

# **Polymorfizmy detekované speciálními metodami s vysokou rozlišovací schopností**

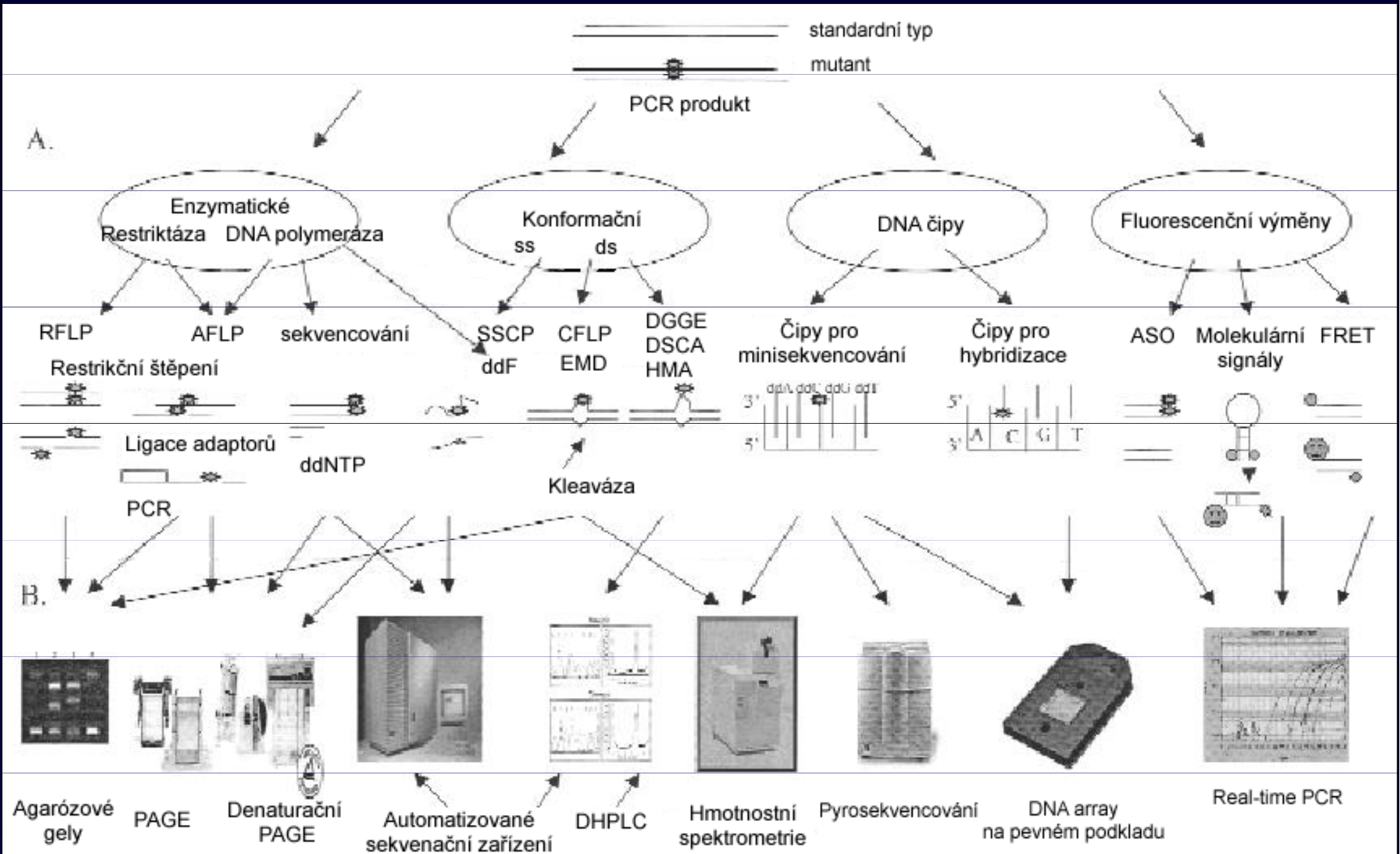
Stanovení jednonukleotidových  
polymorfizmů (Single Nucleotide  
Polymorphisms - SNPs)

# 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**
  - Ligázová řetězová reakce
  - Ligace prostřednictvím RCA
  - AFLP
  - Sangerovo sekvencování
  - Pyrosekvencování
  - CFLP
  - Kleaváza + “vetřelec”
- **Konformační**
  - SSCP
  - ddF
  - DGGE
  - DCSA
- **Hybridizační**
  - Oligonukleotidové čipy
  - Sekvencování hybridizací
  - Kvantitativí PCR s fluorescenčními hybridizačními sondami
  - PNA-sondy
- **Fluorescenční výměny**
  - Molekulární „majáky“
  - FRET
  - Fluorescenční polarizace
- **Hmotnostní spektrometrie**

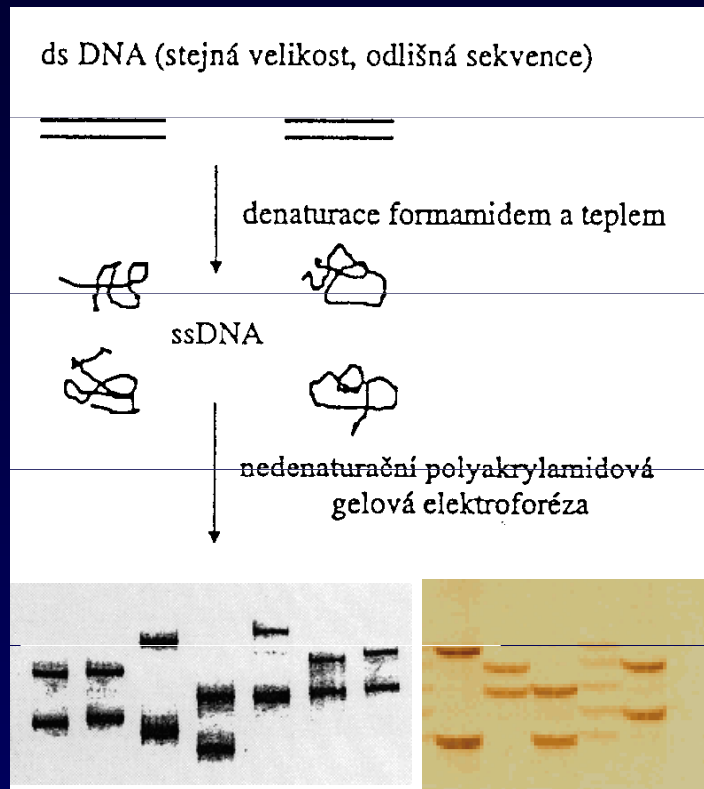
# Polymorfizmy detekované speciálními elektroforetickými metodami

- 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
- Elektroforéza se obvykle provádí v polyakrylamidových gelech
- 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 nedenedaturujících elektroforetických podmínkách
- U delších fragmentů se snižuje diskriminační účinnost a reprodukovatelnost

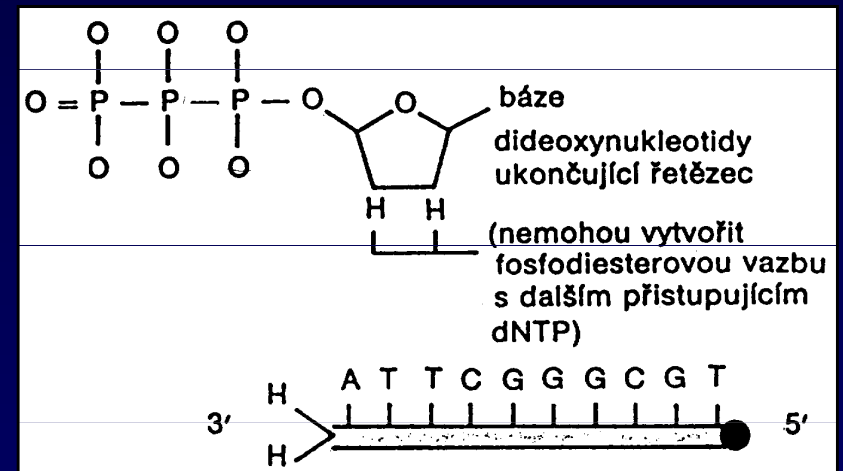
# Princip metody SSCP



- 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)

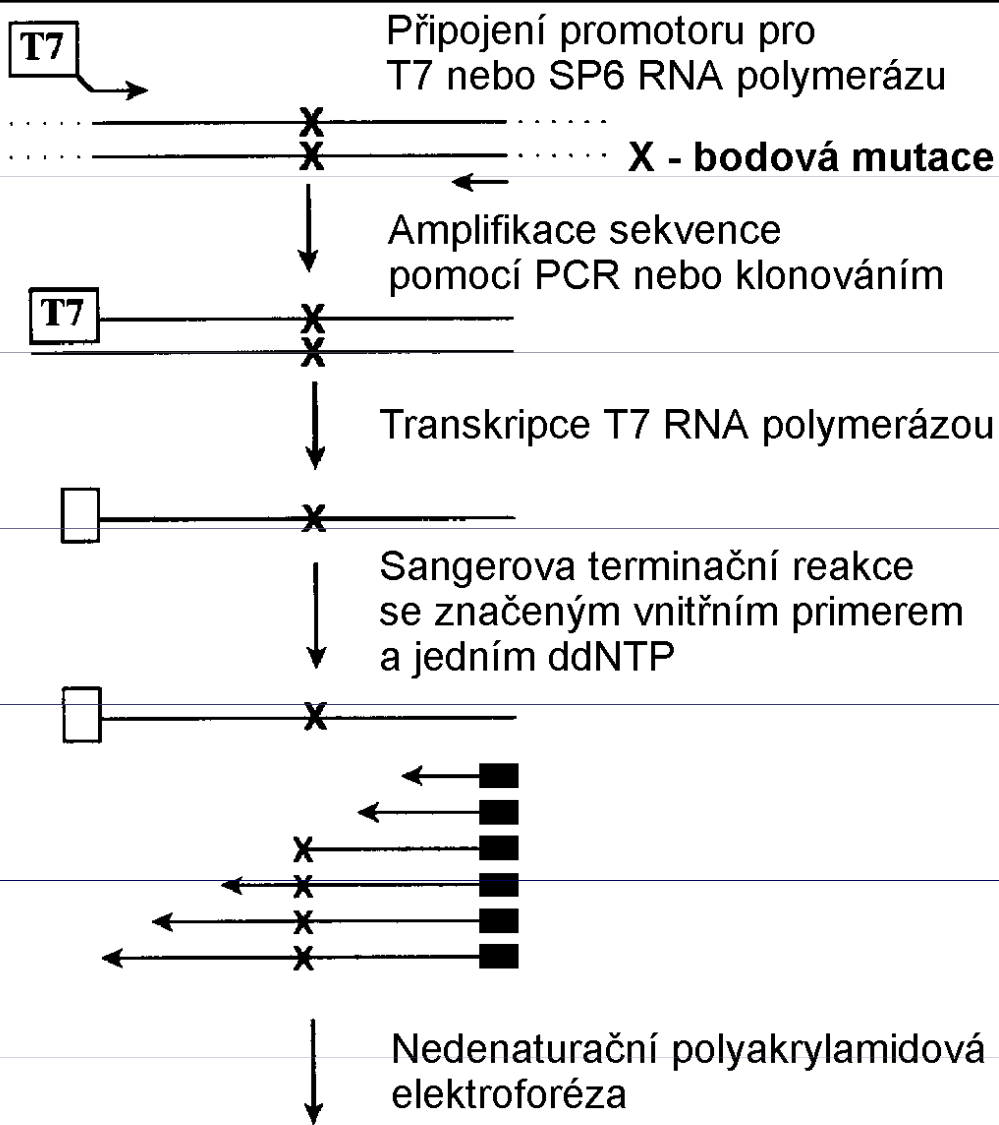
- Hybridní diagnostická metoda využívající dva metodické přístupy:
  - Sangerovo sekvencování, reakce je na rozdíl od klasického sekvencování prováděna pouze s jedním dideoxy terminátorem.
  - SSCP



- 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.

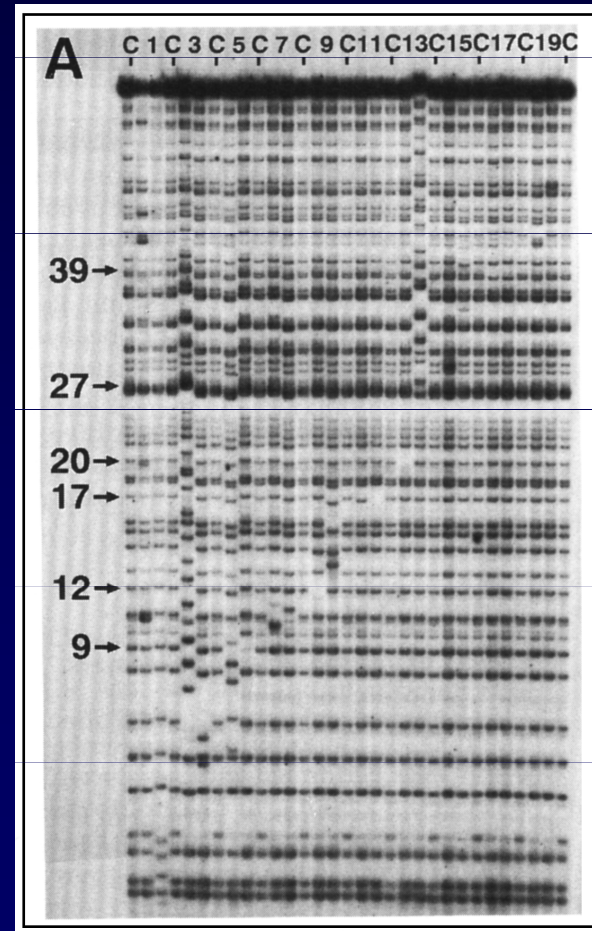


# Princip ddF



1	C	2
*	—	*
*	—	*
*	—	—
—x	—	—
—	—	—
—	—	—

Vzorky 1 a 2 mají mutace, C je kontrola bez mutací



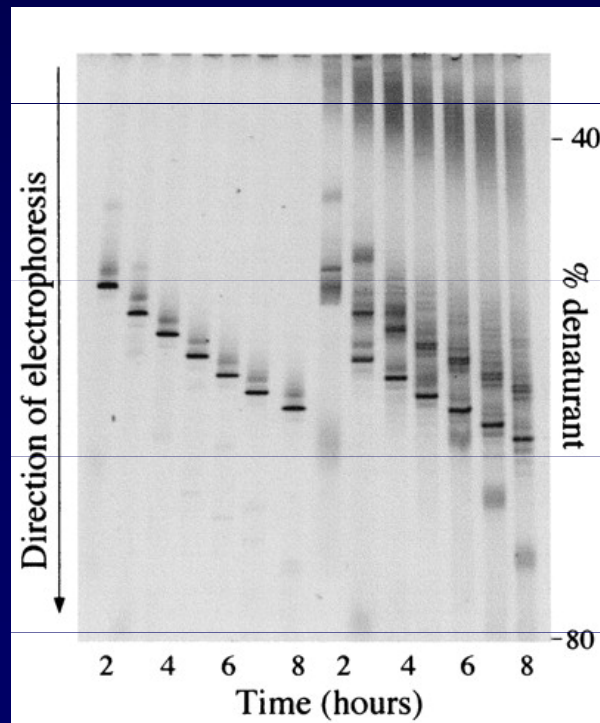
# Denaturační gradientová gelová elektroforéza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)

- 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

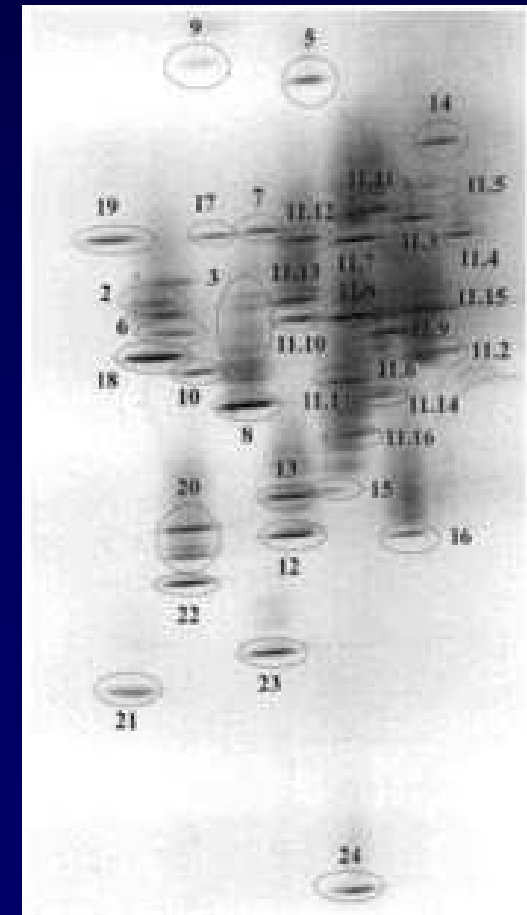
# DGGE je vhodná pro

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

1D

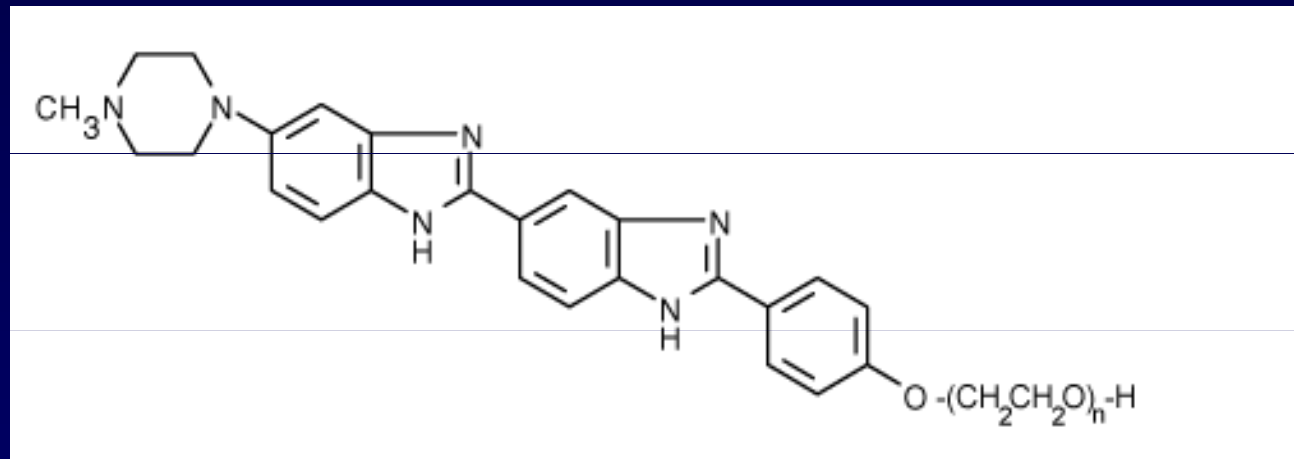


2D TGGE



# Sekvenčně specifická elektroforéza zprostředkovaná vmezeření barviv do DNA

- Zřídka používaná metoda ke stanovení sekvenčních rozdílů v dsDNA fragmentech do velikosti 1500 bp
- využívá vazbu bis-benzimidu (H33342) na AT páry
- Elektroforéza se provádí v agarózových gelech s bis-benzimid-polyetylen glykolem



- Princip metody
  - a) vazba bis-benzimidu na AT bohaté fragmenty DNA
  - b) následné zpomalení elektroforetické mobility dlouhými molekulami polyetylenglykolu u DNA fragmentů bohatých na AT

# 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 nenedenaturujících 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 nenedenaturační 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

HIV Proviral DNA from:

Patient A

Patient B

Patient C

PCR amplify using  
the same primers  
(0.5-1.0 kb amplicon)

PCR Products

PCR Products

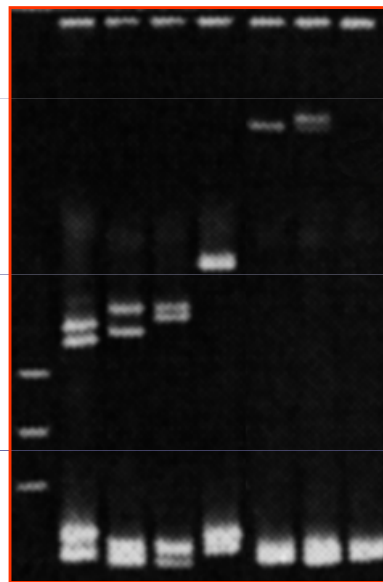
PCR Products

Combine, denature and  
reanneal the products

A + B

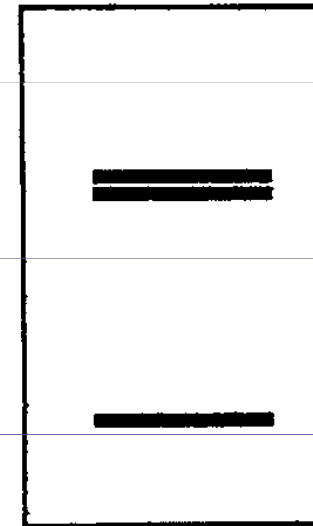
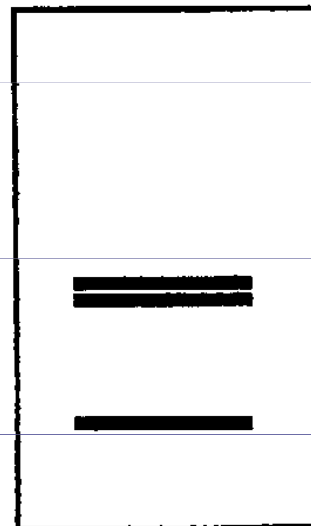
A + C

Analyze on 5% neutral  
polyacrylamide gel



Heteroduplexes

Homoduplex



Heteroduplexes

Homoduplex



# 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, inzerce) a modifikace v nukleotidových sekvencích ovlivňují sekundární strukturu ssDNA a konečným výsledkem se vytvoření rozdílných míst rozpoznávaných enzymem.

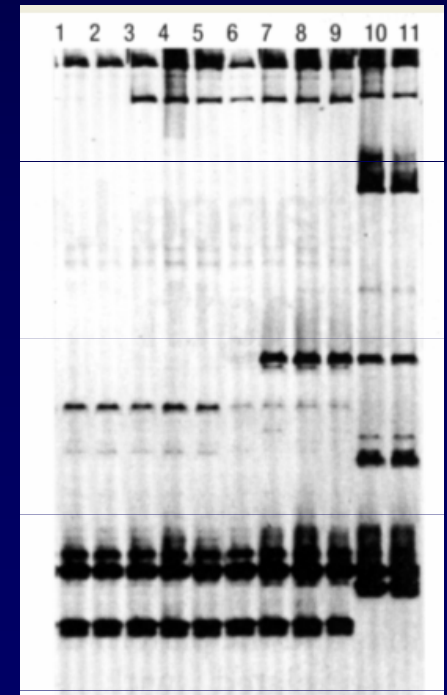
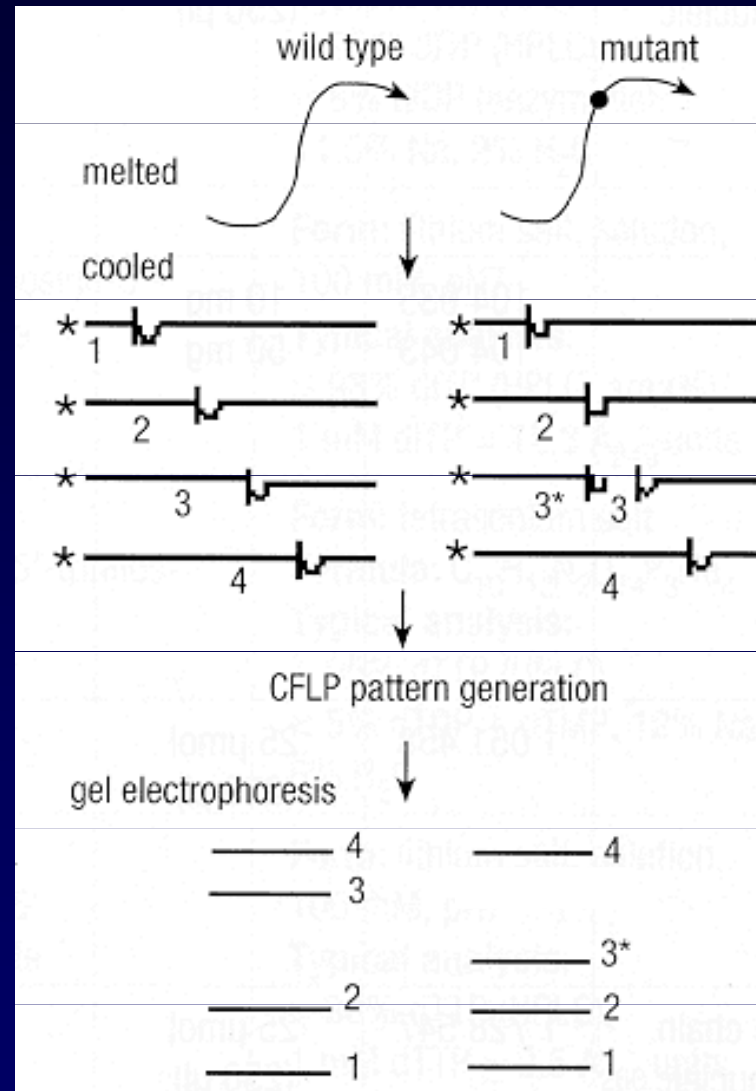


# CFLP

- Po stěpení enzymem Cleavase vzniká spektrum fragmentů charakteristické pro danou molekulu
- Separaci fragmentů provádíme na krátkém denaturačním polyakrylamidovém gelu
- Metoda CFLP je metodou porovnávající 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

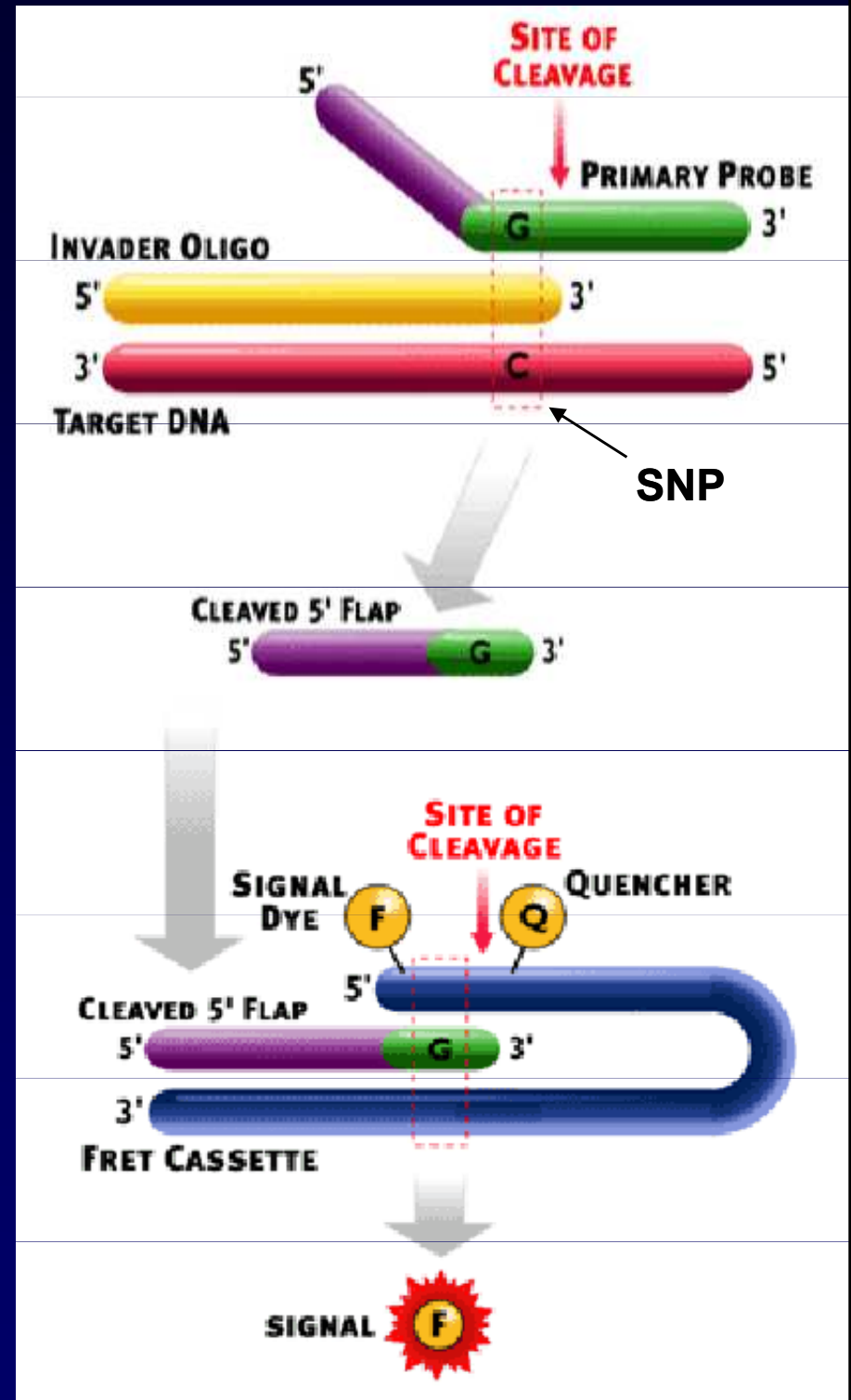
1. Příprava koncově značené dsDNA (na obrázku je znázorněno \*)
2. Teplotní denaturace DNA
3. Ochlazení DNA a vytvoření vlásenek
4. Štěpení Cleavase I (na obrázku znázorněno | )
5. Elektroforéza v denaturačním polyakrylamidovém gelu
  - (pouze koncově značené DNA jsou detekovány)



polymorfizmu CFLP u 16S rDNA různých bakteriálních druhů

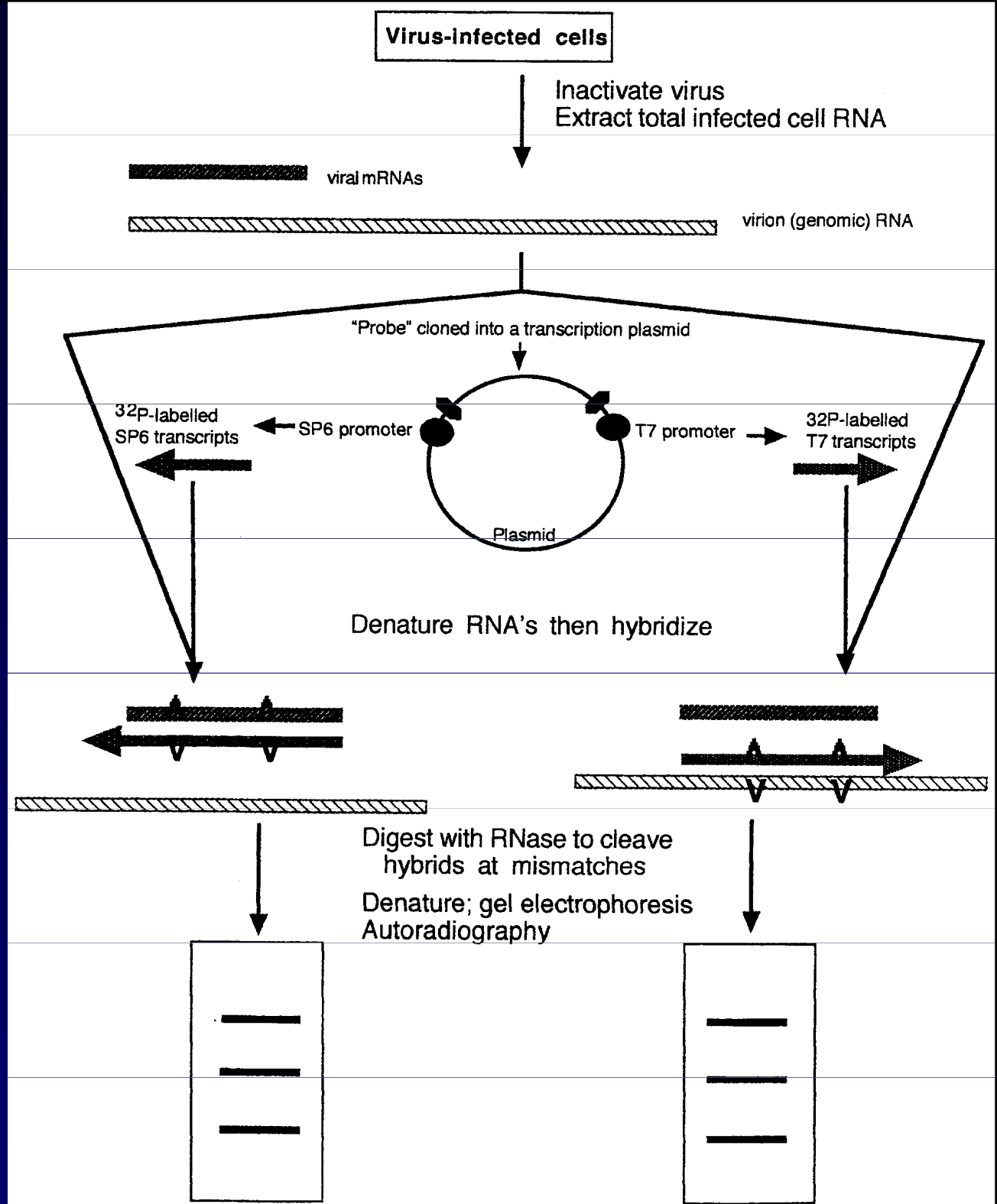
# Vetřelec (Invader®)

- Dva oligonukleotidy jako hybridizační sondy:
  1. Invader
  2. Primární signální sonda
    - Může nést fluorescenční značku
- Komplex ve tvaru klapky:
  - Signální sonda hybridizuje k cílové molekule DNA blíže k jejímu 5'-konci
  - Invader naruší tento komplex proti směru a **vytěsní 1 bázi**
- Kleaváza:
  - Rozpozná vzniklou sekundární strukturu a rozštěpí „klapku“ v pozici 5'-ramene + 1 báze ze signální sondy
- Detekce:
  - Na základě vzniku fluorescence metodou FRET
  - Pomocí hmotnostní spektrometrie



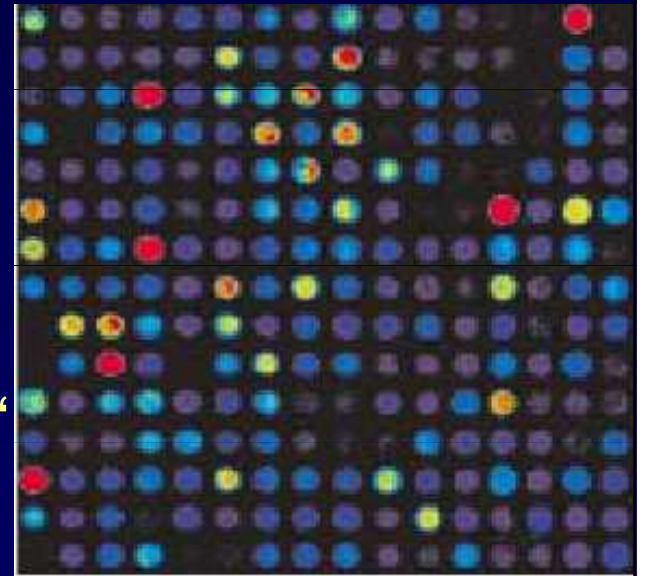
# Test rezistence k RNáze (RNase protection analysis)

- Diagnostická metoda používaná k detekci a lokalizaci bodových mutací v RNA.
- Používá se **RNáza A**, která štěpí úseky ssRNA, kde nedošlo k vazbě  $^{32}\text{P}$  značené sondy připravené ze standardního genu.
- Touto metodou lze detekovat ~ 50% bodových mutací.
- Využívá se zejména u rychle mutujících RNA-virů



# DNA čipy pro hybridizační analýzu

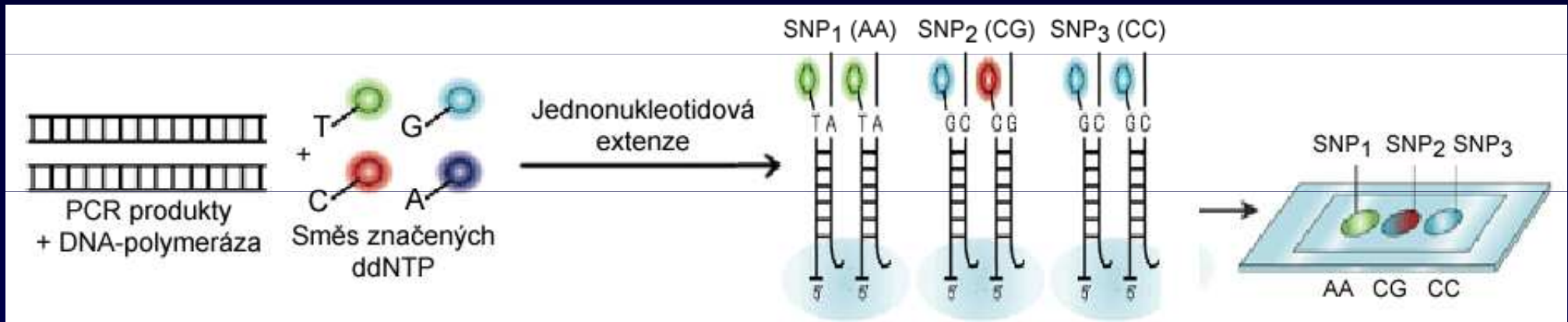
- DNA čipy slouží k paralelnímu provádění DNA hybridizace testované DNA s velkým počtem (desetitisíce) sond.
- Jejich hlavní aplikací je vyhledávání polymorfizmů, např. SNP, nebo srovnávání vzorků RNA izolovaných z různých buněk.
- DNA čip je malá destička nesoucí velký počet sond DNA, které se vzájemně liší svou nukleotidovou sekvencí a na čipu jsou umístěny v definovaných polohách.
- Sondy jsou
  - synteticky připravené oligonukleotidy přímo na povrchu čipu
  - Krátké molekuly DNA nanášené s použitím robotických systémů na skleněný či nylonový povrch matrice „array“
    - cDNA
    - PCR produkty
- U prvních používaných DNA čipů byly sondy DNA nakapány na povrch mikroskopického sklíčka nebo na nylonovou membránu za vzniku uspořádaného seskupení 6400 (80x80) sond na ploše 18x18 mm.



- Novější technologie přípravy DNA čipů využívají **fotolitografii**
- Umožňuje syntetizovat sondy s různou sekvencí přímo na povrchu čipu a dosáhnout tak na stejné ploše podstatně vyšší hustoty sond (až milion oligonukleotidů na  $\text{cm}^2$ ).
- Při vyhledávání SNP je tak možné v jediném pokuse prověřit až půl milionu polymorfismů za předpokladu, že jsou k dispozici oligonukleotidy pro obě alely každého SNP.
- Prakticky se při práci s DNA čipy postupuje tak, že je čip inkubován se značenou cílovou DNA za podmínek, umožňujících hybridizaci k sondě.
- Poloha oligonukleotidové sondy, k níž se hybridizuje testovaná DNA, se stanoví detekováním emitované fluorescence na povrchu čipu pomocí konfokálního mikroskopu nebo laserového detektoru.



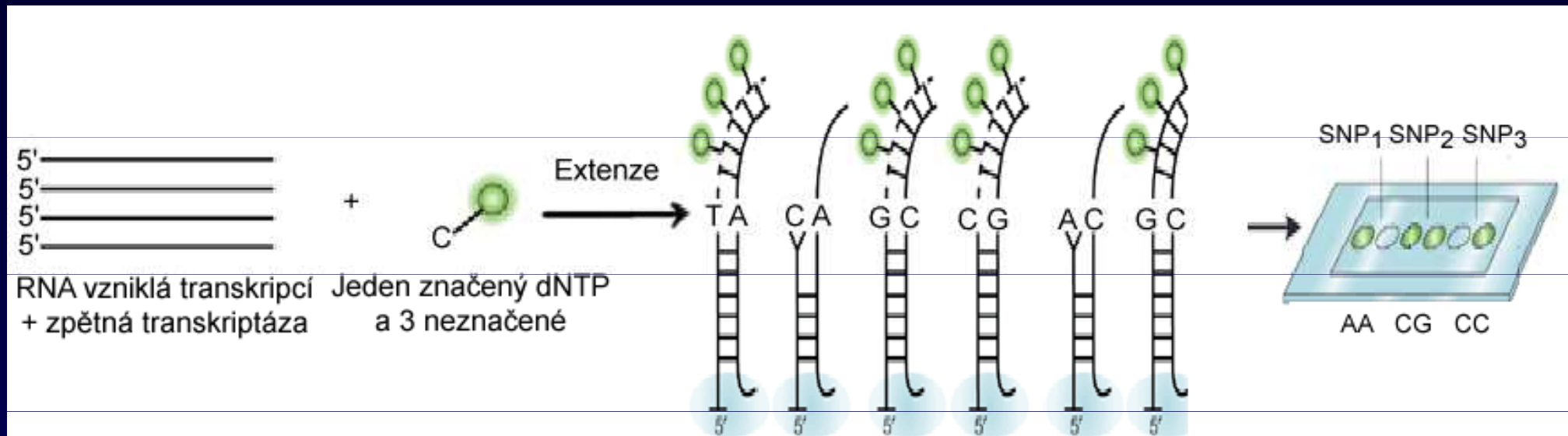
# Stanovení SNP pomocí DNA čipu



## 1. Varianta – Prodloužení primeru vázaného na čipu

- Jeden primer pro každý SNP, který genotypizujeme je imobilizován na sklíčku.
- K čipu jsou přidány multiplex PCR produkty, 3' fluorescenčně značené ddNTPs a DNA-polymeráza.
- Proběhne prodloužení primeru o jeden ddNTP a výsledek reakce je vyhodnocen.
- Pozice primeru na čipu definuje, který SNP analyzujeme a fluorescence nukleotidu určuje genotyp příslušného SNP.

# Stanovení SNP pomocí DNA čipu

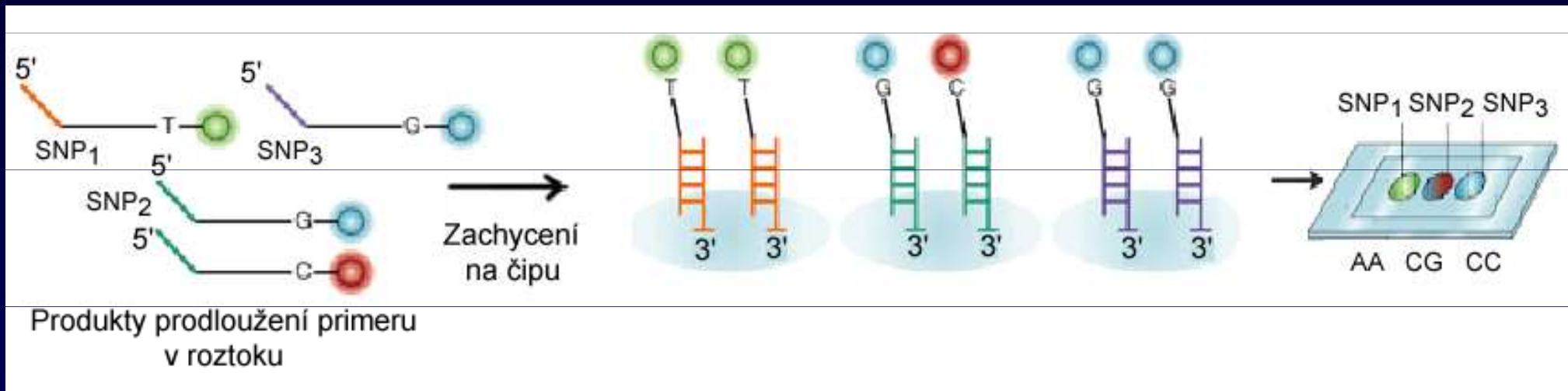


## 2. Varianta – Alelově specifické prodloužení primeru

- Na sklíčku jsou imobilizovány dva alelově-specifické primery s bází na 3'-konci komplementární k oběma možným variantám nukleotidů v každém SNP.
- Produkty multiplex PCR jsou přepsány do mnoha kopií RNA pomocí RNA-polymerázy.
- Molekuly RNA hybridizují k čipu a slouží jako templát pro prodloužení primeru, které je katalyzované pomocí zpětné transkriptázy
- Během zpětné transkripce jsou do každého produktu začleněny fluorescenčně značené dNTP.
- Pro homozygotní genotypy je signál tvořený pouze jedním ze dvou alelově-specifických primerů kdežto u heterozygotních genotypů je signál tvořený oběma primery.



# Stanovení SNP pomocí DNA čipu - minisekvencování

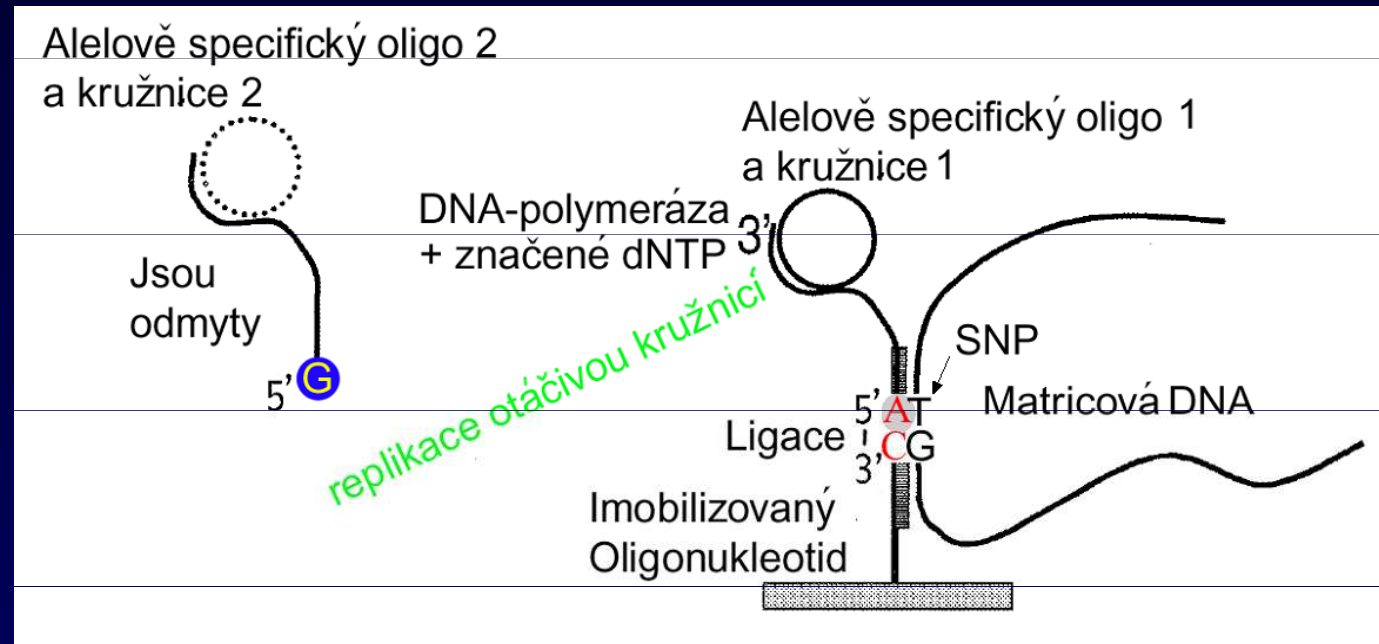


## 3. Varianta – Prodloužení primerů nesoucích specifickou sekvenci na 5'-konci

- Cyklické prodloužení primeru o jeden dideoxynukleotid je prováděno s denaturovanou DNA v roztoku za přítomnosti
  - fluorescenčně značených ddNTPs,
  - DNA-polymerázy
  - primerů nesoucích na 5'-konci přídatnou sekvenci (tag).
- DNA-čip, který je komplementární k přídatným sekvencím primerů (tag array) je potom použit pro zachycení produktů cyklické minisekvenační reakce.

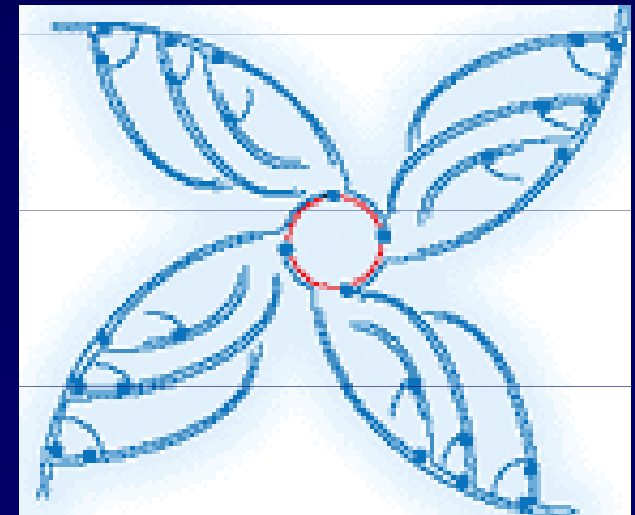
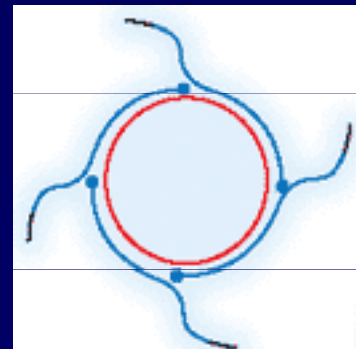
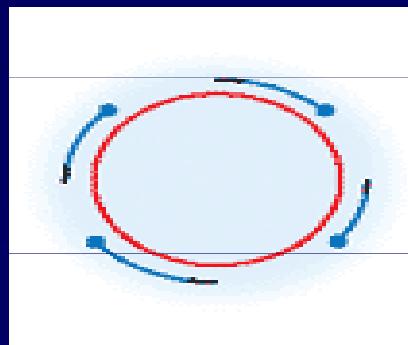
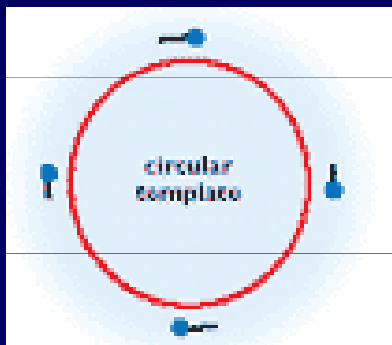
# Stanovení SNP pomocí DNA čipu - RCA (Rolling Circle Amplification)

- 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
- $\phi$ 29 DNA-polymeráza katalyzuje izotermní replikaci formou otáčivé kružnice, inkorporuje značené nukleotidy a rostoucí řetězec je vytěsňován



# 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



# Alelově specifické oligonukleotidy (ASO)

- Identifikace PCR-produktů
- Rutinně lze provádět obrácenou tečkovou hybridizací:

