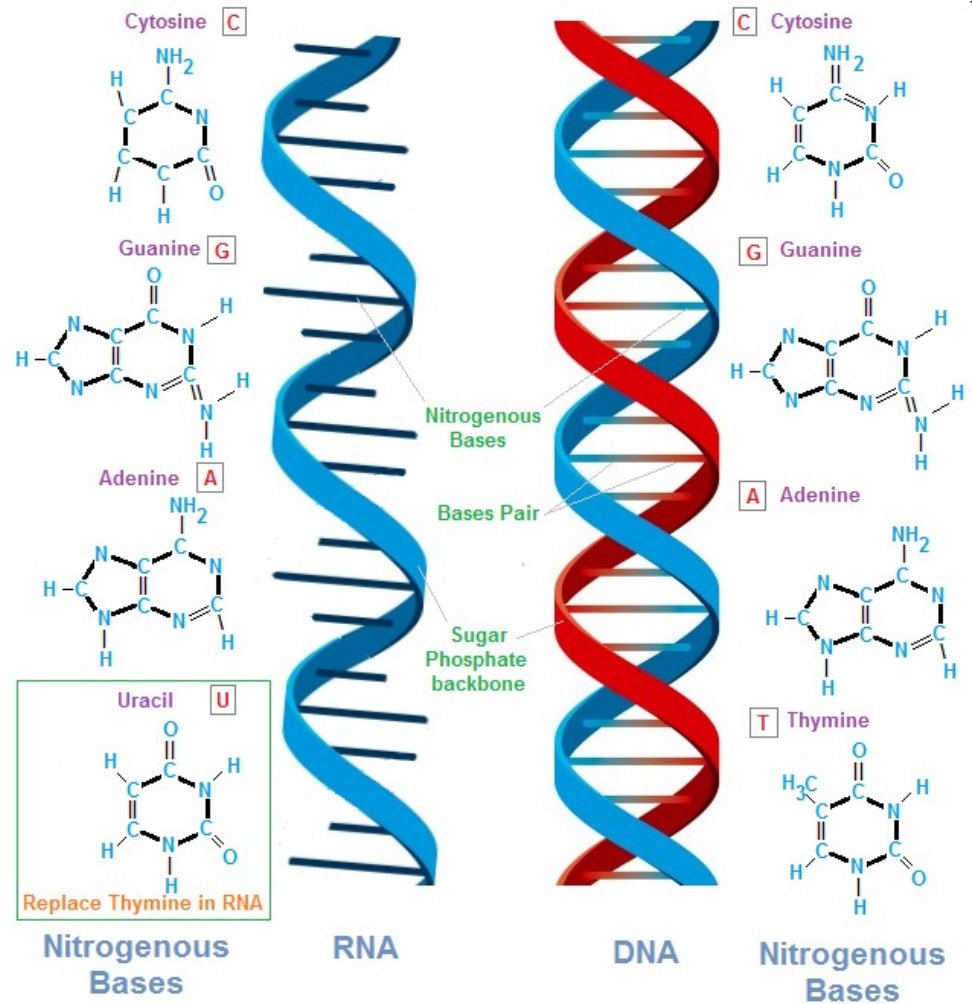
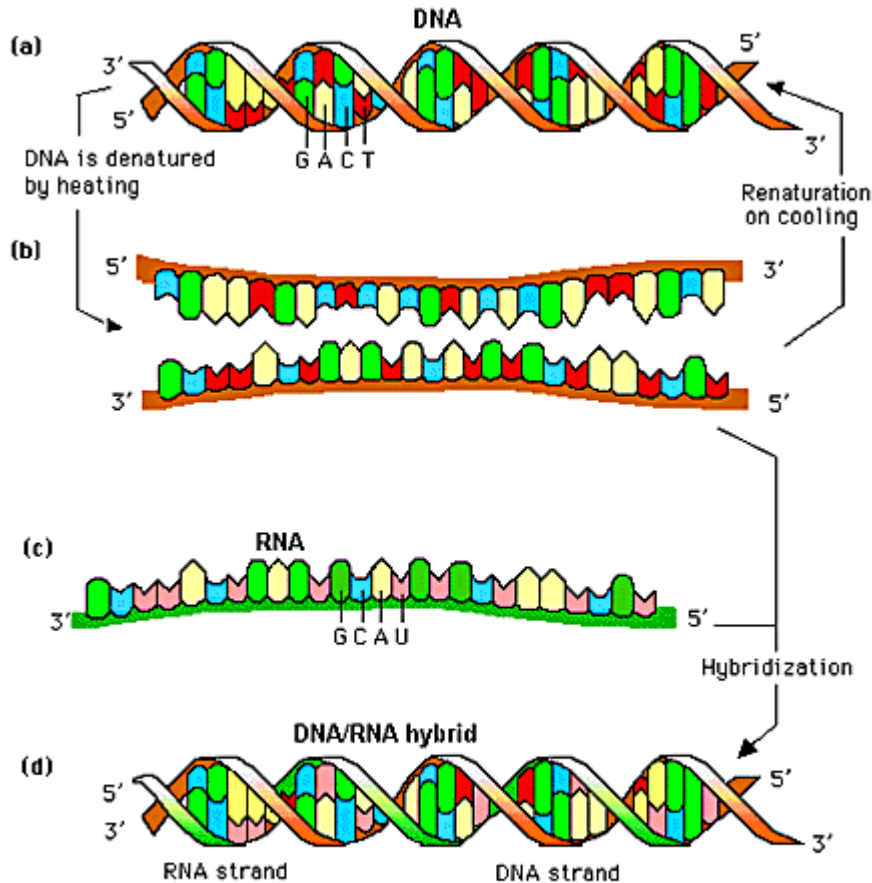


# METODY ZALOŽENÉ NA HYBRIDIZACI NUKLEOVÝCH KYSELIN



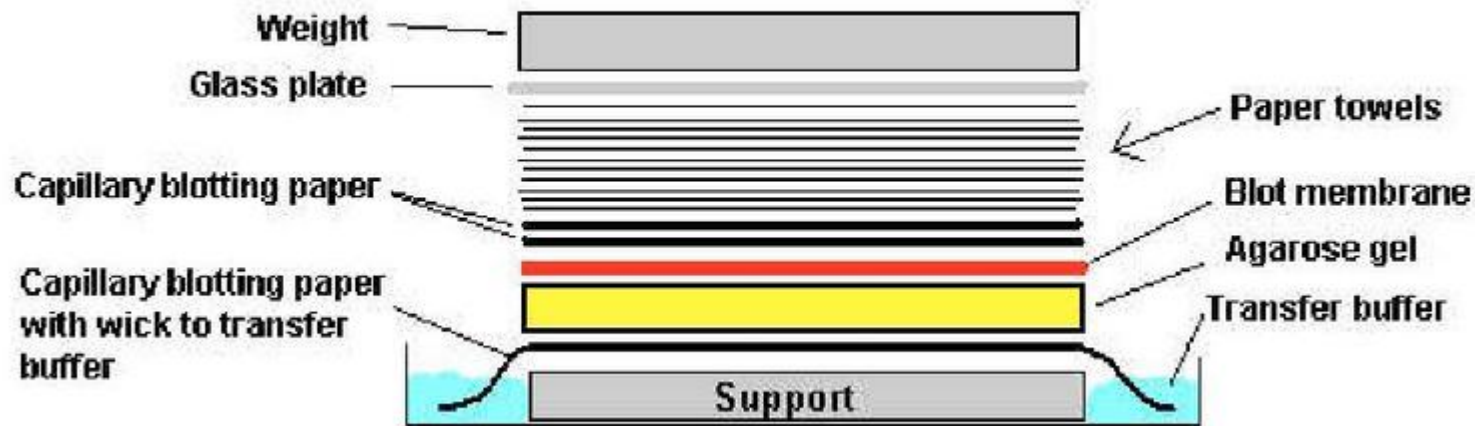
# HYBRIDIZACE NA



Southernův přenos  
northern blotting (hybr. RNA)  
slot-, dot-, blot-hybridizace  
*in situ* hybridizace

## Nucleic Acid Hybridization

# PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – KAPILÁRNÍ



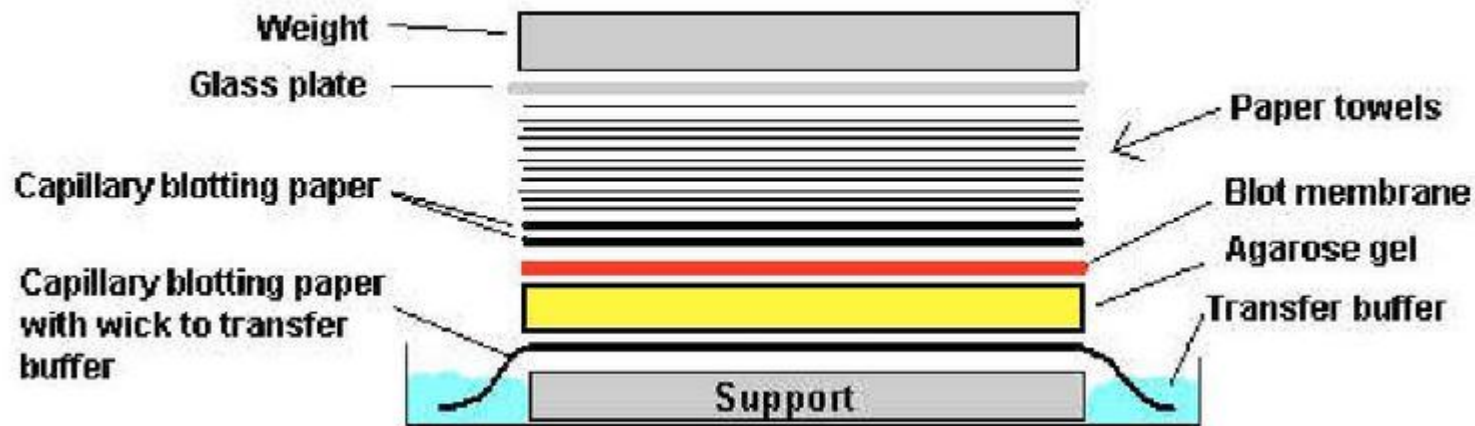
**Příprava gelu před blotováním:**

**DNA: kyselá depurinace (0.25 M HCl)**

**alkalická denaturace (0.4 M NaOH), blotování v NaOH  
+ neutralizace (3 M NaAc, pH 5.5), blotování v 10xSSC**

**RNA: MÍRNÁ denaturace (0.05 M NaOH), blotování ve 20xSSC**

# PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – KAPILÁRNÍ



**Přenos DNA / RNA na nylonovou membránu:** (srovnání s nitrocelulózovou)

mechanicky odolná

pozitivně nabitě membrány, blotting v alkalickém prostředí

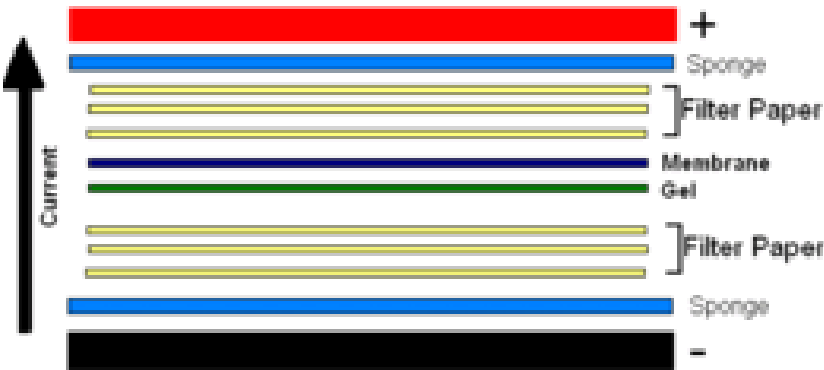
- kovalentní vazba DNA na membránu (UV crosslink, zapékání při 80 C)

vazba krátkých fragmentů (< 50 pb)

vyšší pozadí

# PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – ELEKTROBLOTTING

Transfer Stack



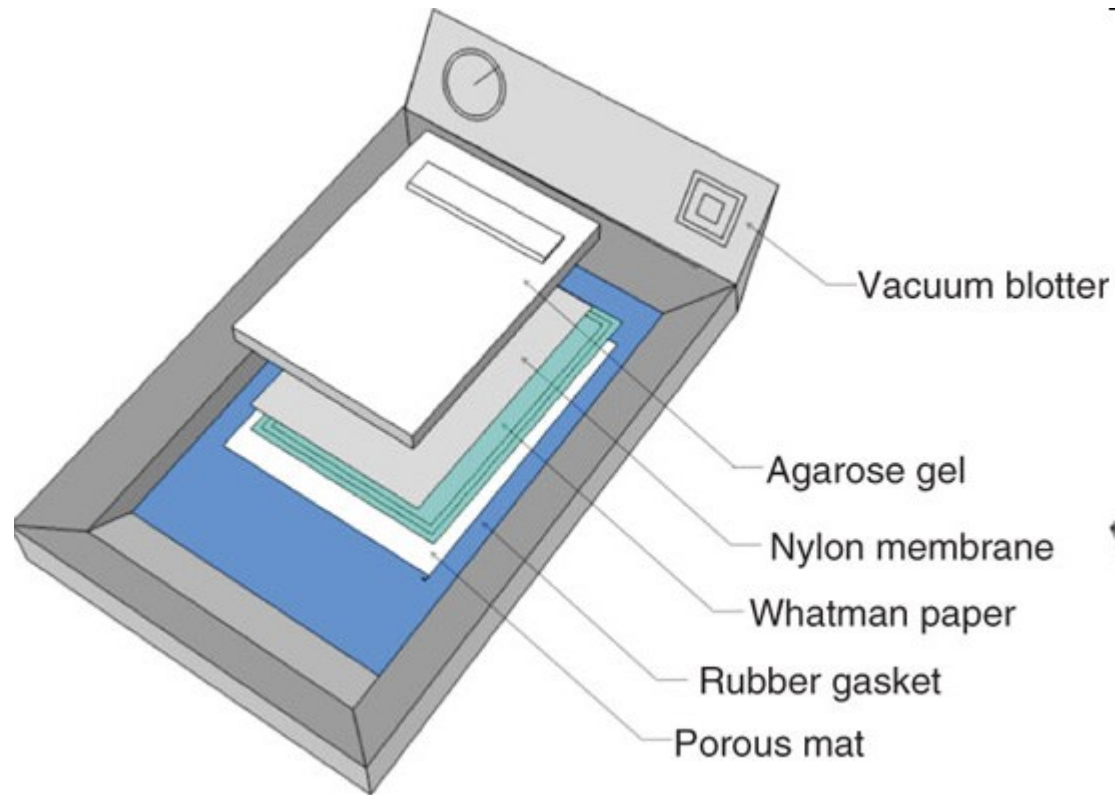
[www.frilabo.pt](http://www.frilabo.pt)

semi-dry blotting:



[www.isogen-lifescience.com](http://www.isogen-lifescience.com)

# PŘENOS DNA / RNA NA MEMBRÁNU – VAKUOVÝ



Kimura et al., Nature Protocols 2010

# HYBRIDIZACE

---

V pufrch s vyšší koncentrací solí, s detergentem (SDS)

RNA:RNA > RNA:DNA > DNA:DNA

Značená ssRNA: vysoká afinita k homolognímu úseku



silný signál

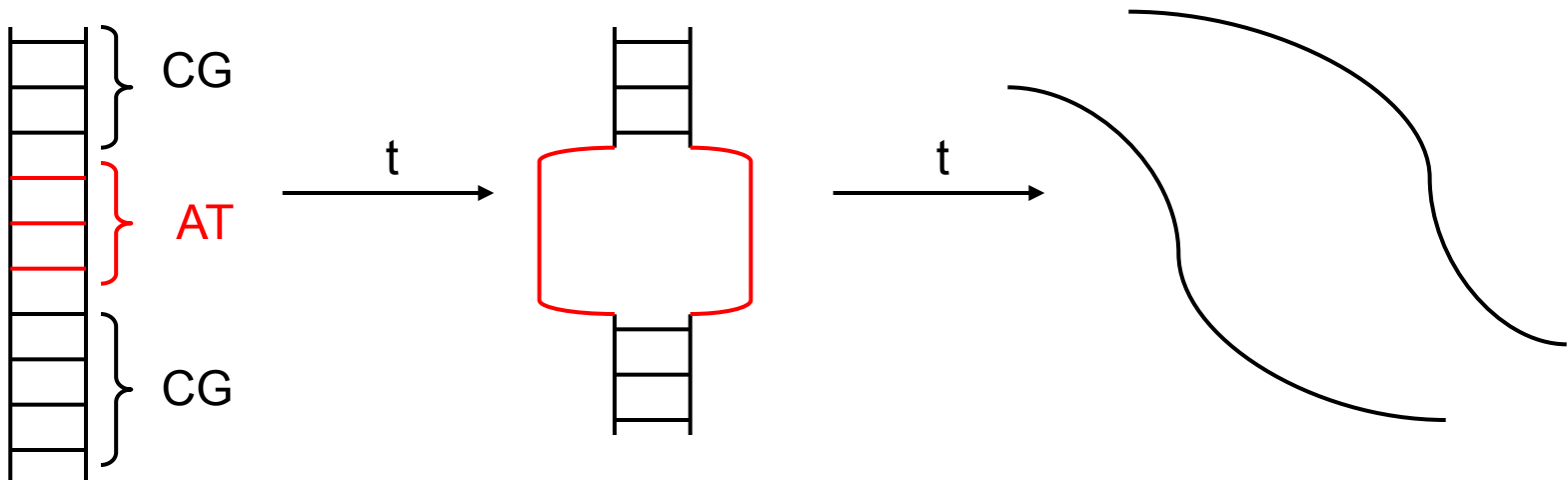
**X**

citlivost próby k RNázám

# HYBRIDIZACE

## Teplota hybridizace:

- obsah CG
- délka hybridizační próby
- homologie mezi próbou a sekvencí na membráně
- koncentrace solí
- pH
- složení hybridizačního pufru (formamid, PEG 6000, dextransulfát)





# HYBRIDIZACE

---

## Teplota hybridizace a koncentrace solí:

Vodné roztoky:

$$T_m = 69.3 \text{ } C + 0.41(\%G+C)^\circ C$$

$$CG \ 40\% \quad T_m = 85.7 \text{ } ^\circ C$$

$$CG \ 45\% \quad T_m = 87.5 \text{ } ^\circ C$$

$$CG \ 60\% \quad T_m = 93.9 \text{ } ^\circ C$$

Roztoky solí (SSC):

$$\text{Eff}T_m = 81.5 + 16.6(\log M(\text{Na}^+)) + 0.41(\%G+C) - 0.72(\%\text{formamide})$$

1% „nehomologie“ snižuje  $T_m$  o 1.4 °C

Teplota hybridizace  $T_m - 20 \text{ } ^\circ C$

# HYBRIDIZACE

---

Próba > 100 pb: hybridizace při ~ 65 °C

Oligonukleotidy: hybridizace při ~ 55 °C

**Formamid:** snižuje  $T_m$  (hybridizace RNA), hybridizace při ~ 42 °C

**PEG 6000:**

**Dextran sulfát:** } molekuly próby síťují – zvýšení citlivosti (10 – 100x)

**Komerční hybridizační pufr:** vysoce senzitivní a SPECIFICKÁ hybridizace při nízké teplotě (42 °C)

**Stringence:** nastavení podmínek hybridizace a odmývání, reflektuje homologii sekvencí a typ próby

**Vysoká stringence:** homologní sekvence (~95%) a delší próby;  
0.2xSSC, 65 °C

**Nízká stringence:** 2xSSC, 55 – 65 °C, homologie ~80%

# HYBRIDIZACE

---

## RNA:

RNA:RNA – vysoká  $T_m$  – hybridizační pufrы s formamidem, odmývání při vysoké stringenci

Všechny reagenty a použité nádoby musí být RNase-free

Hybridizace a odmývání: hybridizační pece:

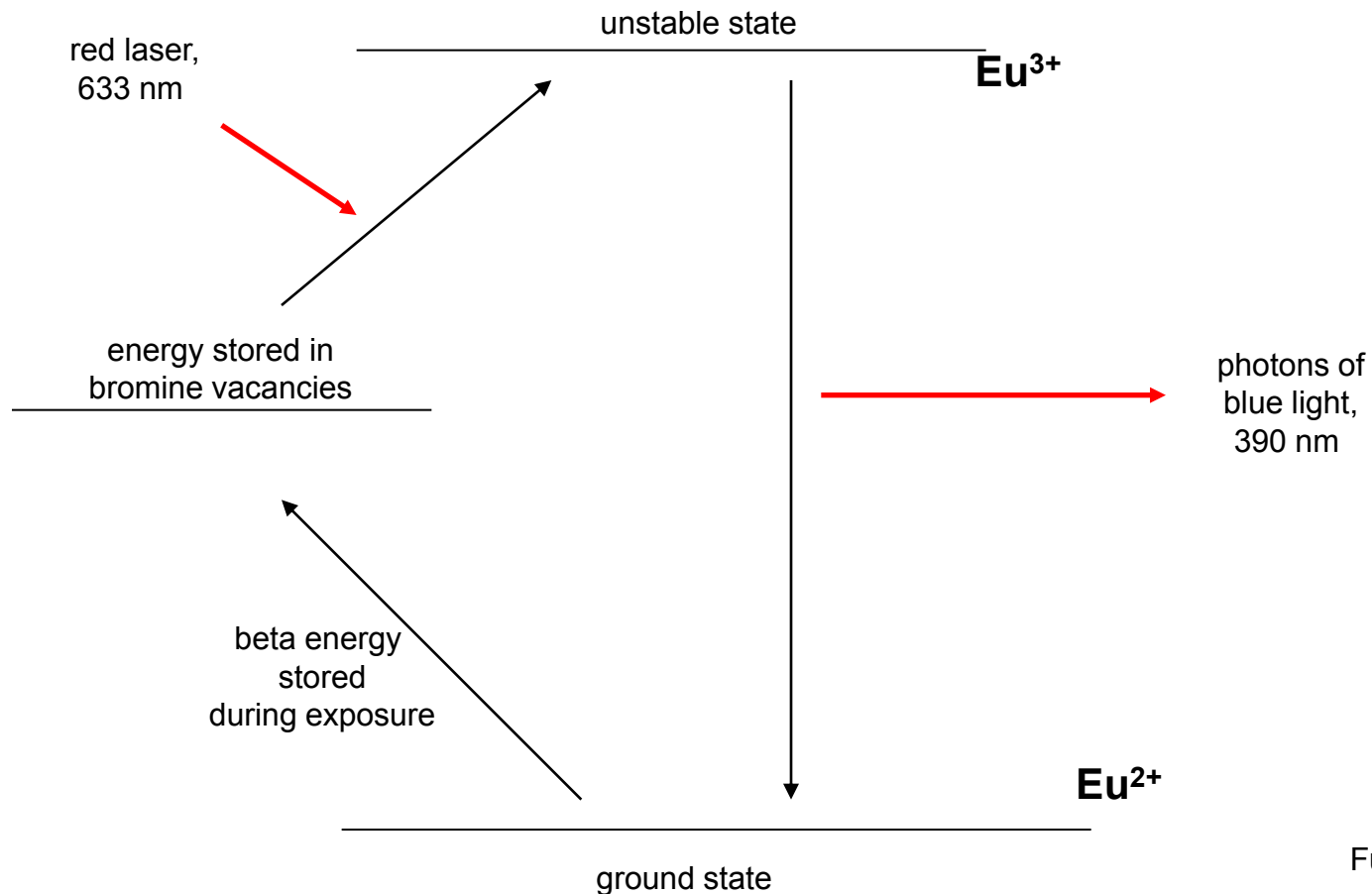


Trigon Plus

# HYBRIDIZACE

## Detekce radioaktivního signálu:

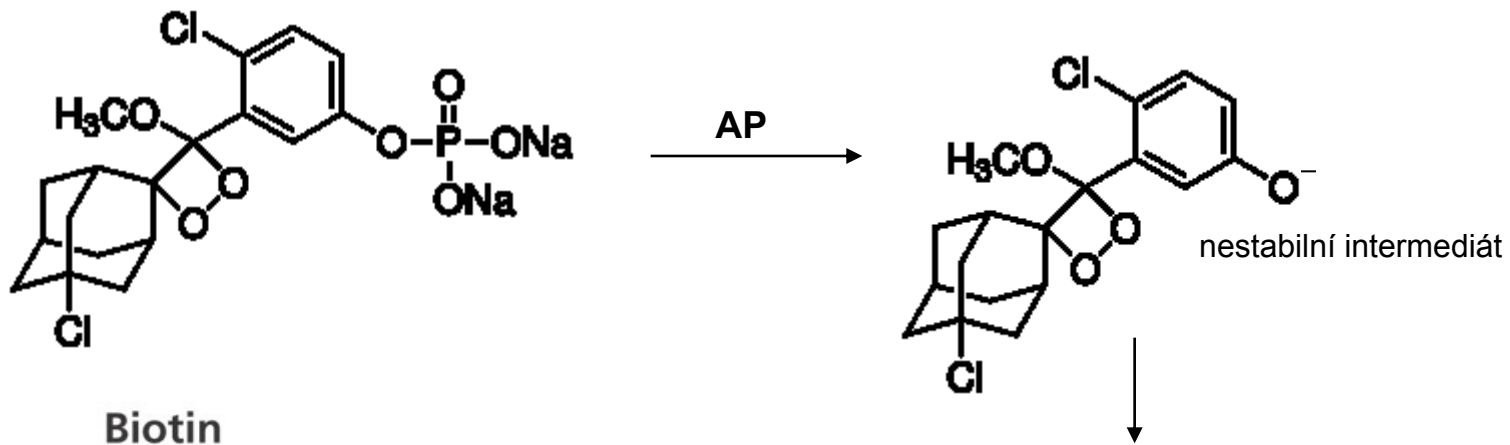
**fosfo-imagery:** energie je „uložena“ ve fotostimulačních krystalech  
(BaFBr:Eu<sup>2+</sup>)



# HYBRIDIZACE

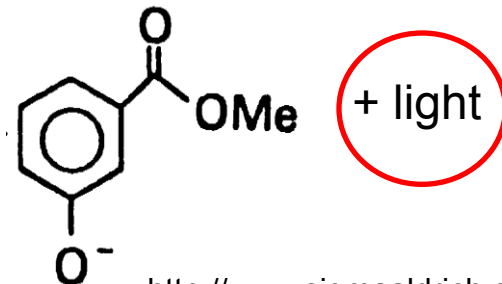
## Detekce neradioaktivního signálu: chemiluminiscence, fluorescence

Chemiluminiscenční substrát pro detekci alkalické fosfatázy: CDP Star (Sigma)



Biotin

1000 100 10 1 pg pUC18

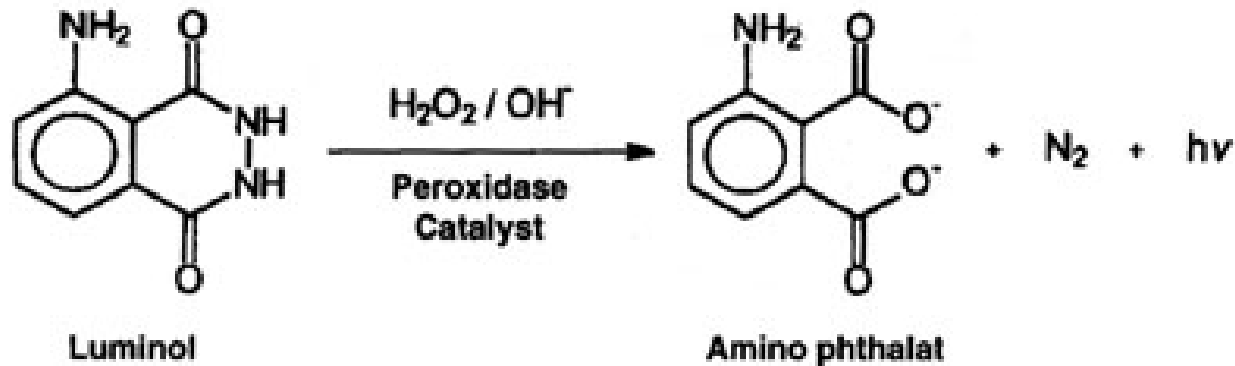


<http://www.sigmaaldrich.com/>

# HYBRIDIZACE

## Detekce neradioaktivního signálu: chemiluminescence, fluorescence

Chemiluminiscenční substrát pro detekci peroxidázy: Luminol



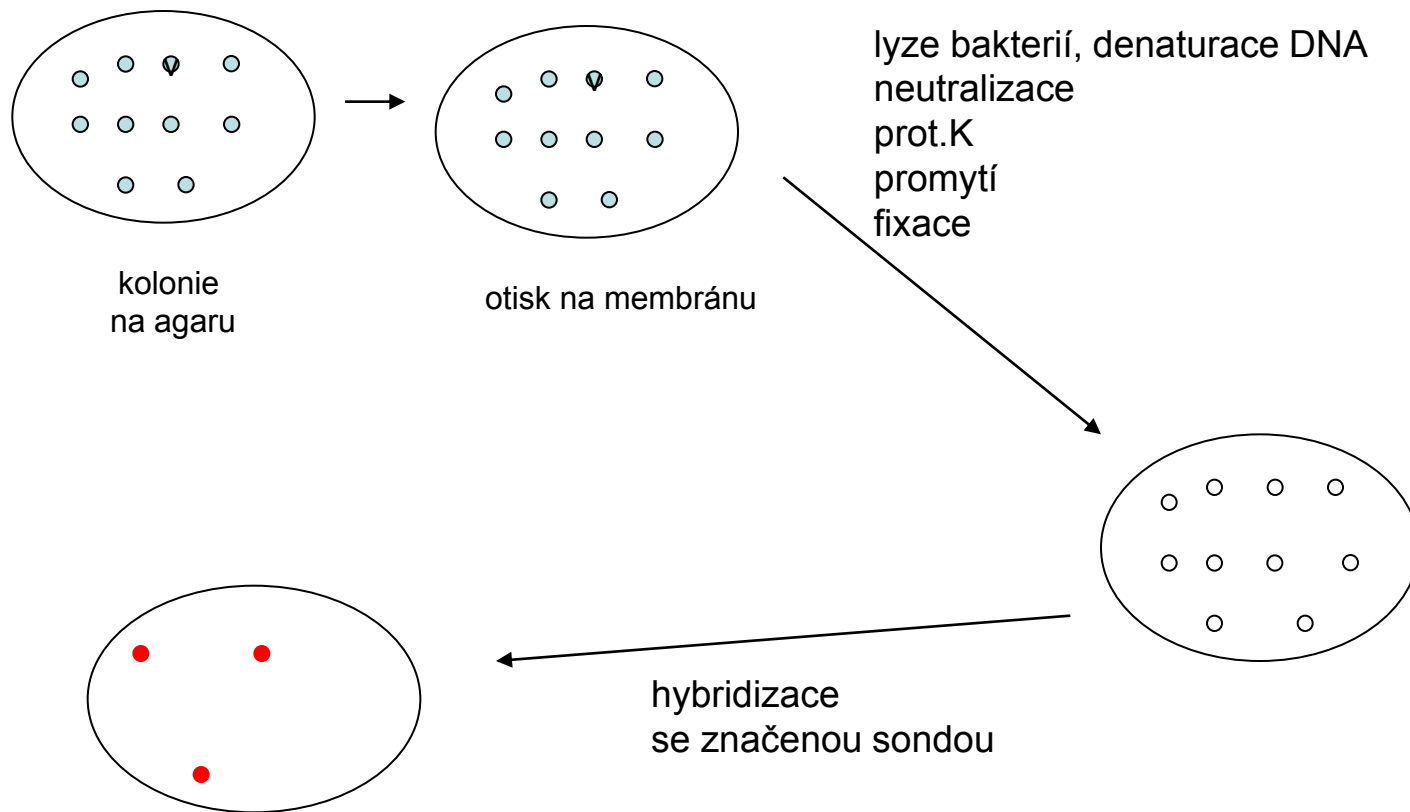
<http://www.anthromed.org/Article.aspx?artpk=74>

**ECL** – enhanced chemiluminescence

# VYUŽITÍ HYBRIDIZACE

## • PLAQUE HYBRIDIZATION

identifikace pozitivních kolonií



# VYUŽITÍ HYBRIDIZACE

---

- **SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM**

identifikace záměn jednotlivých nukleotidů

Predispozice k chorobám, predikce odpovědi na léčbu

SNP v genu pro apolipoprotein E – predispozice pro Alzheimerovu nemoc

Bioinformatické databáze pro SNP: dbSNP (NCBI)

Human Gene Mutation Database  
International SNP Map

Metody analýzy: sekvenování

hybridizace

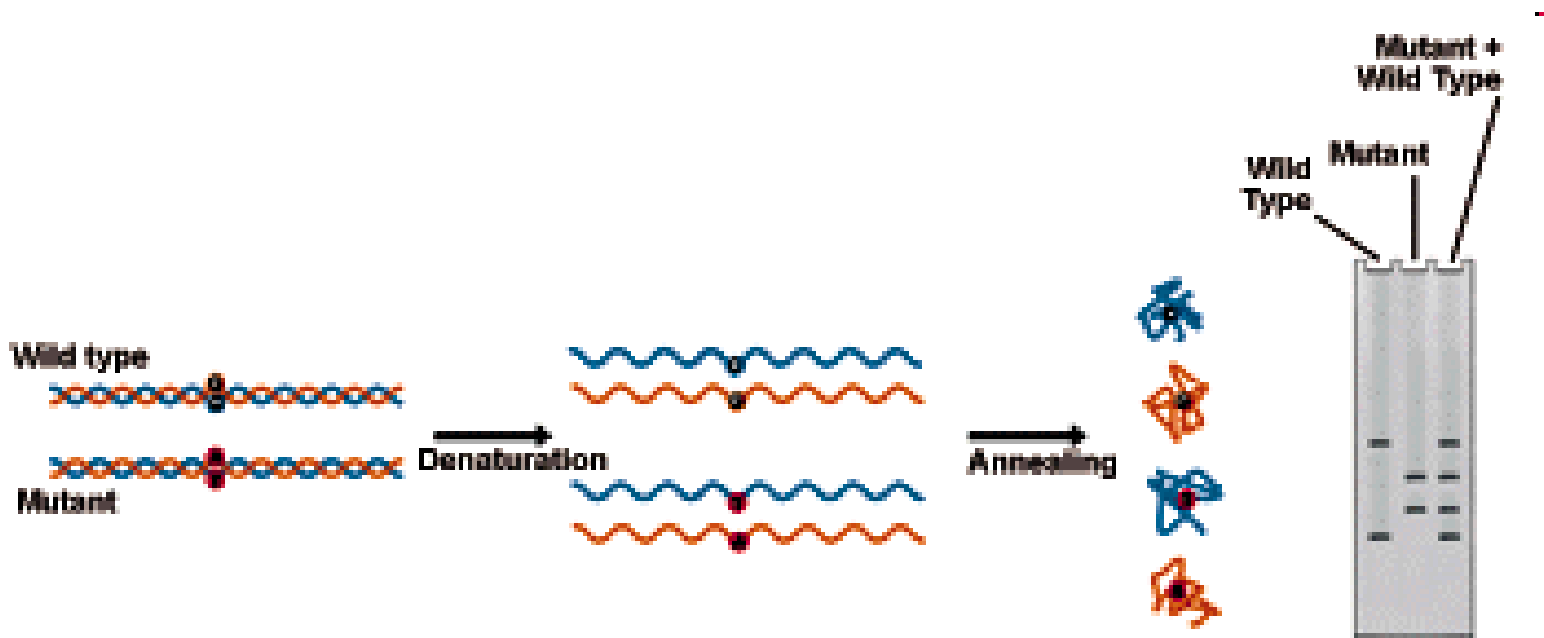
SSCP (single strand conformation polymorphism)

RFLP (restriction fragments length polymorphism)



# DETEKCE SNP

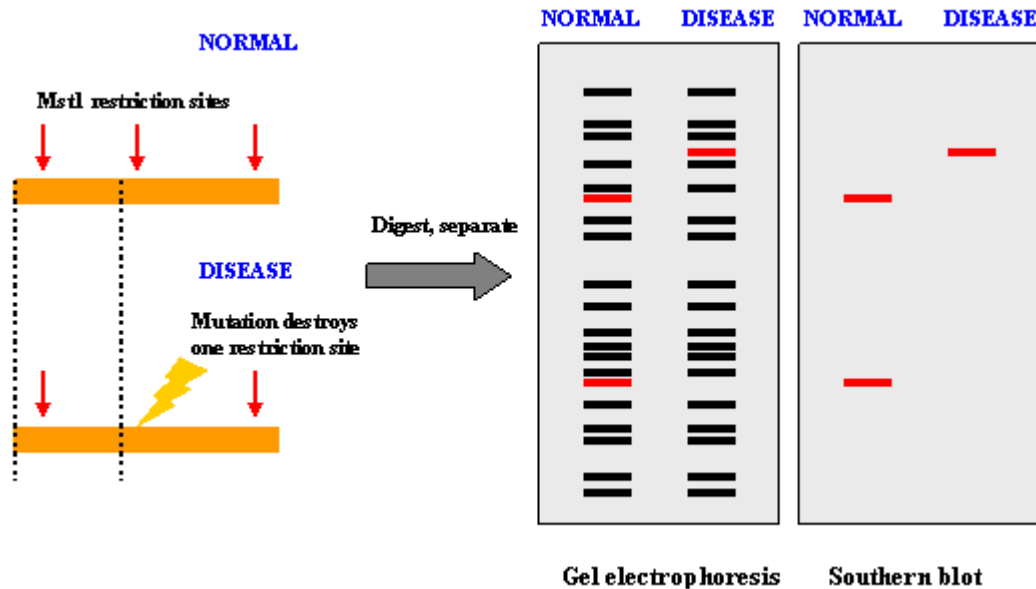
- **SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)**



<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/sscp-analysis>

# DETEKCE SNP

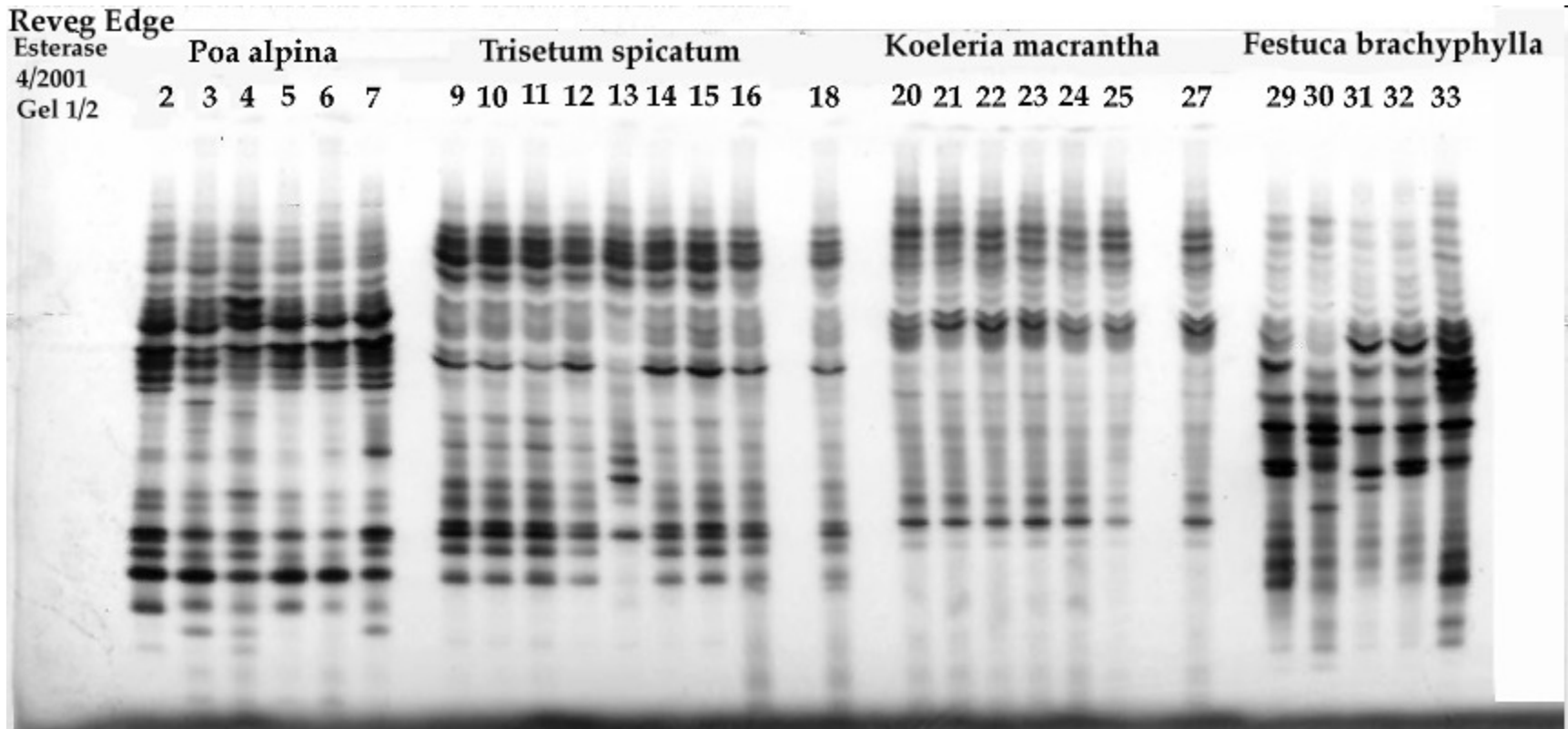
- RFLP (RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM)



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>

# DETEKCE SNP

- **RFLP (RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM)**  
identifikace ekotypů

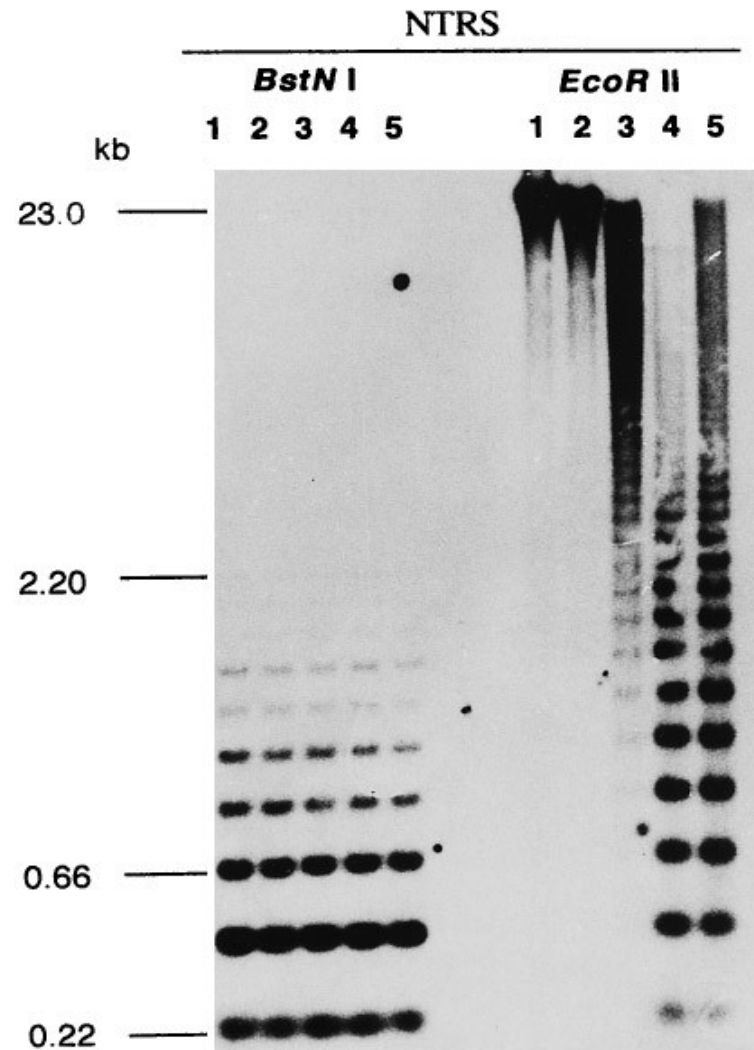
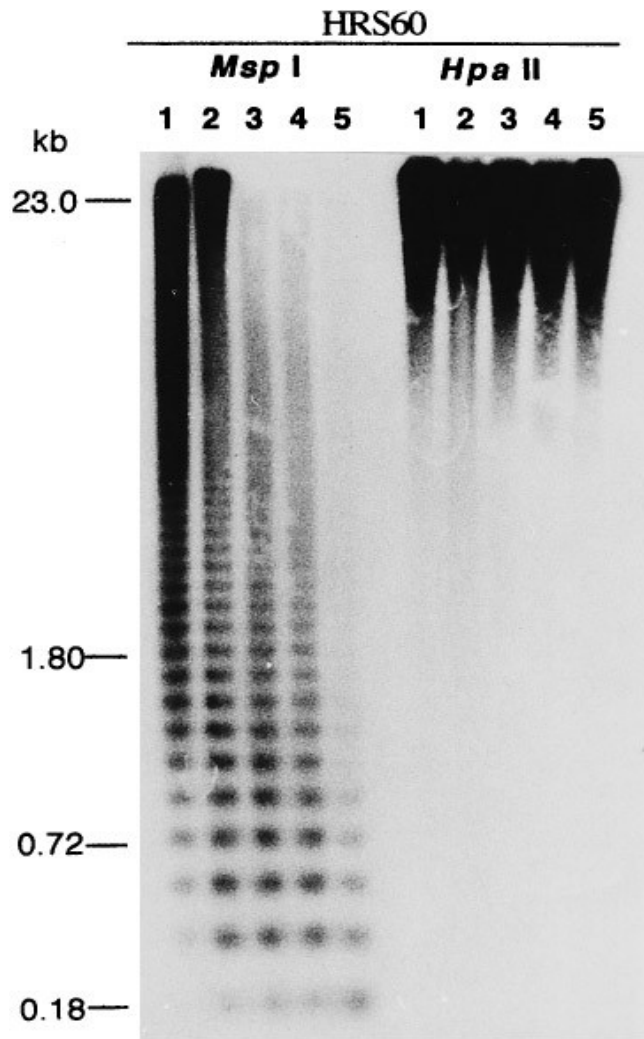


# ANALÝZA METYLACE DNA

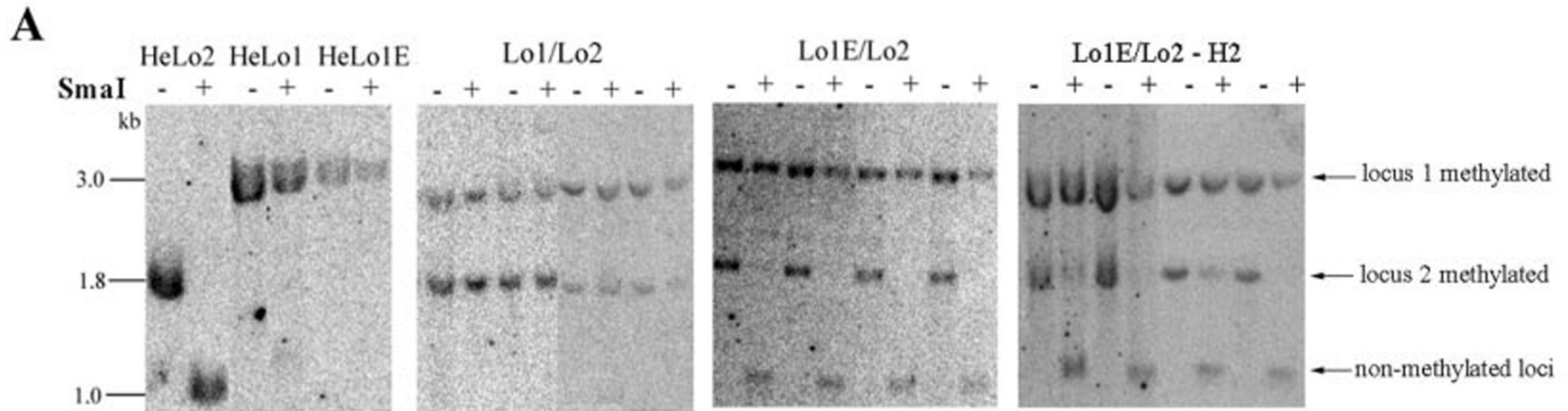
---

1. Digeste metylačně citlivou restriční endonukleázou
2. Elfo na agarózovém gelu
3. Blotting na nylonovou membránu
4. Hybridizace s radioaktivně značenou sondou
5. Detekce signálu

# ANALÝZA METYLACE DNA



# ANALÝZA METYLACE DNA



Fojtová et al., 2006

*Sma* I - CCCGGG

# ANALÝZA DÉLKY TELOMER

---

## Terminal restriction fragments (TRF)

1. Štěpení genomové DNA frekventně štěpící RE, která nemá rozpoznávací místo v telomerové repetici (TTAGGG, TTTAGGG)

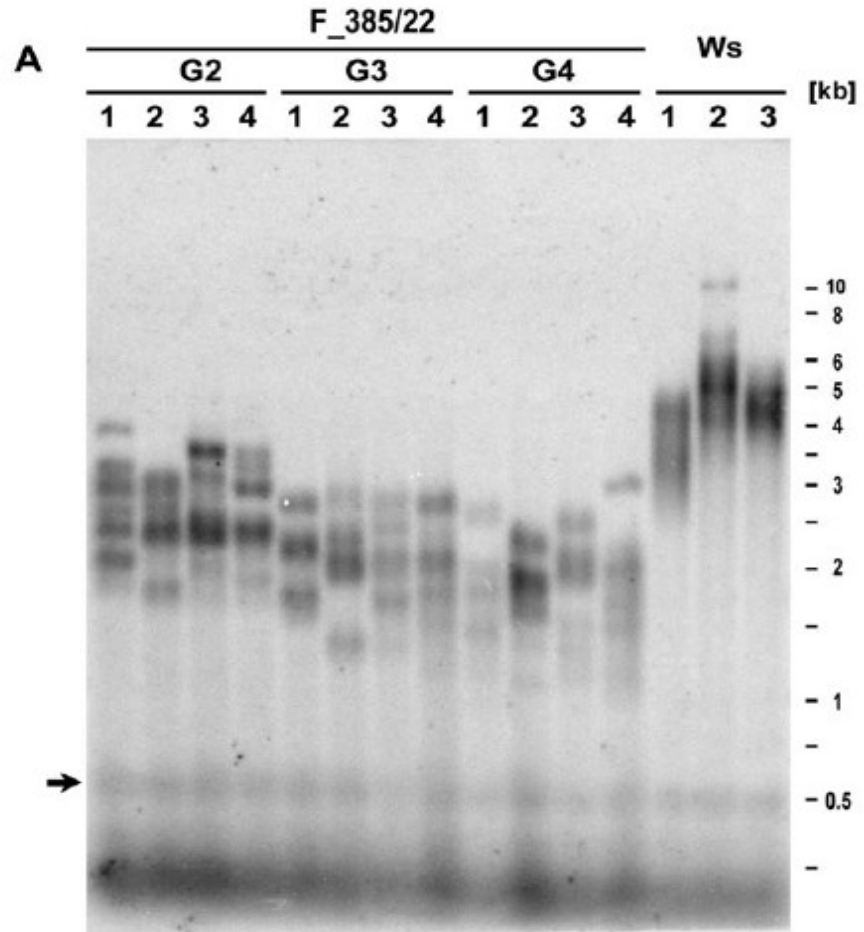
*Tru I (Mse I)* TTAA

*Hae III* GGCC

*Rsa I* GTAC

2. Elfo na agarózovém gelu
3. Blotting na nylonovou membránu
4. Hybridizace s radioaktivně značenou sodnou (telomerový oligonukleotid)
5. Detekce hybridizačního signálu

# ANALÝZA DÉLKY TELOMER

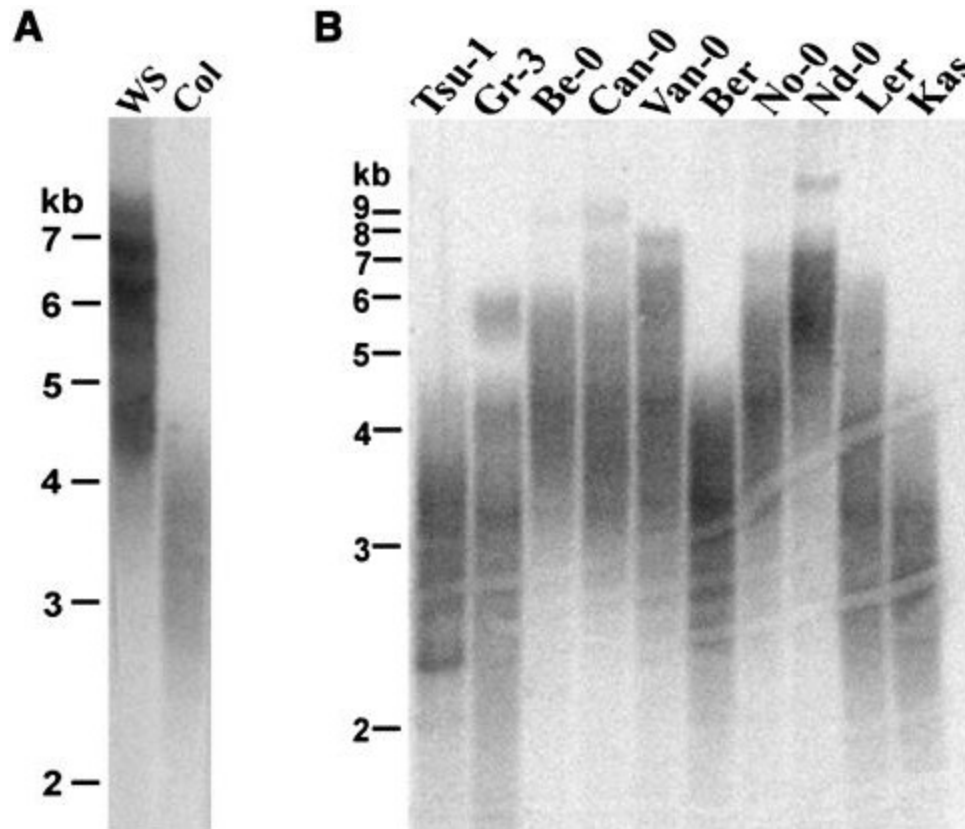


Telomery *A. thaliana*,  
ecotype Wassilevskija

Fojtová et al., 2011

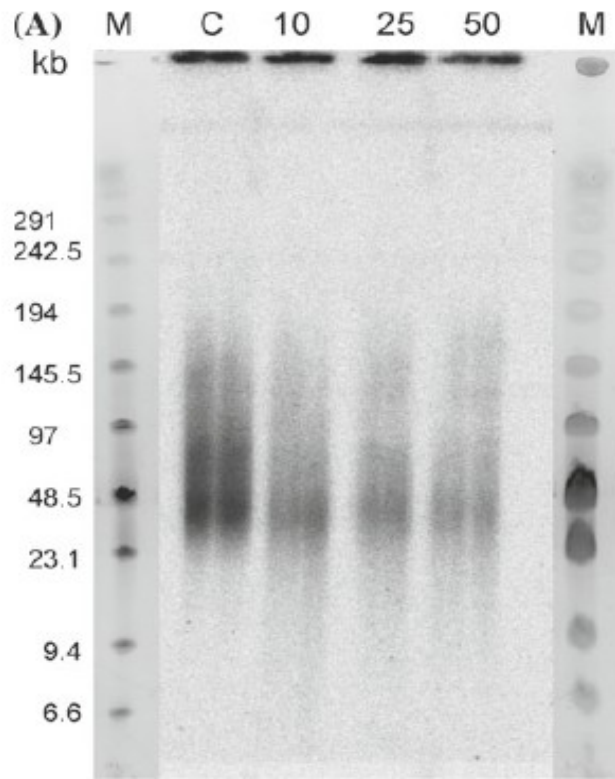


# ANALÝZA DÉLKY TELOMER



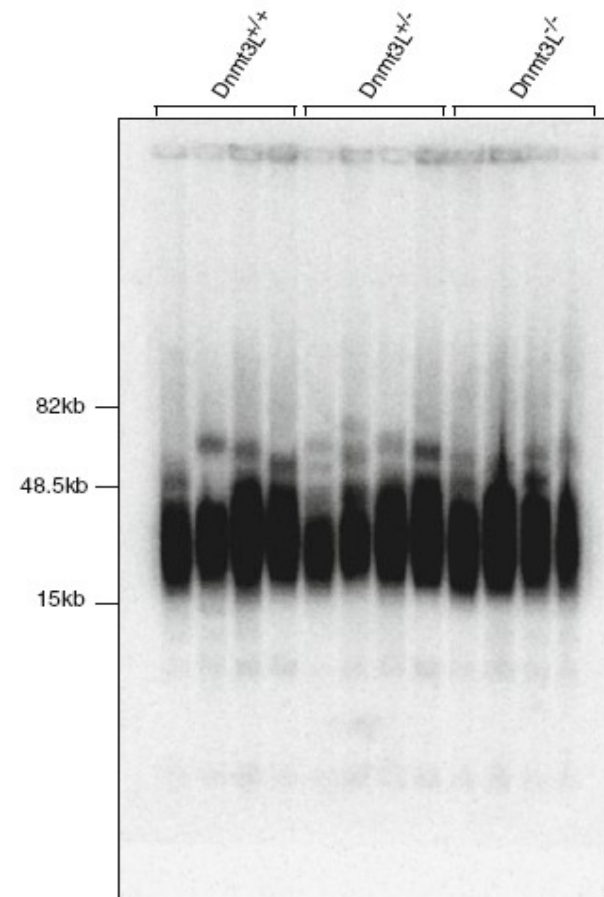
Shakirov and Shippen, 2004

# ANALÝZA DÉLKY TELOMER



Majerová et al., 2011

Telomery TBV-2  
(suspenní tkáňová kultura tabáku)

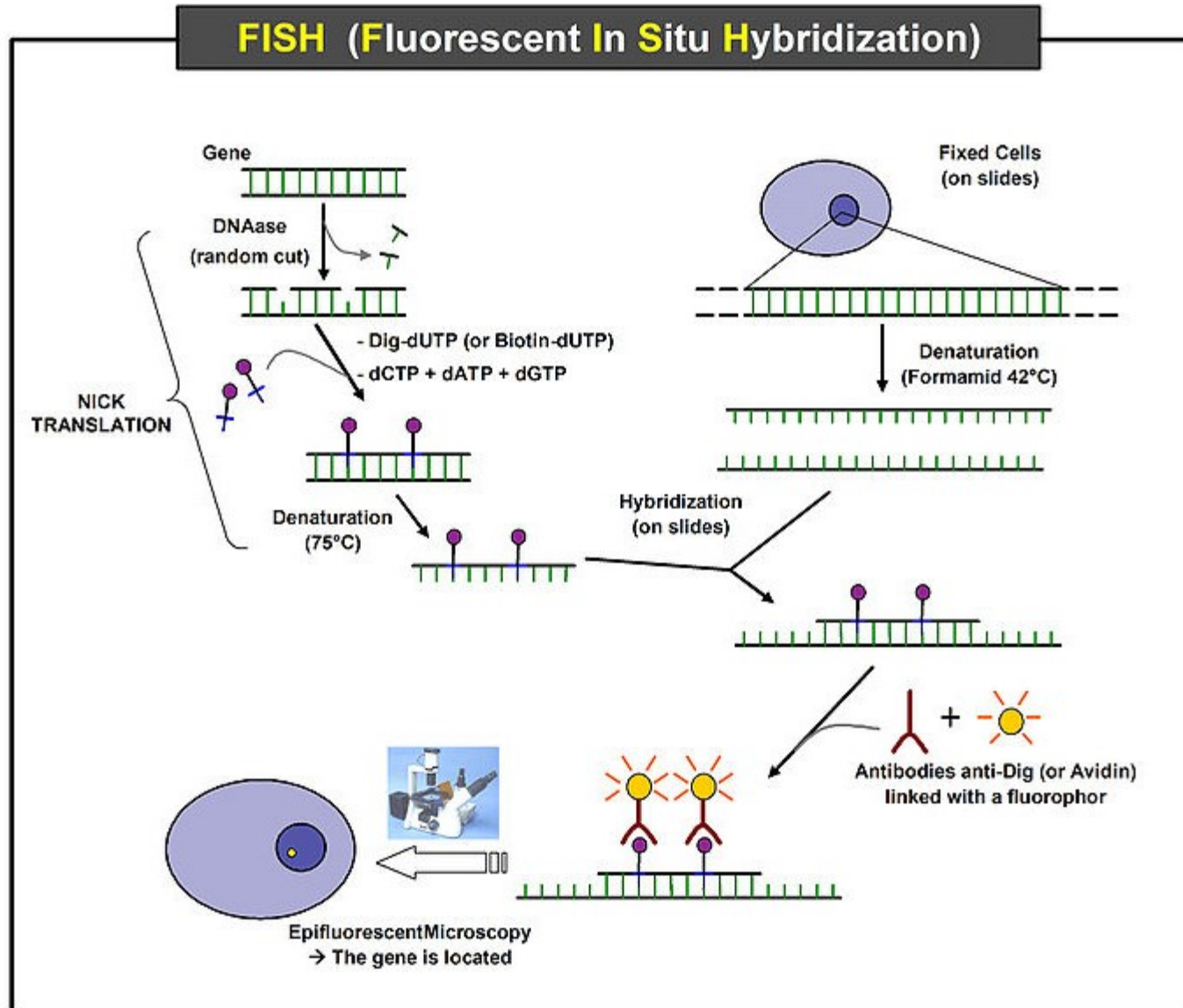


Roberts et al., 2011

Slezina, dospělé myši

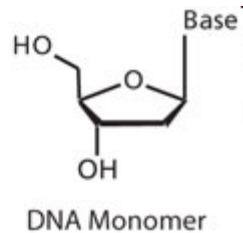
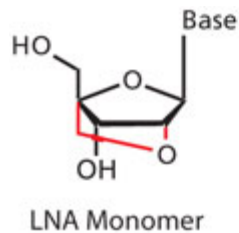
Izolace vysokomolekulární DNA (HMW DNA), PFGE (pulse field gel electrophoresis)

# FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE



# FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

## LNA (locked nucleic acid) sondy

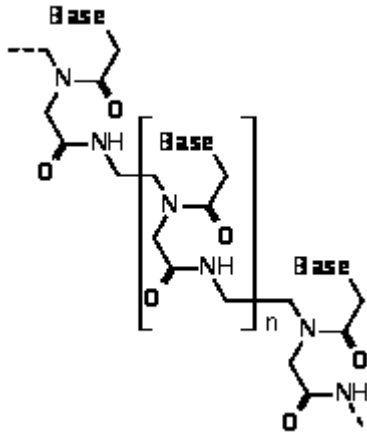


metylénový můstek – vyšší teplotní stabilita  
nižší flexibilita  
vyšší hybr. interakce

sekvence	bází LNA	T <sub>m</sub>
GTGATATGC	0	29 C
<b>GTGATATGC</b>	3	55 C
<b>GTGATATGC</b>	9	64 C

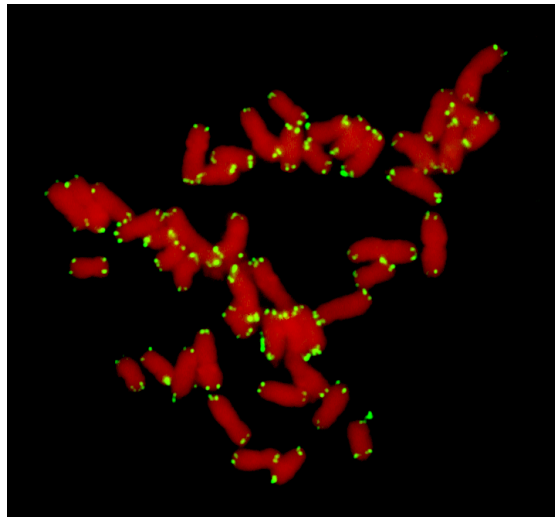
# FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

## PNA (peptide nucleic acid) sondy



N-(2-aminoethyl)-glycinové monomery  
spojené peptidovou vazbou

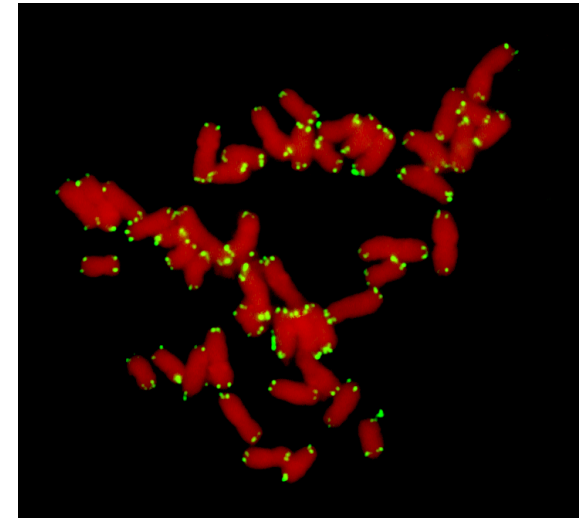
Silná vazba PNA:DNA (bez elektrostatické repulse)  
Hydrofobní



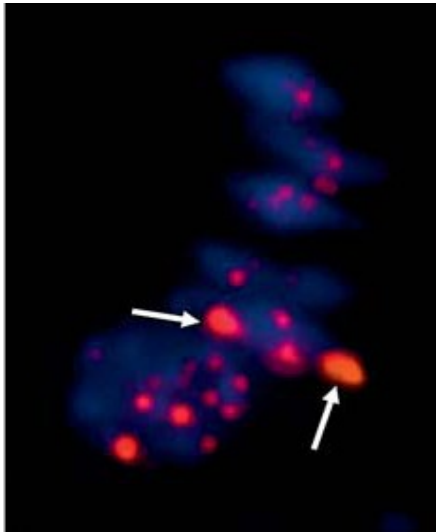
Telomery *Nicotiana tabacum*, © T. Mandáková

# FISH – FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE

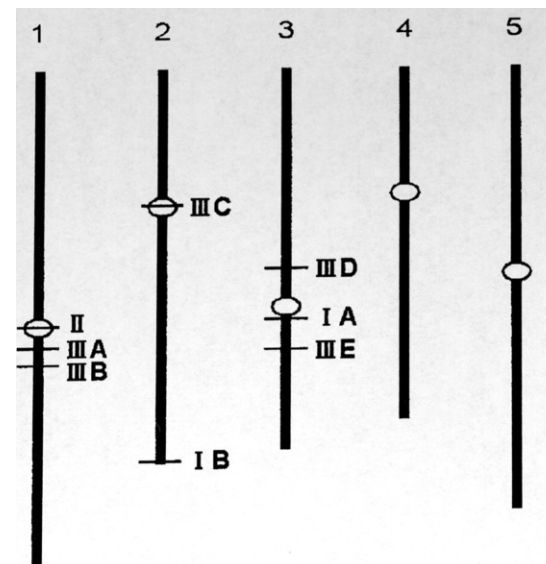
## Identifikace intersticiálních (interních) telomerových sekvencí



Telomery *Nicotiana tabacum*, © T. Mandáková

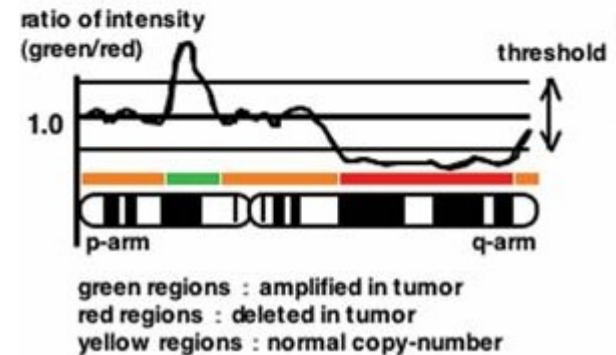
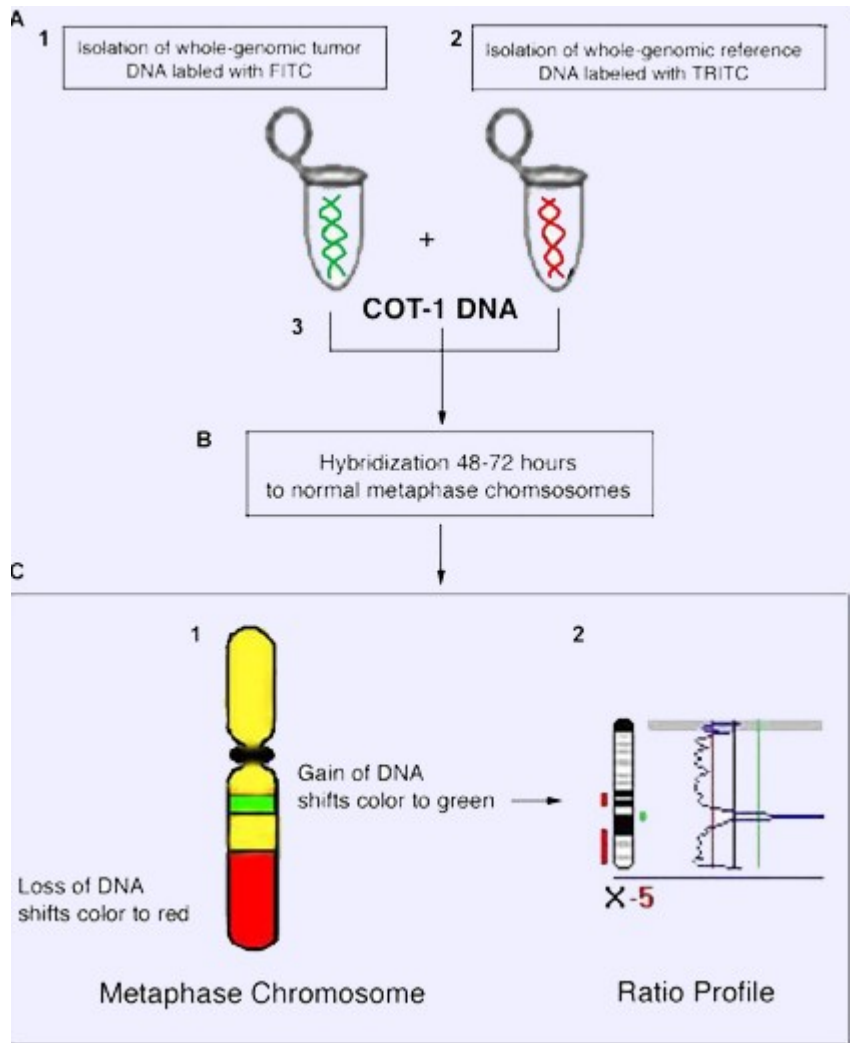


Telomery *A. thaliana*, Šíroký et al., 2002



Uchida et al., 2002

# KOMPARATIVNÍ GENOMOVÁ HYBRIDIZACE



# CHROMOSOME PAINTING

---

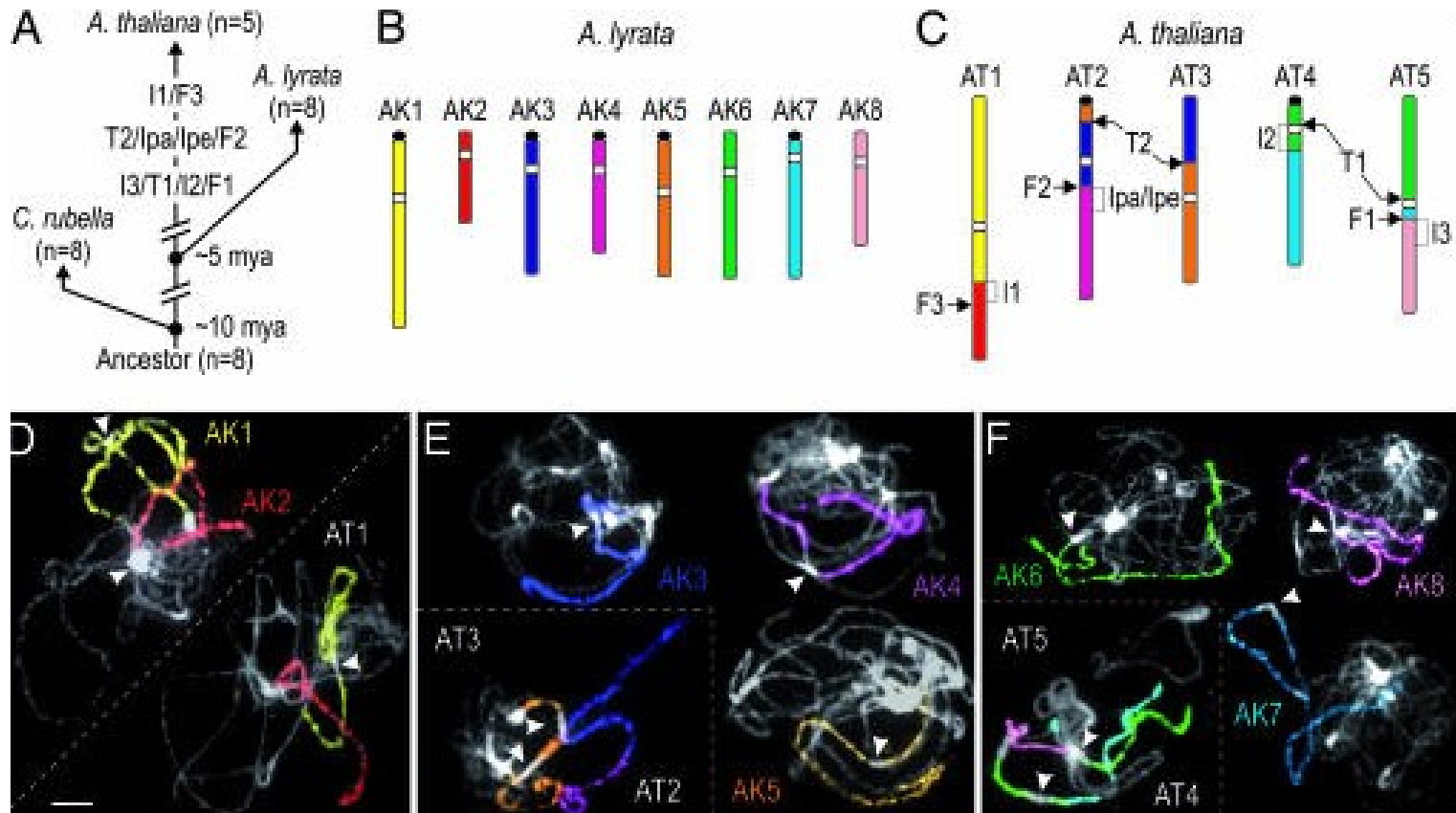
Vizualizace velkých chromosomových segmentů se specifickými fluorescenčně značenými DNA sondami (BAC).

Savci, ptáci, plazi, hmyz – identifikace chromozomálních aberací (diagnostika), chromosomové přestavby (evoluční studie)

Rostliny – velký počet chromosomově nespecifických signálů (vysoká komplexita rostlinných genomů)



# CHROMOSOME PAINTING



Lysák et al. 2006