

Obrázek 8.1: Příklad sekvenace tetrapeptidu Ala-Thr-Gly-Cys pomocí hmotnostní spektrometrie. Vlevo nahoře je znázorněn vznik různých fragmentů s nábojem (+1), vpravo nahoře přehled fragmentů, které mohou vzniknout štěpením jedné vazby našeho tetrapeptidu. Dole je zjednodušené spektrum s vyhodnocením rozdílů hmotností. Signál celého peptidu je znázorněn černě, fragmenty jsou obarveny podle schematu vpravo nahoře.

aminokyselin. Odlišení přibližně izobarických<sup>4</sup> aminokyselin (lysin a glutamin) vyžaduje velmi vysoké rozlišení, zatímco izomerní aminokyseliny (leucin a isoleucin) není možné odlišit bez detailního studia fragmentace postranních řetězců.

Hmotnostní spektrometry detekují pouze nabitě částice (ionty). Dojde-li ke štěpení peptidového řetězce s nábojem +1, může kladný náboj zůstat buď na *N*-koncové části peptidu (takový štěp se označuje písmenem *b*), nebo na *C*-koncové části (štěp *y*). Analýza spekter je navíc komplikována tím, že ke štěpení hlavního řetězce může docházet nejen v místě peptidové vazby, ale i mezi uhlíky (vznikají štěpy *a* a *x*) nebo mezi dusíkem a  $\alpha$ -uhlíkem (vznikají štěpy *c* a *z*). Určování sekvenace proteinů je proto často založeno na počítačovém vyhodnocení spekter, které může zahrnovat všechny uvedené komplikace. Příklad sekvenace krátkého peptidu (Ala-Thr-Gly-Cys) je ukázán na obrázku 8.1.

Sekvenace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie je užitečná i v případech, kdy je známá sekvenace DNA (gen proteinu). Pokud totiž dochází k *posttranslačním modifikacím* proteinu (viz sekci 2.2), lze tyto modifikace z rozdílů hmotností odhalit.

## 8.2 Sekvenace nukleových kyselin

Sekvenace nukleových kyselin je založena na přípravě vzorku obsahujícího směs oligonukleotidů s jedním koncem stejným ale lišící se délkou. Taková směs je pak analyzována elektroforeticky. Podmínky tvorby

<sup>4</sup>Jako izobary se označují částice se stejnou hmotností. Pokud bychom předpokládali, že hmotnost atomu uhlíku je přesně dvanáctkrát větší než hmotnost atomu vodíku, hmotnost atomu dusíku je přesně čtrnáctkrát větší než hmotnost atomu vodíku a hmotnost atomu kyslíku je přesně šestnáctkrát větší než hmotnost atomu vodíku, byly by lysin a glutamin izobary. Protože se poměry hmotností atomů nepatrně liší od uvedených poměrů a protože lysin a glutamin obsahují různé počty atomů jednotlivých prvků, hmotnosti lysinu a glutaminu se mírně liší.

směsi oligonukleotidů musí být zvoleny tak, aby v nich byly zastoupeny všechny délky. Výsledné elektroferogramy mají tvar žebříčků, ve kterých oligonukleotidy lišící se o délku jednoho rezidua mají dráhu, kterou urazí v gelu (nebo čas elektroforézy v kapiláře), odlišnou o dobře definovaný rozdíl. Vhodnou směs nukleotidů lze vytvořit buď částečným odbouráním nebo neúplnou syntézou. Obě možnosti budou popsány níže.

V principu lze pro sekvenaci nukleových kyselin použít hmotnostní spektrometrii jako u proteinů. V současné době je ale toto použití spíše výjimkou (níže popsaná enzymová sekvenace umožňuje určit sekvenci délky několika stovek nukleotidů, zatímco hmotnostní spektrometrie je limitována několika desítkami). Pokud potřebujeme zkoumat delší úseky nukleových kyselin, připravíme kratší překrývající se štěpy pomocí specifických endonukleas, podobně jako u proteinů.

### 8.2.1 Chemická metoda Maxama a Gilberta

Při sekvenaci nukleových kyselin chemickou (odbourávací) metodou je nejprve třeba označit jeden konec vlákna, například 5'-konec radioaktivním fosforem  $^{32}\text{P}$ . Poté potřebujeme čtyři chemické reakce, které přeruší vlákno v místech jednotlivých bází. Pro přerušení vlákna na pyrimidinech se používá štěpení pyrimidinového kruhu hydrazinem. Reaktivita bází klesá v pořadí uracil > cytosin > thymin, takže v případě sekvenování DNA lze zvolit podmínky, za kterých je štěpen cytosin i thymin nebo pouze cytosin (reakce thyminu je potlačena v přítomnosti 2M NaCl). V přítomnosti piperidinu pak dochází k selektivní hydrolyze fosfoesterové vazby nukleotidu s odbouraným pyrimidinovým kruhem. Při štěpení na purinech se nejprve báze methylojí dimethylsulfátem. Guanin se methyloje na dusíku 7, zatímco adenin se methyloje na dusíku 3. Hydrolyzou v zásaditém prostředí se přednostně štěpí *N*-glykosidická vazba s *N*7-methylguaninem, zatímco v kyselém prostředí se odštěpuje guanin i adenin. Fosfoesterová vazba se pak hydrolyzuje alkalicky při 90 °C. Popsané reakce se provádějí za podmínek zvolených tak, aby se každé analyzované vlákno štěpilo v průměru pouze jednou (pochopitelně na různém místě). Vzniknou tak čtyři sady radioaktivně značených oligonukleotidů, které při elektroforéze vytvoří žebříčky (obrázek 8.2), jejichž porovnáním lze snadno odečíst sekvenci studovaného vlákna DNA. Popsaná metoda je vzhledem ke své pracnosti používána málo, lze ji však přizpůsobit například výskytu nestandardních bází, kde selhává níže popsaná dideoxymetoda.

### 8.2.2 Enzymová neboli dideoxymetoda (Sangerova)

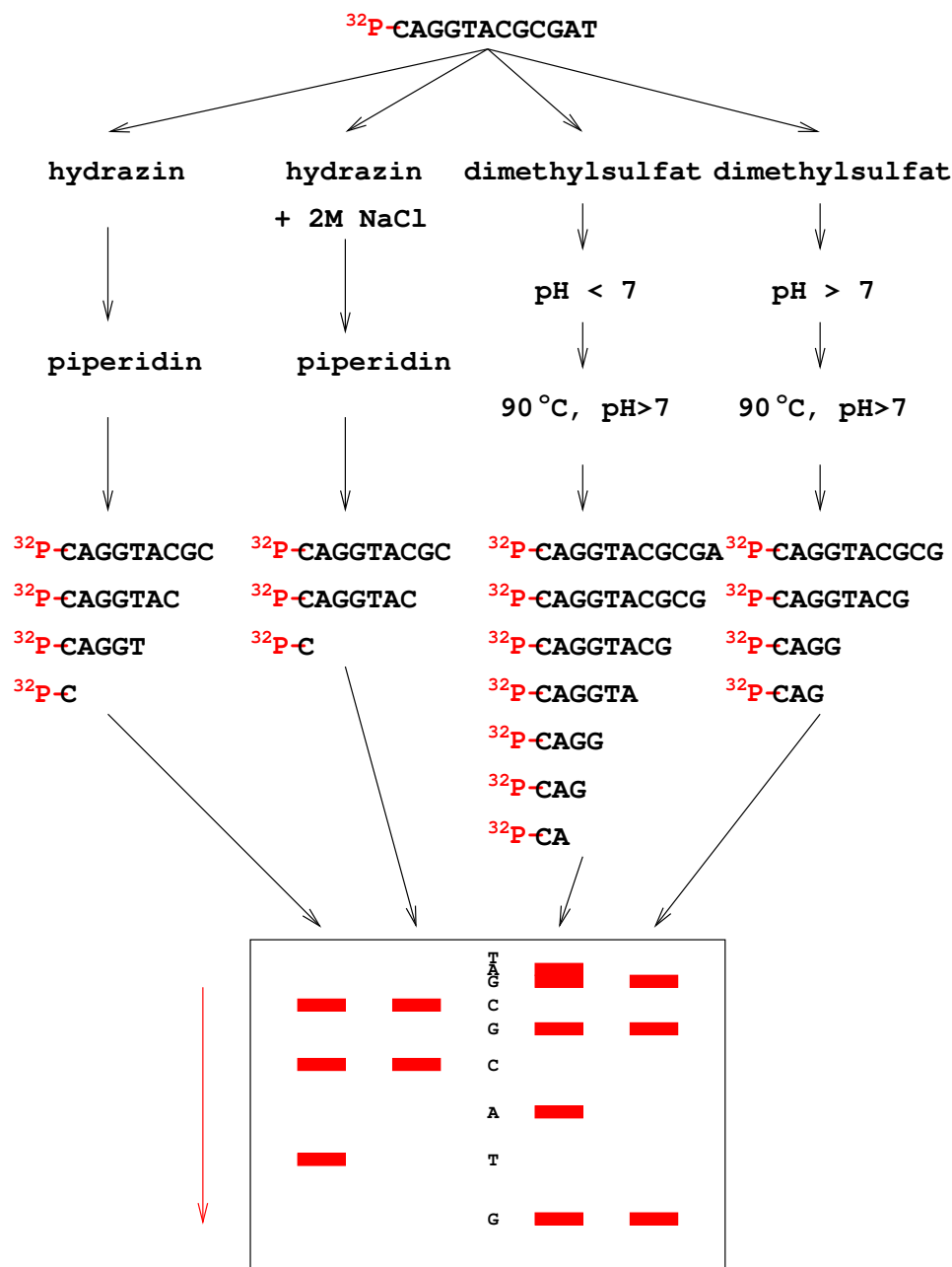
V současnosti je nejběžnější metoda sekvenace DNA založená na enzymové syntéze oligonukleotidů, ve které sekvenovaný oligonukleotid slouží jako *templát*. Přídavkem vhodného množství dideoxyanalogů trifosfátů, ze kterých je oligonukleotid sekvenován (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) je zajištěno náhodné předčasné ukončení syntézy oligonukleotidů<sup>5</sup> (tedy tvorba žebříčku v elektroferogramu, jak je ukázáno na obrázku 8.3). Sekvence, kterou při dideoxymetodě čteme, není sekvencí vlákna DNA použité jako templát, ale sekvencí komplementárního vlákna. Čtená sekvence tedy odpovídá již sekvenci mRNA, podle které se syntetizuje protein.

K dideoxyanalogům bývá navíc vázána nějaká fluoreskující sloučenina, kterou lze při elektroforéze snadno a citlivě detekovat. Pokud použijeme různé fluorescenční značky pro ukončení na jednotlivých bázích (G, A, T, C), můžeme sekvenaci provádět v jedné zkumavce. Obrázek 8.4 ukazuje, jak vypadá výsledek sekvenace s použitím fluorescenčních značek a dělením pomocí elektroforézy v kapiláře.

## 8.3 Sekvenace oligosacharidů

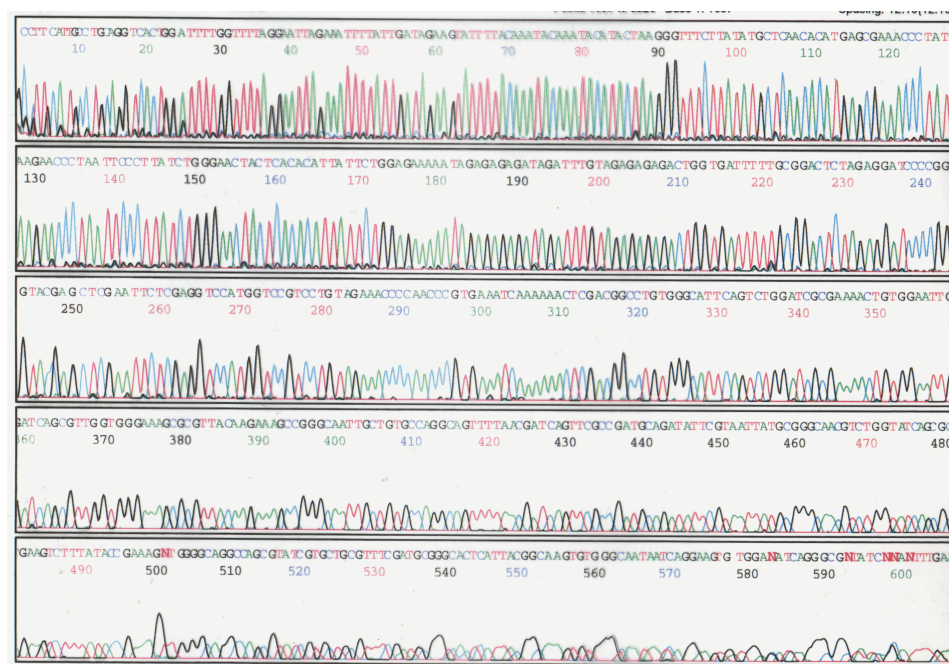
Sekvence oligosacharidů se většinou provádí pomocí hmotnostní spektrometrie. Často se kombinuje použití enzymů štěpících glykosidickou vazbu (glykosidas) specifických pro různé sacharidy a typy gly-

<sup>5</sup>Dideoxyanalog postrádá hydroxyl v poloze 3'. Proto po jeho zabudování nemůže dojít k dalšímu prodlužování řetězce.



Obrázek 8.2: Princip chemické metody Maxama a Gilberta. Ve spodní části obrázku je schematicky znázorněna poloha radioaktivních proužků na gelu, ve kterém byly elektroforézou rozděleny fragmenty vzniklé v jednotlivých reakcích. Šipka vlevo udává v jakém směru oligonukleotidy putovaly během elektroforézy.





Obrázek 8.4: Výstup automatického sekvenátoru využívajícího fluorescenční značky. Obrázek ukazuje záznam čtyř fluorescenčních detektorů, které snímají fluoreskující oligonukleotidy vycházející z elektroforetické kapiláry. Červeně je značen signál fluoroforu navázaného na ddTTP, modře na ddCTP, zeleně na ddATP, černě na ddGTP (obrázek poskytl Laboratoř molekulární fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty MU v Brně).