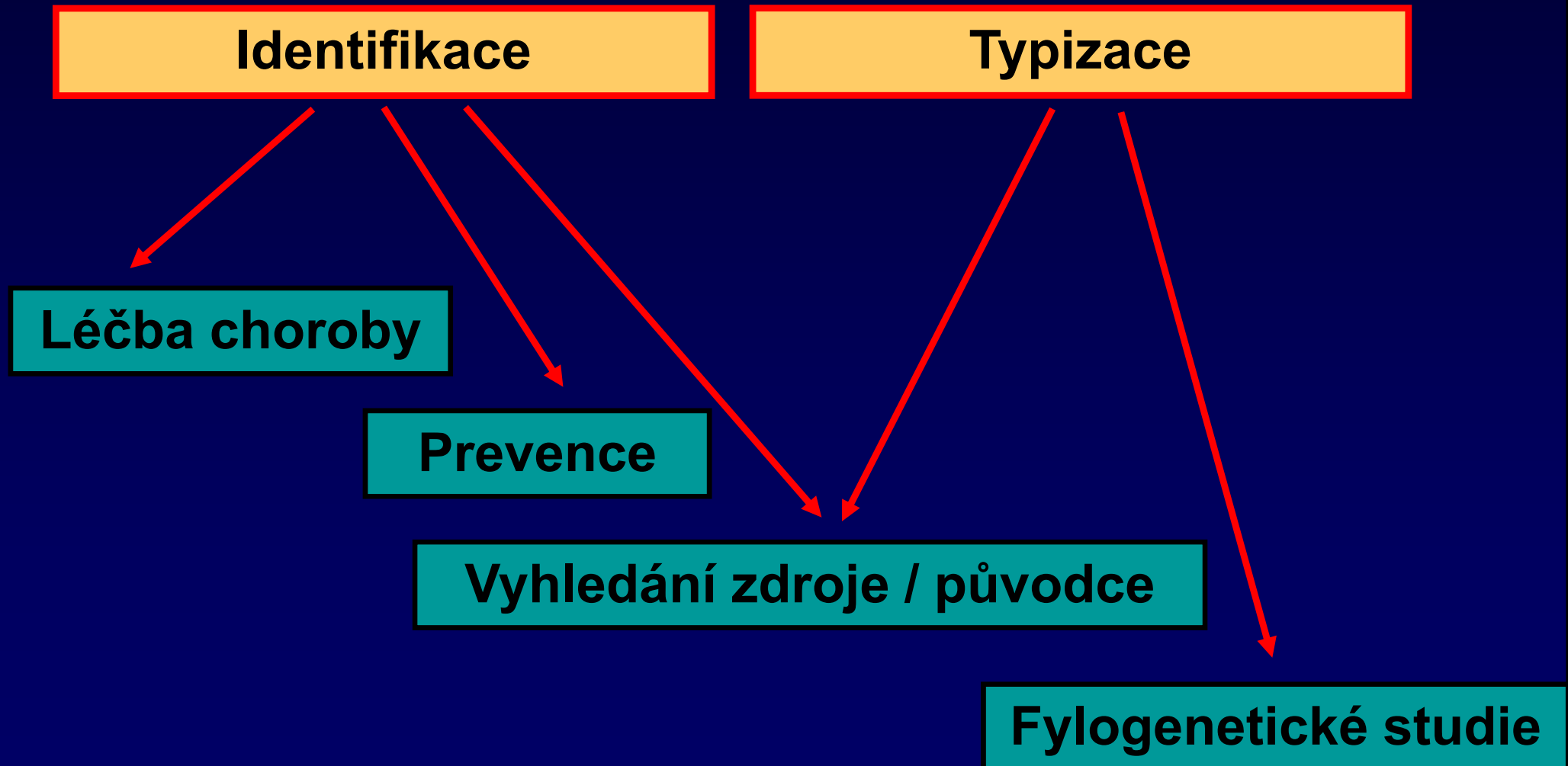


Metody molekulární diagnostiky

Molekulární diagnostika



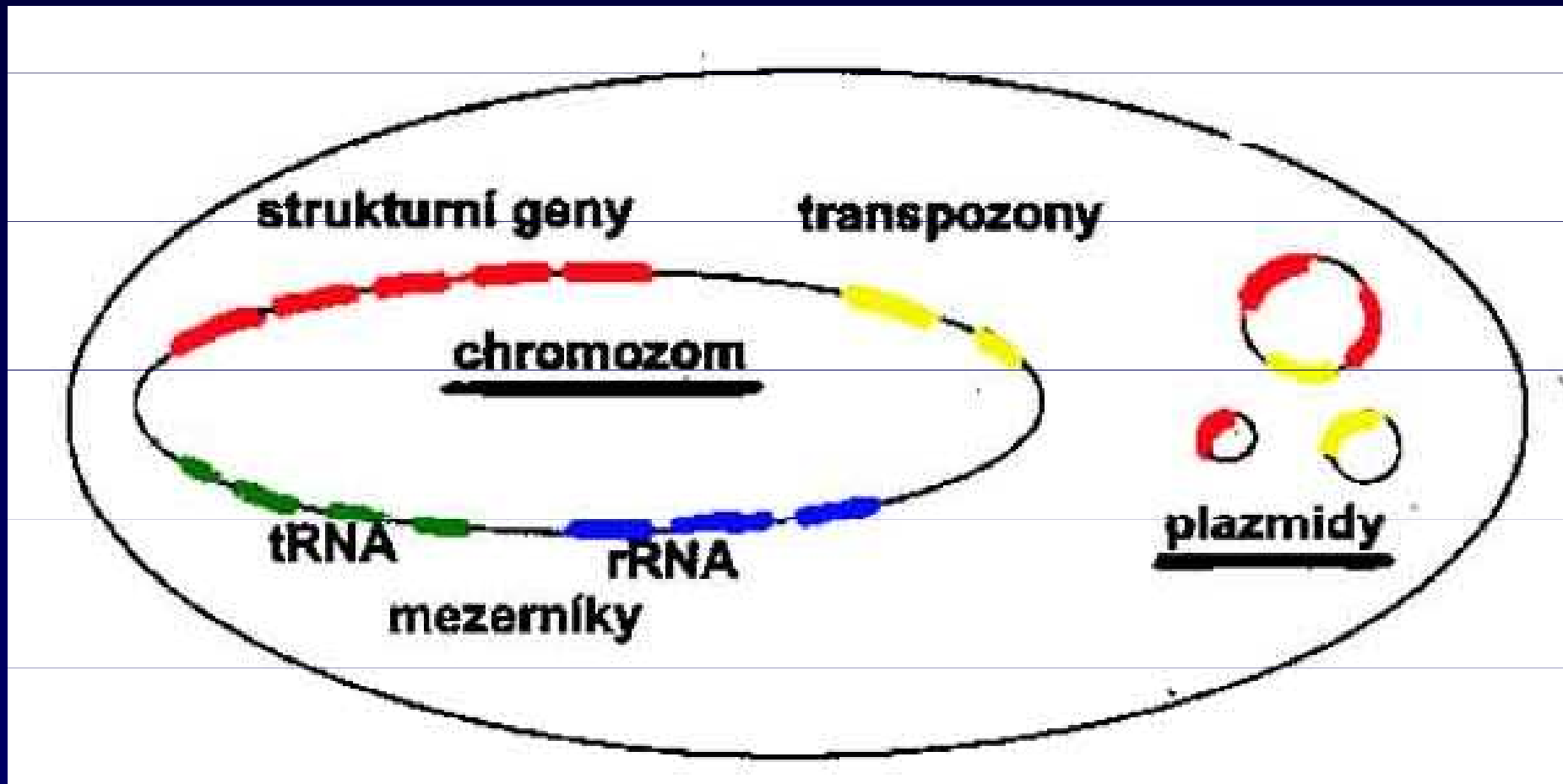
Metody pro detekci polymorfizmů v genomech

**metody elektroforetické a
hybridizační**

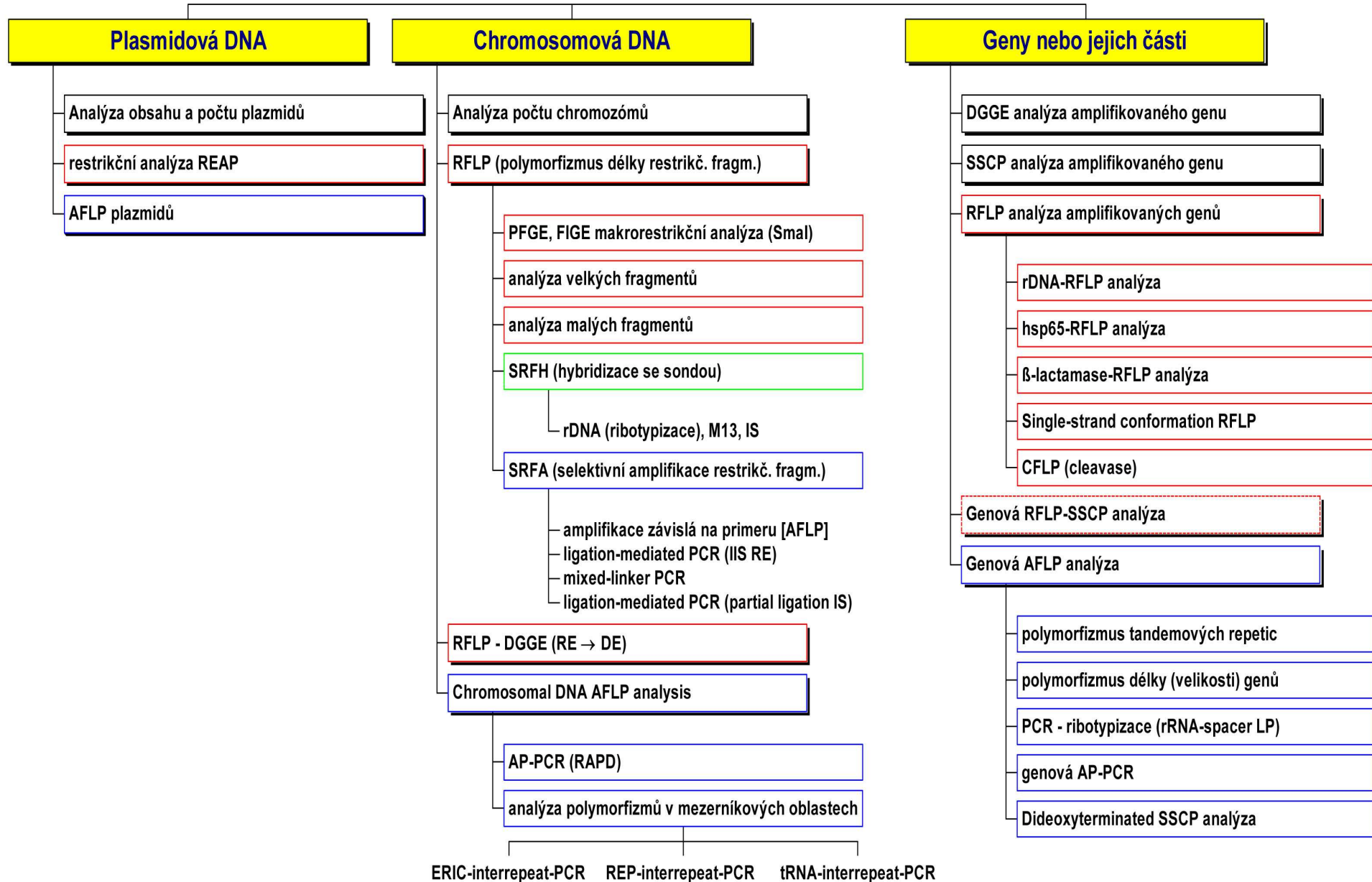
Metody studia sekvenčního polymorfizmu DNA

- 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

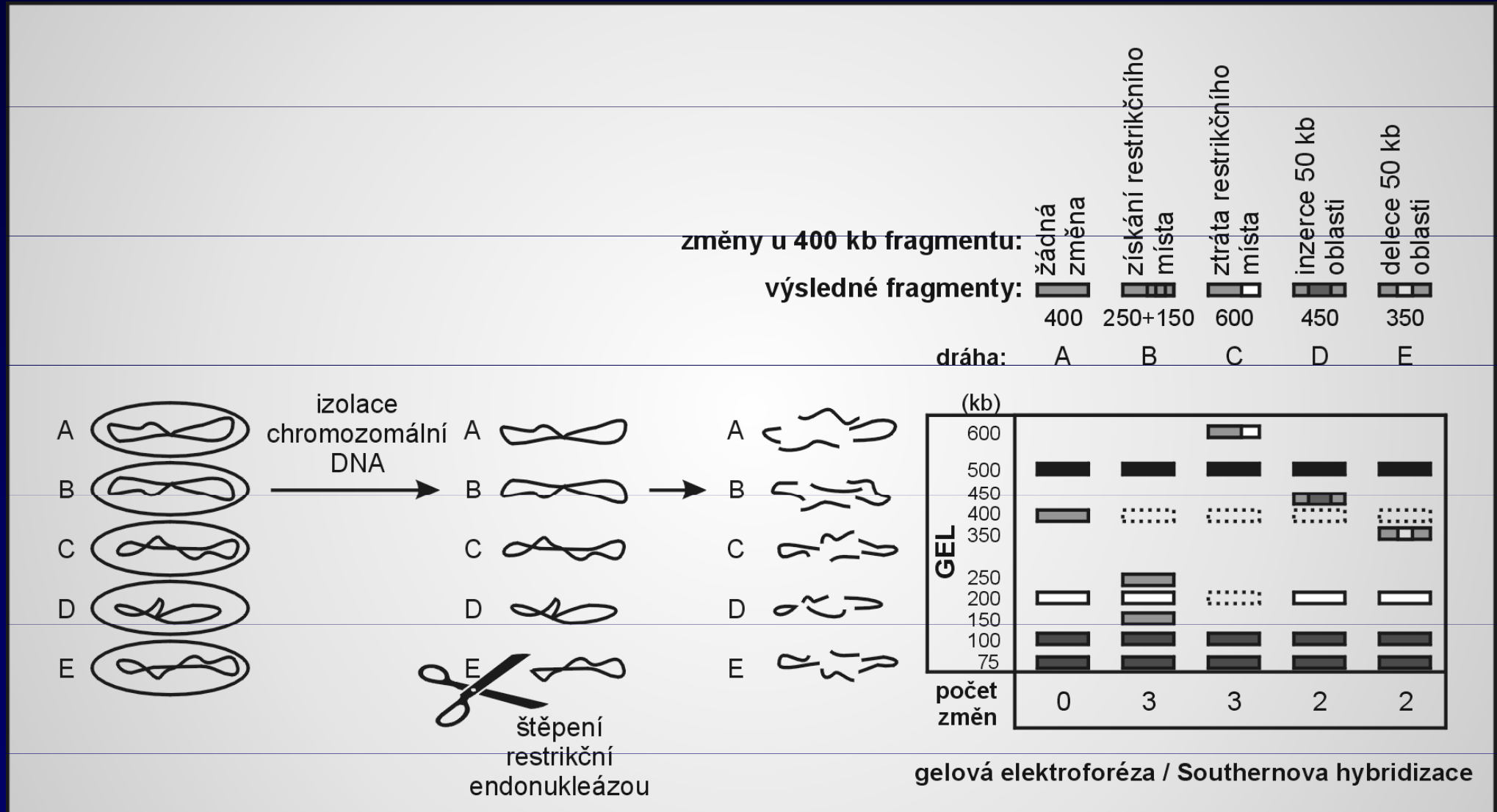


Analýza celkové chromozomové DNA

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)

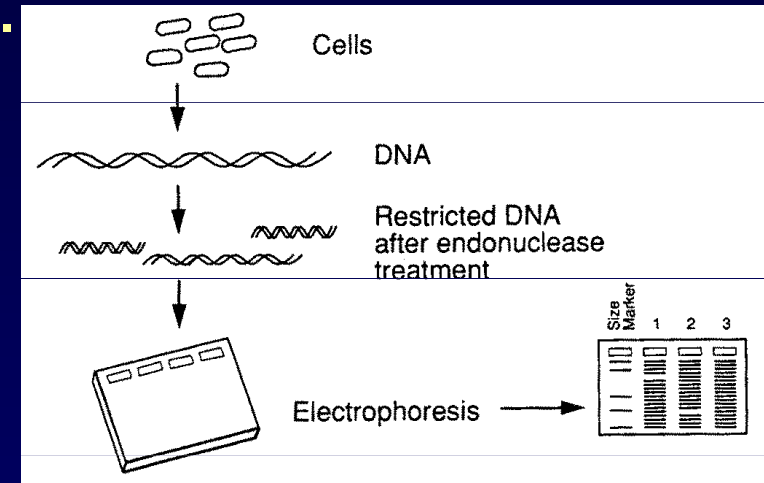
Princip RFLP

RFLP vzniká přestavbami sekvencí
 inzercemi
 delecemi
 substitucemi bazí uvnitř restrikčních míst



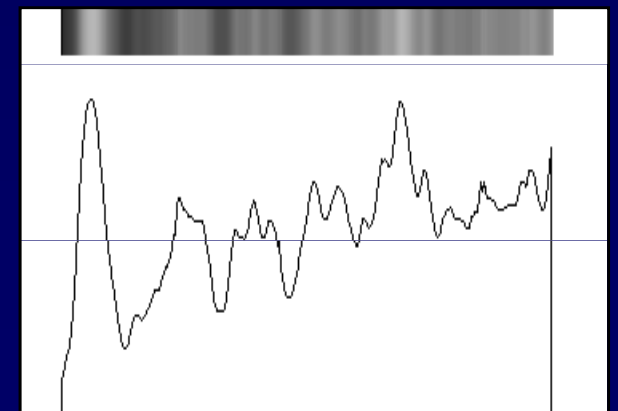
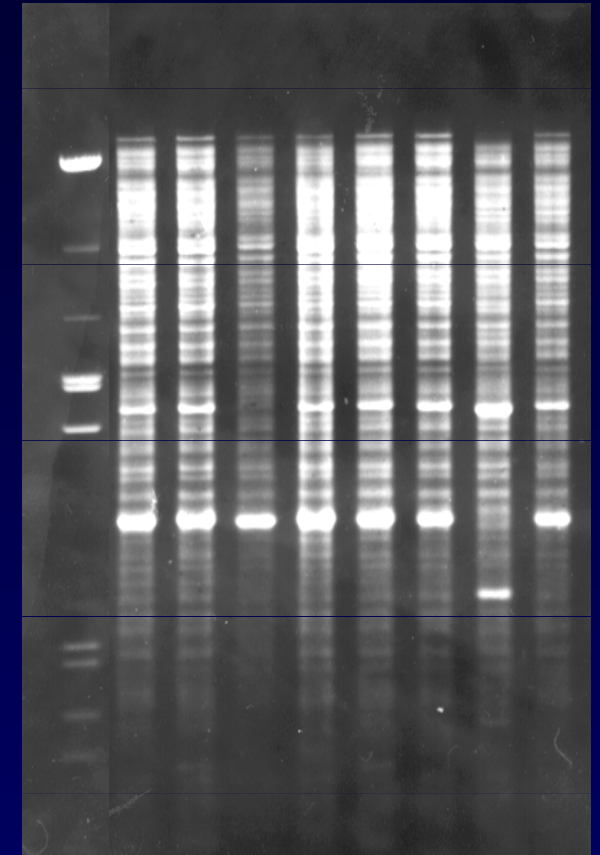
Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- 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 chromozomální 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



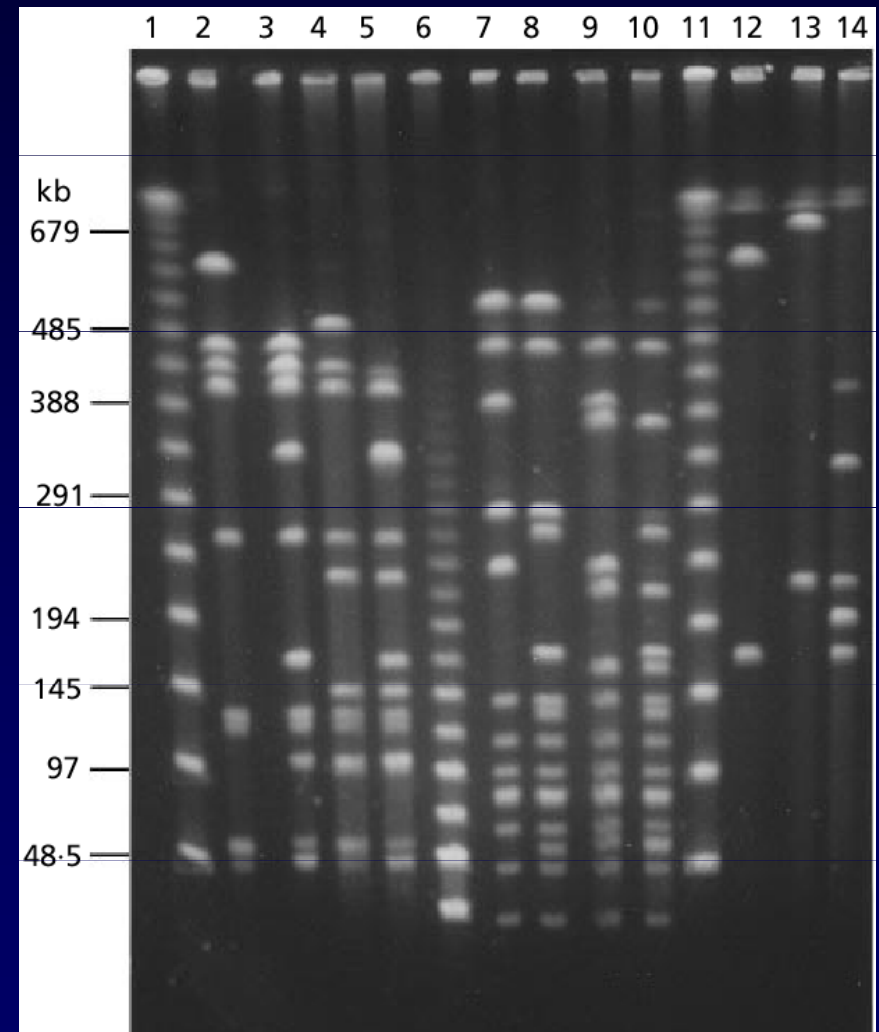
Analýza velkých nebo malých fragmentů

- 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 zjednodušit 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

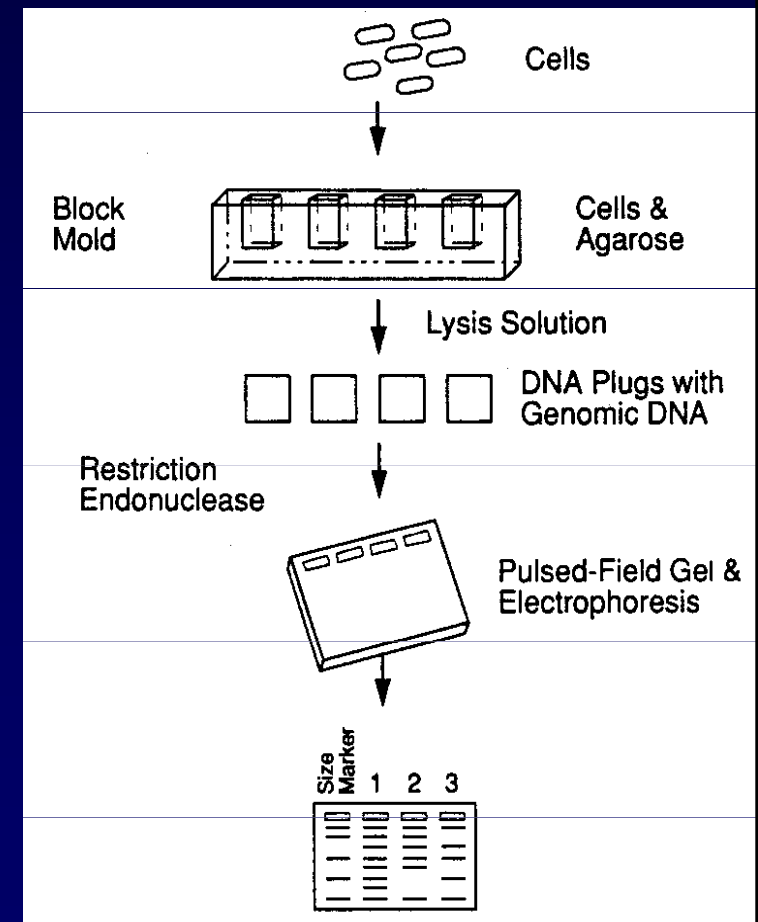
- Metoda slouží pro stanovení RFLP genomové DNA při použití restričních endonukleáz, které štěpí DNA na < 30 místech.
- Vznikají velké fragmenty chromozomální DNA (10 - 1000 kbp), které jsou separovány **pulzní gelovou elektroforézou**.
- Pro izolaci intaktní DNA není vhodná konvenční metoda, ale používá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



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

Příprava vzorků pro PFGE

- Kultivace buněk do přesně stanovené hustoty
- Smíchání buněk s roztavenou agarózou
- Nalítí směsi do malé formičky
- lyze buněk v agarózových bločcích
- deproteinace DNA
- Štěpení restriční endonukleázou, která štěpí s nízkou frekvencí (velikost fragmentů 50 - 10 000 kbp)
- Pulzní elektroforéza
- Barvení gelu v etidiumbromidu



Výběr vhodných restričních enzymů pro makrorestrikční analýzu DNA

1. Výběr na základě délky rozpoznávací sekvence RE

Délka rozpoznávací sekvence by měla být ≥ 6 bp

*Sfi*I 5' GGCCN↓NGGCC 3' příklad RE s 10 bp rozpoznávací sekvencí

*I-Sce*I 5' TAGGG↓ATAA↑CAGGGTAAT 3' příklad intronem kódované endonukleázy s 18 bp dlouhou rozpoznávací sekvencí

2. Výběr na základě obsahu GC

Bakteriální druhy se velice liší v obsahu GC v jejich genomech.

Enzymy s GC-bohatou rozpoznávací sekvencí jsou vhodné pro AT-bohaté genomy

*Sma*I 5' CCC↓GGG 3' *Not*I 5' GC↓GGCCGC 3'

a enzymy s AT-bohatou rozpoznávací sekvencí jsou vhodné pro GC-bohaté genomy.

*Ssp*I 5' AAT↓ATT 3' *Swa*I 5' ATTT↓AAAT 3'

3. Výskyt určitých sekvenčních motivů v rozpoznávací sekvenci

Přítomnost sekvence odpovídající terminačnímu kodonu v rozpoznávacím místě RE může ovlivnit frekvenci štěpení.

*Xba*I 5' T↓CTAGA 3' amber

4. Restriční endonukleázy citlivé na metylaci typu CpG jsou vhodné eukaryotické DNA

Některé enzymy neštěpí DNA jestliže se v rozpoznávacím místě vyskytuje 5-metylcytosin.

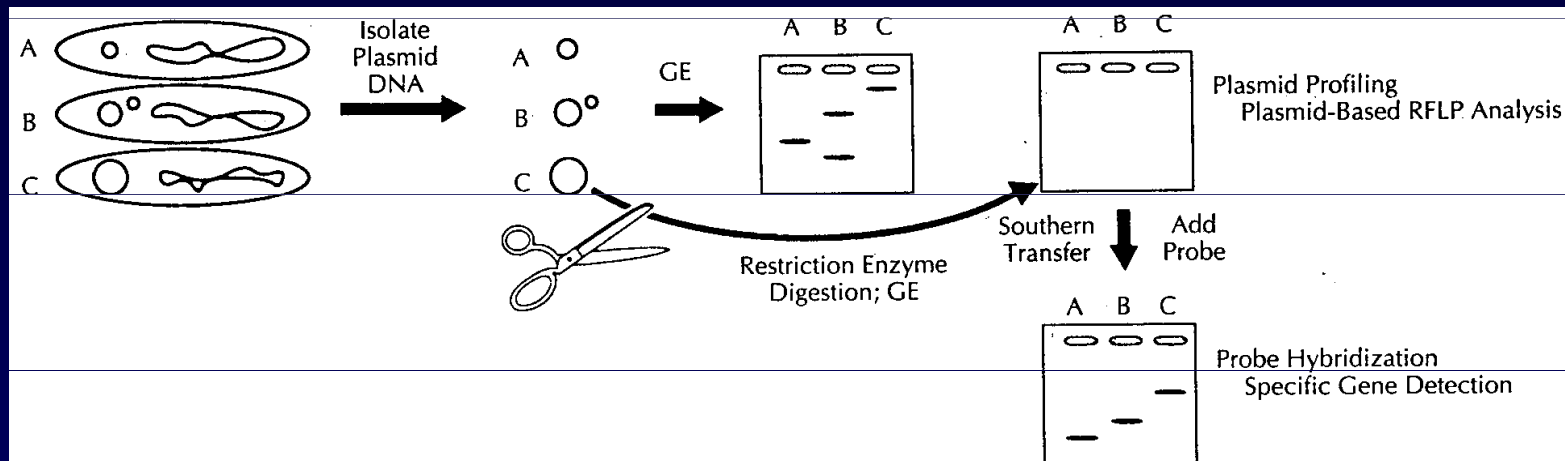
*Mlu*I 5' A↓C*GC*GT 3' tento enzym štěpí savčí DNA méně často než *Sfi*I

Intrpretace výsledků PFGE při typizaci bakterií

Typ genetické změny	Původní počet fragmentů	Výsledek v PFGE ve vztahu k standardnímu kmeni	Výsledný počet fragmentů
Bodová mutace tvorba RE-místa	5	Ztráta 1 fragm. standardního kmene, vznik 2 menších fragm. (suma velikostí se rovná velikosti fragm. st. kmene) 3 rozdíly ve fragmentech	6
Bodová mutace ztráta RE-místa	5	Vznik nového většího fragm., nepřítomného u st. kmene a ztráta 2 malých fragm. 3 rozdíly ve fragmentech	4
Inzerce fragm. DNA bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik většího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5
Delece fragm. bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik menšího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5

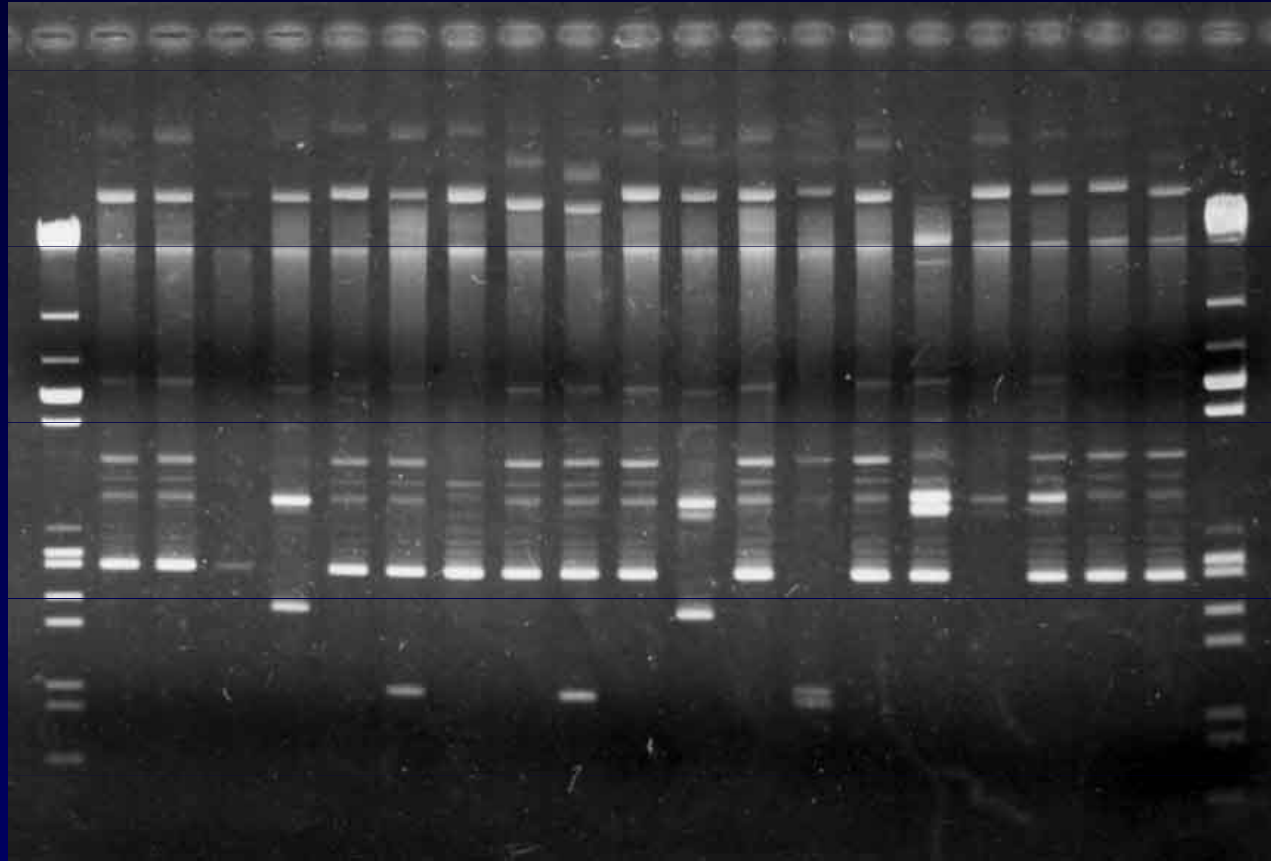
Analýza plazmidové DNA

- 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 netytovatelné
 - interpretace plazmidových profilů není jednoznačná (superhelicita)
 - dlouhodobá stabilita plazmidů je diskutabilní

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

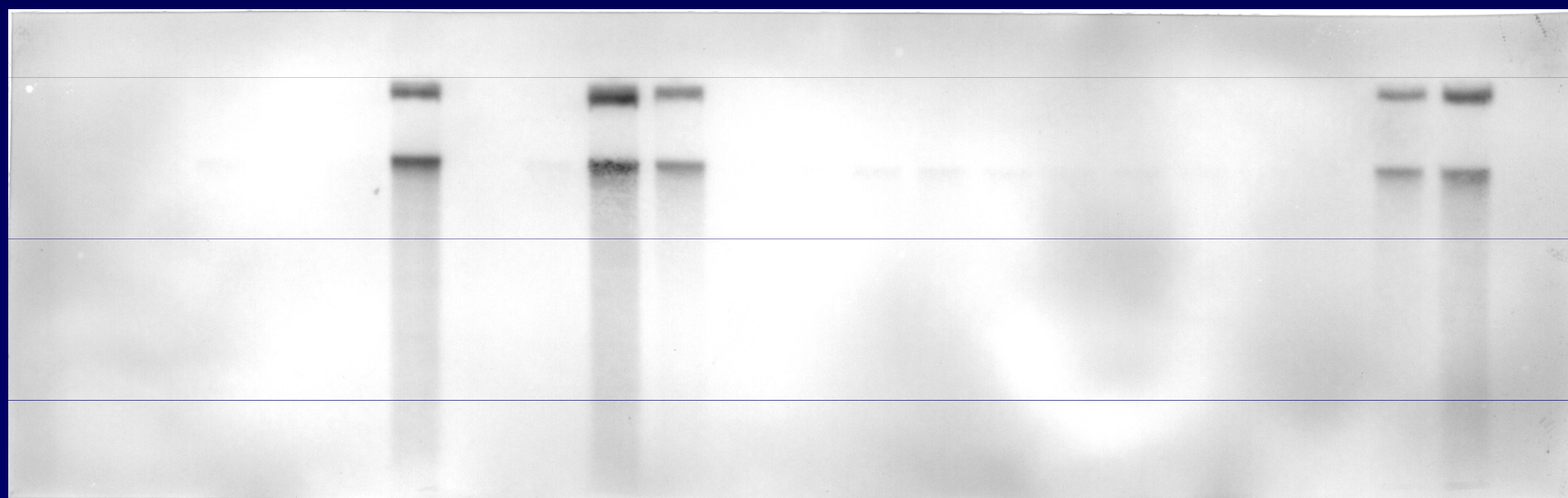
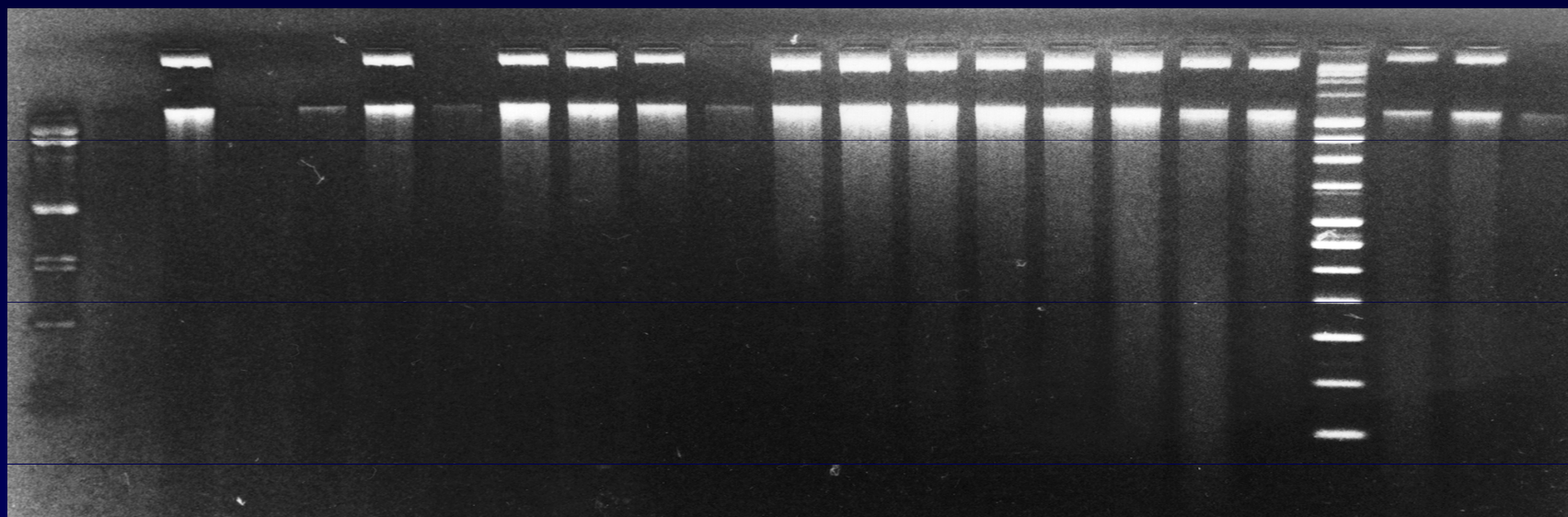


- V současné době se plazmidová analýza používá jako doplňková typizační metoda u gramnegativních (*Salmonella*, *Neisseria*, *Escherichia*) i grampozitivních (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Helicobacter*) bakterií.

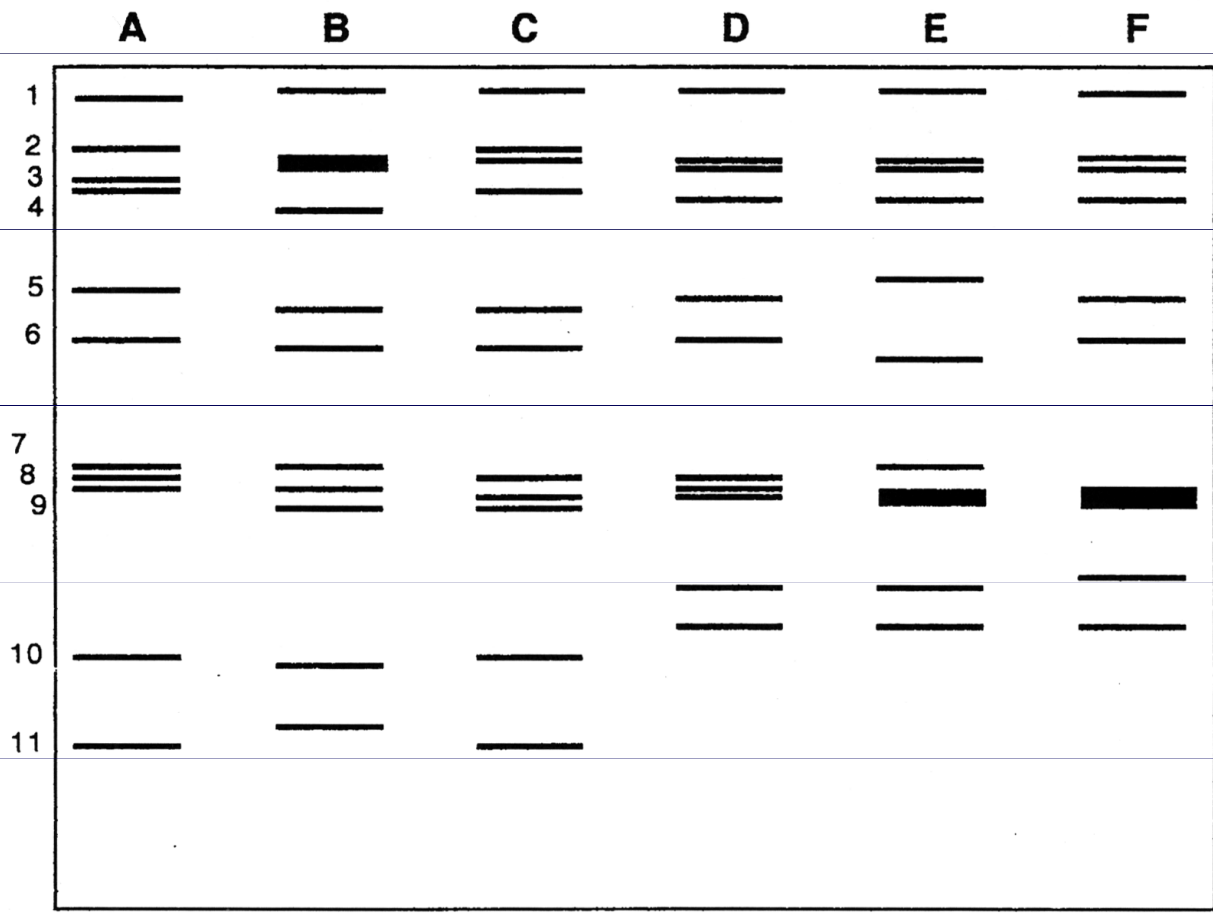
Příklad detekce genu pro exfoliativní toxin na plasmidech kmenů *S. aureus*

OC ♦

CCC ♦



Polymorfizmus délky genomových segmentů u virů se segmentovaným genomem

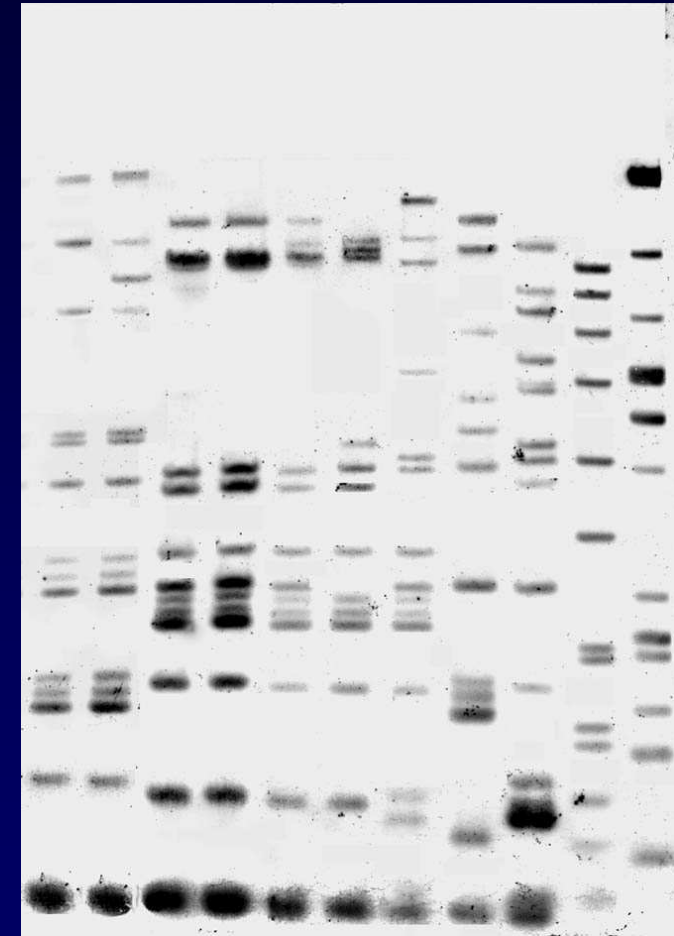
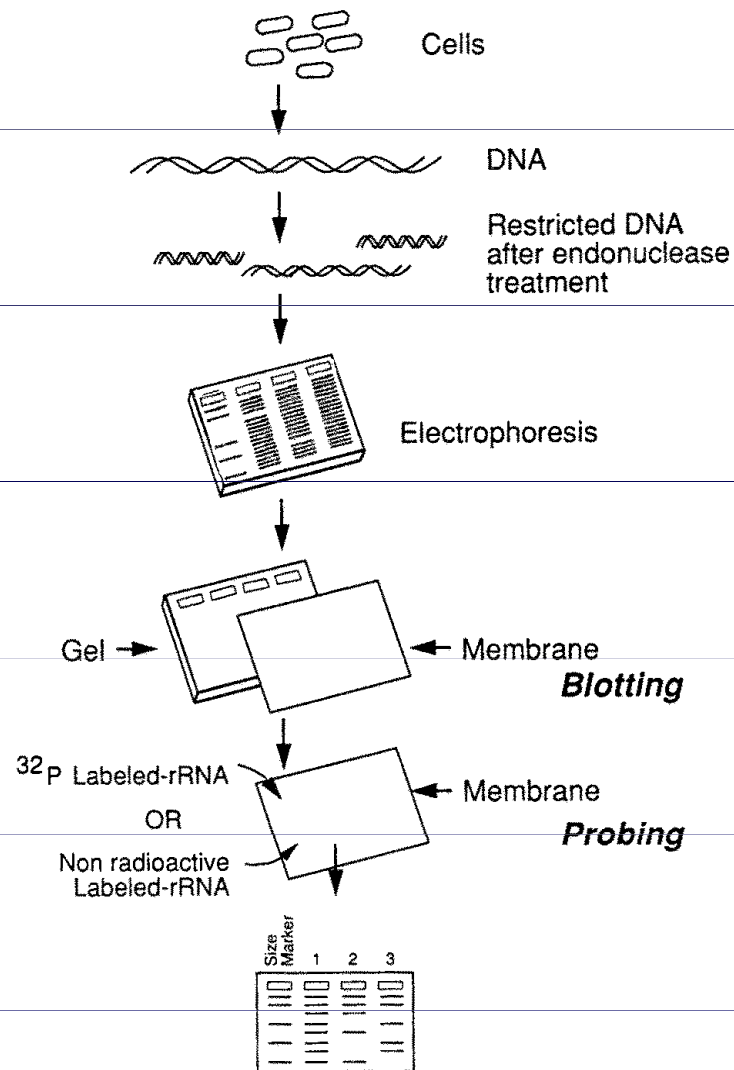


10% polyakrylamidový gel s genomovou segmentovanou RNA rotavirů

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 nitrocelulóзовou 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

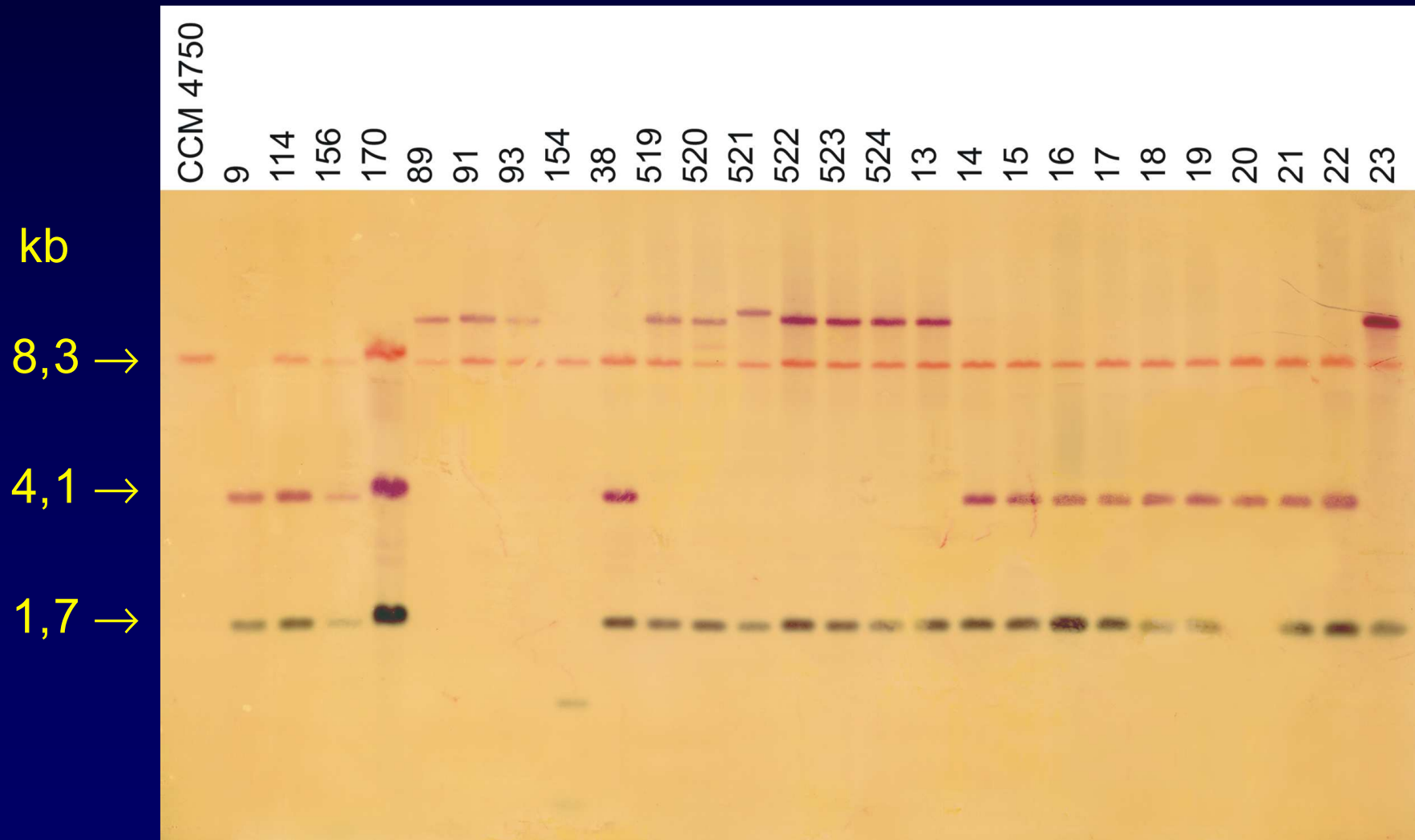
4. Sondy připravené z dalších repetitivních sekvencí

- 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

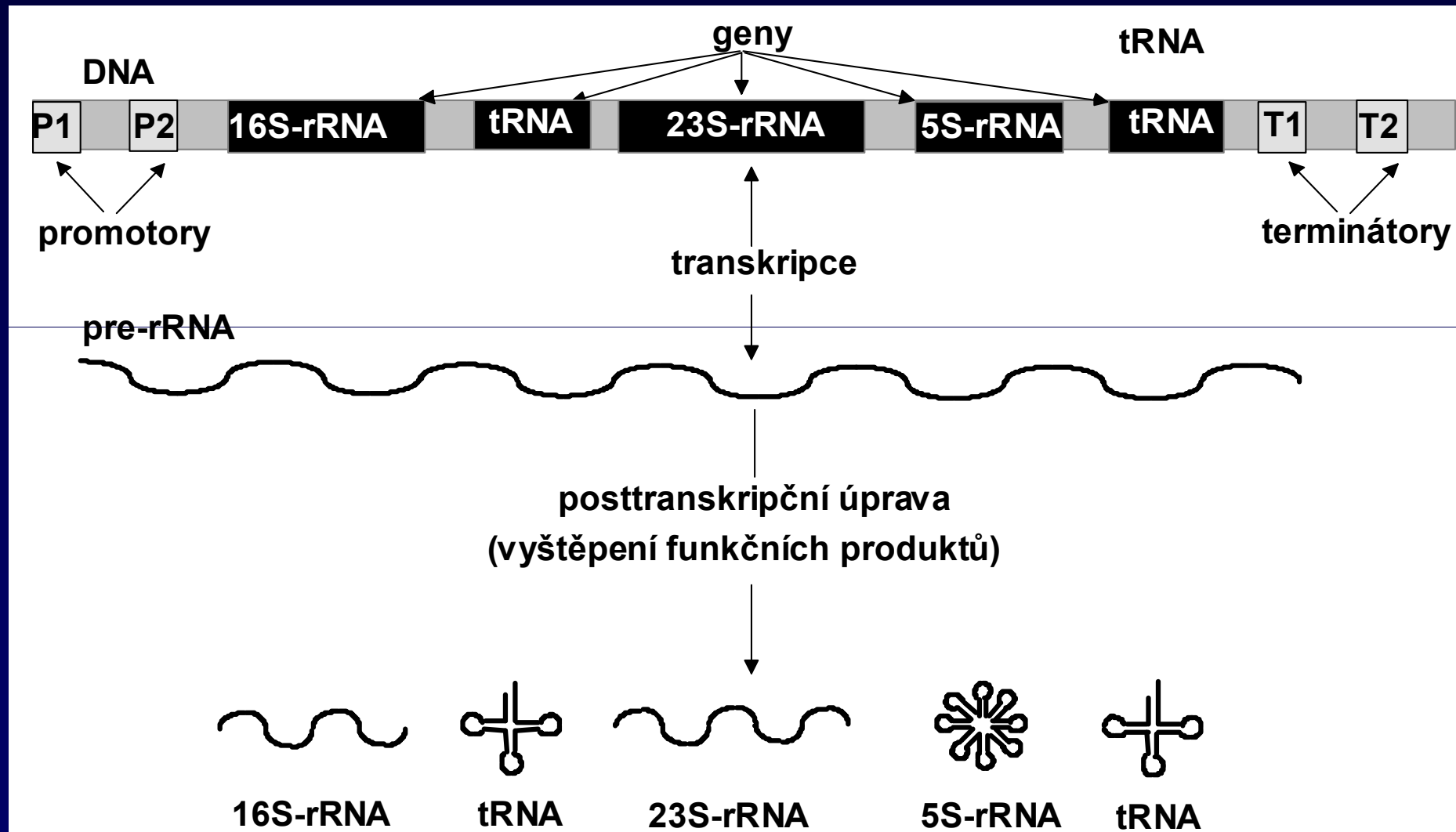


6. Ribotypizace - Sondy připravené z 16S rRNA nebo 23S rRNA (rDNA-SRFH, rDNA-RFLP)

- 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.



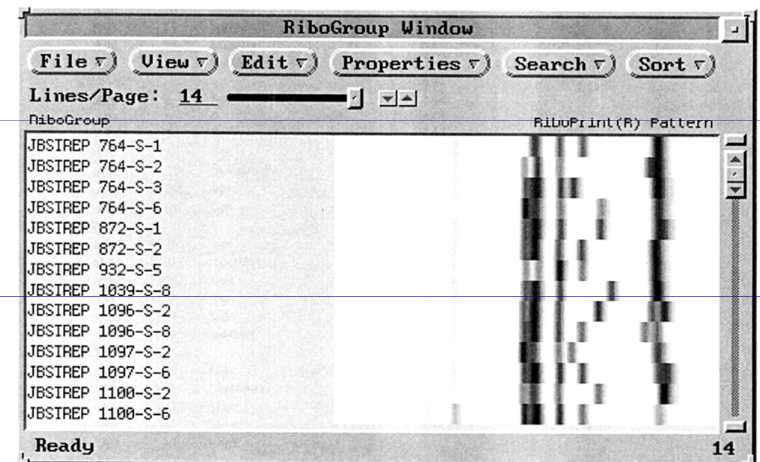
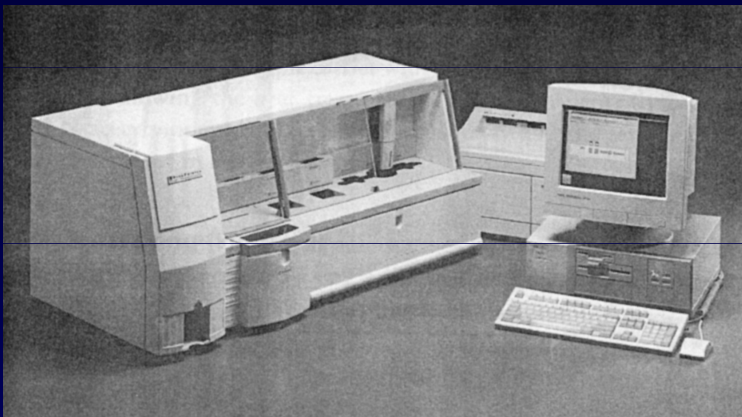
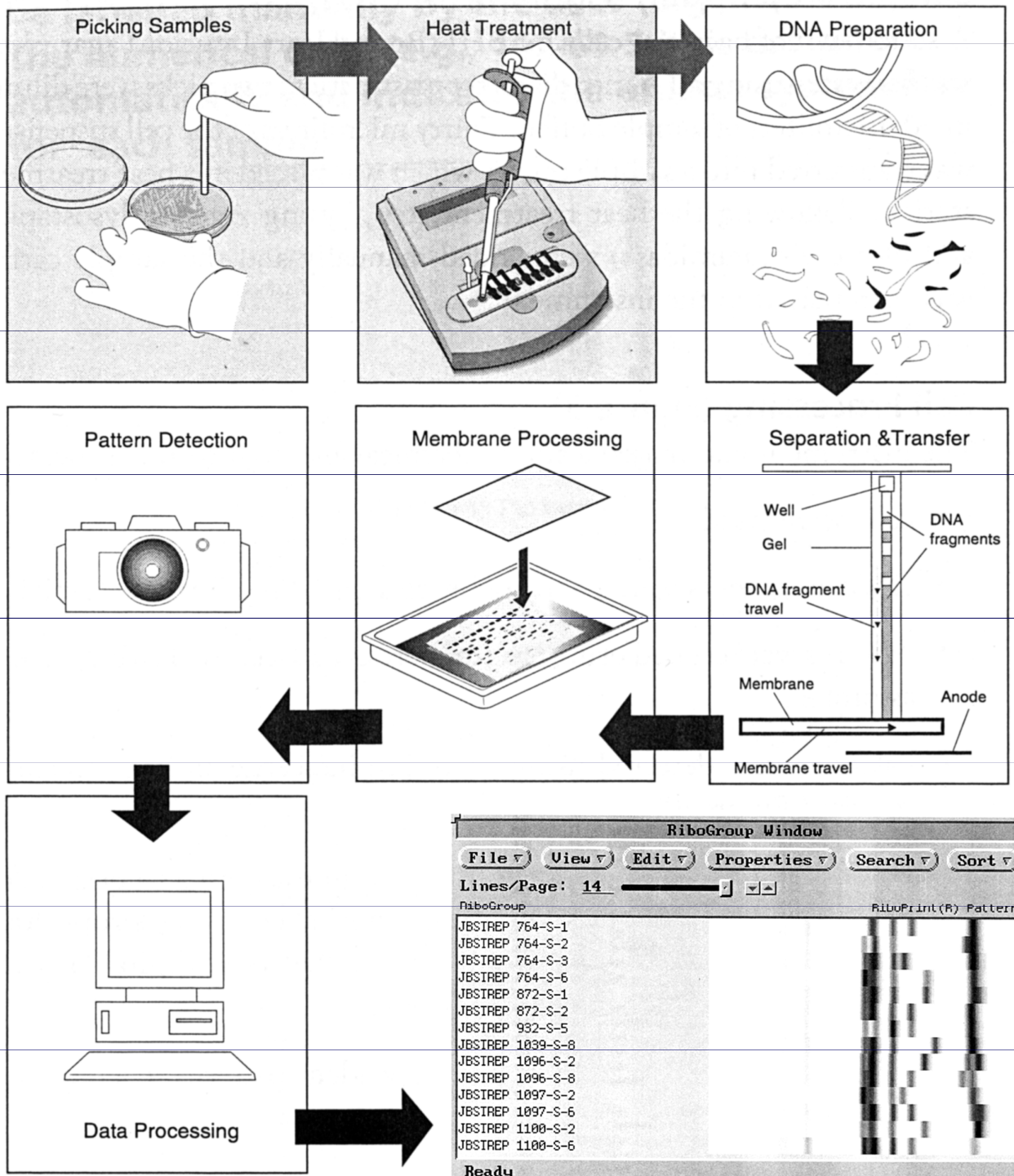
Princip ribotypizace

- 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

EXTERNAL TO RIBOPRINTER™ SYSTEM



Sondy používané pro SRFH u eukaryot

- **Jednolokusové sondy**

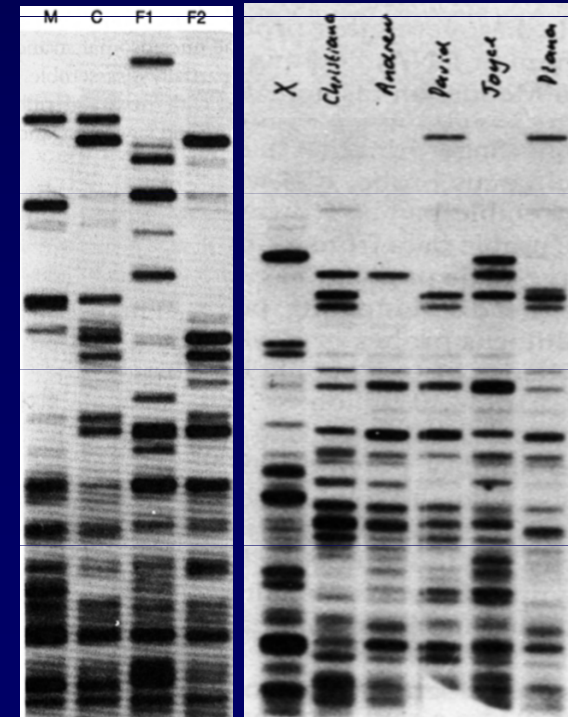
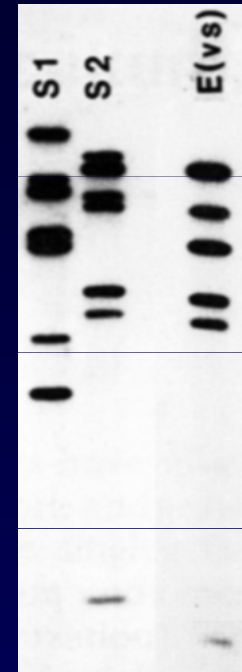
- Hybridizují k jedné hypervariabilní oblasti genomu a vytvářejí vzor o 1-2 proužcích
- Pro identifikační účely se používá směs („koktejl“) jednolokusových sond
- Jsou citlivější a dávají jednodušší obraz než multilokusové sondy
- Pro hybridizaci je třeba min 10 ng DNA

- **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:*

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

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

$S_{i,j}$ = 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.

