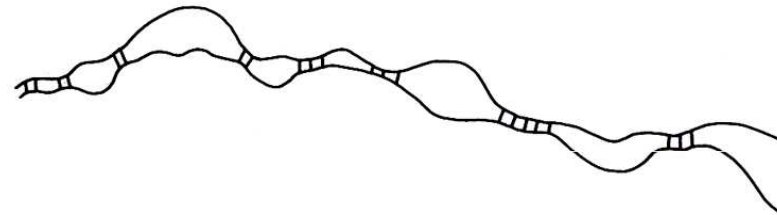


Hybridizace nukleových kyselin

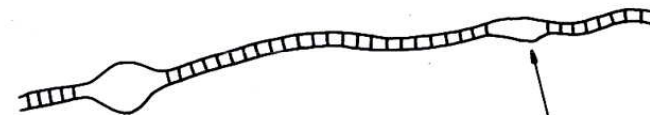
Tvorba dvouřetězcových hybridů ze dvou jednořetězcových a alespoň částečně komplementárních molekul nukleových kyselin

Založena na schopnosti **denaturace a renaturace** DNA.

(a) Nestabilní hybrid

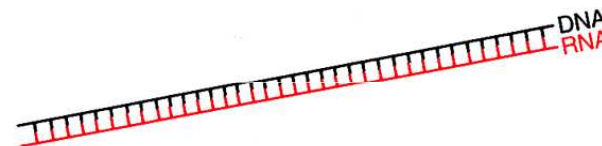


(b) Stabilní hybrid

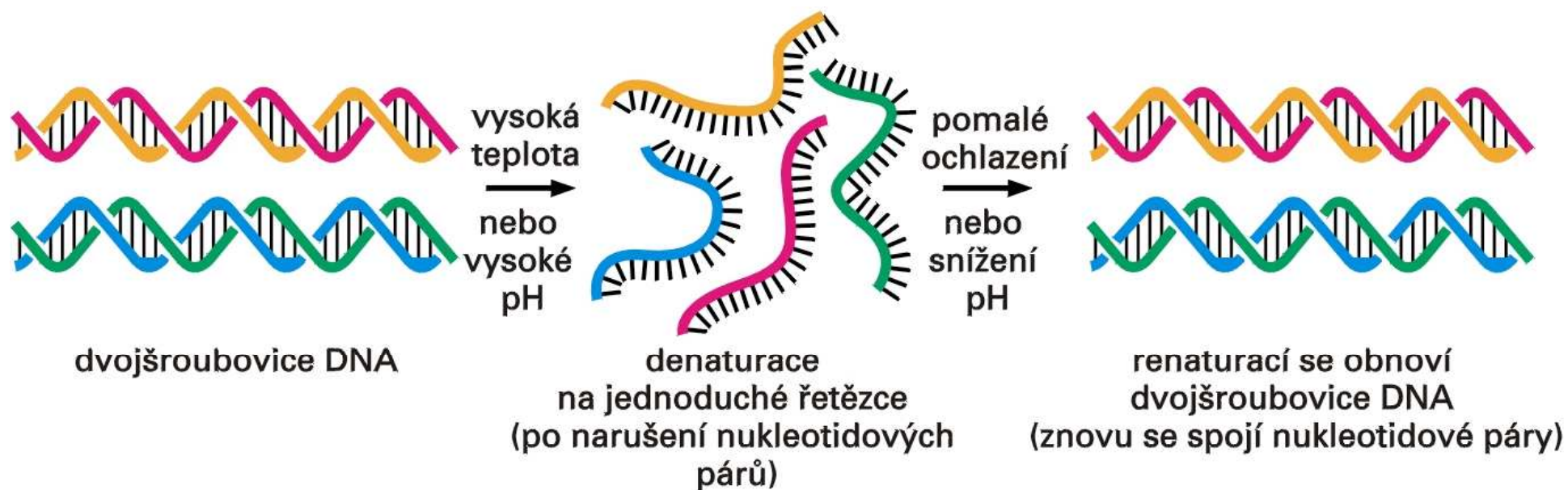


Krátké nekomplementární oblasti neovlivňují celkovou stabilitu

(c) Hybrid DNA-RNA



Denaturace a renaturace DNA

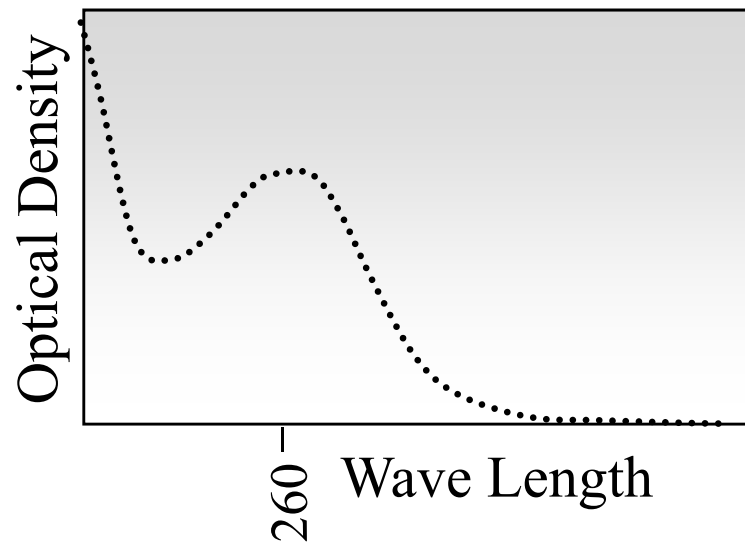


Denaturace DNA

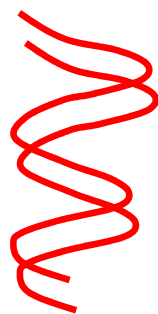
- oddělení komplementárních vláken DNA působením **vyšoké teploty** (90-100°C), extrémních hodnot **pH** nebo **denaturačních činidel** (formamid, močovina)
- změna v uspořádání bází při denaturaci zvyšuje absorpci světla při vlnové délce 260 nm (hyperchromní efekt)

Použití spektroskopie pro analýzu DNA

DNA absorbuje UV světlo při vlnové délce 260 nm



Měření absorpce lze využít, protože se mění v závislosti na struktuře DNA (&RNA):



dsDNA

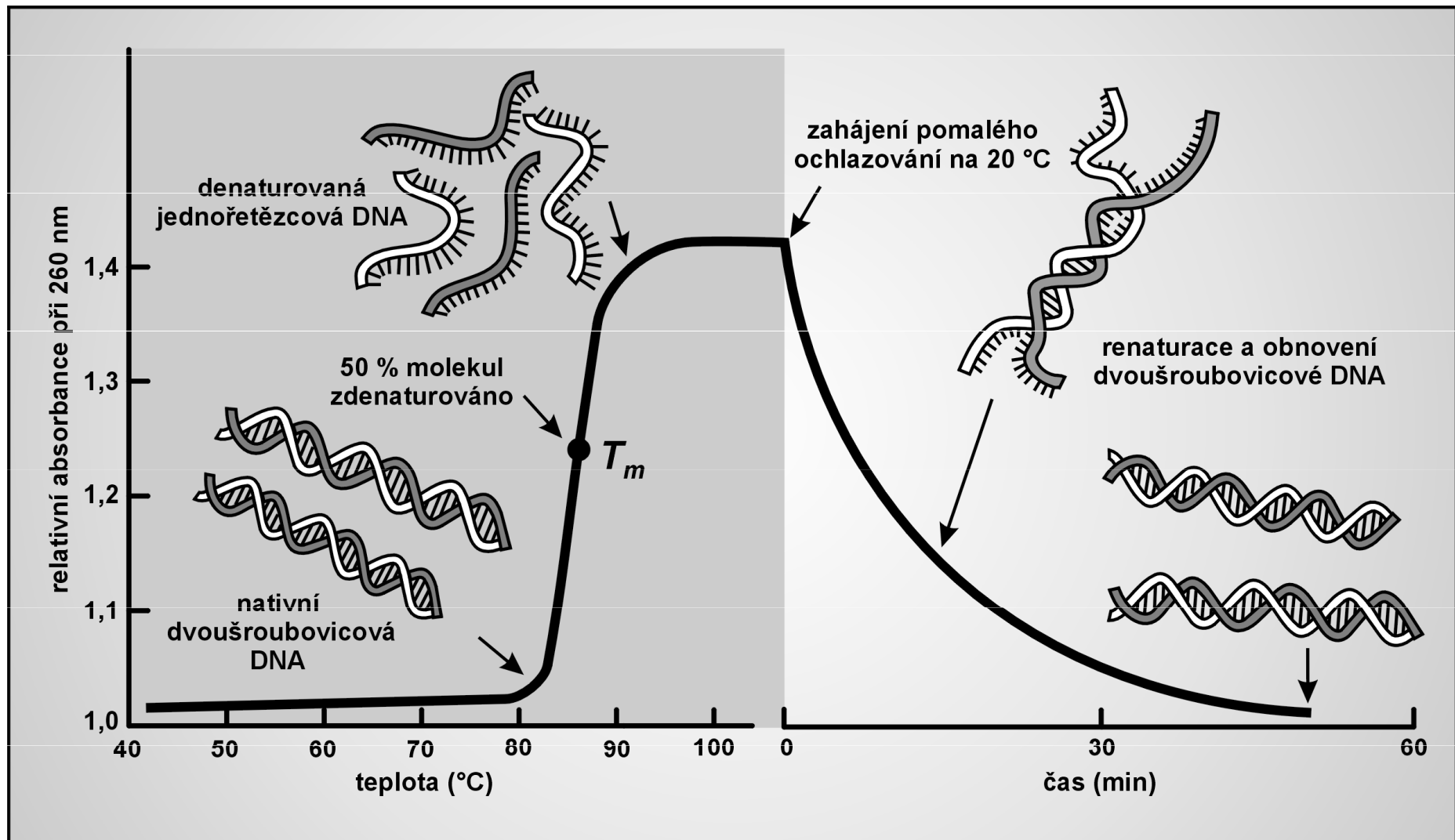
Nízký
extinkční
koeficient



ssDNA

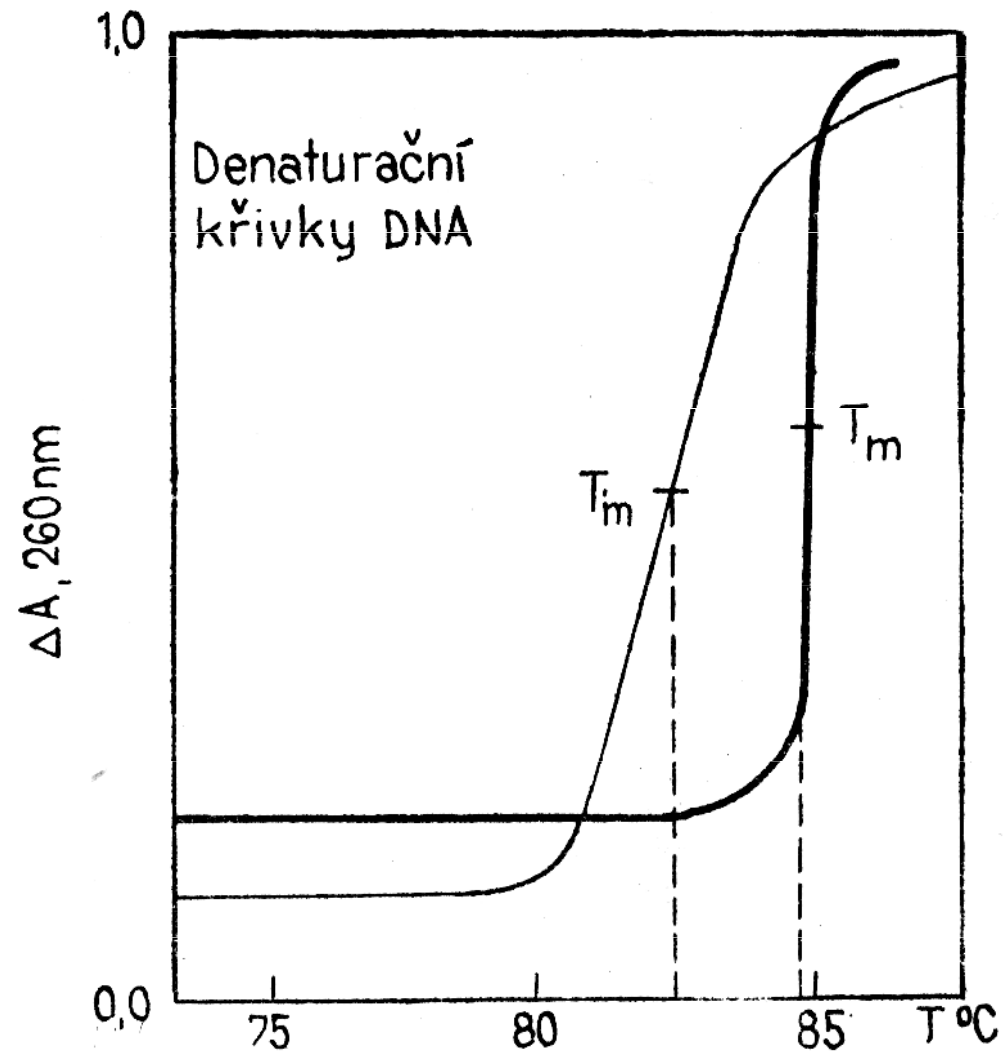
Vyšší extinkční
koeficient

Průběh denaturace i renaturace DNA lze sledovat spektrofotometricky



Teplota tání DNA T_m

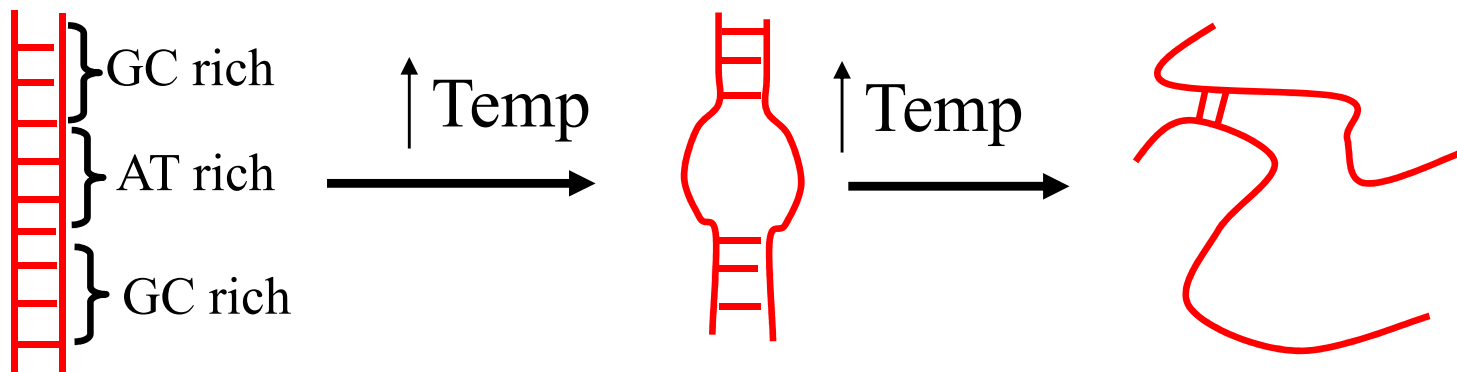
- odpovídá teplotě, kdy je molekula DNA denaturována z jedné poloviny



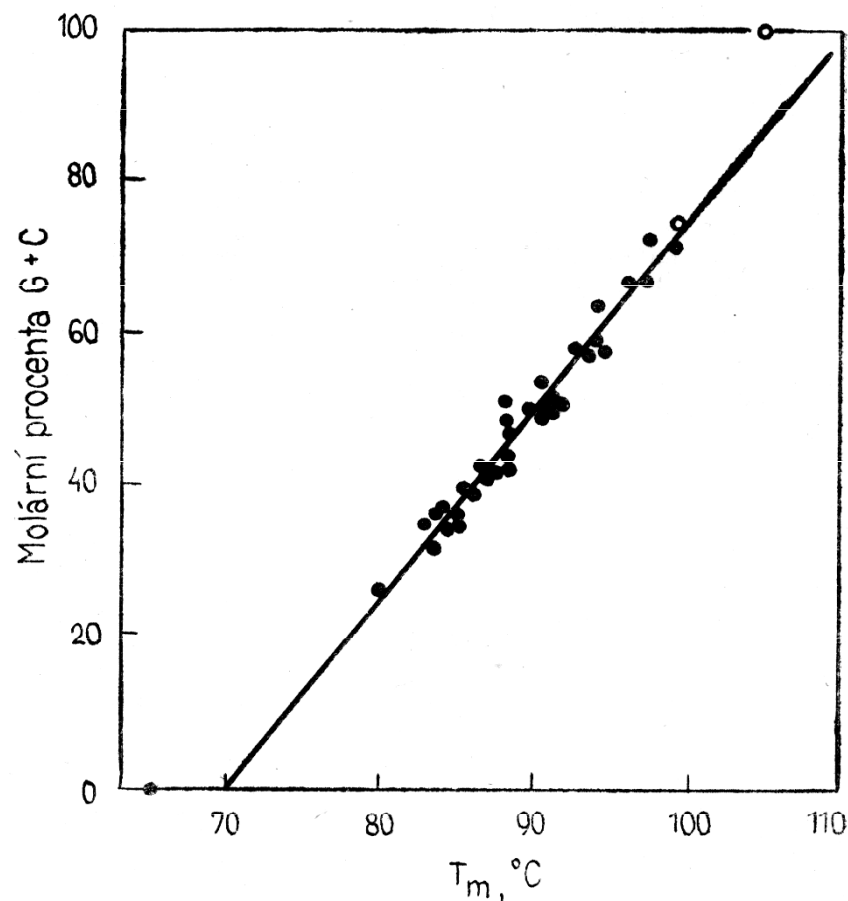
Monitorování teploty tání dsDNA

Teplota tání (denaturace) závisí na čtyřech hlavních faktorech:

- obsahu GC (a AT)
- koncentraci solí
- délce sekvence
- přítomnosti nespárovaných úseků



Teplota tání DNA T_m se lineárně zvyšuje s obsahem G+C



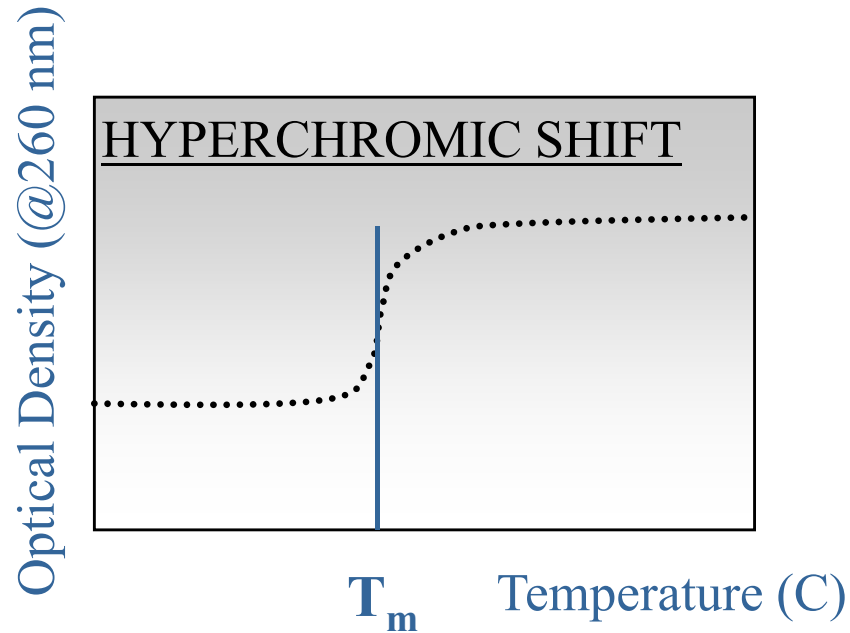
- Obsah G+C v DNA se u různých organismů pohybuje od 22% - 73%

- Vliv obsahu G+C na T_m vyplývá z faktu, že páry G-C jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami a páry A-T dvěma

Vliv dalších faktorů na denaturaci DNA

- **organická rozpouštědla** jako DMSO (dimethyl sulfoxide) a formamid přerušují vodíkové můstky mezi řetězci DNA
- **změny pH** rovněž porušují vodíkové můstky
- **snížení obsahu solí** odstraňuje ionty, které poskytují „ochranu“ negativním nábojům v molekule DNA (eliminace vzájemného ovlivňování nabitých skupin): DNA lze denaturovat při nižší teplotě

Hyperchromní efekt



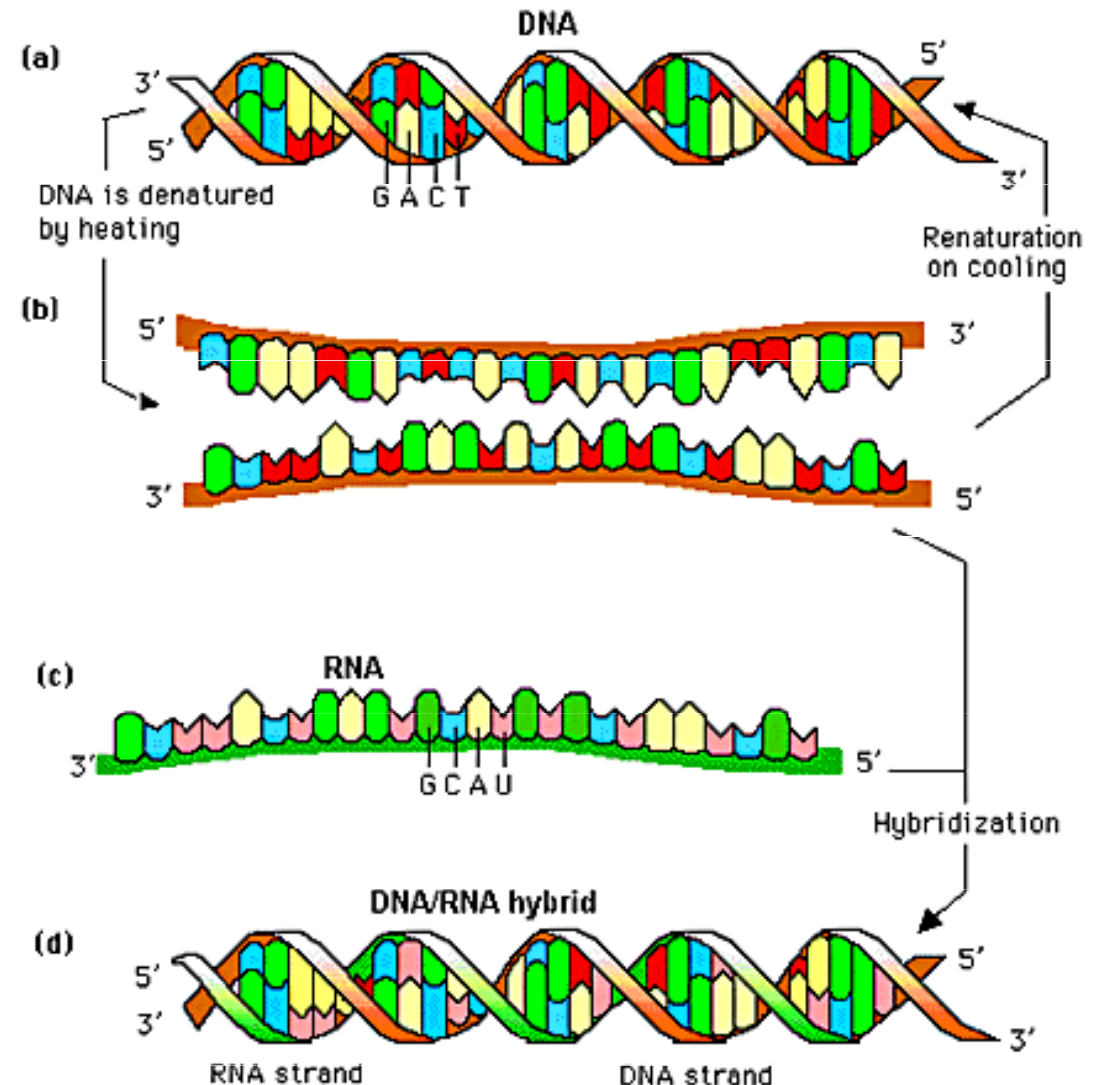
- Spojené řetězce snižují absorbanci
- Při denaturaci absorbance stoupá o 30-40%
- Z toho vyplývá, že řetězce drží pevně pohromadě dokud se nedosáhne T_m , pak se duplex rychle rozpadá

Renaturace

- opětná tvorba dvouřetězcových struktur z jednořetězcových polynukleotidů za vhodných připojovacích („annealing“) podmínek
- nastává při pomalém ochlazování (65°C) roztoku teplem denaturované DNA
- nenastává při prudkém ochlazení roztoku denaturované DNA
- při renaturaci se mohou tvořit hybridní molekuly DNA/DNA, RNA/RNA i DNA/RNA
- rozsah renaturace odpovídá rozsahu komplementarity sekvencí

Faktory ovlivňující tvorbu hybridů

- teplota
- koncentrace solí
- stupeň komplementarity
- délka fragmentů



Nucleic Acid Hybridization

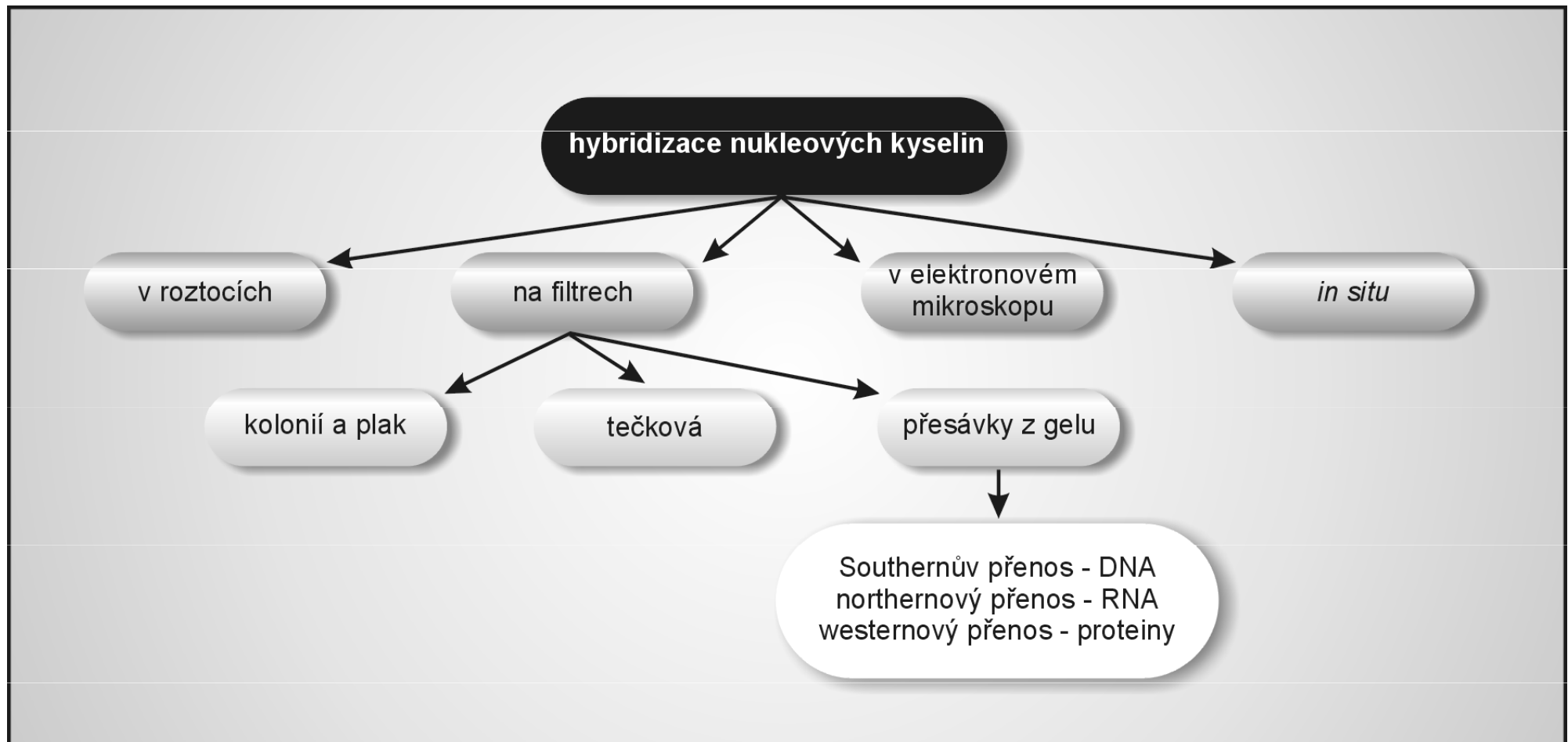
Využití hybridizace nukleových kyselin

- **test komplementarity** sekvencí (ve směsi mnoha molekul DNA budou hybridizovat jen ty, které jsou dostatečně komplementární)
- **detekce molekul DNA a RNA**, které jsou komplementární k jakékoliv izolované nukleové kyselině
- základem hybridizace je obvykle značená sonda o známé nukleotidové sekvenci

Faktory ovlivňující rychlost hybridizace

- velikost sondy
- teplota
- iontová síla roztoku
- stupeň komplementarity DNA a sondy
- koncentrace sondy
- komplexita sondy (přítomnost autokomplementárních sekvencí)
- nukleotidové složení sondy
- přítomnost denaturačních činidel (formamid)
- viskozita
- pH

Uspořádání hybridizačního experimentu je rozmanité podle povahy prostředí, ve kterém probíhá



Typický hybridizační experiment - Southernův přenos

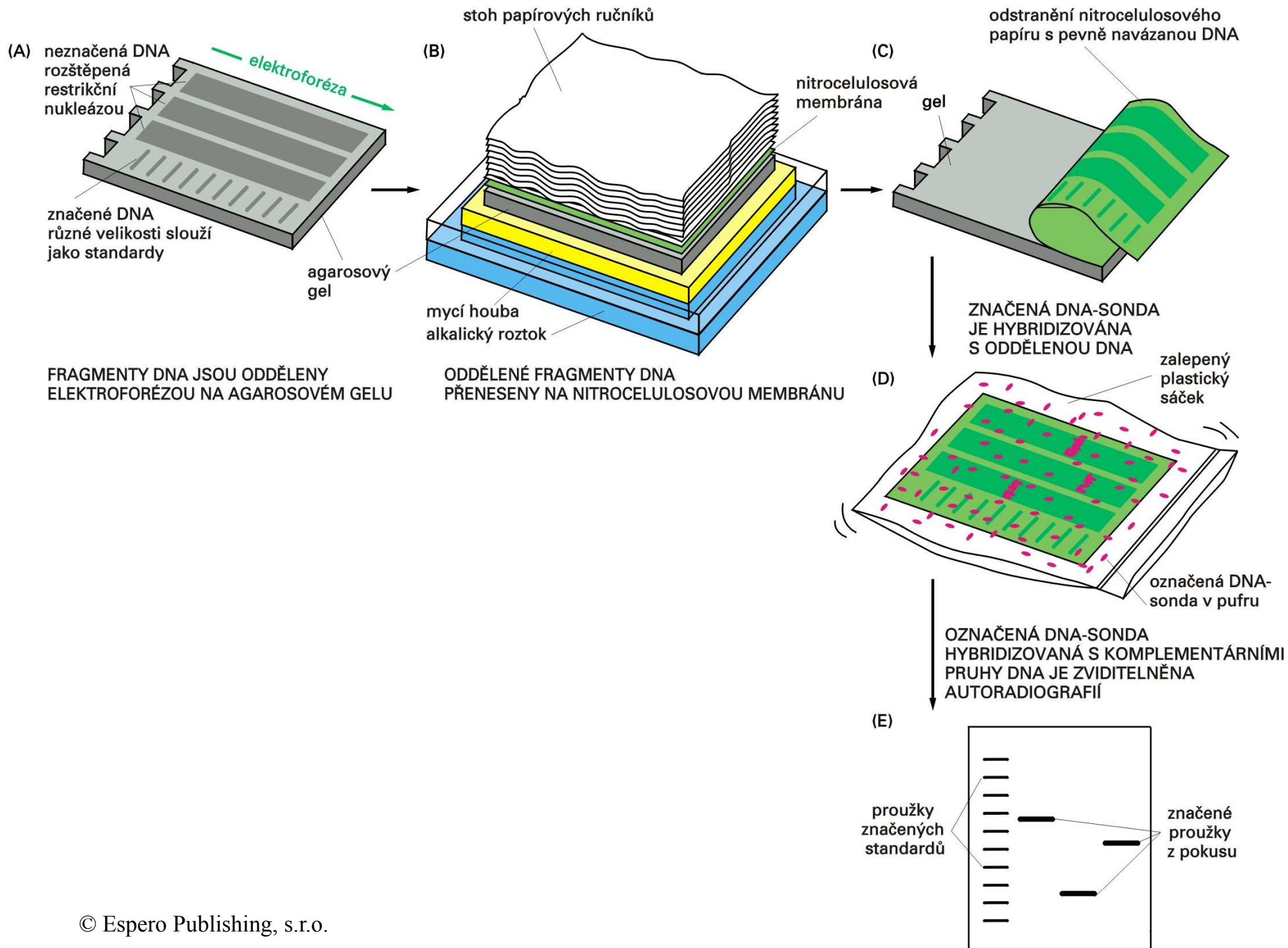
- technika vyvinuta E.M. Southernem

Běžné použití:

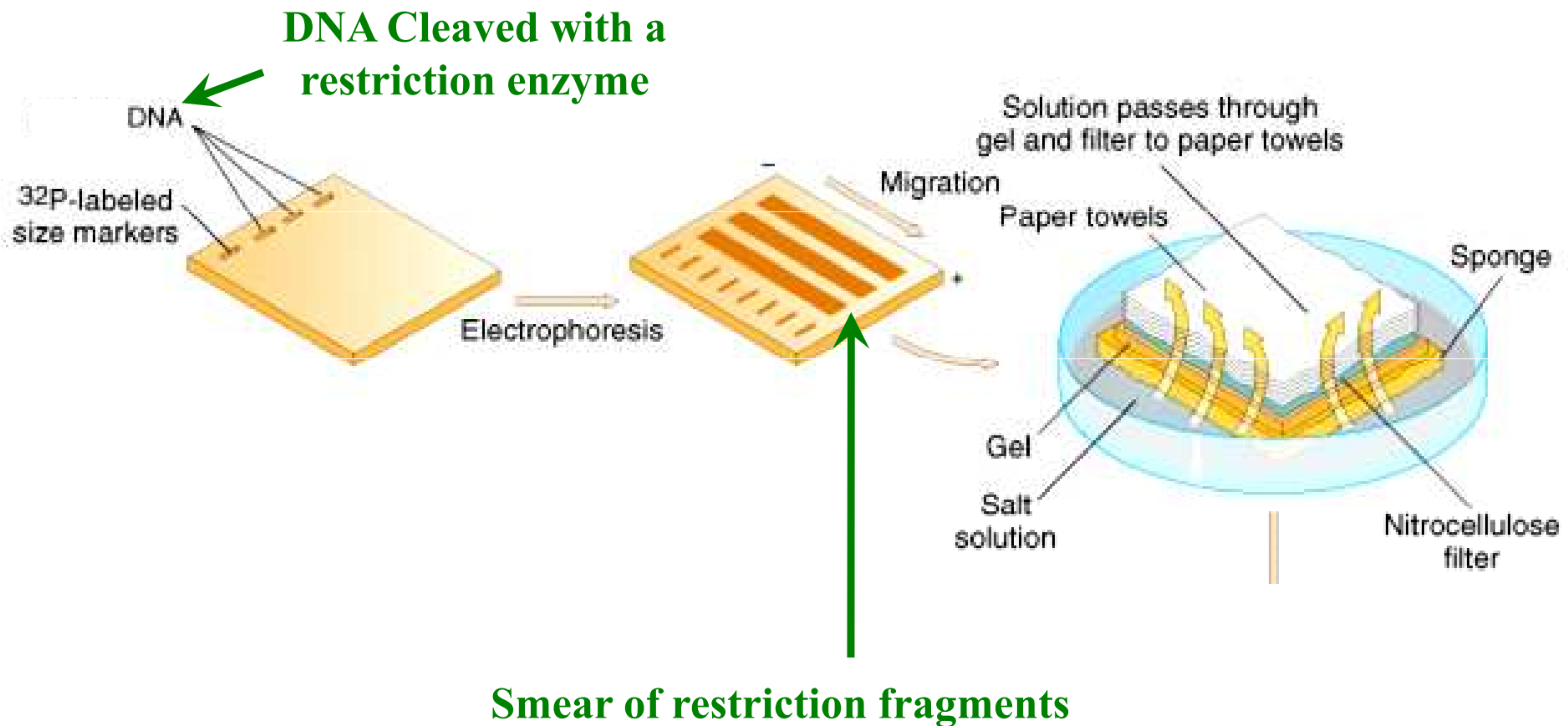
- detekce přítomnosti určitých genů v buněčné DNA
- sledování evoluční příbuznosti vzorků DNA z různých organismů

Southernův přenos - postup

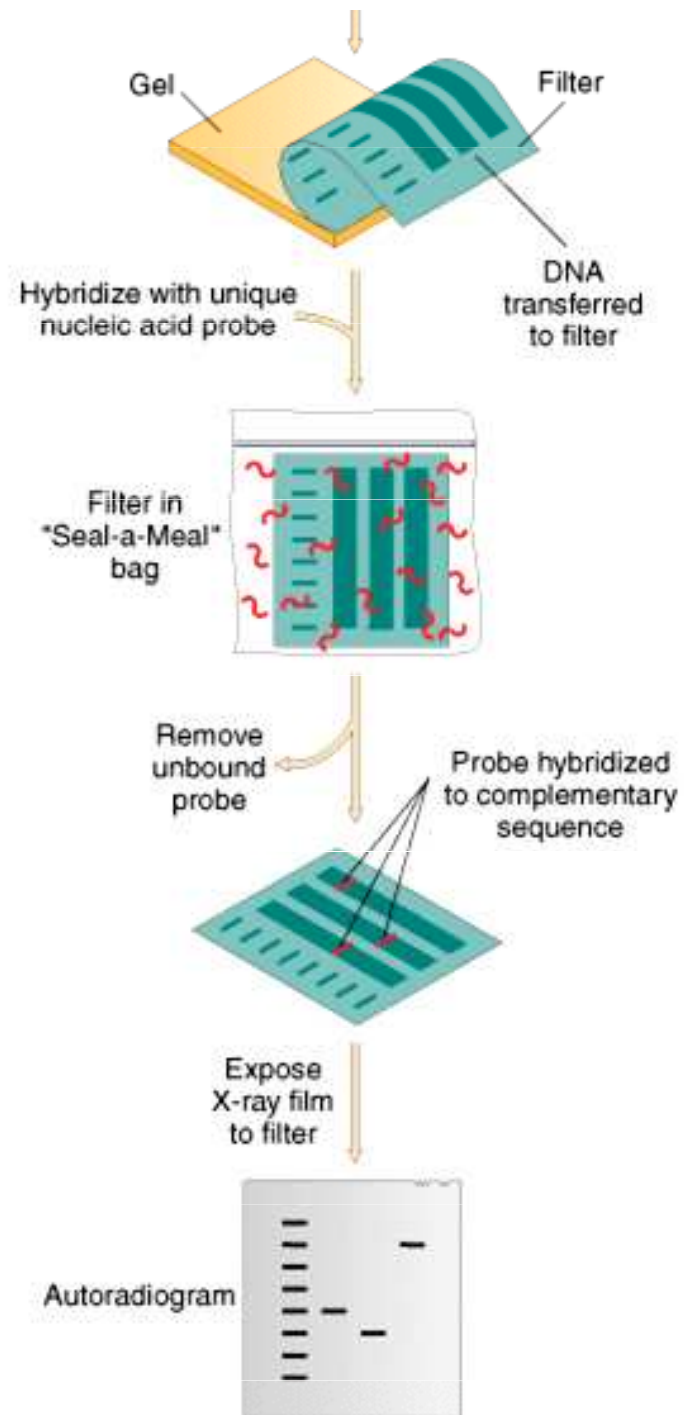
- příprava a značení sondy
- rozdělení restrikčních fragmentů DNA daného vzorku gelovou elektroforézou
- denaturace DNA a přenos jednořetězcových fragmentů DNA na nylonový filtr („blotting“ - přesávka)
- inkubace filtru se značenou jednořetězcovou sondou: hybridizace sondy s komplementární sekvencí imobilizovanou na filtru
- odmytí nenavázané sondy
- detekce navázané sondy - vizualizace hybridů (autoradiografie)



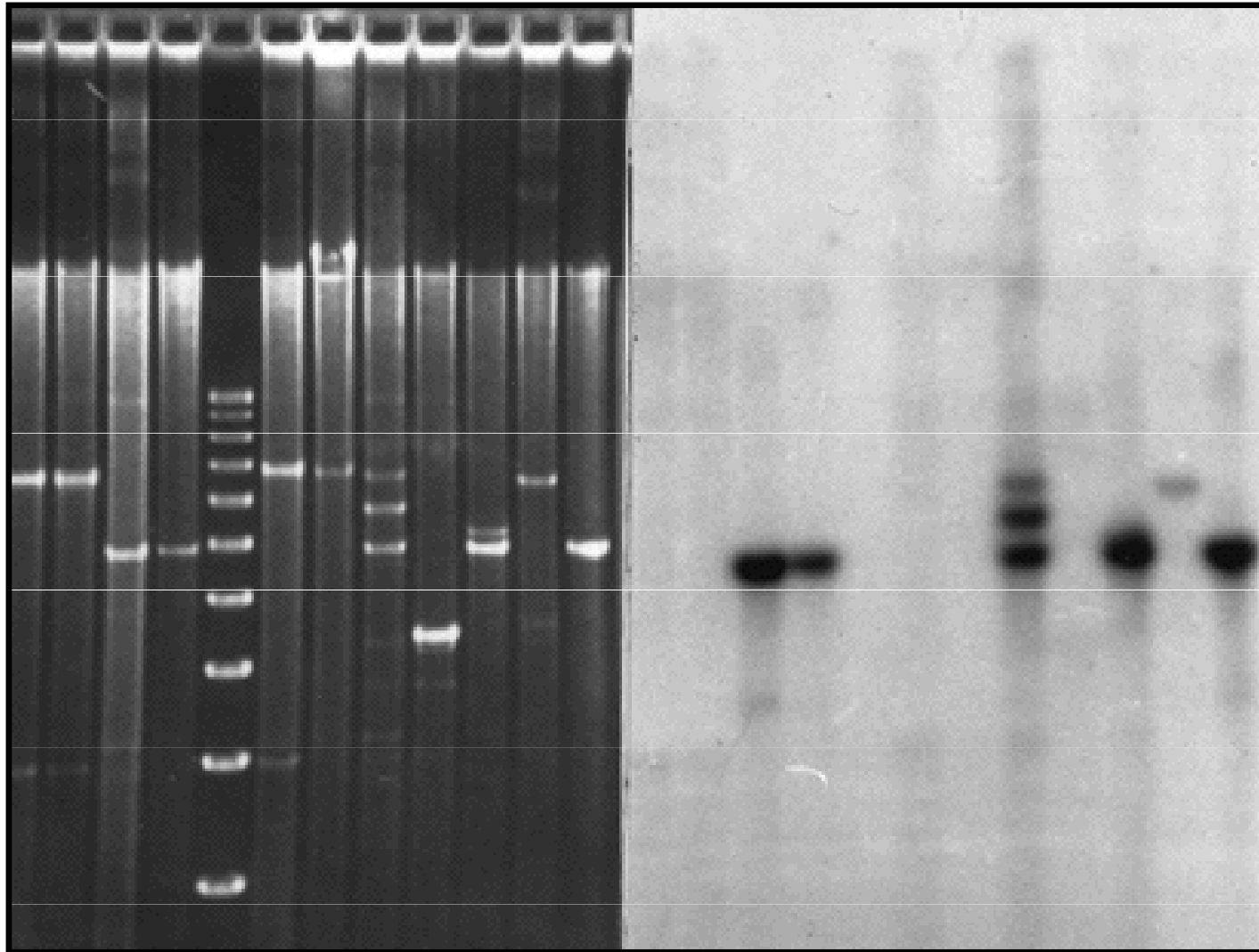
Southernův přenos - část I: gelová elektroforéza a přenos na membránu



Southernův přebos - část II: Hybridizace DNA vázané na membráně se sondou



Southernův přenos



DNA obarvená
etidium bromidem

autoradiogram

Typy sond

- restrikční fragmenty dvouřetězcové DNA
- mRNA izolovaná z buněk nebo tkání
- RNA transkripty *in vitro*
- syntetické oligonukleotidy (připravené podle sekvence aminokyselin)

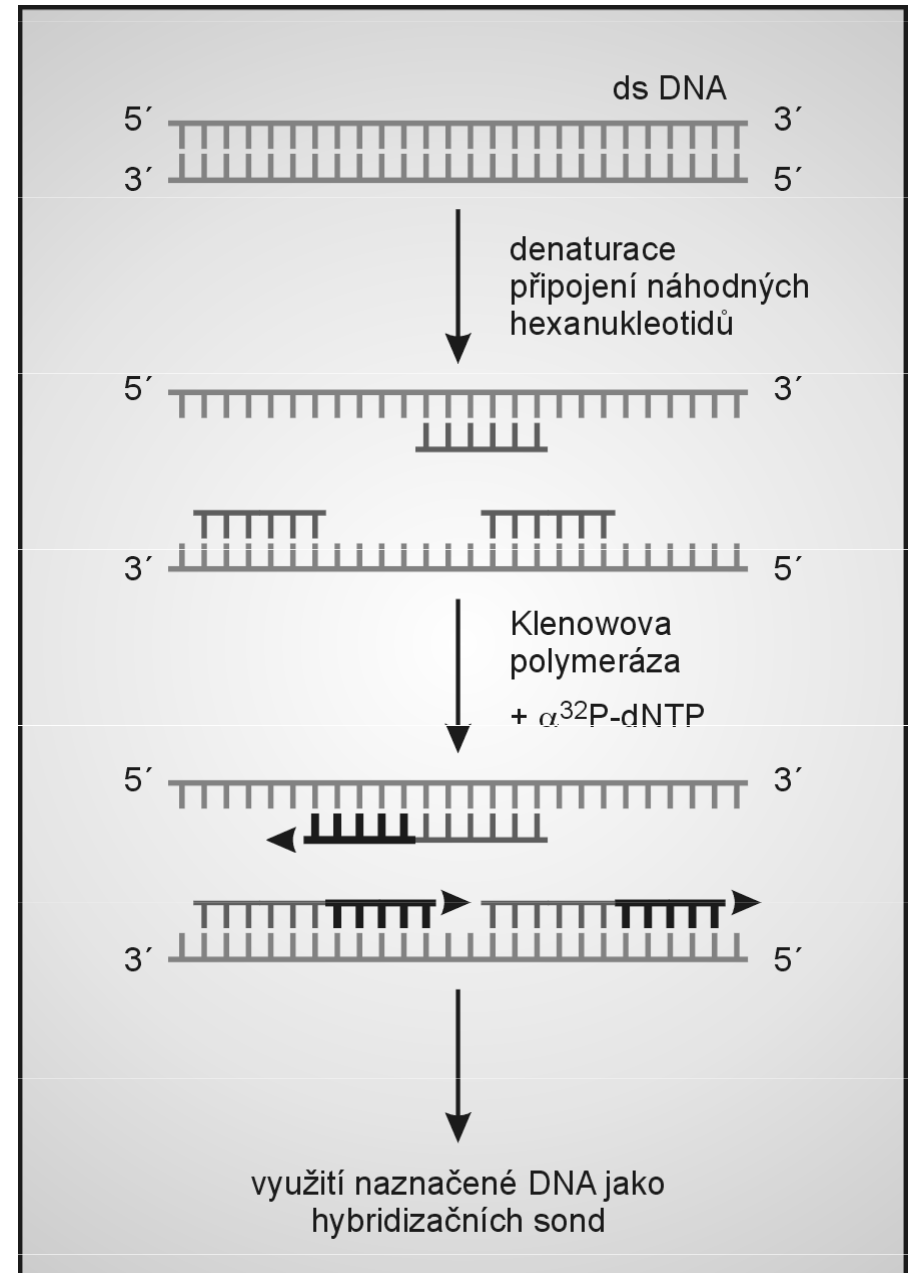
Způsoby značení sond

- prostřednictvím náhodných hexanukleotidů („random primer DNA labeling“)
- posunem jednořetězcového zlomu („nick translation“)
- koncovým značením
- značením vektoru s naklonovanou sondou
- značením transkriptů *in vitro*

Značení DNA pomocí náhodných oligonukleotidů

„Random primer DNA labeling“

- k ssDNA se přidá směs hexanukleotidů o různé sekvenci
- k těmto primerům připojuje DNA polymeráza značené nukleotidy



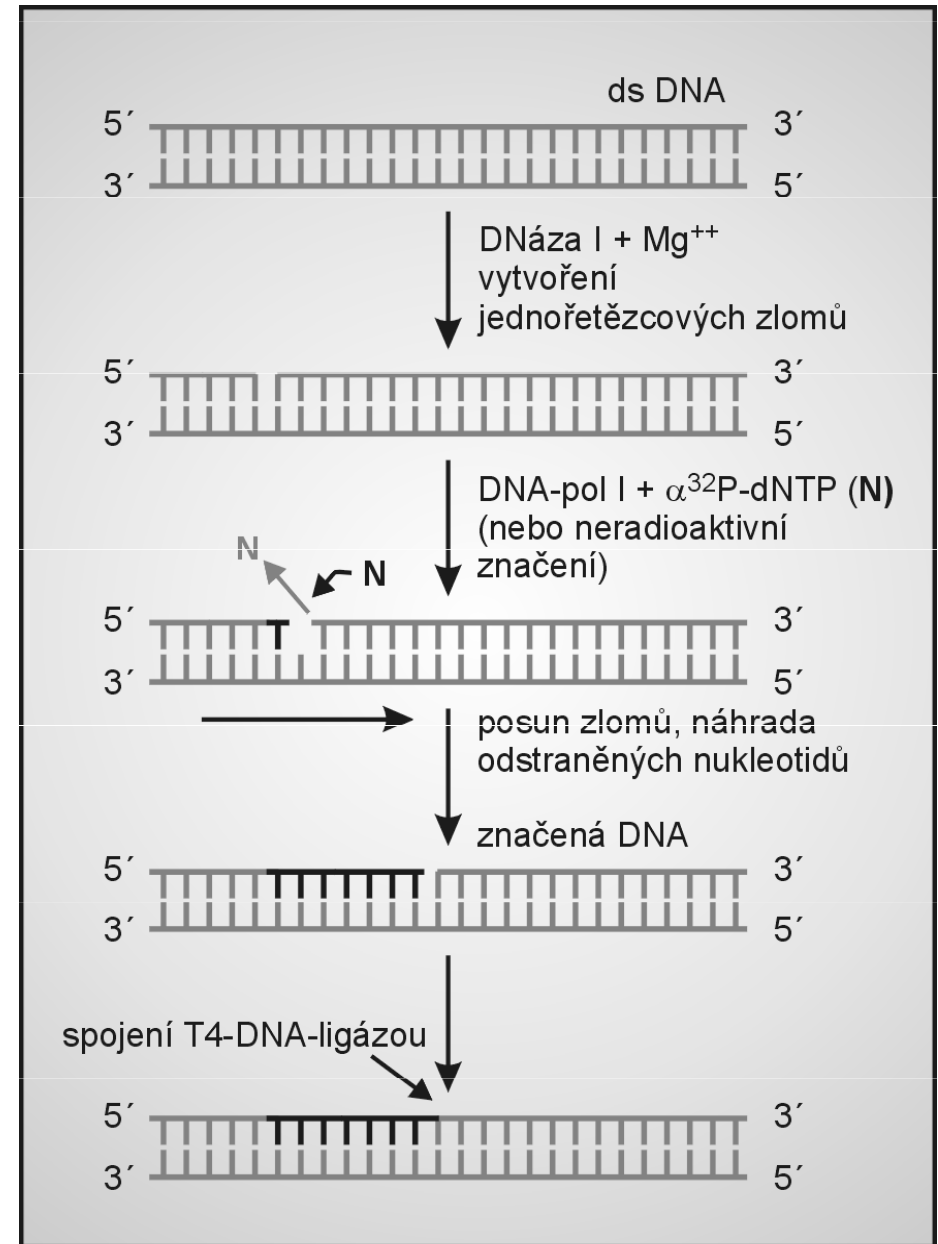
Značení DNA posunem jednořetězcového zlomu

„Nick translation“

Vytvoření náhodných jednořetězcových zlomů DNázou I

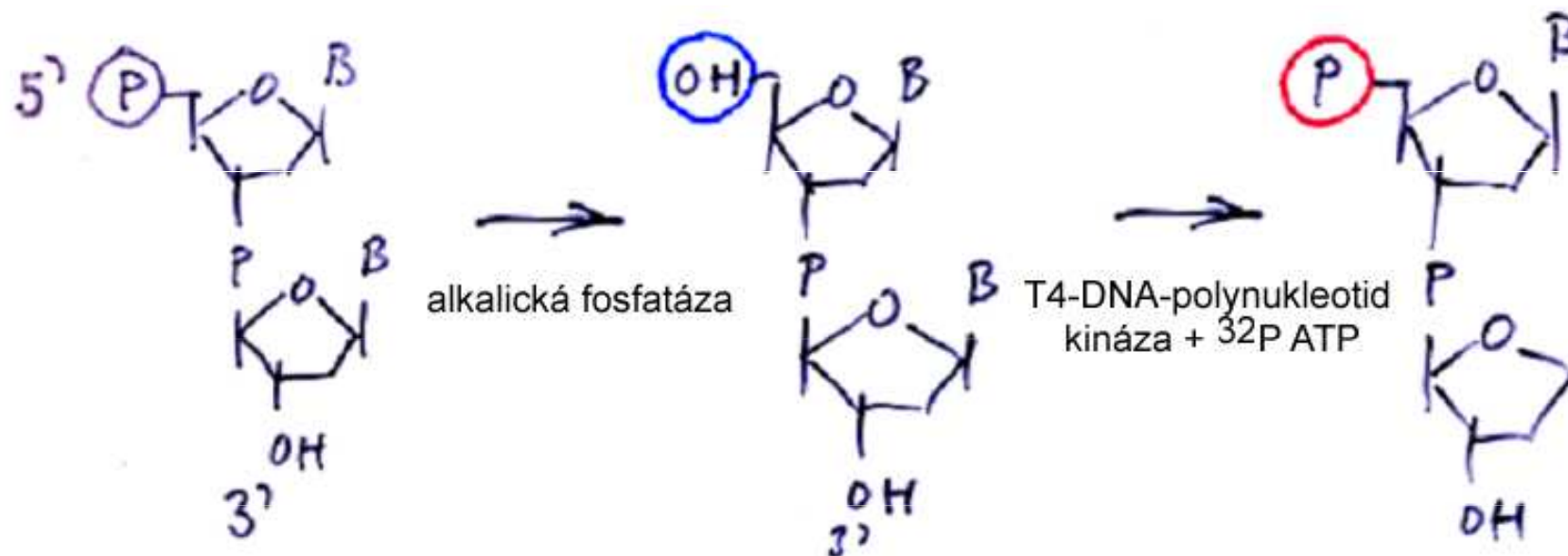
DNA polymeráza I odstraňuje nukleotidy od místa zlomu (exonukleázová aktivita 5' - 3')

Současně ve stejném směru připojuje značené nukleotidy k 3' konci zlomu



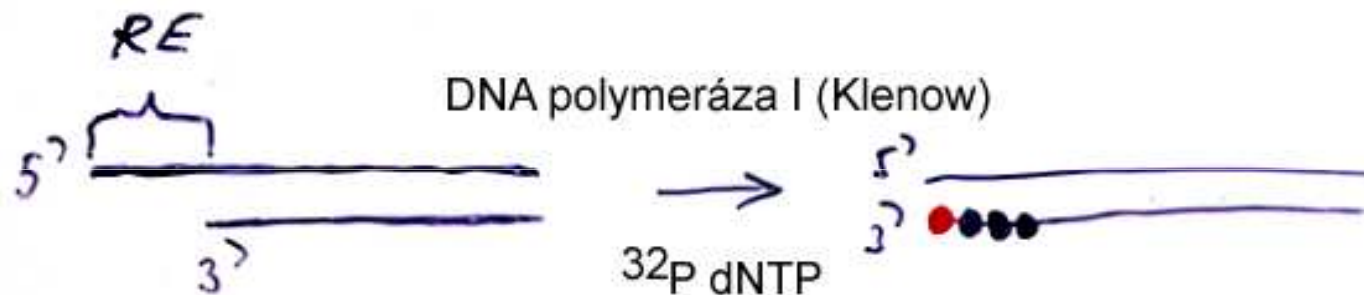
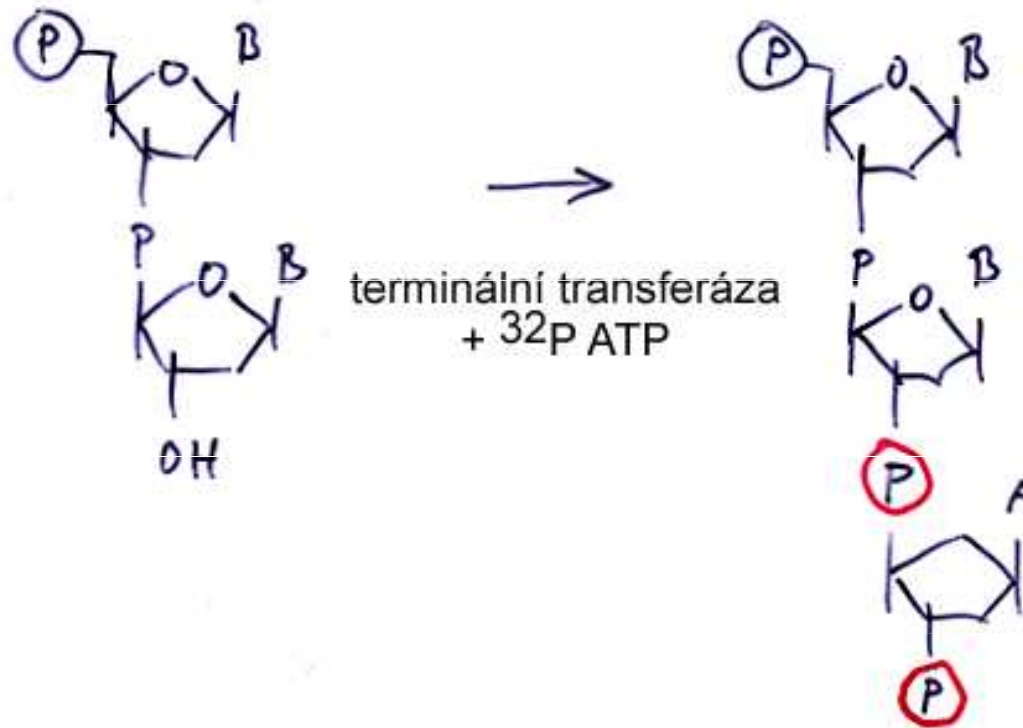
Značení konců fragmentů DNA

a) značení 5' konců

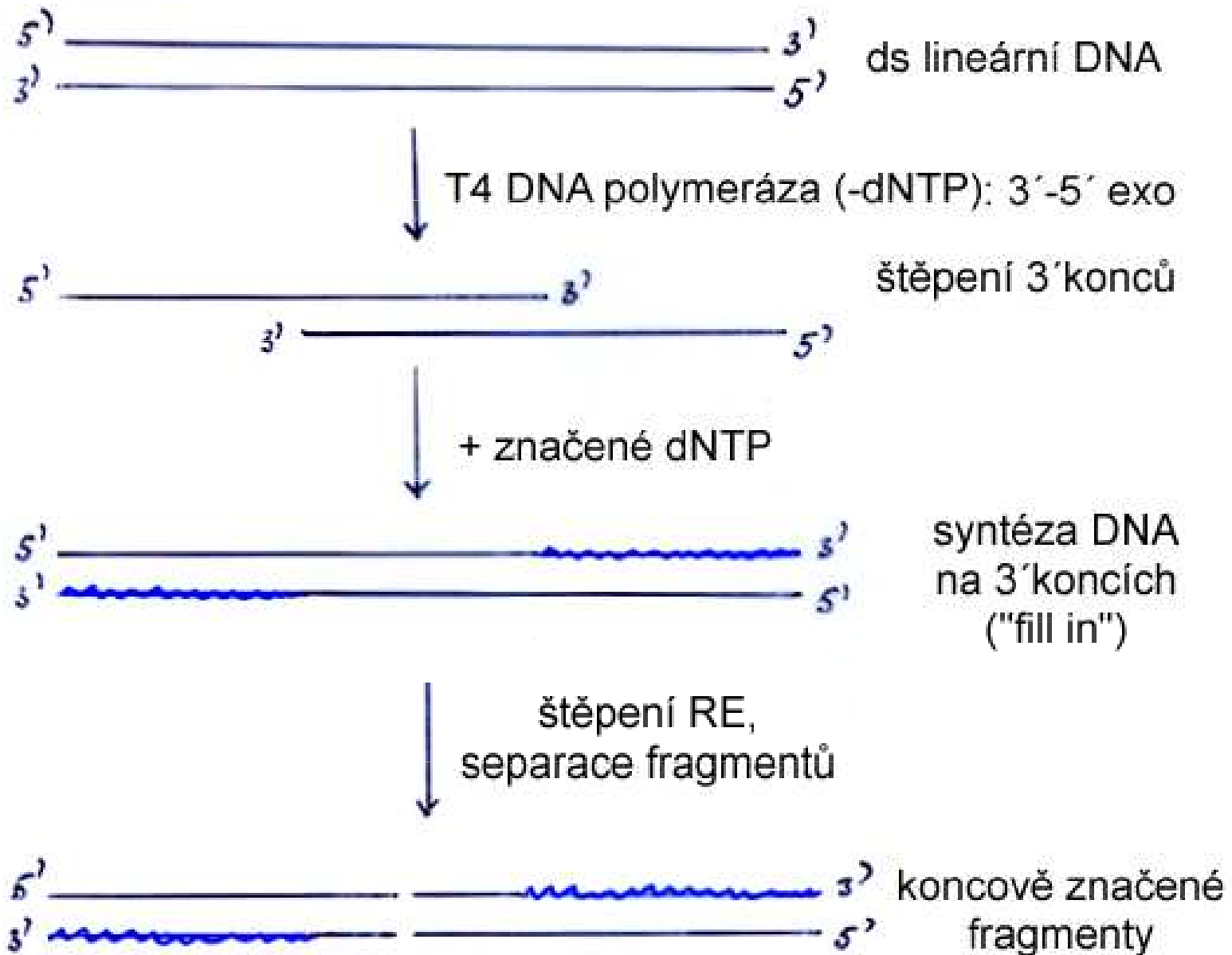


Značení konců DNA fragmentů

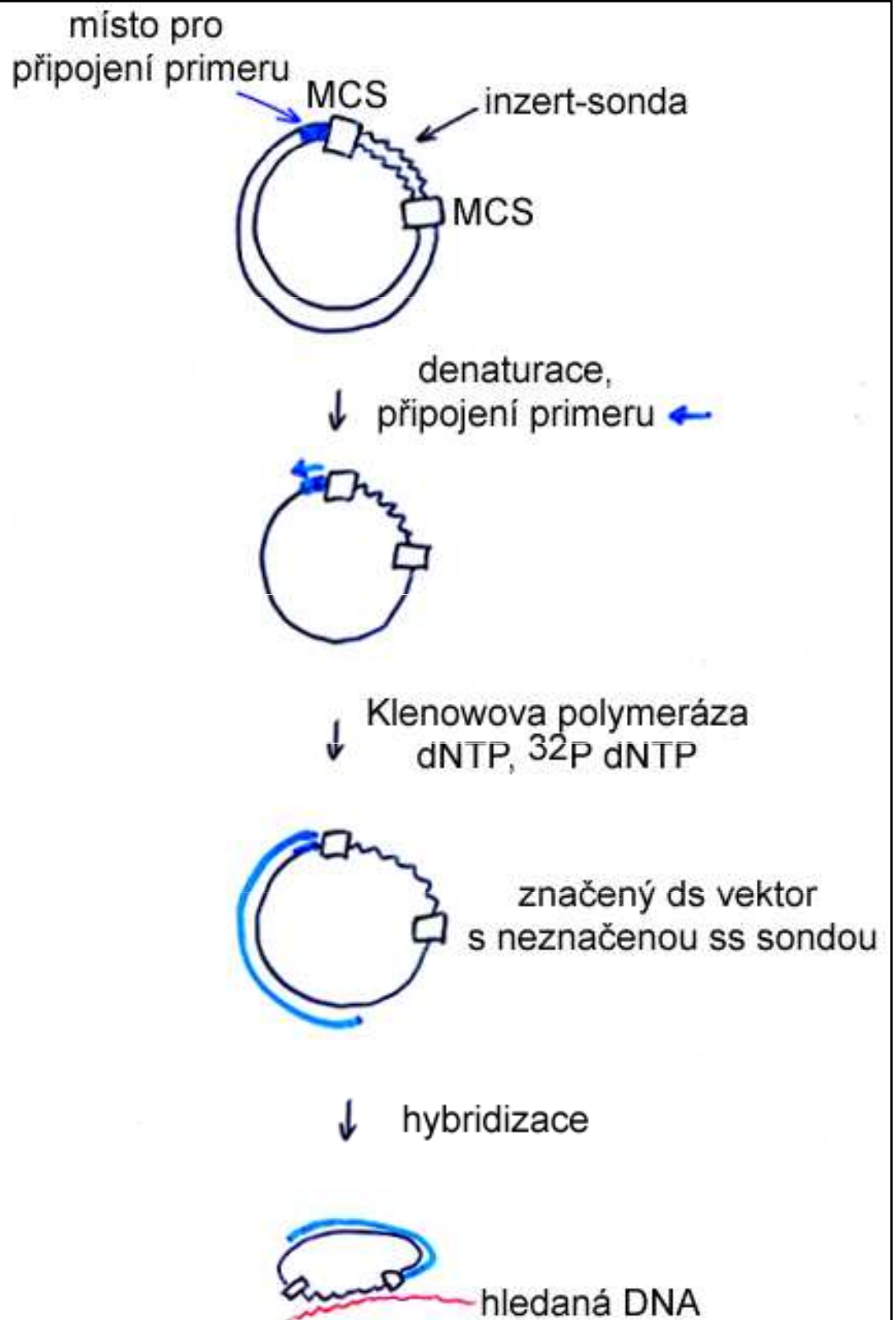
b) značení 3' konců



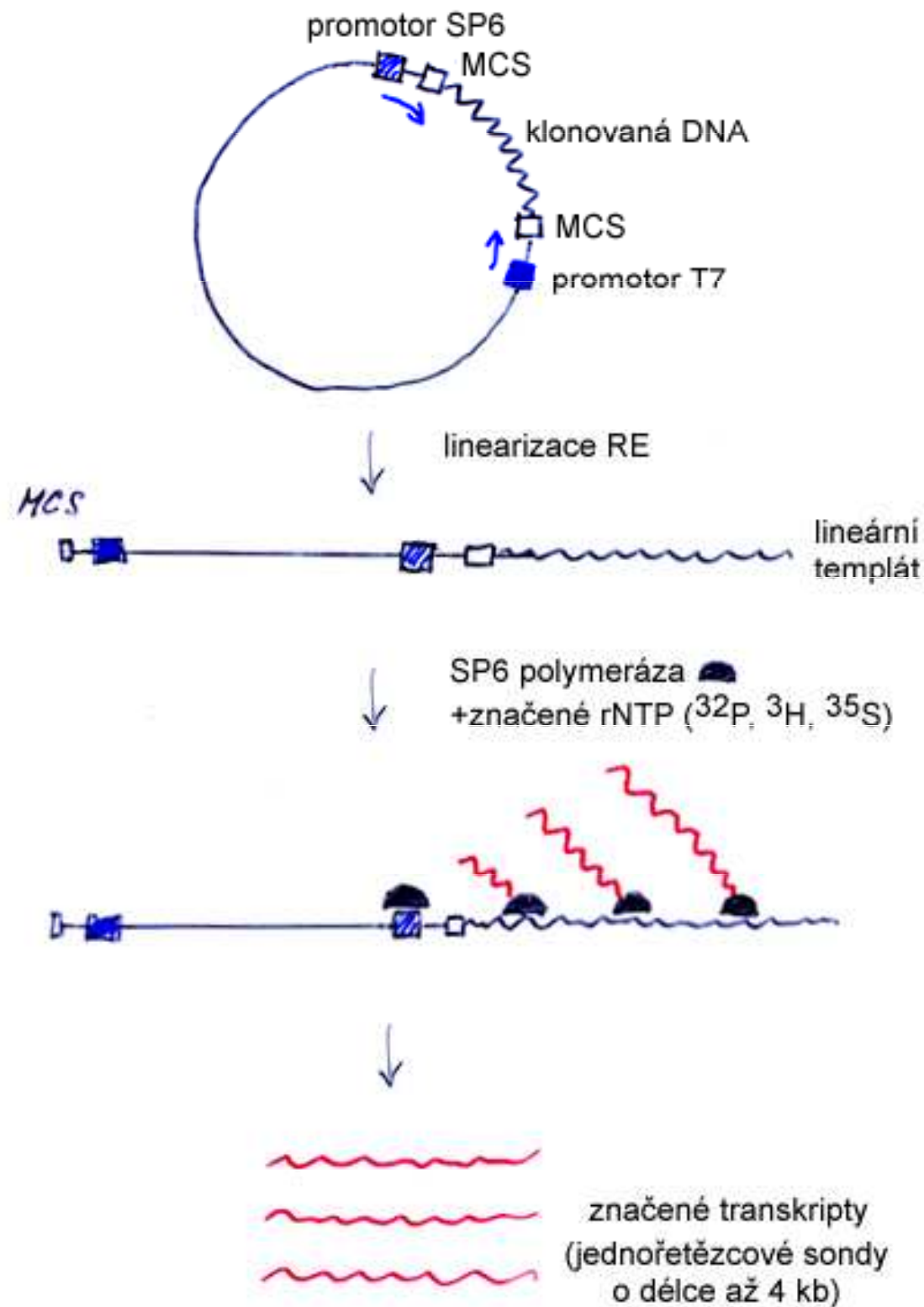
Značení 3' konců DNA T4-DNA-polymerázou



Příprava sondy značením vektoru

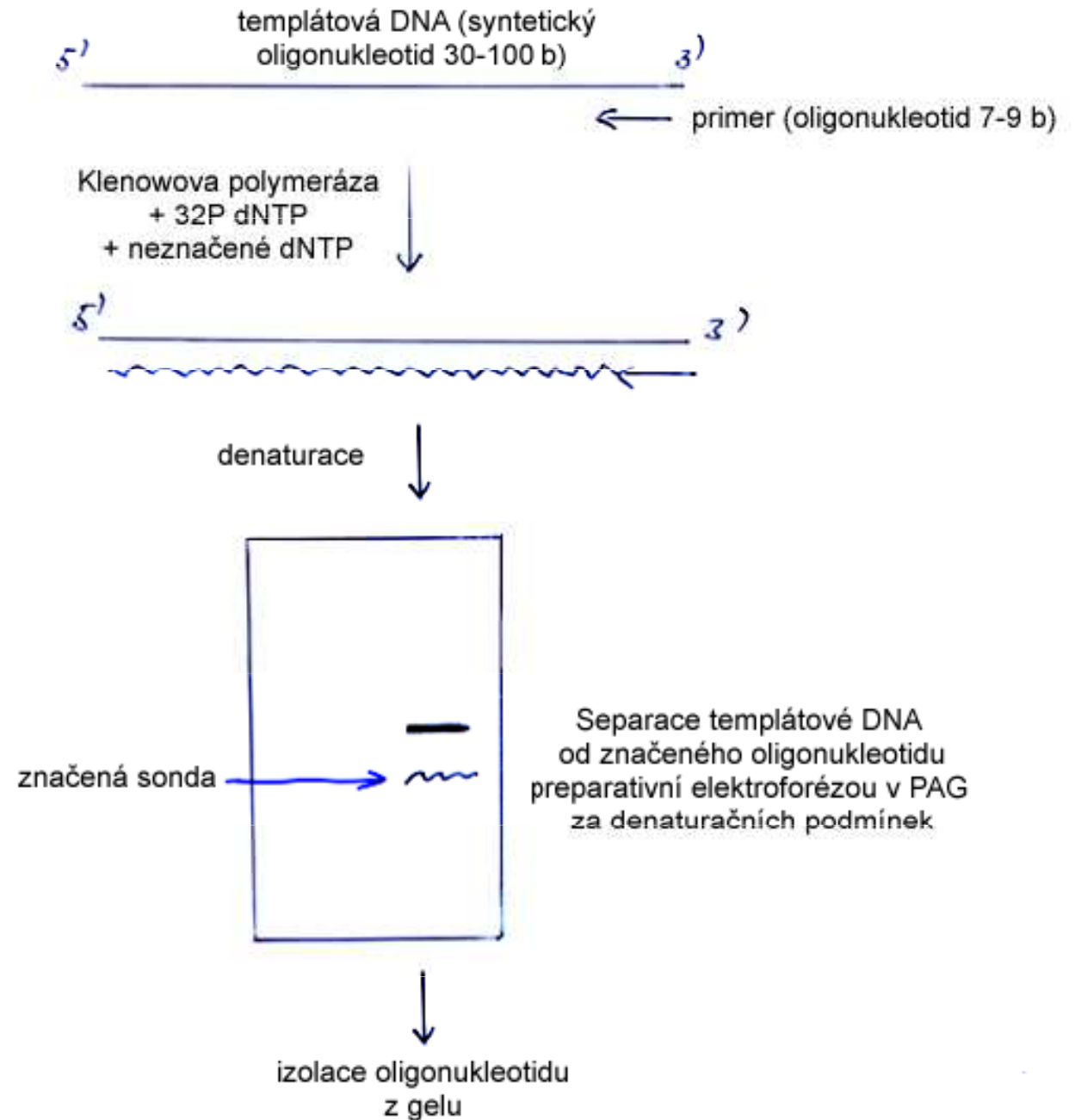


Příprava značených transkriptů



Značení syntetických oligonukleotidů

- na 5' konci T4-polynukleotid kinázou
- Klenowovou polymerázou

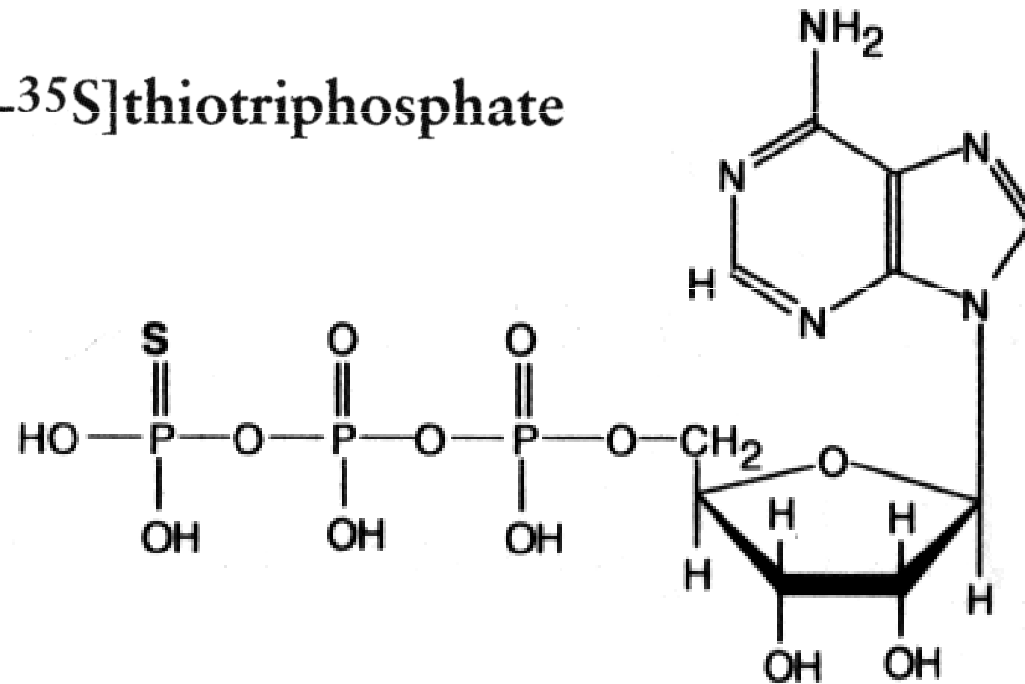


Vlastnosti radioizotopů používaných v biologickém výzkumu

| <i>Atomic number</i> | <i>Symbol and atomic weight</i> | <i>Half-life</i> | <i>Type of particle(s) emitted</i> | <i>Energy of particle (million eV)</i> |
|----------------------|---------------------------------|------------------|------------------------------------|--|
| 1 | ³ H | 12.3 yr | Beta | 0.018 |
| 6 | ¹¹ C | 20 min | Beta | 0.981 |
| | ¹⁴ C | 5700 yr | Beta | 0.155 |
| 11 | ²⁴ Na | 15.1 hr | Beta | 1.39 |
| | | | Gamma | 2.75, 1.37 |
| 15 | ³² P | 14.3 d | Beta | 1.71 |
| 16 | ³⁵ S | 87.1 d | Beta | 0.167 |
| 19 | ⁴² K | 12.4 hr | Beta | 3.58, 2.04 |
| | | | Gamma | 1.395 |
| 20 | ⁴⁵ Ca | 152 d | Beta | 0.260 |
| 26 | ⁵⁹ Fe | 45 d | Beta | 0.460, 0.26 |
| | | | Gamma | 1.30, 1.10 |
| 27 | ⁶⁰ Co | 5.3 yr | Beta | 0.308 |
| | | | Gamma | 1.317, 1.115 |
| 29 | ⁶⁴ Cu | 12.8 hr | Beta | 0.657, 0.571 |
| | | | Gamma | 1.35 |
| 30 | ⁶⁵ Zn | 250 d | Beta | 0.32 |
| | | | Gamma | 1.11 |
| 53 | ¹³¹ I | 8.0 d | Beta | 0.605, 0.250 |
| | | | Gamma | 0.164, etc. |

Izotop síry lze využít při značení nukleových kyselin

Adenosine 5'-[γ - ^{35}S]thiotriphosphate



Radioaktivita

- vyplývá z nestabilní kombinace protonů a neutronů v izotopech
- atom má tendenci se rozpadnout a dostat se do stabilnější konfigurace
- rozpad radioaktivních izotopů vede k uvolnění energie ve formě záření, které lze monitorovat

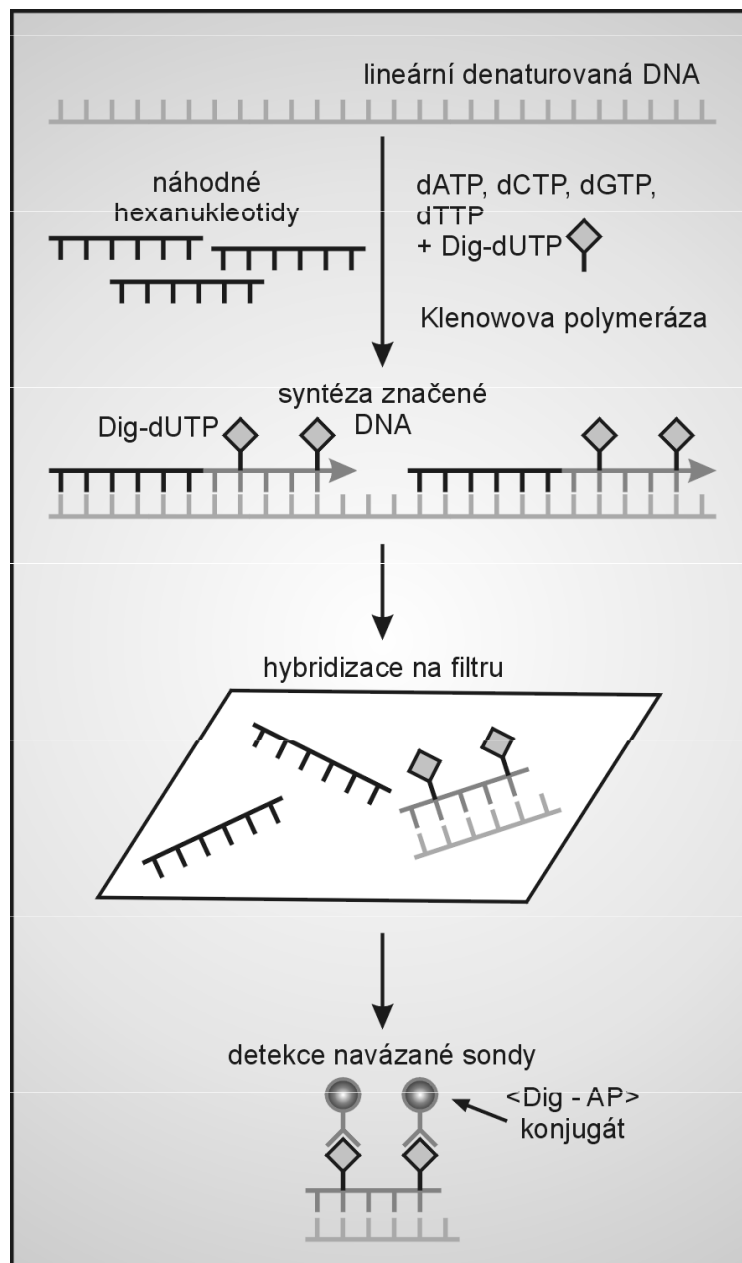
Detekce radioizotopů

- kvalitativní: autoradiografie
- kvantitativní:
 - počítače Geiger
 - tekutá scintilační spektrometrie

Neradioaktivní značení sond DNA

- digoxineninem
- biotinem
- fluorescenčními značkami

Neradioaktivní značení nukleových kyselin digoxigeninem



Detekce digoxigeninu

- protilátkou s navázanou alkalickou fosfatázou (AP)

Substrát pro AP: A) X-fosfát + NBT
B) chemoluminiscenční látka

Detekce: A) barevná reakce
B) zachycení uvolněného světla na filmu

Neradioaktivní značení nukleových kyselin biotinem

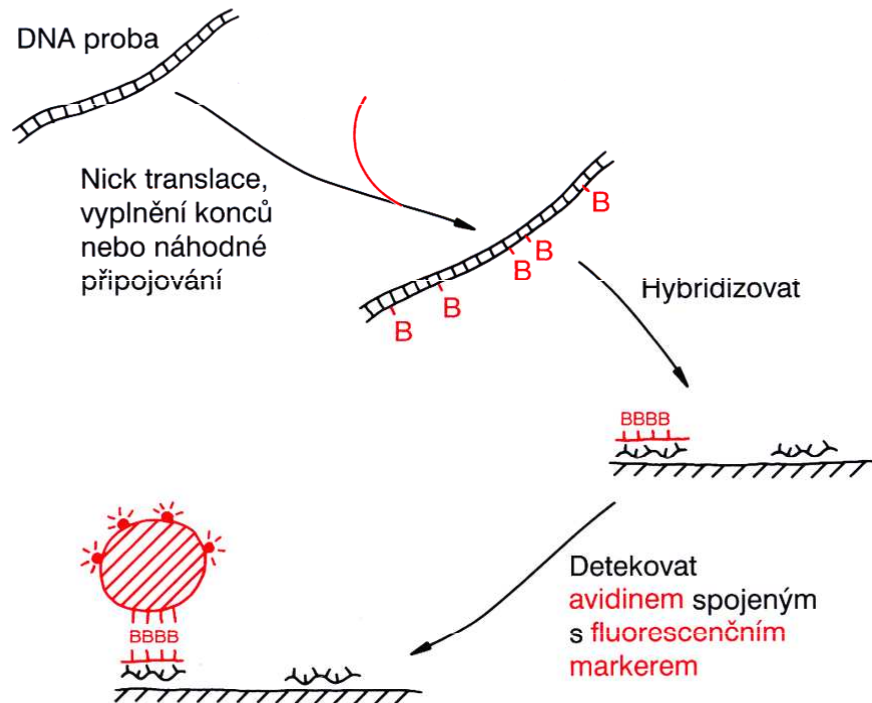
K značení NK se používá např. biotin-16-dUTP (analog TTP)

Detekce DNA značené bio-dUTP:

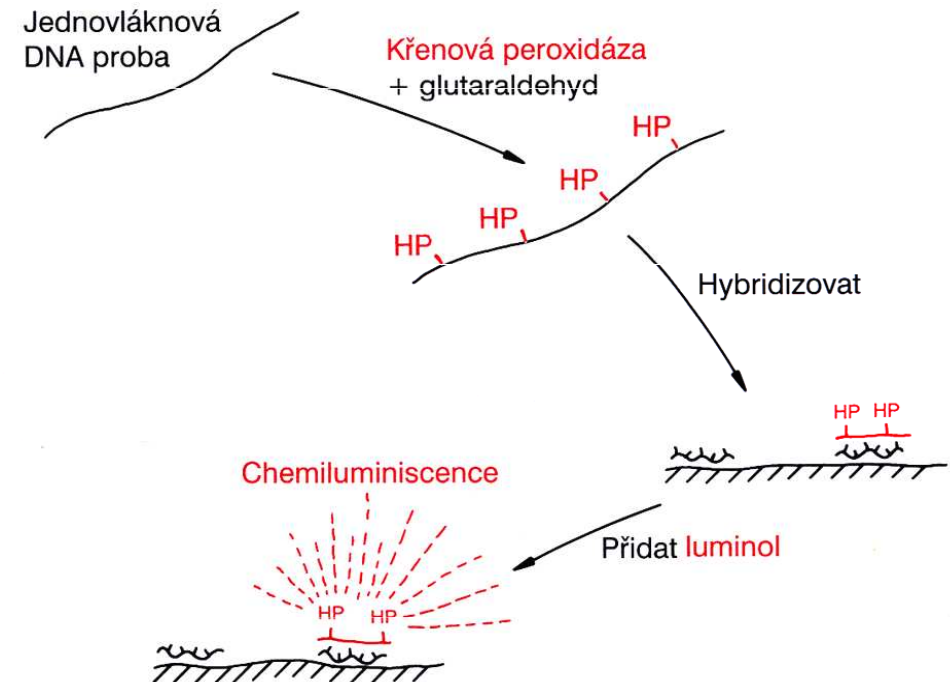
1. avidin (streptavidin) - **AP konjugát**
 - chromogenní substrát (X-fosfát + NBT)
 - barevná reakce
2. avidin (streptavidin) - **luciferáza**
 - substrát (luciferin)
 - emise světla
3. avidin (streptavidin) - **křenová peroxidáza**
 - substrát (luminol)
 - emise světla

Neradioaktivní značení nukleových kyselin biotinem

(a) Označení pomocí biotinovaných nukleotidů



(b) Označení křenovou peroxidázou



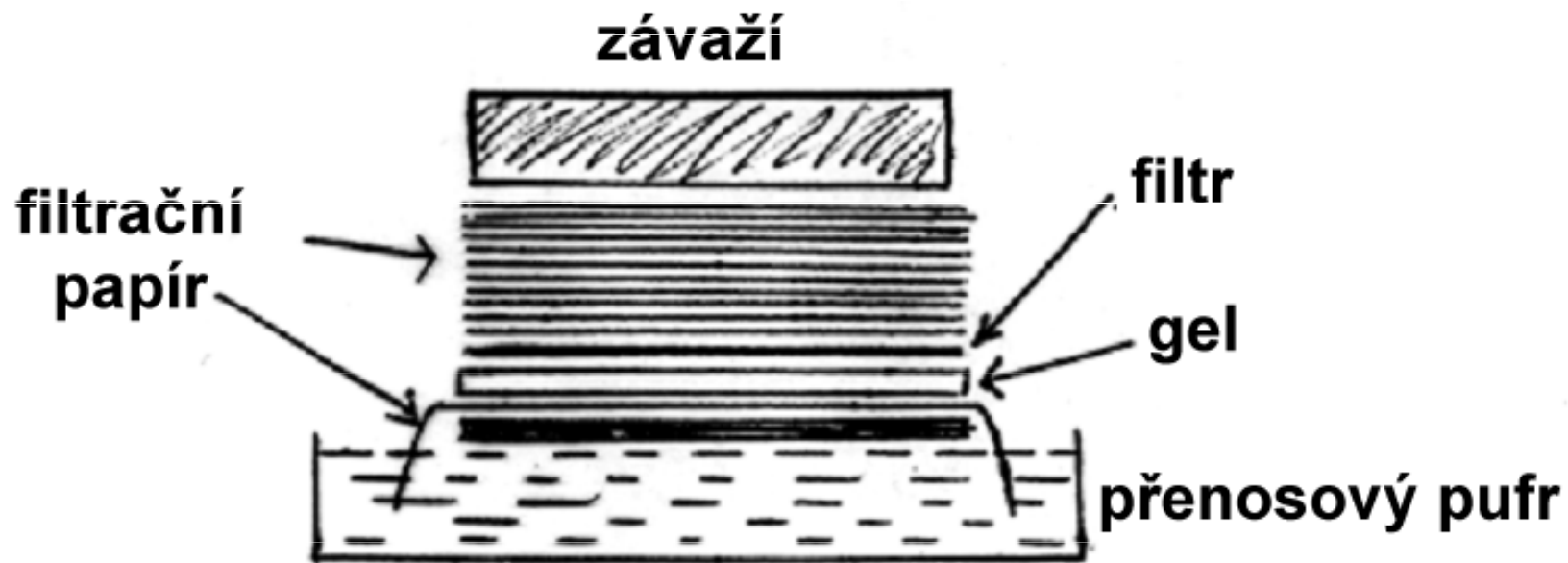
Typy filtrů pro přenos nukleových kyselin

- nitrocelulóзовые filtry (0,1-0,45 μm)
- nylonové membrány (0,1-0,45 μm)
- chemicky modifikovaný papír nebo celulóza
(DBM - diazobenzylxymetyl,
APT-aminofenyltioester)

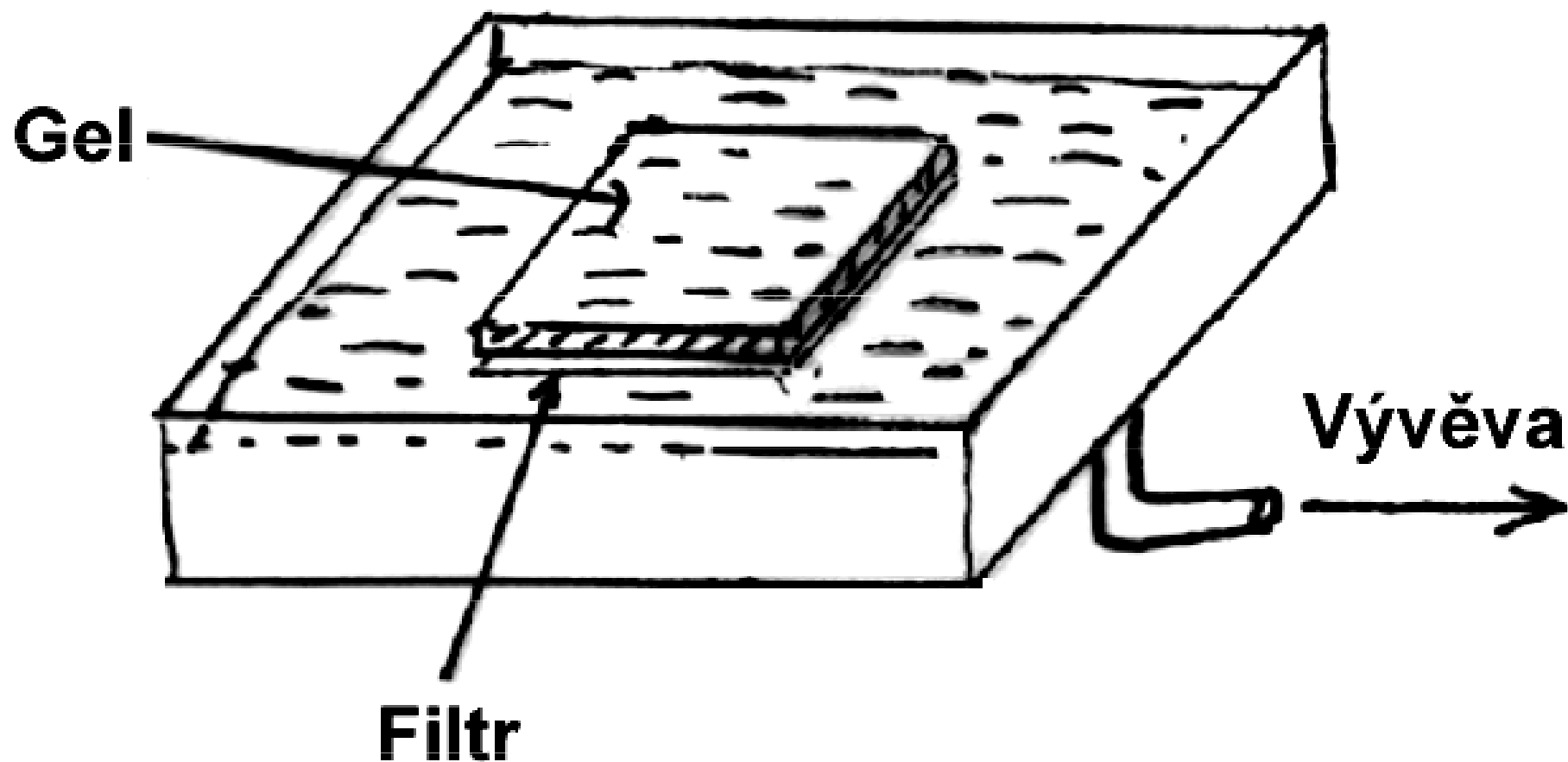
Způsoby přenosu („blotingu“)

- kapilární přenos
- elektroforetický přenos
- vakuový přenos

Kapilární přenos



Vakuový přenos



Imobilizace nukleových kyselin na filtrech

- zapékání
- „UV-crosslinking“

Hybridizační postup

- 1. Prehybridizace** - zabránění nespecifické vazbě sondy na membránu (Denhardtův roztok, BLOTTO, heparin, heterologní DNA)
- 2. Hybridizace** - navázání sondy na komplementární sekvence (68°C, 42°C s formamidem)
 - lze volit různé podmínky („stringence“)

Hybridizační postup

3. Promývání - odstranění nenavázané sondy
(účinnost je ovlivněna teplotou, koncentrací solí)

4. Detekce navázané sondy

- autoradiografie
- imunologická reakce
- barvení
- luminiscence
- fluorescence

Hybridizační postup

5. Rehybridizace

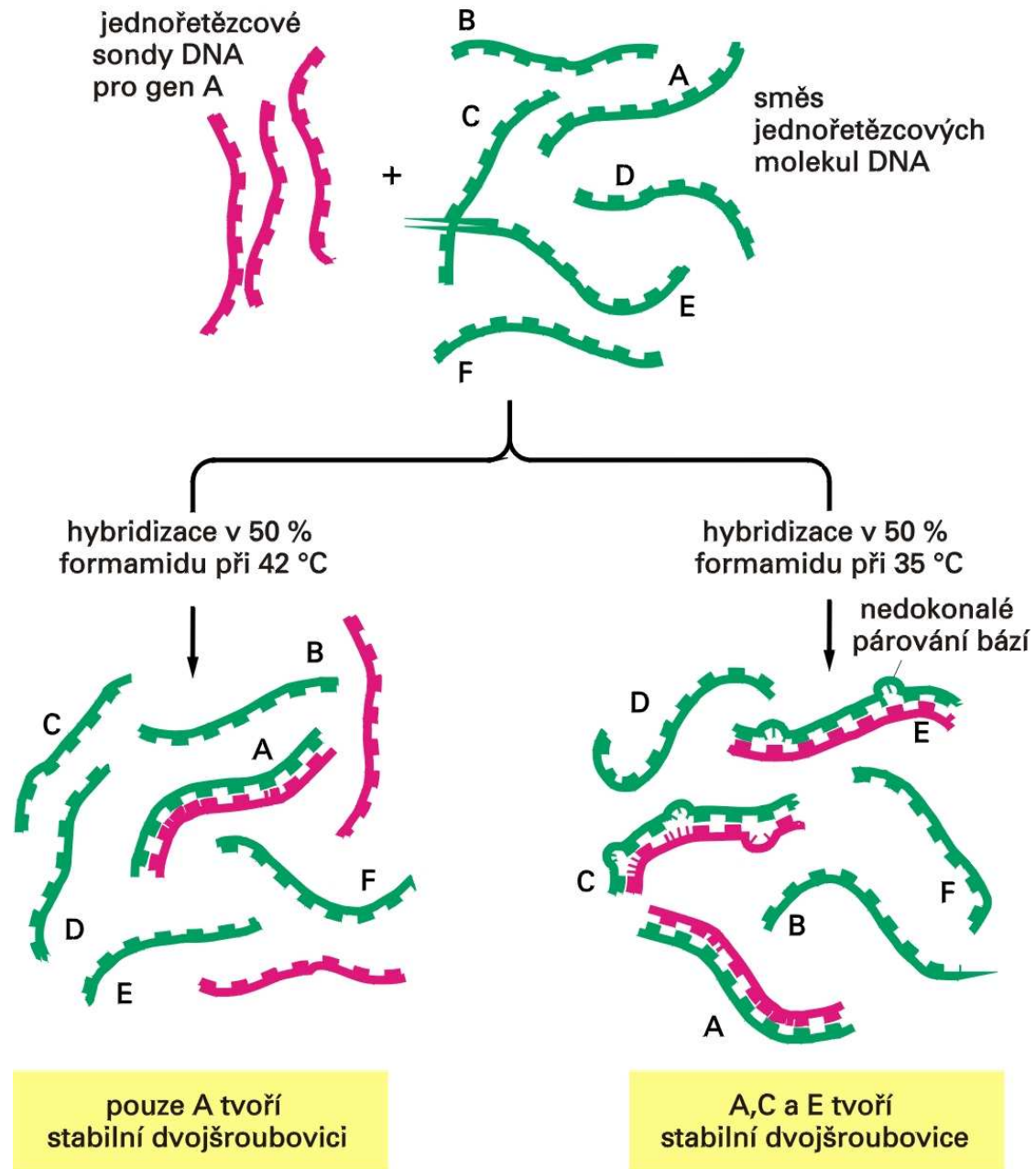
- odmytí navázané sondy
- aplikace další sondy

Stupeň stringence

Blot je hybridizován při podmínkách vysoké stringence pro detekci nukleových kyselin, které jsou vysoce homologní nebo identické se sondou.

| Hybridize/wash conditions | Low stringency | High stringency |
|---------------------------|----------------|-----------------|
| Temperature | Low | High |
| Formamide concentration | Low | High |
| Salt concentration | High | Low |

Různé hybridizační podmínky umožňují vytvoření dvojšroubovice s některými nespárovanými nukleotidy



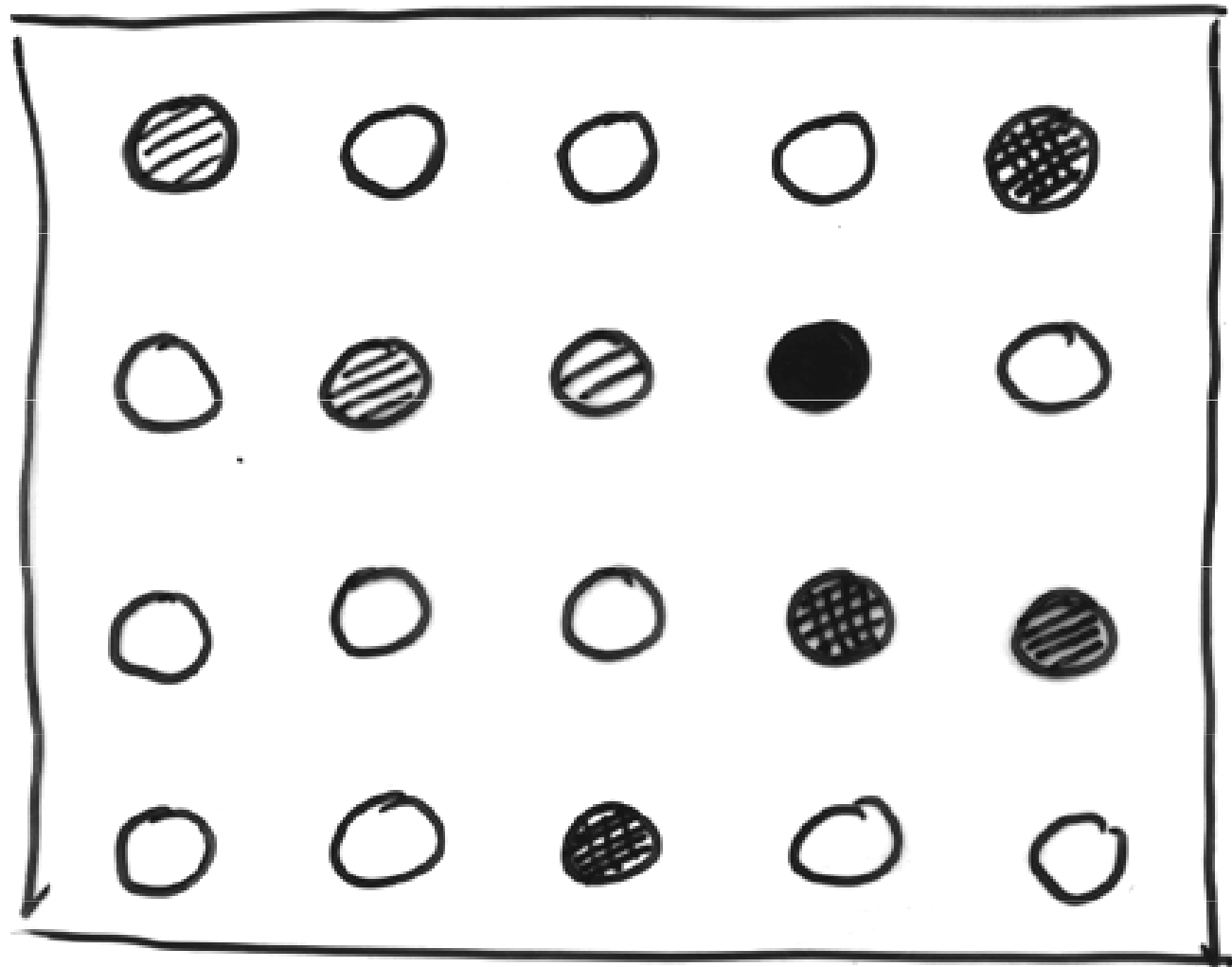
Typy přenosu („blotingu“) podle typu analyzovaných molekul

- **Southernův přenos** - DNA (Dr. Edwin Southern)
- **northernový přenos** - RNA
- **westernový přenos** - proteiny
- **southwesternový přenos** - proteiny vážoucí DNA (sondou je DNA)
- **northwesternový přenos** - proteiny vážoucí RNA (sondou je RNA)

Tečková hybridizace („dot blot“)

Postup:

- sonikace nebo restrikce genomové DNA; linearizace plazmidové DNA
- denaturace
- vzorky DNA naneseny na podložku v podobě teček
- hybridizace se sondou
- hodnocení hybridizace (vizuálně, denzitometrem, β -spektrometrem)



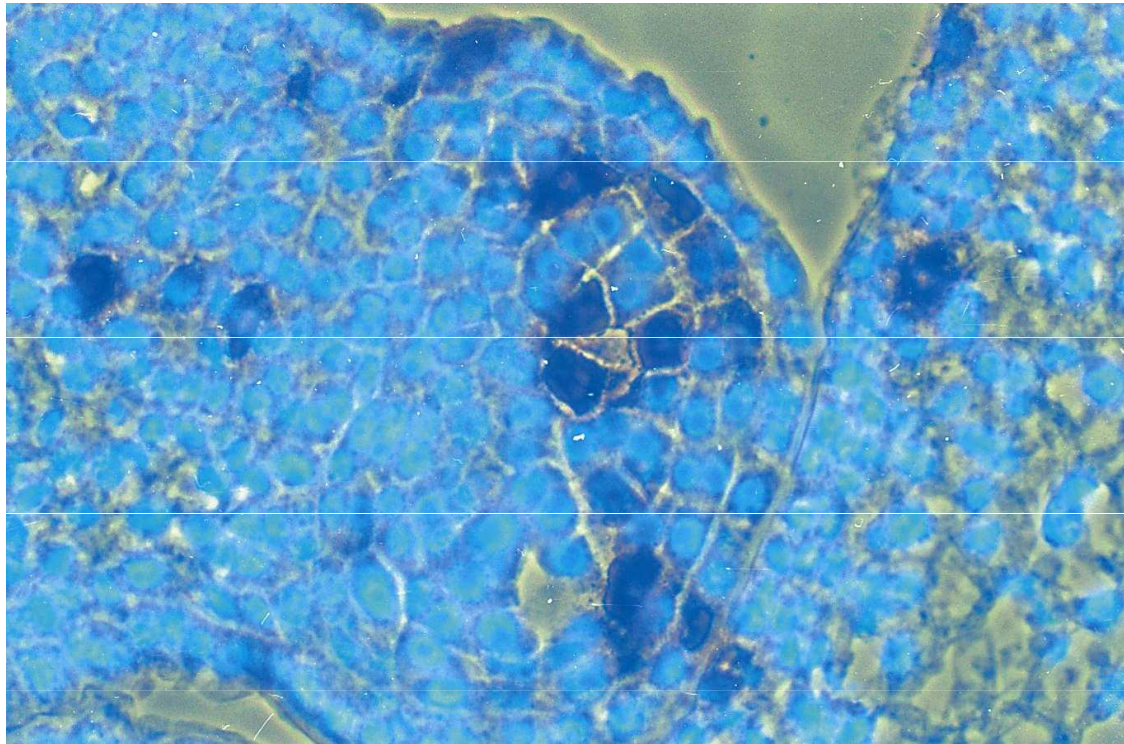
Hybridizace *in situ*

Detekce DNA nebo RNA v intaktních buňkách radioaktivními nebo fluorescenčními sondami.

Využití:

- prostorová lokalizace nukleových kyselin v buňkách a tkáních (hybridizace buněčné RNA)
- lokalizace genů (sekvencí) na chromozómech (hybridizace jaderné DNA)

Buňky produkující určitou mRNA mohou být vizualizovány hybridizací *in situ*.

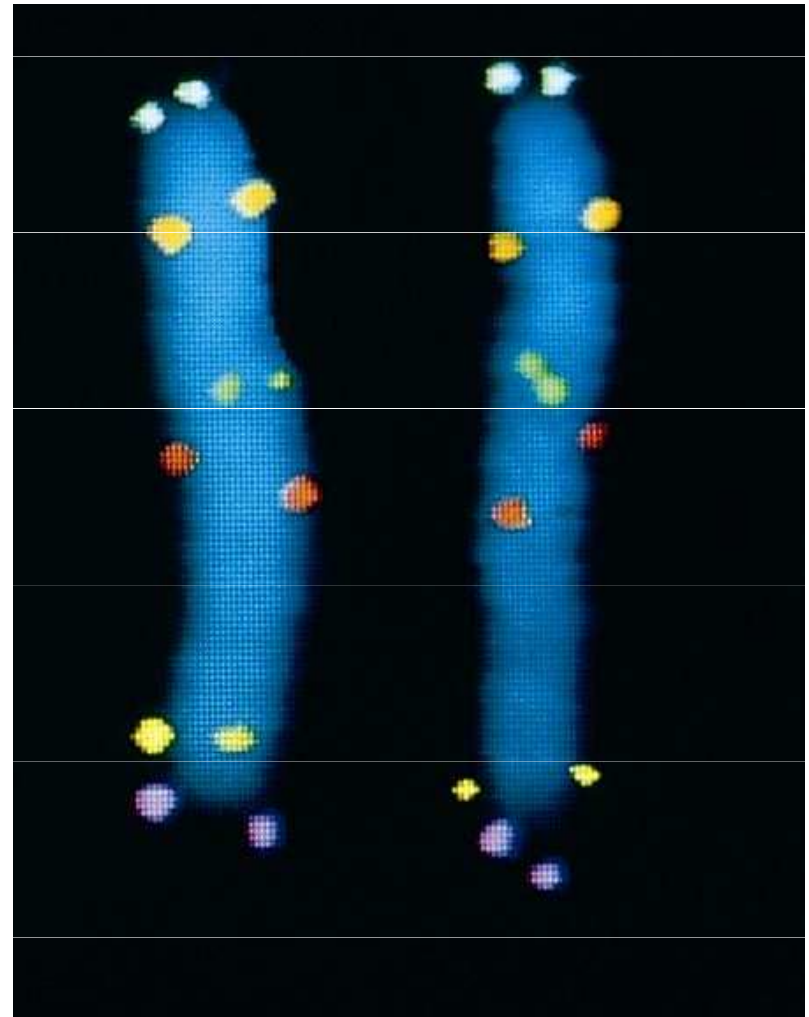


Snímek ukazuje buňky vrcholové části hledíku.
Sonda specifická pro mRNA cyklinu barví buňky tmavě modře, ostatní buňky jsou barveny DAPI (světlá modř)

Použití hybridizace *in situ* pro detekci genů na chromosomech (FISH)

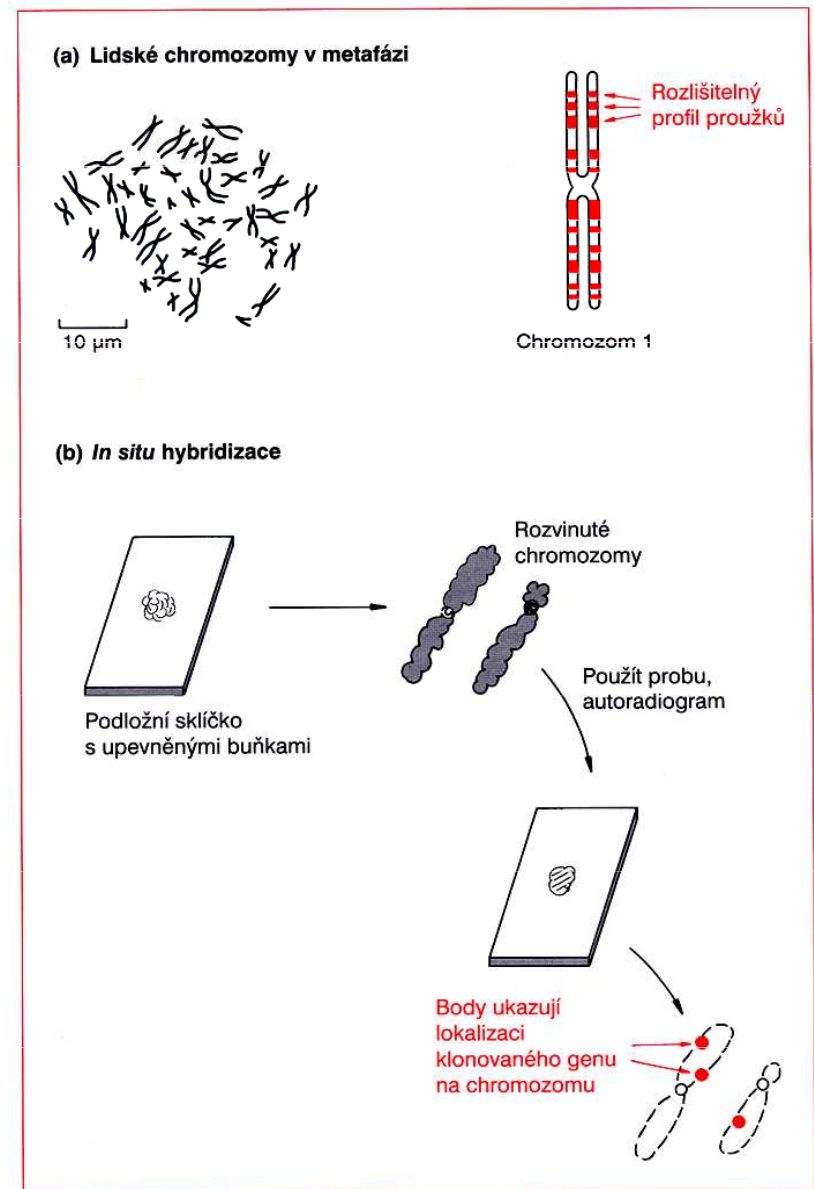
Použito 6 různých sond pro analýzu sekvencí v lidském metafázním chromozomu 5. Každá sonda vytváří 2 tečky na každém chromozomu (v mitóze je DNA zreplikována, tj. chromozom je složen ze dvou chromatid).

Chromatida: chromozomální DNA obsahující jednu dvouřetězcovou DNA



Postup hybridizace *in situ* při studiu chromozómů

- příprava cytologického preparátu
- fixace objektu na podložním sklíčku
- inkubace za přítomnosti ribonukleázy a NaOH (degradace RNA a denaturace DNA, chromozómy se částečně rozbalí a odhalí tak struktury DNA běžně skryté uvnitř chromozómů)
- hybridizace se značenou sondou
- autoradiografie nebo stanovení fluorescence
- barvení preparátu
- světelná nebo fluorescenční mikroskopie



Obvyklá fluorescenční barviva

- fluorescein (zelená fluorescence)
- rhodamin (červená fluorescence)
- kumarin (modrá fluorescence)

Využití hybridizačních technik v praxi

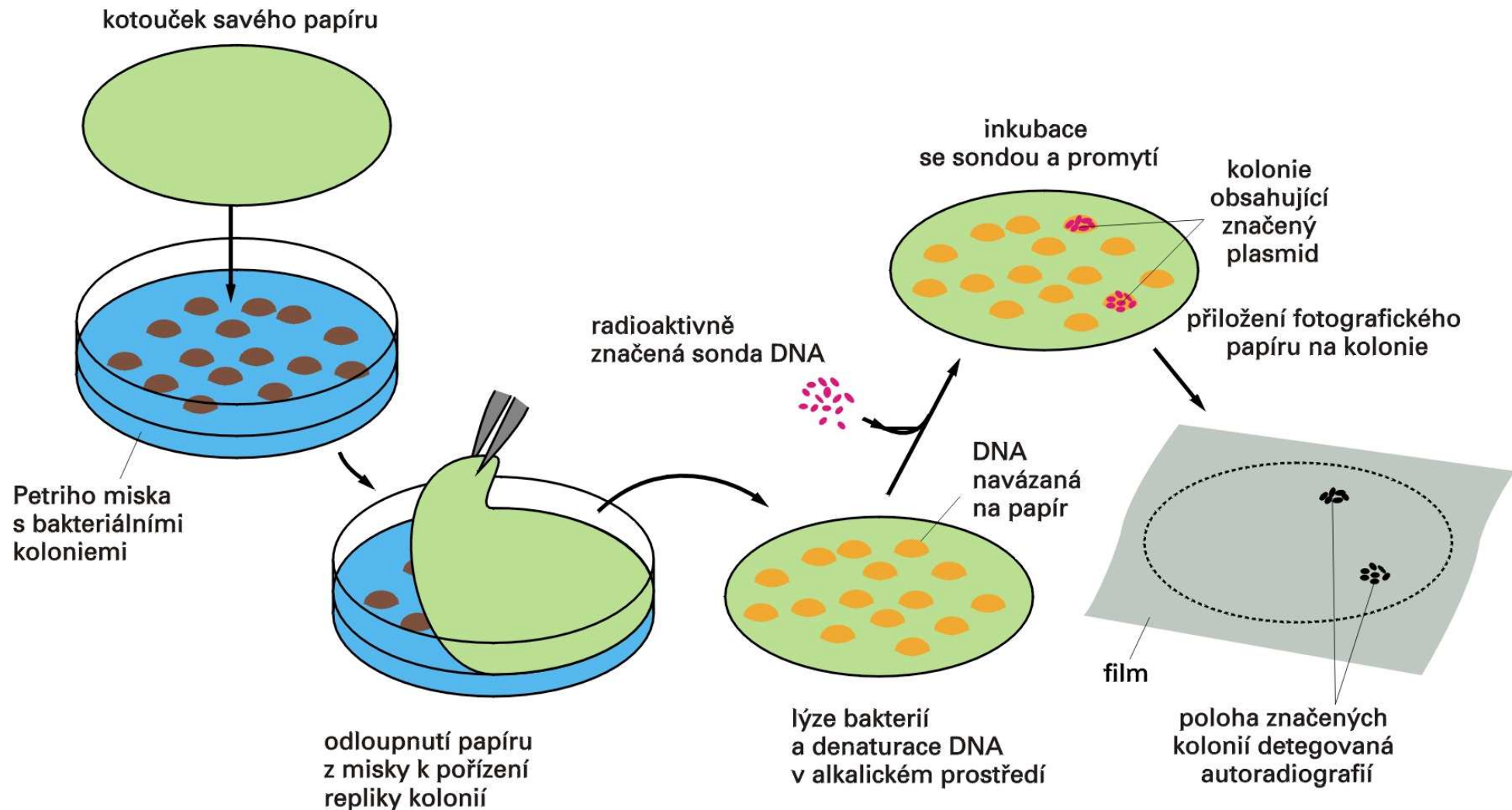
Detekce rekombinantních klonů

- v bakteriích
- ve fágách

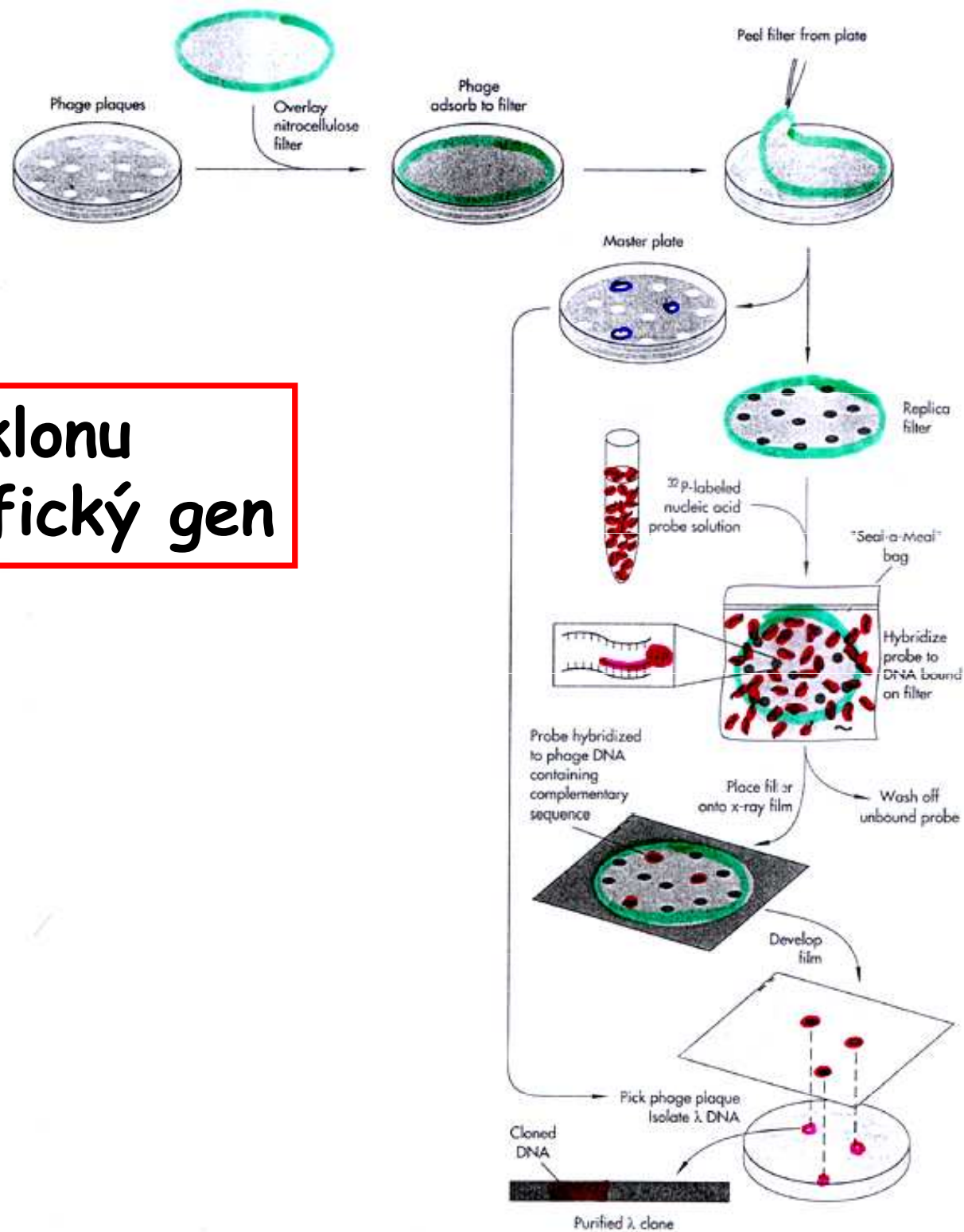
Postup:

- výsev na plotnu (100-1000 CFU/PFU)
- růst do velikosti 0,1-0,2 mm
- přenos na 1 - 2 filtry
- růst na filtru
- denaturace DNA
- neutralizace
- hybridizace
- autoradiografie
- vyhledání odpovídajících kolonií (plak) obsahujících hledanou sekvenci DNA

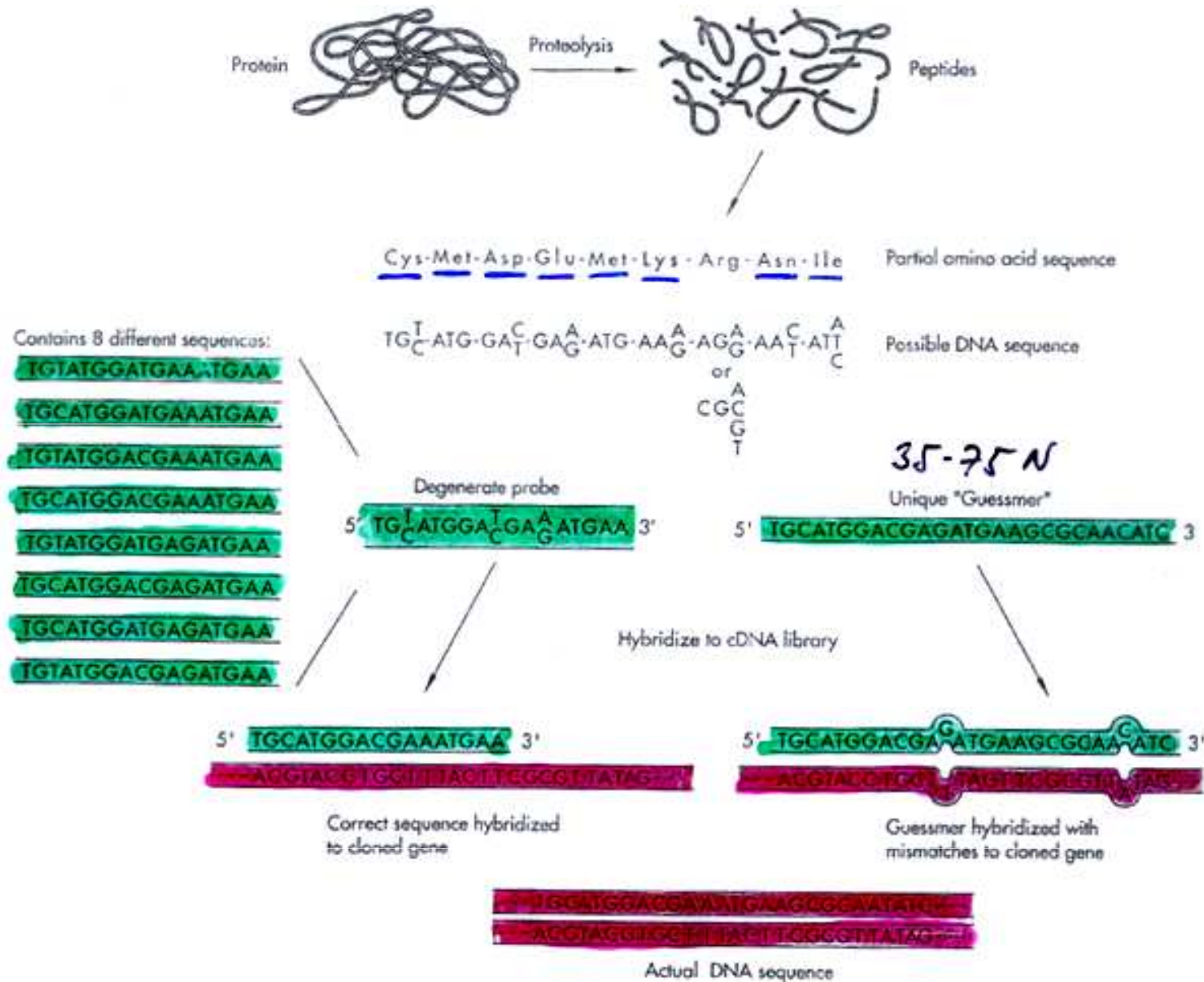
Detekce bakteriálního klonu nesoucího určitý fragment DNA



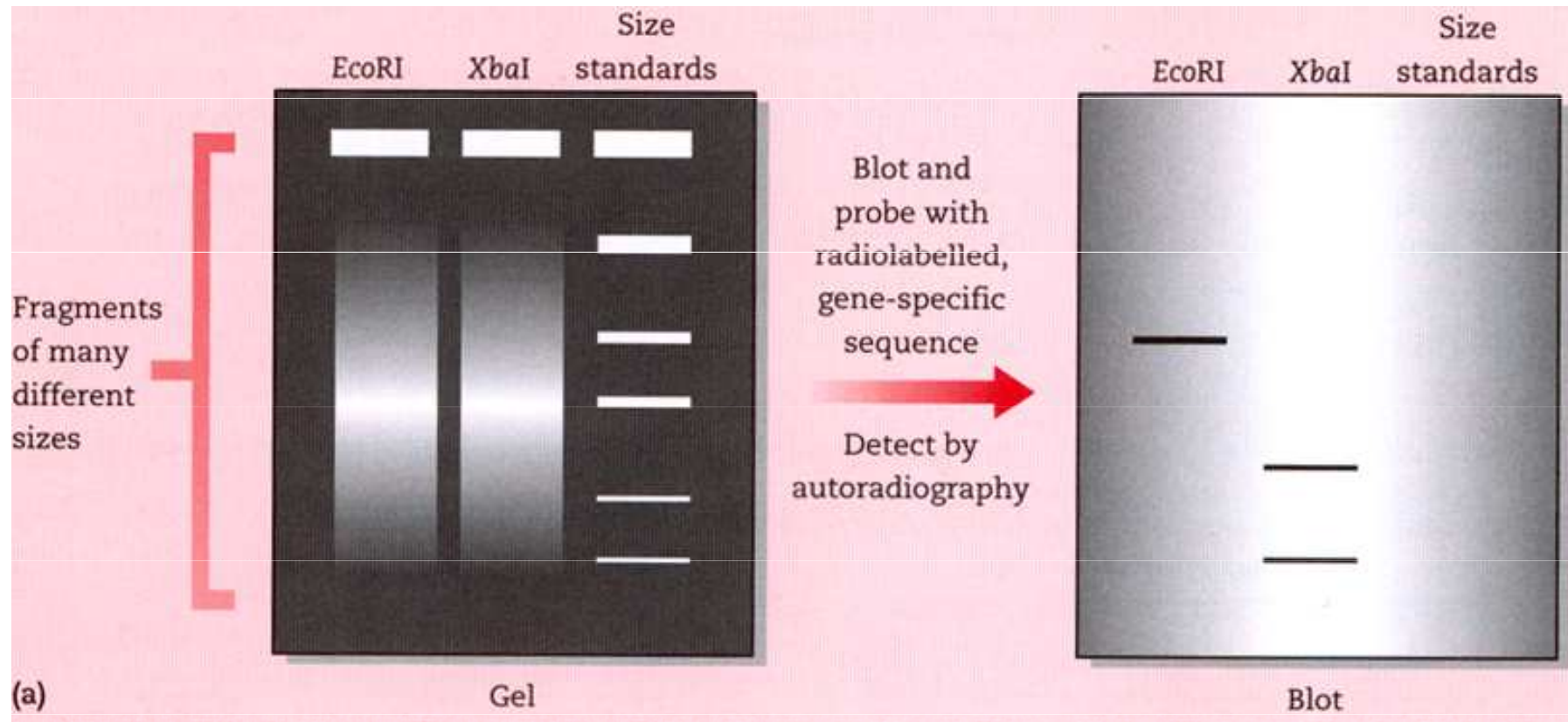
Vyhledání klonu nesoucího specifický gen



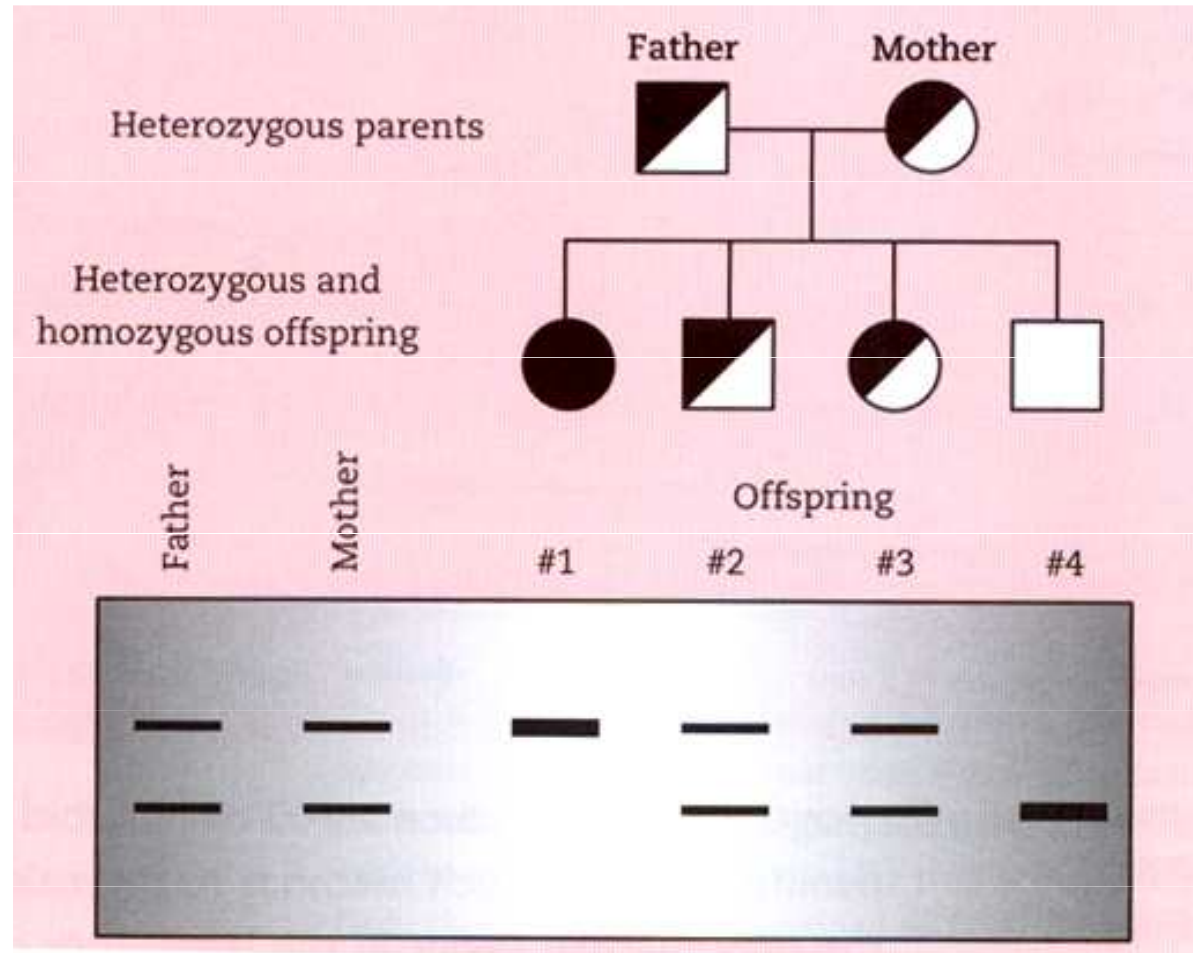
Používání oligonukleotidových sond odvozených ze struktury proteinů



Lokalizace specifických sekvencí v genomové DNA



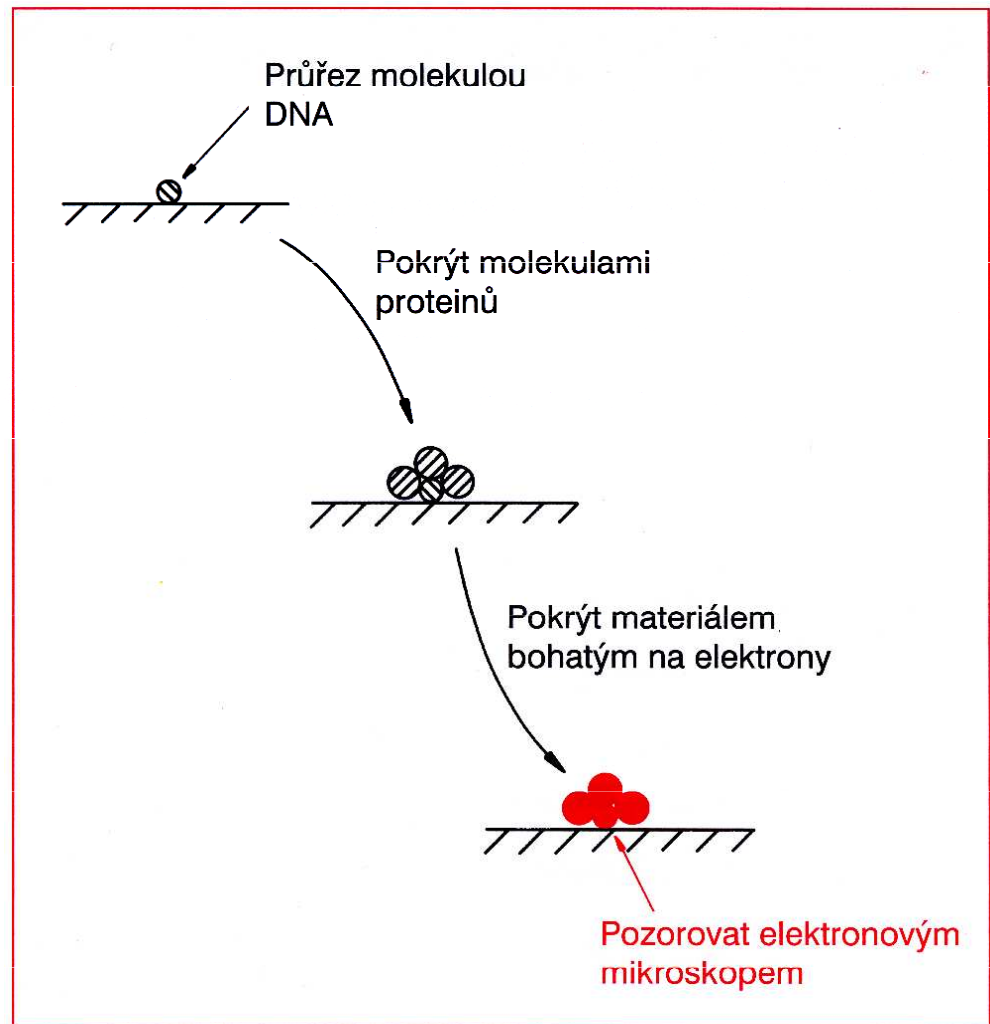
Southernova analýza potomků heterozygotních rodičů (RFLP)



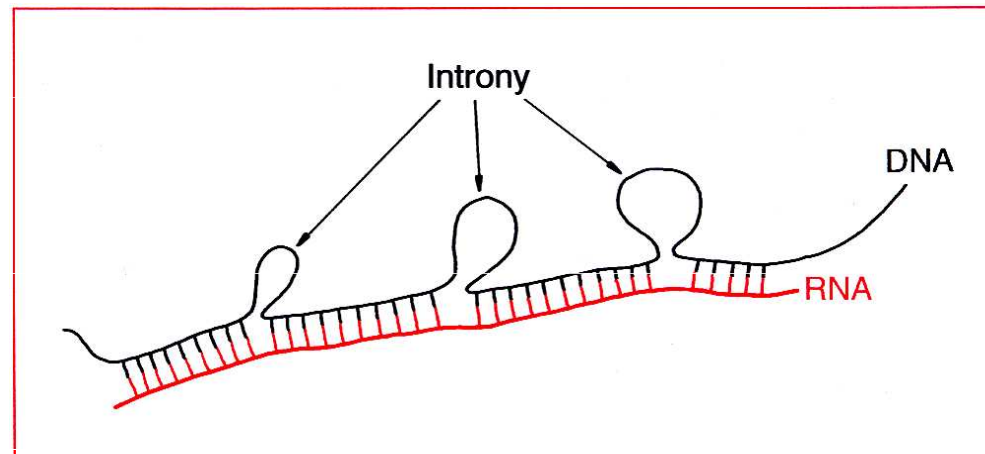
Pokud je výskyt většího fragmentu spojen s nemocí je třeba sledovat dceru #1, sourozenci #2 a 3 jsou přenašeči

Sledování transkripce elektronovou mikroskopií

- neošetřené molekuly nemůžeme pozorovat nukleových kyselin nelze pozorovat EM - jsou příliš tenké
- k DNA se přidává protein, např. cytochrom c, který vlákna DNA pokryje
- obalená vlákna se obarví uranyl acetátem nebo jiným materiálem s velkým počtem elektronů

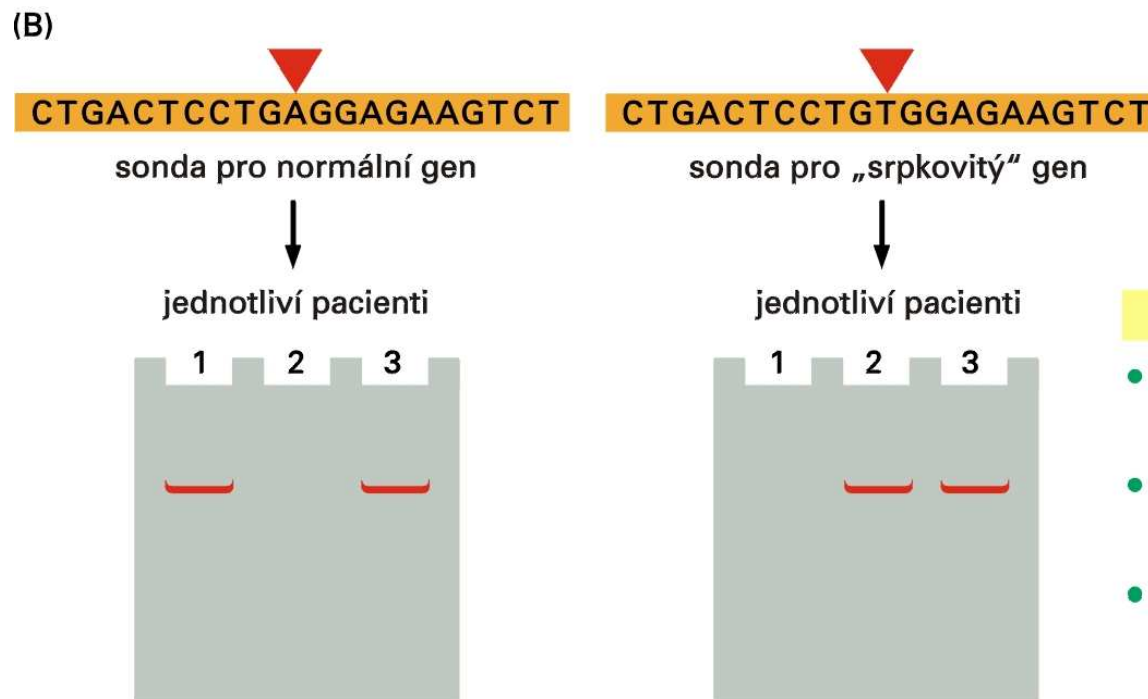
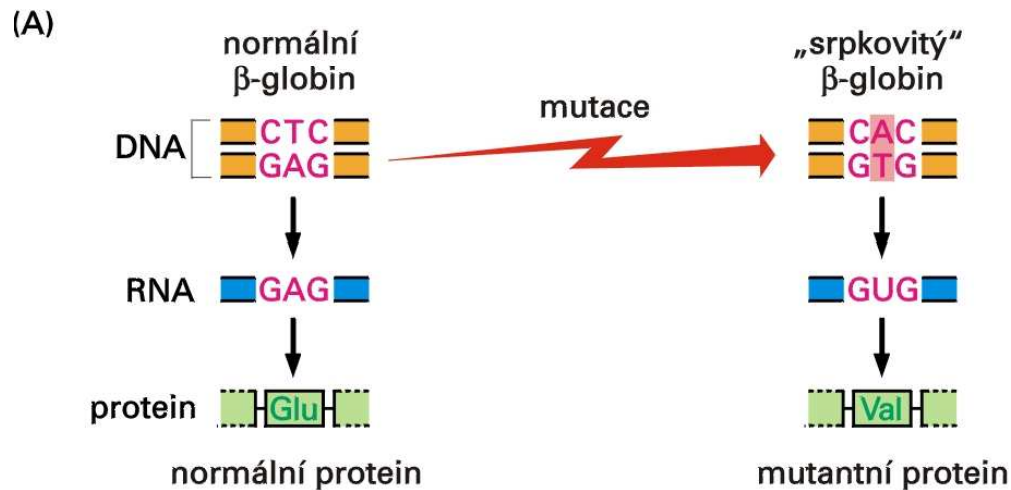


Sledování transkripce elektronovou mikroskopií



- sledování hybridů DNA-RNA se používá pro studium přítomnosti intronů
- počet a poloha smyček odpovídá počtu a poloze intronů

Detekce mutace způsobující srpkovitou anémií



ZÁVĚR

- pacient 1 má 2 normální geny pro β -globin
- pacient 2 má 2 „srpkovité“ geny pro β -globin
- pacient 3 má 1 normální a 1 „srpkovitý“ gen

Na základě znalostí molekulární biologie můžeme dojít od proteinové sekvence ke genu a naopak

