

Hybridizace

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2013

Obsah přednášky

- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**



Doporučená literatura

Tentokrát se musíte spolehnout na základní literaturu + odkazy na odborné publikace uvedené v přednášce

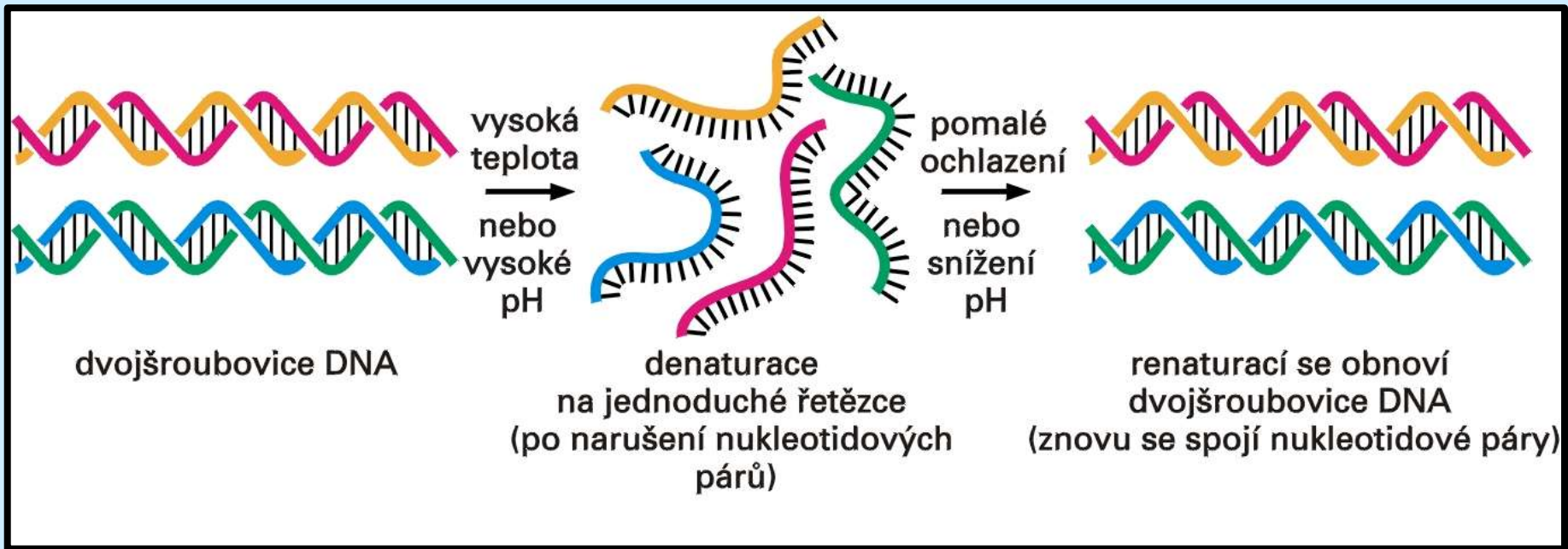
Hybridizace

- reasociace dvou jednořetězcových DNA nebo RNA, pokud mají jejich sekvence úplně nebo částečně komplementární báze



- nemyslí se jí ale spojování jednořetězců, které byly součástí téže molekuly) = renaturace

Hybridizace je založena na schopnosti NA denaturovat a renaturovat

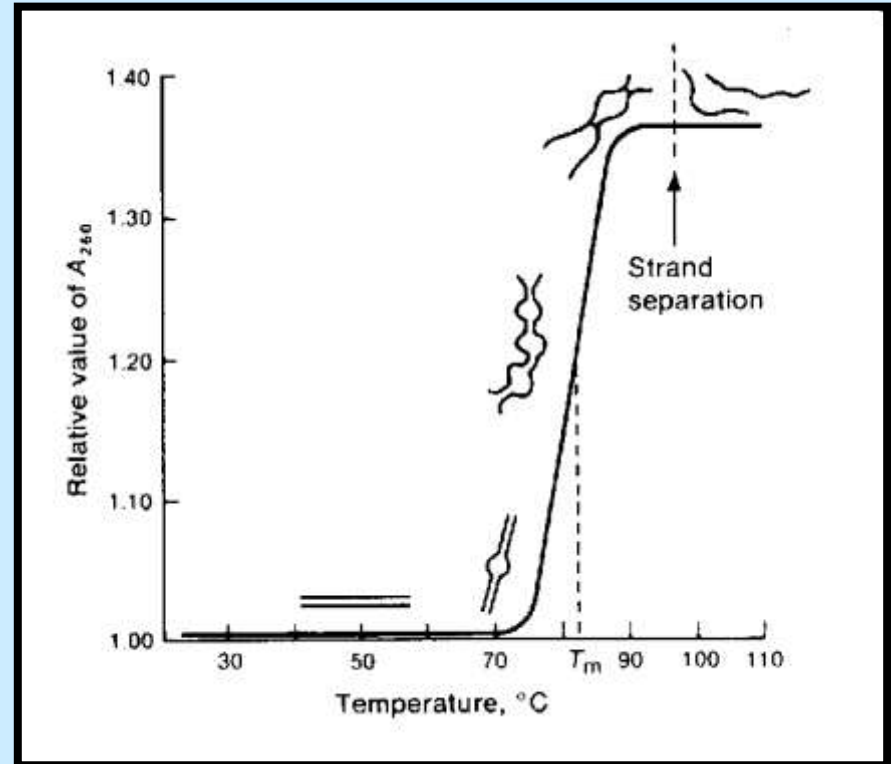


Co to je denaturace DNA

- **oddělení komplementárních vláken DNA působením vysoké teploty (90-100°C), extrémních hodnot pH nebo denaturačních činidel (formamid, močovina)**
- **Při denaturaci se zvyšuje absorpce světla při vlnové délce 260 nm (tzv. hyperchromní efekt)**
- **Je to důsledek změny v uspořádání bází**

Co to je hyperchromní efekt

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



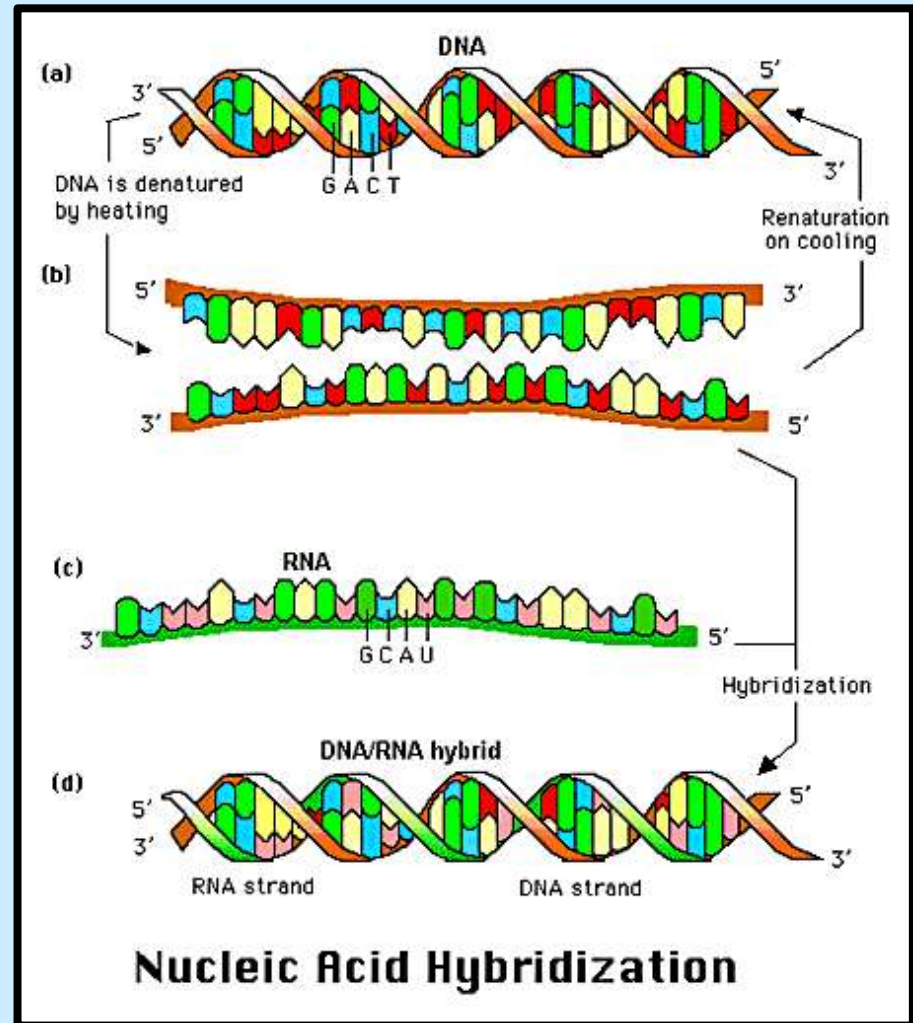
http://members.tripod.com/arnold_dion/RecDNA/Fig1-7.gif

Co to je renaturace DNA

- opětná tvorba dvouřetězcových struktur z jednořetězcových polynukleotidů za vhodných připojovacích („annealing“) podmínek
- nastává při pomalém ochlazení (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



Využití hybridizace

- **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**
- **vyhledávání sekvencí v genových knihovnách**
- **vyhledávání sekvencí v cytologických preparátech**
- **charakterizace sekvencí**
- **mapování genomu**
- **při polymerázové řetězové reakci**

Typy hybridizací

- hybridizace v roztoku
- hybridizace na pevném povrchu
- hybridizace *in situ* (FISH) – mapování chromozómů a specifických lokusů
- DNA, RNA arrays

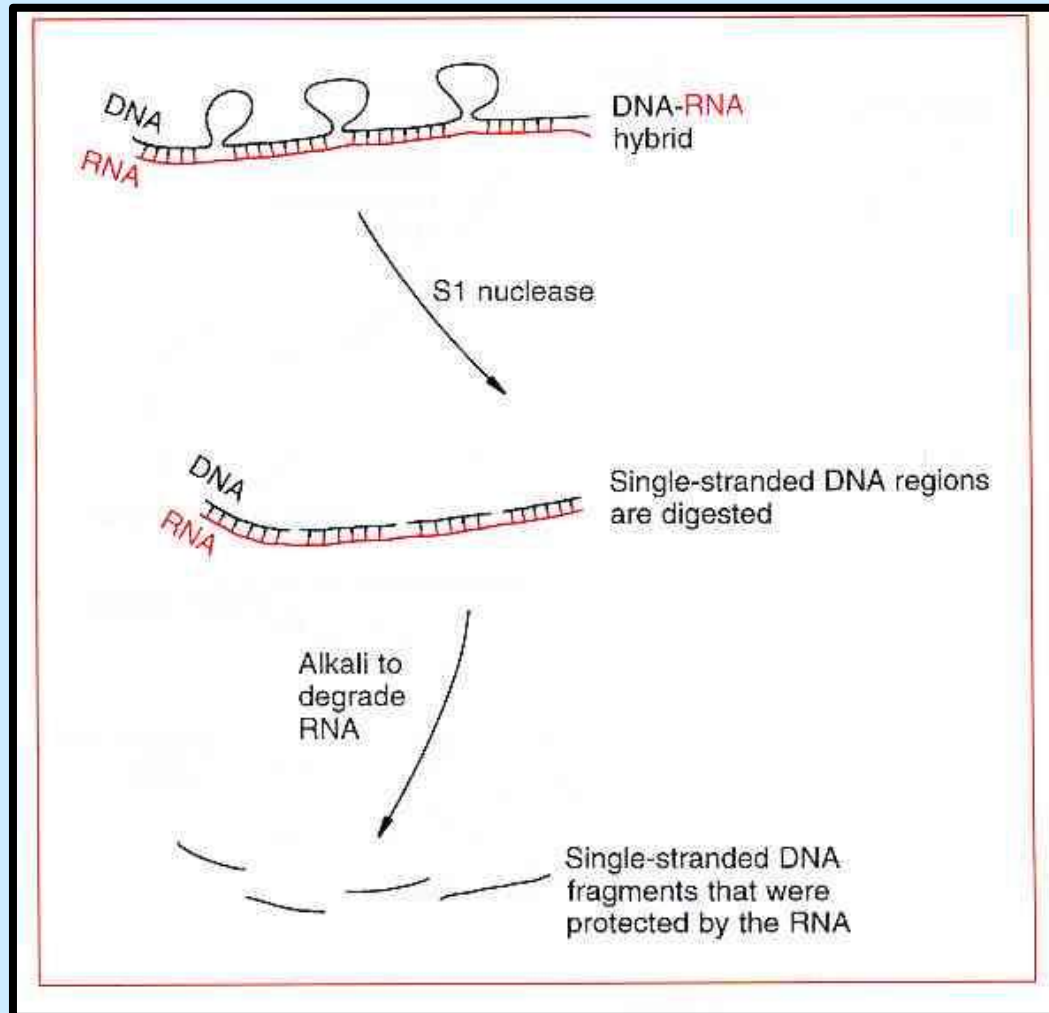
Hybridizace v roztoku

Samotná se téměř nevyužívá, většinou spojená s další detekční technikou

- **S1 mapování (detekce exonů a intronů hybridu DNA/mRNA)**
- **Denaturační gradiendová gelová elektroforéza (DGGE)**
- **Heteroduplexní analýza**

S1 mapování

Význam pro mapování složených genů





Mají bakterie složené geny?

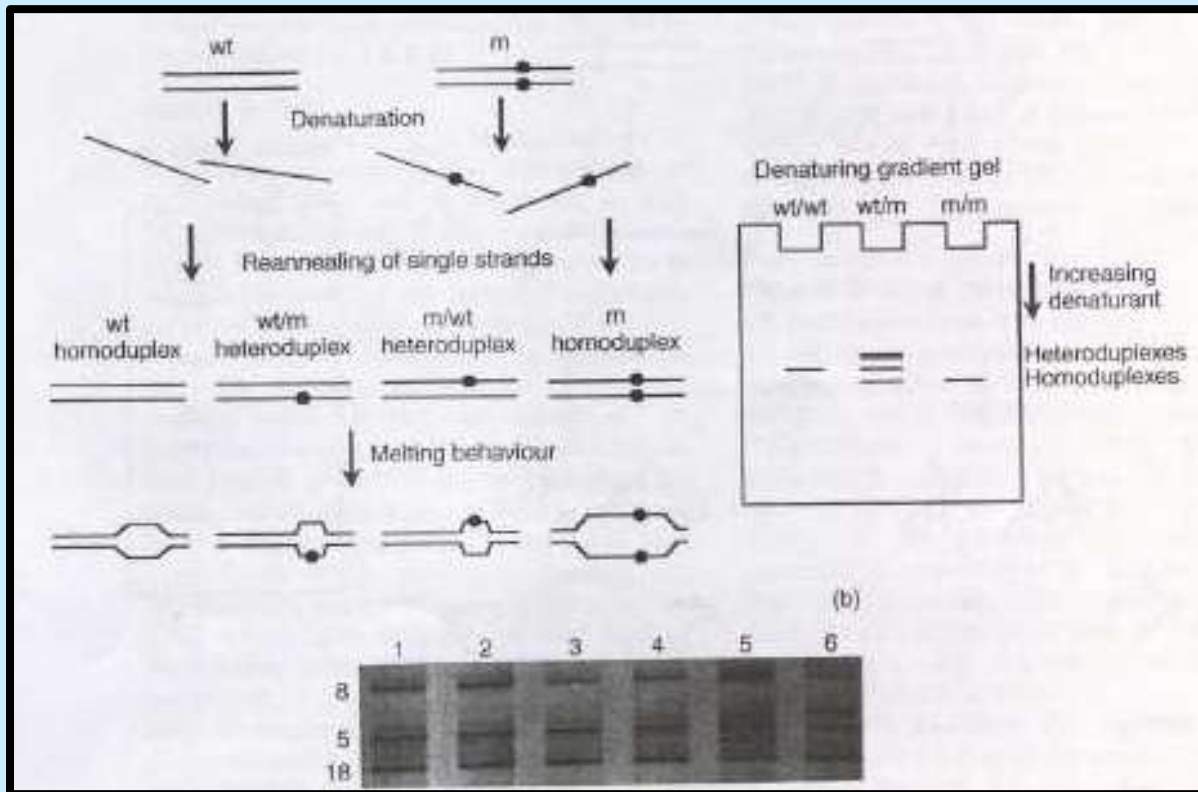
Nemůžu žádný příklad najít.

Ale naše přednáška je o mikroorganismech, nejen o bakteriích. A kvasinky složené geny mají!



DGGE

- Páry CG drží více pohromadě než páry TA



Podobně funguje TGGE

Analýza heteroduplexů

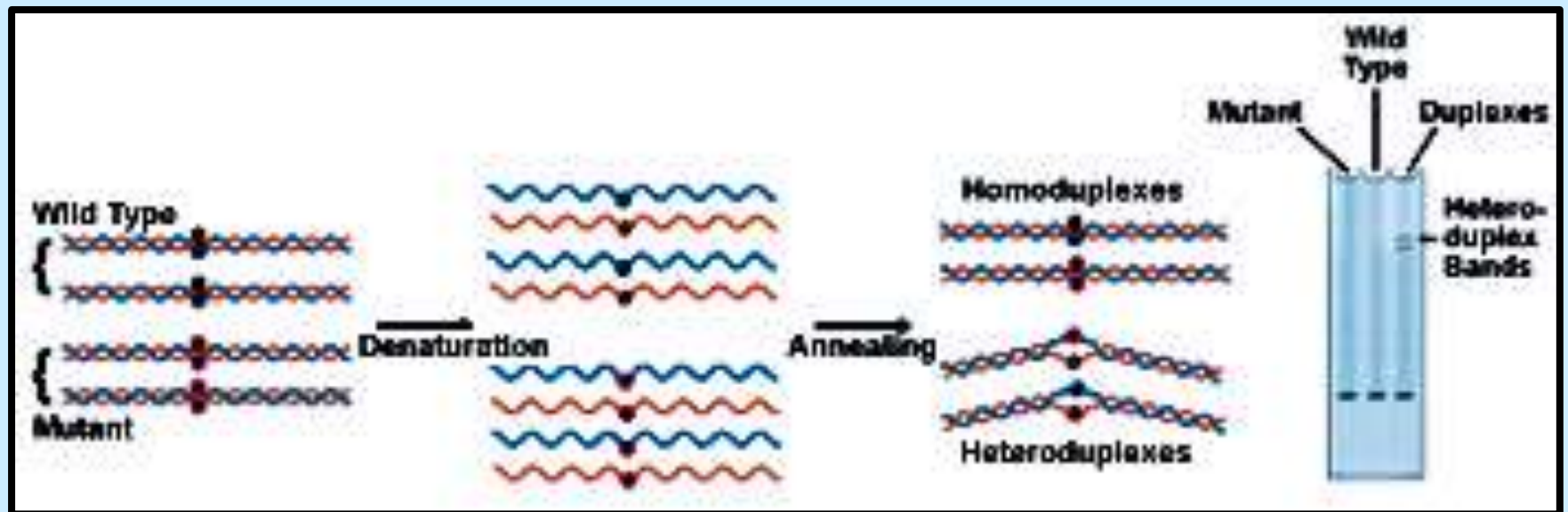
- **Molekuly dsDNA vznikají z řetězců, které pocházejí z různých zdrojů**
- **Výsledné struktury nejsou 100% komplementární, z toho plyne označení heteroduplex**
- **Obsahují smyčky a bubliny v oblastech, kde se sekvence DNA liší**
- **Struktury lze pozorovat mikroskopicky – heteroduplexní mapování**



Podívejte se na heteroduplexní mapování v základní učebnici

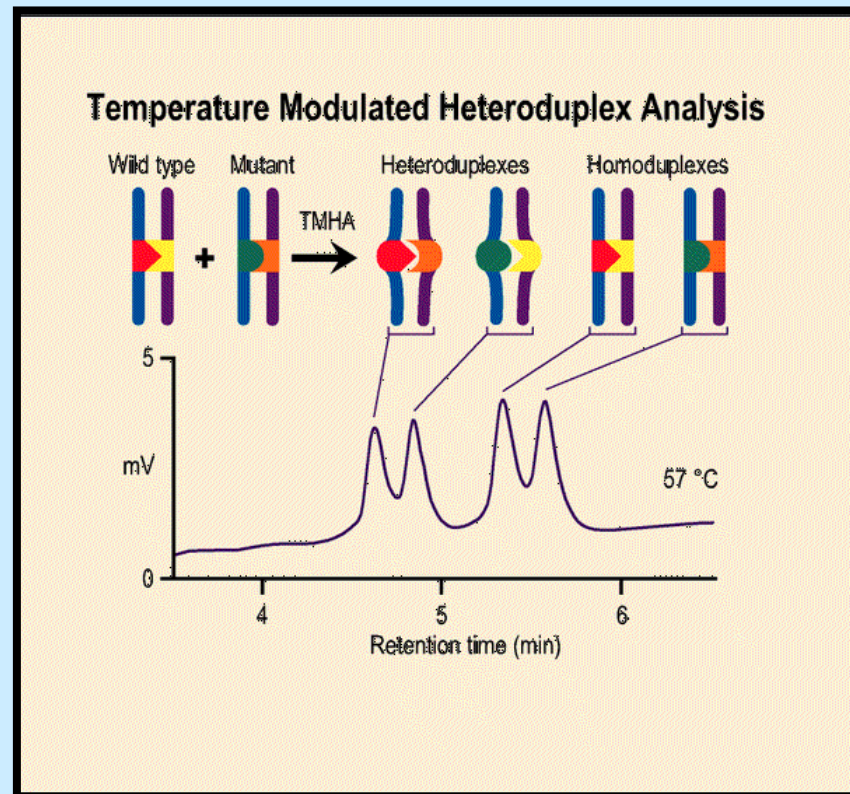
Analýza heteroduplexů

Heteroduplexy se pohybují pomaleji než homoduplexy



Analýza heteroduplexů

Homoduplexy a heteroduplexy lze rozlišit i kapilární elektroforézou



Hybridizace na pevném povrchu

- Probíhá na speciální membráně
- Vzorek se nanáší přímo na membránu = **tečková hybridizace (dot blot)**
- Vzorek se rozdělí na gelu a pak se přenese na membránu = **Southernův přenos (Southern blot)**
- Základem hybridizace je obvykle **značená sonda** o známé nukleotidové sekvenci

Blotting = přenos

- **Southern blotting (Dr. Edwin Southern) = DNA**
- **Northern blotting = RNA**
- **Western blotting = proteiny**

- **southwesternový přenos - proteiny vázající se na DNA (sondou je DNA)**
- **northwesternový přenos - proteiny vázající se na RNA (sondou je RNA)**

K čemu se využívá Southernův přenos

- **Identifikace přítomnosti genu v materiálu vůbec**
- **Identifikace genu za účelem jeho klonování**
- **Využívá se tam, kde je dostupné pouze malé množství vstupního materiálu nebo je vysoké pozadí**

Příprava hybridizačních sond

Sondy radioaktivně značené

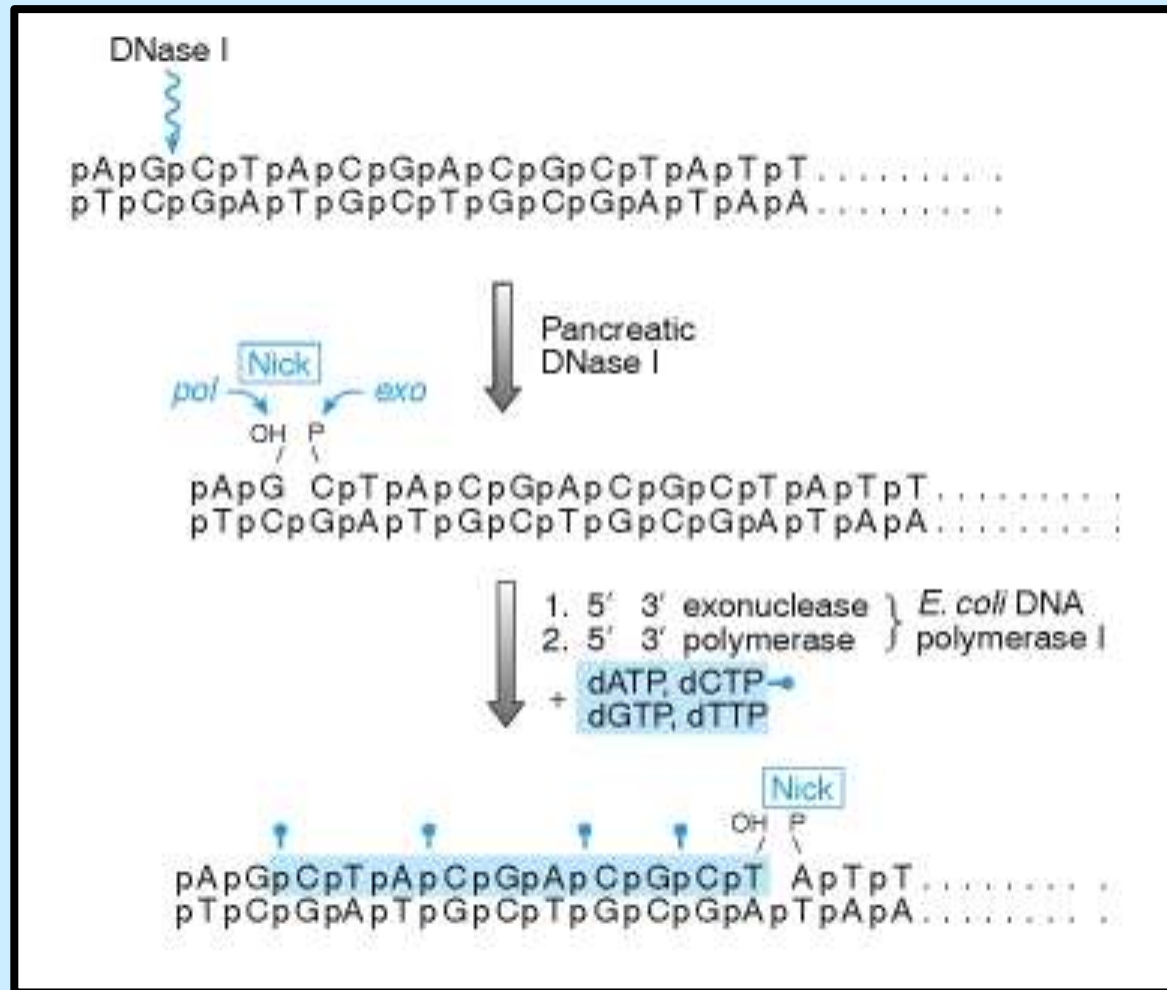
- **Nick translace**
- **Vyplnění jednořetězcových konců**
- **Nahodilé značení**
- **Zpravidla se využívá radioaktivní fosfor ^{32}P**

Sondy fluorescenčně značené

- **Značení biotinem**
- **Značení digoxigeninem**
- **Značení křenovou peroxidázou**
- **Citlivější, bezpečnější, dnes už používané častěji**

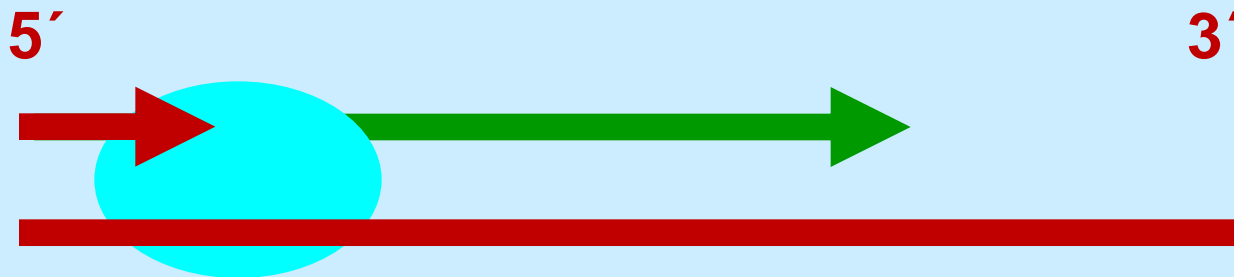
Nick translation

Posun jednořetězcového zlomu

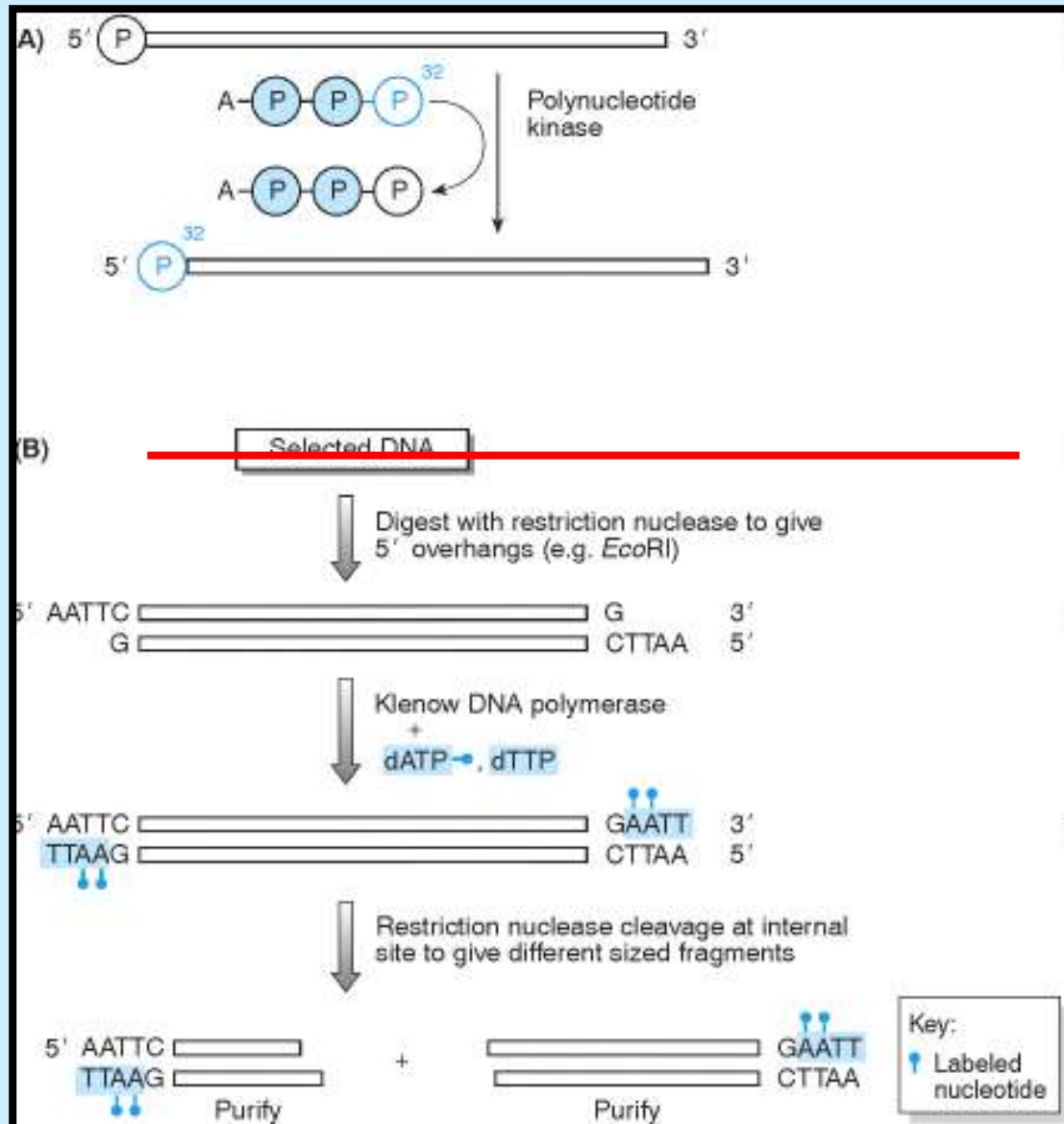


Zopakujme si: Klenowův fragment

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- tam, kde se neodbourává primer
- sekvenování, značení DNA

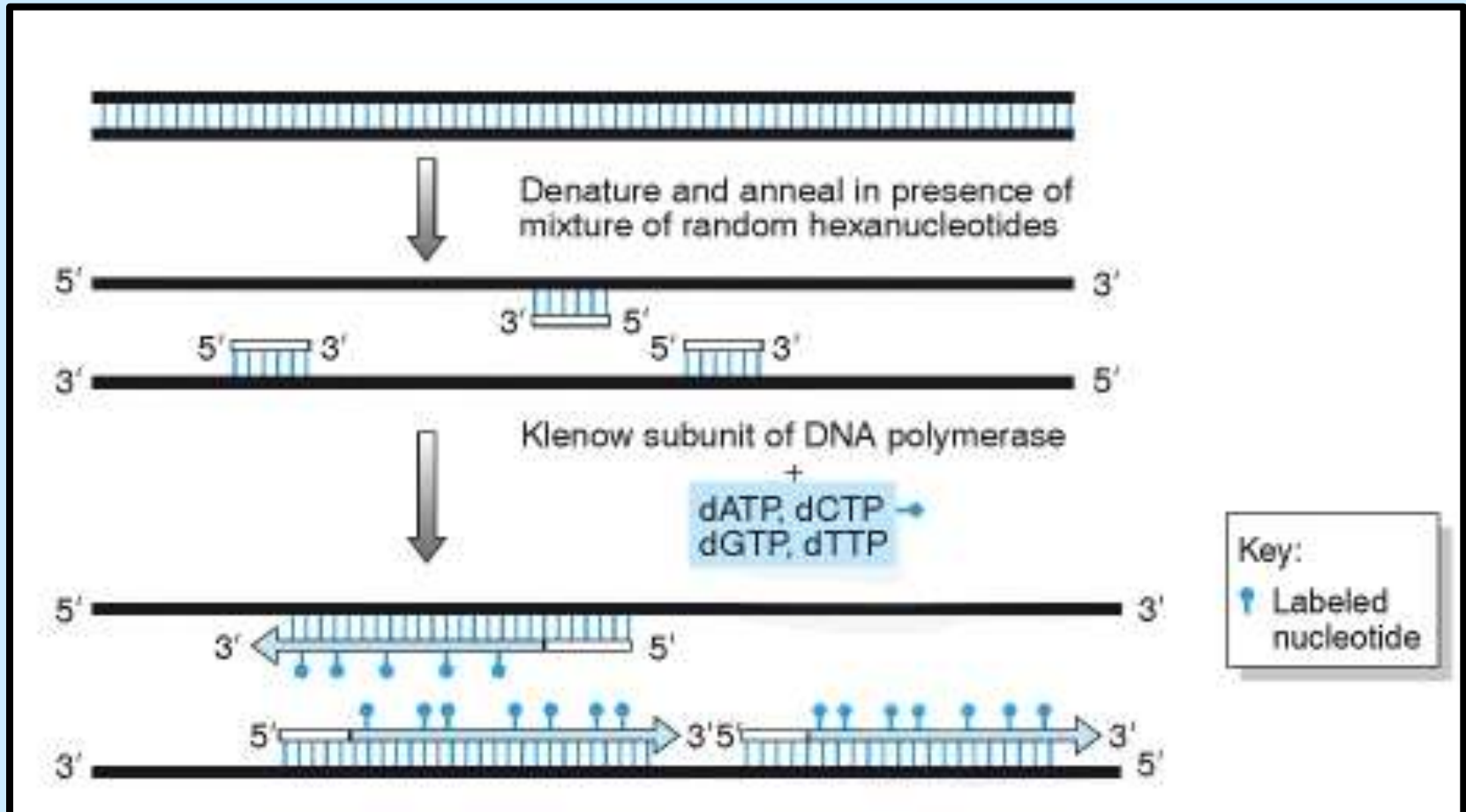


Značení konců nukleových kyselin



Nahodilé značení

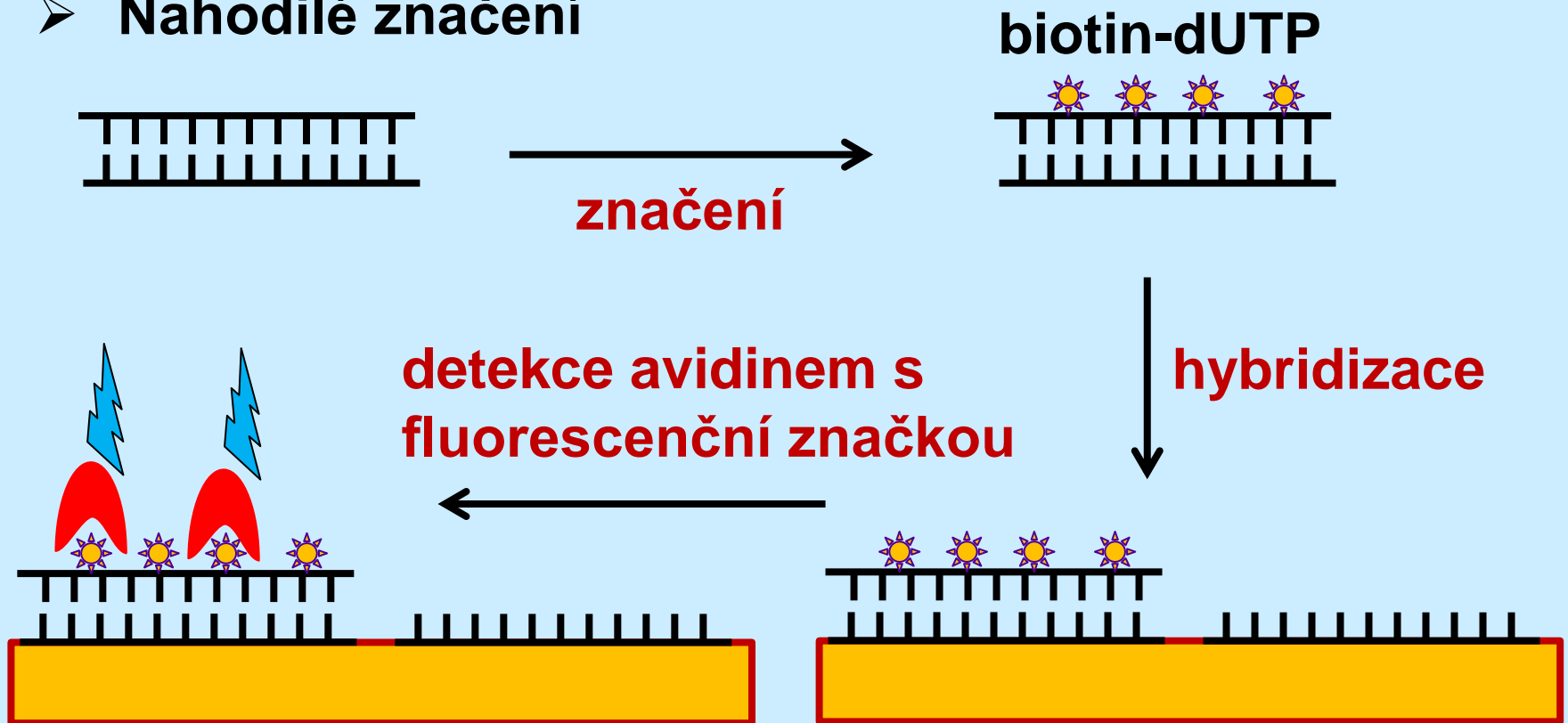
„random primer DNA labeling“ = prostřednictvím náhodných hexanukleotidů



Značení biotinem

Lze využít všech tří základních postupů

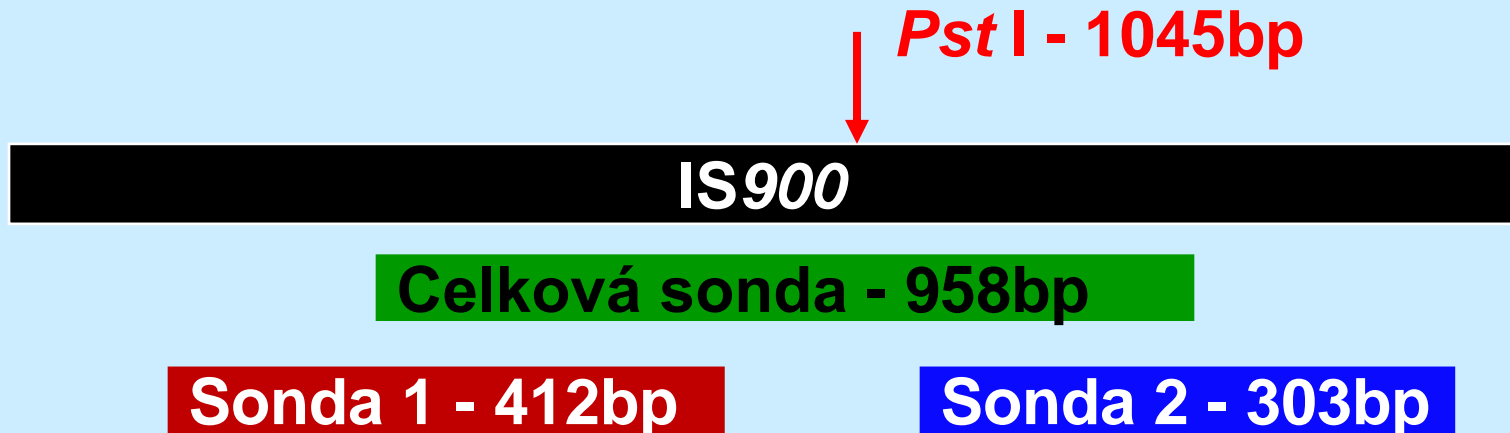
- Nick translace
- Vyplnění jednořetězcových konců
- Nahodilé značení



Praktická aplikace značení sond

Příprava sond pro diferenciaci kmenů *M. a. paratuberculosis*

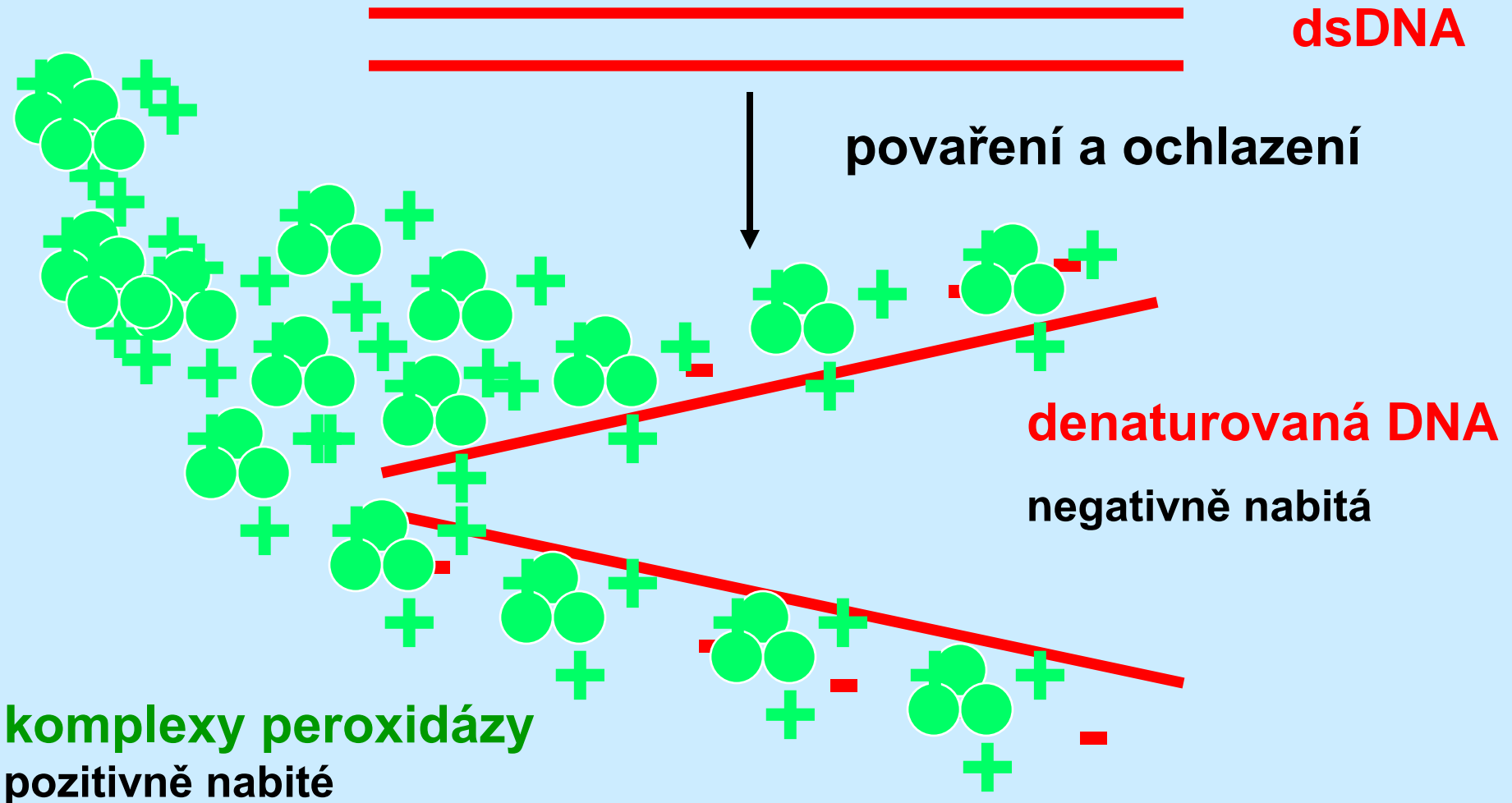
Celkem 3 sondy detekující části inzerční sekvence IS900 – inzerční sekvence specifické pro *M. a. paratuberculosis*



Základní kroky při přípravě sond

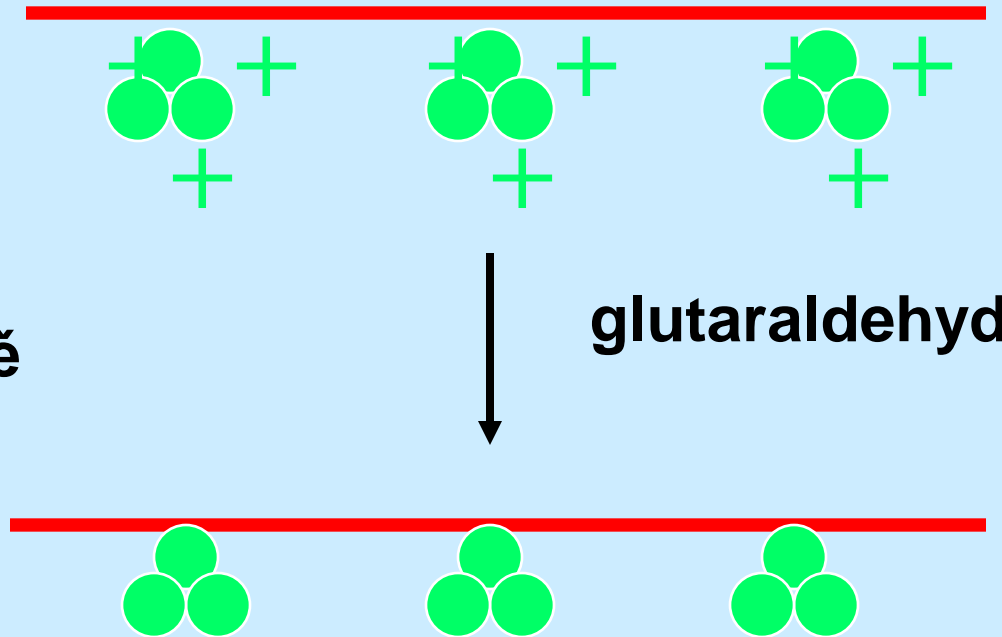
- **Amplifikace specifických fragmentů PCR**
- **Purifikace amplikonů**
- **Značení sond peroxidázou**
- **Kontrola koncentrace sondy**

Značení sondy



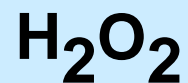
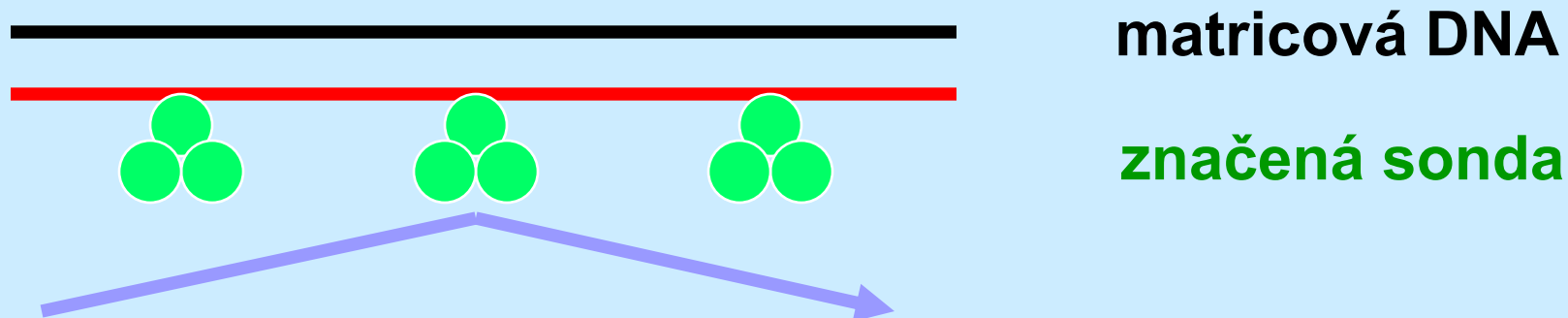
Značení sondy

peroxidáza
se váže k
DNA špatně

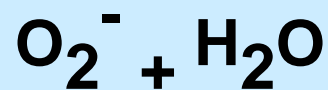


peroxidáza se váže k DNA kovalentně

Detekce peroxidázou značené sondy



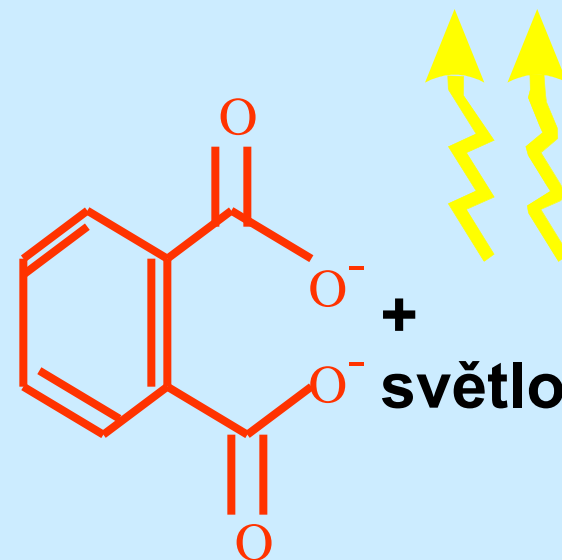
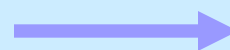
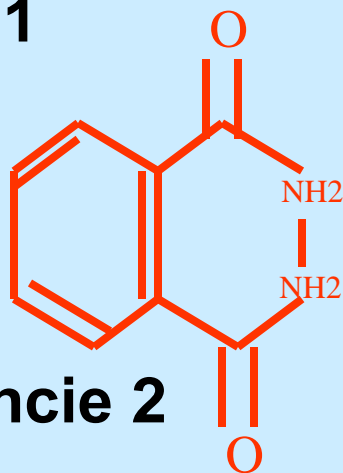
detekční reagensie 1



zesilovač

luminol

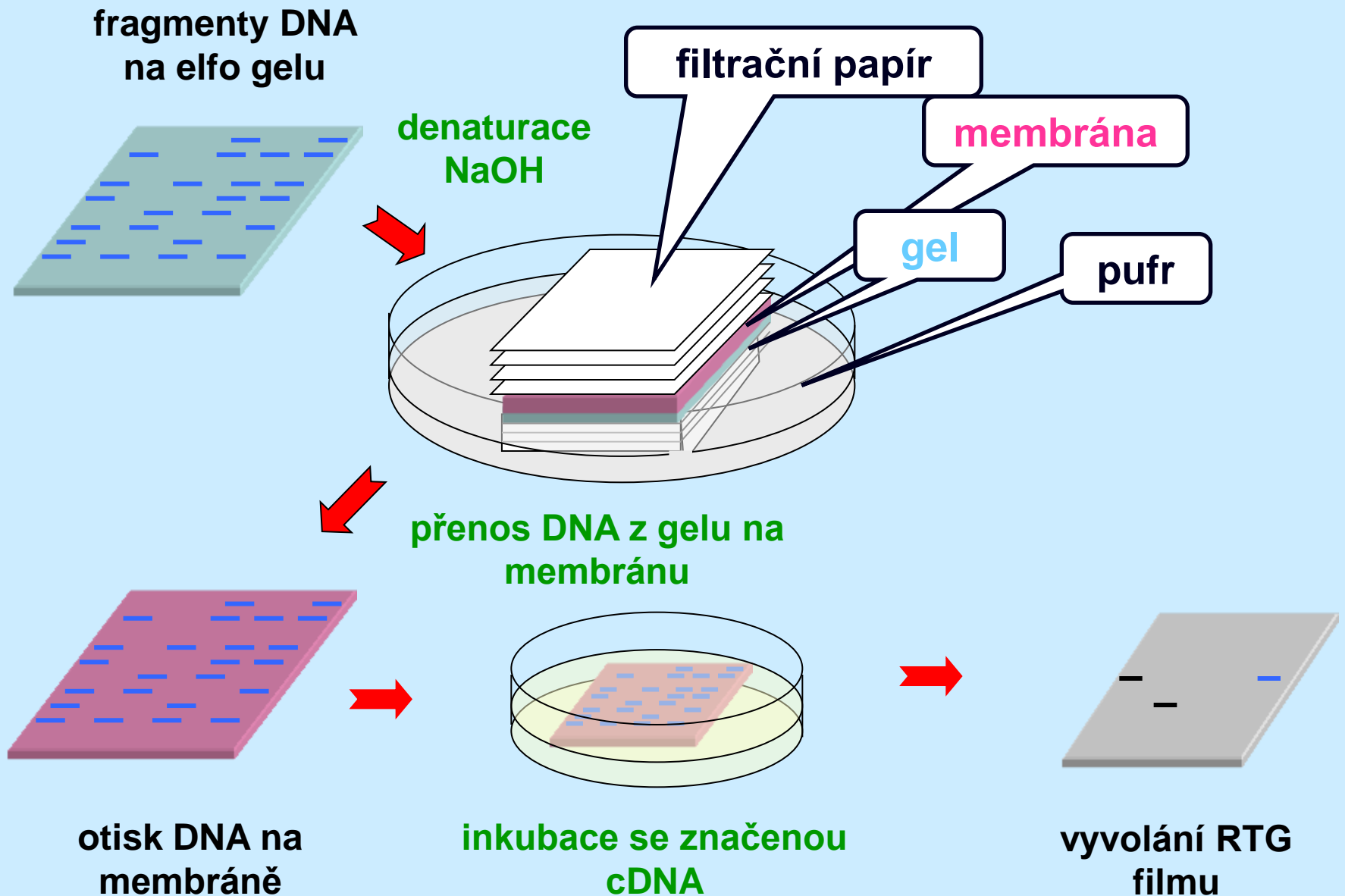
detekční reagensie 2



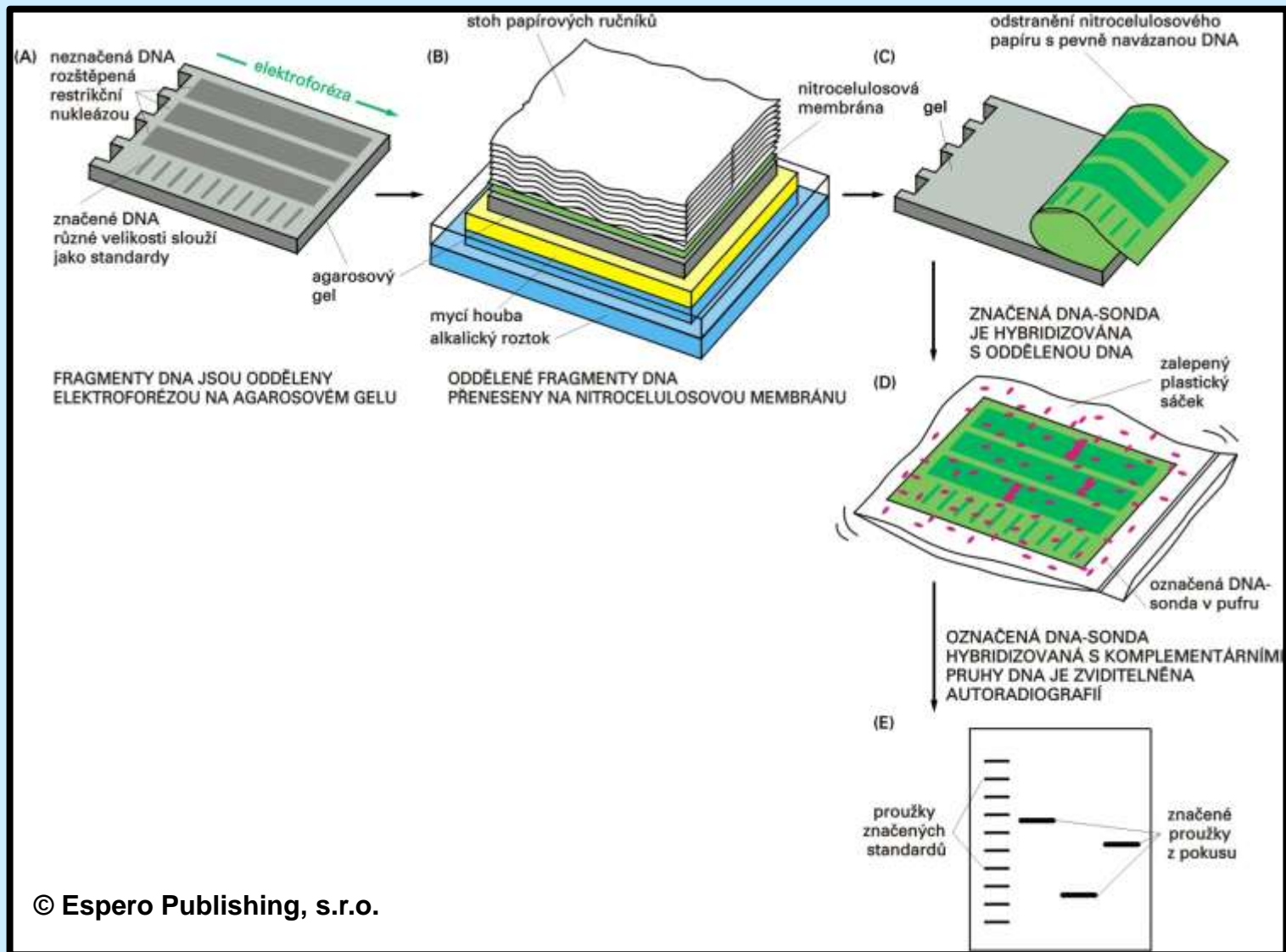
Postup při Southernově přenosu

- 1. rozdělení fragmentů DNA** daného vzorku gelovou elektroforézou
- 2. denaturace DNA a přenos** jednořetězcových fragmentů DNA **na** nylonový **filtr** („blotting“)
- 3. inkubace filtru se značenou** jednořetězcovou **sondou**: hybridizace sondy s komplementární sekvencí imobilizovanou filtru
- 4. odmytí** nenavázané sondy
- 5. detekce** navázané **sondy** - vizualizace hybridů

Southern blotting



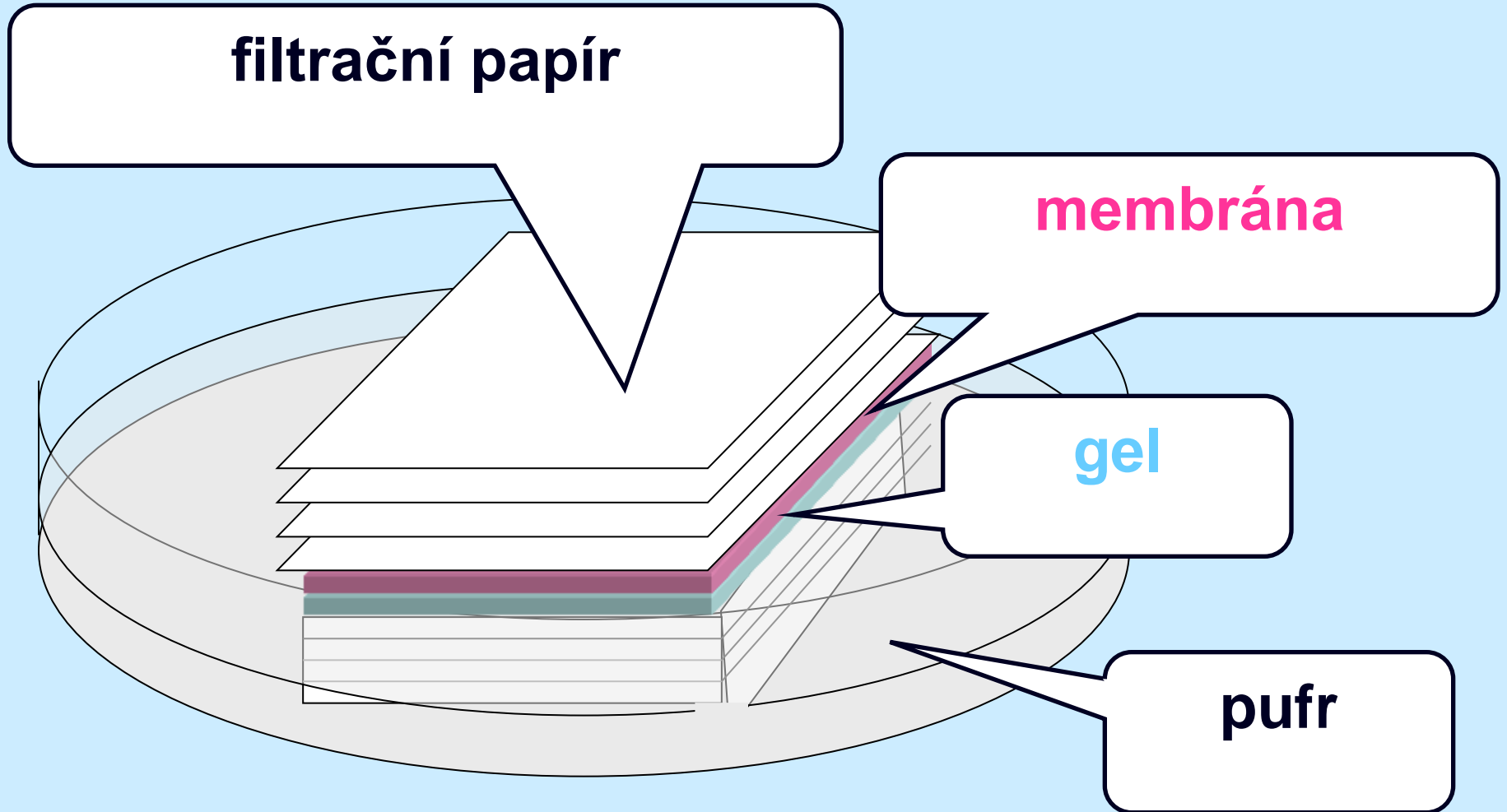
Southern blotting



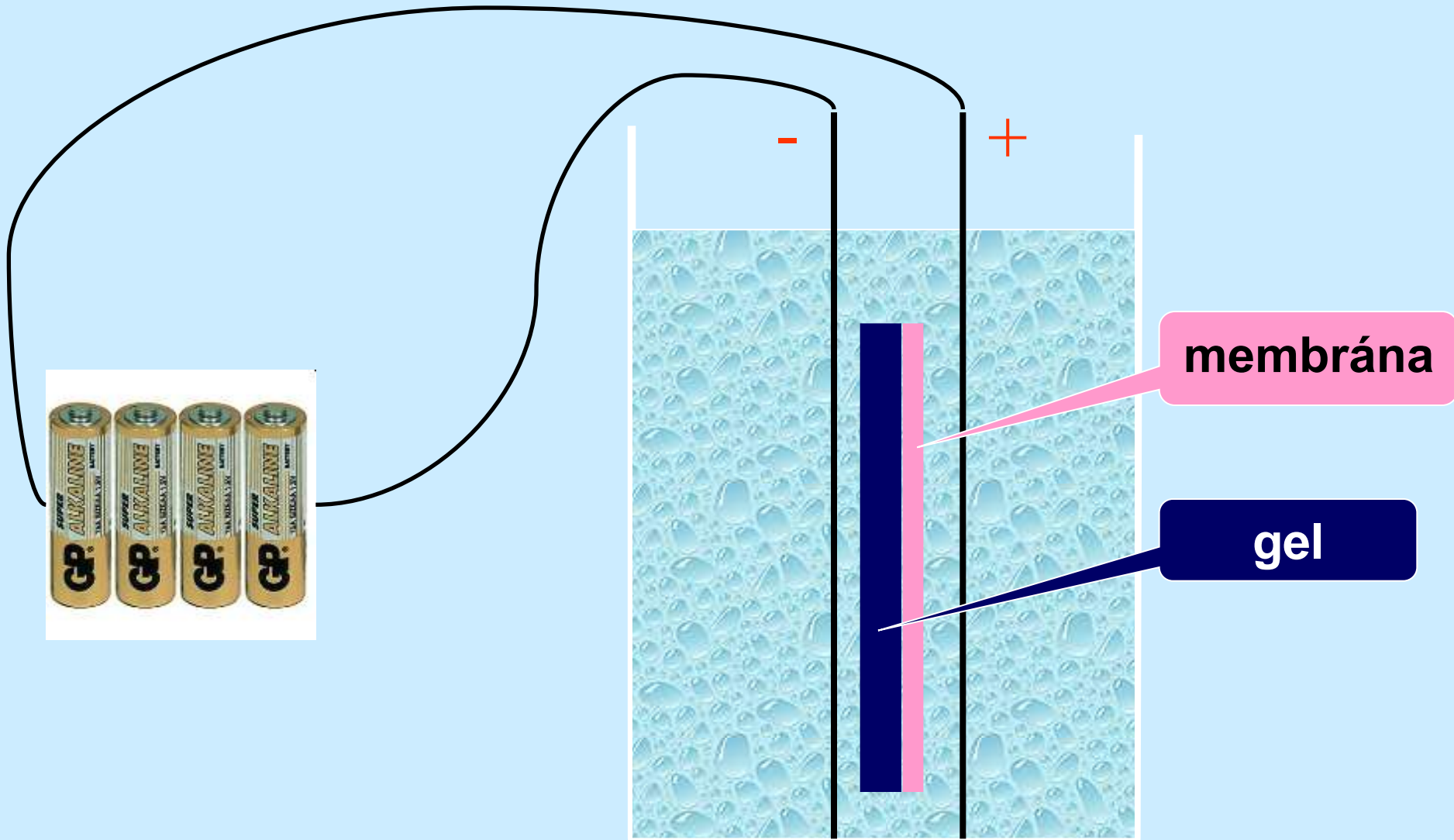
Způsoby přenosu („blottingu“)

- **kapilární přenos**
- **elektroforetický přenos**
- **vakuový přenos**

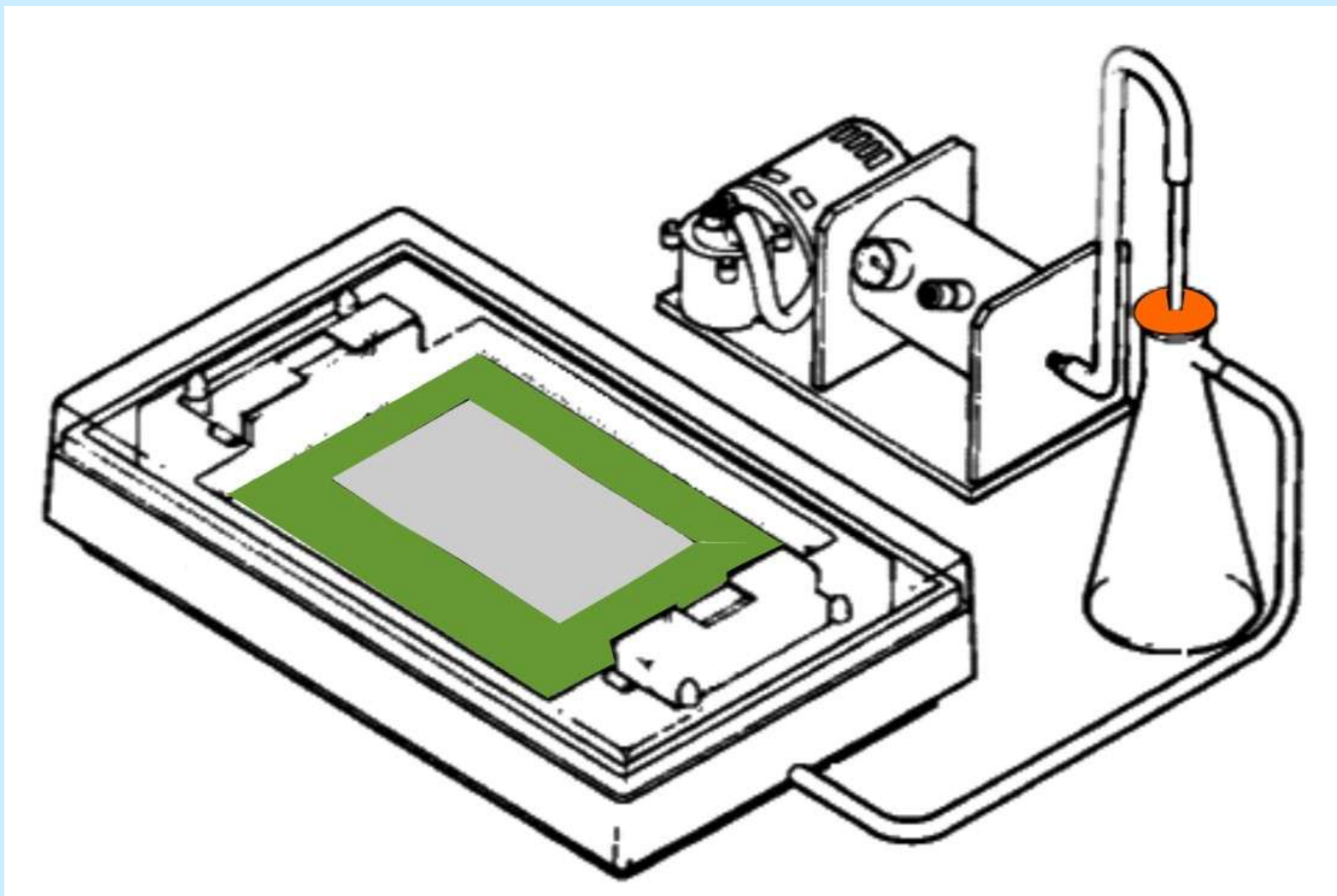
Kapilární přenos



Elektroforetický přenos



Vakuový přenos



Fluorescentní in situ hybridizace

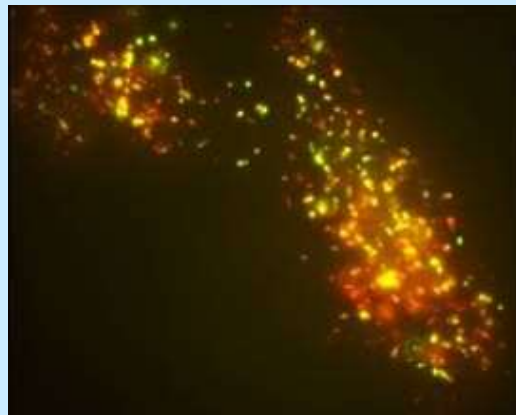
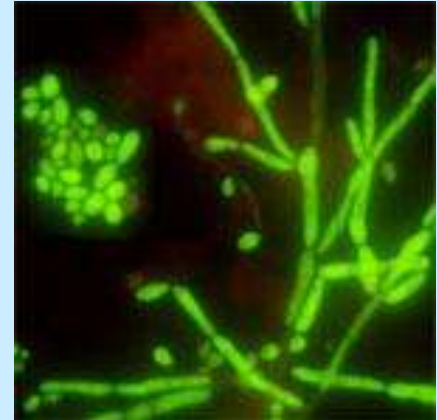
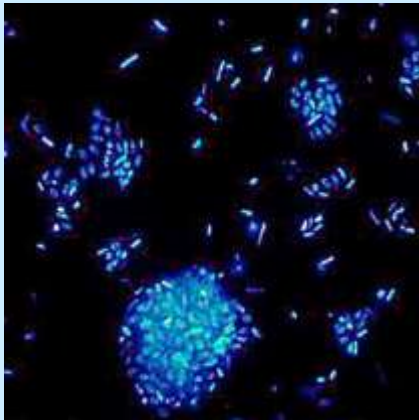
fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Metoda sestává ze tří základních kroků

- **Fixace vzorku na mikroskopickém sklíčku**
- **Hybridizace značené sondy k homologickým fragmentům na genomové DNA**
- **Enzymatická detekce hybridů sonda-cílová sekvence**
- **Sondy radioaktivně značené**
- **Sondy fluorescenční: rychlejší, silnější signál, simultánní diferenciaci různých cílů**

Ukázky FISH

fluorescence *in situ* hybridization



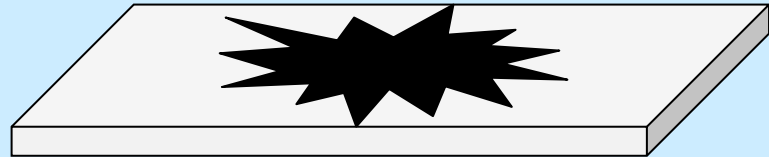
FISH v mikrobiologii

- **Umožňuje detekci i nerostoucích bakterií**
- **Sonda je druhově specifická a míří zpravidla ke genu pro 16S rRNA**
- **Metoda je vhodná pro fylogenetické, ekologické, diagnostické a environmentální studie**
- **Kombinuje preciznost molekulární biologie s mikroskopickým pozorováním**
- **Je možno pozorovat výskyt bakterií v kontextu s morfológickou charakteristikou napadené tkáně**
- **Citlivost až jediná bakterie, metodicky mimo PCR**

Typický FISH protokol

4 základní kroky

1) Fixace a permeabilizace vzorku



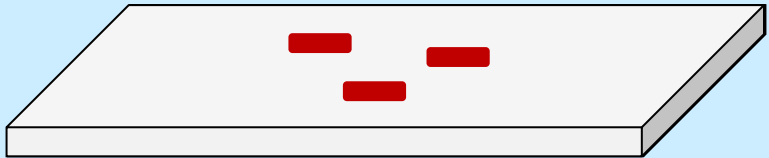
2) Hybridizace



3) Promývací kroky – odmytí nenavázané sondy



4) Detekce značených buněk mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií



Charakteristika sond

Dlouhé 15 až 30 nukleotidů

Fluorofor	Barva	Excitace	Emise
Alexa 488	zelená	493	517
Cy3	červená	552	565
Cy5	červená	649	670
DAPI	modrá	350	456
Fluorescein	zelená	494	523
Rodamin	červená	555	580
TAMRA	červená	543	575
Texas red	červená	590	615

Zodpovězte otázku



Jak dlouhá musí být minimálně sonda, aby našla jedinou specifickou sekvenci v bakterii, jejíž genom má velikost $4,0 \times 10^6$ bp?

$$4,0 \times 10^6 = 4^x$$

$$\ln(4,0 \times 10^6) = X \ln(4)$$

$$X = \ln(4,0 \times 10^6) / \ln(4)$$

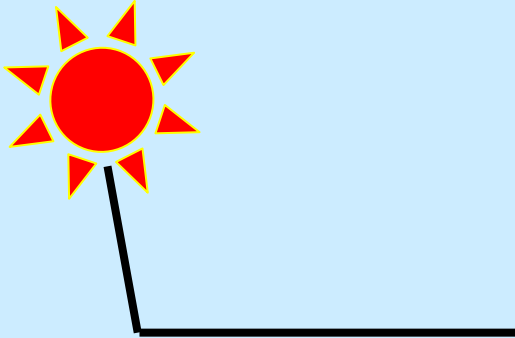
$$X = 11$$



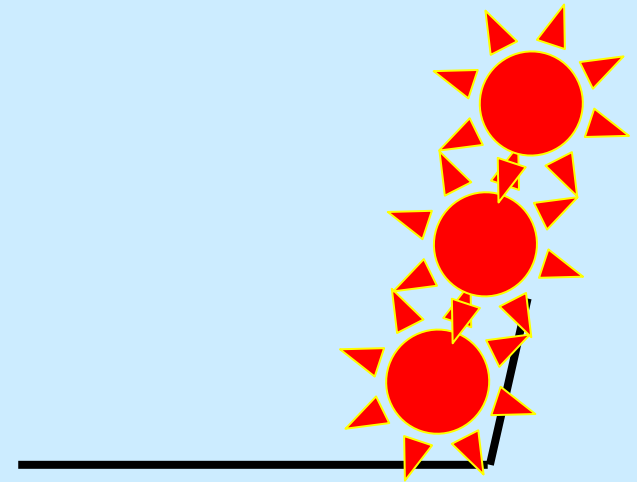
Jak označit sondu?

Přímé značení

5' - koncové značení



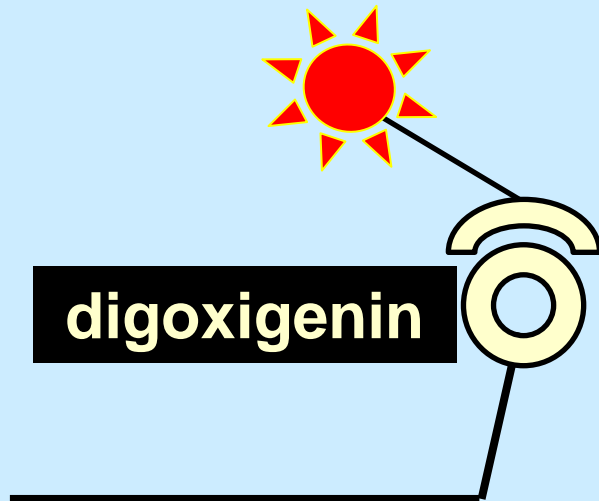
3' - koncové značení



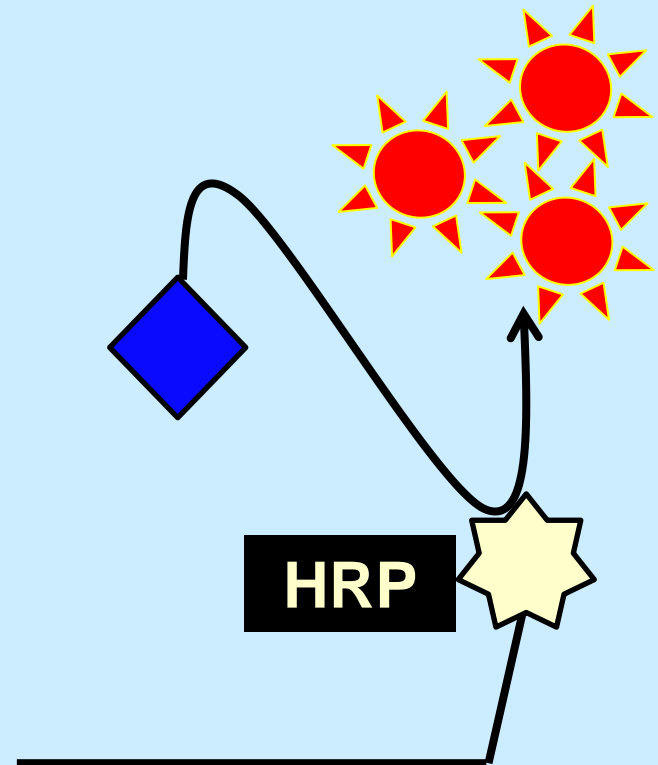
Jak označit sondu?

Nepřímé značení

Reportérová molekula

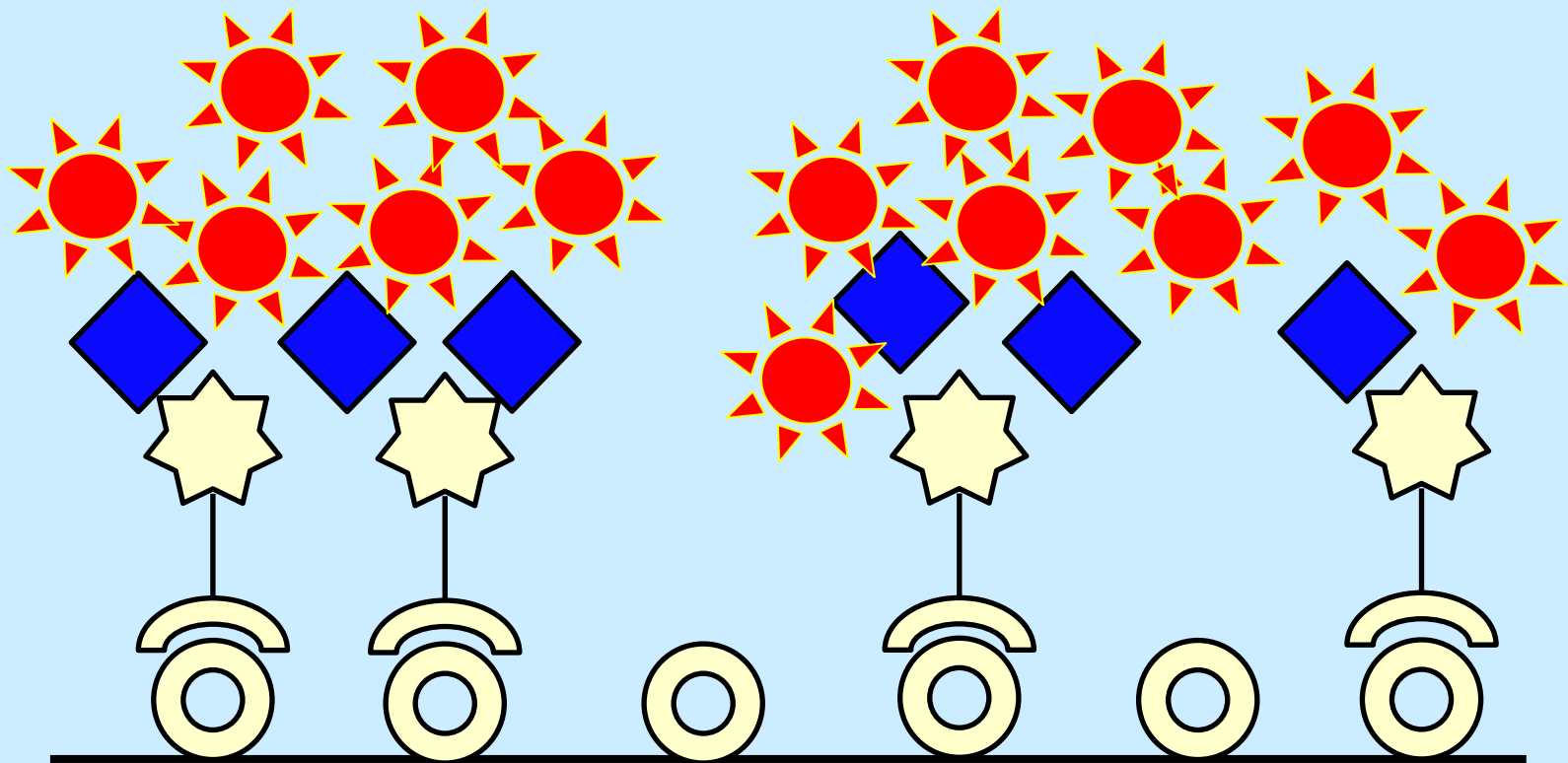


Značení enzymem



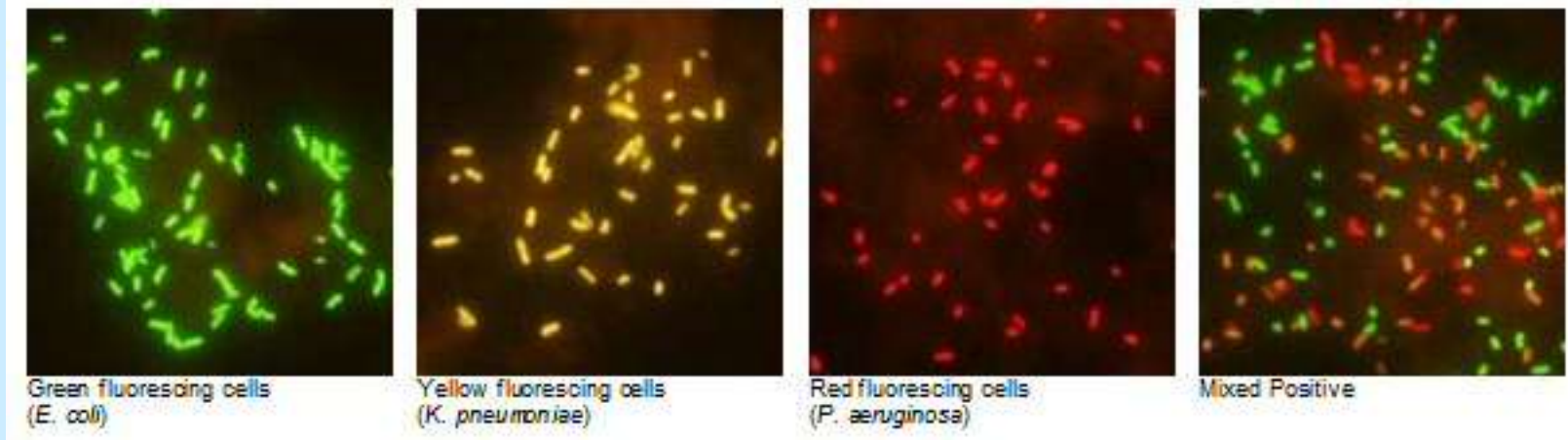
Jak označit sondu?

Nepřímé značení – polyribonukleová sonda



Dvě hlavní oblasti využití FISH v mikrobiologii

- **Analýza vzorků potravin**
- **Studium biofilmů**



Varianty FISH

- ACM-FISH
- armFISH
- CARD-FISH
- catFISH
- CB-FISH
- CO-FISH
- COBRA-FISH
- COD-FISH
- COMBO-FISH
- Comet-FISH
- Cryo-FISH
- D-FISH
- DBD-FISH
- e-FISH
- Fiber-FISH
- Flow-FISH
- Fusion-Signal FISH
- Halo-FISH
- Harlequin-FISH
- Immuno-FISH
- LNA-FISH
- M-FISH
- ML-FISH
- PCC-FISH
- PNA-FISH
- Q-FISH
- QD-FISH
- Rainbow-FISH
- Raman-FISH
- ReD-FISH
- Reverse-FISH
- RING-FISH
- RNA-FISH
- RxFISH
- Split-Signal FISH
- T-FISH
- 3-D FISH
- Zoo-FISH

Další čtení



Bottari B (2006): Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol (2006) 73:485–494

<http://www.nottingham.ac.uk/biosciences/divisions/food/research/projects/foodmicrobiology.aspx>

<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1431h22.php>

Vybrané aplikace hybridizačních technik v mikrobiologii

- **Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)**
- **Ribotypizace**
- **Metoda reverzní hybridizace**
- **Metoda spoligotypizace**

***A více se dozvíte v
5. ročníku***



Shrnutí

- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**