nalezení hierarchického seskupování množin dat s mnoha proměnnými
 - redukuje počet objektů jejich umístěním do skupin

Shluková analýza

1. Metody nehierarchické
 - dávají jednoduché rozdělení, které optimalizuje homogenitu uvnitř skupiny
2. Metody hierarchické
 - členové níže zařazených shluků se stávají členy větších výše zařazených shluků, výsledkem je zobrazení souhrnu jejich hierarchie
 - A. Dělicí
 - Začínají s předpokladem, že všechny objekty jsou částí jednoho shluku
 - Algoritmus štěpí tento velký shluk krok za krokem dokud každý objekt netvoří samostatný shluk
 - B. Aglomerační
 - Na začátku každý shluk obsahuje jeden objekt
 - Shluky jsou postupně spojovány
 - cílem obdržet přímé znázornění příbuznosti mezi objekty
- Výsledek hierarchického shlukování je obvykle zobrazen jako dendrogram, ve kterém jsou zobrazeny následné jednotky shluků společně s hodnotami podobnosti vedoucím k těmto jednotkám

Algoritmus hierarchických aglomeračních metod shlukování

1. Vytvoření množiny dat.
 - Soubor hodnot, které nabývají objekty na základě množství znaků.
2. Transformace dat.
 - Sjednocení jednotek, vyřazení kvalitativně rozdílných znaků.
3. Sestavení matice podobnosti nebo rozdílnosti.
 - Na základě měření podobnosti nebo rozdílnosti každého páru objektů.
4. Shlukování.
 - Výběr vhodného algoritmu, což je v podstatě vztah pro opakovaný výpočet rozdílnosti nebo podobnosti nového shluku s ostatními shluky.
5. Dendrogram.
 - Znázornění postupného shlukování jednotlivých objektů grafickou formou.

Měření podobnosti.

- Při určování podobnosti elektroforetického vzoru (dvou drah proužků) a tím i podobnosti mezi dvěma izoláty se využívají koeficienty podobnosti založené na
 - Přítomnosti nebo absenci proužků
 - denzitometrických hodnotách.
- Koeficienty založené na proužcích

– *Jaccardův koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{n_{i,j}}{n_i + n_j - n_{i,j}}$$

– *Diceho koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{2n_{i,j}}{n_i + n_j}$$

– *Plošně citlivý koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{A_{i,j}}{n_i + n_j + n_{i,j}} \quad A_{i,j} = \sum_{k=1}^{n_{i,j}} \frac{\alpha}{\alpha + |B_{i,k} - B_{j,k}|}$$

$S_{i,j}$ = podobnost mezi i -tou a j -tou řadou proužků

n_i = počet proužků v i -té dráze

n_j = počet proužků v j -té dráze

$n_{i,j}$ = počet odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze

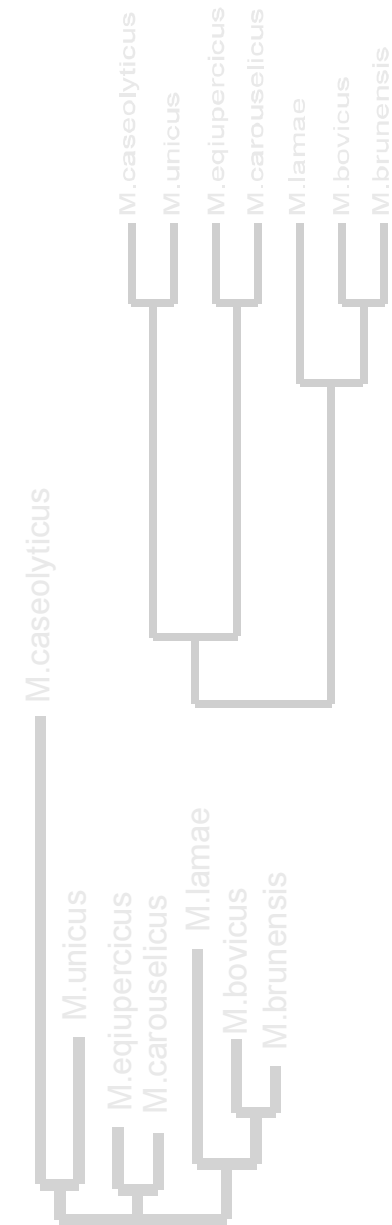
$A_{i,j}$ = hodnota vycházející z počtu odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze, zohledňující rozdíly v plochách odpovídajících si proužků

α = konstanta

$|B_{i,k} - B_{j,k}|$ = absolutní hodnota rozdílu ploch k -tých odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze

Nejčastěji používané metody pro shlukování

- Metoda nevážených průměrů párových skupin (unweighted pair group average method, UPGMA).
 - Shluky jsou spojovány na základě průměrné vzdálenosti mezi všemi členy ve dvou skupinách.
 - Tato metoda se využívá při vyhodnocování otisků DNA (elektroforetických vzorů)
- Jednoduché spojování (neighbour joining, metoda nejbližšího souseda).
 - Shluky jsou spojovány na základě nejmenší vzdálenosti (největší podobnosti) mezi dvěma skupinami.
 - Metoda má použití při sestavování fylogenetických stromů odvozených z porovnávání částečných sekvencí konzervovaných genů, např. 16S a 23S rRNA.

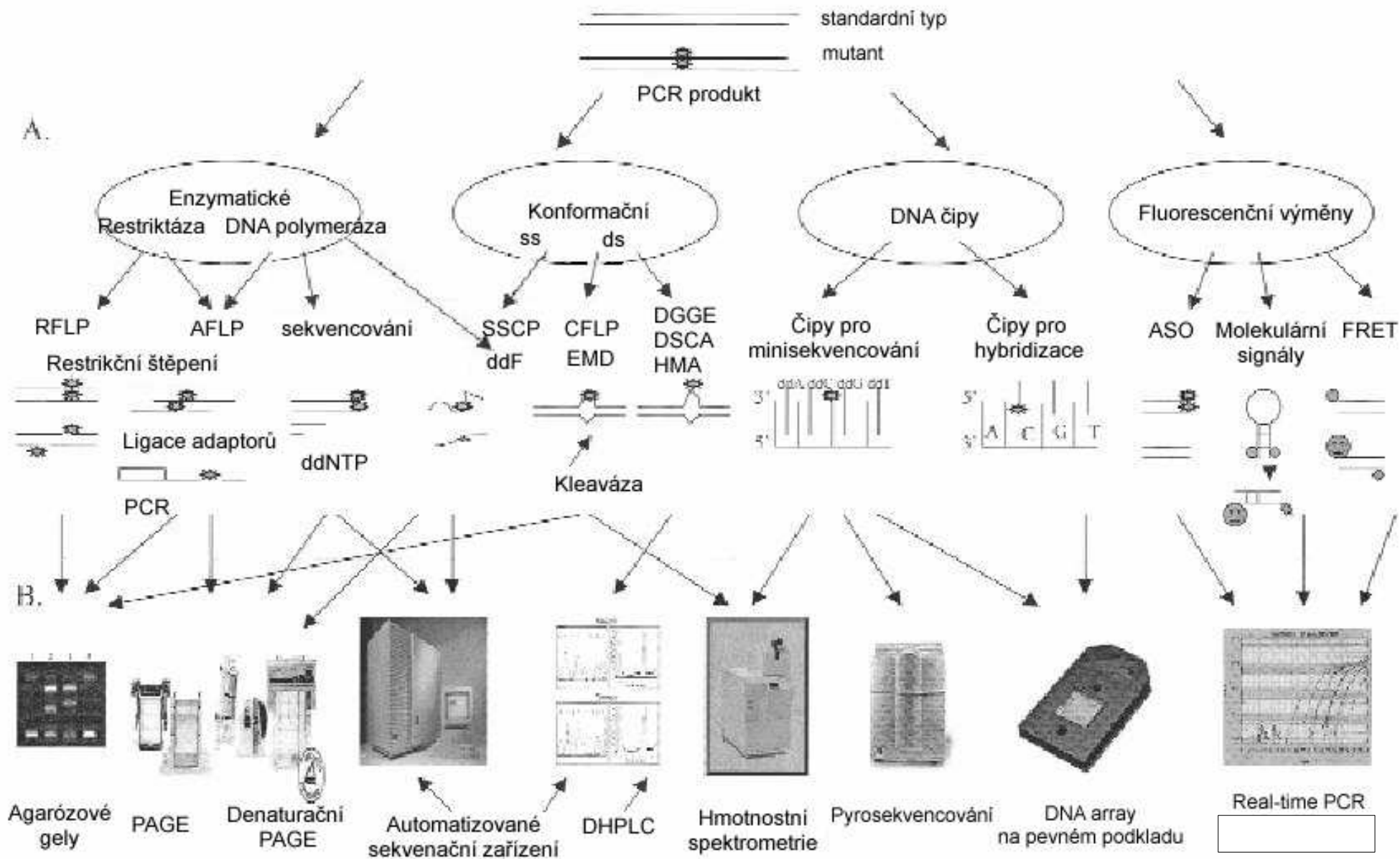


Příklad jednonukleotidových polymorfizmů

Krevní skupina														
A	C	G	T	G	G	T	G	A	C	C	C	C	T	T
B	C	G	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	T	A
0	C	G	T	G	G	T	-	A	C	C	C	C	T	T

- Příklady běžných chorob detekovatelných pomocí SNPs
 - Parkinsonova choroba
 - Alzheimerova choroba
 - Diabetes typu II
 - Crohnova choroba
 - Obezita

Schematické znázornění metod s vysokou rozlišovací schopností pro identifikaci polymorfizmů v genomech



Přehled základních metod

- Enzymatické
 - PCR-RFLP
 - AS-PCR (ARMS)
 - AFLP se specifickými adaptory
 - Ligázová řetězová reakce
 - PCR-OLA
 - Ligace prostřednictvím RCA
 - Sangerovo sekvencování
 - Pyrosekvencování
 - CFLP
- Konformační
 - SSCP
 - PCR-SSCP
 - ddF
 - DGGE
 - DSCP
 - HMA
- Hybridizační
 - ASO
 - FISH
 - PNA-sondy
 - Oligonukleotidové čipy
 - Hybridizace se sondami
 - Minisekvencování
 - Sekvencování hybridizací
- Fluorescenční výměny
 - Kvantitativí PCR s fluorescenčními hybridizačními sondami
 - Molekulární „majáky“
 - FRET
 - Fluorescenční polarizace
- Hmotnostní spektrometrie

Polymorfizmy detekované speciálními elektroforetickými metodami

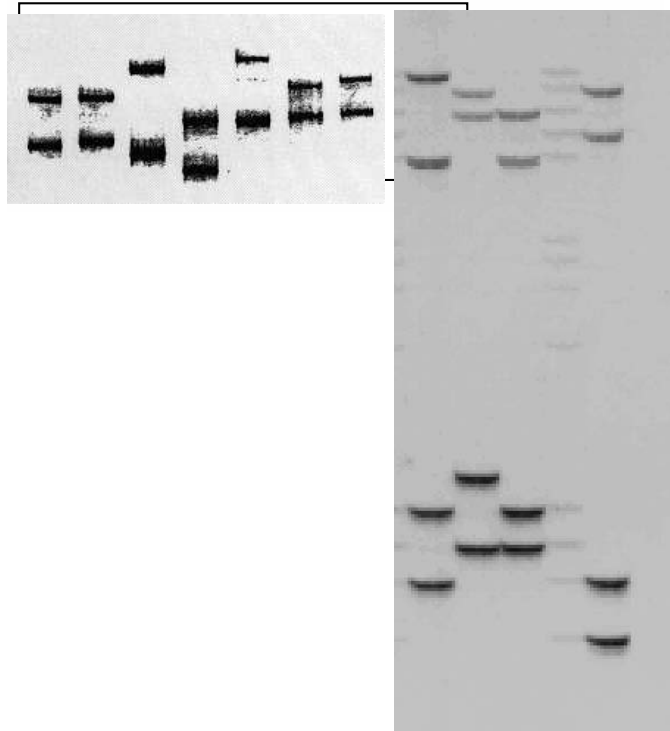
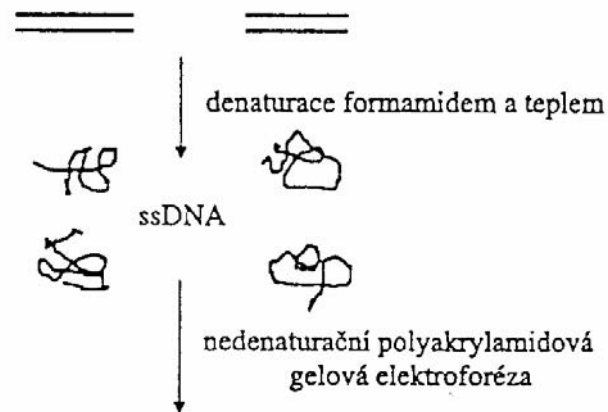
- Odhalení lokálních polymorfizmů v DNA je závislé na použití speciálních elektroforetických
 - Krátké fragmenty DNA o konstantní délce
 - Elektroforetické separace v závislosti na jejich odlišné sekvenci
- Metody jsou vhodné zejména pro srovnání polymorfizmu na úrovni genů, aniž by bylo nutné stanovovat přímo jejich sekvenci.
- Úseky DNA s vhodnou velikostí (100 - 2500 bp) se pro analýzy připravují:
 1. Klonováním
 2. Restrikčním štěpením
 3. Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)
- Výsledky mohou být ovlivněny
 - hustotou a síťováním polyakrylamidového gelu
 - teplotou gelu
 - obsahem přídatných chemických látek v gelu
 - délkou analyzovaného fragmentu
 - lokalizací rozdílných sekvencí na analyzovaných fragmentech

Konformační polymorfismus jednořetězců (Single-Strand Conformation Polymorphism - SSCP)

- SSCP analýza se obvykle používá pro detekci sekvenčních rozdílů mezi různými alelami téhož genu
- Metoda je vhodná pro sledování změn (mutací) na krátkých fragmentech DNA o velikosti 150 - 400 bp
- Metoda využívá vytváření rozdílné sekvenčně specifické intramolekulární struktury ssDNA ovlivňující rychlost pohybu při nedenanaturujících elektroforetických podmínkách
- U delších fragmentů se snižuje diskriminační účinnost a reprodukovatelnost

Princip metody SSCP

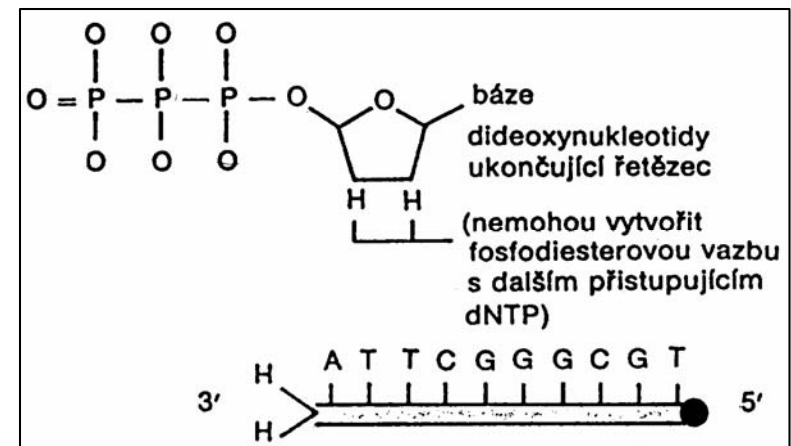
ds DNA (stejná velikost, odlišná sekvence)



- zvýšení účinnosti SSCP se dosahuje různými modifikacemi:
 - RFLP-SSCP
 - přístup kombinující štěpení DNA restriktázami s následnou SSCP
 - vzdálenost polymorfizmu od konce fragmentu
 - Vazbou různých látek ovlivňujících elektroforetickou mobilitu ssDNA
 - RNA-SSCP (je nutno připravit ssRNA transkripcí pomocí T7- nebo SP6-RNA polymerázy)
- SSCP je vhodná pro analýzu mutací v prokaryotických (rDNA), eukaryotických a virových genomech
- Homozygotní DNA vytváří 2 elektroforetické formy
- Heterozygotní DNA obsahující sekvence dvou různých alel vytváří 4 elektroforetické formy

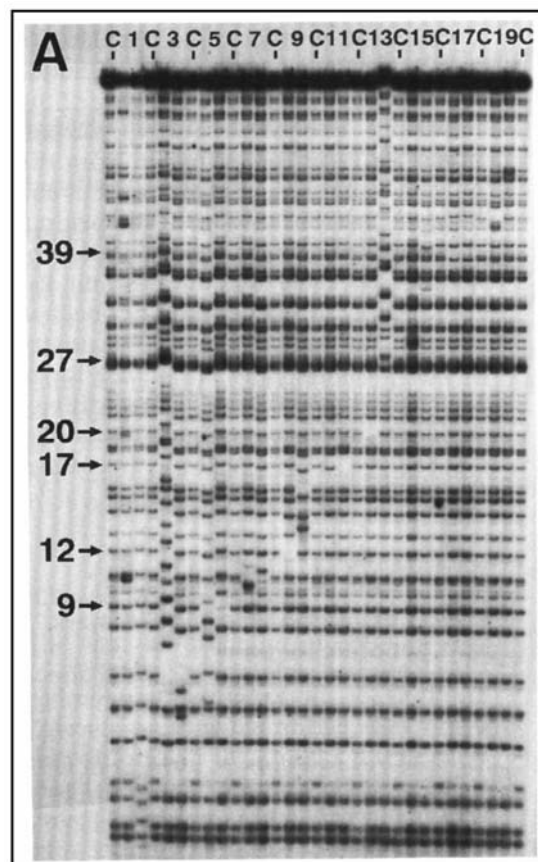
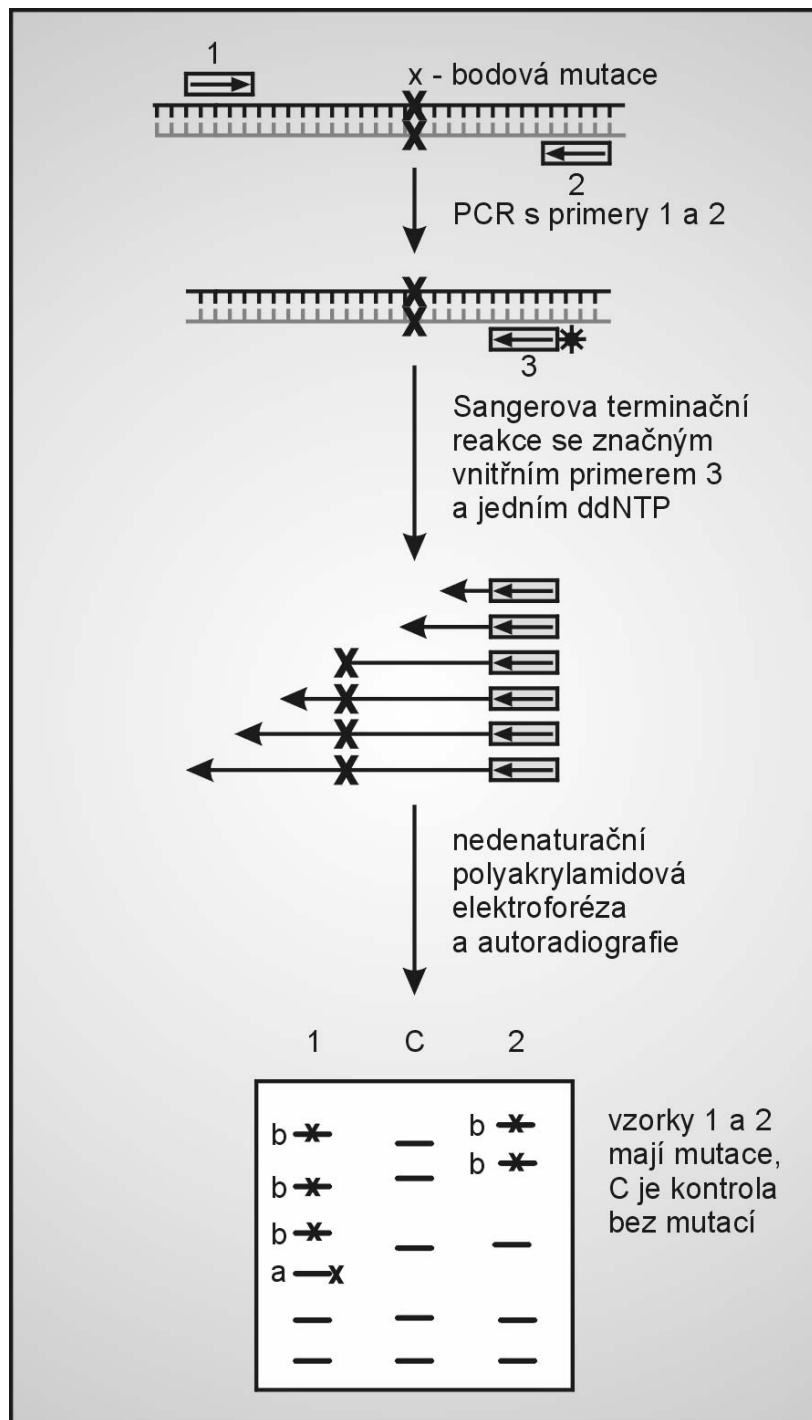
Dideoxy fingerprinting (ddF-SSCP)

- Hybridní diagnostická metoda využívající dva metodické přístupy:
 - Sangerovo sekvencování, reakce je na rozdíl od klasického sekvencování prováděna pouze s jedním dideoxy terminátorem.
 - SSCP



- Používá se zejména k detekci mutací u eukaryotických genů.
- Mutace jsou detekovány jako výsledek ztráty nebo získání dideoxy-terminačního segmentu nebo na základě rozdílné elektroforetické mobility u alespoň jednoho z dideoxy-terminačních segmentů.

Princip ddF

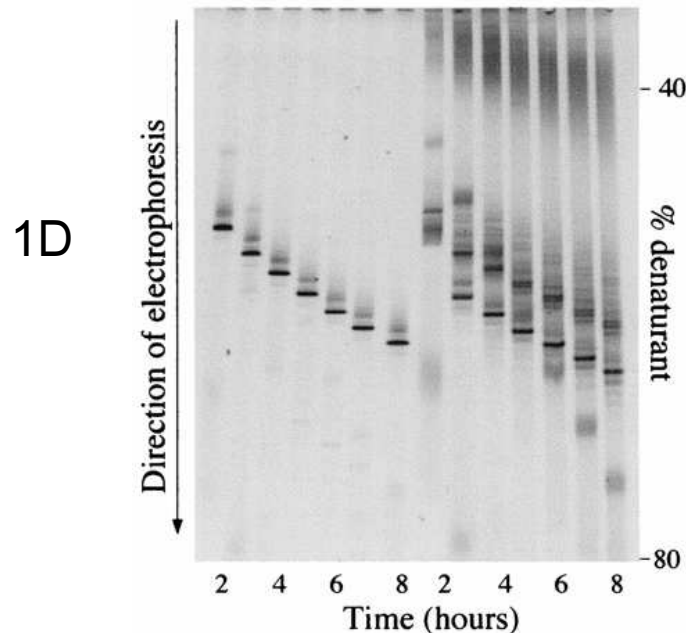


Denaturační gradientová gelová elektroforéza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)

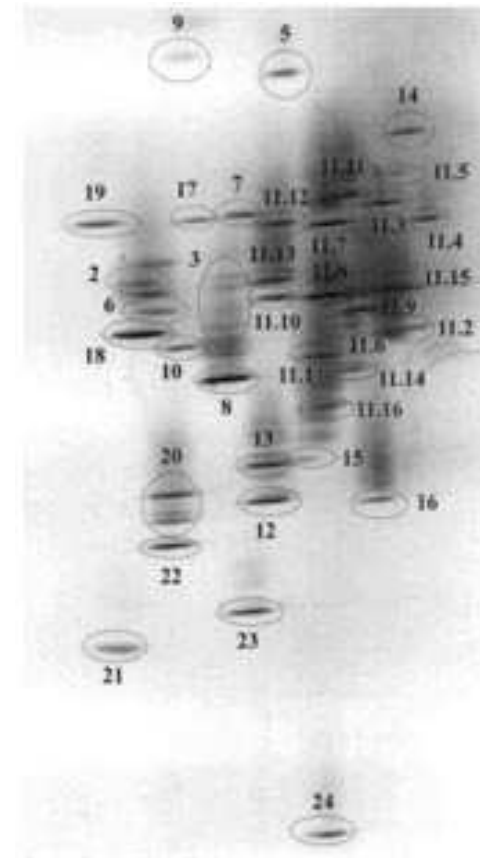
- Metoda využívá rozdílné elektroforetické mobility u částečně denaturované DNA a DNA v nedenaturovaném stavu
- Vzorky o velikosti 150 - 1200 bp se analyzují v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem zajištěným
 - postupně vzrůstající teplotou (TGGE)
 - vzrůstající koncentrací denaturačního činidla
 - formamidu
 - močoviny
- dsDNA se pohybuje během elektroforézy v závislosti na její velikosti a pozvolně denaturuje
 - na začátku elektroforézy není patrný žádný rozdíl v elektroforetické mobilitě
 - po určité době denaturace ovlivní rychlost elektroforetické migrace (zpomalení vzhledem k dsDNA)
 - elektroforéza sama umožní odlišit sekvenční polymorfismus na základě odlišné hodnoty T_m srovnávaných vzorků
- Zvýšení rozlišovací schopnosti dosáhneme
 - připojením GC-svorek na konce analyzovaných fragmentů
 - zamezíme tím úplné denaturaci až do jednořetězcových forem a zvýšíme
 - provedením 2-D (dvojrozměrné) DGGE

DGGE je vhodná pro

- analýzu mutací v eukaryotických genech
- diagnostiku dědičných chorob
- analýzu mutací v prokaryotických genech
 - charakterizaci bakteriálních populací na základě DGGE 16S rDNA



2D TGGE



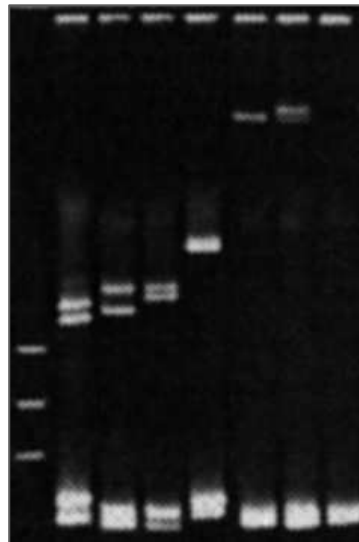
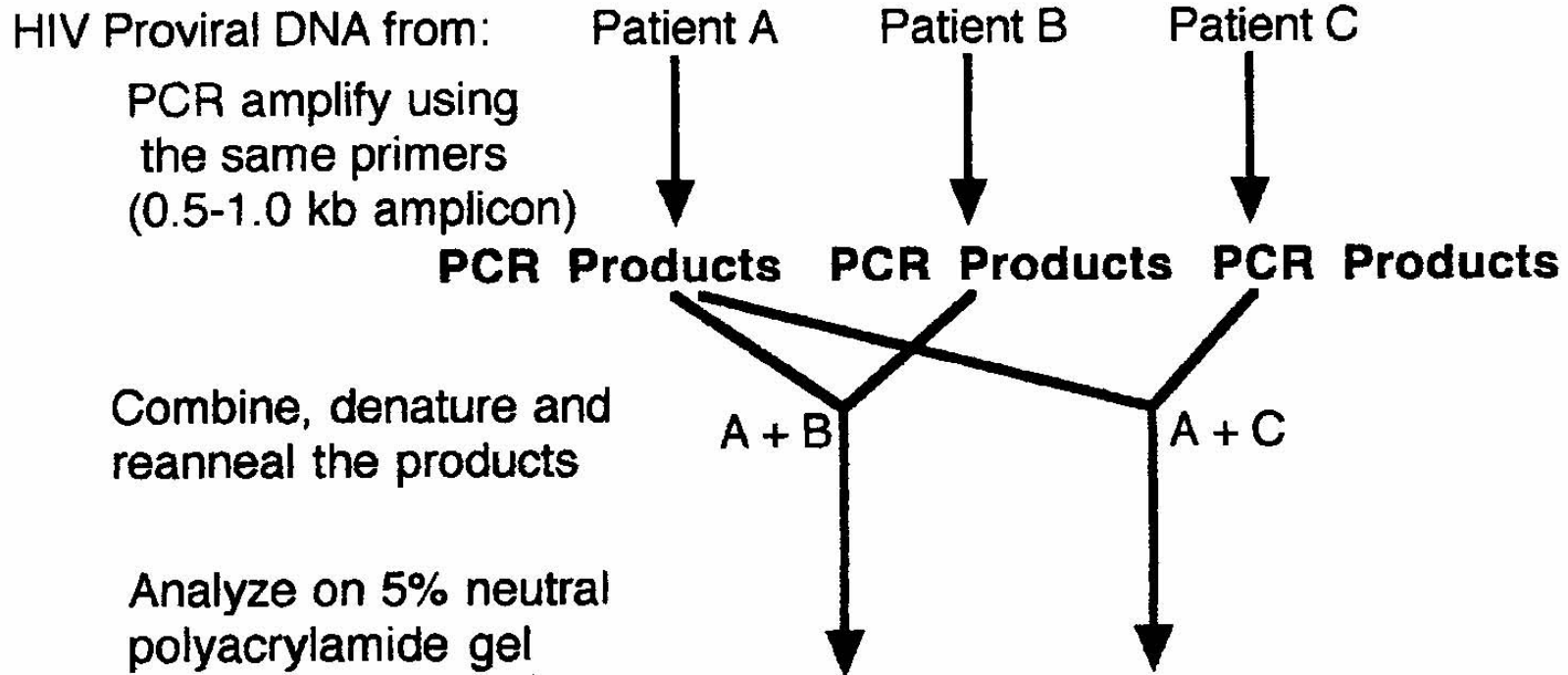
Analýza konformace dvouřetězcové DNA (Double Strand Conformation Analysis - DSCA)

- Diagnostická metoda, která využívá rozdílných ohybů v dsDNA (double strand conformation polymorphism - DSCP) ovlivňujících elektroforetickou pohyblivost při nedenedaturujících elektroforetických podmínkách v polyakrylamidovém gelu a umožňuje tak rozlišit DNA-řetězce s různou sekvencí.
- Metoda využívá předpokladu, že dsDNA ve vodném roztoku zaujímá složitou konformaci s vnitřním zakřivením, které závisí na nukleotidové sekvenci
- Zakřivení DNA se může přímo vztahovat ke tření, které fragment dsDNA překonává při elektroforéze v porézních gelech
- Substituce páru bází v kritickém místě dsDNA fragmentu vede ke změně vinutí a může zásadně ovlivnit elektroforetickou mobilitu během nedenedurační polyakrylamidové gelové elektroforézy s vysokou rozlišovací schopností
- Využívá se k detekci bodových mutací v eukaryotických genech (fragmenty o délce 100-500 bp)

Heteroduplexní analýza, analýza pohyblivosti heteroduplexů (Heteroduplex Mobility Assay – HMA)

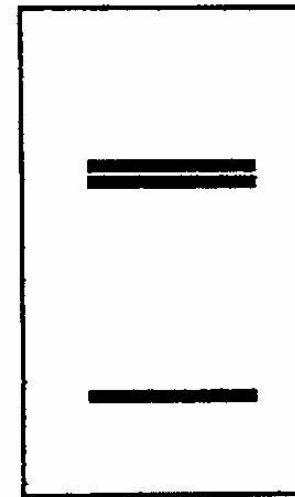
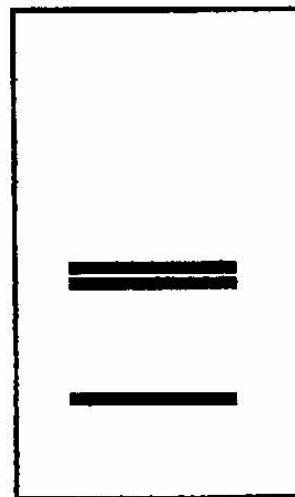
- Diagnostická metoda, která využívá rozdílné elektroforetické pohyblivosti heteroduplexů. Používá se k lokalizaci a detekci bodových mutací v eukaryotických a virových genomech.
- **homoduplex** (homoduplex). Hybridní molekula DNA, jejíž řetězce se vyznačují úplnou komplementaritou.
- **heteroduplex** (heteroduplex). Hybridní molekula DNA vyznačující se neúplnou komplementaritou.

Analýza elektroforetické pohyblivosti heteroduplexů



Heteroduplexes

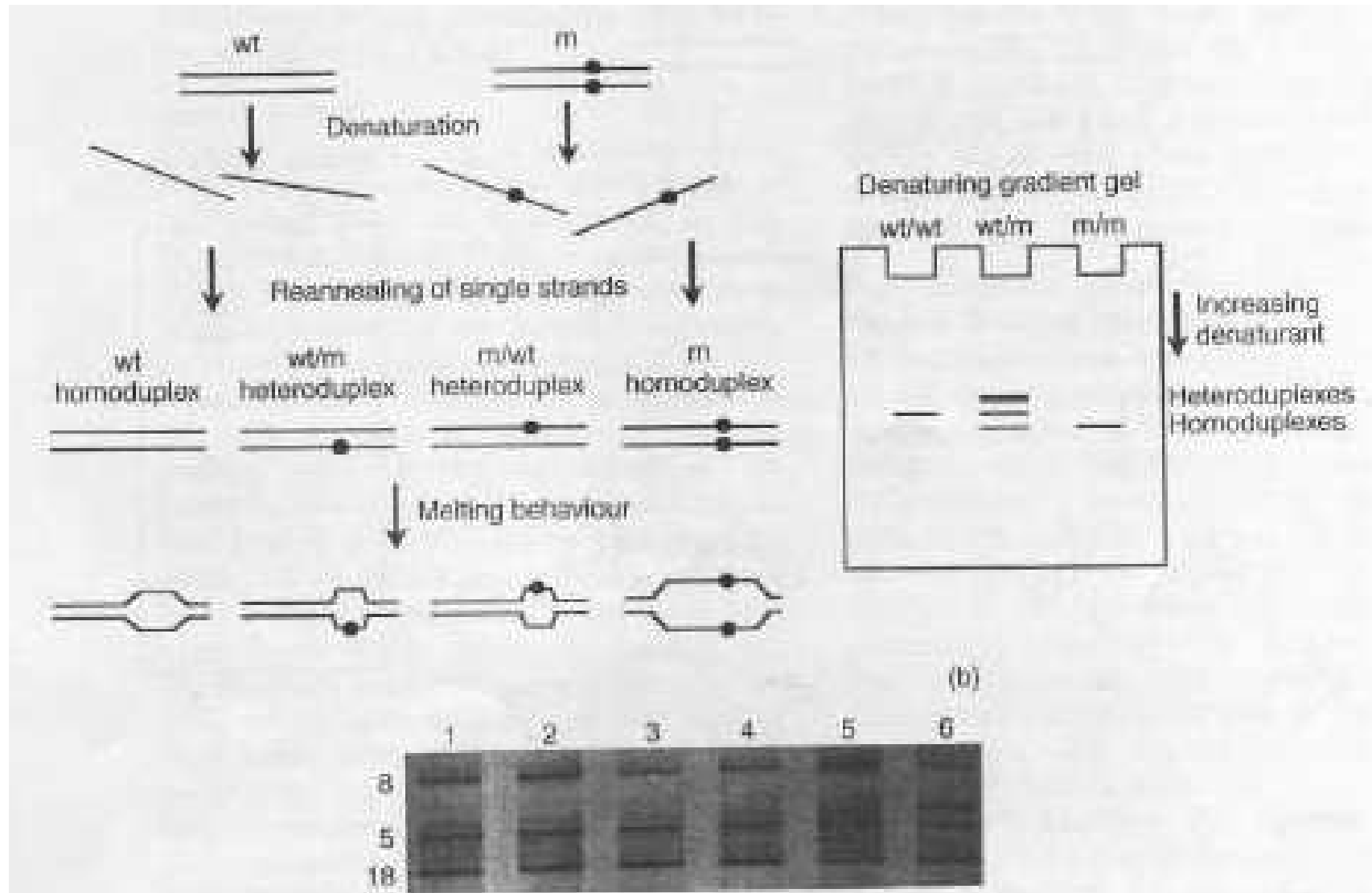
Homoduplex



Heteroduplexes

Homoduplex

Princip metody DGGE heteroduplexů



Polymorfismus délky fragmentů vytvořených štěpením enzymem Cleavase (Cleavase Fragment Length Polymorphisms - CFLP)

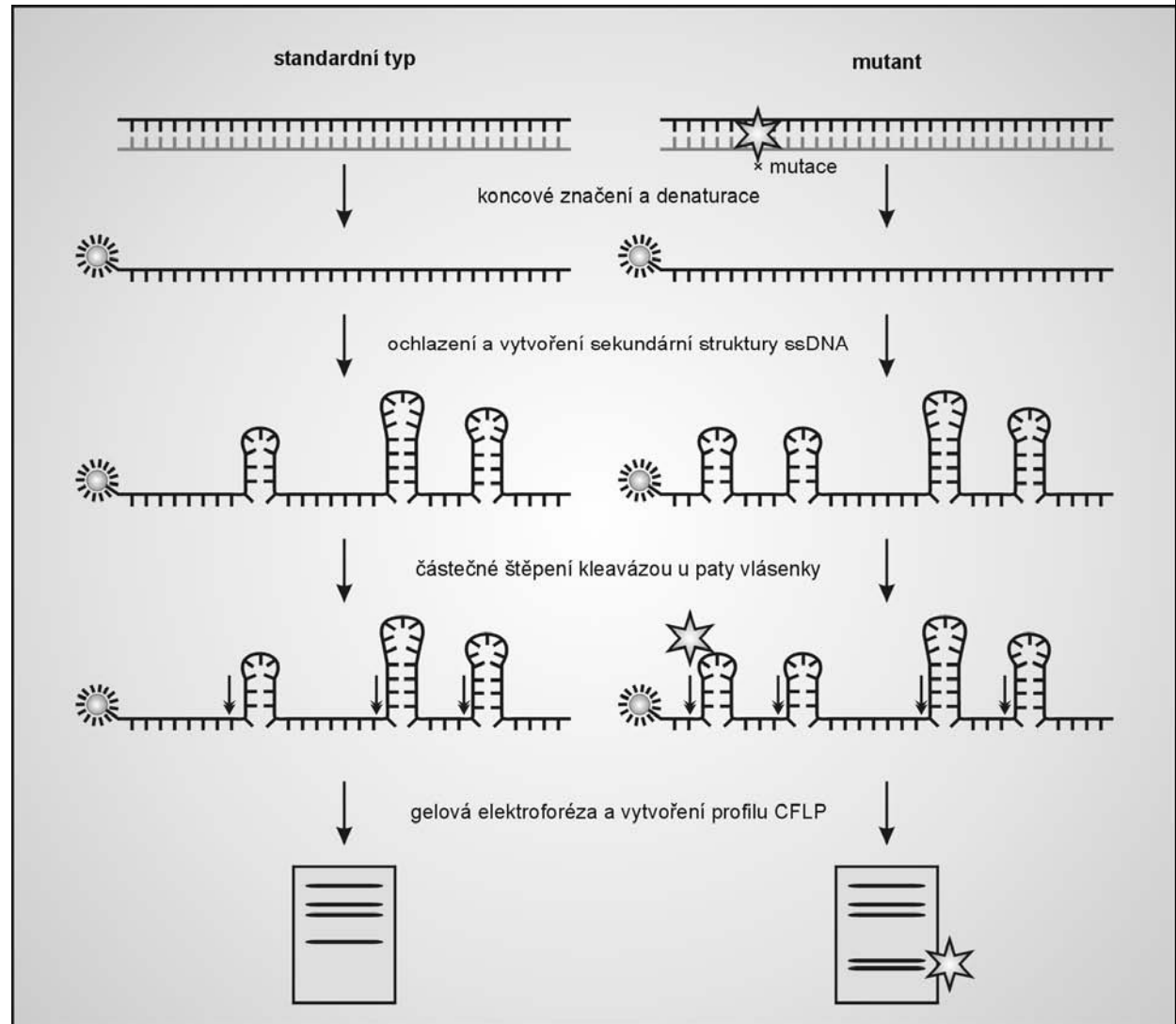
- Diagnostická metoda, která využívá enzymu klevázy k detekci a lokalizaci polymorfizmů v jednořetězcové DNA
- Optimální velikost fragmentů pro tuto analýzu je do 2700 bp.
- ssDNA vytváří různé sekundární struktury (vlásenky, vlásenky se smyčkou, křížové struktury) v závislosti na primární struktuře.
- Cleavase je specifická endonukleáza, jejíž cílové místo se nachází vždy u paty vytvořené vlásenky na molekule ssDNA.
- Enzym nepůsobí na všechny vlásenky (pravděpodobně v závislosti na dalších faktorech ovlivněných strukturou ssDNA).
- Mutace (bodové, delece, inserce) a modifikace v nukleotidových sekvencích ovlivňují sekundární strukturu ssDNA a konečným výsledkem se vytvoření rozdílných míst rozpoznávaných enzymem.

CFLP

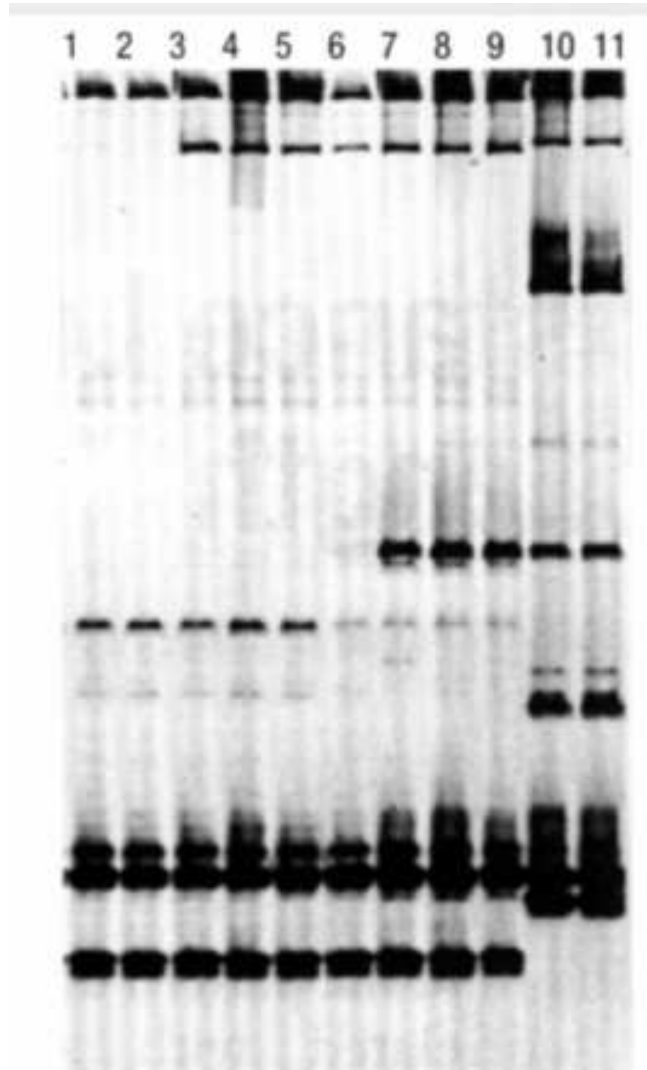
- Po stěpení enzymem Cleavase vzniká spektrum fragmentů charakteristické pro danou molekulu
- Separaci fragmentů provádíme na krátkém denaturačním polyakrylamidovém gelu
- Metoda CFLP je metodou porovnávací tvorbu vlásenek v jednotlivých jednořetězcích, ale z obecného hlediska je polymorfismus CFLP analogický s RFLP.
- Metoda byla použita na
 - odlišení bakteriálních patogenů
 - detekci mutací u rychle mutujících virů
 - detekci mutací v genech pro rezistenci u bakterií
 - detekci mutací v eukaryotických genech (např. gen pro p53)

Schematický postup CFLP

1. Příprava koncově značené dsDNA (na obrázku je znázorněno *)
2. Teplotní denaturace DNA
3. Ochlazení DNA a vytvoření vlásenek
4. Částečné štěpení
Cleavase I (na obrázku znázorněno ↓)
5. Elektroforéza v denaturačním polyakrylamidovém gelu
 - (pouze koncově značené DNA jsou detekovány)



Příklad polymorfizmu CFLP u 16S rDNA různých bakteriálních druhů



Diagnostické amplifikační metody nevyužívající PCR

Amplifikační metody umožňují detekovat jedinou kopii cílové DNA, zatímco při hybridizačních metodách musí být k dispozici minimálně 10^4 - 10^5 kopií DNA, aby bylo možné při detekci získat signál.

Přehled metod používaných pro amplifikaci nukleových kyselin

Amplifikační metoda	Používané enzymy	Rok publikace
<i>Amplifikace specifické sekvence</i>		
• PCR (polymerázová řetězová reakce) a její modifikace	termofilní DNA polymeráza (<i>Taq, Tth, Tma</i>)	1986
• TAS (amplifikace pomocí transkripce)	zpětná transkriptáza, RNA polymeráza	1989
• 3SR (amplifikace pomocí transkripce)	zpětná transkriptáza, RNáza H, RNA polymeráza	1990
• SDA (amplifikace vytěsňováním řetězce)	restrikční endonukleáza, DNA polymeráza (bez 3'→5' exonukleázové aktivity)	1992
<i>Amplifikace sondy</i>		
• LAR (ligázová amplifikační reakce)	DNA ligáza	1989
• LCR (ligázová řetězová reakce)	termofilní DNA ligáza	1991
• reakce s Q β -replikázou	Q β -replikáza	1988

Amplifikační systémy založené na transkripci (TAS a 3SR)

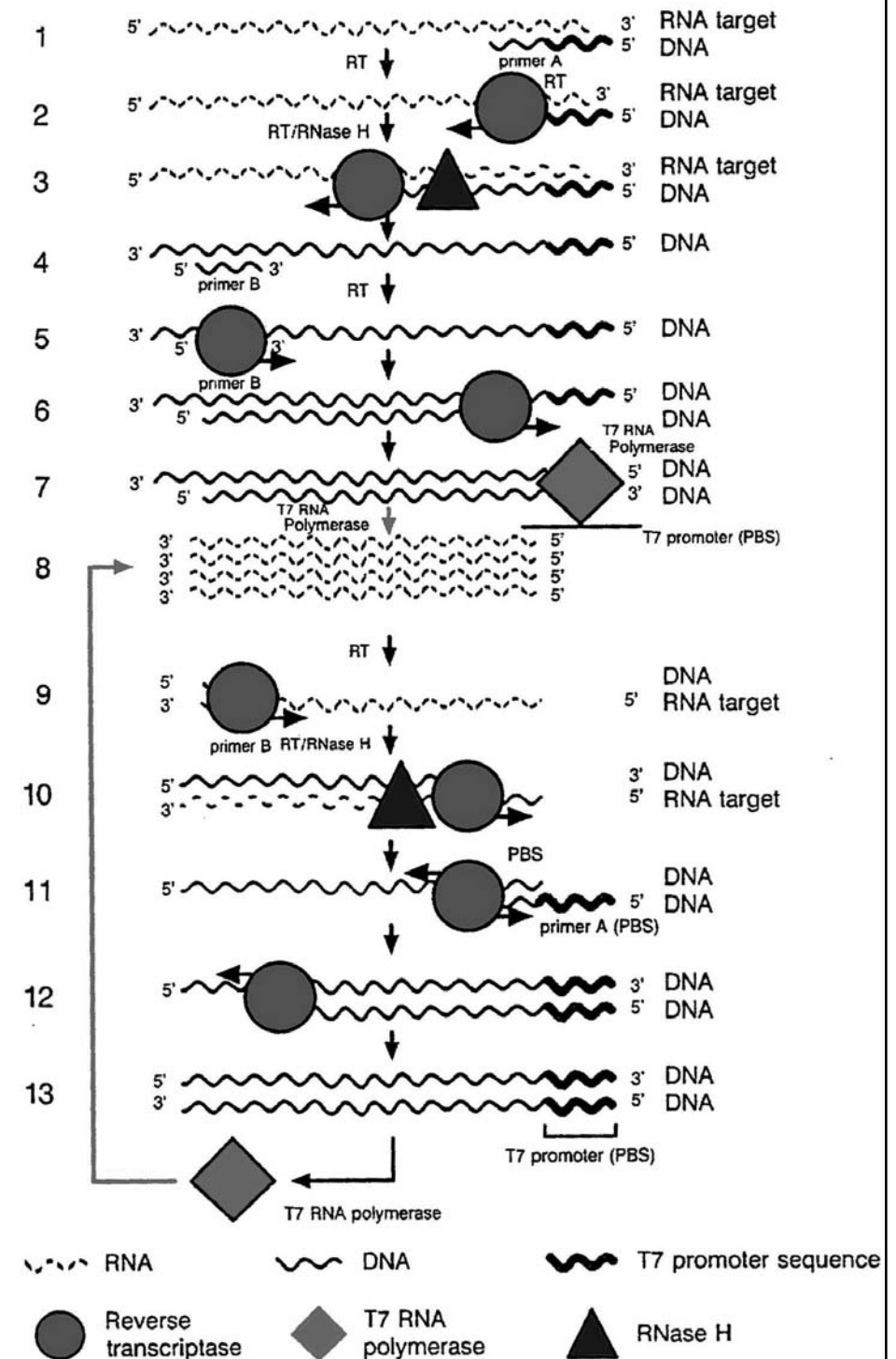
- **Transcription-based Amplification System:** metoda využívá pro amplifikaci nukleových kyselin transkripci *in vitro*.
- Každý cyklus TAS se skládá ze dvou částí:
 - syntéza molekuly DNA, která je komplementární k cílové nukleové kyselině (RNA nebo ssDNA)
 - transkripce nově syntetizované cDNA, která slouží jako intermediát a templát pro RNA polymerázu *in vitro*.
- Syntéza cDNA je umožněna připojením speciálně navržených primerů:
 - oblast primeru směrem ke 3'-konci je komplementární k cílové DNA
 - oblast primeru směrem k 5'-konci tvoří specifická sekvence obsahující promotor pro T7 RNA polymerázu.

Amplifikační systémy založené na transkripci (TAS a 3SR)

- V prvním kroku je po připojení primeru pro každou cílovou RNA nebo ssDNA syntetizována molekula ssDNA pomocí zpětné transkriptázy.
- Syntéza druhého řetězce vyžaduje tepelnou denaturaci *RNA-DNA nebo DNA-DNA hybridních molekul.
- Po přidání druhého primeru a opět zpětné transkriptázy, probíhá syntéza druhého řetězce. Výsledná kopie dsDNA obsahuje funkční T7 promotor na jednom nebo obou koncích cDNA.
- Po přidání T7 RNA polymerázy dochází k transkripci cDNA a z každého templátu vzniká až 40 molekul RNA (toto je amplifikační krok).

TAS a 3SR

- Nové molekuly RNA tvoří substrát pro další cyklus TAS. Po několikanásobném opakování cyklu získáme několik miliónů kopií.
- * proces tepelné denaturace RNA-DNA duplexů může být nahrazen enzymatickým odstraněním RNA pomocí **RNázy H**. Takto modifikovaná amplifikační technika je isotermní (nevyžaduje změny inkubační teploty a přidávání zpětné transkriptázy při dalším cyklu). Proces se nazývá **Self-Sustaining Sequence Replication (3SR)** nebo **Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)**.
- Aplikace a použití:
 - detekce lidského papilomaviru
 - detekce rezistence k azidotymidinu u HIV
 - detekce *Chlamydia trachomatis*
 - detekce *Mycobacterium tuberculosis*



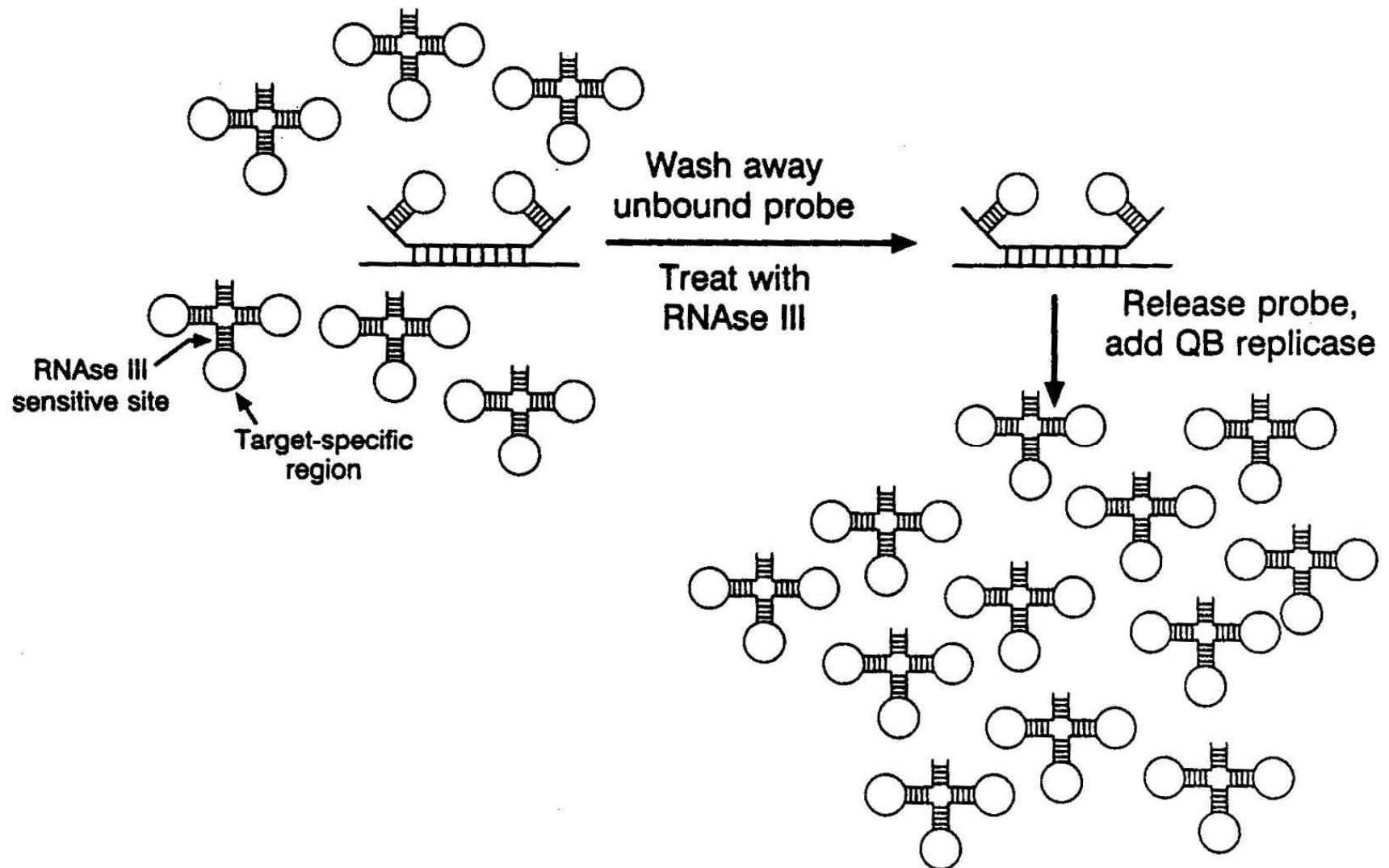
Skupina metod pro amplifikaci molekuly navázané sondy

Alternativní metody pro detekci
nízkého počtu molekul cílové
sekvence využívající amplifikaci
samotné sondy po vazbě na cílovou
sekvenci.

Amplifikace RNA-sondy pomocí Q β -replikázy

- Q β -replikáza je **RNA-dependentní RNA polymeráza**, která replikuje genomovou RNA bakteriofága Q β (*Leviviridae*). Enzym rozpoznává specifickou **sekundární strukturu RNA** tvořenou párováním bazí uvnitř molekuly bakteriofágové RNA. Jiné sekundární struktury RNA nejsou enzymem rozpoznávány.
- Sonda se připravuje transkripcí *in vitro*. Pro konstrukci sondy, která je schopná replikace se využívá:
 - **predikce sekundární struktury RNA** podobné standardní struktuře v genomu bakteriofága
 - sonda nese navíc ve smyčce s vlásenkou na 3' nebo 5' konci **sekvenci specifickou pro cílovou molekulu**.
- Po provedení hybridizace se volná sonda se odstraní RNázou III (u navázané sondy chybí rozpoznávací místo pro RNázu III v důsledku změny sekundární struktury po vazbě na cíl).
- Systém s Q β -replikázou byl vyvinut za účelem zesílení hybridizačních signálů amplifikací samotné sondy.
- Využívá se pro detekci obtížně kultivovatelných mikroorganismů, např. *Chlamydia trachomatis*.

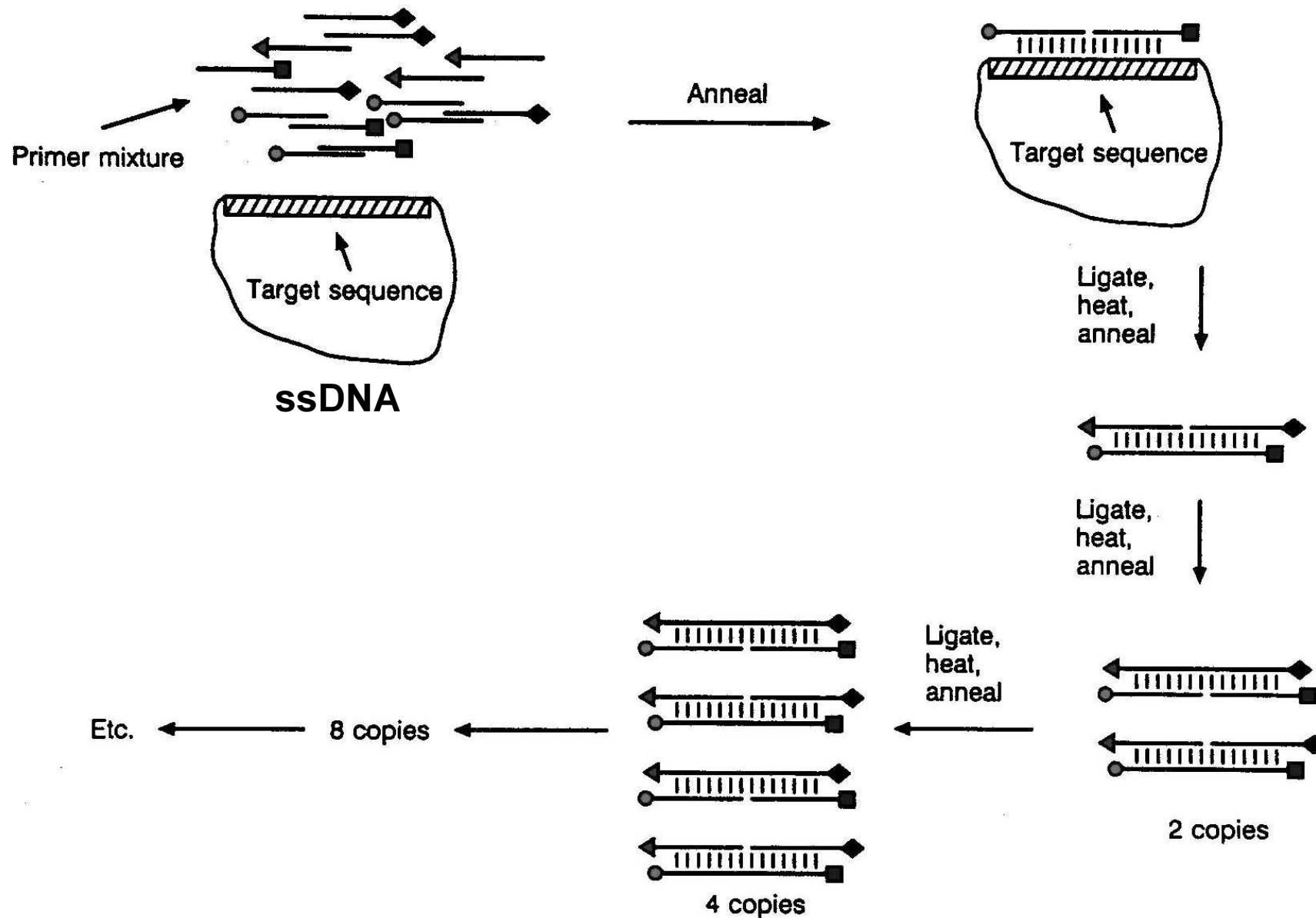
Amplifikace sondy Q β -replikázou



Ligázová řetězová reakce (Ligase chain reaction - LCR)

- **Amplifikace cílové sekvence pomocí ligázy** je alternativní metoda pro amplifikaci **oligonukleotidové sondy** navázané na cílovou sekvenci využívající **DNA ligázu**.
- Při LCR se nevytváří nové kopie cílové sekvence, proto se řadí do skupiny **metod pro amplifikaci sondy**.
- Metoda využívá DNA ligázu ke **spojení dvou párů komplementárních oligonukleotidových sond po jejich připojení na cílovou sekvenci**.
 - Úspěšná ligace proběhne pouze při dokonalém párování 3' a 5' konců obou oligonukleotidových sond k cílové molekule.
- Po proběhnutí první úspěšné ligace vzniká produkt, který **napodobuje původní molekulu** a slouží jako templát pro připojení zbývajících dvojice oligonukleotidů a jejich ligaci.
- Nevýhodou **ligázové amplifikační reakce (LAR)** je teplotní nestabilita DNA ligázy a nutnost přidávat ligázu po každé denaturaci.
 - V současnosti sepoužívá **ternostabilní DNA ligáza** z *Thermus aquaticus*, která je stabilní po mnoha cyklech denaturace (LCR).

Ligázová řetězová reakce (LCR)



Použití LCR

- pro detekci obtížně kultivovatelných patogenů
 - *Neisseria gonorrhoeae*
 - *Borrelia burgdorferi*
 - *Mycobacterium* sp.
- pro detekci mutací v lidských genech (dědičná onemocnění)

Oligonukleotidové ligační stanovení (OLA)

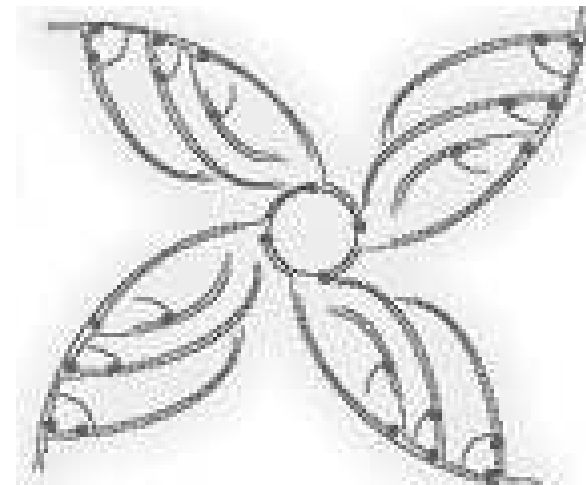
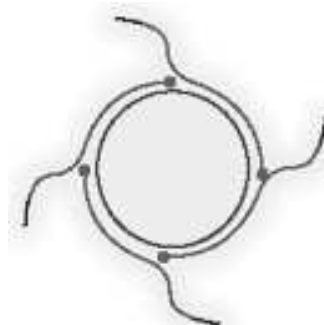
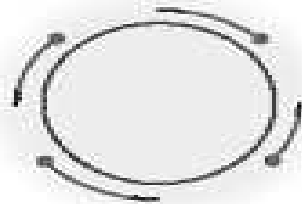
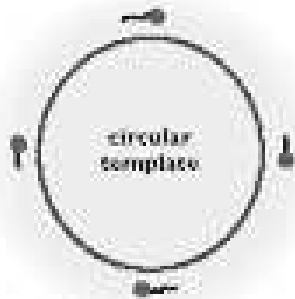
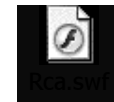
- Modifikace LCR využívající pouze jedné dvojice sousedících oligonukleotidů může být kvantitativní metodou
 - ligázová detekční reakce (LDR)
 - oligonukleotidové ligační stanovení (OLA)
- Lineární kinetika amplifikace
- Ve spojení s analýzou produktů PCR, kde se dá očekávat dostatečné množství templátu, je OLA používáno jako účinný detekční systém bodových mutací (PCR-OLA).
- Tento přístup nevyžaduje průkaz amplifikovaného produktu na elektroforéze
 - využívá 5'-koncového značení první oligonukleotidové sondy afinitní značkou - biotinem a opačného konce druhé sondy reportérskou značkou (např. fluorescenční látka, digoxigenin nebo alkalická fosfatáza).
 - Pouze po ligaci jsou obě značky nesený jednou molekulou.
 - Po ligázové reakci jsou produkty zachyceny na afinitní matici se streptavidinem a nezligované reportérské sondy jsou odmyty.
 - Navázaný materiál je měřen na základě
 - fluorescence,
 - barevné reakce
 - enzymatické aktivity
 - FRET
 - může se stát v budoucnu rozšířenou automatizovanou metodou využívající DNA-čipy pro detekci nízkokopiových cílů a změn v nukleotidových bázích

Amplifikace otáčivou kružnicí - RCA (Rolling Circle Amplification)

- Metoda amplifikace sondy navržená pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů přímo v genomové DNA.
- Pro každý polymorfizmus je navržena alelově specifická sonda, kterou tvoří oligonukleotid dlouhý 80 až 90 bází.
 - Fosforylovaný 5'-konec sondy nese přibližně 20 nukleotidů, které hybridizují k oblasti bezprostředně vedle 5' polymorfního místa.
 - 3'-konec sondy obsahuje 10 až 20 nukleotidů, komplementárních k oblasti bezprostředně vedle 3' polymorfního místa.
- Používané alelově-specifické sondy jsou identické s výjimkou báze na 3'-konci, která se liší tak aby byla komplementární k polymorfnímu místu.
- První krok RCA zahrnuje
 - společnou hybridizaci obou konců sondy s cílovou sekvencí (vytvoření otevřené kružnice)
 - diskriminační ligaci sondy termostabilní ligázou, jejímž výsledkem je kružnicová ssDNA.
 - Ligační krok proběhne pouze v případě, že se 3'-konec sondy páruje s polymorfním místem.
- Mezi koncovými rameny sondy, která jsou cílově specifická pro detekovanou sekvenci jsou vtěsnaná vazebná místa pro RCA-primery.
- Druhý krok RCA zahrnuje
 - hybridizaci RCA-primerů, případně náhodných hexanukleotidů na cirkularizovanou sondu
 - izotermní replikaci otáčivou kružnicí v přítomnosti DNA-polymerázy vytěsňující řetězce (např. DNA-polymeráza fága 29)
 - Prodlužující se řetězce jsou vytěsňovány a tvoří jednořetězcové konkatemery původní sondy, na které se mohou vázat další RCA-primery a vytvořit složité replikativní struktury

RCA v homogenním roztoku

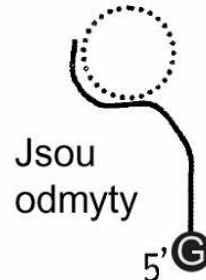
- Ligáza katalyzuje ligaci sondy ve formě otevřené kružnice, která přesně svými 3'- a 5'-konci hybridizuje k místu se SNP
- Hybridizace náhodných hexanukleotidů
- Replikace otáčivou kružnicí pomocí DNA-polymerázy fága 29
- Vznikne až 10^9 kopií sekvence



Stanovení SNP pomocí DNA čipu a RCA

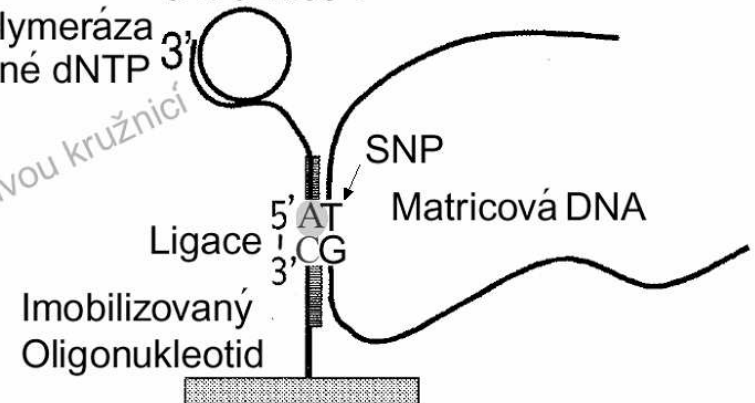
- Metoda pracuje na principu amplifikace signálu na DNA-čipu
- Studovaná cílová molekula DNA je denaturována
- Při hybridizaci k cílové sekvenci ligáza katalyzuje spojení dvou oligonukleotidových sond z nichž jedna je imobilizovaná na pevném podkladu čipu
- Ligace nastane pouze tehdy jestliže je 5' báze v místě SNP přesně komplementární k cílové DNA (je 500× efektivnější než při nehomologickém páru)
- Rozdíly v sekvenci na 5'-konci poskytují možnost specificky a simultánně detekovat jednotlivé varianty SNP
- ϕ 29 DNA-polymeráza katalyzuje izotermní replikaci formou otáčivé kružnice, inkorporuje značené nukleotidy a rostoucí řetězec je vytěsňován

Alelově specifický oligo 2
a kružnice 2



DNA-polymeráza
+ značené dNTP

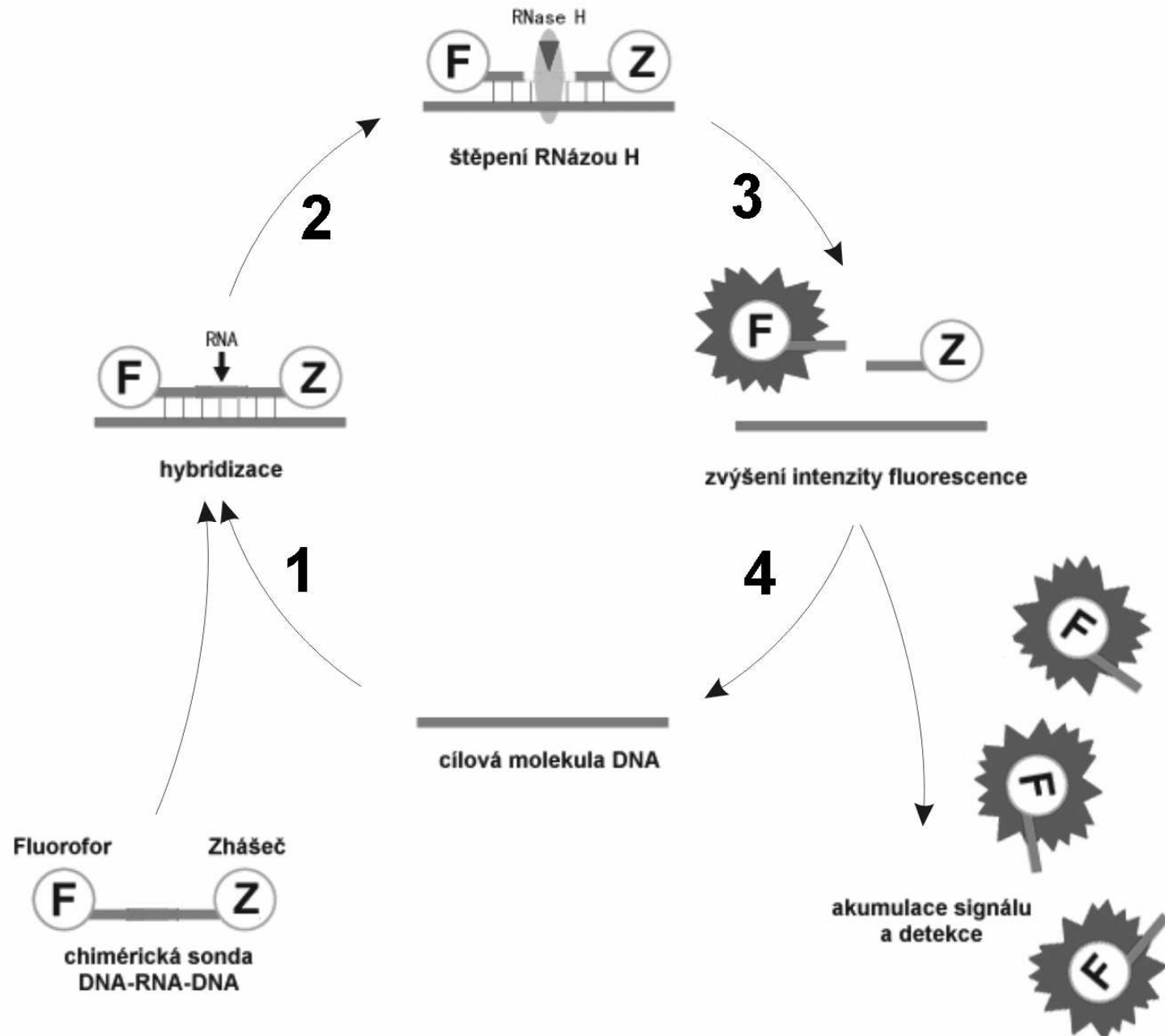
Alelově specifický oligo 1
a kružnice 1



Technologie cirkulující sondy – Cycling Probe Technology (CPT)

- CPT využívá hybridizaci cílové sekvence DNA (může být použit i amplifikovaný produkt PCR) s chimérickou na obou koncích fluorescenčně značenou DNA-RNA-DNA sondou
- Sonda po navázání na komplementární sekvenci poskytuje vytvoření štěpitelného místa pro RNázu H.
- Reakce probíhá za specifické konstantní teploty, která umožňuje jak hybridizaci sondy, tak zachování templátové DNA v jednořetězcovém stavu.
- Vytvořený duplex chimérické sondy a cílové sekvence je rozpoznán RNázou H a RNA-sekvence sondy je degradována.
- Rozštěpené fragmenty sondy nemají v cílovém místě při reakční teplotě stabilní vazbu a disociují do prostředí.
- Uvolněná fluorescenčně značená část sondy emituje fluorescenci, jejíž intenzita je měřena.
- Cílové místo je potom volné, hybridizuje s další sondou a celý cyklus se opakuje
- Fragmenty sondy se akumulují lineární kinetikou a slouží jako základ pro detekci a kvantifikaci cílové sekvence.
- Výhodou oproti PCR je, že cílová sekvence sama o sobě není amplifikována a tím se minimalizuje riziko přenosu kontaminace. Současnou snahou je optimalizace reakce CPT tak, aby bylo možné detekovat jednonukleotidové polymorfizmy.

CPT



Amplifikace signálu

- Pro zvýšení citlivosti hybridizačních metod je možné použít alternativní techniky k technikám enzymatickým (založeným na polymeráze nebo ligáze).
- Zesílení signálu vytvořeného navázanou sondou může být dosaženo
 - větší reportérovou molekulou
 - skupinou více molekul připojených na samotnou sondu (složené sondy)
- Výsledkem metod pro amplifikaci signálu nejsou amplifikované sekvence DNA, proto jsou tyto metody více citlivé na kontaminaci a nespecifické signály
- Detekční citlivost metod pro amplifikaci signálu je vyšší než u klasických hybridizačních metod s autoradiografickou barevnou nebo chemiluminiscenční detekcí.

Amplifikace signálu pomocí složené sondy

